

## 非加熱食品の安全性向上におけるバクテリオシン生産菌の活用

山田加一朗, 八十川大輔

### Utilization of Bacteriocin-producing Bacteria for the Improvement of the Safety of Uncooked Foods

Kaichiro Yamada and Daisuke Yasokawa

Bacteriocins produced by *Carnobacterium maltaromaticum* isolated from salmon roe and *Enterococcus durans* isolated from cured ham inhibited the growth of *Listeria monocytogenes in vitro*. As these two bacterial strains grow at a low temperature of 10°C and tolerate a salt concentration of 4% and a nitrous acid concentration of 2 000 ppm, they are considered to be suitable for pickling vegetables and fermented meat products. Possible combinations of starter lactic acid bacteria and those bacteriocin producing strains for meat fermentation were determined. In a model experiment of pickling Chinese cabbages, the propagation of *L. monocytogenes* was suppressed where *C. maltaromaticum* or *E. durans* was added at rate of 10<sup>6</sup> CFU/g. In a model experiment of fermenting meat, starter lactic acid bacteria alone inhibited the growth of *L. monocytogenes*, presumably by lactate production, and those two bacteriocin producing strains did not show any synergistic or additive effects in respect to growth inhibition of *L. monocytogenes* when they are concurrently used with starter lactic acid bacteria.

バクテリオシンとは微生物が生産する抗菌性ペプチドの総称であり、薬剤や抗生物質とは異なる優れた殺菌効果が報告されている<sup>1)~5)</sup>。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抗菌スペクトルや耐熱性、pH安定性などの違いから様々な種類があり、構造を基に5つに分類されている<sup>6)</sup>。一般的には耐熱性があり、酸性域から中性域で安定、無味無臭で人の消化酵素により分解される特徴を有している。バクテリオシンは生産菌の類縁種やその他のグラム陽性菌に対して高い抗菌活性を示し、食中毒菌 *Listeria monocytogenes* に対して特異的に殺菌効果を示すものも報告されている<sup>7)~9)</sup>。工業的に最も利用されているバクテリオシンであるナイシンAは、チーズやその他の乳製品、缶詰等の保存料として海外60ヵ国以上で使用が認められている。日本においても、ナイシンAが平成21年3月に厚生労働省から食品保存料として認可され<sup>10)</sup>、今後ナイシンAなどバク

テリオシンを利用した食品が増加することが予想される。

*L. monocytogenes* はグラム陽性、無芽胞、通性嫌気性の短桿菌であり、カタラーゼ陽性、運動性を有するリステリア属の一種である。土壌、植物、表流水、牧草、汚水、と畜場等の様々な環境に生息し、食中毒リステリア症の発症者から原因菌として検出される<sup>11)</sup>。*L. monocytogenes* は低温(-0.4°C)で生育し、食塩耐性(11.5%)を持つことから、ready-to-eat食品(消費者が商品を加熱せずにそのまま食べる冷蔵食品、以下RTE食品)や乳及び乳製品、食肉及び食肉製品を汚染し、食中毒を引き起こす原因となる。海外では*L. monocytogenes* による非加熱食品等で食中毒事例が多数報告されている。国内では、2001年に北海道で発生したナチュラルチーズを原因とした集団感染事例の報告のみであるが、厚生労働省では毎年約83件(0.65人/100万人)のリステリア症が発生していると推計している

事業名：経常研究

課題名：バクテリオシン生産微生物を活用した発酵食品の安全性向上に関する研究

表1 バクテリオシン抗菌活性に使用した検定菌

菌種	株名
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	ATCC 19435 <sup>T</sup>
<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	JCM 1157 <sup>T</sup>
<i>Pediococcus pentosaceus</i>	JCM 5885
<i>Listeria innocua</i>	ATCC 33090 <sup>T</sup>
<i>Bacillus coagulans</i>	JCM 2257 <sup>T</sup>
<i>Micrococcus luteus</i>	IFO 12708
<i>Listeria monocytogenes</i>	ATCC 19114

<sup>12)</sup> 食の欧米化に伴い、国内においても、ナチュラルチーズ、生ハム、RTE食品の製造が増加していることから、食品加工における *L. monocytogenes* の制御が重要と考えられる。これら非加熱食品および RTE 食品における *L. monocytogenes* の制御を検討した研究が多数報告されており<sup>13)~15)</sup>、その方法の一つにバクテリオシンを使用する方法が注目されている<sup>16)~18)</sup>。

そこで本研究では、道内既存発酵食品および食品製造環境より *L. monocytogenes* に抗菌活性を持つバクテリオシン生産菌を分離し、非加熱食肉製品及び漬物製品での活用を検討した。

## 実験方法

### 1. バクテリオシン生産菌の分離

水産食品、畜産食品、農産食品および食品工場環境由来の44試料を各種液体培地 (MRS 培地 (Difco), M17 培地 (Oxoid), GAM 培地 (日水製薬), GYP 培地 (グルコース 1%, 酵母エキス 1%, ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.2%, 酢酸ナトリウム 0.2%, 硫酸マグネシウム 0.02%, 硫酸マンガン 0.001%, 硫酸鉄 0.001%, 食塩

