

[研 究 報 文]

ワインより分離した乳酸菌の抗菌活性について

柳田藤寿・小林敏樹・篠原 隆

山梨大学大学院医学工学総合研究部・ワイン科学研究センター
〒400-0005 甲府市北新 1-13-1

Antibacterial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Wine

Fujitoshi YANAGIDA, Toshiki KOBAYASHI and Takashi SHINOHARA

Interdisciplinary Graduate School of Medicine and Engineering and The Institute of Enology and Viticulture,
University of Yamanashi
1-13-1 Kitashin, Kofu, Yamanashi 400-0005, Japan

Using the agar well diffusion method, we examined the production of antibacterial substances by 291 lactic acid bacterial strains isolated from red wine in our laboratory from 1990-1995. Among the strains tested, 63 showed weak antibacterial activity against *Escherichia coli* RIFY 5058^T and *Staphylococcus aureus* RIFY 5058^T. We measured the antibacterial activity after neutralizing with NaOH the culture supernatant to remove organic acids produced during the growth of lactic acid bacteria. As a result, there was not the antibacterial activity in all strains. *Oenococcus oeni* 95StMer4-1 strain isolated from a winery in Yamanashi in 1995 showed antibacterial activity comparable to that of *Oenococcus oeni* JCM 6125^T strain. Because this antibacterial activity was not attributable to lactic acid, we determined the reason behind this observation. The fraction that showed antibacterial activity was evaluated by various methods, including digestion with various proteases, such as proteinase K, pepsin, trypsin, and α -chymotrypsin, the heat tolerance test (60°C - 121°C), dialysis examination, ultrafiltration examination (MW 5,000 - MW 50,000) and the dilution test (2 times - 200 times). Results show that the substance responsible for the antibacterial activity was not a bacteriocin or a peptide. The antibacterial activity of *O. oeni* 95StMer4-1 strain is probably attributable to a lysogenic bacteriophage.

Key words : lactic acid bacteria, bacteriocin, wine, *Oenococcus oeni*, phage of lysogenicity

緒 言

乳酸菌の一部はバクテリオシンと称される、ペプチド性またはタンパク質性の抗菌活性物質を生産する。バクテリオシンは一般的に狭い抗菌スペクトルを有し、類縁菌に対してのみ抗菌効力を示すのが特徴である(20)。乳酸菌は長期に渡りヨーグルト、チーズ、酒類、調味食品等の発酵食品と密接に関わり合ってきたことから、そのバクテリオシンは安全性の高いものだと考えられ、広い分野においてその応用が期待されている。

乳酸菌のバクテリオシンに関する研究は、これまでに *Lactobacillus* 属や *Lactococcus* 属を中心に研究が進められてきた。中でも *Lactococcus lactis* subsp. *lactis* の生産する比較的広い抗菌スペクトルを示すバクテリオシンであるナイシンについては、各国で研究が進み、その分子構造、遺伝学的背景や作用機作等についての詳細な報告(7)も数多くなされている。ナイシンは欧米諸国においては既に食品添加物として認可されており、ワイン醸造における MLF 乳酸菌(後述)の生育コントロール因子としての利用や(11, 14, 15)、清酒醸造での火落菌の生育阻害剤としての利用についても検討され

2005年6月8日受理

ている(24)。また、乳酸菌利用に関してバクテリオファージによる生育阻害も考えられている。

乳酸菌はワイン醸造においても重要な役割を果たしている。ワインに重要な酸味を与える各種有機酸のうち、L-リンゴ酸は発酵中や貯蔵中に乳酸菌によるマロラクティック発酵 (MLF) を受け、L-乳酸と炭酸ガスに分解される(13)。これによりワインの酸味が低減されまろやかになると共に微生物学的にも安定化される。さらに MLF による副産物がワインに芳醇な香味を与えることも知られており、赤ワイン及び一部の白ワインに重要な工程である(18, 19)。MLF に関与する乳酸菌としては、*Lactobacillus plantarum*、*Lactobacillus hilgardii* などの桿菌、*Oenococcus oeni* (4) や *Leuconostoc mesenteroides* (8, 22) などの球菌等が挙げられる。その中で主となるのは *Oenococcus oeni* である。

