



Title	バガスの前処理とバガスセルロースの酵素的分解(農芸化学科)
Author(s)	石原, 昌信; 与那覇, 和雄; 当山, 清善
Citation	琉球大学農学部学術報告 = The Science Bulletin of the Faculty of Agriculture. University of the Ryukyus(30): 193-200
Issue Date	1983-11-19
URL	http://hdl.handle.net/20.500.12000/3992
Rights	

バガスの前処理とバガスセルロースの酵素的分解

石原昌信*・与那覇和雄*・当山清善*

Masanobu ISHIHARA, Kazuo YONAHARA and Seizen TOYAMA:
Enzymatic degradation of cellulose in variously pre-
treated bagasse

Summary

Molds were grown on the solid medium containing wheat bran and bagasse, and compared for their ability to degrade bagasse cellulose by using koji-extracts as enzyme sources. Among 64 strains able to degrade sodium hydroxide-treated bagasse, *Asp. niger* AUR 3124 could appreciably degrade the cellulose. The effectiveness of various pre-treatments of bagasse on the enzymatic degradation of bagasse cellulose was also evaluated. The treatments with sodium hydroxide, sodium chlorite and ethylenediamine significantly increased the degradability. The degree of degradation was dependent on the concentration of treatment agents used for the treatments. The treatment with sodium hydroxide was found to be the most efficient treatment for bagasse in terms of cellulose degradation. The most favorable pH range and temperature for the degradation of bagasse cellulose by the enzyme of *Asp. niger* AUR 3124 was from 4.0 to 4.5 and 40°C, respectively.

結 言

従来、セルロースの微生物起源酵素による分解については広く研究が行われており、*Trichoderma* 属が強いセルロース分解能を有することが知られている。最近、セルロース性物質は再生可能な資源として見直れつつあり、酵素を用いてこれらの分解・糖化を行なうことにより有用な物質へ変換するための研究が盛んに行われている。^{1, 3, 4, 5, 7, 13)} セルロース性物質の分解には主に酵素糖化が考えられており、従って強力なセルラーゼ生産菌の探索や酵素生産条件を検討することが重要な課題となっている。

著者らは、^{14, 15, 16)} これまでに甘蔗糖製造過程で多量に副生されるバガスの有効利用を図る観点からバガスを唯一炭素源として微生物の培養を行ないバガスの微生物による資化利用性や微生物起源酵素（セルラーゼ）によるバガスの分解性等について報告した。バガス中のセルロース、ヘミセルロースはリグニンと強固に結合しており微生物および酵素によって極めて分解し難いため、バガスの易分解性を高めるためにはバガスを物理的及び化学的に前処理を行なう必要がある。

本報では、微生物が生産する酵素によるバガスセルロースの分解性を明らかにすることを目的として、

† 甘藷バガスの微生物学的利用に関する研究 第7報

* 琉球大学農学部農芸化学科

カビにおけるバガスセルロースの分解性を調べるとともに、バガスの前処理条件とバガスセルロースの分解性との関係について検討した。

実験方法

(1) 供試バガス原料：無処理バガスは製糖工場で搾汁直後のバガスを50°Cで乾燥し、ウィレー氏粉砕機で粉砕し、40メッシュの篩を通したものである。バガスの前処理は次の如く行った。即ち、熱水処理バガスの調製は、粉砕バガス20gに水1リットルを加え、120°Cで20分間加圧蒸煮したのち吸引ろ過を行ない、ろ液が透明になるまで水洗浄し、50°Cで乾燥して行なった。アルカリ処理バガスは、粉砕バガス20gに0.5%の水酸化ナトリウム溶液1リットルを加え上記と同様に加圧蒸煮したのち、熱水及び冷水で洗浄後乾燥して調製した。同様な操作で5%次亜塩素酸ナトリウム、5%過酸化水素及び5%硫酸溶液を加えて処理を行ない各種処理バガスを調製した。また、エチレンジアミン処理バガスの調製は上記と同量のバガスに20%のエチレンジアミンを加え、50°Cで20分間放置後吸引ろ過により液部を除去し水洗浄を行ない50°Cで乾燥して行なった。爆砕処理バガスの調製は、粉砕バガスを高温(240°C)高圧(24気圧)水蒸気で瞬時(60秒)処理したのち、直ちに常圧に放出(explode)せしめる方法⁶⁾で行った。

