カタラーゼ活性を利用した生乳中の微生物数の迅速推定法

土井豊彦*・神崎幹雄*・中沼 浩*・渋谷美雪*・松本 清**

Estimation of Microbial Count in Raw Milk Based on Catalase-activity

Toyohiko DOI*, Mikio KANZAKI*, Hiroshi NAKANUMA*, Miyuki SHIBUYA*
and Kiyoshi MATSUMOTO*** Engineering Research Center, Morinaga Milk Industry Co., LTD.
4-515 Tateno Higashiyamato-shi, Tokyo 207** Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture,
Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka-shi 812

The microbial count is an index of suitability of raw milk handling and also one of the most essential item to judge milk quality. Sometimes, the high microbial count is responsible for high titratable acidity and/or off-flavor, and induces heat-unstability or contamination of heat-stable enzymes. Therefore, the high microbial count milk is not available for manufacturing. The measurement of the microbial count is usually carried out by direct counting with a micro scope or by colony counting on an agar plate. But these methods contain complicated procedures and need special techniques. To solve these problems a method by measuring catalase-activity was investigated, since all aerobic microbes have catalase. To separate the catalase-activity of microbes from that of bovine catalase contained in raw milk, the pH-profile of each activity and inhibitory effects of L-ascorbic acid were investigated. To measure the catalase-activity, an increasing rate of dissolved oxygen was measured by mean of an oxygen electrode just after the addition of hydrogen peroxide. The bovine catalase-activity tended to decrease definitely in the pH range higher than 9, but those of bacteria suspensions and raw milk had peak around pH 11. At pH 11, therefore, the catalase-activity was expected to be that of microbes. In experiments using 3 species of bacteria, a high linear relation was obtained between bacterial count and catalase-activity at pH 11, and the lowest bacterial count which can be estimated from the catalase-activity at pH 11, was supposed to be around 10^3 /mL. In experiments using raw milk samples from a tank lorry, catalase-activity at pH 11 was shown to be highly related to the microbial count. A regression formula to estimate the microbial count from catalase-activity at pH 11 was obtained and was shown to be available for raw milk samples.

(Received Jun. 10, 1991)

工場に搬入される生乳中には現在 1 ml 当たり数万から数百万個の微生物が含まれている。それらの多くは搾乳以後の取扱いによって混入したものと考えられている¹⁾²⁾。これらの微生物は、生乳の輸送、保管中に、風味劣化、熱不安定化等直接悪影響を及ぼすのみでなく、

一部の低温菌は耐熱性の酵素を産生することも知られている³⁾⁴⁾。良質の乳製品を生産するためには微生物数の極力少ない生乳を使うことが条件であるが、そのために、生産者、取扱者の指導、取扱い方法の改良、目的による選別などが必要となる。これを効果的に実施するには簡

* 森永乳業(株) (〒207 東京都東大和市立野 4-515)

** 九州大学 (〒812 福岡市東区箱崎 6-10-1)

易迅速に微生物数を知る方法が必要であるが、現在主に行われているのはガラス板に乾燥固定後染色し、直接顕微鏡で計測する方法⁵⁾や、平板培養してコロニーを数える方法⁶⁾である。しかし、これらは操作が繁雑で熟練を要し、また自動化にも不向きであるので、簡便法の検討も行われている(例えばレダクターゼ試験)⁶⁾。また、最近では微生物を蛍光染色し自動計測する方法⁷⁾や微生物の ATP に着目した自動計測法⁸⁾なども行われている。著者らは、混入した微生物のうち好気性微生物の持つカタラーゼを利用し、その活性から微生物数を推定する方法を試みた。この方法については既にいくつかの実施例⁹⁾¹⁰⁾が見られるが、生乳中に相当量含まれる牛体由来カタラーゼの活性除去法についての記載は見られない。

生乳中に混入している微生物の種類についてはいくつかの報告^{2)11)~13)}があるが、それらのうちカタラーゼを有する主な細菌は *Pseudomonas* 属、*Micrococcus* 属、*Bacillus* 属、*Staphylococcus* 属と思われる。一方、生乳中には前述のとおり、牛体由来するカタラーゼが相当量含まれていることも知られている¹⁴⁾¹⁵⁾。したがって微生物に由来するカタラーゼのみの活性を測定するためには両者を区別する方法が必要であるが、著者らは至適 pH の違いを利用する方法や、カタラーゼ阻害物質を利用する方法を検討した結果、至適 pH の違いを利用する方法によって両者を的確に分別し良好な測定結果を得た。

