

木質バイオマス蒸留液を用いた防菌・防藻製品の開発(第3報)

足立良富、横山慎一郎、棚橋光彦*

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

Yoshitomi ADACHI, Shin-ichiro YOKOYAMA and Mitsuhiro TANAHASHI*

ヒノキ枝葉から高圧水蒸気圧搾蒸留法により得られる精油の高度利用を目的に、抗真菌成分であるヒノキ酸の抽出・精製を試み、その抗細菌活性を評価した。ヒノキ酸が酸性成分であることを利用し、簡易な工程により、高純度なヒノキ酸を精製する手法を確立した。この手法を用いて、180℃蒸留ヒノキ精油からヒノキ酸を精製したところ、精油当たりのヒノキ酸の収率は、従来の0.08%(w/v)から1.9%(w/v)に向上した。また、ヒノキ枝葉から蒸留により抽出されるヒノキ酸の量は、蒸留温度に比例して多く抽出されることを明らかにした。180℃蒸留の抽出量は、常圧蒸留の14.1倍であった。精製したヒノキ酸を用いて抗細菌試験を行った結果、コリネバクテリウムおよび表皮ブドウ球菌に対する増殖抑制効果がみられた。体臭の原因となるこれら細菌に対する抗菌性がみられたことから、デオドラント製品等への利用が期待される。

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と固形燃料を同一工程で生産する技術を開発した¹⁻³⁾。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拓が望まれている。

精油に関して既に多くの研究がなされているが、高圧水蒸気圧搾蒸留法では、常圧蒸留では得られない多数の難揮発性化合物も抽出され易くなることから⁴⁾、これら化合物を分離・精製して実利用することは、新規性および独自性が高いと考えられる。ヒノキ枝葉に含まれる難揮発性化合物の一種であるヒノキ酸には、抗真菌性や抗蟻性のような機能が報告されているが^{5,6)}、常圧蒸留により得られる精油からでは0.08%(w/v)しか回収されないため⁷⁾、実用に足る量を得ることが困難であった。本研究では、ヒノキ枝葉から高圧水蒸気圧搾蒸留法により得られた精油を用いて、ヒノキ酸の分離・精製を試み、その抗細菌活性について評価した。

2. 実験方法

2.1 ヒノキ精油の蒸留

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。ヒノキ生葉 500 g を、高圧釜内の温度(水蒸気圧) 140℃ (0.3 MPa)、160℃ (0.6 MPa) および 180℃ (1.0 MPa) 条件下で蒸

留・圧縮した。2時間蒸留し、その回収成分の油層をヒノキ精油として実験に用いた。

常圧蒸留は PureStiller Standard/M (Type SHJK25L, Kohga International Trading Co., Ltd.) を使用して、ヒノキ生葉 1 kg を 10 時間蒸留し、回収成分の油層をヒノキ精油とした。

2.2 精製方法

180℃にて蒸留したヒノキ精油 10 mL に、同量の 0.1 N 水酸化ナトリウム水溶液を加え、1時間攪拌した。一晩静置後、水層を回収した。同じ操作を2回繰り返し、回収してまとめた水層約 30 mL に酢酸エチル 10 mL を加え、1時間攪拌した。水層が分離するまで静置後、水層を回収した。水層中に結晶が析出するまで静置し、次いで 85℃ 下で 1 時間加温した。徐冷後、メンブレンフィルター(セルロースアセテート材、孔径 3 μm) にて結晶をろ過回収し、20% エタノールで洗浄後、乾燥することにより精製産物を得た。

2.3 ヒノキ酸の測定

ヒノキ精油および精製産物について、トリメチルシリルジアゾメタン(TMSD)によるメチル化と、ガスクロマトグラフ質量分析計(GC/MS)による、ヒノキ酸の測定を行った。ヒノキ精油もしくは精製産物溶液 100 μL に、酢酸エチル・メタノール混合液(3:1)を 400 μL を添加し、更に TMSD 100 μL を加えてよく攪拌し、30分間静置した。この反応液を 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。マススペクトルデータベースは、NIST08、NIST08s、Wiley8 を用いた。得られたクロマトグラムおよびマススペクトルより、ヒノキ精油および精製産物の含有するヒノキ酸を、ヒノキ酸メチルとして検出した。

精油中のヒノキ酸の定量は、GC/MS の選択イオン検出法を用いて、ヒノキ酸メチル由来のイオン(主:248、確認:188)を測定し、クロマトグラムのピーク面積より算出した。検量線の作成には精製ヒノキ酸を標準物質として用いた。

*飛騨産業(株)

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°C(2min)-5°C昇温/min-250°C(5min)
キャリアガス	He
注入口温度	250°C
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°C
インターフェース温度	250°C
質量走査範囲	m/z 45-400 (定量では248, 188)

