

## 生乳中の酵母検出率と酵母数の季節変動

仙田晶嗣・中村 正<sup>1</sup>・浦島 匡<sup>1</sup>・荒井威吉<sup>1</sup>

岩手大学大学院連合農学研究科, 盛岡市 020-8550

<sup>1</sup> 帯広畜産大学畜産科学科, 帯広市稲田町 080-8555

(2003. 4. 26 受付, 2003. 7. 28 受理)

**要 約** 生乳中の酵母の動態を明らかにすることを目的として, 帯広畜産大学と近郊の酪農家3戸で飼養している健康なホルスタイン種乳牛(体細胞数  $1 \times 10^5$  cfu/ml 以下)の乳頭表皮, 分房乳, バルク乳およびローリー乳中の酵母数の月別変動について調べた。各試料は1999年7月から2000年6月までの1年間, それぞれ毎月1回ずつ採取した。生乳中の酵母の検出率と平均酵母数はそれぞれ順に, 乳頭表皮では70.1%, 52 cfu/cm<sup>2</sup>, 分房乳は47.9%, 1.8 cfu/ml, バルク乳は100%, 28 cfu/ml およびローリー乳では100%, 66 cfu/ml であった。乳頭表皮および各種類の生乳中において90%以上を占める酵母数の水準は, 乳頭表皮が150 cfu/cm<sup>2</sup>以下(90.8%), 分房乳が10 cfu/ml以下(94.4%), バルク乳が100 cfu/ml以下(97.8%) およびローリー乳が150 cfu/ml以下(91.7%) であると考えられた。生乳中の酵母数は夏から秋期に高く, 冬から春期に低くなる季節的な変動傾向が認められた。健康な乳牛の分房乳中では, 主な乳房炎起因菌(*C. parapsilosis*, *C. lambica*, *C. catenulata*, *C. rugosa*)は夏期に検出されたが, 冬から春期には検出されなかった。

日本畜産学会報, 74(4): 517-523, 2003

乳製品の製造では一部の特定な酵母菌種がスターターなどに利用される。チーズの種類によって酵母菌叢は変動するが *Kluyveromyces marxianus*, *Kl. lactis*, *Debaryomyces hansenii*, *Candida kefyr* などが優勢であり (Ramanoら2001), 乳糖発酵性を示さない *Saccaromyces cerevisiae* なども水牛乳のチーズ (Ramanoら2001) や伝統的自然発酵乳のラバン (荒井ら2002a) などから検出され, 独特の風味形成などに関与していると推定される。しかしヨルダンなど中近東地域の伝統的自然発酵乳から作られるラブネ (labneh) では酵母がガス生成, 酵母臭の発生などの品質劣化の原因になる (YamaniとAbu-Jaber 1994)。チーズ熟成中にスターター乳酸菌は減少するが, 酵母は主にブラインと製造装置の表面から汚染され, 熟成30日では1gあたり  $10^6 \sim 10^8$  の酵母数 (colony forming units: 以下 cfu と記載する) に増加する (WelthagenとViljoen 1998) ことなどから, 一般に酵母は品質劣化との関連が強いと考えられる。

原料牛乳 (以下生乳と記載する) 中で酵母は lactococci, lactobacilli, pseudomonad とともに見いだされる。フランスのバルク乳中の酵母数は  $10^6 \sim 10^8$  cfu/ml の範囲で変動しており, 酵母数水準は酪農家ごとに異なっている (DesmauresとGueguen 1997)。バルク乳中にグラム陰性細菌などが混入する要因は, 乳牛の乳頭表皮, 乳頭口, 乳房炎罹患分房, ミルカーユニットやパイ

ブラインなどの搾乳器具とその洗浄水などである (JayaraoとWang 1999)。バルク乳中に酵母が混入する要因も同様と考えられるが, その他サイレージなどの飼料 (Engel 1986), 牛床 (HoganとSmith 1997), 牛舎環境 (SutherlandとMurdoch 1994) などの影響も考えられる。また, 生乳中の細菌の季節変動は菌種によって異なるが, 酵母も菌種によって生理的性質が多様であり, 気温や環境その他の条件の影響を受けて特徴のある季節変動を示すことが推測される。

そこで本研究では, 生乳中における酵母の動態を明らかにするために, 健康な乳牛個体の乳頭表皮, 分房乳, バルク乳およびローリー乳における酵母数および分房乳中の酵母菌種の季節変動について明らかにすることを目的とした。

