乳酸菌バクテリオシンによる微生物制御

近年、消費者の食に対する安心と安全の意識は高まる一方で、低塩や低糖化、天然志向、非加熱などの食品の増加により、食の安全性が確保されにくいのが現状である。この様な中で、乳酸菌の生産するバクテリオシンを利用した食品の製造や品質保持に関心が高まっている。そこで本稿では、乳酸菌バクテリオシンの性質、スクリーニングの初期段階での新奇性の判別方法の確立、バクテリオシンの利用、今後の展望などについて解説して頂いた。今後も新たなバクテリオシン並びにその実用化に向けて、一層の研究を期待したい。

澤 稔彦¹・善藤威史¹・中山二郎¹・園元謙二^{1,2}

1. はじめに

昨今、食品の安全性に対する関心がますます高まっているが、止むことのない食品の汚染事例は、食品の製品貯蔵のみならず製造過程における衛生管理の重要性を示すものである。一方では、天然・自然志向から、過度の処理を施された食品は敬遠される傾向にある。食品の微生物汚染を防止する対策としては、まず加熱があげられるが、処理による味や風味等の品質の低下を伴いやすい。また、防腐剤、保存料の多用は、人体への悪影響が懸念されている。そこで、近年、これらの問題点を解決する方策として、バイオプリザベーションと呼ばれる新たな食品保存技術が注目され始めた。バイオプリザベーションとは、「食品として、または食品に伴い摂取される人体に無害の生物由来の抗菌性物質を用いて、食品を保存する方法」として定義され、このような抗菌性物質はバイオプリザバティブと呼ばれる¹⁾。バイオプリザバティブの実例として、乳酸、酢酸、アルコール、しらこタンパク質、ポリリジン、竹抽出物等がある。中でも、長年の食経験を有する乳酸菌が生産する抗菌ペプチド、バクテリオシンは優れた特性をもち、かつ安全・安心な最も有効なバイオプリザバティブとして期待されている。最近では、食品

分野に留まらず、医薬品としての利用も期待されている。本稿では乳酸菌バクテリオシンの特性を概説するとともに、微生物制御への利用と将来の可能性を紹介する。

2. 乳酸菌バクテリオシンの性質

バクテリオシンとは、細菌が生産する抗菌ペプチドの総称である。最初に発見され、最も古くから研究されているバクテリオシンは、大腸菌が生産するコリシンである。それ以来、現在まで様々な細菌によるバクテリオシン生産が報告されてきた。その中でも特に、微生物制御への利用の観点から、乳酸菌が生産するバクテリオシンの研究が盛んに行われてきた。乳酸菌が生産するバクテリオシンは、プラスミドあるいは染色体上にコードされており、リボソーム上で合成されるタンパク質もしくはペプチドである。また、一般的に耐熱性で、酸性域から中性域で安定、無味無臭である。乳酸菌バクテリオシンは、主に標的細胞膜に孔を形成することで、生産菌の類縁種やその他のグラム陽性菌に対して抗菌効果を示し、グラム陰性菌や真核細胞に対しては効果が無い。乳酸菌バクテリオシンの抗菌スペクトルは、大半のものがグラム陽性菌に限定されるものの、その中でも幅広く抗菌活性を示すものから、

Microbial Control with Bacteriocins from Lactic Acid Bacteria

Naruhiko SAWA, Takeshi ZENDO, Jiro NAKAYAMA, Kenji SONOMOTO (¹Laboratory of Microbial Technology, Division of Microbial Science and Technology, Department of Bioscience and Biotechnology, Faculty of Agriculture, Graduate School, Kyushu University ²Laboratory of Functional Food Design, Department of Functional Metabolic Design, Bio-Architecture Center, Kyushu University)

特定の菌種のみに抗菌活性を示すものまで様々なタイプのものがある。ニーズに応じた特性、抗菌スペクトルをもつバクテリオシンを選択することで効果的な微生物制御の実現が期待される。

