凍結粉碎したもみがらセルロースの結晶性と酵素分解性

佐々木 堯*・佐藤陽子*・中川貞人*・白石真人**・貝沼圭二*

Crystallinity and Enzymatic Hydrolysis of Cryomilled Rice Hull Cellulose

TAKASHI SASAKI*, YOKO SATO*, SADATO NAKAGAWA*, MASATO SHIRAIISHI**
and KEIJI KAINUMA*

Rice hulls have good potential as a new carbohydrate resource. However, the polysaccharides contained in rice hull are desired to be hydrolyzed to sugars and appropriate pretreatments are essential in order to enhance their susceptibility to the enzyme, because cellulose, xylan, lignin and silicate are firmly bound in the rice hull as structural supports. The effects of cryomilling of rice hull was the reduction of its bulk so that the volume was reduced to about one fourth of its original volume and no crystalline form of the treated cellulose was observed from X-ray diffractogram. The cryomilling of rice hull cellulose increased enzymatic hydrolysis rates and yields of glucose over 10 times but not completely. This means that it is not able to disrupt completely the physical structure of the components such as lignin, which causes steric hindrance of enzyme action to cellulose, surrounding the cellulose fiber by physical treatment. However, the cryomilled cellulose extracted by cellulose solvent or treated with lignin solvent was almost completely saccharified by only Cx-glucanase of *Asperigillus niger* without using C₁-enzyme of *Trichoderma viride*. On the other hand, hemicellulose and silicate did not disturb enzyme reaction to cellulose.

(Received, Mar. 27, 1979)

セルロースの酵素分解性は、作用する酵素側からみれば基質となるセルロースの結晶性の度合ならびにセルロースと共に植物組織を構成するリグニン、ヘミセルロース等によって影響を受ける。また逆に作用を受けるセルロース側からみると、セルロース複合系に含まれる作用の異なる3種類の酵素、C₁-酵素、Cx-グルカナゼおよびβ-グルコシダーゼの割合によってセルロースの分解率が左右される。特に、結晶セルロースに最初に作用するC₁-酵素の活性の強さが、セルロースからグルコースへの加水分解反応の制限因子となっている。

著者らは、これまでセルロースのみからなる単一系のセルロース試料のX線図形分析をもとに、セルロースの結晶性と微生物セルラーゼによる分解性との間に相関関係があることを報告してきた¹⁾。その中でセルロースの

結晶構造を破壊し非晶質型に転換したセルロースは、C₁-酵素の作用を必要とせずCx-グルカナゼおよびβ-グルコシダーゼの2段階反応ですみやかに90%以上グルコースにまで分解されることを明らかにした。

本研究では、さらに複雑な多成分系のセルロース試料、つまりリグニン、ヘミセルロースなどの夾雑物を含むセルロース試料の結晶性と酵素分解性について検討したものである。試料としては、リグニン、ヘミセルロース、ケイ酸を多量に含み、形状的にも難分解性と考えられるもみがらを選んだ。

もみがらは、地球上の1/3の人間が主食としている米生産の最終副産物で、莫大な量が毎年再生産されてくる未利用炭水化物資源の1つである。日本においても、もみがらは農産副生物の中でも量的に最も多く、年間約

* 農林水産省食品総合研究所 (〒305 茨城県筑波郡谷田部町観音台 2-1-2)

National Food Research Institute, Ministry of Agriculture, Forestry and Fisheries,
Kannondai 2-1-2, Yatabe-machi, Tsukuba-gun, Ibaraki

** 日本冷蔵研究所 (〒189 東京都東村山市久米川町1丁目 1768)

250 万トン副生されてくる。このもみがらの中には、米生産量のさらに約 14% に相当する 170 万トンのセルロースとヘミセルロースが含まれており、興味あるそして有望な未利用炭水化物資源と考えられる。

しかしながら、もみがらセルロースの酵素糖化に関する研究は非常に少なく、高桑ら²⁾および JANUS³⁾ がもみがらから微生物タンパクの生産を試みているにすぎない。

本報においては、もみがらのような多成分系のセルロース試料の“かさ”のある強固な植物組織の簡単な粉砕法、試料中のセルロースの結晶性の分析と効果的な酵素分解法ならびに夾雑物の酵素分解反応におよぼす影響について検討し、多成分系セルロース試料の1つであるもみがらセルロースを 80% 以上グルコースに転換する方法を明らかにした。

