

経常研究

保存性向上を目的とした乳酸菌の選抜・培養に関する調査研究

筒井 達也* 郡司 崇浩*

Study on the Selection and Cultivation of Lactic Acid Bacteria
to Improve Food Preservation
TSUTSUI Tatsuya and GUNJI Takahiro

県内発酵食品の保存性向上と製品の差別化を目的として、抗菌性を有し、かつオフフレーバー生成が少ない有用菌株の選抜を目指し、県内食品資源から分離したセンター保有乳酸菌 46 株を対象に抗菌性試験及び香り特性評価を実施した。MRS 培地で培養した乳酸菌上清は枯草菌及び大腸菌に対して抗菌活性を示したが、多くは中和処理により消失し、乳酸菌が産生する有機酸由来の酸依存的作用であることが示された。一方、*L. plantarum* を中心とする一部菌株では中和後も弱い抗菌活性が確認され、酸以外の抗菌因子の関与が示唆された。これら抗菌活性を示した菌株では、GC-MS 分析によりジアセチルが検出あるいは麴エキス培養試料の官能評価における乳様臭や硫黄臭などのオフフレーバーが確認されたことから、強い抗菌活性とオフフレーバーの発生が少ないという条件を同時に満たす菌株は保有株から見出すことができなかった。

Key words: 乳酸菌、抗菌活性、香り特性、官能評価、保存性向上

1 はじめに

近年、県内の発酵食品製造企業においては、商品の高付加価値化や他社との差別化を図るため、地域資源由来の微生物を活用した製品開発への関心が高まっている。一方、清酒、クラフトビール、漬物、味噌などの製造現場では、発酵に使用する有用菌の制御に加え、汚染菌の混入防止や増殖抑制などが課題となっている。このため、食品添加物への依存を低減し、微生物の機能を活用して保存性を向上させる技術の確立が求められている。

乳酸菌は、有機酸を産生して pH を低下させることにより微生物の増殖を抑制することが知られている。さらに、一部の菌株ではバクテリオシンなどの抗菌性代謝物を産生することが報告されており¹⁾、これらの機能を活用することで、発酵工程における汚染菌抑制や製品の保存性向上への応用が期待される。しかしながら、乳酸菌は乳様臭や硫黄臭などの香り成分を産生する場合があります^{2)、3)}、食品の品質に影響を及ぼす可能性がある。そのため、保存性向上効果と香り特性の両面から菌株を評価することが求められる。

そこで本研究では、県内食品資源から分離し、当センターが保有する乳酸菌 46 株を対象に、抗菌活性と香り特性を体系的に評価することで、汚染菌に対して抗菌性を有し、かつオフフレーバー生成が少ない有用菌株の選

抜を目指し、検討を行った。

2 研究の方法

2. 1 乳酸菌

供試菌株には、当センターが酒母や糠床等といった県内食品資源から分離・同定し、保存している乳酸菌 46 株を用いた(表 1)。各菌株は使用前に MRS 液体培地(Becton, Dickinson and Company 社製 BD Difco Lactobacilli MRS Broth)で前培養し、得られた菌体を試験に供した。対照として市販乳酸菌 2 株(*Latilactobacillus sakei*、*Leuconostoc mesenteroides*)も同様に前培養後、試験に供した。

表 1 乳酸菌の菌種別内訳

属	菌種	株数
<i>Latilactobacillus</i>	<i>L. sakei</i>	15
	<i>L. mesenteroides</i>	13
<i>Leuconostoc</i>	<i>L. lactis</i>	3
	<i>L. citreum</i>	4
<i>Lactiplantibacillus</i>	<i>L. plantarum</i>	6
<i>Pediococcus</i>	<i>P. pentosaceus</i>	2
<i>Weissella</i>	<i>W. cibaria</i>	2
<i>Enterococcus</i>	<i>E. faecium</i>	1

