

## プロポリスの香りを活かした生活向上製品の開発(第3報)

今泉茂巳、加島隆洋、水谷恵梨、田澤茂実\*、須蒲千晶\*\*、光永徹\*\*

Development of product for quality life utilizing propolis aroma (III)

Shigemi IMAIZUMI, Takahiro KASHIMA, Eri MIZUTANI, Shigemi TAZAWA\*, Chiaki SUGAMA\*\* and Tohru MITSUNAGA\*\*

プロポリスのエタノールエキス製造時に発生するエタノール抽出滓(副次原料)を原料として直接蒸留法および水蒸気蒸留法で精油を試作した。乾燥した抽出滓1,000 gと蒸留水10 Lを使用して直接蒸留法で5時間蒸留した結果、1.47 mLの精油が得られた。採油率は0.15%(v/w)であった。しかし、水蒸気蒸留法では原料を2,000 gまで増やしても蒸留水の表面にわずかの精油が浮くだけで、採油することができなかった。このことより、本原料を使用する場合、水蒸気蒸留法は適さないことが明らかになった。得られた精油は冷凍濾過物精油<sup>1)</sup>と同様、フローラルかつ僅かにスパイシーで、プロポリスらしい香りもしたが、香りの強さは冷凍濾過物精油より弱かった。この精油の香りをラットに嗅がせた結果、個体差はあるものの、交感神経活動が抑制される傾向が見られた。この結果は、エタノール抽出滓精油が冷凍濾過物精油と同様、交感神経活動を抑制し、興奮状態を押し下げるリラックス効果を与える可能性を示唆している。

### 1. はじめに

プロポリスは、ミツバチが植物の樹脂、特に新芽やつぼみ、植物が分泌する滲出物などを集めて巣に持ち帰り、巣の隙間に詰めた物質であり<sup>2)</sup>、起源植物由来成分を基本とする多種多様の成分を含んでいる。プロポリスは経験的にその抗菌効果や防腐効果が知られ、古代エジプトではミイラの腐食防止に利用されていた<sup>2)</sup>。現在では、主にヨーロッパや南米の一部の国で皮膚の外傷治療や口腔ケアなどにもプロポリスが利用されており、日本でも健康食品素材として利用され、20~30年ほど前から関連商品が世の中に出回るようになった<sup>2)</sup>。

プロポリスは通常、エタノールや水で抽出したエキスの形で摂取される。特にエタノールエキスは独特で強いにおいと苦味・辛味を持ち、従来は水にエキスを数滴たらしめて飲用していたため、そのにおいと味がプロポリスの摂取しにくさの要因となってきた。しかし、近年はタブレットやカプセルの商品が市場に出るようになり、以前より摂取しやすくなっている。

健康食品素材としての長い歴史と上述の商品開発に支えられ、プロポリスの市場規模は300億円程度で安定している<sup>2)</sup>。しかし、更なる市場の拡大はなかなか難しく、いかにしてプロポリスを我々の生活により身近なものにし、市場を活性化していくかということに業界は苦心している。

本研究では従来着目されてこなかったプロポリスの香気成分を活用した新たな製品を開発することを目的として、プロポリスの精油を開発した。なお、その際、現在廃棄されているエタノールエキス製造工程で発生する副生物(未利用資源)を原料とすることにより、プロポリス資源の有効活用を図る。前報<sup>1)</sup>では脱ロウ工程で副生する冷凍濾過

物を原料とした精油の試作、および、その香りによるラットの交感神経活動抑制効果について報告した。本報では、エタノール抽出時に発生する抽出滓(副次原料)を原料とした精油の試作、および、試作精油の香気成分の概要とラットの交感神経活動に与える効果について報告する。

### 2. 実験方法

#### 2.1 精油の試作

ブラジル産グリーンプロポリスのエタノール抽出滓を原料とし、ピュアスティラースタンドM((株)黄河)を使用して、直接蒸留法および水蒸気蒸留法により精油を試作した。

はじめに、乾燥前の抽出滓を原料として直接蒸留法による試作を行った(試作1)。抽出滓500 gを25 Lステンレス釜に採り、そこへ蒸留水を4 L加えた。加熱強さ「最強」で加熱を始め、蒸留液が溜まり始めたら加熱強さを「中+1」に落として、5時間蒸留を行った。上記操作を16回行い、全ての精油を合わせて採油量を求め、以降の香気成分分析や生理活性評価試験に供した。

