

# 木質バイオマス蒸留液を用いた防菌・防藻製品の開発(第1報)

足立良富、横山慎一郎、棚橋光彦<sup>1</sup>

Development of antibacterial and antialgae product using wood biomass distillation (I)

Yoshitomi ADACHI, Shin-ichiro YOKOYAMA and Mitsuhiro TANAHASHI<sup>1</sup>

スギおよびヒノキ枝葉の蒸留液の高度利用を目的に、抗菌機能の評価を行った。その結果、スギおよびヒノキ枝葉の140℃高圧水蒸気圧搾蒸留にて得られる蒸留液に、大腸菌に対する抗菌活性が見られた。しかし、枯草菌等の細菌および真菌であるマラセチア菌に効果は見られなかった。抗菌活性の見られた蒸留液について、固相マイクロ抽出ーガスクロマトグラフ質量分析により、揮発性成分を類推したところ、一部抗真菌性の知られる化合物の存在が見られたが、香料などに利用されている化合物がほとんどを占めていた。そのため抗菌活性成分は未知の化合物か、今回の分析法では検出できなかった極性の高い、もしくは難揮発性の化合物であると考えられる。

## 1. はじめに

資源の循環的、効率的利用を進め、環境に対する負荷の小さい社会を築いていくため、木質バイオマスの利活用が進められている。我々は、これまでに高圧水蒸気圧搾蒸留法を用いて、スギ・ヒノキ枝葉から精油と固形燃料を同一工程で生産する技術を開発した<sup>1-3)</sup>。蒸留で得られる精油や、水層の蒸留液(アロマウォーター)は、天然アロマ素材として嗜好品利用が一般的であるが、アロマ分野には多くの企業が参入しており、価格競争等による収益性の低下も想定される。そこで精油や蒸留液を用いた新規利用分野の開拓が望まれている。

精油に関してはすでに多くの研究がなされているが、蒸留液にも抗菌効果等の機能を持つ種々の有効成分が含まれると考えられることから、本研究ではスギ・ヒノキ蒸留液の抗菌活性についての評価と有効成分の分析を行った。

## 2. 実験方法

### 2. 1 蒸留液

高圧水蒸気圧搾蒸留は、木材圧縮成形装置 (Type HVI-40/58, Hisaka Works Ltd.) に蒸気回収弁、冷却装置、沈殿槽を取り付けたものを用いて行った。スギおよびヒノキ生葉各500gを、高圧釜内の温度(水蒸気圧)140℃(0.3MPa)および180℃(1.0MPa)条件下で蒸留・圧縮し、その蒸留成分から精油を除いた水層を蒸留液として、以降の実験に用いた。

常圧蒸留は PureStiller Standard/M (Type SHJK25L, Kohga International Trading Co., Ltd.) を使用して、スギおよびヒノキ生葉を5時間蒸留し、回収成分の水層を蒸留液とした。

### 2. 2 供試菌株および抗菌試験

抗菌試験には *Escherichia coli* ATCC 14948 (大腸菌)、*Bacillus subtilis* ATCC 6051 (枯草菌)、*Corynebacterium xerosis* JCM 1971 (コリネバクテリウム)、*Staphylococcus*

*epidemicus* JCM 2424 (表皮ブドウ球菌)、*Propionibacterium acnes* JCM 6425 (アクネ菌)、*Malassezia dermatis* JCM 11348 (マラセチア菌) を用いて、ペーパーディスク法にて生育阻止円形成の有無を調べた。

*E. coli* は、LB液体培地 (Invitrogen, Thermo Fisher Scientific Inc.) にて25℃で24時間振とう培養し、固まらない温度まで冷ましたLB寒天培地にその1/50量となるよう培養液を添加して、シャーレに固めたものを試験プレートとした。*B. subtilis* は、培地にトリプティックソイブイオン (Difco, Becton, Dickinson & Co.) を用いて、*E. coli* 同様に試験プレートを作成した。

スギおよびヒノキ蒸留液、および滅菌水を用いて1/10と1/100に希釈した蒸留液をそれぞれ50 μL含浸させたペーパーディスク(8mm径)を調製し、試験プレートに置いて25℃で24時間培養した。

*C. xerosis* と *S. epidemicus* は、MIC(感受性)測定用ブイオン (Nissui Pharmaceutical Co., Ltd.) にて24時間振とう培養した後、同培地で1/20に希釈し、同寒天培地に塗付して試験プレートとした。試験プレート上に140℃蒸留液50 μLを含浸させたペーパーディスクを置き、*C. xerosis* は30℃で5日間、*S. epidemicus* は37℃で30時間培養した。

*P. acnes* は、GAMブイオン (Nissui) を用いて37℃下にて24時間嫌気培養した後、同培地で1/10に希釈し、同寒天培地に塗付して試験プレートとした。試験プレート上に140℃蒸留液を含浸させたペーパーディスクを置き、37℃にて30時間嫌気培養した。