### 材料および方法

#### 1. 調査期間および供試牛, 供試乳

帯広畜産大学附属畜産フィールド科学センターおよび近隣の酪農家3戸で飼養されているホルスタイン種乳牛の牛群を用いた。この4牛群から無作為に生乳中の体細胞数 (Somatic Cell Count: 以下 SCC と記載する) が  $1.0 \times 10^5$ /ml 以下の健康な乳牛を3頭ずつ選抜した。選抜された健康な乳牛の乳頭表皮と分房乳, バルク乳およびローリー乳の試料は1999年7月から2000年6月までの

連絡者: 荒井威吉 (fax: 0155-49-5577, e-mail: arai@obihiro.ac.jp)

1年間、それぞれ毎月1回採取した。

## 2. 試料採取

各酪農家の朝搾乳時に立ち会い、乳頭表皮試料はあらかじめ選抜された健康な乳牛から1分房ずつを無作為に選び、スワブ法を用いて乳頭先端部表皮4 cm<sup>2</sup>を拭き取って10 mlの0.85%滅菌生理食塩水で希釈した。分房乳試料は乳頭表皮を70%エタノール綿で殺菌した後、前搾り乳約10 mlを滅菌試験管に直接搾り入れた。各酪農家のバルク乳試料は、搾乳作業終了直後に滅菌ピペットを用いて直接バルクタンクから約30 mlを滅菌試験管に採取した。ローリー乳試料は、各酪農家のバルク乳を集乳したタンクローリー車から工場受入の直前に滅菌ピペットを用いて約30 mlを滅菌試験管に直接採取した。採取した試料は氷水中で冷却保存して研究室に運び、ただちに試験に供した。

## 3. 酵母の検出および同定

酵母検出用培地は0.01%クロラムフェニコール(和光純薬(株),大阪)添加(高田正樹1986)ポテトデキストロース寒天培地(栄研化学(株),東京)(以下PDAと記載する)を用いた。試料は0.85%滅菌生理食塩水で10倍段階希釈し、ペトリ皿内で各段階希釈試料とPDAを混釈し、30°Cで3日間好氣的に静置培養した。酵母数はコロニー計数器(菅垣医理工工業(株),東京)を用いて、ピンポイントコロニーまでを計測した。計測に用いたPDA平板からコロニー30前後を釣菌してスライドグラス上に火炎固定し、メチレンブルーで単染色した後鏡検して、酵母と細菌またはカビの判別を行った。

酵母菌株は、酵母数を計測した平板から釣菌し、PDA平板を用いた画線塗抹法により純粋分離を行った。純粋分離した酵母菌株について、形態的性状を鏡検法で観察し、糖類の発酵性および資化性などの生理的性質を試験管法とAPI 20C AUX (bioMerieux, Lyon, France)を用いて調べ、Kreger-van Rij (1984)のThe yeast-a taxonomic study- (third edition)に基づいて菌種の同定を行った。

## 結果および考察

### 1. 酵母の検出率

体細胞数 $1.0 \times 10^5$ /ml以下の健康な乳牛を対象として、乳頭表皮、分房乳、バルク乳およびローリー乳中の酵母数を測定し、その検出率を図1に示した。酵母の平均検出率と月別の検出率の範囲はそれぞれ順に、乳頭表皮では70.1%と40.0~100%、分房乳では47.9%と16.7~83.3%であった。一方バルク乳およびローリー乳ではすべてから酵母が検出され、検出率はそれぞれ100%であった。乳頭表皮と分房乳中における酵母の棲息状態は乳牛個体ごとに異なっていた。しかし両者の月別の酵母検出率は、7月から12月が乳頭表皮では40~100%(平均77.5%)、分房乳中では16.7~83.3%(平均52.8%)で夏期から初冬期にかけて高く、1月から6月は順に42.9

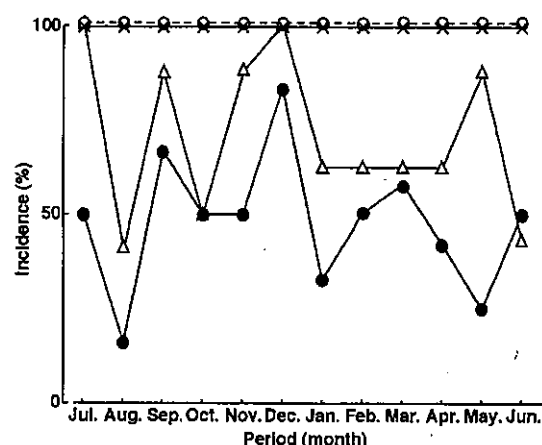


Fig. 1. Changes of the incidence (%) of yeasts in the teat Milk (●), bulk milk (✖), lorry tank milk (○) and in the teat surface (△) in each month from July 1999 to June 2000.

