発酵乳製品中の *Bifidobacterium* 生菌数 測定用選択培地の検討

(昭和 60 年 11 月 13 日受理)

園池耕一郎* 馬田三夫* 務台方彦*

Selective Agar Medium for Counting Viable Cells of *Bifidobacteria* in Fermented Milk

Koichiro SONOIKE, Mitsuo MADA and Masahiko MUTAI

(Yakult Central Institute for Microbiological Research:
1796, Yaho, Kunitachi-shi, Tokyo, Japan)

Transgalactosylated oligosaccharide (TOS), which is metabolic carbon source specific to *bifidobacteria*, was applied to develop a selective agar medium for counting *bifidobacteria* in commercial fermented milk. Investigation was performed with twenty-two strains of *bifidobacteria* and twenty-eight strains of lactic acid bacteria.

TOS agar medium finally developed contained Trypticase (BBL) 10 g, Proteose Peptone No. 3 (Difco) 5 g, ammonium sulfate 3 g, potassium phosphate, monobasic 2 g, potassium phosphate, dibasic 1 g, L-cysteine·monohydrochloride 0.5 g, magnesium sulfate 0.2 g, Agar (Difco) 15 g and TOS (Yakult) 10 g per liter of water. Cells of the strains tested were cultured on pour plates of TOS agar medium in anaerobic jars at 37°C for 2 days.

Colony counts of *bifidobacteria* cultured on TOS agar medium were comparable to those on BL agar medium (non selective medium). The diameter of colonies was larger than 0.8 mm.

Twenty-two strains of lactic acid bacteria formed no colony on TOS agar medium. The other six strains tested formed colonies, but their diameter was smaller than 0.2 mm.

Thus viable cells of *bifidobacteria* in commercial fermented milk could be selectively counted on TOS agar medium.

(Received November 13, 1985)

Key words: 発酵乳製品 fermented milk; ビフィズス菌 *Bifidobacterium*; 選択培地 selective agar medium; 転移オリゴ糖 transgalactosylated oligosaccharide

緒 言

腸内における *Bifidobacterium* の有用性が明らかにされると共に、*Bifidobacterium* を利用した乳製品、医薬品、飼料などが商品化されている。一方、これら商品に含まれる *Bifidobacterium* の生菌数測定法には、いまだ統一された方法がない。特に、発酵乳などでは厚生省の乳等省令との関係から *Bifidobacterium* と乳酸菌を併用した商品が市販されている。これら商品の中から *Bifidobacterium* を選択的に測定する方法として、これ

まで抗生物質などの選択剤を添加した選択培地^{1)~3)}、あるいは *Bifidobacterium* の特有なコロニーを形態的に選別して計測する方法⁴⁾ などが報告されている。選択剤を応用した選択培地は、商品の保存などにより *Bifidobacterium* の活性が低下すると検出率が低くなることが指摘されている⁵⁾。また、コロニーを形態的に選別して計測する方法は、煩雑かつ熟練を要するなどの問題があり、操作が簡単で検出率の高い選択培地の開発が望まれている。

我々は、*Bifidobacterium* と乳酸菌の糖質化能の差に着目し、培地に添加する炭素源によって *Bifidobacte*

* (株)ヤクルト本社中央研究所：東京都国立市谷保 1796

rium を選択しようと試みた。

このような目的に適した炭素源としてラクチュロース⁶⁾、フラクトオリゴ糖⁷⁾、転移オリゴ糖⁸⁾などがある。これらのうちラクチュロースは純度の高いものが入手しにくく、フラクトオリゴ糖は *Bifidobacterium bifidum* が資化できない⁷⁾などの欠点が認められている。一方、転移オリゴ糖は純度の高いものが得られ、かつ *Bifidobacterium* のすべての菌種が特異的に資化する⁹⁾ことから、それを応用した *Bifidobacterium* の生菌数測定用選択培地について検討したので報告する。

実験方法

1. 供試菌株

Bifidobacterium 5 菌種 23 菌株、乳酸菌は主として発酵乳製品に利用されている *Lactobacillus* 5 菌種 15 菌株、*Streptococcus* 1 菌種 11 菌株を用いた (Table 1)。

2. 被検菌液の調製法

Bifidobacterium は VL-lactose 培地⁹⁾、乳酸菌は

Rogosa の培地¹⁰⁾を用いた。*Bifidobacterium* は 1%, 乳酸菌は 10 ml の培地に 1 白金耳それぞれ接種し、37° で 16 時間培養した新鮮な培養液を被検菌液として用いた。

