

〔生物工学会誌 第75巻 第6号 433-443. 1997〕

---

総合論文

---

## 微生物機能の環境・食品への利用に関する研究

(平成8年度 日本生物工学会生物工学賞受賞)

藤 尾 雄 策

九州大学農学部  
〒812 福岡市東区箱崎6-10-1

## A Study in the Application of Microbial Functions to Environmental Cleaning and Fermented Foodstuffs: Biotechnological Aspects of Solid State Fermentation

YUSAKU FUJIO (*Department of Food Science and Technology, Faculty of Agriculture, Kyushu University, 6-10-1 Hakozaki, Higashi-ku, Fukuoka 812*) *Seibutsu-kogaku* 75: 433-443, 1997.

The contents of this paper can be summarized in one keyword; the solid state fermentation process. This is a process which is considered to be the origin of microbial fermentation. In our research, studies were carried out on solid-organic-waste composting, on the microbial enzyme production of wheat bran media, and on soybean fermentation as food processing. Among them, the development of a method for solid-organic waste management may be important because of increases in the amount of the waste year by year. As a treatment method, we dealt with performances on large scale composting units which used dehydrated-sewage-sludge-cake and chicken manure as raw materials. Regarding the chicken manure composting, we obtained many useful results in terms of isolation of de-odorizing *Actinomyces* that can reduce malodorous compounds and increase the effectiveness of drying fermentation. On the other hand, for dehydrated-sewage-sludge-cake composting under high temperature composting, microbial isolation and its characteristics were performed and the composting bacterial flora was determined. The nearly isolated materials was classified as thermophilic bacteria, *Bacillus stearothermophilus*. The amount of fermentation caused by heat generated by the composting was estimated to be 7,968 GJ per 6,000 ton-month. This figure is based on the decreasing water content. Regarding enzyme production, enzymes which hydrolyze starchy materials could be produced effectively on molding solid media. Among the results of the enzyme production, we revealed that a black *Aspergillus* 19 was produced both glucoamylase and an inhibitory factor (IF) which inhibits glucoamylase activity in the enzyme extract solution from the solid culture. We have determined the characteristics of the IF. Recently, fermented soybean has been seen as a healthy food. Typically fermented soybean is used in Natto in Japan and in Tempeh in Indonesia. To determine the quality of the solid fermented food, the quality of Tempeh will be decided by its aroma and texture. Then, we have established a method for quality assessment in the relations between Tempeh aroma and its starter. This method can be used by applying Principal Component Analysis (PCA) to the aroma compounds which are obtained by a head-space gas chromatographic method. In addition, Tempeh texture was also assessed by analyzing the degree of the softness, which was defined from a force-deformation curve. It may be possible to determine the relation of the quality of the Tempeh and the starter used by analyzing the degree of softness and the aromatic character, on the scattergram by PCA. As the results show, depending on the object and raw material used, the solid-state fermentation process under non-sterile conditions can be useful for mass treatment of raw materials. This is abundantly clear when compared with the liquid culture method of to producing materials under sterile condition using pure microorganisms. The effectiveness of the solid-state fermentation process lies in the fact that with it, it is possible to manage a large amount of

raw solid material. In fact more than 100 tons per day can be processed and can be microbially deodorized effectively. Moreover, the effectiveness of the solid-state fermentation process can be seen in that it results in the accumulation and/or acclimation of microorganisms which are active in the biosphere of the Earth. The solid state fermentation process is not only effective on organic-solid wastes, but is also effective in food processing. There are also applications of the solid state fermentation process for the bio-remediation of soil/land which are infected with chemicals. Other uses can be expected to be discovered in the environmental cleaning field in the near future. It is my hope that the attention being given to the solid-state fermentation process in our research will have particular ramifications in solid-organic waste management and microbial food processing.

[Key words: solid state fermentation, compost, organic solid waste, tempeh fermentation, saccharogenic enzyme production]

## はじめに

本論文は、固体発酵をキーワードとして、これまで醸酵工学会誌に掲載された論文を中心として構成したが、小麦フスマを固体基質とした酵素生産以外は、非殺菌系の固体発酵を取扱う。一つは有機性固形廃棄物を発酵除害して有効利用する目的であり、今一つは発酵食品の品質向上である。非殺菌系の固体発酵では、混合菌で構成される種菌を接種するが、非殺菌系の操作にもかかわらず基質に適合した微生物が集積され、主要菌相を構成する。具体的には、大規模な有機性廃棄物の固体発酵例として鶏ふんおよび下水汚泥のコンポスト化を主として記述し、固体発酵による糸状菌の酵素生産および大豆のリゾース発酵の要点についても記述した。

### 1. 有機性廃棄物のコンポスト化発酵

**有機性廃棄物** まず、有機性廃棄物とは何か、と言うことになる。化学合成した有機物は対象外である。有機性廃棄物に分類されている廃棄物は種別で25項目程度（区別はきりが無い）あり、有機汚泥類、食品加工残渣、林産加工残渣、農産加工残渣、畜産廃棄物、生活ごみ、に大別<sup>1)</sup>されている。これらのうち、本項の対象とした有機性廃棄物の年間排出量は、有機汚泥類に分類される下水汚泥が2,307千 $\text{m}^3$ （年間下水処理量100億 $\text{m}^3$ ）、畜産廃棄物に分類される各種家畜ふん尿が90,000千トン、食品加工残渣に分類される果汁残渣が103.7～331千トン（排出は季節的）と推定<sup>2)</sup>されている。この3つの有機廃棄物を原資材としたコンポスト化と固体発酵について記述するが、日本では有機性固形廃棄物を原資材として作ったコンポストと、古来より有機性肥料として使用されている堆肥、すなわち農林産廃棄物を主原資材としてこれに副原料として畜ふんを添加して作った堆肥とは少し意味が異なり、コ

ンポスト化処理<sup>2,3)</sup>とは高速堆肥化技術、その製品がコンポストと考えられている。

### 2. 下水汚泥のコンポスト化

下水汚泥はそのまゝろ過脱水した汚泥ケーキ（Cake, 汚泥関係ではケーキと記載しない）と嫌気消化したのち、ろ過脱水した消化汚泥ケーキに大別される。本項では嫌気消化したのち脱水した石灰汚泥ケーキ（以後脱水汚泥）を原資材としてコンポスト化<sup>4)</sup>を行った例（福岡市汚泥センター）についてこれまで知られていなかった菌相、物質収支、推定発熱量を中心とした研究について記述する。

使用した原資材となる脱水汚泥の主要分析値をTable 1<sup>5)</sup>に示す。Table 1に示すように、水分は70%（湿潤基準）で、乾燥固形分中の有機物量は44%にしかすぎず、残りは無機物である。この脱水汚泥をコンポスト発酵する装置<sup>6)</sup>のフローシートをFig. 1に示す。Fig. 1の装置の処理能力は月あたり6,000トンの脱水汚泥をコンポスト化できる。本装置は一次発酵を行う箱形発酵槽と、熟成を目的とした堅型二次発酵槽に分割されている。種菌の添加、初期水分調整および初期pH調整をかねて熟成した汚泥コンポストを返送混合

Table 1. Typical composition of sewage sludge cake.

