

酵素系による木材多糖の加水分解

東 順 一*・越 島 哲 夫*

Hydrolysis of Wood Polysaccharides by Enzyme System

Jun-ichi AZUMA* and Tetsuo KOSHIJIMA*

1. はじめに

化石系資源が有限であり、日を重ねるごとに枯渇の日へと近づきつつあるため、これらの資源への依存度を軽減してゆかねばならない。このために注目されているのが太陽エネルギーの利用の一貫としてのバイオマスである。バイオマスのなかで一番多量に存在するのは植物資源であるファイトマスである¹⁻³⁾。ファイトマスのうち主要なものをあげると図1に示した4種である⁴⁾。この中でも森林生態系の純生産量は地球上の総純生産量 17.3×10^{10} トン/年の約40%にあたる 6.95×10^{10} トン/年であり、しかも森林の現存量は 16.5×10^{10} トンで全植物の約90%を占めているので、林産植物資源が最もポテンシャルの高いファイトマスである¹⁻³⁾。我国の森林面積は約2,526万 ha で国土面積の66.8%を占めており、総蓄積量は21億8,600万 m^3 である(表I)^{5-a)}。比重を0.5とすると10億9,300万トンと見積られる。しかし、世界的レベルでみると、我国は森林資源国とはいえないし(表II)^{5-b)}、またこれらすべてをバイオマスとして利用できるわけではなく、樹木の伐採は資源保護や環境保全等の観点から制約されている。従って樹木を伐採した場合、用材として大部分利用されるので残った残廃材のみが積極的にバイオマスとして利用されることになる。昭和52年度における残廃材の総量は約3,650万 m^3 と見積られている²⁾。しかし、林地残材や廃材には回収と運搬集結という困難な問題が残っており、最終的にバイオマスとして利用できる量を正確に把握する必要がある。また、我国の昭和55年度の木材需給状態をみると、素材の総需要量が7,794万 m^3 であり、その44%の3,405万 m^3 が国産材であるにすぎず、残りの56%の4,389万 m^3 は外材である⁵⁾。今後資源ナショナリズムの高揚のため丸太での輸入が減少し、我国の木材工業をめぐる状況は増々厳しい状況になることが予想される。以上のように木質系資源の有効利用の道は険しいことがわかるが、それでもなお木質資源は非化石エネルギー源として

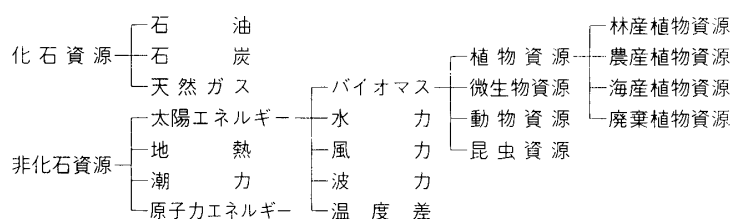


図1 バイオマスと他の資源との関係⁴⁾

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

表I 森林資源の現況^{5-a)} (昭和51年3月31日現在)

単位 { 面積: 1,000ha
蓄積: 1,000m³

区 分	総 数				人 工 林			
	面 積	蓄 積			面 積	蓄 積		
		計	針葉樹	広葉樹		計	針葉樹	広葉樹
合 計	25,263	2,185,916	1,214,733	971,183	9,377	798,359	787,911	10,448
国 有 林	7,937	805,145	362,754	443,391	2,289	140,468	133,323	7,145
林所 { 小 計	7,723	782,972	352,593	430,379	2,255	137,673	130,610	7,063
野管 { 国 有 林	7,551	772,406	342,570	429,836	2,109	127,348	120,641	6,707
庁管 { 官 行 造 林	172	10,566	10,023	543	146	10,325	9,969	356
その他省庁所管	214	22,173	10,161	12,012	34	2,795	2,713	82
民 有 林	17,326	1,380,771	851,979	528,792	7,088	657,891	654,588	3,303
公 有 林 { 小 計	2,537	197,033	99,405	97,628	1,035	67,958	67,365	593
{ 都 道 府 県	1,138	100,108	45,128	54,980	434	25,806	25,493	313
{ 市 町 村 財 産 区	1,399	96,925	54,277	42,648	601	42,152	41,872	280
私 有 林	14,789	1,183,738	752,574	431,164	6,053	589,933	587,223	2,710

表III 木材の組成

表II 世界の森林資源^{5-b)}

単位: 重量%

地 域	蓄積(億m ³)
北 米	589
ラテンアメリカ	1,229
ヨーロッパ	133
アフリカ	348
アジア(日本・ソ連を除く)	408
日 本	18
ソ 連	794
太平洋地域	50
世 界	3,574

成 分	針葉樹	広葉樹
セルロース	39~41	40~45
ヘミセルロース	23~31	23~38
リグニン	25~36	18~25
抽出成分	1~5	1~5
灰 分	0.1~1.0	0.1~1.0
中性糖組成		
アラビノース	1~4	1~3
キシロース	9~13	26~39
マンノース	8~14	3~4
ガラクトース	6~18	1~4
グルコース	61~66	55~69

多くの可能性をもっているのに、その効率的利用技術の開発は緊急を有している。我国では森林資源国とは異なったバイオマス利用法の可能性をさぐってこれを開発し、明日へサバイバルするための道を開く必要があると思われる。今、木材多糖の糖化は林産植物資源の化学的転換法の中核をなしている古くて新しい問題であり、木を食糧とすることのできない人類のひとつの夢である。現在糖化法としては酸加水分解法と酵素加水分解法の二種の方法が試みられており、分解して得られた一次産物の高次の利用をめざしている。木材の糖化による利用のフローチャートを図2に示した⁴⁾。これまで、酵素糖化法に関する総説がいくつか発表されているが^{4,6~12)}、近年のこの領域における進歩が著しい状態を考慮に入れると十分とは言い難いと思われる。そこでここでは、木材の酵素糖化の問題に焦点をあわせて最近の話題を紹介したい。

それに先だち、木材の成分を見直してみよう。日本産木材の化学的特徴をまとめると表IIIのようになる。樹木は他の植物と異なり、リグニンにより高度に木化しているとともに一般に可食部を持たない。針葉樹及び広葉樹は共に骨格物質としてセルロース、マトリックス物質としてヘミセルロース、及び充填物質と

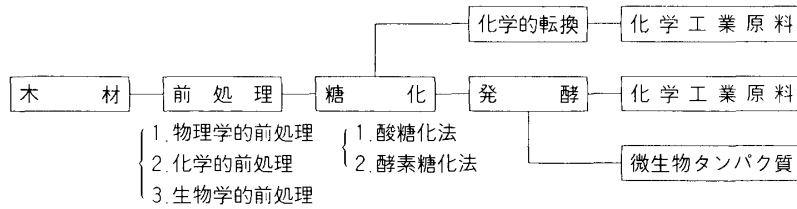


図2 木材の糖化による利用⁴⁾

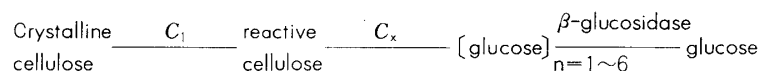
してリグニンの主要三成分から成っているが、針葉樹の方が広葉樹よりもリグニン含量が高く、構成糖としてマンノースを多く含む反面キシロース含量が低い。このことから、広葉樹の方が針葉樹より糖化した場合全還元糖量は多いことがわかる。しかしながら、通常の酵母により発酵されるのは、グルコース、マンノース、及びガラクトースであるので針葉樹の方が発酵のポテンシャルは高くなる。従って、アルコールの生産の目的には針葉樹の方が好ましいといえよう。ここで、酵素糖化の鍵はセルラーゼの力価とそれに先だつ前処理をいかに経済的に行なうかにかかっている。そこで次にこれらの問題について触れる。

2. セルラーゼの最近の動向

酵素による木材糖化は1925年 Karrer によるカタツムリ消化管セルラーゼの研究¹³⁾ によつてはじめて研究対象となった糖化法であり、酸による糖化法に比較して歴史は浅い。この酵素による木材糖化の利点と欠点を表IVにまとめた⁴⁾。この表に示したように酵素糖化法は優れた長所があるが欠点も大きく今後の克服が望まれている。この中で分解率が悪いのは酵素法の最大の問題である。分解率が悪いのは、リグニンの存在と天然セルロースが不溶性の結晶構造をとっていること、及びセルロースのグルコースへの分解には作用の異なるセルラーゼ複合体の共同作用が必要であるためである。すなわち、天然セルロースがグルコースにまで糖化される機構については未だ完全に明らかにされていないが Reese 等¹⁴⁻¹⁶⁾ によつていわゆる C_1-C_x

表IV 酵素による木材糖化の長所と短所

<p>《長所》</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 用いた酵素の基質特異性に基ついて糖化されるので生成物がはっきりしている。 2. 糖化の際の圧力・温度が穏和である。 3. 生成糖の二次分解がおこらない。 4. 耐酸・耐圧装置を必要としない。
<p>《短所》</p> <ol style="list-style-type: none"> 1. 単なる粉碎のみでは分解率が低い。 2. 反応が遅い。 3. 強力なセルラーゼを大量に調製することはそれ自体経済的負担となる。 4. 酵素の回収及び再利用が困難である。



