牛乳および粉乳の腸球菌群に関する研究

IV. 粉乳の主要菌叢としての腸球菌群

(昭和41年9月16日受理)

橋 本 秀 夫*

Studies on Enterococcus Group in Market Milk and Milk Powder

IV. Enterococcus Group as a Predominating Type of Bacterial Flora in Milk Powder

Hideo HASHIMOTO

(Faculty of Fisheries and Animal Husbandry, Hiroshima University:
Midori-cho, Fukuyama, Hiroshima-ken)

Twenty-five samples of spray-dried milk powder obtained from five dairy plants at various districts in Japan in May 1964, and six samples subjected to the previous work (the third report) were examined to clarify the flora of bacteria in them.

The examination of bacterial flora were made by picking all colonies on two or three plates of Plate Count Agar for the colony counts.

The predominating type of bacterial flora in samples from plant A and B was *Bacillus*. However, the type in samples from plant C as well as E, and in samples subjected to the previous work was enterococcus group, and in some cases it was enterococcus group only.

(Received September 16, 1966)

まえがき

乳製品に関する細菌学的研究のうち、粉乳の細菌叢について行なわれた報告も多い。それらによれば、粉乳の主要菌叢として *Bacillus*, *Streptococcus*, *Micrococcus* あるいは *Sarcina* などの名があげられている^{1)~6)}。

われわれは第Ⅲ報⁷⁾において、粉乳の製造工程における腸球菌群の消長を追及して報告した。この実験調査の際、最終段階で生産されてくる粉乳の生菌数検査で、平板培地に出現した全集落を釣菌して調べた結果、それらの大多数のものが腸球菌群に属する集落であることを認め、今までの報告例とは異なる成績を得た。そこで、このような事例が特殊なものなのか、あるいは現在他の工場で生産される粉乳においても一般にみられる現象なのかを調べる目的で、第Ⅰ報⁸⁾と同一の本邦各地の6粉乳工場に再び試料の送付を依頼し、同様の検討を試みたので報告する。

材料および実験方法

検体は第Ⅲ報において供試した脱脂粉乳6例および第Ⅰ報で報告したと同一の、北海道地方2か所、東北、中

国および四国地方各1か所（中部地区工場からの送付は今回なし）の5粉乳工場から、新たに送られて来た5例ずつ（1日1検体5日間採取）の全脂あるいは脱脂粉乳25例の合計31例である。

上記5工場は殺菌方法として、A, B, C 工場では H. T. S. T. 殺菌、E, F 工場では U. H. T. 殺菌処理を行なっている。

送付されて来た粉乳はいずれも昭和39年5月11日～17日の間に製造されたものである。

これらを受領後、直ちに検査に供したのち、残部を室温に保存してさらに製造後3か月目および6か月目にも検査を繰返した。

検査にあたっては、生菌数検査の方法に準拠して検体の10倍希釈液を作り、プレートカウント寒天培地（栄研）2～3枚ずつを用いて35～37°、48時間培養後、発育した全集落を釣菌分離して検討した。すなわち、プレートカウント寒天培地からヒツジ血液寒天培地に分離培養を行ない、レンサ球菌については45°における発育、60°、30分の耐熱性、6.5%食塩培地における発育、BTB Azide Dextrose 培地における発育状況の成績によって腸球菌

* 広島大学水畜産学部：広島県福山市緑町2番17号

群か否かを決定した⁹⁾。腸球菌群以外の菌株についてはグラム染色後、Bergey's Manual (1957)¹⁰⁾、その他^{11) 12)}によって同定を行なった。

一方、1g の段階から、MPN 法によっても腸球菌群の検査を行ない、プレートカウント寒天培地と液体培地 (BTB Azide Dextrose Broth) による本菌群の菌数を比較検討した。

実験成績

1. 製造工程別検査時に採取した粉乳例

第Ⅲ報で報告した粉乳の生菌数は、検体を10倍希釈したのち、プレートカウント寒天培地2枚を用いて算定した成績である。発育した集落を詳しく観察すると、拡散集落が1個もみられず、多くは直径1.5mm程度の独立した集落であった。しかも検体としての乳成分が入っているためか集落の周辺が混濁し、非常に腸球菌に似た性状の集落であった。

