Technical Paper

Development of Quality Control Indexes of Feedstock
for Cellulosic Bioethanol ProductionAiko AKIYAMA^{*1}, Tsuyoshi SUZUKI^{*2}, Masahiro NIWA^{*3}, Yasutoshi IGUCHI^{*3},
Akira FUKUDA^{*3}, and Shuichi MIHASHI^{*1}

(Received May 28, 2014)

セルロース系バイオエタノール原料作物の品質管理指標の開発

秋山愛子^{*1}, 鈴木 剛^{*2}, 丹羽雅裕^{*3}, 井口靖敏^{*3}, 福田 明^{*3}, 三橋秀一^{*1}

For producing cellulosic bioethanol stably, quality control indexes of feedstock are required. From the fact that Napiergrass can be harvested throughout the year in tropical region, growth was used as quality control indexes of feedstock. Each Napiergrass which grew 3-7 months at same field was carried out ammonia pretreatment and enzymatic saccharification under the same condition. Enzymatic saccharification efficiency decreased as Napiergrass grew. However, when Napiergrass samples which grew 5 months under various different conditions were compared, enzymatic saccharification efficiency and content of components were obviously different. Therefore, growth was not suitable for quality control indexes. Correlation coefficient between enzymatic saccharification efficiency and each component in Napiergrass was investigated. There was moderately strong correlation between enzymatic saccharification efficiency and lignin content (thioglycolic acid method, TGAL). From the above, TGAL was suitable for quality control indexes of feedstock for cellulosic bioethanol production. Furthermore, multiple linear regression analysis using saccharification efficiency as objective variable and contents of each component as explanatory variables, revealed that saccharification efficiency can be predicted from the contents of TGAL, glucose and crude protein with standard error of 3.50.

セルロース系バイオエタノールを安定に製造するためには、原料植物の品質管理指標が必要である。熱帯では、ネピアグラスを通年で栽培できるため、栽培期間を指標に用いることにした。同じ圃場で3, 4, 5, 6および7ヶ月間栽培したネピアグラスを、それぞれ同じ条件でアンモニア処理を施し酵素糖化を行ったところ、栽培期間が長くなると糖化率は減少した。しかし、栽培条件が異なると、ネピアグラスは同じ栽培期間でも糖化率や成分組成にばらつきが見られたため、栽培期間のみを原料の管理指標とするのは適切ではないと考えられた。そこで、原料の成分組成と糖化率の単相関係数を調べた結果、原料のリグニン（チオグリコール酸法）（以下、TGALと略記）と糖化率にやや強い相関が見られたことから、原料管理の指標にはTGALが適していると考えられた。さらに、糖化率を目的変数、各成分を説明変数として重回帰分析を行ったところ、TGAL、グルコース、粗タンパク質から、標準誤差 3.50 で糖化率を予測できることがわかった。

Key Words

Cellulosic bioethanol, Energy crop, Napiergrass, Ammonia treatment, Saccharification, Lignin

- ※1 The Research Association of Innovative Bioethanol Technology
2-6-3, Otemachi, Chiyoda-ku, Tokyo 100-8162, Japan
- ※2 TOYOTA MOTOR CORPORATION
4-7-1, Meieki, Nakamura-ku, Nagoya-shi, Aichi 450-8711, Japan
- ※3 JX Nippon Oil & Energy Corporation
8, Chidori-cho, Naka-ku, Yokohama-shi, Kanagawa 231-0815, Japan

- ※1 バイオエタノール革新技術研究組合
〒100-8162 東京都千代田区大手町2丁目6番3号
- ※2 トヨタ自動車株式会社
〒450-8711 愛知県名古屋市中村区名駅4丁目7番1号
- ※3 JX 日鉱日石エネルギー株式会社
〒231-0815 横浜市中区千鳥町8番地

1. 緒 言

セルロース系バイオエタノールの原料としてネピアグラスは非常に有望な特性を持っている。バイオマスの生産性が高く、インドネシアなどの熱帯で年間の乾物収量が 50 t/ha 得られるだけでなく、年間を通して栽培・収穫できるため、周年供給が可能である。この特性は、植物を原料にしてエタノールを年間を通じて生産する上で欠かせない重要なポイントである。また、バイオエタノールの原料に用いる植物を栽培する際には、食料生産と競合しないことが求められるが、ネピアグラスは環境ストレス耐性が高く、食用作物の栽培に適さない痩せた土壌でも収量低下が少ないため¹⁾、エネルギー資源作物として大いに期待できる。

さらに、酵素糖化や発酵といったエタノール製造工程においては、高いエタノール収率を得るために、糖含量が多く、かつ、酵素による糖への変換効率が良い原料が求められているが、ネピアグラスの茎部には栽培期間2ヶ月程度でもセルロースが40%近く含まれており²⁾、製造工程の観点からも原料として有望である。