スキーム1 Reese 等による C_1-C_x 説¹⁷⁾

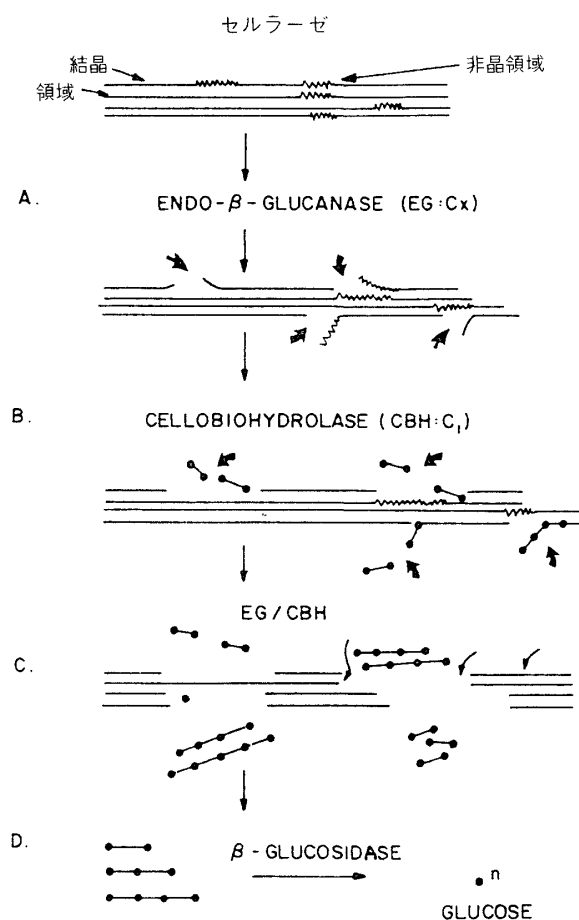


図3 セルロースの糖化におけるステップの模式図¹⁷⁾



スキーム2 C_x (endo型酵素) と C_1 (セロビアーゼ) の段階的作用説¹⁷⁾

説¹⁷⁾が提唱された(スキーム1)¹⁷⁾。この説では、当時 C_1 酵素が未だ単離されていない時代なので C_1 酵素は結晶セルロースに作用し、結晶中の水素結合を切る酵素と仮定された。天然セルロースはまずこの酵素によって活性なセルロースに転換され、これに引き続く C_x 酵素や β -glucosidase の作用により加水分解される。この仮説はその後のセルラーゼの研究のひとつのよりどころとなった。しかしながら、最近になって、実際はこのモデルとは若干異なっていることが明らかになってきた(図3及びスキーム2)¹⁷⁾。すなわち、Wood等の説^{17,18)}では C_1 と C_x の両酵素の作用機作と順序が Reese等とは異なっている。 C_1 (Avicellase) は exoglucanase の一種で cellobiohydrolase (β -1,4-glucan cellobiohydrolase, E.C. 3.2.1.91) であるのに対し、 C_x (CMCase) は endoglucanase で, endocellulase (β -1,4-glucano-glucanohydrolase, E.C. 3.2.1.4) であると提唱している。いずれにしても、最後は β -glucosidase である β -1,4-glucosidase, E.C. 3.2.1.21 (cellubiase) の作用でグルコースモノマーに糖化される。いいかえると、天然セルロースはまず非晶部分に C_x 酵素が作用し、次いで結晶部分の β -1,4-グルコースポリマー鎖間の水素結合を切りセロビオース単位で端から切る C_1 酵素が作用し、 C_1 , C_x のこれら両酵素の作用が進行した

後、最後に β -glucosidase によりグルコースに分解される。天然セルロースの分解されやすい所が先に攻撃される後の方が合理的であるように考えられる。いずれの機作にせよこれらの酵素系で最も重要なのはセルロースの結晶部分に作用する C_1 酵素である。従って、セルロースの酵素糖化を行なうためにはできる限り C_1 活性の高いセルラーゼを用いる必要がある。これまで最も高い C_1 活性を有する菌は *Trichoderma* であり、そのセルラーゼの性質の解明と調製法について多大な努力が払われた。Natick 研究所と Rutgers 大学で遺伝的改良が加えられその結果も纏められている¹⁸⁾。これに対し、我国の技術的進歩も著しく数社で *Trichoderma* 起源のセルラーゼ製剤が生産されている。明治製菓(株)の CEPB-5011 の酵素製剤 (メイセラゼ) の活性とアメリカの Natick 研究所の最近の改良株と思われる 3G78, 及び PP174 株のセルラーゼ、並びにデンマークの Novo 社の SP122 株のセルラーゼの活性の比較もなされている (表V)¹⁹⁾。この表から明らかなように、CEPB-5011 は SP122 株をはるかにしのぎ、かつ 3G78 や PP174 株に匹敵するセルラーゼ活性を持つことがわかった。さらに、CEPB-5011 のセルラーゼ製剤は他のセルラーゼに比較して

表V 国産および外国産トリコデルマのセルラーゼ製剤の活性の比較¹⁹⁾

Units = μ moles グルコース/分

セルラーゼ活性 (pH4.8, 50°C)	Natick 3G78	Natick PP174	Novo SP122	Meicelase CEPB-5011
還元糖 (mg/mg)	0	0	0.06	0
タンパク質 (mg/mg)	0.84	0.85	0.50	0.71
Salicinase (U/mg, 30分)	0.05	—	0.03	1.08
Cellobiase (U/mg, 30分)	—	0.31	0.05	0.46
CMCase 7L2 (U/mg, 30分)	31.5	—	—	33.9
CMCase 50T (U/mg, 30分)	—	—	6.5	12.3
沱紙崩壊活性 (U/mg, 60分)	0.56	0.53	0.26	0.33
Avicelase (U/mg, 60分)	0.78	—	—	0.79

CMCase と β -glucosidase 活性が高いのが特徴となっている。またこの酵素は遊離還元糖を含まず糖化に利用する場合有利である。一方、天然セルロースではなく、非晶化されたセルロースでは、 C_1 酵素を必ずしも必要とせず、 C_2 酵素の活性の高いセルラーゼ製剤 (たとえば *Aspergillus* のセルラーゼ) で容易に加水分解が進行する²⁰⁾。従って、いかに C_1 活性の高いセルラーゼ製剤であってもセルロースの結晶構造の破壊にセルラーゼを用いるか否かの適否は酵素製剤そのものの価格にかかっている。糖化して得られるものがグルコースという付加価値の低いものである点、さらにエタノールの生産をめざすとしてもこれまた付加価値の低い点を考慮に入れば、セルラーゼ製剤は医薬品、食料品や飼料への利用がなされても、エタノールの生産のみをめざして利用されるには、酵素の経済的な問題、糖化時間の短縮、及び酵素の回収の問題を解決する必要があると思われる。固定化酵素や菌体の利用がこの線上にあるが^{21,22)}、セルロースが固体である点困難が多く今後の問題である。今、セルラーゼ側の問題が解決されたとするならば、次に問題となるのは試料をいかにセルラーゼの攻撃を受けやすい形にかえるかという前処理の方法である。木材の場合はセルロースの結晶構造を破壊するとともに、リグニンにより強固に木化しているため、リグニンによる妨害を除去することが不可欠である。この目的を達成するための処理が木材糖化の前処理である。これまで酵素糖化のための前処理法に関しては種々の方法が試みられており、Millett 等を中心にしていくつかの総説にまとめられている^{4,6-12)}。また、糖化を妨げる物理的、化学的要因についても Cowling²³⁾ 及び Cowling と Kirk²⁴⁾ により論じられている。しかしながら、前処理法に関する最近の進歩にはめざましいものがあり、これらを包含した総説はみあたらない。そこで以下に最近の話題を含め前処理法についてまとめる。

3. 酵素糖化のための前処理法

3.1 物理学的前処理

物理学的前処理は、脱リグニン処理を施さずに酵素糖化率の向上を計るもので種々の方法が試みられている (表VI)。以下に各々の前処理法について詳しく述べる。

表VI 酵素糖化のための前処理の方法

物理学的前処理	粉 碎	ボールミル (乾式, 湿式) ハンマーミル ロールミル (二本, 三本) 凍結粉碎
	蒸 煮	水蒸気 爆 碎
	照 射	電子線 γ 線
化学的前処理	酸	濃硫酸, 希硫酸 希塩酸 亜硫酸 次亜塩素酸 リン酸 過酢酸
	アルカリ	水酸化ナトリウム アンモニア エチルアミン
	オゾン セルロース溶媒	
生物学的前処理	腐 朽	ヒラタケ等木材腐朽菌

表VII ボールミル処理と結晶化度の変化²⁹⁾

ボールミル 処理時間	綿		新聞紙		ダグラスファー		レッドオーク	
	結晶化度 (%)	結晶幅 (Å)	結晶化度 (%)	結晶幅 (Å)	結晶化度 (%)	結晶幅 (Å)	結晶化度 (%)	結晶幅 (Å)
0	79	54	55	31	48	29	38	27
10	43	—	37	—	26	—	24	—
30	14	—	10	—	~3	—	6	—
60	0	—	0	—	0	—	0	—
120	0	—	0	—	0	—	0	—
240	—	—	—	—	—	—	0	—

機械的微粉碎化による前処理法：この方法は木材及びセルロースを微粉碎化してセルロースを非晶化するとともに反応の表面積を増大して酵素糖化率の向上をめざしており、Pew と Weyna²⁵⁾ によりはじめて木材糖化に適用された。その結果、スプリースやアスペン材を乾式ボールミル処理すると多糖はほぼ完全に加