~87.5% (平均63.4%)と25.0~58.3% (平均43.1%)で厳寒期から春期にかけて低くなったが、各月ごとの両者の検出率の差はおおむね10~20%の範囲にあり、月別推移には類似した傾向が認められた。乳頭表皮および分房乳などからバルク乳に混入した酵母がローリー乳中へ移行するので、酵母の混入する機会と酵母数は乳量規模が大きくなるたびに増加する傾向が認められる。細菌は全ての乳頭表皮または分房乳中から検出される(荒井ら2002b)が、本研究において酵母はすべての乳頭表皮と分房乳中から検出されるのではなく偏在している特徴が認められた。

Morettiら(1998)の報告によると、イタリアで病原性微生物に感染していない泌乳牛は70.3%で、その平均SCCは $1.6 \times 10^5$ /mlであったが、病原性酵母に感染した個体乳は4.4%(平均SCCは $3.0 \times 10^5$ /ml)、酵母と細菌に感染した個体乳は4.9%(平均SCCは $1.9 \times 10^6$ /ml)であった。この非感染牛のSCC水準は、本研究で健康な乳牛の条件として分房乳中のSCCを $1.0 \times 10^5$ /ml以下に設定したと良く符合している。本研究による健康な乳牛の分房乳中の酵母検出率47.9%は、Morettiら(1998)の報告、およびベルギーの正常な泌乳牛183頭における酵母検出率24%(Legneauら1996)と比較して、2倍以上の高い検出率であった。これらの差異は、それぞれの研究対象が健康な乳牛と乳房炎感染牛、または一般酵母数と病原性酵母数などで、測定した酵母菌叢が異なっているためと考えられた。

### 2. 分房乳中の酵母菌種

ベルギーで乳房炎感染分房の55%から検出された酵母の菌種は*C. kefir* (23%), *C. catenulata* (19%), *C. lambica* (14%)など特定の乳房炎起因菌のみに限定され

ているが、正常分房の24%から検出される酵母の菌種は *C. parapsilosis* (0.2%), *C. tropicalis* (0.2%), *Trichosporon asahii* (0.2%), *Cryptococcus laurentii* (5.9%) など乳房炎起因菌を含む16種類以上の多種に及ぶ (Legneauら1996) ので、明らかに両者の酵母菌叢には差異が認められる。イタリアで酵母が起因菌となる乳房炎は慢性乳房炎の1~4%で、臨床型乳房炎の25%以上になるケースがあり、臨床症状を示さない分房乳の9%からも酵母が検出された (Morettiら1998)。ニューヨークと北部ペンシルバニアにおける乳房炎の起因菌は *Streptococcus agalactiae*, *Staphylococcus aureus* とその菌属だけで感染分房の75%以上を占め、酵母が起因菌となる乳房炎の発生率は0.6%と低いが、それによる経済的な損失額は極めて大きい (Wilsonら1997)。またニューヨーク周辺で感染分房から分離された酵母の78%は *Candida* 属の11菌種であったが、検出率が優位な *C. tropicalis* (42%) と *C. rugosa* (14%)、および *C. parapsilosis* (2.2%), *C. albicans* (4.4%), *Cr. lactativorus* (1.1%) を分房に接種した結果、確実に乳房炎感染を引き起こすことが確認された (Richardら1980)。

本研究で分房乳中から分離した酵母の菌種同定を行い、主な乳房炎起因菌の *C. parapsilosis*, *C. lambica*, *C. catenulata*, *C. rugosa* の4菌種を病原性酵母群とし、その他を非病原性酵母群としてそれらの出現率をみると、病原性酵母群の出現率は夏期に高く、非病原性酵母群の出現率は冬期に高い傾向が認められた (図2)。そこで夏期 (7~9月) と冬期 (1~3月) の菌種別出現率をみると、病原性酵母4菌種は夏期に出現し、*Geotrichum candidum*, *Tr. cutaneum* などは夏期、冬期ともに出現してお

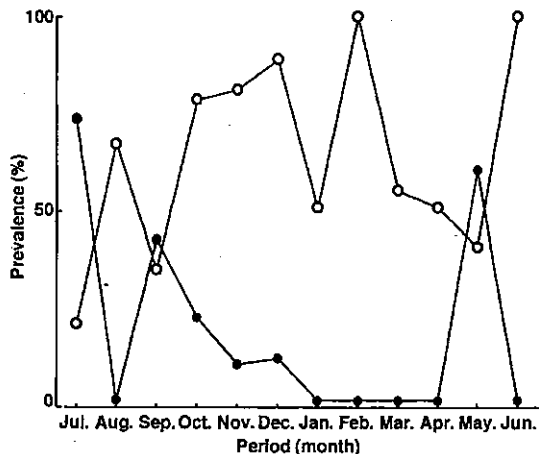


Fig 2. Changes of the incidence (%) of pathogenic yeasts (●) concerning mastitis and non-pathogenic yeasts (○) in the teat milk of healthy Holstein cows in each month from July 1999 to June 2000.