0.001%, Tween80 0.05%), GY 培地 (グルコース 0.5%, 酵母エキス 0.5%, ペプトン 0.5%, 肉エキス 0.5%)) に添加し、35°C, 30°C, 20°C で液体培養した (集積培養)。生育が確認できた培養液を各種集積培養に使用した寒天培地 (0.6%炭酸カルシウムを含む) に画線塗抹し、好気および嫌気培養を行い、ハローを形成した生育株を候補株とした。候補株に対して、表1に示した菌株を抗菌活性 (バクテリオシン活性) 検定菌として、善藤らの方法 (Direct 法, Spot-on-lawn 法)<sup>19)</sup> により、バクテリオシン生産能を評価した。検定菌に対して生育阻害を示した菌株をバクテリオシン生産菌として選択し、16S-rRNA 遺伝子解析により、菌種の同定を行った<sup>20)</sup>。

### 2. バクテリオシン生産菌の生育特性

漬物、発酵食肉およびナチュラルチーズなどの発酵食品への利用可能性を確認するため、生育温度、初発 pH、食塩耐性、亜硝酸耐性を検討した。生育温度は MRS 培地 (Difco), pH6.5, 培養温度 5~50°C (試験区 5°C 刻み) で培養し、培養 1 日, 3 日, 5 日目における生育度を菌体濁度 (目視) 4 段階で判定した。初発 pH は、MRS 培地, 培養温度 25°C, pH4.0~9.0 (試験区 pH0.5 刻み) で培養し、培養 1 日, 2 日, 3 日目の生育度を菌体濁度 (吸光度 700nm) で比較した。食塩濃度は MRS 培地の食塩濃度を 0, 3, 4, 6.5, 7.5, 10% (w/v) となるように調製し、培養温度 25°C, 初発 pH8.5 で培養し、培養 1 日, 2 日, 3 日目の生育度を菌体濁度 (吸光度 655nm) で比較した。亜硝酸濃度は MRS 培地に亜硝酸濃度 (200, 400, 600, 1 000, 2 000ppm (w/v)) となるように調製し、培養温度 25°C, 初発 pH8.5 で培養し、培養 1 日, 2 日, 3 日目の生育度を菌体濁度 (吸光度

表2 分離したバクテリオシン生産菌と抗菌スペクトル

バクテリオシン生産菌	分離源	検定菌							
		<i>Bacillus coagulans</i>	<i>Listeria innocua</i>	<i>Lactobacillus sakei</i> subsp. <i>sakei</i>	<i>Micrococcus luteus</i>	<i>Pediococcus pentosaceus</i>	<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Lactis</i>	<i>L.monocytogenes</i>	<i>S.aureus</i>
<i>C. maltaromaticum</i>	筋子	-	+	-	-	-	-	+	-
<i>E. durans</i>	生ハム	-	-	-	-	+	+	+	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>Cremoris</i>	豚肉	-	-	-	-	-	+	-	-
<i>Staphylococcus warneri</i>	牛肉	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Lactococcus lactis</i> subsp. <i>lactis</i>	筋子	-	-	+	-	+	-	-	-
<i>Leuconostoc citreum</i>	いくら	-	-	+	+	+	-	-	-
<i>Leuconostoc gasicomitatum</i>	いずし	-	-	-	-	+	-	-	-
<i>Enterococcus faecalis</i>	漬物	-	-	+	-	-	+	-	-

抗菌活性 (+ : Direct法およびSpot-on-lawn法のどちらにも活性あり, - : Direct法のみ活性あり, またはどちらも活性なし)

655nm) で比較した。

### 3. バクテリオシン生産菌とスターター微生物との併用検討試験

バクテリオシン生産菌および生産するバクテリオシンに対するスターター乳酸菌の感受性を検討した。スターター乳酸菌は *Pediococcus pentosaceus* (当センター分離株), *Lactobacillus plantarum* ATCC14917 株 (株秋田今野商店), *Pediococcus cerevisiae* IFO3889 株 (株秋田今野商店) を使用した。これらスターター乳酸菌を検定菌として Direct 法, Spot-on-lawn 法でバクテリオシン生産菌に対する感受性を検討した。

