

木質系廃棄物の有効利用に関する研究 — 樹皮の抗菌成分の抽出とその物性 —

山内正信 吉留竜仁 越智久尚 進藤三幸

Study on utilizing of wood waste — Extraction of antifungal compounds in bark and their property —

Masanobu YAMAUCHI, Ryuji YOSHITOME, Hisanao OCHI, Kazuyuki SHINDO

Currently, a lot of wood waste discharged from the wood-processing factory are incinerated or sent to landfill at a great cost. Therefore, the utilization of the wood waste is requested from the standpoint of reusing the resources. To utilize of wood waste, we research the antifungal compound in Sugi bark (*Cryptomeria japonica*) and Hinoki bark (*Chamaecyparis obtusa*).

As a result, the strong antifungal activity was found in the neutral fraction of hexane extract from Sugi bark and Hinoki bark. The antifungal compound was isolated from the hexane extract and it was identified as ferruginol. The amount of ferruginol in Sugi bark (dry weight) and Hinoki bark (dry weight) ranges 0.45-0.72% and 0.40-0.82%, respectively. And ferruginol is stable at high temperature and ultraviolet exposure.

Because of its properties, ferruginol can be useful for utilization of bark products.

Keyword: bark, utilization, ferruginol, *Cryptomeria japonica*, *Chamaecyparis obtusa*

はじめに

廃棄物処理法の改正やダイオキシン類対策特別措置法の施行により、木質系廃棄物の排出元での安易な焼却処理が困難になっている。また、代替としての処理業者に委託しての焼却や埋め立て処理には莫大な費用を要することから、中山間地域を抱える本県林業の経営基盤が大きく圧迫されている。このような背景のなか、現在、木質系廃棄物を新たなバイオマス資源として捉え直し、有効利用するための技術開発が急務となっている。

日本の製材工場から排出される木質系廃棄物のうち、樹皮は年間 349 万³が排出されており、一部は家畜敷料、バーク堆肥、燃料として使用されているが、他の木質系廃棄物(背板、のこ屑など)と比べて有効利用率は非常に低く、年間約 100 万³が焼却処分されている状況にある¹⁾。また、本県においても年間約 5 万³が排出されている。

従来から、木材には、芳香成分、抗菌成分、消臭成分等の有用成分が多く含まれていることが広く知られており、特に樹皮は含有する抗菌成分のため腐朽が進みにくく、古来より屋根や壁面に利用するなど有効利用されてきた。

近年、樹皮利用を目的とした研究が広く行われ、液化、ポリウレタンフォーム、消臭剤等への応用化が検討されてきたが¹⁾、利用技術として確立され、実用化された事例は少ない。

今回、県内で排出される木質系廃棄物(スギ樹皮、ヒノキ樹皮)の持つ抗菌性に着目して、成分の抽出およびその特性把握のための試験を行い、有効成分あるいは樹皮そのものを用いた製品開発のための基礎的データを得た。

方 法

1. 試料

スギ樹皮およびヒノキ樹皮は、愛媛県上浮穴郡久万町の木材加工場から排出されたもので、乾式バーカーにより、はく皮されたものである。

2. 前処理

風乾した樹皮を剪定ばさみを用いて 1cm²程度に裁断し、さらにカッターミキサー(愛工舎製作所製、DITO-SAMA)で粉碎した後、2mm メッシュの篩を通した。得られた粉末状の試料を酸化エチレンガスで滅菌し、これを抽出用試料とした。

3. 抽出

各試料 50g を 500ml の極性の異なる溶媒としてヘキサ

ン、アセトン、エタノールおよび水に24時間浸漬し、抽出液を得た。

抽出液を吸引ろ過し(ろ紙: No.5C), ろ液をロータリーエバポレータ(40°C)で濃縮した後、減圧デシケータ内で24時間乾燥した。

4. 抗菌試験

土壌生菌を用いた平板希釈法²⁾により抽出成分の抗菌性を評価した。

抽出物は、水に難溶性であるため、小藤田らの方法³⁾に準じ、抽出物をアセトン:DMSO=1:1溶液に溶解し、界面活性剤(Tween80)0.2ml, 土壌希釈懸濁液(10⁴希釈液)1mlおよび培地(一般生菌数測定用)20mlをΦ85mmのシャーレに加えて分散・固化し、28°Cで2日間培養した。抽出物はシャーレ1枚あたり0.6mg~45mgを段階的に添加した。