さらに、*Bifidobacterium* は培養液を生理食塩水で 10 倍希釈し、その 0.3 ml を 0.01 M 酢酸-酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 4.3) 10 ml に懸濁させ、5° で 6 日間保存したのも被検菌液として用いた。

3. 炭素源

転移オリゴ糖 (transgalactosylated oligosaccharide 以下 TOS と略する) を炭素源として用いた。TOS は純度 99.7% のものを用い ((株) ヤクルト本社製)、その組成は 3 糖類 55±2%, 4 糖類 33±2%, 5-6 糖類 12±2% であった⁹⁾。

4. 生菌数の測定法

被検菌液は光岡の希釈液から Tween 80 を除いた希釈液 (リン酸一カリウム 4.5 g, リン酸二ナトリウム 6.0 g, システイン塩酸塩 0.5 g, 寒天 1.0 g, 蒸留水 1,000

Table 1. Bacterial Strains Used

Strain		Origin or isolated from (other designation)	Strain		Origin or isolated from (other designation)
<i>Bifidobacterium</i>			<i>Lactobacillus</i>		
<i>B. bifidum</i>	YIT 4013	ATCC (ATCC 15696)	<i>L. gasseri</i>	YIT 0075	ATCC (ATCC 19992)
	YIT 4029	Mitsuoka (E319)		YIT 0168	our collection
	YIT 4007	our collection	<i>L. acidophilus</i>	YIT 0070	ATCC (ATCC 4356)
	29006A	Mitsuoka		YIT 0074	ATCC (ATCC 11506)
<i>B. infantis</i> ss. <i>infantis</i>				YIT 0065	Sharpe (A-28)
	YIT 4018	ATCC (ATCC 15697)		YIT 0165	yogurt
	15075	Mitsuoka	<i>L. bulgaricus</i>	YIT 0181	ATCC (ATCC 11842)
<i>B. infantis</i> ss. <i>liberorum</i>				YIT 0098	our collection
	YIT 4019	ATCC (ATCC 15702)	<i>L. helveticus</i>	YIT 0083	ATCC (ATCC 15009)
<i>B. infantis</i> ss. <i>lactentis</i>				YIT 0100	our collection
	YIT 4020	ATCC (ATCC 25962)	<i>L. helveticus</i> ss. <i>jugurti</i>		
<i>B. breve</i> ss. <i>breve</i>				YIT 0085	ATCC (ATCC 521)
	YIT 4014	ATCC (ATCC 15700)	<i>L. casei</i> ss. <i>casei</i>		
<i>B. breve</i> ss. <i>parvulorum</i>				YIT 0078	ATCC (ATCC 393)
	YIT 4015	ATCC (ATCC 15698)	YIT 9018	our collection	
	YIT 4010	our collection	<i>L. casei</i> ss. <i>alactosus</i>		
<i>B. adolescentis</i>				YIT 0123	ATCC (ATCC 27216)
	YIT 4011	ATCC (ATCC 15703)	<i>L. casei</i> ss. <i>rhamnosus</i>		
<i>B. longum</i>	YIT 4021	ATCC (ATCC 15707)		YIT 0105	ATCC (ATCC 7469)
	YIT 4037	ATCC (ATCC 15708)	<i>Streptococcus</i>		
	YIT 4038	FERM (FERM P-6548)	<i>S. thermophilus</i>	ATCC 19258	ATCC (NCDO 573)
	23A	Mitsuoka		YIT 2021	Morichi (510)
	105A	Mitsuoka		NCDO 821	NCDO
	108A	Mitsuoka		NCDO 1469	NCDO
	BL-1	yogurt		YIT 2001	our collection
	BL-2	yogurt		ST-1	yogurt
	BL-3	yogurt		ST-2	yogurt
	BL-4	yogurt		ST-3	yogurt
BL-5	yogurt	ST-4		yogurt	
		ST-5	yogurt		

ml, 気相: 二酸化炭素) を用い, 10 倍段階法により希釈した. 希釈検体 1.0 ml を被検培地約 15 ml に混釈し, 平板とした. これを嫌気ジャー法により 37° で 2 日

