

水熱反応を利用した各種糖質の生産技術

誌名	応用糖質科学：日本応用糖質科学会誌 = Bulletin of applied glycoscience
ISSN	21856427
著者名	榎島, 聡 佐藤, 伸明
発行元	日本応用糖質科学会
巻/号	2巻3号
掲載ページ	p. 174-179
発行年月	2012年8月

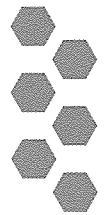
農林水産省 農林水産技術会議事務局筑波産学連携支援センター
Tsukuba Business-Academia Cooperation Support Center, Agriculture, Forestry and Fisheries Research Council
Secretariat





β-結合糖質の
有効活用へ—
ミセルロース
の利用—

水熱反応を利用した各種糖質の生産技術



榎島 聡 (まきしま さとし)^{1,2}

佐藤伸明 (さとう のぶあき)³

¹ 信州大学工学部 特任教授

² 物産フードサイエンス株式会社ビジネスオペレーション本部 本部長付

³ 信州大学工学部物質工学科 講師

1. はじめに

バイオマスとは光合成によって生息する植物体などの独立栄養生物と、それを食とする従属栄養生物の総称であり、一般的にはセルロース、ヘミセルロースおよびリグニンなど植物細胞壁を形成する天然高分子を構成する前者を指す場合が多い¹⁾。細胞壁を構成する成分として、セルロース、ヘミセルロース、リグニンの3成分が総質量の大半を占め、その他に、脂質、タンパク質、無機質(灰分)などが含まれている。現在、バイオマス資源を構成する多糖類の利用を目的として、メタンガスやエタノールを発酵生産する技術の開発に世界が取り組んでいる²⁾。しかし、植物細胞壁を構成する多糖類の多くが難水溶性、難分解性であることから、バイオプロセスの進行が妨げられることになり、工業的な採算基準を満たすためには多くの技術課題がある。今回は、バイオマス利用分野においてバイオプロセスを補益する技術として採り上げられる機会が多くなった水熱反応に着目し、その可能性と産業化の課題について考えてみたい。

2. 水熱反応の原理

植物細胞壁を構成する多糖類のグリコシド結合を加水分解して糖化する手法としては、酸や酵素製剤を用いた処理の他に、古くは水蒸気爆砕にはじまり、最近では超臨界水などの高温高压流体を用いる水熱反応技術が広く知られるようになった¹⁻³⁾。水は374°C、23.4 MPaの臨界点を超えると気体とも液体とも性質の異なる均一な流体となる。これが超臨界水である(図1, Super-critical water)。また、臨界点より温度・圧力の低い領域では亜臨界水(図1, Sub-critical water)と呼ばれることもある。酸および酵素を用いた場合に起こる糖鎖の加水分解反応は、酸-塩基触媒の寄与によるものであるが、高温高压水を用いた水熱処理における場合も同様である。水は高温高压状態を保たれるとき、そのイオン積が上昇する性質を持っており、MarshallとFranckらは広範囲の温度、圧力範囲でのイオン積を測定して、積値が水の密度に対して両対数軸上で直線関係にあることを示し、さらに高温高压領域にも適応可能なイオン積の相関式を発表している^{4,5)}。一方、UematsuとFranck

らは水の誘導率に関して、広範囲の温度、密度において適用可能な計算式を提案した⁶⁾。これらの研究によると、水のイオン積は温度と共に上昇し、水熱反応により植物細胞壁中のヘミセルロースの糖化が起こる190°Cの領域では、そのイオン積は常温時の約460倍の $4.0 \times 10^{-12} \text{mol}^2/\text{L}^2$ レベルとなり、セルロースの糖化領域である240°Cでは最大の $6.5 \times 10^{-12} \text{mol}^2/\text{L}^2$ のレベルに達する。一方、水の誘電率は飽和蒸気圧下で温度の増加とともに低下していく傾向が示され、190°Cでは36.5、300°Cでは20.1を示す。このように、水は温度、圧力を変化させることで、変化に富んだ反応場を提供するため、高温高压水は植物細胞壁構成多糖類を加水分解して可溶化させるための環境負荷の低い溶媒として評価することができる。

3. 水熱反応器の設計思想と課題

高温高压流体の研究は、水などの極性溶媒の物理化学特性を探究して応用することであり、反応・プロセス工学、材料工学、原子力工学など様々な化学工学分野の研究者がリードしてきた⁷⁾。

水熱反応を生じさせる反応器は、①有機化合物の完全分解を目的とするケース、②バイオマスの醗酵や酵素反応の前処理装置として設計するケース、③バイオマスから特定画分を分離する生産装置として設計するケースがあり、自ずと設計思想が異なってくる。使用温度領域や耐圧設計、構成されるパーツやその材質1つにしても、開発設計に携わる研究者の工学的バックグラウンドが色濃く反映されることがあり、大変興味深いものとなっている。