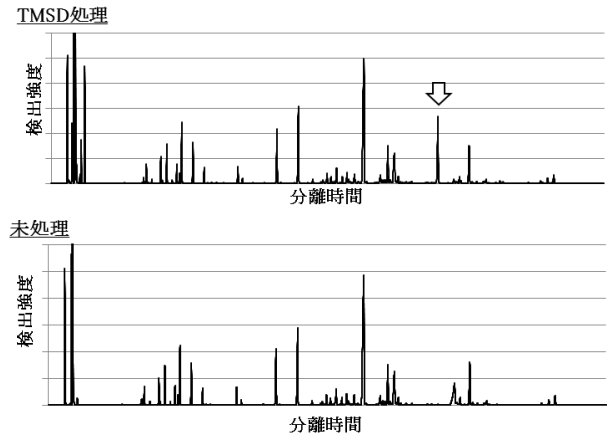


図1 GC/MSによるヒノキ精油の分析

2.4 供試菌株および抗細菌試験

ヒノキ酸の抗菌活性について、*Corynebacterium xerosis* JCM 1971 (コリネバクテリウム)、*Staphylococcus epidermidis* JCM 2424(表皮ブドウ球菌)を用いて、最少発育阻止濃度(MIC)より評価した。

ヒノキ酸および対象物質(塩化ベンザルコニウム、イソプロピルメチルフェノール)は、ジメチルスルホキシドに溶解し、4,000 mg/Lから125 mg/Lまでの試験液を2倍段階希釈により調製した。

C. xerosis と *S. epidermidis* は、MIC(感受性)測定用ブイヨン(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、96穴ウェルプレートに135 µLづつ分注した。次いで、試験液を15 µL添加し、最終濃度400、200、100、50、25、12.5 mg/Lとした。*C. xerosis* は30°Cで5日間、*S. epidermidis* は37°Cで30時間培養を行った。ウェル底面に菌の沈殿を確認することにより、MIC(mg/L)を求めた。

3. 結果と考察

3.1 ヒノキ精油中のヒノキ酸について

高圧水蒸気圧搾蒸留法により得られたヒノキ精油中のヒノキ酸の分析試験を行った。ヒノキ酸は難揮発性化合物のため、ヒノキ精油をTMSD処理することにより、揮発性誘導体であるヒノキ酸メチルに変換し、GC/MSによる分析を行った。140°Cで蒸留したヒノキ精油を用いた分析結果を図1に示す。TMSD処理精油(図1上)には、未処理精油(図1下)には見られない大きなピーク(矢印)が検出された。このピークのマススペクトルを、データベースにて検索したところ、ヒノキ酸メチルと高い類似性を示した。このことから、高圧水蒸気蒸留により得られたヒノキ精油は、主要成分としてヒノキ酸を含有していると考えられた。

3.2 ヒノキ酸の精製

180°Cでの高圧水蒸気蒸留により得られたヒノキ精油を用いて、ヒノキ酸の精製を行った。ヒノキ酸は酸性成分のため、アルカリ処理により精油中から水溶化し、次いで分

液した水層に酸を加え、再不溶化して回収する手法が一般的である。しかし酸の添加による不溶化は、急速な反応であるため、夾雑物の混入や容器等への付着により、純度と回収量が低下する問題があった。そこで本研究では、水に一定の溶解性(8.3 g/100 mL(20°C))を持つ酢酸エチルを用いて、酸処理を行いつつ、かつ徐々に放散することで、穏やかに針状結晶を析出させる手法を考案した。得られた結晶について、TMSD処理とGC/MS分析を行った結果、主要ピークとしてヒノキ酸メチルのみ検出された(図2)。このことから、攪拌と静置を主とした簡易な工程により、ヒノキ酸を高純度結晶として精製することに成功した。

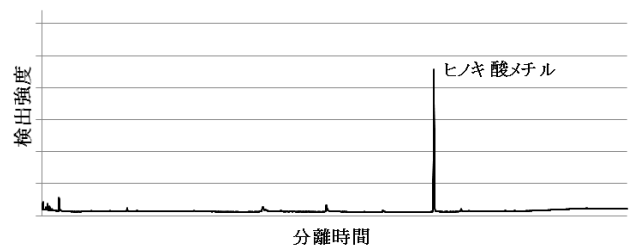


図2 精製産物のGC/MS分析

180°Cヒノキ精油10 mL(ヒノキ酸271.7 mg当量)から、本手法にてヒノキ酸を精製したところ、171.7 mgのヒノキ酸結晶が得られた。これは精油中のヒノキ酸の63.2%(w/w)に相当した。また精油当たりのヒノキ酸収率は1.9%(w/v)と、従来法の0.08%(w/v)から大きく向上した。