東・越島：酵素系による木材多糖の加水分解

表Ⅷ 酵素糖化に及ぼす微粉碎の効果²⁹⁾

粉碎時間 (分)	加水分解 時間 (日)	グルコース(%)換算した加水分解液中の糖収量				グルコース(%)換算した加水分解残査中の糖含量			
		綿リントー	新聞紙	ダグラス ファー	レッド オーク	綿リントー	新聞紙	ダグラス ファー	レッド オーク
0	0	—	—	—	—	108.0	69.6	69.4	62.8
	2	32.4	28.6	6.2	3.7	75.9	39.2	63.5	62.1
	4	49.3	37.1	6.7	4.0	61.4	35.4	68.2	62.1
	8	72.0	37.5	7.0	3.9	42.4	33.8	62.9	61.0
	16	78.5	38.7	6.3	4.0	35.8	33.5	61.3	60.4
10	0	—	—	—	—	104.4	70.3	69.4	62.8
	2	60.1	40.5	25.7	15.6	44.6	29.8	40.9	48.5
	4	80.1	46.8	28.8	17.3	36.5	25.0	38.2	47.6
	8	92.2	47.4	29.3	19.5	15.9	23.8	37.4	46.3
	16	92.4	48.4	33.6	17.3	10.8	21.1	35.1	45.7
30	0	—	—	—	—	103.2	69.0	69.2	59.6
	1	62.4	42.5	42.2	30.0	36.2	20.2	17.7	34.5
	2	85.2	51.2	48.5	30.4	18.0	16.9	14.3	32.2
	4	94.5	52.5	49.1	31.9	7.8	13.2	10.9	31.4
	10	102.0	55.1	48.9	34.9	1.3	12.9	10.7	28.7
60	0	—	—	—	—	109.7	68.9	71.8	60.8
	1	79.2	49.0	52.1	40.9	22.4	14.7	9.0	21.2
	2	92.4	55.4	53.9	41.5	9.7	11.8	7.1	19.2
	4	99.3	57.8	54.0	44.9	2.5	8.8	6.2	19.0
	10	106.7	59.4	52.9	45.6	0.8	7.9	7.6	17.8
120	0	—	—	—	—	105.6	67.9	69.0	58.1
	1	62.1	56.7	56.9	51.3	43.0	6.7	5.2	10.0
	2	83.5	60.9	56.7	53.7	16.4	5.1	4.9	9.0
	4	103.7	62.5	57.8	55.7	3.0	4.4	4.7	7.9
	10	105.4	63.9	56.9	56.6	0.6	3.9	4.8	7.8
240	0	—	—	—	—	—	—	—	57.0
	1	—	—	—	54.8	—	—	—	5.7
	2	—	—	—	56.5	—	—	—	5.4
	4	—	—	—	58.0	—	—	—	3.9
	10	—	—	—	58.3	—	—	—	4.1

水分解されることが明らかになった。その後乾式ボールミルの酵素糖化に及ぼす効果は種々検討され^{12,26~30)}、ボールミルの処理時間の増大に伴ってセルロースの結晶化度は減少するが、この結晶化度の減少よりもむしろ反応表面積の増大に起因することが明らかにされた²⁶⁾。ボールミル処理時間をかえた場合の結晶化度の変化及び糖化率の変化を各々表Ⅶ及びⅧに示した²⁹⁾。またボールミル処理後における糖化率と酵素処理時間の関係を図4に示した²⁷⁾。さらに、表Ⅸに微粉化の程度と糖化率との関係を示した²⁸⁾。微粉化する程糖化率が上昇し、仮導管や繊維細胞の直径以下の粒子径 10~30 μm にまで微粉化すると、シラカバ (37.1%) を除いたカラマツ、ブナ及びアカマツの全多糖の約60~80%が糖化された。この方法では広葉樹の方が糖化率は高い。ハンマーミルを用いて微粉化する方法も試みられたが、十分ではなくさらにボールミル処理が必要である^{31,32)}。

以上述べたのは乾式ボールミルであるため、微粉化効率を上昇させるためには試料を十分乾燥することが不可欠である。しかしながら、最近湿式ボールミル処理も試みられた^{32~34)}。例えば水の存在下でボールミ

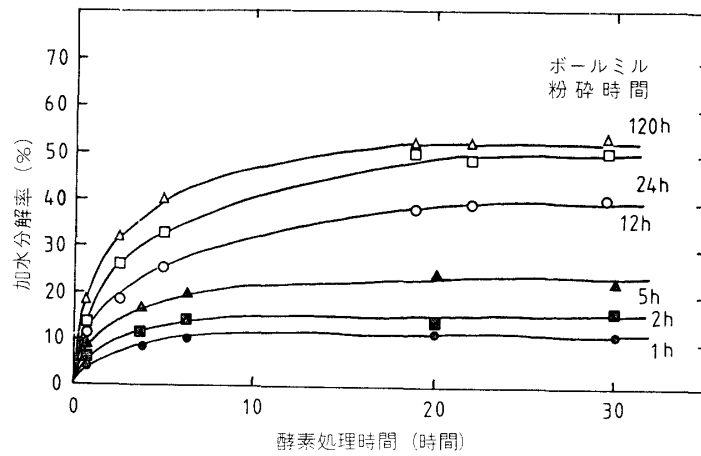


図4 酵素糖化率のボールミル粉砕時間依存性²⁷⁾

表IX 微粉砕化と酵素糖化²⁸⁾

粒子径 (μm)	分解率 (%)	糖 組 成 (%)				
		Man	Ara	Gal	Xyl	Glc
(1)カラマツ						
250~420	6.1					
150~250	7.3					
70~150	12.7	12.6	4.9	5.7	8.2	68.6
30~70	44.1	11.6	2.1	3.3	6.8	76.2
10~30	70.8	11.3	2.0	2.5	7.3	76.9
(2)アカマツ						
250~420	6.9					
150~250	17.2					
70~150	25.1	14.9	3.4	4.7	8.7	68.3
30~70	35.3	15.4	3.0	3.4	8.6	69.6
10~30	76.6	12.8	2.2	2.6	8.6	73.8
(3)シラカバ						
250~420	2.8					
150~250	3.5					
70~150	11.2	8.0	5.3	8.9	14.4	63.4
30~70	28.1	3.5	1.8	2.9	26.0	65.8
10~30	37.1	3.5	1.6	2.2	27.0	65.7
(4)ブナ						
250~420	7.5					
150~250	17.9					
70~150	21.1	1.5	15.6	6.8	76.1	0.0
30~70	25.4	7.7	6.9	3.5	50.4	31.5
10~30	61.8	4.3	2.1	1.0	32.3	60.3

ルを行なった場合水の可塑的性質のため乾式ボールミルより効果が穏かなものになり結晶化度もほとんど変化しない³³⁾。従って乾式ボールミルの場合に比べて湿式ボールミルの場合糖化率も低くなる。この湿式^{33,34)}ボールミルはさらに Kelsey 等によって発展された³⁵⁾。彼らの方法では、pH 5 の 0.1M 酢酸緩衝液中で基質濃度 2% と 0.08% の酵素を含む混合液を砂、ガラスビーズやステンレスのビーズ (3.5mm) の存在下で 45℃ で 200 回振動/分の処理を行ない微粉化と糖化とを同時に行なっている。リグノセルロースではステンレスのビーズの方がガラスビーズより効果があり、しかも乾式ボールミルの三倍効果があるといわれている。このビーズによるホモジェナイズ法は微生物から酵素を抽出する際の破碎装置でも行なうことができ、糖化装置の多目的化と共に糖化率の向上をめざすことができ注目される。

他方、最近モミ殻を対象としたものであるが、-100℃ 下での凍結粉碎とアルカリ処理の前処理を組合せる前処理法 (Cryomill 処理) で 85% 以上の分解率が得られている^{20,36)}。Natick 研究所で二本ロールミルを用いた古紙及び木粉の微粉碎物の糖化が試みられた³⁷⁾。この方法は二本の回転速度の異なるロールの間でセルロースを圧縮捏和するもので効果の著しいメイプルの場合で糖化率が 15% 前後でやはりロールミルのみでは不十分と思われる。このロールミルを三本にしてアカマツに適用した場合 (図 5)^{38-b)} 86% の糖化率 (分解率 60%) が得られている (図 6)^{38,39)}。ロールミルの場合はボールミルの場合よりも経済的であるが、木粉をペースト状にする分散剤が必要であるため今後改良の余地があると思われる。

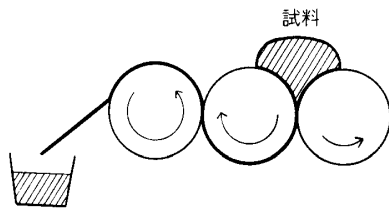


図 5 ロールミル処理の模式図^{38-b)}
(ロールの回転速度比, 6.8 : 2.6 : 1)

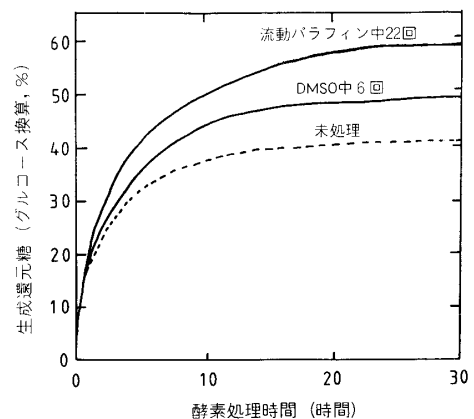


図 6 ロールミル処理木粉の酵素糖化^{38-b)}

爆砕法：この方法は高圧での蒸煮 (autohydrolysis, 化学的前処理) と爆砕 (物理的前処理) とを併用した効率のよい木材構成高分子の低分子化法である。一般に木材を蒸煮すると、木材中の成分 (例えばヘミセルロース) から酢酸等の有機酸が遊離する結果、生じた酸の触媒的作用によって木材成分の分解がみられ、autohydrolysis といわれている^{40,41)}。この autohydrolysis はそれ自体単独でひとつの前処理として用いられているが^{42~45)}、条件設定が極めて重要で再重合や縮重合等の副反応の誘発に十分注意を要する。蒸煮を単に糖化の前処理として利用するのみならず、Berder 等^{46,47)} は木材チップを 100~150 psi (160~170℃) で 2 時間蒸煮することにより羊の食糧の 60% までまかなうことができることを明らかにしている。この蒸煮の効果は広葉樹の方が針葉樹より効果的であり、広葉樹の中でもアスペンが最も効果的であった。以上の蒸煮処理は単独処理であるが、最近この蒸煮処理に引き続いて物理的、化学的処理を付加することによって前処理としての効果の増大がはかられている。物理的な処理法として爆砕法 (autohydrolysis—爆砕のシステム) があり、最近相ついで二つの爆砕法が開発された。

