

報 文

食用担子菌ヤマブシタケによるシュガービートパルプの分解

須藤絵里子^{1,2}, 吉田 誠^{1,2}, 福田 清春², 高畠 幸司³, 金子 哲^{1§}¹食品総合研究所 食品バイオテクノロジー研究領域, 〒 305-8642 茨城県つくば市観音台 2-1-12²東京農工大学 農学部, 〒 183-8509 東京都府中市幸町 3-5-8³富山県林業技術センター, 林業試験場, 〒 930-1362 富山県中新川郡立山町吉峰 3Biodegradation of sugar beet pulp by edible mushroom *Hericium erinaceum*

Abstract

Two strains of *Hericium erinaceum* (strains Her-1 and Her-14) were selected as the possible strains to degrade sugar beet pulp. When the strains were grown on the sugar beet pulp during 57 days, arabinan was preferentially hydrolyzed by Her-1, in contrast, the strain Her-14 selectively degraded cellulose of sugar beet pulp. The activities of the crude enzyme solution which extracted from mushroom beds of each strains corresponded with their hydrolysis modes of sugar beet pulp. High α -L-arabinofuranosidase activity was detected in the crude enzyme solution of Her-1, in contrast, rather high cellulose degrading activity was detected in the crude enzyme solution of Her-14. The both strains did not produced PNP- α -L-rhamnopyranoside degrading enzymes suggested Her-1 and Her-14 could not hydrolyze pectin. These data indicated that the components of sugar beet pulp such as cellulose, pectin and arabinan would be possible to separate by using Her-1 and Her -14. Thus, *H. erinaceum* will be useful for the biorefinery of sugar beet pulp.

近年, 地球温暖化や化石資源の枯渇問題を背景に, 再生可能なエネルギー源であるバイオマスを利用することが, 世界的な風潮である. バイオマス利用は食料と競合することから, 農作物非食用部や食品加工残渣等の廃棄物系バイオマスを有効に利用する技術開発が望まれている. この様なリグノセルロースを中心としたバイオマス利用の最大の問題点は, バイオマスを利用する際にかかるコストが高いという点である. こうした問題点を解決するために, バイオマスから複数の化学製品を生産し, 余すことなく利用することで, バイオ製品市場の拡大, 収入の安定化, 生産コスト低減を実現すると同時に, 新しい生産物を中心とした新規事業展開を狙ったバイオリファイナリーという概念が有望視されている. それゆえ, バイオマス中の特定の

成分のみを抽出, 分離, 分解する技術開発が必要である.

製糖工場において甜菜より砂糖を絞ったカスとして排出されるシュガービートパルプは, 国内の年間発生量が 20 万トンにも達する代表的な食品廃棄物の一つである¹⁾. シュガービートパルプの構成成分は, 乾重量当たり, セルロースが 22-30%, ペクチンが 24-32%, アラビナンが 24-32%, リグニンが 3-4% である²⁾. 構造の異なる多糖類をバランス良く含むことから, 多様な用途への利用可能性を検討し, バイオリファイナリーの技術開発を検討する上で良い材料である. 構成糖のうち, セルロースはグルコースを成分とするため, エタノール等への変換が期待される. 一方, ペクチンやアラビナンはエタノールへの変換が困難な糖

2007 年 10 月 30 日受付, 2007 年 12 月 10 日受理

§ 連絡先 (Corresponding author)

類であるが、柑橘類のペクチンはゲル化剤としてジャム等の製造へ利用されており、シュガービートパルプのペクチンも増粘剤、ゲル化剤等への利用が期待される。また、アラビナンを構成するL-アラビノースは砂糖に似た甘さを持つ糖であり、体内に吸収されにくい³⁾、砂糖と同時に摂取した場合には腸内シュークラゼの活性を阻害し、腸管からの砂糖の吸収を抑制する機能を持つことから⁴⁾、ダイエット食品としての用途が期待されており、アラビノースを有効成分とする特定保健健康食品も市場に出回っている。