今回、これらの乳酸菌からバクテリオシン生産菌やバクテリオファージを持つ菌株が得られればワイン醸造における汚染菌の抑制や MLF 菌の制御に利用できるものと思われた。そこで本研究室で 1990～1995 年の間に赤ワイン仕込み工程から分離した乳酸菌 291 株について、そのバクテリオシン活性およびバクテリオファージについて調べた。

材料と方法

1 乳酸菌の生産する抗菌活性物質の検索

1) 供試菌株および培養方法 供試菌は当研究室において過去 1990 年度から 1995 年度までの赤ワイン仕込工程中より分離された乳酸菌、*Oenococcus oeni* 135 株、*Lactobacillus plantarum* 94 株、*Leuconostoc mesenteroides* 31 株、*Lactobacillus brevis* 10 株、*Lactobacillus reuteri* 5 株、*Lactobacillus mali* 2 株、*Lactobacillus fermentum* 2 株、*Lactobacillus casei* 1 株、*Lactobacillus hilgardii* 1 株、*Lactobacillus helveticus* 1 株、および種未同定の *Lactobacillus* sp. 5 株、*Leuconostoc* sp. 3 株、ならびに未同定株を 1 株の計 291 株を使用した(23)。これらは、スクリーニングの結果と共に Table 1 に示した。全ての分離乳酸菌の培養には BM 培地を使用した。抗菌活性を検出するための指標菌にはワイン醸造工程中から高頻度に分離される乳酸菌のうち代表的な 3 菌種を選んだ (*Lactobacillus plantarum* NRIC1067^T、*Oenococcus oeni* JCM 6125^T、*Leuconostoc mesenteroides* JCM 6124^T)。これらの培養には、BM 培

地を使用した。また、食中毒に関連のある菌株の中から代表としてグラム陽性細菌の *Staphylococcus aureus* RIFY 5059^T、およびグラム陰性細菌の *Escherichia coli* RIFY 5058^T も供試した。これらの培養には、Nutrient 培地を使用した。

2) バクテリオシンの検索方法 Agar well diffusion 法を用いた(1, 17)。

(1) 試験菌株の処理 活性測定に用いる乳酸菌は、5ml の BM 培地にて、前々培養、前培養 (30°C, 3～4 日間) 後に遠心分離 (3,000rpm, 10min) を行い、菌体を除去した。生成された乳酸および各種有機酸の影響を除くため、上清液を 1N NaOH にて pH6.8±0.1 に調整した。さらに、残存する乳酸菌の菌体の影響を排除するためにメンブランフィルター (0.45 μm) による除菌濾過を行った。一次スクリーニングには、NaOH による pH 調整を行わない培養上清液を用いて検索を行った。

(2) 検定用平板培地の作製 指標菌として用いた細菌はそれぞれ液体培地にて培養した。この培養液 100 μl をそれぞれに適した 50ml のオートクレーブ (121°C, 15 min) 済の軟寒天培地 (0.9% agar) に固化する前 (約 60°C) に接種して、予め作製しておいた寒天平板培地に重層した。培地が固まったところでコルクボーラーを用いて直径 5mm、深さ 8mm のウェルを穿った。

(3) 活性の測定 先に調製しておいた培養上清液 50 μl をウェルに無菌的に注入して培養した。指示菌に乳酸菌を用いた場合は 30°C で 3～4 日、*Escherichia coli*、*Staphylococcus aureus* を用いた場合には 2～3 日培養し、ウェルの周辺に阻止円が見られたものを抗菌活性陽性 (+)、見られなかったものを - とした。

2 分離乳酸菌 95StMer 4-1 株 (*Oenococcus oeni*) の抗菌活性の検討

1) 供試菌株および培養方法 指標菌株として、*Oenococcus oeni* JCM 6125^T と、これに対して抗菌活性を示した *Oenococcus oeni* 95StMer 4-1 株を供試した。95StMer 4-1 を前培養後、50ml スケールで 30°C、4 日間培養した。その培養液を遠心分離 (3,000 rpm, 10 min) して得た上清液を、6N NaOH にて pH6.8±0.1 に調整し、メンブランフィルターによる濾過除菌を行った。これを JCM 6125^T を指標菌とした以下の抗菌活性測定