### 4. 食品モデル試験

(1) 白菜漬物モデル試験：白菜を 2～4 cm 角に裁断し、水道水で洗浄後、100ppm 次亜塩素酸ナトリウム溶液で 10℃, 15 分間殺菌し、水道水で洗浄した。次いで、0.5% 酢酸で 15 分殺菌後、水道水で洗浄した。水切り後、約 40g を計量し、同量の 2% 滅菌食塩水を調味液として加え、滅菌容器に充填した。これに TSB (Difco) 培地で前培養した *L. monocytogenes* ATCC19114 株を終濃度 10<sup>6</sup>CFU/g (白菜+食塩水) および同じく MRS 培地で前培養したバクテリオシン生産菌を終濃度 10<sup>6</sup>CFU/g となるよう添加し、10℃ で 5 日間保存した。対照は *L. monocytogenes* のみ添加した区とした。保存 1 日, 3 日, 5 日目に調味液を十分攪拌後に一部抜き取り、クロモアガーリステリア培地 (関東化学) に塗抹して *L. monocytogenes* 生菌数を測定した。また、滅菌試料 (白菜+食塩水) を用いたモデル試験には、滅菌容器に充填後にオートクレーブ滅菌 (121℃, 15 分) を行い、これに前述と同様にバクテリオシン生産菌と *L. monocytogenes* を接種した。

(2) 発酵食肉製品 (発酵サラミ) モデル試験：原料 (豚肉, 食塩, 糖類, 香辛料, 亜硝酸塩) 約 70g に TSB 培地で前培養した *L. monocytogenes* を終濃度 10<sup>5</sup>CFU/g となるように添加した。これに発酵食肉スターター乳酸菌およびバクテリオシン生産菌を各終濃度 10<sup>5</sup>CFU/g となるように添加した。これらを滅菌容器に充填し、20℃, 9 日間発酵させた。対照は *L. monocytogenes* および発酵スターター乳酸菌を添加した区とした。発酵 1 日, 3 日, 5 日, 9 日目に発酵食肉を一部抜き取り、クロモアガーリステリア培地 (関東化学) で *L. monocytogenes* 生菌数を測定し、殺菌および増殖抑制効果を検討した。

## 実験結果と考察

### 1. バクテリオシン生産菌の分離

44 試料より得られた約 6 000 の候補株からバクテリオシン抗菌活性測定法により、バクテリオシン生産菌を 8 株分離し、16S-rRNA 遺伝子解析を行い、菌種を同定した (表 2)。同定されたバクテリオシン生産菌のうち、筋子から分離した *Carnobacterium maltaromaticum* および生ハムから分離した *Enterococcus durans* は *L. monocytogenes* に対して抗菌活性を示した。抗リステリア性の高いバクテリオシンは 5 つに分類される乳酸菌バクテリオシンのクラス IIa 属することが報告されていることから、両株もクラス IIa のバクテリオシンを生産することが示唆された。

### 2. *C. maltaromaticum* および *E. durans* の生育特性

漬物および発酵食肉製品への利用可能性を確認するため、*L. monocytogenes* に対して抗菌性を示す 2 株について生育特性を検討した。生育温度について、*C. maltaromaticum* は 10～35℃, *E. durans* は 10～45℃の

表 3 *C. maltaromaticum* および *E. durans* の生育温度

<i>C. maltaromaticum</i>				<i>E. durans</i>			
培養温度	1日後	3日後	5日後	培養温度	1日後	3日後	5日後
5℃	—	—	—	5℃	—	—	—
10℃	—	—	++	10℃	—	—	++
15℃	—	++	++	15℃	—	—	++
20℃	—	++	++	20℃	++	++	++
25℃	++	++	++	25℃	++	++	+++
30℃	++	+	+	30℃	++	++	++
35℃	+	+	+	35℃	++	++	++
40℃	—	—	—	40℃	++	++	++
45℃	—	—	—	45℃	+	+	+
50℃	—	—	—	50℃	—	—	—

生育度 (+～+++ : 生育あり + 多いほど生育良好, — : なし)

温度帯で生育可能であった(表3)。培地の初発pHについて、*C. maltaromaticum*は初発pH6.0以上で生育可能であり、最適初発pHはpH8.5であった。*E. durans*は初発pH5.5以上で生育可能であり、最適初発pHはpH9.0以上であった(図1)。食塩耐性について、*C. maltaromaticum*、*E. durans*ともに食塩濃度4.0%まで生育可能であった(図2)。亜硝酸耐性については、両株

とも亜硝酸濃度2000ppmにおいても生育可能であった(図3)。一般に浅漬け製品の製造条件は、製造温度10℃以下、塩分濃度は2%程度<sup>21)</sup>である。両株とも低温(10℃)で生育可能であることから、浅漬け製品に利用可能と考えられた。一方で、発酵食肉製品の製造条件は、製造時の発酵温度は20℃以下、塩漬工程の調味液の亜硝酸濃度は200ppm以上である。製品の最終塩分濃