* 栃木県産業技術センター 食品技術部

2. 2 汚染指標菌

抗菌性評価の対象菌として、食品製造現場において問題となる代表的な5つの汚染菌を選択した。具体的には、枯草菌 (*Bacillus subtilis* NBRC111470)、大腸菌 (*Escherichia coli* NBRC3301)、火落菌2株 (*Lactobacillus paracasei*、*Lactobacillus fructivorans* RIB No. 9114)、及び乳酸菌 (*Leuconostoc mesenteroides* subsp. *dextranicum* NBRC100495) を汚染指標菌として用いた。

枯草菌、大腸菌及び乳酸菌は、独立行政法人製品評価技術基盤機構 (NITE) より入手した菌株を使用した。火落菌のうち *Lactobacillus fructivorans* は独立行政法人酒類総合研究所より分譲を受けた菌株を用い、*Lactobacillus paracasei* は、当センターが過去に県内酒蔵より分離し保存している菌株を使用した。

枯草菌及び大腸菌は BHI 培地 (Becton, Dickinson and Company 社製 BD BBL Brain Heart Infusion Agar Medium)、火落菌は SI 培地 (公益社団法人日本醸造協会製 火落菌検出培地)、乳酸菌は MRS 培地 (Becton, Dickinson and Company 社製 BD Difco Lactobacilli MRS Broth) を用いて培養した。

2. 3 抗菌性試験

各乳酸菌株を MRS 液体培地 10 mL に接種し、30℃で 48 時間静置培養した。培養後、12,000 rpm で 10 分間遠心分離し、上清を回収した。回収した培養上清は、上清そのものおよび 1 N NaOH (富士フイルム和光純薬(株)) を用いて pH7.0 に中和した上清を調製し、抗菌性試験に供した。

抗菌性試験は、ステンレスカップを用いた寒天重層法により実施した。基本操作は、Ishiyama ら (2008) の方法を参考に一部改変して行った⁴⁾。枯草菌及び大腸菌には BHI 培地、火落菌には SI 培地、乳酸菌には MRS 培地を用い、下層寒天培地は寒天濃度 1.5%、上層寒天培地は 1.0% に調製した。下層寒天培地上に汚染指標菌 ($10^4 \sim 10^5$ cfu/mL) を含む上層寒天を重層し平板を作製した後、平板表面に内径 6 mm のステンレスカップを設置し、カップ内に乳酸菌培養上清 50 μ L を滴下した。30℃で 48 時間 (火落菌のみ増殖が遅いため 168 時間) 培養後、発育阻止円 (クリアゾーン) の形成状況を観察した。

標準物質としてはナイシン (from *Lactococcus lactis*, N5764; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, USA) を用いた。ナイシンは 0.02 N HCl 水溶液に溶解し、最終濃度が 10、100、1,000 及び 5,000 Units/mL となるよう調製し、カップ内に滴下・培養後、発育阻止円の直径 (mm) を測定した。

2. 4 香気特徴の評価

2. 4. 1 機器分析

香りは DHS-GC/MS 法により測定した。各乳酸菌株を MRS 液体培地を用いて 30℃で 48 時間培養し、得られた培養上清 0.5 mL を 20 mL 容バイアルに封入した。25℃で 5 分間加温して発生する揮発性成分を Carboxpack B&X チューブに捕集し、加熱脱着装置 (Gerstel(株), TDU2) を用いて吸着管を加熱脱着し、揮発性成分を GC/MS (アジレント・テクノロジー(株), Agilent 5977B) に導入し分析した。分析条件は表 2 に示す。

表 2 DHS-GC/MS の分析条件

TDU	30℃ (0.3min) → 720℃/min → 240℃ (3 min)
CIS	10℃ (0.5min) → 12℃/min → 240℃ (20 min)
トランスファー ライン温度	300℃
キャリアガス	He 1.6768 mL/min
注入モード	splitless
カラム	DB-WAX (30 m × 0.25 mm × 0.25 μ m)
オープン温度	40℃ (5min) → 10℃/min → 240℃ (10 min)
イオン源温度	230℃
四重極温度	150℃
イオン化モード	EI