(2) 粗酵素液の調製：バガスコウジは、フスマ3g及び0.5%アルカリ処理バガス1gをシャーレに採り、水7mlを加えてよく混合して殺菌したのち、各種カビを30°Cで120時間静置培養したものである。粗酵素液は、バガスコウジにコウジと同量の蒸留水を加えて十分攪拌し、室温で60分間放置後遠心分離して得られる上澄液である。

(3) 酵素反応並びに酵素分解活性の測定：酵素反応液の組成は、供試バガス30mg、1M酢酸ナトリウム緩衝液(pH 4.5) 0.3mlおよび酵素液で総量3mlとした。酵素反応は、スピッツに酵素反応混液を入れ、40°C、5~24時間ゆるやかに振盪して行ない、10分間煮沸することにより反応を止め、冷却後遠心分離により固液分離を行ない固形部のセルロース量と液部の還元糖量を測定した。セルロース量はUpdegraffの方法¹⁷⁾に準じて測定し、酵素反応液中の還元糖量はSomogyi-Nelson法に従って測定した。酵素活性は、酵素反応後のセルロース量を求め、酵素反応前のセルロース量との差から算出した減少率で、または酵素反応で生成した還元糖量を算出し、反応液1ml中のグルコースmg数で示した。

実験結果

1. 各種カビにおけるバガス分解酵素活性の分布

カビをフスマバガス(3:1)培地で培養するとバガス分解酵素を生産し、培養96~120時間で最も高い分解活性が得られる。Table 1はバガス分解活性の高い酵素を生産するカビの選出を行なうため、保存菌64株のカビについてフスマバガス培地で120時間培養を行ない、バガスコウジから調製した酵素液による0.5%アルカリ処理バガスの分解性について調べた結果である。バガスの分解程度は酵素反応後のバガスセルロースの減少率及び生成還元糖の増加量で表示した。表から明らかなように、*Aspergillus*属では*Asp. niger* ICR 3303, IFO 4091, *Asp. awamori* IFO 4033, *Asp. aculeatus* F-50及び*Asp. niger* AUR 3124をフスマバガス培地に培養して得られた粗酵素液がバガスセルロースを比較的良く分解し、反応液中の還元糖量も高い値を示した。*Penicillium*属では*Pen. citrinum* IFO 6062が良好な分解活性を示したが、他の菌株は活性が低い。*Rhizopus*属では分解活性の高い菌株は得られなかった。従って、以下の実験では、バガス分解活性が比較的高く、フスマバガス培地で良好な生育を示した*Asp. niger* AUR 3124を用いた。なお、本菌は糖蜜培地でクエン酸生産能の高い菌株として選出されたものである。