実験材料および実験方法

1. 実験材料

(1) もみがら

広島県食品工業試験場から入手したもみがらを使用した。

(2) 結晶性セルロース粉末

綿セルロース粉末（東洋科学産業株式会社製，タイプ D）を標準結晶セルロースとして使用した。

(3) セルラーゼ

Trichoderma viride セルラーゼは Meicelase（明治製菓株式会社製），および *Aspergillus niger* セルラーゼは C-APC（天野製菓株式会社製）を使用した。

2. 実験方法

(1) セルロース試料の X 線回折

粉末にしたセルロース試料を試料ホルダーに挿入し、X 線分析装置（理科電気株式会社）により $2\theta=15^\circ\sim30^\circ$ で測定した¹⁾。

(2) 凍結粉砕によるもみがら粉末の調製

もみがら 1kg を凍結粉砕機（リンレックス O 型機，細川鉄鋼製）を用いて， -100°C の雰囲気温度で凍結粉砕し 250 メッシュの粉末を調製した。

(3) 酸溶解法によるもみがらセルロースの調製¹⁾

凍結粉砕したもみがら粉末 2g に低温下で 60% 硫酸 20ml を加え、乳鉢中で攪拌しながら 40 分間セルロースを抽出した。セルロースを含む酸溶液を分別し、冷アセトン 250ml を加えセルロースを再沈殿させた。回収したセルロースは、20ml の冷水に懸濁し、1N 水酸化ナトリウムで pH 5.0 に調整後、再び冷アセトン 250ml

を加えて沈殿させ、ガラスフィルター上でエタノール、エーテルで洗滌、乾燥した。

(4) 脱リグニン試料の調製⁴⁾

凍結粉砕したもみがら粉末 1g に水酸化ナトリウム溶液 20ml を加えてオートクレーブで 120°C ($1.1\text{kg}/\text{cm}^2$) 2 時間処理した後、1N 塩酸で中和した。これをフィルター上で吸引濾過して脱リグニン試料とした。しかし吸引濾過が困難な場合は、遠心分離操作により洗浄し、試料を調製した。

(5) 脱キシラン試料の調製⁵⁾

凍結粉砕したもみがら粉末 1g に 0.1N 塩酸溶液を 20ml 加え、オートクレーブで 120°C 2 時間処理した。この試料を 1N 水酸化ナトリウムで中和した後、ガラスフィルター上で吸引濾過し水で十分に洗浄して脱キシラン試料とした。

(6) 脱ケイ酸試料の調製

試料からのケイ酸の除去は、VAN SOEST ら⁶⁾の方法に従った。凍結粉末したもみがら粉末 2g に、ラウリル硫酸ナトリウム (SDS) 0.6g, EDTA 20mmoles および水 30ml を加えて、1 時間煮沸した後吸引濾過した。残渣を水で十分に洗浄後、脱ケイ酸試料とした。

(7) セルロース試料の全糖の定量法

i) グルコース・オキシダーゼ法

セルロース試料 0.35g に 15°C に冷した 72% 硫酸溶液 5ml を加えて、ときどき攪拌しながら 45 分間放置した。このセルロース溶解液を 40ml の水で希釈し、15 ポンド ($1.06\text{kg}/\text{cm}^2$) 1 時間加水分解した⁷⁾。生成したグルコースは、グルコース・オキシダーゼ-パーオキシダーゼ法⁸⁾により定量した。

ii) フェノール-硫酸法⁹⁾

セルロース試料 100mg に 60% 硫酸溶液 10ml を加え、よく攪拌して 30~60 分放置後フェノール硫酸法で全糖を定量した。

(8) セルロース試料の酵素分解条件

セルロース試料 0.5g, *T. viride* セルラーゼまたは *A. niger* セルラーゼ 100mg および 0.2M 酢酸緩衝液 (pH 5.0) 10ml を 50ml の三角フラスコに入れ、振盪しながら 40°C でインキュベーションした。生成したグルコースは、グルコースオキシダーゼ法によって定量した。

(9) 糖の定性分析

酵素分解試料を東洋濾紙 No. 50 ($20\times20\text{cm}$) にスポットし、酢酸エチル：ピリジン：水 ($120:50:40$) の溶媒を用いて上昇法で展開した。還元糖は、アセトン-硝

酸銀法により検出した。

実験結果

1. もみからの凍結粉碎による構造体破壊とそのX線図型ならびに酵素分解性

もみからは、多成分系セルロース試料で機能上子実を保護するための強固な構造体を有し、形態的にも子実の皮外であるため、いわゆる“かさ”高いことを特徴としている。これらの特性は、もみからセルロースの酵素分解を行う場合、マイナス要因となる。したがって、もみからセルロースの効果的な酵素分解を行うには、もみからセルロースの結晶性の分析のために、さらに酵素がセルロース分子に接触しやすいうように、もみからの構造体を破壊し微粒子化する必要がある。