得られたガスクロマトグラムについて、Aroma Office 2D (Gerstel 製) を用いてにおいを有する化合物を抽出し、各ピーク面積値の平均値を算出した。硫黄臭の指標成分としてジメチルジスルフィド (DMDS)、乳様臭の指標成分としてジアセチルを対象とし、内部標準物質としてベンジルアルコール (富士フイルム和光純薬(株)製、和光特級、純度 99.0%以上) を添加してピーク面積比により相対定量を行った。

2. 4. 2 官能評価

官能評価用試料は、麴エキス (Brix 12%) 10 mL に乳酸菌培養液を 1% (v/v) 添加し、30℃で 48 時間培養して調製した。評価はセンター職員 4 名により実施し、酸臭、硫黄臭及び乳様臭の強度を、0 (感じない)、1 (弱く感じる)、2 (感じる)、3 (強く感じる) の 4 段階で評価した。各評価項目について平均値を算出し、菌株間の香気特性の違いを比較した。

3 結果及び考察

3. 1 抗菌性試験

3. 1. 1 ナイシンによる基準試験

標準物質として用いたナイシンによる発育阻止円の様子 (*B. subtilis* の例) を図 1 に、ナイシンの各汚染指標菌に対する抗菌活性と発育阻止円の結果を表 3 及び図 2 に示す。ナイシン濃度の増加に伴い、各汚染指標菌

に対する発育阻止円の大きさ（直径）は拡大した。抗菌効果の強さ及び感受性は菌種ごとに異なり、特に枯草菌（*Bacillus subtilis*）、火落菌（*Lactobacillus fructivorans*）及び乳酸菌（*Leuconostoc mesenteroides*）では明瞭な濃度依存性が確認された。これらの汚染指標菌では、ナイシン濃度（対数プロット）と発育阻止円の直径との間に線形関係が見られた。一方、火落菌（*Lactobacillus paracasei*）では阻止円の形成が不十分であり、感受性は比較的低い傾向を示した。

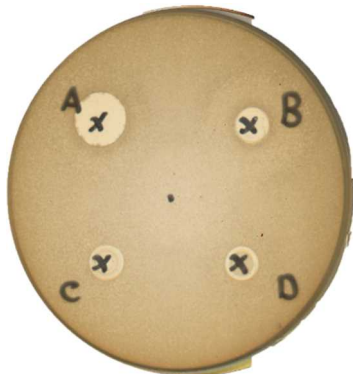


図1 ナイシンによる発育阻止円の様子
 (*B. subtilis* の例)

ナイシン濃度はそれぞれ 5,000 Units/mL (左上)、1000 Units/mL (右上)、100 Units/mL (左下)、10 Units/mL (右下)

表3 ナイシンの各汚染指標菌に対する抗菌活性

汚染指標菌	ナイシン濃度 (Units/mL)			
	10	100	1,000	5,000
<i>B. subtilis</i>	0	6.2	9.0	13.3
<i>E. coli</i>	0	0	8.6	11.8
<i>L. paracasei</i>	0	0	0	5.3
<i>L. fructivorans</i>	0	12.0	24.3	34.7
<i>L. mesenteroides</i>	0	6.8	13.1	16.8