一つの方法はカナダの Delong によって開発された Iotack 法である^{48~51)}。この方法では、31 mm のスクリーンを通した木材チップを 230~240℃、約 40 気圧の水蒸気圧で 30~40 秒処理 (autohydrolysis) した後

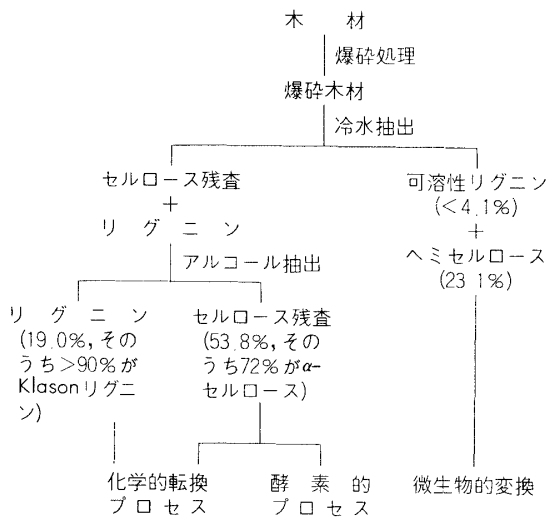


図7 爆砕木粉の分画のフローチャート^{49,51)}

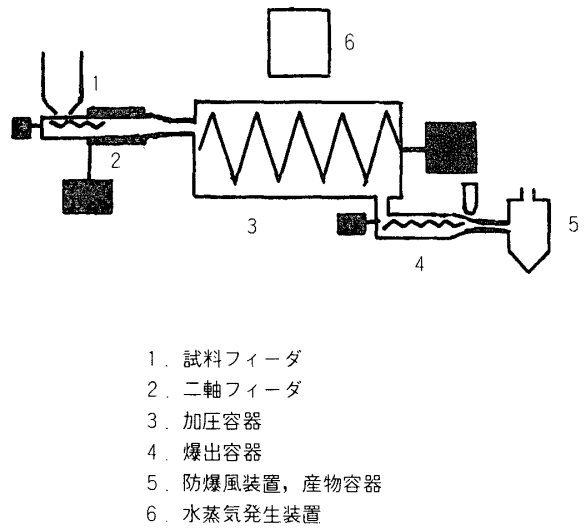


図8 Stake 法による爆砕装置の模式図⁵³⁾

表X アスペン爆砕物の酵素及び酸加水分解⁵⁰⁾

糖	酵素分解	酸分解
ヘキソース ^{a)}	29.8±3.6	31.2±4.2
ヘキソース+二糖 ^{a)}	38.5±3.5	35.6±3.8
ペントソース ^{b)}	5.3 ±1.1	10.4±3.7

a) 乾材に対する重量%; b) 未処理材中のペントサンに対する重量%

急速に大気圧下へ放出爆砕する。今、Iotack 法の前処理の温度はヘミセルロースの熱軟化点(167~181℃)⁵²⁾及びリグニンの熱軟化点(127~193℃)⁵²⁾よりは低いかほぼ近い温度であるのが特徴である。図7に爆砕処理と木材構成成分の分画フローチャートを示す^{49,51)}。すなわち、(i)ヘミセルロースは90%以上冷水可溶である、(ii)リグニンの90%以上はエタノール:水(9:1)液かメタノールに可溶となる、及び(iii)セルロースは結晶性を保持しているが、酵素加水分解に対するアクセシビリティは非常に高い点である(表X)⁵⁰⁾。

もう一つの方法はやはりカナダのトロント大学の Lora と Wayman⁴⁰⁾により明らかにされた autohydrolysis の概念に基づいて Stake Technology 社で開発された Stake 法である^{53,54)}。この方法は、水分含量50%の木材チップを195℃で30秒間蒸煮する。図8及び9に模式図を示した。反応容器は8フィートの長さで直径10インチの水平の円筒で中にスクルー状のコンベヤーが入っており、一方の端から連続的に試料を入れ250ポンド/インチ²の水蒸気圧で処理し、他端から一分間に数秒開放され爆砕処理される。この処理でもセルロースは分解されずに高収率で回収され2%硫酸、190℃の酸糖化法で80%以上糖化されるし、*Trichoderma reesei* のセルラーゼを用いた場合、約90%が糖化される。この Stake システムで得られた糖は *Saccharomyces cerevisiae* により2日でヘキソースの72%が資化された。一方ヘミセルロースは27%しか資化されないがこれはキシロースが資化されずに残ったものと考えられる。この Stake 法は家畜飼料の製造用として実用化されており、PRO-CELL と呼ばれている。これらの爆砕処理の難点は先に述べたが広葉樹や農産廃棄物には適用できるが針葉樹の場合は効果が小さいことである。これはリグニンの性質の違いに

東・越島：酵素系による木材多糖の加水分解

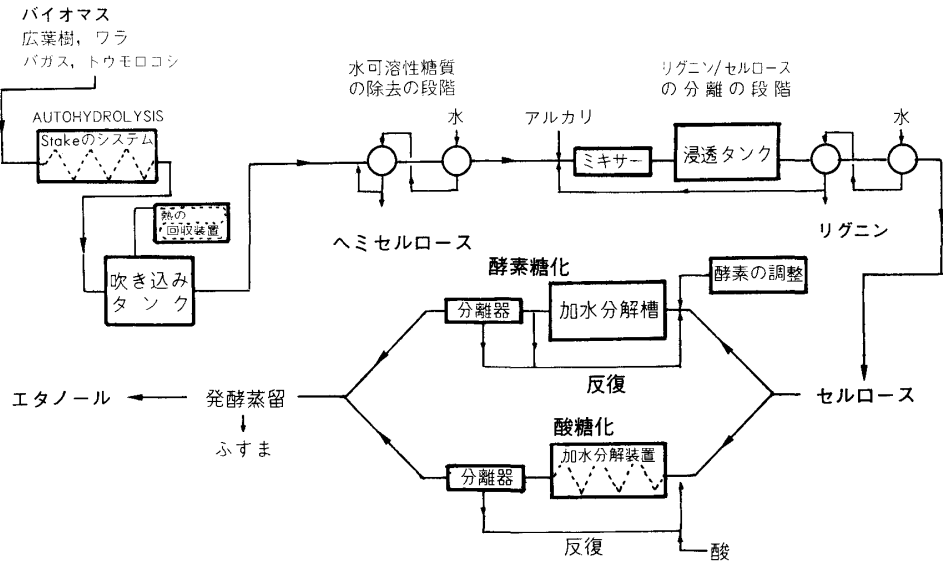


図9 Stake 法によるバイオマス変換プロセス⁵³⁾

起因すると考えられ、今後この点をいかに克服するかが課題である。我国においても全く同様の試みが寶酒蔵(株)を中心になされ、本研究所のリグニン化学部門にバッチ式の装置が試作された。また連続式の装置も試作されている。今後この処理の発展が期待される。