また、試料粉末そのものを添加し、同様に試験を行った。この場合、シャーレ1枚あたりの添加量は培地中に均一に分散できる量として0.2gとした。

抗菌性の評価は、対照培地(Blank)と比較することで行い、成長阻害率を成長阻害率(%)={生菌数(BL)-生菌数(抽出物添加)}/生菌数(BL)×100により算出した。

5. 成分の分離

ヘキサン抽出物については、芦谷らの方法⁴⁾に準じて中性画分と酸性画分に分離した。すなわち、抽出物をヘキサンに溶解し、5%水酸化ナトリウム溶液により液々分配し、得られたヘキサン層を濃縮し、中性画分を得た。水層については、酸性になるまで1NHClを添加した後、ジエチルエーテルにより液々抽出し、得られたエーテル層を濃縮し、酸性画分を得た。

さらに中性画分については、中性画分1gをヘキサン20mlに溶解し、無水硫酸ナトリウムを用いて脱水した後、ロータリーエバポレータ(40°C)および窒素ガス吹き付けで0.5mlまで濃縮したものをシリカゲルカラムクロマトグラフィー(Φ20mm×300mm, 充填剤: ワコーゲルS1, 12g)により成分を単離した。溶出はヘキサン:クロロホルム(9:1)45ml, ヘキサン:クロロホルム(5:5)50ml, クロロホルム50ml, アセトン50mlの順に行った。なお、溶出液は5mlずつ分取し、合計39画分を得た。

6. 成分の同定

成分の同定はGC/MS, ¹Hおよび¹³C-NMR, FT-IRを用いて次の条件で測定した。

GC/MSはHP 5980/5989Bを使用し、カラムはHP innowax(0.25mm×15m, 膜厚0.15μm)を用い、カラム温度は40°C→12°C/分→250°C(5分)とした。注入方法はスプリットレス, 注入温度は250°C, イオン源温度は250°C, イオン化電圧70eVで測定した。¹Hおよび¹³C-NMRスペクトルは日本電子JNM-EX400を用い、FT-IRスペクトルはSENS IR TECHNOLOGIES

TravelIRを用いて測定した。

7. 成分の定量

単離した成分を標準品として用い、ナフタレン-d8を内標準物質としてGC/MSにより定量した。

8. 熱安定性試験

樹皮抽出物を共栓付き試験管に入れ、各温度(80~400°C)に設定したオープンで1時間加熱後、残量をGC/MSで測定した。また、80°Cのオープン中で一定時間加熱後の残量を測定し、経時変化を調査した。

9. 光安定性試験

樹皮抽出物を石英セルに入れ、光源にはSPECTROLINE EF-140型ランプを使用して紫外線(254nm, 1.05W/cm²)を照射し、一定時間経過後の残量を測定した。また、80°Cに加熱しながら、紫外線(254nm)を照射したものについても経時変化を調査した。