Table 1 Number of strains showing antibacterial activity

Lactic acid bacteria	Number of Isolates	Indicator ^{a)}				
		RIFY 5058 ^T	RIFY 5059 ^T	JCM 6124 ^T	JCM 6125 ^T	NRIC 1067 ^T
<i>Oenococcus oeni</i>	135	13	4	0	1	0
<i>Lactobacillus plantarum</i>	94	29	17	0	0	0
<i>Leuconostoc mesenteroides</i>	31	9	8	0	0	0
<i>Lactobacillus brevis</i>	10	1	1	0	0	0
<i>Lactobacillus</i> sp.	17	5	2	0	0	0
<i>Leuconostoc</i> sp.	3	0	0	0	0	0
Unidentified	1	0	0	0	0	0
total	291	57	32	0	1	0

^{a)}: RIFY 5058^T: *E. coli*, RIFY 5059^T: *S. aureus*, JCM 6124^T: *Leu. mesenteroides*, JCM 6125^T: *O. oeni*, NRIC 1067^T: *Lb. plantarum*.

試験に供試した。抗菌活性測定には Agar well diffusion 法を用いた。

2) 抗菌物質の熱耐性試験 抗菌活性に対する加熱の影響を調べた(9, 16)。培養上清液をオートクレーブ (121°C, 15 min) したもので、および 2 ml 容マイクロチューブに入れて、60°C、80°C のウォーターバス中、ならびに沸騰湯浴中 (100°C) で、30 および 60 分処理したものをメンブランフィルターで濾過除菌し、抗菌活性試験に供試した。

3) 各種酵素処理 抗菌活性に対するプロテアーゼ処理による影響(9, 16, 21)を調べた。上清液 400 μ l に対して Proteinase K (Merk), Pepsin, Trypsin, α -Chymotrypsin (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) の各酵素溶液 (2 mg/ml, M/10 Tris-HCl buffer pH 8.0) を 133 μ l (反応液の最終濃度で 500 μ g/ml) 添加し、1.5 ml 容マイクロチューブにて 37°C で 1 時間および 4 時間反応させた。また、Pepsin と α -Chymotrypsin に関しては、反応液の最終濃度を 2 mg/ml に調整した溶液を同様の条件で反応させた。反応の後、同液をメンブランフィルターで除菌濾過して抗菌活性測定試験に供した。

また、抗菌活性が過酸化水素に原因するかを試験した。pH 調整後の培養上清液 400 μ l に対して Catalase (Wako Pure Chemical Industries, Ltd.) 溶液 (2 mg/ml, M/15 Phosphate buffer pH 7.0) を 133 μ l (反応液の最終濃度で 500 μ g/ml) 添加し、1.5 ml 容マイクロチューブにて室温で 30 分間反応させた

ものをメンブランフィルターで濾過し、抗菌活性試験に供した(5)。

4) 抗菌物質の分子量の検討

(1) 透析試験 pH 調整後の培養上清液、約 1 ml を透析チューブ (直径 0.6 cm, 三光純薬株式会社) に入れ、これを 1,000 倍量の脱イオン水および 50 mM Tris-Cl buffer (pH 8.0) に沈めて、4°C で一昼夜透析を行った。透析した内液および透析を行わなかった培養上清液を抗菌活性試験に供した。

(2) 限外濾過および濃縮試験 pH 調整後の培養上清液 10 ml を限外濾過用遠心チューブのウルトラフリー-15 (日本ミリポア株式会社) へ注入し、5,000 rpm で約 1 h の遠心を行って、1.0 ml まで濃縮 ($\times 10$) した。この方式では、濃縮と同時に高分子物質の分画が可能であり、MW 5,000、10,000、30,000、および 50,000 の 4 種のチューブにて限外濾過と濃縮を行った。その濾過液およびチューブ内液をメンブランフィルター (0.45 μ m) で濾過し、抗菌活性試験に供した。

(3) 希釈試験 培養上清液をメンブランフィルター濾過した後、滅菌水にて 1, 2, 5, 10, 20, 40, 80, 100 および 200 倍に希釈した。各希釈液を抗菌活性試験に供した。