そこで本培地に発育している全集落をヒツジ血液寒天培地に分離培養して以後の同定を行なった結果、Table 1の製造後の欄に示すように、6検体12枚の平板培地に出現した合計90個の集落のうち、69個(76.6%)が腸球菌群に属する菌であった。なお、右端のMPNは、同時に選択培地を用いて調べた成績であり、寒天培地による生菌数の成績に合わせて同じレベルの、0.1g 当りに換

算して示したものである。

以上6検体の粉乳の残部を室温に保存して製造3か月後および5か月後にも同様の検査を行なった。

保存検体についてはより詳しく調べるため、1検体当たり3枚ずつのプレートカウント寒天培地を用いて検査を行なった結果、3か月後では18枚の寒天培地に発育した合計147個のうち、129個(87.7%)が腸球菌群であった。5か月後の成績では腸球菌群の占める割合が一層多くなり、合計100集落中90個(90%)を占め、とくにNo. 1および2の検体では、それぞれ3枚の培地に出現した全集落が腸球菌群であった。

2. 送付を受けた粉乳例

1) A工場例

まずA工場例についてみると、その成績はTable 2に示すとおりである。

本例では前項の成績と異なって拡散集落が多く、正確に生菌数の算定ができなかった。集落数のうち()で示した数字は拡散集落出現のため、これ以上計数することができなかったものであり、実数値はいずれもこれより多い。しかしながら、識別できる集落をすべて釣菌分離(拡散集落におおわれたなかから腸球菌群を分離する場合は選択培地による)して腸球菌群か否かを検討した結果、製造後ではA86およびA89例に合計4個、保

Table 1. Number of Enterococci in Milk Powder*1 on Plate Count Agar

Sample No.	After manufacture			3 months after manufacture			5 months after manufacture		
	Colonies per plate*2		MPN 0.1 g	Colonies per plate*2		MPN 0.1 g	Colonies per plate*2		MPN 0.1 g
	Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci	
1	12	10	13	7	3	4.9	9	9	2.4
				5	4		6	6	
	11	8		4	4		3	3	
2	9	7	7	14	11	4.9	8	8	3.5
				10	10		5	5	
	8	6		9	9		4	4	
3	7	6	3.3	8	7	2.4	13	11	3.5
				6	4		4	4	
	7	6		3	2		1	1	
4	11	9	4.6	6	6	3.5	7	7	2.4
				5	5		7	6	
	6	1		4	3		7	5	
5	7	7	7.9	16	16	16	8	8	5.4
				10	8		5	4	
	4	3		7	6		4	3	
6	5	4	3.3	23	21	3.5	5	4	3.5
				8	8		2	1	
	3	2		2	2		2	1	
Total	90	69(76.6%)		147	129(87.7%)		100	90(90%)	

*1: Previous work (the third report)⁷⁾ samples

*2: Dilution (1 : 10)

Table 2. Number of Enterococci in Milk Powder from Plant A on Plate Count Agar

Sample No.	After manufacture			3 months after manufacture			6 months after manufacture		
	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g
	Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci	
A 86	27	0	2.4	(20)	0	0.8	34	0	0.2
	(5)	1		(20)	0		24	0	
	(2)	1		(20)	0		8	0	
A 87	(15)	0	0.3	(20)	0	<0.2	16	0	<0.1
	(3)	0		(20)	0		(13)	1	
	(3)	0		(20)	0		(4)	0	
A 88	19	0	0	(20)	0	0	(12)	0	0
	17	0		(20)	0		(9)	0	
	(3)	0		19	0		6	0	
A 89	15	1	<0.1	19	0	0	23	0	0
	(7)	0		(10)	0		16	0	
	(2)	1		(8)	0		(8)	0	
A 90	(23)	0	0.5	(14)	0	<0.2	34	0	0
	16	0		(10)	0		(9)	0	
	(2)	0		(10)	0		(6)	0	

*: Dilution (1 : 10)