3.1 バッチ式か、連続式か

一般に実験的に超臨界水を発生させる水熱反応器は、 Hastelloyやチタン合金などの耐蝕性金属で製作された数~数十 mLの容量を持つ圧力容器と温調装置によって構成される。高温高压流体中の材料の挙動を外部から観察できるよう、サファイアガラス製の窓を有する反応容器もある。この小容量のバッチ式反応器は、電気ヒーターやソルトバスで精密な反応温度を設定することが可能で、現在も水熱反応を追跡するために広く用いられている。

筆者らは、初期の研究で Hastelloy C-22 製小型セル

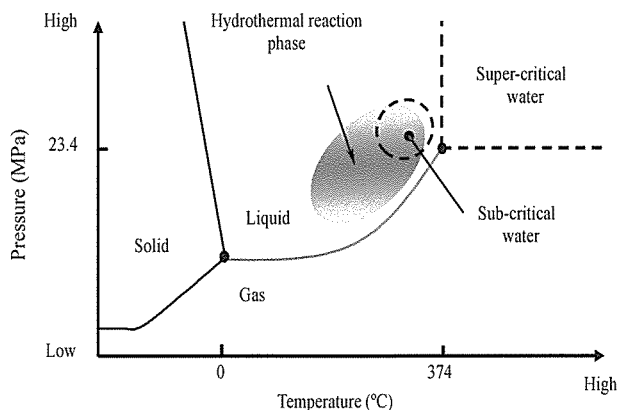


図1. 水の状態図

(10.77 mL, 耐圧硝子工業株) を用いソフトバイオマス〔エノキタケ (*Flammulina velutipes*) 栽培後の培地, コーンコブベース〕に対して 190°C, 1.83 MPa, 10 min レベルの水熱反応条件を与え, ヘミセルロースの構成成分であるキシロ糖の分離を行った。次に水熱処理能力を向上させるため, 小型セルで求められた反応条件をトレースしながら反応部の容量を段階的にスケールアップしていく実験を試みた。バッチ容量が 1 L までは, 反応条件を何とかコントロールすることができたが, それ以上になると怪しくなり, 容量が 30 L になると, 試料が設定温度の 190°C に到達して安定するまでに数時間を費やしてしまった。ヒーター容量や温度制御機能, 攪拌機能の調整を行って反応効率の改善を試みたが, 昇温工程と冷却工程の圧倒的な熱履歴の前に, わずか 10 min の水熱反応を制御することは困難であった。この結果, 生成してくるキシロースに対しての副反応を抑えることができず, 単糖の分解物であるフルフラールが大量に発生した。このようにバッチ式水熱反応装置をスケールアップするためには, その原理上, 工業的限界を避けることができない。

一方, チューブ型の反応管を持つ連続流通式の水熱反応装置は, ある程度の熱容量と管長のある反応管に温度制御を与えたところに, バイオマススラリーを一定の速度で流通させる原理であり, 昇温部と冷却部の構成装置を上手く設計すると, 極めてシャープな反応温度と時間を設定できるメリットがある。しかしながらバイオマス事業に適用する連続式反応装置の最大の課題は, スラリー状の原料を反応管に導入し, スラリー状の処理物として排出する際の反応系内の圧力制御にある。材料導入側と排出側の装置動作に問題が発生して系内の圧力が低下し, 反応器内で沸騰が生じると, 先に解説した水熱反応のメカニズムが一気に損なわれ, 期待される反応モードが消失してしまうことになる。

原料スラリーを常圧から反応圧力 1.8 MPa レベルにまで即時に昇圧させなければならない材料導入部については, 材料輸送とベース圧力の設定という 2 つの機能を担わせるスラリーポンプと, その周辺の装置設計がきわめて重要になってくる。ここでよくみられるのは, 耐圧タンクに原料を封入しておいて, 送液ポンプで系外から水を導入し, 反

応系内を高圧にすると同時に材料を反応管に輸送するという原理を持つ装置である。スラリーが輸送水によって希釈されるため材料濃度が刻々と低下し, 仕込みごとの材料ロスを生じてしまうシステムができるのは, スラリーポンプ周りの設計がいかに困難であるかを物語っている。また, 超臨界領域で有機物を完全に分解する場合は, 分解物は完全な液体になっているので, 排出部では減圧弁を操作するだけで圧力をコントロールすることができる。しかしスラリーとして排出する場合にはどうしても密閉型の材料受けタンクが必要になってくる。以上のように一口に連続流通式水熱反応システムといっても, 反応部こそ連続流通式であれ, 系全体としてみればバッチ式である場合が多い。