次に、乾燥した抽出滓を使用して直接蒸留法(試作2)と水蒸気蒸留法(試作3)の比較を行った。直接蒸留法では抽出滓500 gと蒸留水4 L、または、抽出滓1,000 gと蒸留水10 Lを使用した。一方、水蒸気蒸留法では抽出残渣500 g、1,000 g、2,000 gと蒸留水5 Lを使用した。共に加熱強さ「最強」で加熱を始め、蒸留液が溜まり始めたら加熱強さを「中+1」に落として、5時間蒸留を行った。

#### 2.2 香気分析

試作1の精油について、「ゲステル社において分析システム」により香気分析を行った。

香気成分の捕集はSolvent Extract Full Evaporation Dynamic Headspace(SE-FEDHS)法<sup>3)</sup>により行った。予めエバポレーションにより安定化剤を除去したジエチルエー

\*アピ株式会社長良川リサーチセンター

\*\*国立大学法人岐阜大学応用生物科学部

テルで精油を1,000倍に希釈し、その溶液3  $\mu$ Lを10 mLヘッドスペースバイアルに採取した。多機能オートサンプラーGERSTEL MPS2XL-xt (DHSオプション) によりバイアル内に2本のニードルを挿入し、一方のニードルから窒素ガスをパージし、もう一方のニードルの窒素ガス出口に接続されたTenax TA捕集管(以後、Tenax管)に成分を捕集した。はじめにバイアル温度40 $^{\circ}$ C、Tenax管温度40 $^{\circ}$ C、流速50 mL/minで6分間窒素ガスをパージして溶媒を除去した後、バイアル温度を80 $^{\circ}$ Cに上げ、さらに流速100 mL/minで30分間窒素ガスをパージして、気化した成分をTenax管に捕集すると同時に水分を除去した。

分析はTDU, CIS4, Single PFC付きAgilent 5977B GC/MSD システムにより行った。キャリアガスにヘリウムを使用し、TDUでキャリアガス流量50 mL/min、スプリットレス、温度240 $^{\circ}$ Cで3分間加熱してTenax管の捕集成分を脱着し、CIS4で温度20 $^{\circ}$ CのTenax TAライナーに再捕集した。続いてCIS4の温度を急速に250 $^{\circ}$ Cまで上昇し、捕集成分を気化してスプリット比2:1 (Low Split Mode)でHP-INNOWaxカラム(60 m x 0.25 mm i.d. x 0.25  $\mu$ m thickness)に導入し、カラム流量1.5 mL/minのコンスタントフローモード、昇温プログラム50 $^{\circ}$ C(3 min)-10 $^{\circ}$ C/min-130 $^{\circ}$ C-3 $^{\circ}$ C/min-250 $^{\circ}$ C(9 min)で分離した。カラム出口ガスをほぼ1:1にスプリットし、におい嗅ぎ分析と質量分析(Scan,  $m/z$  = 28.7-350)を同時に行った。

におい強度はOID (Odor Input Device)により強度1~4の4段階で評価した。各試料7回分析を行い、3回以上においを感じた成分について「においを感じた」と判定し、におい強度を平均して小数点以下を四捨五入した。

### 2.3 ラットの交感神経活動に対する影響評価

試作1の精油について評価を行った。精油を蒸留水で100倍に希釈し、よく振ってエマルジョンにしたものを試料溶液として使用した。

ウレタン麻酔下ラットの肩甲骨周辺の毛を刈り、肩甲骨と褐色脂肪組織の間を切開し、褐色脂肪組織を支配する交感神経束を探索した。その束を末端側で切断し、1本1本に分け、その内1本の結合組織を除去した。剥き出しとなった神経を銀線電極に掛け、神経活動を測定した。