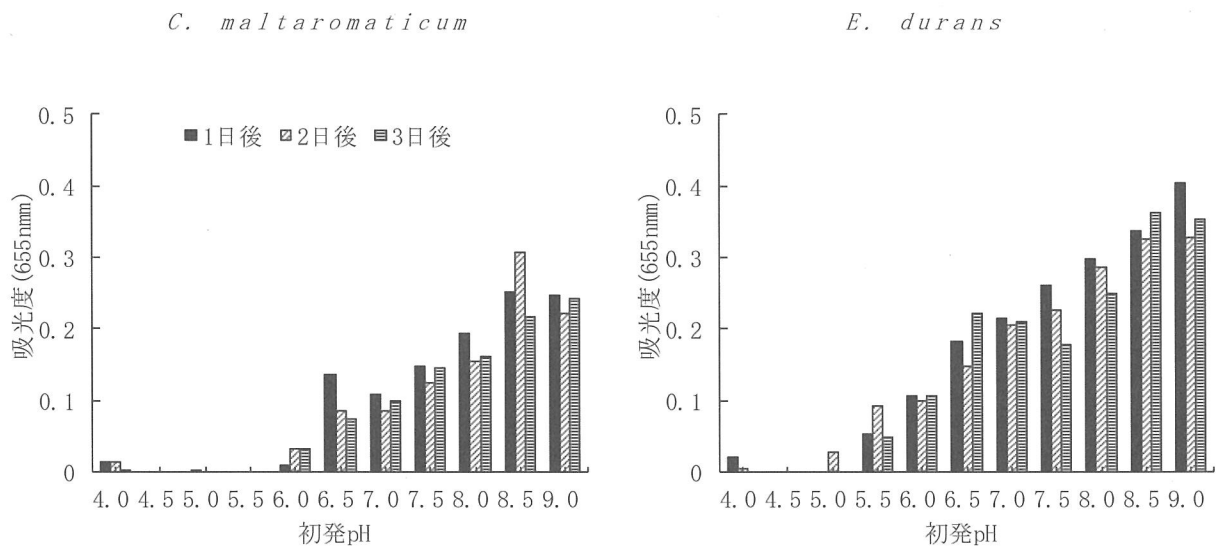


図1 異なる培地初発pHでの*C. maltaromaticum*および*E. durans*の生育

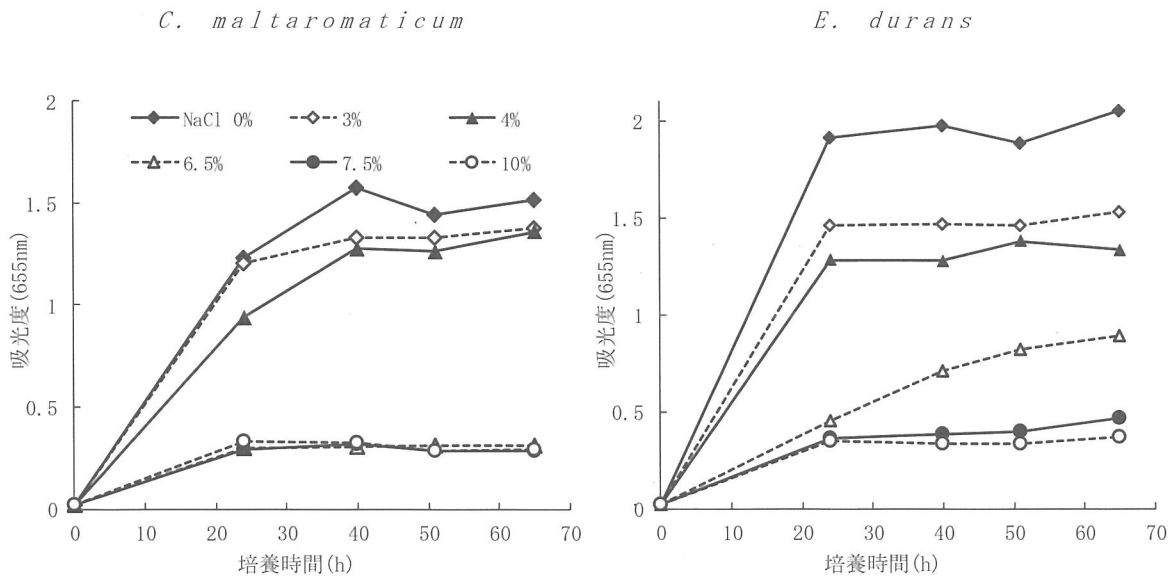


図2 異なる食塩濃度培地での*C. maltaromaticum*および*E. durans*の生育

度については、発酵サラミで3.3%程度<sup>22)</sup>、長期熟成生ハムで5.5%<sup>19)</sup>程度、発酵生ハムでは6~7%程度であるが、発酵生ハム等の塩漬工程で使用する調味液の食塩濃度は20%以上である。したがって両株は、20°C以下で生育可能で、200ppmの亜硝酸耐性があることから、発酵サラミには利用可能である。しかし、製造工程中に高い食塩濃度に晒される発酵生ハムの製造には利用が難しいと考えられた。

### 3. バクテリオシン生産菌とスターター微生物の併用条件

発酵食肉製品に使用するスターター乳酸菌に抗菌活性を示さないバクテリオシン生産菌の組み合わせを検討した。

バクテリオシン生産菌体を使用するDirect法においても(表4A)、培養上清を使用するSpot-on-lawn法においても(表4B)、バクテリオシン生産菌*C. maltaromaticum*はスターター乳酸菌*P. pentosaceus*に対して抗菌活性を示したが、*L. plantarum*、*P. cerevisiae*には抗菌活性を示さなかった。一方、バクテリオシン生産菌*E. durans*は*L. plantarum*、*P. cerevisiae*に対して抗菌活性を示し、*P. pentosaceus*には抗菌活性は示さなかった。

