

リグノセルロースのマイクロ波照射

第7報 セルロースのマイクロ波照射と酵素糖化

東 順一*・尾崎 明美*・越島 哲夫*

Microwave Irradiation of Lignocellulosic Materials

VII. Microwave Irradiation and Enzymatic Saccharification of Celluloses

Jun-ichi AZUMA*, Akemi OZAKI* and Tetsuo KOSHIJIMA*

(昭和60年9月19日受理)

Avicel SF Cellulose (particle size 6~10 μm) and Cellulose Powder D (particle size 150~400 μm) were heated by microwave irradiation in the presence of water and enzymatically saccharified.

The acidity of the microwave-irradiated solution increased with increasing temperature and reached about 0.09 meq at 230°C. Reducing sugar productions initiated at 180°C, and reached 10.5% (Avicel SF Cellulose) and 6.5% (Cellulose Powder D) at 235°C. A portion of cellulose was degraded into glucose and cello-oligosaccharides. The extent of decomposition of cellulose was also evaluated by measuring ultraviolet spectra of the water-soluble fractions. A small amount of hemicellulosic polysaccharides contaminated in these commercially available cellulose preparations could be removed by microwave irradiation at 235°C.

Although the enzymatic susceptibility of the microwave-irradiated celluloses slightly dropped up to 210°C, it rapidly increased with increasing temperature above 220°C. The extent of saccharification reached 81% (Avicel SF Cellulose) and 60% (Cellulose Powder D) at 245°C. The present results indicate the applicability of microwave heating pretreatment for enzymatic saccharification of celluloses.

概 要

アビセル SF セルロース (粒子サイズ 6~10 μm) とセルロースパウダー D (粒子サイズ 150~400 μm) の二種のセルロースを含水・密閉下マイクロ波加熱した後酵素糖化した。

マイクロ波照射後直ちに温度が上昇し、10~12分の処理で 230°C となった。温度の上昇に伴ない酸の生成が認められ、pH は低下した。230°C の加熱では約 0.09 meq の酸が生成し、pH は3.0~3.2となった。還元糖の生成は 180°C 以上の加熱で認められ、235°C ではアビセル SF セルロースの場合10.5%、セルロースパウダー D の場合 6.5%であった。マイクロ波加熱によりセルロースが分解しグルコースとセロオリゴ

* 木材化学部門 (Research Section of Wood Chemistry)

糖が生成した。このセルロースの加熱分解は水層の紫外吸収スペクトルを測定することによりモニターした。また、235°C以上に加熱することによりセルロース中に混在しているヘミセルロース系多糖を除去することができた。

マイクロ波加熱後酵素糖化を行なったところ、210°C以下の加熱では糖化率は低下するが、220°C以上の加熱では急激に糖化率が向上することがわかった。糖化率は245°Cの加熱では、アビセル SF セルロースの場合81%、セルロースパウダーDの場合60%であった。

以上の結果から、マイクロ波加熱前処理はリグノセルロースのみならず、セルロースの酵素糖化においても効果的であると判明された。

1. 緒 言

リグノセルロースの酵素糖化は主としてセルロースの結晶性とリグニンによる被覆のために、一般に極めて困難である。このため、酵素糖化に先だって何らかの前処理を施すことが肝要となっている。著者らは種々の前処理法を試みている過程で図らずもマイクロ波加熱処理が効果的な前処理法となり得ることを見出した¹⁾。しかし、このマイクロ波加熱前処理がいかなる種類のリグノセルロースにも適用されるか否かを明らかにする必要がある。種々の木質系リグノセルロース^{1,3,4)}、農産廃棄リグノセルロース²⁾、および樹皮⁵⁾についてこの前処理の酵素糖化への効果を検討した。その結果、優劣は認められるが、マイクロ波加熱前処理は用いたすべてのリグノセルロースの酵素に対する反応性を向上させることが明らかになった。