り、その他の酵母菌種は冬期を中心に出現する傾向が認められた (図3)。Engel (1986) はドイツのバルク乳中から *C. curvata* (38%), *C. famata* (11%), *G. candidum* (17%), *Tr. cutaneum* (17%) などを検出しており、飼料の主要な酵母としてサイレージや牧草から *C. lambica* (17~50%), *G. candidum* (17~23%), *C. krusei* (10~19%) など、コーンサイレージから *S. cerevisiae* (18%) などを検出したが、生乳中の酵母菌種と共通するものは少なく、季節によって給与する飼料の種類が変わっても生乳中の酵母菌叢はあまり変化しないと報告している。本研究では分房乳中の酵母菌叢に季節変動が認められており、各地で生産される生乳中の酵母菌叢には明らかに地域特異性があると推察された。

### 3. 生乳中の酵母数

分房乳、バルク乳およびローリー乳中の酵母数の月別平均とその範囲の推移を図4に示した。分房乳中の酵母数の月別平均とその範囲は、最高が8月の9.4 cfu/ml (0~11 cfu/ml) で、最低が2月の1.0 cfu/ml (0~2 cfu/ml) となり、夏期に高く冬期に低くなる季節変動が認められた。バルク乳では、最高は4月の41 cfu/ml (15~340 cfu/ml) で、最低は1月の4.7 cfu/ml (1~60 cfu/ml) となり、その他の月は20 cfu/ml 前後の推移を示した。ローリー乳中の月別平均酵母数は、最高が7月の100 cfu/ml (80~130 cfu/ml) で、最低は4月の17 cfu/ml (4~110 cfu/ml) であった。また分房乳、バルク乳およびローリー乳中の各月ごとの酵母数はそれぞれ分布の範囲が広く、それらの変動の幅はかなり大きいことが認められた。分房

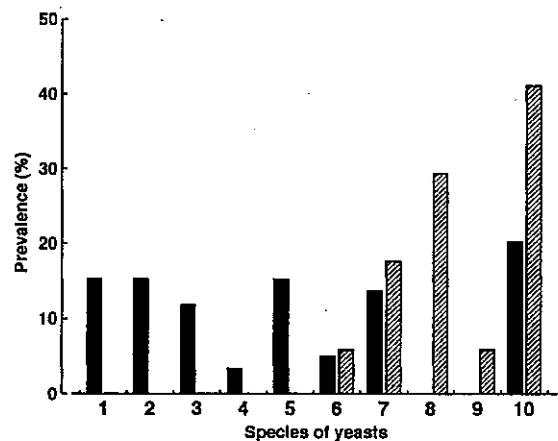


Fig 3. Prevalence (%) of each species of pathogenic and nonpathogenic yeasts concerning mastitis in the teat milk in summer (■) and winter (▨).

Each number represents the following yeast species ; 1. *C. parapsilosis*, 2. *C. lambica*, 3. *C. catenulata*, 4. *C. rugosa*, 5. *C. peltata*, 6. *G. candidum*, 7. *Tr. cutaneum*, 8. *C. glabrata*, 9. *C. humilis* and 10. Unidentified.

乳中の酵母数は夏期に高く冬期に低い季節変動を示し、またバルク乳中の平均酵母数は全体として、夏期の7月から9月の各月平均が16 cfu/ml～29 cfu/mlで高く、冬期の12月から3月の各月平均が4.7 cfu/ml～13 cfu/mlで低くなる傾向の季節変動を示すことが明らかにされた。ただし農家ごとのバルク乳では夏期よりも冬期に酵母数が増加する事例がみられ、混入した酵母の量（酵母数）とその菌種などは酪農家ごとの搾乳や生乳の貯乳管理における衛生的な取り扱い技術の習熟度に依存していることが考えられた。

フランスのバルク乳の酵母数は $10^0 \sim 10^4$  cfu/mlであったが、酪農家ごとの月別推移は多様で、年間をとおして $10^0 \sim 10^2$  cfu/mlで低いか、常に $10^3$  cfu/ml以上で高