しかし、一般に、ネピアグラスは2ヶ月周期で収穫し飼料利用されるため、エネルギー資源作物として最大収量得るために長期間栽培した場合の成分組成の知見が少ない。また、著者らは、大規模で安定供給が可能なエタノールの一貫製造技術の開発に取り組んでおり、年間20万kL規模のエタノール生産を目指している本プロジェクトでは、一日当たり約2000tの原料を必要とするため、各地の圃場から収穫してくることになる。このため、原料の品質管理が非常に重要となってくるが、上記の理由からどのような指標を用いれば原料管理を適切に行えるのか定かでない。また、本プロジェクトでは、酵素糖化の前処理工程にアンモニア処理を採用している。アンモニア処理の利点は、原料に含まれる多糖や単糖など糖類の水への流出や過分解といった損失が無いことで、原料の糖含量≒アンモニア処理後の糖含量である。つまり、原料の糖含量の多寡が後段のエタノール製造工程に影響を与えるため、原料の品質管理が重要となってくる。そこで本研究では、長期間の栽培によるネピアグラスの成分組成の変化や、栽培期間や成分組成の変化が酵素糖化に与える影響を明らかにするとともに、バイオエタノール原料としての品質管理に適した指標を得ることを目的とした。

2. 実 験

2.1 試 料

インドネシア国ランブン州で栽培条件を変え3, 4, 5, 6および7ヶ月間栽培したネピアグラス (*Pennisetum purpureum* Schumach.) の試料34種類を供試した。栽培地は、条件が異なる8圃場を選択し、ネピアグラスの茎苗を株間50cm、畦間1mで植え付けた。土壌の肥沃度を、コーン等の食用作物の栽培に適した土地をGood、キャッサバ等の原料作物を栽培する土地をNormal、生産性が低下し食料生産が成り立たなくなった土地をキャッサバの収量5t/ha/year以下を目安にPoorと定義した。施肥は、化成肥料と堆肥のいず

れかを用いた。収穫は、ネピアグラスを地際で刈り、地上部全体 (Whole)、または、梢頭部を切除した茎下部 (Bottom) の2種類に調製した。栽培時季は雨季、半乾季、乾季に分類した。栽培条件をTable 1に示す。

2.2 アンモニア処理

低圧二段アンモニア法³⁾で処理した。所定温度・所定量のアンモニア存在下で、原料バイオマス中のヘミセルロース-リグニン間のエステル結合をアミド化開裂させて、エステル開裂処理品を得た。常温で所定量の液体アンモニア存在下で、前記エステル開裂処理品中のセルロースを嵩高いⅢ型へ変態させ、低圧二段アンモニア処理品を得た。

2.2.1 エステルのアミド化開裂処理

Fig. 1に示すような装置を用い、実容量5.35Lの反応器(5L)を用いて化学処理した。試料100gを反応器(5L)に入れ、上部フランジを閉じ、系内を窒素で置換した。大気圧になるまで窒素を排気後、CaCl₂水溶液-ドライアイスを用いて反応器内温が-10℃以下になるまで冷却し、アンモニアポンベの蒸気圧との差圧を利用して、反応器内へアンモニアガスを移送した。パッチカウンター付きのマスフローメーターを用いてアンモニアガスを反応器に52.7NL(40g)供給した。直ちに、反応器内温の制御温度を120℃に設定し、最高温度を155℃に設定した鑄込みヒーターを用いて昇温した。反応器内温が115℃に達した時を処理開始とし、2.5時間処理した。2.5時間の平均温度、圧力を処理温度圧力とした。処理終了後直ちに脱圧し、窒素によってアンモニアを除去し、エステル開裂処理品を得た。

2.2.2 セルロース結晶のⅢ型化処理

Fig. 1に示すような装置を用い、反応器(0.25L)を用いて物理処理した。エステル開裂処理品40gを反応器(0.25L)に入れ、上部フランジを閉じ、処理に先立ち、系内を窒素で置換し、さらに、アンモニアガスで置換した。CaCl₂水溶液-ドライアイスを用いて反応器内温が-30℃以下になるまで冷却し、アンモニアポンベの蒸気圧との差圧を利用して、反応器内へアンモニアガスを移送した。パッチカウンター付きのマスフローメーターを用いてアンモニアガスを反応器に44.8NL(34g)供給した。アンモニア供給後直ちに冷却バスを外し、室温雰囲気下にて1時間結晶膨潤化処理をした。そのときの平均温度、圧力は-8.5℃、0.3MPaであった。処理終了後直ちに脱圧し、最高温度を50℃に設定した鑄込みヒーターを用いて加温しながら、反応槽内温を40℃以下(エステル開裂反応が進行しないことを確認している温度)に制御した状態で、窒素によってアンモニアを除去し、低圧二段アンモニア処理品を得た。

2.3 成分分析

Table 1のネピアグラスについて、成分分析を行った。

灰分率、アルコール・ベンゼン可溶分、クラークソンリグニン、ホロセルロース、 α -セルロース、ヘミセルロースは、いずれも木材の化学成分分析法⁴⁾によって行った。なお、ヘミセルロー