担子菌はその多くが木材腐朽菌として知られ、リグノセルロースを単独で完全分解できる唯一の生物である。木材腐朽菌という名の通り、担子菌による木材の分解に関する研究は精力的に行われているが、同じセルロース性のバイオマスであるにもかかわらず、農作物非食用部などの草本性バイオマスの分解に関する研究例は少ない。

本研究では担子菌が有する優れたバイオマス分解能を草本性バイオマスの利用に役立てるため、シュガービートパルプを高効率で分解可能な担子菌の選抜を行い、得られた担子菌のシュガービートパルプ分解メカニズムを解明することを目的として検討を行ったので報告する。

実験方法

1. 実験材料および試薬

供試菌類として、表1に挙げる食用担子菌類12種類を用いた。ヤマブシタケ (*Hericium erinaceum*) は、富山県林業技術センター保存株を用い、その他の株は

独立行政法人製品評価技術基盤機構より取り寄せたものを用いた。シュガービートパルプは、北海道糖業株式会社から供与頂いた。PNP基質は、シグマアルドリッチ社 (St. Louis, MO) から購入した。D-グルコース、L-アラビノース、D-グルクロン酸は、和光純薬株式会社から購入した。

2. 試験管培養によるシュガービートパルプ分解菌の選抜

あらかじめ秤量した試験管にシュガービートパルプ0.5 gと蒸留水1.5 mlを入れ、オートクレーブ滅菌 (121℃, 20分) した後、PDAプレートで生育させた担子菌を直径1 cmにくり貫き、培地ごと接種した。これを22℃, 70日間、暗所で静置した後、凍結乾燥し、秤量した。また、コントロールとして、担子菌を接種せず、同様の実験を行った。得られた質量より、次式で質量残存率を求めた。

$$\text{質量残存率 (\%)} = W/W_0 \times 100$$

W: 培養後の質量

W₀: コントロールの質量

3. シュガービートパルプを基材としたヤマブシタケのボトル培養

ブランタン角形容器 (SIBATA) にビートパルプ20 gと蒸留水60 mlを入れ、オートクレーブ滅菌 (121℃, 20分) した後、ヤマブシタケ Her-1株と Her-14株をそれぞれ接種した。これを25℃, 57日間、暗所で静置培養した。得られた菌床に、氷冷した100 mMリン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) を30 ml加え、6℃で30分間攪拌した。その後、グラスフィルターを

表1 使用菌株

| 番号 | 和名 | 学名 | 株 |
|----|----------|-------------------------------|------------|
| 1 | ツクリタケ | <i>Agaricus bisporus</i> | NBRC 30774 |
| 2 | キクラゲ | <i>Auricularia polytricha</i> | NBRC 30778 |
| 3 | エノキタケ近縁種 | <i>Flammulina populicola</i> | NBRC 7777 |
| 4 | エノキタケ | <i>Flammulina velutipes</i> | NBRC 7663 |
| 5 | エノキタケ | <i>Flammulina velutipes</i> | NBRC 33210 |
| 6 | ヤマブシタケ | <i>Hericium erinaceum</i> | Her-1 |
| 7 | ヤマブシタケ | <i>Hericium erinaceum</i> | Her-14 |
| 8 | シイタケ | <i>Lentinula edodes</i> | NBRC 30719 |
| 9 | ナメコ | <i>Pholiota nameko</i> | NBRC 6141 |
| 10 | エリンギ | <i>Pleurotus eryngii</i> | NBRC 32798 |
| 11 | ヒラタケ | <i>Pleurotus ostreatus</i> | NBRC 30776 |
| 12 | ニオウシメジ | <i>Tricholoma giganteum</i> | NBRC 31860 |

用いて吸引濾過した。この操作を3度繰り返し、得られた残渣を凍結乾燥した後、残渣の質量を秤量した。また、3度の洗浄で得られたろ液を回収し、混合したものを粗酵素液とした。