*M. dermatis* は、MLN培地(1L当りGlucose 10g、Yeast extract (Difco) 2g、Oxgall (Difco) 8g、Glycerol 10mL、Glycerol monostearate 0.5g、Tween 80 5mL、オリーブオイル20mL)を用いて24時間培養し、同培地で1/20に希釈し、クロモアガーマラセチア/カンジダ寒天培地 (Kanto Chemical Co., Inc.) に塗付して試験プレートとした。試験プレート上に140℃蒸留液を含浸させたペーパーディスクを置き、32℃にて3日間培養した。

<sup>1</sup>飛騨産業(株)

### 2. 3 ガスクロマトグラフ質量分析

蒸留液中の揮発性成分について、固相マイクロ抽出法を利用してガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)による分析を行った。ジビニルベンゼン分散ポリジメチルシロキサンとCarboxen分散ポリジメチルシロキサンの2層がコートされた固相(DVB/CAR/PDMS、Supelco、Sigma-Aldrich Co. LLC.)を、140℃で蒸留したヒノキ蒸留液20mLに5分間浸漬し、揮発性成分を吸着させ、GC/MS(GCMS-QP2010Plus、Shimadzu Co.)に導入した。GC/MSの分析条件は表1のとおりである。得られたクロマトグラムより、主要なピークについてマススペクトルデータベース(NIST08, NIST08s, Wiley8)を用いて成分を類推した。

表1 ガスクロマトグラフ質量分析条件

GC	
カラム	Rtx-5MS (RESTEK) 30m x 0.25mm I.D., df = 0.25µm
オープン温度	50℃(2min)-5℃昇温/min-250℃(5min)
キャリアガス	He
注入口温度	250℃
注入法	スプリット 1:20
カラム流量	1mL/min
線速度	36.3cm/s
MS	
イオン化方法	EI
イオン源温度	230℃
インターフェース温度	250℃
質量走査範囲	m/z 29-400

### 3. 結果及び考察

#### 3. 1 抗菌活性について

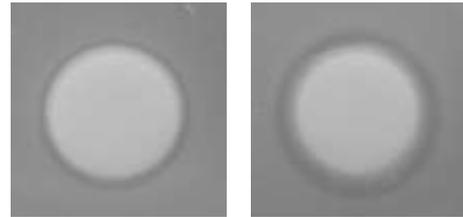
蒸留条件の異なる蒸留液を用いて、*E. coli* と *B. subtilis* に対する抗菌活性を、生育阻止円の有無により評価した。その結果、*E. coli* に対してスギおよびヒノキの140℃蒸留液原液にのみ、生育阻止円が見られた(表2、図1)。一方、*B. subtilis* に対しては、いずれの蒸留液にも抗菌活性は確認されなかった。

衛生・デオドラント用品への利用を想定し、関連した菌種について抗菌試験を行った。*C. xerosis*は腋臭、*S. epidemidis*は体臭、*P. acnes*はニキビ、*M. dermatis*は脂性

表2 *E. coli* に対する抗菌活性

枝葉	希釈	蒸留条件		
		常圧	140℃高压	180℃高压
スギ	×1	—	+	—
	×10	—	—	—
	×100	—	—	—
ヒノキ	×1	—	+	—
	×10	—	—	—
	×100	—	—	—

+: 生育阻止円有り - : 阻止円無し



試験液 DW 140℃ヒノキ蒸留液  
生育阻止円 無し 有り

図1 *E. coli* に対する抗菌活性

フケの原因と考えられている。なお本試験で用いた真菌は、*M. dermatis* のみである。これらの菌種を用いて、スギおよびヒノキの140℃蒸留液の抗菌性を評価したが、どの菌種に対しても抗菌活性は見られなかった(表3)。

表3 グラム陽性菌および真菌に対する抗菌活性

菌種(関連している症状)	スギ蒸留液	ヒノキ蒸留液
<i>Corynebacterium xerosis</i> (腋臭)	—	—
<i>Staphylococcus epidemidis</i> (体臭)	—	—
<i>Propionibacterium acnes</i> (ニキビ)	—	—
<i>Malassezia dermatis</i> (フケ)	—	—

+: 生育阻止円有り - : 阻止円無し

*C. xerosis*, *S. epidemidis*, *P. acnes* は、同様に抗菌活性が見られなかった。*B. subtilis* と同じグラム陽性細菌であり、抗菌活性が見られた *E. coli* はグラム陰性細菌あることから、蒸留液はグラム陰性細菌に有効である可能性が示された。今後の抗菌スペクトルの調査に反映させたい。