Table 1. Bagasse-cellulose degrading activity in various molds

Strains		Degradation (%)	R. sugar (mg/ml)	Strains		Degradation (%)	R. sugar (mg/ml)
<i>Rhizopus</i>	<i>delemar</i> ATCC 34612	85	0.7	<i>Aspergillus</i>	<i>awamori</i> IFO 4122	34.4	3.5
	<i>chinensis</i> IFO 4745	12.9	1.0		IFO 5706	17.3	2.3
	<i>niveus</i> IFO 4759	10.2	1.1		IFO 4119	27.9	3.2
	<i>javanicus</i> AUR 3063	8.0	0.7		IFO 4115	25.0	2.6
<i>Aspergillus</i>	<i>oryzae</i> IAM 2630	23.1	2.4		IFO 4119	21.6	2.4
	<i>japonicus</i> IAM 2016	31.8	3.3	<i>Aspergillus</i>	AUR 3150	24.0	0.3
	<i>usamii</i> IAM 2185	34.9	3.5		<i>higuchi</i> AUR 3151	20.8	2.3
	<i>sojiae</i> IFO 4389	20.3	2.5		<i>aculeatus</i> F-50	67.0	6.2
	<i>oryzae</i> ICR 3311	2.8	0.3		<i>usamii</i> IFO 4388	39.1	4.2
	IFO 4181	1.69	0.23		IFO 8876	31.1	3.4
	IFO 4405	11.0	1.3		IFO 8877	31.2	3.4
	<i>sojiae</i> IFO 4200	1.63	0.19		IFO 6082	30.0	3.3
	<i>cellulosae</i> ICR 3317	14.1	1.7		IFO 4308	32.9	3.4
	<i>niger</i> ICR 3303	43.0	4.6		<i>kawachii</i> IFO 4338	25.9	2.8
	IFO 4338	35.0	3.8		<i>luchuensis</i> AUR 3208	1.54	1.9
	IFO 4091	45.0	4.8		<i>kawachii</i> AUR 3209	1.97	2.3
	IAM 2094	3.87	4.1		<i>niger</i> p-2 AUR 3280	32.9	3.5
	AUR 3124	60.0	6.1		<i>niger</i> p-3 AUR 3281	40.0	4.2
	AUR 3125	30.4	3.3	<i>Penicillium</i>	<i>notatum</i> IFO 4640	4.6	0.5
	IFO 6482	32.3	3.3		<i>chrysogenum</i> IAM 7106	4.4	0.5
	<i>awamori</i> ICR 3306	2.98	3.1		<i>variable</i> IFO 6111	1.97	2.3
	IAM 2112	1.82	2.0		<i>citrinum</i> IFO 6062	4.88	4.8
	IAM 2391	3.63	3.9	<i>Monascus</i>	<i>miyazato</i> ICR 3403	1.23	1.1
	IAM 2087	1.84	2.0	<i>Neurospora</i>	<i>crassa</i> IFO 6068	4.3	0.3
	AUR 3140	2.54	2.9		IFO 6660	4.2	0.6
	AUR 3140-A	3.23	3.6		<i>sitophila</i> ICR 3551	6.5	0.8
	AUR 3140-B	1.97	2.0	<i>Trichoderma</i>	<i>viride</i> IFO 4847	27.9	3.0
	AUR 3140-11	3.22	3.6		IFO 5720	21.5	2.4
	AUR 3140-12	1.75	2.0		AUR 3604	1.24	1.5
	AUR 3141	1.73	2.2		AUR 3700	6.5	0.8
	IFO 4033	4.00	4.1		AUR 3701	1.69	1.7
	IFO 4314	2.36	2.7	<i>Gibberella</i>	<i>fujukuroi</i> IFO 6356	1.0	0.1

Fresh bagasse from a sugar mill was dried and ground to 40 mesh (untreated bagasse). The untreated bagasse was treated with 0.5% NaOH solution (20:1, liquid: bagasse) at 120°C for 20 min. The treated bagasse was recovered by filtration, washed and dried (0.5% NaOH-treated bagasse). Various strains of mold were grown on the solid medium containing wheat bran and 0.5% NaOH-treated bagasse. Wheat bran-bagasse koji was prepared (per 2×10cm petri dish: wheat bran 3g, treated bagasse 1g, water 7ml: sterilized at 120°C, 20min) by inoculation from a sporulated agar slant culture, and incubated at 30°C for 120 hr. The koji preparation (10g) was mixed well with distilled water (10ml) and centrifuged. The supernate, koji-extract, was used as the crude enzyme for enzymatic degradation of bagasse. The reaction mixture for enzyme assay contained 30mg of 0.5% NaOH-treated bagasse, 0.3ml of 1M sodium acetate buffer, pH4.5 and koji-extract in a final volume of 3ml. After incubation at 40°C for 24 hr with shaking, the reaction was terminated by boiling and centrifuged to separate the supernate and residues. Reducing sugar in the supernate and undigested cellulose were determined by the Nelson-Somogyi method and Anthrone method, respectively. The enzyme activity was shown as an increase in the amount of glucose (mg) in the supernate (mg) and the percentage of cellulose degraded.

