

和紙原料（桑皮）の醱酵精練について

IV アセトン・ブタノール醱酵細菌に対するビタミンB₂の
影響及び好気性細菌との混合醱酵について

梶 明, 三野 正浩

On the retting of plant fiber materials (barks of Mulberry-tree)
for Japanese paper manufactureIV The influence of vitamin B₂ and aerobic
bacteria on the fermentation retting by
Clostridium acetobutyricum

By

Akira KAJI and Masahiro MINO
(Laboratory of Technical Microbiology)

緒 言

著者等は第1報(1)乃至第3報(2)(3)に於て、アセトン・ブタノール醱酵細菌(K17)による桑皮の醱酵精練が成功的であることを報告した。これが実用化を考慮するとき、和紙製造工業は醱酵工業と異り直に純粋培養を大規模に実施することは不可能の状況である。従つて或程度の開放醱酵によつても円滑に醱酵が進行する如き内容を有する必要がある。一方アセトン・ブタノール醱酵細菌はその性質は嫌気性であり、これを純粋培養するには嫌氣的の深い液層を有する醱酵槽を必要とし、又この細菌の繁殖の初期に於ては好気性細菌の如き確実なる繁殖に比較してやゝその管理に慎重を期する必要がある。かゝる点より考慮すれば、醱酵を或程度好氣的状況の下に於ても尙確実に遂行せしめることが要望せられる。

かゝる見地よりすれば、醱酵に際して使用する助成料の選択を特に考慮する必要がある。第1報(1)に於て報告した如く、一般に窒素化合物に富む物質は助成料として有効なるものであるが、最近片桐(4)(5)の報告によればアセトン・ブタノール醱酵細菌に高周波を作用せしめた菌株は従來の醱酵と著しくその状況を異にし、むしろ好気性細菌の挙動を呈する。この細菌の性質の變化は唯高周波を照射した菌株に限らず、醱酵液中にビタミンB₂(以下B₂と略記する)がある量存在すれば従來の菌株についても同様に起り得るものであると。著者等は和紙製造に桑皮を使用するときは、その表皮を予め完全に除去する必要を認め、醱酵法によりこの剥皮を行うときは約24時間の第1次醱酵を実施して桑皮の表皮を離脱し易くすることが望ましいことを確認した。かゝる方法について検討中その廢液を第2次醱酵に使用して纖維を開繊せしめたときは、井水を使用した醱酵より著しく良好なる結果を示す事を見出し、この原因は片桐の発表した内容を参照すれば恐らくK17号細菌の生産したB₂自身が第2次醱酵に於て有効的に作用したものと考慮した。こゝに於てB₂を添加して細菌の繁殖が安全確実になると共にその精練作用が著しく良好になるものとするれば、助成料の選択にも自らB₂を含有する物質を選択することが好ましいのである。従つて以下に於てはB₂の醱酵精練に及ぼす影響について実験した結果を報告する。

又一方著者等はK17号細菌による桑皮の醱酵精練の工業化の可能性を検討する目的を以て20L内容のかめに木蓋を施した開放醱酵の実験中偶々著しく精練効果の良好なる結果を得、その醱酵液中には数種の好気性細菌の繁殖を認めた故にこの良結果は共存する好気性細菌の作用によるものと判断して、有効共存細菌の分離を試みた結果以下に記するが如き菌株を分離し得た。偶々中浜(6)は大麻の醱酵作用を有する嫌気性細菌とその共棲微生物に関する研究結果を、中浜、原田(7)は蔗糖を原料とするアセトン・ブタノール醱酵に於ける共棲培養について発表した。著者等は桑皮に関する実験に於ても混合醱酵を実施するときは、K17号細菌の繁殖は著しく容易となり、嚴密なる嫌氣的醱酵槽も不要となり接種菌株の量も著しく少量となり、尙醱酵は容易確実となつて工業化を簡易化し、特に比較的小規模の和紙製造

工場に於ては混合醱酵法を應用することが望ましいと考慮してその結果を發表する。

實 験

I. K17号細菌の醱酵に及ぼすB₂の効果

(1) 試 料 昭和25年3月採取の桑皮(白桑)

(2) 使用細菌 *Clostridium acetobutyricum* に属する菌株で京都大学農学部片桐研究室に於て分離され、整理番号がK17である。

(3) 操 作 醱酵條件は第2報(2)及び第3報(3)に報告した通り実施した。即ち約7cmに截断した桑皮25gを予め乾熱殺菌し、一方内容500ccの平底フラスコに井水500ccを殺菌した後両者を合し、(a)はB₂を5000 γ 添加し、(b)は無添加のままpHを7.0に調節し、K17号細菌の玉蜀黍培養醪を接種して、42°Cにて96時間醱酵した。醱酵時間48時間及び96時間に於ける纖維の開織状況を観察し、醱酵終了後は液のpH及び酸度を測定した。