これらの結果から、*C. maltaromaticum*と併用可能なスターター乳酸菌は*L. plantarum*であり、*E. durans*と併用可能なスターター乳酸菌は*P. cerevisiae*および*P. pentosaceus*と判断した。

### 4. 食品モデルにおける*L. monocytogenes*の抑制効果

#### (1) 白菜漬物モデル試験

白菜漬物のモデル試験におけるバクテリオシン生産菌の*L. monocytogenes*殺菌効果を検討した結果、*C. maltaromaticum*および*E. durans*添加区は保存5日目において、ともに*L. monocytogenes*の増殖を抑制した。特に*C. maltaromaticum*添加区は保存5日目も高い増殖抑制を示した(図4)が、いずれも菌数を減少させるまでには至らなかった。これには原料由来微生物の生残、増殖の影響が考えられたため、2%食塩水に浸漬した白菜を滅菌し、原料由来微生物の影響を排除した後、*C. maltaromaticum*を用いて同様に*L. monocytogenes*の増殖抑制を検討した。その結果、*C. maltaromaticum*添加区は保存1日目から対照区と比較して*L. monocytogenes*の菌数に差が見られ、保存5日目において対照区と比べて菌数が $10^5$ 倍減少した(図5)。また、漬物調味液中から*C. maltaromaticum*が生産したと考えられるバクテリオシンが確認された(図6)。したがって、白菜漬物モデル試験において、白菜由来の乳酸菌等の影響を受けてはいるが、*L. monocytogenes*の増殖を抑制することは可能であると考えられた。

#### (2) 発酵食肉モデル試験

発酵食肉モデル試験において、バクテリオシン生産菌とスターター乳酸菌の併用による*L. monocytogenes*の殺菌効果を検討した。実験方法3により決定した組合せ3試験区(表5)すべてにおいて、*L. monocytogenes*の生