2. 酵素による各種前処理バガスの分解性

Table 2は *Asp. niger* AUR 3124 菌株から調製した粗酵素液による各種の前処理手段で処理したバガスの分解性について調べた結果である。バガスにNaOH溶液, NaClO₂溶液及びエチレンジアミン溶液をそれぞれ加えて120℃, 20分間処理を行な

Table 2. Effect of various treatments on enzymatic degradation of cellulose in bagasse

Pretreatments of bagasse	Cellulose degraded, (%)
1. NaOH (0.5%, 120°C, 20 min)	60
2. NaClO ₂ (5%, 120°C, 20 min)	60
3. Ethylenediamine (20%, 50°C, 20 min)	57
4. Steam-explosion (240°C, 24 atm, 1 min)	32
5. Peracetate (1:1, acetic anhydride: 30% H ₂ O ₂ , 120°C, 20 min)	24
6. H ₂ SO ₄ (5%, 120°C, 20 min)	18
7. Water (120°C, 20 min)	13
8. Untreated	10

Bagasse was subjected to various treatments, and the resultant residues were dried for enzymatic degradation assays. Bagasse was treated with chemical treatment agents (20:1, liquid: bagasse) as indicated conditions. The treated bagasse was incubated with the crude enzyme from *Asp. niger* AUR 3124 at 40°C for 24 hr, and the undigested cellulose was determined. Other conditions are the same as Table 1.

の分解率と比較するため無処理バガスの分解性についても示した。アルカリ処理バガスは酵素反応時間の経過に伴ない分解され, 反応24時間ではバガスセルロースは約60%まで分解された。バガスセルロースの分解とともに反応液中の還元糖量が増加した。一方, 無処理バガスはほとんど分解されず, 反応24時間でのバガスセルロースの分解率は約15%であった。

4. 酵素による各種濃度アルカリ処理バガスの分解

Fig. 2は, バガスのアルカリ溶液による前処理条件と酵素分解性との関係について明らかにする目的で, アルカリ溶液濃度を変えて処理したバガスの分解性について調べた結果である。アルカリ処理バガスの酵素液による分解性は, バガスを処理するアルカリ溶液の濃度に依存し, 0.5%以上のアルカリ溶液で120℃, 20分間処理したバガスにおいて高い分解率(60%)が得られた。0.5%以上のアルカリ溶液で処理したバガスの分解率はほぼ同程度であり, 分解率からみたバガスを処理するアルカリ溶液の濃度は0.5%で充分であると思われる。

液をそれぞれ加えて120℃, 20分間処理を行なうことにより脱リグニンしたバガスは分解されやすく, バガス中のセルロースは反応24時間で約60%まで分解された。爆砕処理バガスの分解率は低く, 爆砕処理による脱リグニンの効果は認められなかった。無処理バガス, 熱水及び5%硫酸処理バガスはほとんど分解されず, 約19%の分解率であった。酢酸-過酸化水素溶液処理により完全に脱リグニンしたバガスセルロースの分解率はNaClO₂溶液により脱リグニンされたバガスセルロースの分解率より低い。これらの結果から, 酵素によるバガスの分解性は前処理をすることにより高められ, 0.5% NaOH溶液, 5% NaClO₂及び20%エチレンジアミン溶液で処理することにより著しく分解性が高められることが明らかとなった。