() : Number of countable colonies except disturbed ones by spreaders

Table 3. Number of Enterococci in Milk Powder from Plant B on Plate Count Agar

Sample No.	After manufacture			3 months after manufacture			6 months after manufacture		
	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g
	Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci	
B 86	(14)	0	1.3	(10)	0	0.5	16	0	0.2
	(10)	3		(10)	0		12	0	
	(3)	1		(10)	0		(6)	0	
B 87	14	2	0.8	(10)	0	0.5	21	0	0
	(12)	1		(10)	0		15	1	
	(2)	0		(10)	0		(10)	0	
B 88	19	0	<0.2	(10)	0	0	13	0	0
	13	0		(10)	0		12	0	
	(10)	0		(10)	0		11	0	
B 89	19	0	0.3	(10)	0	0.1	(27)	0	0
	(3)	0		(10)	0		(17)	0	
	(2)	0		(10)	0		(13)	0	
B 90	(15)	0	3.5	(10)	0	<1.3	(8)	0	0
	14	1		(10)	0		(4)	0	
	(12)	0		(10)	0		(3)	0	

*: Dilution (1 : 10)

() : Number of countable colonies except disturbed ones by spreaders

存後では3か月目で0, 6か月目でA 87 例に1個の腸球菌群集落が認められたのみであった。

ただし、選択培地による成績では腸球菌群陽性例が多く、A 86 および A 87 例では製造後6か月目まで、A

90例は3か月目まで、A 89 例は製造後にそれぞれ腸球菌群が陽性であった。しかし、それらの菌数は前項工程別の検体に比べて少なかった。

2) B工場例

本工場例の成績は Table 3 に示すとおりであるが、
A工場例とほぼ同じような結果が得られた。すなわち、
ほとんどの平板が拡散集落によっておおわれ、腸球菌群

は製造後では B 86, B 87 および B 90 の3検体から、わ
ずか8個検出されたのみであった。

保存3か月後は0, 6か月後は B 87 に1個が認められた。

Table 4. Number of Enterococci in Milk Powder from Plant C on Plate Count Agar

Sample No.	After manufacture			3 months after manufacture			6 months after manufacture		
	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g
	Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci	
C 86	21	20	92	11	7	13	5	5	7
	15	14		8	7		2	1	
C 87	7	5	7.9	9	8	4.9	16	0	4.9
	5	5		5	4		7	0	
C 88	10	6	7	4	3	2.3	5	0	<0.1
	9	7		4	2		3	1	
C 89	17	13	24	13	10	4.9	10	6	7
	16	10		9	7		8	5	
C 90	2	1	0.7	2	1	0.2	2	0	0.1
	1	0		1	0		0	—	
Total	103	81 (78.6%)		84	62 (73.8%)		73	26 (35.6%)	

*: Dilution (1 : 10)

Table 5. Number of Enterococci in Milk Powder from Plant E on Plate Count Agar

Sample No.	After manufacture			3 months after manufacture			6 months after manufacture		
	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g
	Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci	
E 82	6	5	4.9	2	2	0.8	1	1	0.3
	5	5		2	1		0	—	
E 83	6	6	4.9	2	2	1.3	2	2	0.3
	4	3		2	0		0	—	
E 84	1	1	3.3	4	2	1.3	1	1	0.5
	1	1		0	—		0	—	
E 85	2	2	3.3	8	1	3.3	2	1	0.2
	1	1		3	2		2	1	
E 86	9	3	2.3	5	3	1.1	0	—	0.3
	7	2		2	1		0	—	
Total	42	29 (69%)		34	16 (47%)		9	6 (66.7%)	

*: Dilution (1 : 10)

Table 6. Number of Enterococci in Milk Powder from Plant F on Plate Count Agar

Sample No.	After manufacture			3 months after manufacture		
	Colonies per plate*		MPN 0.1 g	Colonies per plate*		MPN 0.1 g
	Total colonies	Enterococci		Total colonies	Enterococci	
F 71	2	0	0	0	—	0
	1	0		0	—	
	1	0		0	—	
F 72	1	0	0	1	0	0
	1	0		1	0	
	0	—		0	—	
F 73	1	0	0	3	0	0
	1	0		1	0	
	1	0		0	—	
F 74	2	0	0	0	—	0
	1	0		0	—	
	0	—		0	—	
F 75	1	0	0	0	—	0
	1	0		0	—	
	1	0		0	—	

*: Dilution (1 : 10)