結果および考察

1. 抗菌試験

各溶媒による抽出物を1枚のシャーレあたり0.6mg~45mgの範囲で添加して行った抗菌試験の結果を図1に示した。

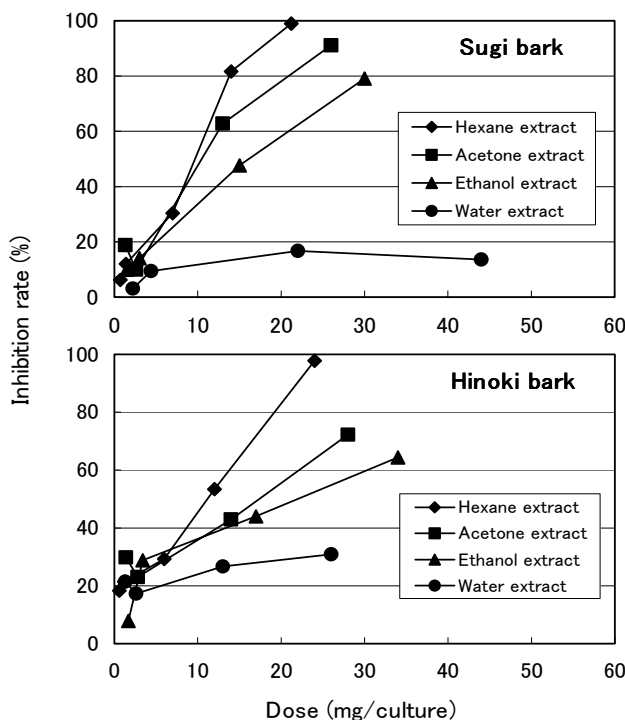


図1 スギおよびヒノキ樹皮抽出物の抗菌試験結果

スギ樹皮の各溶媒抽出物は、全て抗菌性を示した。最も高い抗菌作用を示したものはヘキサン抽出物であり、シャーレ1枚あたり21mg添加した場合、99%成長を阻害した。逆に最も低い抗菌作用を示したのは水抽出物であり、44mg添加した場合でも22mg添加とほとんど変わらず、成長阻害率は14%であった。

ヒノキ樹皮の各溶媒抽出物においても、スギ樹皮抽出

物同様の抗菌作用が認められた。最も高い抗菌作用を示したのはヘキサン抽出物であり、24mg 添加した場合、成長阻害率は98%であった。また、最も低い抗菌作用を示したのは水抽出物で、26mg 添加した場合、12mg 添加よりわずかに高い31%の成長阻害率であった。

スギ樹皮およびヒノキ樹皮のいずれも、抗菌作用はヘキサン抽出物で最も高く、水抽出物では低いことから、抗菌成分は極性の低い溶媒によって効率よく抽出されることが分かった(ヘキサン>アセトン>エタノール>水)。小藤田らも、スギ樹皮中の抗菌成分はヘキサン可溶成分中に最も多いことを報告しており³⁾、これらのことから樹木が生体防御のために樹皮中含有している抗菌成分は雨水等によって流出しない低極性の物質であると推察された。

図2は最も高い抗菌作用が認められたヘキサン抽出物を中性画分と酸性画分に分離し、抗菌試験を行った結果である。その結果、ヘキサン抽出物中性画分に高い抗菌作用が認められ、抗菌成分が優先的に存在していることが示唆された。

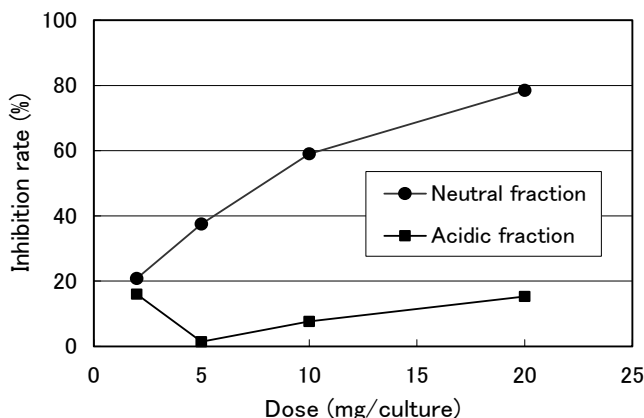


図2 樹皮抽出物中性および酸性画分の抗菌試験結果

樹皮粉末を培地に直接添加した抗菌試験の結果、対照培地に比べて明らかな成長阻害がみられた。樹皮粉末が共存することで培地中の生菌数を正確に計数することはできなかったが、将来、樹皮の有効利用に際しては、樹皮の持つ抗菌成分を抽出・濃縮せず、樹皮そのものでも利用できることが考えられた。