間培養し, 出現したコロニーを計数した. 嫌気ジャー法は光岡の方法¹⁾に従い, 酸性硫酸銅溶液に浸したスチールウールを入れ, 更にジャー内の気相を二酸化炭素ガス

Table 2. Composition of Media Tested

Component	Concentration (%)				
	Hassinen	M1	M2	M3	M4
Ammonium acetate	0.2				
Ammonium sulfate		0.3	0.3	0.3	0.3
L-Cystein·HCl·H ₂ O	0.02	0.05	0.05	0.05	0.05
Calcium pantothenate	40 µg/ml				
Biotin	0.4 µg/ml				
K ₂ HPO ₄	0.25	0.1	0.1	0.1	0.1
KH ₂ PO ₄		0.2	0.2	0.2	0.2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.02	0.02	0.02	0.02	0.02
FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.001				
NaCl	0.001				
MnSO ₄	0.0007				
Trypticase (BBL)		1.0	1.0	1.0	1.0
Tween 80			0.1		
Yeast extract (Difco)				0.5	
Proteose Peptone No. 3 (Difco)					0.5
Agar (Difco)	1.5	1.5	1.5	1.5	1.5
TOS* (Yakult)	1.0	1.0	1.0	1.0	1.0

Adjust pH to 7.0. sterilize at 120°C for 15 min.

* Sterilize 20% solution by filtration.

Table 3. Diameter of Colonies on Tested Media

Strain		Diameter ^{a)} (mm)						
		Hassinen	M1	M1 + Vit ^{b)}	M1 + salt ^{c)}	M2	M3	M4
<i>B. bifidum</i>	YIT 4013	— ^{d)}	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
<i>B. infantis</i>	YIT 4018	0.5	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
	YIT 4019	0.5	1.3	1.3	1.3	1.2	1.5	1.4
	YIT 4020	—	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2	1.2
<i>B. breve</i>	YIT 4014	—	0.4	0.4	0.4	0.4	1.0	1.0
	YIT 4015	—	0.4	0.4	0.4	0.5	1.2	1.2
<i>B. adolescentis</i>	YIT 4011	—	0.5	0.5	0.5	0.4	0.8	0.8
<i>B. longum</i>	YIT 4021	—	0.3	0.3	0.3	0.5	1.5	1.5
<i>L. gasseri</i>	YIT 0075	—	—	—	—	—	0.2	—
<i>L. acidophilus</i>	YIT 0070	—	—	—	—	—	0.2	—
<i>L. bulgaricus</i>	YIT 0181	—	—	—	—	—	1.0	—
<i>L. helveticus</i>	YIT 0083	—	—	—	—	—	0.6	—
	YIT 0085	—	—	—	—	—	0.3	—
<i>L. casei</i>	YIT 0078	—	—	—	—	—	0.7	—
<i>S. thermophilus</i>	YIT 2021	—	—	—	—	—	0.9	—

^{a)} Diameter: means of 10 colonies

^{b)} + Vit.: calcium pantothenate 40 µg/ml, biotin 0.4 µg/ml

^{c)} + Salt: FeSO₄·7H₂O 0.001%, NaCl 0.001%, MnSO₄ 0.0007%

^{d)} —: No colony was detected at 10⁷ dilution.

で2回置換した。

対照として、*Bifidobacterium* は血液を添加しない BL 寒天培地 (栄研化学(株)製)、乳酸菌は BCP 加プレートカウント培地 (栄研化学(株)製) を用いた。

5. コロニー直径の測定法

出現したコロニーの直径は、実体顕微鏡の接眼レンズに入れたマイクロメーターで測定した。

実験結果と考察

1. *Bifidobacterium* の生菌数測定用培地の検討

Hassinen の最少培地¹¹⁾を基礎培地とし、それに炭素源として TOS を添加した *Bifidobacterium* 生菌数測定用選択培地 (Table 2) を用いて、*Bifidobacterium* 及び乳酸菌のコロニー形成とその大きさについて検討した。

その結果は Table 3 に示す如く、*Bifidobacterium* は *B. infantis* YIT 4018 及び同 YIT 4019 のみが直径約 0.5 mm のコロニーを形成し、他の *Bifidobacterium* 及び乳酸菌はコロニーを形成しなかった。

そこで、*Bifidobacterium* のコロニー形成能だけを高

めて、乳酸菌のコロニー形成を抑制する試みと培地組成の単純化について種々検討した。

その結果、Hassinen の培地にカゼインの酵素分解物であるトリプチケースの添加と酢酸アンモニウムを硫酸アンモニウムに置き替えた M1 培地 (Table 2) を考案した。