Table 1 Cultivation condition of Napiergrass samples

No.	Location	Land Type	Fertilizer	Growth	Part	Season
1	K1	Normal	Chemical	3 months	Bottom	Semi Dry
2				4 months	Bottom	Semi Dry
3				5 months	Bottom	Semi Dry
4				6 months	Bottom	Semi Dry
5				7 months	Bottom	Semi Dry
6	K2	Normal	Chemical	3 months	Whole	Semi Dry
7				4 months	Whole	Semi Dry
8				5 months	Whole	Semi Dry
9				6 months	Whole	Semi Dry
10				7 months	Whole	Semi Dry
11	K3	Normal	Chemical	3 months	Bottom	Dry
12				4 months	Bottom	Dry
13				5 months	Bottom	Rains
14				5 months	Bottom	Rains
15				5 months	Bottom	Rains
16				5 months	Bottom	Dry
17				5 months	Bottom	Dry
18				5 months	Bottom	Rains
19				5 months	Bottom	Rains
20	KA	Poor	Chemical	5 months	Bottom	Semi Dry
21				5 months	Whole	Semi Dry
22				5 months	Bottom	Dry
23				5 months	Bottom	Dry
24	S	Good	Compost	5 months	Bottom	Semi Dry
25				5 months	Whole	Semi Dry
26			Chemical	5 months	Bottom	Dry
27				5 months	Bottom	Dry
28				6 months	Bottom	Rains
29	L	Poor	Chemical	6 months	Bottom	Rains
30				5 months	Bottom	Dry
31	W	Normal	Chemical	5 months	Bottom	Dry
32				5 months	Bottom	Rains
33	M	Normal	Chemical	5 months	Bottom	Rains
34				5 months	Bottom	Rains

Fig. 1 Ammonia pretreatment equipment

スは、(ホロセルロース) - (α -セルロース) より求めた。

リグニン (チオグリコール酸法) (TGAL) は、Suzuki ら⁵⁾の方法を用いて定量した。

粗タンパク質 (CP), 結合タンパク (BP), 中性デタージェント不溶性タンパク (NCDIP), 中性デタージェント繊維 (NDF), 酸性デタージェント繊維 (ADF), 酸性デタージェントリグニン (ADL), 非繊維性炭水化物 (NFC), 粗脂質 (EE), 粗灰分, Ca, P, Mg, K, 当量比 K/(Ca+Mg), 細胞内容物 (OCC), 総繊維 (OCW), 高消化性繊維 (Oa), 低消化性繊維 (Ob) は、飼料分析法^{6) 7)}に従って分析した。

アセチル基は、NREL 法⁸⁾に従い酢酸を遊離させ、イオンクロマトグラフィーを用いて定量した。

また、Table 1 の原料ネピアグラスだけでなくアンモニア処理後のネピアグラスについても、構成糖分析⁸⁾を行い、硫酸加水分解により生成するグルコース量 (Glc) およびキシロース量 (Xyl) を定量した。

上記成分分析で求めた各成分は全て、未脱脂試料を基準として算出した。

2.4 酵素糖化

アンモニア処理した試料について酵素糖化を行った。アンモニア処理試料 500 mg に、水 7235 μ L, 150 mM 酢酸ナトリウム緩衝液 (pH 5.0) 1500 μ L, 抗生物質 (10 mg/mL シクロヘキシド: 10 mg/mL テトラサイクリン = 6:8) 140 μ L, 酵素剤 Accellerase DUET (ジェネンコア協和) 625 μ L を加え、50°C, 200 rpm で 24 時間振とうして酵素糖化を行った。得られた酵素糖化液を遠心分離して上澄みを回収し、水で適当な濃度に希釈した。バイオセンサー BF-7 (王子計測機器株式会社) を用いてこの希釈液のグルコース濃度を測定し、アンモニア処理試料 500 mg の酵素糖化により得られたグルコース収量 X_1 (mg) を算出した。さらに、アンモニア処理試料単位乾燥重量当たりの硫酸加水分解により生成するグルコース量を X_2 (g/kg dry biomass (BM)) として、C6 糖化率 Y (%) を以下のように定義した。

$$Y (\%) = X_1 (\text{mg}) \div (X_2 (\text{g/kg}) \times 500 (\text{mg}) \div 1000 (\text{g/kg})) \times 100$$

ここで、アンモニア前処理前後で糖類の損失がほとんどないため、アンモニア前処理前後でのグルコース含有率は変化しないとした。

2.5 重回帰分析

C6 糖化率に影響を与える成分を調べるため、重回帰分析を行った。各アンモニア処理条件について、C6 糖化率を目的変数、各成分の定量値を説明変数にして重回帰分析を行った。取り込む説明変数を最大 4 とし、総当たり法により AIC (赤池情報量) が最小となる式を求めた。各成分と栽培条件は相互に独立であるとは限らないため、多重共線性は除去した。

3. 結果と考察

3.1 同一圃場での栽培期間と糖化性

エタノールの生産量は、原料中の成分組成に強く影響されるため、原料植物の栽培条件と原料の品質管理が重要であり、そのためには何らかの指標が必要である。我々が原料として用いているネピアグラスはインドネシアでは年間を通じて収穫できるので、栽培期間を指標として用いることを検討した。

なお、C5 糖を利用できる酵母の開発も行われているが、原料を選ぶ観点からは、利用が容易な C6 糖を多く得られるものの方が価値が高いと考え、本論文においては、主に C6 糖に着目して検討を行った。

まず、同じ K1 圃場で栽培された栽培期間が異なるネピアグラス (Table 1 No. 1 ~ 5) について、同じ条件でアンモニア処理を施し酵素糖化を行った。酵素糖化で得られた C6 糖化率と栽培期間を比較したところ、負の相関があり、栽培期間が長くなると C6 糖化率が減少していた (Fig. 2)。このように栽培期間と C6 糖化率に負の相関が見られたのは、生長するに従って、セルロースやヘミセルロース、リグニンの含有率の増加やタンパク質の減少など、成分組成が変化することと関係していると考えられた。国内の同一圃場 (東京大学大学院農学生命科学研究科附属生態調和農学機構) における栽培期間と成分変化・酵素糖化性については、古久保ら⁹⁾が詳細に検討を行っている。