3.3 ヒノキ酸抽出量について

蒸留温度のヒノキ酸抽出量への影響を調査した。180°C、160°C、140°Cでの高圧水蒸気蒸留と、常圧蒸留にて得られる精油の量、およびヒノキ酸濃度から、ヒノキ枝葉重量当たりのヒノキ酸抽出量をグラフにした(図3)。ヒノキ枝葉1 kg当たりの抽出量は、常圧蒸留法では41.1 mg、高圧水蒸気圧搾蒸留法では、140°Cで86.7 mg、160°Cで312.5 mg、180°Cで581.5 mgと、蒸留温度に比例して抽出量が増加した。180°C蒸留によるヒノキ酸抽出は、常圧蒸留の14.1倍量のヒノキ酸が得られた。このことから、ヒノキ酸抽出には

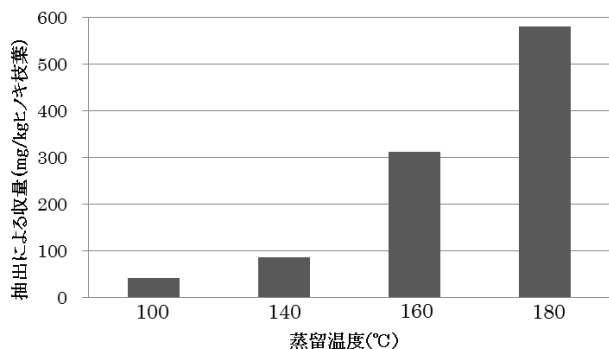


図3 蒸留温度によるヒノキ酸抽出量の比較

高圧水蒸気圧搾蒸留が有効であることが分かった。

3.4 ヒノキ酸の抗菌活性について

衛生・デオドラント用品への利用を想定し、関連した菌株についてヒノキ酸による抗菌試験を行った。供試 *C. xerosis* は腋臭原因菌として知られており、*S. epidemidis* は加齢臭の原因菌である *S. aureus* と同属である。対照物質として、消毒剤として汎用される塩化ベンザルコニウム、化粧品の防腐剤等として用いられるイソプロピルメチルフェノールを用いた。

表2 ヒノキ酸の抗菌活性

供試菌株	MIC(mg/L)		
	塩化ベンザル コニウム	イソプロピル メチルフェノール	ヒノキ酸
<i>Corynebacterium xerosis</i> JCM 1971	< 12.5	400	100
<i>Staphylococcus epidemidis</i> JCM 2424	< 12.5	400	200

表2より、ヒノキ酸はこれら菌株に対していずれも増殖抑制効果がみられた。また、その抗菌活性は、既知のイソプロピルメチルフェノールよりも優れていた。このことからヒノキ酸は、不快体臭の原因となる細菌の増殖を抑えるデオドラント製品等への利用が期待できる。

4. まとめ

木質バイオマスの高度利用を目指し、ヒノキ枝葉の蒸留精油から、有効成分であるヒノキ酸の精製を試み、その抗菌活性を評価した。

高圧水蒸気圧搾蒸留法により得られるヒノキ精油に、主要成分としてヒノキ酸が含まれることを確認した。この精油を材料として、簡易な工程により、従来法に比べ収量が高く、高純度なヒノキ酸を精製する手法を確立した。新たなヒノキ酸精製法により、精油当たりのヒノキ酸の収率は、従来の0.08%(w/v)から1.9%(w/v)に向上した。また、蒸留温度に比例して、ヒノキ酸の抽出量が増加することを明らかにした。

ヒノキ枝葉当たりのヒノキ酸抽出量は、180°C蒸留で常圧蒸留の14.1倍にも達した。精製したヒノキ酸を用いて、体臭の原因菌への抗菌試験を行ったところ、増殖抑制効果がみられたことから、今後デオドラント製品等への利用が期待される。

本研究成果の一部は、「ヒノキ酸含有精油及びヒノキ酸の製造方法」⁸⁾および「ヒノキ酸を含有する抗菌剤、消臭剤、及び消臭用化粧品」⁹⁾として特許出願中である。

【謝 辞】

試料となる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) 浅井淳子ら, バイオマス科学会議発表論文集, 4, pp.58-59, 2009.
- 5) Hideo Ohashi *et al.*, *Holzforchung*, 48, pp.193-198, 1994.
- 6) 王ら, 森林バイオマス利用学会誌, 8(1), pp.13-19, 2013.
- 7) 奥田治, 薬学雑誌, 72, pp.703-705, 1952.
- 8) 棚橋光彦, 横山慎一郎, 足立良富, 特願2017-152302
- 9) 棚橋光彦, 横山慎一郎, 足立良富, 特願2017-152303