

# 木質バイオマス蒸留液を用いた防菌・防藻製品の開発(第2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 (II)

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、防藻活性について評価を行った。その結果、スギ枝葉から180℃の高圧水蒸気圧搾蒸留にて得られる蒸留液に、藍藻 (*Oscillatoria laetevirens* Gomont NIES-31) に対する増殖抑制がみられた。続いて緑藻 (*Chlorella vulgaris* Beijerinck var. *vulgaris* NIES-227) への180℃蒸留液の防藻活性を評価したところ、ヒノキおよびスギ蒸留液共に増殖抑制がみられたが、スギ蒸留液がより強い活性を示した。逆相カラムを用いて、スギ180℃蒸留液より有効成分の分画を試みたが、通過画分に防藻活性がみられたことから、有効成分は極性の高い化合物であると推察される。

## 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等の蒸留成分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蒸留液(アロマウォーター)は、嗜好品としての利用が一般的であるが、アロマ嗜好品市場には多くの企業が参入しており、今後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機能製品の開発が望まれている。

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。本研究では、これまでに蒸留液の抗菌活性についての評価を行い、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を見出している<sup>4)</sup>。しかしその活性は低く、抗菌スペクトルは狭いものがあった。そこで本年度は、蒸留液の防藻活性についての評価と有効成分の解析を行った。

## 2. 実験

### 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枝葉各500 gを、高圧釜内の温度(水蒸気圧)140℃ (0.3 MPa) および180℃ (1.0 MPa) 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。

### 2.2 供試藻類株および防藻試験

試験には *Oscillatoria laetevirens* Gomont NIES-31 (藍藻、藍色細菌: コレモ) と、*Chlorella vulgaris* Beijerinck var. *vulgaris* NIES-227 (緑藻: クロレラ) を用いて、光環境下での

<sup>1</sup> 飛騨産業(株)

増殖抑制効果を評価した。

*O. laetevirens* は、MDM寒天培地(表1)にて22℃、6.3  $\mu$  mol photons/m<sup>2</sup>/秒の連続光下で、藻糸が培地全面に広がるまで培養したものをを用いた。固化しない温度まで冷ましたMDM寒天培地に、pH 8.0に調整したスギおよびヒノキ蒸留液、および滅菌水(対照)を1/10量となるよう添加した。12穴シャーレ2枚(計24穴)を添加液別に8穴ずつ分けし、1穴あたり4 mL を分注して試験用寒天培地とした。約2 mm角に切り出した *O. laetevirens* 藻糸を含む寒天を試験用寒天培地の中央に置き、22℃、10  $\mu$  mol photons/m<sup>2</sup>/秒の連続光下にて培養を行い、培地表面を伸長する藻糸を観察することによって増殖抑制効果を評価した。

*C. vulgaris* は、22℃、35  $\mu$  mol photons/m<sup>2</sup>/秒の連続光下で、C液体培地(表1)にて7~10日間通気培養を行ったものをを用いた。C液体培地に *C. vulgaris* 培養液を1/1000量添加し、直径20 mm の試験管に9mL ずつ分注した。これに

表1 培地

#### MDM寒天培地 (100 mL)

KNO<sub>3</sub> 100 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 25 mg, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 25 mg, NaCl 10 mg, CaCl<sub>2</sub>·2H<sub>2</sub>O 1 mg, Fe solution 0.1 mL, A5 solution 0.1 mL, 寒天 1.2 g, 蒸留水 99.8 mL, pH 8.0

#### Fe solution

FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 200 mg, 蒸留水 100 mL, 濃硫酸 0.026 mL

#### A5 solution

H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 286 mg, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 250 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 22.2 mg, CuSO<sub>4</sub>·5H<sub>2</sub>O 7.9 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 2.1 mg, 蒸留水 100 mL

#### C液体培地 (100 mL)

Ca(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 15 mg, KNO<sub>3</sub> 10 mg, MgSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 4 mg,  $\beta$ -Na<sub>2</sub>glycerophosphate·5H<sub>2</sub>O 5 mg, Vitamin B<sub>12</sub> 0.01  $\mu$  g, Biotin 0.01  $\mu$  g, Thiamine HCl 1  $\mu$  g, PIV metals 0.3 mL, Tris(hydroxymethyl)aminomethane 50 mg, 蒸留水 99.7 mL, pH 7.5