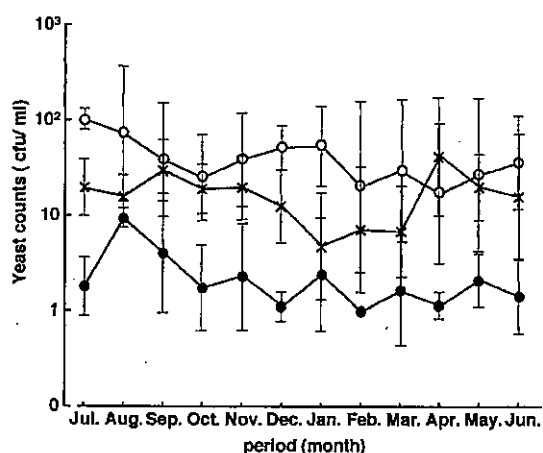


Fig. 4. Changes of the yeast counts in the teat milk (●), bulk Milk (×) and lorry tank milk (○) in each month from July 1999 to June 2000.

い推移、または夏に $10^2$  cfu/ml以下で低く冬に $10^3 \sim 10^4$  cfu/mlと高いか、夏に $10^3 \sim 10^4$  cfu/mlで高く冬に $10^2$  cfu/ml以下と低くなる推移などの傾向がみられ、一定の季節変動は認められなかった(DesmauresとGueguen 1997)。またバルク乳中の細菌数の変動は飼養形態と密接な関係があり、放牧を行う夏期は低いが舎飼いを行う冬期は高くなるという季節変動が認められている(McKinnonら1990)。放牧から舎飼いに移すと牛体密集度が高まり、乳房炎などの病原性微生物に感染する機会と頻度が増加することなどが考えられ、乳牛が各種ストレスを受ける時期や季節は飼養形態によって異なる。本実験では放牧より牛体密集度が常に高い舎飼いが中心で飼養形態の差が小さいため、バルク乳中の酵母数の月別変動には、主として乳牛の周囲環境に棲息する酵母数が影響し、その水準と季節変動が反映されていると推測された。

生乳中の酵母数の平均は、分房乳が1.8 cfu/ml (0～41 cfu/ml)、バルク乳が28 cfu/ml (1～340 cfu/ml)、およびローリー乳が66 cfu/ml (2～360 cfu/ml)であった(表1)。これらに分房乳の平均酵母数と比較すると、バルク乳では約16倍、ローリー乳では約37倍であった。この酵母数の増加には、生乳を取り扱う作業回数と作業内容が反映されていると考えられた。またローリー乳中で検出された各月ごとの最大の酵母数は年間をとおしてあまり変わらず、おおむね類似した酵母数水準で推移することが認められた。したがってローリー乳に多量の酵母(酵母数)が混入する機会とその汚染要因は、生乳の周囲環境に常に存在していると考えられた。とくにローリー乳中の酵母数水準は、主として当該ローリーの集乳対象となったすべての酪農家が行っている搾乳作業とバルク設

Table 1. Prevalence of yeast counts in teat milk, bulk milk, lorry tank milk and teat surface

Distribution of counts	Teat milk (n=144) <sup>*1</sup>	Bulk milk (n=46) <sup>*1</sup>	Lorry tank milk (n=36) <sup>*1</sup>	Teat surface (n=87) <sup>*1</sup>
1. Yeast counts <sup>*2</sup>	Percent			
0 ≤ 10	94.4	34.8	16.7	59.8
11 ≤ 30	4.2	45.6	22.2	12.5
31 ≤ 50	1.4	8.7	13.9	5.8
51 ≤ 100	0	8.7	25.0	11.5
101 ≤ 150	0	0	13.9	1.2
> 150	0	2.2	8.3	9.2
2. Range <sup>*2</sup>	0～41	1～340	2～360	0～700
3. Mean <sup>*2</sup>	1.8	28	66	52

<sup>\*1</sup>: Figures in parenthesis indicate the number of each kind of raw milk samples and teat surface samples examined.

<sup>\*2</sup>: Yeast counts are shown as follows: Three kinds of raw milk samples are cfu/ml, and the teat surface sample is in cfu/cm<sup>2</sup>.

