

(5) 毛髪分解細菌による下水汚泥コンポストの品質向上に関する基礎的研究
Basic Study on Quality Improvement of the Sewage Sludge Compost by
Hair-Decomposing Bacteria

倭 常郎*, 矢口 淳一**, 野池 達也*

Tsuneo YAMATO*, Junichi YAGUCHI**, Tatsuya NOIKE*

ABSTRACT: In order to improve the quality of sewage sludge compost products, hair-decomposing bacteria were isolated and investigate their function on composting process, because much human hair remaining in sewage sludge compost causes deterioration in quality. The isolated strains on the agar plates served in hair and keratin liquid medium for measuring the generated amino acid concentration and observing the situation of hair decomposition microscopically. Three strains, including *Bacillus* sp. (No.5) and two actinomycetes (No.9 and No.10) were obtained as promising bacteria and their characteristics were examined through four experiments. From the results of time course experiments, No.10 got the highest rate of amino acid production of 1.834(g/L·day) from keratin. The temperature experiments showed that in the hair liquid medium the peak of the rate of amino acid production was at 25℃ and the minimum was at 50℃. The falling rate of No.5 by the effect of rising temperature was smaller than other two. The coefficient dependent on temperature which was analogous to the activation energy in Arrhenius equation was introduced to evaluate the effect of temperature. In addition, the results of the mixture of experiments and the pretreatment experiments were discussed.

Keywords: sewage sludge compost, human hair, hair-decomposing bacteria, keratin, amino acid production rate

1 はじめに

近年、下水道の普及にともない排出される汚泥の量も年々増加している。現在下水汚泥の処分状況は有効利用が 57.6%、埋立処分が 40.6%となっている¹⁾。また、最終処分場の残余年数も全国平均で 3.9 年²⁾と非常に逼迫している状況を考えると、下水汚泥の排出量を減少させるか埋立処分量を低減させ、汚泥の有効利用を促進させることが重要である。国土交通省では平成 15 年 12 月 1 日から下水汚泥資源化・先端技術誘導プロジェクト (LOTUS Project) として、スラッジ・ゼロディスチャージ技術の開発や

* 東北大学大学院 工学研究科 土木工学専攻 (Department of Civil Engineering, Graduate School of Engineering, Tohoku University)

** 八戸工業高等専門学校 建設環境工学科 (Hachinohe National College of Technology, Department of Civil and Environmental Engineering)

グリーン・スラッジエネルギー技術の開発が始動している³⁾。本研究では下水汚泥の有効利用手法の一つであるコンポスト化に注目し、下水汚泥コンポスト製品の品質上の問題点である毛髪の残存を改善し、コンポストの品質向上を目指した。現在、下水汚泥コンポスト製品中には毛髪が多く含まれ、農業利用者にとって非常に使いづらいものとなっている。毛髪の除去方法としては、スクリーンを設置し物理的に除去する方法もあるが、大きな浮遊物質も全て阻止されてしまうのでスクリーンはすぐに目詰まりを起こし、維持管理、コストの面で推奨できるものではない。そこで、汚泥のコンポスト過程で毛髪を生物学的に分解することができればコンポスト製品の品質向上が図れると考え、毛髪分解活性の高い細菌のスクリーニングを行った。スクリーニングした菌株から有望株を3株ピックアップし、顕微鏡観察、分解活性の測定、諸性質の検討を行い最適株を選定した。

2 毛髪の構造

毛髪はシスチン含量の低いタンパク質と高いタンパク質の2種類から成り、前者はマイクロフィブリルを構成するIFタンパク、後者はマイクロフィブリルを包埋するマトリックス物質の構成成分で、マトリックスタンパク(IFAP)と呼ばれている⁴⁾。図-1に毛髪の階層構造模式図を示す⁴⁾。IFタンパクはらせん状の α -ヘリックスをもつ分子で、この分子2本が互いに巻きついてロープ状を形成し、さらにロープが集まって4分子集合体となる。この集合体が8単位集合しマイクロフィブリルを構成する。一方IFAPタンパクは球状タンパク分子であると言われ、それらは集合してマトリックスを形成しており、マトリックスに埋め込まれたマイクロフィブリルが規則的に集まってマクロフィブリルを形成する⁵⁾。コルテックス細胞はマクロフィブリルの集合体からなり、隣接細胞との境界には3層構造からなる細胞膜複合体(CMC)が存在している。