3.2 様々な圃場での栽培期間と成分の比較

バイオエタノールを製造する際には、大量のバイオマスが必要とすることから、生産圃場や栽培時期が多岐にわたると予想され、栽培期間以外にも様々な条件のもとで栽培されたネピアグラスが原料となる。このため、栽培条件が異なる

Fig. 2 Relationship between growth and enzymatic saccharification efficiency of C6 at single location (K1)

圃場から収穫してきたネピアグラスについても、成分変化やC6糖化率を調べる必要がある。そこで、雨季・乾季や施肥条件、土壌の状態などが異なる圃場から収穫してきたネピアグラスについても、同様にアンモニア処理を施して酵素糖化を行い、栽培期間に対してC6糖化率や成分の変化を調べた。栽培期間とC6糖化率の比較をFig. 3に、栽培期間と主な成分(Glc, Xyl, TGAL, CP)を比較した結果をFig. 4～7に示した。(上記以外の成分も併せて、栽培期間と各成分の単相関係数をTable 2に示した。)なお、雨季・乾季や施肥条件、土壌の状態など栽培期間以外の栽培条件に対しても、C6糖化率や各成分を比較したが、相関は見られなかった。

C6糖化率と栽培期間を比較したところ、同一圃場の場合と同様に、栽培期間が長くなるとC6糖化率が減少する傾向ではあったが、同じ栽培期間でも、例えば5ヶ月ではC6

Fig. 3 Relationship between growth and enzymatic saccharification efficiency of C6 at multiple locations

Fig. 4 Relationship between growth and Glc in Napiergrass at multiple locations

Fig. 5 Relationship between growth and Xyl in Napiergrass at multiple locations

Fig. 6 Relationship between growth and lignin content (TGAL) in Napiergrass at multiple locations

Fig. 7 Relationship between growth and CP in Napiergrass at multiple locations

Table 2 Correlation coefficients between growth and each component in Napiergrass

Components	Correlation coefficient with growth
Ash content	-0.36 *
Alcohol-benzene extractives	-0.15
Klason lignin	0.70 **
Holocellulose	0.20
α -Cellulose	0.53 **
Hemicellulose	-0.56 **
TGAL	0.66 **
CP	-0.49 **
BP	-0.32
NDICP	-0.33
NDF	0.39 *
ADF	0.52 **
ADL	0.29
NFC	-0.09
EE	-0.15
Crude ash	-0.42 *
Ca	0.14
P	-0.26
Mg	-0.52 **
K	-0.04
K/(Ca+Mg)	0.09
OCC	-0.15
OCW	0.27
Oa	-0.58 **
Ob	0.58 **
Acetyl group	0.40 *
Glc	0.60 **
Xyl	0.07

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

糖化率が 61.6 ~ 83.3%と大きくばらついていた。また、成分と栽培期間の比較でも、Glc では 363 ~ 404 g/kg BM, TGAL では 17.4 ~ 25.2%とばらつきが大きく、栽培期間よりも栽培条件が成分組成、糖化率に与える影響が大きいと考えられた。Fig. 2 のように、同じ圃場では C6 糖化率と栽培期間に相関が見られたことから、ネピアグラスの生長と成分の変化に何らかの関係はあると推察されるが、様々な圃場から原料を集めてくる場合は、栽培期間だけを指標として原料を管理することは難しいことが分かった。そこで、原料管理に最適な指標を得るため、成分と C6 糖化率の相関を調べることにした。

3.3 原料の成分と糖化率の比較

原料管理に最適な指標を得るため、原料の各成分と C6 糖化率の単相関係数を求めた。結果を Table 3 に示す。本研究で採用したアンモニアによる前処理に対して、原料成分と糖化率の相関に関する知見がほとんど無いため、草本に適した飼料分析以外に木材の化学成分分析やキシランのアセチル基分析、イネに適した TGAL など併せて実施した。各試料の成分分析の結果と C6 糖化率を Tables 4-1 ~ 4-4 に示す。その中でも C6 糖化率とやや強い相関($|r| > 0.7$)があった成分は、相関の良い順に、TGAL, Ob であった (Figs. 8, 9)。

一般に、リグニンはセルロースへの酵素の接近を妨げ酵素糖化を阻害すると考えられている¹⁰⁾。今回のようなアンモニアによる前処理を施した試料についても、TGAL と C6 糖化率にやや強い負の相関が見られ、既往の知見と一致した。また、ネピアグラスは成長が進むにつれてリグニン含量が増加することが知られており^{11) 12)}、栽培期間との間に負の相関がみられたことと一致する (Fig. 6, Table 2)。Ob は、酵素によって分解しない成分なので、C6 糖化率と負の相関が見られたことは妥当と考えられた。