乳酸菌を含むグラム陽性菌が生産するバクテリオシンは、分子量、耐熱性、修飾アミノ酸の存在、一次構造および作用機構を基準にして主に5つのクラスに分類されるが、大半のものはクラスⅠもしくはⅡに属する（第1表）。近年、未だ精製されず詳細な構造が明らかとなっていないクラスⅣの分類の意義や、新たに見つかった環状バクテリオシンをクラスⅤとして分類することが議論されている²⁾。

クラスⅠバクテリオシンは、ランチビオティックとも呼ばれ、翻訳後修飾によって生じたデヒドロアラニンやデヒドロブチリンといった不飽和アミノ酸やランチオニン、3-メチルランチオニンなどの異常アミノ酸を含む。異常アミノ酸は抗菌活性や安定性に重要な役割を果たしている。世界で広く実用され、*Lactococcus lactis* ssp. *lactis* に属する菌株が生産するナイシンAは、クラスⅠに属する（第1図a）。

クラスⅡバクテリオシンは、ランチオニン等の異常アミノ酸をもたないペプチドで、その特徴から、さらに3つのサブグループに分類されている。クラスⅡaバクテリオシンは、N末端側にコンセンサス配列（-Tyr-Gly-Asn-Gly-Val-Xaa-Cys-）をもつ抗リステリア活性ペプチドである。クラスⅡaの代表例として、*Pediococcus acidilactici* などが生産するペディオシンPA-1がある（第1図b）。クラスⅡbバクテリオシンは、構造の異なる2種のペプチドが複合体を形

成して抗菌活性を示す。一般的に2つのペプチドを1対1で混合した際に最も高い抗菌活性を示し、単独ではほとんど活性が無い。クラスⅡbの例として、*Lc. lactis* QU 4が生産するラクトコッシンQがある³⁾。クラスⅡcバクテリオシンは、ⅡaおよびⅡb以外のクラスⅡバクテリオシンであり、例として *Lc. lactis* QU 5が生産するラクティシンQが挙げられる^{4,5)}（第1図c）。

3. 乳酸菌バクテリオシンの探索

乳酸菌とは、消費糖に対して50%以上の乳酸を生産するグラム陽性、カタラーゼ陰性、通性嫌気性等の特徴を有する細菌の総称であり、様々な栄養要求性を示すことから、食品は絶好の生息場所となる。故に、乳酸菌はその存在が知られる以前から食品の発酵に深く関わってきた。その発酵食品においては、乳酸菌は様々な抗菌性物質を生産して保存性を高めると同時に、その食品の風味に深く関与している。また、発酵食品以外にも、多種多様な乳酸菌が自然界に広く分布していることが、近年明らかとなっている。一方、上記のように、バクテリオシンにも様々なタイプのものがある。現在までに多様な乳酸菌バクテリオシンが見出されているが、ある特定のバクテリオシンを生産する乳酸菌は、特定の菌種に属する菌株に限定されている場合がほとんどである。したがって、新しい乳酸菌が分離されれば、新しい特性をもつ新奇のバクテリオシンを得られる可能性が高い。

より効果的な微生物制御を実現するには、多様なバクテリオシンからニーズに見合ったバクテリオシンを

第1表 乳酸菌バクテリオシンの分類

クラス	性質	代表例
Ⅰ	ランチビオティック：不飽和アミノ酸，異常アミノ酸を含む低分子ペプチド(<5 kDa)	ナイシンA, Z, Q ラクティシン3147
Ⅱ	異常アミノ酸を含まない低分子ペプチド(<10 kDa)	
Ⅱa	N末端にコンセンサス配列(YGNGVXC)をもつ抗リステリアペプチド	ペディオシンPA-1 サカシンP
Ⅱb	2つのペプチドの相乗的作用により抗菌活性を示すもの	ラクトコッシンQ
Ⅱc	a, bに属さないもの	ラクティシンQ, Z
Ⅲ	熱感受性の高分子タンパク質(>30 kDa)	エンテロリシンA
Ⅳ	糖質や脂質と複合体を形成し抗菌活性を示すもの	不明
Ⅴ	環状構造をとるもの	エンテロシンAS-48