本培地においては、乳酸菌の供試菌株はいずれもコロニーを形成することができず、*Bifidobacterium* は、供試菌株のすべてにコロニーの形成が認められたが、*B. breve*, *B. adolescentis* 及び *B. longum* は直径 0.3~0.5 mm 程度の小さなコロニーしか形成しなかった。

また、Hassinen の培地に用いられているパントテン酸カルシウム、ビオチン及び塩類の一部は *Bifidobacterium* のコロニー形成能及びその大きさに影響しないこ

Table 5. Colony Formation of Lactic Acid Bacteria on TOS Agar Medium

Strain	Colony count on BCP agar	Colony count on TOS agar
<i>L. gasseri</i>		
YIT 0075	102×10 ⁷ /ml	—
YIT 0168	70	—
<i>L. acidophilus</i>		
YIT 0070	46	—
YIT 0074	83	P (10 ⁵), — (10 ^{6.7})
YIT 0065	53	P (10 ⁵), — (10 ^{6.7})
YIT 0165	27	P (10 ⁵), — (10 ^{6.7})
<i>L. bulgaricus</i>		
YIT 0181	38	—
YIT 0098	39	—
<i>L. helveticus</i>		
YIT 0083	76	—
YIT 0100	20	—
YIT 0085	35	—
<i>L. casei</i>		
YIT 0078	82	—
YIT 9018	153	P (10 ⁷)
YIT 0123	212	—
YIT 0105	192	P (10 ⁷)
<i>S. thermophilus</i>		
ATCC 19258	31	—
YIT 2021	25	—
NCDO 821	26	—
NCDO 1469	51	P (10 ⁵), — (10 ^{6.7})
YIT 2001	32	—
ST-1	62	—
ST-2	33	—
ST-3	41	—
ST-4	16	—
ST-5	143	—

—: No colony was detected at 10⁵ dilution.

P: Pinpoint colony (diameter <0.2 mm)

Table 4. Colony Count of *Bifidobacteria* Cultured on TOS Agar Medium Compared with That on BL Agar Medium

Strain		Percentage of colony count on TOS agar medium to on BL agar medium		
		Experiment		
		1	2	3
<i>B. bifidum</i>	YIT 4013	103	91	95
	YIT 4029	107	109	114
	YIT 4007	119	106	
	29006A	113		
<i>B. infantis</i>	YIT 4018	104	109	86
	15075	100		
	YIT 4019	105	91	100
	YIT 4020	94	101	94
<i>B. breve</i>	YIT 4014	104	101	114
	YIT 4015	101	97	96
	YIT 4010	84	118	106
<i>B. adolescentis</i>				
<i>B. longum</i>	YIT 4011	105	103	102
	YIT 4021	108	97	99
	YIT 4037	94	105	109
	YIT 4038	102	110	
	23A	101	104	
	105A	82	104	81
	108A	89	81	85
	BL-1	109	118	
	BL-2	96	113	101
	BL-3	89	98	95
	BL-4	93	101	94
	BL-5	106	105	

とから排除した (Table 3).

次いで, M1 培地は供試菌株の一部にコロニーが小さいという欠陥が認められたので, その欠陥を改善するため, M1 培地に Tween 80, 酵母エキスを及びプロテオースペプトン No. 3 をそれぞれ添加した M2, M3 及び M4 培地を考案した (Table 2).

Tween 80 を添加した M2 培地は M1 培地とほとんど差がなく, M1 培地の欠陥を改善することができなかった (Table 3).

酵母エキスを添加した M3 培地は, M1 及び M2 培地でコロニーの小さかった *B. breve*, *B. adolescentis* 及び *B. longum* がそれぞれ直径 0.8 mm 以上のコロニーを形成するようになったが, それと同時に乳酸菌のコロニーが出現するようになった (Table 3). これはおそらく, 酵母エキスに含有されるビタミン, 炭水化物などに起因すると考えられる. 酵母エキスの代りに, それらを含有しないプロテオースペプトン No. 3 を添加した M4 培地は乳酸菌のコロニーが完全に抑制された. これに対し, 供試 *Bifidobacterium* 菌株のすべてが直径 0.8 mm 以上で肉眼でも十分計測可能なコロニーを形成した (Table 3).

2. *Bifidobacterium* の生菌数測定とその精度

Bifidobacterium の各供試菌を培養した新鮮な培養液の菌数を, 前項で検討した M4 培地 (以下 TOS 寒天培地と称する) を用いて測定し, 得られた値を BL 寒天培地に対する検出率で検討した.