「0」はステンレスカップ内に汚染指標菌の増殖が見られたもの。表中の数値は発育阻止円の大きさ（直径 mm）を示す。

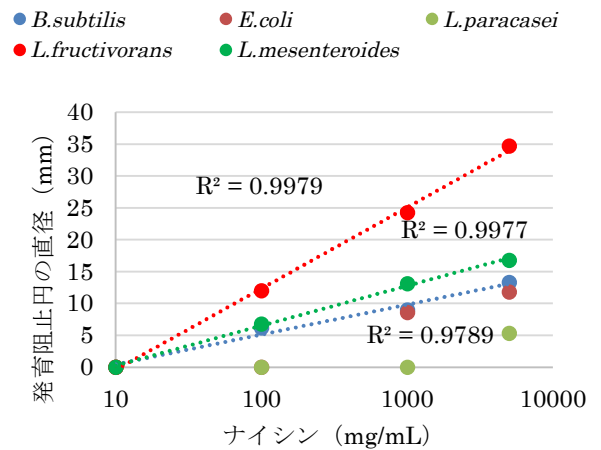


図2 ナイシン濃度と発育阻止円の相関

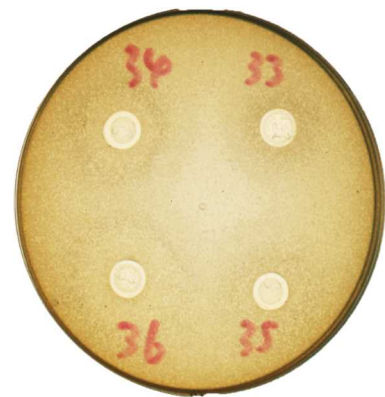


図3 乳酸菌培養液によるクリアゾーンの様子
 (*B. subtilis* の例)

右上：活性あり「+」 左上、左下、右下：活性なし「-」

3. 1. 2 乳酸菌培養上清の抗菌性

乳酸菌培養上清を滴下した際のクリアゾーンの様子（*B. subtilis* の例）を図3に示す。活性が認められない試料では、ステンレスカップ内に汚染指標菌の増殖が観察された。一方、活性が認められた試料では、カップ外に明瞭な抗菌円は形成されなかったものの、カップ内の増殖は抑制された。このため、本試験では発育阻止円の大きさによらず、ステンレスカップ内の増殖抑制が観察された試料を抗菌活性あり（+）、観察されない試料は抗菌活性なし（-）と評価することとした。

乳酸菌培養上清の汚染指標菌に対する抗菌活性の結果を表4に示す。枯草菌及び大腸菌など至適 pH が中性付近の汚染指標菌に対しては、一部の菌株で抗菌活性が認められた。一方、火落菌及び乳酸菌など酸性環境に適応した菌に対しては、いずれの試料でも明確な抗菌活性は認められなかった。

3. 1. 3 中和後培養上清の抗菌性試験

E. coli を例とした中和処理前後のクリアゾーンの様子を図4に示す。中和による活性変化から酸依存性の有無を評価した。上段及び下段はそれぞれ同一試料であり、シャーレの左側が中和処理前、右側が中和処理後を示す。抗菌活性は「+（活性あり）」、「±（弱い活性）」、「-

「-（活性なし）」の3段階で評価した。両試料とも中和前（左側）では抗菌活性が認められているが、中和後（右側）は、下段試料では汚染指標菌の増殖が確認され活性は認められなかった（-）。これに対し、上段試料では増殖が一部抑制され、弱い活性（±）が認められた。

