Technical Paper

Special articles : Biomass

特集：バイオマス

Ethanol Production from Bamboo Pulp under Simultaneous Saccharification and Fermentation Using a Cocktail Enzyme of *T. reesei* and Sporeless Strain of *A. tubingensis*

Tomoko SHIMOKAWA^{*1}, Tsutomu IKEDA^{*1}, Kengo MAGARA^{*1}, Sanae SHINAGAWA^{*2},
Hideo SHINAGAWA^{*2}, Masanobu NOJIRI^{*1}, and Seiji OHARA^{*1}

(Received February 28, 2013)

T. reesei 及び低孢子性 *A. tubingensis* のカクテル酵素を用いたタケパルプからの同時糖化発酵による エタノール生産

下川知子^{*1}, 池田 努^{*1}, 眞柄謙吾^{*1}, 品川早苗^{*2}, 品川日出夫^{*2}, 野尻昌信^{*1}, 大原誠資^{*1}

Bamboo is an attractive biomass resource which grows rapidly, reaching their maximum size within a few months. Bamboo pulp, prepared by soda-anthraquinone cooking, was fermented to ethanol with a cocktail enzyme of *Aspergillus tubingensis* KRCF700-33Y and *Trichoderma reesei* ATCC66587, and thermotolerant yeast (*Saccharomyces cerevisiae* BA-11) under simultaneous saccharification and fermentation (SSF) at 40°C. The strain *A. tubingensis* KRCF700-33Y, having sporeless, high β -glucosidase productive capacity was generated by UV irradiation. The highest activity of 5 FPU/ml was obtained with a cocktail enzyme having a 10% content of *A. tubingensis*, and the cocktail effect was also shown under the SSF process. An ethanol concentration of 47.1 g/L was achieved using a cocktail enzyme (15% content of *A. tubingensis*) with a substrate loading level of 15% under small scale SSF, which resulted in an ethanol yield of 76.8% after 96 h. An ethanol concentration of bamboo pulp reached 44.0 g/L under SSF process using a reactor (1-L kneader) with a cocktail enzyme (10% content of *A. tubingensis*, 4 FPU/g-DM), which resulted in an ethanol yield of 71.8% after 144 h. The results indicated the feasibility of bioethanol production from bamboo pulp under SSF using on-site produced enzyme by solid-state fermentation.

ソーダ-アントラキノン蒸解処理によって調製したモウソウチク（孟宗竹）のタケパルプから、*Aspergillus tubingensis* KRCF700-33Y と *Trichoderma reesei* ATCC66587 のカクテル化酵素及び耐熱性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BA-11を用いた40°Cでの同時糖化発酵によってエタノールを生産させた。高い β -グルコシダーゼ活性を有し、孢子生産性の低い *A. tubingensis* KRCF700-33Y 株はUV変異により作出した。*A. tubingensis*を10%含むカクテル化酵素において最も高いろ紙分解活性（5 FPU/ml）が得られ、同時糖化発酵においてもカクテル化による反応の効率化が認められた。小容量の同時糖化発酵実験では、基質濃度15%のタケパルプから96時間の反応で47.1 g/Lのエタノール濃度を達成し、このときのエタノール変換効率76.8%であった。また、1 L容のニーダーをリアクターとして用いた同時糖化発酵では、*A. tubingensis*を10%含む酵素液（4 FPU/g-DM）を用いて144時間の反応によりエタノール濃度44.0 g/L、変換効率71.8%を達成した。これらの結果は、固体培養によってオンサイト生産された酵素を用いたタケパルプからのバイオエタノール生産の可能性を示したものである。

Key Words

Bamboo, Bioethanol, Simultaneous saccharification and fermentation, *Aspergillus tubingensis*

* 1 Forestry and Forest Products Research Institute
1, Matsunosato, Tsukuba-shi, Ibaraki 305-8687, Japan
* 2 BioAcademia, Inc.
7-7-18, Saito-asagi, Ibaraki-shi, Osaka 567-0085, Japan