結果及び考察

1 分離菌株の抗菌活性について

当研究室にて過去に赤ワイン仕込み工程中から

分離された乳酸菌 291 株の抗菌活性の一次スクリーニング結果を Table 1 に示した。培養上清液の pH 調整を行わない場合、*Escherichia coli*、ならびに *Staphylococcus aureus* に対して阻止円を形成した菌株が複数の種に渡って多く存在した。同種の中でも抗菌作用を示す株とそうでない株が存在する点は、興味深いものであった。しかし、それらの活性は pH 調整後に失活した（結果は示していない）。このことから抗菌活性は、乳酸菌の生育に伴う乳酸あるいはその他の有機酸生成によるものだと考えられた。今回、分離株 95StMer 4-1 の 1 株のみが *Oenococcus oeni* JCM 6125^T に対して、pH 調整後も抗菌活性が認められました。この株は山梨県内のワイナリーの赤ワイン仕込み工程中から 1995 年度に分離されたものであり、形態学的、生理生化学的試験、および 16S ribosomal RNA-DNA の RFLP 分析により *Oenococcus oeni* と同定されている。

Table 2 Effect of heat treatment on antibacterial activity of 95StMer 4-1

Temperature	30 min	60 min
20°C	+ ^{a)}	+
60°C	-	-
80°C	-	-
100°C	-	-
Autoclaving (121°C, 15 min)	-	-

^{a)}: +, positive activity ; -, negative activity

Table 3 Effect of protease and catalase treatment on antibacterial activity of 95StMer 4-1

Tested protease	React for 1	React for 4
	hour	hour
Proteinase K	+ ^{a)}	+
Trypsin	+	+
α -Chymotrypsin	+	+
Pepsin	+	+
Conc-Pepsin ^{b)}	+	+
Conc- α -Chymotrypsin ^{b)}	+	+
Catalase	+	+

^{a)}: +, positive activity ; -, negative activity

^{b)}: 2 mg/ml of final concentration

2 *Oenococcus oeni* 95StMer 4-1 株の抗菌活性について

本菌株のバクテリオシン活性について、以下のように詳細に検討した。*Oenococcus oeni* は一般的に生育が遅く、多種のバクテリオシンに対する感受性が報告されている。現在のところ、この菌種ではバクテリオシン生産に関する報告はなされておらず、今回活性を有した 95StMer 4-1 が *Oenococcus oeni* である点に注目した。

Table 2 に加熱処理後の培養上清液の残存活性を示した。全ての処理区で加熱処理後に抗菌活性は失活していた。特に 60°C の比較的低温の処理でも失活した。Table 3 に各プロテアーゼ処理をした後の残存活性について示した。

一般に乳酸菌のバクテリオシン (9, 16, 21) では、各種プロテアーゼによる失活が認められるが、本試験では 1 時間ならびに 4 時間反応させた両区分で全く失活しなかった。また、Proteinase K と Pepsin については、さらに高濃度での処理も行ったが、阻止円形成に変化は見られなかった。本結果から、抗菌活性物質がタンパク性でない可能性が示唆された。また、Catalase 処理後にも抗菌活性は維持されており、本活性が過酸化水素によるものではないことも判明した。さらに、透析後の上清液の活性は、脱イオン水および buffer の両試験区分に、透析前と同様に保有された。これより、抗菌活性因子が高分子の物質である可能性が示唆された。Table 4 に限外濾過および濃縮による活性への影響を示した。この場合、MW 30,000 までを分画できるチューブによる限外濾過では、いずれの区分でもチューブ内液には抗菌活性が見られており、濾過液には見られなかった。MW 50,000 の分画チューブでは、濾過液およびチューブ内液共に抗菌活性が見られた。通常ならば、どちらか一方に活性が維持されるはずであるが、共に活性を維持するという結果となった。この抗菌物質の分子量がこれを通過できるサイズであることが示唆された。一般に抗菌活性試験では検定液中の抗菌活性物質の濃度が高くなるにつれ、阻止円の直径は大きく

Table 4 Result of ultrafiltration test

Ultrafiltration tube	Fraction ^{b)}	
	Internal fluid	External fluid
MW 5,000 cut off	+ ^{a)}	-
MW 10,000 cut off	+	-
MW 30,000 cut off	+	-
MW 50,000 cut off	+	+

^{a)} : +, positive activity ; -, negative activity

^{b)} : Internal fluid were concentrated to 10 times-fold.