ところで、上記の未処理リグノセルロースの他、いったん物理的・化学的な処理が施されたセルロース性製品の廃棄物の酵素糖化も資源の有効利用を計る上で重要であると思われる。このようなセルロース性資源には、古新聞、古雑誌、古本、使用済みの紙製品や繊維製品等があげられる。しかしながら、これらのセルロース性資源にはセルロース以外の成分が含まれており、酵素糖化する場合影響を無視することはできない。従って、これらのセルロース性資源の酵素糖化を効果的に行なうためにはそれに先だって、純粋セルロースの酵素糖化を行なう必要があると思われる。マイクロ波加熱前処理法をセルロースに適用する場合、含水下における高温高圧処理のセルロースに及ぼす作用が問題となる。これまでセルロースの乾式熱分解については多量のデータが集積され、分解機構が次第に解明されつつある⁷⁻¹⁰⁾。しかしながら、セルロースの含水下での熱分解については研究例は少ない¹¹⁻¹⁴⁾。特に200°C以上で単時間加熱した場合のセルロースの挙動については不明な点が多い。

そこで、著者らはワットマン CF11 セルロースをとりあげ、マイクロ波加熱を行ない酵素糖化への効果を検討した。その結果、マイクロ波加熱のみではセルロースの分解・糖化の程度は低く、糖化率を向上させるためにはリグノセルロースの場合よりも約10°C高温(230°C以上)に加熱した後酵素処理する必要があることが明らかになった⁵⁾。ここで、ワットマン CF11 セルロースはコットン由来の大部分の粒子サイズが10~140 μmにある微結晶セルロースである。従って、セルロースの酵素糖化に対するマイクロ波加熱の効果をさらに詳細に検討するためには起源と粒子サイズの異なるセルロースについても同様の研究を行なう必要があると考えられた。

本研究では、同じくコットン起源であるがワットマン CF11 セルロースより粒子サイズの大きいセルロースパウダーD(150~400 μm)と、粒子サイズの小さいパルプ起源のセルロース標品であるアビセル SF セルロース(6~10 μm)についてマイクロ波加熱を行ない、これらセルロースへの作用の解明を試みると同時に加熱にともなう酵素反応性の変化を比較検討した。

2. 実験方法

2.1 試料

セルロース試料としてパルプ起源のアビセル SF セルロース (旭化成工業, 薄層クロマトグラフ用, 粒子サイズ 6~10 μm), および, コットン起源のセルロースパウダー D (東洋科学産業, カラムクロマトグラフおよび動物飼料実験等用, 粒子サイズ 150~400 μm) の二種の起源・粒子サイズの異なるセルロースを用いた。

2.2 マイクロ波加熱

A-3-L₂ 型耐圧ガラス管 (耐圧ガラス工業) にあらかじめ水分含量を求めた 2 g の試料を入れ蒸留水 14 ml 中に懸濁した。アスピレーターで減圧して十分水をセルロース中に浸透させた後常圧下ステンレス製の栓をして封管した^{1,2)}。マイクロ波加熱は東芝 TMB-3210 型マイクロ波オーブン (周波数 2,450 \pm 50 MHz, 出力 2.4 kW) を用いて, 既報の方法³⁾に準じ, 11~13分内の時間マイクロ波を照射することにより行なった。加熱温度 (最高到達温度) は 6T-16 型サーモスタット赤外線温度計 (三栄測器) を用いて測定した。

2.3 分析方法

2.3.1 セルロースに対するマイクロ波加熱作用の分析

マイクロ波加熱後扇風機を用いて強制冷却し室温に戻してから開封した。水層の pH を測定後 1G4 のガラスフィルターで濾過して濾液と残渣とに分別した。残渣は蒸留水で十分洗浄し 105°C で乾燥後重量を測定し水不溶性成分の重量パーセントを求めた。また, この値を用いてマイクロ波加熱によって生じた水可溶性成分の重量パーセント (重量減少率) を算出した。濾液と洗浄液とをあわせて 200 ml にフィルアップし水可溶性成分とした。この水可溶性成分中の還元糖 (還元糖生成量) と酸の生成量はそれぞれジニトロサリチル酸法^{4,5)}および滴定により定量した。還元糖生成量は 0.9 倍し多糖ベースに換算した。また, 水可溶性成分を Dowex 50 \times 8 (H⁺ 型) と Dowex 1 \times 8 (酢酸型) の連立カラムを用いて脱塩して中性成分を得た。その成分中の中性単糖組成はアルジトールアセテートに変換後ガスクロマトグラフィーにより定量した¹⁶⁾。また, この中性成分の分子量分布は Bio Gel P-2 (-200 メッシュ) のカラム (100 \times 1.4 cm) を用いたゲル濾過 (GFC) により分析した。溶出は水を用いて 40°C で行ない RI-8 型示差屈折計 (東洋曹達) を用いてモニターした。中性のオリゴ糖や単糖の組成分析は Aminex HPX-87P (300 \times 7.8 cm) を用いた高速液体クロマトグラフィー (HPLC) と薄層クロマトグラフィー (TLC, メルク Art 5744; 溶媒, 1-ブタノール:2-プロパノール:水=3:12:4, v/v) を併用して行なった。HPLC については 70°C の水を用いて溶出し, 示差屈折計でモニターした。さらに, マイクロ波加熱後得られる水可溶性成分の紫外・可視領域の吸収スペクトルを測定し (UVDEC-1 型分光光度計, 日本分光), セルロースの加熱分解過程のモニターを試みた。吸光度は 282 nm におけるセルロース 1 g, 1 l 容量当りの吸光係数 a_{282} ($l\cdot\text{g}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$) で表わした。