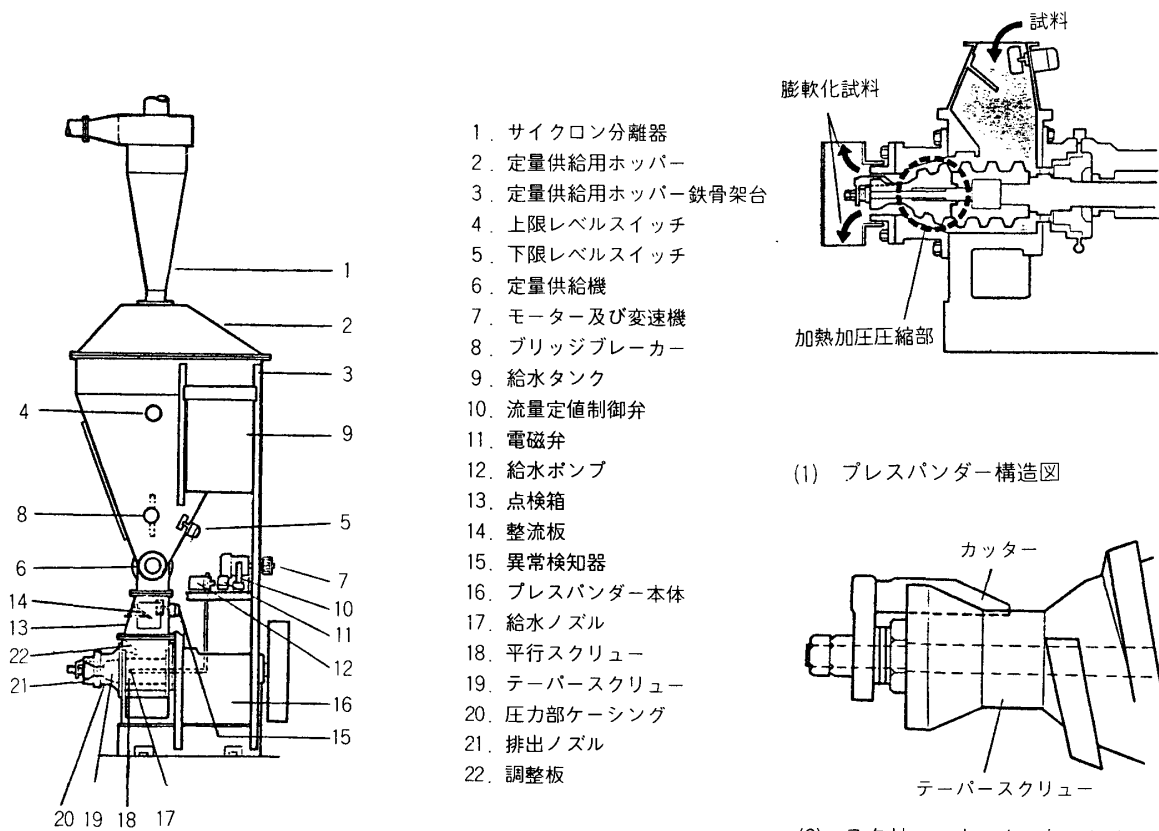


図10 プレスパンダー全体図

図11 プレスパンダー部分拡大図

糖化までといかずとも、飼料用に適した類似法として鶴見曹達(株)の開発した膨軟化装置(プレスパンダー)がある⁵⁵⁾。概略図を図10及び11に示した。この装置の特徴は外部より一切熱を加えないことにあり、スクリーと試料との間の摩擦熱を利用する点にある。省エネルギーで使用目的によっては有利と思われる。

次に、この autohydrolysis—爆砕のシステムは最近爆砕と同時に化学的処理をさらに付加することにより、酸糖化に用いられている。これはニューヨーク大学の Brenner と Rugg により開発されたセルロースの連続式糖化システムである⁵⁶⁻⁵⁹⁾。酵素糖化ではなく酸糖化への利用であるが、方法が斬新なので少し詳しく触れる。すなわち、(1)セルロース廃棄物を Werner & Pfleiderer 社製のプラスチック加工用二軸スクリー押出機 ZDS53 (53 mm) で細粉し余分の水分を除去する、(2)スラリーを243℃ に熱し 500 psi の圧力かける、(3)押し出される直前に0.5%硫酸を注入して瞬間的に加水分解し、20秒後に排出急冷する。同大学 Westbury 研究所のパイロットプラントによる過去4年間の実績によると、90 kg/hr のセルロースより30%のグルコースを含有したスラッジが得られる。グルコースの収率は60%である。この装置の開発により、古新聞、古紙はもとより農産植物廃棄物や木材を原料にしてワンステップでグルコースを含んだ糖化液を生産し、次いで発酵によるアルコール生産と微生物タンパク質 (SCP) の生産へのプロセスが開かれたことになり、今後の発展が期待される。なお模式図を図12及び13に示した。

電子線、放射線による前処理：電子線照射による酵素糖化の効果は稲わら、もみ殻、及び木材を材料にして熊倉と嘉悦により研究され、その有効性が明らかにされた⁶⁰⁾。すなわち長さ 1 cm の稲わら及び 32 mesh のもみ殻と木粉に 2 MeV, 2 mA の加速器で発生された電子線を200℃ の空气中で 2×10^6 rad/min で

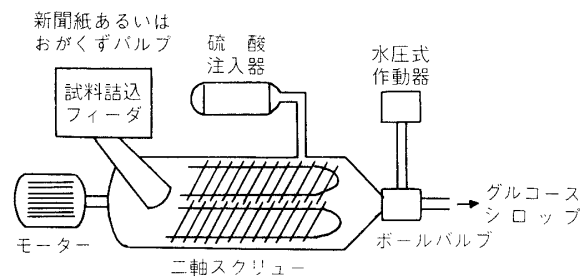


図12 二軸スクリー押出機の模式図⁵⁶⁾

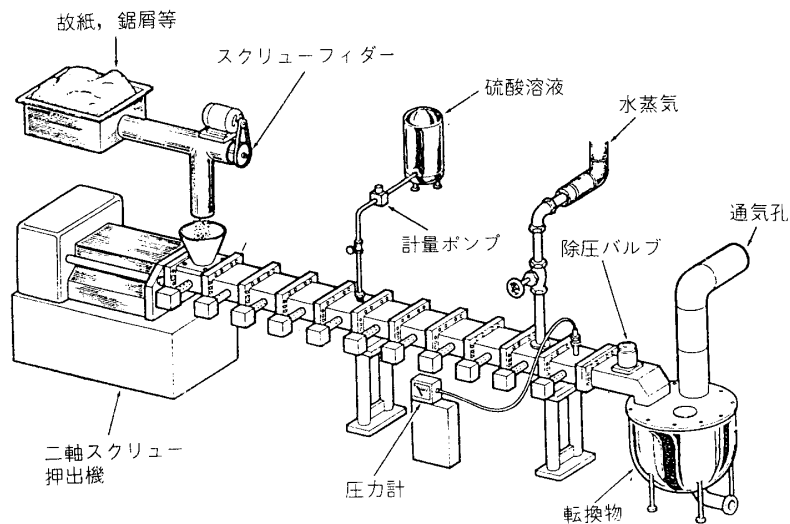


図13 二軸スクリー押出機を用いた糖化システム⁵⁷⁾

5×10^8 rad 照射した後、酵素濃度 0.25%，基質濃度 1% で 40℃，34時間糖化を行なった。その結果、種々、もみ殻及び木粉は各々約85，75及び80%糖化されることが明らかになった。酵素糖化のみならず、ルーメン微生物に対する至適照射線量も 10^8 rad 付近にある^{61,62)}。この方法の欠点は樹種によって著しく作用が異なる点にある。

また、 γ 線照射の効果も検討されている^{8,63)}。石原等によると、 ^{60}Co の γ 線照射した木粉の糖化率は広葉樹の方が針葉樹より大きく、広葉樹では 1.9 rad の照射で約80%糖化されるのに対し、針葉樹では 3 rad の照射でやっと70%であった⁸⁾。

以上述べたように電子線や放射線による糖化に対する効果は大きいですが、今後照射のコストと照射物の人体への安全性が問題となろう。

3.2 化学的前処理法

化学的な前処理法は本質的には脱リグニンと結晶性セルロースの非晶化をめざしている。化学的脱リグニン処理は製紙と結びついているため種々検討されている。表IVにまとめた。

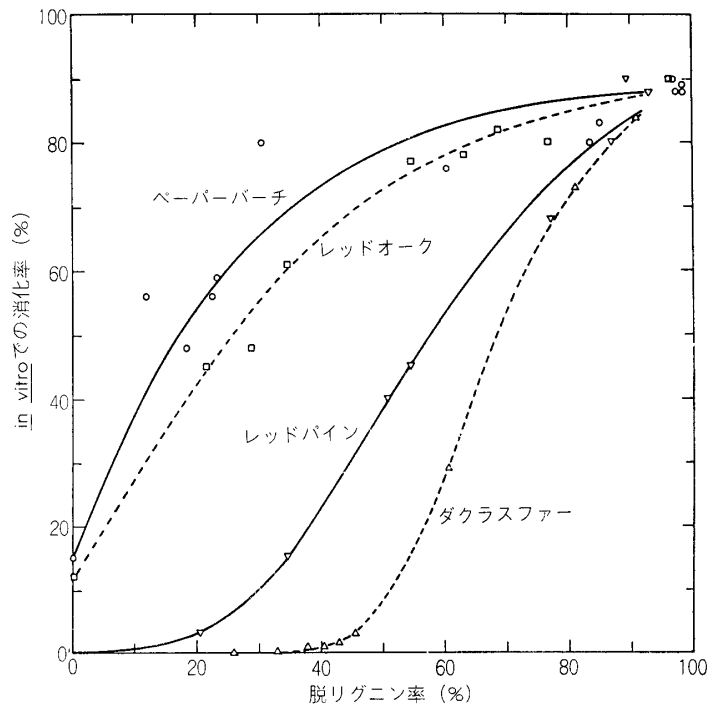


図14 四種の樹木より作ったクラフト紙の脱リグニン率と *in vitro* の消化率⁶⁵⁾

Baker 等は脱リグニンの程度が異なった種々のクラフトパルプを調製し、ルーメン微生物による消化能を分析した (図14)⁶⁴⁻⁶⁶⁾。その結果、広葉樹と針葉樹では脱リグニン度が消化性に及ぼす効果に差が認められ、同一脱リグニン化度では広葉樹の方が針葉樹より消化性がよく脱リグニン処理により急速に消化度が上昇し最終的に約90%まで消化されること、及び針葉樹では誘導期の後にはほぼ直線的に消化性が増して最終的に広葉樹とほぼ同程度にまで消化されることが明らかにされた。同様のことが *Aspergillus fumigatus* や好熱バクテリアの資化性についてもあてはまることが見出されている⁶⁷⁾。

亜塩素酸塩法による脱リグニンの効果は、Millett 等の総説に詳しく論じられている^{11,12)}。また酵素糖化への直接的アプローチが須藤等によって研究されている (図15)⁶⁸⁾。広葉樹の場合60%の Klason リグニン