実 験 方 法

1. 供試試料

生乳：タンクローリーで工場に搬入されたものから採取した。また、一部は 10 台以上のタンクローリー分を合わせたものを工場の貯乳タンクから採取した。

Escherichia coli 懸濁液：栄研化学製普通ブイヨン培地 18 g、和光純薬工業製試薬特級ブドウ糖 1 g を脱イオン水 1 l に溶かし、121℃ で 15 分滅菌した培地に菌株 (IID-0-111) を接種し、35℃ で 24 時間静置培養後、培養液を 4 500 rpm で 15 分間遠沈し、沈澱を滅菌生理食塩水 100 ml に懸濁し、適宜希釈し使用した。

Bacillus subtilis 懸濁液：ATCC 6633 株を使って *Escherichia coli* と同様に調製した。

Pseudomonas fluorescens 懸濁液：IFO-14160 株を使って *Escherichia coli* と同じ培地で、20℃ で 48 時間静置培養し以下同様に調製した。

牛腿肉抽出液：市販の和牛腿ブロック肉の外周部を除き、石英砂と共に乳鉢で破碎し、同量の無菌水と混合

後、4 000 rpm で 10 分間遠心分離し、上澄み液を無菌水で 1 000 倍に希釈し使用した。この液の 1 ml 当たりの微生物数は 10 個未満であった。

2. 試 薬

水酸化ナトリウム、塩酸、30% 過酸化水素水：和光純薬工業製試薬特級を使用した。

牛肝製カタラーゼ：和光純薬工業製凍結乾燥粉末、5 000~9 000 units/mg を使用した。

Aspergillus niger 製カタラーゼ：Feinbiochemica GmbH 製 (生化学工業扱い) 凍結乾燥粉末、1 950 units/mg を使用した。

L-アスコルビン酸、フェニルヒドラジン：和光純薬工業製試薬特級を使用した。

窒素ガス：中野酸工業、純度 99.9% を使用した。

3. 装 置

溶存酸素計：セントラル科学製 ULTRA-DO METER を使用した。

pH メーター：東亜電波工業製 HM-60 S を使用した。

超音波細胞破砕機：日本精機製作所製 US-150 に直径 7 mm のチップを装着し使用した。

遠心分離機：久保田商事製 KS-5000 を使用した。

記録計：横河電機製 LR 8100 を使用した。

マイクロシリンジ：HAMILTON 製 # 701 を使用した。

4. カタラーゼ活性の測定方法

試料を 1 規定及び 0.1 規定の水酸化ナトリウム溶液及び塩酸で所定の pH に調整後、溶存酸素計セル (容量 1.1 ml) に分注し、窒素ガスをバブリングして酸素濃度を 2 ppm 以下に下げた後、密栓をして、栓の中心に設けられた細孔を通してマイクロシリンジで 30% 過酸化水素水 2 μ l を注入し測定した。セル内はマグネッスターで常時攪拌し、セル温度は 28~30℃ に保った。過酸化水素注入後、10 秒後から 1 分間の酸素濃度増加量 (ppm/min) を読んでカタラーゼ活性とした。なお pH 調整のための試料増分は、調整前後の重量を測定し活性値を補正したが、アルカリ液の添加量が試料量の 10% を超えるものは無かった。盲検は殺菌したイオン交換水を使用して同様に、測定開始時と終了時に測定し、その平均値を各測定値から差し引いた。

5. 微生物数の測定方法

直接染色し顕微鏡下で計測する方法は、特に微生物数が少ない時誤差が大きくなることが予想されたので、全て培養法で行った。栄研化学製標準寒天培地 23.5 g を 1 l の脱イオン水に溶解し、121℃ で 15 分間滅菌した培地を使用し、1 ml 当たり微生物数が 30~300 個になる

ように生理食塩水で稀釈した試料 1 ml に培地約 15 ml を加えシャーレで混釈凝固したものを、生乳の場合 30℃ で 48 時間培養後出現したコロニーを算出した。カタラーゼ産生菌の判定は、1 枚当たり数十個のコロニーが発生したシャーレから全コロニーを採取し、別に調整した寒天培地プレートに塗抹し (1 枚当たり 5 コロニー)、30℃ で 24 時間培養した後、3% 過酸化水素水を滴下して泡の発生の有無を観察する方法で行った。