キューティクルは硬いウロコ状の細胞からなり、根本から毛先に向かって厚さ約0.5 μ mの扁平なキューティクル細胞が6層から10層重なりあって、内側のコルテックスを保護している。キューティクルは毛髪体積全体の13.5%程度を占めており、その重なる枚数が多いほど毛髪の強度が増す。キューティクルは最内層のエンドキューティクル、中間層のエキシキューティクル、最外層のエピキューティクルの3層で構成され、エピキューティクルは疎水性で塩素水に対して抵抗性がある。また最内層のエンドキューティクルは、親水性でアルカリを吸い込むので、繊維の膨潤挙動に大きく関係している⁴⁾。

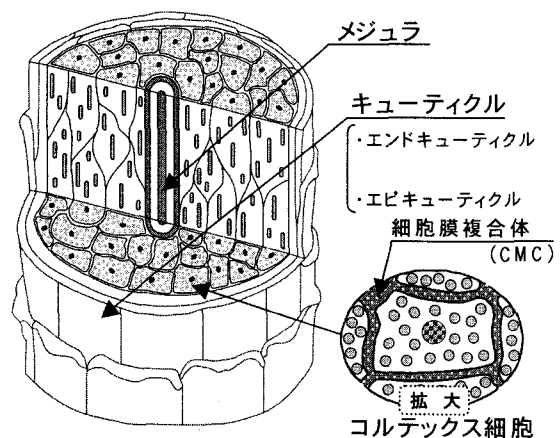


図-1 毛髪の階層構造⁴⁾

3 実験材料および方法

3.1 実験のフロー

図-2 に実験方法のフローを示す。先ず始めに土壌、活性汚泥、底泥、養鶏場付近の土壌などからサンプルを収集した。次にサンプルを適宜希釈して平板培養を行い、ケラチン寒天培地、スキムミルク寒天培地でケラチン分解菌、タンパク質分解菌を分離培養し、分離した菌株はスラント培養で長期間保存した。ここまでを一次スクリーニングと定義する。二次スクリーニングでは、ケラチン液体培地及び毛髪液体培地を用いて、各基質を分解して生成するアミノ酸の濃度を測定し、分解活性を調査した。また液体培養終了後、毛髪液体培地から毛髪を採取し顕微鏡で毛髪の分解の様子を観察した。これらの結果に基づいて有望株を選定し、諸性質の検討を行い最適株を選定した。

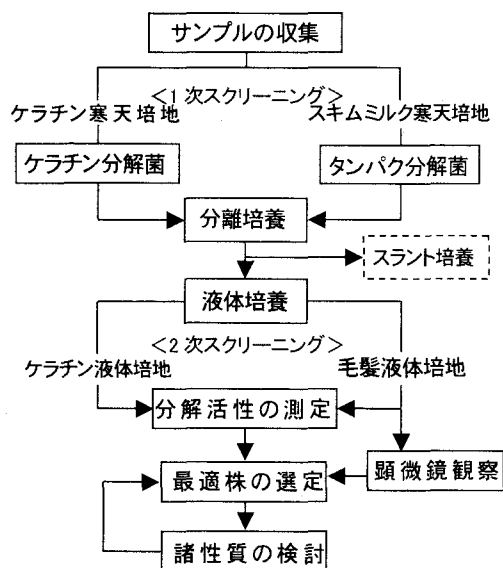


図-2 実験方法のフロー

3.2 一次スクリーニング

土壌や底泥などのサンプルをガラスホモジナイザーで粉碎して均一にし、表-1 に示した分離培地⁶⁾ を使用してサンプルを適宜希釈し平板培養を行った。分離培地には、毛髪の主成分であるケラチン（和光純薬製）と乳タンパク質であるスキムミルク粉末（東京化成製）を単一炭素源とする合成寒天培地を使用し、各寒天培地上で明白なハロー（透明部）を形成した菌株をスクリーニングした。単離した菌株はスラント培地で長期間保存した（約 3 ヶ月間）。またケラチン分解活性が既に報告されている菌株⁷⁾、12 株を生物遺伝資源センターより購入し、ケラチンと毛髪の分解能力を調べた。