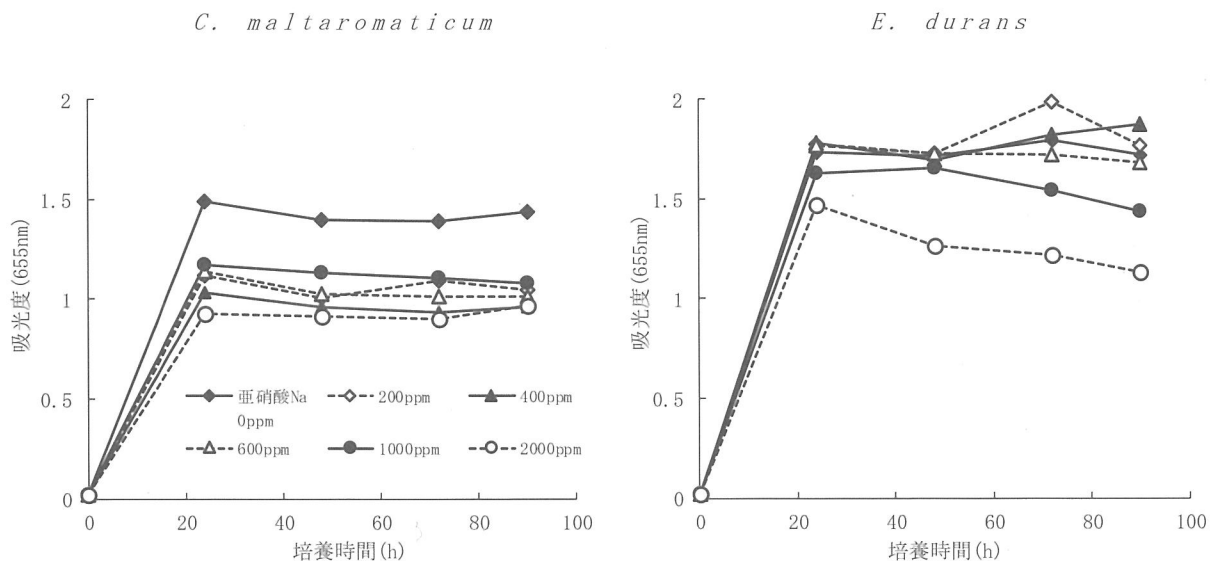


図3 異なる亜硝酸濃度培地での*C. maltaromaticum*および*E. durans*の生育

表4 バクテリオシン生産菌の発酵食肉用乳酸菌への影響

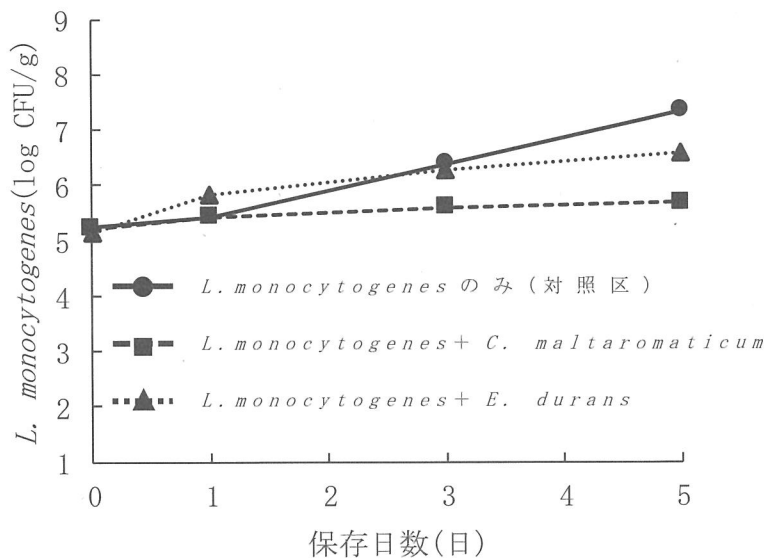
(A) Direct法			
バクテリオシン 生産菌	発酵食肉スターター乳酸菌		
	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>P. cerevisiae</i>
<i>C. maltaromaticum</i>	+	-	-
<i>E. durans</i>	-	+	+

+：生育阻害あり -：阻害なし

(B) Spot-on-lawn法			
バクテリオシン 生産菌	抗菌活性 (AU/mL)		
	<i>P. pentosaceus</i>	<i>L. plantarum</i>	<i>P. cerevisiae</i>
<i>C. maltaromaticum</i>	400	0	0
<i>E. durans</i>	0	400	100

抗菌活性 (AU/mL) = 培養上清の最大希釈率 (AU) ÷ 試料溶液の滴下量 (mL)  
 抗菌活性が強い場合には希釈率が高くても抗菌活性を示すことから、活性値 (AU/mL) の大きい方が抗菌活性の強いことを示している。また、抗菌活性を示さなかった場合は0 (ゼロ) AU/mLとする

図4 白菜漬物モデル中のバクテリオシン生産菌による*L. monocytogenes*の抑制

育を阻害した。しかし、スターター乳酸菌のみを使用した対照区も同様に *L. monocytogenes* の生育阻害を示し、その効果は併用区と同様であることから、バクテリオシン生産菌添加による相乗的な *L. monocytogenes* の増殖抑制効果は確認されなかった (図7)。

### 要 約

筋子から分離した *C. maltaromaticum* および生ハムから分離した *E. durans* が生産するバクテリオシンは *L. monocytogenes* の生育を阻害した。これら2株は低温 10°C で生育し、食塩濃度 4% および亜硝酸濃度 2000ppm に

対して耐性を有しており、漬物および発酵食肉で利用可能と考えられた。また、発酵食肉スターター乳酸菌と併用利用可能な組合せを決定した。白菜漬物モデル試験において、*C. maltaromaticum* または *E. durans* を 10<sup>6</sup>CFU/g 添加した試験区では *L. monocytogenes* の増殖抑制が観察され、発酵食肉モデル試験では、バクテリオシン生産菌とスターター乳酸菌併用区は、スターター乳酸菌のみ使用した区と同様のリステリア菌の増殖抑制を示したが、バクテリオシン生産菌による増殖抑制にはならなかった。