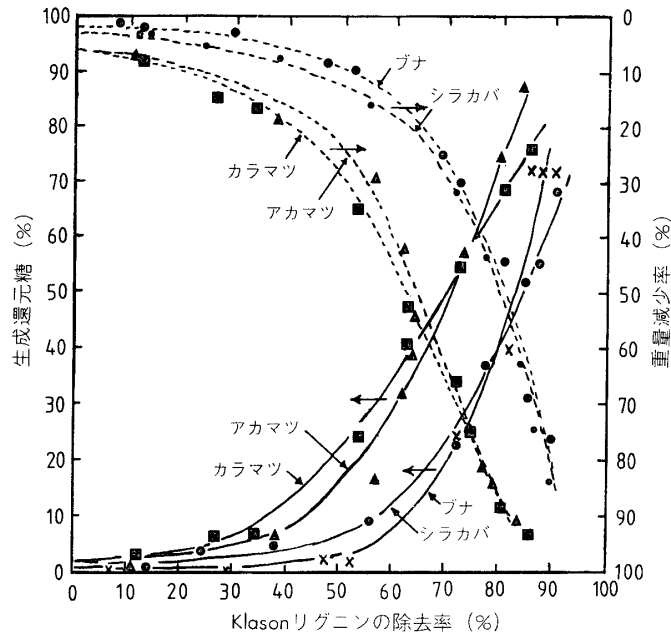


図15 亜塩素酸塩法による脱リグニン度と酵素糖化率⁶⁸⁾

の除去後急速に増大し、最終的にホロセルロースの70~80%に達し、一方針葉樹では80%の脱リグニン後に急速に増大し、最終的には90%以上が糖化されることが明らかになった。

オゾン処理による脱リグニン処理では処理時間とともに糖化率も上昇するが、生成糖のオゾンによる酸化が考えられ問題であることが明らかになっている^{60,70)}。

アルカリは木材を膨潤させる効果があり、セルロースの非晶化をもたらす^{11,12)}。広葉樹や草本性植物の酵素糖化に著しい促進効果があり、12.5%の水酸化ナトリウムを用いて高温処理した試料は、木材多糖の80%が酵素糖化される。針葉樹の場合は広葉樹よりも水酸化ナトリウムに対し抵抗性を示す^{71,72)}。Baker等は、100gの木材に対し5~6gの水酸化ナトリウムを用いた場合に最も効果が著しく、またこの含量のアルカリは木材のアセチルカルボキシル基の総量と当量の関係があることを見出した^{61,73)}。この事実から、TarkowとFeistはアルカリ前処理の主な作用は分子間のエステル結合の開裂にあり木材成分の膨潤を促進すると仮定した⁷⁴⁾。

表XI アンモニア処理木粉の酵素糖化⁷⁵⁾

樹種	生成還元糖量 (処理木粉に 対する%)	糖の組成 (%)				
		Man	Ara	Gal	Xyl	Glc
シラカバ	36.4	2.52	0.0	0.0	32.07	65.41
ドノキ	30.2	2.32	0.0	0.0	23.19	74.49
マカンバ	27.5	1.87	0.0	2.01	21.01	75.11
アカマツ	6.2	8.74	2.19	2.49	6.91	76.43
ブナ	14.9	3.35	1.56	0.0	22.56	72.53
ナラ	19.1	3.36	0.86	2.10	27.45	66.17
ラワン	5.6	3.86	0.0	0.0	6.49	89.65

アンモニアの木材に対する作用は一般に水酸化ナトリウムより弱い^{11,12)}。シラカバ木粉を5%のアンモニア水に浸漬した場合、約40%の多糖が糖化された。この効果はキシランのエステル結合の切断によるものと推察されており、樹種により効果の差が激しく、一般的に広葉樹の方が針葉樹よりも効果が大きい。特にラワンやアカマツでは効果はほとんど認められなかった(表XI)⁷⁵⁾。

エチルアミン水溶液処理ではセルロースの場合結晶化度は約30%に低下し、加水分解速度が約2倍になると言われている^{76,77)}。

亜硫酸(二酸化イオウの水溶液)を使用して120℃で2~3時間処理した木粉は優れた微生物分解特性を示した^{11,12,65)}。この方法では二酸化イオウガスを用いており、リグニンモノマーや糖が遊離せずリグニンが選択的に低分子化し、Klason リグニン含量が約1/3に減少することが明らかにされた。この方法で脱リグニンした場合、セルロースの非晶化をもたらす結果、酵素糖化率が上昇するという報告もあるが⁷⁸⁾、セルロースの重合度は減少するが結晶化度に変化はなく、酵素糖化率も上昇しないという報告⁷⁹⁾もあり一致した結論が得られていない。しかし、後者の結果はセルロースの酵素糖化に大きく寄与するのはセルラーゼと接触するセルロースの表面の物理的变化であり、重合度の変化は限定的なものではないという指摘を裏づけている。この推論は、先に述べたようにボールミル粉碎の場合についてもあてはまる。

メタノール・塩酸法による脱リグニン処理では、セルロースを完全に酵素加水分解するにはアカマツで70%、ブナで80%以上の脱リグニンが必要であった⁸⁰⁾。

その他、脱リグニンの効果については過酢酸加熱処理も検討されている^{81~83)}。

木材成分の膨潤による前処理の方法を発展させたものとして、いわゆるセルロース溶媒等に可溶化してからセルラーゼ処理を行なう方法も試みられている^{11,12,84)}。Tsao 等はカドキセンや鉄・酒石酸ソーダ溶液を用いていったんセルロースを可溶化することにより大巾に糖化率をあげることができることを明らかにした⁸⁵⁾。田中等はセルロースを種々の濃度のリン酸でセルロースを処理していわゆる Walseth セルロースを調製し、酵素糖化能を分析した^{86,87)}。その結果リン酸処理によるセルロースの結晶化度の低下とともに酵素糖化率は直線的に上昇することが明らかになった。これらの前処理法は木材そのものよりもむしろリグニン含量の少ない農産植物やセルロースそのものに適用した方が好ましいと思われる。また、希酸や70~75%硫酸及び発煙塩酸(40%)の濃酸を利用した前処理は酸糖化法にもっぱら用いられた方法であり、酵素糖化法への適用も試みられている^{11,12)}。

以上、種々の化学的前処理法を挙げたが、未だいずれも実用に供されるまでには至っていない。その理由の一つは使用した試薬の回収と再使用法等の経済的問題が解決していない点があげられる。

3.3 生物学的前処理法

微生物、特に木材腐朽菌による脱リグニン及びセルロースの非晶化である。このうち後者はまだ夢にすぎないが、前者の微生物による脱リグニン処理は近年セルラーゼ活性の喪失した菌も得られており、biological pulping の方向とも一致している。スギ及びブナの木片を白色腐朽菌ヒラタケと褐色腐朽菌オオウズラタケで腐朽させ、腐朽によるリグニン含量、糖組成、セルロースの結晶化の変化とセルラーゼによる酵素糖化率との関係が分析された⁸⁸⁾。その結果、セルラーゼによる糖化率はリグニン含量の低下する程高くなり、白色腐朽したスギの場合、健材の12.1%(リグニン含量34.5%)から63.5%(リグニン含量27.1%)に糖化率が上昇する。褐色腐朽菌による処理は酵素糖化の前処理としては適していないことも明らかにされた。また、現在知られているリグニン分解菌は高分子のリグニンを分解する速度が極めて遅い上に、リグニンの分解のために糖を消費するので大量処理には不利である。リグニン分解酵素を用いてリグニンの分解を行なうことも現在では困難である。以上のような困難さにもかかわらず、生物学的前処理は常温、常圧、省エネルギー、省試薬品、無公害で理想的な方法であり、微生物を用いた脱リグニン処理は製紙工業^{89,90)}と結びついているところから、単なる糖化のみならず今後の発展が期待される¹⁰⁰⁾。

4. ま と め

以上、木材多糖の酵素糖化の現状を把握した。その結果、木材を脱リグニンしさらにヘミセルロースを除いてセルロースにすれば、現在強力な *Trichoderma* のセルラーゼが開発されており、その結晶性を問題とせず充分糖化されること、及びセルロースを非晶化すれば *Aspergillus* のセルラーゼでこれまた問題なく糖化されることが明らかになったといえよう。従って、天然セルロース系資源の酵素糖化においては、単一の酵素系を使用するよりは、タイプの異なった種々の酵素（例えば *Trichoderma* と *Aspergillus* 由来の酵素）を併用した混合酵素系を用いると相乗効果が期待され、事実そうであることがはっきりと実証された^{27,91,92)}。技術的にここまできているが実用化にはまだほど遠い。従って、有効な前処理法を開発することも必要であるが、セルラーゼの力価をさらに上昇することも必要と思われる。セルラーゼ間の厳しい淘汰がなされた結果、現在 *Trichoderma*, *Irpex*, *Oxiporus*, *Aspergillus* 等の数種の菌由来のセルラーゼ製剤が生産されている。今後さらに新しい強力なセルラーゼを求める努力もなされなければならない。単にセルラーゼといっても常温のものばかりでなく好熱性や好アルカリ性のないし耐アルカリ性の菌由来のセルラーゼも今後注目されよう。また天然の状態では木材に害を与えるものにはきのこの他にしろあり等の木を食う昆虫がいる。現状では後者のセルラーゼの性質は研究途上にあり^{57,58)}、今後その発展が期待される。一方、ヘミセルロースを分解するヘミセルラーゼの開発も必要と思われるが、モノマーまで変換できたとしてもその後の利用法の裏うちが現状では明確に実用化されるものはほとんどない。今、木材全体の利用のフローチャートが提示されているが（図16及び17）⁹⁴⁾、これらのヘミセルロースの利用法はここ数十年目立った進歩のあとがみられないことは残念なことであるが、希望の光が認められる点もある。それはペントースのアルコール発酵である。この発酵については1928年に White と Willaman が *Fusarium lini* で見出したもので⁹⁵⁾、その後