2. 成分の分離および同定

抗菌試験の結果、樹皮のヘキサン抽出物中性画分に高い抗菌作用が認められたことから、抗菌成分の同定を試みた。

スギ樹皮およびヒノキ樹皮のヘキサン抽出物中性画分のGC/MS測定によるTICスペクトルを図3に示す。

スギ樹皮およびヒノキ樹皮ヘキサン抽出物中性画分に、10種以上のピークが確認されたが、両樹皮ともに特にCompound (A) (保持時間17.10分)の存在量が突出していた。また、TICスペクトルの面積から両樹皮ともにほぼ同量含有していることが分かった。

Compound (A)のフラグメントイオンのパターンおよ

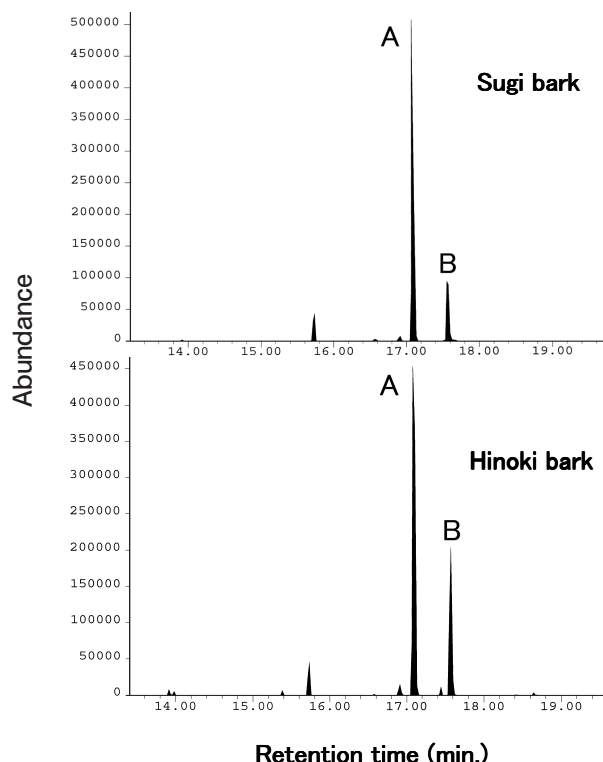


図3 スギおよびヒノキ樹皮抽出物のTICスペクトル

び強度比は、これまでに樹皮中の抗菌成分として知られているフェルギノールのもの⁵⁾とほぼ一致した(表1)。

また、シリカゲルカラムクロマトグラフィーによりCompound (A)を単離し、¹H-および¹³C-NMR測定を行った結果、フェルギノールのNMRスペクトル⁶⁾と一致した(表2)。これらのことからCompound (A)をフェルギノールであると同定した。

フェルギノールはジテルペンの一種で、これまでにスギ樹皮^{3,4,7)}、ヒノキ樹皮^{7,8)}やサルビア^{6,16,17)}等から抽出されており、植物病原菌³⁾、担子菌⁹⁻¹³⁾およびグラム陽性菌¹⁴⁻¹⁶⁾に対する抗菌作用が知られている。また、抗ダニ効果を持つことも報告されている¹⁸⁾。構造式を図4に示した。

Compound (B) (保持時間17.57分)は、GC/MS測定の結果から、スギ樹皮ヘキサン抽出物中性画分にフェルギノールとともに主要な成分として報告されている6,7-ジヒドロフェルギノール⁴⁾であると推定した。

表1 フェルギノールとCompound (A)のMSデータ

m/z	Relative intensities	
	Ferruginol ⁵⁾	Compound (A)
286	100	100
271	97	96
69	55	20
189	55	59
175	51	55
201	45	34
187	32	17

表2 フェルギノールと Compound (A) の¹H-および¹³C-NMRデータ

(δ ppm, J in Hz)