なる(12) はずである。今回の場合、濃縮後に失活は起きなかったものの、いずれのチューブで濃縮した場合も阻止円の拡大が見られなかった。さらに、最小阻害濃度 (MIC) の希釈試験を行った。その結果、抗菌活性は、希釈 80 倍までの区分で認められ、100 倍の希釈では見られなかった。また、80 倍までの希釈サンプルにおいては、各希釈率による阻止円の形成状況 (直径、形状) に全く差異は見られなかった。よって、この培養上清液による抗菌作用が、検定液中の抗菌物質の濃度に依存しないことを示唆した。すなわち、これは単なる高分子量物質ではなく、他の何らかの因子によるものであることが推定された。以上の結果より、この抗菌活性が 1) 熱感受性である、2) タンパク性の物質ではない、3) 過酸化水素によるものではない、4) 低分子量の物質によるものではない、5) 有機酸物質によるものではない、などの性質を示した。これらのことから、バクテリオシンではないことが示唆された。

また、Agar well diffusion 法による抗菌活性の検出において、軟寒天培地上の阻止円から幾分離れた位置に、僅かな生育阻害が見られた。この形状がファージの検定を行う際に見られるブランク (溶菌斑) と類似していた。よって、上記の性状およびその抗菌性 (生育阻害) からみて、*Oenococcus oeni* 95StMer 4-1 株の抗菌活性は、本菌株に感染している溶原性のバクテリオファージによることも考えられた。

乳酸菌の生産するバクテリオシンに関する研究は近年急速に進展しており、*Lactobacillus plantarum* の Plantaricin-149 (6)、Plantaricin A (3) および Plantacin B (25)、*Lactobacillus brevis* の Brevicin 37 (16)、*Leuconostoc mesenteroides* の Mesenterocin 52 (10)、Mesenterocin 5 (2) 等が知られている。また、ワインより分離された乳酸菌の生産する抗菌活性物質に関する報告(1) もされている。

今回、ワインから分離した乳酸菌の生産するバクテリオシンは、見出せなかった。しかし、1995 年に山梨県内のワイナリーより分離された *Oenococcus oeni* 95StMer 4-1 株は、*Oenococcus oeni* JCM 6125^T 株に抗菌活性を示した。この抗菌活性の性状を検討した結果、本菌株の有している溶原性のバクテリオファージによることが推察できた。今後、このファージの詳細な検討を行い、ワイン醸造における汚染菌の抑制や MLF 菌の制御等への利用の可能性について検討していく予定である。

要 約

本研究室で 1990～1995 年の間に赤ワインもろみから分離した乳酸菌 291 株について、その生産するバクテリオシン活性を、培養上清液を用いて Agar well diffusion 法により検索した。供試菌のうち、63 株が *Escherichia coli* RIFY 5058^T および *Staphylococcus aureus* RIFY 5058^T に対して弱い活性を示した。次に乳酸菌の生育に伴い生成される有機酸による活性作用を除くために、培養上清液を NaOH にて中和後、バクテリオシン活性の測定を行った。その結果、全ての抗菌活性が失活した。次に、1995 年に山梨県内のワイナリーより分離された *Oenococcus oeni* 95StMer 4-1 株は、*Oenococcus oeni* JCM 6125^T 株に対して抗菌活性を示した。この抗菌活性の性状を検討した結果、Proteinase K, Pepsin, Trypsin, α -Chymotrypsin を用いたプロテアーゼ試験、60℃～121℃までの耐熱性試験、透析試験、MW 5,000～MW 50,000 までの限外濾過試験、および、2 倍～200 倍までの希釈試験を行った。そ

の結果から、本活性物質がペプチド性物質でないこと、すなわち、バクテリオシンではないことが判明した。さらに、*Oenococcus oeni* 95StMer 4-1 株の抗菌活性は、本菌株の有している溶原性のバクテリオファージによることが推察できた。