3.3 二次スクリーニング

二次スクリーニングでは、分離株のケラチン分解活性と毛髪分解活性を液体培養で測定した。使用した培地は、表-1 の培地組成から寒天を除き酵母エキスを 1.0g/L の濃度で添加したケラチン液体培地、およびエタノールと水で洗浄し乾燥させた毛髪 2g/L に表-1 の無機塩類、酵母エキスを添加した毛髪液体培地である。液体培養は、温度 30℃、回転数 120rpm、期間 10 日間の条件で 50mL の坂口フラスコで振とう培養した。振と

表-1 培地の組成⁶⁾

構成物質	濃度 (g/L)
K_2HPO_4	1.0
KH_2PO_4	0.5
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.025
$CaCl_2$	0.025
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	0.015
$ZnSO_4 \cdot 7H_2O$	0.005
keratin	10
skim milk	30
agar	18
pH 7.3	

う培養終了後、培養液 0.5mL と 50%TCA（トリクロロ酢酸）溶液 0.5mL を遠沈管にとり浮遊するタンパク質を沈殿させた。遠心分離後、試験管に上澄み 0.2mL をとり蒸留水 1.8mL およびニンヒドリン試薬 2.0mL を添加し、沸騰水浴中で 15 分間加熱後、波長 570nm で吸光度を測定して、各分離株がタンパク質を分解して生成するアミノ酸の濃度を測定した。⁸⁾ また液体培養終了後毛髪をラクトフェノールブルーで染色して⁹⁾顕微鏡で観察し、毛髪の分解状況を調べた。

3.4 有望株の諸性質の検討

二次スクリーニングで良好な結果を得ることができた有望菌株に関しては、温度条件 25℃で単独および 2 株、3 株を混合した混合培養実験と培養温度を 25℃、30℃、40℃、45℃、50℃に設定して液体培養した温度実験を行った。また液体培養前の毛髪をブレンダー（大阪ケミカル製）で回転数 15,700rpm、5 分および 15 分の条件で処理したケースと、超音波ホモジナイザー（50W、日本精機製）で 1 分および 3 分の条件で処理したケースの 4 系統について温度条件 25℃で前処理実験を行った。液体培地には二次スクリーニングで用いたケラチン液体培地と毛髪液体培地を使用した。

4 実験結果および考察

4.1 スクリーニング結果

4.1.1 一次スクリーニング結果

現在までに分離したタンパク質分解菌およびケラチン分解菌は約 120 株であり、ほとんどが土壌から分離された。菌の種類は 80%以上がバクテリアでその他放線菌、カビ、酵母も分離された。また生物遺伝情報センターより購入した *Bacillus licheniformis* 10 株、*Streptomyces pactum* 2 株の合計 12 株に関してケラチンおよび毛髪分解能を寒天培地で調査したところ、全ての株がスキムミルク寒天培地でハローを形成し、半分の 6 株はケラチン分解能力を示した。

表-2 スクリーニング結果の総括表

	分離源	菌の形態	耐熱性*	顕微鏡観察*	推定される属
1	土壌	長桿菌	—	—	
2	土壌	桿菌・芽胞あり	+	+	<i>Bacillus</i>
3	河川底泥	球菌	—	++	
4	鳥糞	桿菌・芽胞あり	+	++	<i>Bacillus</i>
5	土壌	桿菌・芽胞あり	++	+++	<i>Bacillus</i>
6	腐葉土	桿菌・芽胞あり	++	++	<i>Bacillus</i>
7	購入株	桿菌・芽胞あり	+	+	<i>Bacillus licheniformis</i>
8	腐敗きのこ	菌糸状	++	+++	放線菌
9	土壌	菌糸状	—	+++	放線菌
10	腐敗きのこ	菌糸状	++	+++	放線菌

*耐熱性試験(60℃、2hrs)