	¹ H				¹³ C	
	Ferruginol ⁽⁶⁾		Compound (A)		Ferruginol ⁽⁶⁾	Compound (A)
1	1.37	td	1.37	m	38.9	38.8
	2.15	dtd	2.14	m		
2	1.58	dq	1.58	m	19.4	19.3
	1.72	qt	1.72	m		
3	1.23	td	1.22	m	41.8	41.7
	1.46	dtd	1.44	m		
4					33.5	33.4
5	1.31	dd	1.30	dd	50.4	50.3
6	1.66	dddd	1.66	m	19.3	19.2
	1.85	ddt	1.85	m		
7	2.76	ddd	2.77	m	29.8	29.7
	2.85	ddd	2.82	m		
8					127.2	127.1
9					148.6	148.6
10					37.6	37.4
11	6.61	s	6.61	s	110.9	111.0
12					150.5	150.7
13					131.3	131.5
14	6.81	s	6.82	s	126.5	126.5
15	3.11	heptet	3.12	heptet	26.9	26.8
	[7.0]		[6.8]			
16	1.22	d	1.21	d	22.6	22.6
	[7.0]		[6.8]			
17	1.24	d	1.25	d	22.8	22.7
	[7.0]		[7.8]			
18	0.93	s	0.93	s	33.4	33.4
19	0.91	s	0.91	s	21.7	21.6
20	1.16	s	1.15	s	24.8	24.7
12-OH	4.60	br s	4.93	s		

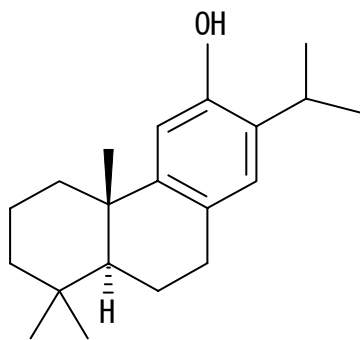


図4 フェルギノールの構造式

一方、酸性画分についてはFT-IR測定により、カルボン酸に特徴的な3300~2700cm⁻¹(O-H伸縮), 1720~1700cm⁻¹(C=O伸縮) および950~850cm⁻¹(O-H変角)の吸収が認められ、GC/MS測定によりスギ樹皮ヘキササン抽出物酸性画分の主要な成分として報告されているジテルペンカルボン酸のサンダラコピマル酸⁴⁾とみられるピークを検出した。これまでに、サンダラコピマル酸はグラム陽性菌¹⁵⁾や漏脂病原菌⁸⁾に対する抗菌作用が知られているが、スギおよびヒノキ樹皮中の存在量はTICスペクトルの面積からフェルギノールと比べて少なく約

5分の1程度であった。これらのことから、酸性画分に若干みられた抗菌作用はサンダラコピマル酸によるものと推定した。

3. フェルギノールの抗菌性

図5は、ヒノキ樹皮ヘキササン抽出物を用いた抗菌試験の結果であり、シャーレあたり抽出物を30mg添加したときに成長阻害率が100%となることを示している。この場合、抽出物30mg中のフェルギノール量をGC/MSで定量すると7.5mgになる。このことから、フェルギノール7.5mgをシャーレに添加して抗菌試験を行ったところ、成長阻害率は83%であった(図6)。各溶媒を用いた抗菌試験では全ての抽出物に程度の差はあっても何らかの抗菌作用が認められ、ヘキササン抽出物中にもGC/MS測定ではフェルギノールを含めて25本のピークが認められたことから、樹皮の抗菌成分についてはフェルギノール以外にも多くの成分が単体で、あるいは相乗作用していると考えられるが、少なくともヒノキ樹皮の場合、ヘキササン抽出物中の抗菌作用のうち、約8割程度はフェルギノールによるもので、2割程度はフェルギノール以外の抗菌成分によるものと推察した。木材には本研

究で同定したフェルギノールやサンダラコピマール酸以外にも多くのテルペン系化合物が存在している¹⁹⁾が、小藤田らも報告³⁾しているようにフェルギノールは樹皮中のテルペン類としては多量に含まれている成分であることから、樹皮の持つ抗菌作用に極めて重要な役割を果たしているものと考えられた。