3. 酵素によるアルカリ処理バガスの分解

Asp. niger AUR 3124 菌株から調製した粗酵素液によるバガスの分解性はバガスをNaOH溶液で前処理することにより著しく高められることがわかったので, 次に本酵素によるアルカリ処理バガスの分解性を調べた。0.5% NaOH溶液処理バガス30mgに本酵素液を添加し, pH 4.5, 40℃で酵素反応を行ない還元糖の増大とバガスセルロースの減少率について経時的に調べた結果をFig. 1に示した。アルカリ処理バガス

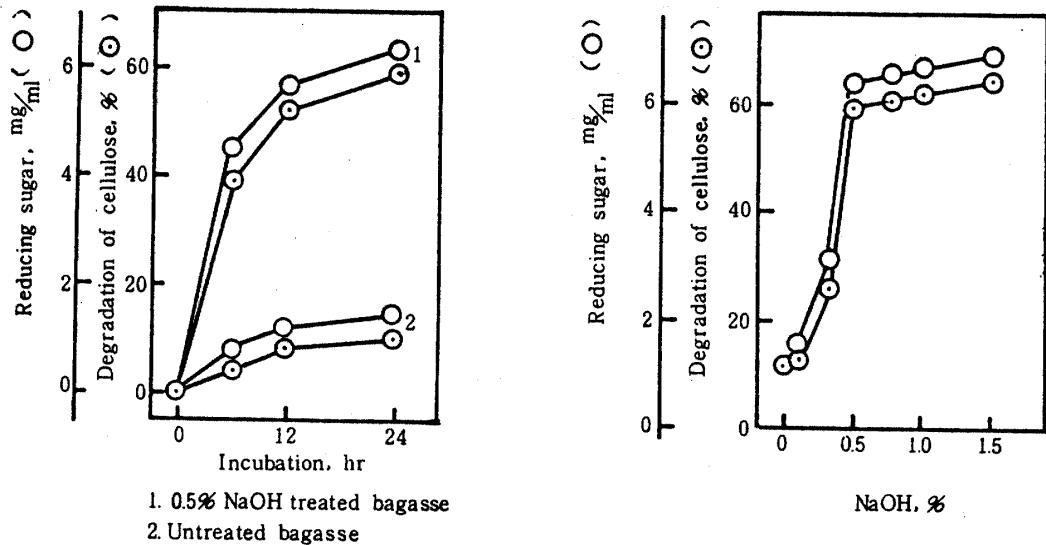


Fig. 1. Enzymatic degradation of cellulose in untreated and sodium hydroxide-treated bagasse

Untreated and 0.5% NaOH-treated bagasse were incubated with the crude enzyme from *Asp. niger* AUR 3124 at 40°C, and the reducing sugar increased and cellulose degraded were determined. Other conditions are the same as Table 1.

Fig. 2. Enzymatic degradation of cellulose in the bagasse treated with various concentrations of sodium hydroxide

Bagasse was treated with various concentrations of NaOH solution at 120°C for 20 min, and the treated bagasse was incubated with the crude enzyme from *Asp. niger* AUR 3124 at 40°C for 24 hr. Other conditions are the same as Table 1.

5. 酵素による各種濃度次亜塩素酸ナトリウム処理バガスの分解

バガスに5% NaClO₂溶液を加え120°C, 20分間処理してほぼ完全に脱リグニンしたバガスセルロースがアルカリ処理バガスと同程度まで分解されることがわかったので (Table 2), 次にNaClO₂溶液による処理条件と分解性を調べた。各種濃度のNaClO₂溶液で処理したバガスの分解性について調べた結果がFig. 3である。分解率はバガス処理するNaClO₂溶液濃度の増加に伴ない上昇し, 5% NaClO₂溶液で処理したバガスでは約60%まで分解された。しかし, アルカリ処理バガスと同程度の分解率を得るためには比較的高濃度のNaClO₂溶液でバガス処理する必要がある。

6. 酵素活性に及ぼす反応pH及び温度の影響

Asp. niger AUR 3124 菌株から調製した酵素液を用い, 0.5%アルカリ処理バガスを基質として反応液のpH及び反応温度を変えて24時間酵素反応を行ない生成還元糖量を測定したのがFig. 4とFig. 5である。