(-) : コロニー形成無し、(+) : 一部コロニー形成、(++) : 大部分コロニー形成

**液体培養(30℃、10 日間、120rpm)後の毛髪顕微鏡観察

(-) : 変化なし、(+) : 一部の毛髪破損、(++) : 約半数の毛髪破損、(+++) : 大多数の毛髪破損

4.1.2 二次スクリーニング結果

分離培養した菌株と購入株は、ケラチン液体培地と毛髪液体培地を用いて液体培養を行い、ケラチン分解活性と毛髪分解活性を測定した。二次スクリーニングで良好な結果を得ることができた菌株 10 株についてのスクリーニング結果を表-2 に示す。顕微鏡などによる形態観察により、No.2、No.4、No.5 および No.6 株は *Bacillus* 属、No.8、No.9、No.10 株は放線菌であると推測された。購入株については、No.7 株の *B. licheniformis* (NBRC14206) のみ活性が高かった。*Bacillus* 属と推測された 4 株と購入株の No.7 株は芽胞を有し、耐熱性試験の結果 60℃ の高温でも耐えられることが確認できた。また、No.8 株と No.10 株についても耐熱性試験で 60℃ の高温に耐えうる性質を持っていることが分かった。表-2 に示した 10 株の液体培養実験結果について、ケラチン分解活性を図-3 に、毛髪分解活性を図-4 にそれぞれ示す。ケラチンおよび毛髪を分解して生成したアミノ酸の量は、ケラチン液体培地の方が毛髪液体培地より約 10 倍多く、窒素を基準とするアミノ酸生成収率で比べてもケラチン培地では 50% を超える菌株が 3 株見られたのに対し、毛髪培地では 1 株もなかった。これは液体培地中のケラチンと毛髪の初期濃度が 5 倍違うことも影響するが、強固な毛髪の構造も大きく影響していると考えられる。

毛髪は、図-2 に示すようにメジュラ、コルテックス、キューティクルの 3 層構造となっており、毛髪内部のコルテックスを硬いうるこ状のキューティクルが被覆し保護しているため、ケラチンに比べて分解活性が低かったものと考えられる。写真-1 は、毛髪液体培地で No.5 株を 10 日間振とう培養した後の毛髪を顕微鏡観察したものである。毛髪は分解が進んで毛髪内部を保護していたキューティクルが破壊され、内部のコルテックスが露出しマクロフィブリルがほぐれてきていた。No.5 株と同様に、No.8、No.9、No.10 株ではほとんど全ての毛髪で表面のキューティクルが剥離していた。耐熱性を有しケラチン分解活性が高く顕微鏡観察でも良好な結果が得られた No.8 株、No.10 株、またケラチン分解活性や毛髪分解活性は他の菌株より

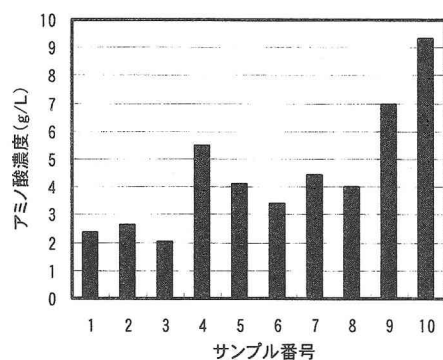


図-3 各分離株のケラチン分解活性

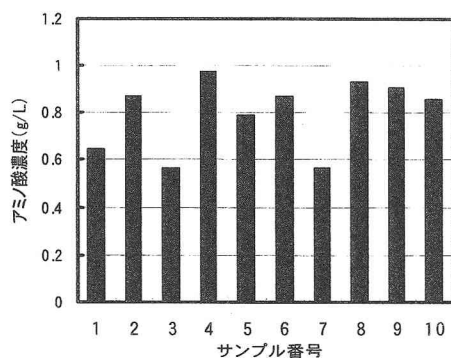


図-4 各分離株の毛髪分解活性

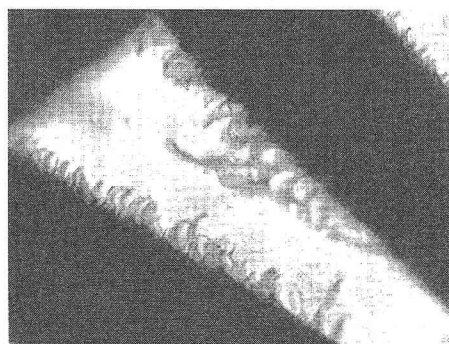


写真-1 No.5 株液体培養顕微鏡写真(×400)