第1図 代表的な乳酸菌バクテリオシン，(a)ナイシン A，(b)ペディオシン PA-1，(c)ラクティシン Q の構造

(a)ナイシン A は翻訳後修飾によって形成される不飽和アミノ酸やランチオニンなどの異常アミノ酸を有する。(b)ペディオシン PA-1 は2つのジスルフィド結合を有する。白抜き部分はクラス IIa バクテリオシンに保存された配列を示す。(c)ラクティシン Q の N 末端のメチオニンはホルミル化されている。網掛け部分は α ヘリックスを構成することが予想されている。

選択することが必要と考えられる。そこで，我々は，広く自然界を分離源として，新奇バクテリオシンの探索を行っている。バクテリオシンを検出する方法としては，バクテリオシン感受性株を指標菌とした抗菌活性試験が一般的である。その後，培養液上清からバクテリオシンを精製し，構造を決定する。しかし，結果として得られるバクテリオシンは必ずしも新奇なものばかりではなく，時間と労力を費やした精製・構造解析が徒労に終わることも多々あった。そこで，抗菌スペクトルと分子量に着目し，スクリーニングの初期，培養液上清レベルでの新奇性の判定方法を確立した⁶⁾。

抗菌スペクトルは，培養液上清が各指標菌に対して示す抗菌活性を数値化し，多変量解析の一つである主成分分析によって解析した。分子量は，高速液体クロマトグラフィー質量分析計 (LC/MS) を用いて培養液上清から直接測定した。これらの解析によって，3つのナイシン類縁体 (A, Z, Q) をはじめとする数種類のバクテリオシンの検出・同定，さらには新奇性の判定が可能となっている。本迅速化手法によって，

解析に要する時間の大幅な短縮を実現し，結果として多くの新奇バクテリオシンを獲得することができた (第2表)。

第三のナイシン類縁体であるナイシン Q⁷⁾ を見出したほか，ラクトコッシン Q³⁾，ラクティシン Q^{4,5)}，ラクティシン Z⁸⁾ などの新奇バクテリオシンを獲得することができた。クラス IIb のラクトコッシン Q は，*Lc. lactis* のみにしか活性を示さないという非常にユニークな抗菌スペクトルを有している。クラス IIc に属するラクティシン Q は，一般的なバクテリオシンに見られるリーダー配列を有しておらず，ホルミル化された N 末端のメチオニンを含む全 53 アミノ酸残基から成るバクテリオシンである (第1図 c)。ラクティシン Z は，3 アミノ酸残基が置換したラクティシン Q の類縁体である。ラクティシン Q と Z は，ナイシンに匹敵する広い抗菌スペクトルを示す一方で，ナイシンをはじめとする他のバクテリオシンが失活するアルカリ条件下で特に高い安定性を示す。これは既存の乳酸菌バクテリオシンの常識を覆す特性であり，従来

第2表 筆者らの研究室で見出したバクテリオシン生産乳酸菌

菌種*	株	分離源	バクテリオシン	クラス	抗菌 スペクトル
<i>Lc. lactis</i>	IO-1, QU 1 など	ぬか床, 野菜類など	ナイシン Z	I	広い
<i>Lc. lactis</i>	61-14	河川水	ナイシン Q	I	広い
<i>Lc. lactis</i>	QU 4	トウモロコシ	ラクトコッシン Q	IIb	特異的
<i>Lc. lactis</i>	QU 5	トウモロコシ	ラクティシン Q	IIc	広い
<i>Lc. lactis</i>	QU 14	馬腸管	ラクティシン Z	IIc	広い
<i>E. mundtii</i>	QU 2	大豆	ムンジチシン	IIa	中程度
<i>E. faecium</i>	WHE 81	ソフトチーズ	エンテロシン A, B	IIa, IIc	中程度
<i>E. faecium</i>	NKR-5-3	発酵魚	プロコシン A など	IIb など	広い
<i>P. pentosaceus</i>	TISTR 536	発酵ソーセージ	ペディオシン PA-1	IIa	中程度
<i>Lb. salivarius</i>	AC 21	ニワトリ腸管	Abp 118 α など	IIb	広い