3.2 信州大学 (生研センター) 方式

生物系特定産業研究支援センター「生物系産業創出のための異分野融合研究支援事業」(2004~2008 年度) で信州大学工学部天野良彦教授 (技術コーディネーター) を中心とするコンソーシアムは, バイオマス処理用の水熱反応装置として, ベンチスケールの連続流通式水熱反応システムを開発した⁸⁻¹⁰⁾。本システム (図 2, バイオマス変換用チューブリアクター, 木村化工機株) は, 材料供給部とチューブ型水熱反応器, 材料排出部から構成される (図 3)。システム全体の外形サイズは, 幅 3,000 mm × 奥行き 2,050 mm × 高さ 2,500 mm であり, バイオマスの産出現場でオンサイト処理ができるよう, 当初から 4 トン型トラックに搭載が可能な小型システムとして設計された。構成する全ての反応管の使用最高温度および圧力は 230°C, 3.0 MPa であり, ソフトバイオマス (コーンコブ) スラリーの処理速度は 20 kg/h, 乾燥材料に換算すると 3 kg/h の処理能力がある。

図 3 に沿って解説する。材料供給部にはモノスラリーポンプ (the NEMO[®] pump, 13 stages type, 兵神装備株) を採用し, 材料供給タンク下部に配置することで反応管に容易に材料を輸送することが可能になった。粉碎したバイオマスと水を混練するため, 湿式粉碎機 (MKCA 6-3, 増

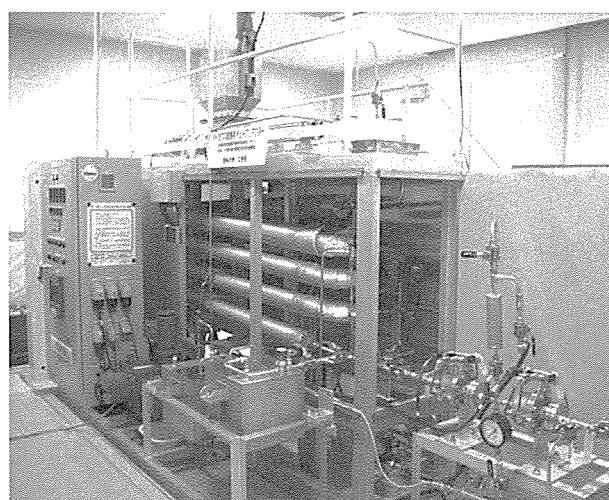


図2. 連続流通式水熱反応システム (信州大学工学部)

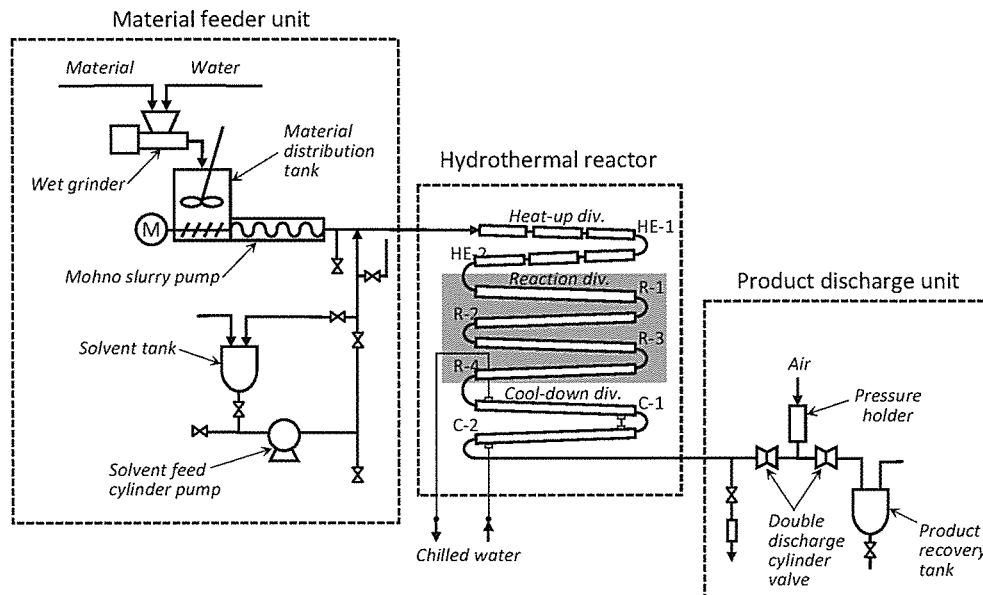


図3. 連続流通式水熱反応システムの構造

幸産業(株) をシステム前段に配備したほか、スラリーポンプ以外に溶媒供給ポンプも設置した。この溶媒供給ポンプは、材料導入前のコンディショニング(水運転)に用いられ、スラリーポンプによる水熱反応運転時には、溶媒を供給する機能があるため、反応管中での材料濃度や滞留時間をより精密に制御することが可能となった。