単相関係数の結果から、原料管理の指標には C6 糖化率と最も相関が強かった TGAL が適していると考えられた。Fig. 8 より TGAL と C6 糖化率の近次式が得られたことから、原料の TGAL を調べるだけで、C6 糖化率をある程度まで予測できる。ただし、今回の実験に用いた酵素剤 DUET は、セルラーゼだけでなくキシラナーゼ等も含む複合酵素であるように、単一の成分が糖化率に影響を与えているのではなく、複数の成分が糖化率に影響を与えていると考えられたため、重回帰分析を行った。C6 糖化率を目的変数、各成分を説明変数とし、取り込む説明変数を最大 4、総当たり法により AIC が最小となる式を求めた。アンモニア処理試料の C6 糖化率 (目的変数) に対して、AIC が最小となった組合せの説明変数や標準偏回帰係数、P- 値の結果を Table 5、得

Table 3 Correlation coefficient between enzymatic saccharification efficiency of C6 and each component in Napiergrass

Components	Correlation coefficient with enzymatic saccharification efficiency of C6
Ash content	0.64 **
Alcohol-benzene extractives	0.05
Klason lignin	-0.61 **
Holocellulose	-0.32
α -Cellulose	-0.64 **
Hemicellulose	0.57 **
TGAL	-0.81 **
CP	0.65 **
BP	0.55 **
NDICP	0.50 **
NDF	-0.49 **
ADF	-0.59 **
ADL	-0.35 *
NFC	0.04
EE	0.07
Crude ash	0.67 **
Ca	-0.04
P	0.35 *
Mg	0.43 *
K	0.35 *
K/(Ca+Mg)	0.17
OCC	0.23
OCW	-0.42 *
Oa	0.58 **
Ob	-0.71 **
Acetyl group	-0.32
Glc	-0.66 **
Xyl	-0.01

* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$

Table 4-1 Enzymatic saccharification efficiency of C6 and each component in Napiergrass samples

No.	Enzymatic saccharification efficiency of C6	Ash content	Alcohol-benzene extractives	Klason lignin	Holocellulose
1	91.3	8.2	7.6	16.3	63.1
2	71.5	6.3	9.6	19.6	63.6
3	63.9	6.4	9.5	20.1	61.3
4	61.6	4.4	10.6	20.7	62.9
5	52.7	5.3	8.4	23.9	62.8
6	84.6	9.3	6.0	17.5	63.8
7	77.9	8.5	7.2	19.0	65.0
8	66.7	6.6	8.0	21.1	62.3
9	65.5	6.6	9.6	20.8	62.1
10	60.3	5.9	8.9	21.0	63.5
11	84.3	7.1	15.8	14.9	58.8
12	75.6	6.7	14.2	17.7	59.9
13	65.4	6.5	10.8	18.3	62.8
14	68.4	6.5	10.8	18.3	62.8
15	65.6	6.5	10.8	18.3	62.8
16	80.4	9.7	12.5	21.0	58.4
17	83.3	9.7	12.5	21.0	58.4
18	69.1	7.4	5.4	19.9	64.2
19	66.9	7.4	5.4	19.9	64.2
20	67.8	3.9	5.4	24.5	64.8
21	73.8	5.1	9.7	21.6	62.5
22	61.6	4.1	14.7	20.9	61.2
23	61.6	4.1	14.7	20.9	61.2
24	71.4	8.7	3.7	21.2	66.1
25	69.1	10.3	4.4	20.5	64.2
26	69.8	5.6	8.5	19.2	63.9
27	72.8	5.8	13.3	18.5	61.3
28	57.5	6.1	5.8	21.3	66.6
29	66.6	6.1	5.8	21.3	66.6
30	75.2	8.3	9.3	18.4	59.5
31	79.2	8.3	9.3	18.4	59.5
32	66.6	5.5	11.6	21.5	62.0
33	68.5	5.5	11.6	21.5	62.0
34	76.0	8.4	3.7	20.1	66.1

Table 4-2 Enzymatic saccharification efficiency of C6 and each component in Napiergrass samples