その目的のために、本実験では凍結粉碎法によるもみからの微粉化を試みた。もみからは、そのままでは大きな容積を占有し、通常の方法では微粒子化は困難である。しかしながら、凍結粉碎法はもみからを簡易、迅速に微粒子化できる効果的な処理法であった。表1は、未処理および凍結粉碎したもみからの一定重量に対する容積の変化を示してある。これからも解るように、凍結粉碎処理により容積が約 1/4.4 に減少した。

Table 1. Bioconversion of Rice Hull Cellulose to Glucose

(1) Effect of Cryomilling Treatment

Rice hull	Volume*	Hydrolysis**
Untreated	100 ml	3.0%
Cryomilled	23 ml	35.0%

* Volume of 10 g rice hull

** *T. viride* cellulase

凍結粉碎したもみから粉末セルロースのX線図型は図1に示した。対照として、同様に処理した綿セルロース粉末は、 $2\theta=22.5^\circ$ に結晶構造に起因する特有のピークをもっているが、凍結粉碎したもみから粉末セルロースには結晶構造が認められなかった。

すでに報告してきたように、結晶性のないセルロースからなる試料は酵素によって90%以上すみやかに分解される¹¹⁾。このことから多成分から成るもみから粉末セルロースも高い分解率が得られるものと予想されたが、表1ならびに表2~5に示したように、約35%の糖化率であった。未処理の試料に対し凍結粉碎したものでは約12倍分解性が良くなっており、もみからに対する凍結粉碎効果は明らかに認められた。

Fig. 1. X-ray diffractogram of rice hull cellulose

(A) Cryomilled cotton cellulose powder
(B) Cryomilled rice hull cellulose powder

このように、結晶性が低いにもかかわらず酵素分解性が悪い原因として、多成分系の試料ではセルロースに強く結合した他の組織構成分子が、立体的に酵素のセルロースへの接触を妨害しているためと考えられる。

つぎに、この酵素分解を妨害していると考えられる要因を明らかにする目的で、図2に示したように、凍結粉碎したもみから粉末を用いて各々、

- (1) セルロースの抽出
- (2) リグニンの除去
- (3) ヘミセルロースの除去
- (4) ケイ酸の除去

の処理をしたもみからセルロース酵素分解性について検討した。

2. 抽出したもみからセルロースの酵素分解性

凍結粉碎したもみから粉末中のセルロースを、60% H_2SO_4 溶液を用いて抽出後、冷アセトンによって回収した。

このセルロースにセルラーゼを作用させて分解率を調べたのが表2である。もみからの酸抽出セルロースは約86%まですみやかに分解され、さらに *T. viride* セルラーゼに *A. niger* セルラーゼを組合せることにより90%を超える分解率が得られた。

この結果は、もみからのようにセルロースの他にリグニン、ヘミセルロースおよびケイ酸を含む多成分系試料でも、酸抽出法によって簡単にセルロースを抽出できること、ならびに酵素分解性の結果からセルロースと強い結合関係をもつと考えられるリグニン等の成分による妨

Fig. 2. Bioconversion of variously treated samples of rice hull cellulose to glucose

Table 2. Bioconversion of Rice Hull Cellulose to Glucose

(2) Effect of Dissolving Treatment

Rice hull	Cellulase	Saccharification
Cryomilled	<i>T. viride</i>	35.3%
	<i>A. niger</i>	32.4%
Dissolved Cellulose	<i>T. viride</i>	85.3%
	<i>A. niger</i>	86.6%
	<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>	93.2%

害効果が除かれたことを示している。

3. リグニンを除去したもみからセルロースの分解性

リグニン溶剤としてアルカリ溶液を用い、凍結粉碎したもみから粉末中のリグニンの除去と処理したセルロースの分解性について検討した。

表3は、アルカリ溶液の濃度を変化させて調製した試料をセルラーゼによって分解した結果を示している。

Table 3. Bioconversion of Rice Hull Cellulose to Glucose

(3) Effect of Removal of Lignin

Rice hull	Cellulase	Saccharification
Cryomilled	<i>T. viride</i>	35.3%
+0.10N NaOH	"	55.1
0.20N "	"	67.1
0.35N "	"	84.7
0.35N "	<i>A. niger</i>	85.5
0.25N "	<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>	92.7
0.25N " +60% H ₂ SO ₄	<i>T. viride</i>	99.5
0.35N " +60% H ₂ SO ₄	<i>A. niger</i>	99.3