チューブ型水熱反応器は昇温部(HE-1, HE-2)、反応部(R-1~R-4)および冷却部(C-1, C-2)の3つの部分からなり、水熱反応管は外径25.4 mm、厚さ2.1 mmのSUS 316製で、管長はそれぞれ4.5 m, 10.4 mおよび4.5 mに設計した。昇温部と反応部は電気ヒーターによる加熱、また、冷却部は水による冷却を行っており、各部位は多数の熱電対が配置され温度制御に利用している。全ての管は、バイオマススラリーの円滑な流れを得るため、上部よりなだらかな傾斜がつけられている。

材料排出部は、2つのシリンダーバルブと両バルブの中間に配置された圧力保持容器で構成される¹⁰⁾。反応管中の圧力を調整するため、圧力センサーからの信号により、2つのシリンダーバルブは交互に連携して作動する。反応器側(上流)のシリンダーバルブが開放したときに、圧力保持容器内に維持されている空気圧により水圧変動が緩衝され、反応管内に生じる圧力変動が最小になるよう設計されている。また排出側(下流)のシリンダーが動作する場合は圧力保持容器内の気圧により、溶液の排出が促される。このように、容器内の圧縮空気は、水熱反応圧力の安定と円滑な材料輸送に重要な役割を果たしている。

開発の結果得られた反応装置の制御性能を示す(図4)。横軸には操作時間、上段には反応器内の圧力、下段には図3のチューブ型水熱反応器の昇温部(HE-1, HE-2)、反応部(R-1~R-4)および冷却部(C-1, C-2)構成ユニットの温度プロファイルを示したものである。バイオマススラリーに190°Cの水熱反応を与えるため、溶媒ポンプの動作による水運転にて系内のコンディショニングを行い、操作

時間0で、モノスラリーポンプからの材料供給を開始した。各反応管に材料が到達して安定化するまでは粘度と熱容量が変化するためモニター温度が乱れるが、操作時間1.5 h以降は反応条件が安定的に維持されているのが本装置の特質である¹⁰⁾。

3.3 産業利用上の課題

以上のように、信州大学システムではバイオマススラリーに対して極めて精密な水熱反応条件を与えることに成功しているが、同じ原理のままスケールアップしてベンチスケール同様のマテリアルバランスが得られる産業用リアクターを完成させるためには、克服しなければならない課題がある。

3.3.1 構成部品のスケール限界と信頼性

材料導入部のモノスラリーポンプの容量には限界があるため、工業スケールを得るために新たなポンプ設計が必要である。また、材料排出部のシリンダーバルブについては、バイオマススラリーの固形分にシリンダー部品が接触するような遮断動作を行っているため、構成部品の信頼性・耐久性の検証が不可欠である。

3.3.2 チューブ式反応管の設計限界

処理量を増やすため、現在使われている1インチ径の反応管の断面積を上げていくと、反応管内の流体の挙動が変化し、現状のような熱伝達条件を得ることができない。これを避けるために、反応管を無数に分岐させて大型ポンプで材料を一括で押し試みると、総流量はあがるものの、反応管ごとのコンディションにより流速にばらつきが発生してしまう。従って反応管とポンプは独立で設計しなければならない、その結果、装置を何十台も並べると同じような仕様となり、装置コストが膨大に跳ね上がる。