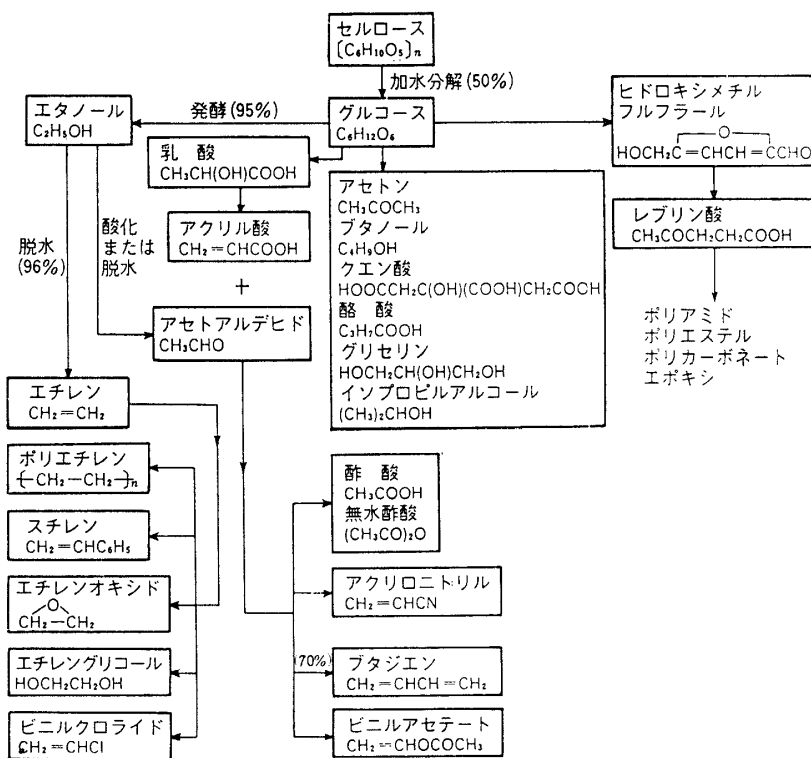


図16 セルロースの加水分解と石油化学工業の原料への転換⁹⁴⁾

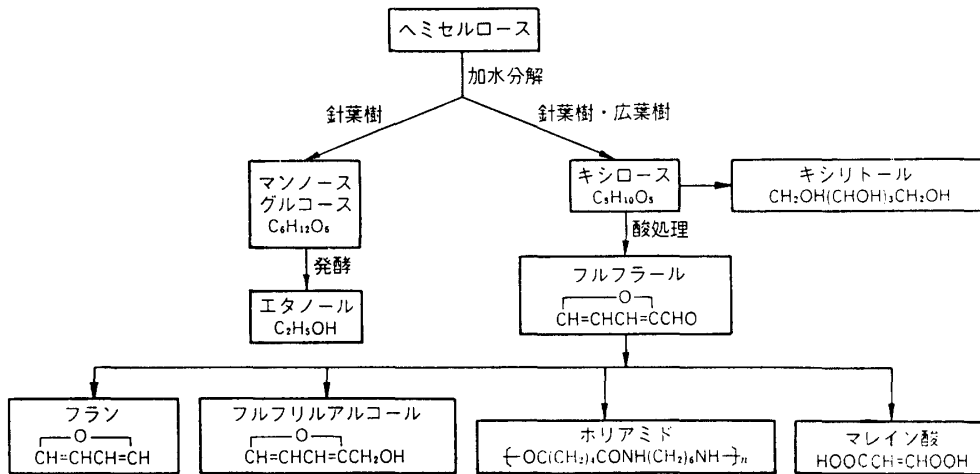


図17 ヘミセルロースの分解と石油化学工業への転換⁹⁴⁾

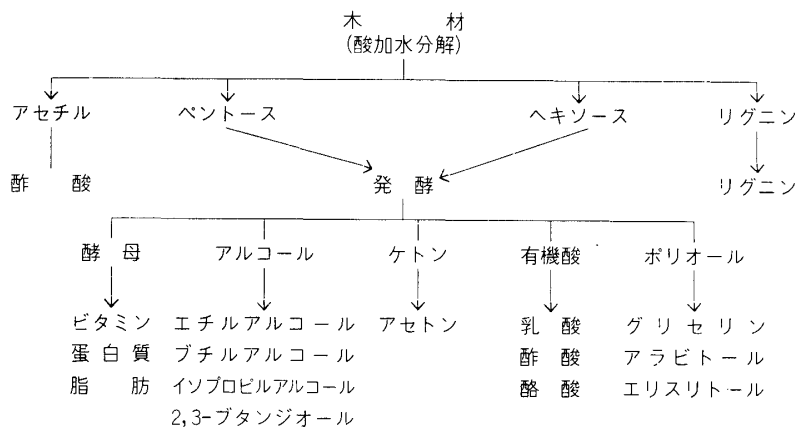


図18 木材の加水分解物を利用した発酵生産物⁸⁸⁾

目立った進歩がみられなかった。しかし、最近キシロースのアルコール発酵が注目されてきている^{96,97)}。Wilke 等の開発したプロセスではセルロースの硫酸による前処理を含んでいる⁹⁶⁾。この時遊離してくるヘミセルロースは *Fusarium lini* と *Bacillus marcelance* によりエタノールに変換される。その他、*Klebsiella* や *Aeromonas* がペントースを資化してブタンジオールを生成することが報告されている⁹⁸⁾。

遺伝子工学的手法を成功裡に木材糖化に適用した報告は未だみあたらないが、今後の魅力あるひとつの方向と思われる。

最近、U. S. Forest Product Laboratory の約70年間の成果の総説が出された。糖化、木糖の発酵への利用、木材の飼料化等について詳しく論ぜられている⁹⁹⁾が、特に木材の糖化後の発酵への利用に約半分の紙面がさかれており、糖化産物の有効利用法の開発の重要性が再認識される。糖化産物の発酵への利用のフローチャートを図18に示した。

化学工業原料や飼料等を太陽を中心とした自然のサイクルの中に求めるといふ人類の夢。この夢を実現して再生産可能資源による化石系資源の代替化をおし進め、明日へサバイバルすることを切望する。

謝 辞

本総説は昭和57年5月31日に、日本能率協会主催の「バイオマス・バイオエネルギー研究会」第21回フォーラムにおいて発表した原稿をもとに加筆してまとめたものであり、本誌への掲載を快諾して下さいました日本能率協会「バイオマス・バイオエネルギー研究会」に深く感謝します。また本総説は文部省科学研究費（「エネルギー特別研究，生物エネルギーの利用と開発」，課題番号5604644）の補助金によって行なった。

文 献

- 1) 佐々木恵彦：バイオマス生産と変換（上），学会出版センター，69（1981）
- 2) 宮崎 信：バイオマス生産と変換（上），学会出版センター，223（1981）
- 3) 越島哲夫：エネルギー，資源，2，242（1981）
- 4) 東順一，佐藤 惺：有機資源の化学，化学増刊，90，化学同人，47（1981）
- 5-a) 昭和55年木材需給報告書 p. 9 及び p. 231，農林水産省 経済局 統計情報部編集，農林統計協会発行（1981）
- 5-b) 国際食糧農業協会：FAO 世界森林資源調査，季報15号（1979）
- 6) 古谷 剛：材料 30，657（1981）
- 7) 越島哲夫：木材研究・資料 16，16（1981）
- 8) 石原達夫：木材工業 34，192（1979）
- 9) 志水一允：高分子 28，860（1979）
- 10) 佐々木 堯：日食工誌 28，508（1981）
- 11) M. A. MILLETT, A. J. BAKER and L. D. SATTER: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5*, 193 (1975)
- 12) M. A. MILLETT, A. J. BAKER and L. D. SATTER: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 6*, 125 (1976)
- 13) P. KARRER, P. SCHUBER and W. WEHRLI: *Helv. Chim. Acta*, 8, 797 (1925)
- 14) E. T. REESE, R. G. H. SIU and H. S. LEVINSON: *J. Bacteriol.*, 59, 485 (1950)
- 15) H. S. LEVINSON, G. R. MANDELS and E. T. REESE: *Arch. Biochem. Biophys.*, 31, 351 (1951)
- 16) E. T. REESE: *Marine Boring and Fouling Organisms* (Ed. D. L. RAY), p. 265, Univ. of Washington Press, Seattle (1959)
- 17) T. M. WOOD and S. I. McCRAE: *Hydrolysis of Cellulose, Mechanisms of Enzymatic and Acid Catalysis*, *Adv. Chem. Ser.*, 181, 181 (1979)
- 18) M. C. FLICKINGER: *Biotechnol. Bioeng.*, 22, Suppl. 1, 27 (1980)
- 19) 外山信男，小川喜八朗，外山英男：発酵と工業 39，812（1981）
- 20) 佐々木堯，佐藤陽子，中川真人，白石真人，見沼圭二：日食工誌 26，523（1979）
- 21) 嘉悦 勲：バイオマス生産と変換（下），学会出版センター，115（1981）
- 22) A. MARZETTI, B. FOCHE, L. D'ANGIURO and V. SARTEO: *Cellulose Chem. Technol.*, 15, 3 (1981)
- 23) E. B. COWLING: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5*, 163 (1975)
- 24) E. B. COWLING and K. KIRK: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 6*, 95 (1976)
- 25) J. C. PEW and P. WEYNA: *Tappi*, 45 (3), 247 (1962)
- 26) D. F. CAULFIELD and W. E. MOORE: *Wood Sci.*, 6, 375 (1974)
- 27) R. TANAKA, F. YAKU, E. MURAKI and T. KOSHIJIMA: *Cellulose Chem. Technol.*, 14, 859 (1980)
- 28) 松村義人，須藤賢一，志水一允：木材学会誌 23，562（1977）
- 29) M. A. MILLETT, M. J. EFFLAND and D. F. CAULFIELD: *Hydrolysis of Cellulose, Mechanism of Enzymatic and Acid Catalysis*, *Adv. Chem. Ser.*, 181, 71 (1979)
- 30) W. E. MOORE, M. EFFLAND and M. A. MILLETT: *J. Agric. Food. Chem.*, 20, 1173 (1973)
- 31) M. MANDELS and D. STERNBERG: *J. Ferment. Technol.*, 57, 186 (1979)
- 32) M. MANDELS, L. HONTZ and J. NYSTROM: *Biotechnol. Bioeng.*, 16, 1471 (1974)
- 33) B. LEOPOLD and S. K. R. MOULIK: *Tappi*, 51, 334 (1968)
- 34) D. F. CAULFIELD and R. A. STEFFES: *Tappi*, 52, 1361 (1969)
- 35) R. G. KELSEY and F. SHAFIZADEH: *Biotechnol. Bioeng.*, 22, 1025 (1980)
- 36) 佐々木堯，佐藤陽子，見沼圭二：日食工誌，26，493（1979）