No.	α -Cellulose	Hemicellulose	TGAL	CP	BP	NDICP	NDF	ADF	ADL
1	34.8	28.3	17.2	3.9	2.0	2.2	76.7	49.6	10.4
2	37.6	26.0	21.3	2.1	1.3	1.3	79.5	56.5	18.7
3	37.0	24.3	24.1	2.0	1.3	1.5	77.9	55.7	14.6
4	38.8	24.2	23.3	1.5	1.0	1.4	83.0	59.9	17.4
5	39.3	23.6	26.2	1.7	1.1	1.5	81.3	60.5	15.7
6	34.5	29.3	17.8	5.1	1.9	2.9	78.7	51.2	9.9
7	37.2	27.7	20.0	3.1	1.5	2.1	81.5	55.9	13.7
8	35.9	26.4	22.9	2.2	1.4	1.6	79.2	55.1	13.8
9	37.6	24.5	21.5	2.2	1.6	1.7	77.9	55.7	17.7
10	38.4	25.1	23.6	2.1	1.5	1.8	79.3	57.4	15.2
11	33.4	25.4	16.2	2.2	1.3	1.4	71.2	46.1	6.9
12	33.5	26.4	18.2	3.2	1.7	2.3	74.3	49.0	10.1
13	37.3	25.5	20.4	1.4	1.2	1.0	77.9	50.5	9.9
14	37.3	25.5	20.4	1.4	1.2	1.0	77.9	50.5	9.9
15	37.3	25.5	20.4	1.4	1.2	1.0	77.9	50.5	9.9
16	32.3	26.1	17.4	2.4	1.6	1.8	76.2	49.1	8.6
17	32.3	26.1	17.4	2.4	1.6	1.8	76.2	49.1	8.6
18	37.1	27.1	23.8	2.5	1.5	1.5	78.8	56.3	10.7
19	37.1	27.1	23.8	2.5	1.5	1.5	78.8	56.3	10.7
20	39.0	25.8	25.2	2.8	1.9	2.4	86.3	66.6	24.1
21	37.4	25.0	22.2	3.9	2.3	2.3	82.0	61.1	22.9
22	37.8	23.4	22.5	1.5	1.1	1.4	78.8	57.2	13.8
23	37.8	23.4	22.5	1.5	1.1	1.4	78.8	57.2	13.8
24	41.3	24.8	21.8	2.7	1.5	2.0	83.5	63.0	26.9
25	39.6	24.6	20.5	4.0	1.8	2.0	80.0	58.2	18.9
26	40.8	23.1	21.0	1.9	0.9	1.3	81.0	59.6	12.9
27	38.8	22.5	19.8	1.8	0.9	1.5	76.5	57.2	12.0
28	41.6	25.0	21.3	1.9	1.2	1.6	82.6	62.4	13.3
29	41.6	25.0	21.3	1.9	1.2	1.6	82.6	62.4	13.3
30	34.8	24.7	19.6	3.7	1.8	1.8	73.4	51.4	10.4
31	34.8	24.7	19.6	3.7	1.8	1.8	73.4	51.4	10.4
32	37.3	24.8	22.5	1.9	1.1	1.6	82.2	60.0	13.2
33	37.3	24.8	22.5	1.9	1.1	1.6	82.2	60.0	13.2
34	39.6	26.5	21.5	2.7	1.6	2.0	80.6	57.4	10.7

Table 4-3 Enzymatic saccharification efficiency of C6 and each component in Napiergrass samples

No.	NFC	EE	Crude ash	Ca	P	Mg	K	K/(Ca+Mg)
1	12.0	1.0	8.6	0.2	0.1	0.4	0.8	0.4
2	11.9	1.2	6.6	0.2	0.0	0.3	0.4	0.3
3	15.1	0.7	5.8	0.2	0.0	0.2	0.7	0.7
4	11.6	0.9	4.4	0.1	0.0	0.2	0.5	0.6
5	13.2	0.7	4.6	0.2	0.0	0.2	0.4	0.5
6	9.5	0.7	8.9	0.0	0.1	0.3	1.2	1.1
7	9.2	0.7	7.6	0.3	0.1	0.3	0.7	0.5
8	12.3	1.0	6.9	0.2	0.0	0.2	0.8	0.8
9	14.4	0.8	6.4	0.2	0.0	0.2	0.7	0.8
10	13.4	0.8	6.2	0.2	0.0	0.2	0.4	0.4
11	19.0	1.3	7.7	0.1	0.1	0.3	0.6	0.5
12	16.7	1.2	6.9	0.1	0.1	0.2	0.7	0.9
13	14.2	0.9	6.6	0.3	0.0	0.2	0.9	0.7
14	14.2	0.9	6.6	0.3	0.0	0.2	0.9	0.7
15	14.2	0.9	6.6	0.3	0.0	0.2	0.9	0.7
16	13.3	1.1	8.8	0.3	0.0	0.2	1.3	1.0
17	13.3	1.1	8.8	0.3	0.0	0.2	1.3	1.0
18	12.0	0.8	7.4	0.3	0.1	0.3	0.8	0.6
19	12.0	0.8	7.4	0.3	0.1	0.3	0.8	0.6
20	8.7	0.7	3.9	0.2	0.0	0.2	0.3	0.3
21	10.4	1.0	5.0	0.2	0.1	0.2	0.4	0.4
22	14.8	1.0	5.3	0.1	0.0	0.1	0.3	0.4
23	14.8	1.0	5.3	0.1	0.0	0.1	0.3	0.4
24	6.7	0.8	8.3	0.2	0.1	0.2	1.4	1.5
25	6.9	1.0	10.1	0.3	0.2	0.2	1.8	1.6
26	11.6	0.8	6.0	0.0	0.1	0.1	1.0	3.5
27	16.0	1.1	6.1	0.0	0.1	0.1	1.0	2.5
28	9.8	1.2	6.1	0.2	0.2	0.1	1.3	2.1
29	9.8	1.2	6.1	0.2	0.2	0.1	1.3	2.1
30	14.5	0.7	9.5	0.2	0.0	0.1	2.5	4.6
31	14.5	0.7	9.5	0.2	0.0	0.1	2.5	4.6
32	10.7	1.6	5.2	0.2	0.0	0.1	0.9	1.3
33	10.7	1.6	5.2	0.2	0.0	0.1	0.9	1.3
34	9.3	1.0	8.4	0.1	0.2	0.1	1.1	2.6

Table 4-4 Enzymatic saccharification efficiency of C6 and each component in Napiergrass samples