文 献

- Ana M. Strasser de Saad., and Maria C. Manca de Nadra : Characterization of bacteriocin produced by *Pediococcus pentosaceus* from wine., J. Appl. Microbiol., 74, 406-410 (1993)
- Daba, H., Pandian, S., Gosselin, J. F., Simard, R. E., Huang, J. and Lacroix, C. : Detection and Activity of Bacteriocin Produced by *Leuconostoc mesenteroides*., Appl. Environ. Microbiol., 57, 3450-3455 (1991)
- Daeschel, M. A., McKenny, M. C. and McDonald, L. C. : Bacteriocidal Activity of *Lactobacillus plantarum* C-11., Food Microbiol., 7, 91-98 (1990)
- Dicks, L. M. T., Dellaglio, F. and Collins, M. D. : Proposal to *Leuconostoc oenos* as *Oenococcus oeni* [corrig] gen. nov., comb. nov., Int. J. Syst. Bacteriol., 45, 395-397 (1995)
- Juven, B. J., Weisslowicz, H. and Harel, S. : Detection of hydrogen peroxide produced by meat lactic starter cultures., J. Appl. Bacteriol., 65, 357-360 (1988)
- Kato, T., Matsuda, T., Ogawa, E., Ogawa, H., Kato, H., Doi, U. and Nakamura, R. : Plantaricin-149, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* NRIC 149., J. Ferment. Bioeng., 77, 277-282 (1994)
- Klaenhammer, T. R. : Genetics of bacteriocins produced by lactic acid bacteria, FEMS Microbiol. Rev., 12, 39-85 (1993).
- Lafon-Lafourcade, S., Carre, E. and Ribereau-Gayon. : Occurrence of lactic acid bacteria during the different stages of vinification and conservation of wines., Appl. Environ. Microbiol., 46, 874-880 (1983)
- Larsen, A. G., Vogensen, F. K. and Josephson, J. : Antimicrobial Activity of Lactic Acid Bacteria Isolated from Sour Doughs: Purification and Characterization of Bavaricin A, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus bavaricus* MI401., J. Appl. Bacteriol., 75, 113-122 (1993)
- Mathieu, F. Sudirman Suwandih, I. Rekhif, N. Millere, J.B. and Lefebvre, G. : Mesenterocin 52, a bacteriocin produced by *Leuconostoc mesenteroides* subsp. *mesenteroides* FR52., J. Appl. Microbiol., 74, 372-379 (1993)
- Marka, D., Dong-Sun, J. and Barney, T.W. : Controlling wine malolactic fermentation with nisin and nisin-resistant strain of *Leuconostoc oenos*., Appl. Environ. Microbiol., 57 (2), 601-603 (1991)
- 日本生物工学会編 : 生物工学実験書, 生物工学基本操作, pp.32, 培風館, (1992)
- 野々村英夫, 小原巖 : 本邦産ブドウ酒のマロラクティック発酵, 醸協., 65 (10), 868-872 (1970)
- Radler, F. : Possible use of nisin in wine making. I. Action of nisin against lactic acid bacteria and wine yeast in solid and liquid media., Am. J. Enol. Vitc., 41, 1-6 (1990)
- Radler, F. : Possible use of nisin in wine making. II. Experiments to control lactic acid bacteria in the production of wine., Am. J. Enol. Vitc., 41, 7-11 (1990)
- Rammelsberg, M., Radler, F. : Antibacterial Polypeptides of *Lactobacillus* species., J. Appl. Microbiol., 69, 177-184 (1990)
- Schllinger, U. and Lucke, F-K. : Antimicrobial Activity of *Lactobacillus sake* Isolated from Meat. Appl. Environ. Microbiol., 55, 1901-1906 (1989)
- 島津善美 : ワインの有機酸と品質に関する醸造学的研究 (博士論文) pp.69-78 (1987)
- 清水理通, 青柳尚徳, 柴崎茂郎, 井上浩, 大塚

- 謙一：化学成分によるワインの類別, 醸協., 81 (2), 113-120 (1986)
20. Tagg, J. R., Dajani, A. S. and Wannmaker, L. W. : Bacteriocins of gram-positive bacteria., *Bacteriol. Rev.*, 40, 722-756 (1976)
21. Toba, T., Samant, S, K., Yoshioka, E. and Itoh, T. : Reuterin 6, a new bacteriocin produced by *Lactobacillus reuteri* LA6., *Lett. Appl. Microbiol.*, 13, 281-286 (1991)
22. 柳田藤寿, 鎌田勉, 篠原隆, 後藤昭二：赤ワイン仕込経過中に分離された乳酸菌の同定, 醸協., 88 (3), 253-259 (1993)
23. 柳田藤寿：赤ワイン醸造に関与する乳酸菌の種内多様性, 醸協., 99 (4), 225-231 (2004)
24. 吉田和司：乳酸菌抗菌性ペプチド「バクテリオシン」の清酒醸造への利用, 醸協, 88 (7), 512-516 (1993)
25. West, C. A. and Warner, P. J. : Plantacin B, a Bacteriocin Produced by *Lactobacillus plantarum* NCDO 1193., *FEMS. Microbiol. Lett.*, 49, 163-135 (1989)