* 1 (独)森林総合研究所
〒305-8687 茨城県つくば市松の里1
* 2 バイオアカデミア(株)
〒567-0085 大阪府茨木市彩都あさぎ7-7-18

1. 緒 言

竹はアジアを中心に広く分布している早生植物資源であり、タケノコを食用とする他、建築材や細工の素材に用いられる等、なじみの深い植物である。日本の竹林の広範を占めるモウソウチク (*Phyllostachys pubescens*) は、竹類の中でも大型であり、急激に生長することで知られている¹⁾。しかし、その生育の旺盛さから過剰に繁茂して周辺地域に拡大し、悪影響を及ぼす例が報告されており²⁾、放置・拡大竹林を減少させるには竹材の利用方法を開発する必要がある。生長が早く、食料資源とも競合しない竹は、バイオエタノールの生産原料として大きな可能性を秘めている。

竹を効率的に糖化してバイオエタノールを得ることを目的とした様々な取り組みが進められており、酸糖化³⁾に加え、酵素糖化を利用した取り組みも数多く検討されている。リグノセルロース資源である竹を原料に、酵素糖化と酵母を利用したエタノール変換によるバイオエタノール生産プロセスを検討する場合、高い酵素糖化率及びエタノール変換効率を得るために粉碎処理⁴⁾、蒸解処理⁵⁾などの各種前処理が検討されている。

ソーダ-アントラキノン蒸解による前処理は大量処理に適するといった利点があり、我々はソーダ-アントラキノン蒸解により調製したスギパルプに固体培養で調製した *Trichoderma reesei* と *Aspergillus tubingensis* の糖化酵素を添加し、耐熱性酵母を用いた同時糖化発酵によって、変換効率 76% で 44.8 g/L のエタノールを生産可能であることを報告した⁶⁾。優秀なセルロース分解菌である *T. reesei* の生産する酵素系に不足する β -glucosidase を主とした糖質分解酵素を *A. tubingensis* によって補うことで、効果的な反応が行われた。酵素のオンサイト生産を考えた場合、固体培養方法は菌の持つ潜在的能力を発揮するのに適した培養方法であるのみならず、農産廃棄物などの安価な培地資材を使用可能⁷⁾であることから酵素生産コストの削減が可能であり、バイオエタノール生産プロセスの経済性に寄与すると考えられるが、固体培養時に *A. tubingensis* は多量の胞子を生産した。カビの胞子は多量に吸い込むことでカビ過敏症やアレルギー反応を起こす例があるため、 β -glucosidase 活性が高く、胞子生産量の少ない菌株の育成が必要となった。そこで、UV変異処理によって固体培養時にほとんど胞子を生産しない *A. tubingensis* KRCF700-33Y 株を育成し、固体培養によって別途オンサイト生産した *T. reesei* ATCC66587 由来の破碎酵素液とのカクテル化酵素を使用して、ソーダ-アントラキノン蒸解法により調製したタケパルプからバイオエタノールを生産すること、特にエタノール生産プロセスにおいて蒸留に要するエネルギーとの関係から重要と考えられている 4 wt%, 40 g/L 以上⁸⁾ のエタノールを生産することを目的として、タケパルプからのバイオエタノール生産の可能性について検証した。

2. 実 験

2.1 タケパルプの調製

モウソウチク (*P. pubescens*) を節を除かない状態で玉切り

にした後、繊維方向に細かく割り、4センチ角程度の大きさのタケチップを作成した。アルカリ蒸解は、タケチップ200gに水酸化ナトリウム 52 g, アントラキノン系蒸解助剤 (川崎化成 SAQ) 0.2 g を含む水溶液 600 ml を加え、2 L 容ステンレス製オートクレーブで90分間かけて室温から155℃にまで加温した後、155℃で1時間保持した。蒸解終了後、固形部分(タケパルプ)と液部分(黒液)を分離し、ディスインテグレーターで解繊し、フラットスクリーンでタケパルプを十分に水洗した。得られたタケパルプは、パルプ濃度 39.6% (含水率 60.4%) まで脱水して保存した。灰分は600℃で加熱処理することによって測定し、リグニンは、TAPPI T249 cm-85に示される加水分解方法、すなわち、0.35 gの試料に72%硫酸 3 ml を加えて1時間処理後、84 mlの水を添加してオートクレーブによって120℃で1時間加水分解した残渣を酸不溶性リグニンとして定量した。酸可溶性リグニンについては考慮しなかった。タケパルプの糖組成は、硫酸加水分解後の糖液をCarboPac PA1 (DIONEX) を用いたイオン交換クロマトグラフィーによって分析した⁶⁾。