- 37) T. TASSINARI, C. MACY, L. SPANO and D. D. Y. RYU: *Biotechnol. Bioeng.*, **22**, 1689 (1980)
- 38-a) 東 順一, 越島哲夫: エネルギー特別研究 “生物エネルギーの利用と開発” 昭和55年度 研究成果報告, p. 75 (1981)
- 38-b) 村木永之介, 夜久富美子, 田中龍太郎, 越島哲夫: *木材学会誌*, **28**, 122 (1982)
- 39) T. KOSHIJIMA, F. YAKU, E. MURAKI and J. AZUMA: Program and Abstracts of The Ninth Cellulose Conference, May 24–27, p. 37 (1982), State University of New York, College of Environmental Science and Forestry, Syracuse, New York
- 40) J. H. LORA and M. WAYMAN: *Tappi*, **61** (6), 47 (1978)
- 41) M. G. S. CHUA and M. WAYMAN: *Can. J. Chem.*, **57**, 1141 (1979)
- 42) H. H. DIETRICH, M. SINNER and J. PULS: *Holzforschung*, **32**, 193 (1978)
- 43) D. G. MACDONALD and J. F. MATHEWS: *Biotechnol. Bioeng.*, **21**, 1091 (1979)
- 44) N. NEESE, J. WALLICK and J. M. HARPER: *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 323 (1977)
- 45) 志水一允, 石原光朗, 須藤賢一: 第32回日本木材学会大会 (福岡) 研究発表要旨集, p. 298 (1982)
- 46) F. BENDER, D. P. HEANEY and A. BOWDEN: *Forest Prod. J.*, **20** (4), 36 (1970)
- 47) D. H. HEANEY and F. BENDER: *Forest Prod. J.*, **20** (9), 98 (1970)
- 48) R. H. MARCHESSAULT and J. ST-PIERRE: Proceedings of World Conference on Future Sources of Organic Raw Materials, Toronto (1978)
- 49) R. H. MARCHESSAULT, S. COULOMBE, T. NANAI and H. MORIKAWA: *Trans. Tech. Sec. CPPA*, **6**, TR52 (1980)
- 50) L. JURASEK: *Development in Industrial Microbiology*, **20**, 177 (1979)
- 51) 森川弘道: *化学と生物*, **19**, 286 (1981)
- 52) D. A. I. GORING: *Pulp and Paper Mag. Can.*, **64**, T-517 (1963)
- 53) M. WAYMAN, J. H. LORA and E. GULBINAS: *Chemistry for Energy*, ACS Symp. Ser., **90**, 183 (1979)
- 54) J. D. TAYLOR: *Energy for Biomass*, 1st E.C. Conference, p. 330 (1980), Applied Science Pub. Ltd. London
- 55) 東 順一, 越島哲夫: 第32回日本木材学会大会 (福岡) 研究発表要旨集, p. 299 (1982), 鶴見曹達株式会社パンフレット。
- 56) *Chem. Engng. News*, Oct. 8, 19 (1979)
- 57) *Chem. Engng. News*, Nov. 5, 12 (1979)
- 58) *Chem. Week*, Feb. 27, 40 (1980)
- 59) B. RUGG and W. BRENNER: Proceedings of the 7th Energy Technology Conference and Exposition, (1980), Washington, D. C.
- 60) M. KUMAKURA and I. KAETSU: *Biotechnol. Bioeng.*, **20**, 1309 (1978)
- 61) M. A. MILLETT, A. J. BAKER, W. C. FEIST, R. W. MELLEBERGER and L. D. SATTER: *J. Animal Sci.*, **31**, 781–788 (1970)
- 62) G. I. PRITCHARD, W. J. PIGDEN and D. L. MINSON: *Can. J. Anim. Sci.*, **42**, 215 (1962)
- 63) Y. W. HAN, J. TIMPA, A. CIEGLER, C. W. F. CURRY and E. N. LAMBRENT: *Biotechnol. Bioeng.*, **23**, 2525 (1981)
- 64) A. J. BAKER: *J. Animal Sci.*, **36** (4), 768 (1973)
- 65) A. J. BAKER, M. A. MILLETT and L. D. SATTER: *Cellulose Technology Research*, ACS Symp. Ser., **10**, 75 (1975)
- 66) P. SAARINEN, W. J. JENSON and J. ALHOJARXI: *Acta. Agr. Fenn.*, **94**, 41 (1959)
- 67) A. BAKER, A. A. MOHAUPT and D. F. SPINO: *J. Animal Sci.*, **37** (1), 179 (1973)
- 68) 須藤賢一, 松村義人, 志水一允: *木材学会誌*, **22**, 670 (1976)
- 69) 「農林水産廃棄物の活用による飼料等の開発に関する研究」推進会議資料農林水産技術会議 (昭和 51, 52, 53, 54年)
- 70) A. BINDER, L. PELLORI and A. FIECHTER: *Eur. J. Microbiol. Biotechnol.*, **11**, 1 (1980)
- 71) 松村義人, 須藤賢一, 志水一允: *木材学会誌*, **23**, 562 (1977)
- 72) N. TOYAMA and K. OGAWA: *Proc. IVIFS, Fermentation Today*, p. 743 (1972)
- 73) W. C. FEIST, A. J. BAKER and H. TARKOW: *J. Animal Sci.*, **30** (5), 832 (1970)
- 74) H. TARKOW and W. C. FEIST: *Cellulases and their applications*, ACS Adv. Chem. Ser., **95**, Chapter 12 (1969)

- 75) 石原達夫, 石原光郎: 木材学会誌, **25**, 804 (1979)
- 76) C. H. HAYDEL, J. F. SEAL, H. J. JANSSEN and L. E. VIX: *Ind. Eng. Chem.*, **50**, 74 (1958)
- 77) M. L. NELSON: *J. Polym. Sci.*, **43** (142), 351 (1960)
- 78) Y. Y. LEE, C. M. LIN, T. JOHNSON and R. P. CHAMBERS: *Biotechnol. Bioeng., Symp.* **8**, 75 (1979)
- 79) A. H. CONNER: *Biotechnol. Lett.*, **2**, 439 (1980)
- 80) 志水一允, 宇佐見国典: 木材学会誌, **24**, 632 (1978)
- 81) 外山信夫: 繊維と工業, **3**, 493 (1970)
- 82) N. TOYAMA and K. OGAWA: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 5*, 225 (1975)
- 83) N. TOYAMA: *Biotechnol. Bioeng. Symp. No. 6*, 207 (1976)
- 84) G. JAYME: *Cellulose and Cellulose derivatives*, **5**, 381 (1971), Wiley-Interscience, N.Y.
- 85) G. T. TSAO, M. LADISCH, C. LADISH, T. A. HSU, B. DALE and T. CHUO: *Fermentation Processes*, D. PERLMAN, ed., 1978, Academic Press, N.Y.
- 86) M. TANAKA, M. TANIGUCHI, T. MORITA, R. MATSUNO and T. KAMIKUBO: *J. Ferment. Technol.*, **57**, 186 (1979)
- 87) 田中三男: 醸酵工学, **58**, 145 (1980)
- 88) 広居忠量: 木材学会誌, **27**, 684 (1981)
- 89) 近藤民雄: 紙パ技協誌, **31**, 306 (1977)
- 90) 福住俊郎: 紙パ技協誌, **34**, 761 (1980)
- 91) 東 順一, 越島哲夫: エネルギー特別研究 “生物エネルギーの利用と開発” 昭和56年度研究成果報告, p. 54 (1982)
- 92) 村尾沢夫: エネルギー特別研究 “生物エネルギーの利用と開発” 昭和56年度研究成果報告, p. 101 (1982)
- 93) K. KANAI, J. AZUMA and K. NISHIMOTO: *Wood Research*, **68**, 47 (1982)
- 94) 岡村圭造: 有機資源の化学, 化学増刊 90, 化学同人, 7 (1981)
- 95) M. G. WHITE and J. G. WILLAMAN: *Biochem. J.*, **22**, 583 (1928)
- 96) S. L. ROSENBERG, T. R. BATTER, H. W. BLANCH and C. R. WILKE: *AIChE Symposium*, 107 (1981)
- 97) 安井恒男: 環境科学特別研究. “資源循環: 植物廃棄物の有効利用に関する研究 (R-33-8)” 研究会, 8 (1982)
- 98) M. R. LADISCH, M. C. FLICKINGER and G. T. TSAO: *Energy*, **4**, 263 (1979)
- 99) G. J. HAJNY: Research Paper, FPL 385, March 1981, Forest Products Laboratory, United States Department of Agriculture
- 100) 島田幹夫: 木材研究・資料 (本号) (1982)