図から明らかのように, 反応の至適pHは4~4.5付近にあり, pH 8以上のアルカリ域では分解性は低い。また, 至適反応温度は40°Cであり, 50°C以上の温度では急激に分解活性は低下した。

考 察

甘蔗バガスの構成成分は主にセルロース, ヘミセルロース及びリグニンから成り, その含量はそれぞ

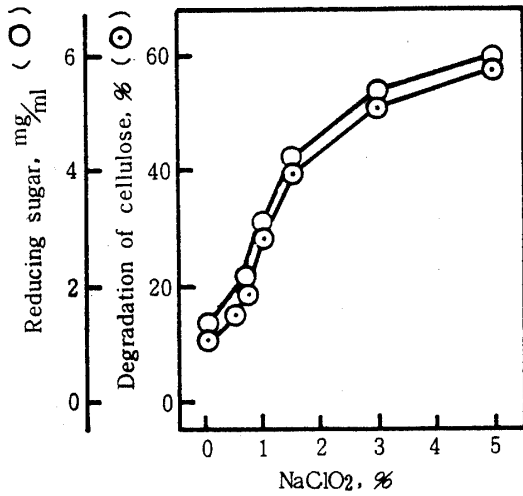


Fig. 3. Enzymatic degradation of cellulose in the bagasse treated with various concentrations of sodium chlorite

Bagasse was treated with various concentrations of NaClO_2 solution at 120°C for 20 min, and the treated bagasse was incubated with the crude enzyme from *Asp. niger* AUR 3124 at 40°C for 24 hr. Other conditions are the same as Table 1.

れ 45.5%, 22.0%及び 19.8%である。¹⁵⁾ バガス中のセルロース及びヘミセルロースはリグニンと強固な複合構造を形成しており, 酵素又は微生物による分解・糖化が極めて困難である。従って, バガスの分解性を高めるためにはバガス中のリグノセルロース構造を破壊する必要があり, 各種の物理的及び化学的前処理法が検討されている。^{2, 9, 10, 12)} バガス成分の酵素による分解糖化を行なうためには, 有効な前処理法の開発とともに, バガス成分に高い分解活性を有する菌株の検索が望まれている。本報では, カビにおけるバガスセルロースの分解活性を調べるとともに, バガスの前処理と酵素による分解性等について検討した。64株のカビについてバガスセルロース分解酵素の活性分布を調べた結果, *Asp. niger* AUR 3124 のバガスコウジ抽出液が比較的高い分解活性を示した。本菌から調製した粗酵素液は水酸化ナトリウム, 次亜塩素酸ナトリウム及びエチレンジアミンを加えて処理したバガス等をよく分解したが, 無処理バガスや熱水処理バガスはほとんど分解されなかった。アルカリ処理により脱リグニンしたバガスは酵素反応時間の経過に伴ない分解され, 還元糖量の増大がみられた。分解率はバガスを処理するアルカリ濃度に依存し, 0.5%以上のアルカリで処

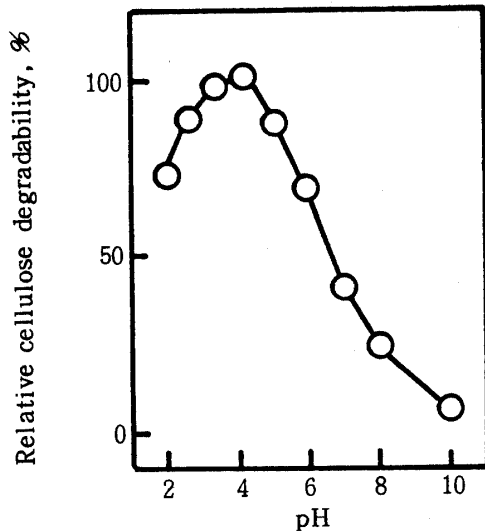


Fig. 4. Effect of pH on the enzymatic degradation of cellulose in sodium hydroxide-treated bagasse

Alkali (0.5% NaOH)-treated bagasse was incubated with the crude enzyme from *Asp. niger* AUR 3124 at the indicated pH for 5 hr. Other conditions are the same as Table 1.