神経を電極に掛けたまま、嗅覚刺激を行った。30分間何も刺激を行わない状態でデータを取り、それをコントロールとした。続いてキムワイプを入れた紙コップに試料溶液1 mLを染み込ませたものをラットの鼻先に提示して嗅覚刺激を開始し、10分毎に新しく調製した試料溶液と交換して、合計60分間嗅覚刺激を行った。嗅覚刺激終了後も測定を継続した。得られたデータから肩甲骨間褐色脂肪組織支配交感神経活動(BAT-SNA: Brown Adipose Tissue Sympathetic Nerve Activity)を求めた。

## 3. 結果と考察

### 3.1 精油の試作

乾燥前の抽出滓から精油を試作した(試作1)結果、各

蒸留操作で0.37~0.52 mLの精油が採油でき、16回の試作を合計すると、抽出滓8,003 gから7.14 mLの精油が採油された。採油率は0.09%(v/w)で、これは前報<sup>1)</sup>の冷凍濾過物精油の採油率0.04%(v/w)の倍以上であった。これは、本試作では冷凍濾過物精油試作時と異なり蒸留開始時から精油と蒸留水が分離したためと、冷凍濾過物は非常に多くのエタノールを含み、抽出滓の方が冷凍濾過物より固形分が多いためであると思われる。

続いて、乾燥した抽出滓を使用して直接蒸留法(試作2)と水蒸気蒸留法(試作3)の比較を行った。直接蒸留法では抽出滓500 g、蒸留水4 Lを使用した際に0.59 mL(採油率0.12%)の、抽出滓1,000 g、蒸留水10 Lを使用した際に1.47 mL(採油率0.15%)の精油が得られた。しかし、水蒸気蒸留法では、抽出滓を2,000 gまで増やしても蒸留水の表面に若干の精油が浮くだけで、採油することができなかった。このことより、この原料の場合、水蒸気蒸留法は適さないことが明らかになった。

### 3.2 精油の香気成分分析

試作した精油はフローラル、僅かにスパイシー、かつ、プロポリスらしい香りで、冷凍濾過物精油と似たような香調であった。しかし、香りの強さは冷凍濾過物精油よりも弱かった。

抽出滓精油と、冷凍濾過物精油のトータルイオンクロマトグラム(TIC)およびOIDシグナルを図1に、その解析結果を表1に示す。抽出滓精油の方が冷凍濾過物精油よりも全体的にピークが小さかった。その結果、においの感知数も冷凍濾過物精油の26成分に対し、抽出滓精油は12成分と半分ほどであり、抽出滓精油で強くにおいを感じた成分はethyl hydrocinnamateのみであった。これは両精油を直接鼻で嗅いだ時の香りの強さの違いに表れており、抽出滓精油の方が80 $^{\circ}$ Cの窒素パージでは気化しない成分の割合が大きいことを示唆していると思われる。

### 3.3 精油のラットの交感神経活動に対する効果

12~13週齢の4体のラット(検体1~4)に抽出滓精油の香りを嗅がせた時の交感神経活動の変化を図2に示す。

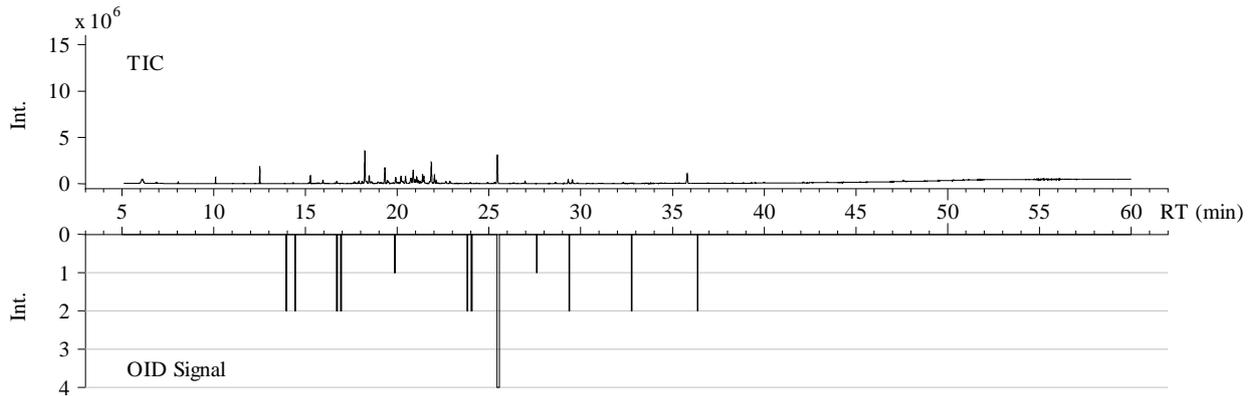
検体1では、嗅覚刺激開始直後からBAT-SNAが低下しはじめ、BAT-SNAが低い状態がしばらく続いた。嗅覚刺激終了時からBAT-SNAが再び上昇しはじめ、逆にコントロールよりもかなり高くなった後徐々に減少するという、他の検体とは異なる傾向が見られた。最大抑制率は94%であった。嗅覚刺激終了後に交感神経活動が活発になった要因については今後の検討課題となった。