表4 乳酸菌培養上清の各汚染指標菌に対する抗菌活性

No.	菌種	枯草菌 <i>B. subtilis</i>	大腸菌 <i>E. coli</i>	火落菌 <i>L. paracasei</i>	火落菌 <i>L. fructivorans</i>	乳酸菌 <i>L. mesenteroides</i> subsp. <i>dextranicum</i>
1	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
2	<i>L. sakei</i>	-	+	-	-	-
3	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
4	<i>L. sakei</i>	-	+	-	-	-
5	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
6	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
7	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
8	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
9	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
10	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
11	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
12	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
13	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
14	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
15	<i>L. sakei</i>	-	+	-	-	-
16	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
17	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
18	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
19	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
20	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
21	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
22	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
23	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
24	<i>L. mesenteroides</i>	+	+	-	-	-
25	<i>L. mesenteroides</i>	+	+	-	-	-
26	<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-
27	<i>L. mesenteroides</i>	-	-	-	-	-
28	<i>L. mesenteroides</i>	-	+	-	-	-
29	<i>L. plantarum</i>	+	+	-	-	-
30	<i>L. plantarum</i>	+	+	-	-	-
31	<i>L. plantarum</i>	+	+	-	-	-
32	<i>L. plantarum</i>	+	+	-	-	-
33	<i>L. plantarum</i>	+	+	-	-	-
34	<i>L. plantarum</i>	+	+	-	-	-
35	<i>L. citreum</i>	-	+	-	-	-
36	<i>L. citreum</i>	+	+	-	-	-
37	<i>L. citreum</i>	+	+	-	-	-
38	<i>L. citreum</i>	+	+	-	-	-
39	<i>L. lactis</i>	-	+	-	-	-
40	<i>L. lactis</i>	-	+	-	-	-
41	<i>L. lactis</i>	+	+	-	-	-
42	<i>P. pentosaceus</i>	+	+	-	-	-
43	<i>P. pentosaceus</i>	-	+	-	-	-
44	<i>W. cibaria</i>	-	+	-	-	-
45	<i>W. cibaria</i>	-	+	-	-	-
46	<i>E. faecium</i>	-	-	-	-	-
Ref. 1	<i>L. sakei</i>	+	+	-	-	-
Ref. 2	<i>L. mesenteroides</i>	+	+	-	-	-

「+」：活性あり、「-」：活性なし

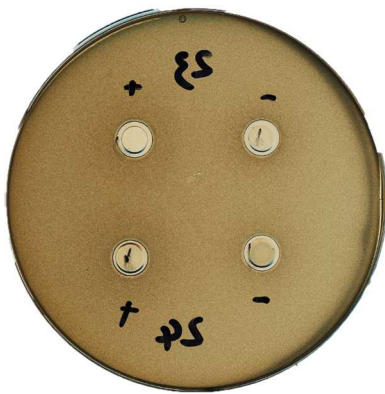


図4 中和処理前後のクリアゾーンの様子
(*E. coli* の例)

左上：活性あり「++」（中和前）、右上：弱い活性あり「+-」（中和後）、左下：活性あり「++」（中和前）、右下：活性なし「-」（中和後）

多くの菌株では、中和前に確認された抗菌活性が中和後には消失した。この結果から、本試験で認められた抗菌活性の多くは、乳酸菌が産生した有機酸による pH 低下に起因する酸依存的な作用と考えられる。

一方、*Lactobacillus plantarum* を中心とする一部の菌株では、中和後も弱い抗菌活性が残存した。これらの菌株では、有機酸以外の抗菌因子（バクテリオシンなど）の関与が示唆された。

なお、枯草菌に対しては抗菌活性が認められたにもかかわらず、大腸菌では活性が認められなかった試料が見られたが、これは大腸菌がグラム陰性菌で外膜構造を有するためグラム陽性菌である枯草菌と比較して有機酸以外の抗菌因子の影響を受けにくいことによるものと考えられた。

3. 2 香気特性

乳酸菌株について、GC-MS による揮発性成分分析及び官能評価を実施した。GC-MS 分析では、内部標準補正後の各香気成分ピーク面積を全株平均値で除した相対比率（%）を算出し、「++（300%以上）」、「+（150～300%）」、「-（検出せず）」の区分で整理した。官能評価は 0～3 の 4 段階で実施し、平均値 1.5 以上 2.0 未満を「+」、2.0 以上を「++」として整理した。

3. 2. 1 供試乳酸菌株の香気特性

乳酸菌 48 株について、乳酸菌培養上清の香気特性結果を表 5 に示す。GC-MS 分析の結果、DMDS は一部の *L. sakei* 及び *L. mesenteroides* 等の菌株で検出された。一方、ジアセチルは主に *L. plantarum* において強く認められた。

官能評価では、酸臭は多くの菌株に共通して認められたが、硫黄臭及び乳様臭は菌株間で差がみられた。DMDS が検出された菌株では硫黄臭が指摘される傾向が見られ、ジアセチルを生成する菌株では乳様臭が認められた。特に *L. plantarum* では乳様臭が顕著であった。