劣っていたが、顕微鏡観察ではほとんどの毛髪でキューティクルの剥離が確認できた No.5 株は有望な菌株であると考えられる。

4.2 有望株の諸性質の検討

4.2.1 経日変化

二次スクリーニングで良好な結果を得ることができた No.5、No.9、No.10 株については、ケラチン液体培地と毛髪液体培地を用いて 30℃、22 日間の条件で振とう培養を行い、生成するアミノ酸濃度の経日変化を測定した。ケラチンから溶出したアミノ酸濃度は、No.10 株、No.5 株が実験開始後 5 日目で最大となったのに対し、No.9 株は 10 日目にピークを向かえた。このピーク値とピークに到達した培養期間からアミノ酸生成速度を求めた結果、No.5 株は 0.918g/L・day、No.9 株は 0.947g/L・day、No.10 株は 1.834g/L・day となり、No.10 株は No.5 株と No.9 株の 2 倍のアミノ酸生成速度を示した。

毛髪から溶出したアミノ酸濃度の変化は 3 株とも同じような挙動を示し、実験開始 10 日以降はアミノ酸濃度の増加はほとんど見られなかった。この 10 日目のデータからアミノ酸生成速度を算出すると、3 株とも 0.19~0.22g/L・day の範囲で、ケラチンからのアミノ酸生成速度の約 1/5~1/10 であった。これらの結果から No.10 株が最も有望な菌株であると推測される。またアミノ酸生成速度は菌体濃度の影響を受けるが、本研究では培養後の菌体濃度は、菌体と不溶性基質のケラチン、毛髪との分離が難しく測定していない。

4.2.2 混合培養実験

二次スクリーニングで良好な結果を得ることができた No.5 株、No.9 株、No.10 株について菌株を混合して 25℃、期間 10 日間の条件で液体培養を行い、単独株の場合と比較検討した。図-5 に混合培養実験におけるアミノ酸生成速度を示す。ケラチン分解実験では No.9・No.10 混合系が 1.17g/L・day と最も活性が高く、それぞれの単独培養と比較して No.9 株と No.10 株の間には混合効果が認められた。No.9 株は No.5 株と混合

培養した場合もアミノ酸生成速度が増加し、混合効果を確認することができた。一方 No.5 株は各分離株を混合したときより No.5 株単独で培養したほうが活性が高くなり、No.5 株に関しては菌の混合効果はみられなかった。特に No.5 株と No.10 株を混合した場合、各々の単独株よりアミノ酸生成速度が低下し、負の効果がみられた。これは 3 株の混合培養でも認められる。

また毛髪分解実験でも No.9・No.10 混合株が 0.26g/L・day と最も活性が高

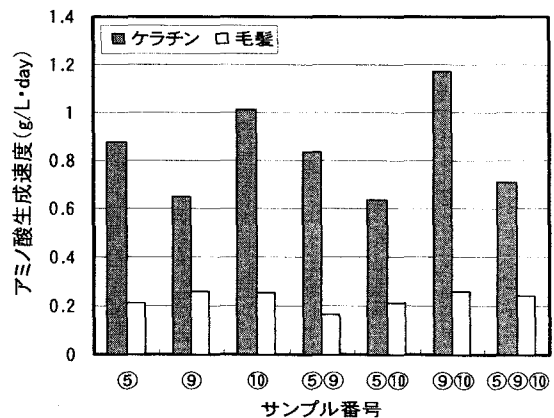


図-5 菌混合培養によるアミノ酸生成速度

くなったが、ケラチン分解実験ほど混合効果はみられなかった。No.5 株との混合によるマイナス効果は毛髪分解実験でも観察された。

4.2.3 温度実験

液体培養実験を 25℃、30℃、40℃、45℃、50℃の温度条件で 3 つの有望株について行い、アミノ酸生成速度を解析した。図-6 にアミノ酸生成速度に及ぼす温度変化の影響を示す。ケラチン分解実験に及ぼす温度の影響では、3 株とも 30℃でアミノ酸生成速度が最も速く、温度が高くなるにつれアミノ酸生成速度が低下した。温度 30℃