**Lc.*, *Lactococcus*; *E.*, *Enterococcus*; *P.*, *Pediococcus*; *Lb.*, *Lactobacillus*.

の乳酸菌バクテリオシンが抱える弱点を補う存在として、その応用が期待される。

4. 乳酸菌バクテリオシンの利用

最も代表的な乳酸菌バクテリオシンであるナイシン A は、世界 50 ヶ国以上で食品保存料として使用されている。1969 年に FAO (Food and Agriculture Organization) と WHO (World Health Organization) の食品添加物についての共同委員会会議において安全な食品保存料として認められ、米国では Generally Recognized As Safe (GRAS) 物質として認可されている。また、オーストリアやイギリスではチーズや缶詰に、ボリビアでは全ての食品に無制限に使用が許可されている。現在、日本においても、食品添加物としての認可を検討中である。

ナイシン A は欧米を中心に食品の保蔵に広く用いられているが、グラム陽性菌のみにしか抗菌活性を示さないことや効果の持続性に乏しいことなどの欠点を抱えている。この有効な解決法の一つに、さまざまな抗菌物質や殺菌法との併用がある。異なる作用機作をもつ抗菌物質や殺菌法の併用は、相乗作用による抗菌スペクトルの拡大だけでなく、個々の処理の軽減を可能にする。こうした概念は、Leistner によってハードルテクノロジーとして提唱されている⁹⁾。つまり、いくつかの保存要因（ハードル）の組み合わせにより、相加的あるいは相乗的な効果（ハードル効果）を生み出そうとするものである。結果として、処理による食品の劣化を最低限にとどめることができるばかりでな

く、処理コストの削減も期待できる。さらには、単一の抗菌物質や殺菌法の継続的な利用の際に懸念される耐性菌の出現を防止することもできる。

ナイシン A をはじめとする乳酸菌バクテリオシンについては、種々の抗菌物質や殺菌法との併用による相乗作用が検討されている（第3表）。ナイシン A との併用例として、食塩、植物由来の抗菌性物質、有機酸類、キレート剤など他の添加物との併用のほか、熱処理、高圧処理、高電圧パルス、真空パッケージ等による物理的処理との併用などがある⁶⁾。また、バクテリオシンは即効性の殺菌効果を示すが、拡散や食品成分による不活性化によって、その効果は継続しにくい傾向にある。そのため、近年、フィルム材に固定し利用する方法が研究され始めている¹⁹⁾。

ところで、*Bacillus* 属や *Alicyclobacillus* 属は耐熱性の芽胞を形成することで、100°Cの熱処理や、高塩濃度、低 pH 域においても死滅せず、大きな問題となる。汚染製品が二次食品等に使用されると、ストレスが軽減され芽胞から栄養細胞となり増殖する。ナイシン等のバクテリオシンは栄養細胞には十分な抗菌活性を示すものの、芽胞に対しては効果が無い。そこで、発芽誘導物質であるアラニンとナイシンと併用することで、芽胞菌の制御が達成されている²⁰⁾。

一方、*Listeria monocytogenes* は、他の細菌の生育が抑制される低温でも増殖可能であるため、生鮮食品や冷蔵食品で増殖し、日本では報告例が少ないが、欧米では深刻な食中毒を引き起こしている。前述のペディオシン PA-1 をはじめとするクラス IIa バクテリオ