選択培地による MPN の成績では、製造後では 5 例すべて、3 か月後では 4 例が陽性であったが、6 か月後では B 86 のみが腸球菌群陽性であった。

3) C 工場例

本例の検査成績は Table 4 に示される。本例は前 2 者同様、H. T. S. T. 殺菌を行なっている工場例であるにもかかわらず、腸球菌群の出現状況は A, B 両工場例とは異なり、むしろ最初の工程別の検体と似た結果を示した。

すなわち、拡散集落が少なく、あっても集落の算定には支障がなかった。しかも腸球菌群は 5 例とも陽性で、製造後は合計 103 集落のうち、81 個 (78.6%) を占めていた。ただし、3 か月後で 62/84 (73.8%)、6 か月後で 26/73 (35.6%) と腸球菌群の全集落中に占める比率が次第に低くなる点では、工程別の検体例とは少し異なった。

選択培地による MPN の成績では全例陽性であった。

なお、6 か月目 C 87 例の集落数のうち、16 個というのは少しばかり異常であり、本数値は操作の誤りによる雑菌の混入が疑われる。

4) E 工場例

D 工場例は都合により検体の送付がなかったため、E 工場例の成績を Table 5 に示す。本例は U. H. T. 殺菌を行なっている工場製品である。

Table 5 に示されるごとく、本例も C 工場例および最初の工程別の検体例と同様に腸球菌群が多く、製造後の E 84, 85 の例では、出現した全集落が腸球菌群であった。合計した成績では、製造後で 69% (29/42)、3 か月後で

47% (16/34) が腸球菌群で占められた。また 6 か月後では、平板に発育する集落数そのものが大いに減少したが、E 82, 83, 84 例のごとく、発育した集落のすべてが腸球菌群で占められており、その出現率は 66.7% (6/9) を示した。

一方、MPN の成績では菌数は少ないながら全例が腸球菌群陽性であった。

5) F 工場例

最後に F 工場例の成績を Table 6 に示す。本例では生菌数そのものがきわめて少なく、また腸球菌群は分離培養および選択培地による成績においても、すべて陰性であった。したがって検査は 2 回で中止した。

ちなみに本工場由来の粉乳は、第 I 報⁹⁾でも述べたごとく、試験の対象となった 6 工場例中、最も生菌数が少なく、また腸球菌群の検出率も低かったものである。

3. 生菌数検査用培地に出現した粉乳の細菌叢

以上の成績のごとく C, E 工場例では腸球菌群が主要菌叢であったが、A, B 工場例では拡散集落が多かった。

そこで、腸球菌群以外の集落はどのような菌種によって占められているかを調べるため、その他の分離菌についても同定を行なった。その成績は腸球菌群も含めて示すと Table 7 のとおりである。

試験株は製造後の検査時にプレートカウント寒天培地に発育した全集落から分離したものである。しかし、拡散集落におおわれた培地からは全集落が分離できなかったし、また検査の途中で死滅した株もあり、結局 96 株 (腸球菌群も含めて合計 308 株) について同定試験を行な

Table 7. Bacterial Flora of Milk Powder in Each Plant

Plant	A	B	C	E	F	(G)*	Total
No. of strains examined	38	27	95	39	9	100	308
<i>Enterococcus</i>	4	8	81	29	—	90	212
<i>Bacillus</i>	30	15	12	3	2	1	63
Gram-positive rods	4	2	—	3	1	—	10
<i>Corynebacteriaceae</i>	—	—	—	1	2	5	8
<i>Micrococcus</i>	—	—	1	2	3	1	7
<i>Ga. ffkya</i>	—	—	—	1	1	2	4
Gram-negative rods	—	2	1	—	—	—	3
<i>Staphylococcus</i>	—	—	—	—	—	1	1

*: Previous work (the third report)⁷⁾ samples

H. T. S. T. pasteurization plant (A, B, C), U. H. T. pasteurization plant (E, F, (G))

った。なお、Table 7 の右側 G 欄の例は、第Ⅲ報の工程別の粉乳由来株であり、しかも本例のみは5か月後の検査時に分離したものである。

Table 7 から明らかなように、グラム陰性菌が少なく、わずか3株のみでその他はすべてグラム陽性菌であった。

一般的にみて、A, B, C 工場例では *Bacillus* が多く、E, F, G 例では *Bacillus* 以外に各種の菌が平均して出現している傾向がみられた。しかし、これらの出現菌叢の違いは、A, B 工場例からの菌分離にあたって、拡散集落出現のため全集落を分離できなかった点も考慮する必要がある。