|                                 |        |
|---------------------------------|--------|
| Moisture content                | 60–70% |
| Inorganic matter in dried solid | 30–40% |
| Organic matter in dried solid   | 60–70% |
| Carbohydrates in organic matter | 8%     |
| Protein in organic matter       | 20%    |
| Fat on organic matter           | 10%    |

---

| Elementary analysis of sewage sludge cake (%) |     |     |     |     |                                |      |                  |
|-----------------------------------------------|-----|-----|-----|-----|--------------------------------|------|------------------|
| C                                             | H   | N   | S   | Cl  | Al <sub>2</sub> O <sub>3</sub> | CaO  | SiO <sub>2</sub> |
| 21.0                                          | 3.9 | 2.1 | 1.1 | 0.7 | 4.6                            | 18.0 | 16.2             |

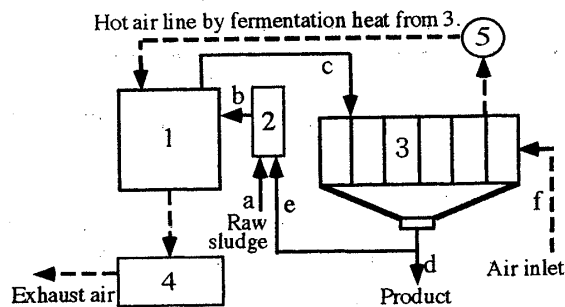


Fig. 1. Flow chart of sewage sludge composting system. 1, Batch box fermenter; 2, mixing reservoir; 3, continuous fermenter; 4, deodorizer; 5, air suction pump. Usually, charge amount of raw sludge is 200 ton/d and the ratio (a/e) of raw sludge to matured compost was 1:1~2, depending on season.

するが、原料汚泥と返送コンポストの比は、1:1 から 1:2 (Fig. 1 の a:e) にも及ぶ。この比率の相違は季節、脱水汚泥水分に依存する。通気は二次発酵槽より吸引によって行い、ここで発生した温度の高い空気を一次発酵相に圧送、通気して一次発酵の期間短縮を計っている。コンポスト化一次発酵経過の例を Fig. 2<sup>7)</sup> に示す。Fig. 2 の一次発酵経過には外部空気を通気した場合と一次発酵槽より約50度の高温空気を通気した場合とが示されているが、最高温度への到達日数は二次発酵より50度の空気を通気すると約3日で最高温度が85°C、外部温度10°Cの空気のみを通気した時は6日で最高温度が75°C、と3日の差が生じている。しかしながら、双方の最高温度は病原菌や回虫卵を死滅させるには十分な温度である。本装置を使用して、水分約70%の脱水汚泥を1月あたり6,000トンコンポスト化処理し、水分28%の汚泥コンポスト約2,100トンに転換される。

**汚泥コンポストの菌相<sup>8)</sup>** これまで充填塔式ろ床による排水処理の研究<sup>9-14)</sup> においてろ床生物膜の微生物相を決定したが、この場合は原因は不明であったが微生物相の変遷<sup>11)</sup> が起った。農産廃棄物を原資材とした堆肥の菌相<sup>15)</sup> は資材の腐朽進行に伴って細菌から糸状菌に渡って複雑な変遷が起り、熟成した堆肥が熟成したときには小動物が見られると一般に言われている。過去にも堆肥ではないが、家畜ふん尿を施肥した土壌の菌相を研究した例も報告<sup>16)</sup> されているが、有機性廃棄物のコンポスト化微生物についての報告例はない。汚泥コンポストの場合は高温発酵であること、汚泥コンポストそのものを種菌として多量に添加するので、熟成汚泥コンポストの菌相がそのままコンポ

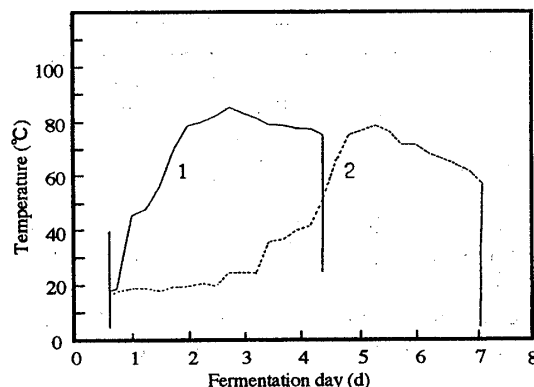


Fig. 2. Temperature profiles of first stage composting fermentation. Line 1: Aeration of hot air from second stage fermentor. Line 2: Aeration of room temperature from surroundings.

ト発酵に係わる主要菌相となると考えられることから、熟成コンポストの菌相を決定することがそのまま汚泥のコンポスト発酵菌相と考えて良い。汚泥コンポストより分離した菌の形態学的、生理的試験結果を Table 2<sup>8)</sup> に示した。Table 2 に示すように、菌相は予想どおり単純で、ほとんどが中程度好熱性細菌とされる *Bacillus stearothermophilus* に属していた。由来はまったく不明であるが、高度好熱細菌に属する *Thermus* 属に類似した細菌も分離された。本細菌は至適生育温度が75°Cと少し低いこと、*Thermus* 属の分類形質の一つとされる色素生成が認められない点で既報告の *Thermus* 属<sup>17-19)</sup> とは異なっている。この他、正確な同定はできなかったので記載はしなかったが、セルラーゼの活性<sup>20)</sup> が認められる好熱性 *Clostridium* と考えられる嫌気性細菌が1株分離された。

**分離菌による下水汚泥の分解** 下水汚泥有機物がどのような経過で分解するのか知るために、分離細菌を混合して殺菌系で分解を試みた。その一例を Fig. 3<sup>21)</sup> に示す。Fig. 3 に示すように、汚泥有機物は分離菌株を混合した菌群によって確かに分解が起り、この培養物中にはセルラーゼ<sup>22)</sup> と各種のプロテアーゼの活性<sup>23-28)</sup> が認められた。これらの酵素群が汚泥有機物を分解し、低分子化しているものと考えられた。

**物質収支と発酵熱** 一般に、コンポスト化発酵など固体発酵の物質収支を正確に計算することはきわめて困難である。しかし、ここに示した脱水汚泥のコンポスト化発酵は、月間6,000トンの原資材処理を行っており、2,100トンの熟成コンポストを生産していることから、物質収支の誤差は小さいものと考えて良い。物質収支は有機物と水分の減少量を分析値より計算し

Table 2. Morphological, physiological and biochemical characteristics.