以上の課題が、スラリーイン・スラリーアウトの産業用水熱反応装置の実現を困難にしている。当研究部門では、これら産業上の課題を解決するための開発設計に取り組ん

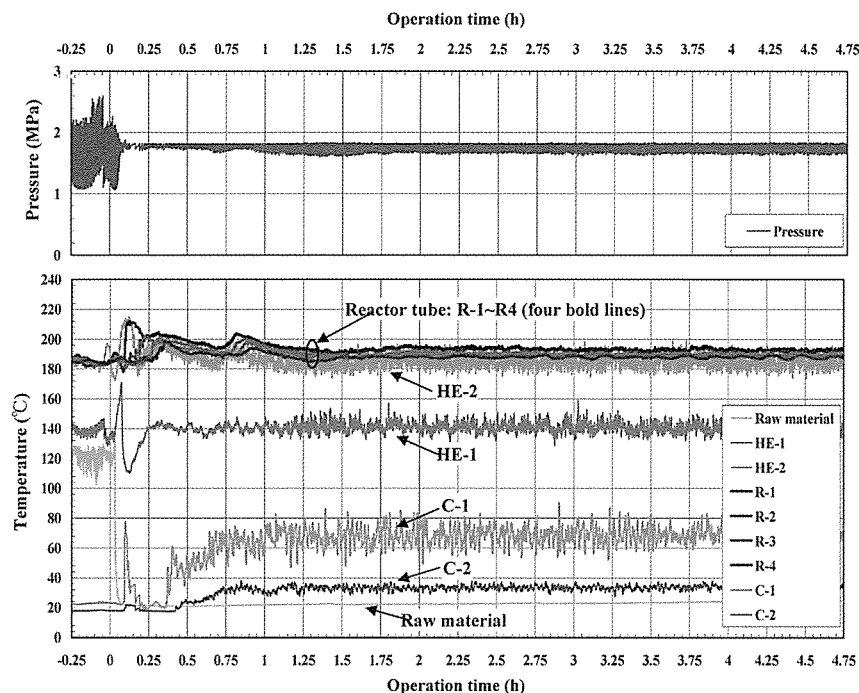


図4. 連続流通式水熱反応システムの制御性能

でいるところである。

4. 水熱反応の効果

200°C前後に温度制御された水熱反応は、バイオマスからヘミセルロース成分を分離するのに適している。ヘミセルロースを構成する糖質の実用的な研究領域としては、整腸作用の強いオリゴ糖、食物繊維、動植物の成長促進剤としての利用が知られている¹²⁾。また、キシロースなどのC5糖を取り込み発酵させる能力を持つ、*Zymomonas mobilis*由来の遺伝子を組み込んだ遺伝子組換え大腸菌による、アルコール燃料の生産に関する研究も報告されている¹³⁾。現在、最も知られている利用法の1つは、単糖のキシロースを水添したキシリトールであり、清涼感を伴う抗う食性の甘味素材として、国内だけでも年間約7,300トンが消費されている。

4.1 キシランおよびセルロースの可溶化・加水分解

出発原料をコーンコブとして、水熱反応を与えると160°Cからヘミセルロースの溶出が始まり、キシロース、キシロオリゴ糖~キシロポリサッカライド (DP = 20以上)としてキシランのほぼ全量が可溶化してくる¹⁴⁾。反応速度に最も有利なのは190~200°C領域で、200°Cを超えると単糖の生成が多くなるばかりではなく、過分解物のフルフラールが生成してくる¹⁵⁾。

230°Cの領域ではセルロース部分が加水分解を受け、単糖のブドウ糖やセロオリゴ糖が生成する。ここでは、200°C領域で可溶化してきたキシラン成分を予め除去しておかないとフルフラールの生成も増大するため、後段のバイオプロセス (酵素反応・醗酵工程) を阻害するおそれがある。

4.2 酵素反応とのハイブリッド処理

コーンコブから水熱反応により可溶化したキシロポリサッカライドにキシラナーゼを作用すると、酵素反応は著しく速くなり、キシロオリゴ糖、キシロースを効率よく回収できる。アルカリや蒸煮処理をしたコーンコブに直接酵素反応させるよりも、キシラナーゼの見かけ上の活性は数十倍に向上するというデータも得られている。また酵素反応特有の反応頭打ち現象も緩和され、収率の向上も期待できる。

一方、190°Cの水熱反応の残渣であるリグノセルロースにセルラーゼ [Driselase, 協和発酵株] を作用させると、酵素反応速度が約8倍程度になるという報告をした^{14,16)}。(図5) これは水熱反応によって細胞壁からヘミセルロースが離脱して二次細胞壁が露出する状態 (図6) になり、セルロースに対する酵素のアクセサビリティが向上するた

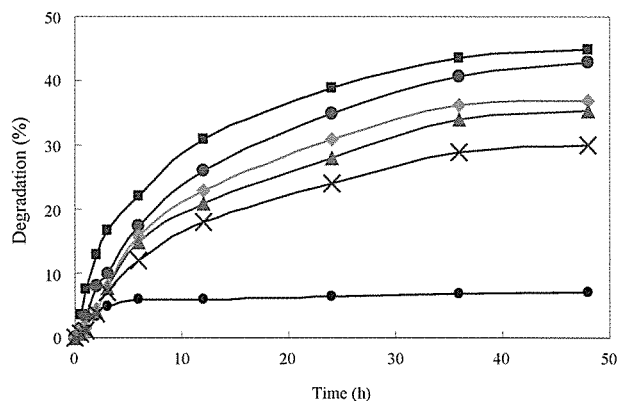


図5. 水熱反応残渣に対するセルラーゼの反応

エノキタケ栽培後の培地 (コーンコブベース) に水熱反応を与え、得られる固形分残渣 (リグノセルロース) に対するセルラーゼの反応を観察したもの。水解率は以下の計算式を適用。水解率 (%) = (還元糖量 (mg)) / (水熱反応残渣 (mg)) × (162 / 180)。水熱反応条件: ●, 100°C (沸騰条件); ■, 180°C; ●, 190°C; ◆, 200°C; ▲, 210°C; ×, 220°C; 反応時間, 10 min。