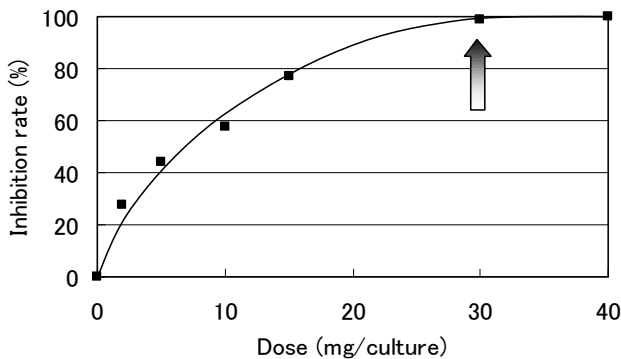
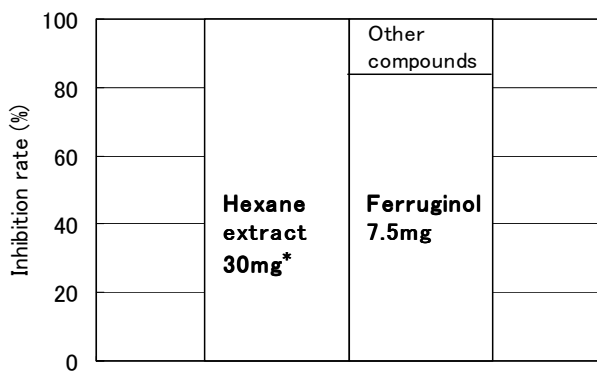


図5 ヒノキ樹皮へキサン抽出物の抗菌試験結果



*Complete inhibitory concentration of hexane extract was 30mg/culture. Hexane extract from bark (30mg) include Ferruginol (7.5mg)

図6 ヒノキ樹皮へキサン抽出物とフェルギノールの抗菌作用の比較

4. 樹皮中のフェルギノール量

樹皮中のフェルギノール量が木材の伐採時期によりどのように異なるかを確認するため、平成14年8月、15年2月、6月の3時期に県内の木材加工場から排出されたスギおよびヒノキの樹皮を採取し、樹皮中フェルギノール量を測定した。

測定にあたっては、標準品が市販されていないため、単離したフェルギノールを標準品としてGC/MSを用いて行った。まず、測定に先立って浸漬日数によるフェルギノール抽出率の変化を調べた結果、7日目以降は抽出率の増加がないこと、へキサンによるソックスレー抽出を行った結果、7日間の浸漬抽出と比較して抽出率に差はなかったことから、7日間へキサンに浸漬したものをを用いることとした。

樹皮のフェルギノール含有量は乾燥重量あたりの割合として、スギ樹皮では0.45～0.72%、ヒノキ樹皮では

表3 スギおよびヒノキ樹皮のフェルギノール含有量

	Date	Ferruginol (%)
Sugi bark	H14.08	0.66
	H15.02	0.72
	H15.06	0.45
Hinoki bark	H14.08	0.40
	H15.02	0.82
	H15.05	0.61

0.40～0.82%であり(表3)、冬期に木材加工場で採取したものがスギおよびヒノキ樹皮ともに含有量が多かったが、この原因が伐採時期によるものか、あるいは伐採後の保管条件の違いによるものか等については明らかでない。樹皮中のフェルギノール量については個体による差があることも報告されている³⁾が、我々が樹皮中のフェルギノールに着目した有効利用を考えるうえでは、今回の含有量の差は許容される範囲と判断した。

なお、フェルギノール量の伐採時期による違い、個体差並びに木材の保管条件による違い等については機会を得てさらに検討を加えたい。

5. フェルギノールの熱・光安定性

樹皮に含まれるフェルギノールの抗菌性に着目して、樹皮の有効利用を考えるにあたり、フェルギノールの抗菌性がどの程度持続するかを評価するため、フェルギノールの熱・光安定性試験を行った。