4. 成分分析

ウィリーミルにより粉末化した試料約 20 mg に、72 % (v/v) 硫酸 450 μ l を加え、よく混合した後、蒸留水 8.05 ml を加えて沸騰水中 (100°C) で 2 時間加水分解した。その後流水で室温まで冷却し、1.5 ml 蒸留水を加えた。そこから 1 ml 分取し、9 % (w/w) NaOH 溶液を 595 μ l 加えて中和し、メスフラスコで 20 ml に定容し、硫酸加水分解液とした。硫酸加水分解液中のヘキソース量は、D-グルコースを標準物質としたアンスロン硫酸法⁵⁾により測定した。ペントース量は、L-アラビノースを標準物質としたオルシン-Fe³⁺-塩酸法⁶⁾により測定した。ウロン酸の量は、D-ガラクトuron酸を標準物質とした *m*-ヒドロキシビフェニル法⁷⁾により測定した。また、リグニン含量は、アセチルプロマイド法⁸⁾により測定した。本分析におけるリグニンの吸光係数は、 $\varepsilon \cdot = 20.0091 \text{ g}^{-1}\text{cm}^{-1}$ とした。

5. 酵素活性測定

PNP 基質の分解活性は、各基質からの PNP の遊離量を定量することにより測定した。酵素反応は、2 mM PNP 基質 50 μ l と 100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) 40 μ l の混合液を 45°C で 5 分間予熱した後、10 μ l の酵素液を加え、45°C で 10 分間反応した。反応停止は 0.2 M の炭酸ナトリウム水溶液を 100 μ l 加えることにより行った。本反応液の 400 nm における吸光度を測定し ($\varepsilon_{400} = 17.1 \text{ mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$)、PNP 基質から 1 分間に 1 μ mol の PNP を遊離する酵素活性を 1 ユニット (U) とした。

6. 走査型電子顕微鏡 (SEM) 観察

凍結乾燥した試料を 5 mm 角に切り、厚さ 300 nm になるように金蒸着した。この試料を走査型電子顕微鏡 (JEOL 製 SCANNING MICROSCOPE JSM-5200) を用いて、印加電圧 10 kv, 作動距離 25 mm の条件下で観察した。

実験結果および考察

1. シュガービートパルプ分解性に優れた食用担子菌の選抜

表 1 に示した担子菌をシュガービートパルプと水のみを入れた試験管内で培養し、その生育を調べた (図 1)。生育の度合いは培養している試験管を凍結乾燥し、その重量減少を測定することで評価した。その結果、シュガービートパルプに生育できる菌とできない菌が顕著に区別された。また、興味深いことにヤマブシタケ Her-14 株では子実体が観察された (図 2C)。シュガービートパルプ中にはアラビナンが多量に含まれるが²⁾、その構成糖である L-アラビノースは真菌類によりアラビトールと呼ばれる糖アルコールに変換される⁹⁾。子実体形成法として一般に行われている食用菌の低温処理が、菌体内のアラビトール含量を増加させること¹⁰⁾、また、ヤマブシタケの菌体内のアラビトール含量が子実体収穫後に著しく減少すること¹¹⁾等、子実体形成とアラビトールには密接な関係があることが示されており、本研究において、培養過程で子実体の形成が観察されたのは、ビートパルプからアラビトールが形成され、子実体の形成が促進されたことが原因と考えられた。