すなわち、リグニン溶剤 NaOH の高い濃度で処理した試料程、酵素分解性が良くなる傾向を示し 0.25N 水酸化ナトリウム処理では約 85% の分解率が得られた。さらに *T. viride* と *A. niger* の両者の酵素を作用させると 90% を越える糖化率が得られた。この結果は、前述の 60% 硫酸で抽出したセルロースの分解率にほぼ等しい値である。

つぎに完全分解を目的として、脱リグニン処理をした試料から 60% 硫酸を用いてセルロース抽出を行った。このセルロースの酵素分解性は、表3に示したように 99.5% とほぼ完全分解に等しい値が得られた。

これらの酵素分解液をペーパーマトグラフィーにより分析した結果を図3に示した。凍結粉碎もみから粉末およびアルカリ処理試料の酵素分解では、グルコースの他に微量のキシロースが検出され、水酸化ナトリウム-硫酸処理試料ではほとんどがグルコースであった。キシロースはキシランが粗セルラーゼ標品に混在しているヘミセルラーゼによって分解されたものであろう。

Fig. 3. Enzymatic hydrolysis of NaOH-treated rice hull cellulose

1. Standards
2. Cryomilled
3. 0.25N NaOH treated
4. 0.25N NaOH-60% H₂SO₄ treated

以上のように、もみから試料からリグニンを除去することにより、セルロースの酵素分解性を顕著に増大させることを認めた。しかしながら、リグニン除去のためのアルカリ処理は、もみからに含まれるセルロースの回収率を低下させる。表4に示したように、凍結粉碎したも

もみがらに含まれていたセルロースはアルカリ濃度が高くなるにつれ回収率の低下がみられるのに反し、酵素糖化率は高くなる傾向がみられた。さらにもみがら粉末を 0.25*N* 水酸化ナトリウムで処理後 60% 硫酸で抽出したセルロースの分解率は 99.5% という完全分解に近い値が得られたが、セルロースの回収率は 21.0% という低い結果になった。この値は、出発試料中に含まれるセルロースの約 57% が回収されたことを示している。

このようにリグニン除去のためのアルカリ処理は、セルロースの酵素分解性を高める反面、セルロースの収率の低下を来すことになる。これまでの結果から、凍結粉碎したもみがら粉末では 0.25*N* 水酸化ナトリウム、120°C、2時間の条件が最適と考えられる。この条件下では、もみがらセルロースの収率 86.5% で、酵素糖化率 92.7% となり、出発試料中のセルロースの約 80% がグルコースとして回収されたことを意味する。

Table 4. Yield of Cellulose in Various Treated Samples of Rice Hull

Rice hull	Yield of cellulose
Cryomilled	37.0%
+0.25 <i>N</i> NaOH	32.0
+0.25 <i>N</i> NaOH-60% H ₂ SO ₄	21.0
+1.0 <i>N</i> NaOH	23.1

つぎに、凍結粉碎後アルカリ処理したもみがらセルロースの酵素分解の経時的变化をみたのが図 4 である。も

Fig. 4. Saccharification of rice hull cellulose by *T. viride* or *A. niger* cellulase

1. 0.25*N* NaOH-treated rice hull+*T. viride* cellulase
2. 0.25*N* NaOH-treated rice hull+*A. niger* cellulase
3. 0.25*N* NaOH-treated rice hull+*T. viride* cellulase +*A. niger* cellulase

みがらセルロースは 24 時間で 85% 以上の分解率を示している。この結果から、もみがら酵素糖化の分解時間は 24 時間で十分であることがわかった。

さらに、アルカリ処理もみがらセルロースは、*A. niger* セルロラーゼによっても容易に分解され、その分解曲線は *T. viride* セルラーゼの結果とほとんど同じであった。

この結果は、凍結粉碎-アルカリ処理もみがらセルロースは、C1-酵素（結晶構造を開裂する活性）を必要とせず、Cx-グルカナーゼ+β-グルコシダーゼを含んだ酵素だけの 2 段階の反応でグルコースにまで分解されることを意味している。