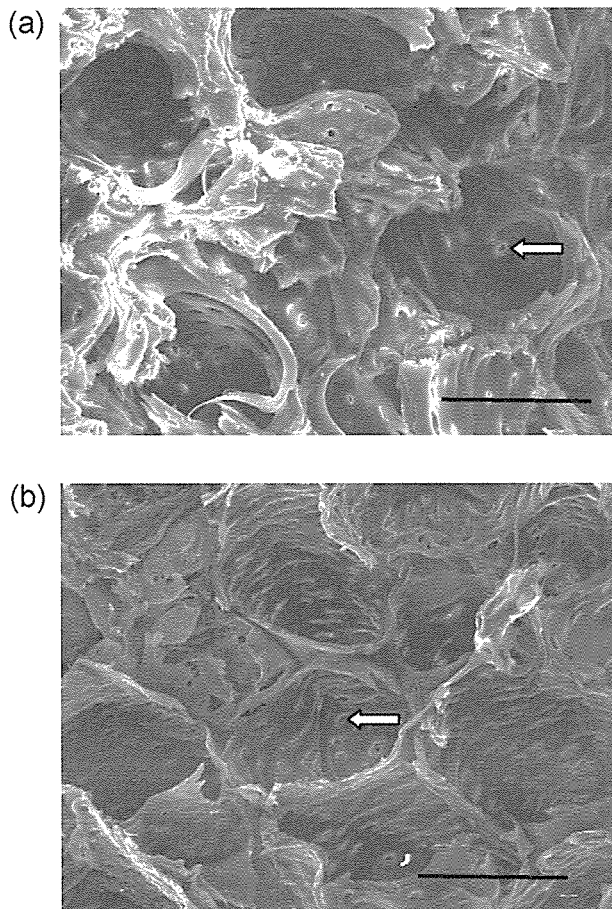


図6. 水熱反応によるコーンコブ細胞壁の形態変化

(a) は反応前, (b) は 190°C, 1.83 MPa, 10 min の水熱反応後の形態。右下のバー長は, 60 μm を示す。矢印部にはコーンコブ細胞壁のピットが観察できる。

めである。この比較的穏やかな水熱反応領域は、セルロースの結晶構造にまで変化を与えるようなエネルギーレベルにはないと考えている¹⁴⁾。

5. 水熱反応を利用した新しい糖質の生産

植物細胞壁を構成する多糖類としては、セルロース以外に様々な種類のヘミセルロースが存在する。ヘミセルロースとしては、主にキシラン、アラバン、ペクチン、グルコマンナン、ガラクトサン、そしてキシログルカンなどが知られている。当研究部門では、国内の製糖産業で回収される比較的まとまったバイオマスであるビートファイバーに対して水熱反応を与え、ペクチン構成成分の分離回収を試みた^{17,18)}。

SUS316 製バッチ式反応器 (50 mL, 耐圧硝子工業株) に 10 wt% のビートファイバー (日本甜菜糖製糖(株)提供) を仕込み、ソルトバス中で 160~190°C, 5~15 min の水熱反応を与え、溶出してくる糖質を追跡したので、その結果を一部紹介したい¹⁸⁾。

160~190°C の水熱反応条件でビートファイバーから可溶化してくる糖質の濃度 (図 7(a)), 遊離またはオリゴ糖にエステル結合しているフェルラ酸の濃度 (図 7(b)) を示した。水熱反応によりビートファイバー由来のフェルラ酸が

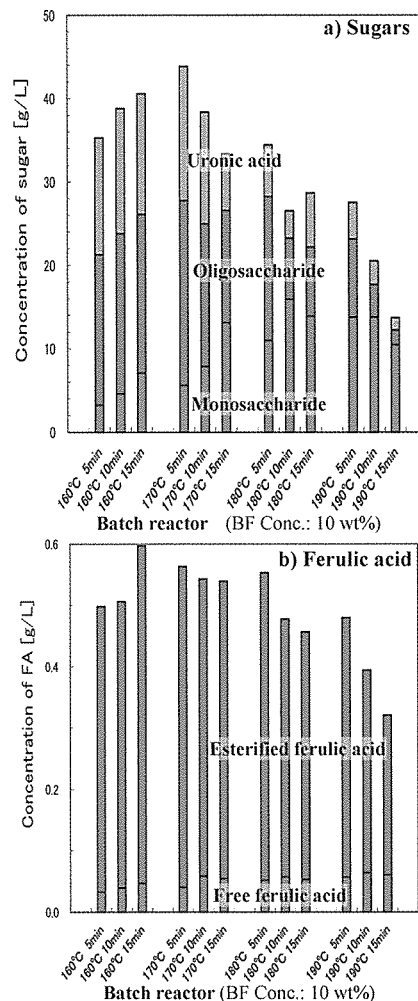


図7. 水熱反応によるビートファイバーの可溶性成分

(a) は糖質の濃度, (b) は遊離およびオリゴ糖にエステル結合したフェルラ酸の濃度を示したもの。170°C, 5 min 水熱反応条件で結合型フェルラ酸の回収率が最大になる。