置場所、牛乳処理室などの環境およびその他の衛生管理の程度、およびローリー集乳における衛生的な集乳作業の程度に依存していると考えられた。

乳頭表皮における月別の平均酵母数は、最高が7月の120 cfu/cm<sup>2</sup> (50~300 cfu/cm<sup>2</sup>) で、最低は1月の5 cfu/cm<sup>2</sup> (0~18 cfu/cm<sup>2</sup>) であり、平均酵母数は52 cfu/cm<sup>2</sup> (0~700 cfu/cm<sup>2</sup>) であった (図5)。乳頭表皮に棲息する酵母数の月別変動は、分房乳中の酵母数の変動と同様に全体として夏から秋期に高く、冬から春期に低くなる傾向が認められたが、各月ごとの酵母数の変動の範囲は非常に大きかった。乳頭表皮における酵母検出率と平均酵母数は70.1%と52 cfu/cm<sup>2</sup>であったが、分房乳ではそれぞれ順に47.9%と1.8 cfu/ml となり、乳頭表皮と比較して極めて低い傾向が明らかになった。このことから乳頭口から分房内への酵母や細菌の侵入は、乳牛の感染防御機構の作用とともに、搾乳時の乳頭の洗浄と消毒 (荒井ら2002b)、プレディッピング (Pankey 1989)、ポストディッピング (Oliverら1999) などの搾乳技術と衛生的な管理を実践することによって効果的に抑制できると考えられた。

日本では生乳中の細菌数は一般に夏期に増加し、冬期に低下する傾向を示している (笹野ら1997)。一方乳頭表皮に棲息する細菌では、中温菌や高温菌などは夏期に高く冬期に向かって減少するが、低温菌は逆に夏期に低く冬期に向かって増加する傾向が認められている (荒井ら2002b)。また乳房炎の起病因菌数や感染率は夏期に増加する傾向があり (Todhunterら1995)、*Tr. beigellii* などの酵母に感染するとバルク乳中の細菌数は高くなる傾向が認められる (Gonzalezら2001)。本研究で健康な乳牛の分房乳中においても、夏期には *C. parapsilosis*, *C. lambica*, *C. catenulata*, *C. rugosa* などの乳房炎起病因菌と

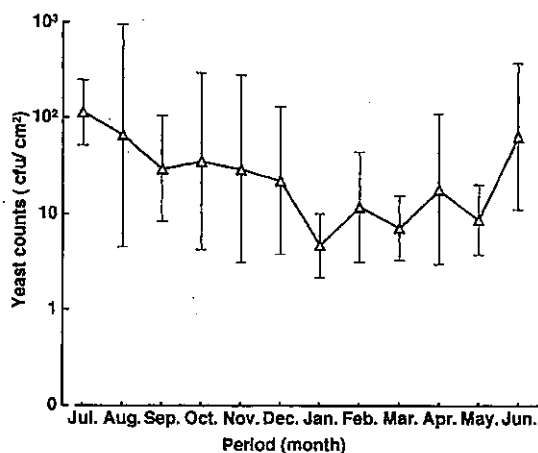


Fig. 5. Changes of the yeast counts in the teat surfaces of healthy Holstein cows ( $\leq 1 \times 10^5$  somatic cells/ml) in each month from July 1999 to June 2000.

なる酵母がそれぞれ3~15% 検出されたので、乳頭表皮などに棲息している酵母の一部は、乳房炎感染の要因として関与している可能性が示唆された。

#### 4. 生乳中の酵母数の分布

乳頭表皮、分房乳、バルク乳およびローリー乳中の酵母数の分布を表1に示した。分房乳では10 cfu/ml 以下の比率が94.4%であった。バルク乳では30 cfu/ml 以下の酵母数の少ない区分に80.4%分布していたが、31~50 cfu/ml および51~100 cfu/ml にそれぞれ8.7%ずつ分布しており、100 cfu/ml 以下の区分で全体の97.8%を占めた。Desmauresら(1997)は、フランスのノルマンジー地方でカマンベールチーズを生産するための良質バルク乳中の酵母数は100 cfu/ml 以下が75%であったと報告している。この酵母数水準と比較すると、本研究におけるバルク乳中の酵母数は80.4%が30 cfu/ml 以下の区分に分布しており、生乳中の酵母数は極めて低い水準にあることが明らかにされた。ローリー乳中の酵母数は10 cfu/ml 以下、11~30 cfu/ml、31~50 cfu/ml、51~100 cfu/ml、101~150 cfu/ml の各区分にそれぞれ約20%ずつ分布しており、150 cfu/ml 以下の区分が91.7%であった。ローリー乳では、酵母が特定の酵母数区分に偏在する傾向は認められず、広い範囲におおむね均等に分布する特徴がみられた。

乳頭表皮の酵母数は10 cfu/cm<sup>2</sup> 以下の区分に59.8%、11~30 cfu/cm<sup>2</sup> に12.5%、31~50 cfu/cm<sup>2</sup> に5.8%が分布しており、150 cfu/cm<sup>2</sup> 以下の区分が90.8%を占めた (表1)。乳頭表皮で検出された酵母数は、酵母数の少ない区分に多く分布する傾向を示したが、その水準は、乳牛や乳房周辺に棲息している酵母数の範囲を反映していると考えられた。乳頭表皮の酵母は、乳牛の感染防御機構の作用やポストディッピング (Oliverら1999) などによって分房内への侵入が制限されるので、分房乳への酵母侵入の機会と比べて、搾乳作業や畜舎環境からの酵母の汚染が容易なバルク乳と類似した分布状態を示す傾向が認められた。この結果は、生乳中の酵母汚染の抑制には搾乳衛生、畜舎環境の衛生管理などが重要であることを示している。