4. キシランを除去したもみがらセルロースの分解性

もみがらの中には、主にキシランからなるヘミセルロースが 20% 近く含まれているといわれている^{11,12}。

凍結粉碎したもみがら中のヘミセルロースを 0.1*N* 塩酸で加熱抽出して除去した後、その残渣中のセルロースの酵素分解性について検討した。

図 5 のペーパークロマトグラムは、塩酸加熱抽出区分（ヘミセルロースの酸加水分解されたもの）からは多量のキシロースとグルコースが検出され、もみがらヘミセルロースはグルコキシランであることを示唆している。さらに残渣区分のセルラーゼ分解ではグルコースのみが検出された。

しかしながら、酵素糖化率は表 5 に示したように、対照の凍結粉碎試料の 35.3% に対してキシランを除去した試料では 39.3% であり促進効果は認められなかった。

Fig. 5. Enzymatic hydrolysis of HCl-treated rice hull cellulose

1. Standards
2. HCl-extracted fraction
3. Residue fraction+*T. viride* cellulase
4. Residue fraction+*T. viride* cellulase+*A. niger* cellulase

Table 5. Bioconversion of Rice Hull Cellulose to Glucose

(4) Effect of Removal of Xylan or Silicate

Rice hull	Cellulase	Saccharification
Cryomilled	<i>T. viride</i>	35.3%
+0.1N HCl	<i>T. viride</i>	37.1
+0.1N HCl	<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>	39.3
+SDS-EDTA	<i>T. viride</i>	24.8
+SDS-EDTA	<i>T. viride</i> + <i>A. niger</i>	26.7

この結果は、もみがら組織中のキシランはセルロースの酵素分解に阻害的影響を与えていないことを示している。

5. ケイ酸を除去したもみがらセルロースの分解性

もみがらの組織にはケイ酸が約 18% 含まれており^{11,12)}、この多量に含まれているケイ酸のセルロースの酵素糖化に及ぼす影響について検討した。

もみがらのケイ酸は、VAN SOEST ら⁶⁾の方法により、凍結粉碎したもみがら粉末を SDS-EDTA 溶液で加熱処理して除去した。表5に示したように、ケイ酸を除去したもみがらセルロースの分解性の増大は認められず、もみがら中のケイ酸はセルロースの酵素糖化に、みかけ上阻害的影響を及ぼしていないと考えられる。

考 察

セルロースを含む農産副生物は、一般に多成分系であり、大きな容積を占有し、強固な構造体からなっている。特にもみがらは“かき”が大きく粉碎が困難な農産副生物として知られている。もみがらの粉碎は乳鉢や粉碎機²⁾あるいはポットミル⁸⁾などで行われているが、時間がかかり微粉化は困難であった。しかしながら、本研究で採用した凍結粉碎法は非常に簡単に短時間でもみがらを微粉末にすることができ、体積も約 1/4.4 に減少することができた。

微粉化したもみがらセルロースは、X線図形分析から結晶構造は認められなかったが、もみがらセルロースが元々結晶構造を有しないのか、あるいは凍結粉碎によって破壊されたのかは不明である。しかし、非常に結晶性の高い綿セルロース試料を凍結粉碎すると、約 50% 結晶構造が破壊されている(図1)。従って、もみがらのように多成分なる試料ではセルロースの構造体も綿セルロースほど強固ではなく、凍結粉碎によって容易に破壊された可能性もある。

いずれにせよ微粉化したもみがらセルロースの結晶性が消失していることは非常に興味あることであり、次の

酵素処理を有効に行える指標になる。すでに報告している¹⁾ように、単一成分系のセルロース(綿セルロース)では、結晶構造を有していれば C1+Cx-酵素系(*T. viride* セルラーゼ)でも最高 30% 程度の分解率である。しかし、この結晶構造を破壊して非晶質に転換したセルロースは C1-酵素を必要とせず Cx-酵素系ですみやかに 90% 近く分解されるようになる。多成分系セルロースでも上記の関係がみられることが興味あるところである。もみがらセルロースでは結晶性がないことから 12 倍ぐらい分解性が良くなっているが分解率は35%止りであった。つまり、多成分系セルロースでは、単一成分系セルロースにみられる結晶度合と酵素分解性との相関関係はみられないといえる。その理由として、セルロースと共に植物組織を構造しているリグニン等の夾雑成分が、セルロースの酵素分解を妨害しているためと考えられる。もみがらでは、リグニン、ヘミセルロース、ケイ酸の夾雑成分の中で、リグニンがセルロースの酵素分解を妨害していることがわかった。種々のセルロース試料で脱リグニン処理によりセルロースの酵素分解性がよくなることが報告されているが^{4,10)}、セルロースとリグニン相互間のからみ具合についてはあまり知られていない。もみがらセルロースの 250 メッシュに粉碎した試料は、結晶性がないにもかかわらずリグニンを除去することにより分解性がよくなるということから、セルロースとリグニンは強固に結合していると考えられる。