|                                        | IFO   |       |       | Strain no. |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|----------------------------------------|-------|-------|-------|------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|                                        | 13737 | 12550 | 12983 | 1          | 2   | 3   | 4   | 5   | 6   | 7W  | 7   | 8   | 1T  | 2T  |
| Morphology                             |       |       |       |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Cell size                              |       |       |       |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| length of rods $\mu\text{m}$           | 1-2.5 | 1-2   | 1-2.5 | 2-3        | 2-3 | 2-4 | 3-5 | 2-4 | 2-4 | 2-4 | 2-3 | 3-4 | 3-4 | 2-3 |
| width of rods $\mu\text{m}$            | 0.7   | 0.8   | 0.8   | 0.4        | 0.3 | 0.5 | 0.5 | 0.7 | 0.4 | 0.7 | 0.4 | 0.3 | 0.6 | 0.8 |
| Endospore                              |       |       |       |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| length of spores $\mu\text{m}$         | 1-2   | 1-1.5 | 1-1.5 | 2          | 2   | 1   | 1   | 1.5 | 1.5 | 1   | 1.5 | 1.5 | —   | —   |
| width of spores $\mu\text{m}$          | 1     | 1-1.2 | 1-1.2 | 1.2        | 1.2 | 0.5 | 0.8 | 0.8 | 1   | 0.8 | 1   | 1.2 | —   | —   |
| Gram stain                             | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | —   |
| Motility                               | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Biochemical and physiological reaction |       |       |       |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| NaCl tolerance (%)                     | 1     | 1     | 1     | 2          | 2   | 3   | 2   | 3   | 3   | 3   | 3   | 3   | 2   | 2   |
| Sodium azide                           | —     | —     | —     | —          | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | +   | +   |
| Catalase                               | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Oxidase                                | —     | —     | —     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Nitrate                                | +     | +     | +     | +          | +   | —   | +   | —   | —   | —   | —   | —   | +   | +   |
| Casein digestion                       | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Esclin                                 | —     | —     | +     | +          | +   | +   | W   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Citrate                                | —     | —     | —     | —          | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| Indol                                  | —     | —     | —     | —          | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| ONPG                                   | —     | —     | —     | +          | +   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | +   | +   |
| VP test                                | +     | —     | —     | —          | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| Temperature                            |       |       |       |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| min.                                   | 40    | 40    | 40    | 40         | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  | 40  |
| max.                                   | 78    | 75    | 75    | 75         | 75  | 75  | 78  | 75  | 75  | 75  | 75  | 78  | 78  | 78  |
| optimum                                | 65    | 65    | 65    | 60         | 60  | 60  | 60  | 60  | 60  | 60  | 60  | 60  | 65  | 65  |
| Anaerobic growth                       | +     | +     | +     | W          | W   | W   | —   | W   | W   | W   | W   | W   | W   | W   |
| Acid formation                         |       |       |       |            |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Adonitol                               | —     | —     | —     | —          | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | W   | —   |
| Arabinose                              | —     | —     | —     | +          | +   | —   | +   | —   | —   | —   | —   | —   | +   | +   |
| Cellobiose                             | W     | —     | W     | +          | +   | +   | —   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Erythritol                             | —     | —     | —     | —          | +   | —   | —   | W   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| Galactose                              | +     | W     | +     | +          | +   | +   | W   | W   | W   | +   | +   | W   | W   | +   |
| Glucose                                | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Glycerol                               | +     | W     | W     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Glycogen                               | +     | +     | +     | +          | +   | —   | W   | —   | —   | —   | —   | —   | +   | +   |
| Inositol                               | —     | —     | —     | —          | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | W   |
| Lactose                                | W     | —     | W     | —          | —   | —   | —   | —   | W   | W   | —   | —   | W   | W   |
| Levulose                               | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Maltose                                | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Mannitol                               | W     | —     | —     | —          | —   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | —   |
| Mannose                                | —     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Raffinose                              | +     | +     | +     | —          | —   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | —   |
| Rhamnose                               | —     | —     | —     | —          | —   | W   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| Salicin                                | —     | W     | +     | —          | —   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | W   |
| Starch                                 | W     | +     | +     | —          | —   | +   | W   | +   | +   | +   | +   | +   | —   | +   |
| Sucrose                                | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Sorbitol                               | —     | —     | —     | —          | —   | —   | W   | W   | —   | —   | —   | —   | —   | —   |
| Trehalose                              | +     | +     | +     | +          | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |
| Xylose                                 | —     | —     | —     | +          | +   | —   | +   | —   | —   | —   | —   | —   | +   | +   |
| Glucose (anaerobic)                    | +     | +     | +     | +          | +   | +   | —   | +   | +   | +   | +   | +   | +   | +   |

W denotes weak positive reaction. Spores of no. 1~no. 8 were oval.

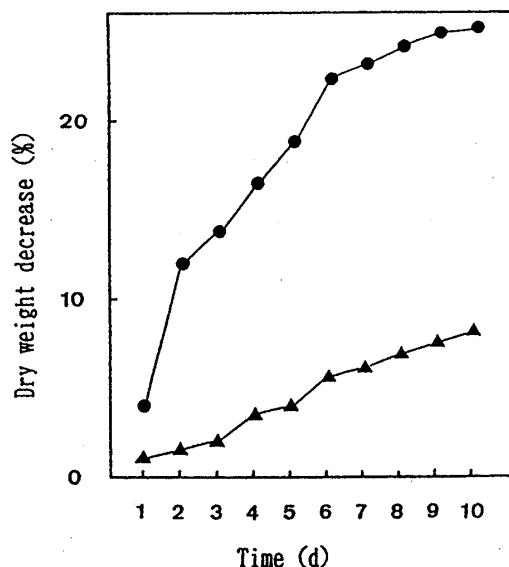


Fig. 3. Digestion of municipal sewage sludge by a mixture of 11 thermophilic bacilli. Symbols: ●, test medium; ▲, control test. Test medium, inoculated with a mixture of 11 bacilli, composed of 10% sewage sludge.

た。物質収支の結果を脱水汚泥1,000トン基準としてTable 3<sup>29)</sup>に示す。発酵熱はコンポスト化微生物による有機物の生化学的燃焼に由来する。問題は発酵熱の推定に水分の減少値がそのまま適用できるかどうかである。もちろんコンポスト発酵の期間中に水分を補給することはないので、熟成コンポストの水分低下は初期水分の蒸発減少によることは論をまたない。したがって、物質収支から得られる水分減少量に妥当な蒸発潜熱2.268 MJ/kgを乗じることによって概略の発酵熱量が推定できる。しかし、コンポスト化発酵装置のような場合は、外部との熱の出入りがまったく不明である。そこで、物質収支から得られる有機物減少量を炭水化

Table 3. Material balance of sewage sludge composting.

|                          | Water (ton) | Solid (ton) | Organic matter (ton) | Inorganic matter (ton) |
|--------------------------|-------------|-------------|----------------------|------------------------|
| Input                    | 697         | 303         | 132                  | 170                    |
| Output                   | 112         | 238         | 67                   | 171                    |
| Decrease                 | 585         | 65          | 65                   | -1                     |
| Carbon dioxide formation |             |             | 95                   |                        |
| Water formation          |             |             | 39                   |                        |

Material balance based on 1,000 ton sludge:

Assuming that  $\text{CH}_2\text{O} + \text{O}_2 \rightarrow \text{CO}_2 + \text{H}_2\text{O} - \Delta\text{H}$ :  $\Delta\text{H} = 25.2 \text{ MJ/kg}$ .

Table 4. Estimated heat generation by composting.

|                              | Decrease (ton/month) | Heat generated (GJ/month) |
|------------------------------|----------------------|---------------------------|
| From water decrease          | 3,510                | 7,968                     |
| From organic matter decrease | 390                  | 9,828                     |

Based on 6,000 ton/month.

Assumption:

Latent heat of water vaporization = 2.268 MJ/kg.

Heat of combustion of carbohydrate = 25.2 MJ/kg.

Heat efficiency based on organic matter decrease = 81%.

from water decrease oil = 189.7 ton/month = 6.3 ton/d = 1.05 kg/ton-sludge-d.

from carbohydrate decrease oil = 234 ton/month = 7.8 ton/d = 1.3 kg/ton-sludge-d.