2.2 *A. tubingensis* 株の変異処理及びスクリーニング

A. tubingensis KRCF700株をPotato Dextrose Agar (PDA) プレート上で28℃、2週間培養し、胞子懸濁液を調製した。この胞子懸濁液を紫外線光源の下に静置し、一定時間経過ごとに懸濁液の一部を取り出して適宜希釈し、PDA寒天培地上に生育してきたコロニーを釣菌してAZCL-HE-celluloseを含む寒天培地⁹⁾に塗布し、セルラーゼを生産しており、かつ胞子生産量の低い菌を選択した。選択された菌を、固体培地に植菌して培養した後、バッファーを加えて破碎することで粗酵素液を調製し、粗酵素液に含まれる β -glucosidase活性を測定した。

2.3 酵素活性及びタンパク量の測定

β -glucosidase 活性の測定には、*p*-nitrophenyl- β -D-glucopyranoside を基質として用い、生成した*p*-nitrophenol 量を比色定量した。1分間に1 μ mol の*p*-nitrophenol を遊離させる酵素量を1 unit と定義した。

セルラーゼ活性は、固体培養で得られた酵素液の上清を用い、IUPACの方法¹⁰⁾に基づいてFPU活性の測定を行った。タンパク質の定量は、bovine gamma globulin をスタンダードとしたBradford法により行った。

2.4 固体培養による酵素破碎液の調製

T. reesei ATCC66587 及び *A. tubingensis* KRCF700-33Y から酵素液を調製するため、5%スギパルプ、33%コーンコブ、62%小麦ふすまに培地乾燥重量の2.5%にあたる量の硫酸を添加した固体培地(含水率70%)を別個に調製し、PDAプレート上で生育させた菌の破碎液を植菌して5.7日間28℃で静置培養を行った⁶⁾。培養後、乾燥重量3gの培地1本当たり15mlのクエン酸ナトリウムバッファー(2 mM, pH 4.8)を加えて破碎した破碎液をそのまま同時糖化発酵に使用した。乾燥重

量 3 g の培地から、それぞれ約 22 g の破碎酵素液が得られた。

2.5 同時糖化発酵によるエタノール生産

酵母は、耐熱性酵母 *Saccharomyces cerevisiae* BA-11 (BioAcademia) を使用した。酵母は -80℃ でグリセロール溶液中に保存しており、使用毎に種培養、本培養を行って必要量の酵母を調製した。同時糖化発酵を行う反応液に順化させるため、予備実験で調製された同時糖化発酵の反応液を滅菌し、酵母を培養する YM 培養液 100 ml に 0.3 g の滅菌した同時糖化発酵液を添加した培養液を用いて、35℃ での培養を行った。遠心処理によって菌体を回収し、同時糖化発酵に用いた。

同時糖化発酵によるエタノール生産試験は、19 ml 容のスクリュウ瓶で行い、タケパルプ、オンサイト生産した破碎酵素液、酵母、バッファー（終濃度 25 mM クエン酸ナトリウム、pH 4.8）を混合した後、チューブ付きのシリコン栓を取り付け、空気の流入を防ぐトラップを設けてスターラーによる攪拌下、40℃ での反応を行った。反応前の混合物は全体で 4 g とし、酵母は湿重量で 3 % (w/w) となるように添加した。反応液は、遠心処理によって不溶物を取り除いてからバイオセンサ BF-5D (王子計測) によって溶液中のエタノール濃度を求めた。小容量での同時糖化発酵では、96 時間の反応を行った。