検体2では、BAT-SNAは嗅覚刺激開始後に約70%まで低下した状態が続き、さらに嗅覚刺激終了直前に大きく低下した。その状態が90分程度続いた後、ほぼ元の値まで回復した。最大抑制率は95%であった。

検体3では、嗅覚刺激終了5分後にBAT-SNAが急速に低下し、その状態が70分続いた後、元のレベルに回復した。最大抑制率は97%で、4検体中最も大きかった。

検体4では、嗅覚刺激開始20分後からBAT-SNAが低

a) エタノール抽出滓精油



b) 冷凍濾過物精油

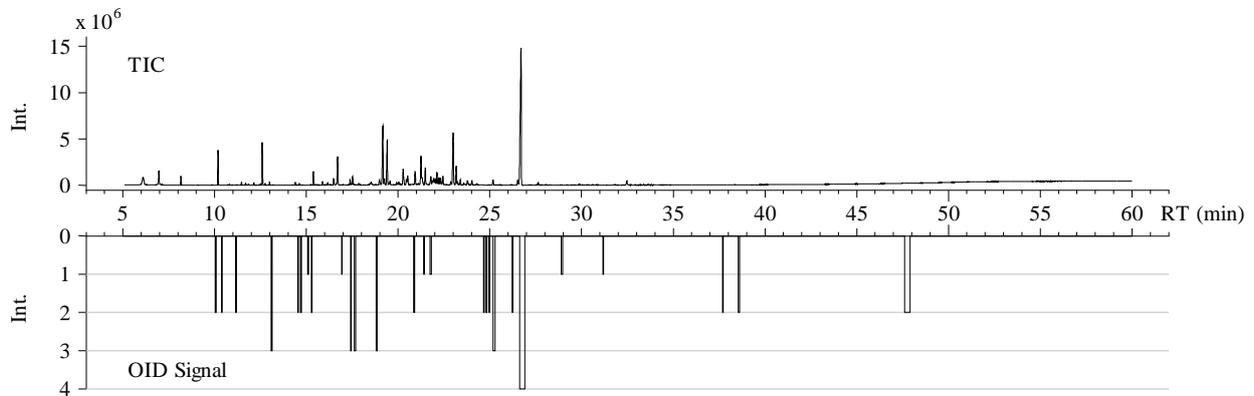


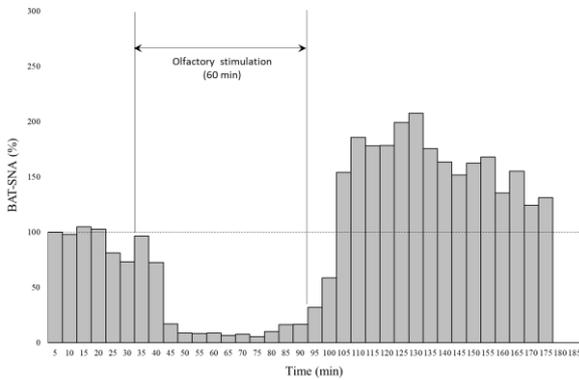
図1 試作した精油のTICおよびOIDシグナル

表1 においを感じた香気成分

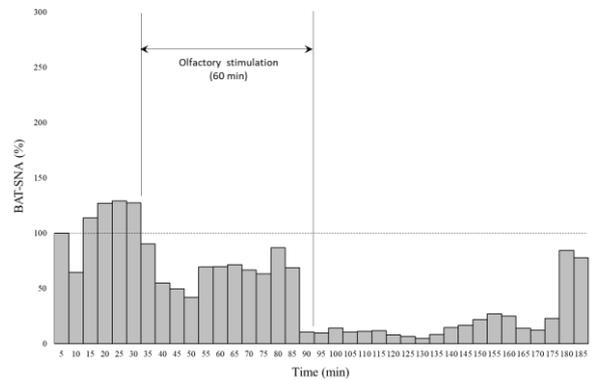
| Compound Name  | Odor Character             | エタノール抽出滓精油    |             |           | 冷凍濾過物精油(比較)   |             |           |
|--|----------------------------|---------------|-------------|-----------|---------------|-------------|-----------|
|  |                            | RT (min)      | RI          | Odor Int. | RT (min)      | RI          | Odor Int. |
| 1-hexen-3-one  | metallic, green            |               |             |           | 9.926         | 1111        | 2         |
| sabinene   | green                      |               |             |           | 10.363        | 1136        | 2         |
| heptanol ?   | sweet, fruity, pear        |               |             |           | 11.239        | 1198        | 2         |
| 1-octen-3-one  | metal, terpene, green      |               |             |           | 13.040        | 1315        | 3         |
| nonanal  | green, leaf-like           | 14.041        | 1405        | 2         | 14.609        | 1408        | 2         |
| (unknown)  | cool, water, woody         | (14.41-14.46) | (1426-1429) | 2         | (14.86-14.90) | (1421-1423) | 2         |
| (unknown)  | herbal                     |               |             |           | 15.085        | 1433        | 1         |
| ethyl caprylate                                      | sweet, fruity, pear        |               |             |           | 15.232        | 1441        | 2         |
| (unknown)  | green, stink               |               |             |           | 16.974        | 1528        | 1         |
| linalool   | citrus, fruity             | 16.657        | 1545        | 2         | 17.385        | 1547        | 3         |
| $\beta$ -cubebene                                    | woody                      | 16.812        | 1552        | 2         | 17.593        | 1557        | 3         |
| $\beta$ -elemene                                     | herbal, green              |               |             |           | 18.779        | 1604        | 3         |
| $\alpha$ -humulene                                   | herbal, chestnut, nut-like | 19.907        | 1691        | 1         | 20.927        | 1697        | 2         |