硫黄臭が強く指摘された一部の菌株では DMDS が相対的に高濃度で検出されたが、DMDS が低値であっても硫黄臭が指摘された例も認められた。これは、硫黄系化合物の嗅覚閾値が低いこと、あるいは他の揮発性成分や酸臭との相互作用が影響した可能性が考えられる。

なお、本研究では GC-MS 分析には MRS 培地培養試料を、官能評価には麴エキス培養試料を用いており、培地条件は一致していない。しかしながら、両者の傾向は概ね対応しており、菌株固有の香気生成特性が反映されたものと考えられる。

3. 2. 2 抗菌活性保持菌株の香気特性とその課題

中和後にも弱い抗菌活性を示した菌株（No. 24、No. 29～34）の香気特性については、表 5 のデータに基づき評価した。

No. 29～34 の *L. plantarum* では、GC-MS 分析においてジアセチルが「+～++」と検出され、官能評価においても乳様臭が「+～++」と確認された。

一方、No. 24 の *L. mesenteroides* では、GC-MS 分析においてジアセチルと DMDS が弱いながらも検出されたものの、官能評価においては乳様臭は認められず、硫黄臭は「+」と評価された。

以上より、汚染菌に対する抗菌性を有し、かつオフフレーバー生成が少ない乳酸菌株の選抜を目的として実施したものの、残念ながら供試した菌株からはこれらを同時に満たすものは確認されなかった。しかしながら、抗菌性の判別と、GC-MS 及び官能評価による香気特性解析を組み合わせた本手法は、今後の抗菌活性を有する乳酸菌の食品利用に向けたスクリーニング手法として有用と考えられる。

4 おわりに

本研究では、県内食品資源由来の乳酸菌 46 株を対象に、抗菌活性及び香気特性の両面から有用菌株の選抜を目指して検討を行った。その結果、以下の知見が得られた。

- (1) 枯草菌及び大腸菌など至適 pH が中性付近の汚染指標菌に対しては、一部の菌株で抗菌活性が確認された。一方、火落菌及び乳酸菌など酸性環境に適応した菌に対しては、明確な抗菌活性は認められなかった。

表 5 乳酸菌培養上清の香気特性

No.	菌種	GC-MS 分析※ ¹		官能評価※ ²		
		DMDS	ジアセチル	酸臭	硫黄臭	乳様臭
1	<i>L. sakei</i>			+	+	+
2	<i>L. sakei</i>			+		
3	<i>L. sakei</i>			+	+	
4	<i>L. sakei</i>		—	+	+	
5	<i>L. sakei</i>					
6	<i>L. sakei</i>	+			++	
7	<i>L. sakei</i>			++	+	
8	<i>L. sakei</i>			++		
9	<i>L. sakei</i>			++		
10	<i>L. sakei</i>			+	+	+
11	<i>L. sakei</i>					
12	<i>L. sakei</i>					+
13	<i>L. sakei</i>					
14	<i>L. sakei</i>	+	+		+	+
15	<i>L. sakei</i>	+		+	+	
16	<i>L. mesenteroides</i>	++		+	++	
17	<i>L. mesenteroides</i>			+	+	
18	<i>L. mesenteroides</i>			+	+	
19	<i>L. mesenteroides</i>		—	+	+	
20	<i>L. mesenteroides</i>				+	
21	<i>L. mesenteroides</i>			+	++	
22	<i>L. mesenteroides</i>	+		++	+	
23	<i>L. mesenteroides</i>	+		++	+	
24	<i>L. mesenteroides</i>			+	+	
25	<i>L. mesenteroides</i>		+	++		+
26	<i>L. mesenteroides</i>			+	++	
27	<i>L. mesenteroides</i>				+	
28	<i>L. mesenteroides</i>					
29	<i>L. plantarum</i>		++	++		++
30	<i>L. plantarum</i>		+	+		+
31	<i>L. plantarum</i>		++			+
32	<i>L. plantarum</i>		++	+	+	+
33	<i>L. plantarum</i>		++	++	++	++
34	<i>L. plantarum</i>		++	+		+
35	<i>L. citreum</i>	+	—	+	++	
36	<i>L. citreu</i>			++		
37	<i>L. citreum</i>			++		
38	<i>L. citreum</i>			++		
39	<i>L. lactis</i>		—	+		
40	<i>L. lactis</i>			+	+	+
41	<i>L. lactis</i>		+	+	++	++
42	<i>P. pentosaceus</i>					
43	<i>P. pentosaceus</i>	+		++	++	+
44	<i>W. cibaria</i>		—	+	++	
45	<i>W. cibaria</i>			+		
46	<i>E. faecium</i>	+	+		++	+
47	<i>L. sakei</i>		++		++	+
48	<i>L. mesenteroides</i>		—		+	