一方, 残渣セルロースについては上述したように重量減少量を求めるとともに, 残存ヘミセルロース性多糖の含量を定量した。すなわち, 残存ヘミセルロース性多糖が微量なためと多量のセルロース由来のグルコースの影響を避けるために, 残渣を 1 N の硫酸で 100°C で 6 時間加水分解した。加水分解後炭酸バリウムで中和し, 脱塩後上述と同様にガスクロマトグラフィーにより単糖含量を定量した。ヘミセルロース性グルコースの量はマンノースに対して 1/3 モル存在するとして見積った。

2.3.2 マイクロ波加熱の酵素糖化率への影響

マイクロ波加熱後冷却した懸濁液を少量の水を用いて 200 ml 容三角フラスコへ定量的に移した。これに 20 ml の 0.5 M 酢酸緩衝液 (pH 4.3) を添加後蒸留水で 100 ml にした。この試料にメイセラゼ (CEPB5042, 明治製菓) を 200 mg 加え (基質濃度 2.0%, 酵素濃度 0.2%), トルエンを数滴滴下後 40°C

で48時間糖化した¹⁾。酵素糖化率は前述と同様の操作を行なって還元糖生成量と重量減少量を測定することにより評価した。

3. 実験結果と考察

3.1 マイクロ波加熱のセルロースへの作用

アビセル SF セルロースとセルロースパウダー D についてマイクロ波加熱後の還元糖生成量、水可溶性成分量(重量減少量)、pH を測定した (Fig. 1, 2)。マイクロ波の照射とともに温度が上昇し、10~12分間の照射で 230°C に到達した。この加熱に要する時間はワットマン CF11 セルロース (8~12分) とほぼ等しいが、リグノセルロースの場合^{1~4,6)}より 2~4分長かった。リグノセルロースの場合、内在している有機酸がマイクロ波を吸収するためにマイクロ波の加熱効率がよいと考えられる。一方、セルロースの場合は有機酸が存在しないため加熱に長時間を要したものと解釈されるが、加熱に伴ないやより酸が生成し、水溶液の pH が低下した。この pH の低下は 160°C 以上で顕著となり、230°C では pH が約 3.0~3.2 となった。酸の生成量についてはアビセル SF セルロースとセルロースパウダー D 間に目立った差が認められなかったため、アビセル SF セルロースの場合の結果を Table 1 に示した。セルロースの場合、酸の生成量は