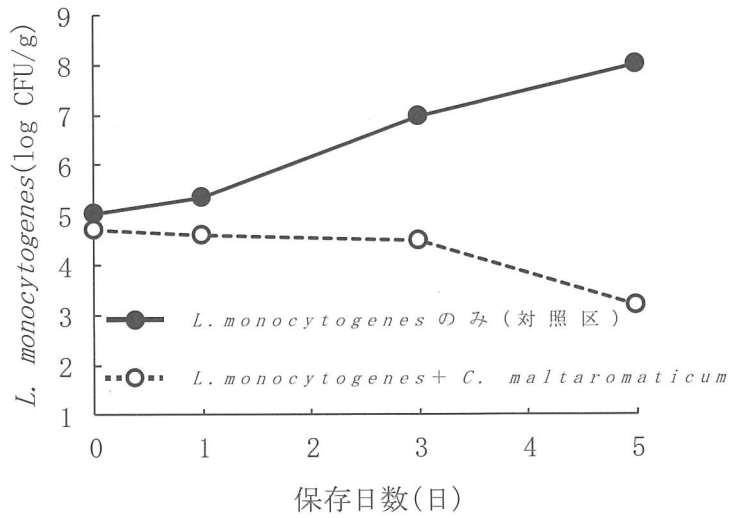


図5 滅菌した白菜漬物モデル中の*C. maltaromaticum*による*L. monocytogenes*の抑制

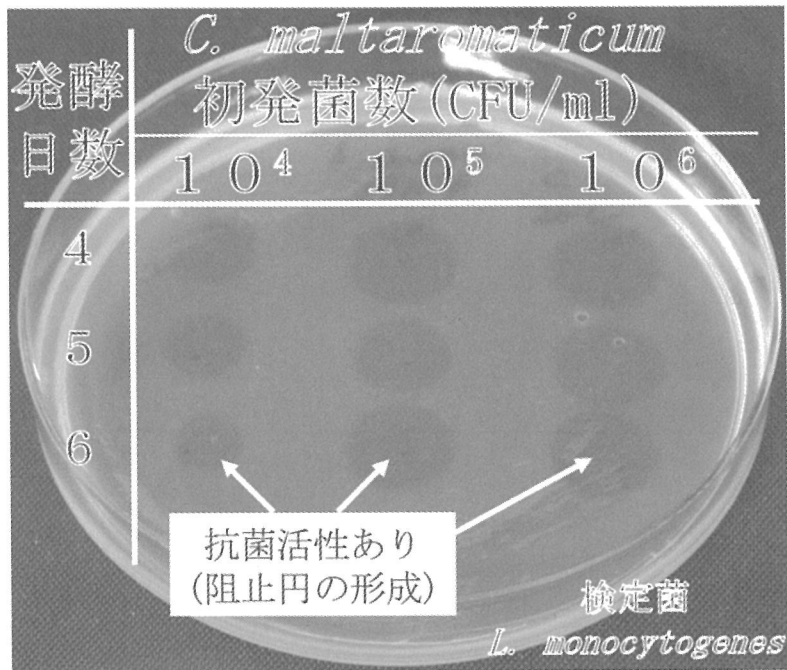


図6 *C. maltaromaticum*が生産したバクテリオシンの確認 (滅菌した白菜漬物モデル)