物と仮定して、その燃焼熱より計算した熱量と比較することで発酵熱を推定した。こうして推定した1月の処理量、6,000トンの原資材あたりの推定発酵熱をTable 4<sup>29)</sup>に示す。Table 4の発酵熱量は双方の計算ともきわめて大きく、石油の熱量を42 MJ/kg密度を0.9 kg/kgと仮定して、水分減少量から得られる発酵熱は、一日あたり石油換算で6.3 klにも相当する。また、標準状態での炭水化物の燃焼熱25.2 MJ/kgを基準として計算した熱量が発酵によって生じた全発生熱量とすると、この値が装置全体の熱損失と水分減少量から得られる熱量の和に相当する。炭水化物の燃焼熱を基準発生熱量とすると、発生した熱量のうち水分蒸発に使用された熱量は全発生熱量の約80%となり、この値は妥当と考えられる。つまり、このコンポスト化装置は、好熱性コンポスト化細菌による有機物の生化学的燃焼による熱発生装置と考えて良い。

### 3. 鶏ふんの発酵乾燥と脱臭

**鶏ふん処理に由来する公害** 日本の食生活の向上に伴う畜産業の発展によって発生する各種家畜ふん尿は年間90,000千トン<sup>31)</sup>にも及ぶ。畜ふんより発生する悪臭は周囲環境に対して公害の源となっている。一般に畜ふんは水分が高く、腐敗によってあらゆる種類の悪臭化合物を発生する。検出される悪臭物質は、アミン類、フェノール類、脂肪酸系、アルデヒド類、硫化物類、に属する悪臭物質<sup>31)</sup>である。これらの化合物の嗅閾値が低いので、低濃度で人に不快感を与え、食欲を失わせしめる。なかでも微生物分解性が悪く、熱分解温度も高く、しかも空気より重くて嗅閾値（二硫化メチルで0.277 ppb）と低い硫化物は、悪臭化合物

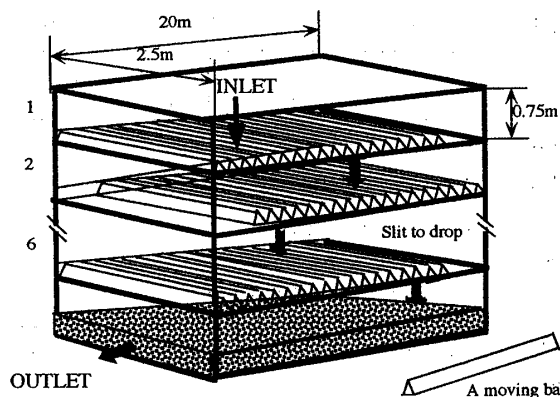


Fig. 4. A chicken manure composting fermentor with six stages. Raw manure is charged on the top stage (1) and drops the chicken manure down through slit of moving bar, one stage per day.

のなかでも難物とされる。これら畜ふんに由来する悪臭物質の発生防止には、まず乾燥して腐敗を防止することにある。同時に、微生物によって分解資化できる物質はいわゆる脱臭微生物<sup>30,31)</sup>によってある程度の除去は可能である。極端に水への溶解度が低い硫化物は微生物脱臭も困難とされているが、二硫化メチルの *Thiobacillus thioparus* による酸化分解機構<sup>32,33)</sup> は明らかにされている。そこで、微生物脱臭<sup>34,36)</sup> と同時に水分低下ができる発酵乾燥装置を開発すれば悪臭公害の問題は解決できる。このような観点から脱臭をかねた畜ふんコンポスト化が研究<sup>35,36)</sup> されてきた。本項では、大規模畜産の典型である養鶏場で発生する鶏ふんの乾燥処理を目的として開発した発酵乾燥装置とその機能について述べる。

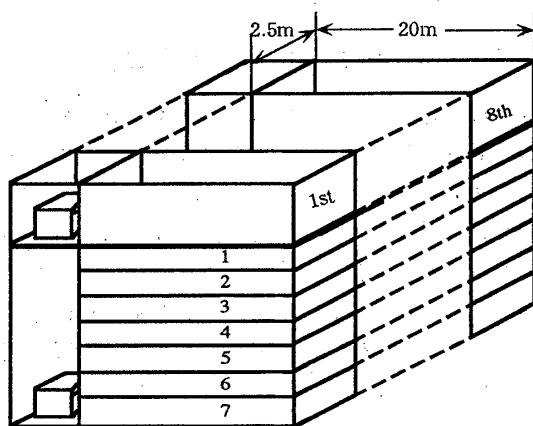


Fig. 5. Fermentation-drying unit of chicken manure. The unit composed of eight fermentors and a nominal capacity of chicken manure treatment: is 96 ton per day.

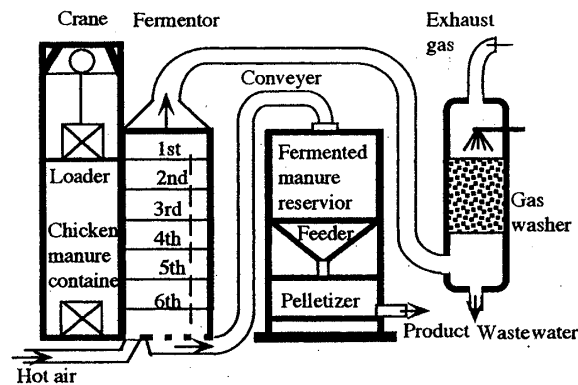


Fig. 6. Flow diagram of fermentation drying for chicken manure. Hot air is used only for final moisture content adjustment.

**鶏ふんの発酵乾燥装置** 予備試験の結果、脱臭には発酵乾燥が有効との結論を得た。この予備試験発酵装置の内部構造を Fig. 4<sup>35)</sup> に、この構造を実装置にスケールアップした装置概要を Fig. 5<sup>37)</sup> に示す。実装置は6段の棚段を有する幅2.5m、長さ20mの発酵槽が8基並列に設置してあり、設計鶏ふん処理量は日量湿润鶏ふん96トンである。一般に鶏舎の鶏ふんは年1回除去する程度で放置してあるため、発酵に必要な微生物は十分付着しているものと考えられるので種菌の添加は必要ない。本装置には水溶性の悪臭を除去する洗浄装置、発酵槽の換気をする通気装置、発酵鶏ふんの最終水分を調整する空気加熱装置、発酵鶏ふんをペレットにする装置、袋詰め装置が付属している。それらのフローシートを Fig. 6<sup>37)</sup> に示す。原料鶏ふんは発酵槽最上段に仕込まれ、一日一回棚を構成している可動棒をずらすことで棚に隙間を作り、下段に落される。

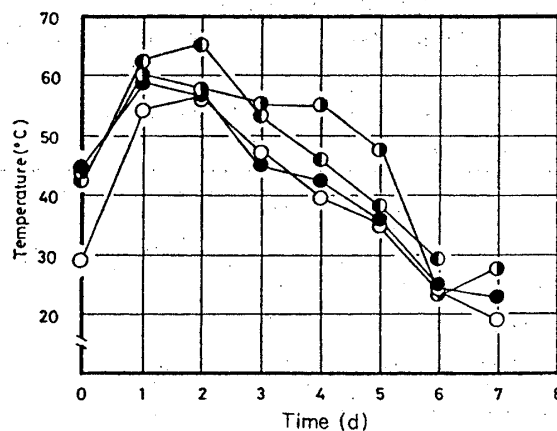


Fig. 7. Temperature changes during fermentation in different month. Fermentation days correspond to each stage of fermentor. Symbols: ○, February; ●, April; ◐, June; □, October.