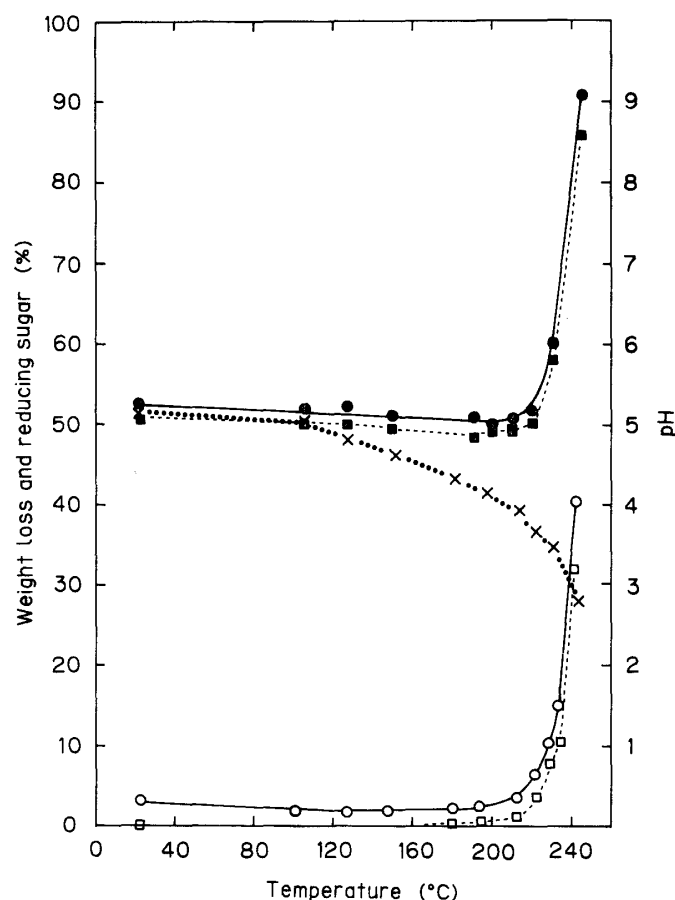


Fig. 1. Microwave heating and enzymatic saccharification of Avicel SF Cellulose. Symbols: (○, ●) Weight loss; (□, ■) Reducing sugar production; x, pH. Open symbols are for microwave pre-treatment alone, and closed, for enzymatic saccharification after microwave pretreatment, except those at 20°C which were of the native cellulose.

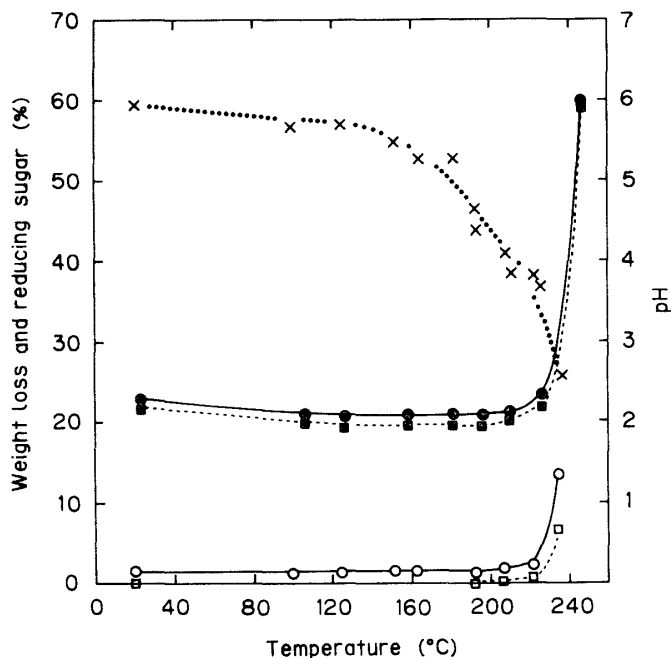


Fig. 2. Microwave heating and enzymatic saccharification of Cellulose Powder D. Symbols: See Fig. 1.

Table 1. Production of acid and neutral monosaccharides by microwave irradiation of Avicel SF Cellulose, and residual hemicellulose content in the same microwave pre-irradiated cellulose

Temperature (°C)	Acidity (meq)	Neutral monosaccharides				Yield ^a (%)	Residual hemicellulose content ^b (%)
		Ara	Xyl	Man	Glc		
200	0.03	1.9	32.2	19.4	46.5	0.33	0.80
215	0.04	2.0	19.5	24.2	54.3	0.66	0.16
222	0.05	1.5	10.0	25.0	63.5	1.78	0.09
230	0.09	0.9	6.6	17.2	75.3	5.04	0.04
235	0.11	0.7	4.2	9.5	85.6	7.10	0
241	0.15	0.2	0.9	3.4	95.5	16.50	0

a: Based on the dry matter of the original cellulose.

b: Based on the dry matter of the residual material after removal of water-soluble components from the microwave irradiated cellulose.