一部遊離してくるが、そのほとんどがオリゴ糖に結合したまま可溶化してくることがわかった。170°C, 5 min の水熱反応条件でこの糖結合型フェルラ酸の回収率が最大になることがわかる。一方、可溶化してくるオリゴ糖成分の変化については GPC チャートに示した (図 8)。反応条件が過酷になるにつれて高分子側の多糖類の加水分解が進み、DP 2~10 のアラビノオリゴ糖として回収されている。

本試験では連続式水熱反応器を用いても同様のマテリアルバランスが得られており、ビートファイバーに含まれるアラビナン成分の 70% 以上をアラビノオリゴ糖 (フェルロイルアラビノオリゴ糖を含む) として回収することに成功した。フェルロイルアラビノオリゴ糖は、アラビノオリゴ糖鎖にフェルラ酸がエステル結合したもので、その存在は、水熱反応により生成するオリゴ糖成分を疎水性吸着剤によって分画した後、MALDI-TOFMS によって確かめられた¹⁹⁾。

フェルロイルアラビノオリゴ糖はオリゴ糖の持つプレバイオティクスの機能に加え、フェルラ酸の抗酸化機能を持つ物質として注目することができるが、通常の酵素反応プロセスでは、共存するエステラーゼの影響を排除できないため、回収することが難しい成分として知られている。

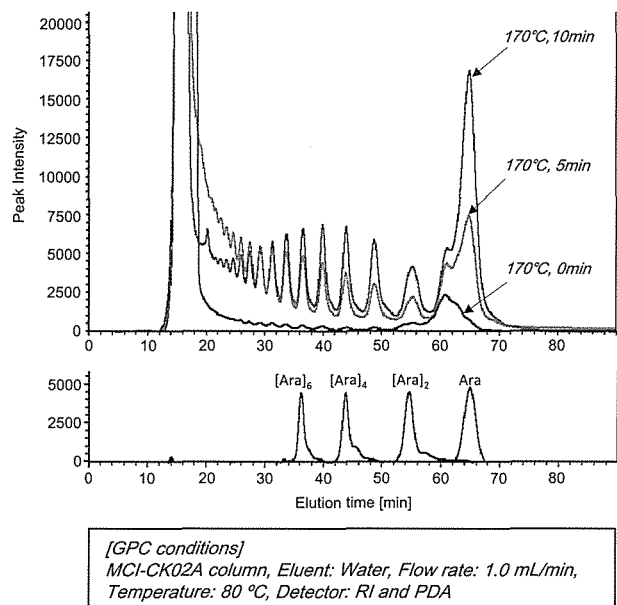


図8. 水熱反応によるビートファイバー可溶化成分のGPCチャート

反応とともに高分子の多糖類は加水分解が進み、DP 2~10のアラビノオリゴ糖として回収される。

以上の研究は、反応条件が精密に制御された水熱反応技術の可能性を示したものであり、今後注目されるべき生産技術であるといえる。

6. おわりに

水熱反応は、反応時間が短く特殊な薬品を使わないので、いくつかの工業的な利点を認めることができる。しかしながら、昇温、冷却工程を高度に制御して材料に対する反応履歴（反応過酷度）を完全に制御できなければ、バイオプロセスに代替するような生産システムにはなりえない。水熱反応は高温高圧下で励起された水の対電子が一種の求核試薬として作用し、バイオマスを構成する糖の構造に直接働きかけるのが特徴である。高温高圧条件における糖鎖の電子密度分布に従って、水熱反応には一定の反応準位が存在するとも考えられる。もし水熱反応条件を緻密に制御できるようになれば、その反応選択性を工業的に利用することも夢ではなくなる。今後は、バイオマス原料の選択や他の溶媒・触媒との組み合わせにより、より穏やかで効率的な反応システムが探求されるべきであるし、反応器を暖めて冷やすという原理を採る以上、工業的な熱回収システムの構築も不可欠である。

今回、紹介させていただいた160~230°Cの比較的穏やかな水熱反応領域は、バイオマス事業における単なる前処理（膨潤処理）技術にとどまらない魅力があり、バイオプロセスとの組み合わせによって積極的に活用されるべきであろう。信州大学工学部物質工学科研究部門（物産フードサイエンス(株)による寄附研究部門）ではこの水熱反応と酵素反応プロセスの最適な組み合わせを「ハイブリッドリアクターシステム」と呼んで実用化研究に取り組んでおり、この場を借りて応用糖質学会ならびに関係機関の皆様の