ヤマブシタケは中国では「猴頭菇」(ホウトウクウ)とよばれ、熊の手・ナマコ・フカヒレとともに四大山海珍味の一つとして知られており、昔から珍重され、

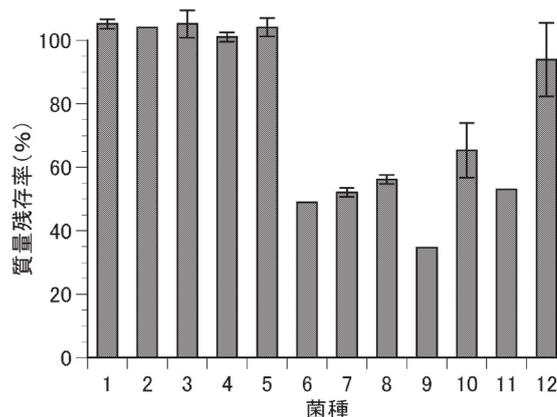


図 1 食用担子菌を用いたシュガービートパルプ分解菌の選抜

食用担子菌を、シュガービートパルプを単一の栄養源とする培地で 70 日間試験管培養し、重量減少を測定した。菌種番号は、表 1 の番号に準ずる。実験は 2 連で行い、その平均値を記載した。



図2 ヤマブシタケ Her-1 株および Her-14 株による各種バイオマスの分解挙動

ヤマブシタケを、バガス、イナワラ、シュガービートパルプを単一の栄養源とする培地で70日間試験管培養した。(A)未分解サンプル、(B)ヤマブシタケ Her-1、(C)ヤマブシタケ Her-14。

宮廷料理に用いられている付加価値の高いキノコである。キノコ栽培をバイオマス利用工程に組み込むことができれば、バイオリファイナーの一環として大いに役立つことが期待されることから、本研究ではシュガービートパルプの高い分解性に加えて、子実体の形成が観察されたヤマブシタケ Her-14 株を用いて更に詳細な実験を行うこととした。また、同菌種間での分解特性の差異を明らかにするため、ヤマブシタケ Her-1 株も以後の実験に用いた。

シュガービートパルプへの生育の可否はシュガービートパルプに含まれる多糖を分解できる担子菌とできない担子菌の別であると考えられた。甜菜は双子葉植物であることから、その細胞壁構造は単子葉植物とは大きく異なり、その分解に関与する酵素は単子葉植物の細胞壁を分解する酵素とは異なると予想される。そのことを証明する為に、ヤマブシタケ Her-1 株及び Her-14 株を同条件下で、サトウキビバガス、イナワラ、シュガービートパルプへの生育を調べた(図2)。両菌ともに予想通りシュガービートパルプのみに生育した(図2)。このことから、ヤマブシタケは双子葉植物の細胞壁を特異的に分解可能であることが示唆された。

ヤマブシタケ両菌株では、どちらもシュガービートパルプを分解していたものの、菌床の形態は大きく異なっていた。両菌の質量減少は同程度だったにも関わらず、図2Bに見られるように、Her-1 株の菌糸はバイオマスに這うように生育し、バイオマスの高さを低下が見られたのに対して、Her-14 株では菌糸がバイオマス全体を覆うように著しく成長した(図2C)。両菌の分解挙動の差異を詳細に調べるため、それぞれの菌床をSEMにより観察したところ、分解挙動に形態的な差異は観察されなかった(図3B, C)。これらの菌床を未分解のものと比較したところ、共に著しい分解跡が見られたことから、両菌株ともにシュガービートパルプ分解菌として適したものであると考えられた。

2. ヤマブシタケによるシュガービートパルプの分解

ヤマブシタケ Her-1 株および Her-14 株によるシュガービートパルプの分解特性を明らかにするため、それぞれの菌をビートパルプ上で57日間培養し、主要成分の分析を行った。各菌に対して同組成の培地を2つ調製し、同条件で培養した後、質量減少を測定した。その結果、ヤマブシタケ Her-1 株の質量残存率は、それぞれ43.2%、28.8%であり、ヤマブシタケ Her-14 株においては、それぞれ45.6%、45.9%であった。得られた菌床の主要成分を解析した結果を図4に示した。未分解のシュガービートパルプの成分含量に基づき、それぞれの菌床における各成分の残存率を算出した。ヤマブシタケ Her-14 株では、ヘキソース含有多糖が最も分解されたのに対し、ヤマブシタケ Her-1 株においては、ペントース含有多糖の優先的な分解