TOS 寒天培地における *Bifidobacterium* のコロニーの大きさは肉眼で十分計測できる大きさであった. 生菌数は菌種によって多少の差が認められ, 特に *B. longum* はやや低い傾向を示したが, その値は実用上に支障をきたす程の差ではないと考えられた (Table 4).

3. 乳酸菌のコロニー形成

TOS 寒天培地における 乳酸菌 のコロニー形成能の有

Fig. 1. Colonies on TOS Agar Medium of *B. adolescentis* YIT 4011 (0.8 mm in Diameter) and *L. casei* YIT 9018 (0.2 mm)

無を Table 3 に示した乳酸菌より, 更に菌種, 菌株を増して検討した.

L. acidophilus, *L. casei* 及び *S. thermophilus* にコロニーを形成する菌株が認められた. しかし, そのコロニーは直径が 0.2 mm 以下のピンポイントコロニーであった (Table 5).

これらの乳酸菌と *Bifidobacterium* とが混在する場合, 両者はコロニーの大きさに容易に分別することが可能であった (Fig. 1).

4. 低 pH に保存した *Bifidobacterium* の生菌数測定

これまでに報告されている *Bifidobacterium* の選択培地は, いずれも乳酸菌のコロニー形成を抑制するため, 抗生物質などの制菌剤が添加されている. そのため, 発酵乳中で長時間保存された *Bifidobacterium* はコロニーの形成能が低下して検出率が低下することが指摘されている.

本項においては, pH 4.3 の酢酸緩衝液中に懸濁保存

Table 6. Relative Colony Count on TOS Agar Medium to BL, Agar Medium of *Bifidobacteria* Stored in pH 4.3 Acetate Buffer

Strain		0	Storage period in days	
			2	6
<i>B. bifidum</i>	YIT 4007	139 ^{a)} (5.2×10^5) ^{b)}	126 (3.4×10^5)	92 (1.3×10^4)
<i>B. infantis</i>	YIT 4018	114 (3.5×10^6)	100 (1.2×10^5)	(—)
	YIT 4019	104 (7.6×10^5)	118 (2.2×10^5)	103 (2.9×10^4)
<i>B. breve</i>	YIT 4014	104 (2.6×10^6)	100 (7.1×10^4)	(—)
	YIT 4015	131 (1.3×10^6)	100 (5.3×10^5)	80 (1.1×10^5)
<i>B. adolescentis</i>	YIT 4011	122 (9.2×10^5)	115 (2.0×10^4)	(—)
<i>B. longum</i>	YIT 4021	117 (3.5×10^6)	108 (1.2×10^5)	158 (1.2×10^3)
	YIT 4038	110 (2.0×10^6)	93 (4.3×10^4)	100 (1.3×10^3)

^{a)} Percentage of colony count on TOS agar medium to that of BL agar medium

^{b)} Colony count on TOS agar medium

—: <10/ml

Table 7. Colony Count of Bifidobacteria and Lactic Acid Bacteria in Commercial Products

Commercial product	pH	Days after production	Bifidobacteria		Lactic acid bacteria BCP agar
			BL agar	TOS agar	
Fermented milk A (drink type)	5.5	2	$1.2 \times 10^9/\text{ml}$	$1.0 \times 10^9/\text{ml}$	$5.5 \times 10^7/\text{ml}$
		10	1.1×10^8	8.9×10^7	3.0×10^7
Fermented milk B (drink type)	4.3	2	3.5×10^8	2.6×10^8	3.2×10^8
		6	1.7×10^7	2.7×10^7	3.0×10^8
Fermented milk C (yogurt type)	4.3	4	1.2×10^8	1.5×10^8	7.8×10^8
		11	—	1.1×10^7	8.5×10^8
		15	—	1.1×10^8	7.5×10^8
Fermented milk D (yogurt type)	4.6	2	1.1×10^8	1.1×10^8	8.3×10^8
		10	—	1.8×10^8	8.1×10^8
Fermented milk E (yogurt type)	4.3	3	—	4.3×10^6	8.5×10^8
Lactic acid beverage	3.8	2	1.2×10^8	1.0×10^8	4.5×10^8
Bifidus milk A	6.6	10	2.0×10^7	1.8×10^7	3.1×10^7
Bifidus milk B	6.6	10	3.6×10^7	3.0×10^7	3.6×10^7
Bifidus milk C	6.6	10	1.4×10^7	1.1×10^7	2.8×10^7

—: Colonies of bifidobacteria were unable to be distinguished from colonies of lactic acid bacteria.