No.	OCC	OCW	Oa	Ob	Acetyl group	Glc	Xyl
1	14.8	76.6	15.1	61.6	2.1	354.6	208.0
2	13.6	79.8	8.9	70.9	2.3	365.4	176.7
3	19.4	74.8	0.4	74.4	2.1	382.7	203.4
4	16.5	79.1	3.7	75.4	2.5	394.2	182.0
5	15.1	80.4	0.5	79.9	2.2	390.2	224.3
6	15.3	75.8	11.6	64.1	1.5	371.5	198.9
7	12.1	80.3	6.9	73.4	2.0	359.0	194.7
8	16.8	76.3	3.3	73.0	1.9	366.2	189.5
9	16.7	76.9	2.5	74.4	2.1	398.2	180.1
10	17.6	76.2	0.2	76.1	2.3	380.0	183.0
11	22.8	69.6	6.0	63.6	1.9	360.3	174.7
12	20.3	72.8	4.7	68.1	1.9	356.5	173.2
13	22.4	71.0	3.4	67.6	2.1	402.4	191.5
14	22.4	71.0	3.4	67.6	2.1	402.4	191.5
15	22.4	71.0	3.4	67.6	2.1	402.4	191.5
16	21.4	69.7	6.3	63.5	2.3	362.5	192.7
17	21.4	69.7	6.3	63.5	2.3	362.5	192.7
18	18.1	74.5	2.5	72.0	2.1	380.4	193.8
19	18.1	74.5	2.5	72.0	2.1	380.4	193.8
20	11.5	84.6	1.9	82.7	2.1	392.5	180.2
21	15.0	80.0	0.3	79.7	2.2	374.1	172.7
22	16.0	78.8	2.8	76.0	2.3	385.6	174.4
23	16.0	78.8	2.8	76.0	2.3	385.6	174.4
24	10.0	81.8	4.9	76.9	1.5	400.7	188.9
25	15.4	74.5	1.0	73.6	1.2	392.4	183.8
26	15.6	78.4	1.1	77.3	2.0	404.2	173.2
27	18.4	75.6	4.5	71.1	2.0	384.2	168.3
28	9.4	84.6	8.5	76.1	2.3	418.0	185.0
29	9.4	84.6	8.5	76.1	2.3	418.0	185.0
30	21.8	68.7	3.3	65.4	2.0	377.4	184.1
31	21.8	68.7	3.3	65.4	2.0	377.4	184.1
32	12.4	82.4	5.3	77.1	2.3	387.9	177.0
33	12.4	82.4	5.3	77.1	2.3	387.9	177.0
34	13.4	78.3	3.2	75.1	2.0	382.8	178.9

Fig. 8 Relationship between lignin content (TGAL) in Napiergrass and enzymatic saccharification efficiency of C6

Fig. 9 Relationship between Ob in Napiergrass and enzymatic saccharification efficiency of C6

Table 5 Result of multiple regression analysis using enzymatic saccharification efficiency of C6 as a objective variable

Explanatory variables	Coefficients	Standard partial regression coefficient	p-value
Intercept	159.88		1.0E-10
TGAL (%)	-2.06	-0.58	6.0E-08
Glc (g/kg BM)	-0.14	-0.27	0.003
CP (%)	2.76	0.30	0.001
AIC		-57.68	
Multiple R		0.92	
R Square		0.85	
Adjusted R Square		0.83	
Standard Error		3.50	
Observations		34

Fig. 10 Relationship between measured and predicted enzymatic saccharification efficiency of C6

られた予測式を式 (1) に示す。

$$Y = -2.06X_1 - 0.14X_2 + 2.76X_3 + 159.88 \quad (1)$$

(C6 糖化率を Y (%), TGAL を X_1 (%), Glc を X_2 (g/kg BM), CP を X_3 (%)) とする)

式 (1) から求めた C6 糖化率の予測値と実測値の相関を Fig. 10 に示す。この予測式を用いると標準誤差 3.50 で、原料成分から C6 糖化率を予測できる。

また、式 (1) は、C6 糖化率に対して TGAL と Glc は負の相関、CP は正の相関があることを示している。単相関係数の結果と同様に、リグニン量が増えるとセルロースへの酵素の接近を妨げ酵素糖化を阻害するため、TGAL は負の相関になっていると考えられる。Glc や CP については、式 (1) によると Glc が少なく、CP が多い試料が高い C6 糖化率を得られると示されている。栽培期間との比較で Glc は弱い負の相関、CP は弱い正の相関が見られたことから (Figs. 4, 7, Table 2), Glc が少なく CP が多い試料は生育が進んでいない若い組織と考えられ、同一圃場での栽培期間と糖化率の比較では栽培期間が短い方が C6 糖化率が高かったことから (Fig. 2), 若い組織からは高い C6 糖化率が得られると推

察されるので、式 (1) で Glc が負の相関、CP が正の相関となったことは妥当と考えられた。ただし、栽培期間が短いものが若い組織とは限らないことが Figs. 4 ~ 7 で示されている。TGAL と Glc が少なく、CP が多い原料を用いれば、高い C6 糖化率が得られると導き出されるので、このような成分組成の原料を得られる栽培条件が分かれば、原料管理にさらに役立つと期待できる。