また、抗菌活性は140℃蒸留液の原液でのみ見られ、活性も弱いため、その利活用には有効成分を同定した上で、抽出や濃縮等の操作が必要と考えられる。

#### 3. 2 揮発性成分の分析

*E. coli* に対する抗菌性の有効成分について情報を得るため、固相マイクロ抽出-GC/MS法を用いて、蒸留液中の揮発性成分に関する解析を行った。図2に140℃におけるヒノキ蒸留液を分析した総イオンクロマトグラムを示す。

主要な10成分について、マススペクトルデータベースにより化合物を類推した(表4)。どの成分のマススペクトルも類似度は90以上であった。類推された化合物について機能性や利用について調査したところ、ピーク番号1から7のモノテルペン類は主に香料等として利用される化合物で、抗菌性を有しないことが明らかとなっている。ピーク番号9および10のEudesmolには、抗ダニ性や抗真菌性についての報告例はあるが、抗細菌性については認められていない<sup>4)</sup>。Elemol(ピーク番号8)を約10%含むイヌガシ由来の精油では、*P. acnes*に対する抗菌活性が報告されている<sup>5)</sup>が、本蒸留液には当該抗菌活性は見られなかった。

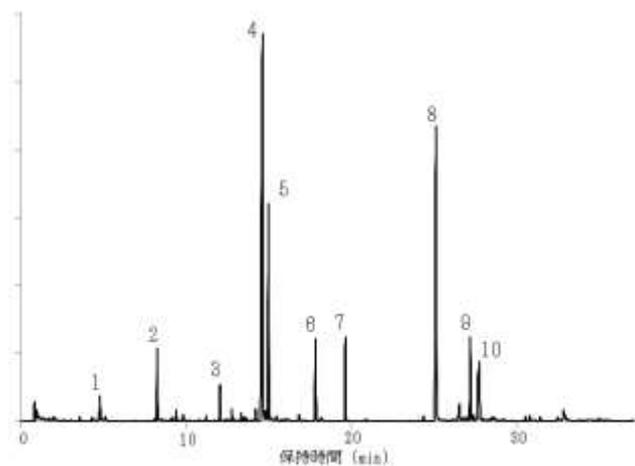


図2 固相マイクロ抽出-GC/MSによる蒸留液中揮発性成分の分析

表4 140℃ヒノキ蒸留液中の揮発性成分

保持時間	類推される物質	特徴、利用分野など
1	5.21 3-Hexen-1-ol	青葉アルコール、青臭い特有の香気
2	8.61 3-Octenol	マツタケアルコール、虫の誘引
3	12.35 Linalool	香料
4	14.88 δ-Terpineol	香料、化粧品や石鹸などへの添加物
5	15.23 α-Terpineol	香料、化粧品や石鹸などへの添加物
6	18.04 α-Fenchyl acetate	香料
7	19.81 α-Terpineol acetate	香料、化粧品や石鹸などへの添加物
8	25.21 Elemol	抗炎症作用
9	27.25 β-Eudesmol	抗ダニ、抗真菌
10	27.72 γ-Eudesmol	抗ダニ、抗真菌

以上の結果より、*E. coli* に抗菌活性を示す成分は未知の化合物である可能性が考えられる。また、本試験で用いた吸着相DVB/CAR/PDMSは、炭素数3から20の揮発性化合物を主な捕集対象としている。本試験で見られた抗菌性の成分は、今回用いた吸着相には適合しない極性の高い、も

しくは難揮発性の化合物であることも考えられる。

#### 4. まとめ

スギおよびヒノキ枝葉の蒸留液の新規利用を検討するため、蒸留液の抗菌機能についての評価と有効成分の分析を行った結果、次のような知見を得た。

- ・スギおよびヒノキ枝葉の140℃蒸留液に、*E. coli* に対する抗菌活性が見られた。しかし、*B. subtilis* 等のグラム陽性細菌および*M. dermatis*に効果は見られなかった。
- ・固相マイクロ抽出-GC/MS分析により、ヒノキ140℃蒸留液中の抗細菌性成分について分析したところ、抗細菌活性の知られる既知の化合物は見られなかった。
- ・蒸留液中の抗細菌性成分は、未知の化合物か、今回の分析では検出できなかった極性の高い、もしくは難揮発性化合物であることが考えられる。

#### 【謝 辞】

試料となるスギおよびヒノキ枝葉を提供頂きました、岐阜県森林研究所の古川邦明所長並びに上辻敏久専門研究員に深謝いたします。

#### 【参考文献】

- 1) 横山慎一郎ら、岐阜県産業技術センター研究報告, 7, pp.10-13, 2013.
- 2) 横山慎一郎ら、岐阜県産業技術センター研究報告, 8, pp.36-39, 2014.
- 3) 横山慎一郎ら、環境技術, 9, pp.26-34, 2015.
- 4) 森満範ら、北海道立総合研究機構林産試験場報, 14巻1号, pp.1-5, 2000.
- 5) Kim S.S. *et al.*, *Nat. Prod. Commun.*, 6(8), pp.1193-1198, 2011.