微粉末化し脱リグニンしたもみがらセルロースは、言換えるならば非晶質性の単一成分系セルロースといえるもので Cx-酵素系ですみやかに分解されるはずであり、事実 *A. niger* セルラーゼ(Cx-酵素系)で 80% 以上の分解率が得られている。

従来、セルロースの酵素糖化は基質ならびに酵素の非単一性のために難しいものとされ、かなり経験的なアプローチが支配的であった。従って、セルロースの分解といえば一般的にアルカリ処理と *T. viride* セルラーゼを用いる方法がよく使用される。個々の方法は間違っていないが、本実験の結果からも、扱うセルロース試料に結晶性がない場合には *T. viride* セルラーゼを使う必要はなく、*A. niger* セルラーゼで十分に目的が達せられる。

もみがらは、農産副生物の中でも最も糖化困難な試料と考えられていたが、本研究により非常にすみやかに高度に酵素分解されることがわかった。このような糖化速度、糖化率の結果は、実用的に利用可能であることを示している。

要 約

もみがらセルロースを効果的に酵素糖化する諸条件について検討し、次の諸点を明らかにした。

(1) もみがらのかさのある強固な構造体を凍結粉碎法により簡単に破壊し粉末化することができた。凍結粉碎したもみがら粉末は、体積が約 1/4.4 に減少し、X線分析の結果からセルロースに結晶構造は認められず、セルラーゼによる分解性は約 12 倍に増大した。

(2) 凍結粉碎したもみがらのセルロースの酵素糖化率は 35% であるが、凍結粉碎もみから酸抽出したセルロースおよび脱リグニンしたセルロースは、24時間で 85% 以上分解された。

(3) もみがらセルロースに対し、*T. viride* セルラーゼまたは *A. niger* セルラーゼは、各々単独ではほぼ同じ分解率を与えるが、共存することによりセルロース分解に促進効果を示した。

(4) もみがらセルロースの酵素糖化は、リグニンによって阻害を受けているが、ヘミセルロースおよびケイ酸は阻害していなかった。

(5) 以上の結果は、もみがらのように多成分系から成るセルロース試料では、セルロースの結晶構造が消失していても、リグニンが酵素分解を妨害している。しかし、リグニンを除去したセルロースでは、C1-酵素 (*T. viride*) を必要とせず、Cx-グルカナナーゼと β -グルコシダーゼの2段階反応ですみやかに分解されることを示している。

文 献

- 1) SASAKI, T., TANAKA, T., SATO, Y., NANBU N., and KAINUMA, K.: *Biotech. and Bioeng.*, **21**, 1031 (1979).
- 2) 高桑正義・古川栄子: 食品工誌, **16**, 164(1969).
- 3) JANUS, M.J.: Abstracts of Paper, International Symposium on Bioconversion of Cellulosic Substances, (Delhi), 45 (1977).
- 4) TOYAMA, N. and OGAWA, K.: *Abstracts of Paper, International Symposium on Bioconversion of Cellulosic Substances* (Delhi) 31(1977).
- 5) SPRINGER, E.L. and ZOCH, L.L.: *Tappi*, **51**, 214 (1968).
- 6) VAN SOEST, P.J. and ROBERTSON, J.B.: *Nutrition Reviews*, **35**, (3), 12 (1977).
- 7) SAEMAN, J.F., BUHL, J.L. and HARRIS, E.E.: *Ind. Eng. Chem., Anal. Ed.*, **17**, 35 (1945).
- 8) PAPADOPULAS, N.M., HESS, W.C.: *Arch. Biochem. Biophys.*, **88**, 167 (1960).
- 9) DUBOIS, M., GILLES, K.A., HAMILTON, J.K., REBERS, P.A. and SMITH, F.: *Anal. Chem.*, **28**, 350 (1956).
- 10) MILLET, M.A., BAKER, A.J. and SATTER, L.D.: *Biotechnol and Bioeng.*, Symp. No. 6., 125 (1976).
- 11) BUSTOR, H.W.: *The Methods of Cellulose Chemistry* (2nd. ed.) D. Chapman and Hall, London (1947).
- 12) LEONZIO, M.: *Riso*, **16**, 313 (1967).

(昭和54年3月27日受理)