#### まとめ

生乳中で90%以上を占める酵母数の水準は、分房乳が10 cfu/ml 以下、バルク乳が100 cfu/ml 以下、ローリー乳が150 cfu/ml 以下であり、乳頭表皮または乳房周辺に棲息する酵母数は150 cfu/cm<sup>2</sup> 以下であると考えられた。また *C. parapsilosis*, *C. lambica*, *C. catenulata*, *C. rugosa* などの乳房炎起病因菌となる酵母は夏期の出現率が高い傾向が認められたので、夏期の乳房炎感染の防止に努める必要がある。本研究において生乳中で検出された酵母数は、現在の北海道産生乳中の細菌数 (10<sup>4</sup> cfu/ml 水準) の1~2%であるが、一般に酵母は脂肪分解活性、

タンパク分解活性の強いものが多く、乳製品製造などに用いる生乳では酵母による汚染を抑制することが重要と考えられる。

## 謝 辞

本研究を遂行するにあたり、乳牛個体乳のサンプリングにご協力いただいた帯広市川西地区酪農業加藤務氏、尾関卓一氏および荒井克彦氏、ならびにローリー乳のサンプリングにご協力いただいた帯広市畜産総合指導センター遠藤正信所長、梶和之氏に厚く感謝申し上げます。本研究の一部は文部科学省 21 世紀 COE 形成プログラムによる研究助成を受けております。また本研究の大部分は財団法人森永奉仕会平成 11 年度研究奨励金による研究費の援助によって行われたものであり、ここに感謝の意を表します。

## 文 献

- 荒井威吉・中島景典・丸山千弘玲・中村 正・戸羽隆宏・浦島 匡. 2002 a. イエメン産の伝統的自然発酵乳“ラバン”の菌叢ならびに官能特性の解析. *ミルクサイエンス*, 51 : 63-72.
- 荒井威吉・仙田晶嗣・山上貴礼・無量谷亜希・中村 正・浦島 匡. 2002 b. 強酸性電解水による乳頭清拭の効果. *北海道畜産学会報*, 44 : 59-63.
- Desmaures N, Bazin F, Gueguen M. 1997. Microbiological Composition of raw milk from selected farms in the Camembert region of Normandy. *Journal of Applied Microbiology*, 83 : 53-58.
- Desmaures N, Gueguen M. 1997. Monitoring the microbiology of high quality milk by monthly sampling over 2 years. *Journal of Dairy Research*, 64 : 271-280.
- Engel VG. 1986. Hefen in silagen und rohmilch. *Milchwissenschaft*, 41 : 633-637.
- Gonzalez RN, Wilson DJ, Sickles SA, Zurakowski MJ, Weibrecht PM, Walsh AK. 2001. Outbreaks of clinical mastitis caused by *Tricosporon beigellii* in dairy herds. *Journal of the American Veterinary Medical Association*, 218 : 238-242.
- Hogan JS, Smith KL. 1997. Bacteria counts in sawdust bedding. *Journal of Dairy Science*, 80 : 1600-1605.
- Jayarao BM, Wang L. 1999. A study on the prevalence of gram-negative bacteria in bulk tank milk. *Journal of Dairy Science*, 82 : 2620-2624.
- Kreger - van Rij NJW. 1984. *The yeasts - a taxonomic study*- third revised and enlarged edition. Elsevier, Amsterdam.
- Legneau PE, Lebtahi K, Swinne D. 1996. Isolation of yeasts from bovine milk in Belgium. *Mycopathologia*, 135 : 99-102.
- McKinnon CH, Rowland GJ, Bramley AJ. 1990. The effect of udder preparation before milking and contamination from the milking plant on bacterial numbers in bulk milk of eight dairy herds. *Journal of Dairy Research*, 57 : 307-318.
- Moretti A, Pasquali P, Mencaroni G, Boncio L, Fioretti DP. 1998. Relationship between cell counts in bovine milk and the presence of mastitis pathogens (yeasts and bacteria). *Journal of Veterinary Medicine. Series B*, 45 : 129-132.
- Oliver SP, Lewis MJ, Gillespie BE, Ivey SJ, Coleman LH, Almeida RA, Fang W, Lamar K. 1999. Evaluation of a postmilking teat disinfectant containing a phenolic combination for the prevention of mastitis in lactating dairy cows. *Journal of Food Protection*, 62 : 1354-1357.
- Pankey JW. 1989. Premilking udder hygiene. *Journal of Dairy Science*, 72 : 1308-1312.
- Ramano P, Ricciardi A, Salzano G, Suzzi G. 2001. Yeasts from Water Buffalo Mozzarella, a traditional cheese of the Mediterranean area. *International Journal of Food Microbiology*, 69 : 45-51.
- Richard JL, McDonald JS, Fichtner RE, Anderson AJ. 1980. Identification of yeasts from infected bovine mammary glands and their experimental infectivity in cattle. *American Journal of Veterinary Research*, 41 : 1991-1994.
- 笹野 貢・青山英俊・能野康隆・小野量司. 1997. 最近 5 ヶ年 (1992~1996 年) において北海道内で生産された生乳の乳質の推移について. *ミルクサイエンス*, 46 : 103-109.
- Sutherland AD, Murdoch R. 1994. Seasonal occurrence of psychrotrophic *Bacillus* species in raw milk, and studies on the interaction with mesophilic *Bacillus* species. *International Journal of Food Microbiology*, 21 : 279-292.
- 高田正樹. 1986. 微生物の分類法 (山里一英・宇田川俊一・児玉 徹・森地俊樹編). III. 種々の環境および資料からの分離法. 33-34. R & D プランニング. 東京.
- Todhunter DA, Smith KL, Hogan JS. 1995. Environmental streptococcal intramammary infection of the bovine mammary gland. *Journal of Dairy Science*, 78 : 2366-2374.
- Welthagen JJ, Viljoen BC. 1998. Yeast profile in Gouda cheese during processing and ripening. *International Journal of Food Microbiology*, 41 : 185-194.
- Wilson DJ, Gonzalez RN, Das HH. 1997. Bovine mastitis pathogens in New York and Pennsylvania: Prevalence and effects on somatic cell count. *Journal of Dairy Science*, 80 : 2592-2598.
- Yamani MI, Abu-Jaber MM. 1994. Yeast flora of labaneh produced by in-bag straining of cow milk set yogurt. *Journal of Dairy Science*, 77 : 3558-3564.