2.6 ニーダーによるエタノール生産

ニーダー (1 L ニーダー PN-1, 等速 Σ 型捏和翼, 入江商会) による同時糖化発酵実験では、全容量 1 L の反応槽に反応物を入れ、混合することにより反応を開始させた。同時糖化発酵は 40℃ で行い、基質濃度は 15%, 酵素は全体の 10% が *A. tubingensis* 酵素よりなるカクテル化酵素を使用した。反応物の内訳は、タケパルプ 151.52 g (乾燥重量 60 g), カクテル化した破碎酵素 48 g, 遠心処理により回収した酵母 12 g, 0.2 M のクエン酸ナトリウムバッファー (pH 4.8) 50 ml を混合し、イオン交換水によって全体の重さを 400 g とした。ニーダーの平均回転数は約 26 回転 / 分とした。

3. 結果と考察

ソーダ-アントラキノン蒸解処理によって調製したタケパルプの灰分は 0.83% であった。モウソウチクに含まれる灰分量は、その成熟度合いによって変化があるものの、成竹では 2-3 % 程度^{11) 12)} と報告されているため、残りは黒液中に溶出したものと考えられた。タケパルプに含まれる酸不溶性リグニン量は、灰分補正を行わない状態で 2.16% であり、これ以外の 97.84% をタケパルプに含まれる多糖の割合とした。酸加水分解後のタケパルプの糖組成が、アラビノース:ガラクトース:グルコース:キシロース = 1.3:0.1:69.3:29.3 (mol%) であったことから、*Saccharomyces* 酵母で発酵可能な六炭糖 (本実験においてはグルコース及びガラクトース) を生じる多糖の割合は、無水糖換算後に積算すると、多糖中の 73.6% であり、タケパルプ全体の 72.0% (w/w) となった。糖化時の加水により元のタケパルプ (乾燥) 100 g からは 80.0 g の六炭糖が得られるので、糖化及び発酵での変換効率を 100% とした理

論エタノール濃度は、基質濃度 15.0% (w/v) で 61.3 g/L と計算された。

UV 変異処理によって、固体培養時に孢子生産がほぼ認められず、 β -glucosidase 活性の高い *A. tubingensis* KRCF700-33Y 株 (FERM P-22229) が得られた。KRCF700-33Y 株から調製された酵素液の β -glucosidase 活性は、15.5 U/ml であった。*A. niger* NBRC31125 株は固体培養において高い β -glucosidase 活性を示した菌株であり⁹⁾、比較のために同条件での酵素生産を行った。*A. niger* NBRC31125 株の β -glucosidase 活性は 10.7 U/ml であり、*A. tubingensis* KRCF700-33Y 株の方が高い生産性を示した。NBRC31125 株及び変異前の *A. tubingensis* KRCF700 株は、ともに固体培養で、培地表面に多くの孢子を生産した。*A. niger* NBRC31125 株及び *A. tubingensis* KRCF700 株はどちらも PDA 平板培地上でも孢子を生産したが、*A. tubingensis* KRCF700-33Y 株は PDA 平板培地上で 2 週間培養しても孢子を生産しなかった。

固体培養により調製した *T. reesei* ATCC66587 の酵素液 (トリコデルマ酵素) と *A. tubingensis* KRCF700-33Y の酵素液 (アスペルギルス酵素) は、アスペルギルス酵素を 10% とした状態において最もろ紙分解活性: FPU が高く (5.0 FPU/ml), タンパク量は 7.9 mg/ml であった。アスペルギルス酵素が 10% 含まれるカクテル化酵素を用い、同時糖化発酵に用いる混合酵素の供試量を変化させてエタノール生産に及ぼす影響を検討した (Fig. 1)。乾燥パルプ 1 g 当たり (/g-DM) の添加酵素量を増加させるほど生成するエタノールの濃度は増加したが、パルプ 1 g あたりの添加量を 0.8 g (タンパク量 6.3 mg) 以上に増加させてもエタノール濃度の増加に対する顕著な効果は認められなかったため、以後の実験では酵素の添加量を 0.8 g/g-DM とした。