わずかで、230°C の加熱においても 1.0 meq を越えることはなく、220~230°C における生成量 (0.05~0.09 meq) はリグノセルロースの場合^{1,4,6)}の 1/3~1/36 にすぎなかった。

一方、還元糖生成量と重量減少量の上昇はいずれも 180°C 以上になってはじめて認められ、以後温度の上昇に伴ない増大した。特に、220°C 以上では急激に増大し、本実験における最高到達温度 (235~241°C) に到ってもリグノセルロースの場合に認められた極大値は存在しなかった。235°C における還元糖生成量と重量減少率はアビセル SF セルロースの場合それぞれ 10.5% および 16.0% であるのに対し、セルロースパウダー D の場合ではそれぞれ 6.5%、および 13.5% と小さい。これらの値をリグノセルロースの場合^{1,4,6)}と比較すると還元糖の生成量には有意差が認められなかったが、重量減少率はリグノセルロースの場合の

1/4~1/2にすぎなかった。リグノセルロースの場合には、セロオリゴ糖の他にヘミセルロース由来のオリゴ糖が生成するために水可溶性成分の量が多くなったと考えられる^{1-4,6)}。

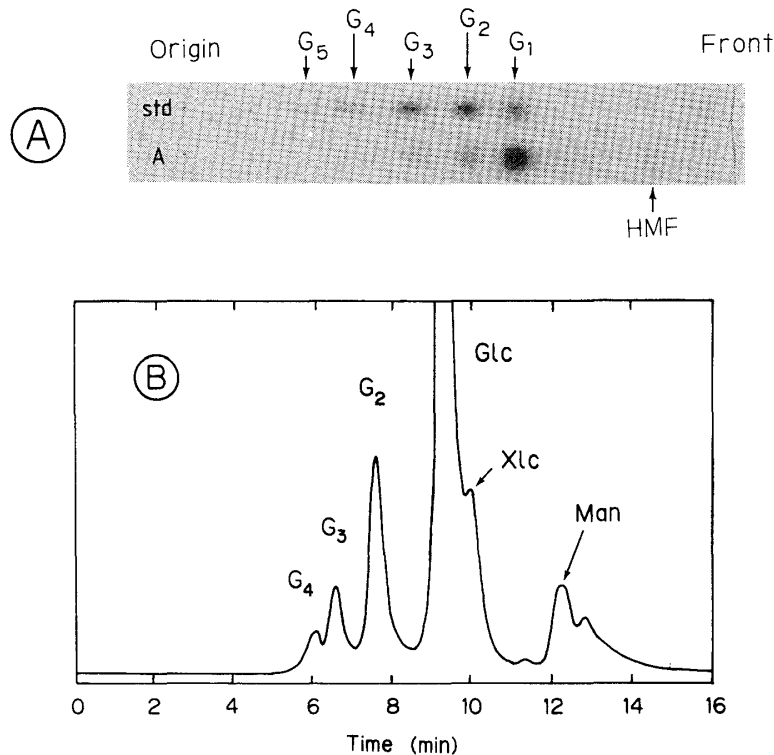


Fig. 3. Thin layer chromatography and high performance liquid chromatography on Aminex HPX-78P of the neutral water-soluble components produced from Avicel SF Cellulose by microwave heating at 235°C. Symbols: (A) Thin-layer chromatogram super-visualized by *p*-anisidine hydrochloride reagent and 10% sulfuric acid; (B) High performance liquid chromatogram; (std) A series of cello-oligosaccharides used as standard; (A) Avicel SF Cellulose; (G₁-G₆) Positions of glucose and cello-oligosaccharides having d.p. of 2-6; (Xlc, Man, Glc, HMF) Positions of xylose, mannose, glucose and 5-(hydroxymethyl)-2-furfural.

Fig. 3-B に生成した水可溶性の成分の HPLC における分析結果を示した。グルコースの他重合度が 2 ~ 4 のセロオリゴ糖の生成とともに、驚くべきことに、ヘミセルロース性多糖由来と思われるキシロースおよびマンノースの存在が示された。セロオリゴ糖の生成は TLC (Fig. 3-A) や GFC によっても確認された。GFC の溶出パターンは図示しなかったが HPLC の結果と全く同一であった。一方、TLC では、中性糖の他、5-(ヒドロキシメチル)-2-フルフラールの生成が認められ、セルロースはグルコースに分解すると同時に二次分解がおこなっていることが示された (Fig. 3-A)。次に、ヘミセルロース性単糖の存在が示されたので、GLC により生成した中性単糖の組成をさらに詳しく分析した。単糖組成値は両セルロースについてはほぼ等しかったので、アビセル SF セルロースの結果のみを示した (Table 1)。HPLC によって存在が示されたキシロースとマンノースの他、微量のアラビノースが遊離してきていることがわかった。アラビノースとキシロースの占める割合は 200°C 以上の温度では加熱温度の上昇に伴ない低下したが、グルコースの割合は加熱温度の上昇とともに逆に急激に増大した。一方、マンノースは 215°C 付近で最大となった。アビセル SF セルロースはパルプ起源のセルロースであるのでグルコマンナン系統のグルコースも含ま