いずれにせよ、A, B 工場例では *Bacillus* が、C, E および G 工場例では腸球菌群が主要菌叢であった。

考 察

粉乳に存在する主要菌叢として従来の報告では、*Bacillus*, *Micrococcus*, *Sarcina* の他に *Streptococcus* の名もあげられている。

Streptococcus が生乳あるいは殺菌乳の主要菌叢であるという報告¹³⁾¹⁴⁾も多く、したがって粉乳にも存在することは当然考えられる。また、*Streptococcus* が多かったという報告例では腸球菌群に属する菌を含めている場合も多い。しかしながら、それらの多くは生菌数の多い粉乳例についての、しかも分離培養での成績である。Galesloot¹⁵⁾ は 1g 当り 5,000 個以上の菌数を示した粉乳の細菌叢の研究で *Str. durans* が大いに関係していたと述べている。

さて、今回の例は生菌数がいずれも300以下と少なく、また生菌数検査用培地を用いての全集落についての検査成績であり、その結果は腸球菌群が主要菌である例が観察された。しかも、そのような例は、たまたまある検体にみられたというのではなく、検査した5日間の検体すべて、換言すると工場によっては毎日生産されるすべて

の粉乳にそのような傾向のあることが示される成績であった。

乳製品の細菌叢に最も大きな影響を与える因子としては、原料乳の品質はさて置き工場に受入れてからは、殺菌機の性能と製造工程における殺菌機以後に属する各種機器類あるいはパイプなどに対する洗浄と殺菌の良否が大きく関係する。

すなわち、殺菌方法に関しては従来の L. T. L. T. 殺菌方式から、H. T. S. T. 殺菌あるいは U. H. T. 殺菌と進んできたことが、乳製品の細菌叢にも大きな変化をもたらしたものと推定される。このように殺菌効率が上がるにつれて、もし殺菌機以後に属するパイプ、機器類の洗浄殺菌が不十分であれば、むしろこれらが殺菌後の二次汚染として大きく作用し、最終製品の細菌叢形成に影響を与えるであろう。

さて、腸球菌群が主要菌型という事例を示す検体がみられたことから、このような粉乳が他にもあるかどうかを調べるため、生産地を異にし、また殺菌方法の異なる各地の粉乳製品について同様な検査を試みた。その結果、やはり従来の報告同様 *Bacillus* が主要菌型の例もみられたが、H. T. S. T. 殺菌方式を採用している3工場例と、U. H. T. 殺菌方式の2工場例のうち、それぞれ1工場ずつの粉乳に腸球菌群が主要菌型として認められた。しかも、このような検体例のなかには、生菌数検査用培地に発育した集落がすべて腸球菌群のみという事例さえ多数認められた。このような現象は乳製品の細菌学の立場からみても、きわめて興味深い事がらである。

なお、固型培地による腸球菌群の菌数と、液体培地による腸球菌群の MPN の比較では、一般に後者の方の菌数が多かった。これは生菌数の検査で、たとえば平板培地3枚を使用した場合、検体の実量が10倍希釈液からはじめて3枚分2段階で合計 0.33g となるのに対し、液体培地5本ずつを使用し、1g の段階からはじめて今回

の MPN の方の検体実量は 5.5 g 以上を要したことから、このような差がでたものと考えられる。

以上、各検体から出現した腸球菌群の由来は、前報⁷⁾の実験例からみて、とくに U. H. T. 殺菌を行なっている工場製品では、殺菌後の工程における機器系統からの汚染が大と推定される。しかしながら、これらの粉乳の生菌数は非常に少なく、腸球菌群が主要菌型であった C, E 工場製品は、*Bacillus* が主要菌型であった A, B 工場製品に比べて、単に生菌数という点からみるならば、むしろ菌数のより少ない、もちろん現行の乳製品の成分規格をはるかに下回る良好な製品であった。