#### PIV metals

Na<sub>2</sub>EDTA·2H<sub>2</sub>O 100 mg, FeCl<sub>3</sub>·6H<sub>2</sub>O 19.6 mg, MnCl<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O 3.6 mg, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 2.2 mg, CoCl<sub>2</sub>·6H<sub>2</sub>O 0.4 mg, Na<sub>2</sub>MoO<sub>4</sub>·2H<sub>2</sub>O 0.25 mg, 蒸留水 100 mL

pH 7.5に調整したスギおよびヒノキ180℃蒸留液、および滅菌水(対照)を1 mL 加え、22℃、210 μmol photons/m<sup>2</sup>/秒の連続光下で通気培養を行った。経日的に培養液を分取し、分光光度計UV-2450(島津製作所)にて吸収スペクトルを測定した。クロロフィル由来の688 nm付近の吸光度ピークから、散乱による800 nmの吸光度を差し引いた値(A<sub>688-800</sub>)を増殖の指標として、蒸留液の増殖抑制効果を評価した。

### 2. 3 蒸留液成分の分画

蒸留液中の防藻成分について、Sep-Pak Plus C18カートリッジ(Waters)を用いて逆相カラム分画を行った。カラムを蒸留水で平衡化し、スギ180℃蒸留液を通して低極性成分を相互作用させ、蒸留水で洗浄した後、20%メタノールおよび50%メタノールを含む蒸留水で溶出した。画分の防藻活性は、上記同様*C. vulgaris*を用いた試験にて評価した。

## 3. 結果及び考察

### 3. 1 防藻活性について

蒸留条件の異なる蒸留液を用いて、*O. laetevirens*に対する防藻活性を評価したところ、スギ枝葉の180℃蒸留液を加えた試験用寒天培地において、藻糸の増殖抑制効果がみられた(図1および図2上)。一方で、大腸菌に対する抗菌活性がみられたスギおよびヒノキ140℃蒸留液には、防藻活性がみられなかった(図2下)。このことから、スギ180℃蒸留液の防藻活性は、抗菌活性とは異なる成分の関与や作用機序である可能性が示唆された。

次に、スギおよびヒノキ180℃蒸留液を用いて、*C. vulgaris*に対する防藻活性を評価した。その結果、どちらの蒸留液を添加した培養液においても*C. vulgaris*の増殖を抑制することが明らかとなった(図3および図4)。またヒノキに比べスギ

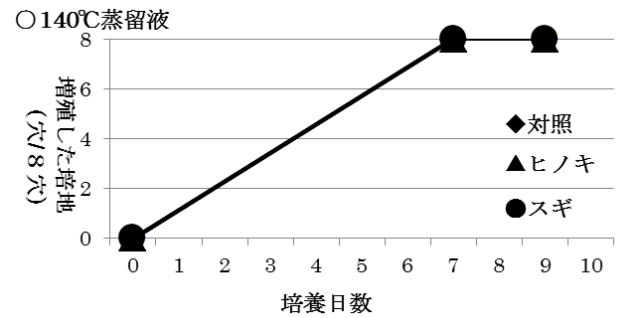
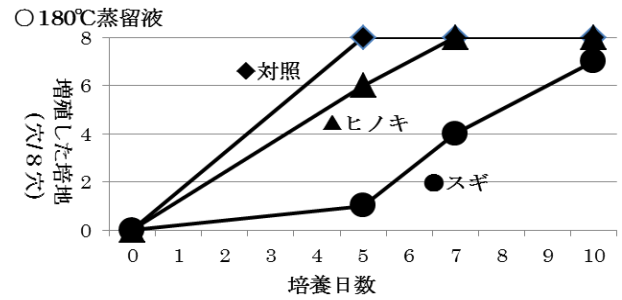


図2 *O. laetevirens*の増殖に対する蒸留液の抑制効果

の180℃蒸留液に、より強い抑制効果が認められた。

これらの結果より、ヒノキおよびスギの180℃蒸留液には、藻類の増殖を抑制する成分が含まれるものと考えられる。より強い防藻活性を示したスギ180℃蒸留液は、細菌である藍藻(*O. laetevirens*)と真核生物である緑藻(*C. vulgaris*)の双方に効果があり、幅広い藻類に有効な可能性がある。しかし、培養を6日以上継続すると抑制されていた藻の増殖が確認されることから、本試験で用いた蒸留液では殺藻まで至らないものと考えられる。