れているものと思われる。一般に、木材中のグルコマンナンのマノースとグルコースのモル比は1:1~4:1であり^{17,18)}、Table 1 に示されたグルコースの量はいずれもグルコマンナン由来と考えられる量より大きい。従って、マイクロ波加熱によりヘミセルロースのみならずセルロースの一部も分解すると結論された。

以上の結果は逆にマイクロ波加熱によりセルロース中に微量混在するヘミセルロース性多糖を除去しセルロースを純化することができる可能性を示している。そこで、マイクロ波加熱後濾過・水洗して得た残渣セルロースを酸加水分解してなお残存しているヘミセルロース含量の定量を試みた (Table 1)。その結果、235°C 以上加熱することにより夾雑しているヘミセルロースを完全に除去しうることがわかった。しかし、この温度下ではセルロースの分解も一部進行している。今後、セルロースの分解を最小限にとどめながら夾雑しているヘミセルロースを完全に除去しセルロースを純化することのできるようなマイクロ波の加熱条件を見出す必要がある。

ところで、セルロースの分解の進行に必要な加熱温度 (230~240°C) はセルロースのガラス転移点 (230~250°C)²⁰⁾ とよく一致している。セルロースの乾式加熱分解においては、澱粉の場合と異なり熔融することなく分解していくことが知られている。しかしながら、水の存在下におけるセルロースの加熱分解では微量に生成した酸が触媒となり、ガラス転移したセルロース分子鎖にニックが入りセロオリゴ糖からグルコースが生成し、さらに 5-(ヒドロキシメチル)-2-フルフラール等へ二次分解していくことが明らかになった。

さて、5-(ヒドロキシメチル)-2-フルフラールが紫外領域に吸収を示すところから、マイクロ波加熱後得られる水溶液の吸収特性を分析することはセルロースの分解を解明する上で重要と考えられる。そこで、次