腸球菌群に属する菌種のうち、あるものは乳酸菌製剤として、あるいはかつてスターター¹⁰⁾としても試験されたことがある一方、ある場合には食中毒の一原因菌として、またある場合には汚染指標菌として検討が行なわれてきた。とくに汚染指標菌としての意義については、われわれも主張してきたとおりである¹⁷⁾。

しかしながら、粉乳からこのように腸球菌群が検出され、しかも菌数そのものがこの程度である限り、もちろん数は少なくとも細菌学的に厳密に考えるならば、殺菌後の汚染が疑われるのであるが、ともかく現今の粉乳の製造水準からみて、腸球菌群が主要菌叢であった C, E 工場製品が、A, B 工場の製品に比べて衛生的な品質が劣っていたとは考えられない。すなわち、現時点では、汚染指標菌としての大腸菌群が陰性で腸球菌群のみが検出される粉乳では、必ずしも不良な製品とは認められないものと思われる。

ただし、一方では F 工場例のごとく、腸球菌群も陰性で、生菌数そのものも非常に少ない製品例もあることから、いずれは粉乳製品が、この水準にまでいくことが望ましいことは当然であろう。

要 約

第Ⅲ報において報告した粉乳と、新たに本邦各地の 5 工場から集められた粉乳合計 31 例について、生菌数検査用培地に発育した集落の成績から、細菌叢について検討した。

その結果、従来の報告例同様 *Bacillus* が主要菌叢の例もみられたが、第Ⅲ報の工程別の粉乳例および H. T. S. T. 殺菌方式と U. H. T. 殺菌方式の各 1 工場由来の合計 16 例の粉乳検体では、すべて腸球菌群が主要菌叢であった。しかも、これらの例のうちには、プレートカウント寒天培地に発育した全集落が腸球菌群のみという例

すらみられた。

従来の報告にはみられなかった、このような細菌叢のありかたには、現行の殺菌方法と殺菌機以後に属する器具類に対する洗浄、殺菌の良否が関係しているのであろう。

終わりに当って、粉乳試料を提供していただいた雪印、明治、森永の各乳業会社に対して感謝の意を表する。

本報の要旨は第 59 回日本獣医学会(昭和 40 年 4 月 6 日、東京)において発表。

文 献

- 1) G. C. Supplee, V. J. Ashbaugh: J. Dairy Sci. 5, 216 (1922).
- 2) A. A. Nichols: J. Dairy Res. 10, 202 (1939).
- 3) C. Higginbottom: ibid. 13, 308 (1944).
- 4) C. Higginbottom: ibid. 15, 285 (1948).
- 5) B. W. Hammer: "Dairy Bacteriology" 3rd Ed. p. 333 (1952) John Wiley & Sons, Inc. New York.
- 6) E. M. Foster, F. E. Nelson et al.: "Dairy Microbiology" p. 254 (1958) MacMillan & Co., Ltd. London.
- 7) 橋本秀夫, 川上英之: 食衛誌. 6, 506 (1965).
- 8) 橋本秀夫, 伊藤 烈, 池辺慶三: 同上. 4, 300 (1963).
- 9) 橋本秀夫: メディヤサークル No. 41, 111 (1963).
- 10) R. S. Breed, E. G. D. Murray, N. R. Smith: "Bergey's Manual of Determinative Bacteriology" 7th Ed. (1957) Williams & Wilkins Co., Baltimore.
- 11) 坂崎利一, 波岡茂郎: "腸内細菌検査法" (1956) 納谷書店.
- 12) 東 量三: New Food Industry 4 (9), 67; 4 (10), 61 (1962).
- 13) J. M. Sherman, C. F. Niven: J. Inf. Dis. 62, 190 (1938).
- 14) H. Alexander, C. Higginbottom: J. Dairy Res. 20, 156 (1953).
- 15) T. E. Galeslout: Neth. Milk Dairy J. 9, 194 (1955) [Dairy Sci. Abst. 18, 329 (1956)].
- 16) A. C. Dahlberg, F. V. Kosikowsky: J. Dairy Sci. 31, 275 (1948).
- 17) 橋本秀夫: 広大水畜産. 3, 503 (1961).