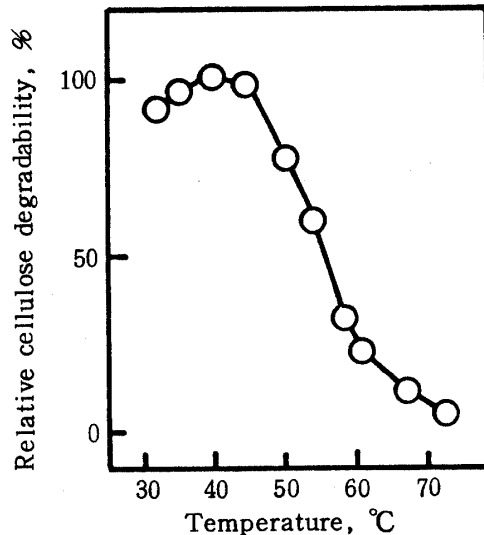


Fig. 5. Effect of temperature on the enzymatic degradation of cellulose in sodium hydroxide-treated bagasse

Alkali (0.5% NaOH)-treated bagasse was incubated with the crude enzyme from *Asp. niger* AUR 3124 at the indicated temperature for 5 hr. Other conditions are the same as Table 1.

理したバガスの分解率は約60%であった。次亜塩素酸ナトリウム処理バガスも高い分解率を示したが、アルカリ処理バガスと同程度の分解率にするためには比較的高濃度の次亜塩素酸ナトリウム溶液でバガス进行处理する必要がある。谷口らは、稲わらの酵素による可溶化においても水酸化ナトリウム、亜塩素酸塩等の化学的前処理が効果的であることを発表している。高温（240℃）高圧（24気圧）で処理する、いわゆる爆砕処理バガスの本酵素による分解性は低かったが、無処理バガスの約2倍の分解率を示した。一方、酢酸一過酸化水素により完全に脱リグニンしたバガスセルロースの分解は次亜塩素酸ナトリウムによって脱リグニンしたバガスの分解率より低かった。バガスセルロースの分解率は、脱リグニンの程度によって異なるとともに、脱リグニンしたのちのセルロースの特性によっても異なるものと考えられる。

村尾らは、^{8,11)} *Asp. aculeatus* F-50の生産する酵素がセルロースに対して高い分解能力を有し、各種セルラーゼ剤とともに使用することによりセルロース分解力が著しく高められることを報告している。*Asp. niger* AUR 3124 菌株が生産するセルラーゼの各種処理バガスに対する分解性は *Asp. aculeatus* F-50 のセルラーゼとほぼ同じ分解性を示すことが確かめられており、*Asp. niger* AUR 3124 セルラーゼのバガスセルロース分解に対する各種セルラーゼ剤との相乗効果についても検討中である。

要 約

64株のカビをフスマーバガス培地に培養して得られる麹抽出液を酵素液としてバガス分解活性を調べた結果、*Aspergillus niger* AUR 3124が比較的高い活性を有することがわかった。本菌株が生産する酵素によるバガスセルロースの分解性とバガスの前処理との関係を調べた。バガスセルロースの分解性は、水酸化ナトリウム、次亜塩素酸ナトリウム及びエチレンジアミン処理することにより著しく高められた。バガスセルロースの分解率は、バガス进行处理する水酸化ナトリウム及び次亜塩素酸ナトリウムの濃度に依存した。本酵素によるバガス分解性を高めるためバガスセルロースの分解性からみたバガスの前処理法は水酸化ナトリウムによる処理が適当であった。*Asp. niger* AUR 3124 菌株セルラーゼの反応の至適 pH 及び温度はそれぞれ 4.0~4.5, 40℃であった。