| (unknown)  | green                      |               |             |           | (21.30-21.34) | (1711-1712) | 1         |
| E,E-2,4-nonadienal + 2,3-dihydrobenzofuran           | baked sweet potato         |               |             |           | 21.785        | 1729        | 1         |
| E,E-2,4-decadienal                                   | baked sweet potato, floral | (23.81-23.84) | (1840-1841) | 2         | 24.598        | 1831        | 2         |
| (unknown)  | herbal, floral             |               |             |           | (24.79-24.84) | (1837-1839) | 2         |
| 1,1,4a-trimethyl-5,6-dimethylenedecahydronaphthalene | seirogan-like              | (24.02-24.07) | (1847-1849) | 2         | 24.962        | 1843        | 2         |
| calamenene   | herbal, floral             |               |             |           | 25.176        | 1851        | 3         |
| isopropyl 3-phenylpropanoate ?                       | fruity                     |               |             |           | 26.169        | 1883        | 2         |
| ethyl hydrocinnamate                                 | sweet, fruity              | 25.453        | 1899        | 4         | 26.698        | 1903        | 4         |
| $\beta$ -calacorene ?                                | herbal, woody              | 27.566        | 1972        | 1         |               |             |           |
| isopropyl 3-phenylpropanoate                         | fruity                     |               |             |           | 28.912        | 1986        | 1         |
| (unknown)  | woody                      | (29.36-29.39) | (2033-2034) | 2         |               |             |           |
| nerolidol  | fruity, sweet              |               |             |           | 30.664        | 2045        | 1         |
| ethyl cinnamate                                      | fruity, propolis, burned   | 32.683        | 2147        | 2         |               |             |           |
| isospathulenol ?                                     | woody                      | (36.36-36.39) | (2275-2276) | 2         | 37.374        | 2273        | 2         |
| (unknown)  | woody                      |               |             |           | (38.19-38.25) | (2292-2294) | 2         |
| hydrocinnamic acid                                   | acid, sweat                |               |             |           | 47.092        | 2629        | 2         |