の条件では、No.10 株が No.5 株、No.9 株の約 2 倍のアミノ酸生成速度を示し、最も活性が高かったが、温度が上昇するにつれアミノ酸生成速度が遅くなり、40℃、45℃および 50℃の温度条件では 3 株のアミノ酸生成速度はほとんど変わらなかった。温度条件 30℃と 50℃のアミノ酸生成速度を比較して温度変化による速度低下率を算出すると、No.5 株が 82.1%、No.9 株が 87.6%、No.10 株が 93.6%であった。

毛髪由来のアミノ酸生成速度でも 3 株は同じ挙動を示し、25℃で最もアミノ酸生成速度が速く、40℃ではアミノ酸生成速度が最も低下した。また 3 株ともアミノ酸生成速度に大きな差はみられなかった。温度条件 25℃と 50℃のアミノ酸生成速度を比較して速度低下率を算出すると、No.5 株が 33.9%、No.9 株が 46.1%、No.10 株が 60.6%となり、ケラチン、毛髪どちらに関しても No.10 株が高温領域に弱く、逆に No.5 株は温度上昇による速度低下率が最も小さかった。

ほとんどの化学反応や生物反応は、温度上昇によって反応速度が増大する。こうした、温度上昇に伴う反応速度の増大は反応速度定数の増大として示され、次の Arrhenius 式が適用される¹⁰⁾。

$$\frac{d \ln k}{dT} = \frac{E_a}{RT^2} \quad \dots\dots\dots \text{式(1)}$$

ここに、k：反応速度定数、E_a：活性化エネルギー、R：気体定数、T：絶対温度

式(1)を積分変形して lnk と 1/T の関係をプロットして活性化エネルギー E_a を算出することができる。しかしながら、生物反応は様々な化学反応が積み重なった総括的な反応であり、算出された活性化エネルギーの意味するところが不明なことが多い。そこで遠藤ら¹¹⁾は、Arrhenius 式と同形の式(2)を用いて嫌気性消化の酸生成相に対する温度の影響を解析した。

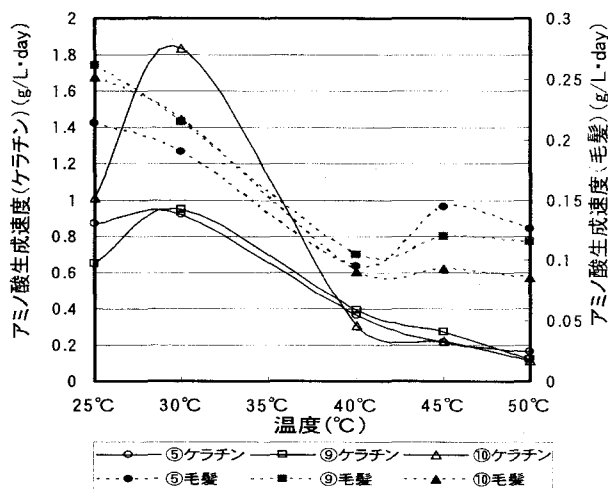


図-6 アミノ酸生成速度に及ぼす温度変化の影響

$$v = c \cdot e^{-u/T} \quad \dots\dots\dots \text{式(2)}$$

$$\ln(v) = -u \frac{1}{T} + c' \quad \dots\dots\dots \text{式(3)}$$

ここに、 u ：温度依存係数、 c 、 c' ：定数、 v ：アミノ酸生成速度

本研究においても、アミノ酸の生成速度は温度条件だけで決定されるだけでなく、温度変化に伴って変化する他の環境因子によって二次的影響を受ける。ここでは、アミノ酸生成速度を対象として温度による影響について式(2)、式(3)を用いて考察する。

図-7には各分離株におけるケラチンからの $\ln(v)$ と $1/T$ のプロットを、図-8には毛髪からの $\ln(v)$ と $1/T$ のプロットを示す。また、表-3に得られた各分離株の温度依存係数を示す。各株とも毛髪からのアミノ酸生成速度に関する温度依存係数は、ケラチンにおける温度依存係数の約1/3～1/4倍となった。これは毛髪からのアミノ酸生成速度の方がケラチンからのアミノ酸生成速度より温度上昇による影響が小さいことを意味する。また各分離株の温度依存係数を比較すると、ケラチンおよび毛髪液体培地ともNo.10株が最も温度上昇に影響されることが確認された。一方、他の2株と比べNo.5株の温度依存係数は低く、温度上昇に影響されにくいことが知られた。