結果及び考察

1. 過酸化水素濃度の決定

最適測定条件の過酸化水素濃度を定めるために、0.1, 1, 5, 10, 15, 30% 濃度に調製し、*Bacillus subtilis* 懸濁液 (73×10^5 /ml)、牛肝製カタラーゼ (0.3 units/ml) 及び脱イオン水の活性を測定した。結果を図 1 に示した。過酸化水素濃度を上げるほど、感度が上がることがわかったが、高濃度になると、盲検値も高くなった。濃度調整の手間を考慮し、試薬そのまま (30%) を 2 μ l 使用 (測定時濃度 545 ppm) することにした。

2. カタラーゼ活性の pH 依存性

牛体由来するカタラーゼと微生物の有するカタラーゼとで、活性の pH 依存性が異なるならば、それを利用して分別定量が可能である。そこで、*Escherichia coli*, *Bacillus subtilis* 及び *Pseudomonas fluorescens* の懸濁液、並びに *Aspergillus niger* 製及び牛肝製のカタラーゼ、牛腿肉抽出液それに生乳の、計 7 個の試料を 0.1 規定および 1 規定の水酸化ナトリウム溶液

図 1 過酸化水素濃度によるカタラーゼ活性の変化

●：牛肝製カタラーゼ 0.3 IU/ml, ▲：*B. subtilis* 懸濁液 73×10^5 /ml, ■：殺菌脱イオン水、全て pH 7 で測定

及び塩酸で pH を 2 から 13 まで変化させ、それぞれの活性を測定した。結果は、各試料の pH 7 の時の活性値で割り算して標準化し、図 2 に示した。牛由来のカタラーゼ活性と、微生物懸濁液の活性を比較すると高 pH での特性に大きな差異が見られる。つまり、牛腿肉抽出液や牛肝製カタラーゼの場合、pH 9 付近から、明確な活性低下が見られるが、微生物の活性は種類によって若干異なるものの、pH 11 付近までは大きな落ち込みは無い。したがって pH を 11 近辺に調整して活性測定を行うと、牛由来のカタラーゼ活性は抑制され、活性の大部分を微生物由来と見なせるはずである。なお、低 pH 側では、目立った差異は見られなかった。生乳は、ほぼ微生物の活性に類似した変化を見せたが、pH 7 以上の増加傾向がより顕著であった。一方、酵素標品はいずれも、pH 6.8 付近に活性のピークが見られるのに対して、微生物懸濁液及び生乳では、pH 7 を超しても活性は増加し続け、pH 11 あたりでピークに達し、その後急速に低下している。この原因を推定するために、各微生物懸濁液及び生乳を中性付近 (pH 6.5~6.8) から一旦 pH 11 にした後、再び元の pH に戻してカタラーゼ活性を測った。その結果は、pH を 11 にする前に測定した値と差が見られなかった。また、*E. coli* の懸濁液 50 ml を超音波破碎機で 15 分間処理した後、メンブランフィルター (ポアサイズの 0.8μ m) で濾過し、濾液について測定した pH 依存性にはアルカリ側での活性上

図 2 カタラーゼ活性の pH 依存性

●：牛肝製カタラーゼ 0.3 IU/ml, ▲：*Asp. niger* 製カタラーゼ 0.1 IU/ml, ■：牛もも肉抽出液, △：生乳, □：*E. coli* 懸濁液 86×10^5 /ml, ◇：*B. subtilis* 懸濁液 73×10^5 /ml, ○：*Ps. fluorescens* 懸濁液 140×10^5 /ml

昇は見られなかった。これらのことから、微生物懸濁液に特有のアルカリ側での pH 依存性は細胞の破損や微生物カタラーゼの pH 依存性等に起因するのではなく、細胞の構造自体に原因があるように思われるが、具体的な原因については今後究明を要する。

さらに、pH による、牛由来カタラーゼの活性と微生物のカタラーゼ活性との分別の可能性を確認するために、生乳に牛肝製カタラーゼを加えた試料を調製し、pH を変えてカタラーゼ活性を測定した。結果を表 1 に示した。予想した通り、pH 11 以上では牛肝製カタラーゼ添加による活性の増加分が、極めて小さくなることがわかった。測定には、活性値として高い値が得られ、生乳の活性値のピーク付近で pH のふれによる影響を受けにくい pH 11 が適していると考えた。