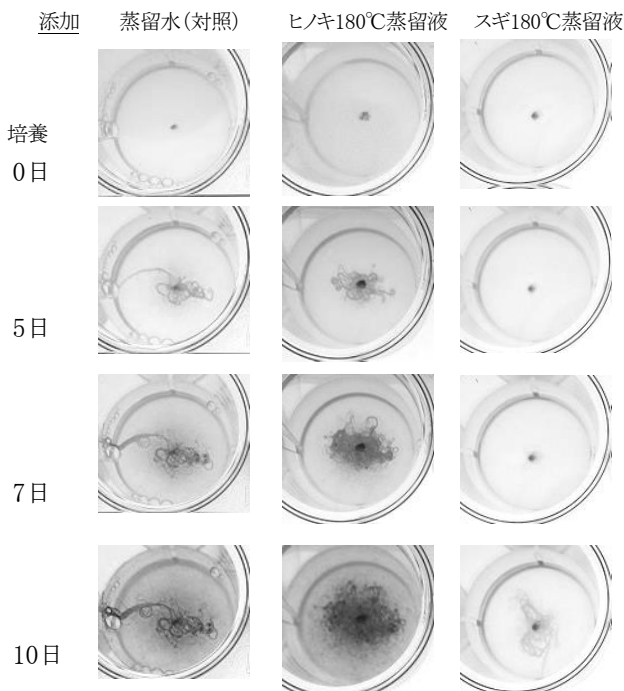


図1 *O. laetevirens*に対する防藻試験



図3 *C. vulgaris*に対する防藻試験(8日目)

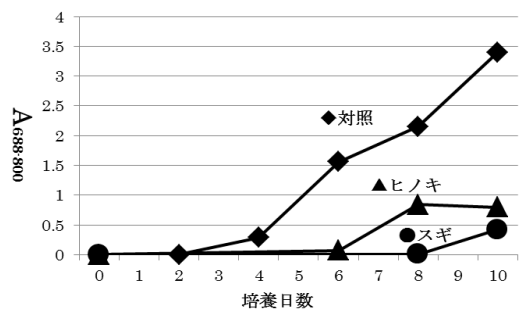


図4 *C. vulgaris*の増殖に対する蒸留液の抑制効果

### 3. 2 分画画分の防藻性評価

防藻成分について解析を進めるため、極性の低い化合物の分離に利用される逆相カラムを用いて、スギ180℃蒸留液の分画を行った。溶出画分および通過画分について、*C. vulgaris*への防藻活性を評価したところ、溶出画分には防藻活性がみられず、通過画分に活性がみられたことから、有効成分は逆相カラムと相互作用しない極性の高い化合物と推察される(図5)。

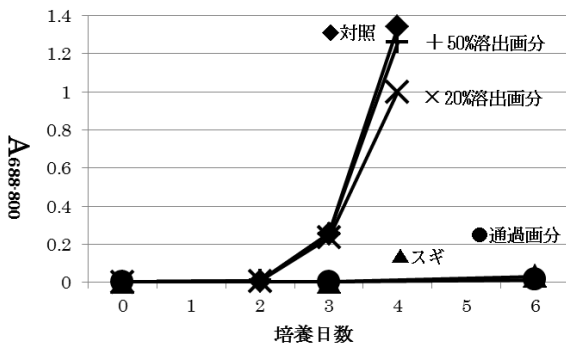


図5 分画成分の*C. vulgaris*に対する増殖抑制効果

### 4. まとめ

スギおよびヒノキ枝葉の蒸留液の新規利用を探索するため、蒸留液の防藻活性についての評価と有効成分の分画を行い、次のような知見を得た。

・スギ枝葉の180℃蒸留液に、*O. laetevirens*に対する防藻活性がみられた。大腸菌に抗菌活性を有する140℃蒸留液では防藻効果は認められないことから、これとは異なる成分や作用機序の関与が示唆された。

・スギおよびヒノキ枝葉の180℃蒸留液に、*C. vulgaris*に対する防藻活性がみられた。ヒノキに比べスギ蒸留液に、より強い防藻活性がみられた。

・スギ180℃蒸留液の防藻効果は、逆相カラム通過画分にみられたことから、有効成分は極性の高い化合物であると推察される。

本研究において、スギおよびヒノキ180℃蒸留液に防藻活性が見られたが、殺藻には至らなかった。実利用にはイオン交換クロマトグラフィー等による分離、濃縮が必要であると考えられる。

### 【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。

### 【菌 株】

*Oscillatoria laetevirens* Gomont NIES-31 および *Chlorella vulgaris* Beijerinck var. *vulgaris* NIES-227 は、国立研究開発法人国立環境研究所微生物系統保存施設(NIESコレクション)より分譲されました。

### 【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, No.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, No.8, pp.36-39, 2014
- 3) 横山慎一郎ら, 環境技術, 9, pp.26-34, 2015.
- 4) 足立良富ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, No.10, pp.18-20, 2016