4.2.4 前処理実験

前述のように、毛髪の強度はキューティクルの被覆枚数や厚みに大きく依存する。そこであらかじめ前処理によって毛髪表面のキューティクルにダメージを与えることで、その後の生物学的処理に効果が期待できるのではないかと考え前処理実験を行った。液体培養前にブレンダーで5分もしくは15分間で破碎処理した毛髪と、超音波で1分および3分で処理した毛髪を使用し、未処理の毛髪と比べ生成するアミノ酸濃度に変化するか調査した。図-9にNo.10株における毛髪の前処理実験結果を示す。ブレンダーで処理した場合のアミノ酸生成速度

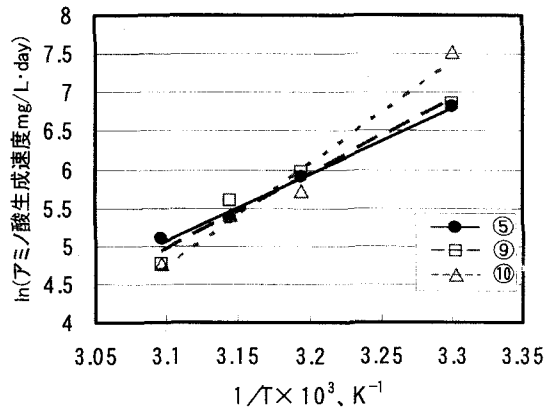


図-7 ケラチンにおける $\ln(v)$ と $1/T$ のプロット

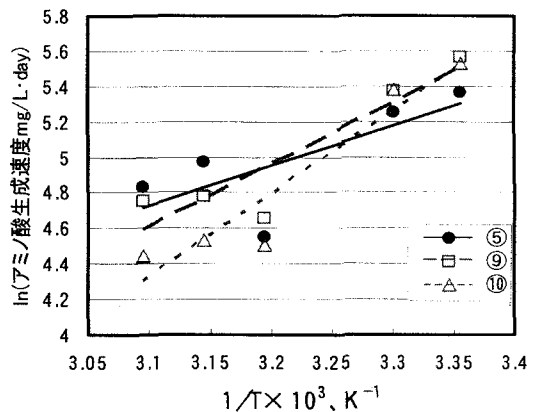


図-8 毛髪における $\ln(v)$ と $1/T$ のプロット

表-3 各分離株の温度依存係数

	温度依存係数(u)		
	No.5株	No.9株	No.10株
ケラチン液体培地	-8.68	-9.73	-13.33
毛髪液体培地	-2.23	-3.50	-4.68

は、未処理の $0.34 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ と比べ 5 分間のブレンダー処理で $0.40 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ 、15 分間のブレンダー処理で $0.41 \text{ g/L} \cdot \text{day}$ とわずかながら効果が認められた。また超音波処理は、実施した実験条件下では効果が見られなかった。

前処理した毛髪を液体培養前に顕微鏡観察したところ、ブレンダー処理では毛髪表面に傷が見受けられたのに対し、超音波処理では変化が認められなかった。液体培養後の毛髪を顕微鏡で観察した結果、写真・1 に示した前処理なしで液体培養した毛髪と大きな差はみられなかった。しかしながら、液体培養後の毛髪をブレンダーで処理（後処理）し、顕微鏡観察したところ毛髪が大きく破損しているのを確認することができた。写真・2 にブレンダーで後処理した毛髪の顕微鏡写真を示す。毛髪は内部まで大きく破断され、ばらばらに破損していた。これは液体培養後の毛髪は表面のキューティクルが毛髪分解菌によって侵食され、弱体化している所にブレンダーで処理したため大きく破損したものと考えられる。

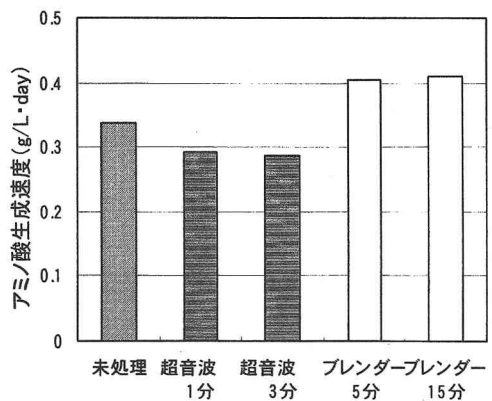


図-9 毛髪前処理実験結果 (No.10 株)