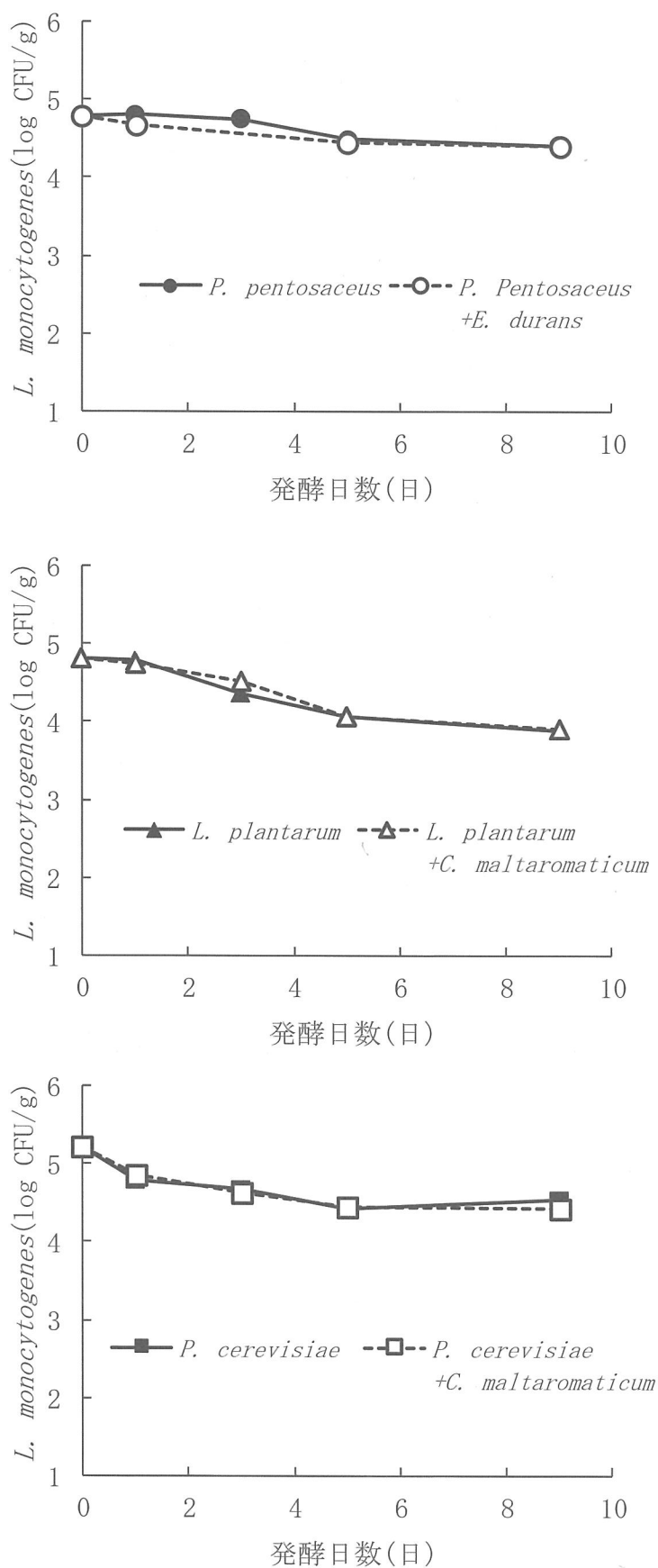


図7 発酵食肉モデル中のバクテリオシン生産菌による*L. monocytogenes*の抑制



## 文 献

- 1) 園元謙二, 善藤威史, 中山二郎, 乳酸菌バクテリオシンとバイオプリザベーション, 食品と開発, **41**, 73-75 (2008)
- 2) Sugimoto, S., Abdullah-Al-Mahin, and Sonomoto K., Molecular chaperones in lactic acid bacteria: physiological consequences and biochemical properties, *J. Biosci. Bioeng.* **106**, 324-336 (2008)
- 3) 園元謙二, 指原紀宏, 乳酸菌のバクテリオシンの構造と作用機構, 蛋白質 核酸 酵素, **46**, 323-328 (2001)
- 4) 指原紀宏, 園元謙二, 石崎文彬, 乳酸菌の生産するバクテリオシンとその応用, *J.J. Lactic Acid Bacteria*, **10**, 2-18 (1999)
- 5) 富士田浩二, 善藤威史, 中山二郎, 園元謙二, 乳酸菌バクテリオシンとその利用, *Bokin Bobai*, **32**, 127-134 (2004)
- 6) 園元謙二, 澤稔彦, 善藤威史, 中山二郎, バクテリオシン, 「微生物資源国際戦略ガイドブック」, 第1版 (サイエンスフォーラム, 東京), pp.260-267 (2009).
- 7) Martin-Visscher, L. A., van Belkum, M. J., Garneau-Tsodikova, S., Whittall, R. M., Zheng, J., McMullen, L. M., and Vederas, J. C., Isolation and characterization of carnocyclin a, a novel circular bacteriocin produced by *Carnobacterium maltaromaticum* UAL307., *Appl. Environ. Microbiol.*, **74**, 4756-4763 (2008)
- 8) Kawahara, T., Iida, A., Toyama, Y., and Fukuda, K., Characterization of the bacteriocinogenic Lactic acid bacteria *Lactobacillus curvatus* strain Y108 isolated from Nozawana-Zuke pickles, *Food Sci. Technol. Res.*, **16**, 253-262 (2010)
- 9) Zhang H., Liu L., Hao Y., Zhong S., Liu H., Han T., and Xie Y., Isolation and partial characterization of a bacteriocin produced by *Lactobacillus plantarum* BM-1 isolated from a Traditionally fermented Chinese meat product, *J. Appl. Microbiol.*, **105**, 1364-5072 (2008)
- 10) 食安発第 0302006 号 (2009)
- 11) 食品衛生法検査指針 微生物編 2004, 249-265 (2004)
- 12) 厚生労働省, 食品により媒介される感染症等に関する文献調査報告書 (2010)
- 13) Longa, M., Wanga, J., Zhuang, H., Zhanga, Y., Wua, H., and Zhanga, J., Performance and mechanism of standard nano-TiO<sub>2</sub> (P-25) in photocatalytic disinfection of foodborne microorganisms - *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*, *Food Control*, **39**, 68-74 (2014)
- 14) Upadhyay A., Upadhyaya I., Kollanoor-Johny A., Ananda Baskaran S., Mooyottu S., Karumathil D., Venkitanarayanan K., Inactivation of *Listeria monocytogenes* on frankfurters by plant-derived antimicrobials alone or in combination with hydrogen peroxide, *Int. J. Food Microbiol.*, **163**, 114-118 (2013)
- 15) Stopforth J. D., Visser D., Zumbrink R., van Dijk L., Bontenbal E. W., Control of *Listeria monocytogenes* on cooked cured ham by formulation with a lactate-diacetate blend and surface treatment with lauric arginate, *J. Food Prot.*, **73**, 552-555 (2010)
- 16) 山木将悟, 山崎浩司, 食品微生物制御へのバクテリオシンの利用, 日本醸造協会誌, **109**, 636-642 (2014)
- 17) Hammou, F. B., Skali, S. N., Idaomar, M., and Abrini, J., Combinations of nisin with salt (NaCl) to control *Listeria monocytogenes* on sheep natural sausage casings stored at 6°C, *African J. Biotechnol.*, **9**, (2010)
- 18) 高橋肇, 非加熱喫食水産食品におけるリステリア菌に対する市販抗菌剤の相乗効果に関する研究, 日本食品化学研究振興財団研究成果報告書, **17**, 89-93 (2011)
- 19) 善藤威史, 博士論文, 九州大学 (2004)
- 20) 長島浩二, 八十川大輔, 中川良二, 池田隆幸, 塩基配列に基づく細菌同定法の食品ミクロフローラ解析への応用, 日本食品科学工学会誌, **45**, 58-65 (1998)
- 21) 文部科学省, 五訂増補日本食品標準成分表
- 22) 厚生労働省, 食肉製品の製造基準, 食品衛生法