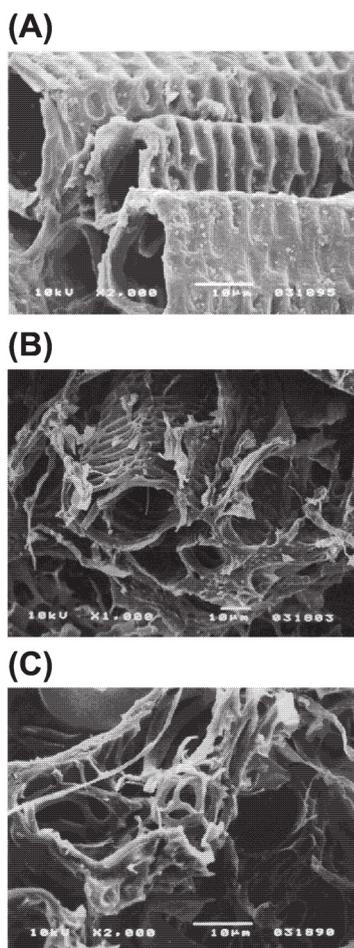


図3 SEMによるヤマブシタケ Her-1 株および Her-14 株のシュガービートパルプ菌床の観察

ヤマブシタケをシュガービートパルプを単一の栄養源とする培地で70日間試験管培養し、SEM観察を行った。(A)未分解サンプル、(B)ヤマブシタケ Her-1、(C)ヤマブシタケ Her-14.

が観察された。既往の研究において、ビートパルプ中の主要なヘキソースは、セルロース由来のグルコースであり、主要なペントースはアラビナン由来のアラビノースであることが示されている^{12) 13)}。したがって、ヤマブシタケ Her-14 株はセルロースを優先的に分解し、ヤマブシタケ Her-1 株においては、アラビナンの分解が優先的であると考えられた。また、同程度の質量残存率を示した両菌株の菌床中のリグニン量を比較したところ(図4A, C, D)、いずれの菌床においても多糖に比べ、リグニンの残存率が高かったが、ヤマブシタケ Her-14 株と Her-1 株では Her-1 株のリグニン残存率が低かったことから、ヤマブシタケ Her-1 株は

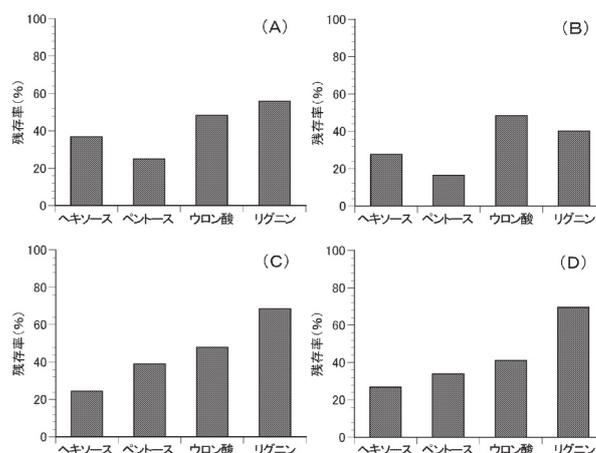


図4 ヤマブシタケ Her-1 株および Her-14 株のシュガービートパルプ菌床の成分組成
(A) ヤマブシタケ Her-1 株菌床 重量残存率 43.2%, (B) ヤマブシタケ Her-1 株菌床 重量残存率 28.8%, (C) ヤマブシタケ Her-14 株菌床 重量残存率 45.6%, (D) ヤマブシタケ Her-14 株菌床 重量残存率 45.9%.