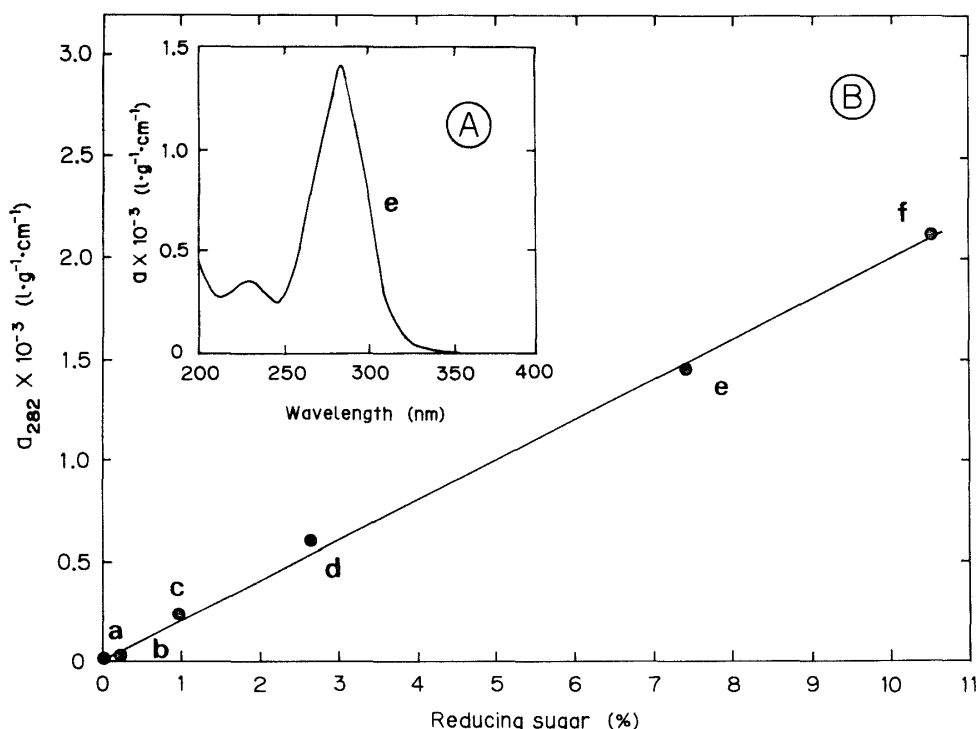


Fig. 4. Dependence of ultraviolet absorption spectra on degradation of cellulose. Symbols: Microwave heating of Avicel SF Cellulose at 179°C (a), 192°C (b), 208°C (c), 218°C (d), 230°C (e), and 235°C (f); (A) Ultraviolet spectrum of the water-soluble fraction after microwave heating at 230°C (e); (B) Dependence of the ultraviolet absorption coefficients at 282 nm on the amounts of reducing sugars produced by microwave heating.

に、マイクロ波加熱後得られる水溶液の吸収スペクトルを分析した (Fig. 4-A)。アビセル SF セルロースとセルロースパウダー D とは互に類似したスペクトルを与えたので前者の結果のみを図示した。水溶液は 200~700 nm の波長の範囲では 226 nm に小さい吸収と 282 nm に大きい吸収の二つの吸収ピークを有しており、300 nm 以上の波長では吸収のピークは観測されなかった。また、水溶液をいったん 40°C でエバポレーターを用いて完全に蒸発乾固した後再度水に可溶化して吸収スペクトルを測定したところ、226 nm の吸収は消失し、しかも 282 nm の吸収ピークが 283 nm と 1 nm 長波長側にシフトし、吸光度が低下することがわかった。このことから、セルロースのマイクロ波加熱では 280 nm 付近に吸収を有する揮発性の成分と、揮発しにくい 283 nm に吸収を有する成分の少なくとも二成分が生成することが示唆された。いま、フルフラールの吸収のピークが 278 nm にあることと、5-(ヒドロキシメチル)-2-フルフラールの吸収ピークが 283 nm にあることを考慮に入れると、セルロース中に夾雑物として混在しているヘミセルロース由来のペントースが分解してフルフラールが生成し、それと同時にヘキソースも 5-(ヒドロキシメチル)-2-フルフラールに分解していることが示唆された。事実、上述したように、TLC 上で 5-(ヒドロキシメチル)-2-フルフラールの存在が認められた (Fig. 3-A)。フルフラールは易揮発性のため TLC 用のサンプルの調製の過程で蒸発してしまったものと思われる。Fig. 4-B に 282 nm の吸光係数とマイクロ波加熱のみによって生じた還元糖の生成量との関係を示した。吸光係数の変化は還元糖生成量と正の相関関係があることがわかる。これらの結果から、吸光度の変化をマイクロ波加熱中に経時的に測定することができれば、加熱温度のモニタリングとあわせて、セルロースの分解の程度を加熱と同時に予想することが可能となる。連続的にマイクロ波加熱して多量に試料を調製する場合、この方法は効果的なモニター法になると期待される。

以上述べてきたように、セルロースのみを含水・密閉下マイクロ波加熱しても分解の程度は低く効果的に糖化されえないことが明白となった。そこで、以下は、このマイクロ波加熱を酵素糖化の前処理としてとらえてセルロースの酵素糖化を試みた。

3.2 マイクロ波加熱前処理のセルロースの酵素糖化に及ぼす効果

前述したように、マイクロ波加熱のみでは還元糖の生成量が低い上に著量のセロオリゴ糖が検出された。そのため、マイクロ波加熱後その全量を引き続いて酵素糖化に供した。糖化率は還元糖の生成量と重量減少率を測定することによって評価した。Fig. 1 および Fig. 2 に示したように、酵素糖化率は 210°C 付近までは期待に反して低下し、220°C 付近の加熱でようやく未照射のセルロースの値と同一レベルに回復した。この現象はワットマン CF11 セルロースについても同様に認められたが⁵⁾、これまで用いたリグノセルロースでは全く認められなかった^{1-4,6)}。従って、この現象はセルロースに特徴的なものである可能性が極めて高い。セルロースの酵素糖化でさらに特徴的なのはリグノセルロースの場合のように、220~230°C 間で糖化率に最大値を示さず、220°C を越えてはじめて、しかも以後は急激に温度の上昇に伴ない糖化率が向上する点である。セルロースに特徴的なこれら二つの現象の原因は現在不明であり今後の研究が期待される。240°C における糖化率はアビセル SF セルロースの場合 72%、セルロースパウダー D の場合 46% であった。これより 5°C 高い 245°C ではさらに糖化率は向上し、アビセル SF セルロースの場合 81%、セルロースパウダーの場合 60% となった。重量減少率と還元糖生成量との差は 2.0~5.5% と小さいので効果的に糖化が進行していることがわかる。先に用いたワットマン CF11 セルロースの場合、240°C における酵素糖化率は 43.2% であった⁵⁾。いま、これらの三種のセルロース標品の粒子サイズの大きさの順はセルロースパウダー D > ワットマン CF11 セルロース > アビセル SF セルロースであるのに対して、糖化されやすさの順序はアビセル SF セルロース > セルロースパウダー D > ワットマン CF11 セルロースとなっている。セルロースパウダー D とワットマン CF11 セルロースはいずれもコットン起源のセルロースであり、前者の方が後者よりも粒子サイズが大きいにもかかわらず糖化されやすい。一方、起源は異なるが粒子サイズの小さいアビセル SF セルロースは極めて良好に糖化される。従って、粒子サイズの小さい方が酵素の攻撃しう