3. pH 11 でのカタラーゼ活性と微生物濃度の関係

pH 11 でのカタラーゼ活性から微生物濃度を推定できる可能性を調べるために、3 種の微生物懸濁液を、殺菌した脱イオン水で 6 段階に希釈したものを pH 11 に調製し、活性を測定した。結果を図 3 に示した。微生物

数とカタラーゼ活性の相関係数を求めると *Escherichia coli* が 0.99, *Bacillus subtilis* が 0.98, *Pseudomonas* が 0.98 といずれも高い相関を示し、この方法の可能性が示された。また、盲検値との比較から、測定可能な最低微生物濃度は $10^3/ml$ 程度と推定される。

4. アスコルビン酸による分別

カタラーゼの阻害物質としてフェニールヒドラジン¹⁶⁾やアスコルビン酸¹⁷⁾などが知られているが、それらの阻害物質の中で、牛由来のカタラーゼと、微生物細胞に含まれるカタラーゼに対する作用が異なるものがあれば、それによる分別が可能と考えられた。そこで、フェニールヒドラジン及びアスコルビン酸を、酵素溶液及び微生物懸濁液に加え、pH 7 に調整後、加えないときとの活性

図 3 微生物濃度とカタラーゼ活性の相関

▲: *Ps. fluorescens*, ●: *E. coli*,
■: *B. subtilis*, いずれも pH 11 で測定

表 1 pH による牛由来カタラーゼ活性の抑制

pH	(1) 生乳 49g+水 1g (ppm/min)	(2) 生乳 49g+15 IU/ml 牛肝製カタラーゼ 1g (ppm/min)	(2)/(1)
6.8	3.70	5.73	1.55
11.0	6.34	6.60	1.04
11.2	3.86	3.92	1.02
11.4	1.51	1.45	0.96

表 2 カタラーゼ阻害剤による活性の抑制効果

試 料	水 0.2% 添加 (ppm/min)	フェニールヒドラジン 0.2% 添加 (ppm/min)	L-アスコルビン酸 0.2% 添加 (ppm/min)
牛肝製カタラーゼ			
0.3 IU/ml	4.52	0.87	0.32
<i>Asp. niger</i> 製カタラーゼ			
0.1 IU/ml	3.54	3.00	3.43
<i>Ps. fluorescens</i>			
懸濁液	4.34	0.48	6.66
<i>B. subtilis</i>			
懸濁液	4.20	2.21	3.46
<i>E. coli</i>			
懸濁液	1.64	0.80	2.50

の違いを調べた。結果を表2に示した。フェニールヒドラジンは、牛肝酵素のみでなく、微生物の活性も強く阻害することがわかった。一方、アスコルビン酸は牛肝酵素は強く阻害するが、微生物の活性はほとんど阻害しないか、種によってはやや促進する傾向があることがわかった。次にアスコルビン酸の添加量と各活性の変化を調べた。牛肝酵素、*Aspergillus niger* 酵素、*Pseudomonas fluorescens* 懸濁液及び生乳について、アスコルビン酸の添加量を変え活性を測定した。なお、いずれも pH は7に調整した。結果を図4に示した。0.02% から微生物及び生乳群と牛肝製カタラーゼとの間に顕著な差が見られた。

5. pH 分別法とアスコルビン酸分別法による測定値の比較

どちらの方法が、より良い微生物濃度の推定が行えるかを調べるために、タンクローリーから採取した試料を使って測定を行った。カタラーゼ活性は、『そのまま』、『pH11』及び『アスコルビン酸0.4%添加後』の3とおりで測定した。なお、アスコルビン酸添加後の pH は5.5程度であり、微生物のカタラーゼ活性測定に支障ないと

考え pH の調整は行わなかった。微生物数は平板培養法で 30℃、48 時間で行った。さらに、一部の試料につ

図4 L-アスコルビン酸によるカタラーゼ阻害

●：牛肝製カタラーゼ 0.3 IU/mL, ▲：Asp. niger 製カタラーゼ 0.1 IU/mL, △：Ps. fluorescens 懸濁液 (95×10^5 /mL), □：生乳, いずれも pH 7 にて測定