Her-14 株と比較し、より高いリグニン分解能を有していると考えられた。さらに、ヤマブシタケ Her-1 株の場合、分解が進むにつれ、ヘキソース、ペントース、リグニンの残存率が減少したものの、ウロン酸の残存率に変化は見られなかった(図4A, B)。ビートパルプ中の主要なウロン酸は、ペクチン中のガラクトロン酸であることから¹²⁾、本菌は培養初期にペクチンを分解するものの、培養後期にはペクチン分解能は低下することが示唆された。

3. ヤマブシタケがシュガービートパルプ分解時に分泌する糖質加水分解酵素

菌床の成分分析により、ヤマブシタケ Her-1 株と Her-14 株はシュガービートパルプ中の異なる成分を選択的に分解することが示唆された。そこで、両菌がシュガービートパルプ分解時にどのような糖質加水分解酵素を生産するか解析を行った。100 mM リン酸カリウム緩衝液 (pH 6.0) により、菌床からタンパク質の抽出を行い、その抽出液中の酵素活性を PNP 基質を用いて測定した(図5)。全ての菌床由来の抽出液中で、PNP- α -D-ガラクトピラノシドに対する高い分解活性が観察された。一般に、多くの糸状菌は、固体培養系で大量の α -ガラクトシダーゼを生産することが報告されている^{14)~17)}。よって、本研究で観察された PNP- α -D-ガラクトピラノシドに対する高い活性は、固体培養の影響を反映したものであると思われる。また、