\*一部の成分はTICピークが見られなかったため、においを感じた時間およびその保持指標 (RI) の範囲を括弧書きで示している。  
また、2試料の分析時期が異なるため、同一成分であっても保持時間 (RT) がずれている。ただし、保持指標 (RI) はほぼ同じである。

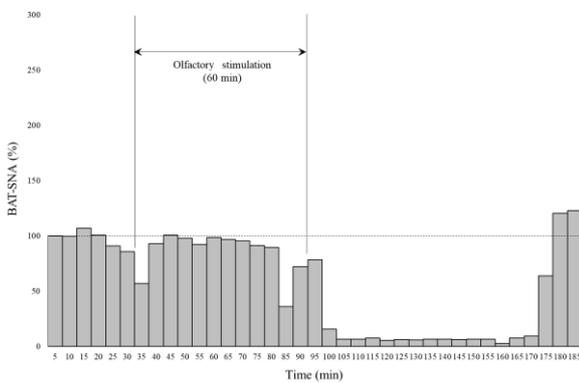
【検体1】 13週齢 304.21 g



【検体2】 13週齢 307.13 g



【検体3】 12週齢 302.65 g



【検体4】 12週齢 312.05 g

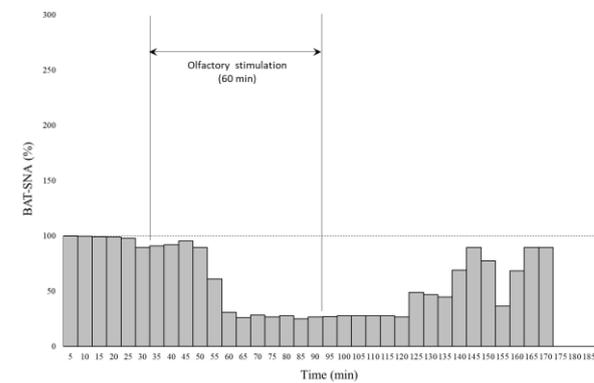


図2 ラットに抽出滓精油の香りを嗅がせた時の交感神経活動の変化

下し、30分後から1時間程度低い状態が続いた後、徐々に元の活動に戻った。最大抑制率は75%であった。

以上の結果より、個体差はあるものの、プロポリスのエタノール抽出滓精油の嗅覚刺激によりラットの交感神経活動が抑制されることが明らかになった。この結果は、本精油が交感神経活動を抑制し、興奮状態を押さえリラックス効果を与える可能性を示唆している。

#### 4. まとめ

プロポリスのエタノールエキス製造時に発生するエタノール抽出滓(副次原料)を原料として精油を試作した。乾燥した抽出残渣を使用し、直接蒸留法により最大採油率0.15%(v/w)で精油を得られた。得られた精油は、冷凍濾過物精油と同様フローラルかつ僅かにスパイシーで、プロポリスっぽい香りもしたが、香りの強さは冷凍濾過物精油より弱かった。この精油の香りをラットに嗅がせた結果、交感神経活動を抑制する傾向を示した。最大の交感神経活動抑制率は97%であった。この結果は、抽出滓精油が冷凍濾過物精油と同様、交感神経活動を抑制し、興奮状態を押さえリラックス効果を与える可能性を示唆している。

#### 【参考文献】

- 1) 今泉茂巳ら, 岐阜県産業技術センター研究報告, No.12, pp.35-38, 2018
- 2) 熊澤茂則, ふんせき 2018(5), pp.193, 2018
- 3) 落合伸夫, アジレント/ゲステル食品中香気分析セミナー2015テキスト, pp.57-88, 2015