一層のご指導をお願いしたい。

文献

- 1) 坂 志朗：超臨界流体によるバイオマス研究の試み, *Cel-lulose Commun.*, **5**, 129 (1998).
- 2) 坂 志朗編：バイオマス・エネルギー・環境. アイピーシー, 東京 (2001).
- 3) 水熱科学ハンドブック編集委員会編：水熱科学ハンドブック, 技報堂出版, 東京 (1997).
- 4) W.L. Marshall: Draft release on the ion product of water substance. in *The International Association for the Properties of Water and Steam, in Erlangen, Germany, 14-20 September, 1997*, 1997 International Association for the Properties of Water and Steam, Erlangen (1979).
- 5) W.L. Marshall and E.U. Franck: *Water and steam, their properties, and current industrial application*. J. Strab and K. Sheffler, eds., Pergamon Press, New York, p. 506 (1980).
- 6) M. Uematsu and E.U. Franck: Static dielectric constant of water and steam. *J. Phys. Chem. Ref.*, **9**, 1291-1306 (1980).
- 7) 新井邦夫, 佐古 猛, 福里隆一：超臨界流体の環境利用技術, エヌ・ティー・エス, 東京 (1999).
- 8) 物産フードサイエンス(株), 信州大学共同出願, 榎島 聡, 天野良彦：バイオマス処理用連続式高圧水熱反応装置, 特開2008-253861.
- 9) B Food Science Co., Ltd., Shinshu University 共同出願, S. Makishima and Y. Amano: Continuous high-pressure hydrothermal reaction apparatus for biomass treatment, PCT/JP 2008/055857, 0801001639.
- 10) S. Makishima, M. Mizuno, N. Sato, K. Shinji, M. Suzuki, K. Nozaki, F. Takahashi, T. Kanda and Y. Amano: Development of continuous flow type hydrothermal reactor for hemicellulose fraction recovery from corncob. *Bioresour. Technol.*, **100**, 2842-2848 (2009).
- 11) 木村化工機(株), 池田博史：スラリー液高温高圧反応システムの圧力制御方法, 特許第4843125, 2011-10-14.
- 12) 湯川英明監修：バイオマスエネルギー利用技術. 267-270 (石原光朗分担執筆), シーエムシー出版, 東京 (2006).
- 13) G. Burchhardt and L.O. Ingram: Conversion of xylan to ethanol by ethanologenic strains of *Escherichia coli* and *Klebsiella oxytoca*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 1128-1133 (1992).
- 14) S. Makishima, K. Nozaki, M. Mizuno, E. Netsu, K. Shinji, T. Shibayama, T. Kanda and Y. Amano: Recovery of soluble sugars from waste medium for Enokitake (*Flammulina velutipes*) mushroom cultivation with hydrothermal reaction and enzyme digestion. *J. Appl. Glycosci.*, **53**, 261-266 (2006).
- 15) N. Sato, K. Shinji, M. Mizuno, K. Nozaki, M. Suzuki, S. Makishima, M. Shiroyoshi, T. Onoda, F. Takahashi, T. Kanda and Y. Amano: Improvement in the productivity of xylooligosaccharides from waste medium after mushroom cultivation by hydrothermal treatment with suitable pretreatment. *Bioresour. Technol.*, **101**, 6006-6011 (2010).
- 16) S. Makishima, N. Sato, Y. Takano and Y. Amano: Efficient recovery of β -linked sugar from soft-biomass cell wall with hydrothermal and enzyme hybrid reaction. in *12th Bratislava Symposium on Saccharides*, Institute of Chemistry, Slovak Academy of Sciences, Bratislava, p. 49 (2011).
- 17) Y. Takano, N. Sato, M. Mizuno, K. Nozaki, T. Matsuzawa, T. Kanda and Y. Amano: *59th Annual Meeting of the Japanese Society Applied Glycoscience, Shizuoka, Japan*, Japanese Society Applied Glycoscience, Tokyo, Bp 2-19 (2010).
- 18) N. Sato, Y. Takano, S. Umemura, M. Mizuno, K. Nozaki, T. Matsuzawa, Y. Amano and S. Makishima: *60th Annual Meeting of the Japanese Society Applied Glycoscience, Sapporo, Japan*, Japanese Society Applied Glycoscience, Tokyo, Da-2 (2011).
- 19) N. Sato, Y. Takano, S. Umemura, M. Mizuno, K. Nozaki, T. Matsuzawa, Y. Amano and S. Makishima: Production of feruloylated arabino-polysaccharides and oligosaccharides from beet fiber by using the hydrothermal treatment. in *10th International Symposium on Supercritical Fluids (ISSF 2012)*, San Francisco, L-128 (2012).