第3表 ナイシンと他の処理の併用例

併用処理	効果	参考文献
N ₂ , CO ₂ , 低温	<i>Listeria monocytogenes</i> の相乗的阻害	10, 11
高電圧パルス	<i>Bacillus cereus</i> への抗菌活性の増強	12
高圧処理	ハムにおける <i>L. monocytogenes</i> , <i>Salmonella enterica</i> への相乗的阻害	13
キレート剤	<i>Salmonella</i> 等のグラム陰性菌の相乗的阻害	14
ラクトパーオキシダーゼ	生乳中での <i>L. monocytogenes</i> の相乗的阻害	15
ショ糖脂肪酸エステル	<i>L. monocytogenes</i> , <i>B. cereus</i> , <i>Staphylococcus aureus</i> 等の相乗的阻害	16
ニンニク抽出物	<i>L. monocytogenes</i> の相乗的阻害	17
ポリリジン	調味液(明太子の漬け汁)に添加することで、調製した辛子明太子中の一般生菌数の低減と保存性向上	18
フィルム材	抗菌活性の持続と鶏肉中の <i>Salmonella</i> Typhimurium の不活性化	19
L-アラニン	芽胞の発芽誘導による、麴中での芽胞菌の低減	20

シンは、*L. monocytogenes* に対して強い抗菌活性をもつため、その利用が広く検討されている。多くの食品を輸入に頼っている日本においても、*L. monocytogenes* による食中毒が顕在化する可能性があり、クラス IIa バクテリオシンへの注目が高まるであろう。

バクテリオシンの使用形態には、精製物や粗精製物、あるいはそれらを利用した製剤などが想定される。その他に、食品等では、バクテリオシン生産乳酸菌を添加し、対象中で直接バクテリオシンを生産させる方法も検討されている。その典型的な例は発酵食品であるが、バクテリオシン生産菌をスターターとして用いることができれば、バクテリオシンの持続的な効果が期待できる。

タイの伝統的発酵ソーセージである Nham は、一般に原料を加熱処理せず、スターターを利用しない自然発酵によって 3~5 日間で製造されている。水分活性の高い製品は一般に加熱することなく食されるため、グラム陰性菌のサルモネラ菌やグラム陽性菌のリステリア菌などの食中毒菌の汚染が問題となる。そこで、我々は、Nham から分離した *Pediococcus pentosaceus* TISTR 536 をスターターとして、発酵ソーセージの製造を試みた。本株は、クラス IIa バクテリオシン、ペディオシン PA-1 を生産し、Nham からの分離株であるため、Nham での良好な生育が期待でき、Nham の風味を損なうこともない。実際に、TISTR 536 株は Nham 発酵中にペディオシン PA-1 を生産し、その抗菌活性は生産乳酸や添加物の亜硝酸塩 (125ppm) とニンニク (5%) によって相乗的に向上し、かつ発酵期間中安定であった。Nham 発酵の開

始時にサルモネラ菌を植菌し、サルモネラ菌の経時変化を調べたところ、TISTR 536 株をスターターとした場合には、バクテリオシン非生産乳酸菌スターターを用いた場合よりも効果的にサルモネラ菌の制御が可能であった (第2図)。ペディオシン PA-1 は元来リステリア菌には強い抗菌活性を有するものの、グラム陰性菌であるサルモネラ菌には単独では効果がない。しかし、このように、生産菌をスターターとして利用し、さらに併用した抗菌物質との相乗効果によって、サルモネラ菌フリーの発酵ソーセージの製造が可能となった²¹⁾。

5. おわりに

現在、世界で広く使用されているナイシン A は優れたバクテリオシンであるが、その抗菌活性の持続性、アルカリ条件下での低い安定性、有用菌への影響など、いくつかの問題が指摘されている。そこで、ナイシンとは異なる特徴をもち、ナイシンの弱点を克服できるバクテリオシンの実用化が望まれている。バクテリオシンは一般のタンパク質と同様に転写、翻訳を経て生産されるペプチドであることから、遺伝子工学的な手法による改変も可能である。しかし、食への安全志向や自然志向が高まる現代の日本社会においては、食品への遺伝子組換え技術の利用が受け入れられる状況にはなく、新奇バクテリオシンを自然界に広く求めていくことになる。このような背景から、筆者らは新しいスクリーニング法を構築し、新奇バクテリオシンの探索を広く行い、優れた特性を持つラクティシン Q などを見出すに至った。この迅速スクリーニング法によ