4. 結 論

同じ圃場で栽培されたネピアグラスでは、栽培期間と C6 糖化率に負の相関が見られ、栽培期間が長くなるにつれ酵素糖化性が下がった。これまで成分分析の結果は、栽培期間が 2 ヶ月までのものしかなかったが、栽培期間 3 ヶ月から 7 ヶ月の間のネピアグラスの成分分析を行うことにより、長期間の栽培により TGAL と Glc は増加する傾向が見られ、Xyl はあまり増加しない、また、CP は減少傾向になることが明らかとなった。しかし、同じ栽培期間でも圃場が異なるとグルコース含量や TGAL に差が見られ、糖化率もばらつきが大きいため、栽培期間は原料管理の指標には適切ではないことが示された。

原料の各成分と C6 糖化率の単相関係数を調べたところ、原料の TGAL とアンモニア処理後の C6 糖化率にやや強い相関が見られたことから、原料管理の指標には TGAL が適していると考えられた。加えて、重回帰分析の結果から、TGAL, Glc, CP の 3 指標を用いれば、C6 糖化率をさらに精度良く予測できると考えられ、これらを原料管理の指標として用いれば、原料の TGAL, Glc, CP を調べるだけで酵素糖化工程における糖化率が予測できるだけでなく、さらには予測糖化率と Glc を使って糖収量も導き出せるため、バイオエタノール製造全体の生産管理にも役立つと期待できる。

謝 辞

本研究は (独) 新エネルギー・産業技術研究開発機構 (NEDO) からの受託事業「セルロース系エタノール革新的生産システム開発事業」として実施したものである。本研究を遂行するにあたり、材料の提供に尽力いただいた PT トヨタ・バイオ・インドネシアの各氏、イネ科植物の分析法を指導いただいた農業・食品産業技術総合研究機構作物研究所の近

藤始彦氏, 荒井裕見子氏, 趙鋭氏ほか関係各位に感謝申し上げます。

文 献

- 1) Yasutani, I.; Suzuki, T.; Matui, K.; Ogawa, H.; Morita, E.; Morita, S., Baiomasu Kagaku Kaigi Happyou Ronbunshu, 7, p. 118 (2012): 保谷泉, 鈴木剛, 松井邦夫, 小川浩司, 守田英太郎, 森田茂紀, 第7回バイオマス科学会議論文集, p. 118 (2012)
 - 2) Miyagi, E., *Grassl. Sci.*, **29**(3), 232-240 (1983): 宮城悦生, 日本草地学会誌, **29**(3), 232-240 (1983)
 - 3) Niwa, M.; Iguchi, Y.; Isomura, Y.; Uemura, T.; Aoyagi, K.; Mihashi, S., Baiomasu Kagaku Kaigi Happyou Ronbunshu, 7, p. 120(2012): 丹羽雅裕, 井口靖敏, 磯村佳功, 上村毅, 青柳健一, 三橋秀一, 第7回バイオマス科学会議論文集, p. 120 (2012)
 - 4) The Japan Wood Research Society Ed., Mokushitsu Kagaku Jikken Manual, Buneido-shuppan, (2000): 日本木材学会編, 木質科学実験マニュアル, 文永堂出版, (2000)
 - 5) Suzuki, S.; Suzuki, Y.; Yamamoto, N.; Hattori, T.; Sakamoto, M.; Umezawa, T. *Plant Biotechnol.*, **26**, 337-340 (2009)
 - 6) Jikyu Shiryou Riyou Kenkyukai Ed., Soshiryou no Hinshitu Guidebook, 3rd ed, Japan Grassland Agriculture and Forage Seed Association, (2009): 自給飼料利用研究会編, 粗飼料の品質評価ガイドブック, 三訂版, 日本草地畜産種子協会, (2009)
 - 7) Food and Agricultural Materials Inspection Center and Shiryou Bunseki Kijun Kenkyukai Ed., Shiryou Bunsekihou Kaisetsu I, Japan Scientific Feeds Association, (2009): 独立行政法人農林水産消費安全技術センター・飼料分析基準研究会編, 飼料分析法・解説 I, 日本科学飼料協会, (2009)
 - 8) Sluiter, A.; Hames, B.; Ruiz, R.; Scarlata, C.; Sluiter, J.; Templeton, D.; Crocker, D., Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass, Laboratory analytical procedure, (2008)
 - 9) Kokubo, M.; Kurosawa, M.; Yamashita, T.; Sakuragi, K.; Shiotsu, F.; Igarashi, K.; Morita, S.; Samejima, M., *J. Jpn. Inst. Energy* (submitted): 古久保美樹, 黒澤美幸, 山下達也, 櫻木潔, 塩津文隆, 五十嵐圭日子, 森田茂紀, 鯨島正浩, 日本エネルギー学会誌 (投稿中)
 - 10) Chen, F.; Dixon, R. A., *Nature biotechnology*, **25**(7), 759-761 (2007)
 - 11) Tanaka, S.; Ito, K.; Miyagi, E.; Inanaga, S., *Jpn. J. Crop Sci.*, **58**(4), 562-568 (1989): 田中重行, 伊藤浩司, 宮城悦生, 稲永忍, 日本作物學會紀事, **58**(4), 562-568 (1989)
 - 12) Tsuruta, S.; Akashi, R.; Kawamura, O.; Numaguchi, H., *Grassl. Sci.*, **47**(6), 604-609 (2002): 鶴田真一, 明石良, 川村修, 沼口寛次, 日本草地学会誌, **47**(6), 604-609 (2002)
-