表3 各処理による生乳のカタラーゼ活性値

生乳試料 No.	微生物数 ($\times 10^3$ /g)	未処理のカタラーゼ 活性 (ppm/min)	pH11 でのカタラーゼ 活性 (ppm/min)	L-アスコルビン酸 0.4% 添加後の カタラーゼ活性 (ppm/min)	カタラーゼ産生菌 の比率 (%)
1	170	4.16	8.52	1.90	
2	50	3.53	7.52	1.99	
3	11	1.54	7.44	1.05	
4	160	4.20	7.96	2.32	
5	60	2.45	8.04	1.11	
6	100	5.81	9.30	2.36	
7	40	3.81	8.26	2.17	
8	290	5.24	11.66	2.73	
9	72	4.15	8.05	1.35	38
10	16	4.20	7.25	0.86	33
11	36	3.42	7.07	1.12	31
12	63	3.66	7.92	1.83	46
13	580	6.21	15.32	3.67	71
14	180	3.87	12.35	2.52	47
15	240	5.81	11.20	2.65	51
16	30	1.25	7.35	1.75	57
17	510	7.34	14.36	3.11	53
18	79	5.18	8.74	2.29	36
19	38	3.72	7.41	1.96	41

いてはカタラーゼ産生菌の比率を測定した。結果を表 3 に示した。どの方法がより良い推定法であるかを調べるために、微生物数と、各活性値との相関係数を計算した結果、高い順に、pH 分別法 0.94、アスコルビン酸分別法 0.84、そのままのカタラーゼ活性 0.75 となり、pH 分別法が最も優れていることがわかった。一方、カタラーゼ産生菌の比率はカタラーゼ活性に基づく微生物測定の精度に影響を与える可能性が有るが、今回の測定試料では、最大最小の比が 2 倍程度であった。また、微生物数が多くなると、カタラーゼ産生菌の比率が高くなる傾向が見られた。今後、季節や地域の違いによるカタラーゼ産生菌の比率の変化を調査する必要がある。

6. pH 分別法によるカタラーゼ活性値から微生物数の推定

表 3 に示した、微生物数と pH 分別法によるカタラーゼ活性値を使用し回帰分析を行ない次の回帰式を得た。

$$Y = (61X - 422) \times 10^3$$

但し、Y：生乳 1 ml 当たりの微生物数、X：pH 11 で測定したカタラーゼ活性 (ppm/min) である。この式の寄与率は、88% であった。この式を使って別の試料の pH 11 におけるカタラーゼ活性から微生物数を推定し、培養法による値と共に表 4 に示した。生乳の微生物数の測定精度としては十分であると思われる。さらに、この方法の前処理は一定比率で試料にアルカリ溶液を加えるだけであるので、測定は数分で終了し自動化にも向いている。また、1 検体の費用も ATP 法等に比べて安い。

表 4 微生物数実測値と pH 11 におけるカタラーゼ活性値からの推定値

生乳試料 No.	実測値 ($\times 10^3$ /g)	推定値 ($\times 10^3$ /g)	pH 11 における カタラーゼ活性 (ppm/min)
1	220	130	9.10
2	79	86	8.32
3	61	40	7.57
4	40	97	8.50
5	240	320	12.21
6	44	16	7.18
7	230	160	9.46
8	120	78	8.20
9	51	61	7.92
10	640	440	14.10

要 約

生乳に混入した微生物数を微生物のカタラーゼに着目し、その活性値から推定する方法を検討した。カタラーゼ活性を測定するときの過酸化水素濃度は高いほど高い活性値が得られたが、同時に盲検値も高くなるため試料 1.1 ml に対し、30% 過酸化水素水を 2 μ l 使うことにした。生乳中には微生物以外にも牛体由来のカタラーゼが含まれているので、これを分別する必要があった。まず、両者の pH 特性を調べた結果、牛由来のカタラーゼは pH 9 を超すと明確に活性が低下するのに対し、3 種の微生物の懸濁液や生乳は pH 11 付近でも高い活性が見られ、pH 11 に調整すると、大部分微生物に由来する活性として測定されたと考えられた。一方、カタラーゼの阻害物質として L-アスコルビン酸と、フェニールヒドラジンの特性を調べた結果、フェニールヒドラジンは微生物の活性にも影響を与えたが、L-アスコルビン酸は微生物に対する阻害作用は小さく牛由来酵素を選択的に阻害した。生乳試料を使って pH を調整する方法と L-アスコルビン酸を加える方法を比較した結果、pH を調整する方法が培養で得た微生物数と、より高い相関があることがわかった。培養で得られた微生物数と pH 11 におけるカタラーゼ活性を使って得られた回帰式を実際の生乳試料に適用した結果、ほぼ実用になる精度が得られた。