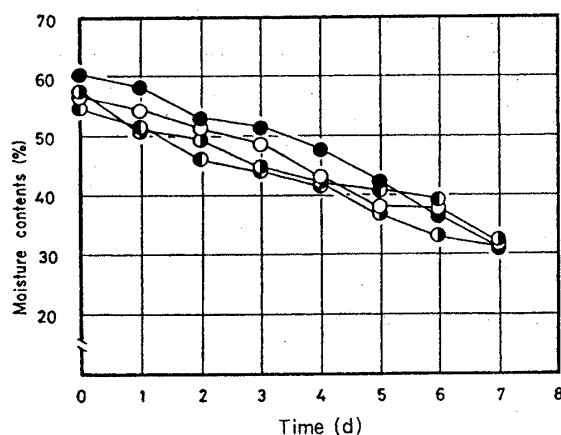


Fig. 8. Changes in moisture during fermentation in different month. Fermentation days correspond to each stage of fermentor. Symbols are the same as in Fig. 7.

こうして6日後には発酵乾燥鶏ふんが得られる。したがって、各段の分析をすることにより、6日間の発酵経過が得られる。予備試験時に測定した発酵温度と水分の経過<sup>35)</sup>をFig. 7とFig. 8に示す。Fig. 7に示されるように発酵温度は季節によって多少変動するが、いずれの場合も最高温度が60°Cに達しており、病原菌などは死滅するものと考えられる。最終水分はいずれの季節にも初期水分55~60%が30%前後まで低下し、この最終水分は外部空気湿度とはほぼ平衡水分に到達している。本装置は鶏ふんの発酵乾燥機として十分機能することが明らかとなった。結果として、悪臭の発生も低減し、難物であった硫化物の周囲環境濃度<sup>37)</sup>も十分に低下した。

**発生発酵熱** 本装置では、初期鶏ふん水分は平均60%で、発酵終了時には平均30%に低下する。この水分低下は、乾燥鶏ふん1トン基準で179 kgの水が蒸発除去されたこととなる。これに水の蒸発潜熱を575 kcal/kgとして乗じて得られた熱量をTable 5<sup>37)</sup>に示す。Table 5に記載してあるように、本装置では乾燥鶏ふんをペレットに成形するために、加熱空気によって水分を調整して20%まで低下させている。この水

分20%まで乾燥するために必要な熱量を全熱量と仮定すると、発酵によって得られる熱量は全熱量の85%となる。最終的にペレット成形機を通過して棒状に成形された乾燥鶏ふんの水分は15%まで低下していた。15%水分の発酵乾燥鶏ふんは袋詰して放置しておいても再発酵することはない。

**発酵微生物と脱臭微生物** 通気空気の排出口、発酵槽の初段仕込入口、鶏ふん貯蔵ヤードで測定した大気中硫化物濃度をTable 6<sup>37)</sup>に示す。Table 6に示すように、本発酵乾燥装置のすぐそばに位置している鶏ふん貯蔵ヤードでさえも悪臭硫化物の濃度は問題にならないほど低い。一方、生鶏ふん、風乾した乾燥鶏ふん、真空乾燥鶏ふん、加熱乾燥鶏ふん、発酵乾燥鶏ふんの二硫化メチル、二硫化ジメチルなどの悪臭物質濃度の分析値をTable 7<sup>37)</sup>に示す。Table 7の分析値は各試料10 gを水100 mlに懸濁し、密栓して温度40°Cに2時間放置したのち、ヘッドスペースガスに含まれる悪臭化合物をガスクロマトグラフで分析した濃度である。この結果、発酵乾燥鶏ふんの悪臭化合物濃度は検出限界以下の値であった。このことは発酵中に悪臭化合物が鶏ふん発酵微生物によって酸化されて除去されたものと考えられる。

**含硫悪臭化合物の微生物分解** 発酵中および発酵鶏ふん試料より鶏ふん発酵微生物の分離を試み、概略の菌相を決定<sup>38)</sup>した。同時に分離菌の悪臭化合物消滅能力を硫化物と脂肪酸について測定した。分離した微生物は代表的細菌6種類と好熱性放線菌2種類のみであった。脂肪酸系の悪臭化合物は分離細菌によって容易に減少した。難物である硫黄化合物は分離細菌によってまったく減少しなかった。放線菌の分離菌株について二硫化ジメチルを唯一の硫黄源として菌の増殖を測定したところ、好熱性放線菌W-24がわずかに、G-21では明らかな増殖を示した。つまり、分離放線菌G-21は悪臭硫黄化合物を唯一の硫黄源として生育する微生物と考えられた。その結果をTable 8<sup>38)</sup>に示す。そこで放線菌G-21の同定を試みた結果、G-21は

Table 5. Heat generation from chicken manure composting.

| Chicken manure      | Moisture content (%) | Moisture removal (ton/d) | Heat capacity of moisture removal (GJ/d) |
|---------------------|----------------------|--------------------------|------------------------------------------|
| Before fermentation | 60                   | 0                        | 0                                        |
| After fermentation  | 30                   | 41.2                     | 98.9                                     |

Based on 96 ton (38.4 ton dried matter) raw chicken manure/d.

Assumption: latent heat of water vaporization = 575 kcal/kg = 2.4 MJ/kg.

Table 6. Analytical values of malodor compounds.

| Sampling position       | Ammonia mercaptan (ppm) | Methylmercaptan (ppm) | Hydrogen sulfide (ppm) | Methylsulfide (ppm) | Trimethylamine (ppm) |
|-------------------------|-------------------------|-----------------------|------------------------|---------------------|----------------------|
| Escape gas              |                         |                       |                        |                     |                      |
| 60 m <sup>3</sup> /min  | 400                     | 0.067                 | 0.212                  | 0.048               | 0.482                |
| 500 m <sup>3</sup> /min | 240                     | 0.127                 | 0.234                  | 0.074               | 0.458                |
| Entrance of raw manure  | 110                     | 0.022                 | 0.029                  | 0.017               | 0.152                |
| Manure container yard   | 4                       | 0.002                 | 0.055                  | 0.006               | 0.027                |

Table 7. Malodor from chicken manure.

|                                   | Methylmercaptan (ppm (v/v)) | Dimethylsulfide (ppm) | Dimetyldisulfide (ppm) |
|-----------------------------------|-----------------------------|-----------------------|------------------------|
| Pellet dried by fermentation      | Trace                       | Trace                 | Trace                  |
| Vacuum dried for 1 d              | Trace                       | 1.16                  | Trace                  |
| Dried by heating at 170°C for 1 d | Trace                       | 0.96                  | 0.82                   |
| Dried by heating at 40°C for 2 d  | Trace                       | 1.64                  | 0.50                   |
| Naturally dried for 3 d           | Trace                       | 1.64                  | 0.29                   |
| Raw manure                        | Trace                       | 3.13                  | 2.78                   |

生育至適温度が45~55°C, 可溶性緑色色素を産生することから, *Saccharomonospora virides* (Syn. *Thermomonospora virides*) と同定<sup>39)</sup>した. 本分離菌は pH 6~10 の範囲で二硫化メチルを唯一の硫黄源とした二硫化メチル培地で増殖する. 基準菌として使用した *S. virides* IFO 12207 も二硫化メチル培地で増殖するが, 分離菌と比較すると増殖度はわずかであった. 状況証拠ではあるが, 鶏ふん発酵に関与している好熱性放線菌が硫化物を唯一の硫黄源として増殖<sup>39)</sup>することから, 分離放線菌が難物である硫化物系の悪臭物質の低減に寄与しているものと考えられた.