※1 GC-MS による香気成分の評価は、内部標準補正後の各成分のピーク面積値を全供試菌株の平均値で除して相対比率(%)を算出し、以下の基準で区分した。

「++」: 300%以上、「+」: 150%以上 300%未満、150%未満は空欄、検出されなかった場合は「—」とした。

※2 官能評価は「0: 感じない、1: 弱く感じる、2: 感じる、3: 強く感じる」の4段階で実施し、各評価の平均値に基づき以下の基準で表示した。

平均値 1.5 未満は空欄、1.5 以上 2.0 未満は「+」、2.0 以上は「++」とした。

- (2) 抗菌活性を示した多くの菌株では、培養上清を pH7.0 に中和することで抗菌活性が消失したことから、本研究で確認された抗菌作用の主体は、乳酸菌が産生した有機酸による pH 低下に起因する酸依存的作用であると考えられた。
- (3) *Lactobacillus plantarum* を中心とする一部菌株では、中和後も弱い抗菌活性が残存し、有機酸以外の抗菌因子（バクテリオシン様物質等）の関与が示唆された。
- (4) GC-MS 分析及び官能評価の結果、中和後に抗菌活性を示した菌株の一部ではジアセチルや DMDS の生成が確認され、乳様臭や硫黄臭などのオフフレーバーが認められた。
- (5) 本研究の範囲では、強い抗菌活性とオフフレーバーの発生が少ないという条件を同時に満たす菌株は確認されなかったが、抗菌活性の判別（中和試験）と GC-MS 及び官能評価による香気特性解析を組み合わせた本評価法は、抗菌活性を有する乳酸菌の食品利用に向けたスクリーニング手法として有用であると考えられる。

謝 辞

本研究の実施にあたり、技術的助言及び御協力を賜りました小山工業高等専門学校 物質工学科 微生物工学研究室 准教授 高屋朋彰 先生に深く感謝申し上げます。

参考文献

- 1) 善藤 威史、石橋 直樹、園元 謙二. “乳酸菌バクテリオシンの探索と利用. 日本乳酸菌学会誌”、25 (1) : 24-33 (2014). DOI:10.4109/jslab.25.24
- 2) 岩佐 悟、飛田 啓輔、吉浦 貴紀. 漬物の発酵に由来する香りの研究（第6報）—乳酸菌の選抜と香気成分の探索. 平成 29 年度研究報告書（第 46 号）、茨城県産業技術イノベーションセンター、（2017）
- 3) 内藤 茂三. 乳酸菌と酵母による食品工場汚染と食品の異臭変敗. におい・かおり環境学会誌 41 (4) : 226-239 (2010). DOI:10.2171/jao.41.226.
- 4) Ishiyama Yohei et al.. Production of bacteriocin by *Staphylococcus* sp. NPSI 38 in Koji Extract Medium with Rice Protein Hydrolyzate and Its Growth-inhibitory Activity against Hiochi-bacteria. Food Sci. Technol. Res., 14 (3) : 239-248 (2008).