## Seasonal Incidences and Populations of Yeast in a High Quality Raw Milk

Akitsu SENDA, Tadashi NAKAMURA<sup>1</sup>, Tadasu URASHIMA<sup>1</sup> and Ikichi ARAI<sup>1</sup>

The United Graduate School of Agricultural Sciences, Iwate University, Morioka-shi 020-8550, Japan

<sup>1</sup> Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine, Obihiro-shi 080-8555, Japan

Corresponding : Ikichi ARAI (fax : +81 (0) 155-49-5577, e-mail : arai@obihiro.ac.jp)

The objective of this study was to investigate the seasonal incidences of yeast and the seasonal changes of yeast counts (cfu/ml) in a high quality raw milk produced by healthy Holstein cows ( $\leq 1 \times 10^5$  somatic cells/ml) bred in Obihiro University of Agriculture and Veterinary Medicine and in three local dairy farms near the University campus. The populations of yeasts in teat milk, bulk milk and lorry tank milk as well as in one of teat surfaces which were collected in each month from July, 1999 to June, 2000 were counted. The incidences of yeasts in teat milk, bulk milk, lorry tank milk, and in one of teat surfaces were 47.9%, 100%, 100% and 70.1%, respectively, whereas the mean of yeast counts in these samples were 1.8cfu/ml, 28cfu/ml, 66cfu/ml and 52cfu/cm<sup>2</sup>, respectively. The levels of yeast counts, which occupied over 90% of the cumulative frequency distributions of the incidence, were  $\leq 10$ cfu/ml (94.4%) in teat milk,  $\leq 100$ cfu/ml (97.8%) in bulk milk,  $\leq 150$ cfu/ml (91.7%) in lorry tank milk, and  $\leq 150$ cfu/ml (90.8%) in teat surfaces. It was recognized that the yeast counts in these raw milk samples and in teat surfaces overall increased from summer to autumn, and then decreased from winter to spring. It was found that the four major pathogenic yeast species concerning mastitis (*C. parapsilosis*, *C. lambica*, *C. catenulata*, *C. rugosa*) in teat milk of healthy Holstein cows were detected in summer, not in winter.

*Nihon Chikusan Gakkaiho*, 74 (4) : 517-523, 2003

Key words : Yeast in milk, The incidence of yeast, The seasonal changes of yeast counts