Table 8. Growth of the strains isolated from chicken manure on DMDS medium at 50°C.

| Strain no. | Type of strain | Growth (OD <sub>660</sub> ) | Final pH |
|------------|----------------|-----------------------------|----------|
| HFB-10     | Bacteria       | none                        | 7.9      |
| HFB-1      | Bacteria       | none                        | 8.0      |
| HFW-16     | Bacteria       | none                        | 8.0      |
| HFW-20     | Bacteria       | none                        | 7.8      |
| HFW-24     | Bacteria       | none                        | 8.0      |
| HHA-8      | Actinomyces    | none                        | 8.0      |
| G-21       | Actinomyces    | 0.43                        | 6.8      |
| W-24       | Actinomyces    | 0.07                        | 7.1      |
| Blank      |                | none                        | 8.0      |

#### 4. 固体培養による糸状菌酵素生産

黒麹菌のグルコアミラーゼ阻害因子 1株の黒麹菌 (*Aspergillus niger* 19) は小麦ふすまを固体培地として培養すると大量のグルコアミラーゼを生成する. 生成したグルコアミラーゼは生デンプン分解活性を有するグルコアミラーゼ I<sup>40)</sup> と糊化デンプンのみに活性を示すグルコアミラーゼ II の双方を含んでいる. ところがグルコアミラーゼ I の活性を阻害する因子 (Inhibitory Factor, IF) が同一培養抽出液中に存在することを見だし,<sup>41,42)</sup> IF の概略性質の決定<sup>43-45)</sup>を行った. その結果, IF は 10 kDa 以下の低分子量ペプチドで耐熱性があり, 多様性を持っていることが判明<sup>46)</sup>した. さらに, この IF は生デンプン粒子に強く吸着するが, その吸着量はデンプンの起源によって異なることが判明<sup>47,48)</sup>し, 各種起源の IF 吸着度の異なる生デンプンを用いて, グルコアミラーゼ I による分解度と IF 吸着デンプンの阻害度を測定し, この比が 0.8~1.0 の範囲内にあることから, 生デンプン表面の同一部位に IF とグルコアミラーゼ I が吸着するものと推定<sup>47)</sup>した. IF の精製にあたり, IF は生デンプン粒子表面へ強く吸着し, 一度吸着すると脱着は困難であるが, 0.02 M ほう酸ソーダで吸着 IF のほとんどが脱着して溶出することが判明し,<sup>49)</sup> 培養抽出液から IF の分離,

Table 9. Classification of *Rhizopus* strains based on their production of GA (total glucoamylase activity) on wheat bran medium and the ratio of GARS (raw starch digesting glucoamylase activity) to GA.

| Strain | GA<br>(unit/ml) | GARS<br>(unit/ml) | GARS/GA<br>(unit/unit) | Group <sup>a</sup> | Strain                      | GA<br>(unit/ml)     | GARS<br>(unit/ml)   | GARS/GA<br>(unit/unit) | Group |
|--------|-----------------|-------------------|------------------------|--------------------|-----------------------------|---------------------|---------------------|------------------------|-------|
| A11    | 79              | 4                 | 0.05                   | D                  | G1                          | 7                   | 1                   | —                      | D     |
| A19    | 47              | 2                 | 0.04                   | D                  | G2                          | 35                  | 4                   | 0.11                   | D     |
| A63    | 61              | — <sup>b</sup>    | —                      | D                  | G4                          | 86                  | 3                   | 0.02                   | D     |
| F55    | 100             | 9                 | 0.09                   | B                  | G9                          | 118                 | 14                  | 0.12                   | A     |
| F60    | 45              | 7                 | 0.14                   | C                  | G16                         | 81                  | 2                   | 0.02                   | D     |
| F61    | 54              | —                 | —                      | D                  | G17                         | 79                  | 7                   | 0.09                   | D     |
| F62    | 40              | 5                 | 0.13                   | C                  | G20                         | 50                  | —                   | —                      | D     |
| F64    | 41              | 6                 | 0.15                   | C                  | G22                         | 89                  | 2                   | 0.02                   | D     |
| F67    | 55              | 7                 | 0.13                   | C                  | G24                         | 47                  | 1                   | —                      | D     |
| F68    | 54              | —                 | —                      | D                  | G25                         | 86                  | 3                   | 0.03                   | D     |
| F69    | 103             | 5                 | 0.05                   | B                  | G82                         | 47                  | 4                   | 0.09                   | D     |
| F70    | 116             | 5                 | 0.04                   | B                  | Rh3                         | 119                 | 12                  | 0.10                   | A     |
| F71    | 51              | 6                 | 0.12                   | C                  | Rh4                         | 102                 | 12                  | 0.12                   | A     |
| F73    | 91              | 2                 | 0.02                   | D                  | IFO <i>Rhizopus</i> strains |                     |                     |                        |       |
| F75    | 68              | 11                | 0.16                   | C                  | 4697                        | 125                 | 15                  | 0.12                   | A     |
| F76    | 122             | 13                | 0.11                   | A                  | 4726                        | 76                  | 6                   | 0.08                   | D     |
| F77    | 51              | 1                 | —                      | D                  | 4734                        | 46                  | 5                   | 0.11                   | C     |
| F79    | 96              | 1                 | —                      | D                  | 4754                        | 98                  | 9                   | 0.09                   | D     |
| F81    | 96              | 6                 | 0.06                   | D                  | 4801                        | 99                  | 9                   | 0.10                   | D     |
| F86    | 97              | 6                 | 0.06                   | D                  | 5318                        | 96                  | 13                  | 0.13                   | C     |
| F87    | 96              | 5                 | 0.05                   | D                  | 5438                        | 74                  | 5                   | 0.07                   | D     |
| F88    | 42              | 5                 | 0.12                   | C                  | 5441                        | 107                 | 13                  | 0.12                   | A     |
| F89    | 95              | 7                 | 0.07                   | D                  | 5442                        | 97                  | 6                   | 0.06                   | D     |
| F91    | 110             | 7                 | 0.06                   | B                  | <i>Aspergillus niger</i>    |                     |                     |                        |       |
| F94    | 112             | 4                 | 0.04                   | B                  | K-20                        | 154                 | 4                   | 0.03                   | B     |
| F98    | 56              | 9                 | 0.16                   | C                  | GR-2 <sup>c</sup>           | 1.6×10 <sup>4</sup> | 1.5×10 <sup>3</sup> | 0.09                   |       |

<sup>a</sup> Group A, GA >100, GARS >10, GARS/GA >0.10; Group B, GA >100, GARS <10, GARS/GA <0.10; Group C, GA <100, GARS >5, GARS/GA >0.10; Group D, GA <100, GARS <10, GARS/GA <0.10.

<sup>b</sup> Activity not detected.

<sup>c</sup> Commercial glucoamylase preparation (Gluczyme).