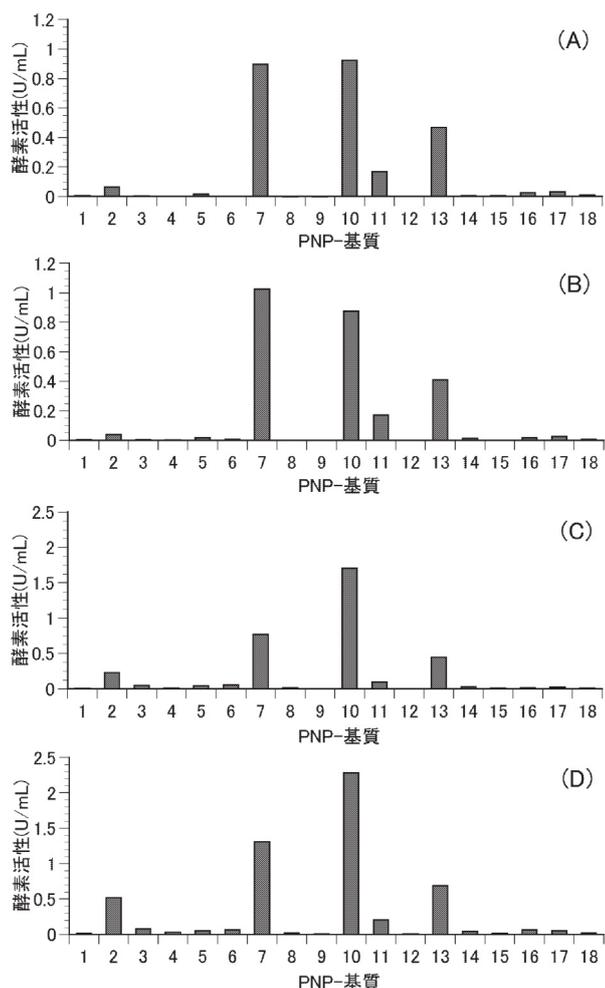


図5 ヤマブシタケ Her-1 株および Her-14 株の PNP 基質分解活性

- (A) ヤマブシタケ Her-1 株菌床 重量残存率 43.2 %,
 (B) ヤマブシタケ Her-1 株菌床 重量残存率 28.8 %,
 (C) ヤマブシタケ Her-14 株菌床 重量残存率 45.6 %,
 (D) ヤマブシタケ Her-14 株菌床 重量残存率 45.9 %,
 1. PNP- α -D-Glucopyranoside, 2. PNP- β -D-Glucopyranoside, 3. PNP- β -D-Cellobioside, 4. PNP- β -D-Lactoside, 5. PNP- α -D-Xylopyranoside, 6. PNP- β -D-Xylopyranoside, 7. PNP- α -L-Arabinofuranoside, 8. PNP- α -L-Arabinopyranoside, 9. PNP- β -L-Arabinopyranoside, 10. PNP- α -D-Galactopyranoside, 11. PNP- α -D-Galactopyranoside, 12. PNP- α -L-Rhamnopyranoside, 13. PNP- α -L-Fucopyranoside, 14. PNP- β -D-Fucopyranoside, 15. PNP- α -D-Mannopyranoside, 16. PNP- β -D-Mannopyranoside, 17. PNP- β -D-Glucuronide, 18. PNP- β -D-Galacturonide.

シュガービートパルプは砂糖の絞りカスであるが、微量のシュクロースやラフィノース等が含まれており、これらの糖が α -ガラクトシダーゼを誘導した可能性もある。 α -L-アラビノフラノシダーゼ活性も全ての抽出液で観察されたが、ヤマブシタケ Her-1 株においては、最も主要な酵素であった。この結果は、本菌の菌床の成分分析により観察されたアラビナンの優先的分解 (図 4A および B) と一致する結果である。また、PNP- β -D-ガラクトピラノシドに関して、ヤマブシタケ Her-1 株で高い活性が観察された。一方、ヤマブシタケ Her-14 株の抽出液では、Her-1 株のものと比較し、PNP- β -D-グルコピラノシドおよび PNP- β -D-セロピオシドの活性が高いことが明らかとなった。これは図 4C および D で観察されたセルロースの優先的分解を裏付ける結果である。したがって、ヤマブシタケ Her-14 株は、Her-1 株と比較し、高いセルロース分解能を有していると推察される。

ペクチンの分解においてはエンド型のエンド-ポリガラクトツロナーゼが主要な役割を果たすことが知られているが¹⁸⁾、今回試験した基質ではペクチン主鎖を分解する活性を測定できなかった。しかしながら、ペクチンの側鎖の構成糖である α -L-ラムノシダーゼ活性が検知されなかったことから、ヤマブシタケ両菌株はペクチンをあまり分解できない可能性が高い。実際に、成分分析の結果より、ガラクトツロン酸の残存率は、分解が進行してもほとんど変化が見られなかった (図 4)。このことはヤマブシタケを用いてシュガービートパルプよりペクチンのみを選択的に抽出できる可能性を示唆している。

本研究では、シュガービートパルプのバイオリファイナリーの可能性を検討するために、シュガービートパルプ分解菌としてヤマブシタケ 2 株 (Her-1 株および Her-14 株) を選抜した。両菌共に、シュガービートパルプを高度に分解したが、ペクチンの分解能は低かった。また、両菌によるシュガービートパルプの分解パターンは異なっており、Her-1 株ではアラビナンを優先的に分解し、Her-14 株ではセルロースがより多く分解された。これらの事実は本研究で選抜した 2 種類のヤマブシタケを用いて、シュガービートパルプに含まれるセルロース、アラビナン、ペクチンを分画できる可能性を示唆しており、シュガービートパルプのバイオリファイナリーに有用であると考えられる。また、担子菌をシュガービートパルプに生育させることで特段の処理をすることなく、容易に子実体を形成

できたことは付加価値の高いキノコであるヤマブシタケをシュガービートパルプのバイオリファイナリーに組み込める可能性を示唆している。以上の様にヤマブシタケはシュガービートパルプの利用に有用な菌であり、今後の研究の進展により、アラビノース、ペクチン、キノコ等の産物で、利益を得ながら、残ったセルロースから安価にバイオエタノールを生産するシステムが構築されることが期待される。

謝 辞

本研究で用いたシュガービートパルプを供与いただきました北海道糖業株式会社の石塚忠義氏に深く感謝いたします。本研究は農林水産省委託研究プロジェクト「地球温暖化が農林水産業に及ぼす影響の評価と高度対策技術の開発」及び「地域活性化のためのバイオマス利用技術の開発」により実施されたものである。