第2図 Nham 発酵におけるバクテリオシン生産スターターの影響

Nham 発酵開始時に、サルモネラ菌 (*Salmonella anatum*) とともに、ペディオシン PA-1 生産乳酸菌 (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) もしくは非生産乳酸菌 (*P. pentosaceus* JCM 5890^T) をスターターとして植菌し、サルモネラ菌数の変化を計測した。

って、さらに優れたバクテリオシンが見出される可能性も高く、それらを用いたより効果的な微生物制御の実現が期待される。

幸いなことにナイシンについては耐性菌の報告はなく、他の認可された食品保存料に比べて格段に安全であるが、バクテリオシンに限らず抗菌物質の継続的な利用で最新の注意を払わねばならないのが、耐性菌の出現である。耐性菌の蔓延を阻止するには、未だ詳細が明らかとなっていない耐性機構や作用機作を解明し、それに基づくバクテリオシンの適正な利用法を設定することが必要であろう。ここで述べた種々の抗菌物質や殺菌法との併用は、耐性菌の出現を未然に防ぐ非常に有効な手段と考えられる。また、併用によって、これまでバクテリオシンのみでは困難とされてきた芽胞菌やグラム陰性菌、真菌の制御の実現も期待される。さらには、今後の探索で様々なバクテリオシンを発見することで、それらの組み合わせによって、状況に応じた抗菌スペクトルをオーダーメイドで作り出すことも可能となろう。特に、抗菌スペクトルの狭いあるいは特異的なバクテリオシンは、有害菌のみの超選択的制御への可能性を拓くものとして期待される。これは一般の抗菌剤では達成されがたい「理想の微生物制御」と言えよう。

乳酸菌バクテリオシンの用途は、ここで述べた食品分野のみにとどまらない。バクテリオシンの中には、近年問題となっている MRSA (メチシリン耐性黄色ブドウ球菌) や VRE (バンコマイシン耐性腸球菌) などの多剤耐性菌に対して抗菌活性を持つものも存在しており、医療分野への利用も検討されている。また、スキンケア用品や歯磨き用品への利用も検討されており、バクテリオシンの需要はさらに高まることが予想される。優れた特性、機能を有するバクテリオシンを見出し、利用することで、安全かつ安心な微生物制御への新しい展開が図られることが期待される。

<¹九州大学 大学院農学研究院 生物機能科学部門 応用微生物学講座 微生物工学分野 ²九州大学 バイオアーキテクチャーセンター 機能デザイン部門 食品機能デザイン分野>

引用文献

- 1) 森地敏樹, 松田敏生 (編著). (1999) バイオブリザベーション. 幸書房, 東京.
- 2) P. D. Cotter, C. Hill, R. P. Ross. (2005) Bacteriocin : developing innate immunity for food. *Nat. Rev. Microbiol.*, **3** (10), 777-788.
- 3) T. Zendo, S. Koga, Y. Shigeri, J. Nakayama,