同時糖化発酵に供する破碎酵素量を 0.8 g/g-DM とし、そこに含まれるアスペルギルス酵素の添加割合を変化させた結果を Fig. 2 に示す。基質濃度 15% のタケパルプは、反応前の混合物に流動性がなく、ほぼ固体状であった。そのため、同時糖化発酵の反応初期には攪拌子でほとんど攪拌することはできなかった。反応が進むにつれて液化することにより、攪拌

Fig. 1 Effects of enzyme dosage on ethanol productivity under SSF with 15% bamboo pulp. The amounts of protein and FPU in 0.6-1.0 g of the cocktail enzyme having a 10% content of *A. tubingensis* enzyme were 4.7-7.9 mg, and 3-5 FPU, respectively. Mean values $\pm$ SD (n = 3) are given

Fig. 2 Cocktail effect of *A. tubingensis* and *T. reesei* enzymes on ethanol production under SSF with 15% bamboo pulp. The dosage of whole crushed enzyme was 0.8 g/g-DM. Mean values $\pm$ SD ($n = 3$) are given

が可能となったが、アスペルギルス酵素を添加しなかった場合では 96 時間の反応後もパルプの均一な液化は確認できなかった。アスペルギルス酵素の添加割合が 15% でエタノール濃度は最も高い 47.1 g/L となり、変換効率は 76.8% に達したことから、同時糖化反応に酵素のカクテル化が有効であることが示された。スギパルプのカクテル化酵素を用いた同時糖化発酵⁶⁾では、アスペルギルス酵素の添加によって反応液中に残存するセロビオースの量が減少し、反応効率の向上につながったことが明らかにされており、タケパルプでも同様の効果が働いたと考えられる。

タケからエタノールを生産した報告例としては、De Menezes ら¹³⁾ が高温処理した *Bambusa vulgaris* より得られた酵素糖化液を用いてエタノール濃度 12.6 g/L を報告し、Sun ら³⁾ はタケの酸糖化液から 27.2 g/L のエタノールを、どちらも *S. cerevisiae* を用いて生産させている。また、Sai Ram ら¹⁴⁾ は *Clostridium thermocellum* を利用してタケパルプから 8.6 g/L のエタノール濃度を報告している。タケから同時糖化発酵によってエタノールを生産した報告例としては、Wang ら⁵⁾ がタケパルプ (*Dendrocalamus latiflorus*) より 15 g/L 程のエタノール濃度を報告しているほか、柳澤ら¹⁵⁾ は微細化したタケ粉末にアルカリ処理を併用し、7.1 g/L を報告している。未成熟なモウソウチクを用いた報告¹⁶⁾ でも、同時糖化発酵を行った基質濃度の低さ (5%) から高エタノール濃度は達成されておらず、タケからのエタノール生産で 40 g/L を超える報告例はほぼ見当たらない。今回、基質濃度 15% のタケパルプを用いることで 47.1 g/L のエタノール濃度を達成したが、反応効率には改善の

Fig. 3 Ethanol production during SSF of 15% bamboo pulp by 1-L kneader. The cocktail enzyme having a 10% content of *A. tubingensis* was adjusted to 0.8 g/g-DM for the SSF process