る表面積は増大する傾向にあるが、その他の要因たとえば調製法の差に基づく微妙な高次構造の差や結晶化度、結晶の格子定数、マイクロフィブリルの幅、結晶領域のサイズ等の差が上記のような糖化率の差をもたらしていると推定される。

以上、本研究の結果を要約すれば、セルロースは 210°C 以下のマイクロ波加熱には安定であったが、220°C 以上の温度に加熱すればセルロースの分解が進行すると同時に酵素糖化率も向上した。また、235°C におけるマイクロ波加熱により、市販のセルロース中に混在しているヘミセルロース性多糖を除去することができた。今後、マイクロ波加熱を用いたセルロース性廃棄物の酵素糖化およびセルロースの純化法についてさらに検討を進める予定である。

謝 辞

本研究にあたって、御協力をいただいた本研究所木材物理部門則元 京助教授、本学林産工学科林産機械教室の野口昌己教授および服部順昭助手に深謝する。

なお、本研究の一部は文部省のエネルギー特別研究(1)(58040047 および 59040043)によった。

文 献

- 1) 東 順一, 田中文男, 越島哲夫: 木材誌, **30**, 501 (1984)
- 2) 東 順一, 田中文男, 越島哲夫: *J. Ferment. Technol.*, **62**, 477 (1984)
- 3) 東 順一, 越島哲夫: 木材研究・資料, **20**, 22 (1985)
- 4) 東 順一, 東野 潤, 井坂正夫, 越島哲夫: *Wood. Res.*, **71**, 13 (1985)
- 5) 東 順一, 浅井通弘, 井坂正夫, 越島哲夫: *J. Ferment. Technol.*, **63**, 529 (1985)
- 6) 東 順一, 東野 潤, 越島哲夫: 木材誌, 投稿中
- 7) E.J. KILZER: "Cellulose and Cellulose Derivatives", Vol. V, Part V, John Wiley and Sons, Inc., New York, p. 1015 (1971)
- 8) F. SHAFIZADEH: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **23**, 419 (1968)
- 9) F. SHAFIZADEH: *J. Polym. Sci.*, **C36**, 21 (1971)
- 10) M. ČERNÝ and J. STANĚK, JR.: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **34**, 23 (1977)
- 11) B.B. MITHEL, G.H. WEBSTER and W.H. RAPSON: *Tappi*, **40**, 1 (1957)
- 12) O. ANT-WUORINEN and A. VISAPÄÄ: *Paperi Puu*, **42**, 317 (1960)
- 13) 武 祐一郎, 糸原福雄: 工化, **64**, 1115 (1961)
- 14) R.H. ATALLA, J.D. ELLIS and L.R. SCHROEDER: *J. Wood Chem. Technol.*, **4**, 465 (1984)
- 15) G.L. MILLER: *Anal. Chem.*, **31**, 426 (1959)
- 16) 東 順一, 高橋信義, 越島哲夫: *Carbohydr. Res.*, **93**, 71 (1981)
- 17) T.E. TIMELL: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **19**, 247 (1964)
- 18) T.E. TIMELL: *Adv. Carbohydr. Chem.*, **20**, 409 (1965)
- 19) D.A.I. GORING: *Pulp Pap. Mag. Can.*, **64** T-517 (1963)