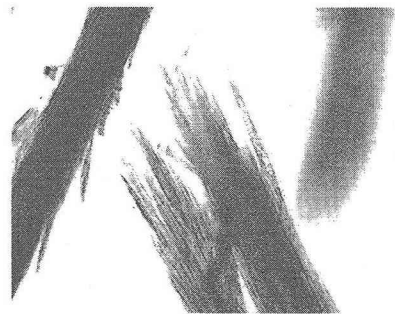


写真-2 液体培養後にブレンダー処理した毛髪写真 (×400)

5 まとめ

本研究で得られた知見を以下にまとめる。

- (1) 液体培養実験や耐熱性試験、顕微鏡観察などで行った二次スクリーニングの結果、*Bacillus* 属と推定される No.5 株、放線菌である No.9 株と No.10 株が毛髪分解活性が高く、コンポスト過程でも機能する有望株であると推測された。
- (2) 有望株の 3 株を混合培養実験、温度実験、前処理実験を行い諸性質を検討した結果、混合培養実験では No.9・No.10 株で混合効果が認められ、温度実験では No.5 株が高温領域でもアミノ酸生成速度が低下しにくいことが確認できた。また前処理実験ではブレンダー処理でも超音波処理でもアミノ酸生成速度は未処理と比べ大きな変化はみられなかった。

今後は分離された有望株を用いて実際に下水汚泥コンポスト実験を行い、コンポスト発酵過程でこれらの菌株が有効に機能するかどうか検討するとともに、 60°C となる条件でも活性の高い高温菌の探索も同時に行っていきたい。

〔謝辞〕

本研究の一部は、(財)東北建設協会の平成 13 年度「建設事業の技術開発に関する助成事業」(2001-05)の一環として行われたものである。また本研究を進めるにあたり、八戸高専建設環境工学科学学生(当時)、柿崎道子、後村勝美の諸君に協力いただいた。記して深く感謝の意を表わす。

参考文献

- 1) 社団法人日本下水道協会、下水道のあれこれ、http://www.alpha-web.ne.jp/jswa/05_a_rekore/index.html
- 2) 環境省：平成 15 年版環境白書、株式会社ぎょうせい、pp154-159 (2003)
- 3) 国土交通省都市・地域整備局下水道部：汚泥有効利用に関するデータベース、<http://www.mlit.go.jp/crd/city/sewerage/information/odeidb/031224db.html>
- 4) 松崎 貴、新井幸三、上甲恭平、細川 稔、中村浩一：最新の毛髪科学、毛髪科学技術者協会編、フレグランスジャーナル社、pp59-72 (2003)
- 5) 小山次郎、竹内敬人、堀内忠郎、山科郁男、山羽 力訳：レーニンジャーの新生化学(上)、廣川書店、pp165-185 (1984)
- 6) Evans E.G.V. and Hose H. : In Vitro Degradation of Human Hair by *Hendersonula Toruloidea*, *Sabouraudia*, Vol.13, pp323-328 (1975)
- 7) Onifade A.A., Al-Sane N.A., Al-Musallam.A.A. and Al-Zarban S. : A Review: Potentials for Biotechnological Applications of Keratin-Degrading Microorganisms and Their Enzymes for Nutritional Improvement of Feathers and Other Keratins as Livestock Feed Resources, *Bioresource Technology*, Vol.66, pp1-11 (1998)
- 8) 社団法人日本生物工学会編：生物工学実験書、培風館、pp6-7 (1992)
- 9) 高橋久：ケラチン分解菌、山里一英、宇田川俊一、児玉徹、森地敏樹監修、微生物分離法、プランニング社、pp229-238 (1986)
- 10) 北尾高嶺：生物学的排水処理工学、コロナ社、p65 (2003)
- 11) 遠藤銀朗、野池達也、松本順一郎：嫌気性消化の酸生成相に及ぼす温度と pH の影響、土木学会論文報告集、第 330 号、pp49-57 (1983)