余地があると思われる。

ニーダーを用いた同時糖化発酵試験では、乾燥パルプ 1 g あたりの混合酵素液量を 0.8 g (4.0 FPU/g-DM) とし、経時的にエタノール濃度を測定した (Fig. 3)。オンサイト生産された酵素を長期間保存することなくすぐに使用して実験を行うことを優先したため、ニーダーによる反応ではアスペルギルス酵素を 10% 含むカクテル化酵素を使用した。これは、ろ紙分解活性が混合割合 10% で最も高かったためだが、同時糖化発酵で最も効果的な混合割合は Fig. 2 に示されるように 15% であった。タケパルプは嵩張るため、400 g の反応混合物は、反応開始時点 (0 h) ではニーダーの使用容積である 0.7 L に達するほどであったが、3 時間の反応後には液状化が進むことによってスラリー化し、24 時間反応後には完全に液状化して容積も減少した (Fig. 4)。スクリー瓶を用いて攪拌子での攪拌を試みた小容量の反応系では、アスペルギルス酵素の添加割合が 25% の最も高い反応系であっても 3 時間の反応で明確な基質の形状変化は確認できず、液化して攪拌が可能になるためには 24 時間程度の反応時間を要していたことから、ニーダーによる均一な混合は短時間での液化に効果的であった。96 時間及び 144 時間ニーダーで反応させたエタノール濃度は、それぞれ 39.5 g/L、44.0 g/L であり、変換効率はそれぞれ 64.4%、71.8% に達し、目標とした 40 g/L 以上のエタノール濃度は、ニーダーでの反応 96 時間から 120 時間の間で達成された。

バイオマスからエタノールを生産するにあたり、高基質濃

Fig. 4 View of reactor (kneader) during SSF of 15% bamboo pulp at $t = 0, 3$ and 24 h. The cocktail enzyme having a 10% content of *A. tubingensis* was adjusted to 0.8 g/g-DM (4.0 FPU/g-DM) for the SSF process

度で反応を行うことで生産物の濃度を高めることは、後段の蒸留システムで要するエネルギーを減少させるだけでなく、タンクの大きさなどシステム全体の設備投資にも関係し、経済性を考える上で重要な要素とされている¹⁷⁾。Jørgensenら¹⁸⁾は、今回用いたニーダーと同様に、水平方向に設置したドラムの内部で、反応物の自由落下を利用して全体的な攪拌を行うリアクターを提案し、基質濃度35%の麦わらから同時糖化発酵によって48 g/kgのエタノール濃度を達成し、低速度の攪拌であっても酵素と基質が接触する機会を確保し、生成物の局所的滞留を妨げる効果が得られることを示している。短時間で液化が進行することは、攪拌動力の低減につながり、エタノール生産システムの経済性に寄与するため、効果的な攪拌についてさらに検討する必要がある。今回、小容量で行った10%アスペルギルス酵素を用いた96時間の同時糖化発酵試験では、45.4 g/Lのエタノールが生産されており、ニーダーでの結果(96時間で39.5 g/L)よりも高い値を示した。ニーダーを用いた試験では、反応48時間経過後、24時間ごとに蓋を開けてサンプリングを行うなど最適な同時糖化発酵を行ったとは言い難く、条件を最適化することでタケパルプのニーダーを用いたエタノール生産の変換効率は、さらに上昇させることが可能と考えられる。

4. 結 論

ソーダ-アントラキノン蒸解によってモウソウチクから生産したタケパルプを用いて、同時糖化発酵によってエタノール濃度40 g/L以上を達成するために、基質濃度15%での反応を検討した。糖化酵素は固体培養によって調製したが、*T. reesei* ATCC66587のセルラーゼとカクテル化するために、低孢子性で β -glucosidase活性の高い*A. tubingensis* KRCF700-33YをUV変異により作出した。カクテル化酵素のセルラーゼ活性は、アスペルギルス酵素を10%混合させたものが最も高いろ紙分解活性を示したが、タケパルプの同時糖化発酵では、15%の混合割合で最も高いエタノール変換効率を示した。オンサイト生産したカクテル化酵素及び耐熱性酵母*S. cerevisiae* BA-11を利用した40℃での同時糖化発酵により、タケパルプから96時間で47.1 g/Lのエタノールを変換効率76.8%で生産した。ニーダーを利用した反応では、96時間の反応で39.5 g/Lのエタノールが変換効率64.4%で生産され、144時間の反応により、濃度44.0 g/Lのエタノールが変換効率71.8%で生産された。タケパルプの短時間での液化にニーダーは効果的であったが、同時糖化発酵において短時間で高いエタノール変換効率を得るためには、反応の諸条件を最適化する必要性が認められた。