精製が容易となった。その後、この IF は黒麹菌が生産する生デンプン分解性グルコアミラーゼの生デンプン吸着に係わるペプチド部分であることが、この酵素のプロナーゼ分解によって生ずるペプチド部分と同一であることが判明<sup>50)</sup>して決着した。

##### 5. リゾープスのふすま培養によるグルコアミラーゼ

リゾープス菌は黒麹菌同様にグルコアミラーゼの生産菌として知られている。黒麹菌のグルコアミラーゼは反応至適 pH が 3.5 付近と低い、リゾープス菌のグルコアミラーゼのそれは 4.5 付近にあり、金属機器の防食の観点から工業的には使いやすい。そこで、各種分離源より分離したリゾープス菌 39 株と標準菌 9 株についてふすま培養によるグルコアミラーゼの生産についてスクリーニングを行った。固体培養抽出液のグルコアミラーゼの全活性とともに生デンプン分解性の

グルコアミラーゼ I の活性を測定し、全活性に対する比を指標とした。その結果を Table 9<sup>51)</sup>に示す。Table 9 に示されるように、全活性が 100 単位以上で、しかもグルコアミラーゼ I の活性が全活性の 10% 以上を生産する菌株が分離菌より 4 株、標準菌に 2 株見いだされた。これらの菌株のグルコアミラーゼは生デンプン分解能が高いので、生デンプンからグルコースの生産、生デンプンの無蒸煮アルコール発酵<sup>52)</sup>に使用する糖化酵素の生産菌株として有用と考えられる。

##### 6. 大豆テンペスターターの評価法

テンペは主にインドネシアおよびその周辺地域において大豆種子の子葉をリゾープス（主要菌は *Rhizopus oligosporus*）を主とする餅麴スターター<sup>53)</sup>で発酵させ、タンパク質およびビタミン類の給源<sup>54)</sup>として 800 年来食用にされている食品<sup>55-57)</sup>である。テンペは製造条

件や使用するスターターによって香りが異なる。食品として差別化するためには香りのバランスがとれたテンペを製造する必要がある。テンペの香りの分析はこれまでに報告<sup>59)</sup>されているが、使用スターターの種類や発酵条件と生成する香りとの関係は知られていなかった。

そこで、各種のテンペスターターを入手し、スターターの相違によるテンペの香り成分をヘッドスペース法<sup>59)</sup>により測定した。香り成分は、まず一定条件下でヘッドスペースガスに含まれる香り成分を高分子吸着剤、テナックスに吸着し、これをガスクロマトグラフで分析した。主要ピークを主成分分析<sup>60,61)</sup>で処理して香り成分とスターターを関係づけることができた。この結果、5種類の異なるスターターで調製したテンペの香り成分は46成分が共通成分として検出され、このうち主要成分と考えられる16成分を変数として主成分分析を行った。主成分分析の結果は、散布図上で各スターター別に香り成分がスターターごとにグループ化され、テンペ発酵で生成する香りを使用したスターターに特徴づけることに成功<sup>62)</sup>した。同様に、香りプロファイルの発酵時間依存性<sup>63)</sup>、香りプロファイルの発酵温度依存性<sup>64)</sup>についても主成分分析で特徴づけることができた。ここで示した手法をテンペ製造に適用することでスターターの選択、発酵時間と発酵温度の選択<sup>65)</sup>が可能になると考えられる。同時に、固形発酵食品としてのテンペのテクスチャーの評価について、その判別評価法<sup>66)</sup>を考案し、各種のスターターで調製したテンペの酵素群とテクスチャーの関係について評価<sup>67)</sup>を行った。これら香りプロファイル評価およびテクスチャー評価を総合することで、優良なスターターの選択をすることが期待される。

### おわりに

微生物の固体培養に共通する困難さを羅列すると、不均一実験系の困難さ、定量的な取扱の困難さ、純粋培養の困難さ、混合菌系の取扱の困難さ、微生物増殖量を知る困難さ、制御・計測の困難さが未解決の問題としてあり、これらの困難さの項目はそのまま科学論文作成の困難さに通じる。加えて非殺菌系で固体培養を行うことは、因果関係を明確にする科学的データ収集には致命傷となりやすい。つまり、目的とする結果が得られたとしても、その根拠の判別を明確にする手段がなく、推察、状況証拠から結果の説明をすることとなる。このような非科学的な事情が非殺菌系の固体発

酵研究を遅らせているものと推測している。しかし、目的によっては、コンポスト発酵や発酵食品製造に見られるように、非殺菌系の固体発酵は大量処理が可能で、低コストで、しかも自然環境にやさしい状態で物質変換が遂行される。また、有機性固形廃棄物の除害処理は21世紀には巨大産業に成長するものと着目されている。殺菌系発酵によって特定の菌株のみを増殖させ、有用物質生産を行うことの重要性はよく承知しているが、自然を巧みに利用するという観点からも、さらに非殺菌系固体発酵の利用研究を進めてもよいのではなかろうか。

私は、平成8年度の生物工学賞を受賞するという思いもかけなかった栄誉を生物工学会より戴き、身に余る光栄と感じております。この機会にご推薦賜った方々を始め、ご審査賜った審査員の諸先生方に心からの謝意を表するものであります。私の所属する九州大学農学部の諸先生方を始め、各地におられる関係の諸先生方に併せて深謝申上げるものであります。また、本研究の遂行にあたりましては、恩師、上田誠之助九州大学名誉教授、吉田総合研究所所長、吉田忠幸博士ならびに元児湯養鶏組合長、大富芳郎氏に多大なご教示を賜りました。記して謝意を表します。同時に、私の研究室で研究活動を共にして過し、社会で活躍されている卒業生諸君に感謝の意を改めて表します。

私は、過去28年間にわたって旧日本醸酵工学会および日本生物工学会を研究活動の場として利用させて戴いて参りました。日本生物工学会に深謝申し上げますとともに、今後の日本生物工学会の益々の発展を心より念じて御礼とさせていただきます。

### 文 献

- 1) 有機質資源化推進会議編：有機廃棄物資源化大辞典，p. 141-371，農山漁村文化協会(1997)。
- 2) 基準用語調査，バイオマス，日本産業調査会(1984)。
- 3) 藤尾雄策：有機質廃棄物のコンポスト化に関するシンポジウム講演集，p. 62-68，下水汚泥資源利用協議会(1982)。
- 4) Yoshida, T. and Kobayashi, M.: *Proc. of United Nations, Center for Science and Technology for Development, Tokyo Workshop*, p. 1-18 (1984)。
- 5) Fujio, Y.: *Proc. of the Memorial Seminar on the Future of Agricultural Science in Korea and Japan*, p. 74-94 (1990)。
- 6) Fujio, Y.: *Proc. of the Society of Chemical Engineering, Japan*, vol. 2, p. 380-381 (1997)。
- 7) 藤尾雄策：文部省科学研究費重点領域研究，人間環境系研究報告集 G035 N14-02，含窒素廃棄物の資源化，N-33, 5-33 (1990)。
- 8) Fujio, Y. and Kume, S.: *J. Ferment. Bioeng.*, 72, 334-337 (1991)。
- 9) 吉原一年，三分一政男，藤尾雄策，上田誠之助：醸酵工学，55, 122-128 (1977)。
- 10) 吉原一年，大久保哲朗，藤尾雄策，上田誠之助：醸酵工学，57, 475-481 (1979)。
- 11) 吉原一年，筏島克裕，藤尾雄策，上田誠之助：醸酵工学，58, 131-138 (1980)。