した *Bifidobacterium* の生菌数を経日的に TOS 寒天培地を用いて測定し、得られた結果を BL 寒天培地に対する検出率で検討した。

Bifidobacterium の生菌数は保存の時間的経過に伴って減少したが、検出率はいずれもほぼ 100% を示した (Table 6)。この結果から、本培地は製造後の時間が経過した製品に対しても、新鮮な製品と同様な精度で *Bifidobacterium* の生菌数が測定できることを示唆した。

5. 市販乳製品中の *Bifidobacterium* の生菌数測定

TOS 寒天培地を用いて、市販の発酵乳製品に含有する *Bifidobacterium* の生菌数を測定し、得られた結果を血液加 BL 寒天培地⁴⁾ のそれと比較した。

pH の低い発酵乳で、製造後の時間が余り経過していない製品では、両培地間においてほとんど差がなかった。しかし、製造後の時間が経過して、あるいは製造直後から *Bifidobacterium* の生菌数が乳酸菌数の 1% 以下であると、BL 寒天培地では多数存在する乳酸菌のコロニーの中から *Bifidobacterium* のコロニーを形態によって分別することは困難であったが、TOS 寒天培地ではそのような製品に対しても容易に測定することができた (Table 7)。

要 約

Bifidobacterium と乳酸菌の混在する発酵乳製品から、*Bifidobacterium* のみを選択的に測定する培地を考案するため、転移オリゴ糖 (TOS) を炭素源とした選択培地について検討した。

1. Hassinen の最少培地を単純化してから、それに炭素源として TOS、窒素源としてトリプトケース及びプロテオースペプトン No. 3 を添加した *Bifidobacte-*

rium の生菌数測定用選択培地 (TOS 寒天培地) を考案した。

2. TOS 寒天培地における *Bifidobacterium* は、供試菌のすべてが直径約 0.8 mm 以上のコロニーを形成した。乳酸菌は、供試27菌株中21菌株はコロニーを形成しなかったが、6菌株だけがピンポイントコロニーを形成した。

3. TOS 寒天培地を用いて、低 pH 酢酸緩衝液の懸濁液及び市販の発酵乳製品から *Bifidobacterium* の生菌数を測定した結果は、いずれも BL 寒天培地を用いてコロニーの形態によって分別測定した値と一致した。

その場合、BL 寒天培地は、*Bifidobacterium* が乳酸菌数の 1% 以下の製品に対しては分別測定することが困難であったが、TOS 寒天培地はそのような製品に対しても選択的に測定できることを確認した。

文 献

- 1) 島田清弘, 馬田三夫, 務台彦彦, 鈴木 昭, 小沼博隆: 食衛誌, **18**, 537~546 (1977).
- 2) 寺口 進, 植原真理子, 小笠勝啓, 光岡知足: 日細菌誌, **33**, 753~761 (1978).
- 3) 寺口 進, 川島拓司, 久保山盛雄: 食衛誌, **23**, 39~44 (1982).
- 4) 光岡知足: 乳技協資料, **32**(6), 15~26 (1983).
- 5) 島村誠一: 同上, **32**(1), 2~15 (1982).
- 6) Sahota, S. S., Bramley, P. M., Menzies, I. S.: J. Gen. Microbiol. **128**, 319~325 (1982).
- 7) 光岡知足, 原 哲郎: ネオシュガー研究会報告, 87~94 (1982).
- 8) Tanaka, R., Takayama, H., Morotomi, M.

- Kuroshima, T., Ueyama, S., Mastumoto, K., Kuroda, A., Mutai, M.: *Bifidobacteria Microflora* **2**, 17~24 (1983).
- 9) Azuma, R., Suto, T.: "Proceedings of the First International Conference on Culture Collections" ed. by Iizuka, H., Hasegawa, T. p. 493~505 (1970) University of Tokyo Press, Tokyo.
- 10) Efthymiou, C., Hansen, P. A.: *J. Infec. Dis.* **110**, 258~267 (1962).
- 11) Hassinen, J. B., Durbin, G. T., Tomarelli, R. M., Bernhart, F. W.: *J. Bacteriol.* **62**, 771~777 (1951).