謝 辞

本研究は農林水産省委託プロジェクト「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」の一環として実施したものであり、関係各位に謝意を表します。

文 献 : References

- 1) Xu, Y.; Wong, M.; Yang, J.; Ye, Z.; Jiang, P.; Zheng, S.: *Bot. Rev.*, **77**, 287 (2011)
- 2) Torii, A.; Isagi, Y.: *Jpn. J. Ecol.*, **47**, 31 (1997) : 鳥居厚志, 井鷲裕司, 日本生態学会誌, **47**, 31 (1997)
- 3) Sun, Z. Y.; Tang, Y. Q.; Iwanaga, T.; Sho, T.; Kida, K.: *Biores. Tech.*, **102**, 10929 (2011)
- 4) Shiraishi, K.; Itoh, K.; Tachibana, S.: Abstracts of the 62nd Annual Meeting of the Japan Wood Research Society, 187 (2012) : 白石恭太, 伊藤和貴, 橋燦郎, 第62回日本木材学会大会研究発表要旨集, 187 (2012)
- 5) Wang, Y. N.; Ko, C. H.; Lee, C. Y.; Tsai, H. P.; Chen, W. H.; Hwang, W. S.; Tsai, M. J.; Chang, F. C.: World Renewable Energy Congress, Sweden, 8-13 May, 2011, Linköping, Sweden <http://dx.doi.org/10.3384/ecp11057171>, (Accessed February 25, 2013)
- 6) Shimokawa, T.; Shibuya, H.; Ikeda, T.; Magara, K.; Shinagawa, S.; Shinagawa, H.; Nojiri, M.; Ohara, S.: *J Wood Sci.*, **59**, 171 (2013)
- 7) Krishna, C.: *Crit. Rev. Biotech.*, **25**, 1 (2005)
- 8) Öhgren, K.; Rudolf, A.; Galbe, M.; Zacchi, G.: *Biomass Bioenergy*, **30**, 863 (2006)
- 9) Shimokawa, T.; Shibuya, H.; Ishihara, M.; Yamaguchi, M.; Ota, Y.; Miyazaki, K.; Ikeda, T.; Magara, K.; Nojiri, M.: *Bull Forestry Forest Prod Res Inst.*, **11**, 57 (2012)
- 10) Ghose, T. K.: *Pure Appl Chem*, **59**, 257 (1987)
- 11) Shibamoto, T.; Shoji, S.; Kubota, S.: *Bull. Tokyo Univ. For.*, **48**, 203 (1955) : 芝本武夫, 庄司竜史, 久保田澄子, 東京大学農学部演習林報告, **48**, 203 (1955)
- 12) Fujii, Y.; Azuma, J.; Marchessault, R. M.; Morin, F. G.; Aibara, S.: *Holzforschung*, **47**, 109 (1993)
- 13) De Menezes, T. J. B.; Dos Santos, C. L. M.; Azzini, A.: *Biotechnol Bioeng.*, **25**, 1071 (1983)
- 14) Sai Ram, M.; Seenayya, G.: *World J Microbiol Biotech.*, **7**, 372 (1991)
- 15) Yanagisawa, M.; Nakasaki, K.: Abstracts of the 61st Annual Meeting of the Society for Biotechnology, Japan, 169 (2009) : 柳澤満則, 中崎清彦, 第61回日本生物工学会大会講演要旨集, 169 (2009)
- 16) Shimokawa, T.; Ishida, M.; Yoshida, S.; Nojiri, M.: *Biores Tech.*, **100**, 6651 (2009)
- 17) Wingren, A.; Galbe, M.; Zacchi, G.: *Biotechnol Prog.*, **19**, 1109 (2003)
- 18) Jørgensen, H.; Vibe-Pedersen, J.; Larsen, J.; Felby, C.: *Biotechnol Bioeng.*, **96**, 862 (2007)