本研究の実施に協力された天野仁了君及び嘉数輝雄君に感謝します。*Asp. aculeatus* F-50を分与下さった大阪府立大学農学部村尾沢夫教授また、爆砕バガスを調製して下さった京都大学木材研究所の樋口隆昌教授に感謝します。

なお、本研究の費用の一部は昭和57年度文部省科学研究費補助金エネルギー特別研究（課題番号 570 40071）によったもので謝意を表します。

引用文献

1. Ben-Ghedalia, D., Miron, J. 1981 The effect of combined chemical and enzyme treatments on the saccharification and in vitro digestion rate of wheat straw, *Biotechnol. Bioeng.*, **23** : 823-831
2. Ben-Ghedalia, D., Miron, J. 1981 Effect of sodium hydroxide, ozone and sulphur dioxide on the composition and in vitro digestion of wheat straw, *J. Sci. Food Agric.* **32** : 224-228
3. Carbello, A., Conde, J., Otero, M. A. 1981 Prediction of the degradability of sugar cane cellulosic residues by indirect methods, *Biotechnol. Bioeng.*, **23** : 2737-2745

4. Detroy, R. W., Lindenfelser, L. A., Julian, G. st., Orton, JR. W. L. 1980 Saccharification of wheat-straw-cellulose by enzymatic hydrolysis following fermentative and chemical pretreatment, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **10**, 135-148
5. Fan, L. T., Ghapuray, M. M, Lee, yong-ityuu. 1981 Evaluation of pretreatments for enzymatic conversion of agricultural residues, *Biotechnol. Bioeng. Symp.*, **11** : 29-45
6. 樋口隆昌 1983 木材の酵素糖化に及ぼす爆砕処理の効果, 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" 昭和57年度研究成果報告 161-166
7. 三石安, 山辺倫, 高崎義幸 .1981 セルロース資源の酵素糖化に関する研究, 日本農芸化学会 昭和56年度大会要旨集 p. 443
8. 村尾沢夫 1983 セルロース, ヘミセルロース類(稲ワラ, 木材, みかん果皮類)の糖化分解とその利用, 文部省科学研究費エネルギー特別 "生物エネルギーの利用と開発" 昭和57年度研究成果報告 157-160
9. Nesse, N., Wallick, T., Harper, J. M. 1977 Pretreatment of cellulosic wastes to increase enzymatic reactivity, *Biotechnol. Bioeng.*, **19** : 323-336
10. Saddler, J. N., Brownell, H. H., Clemout, L. P., Levitiu, N. 1982 Enzymatic hydrolysis of cellulose and various pretreated wood fraction, *Biotechnol. Bioeng.*, **24** : 1389-1402
11. 阪本禮一郎, 林裕隆, 森山康司, 荒井基夫, 村尾沢夫 1982 *Aspergillus aculeatus*の粗酵素によるセルロース性物質の分解, *醸工* **60** : 333-341
12. Tanaka, T., Yamanaka, S., Takinami, K. 1978 Saccharification of cellulose by acetylsis *J. Ferment. Technol.* **56** : 410-415
13. 外山信男, 小川喜八郎, 外山英男 1981 セルロース資源の酵素糖化とアルコール発酵, *発酵と工業* **39** : 812-826
14. 当山清善, 宮里興信, 金城均 1972 甘蔗バガスの利用に関する研究, *琉大農学報* No. 19, 279-290
15. Toyama, S., Yoraha, K., Ishihara, M. 1981 Degradation of bagasse cellulose by *Acremonium sp.* *琉大農学報* No. 26, 89-100
16. 当山清善 1983 バガスのアルカリ処理で抽出される成分と微生物による資化分解, 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" 昭和57年度研究成果報告 167-170
17. Updegraff, D. M. 1969 Semimicro determination of cellulose in biological materials, *Anal. Biochem.* **32** : 420-424