- 12) 吉原一年, 箆島克裕, 藤尾雄策, 上田誠之助: 醸酵工学, **58**, 187-195 (1980).
- 13) 吉原一年, 藤尾雄策, 上田誠之助: 醸酵工学, **60**, 343-348 (1982).
- 14) 吉原一年, 箆島克裕, 藤尾雄策, 上田誠之助: 醸酵工学, **60**, 349-353 (1982).
- 15) Metcalf and Eddy, Inc.: *Wastewater Engineering; Collection, Treatment, Disposal*, p. 378, McGraw-Hill, New York (1972).
- 16) 加藤邦彦, 鈴木達彦: 農業技術研究所報告, B, 第30号, p. 73-135 (1979).
- 17) Hudson, J. A., Morgan, H. W., and Daniel, R. M.: *J. Gen. Microbiol.*, **132**, 531-540 (1986).
- 18) Brock, T. D. and Freeze, H.: *J. Bacteriol.*, **98**, 289-297 (1969).
- 19) Ramaley, R. F. and Hixson, J.: *J. Bacteriol.*, **103**, 527-528 (1970).
- 20) Hara, T., Kume, S., Fujio, Y., Ishizaki, I., and Ogata, S.: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **36**, 13-22 (1991).
- 21) Kume, S. and Fujio, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **36**, 189-194 (1990).
- 22) Kume, S. and Fujio, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **37**, 25-34 (1991).
- 23) Fujio, Y. and Kume, S.: *World J. Microbiol. and Biotech.*, **7**, 12-16 (1991).
- 24) Sapin, A. B., Kume, S., and Fujio, Y.: *Ann. Rep. of ICBiotech.*, **14**, 187-195 (1991).
- 25) Fujio, Y. and Kume, S.: *Microbial Util. Ren. Res.*, **6**, 44-48 (1989).
- 26) Fujio, Y. and Kume, S.: *Microbial Util. Ren. Res.*, **7**, 70-78 (1990).
- 27) Kume, S. and Fujio, Y.: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **36**, 37-44 (1991).
- 28) Ohta, H., Katoh, T., and Fujio, Y.: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **40**, 9-17 (1995).
- 29) Fujio, Y.: *Proc. of the International Symposium on Environmental Biotechnology*, p. 23-32 (1996).
- 30) Fujio, Y.: *Bio Industry*, **15**, 881-887 (1988).
- 31) 金川貴博, 三上栄一: 日本農芸化学会大会講演要旨集, p. 288 (1987).
- 32) Kanekawa, T. and Kelly, D. P.: *FEMS Microbiol. Lett.*, **34**, 13 (1986).
- 33) 金川貴博, Kelly, D. P.: 微工研研究報告, **66**, 37 (1986).
- 34) 太田欽幸, 池田 貢: 農化, **53**, 277 (1979).
- 35) 藤尾雄策, 大富芳郎, 林 幸男, 上田誠之助: 醸酵工学, **56**, 304-309 (1978).
- 36) 田中米実, 田中稔篤, 南里信也, 林田晋策: 醸酵工学, **56**, 788-793 (1978).
- 37) 藤尾雄策, 大富芳郎, 上田誠之助: 醸酵工学, **58**, 17-21 (1980).
- 38) 林 幸男, 藤尾雄策, 上田誠之助: 醸酵工学, **58**, 198-202 (1980).
- 39) 林 幸男, 藤尾雄策, 上田誠之助: 醸酵工学, **59**, 239-243 (1981).
- 40) Ueda, S.: *Bull. Agric. Chem. Soc. Jpn.*, **21**, 284-290 (1957).
- 41) Ueda, S. and Saha, B. C.: *Starch/Starke*, **32**, 420-423 (1980).
- 42) Towprayoon, S., Saha, B. C., Fujio, Y., and Ueda, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **29**, 289-291 (1988).
- 43) Saha, B. C. and Ueda, S.: *Starch/Starke*, **33**, 313-316 (1981).
- 44) Saha, B. C. and Ueda, S.: *Agric. Biol. Chem.*, **47**, 2773-2779 (1983).
- 45) Saha, B. C. and Ueda, S.: *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **19**, 341-346 (1984).
- 46) Towprayoon, S., Fujio, Y., and Ueda, S.: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **8**, 98-101 (1992).
- 47) Towprayoon, S., Fujio, Y., and Ueda, S.: *World J. Microbiol. Biotechnol.*, **6**, 400-403 (1990).
- 48) Van Hop, D., Towprayoon, S., Fujio, Y., and Ueda, S.: *ICBiotech.*, **11**, 271-278 (1988).
- 49) Towprayoon, S. and Fujio, Y.: *ICBiotech.*, **14**, 377-380 (1991).
- 50) Hayashida, S., Nakahara, K., Kanlayalrit, W., Hara, T., and Teramoto, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **53**, 143-149 (1989).
- 51) Elegado, F. B. and Fujio, Y.: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **39**, 541-546 (1993).
- 52) Fujio, Y., Suyanadana, P., Attasampunna, P., and Ueda, S.: *Biotechnol. Bioeng.*, **26**, 315-319 (1984).
- 53) Hadiseepoetro, E. S., Takeda, N., and Oshima, Y.: *J. Ferment. Technol.*, **54**, 251-259 (1979).
- 54) Truesdell, D. D., Green, N. R., and Acosta, P. B.: *J. Food Sci.*, **52**, 493-494 (1987).
- 55) Karyadi, D.: *Proc. Asian Symposium on Non-Salted Soybean Fermentation*, p. 50-59 (1985).
- 56) Steinkraus, K. H.: *Proc. Asian Symposium on Non-Salted Soybean Fermentation*, p. 9-19 (1985).
- 57) Winarno, F. G.: *JAOCs*, **56**, 363-366 (1979).
- 58) Murata, K., Ikeda, H., and Miyamoto, T.: *J. Food Sci.*, **32**, 580-586 (1967).
- 59) Wada, K., Ohgama, S., Sasaki, H., Shimoda, M., and Osajima, Y.: *Agric. Biol. Chem.*, **51**, 1745-1752 (1987).
- 60) Aishima, T.: *Agric. Biol. Chem.*, **43**, 1711-1718 (1979).
- 61) Duus, D. T., Kraggerud, H., and Dahl, M.: *Flavour Science and Technology*, (Martin, M., Dalen, G. A., and Ruswurm, H. Jr.), p. 509-514, John Wiley & Sons (1987).
- 62) スプリアント, 和田浩二, 早川 功, 藤尾雄策: 醸酵工学, **69**, 331-336 (1991).
- 63) スプリアント, 早川 功, 藤尾雄策: 九大農学芸誌, **46**, 9-15 (1991).
- 64) スプリアント, 早川 功, 藤尾雄策: 九大農学芸誌, **46**, 17-22 (1991).
- 65) 藤尾雄策: 大豆月報, 通巻171号, 4-10 (1991).
- 66) Manurukchinakorn, S. and Fujio, Y.: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **41**, 231-237 (1997).
- 67) Manurukchinakorn, S. and Fujio, Y.: *J. Fac. Agr., Kyushu Univ.*, **41**, 223-230 (1997).