要 約

シュガービートパルプを効率的に分解する食用担子菌を探索し、ヤマブシタケ Her-1 株および Her-14 株を選抜した。これらの菌をシュガービートパルプに 57 日間生育させ、成分分析に供したところ、Her-1 株ではアラビナン、Her-14 株ではセルロースが優先的に分解された。両菌の菌床から酵素を抽出し、PNP 基質に対する活性を測定した結果、Her-1 株では PNP- α -L-アラビノフラノシドに対する活性が高く、Her-14 株では、Her-1 株と比較し、セルロース分解酵素が多く生産されていた。さらに、いずれの抽出液においても、ペクチンの成分である L-ラムノースの結合を分解する活性である PNP- α -L-ラムノピラノシドの分解活性は検知されなかった。これらのことは Her-1 株および Her-14 株の 2 種類のヤマブシタケを用いて、シュガービートパルプに含まれるセルロース、アラビナン、ペクチンを分画できる可能性を示唆しており、ヤマブシタケがシュガービートパルプのバイオリファイナリーに有用であると考えられた。

参考文献

- 1) K. Onari, *Animal Husbandry*, **57**, 595-598 (2003).
- 2) M. Coughlan, R. K. Mehra, P. J. Considine, A. O' Rourke and J. Puls, *Biotechnol. Bioeng. Sump.*, **15**, 447-458 (1985).
- 3) K. Seri, K. Sanai, N. Matsuo, K. Kawakubo, C.-Y. Xue and S. Inoue, *Metab. Clin. Exp.*, **45**, 1368-1374 (1996).
- 4) K. Sanai, K. Seri and S. Inoue, *J. Jpn. Soc. Nutr. Food Sci.*, **50**, 133-137 (1997).
- 5) D. L. Morris, *Science.*, **107**, 254-255 (1948).
- 6) W. R. Fernell and H. K. King, *Analyst*, **78**, 80 (1953).
- 7) W. S. York, A. G. Darvill, M. McNeil, T. T. Stevenson and P. Albersheim, *Methods Enzymol.* **118**, 3-40 (1985).
- 8) S. Y. Lin and C. W. Dence, *Methods Lignin Chem.*, (Springer-Verlag, Berlin) p. 44-48 (1992)
- 9) B. Hohn-Hagerdal, K. Karhumaa, C. Fonseca, I. Spencer and M. F. Gorwa-Grauslund, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **74**, 937-953 (2007)
- 10) E. P. Feofilova, V. M. Tereshina, A. S. Memorskaya, L. A. Zav'yalova and N. S. Maryshova, *Microbiology*, **68**, 304-309 (1999)
- 11) 小島靖, 「奈良県森林技術センター研究報告」 **30**, 11-16 (2000)
- 12) C. M. G. C. Renard and J.-F. Thibault, *Carbohydr. Res.*, **244**, 99-114 (1993)
- 13) A. Oosterveld, G. Beldman, H. A. Schols and A. G. J. Voragen, *Carbohydr. Res.*, **288**, 9143-153 (1996).
- 14) C. L. Wang, D. F. Li, W. Q. Lu, Y. H. Wang and C. H. Lai, *Lett. Appl. Microbiol.*, **39**, 369-375 (2004).
- 15) C. Q. Liu, Q. H. Chen, B. Tang, H. Ruan and G. Q. He, *Lett. Appl. Microbiol.*, **45**, 206-212 (2007).
- 16) C. Q. Liu, Q. H. Chen, Q. J. Cheng, J. L. Wang and G. Q. He, *J. Zhejiang Univ. Sci. B*, **8**, 371-376 (2007).
- 17) S. K. Shankar and V. H. Mulimani, *Biores. Technol.*, **98**, 958-961 (2007).
- 18) R. P. De Vries and J. Visser, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **65**, 497-522 (2001).