文 献

- 1) 穴釜雄三：乳学，初版（光琳書院，東京），p. 359 (1975)。
- 2) 乳業ハンドブック，初版，津郷友吉・中西武雄・大条方義編（朝倉書店，東京），p. 51 (1973)。
- 3) 芝崎 勲：新・食品殺菌工学（光琳，東京），p. 54 (1983)。
- 4) 三河勝彦・有馬俊太郎：乳技協資料，34，1 (1984)。
- 5) 乳及び乳製品の成分規格等に関する省令（昭和 26 年 12 月 27 日 厚生省令第 52 号）別表の（七）の 8。
- 6) 津郷友吉・山内邦男：牛乳の化学，初版（地球社，東京），p. 276 (1975)。
- 7) 佐藤哲生・吉野正純・北田徳蔵・古川左近・染谷幸雄・橋詰和宗・森地敏樹：日畜会報，58，1040 (1987)。
- 8) LANGEVELD, L.P.M. and VAN DER WAALS, C.B.: *Netherland Milk Dairly Journal*, 42, 173 (1988)。
- 9) KROLL, R.G., FREARS, E.R. and BAYLISS,

- A.: *Journal of Applied Bacteriology*, **66**, 209 (1989).
- 10) キッコーマン醤油株式会社：日特公，昭 55-15999 (1980).
- 11) 津郷友吉・山内邦男：牛乳の化学，初版（地球社，東京），p. 191 (1975).
- 12) 乳業技術講座，第 11 版，第 1 巻，乳業技術講座編集委員会編（朝倉書店，東京），p. 227 (1963).
- 13) 穴釜雄三：乳学，初版（光琳書院，東京），p. 367 (1975).
- 14) 穴釜雄三：乳学，初版（光琳書院，東京），p. 140 (1975).
- 15) 津郷友吉・山内邦男：牛乳の化学，初版（地球社，東京），p. 83 (1975).
- 16) ORTIZ DE MONTELLANO, P.R. and KERR, D.E.: *J. Biol. Chem.*, **258**, 10558 (1983).
- 17) DAVIDSON, A.J., KETTLE, A.J. and FATUR, D.J.: *Biol. Chem.*, **261**, 1193 (1986).
- (平成 3 年 6 月 10 日受理)

 新 刊 紹 介

Sensory Science

Theory and Applications in Foods

Harry T. LAWLESS and Barbara P. KLEIN 編

官能検査が食品の分野において隆盛を見ている今日、官能検査関係の書物が数多く出版されるようになってきている。これをカバーするには、心理学、生理学、統計学等の広範な分野の知識を必要とする。本書では主として、欧米において伝統のある感覚心理学的側面について、選ばれた 15 のテーマについて、それぞれの著者の業績を含め最新の知見を述べたものになっている。官能検査において、心理測定にともなう曖昧さ、不確かさが常に問題となるところであるが、表題にもあるように、この分野を一つのサイエンスとしてとらえ、綿密な考証を加えて行くことによって、食品の官能検査の実務の背後にある科学性を確立していくことをめざしている。内容の一部を紹介する。

① 感覚の科学と製品評価の問題 ② 官能検査における嗅覚障害の影響 ③ スティーブンス・ウエバーフェフィナーの法則の数学的展開 ④ ニューラル・ネットワークによる人間の価値判断の解析 ⑤ 記述分析における概念の統一 ⑥ 感覚感度の個人差の問題など豊富な内容が取り扱われている。しかし、本書は単に研究書に終わることなく、実用書的な面も十分に強調されている。官能検査を、原点に立ち帰って考える上での良書である。

(O)

15.5 × 23.5 cm, 441 頁, 80 \$, 1991 年刊

Marcel Dekker, Inc.

270 Madison Avenue,

New York, N.Y. 10016

U.S.A.