- K. Sonomoto. (2006) Lactococcin Q, a novel two-peptide bacteriocin produced by *Lactococcus lactis* QU 4. Appl. Environ. Microbiol., **72** (5), 3383-3389.
- 4) K. Fujita, S. Ichimasa, T. Zendo, S. Koga, F. Yoneyama, J. Nakayama, K. Sonomoto. (2007) Structural analysis and characterization of lacticin Q, a novel bacteriocin belonging to a new family of unmodified bacteriocins of gram-positive bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **73** (9), 2871-2877.
- 5) 米山史紀, 善藤威史, 古賀祥子, 中山二郎, 園元謙二. (2007) 夢のスーパーバクテリオシン, ラクティシン Q. 食品工業, **50** (2), 20-25.
- 6) 岩谷 駿, 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二. (2007) 乳酸菌が生産する抗菌ペプチド—探索と応用研究—. バイオインダストリー, **24** (9), 23-31.
- 7) T. Zendo, M. Fukao, K. Ueda, T. Higuchi, J. Nakayama, K. Sonomoto. (2003) Identification of the lantibiotic nisin Q, a new natural nisin variant produced by *Lactococcus lactis* 61-14 isolated from a river in Japan. Biosci. Biotechnol. Biochem., **67** (7), 1616-1619.
- 8) S. Iwatani, T. Zendo, F. Yoneyama, J. Nakayama, K. Sonomoto. (2007) Characterization and structure analysis of a novel bacteriocin, lacticin Z, produced by *Lactococcus lactis* QU 14. Biosci. Biotechnol. Biochem., **71** (8), 1984-1992.
- 9) L. Leistner. (2000) Basic aspects of food preservation by hurdle technology. Int. J. Food Microbiol., **55** (1-3), 181-186.
- 10) E. A. Szabo, M. E. Cahill. (1998) The combined affects of modified atmosphere, temperature, nisin and ALTA 2341 on the growth of *Listeria monocytogenes*. Int. J. Food Microbiol., **43** (1-2), 21-31.
- 11) L. Nilsson, Y. Chen, M. L. Chikindas, H. H. Huss, L. Gram, T. J. Montville. (2000) Carbon dioxide and nisin act synergistically on *Listeria monocytogenes*. Appl. Environ. Microbiol., **66** (2), 769-774.
- 12) I. E. Pol, H. C. Mastwijk, P. V. Bartels, E. J. Smid. (2000) Pulsed-electric field treatment enhances the bactericidal action of nisin against *Bacillus cereus*. Appl. Environ. Microbiol., **66** (1), 428-430.
- 13) T. Aymerich, A. Jofré, M. Garriga, M. Hugas. (2005) Inhibition of *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* by natural antimicrobials and high hydrostatic pressure in sliced cooked ham. J. Food Prot., **68** (1), 173-177.
- 14) K. Stevens, A. B. W. Sheldon, N. A. Klapes, T. R. Klaenhammer. (1991) Nisin treatment for inactivation of *Salmonella* species and other gram-negative bacteria. Appl. Environ. Microbiol., **57** (12), 3613-3615.
- 15) E. Rodriguez, J. Tomillo, M. Nunez, M. Medina. (1997) Combined effect of bacteriocin-producing lactic acid bacteria and lactoperoxidase system activation on *Listeria monocytogenes* in refrigerated raw milk. J. Appl. Microbiol., **83** (3), 389-395.
- 16) L. V. Thomas, E. A. Davies, J. Delves-Broughton, J. W. Wimpenny. (1998) Synergist effect of sucrose fatty acid esters on nisin inhibition of gram-positive bacteria. J. Appl. Microbiol., **85** (6), 1013-1022.
- 17) B. Singh, M. B. Falahee, M. R. Adams. (2001) Synergistic inhibition of *Listeria monocytogenes* by nisin and garlic extract. Food Microbiol., **18** (2), 133-139.
- 18) 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二. (2002) バイオブリザベーション—乳酸菌バクテリオシンの利用—. 化学工業, **53** (2), 94-100.
- 19) N. Natrajan, B. W. Sheldon. (2000) Efficacy of nisin-coated polymer films to inactivate *Salmonella* Typhimurium on fresh broiler skin. J. Food Prot., **63** (9), 1189-1196.
- 20) 善藤威史, 島田信也, 谷本保英, 相馬さやか, 中山二郎, 園元謙二. (2002) 乳酸菌のバクテリオシンを利用するバイオブリザベーション。生物工学, **80** (12), 569-573.
- 21) A. Swetwathana, N. Lotong, J. Nakayama, K. Sonomoto. (2007) Maturation of Nham—a Thai fermented meat product. Effect of pediocin PA-1 producer (*Pediococcus pentosaceus* TISTR 536) as starter culture, nitrite and garlic on *Salmonella anatum* during Nham fermentation. Fleischwirtschaft International, **22** (3), 46-49.