まず、スギ樹皮のへキサン抽出物を一定温度に保持したオーブン中で1時間加熱し、フェルギノール量の経時変化を調査した(図7)。

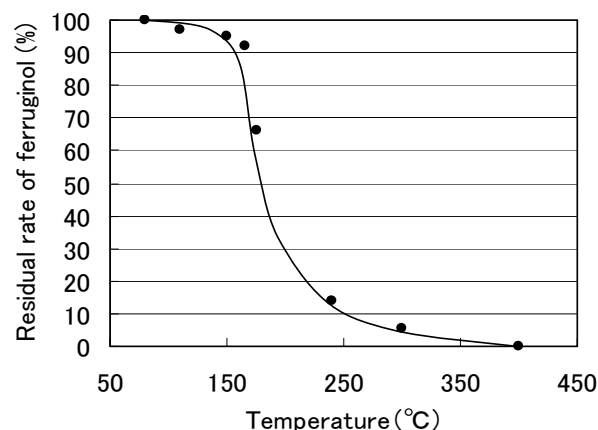


図7 フェルギノールの熱安定性試験結果

フェルギノールは150°Cで95%、160°Cで92%残存するのに対し、フェルギノールの沸点が175°Cであること²⁰⁾から、170°C付近から急速に消失した。

次に80°Cに加熱し、フェルギノール量の経時変化を調査した(図8)。多少の分解は認められたが、35時間後でも残量70%以上であった。紫外線(254nm)に対する安定性を調査した結果、3時間以内では90%以上残存し

ていたが、10時間後に残量50%となった。また、加熱(80°C)しながら紫外線(254nm)を照射したところ、2時間以内では90%以上残存していたが、10時間後には残量10%程度となり、熱と紫外線の相乗効果が認められた。

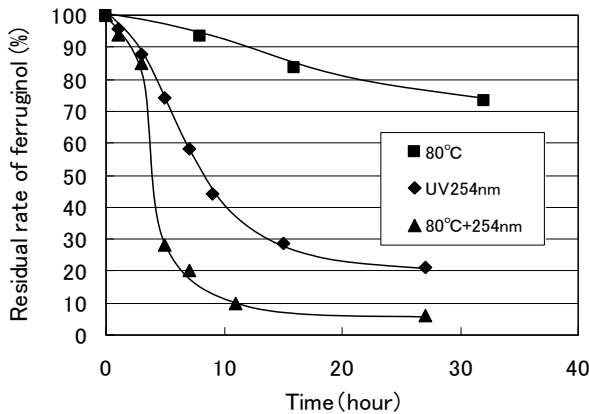


図8 フェルギノールの熱・光安定性試験結果

このように、短時間の高温、長時間の相当温度、さらには高エネルギーの紫外線下ではフェルギノールは安定性を保てなかったが、逆にこれらの結果は我々の日常生活圏ではかなり安定な物質であることを否定するものではなかった。つまり今後の有効利用では、木材としての利用が可能な範囲内では、その抗菌作用は十分に期待できると推察した。なお、今回、試験できなかった常温での長期間の安定性については、古来より屋根材等の利用がかなり長期間持続している事実から特に問題ないと思われる。

6. フェルギノールの有効利用

今回、我々はフェルギノールの抗菌性を土壌生菌を用いて評価したが、これまでに様々な菌類に対する成長阻害作用が報告されている(表4)。そこでフェルギノールの持つ抗菌性に着目した製品化の可能性を考察した。まず、植物病原菌の増殖を抑制する効果を持つことから、マルチシート、育苗ポットおよび土壌改良材など農業用資材への利用が期待される。また、黄色ブドウ球菌など細菌類への抗菌作用から抗菌スプレーや包装資材など衛生用品への利用が想定できる。

また、スギやヒノキなど針葉樹樹皮の堆肥化が困難である理由の一つにフェルギノール等抗菌成分が木材腐朽菌の成長を抑制することが挙げられる。そこで抗菌成分を抽出した残さは容易に堆肥化が進行し、優良な堆肥の製造が可能になるものと思われる。また、松井ら¹¹⁾はフェルギノールを除去することが出来れば、スギ材はシイタケ菌の菌床になりうるとしており、同様に樹皮についても抗菌成分を抽出除去することで菌床としての利用が可能であろう。

表4 フェルギノールによる菌類成長阻害の報告例

	Reference
Fungi	
<i>Alternaria alternata</i>	3)
<i>Pyricularia oryzae</i>	3)
<i>Rhizoctonia solani</i>	3)
<i>Fusarium oxysporum cucumerinum</i>	3)
<i>Pezizula livida</i>	8)
<i>Sarea resiniae</i>	8)
<i>lentinus edodes (Berk.) Sing</i>	9, 10)
<i>lentinus edodes (Berk.) Pegler</i>	11)
<i>Coriolus versicolor</i>	12)
<i>Laetiporus sulphureus</i>	12)
<i>Lentinus lepideus Fr.</i>	13)
Microorganisms	
<i>Bacillus subtilis</i>	14-16)
<i>Bacillus pumilus</i>	16)
<i>Staphylococcus aureus</i>	14-16)
<i>Staphylococcus durans</i>	15)
<i>Staphylococcus albus</i>	16)
<i>Staphylococcus epidermidis</i>	16)
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	15)
<i>M.intracellulare</i>	15)
<i>M.xenopi</i>	15)
<i>M.chelonii</i>	15)
<i>Micrococcus luteus</i>	16)

まとめ

本研究では、スギ樹皮およびヒノキ樹皮をバイオマス資源として有効利用するにあたり、有効成分として抽出成分の抗菌性に着目して試験を実施し、若干の知見を得た。今後は、これらの特性を活かした樹皮そのもの、あるいは抽出された有効成分を用いた製品化を期待したい。

- 1) スギ樹皮およびヒノキ樹皮のヘキササン抽出物に強い抗菌作用が認められた。
- 2) 樹皮中の主要な抗菌成分として、フェルギノールを単離した。
- 3) フェルギノールはスギ樹皮およびヒノキ樹皮中に存在し、存在量は0.5%前後であった。
- 4) フェルギノールは通常の熱や光に対して比較的安定であった。
- 5) 実用化に際しては、フェルギノールは水に不溶であることから雨水等で洗い流される可能性は低く、太陽光による熱分解、光分解もそれほど速く進行せず、抗菌効果は持続すると思われた。

文献

- 1) 大原誠資：木材工業，56(5)，209-215(2001)
- 2) 須藤隆一：環境微生物実験法，講談社，133-153(1994)
- 3) 小藤田久義ほか：木材学会誌，47(6)，479-486(2001)
- 4) 芦谷竜矢ほか：木材学会誌，47(3)，276-281(2001)
- 5) THE MASS SPECTROMETRY DATA CENTRE：EIGHT PEAK INDEX OF MASS SPECTRA，Third Edition，2(2)，2156(1983)
- 6) Y.Teizuka et al：Chem.Pharm.Bull，46(1)，107-

- 112 (1998)
- 7) 善本知孝ほか：木材学会誌, 30(4), 335 - 339(1984)
 - 8) 羽成修康ほか：木材学会誌, 44(5), 342 - 350(1998)
 - 9) 中島健ほか：木材学会誌, 26(10), 698 - 702(1980)
 - 10) 河内進策ほか：木材学会誌, 37(10), 971 - 975(1991)
 - 11) 松井隆尚ほか：木材学会誌, 47(1), 58 - 62(2001)
 - 12) S. - T.Chang et al : Holzforschung, 53, 487 - 490 (1999)
 - 13) P.Rudman : Holzforschung, 19, 57 - 58 (1965)
 - 14) H.Fukui et al : Agric.Biol.Chem, 42(7), 1419 - 1423 (1978)
 - 15) I.Muhammand et al : Phytotherapy Research, 6, 261 - 264 (1992)
 - 16) L.Moujir et al : Phytotherapy Research, 10, 172 - 174 (1996)
 - 17) A.Ulubelen et al : Phytochemistry, 52, 1455 - 1459 (1999)
 - 18) S.-T.Changetal : JournalofMedicalEntomology, 38 (3), 455-457 (2001)
 - 19) 橘燦郎：木材学会誌, 41 (11), 967 - 977 (1995)
 - 20) 化学大辞典編集委員会：化学大辞典 7, 共立出版, 744 (1980)