分析方法はpHについては東洋濾紙水素イオン濃度試験紙により、酸度は醱酵液10ccをとり煮沸して炭酸ガスを追出した後フェノールフタレインを指示薬として $\frac{N}{10}$ 苛性ソーダ溶液にて中和滴定し、所要cc数を以て表示した。

又一方Speakmanの準合成培養基500ccを使用して、(c)にはB₂を5000 γ 添加し、(d)は無添加のままK17号細菌を接種し、20時間後細菌が充分繁殖したのを確認し、これに予め乾熱殺菌した桑皮を25g宛投入して前記同様纖維の開織状況を観察し、醱酵液のpH及び酸度を測定した。

(4) 実 験 結 果

第1表 醱酵精練に及ぼすビタミンB₂の影響

番号	培 養 基 の 配 合	pH	酸 度	開 織 状 況		細 菌 数
				48時間後	96時間後	
a	桑皮、井水、ビタミンB ₂	4.2	3.5	卅	卅	—
	桑皮、井水	4.2	3.6	卅	卅	—
c	Speakman培養液、B ₂ 、桑皮	4.2	3.5	卅	卅	252 × 10 ⁸
d	Speakman培養液、桑皮	4.2	2.7	+	卅	192 × 10 ⁸

(備考) 細菌数は桑皮投入前即ち醱酵時間20時間に於ける醱酵液1cc中の数をトーマー血球計を使用して測定した。

実験結果によれば桑皮、井水の配合液に於てはB₂を添加した場合(a)の纖維の開織度は醱酵48時間に観察すれば明らかに無添加(b)よりも良好であるが、醱酵時間がより長くなれば、即ち96時間後には両者間に相異を認め得なかつた。即ちB₂の添加によつて桑皮のペクチン分解は醱酵初期に急激に進行することが確認された。又一方Speakmanの準合成培養基を使用した(c)及び(d)の醱酵に於ても同様の結果を認め得た。

II. B₂を添加した醱酵液に通氣を施したときの精練状況

(1) 操 作 前記同様の桑皮を使用し、500cc内容の平底フラスコに通氣管を施し、予め稀硫酸稀苛性ソーダ溶液、濃硫酸の順に洗滌した空気を綿濾過器を通して無菌的となしフラスコ中に導入した。フラスコよりの排出管にも綿濾過器を附しその後端を水流ポンプに連結した。通氣量は1分間180ccであつた。

醱酵液の配合割合は、(a)井水500cc、桑皮25g、甘藷粉2.5g、B₂5000 γ とし、前記同様桑皮は乾熱殺菌した。尙比較のため、(b)はB₂無添加の醱酵とした。醱酵温度は42°C、醱酵時間は96時間とした。

(2) 実 験 結 果

第2表 醱酵液に通氣を施したときの精練状況

番号	B ₂ 添加及び通氣の有無	pH	酸 度	開 織 状 況
a	B ₂ 5000γ、通氣をなす	4.0	5.0	冊
b	B ₂ 無添加、通氣をなす	4.2	2.5	冊

実験結果に示す如く、醱酵液100ccに対してB₂1000γを添加すれば通氣を施すも尙円滑なる醱酵を継続したに反し、B₂無添加の場合は甚だ不良であつた。

III. 混合培養による桑皮の醱酵精練

(1) 好氣性細菌の分離 著者等は1950年1月桑皮を原料とするK17号細菌による醱酵精練の工業化を検討する目的を以て、約20L内容のかめを使用して醱酵を実施し、常圧及び加圧殺菌を施した桑皮を使用して何れも良好なる結果を得た。第3報(3)に報告した如く、常圧殺菌を施した桑皮の醱酵は加圧殺菌を施した桑皮よりも精練効果がやゝ劣るものであるが、上記醱酵試験に於て常圧殺菌醱酵の桑皮の精練効果は甚だ良好であつた。これは醱酵液中に共存する好氣性細菌がK17号細菌の繁殖に良好なる結果を及ぼしたものと推察し、細菌の分離を試み二株の球菌及び二株の桿菌を得た。この四株を使用してK17号細菌との混合培養を試験した結果は何れも有効であつたが特に一桿菌(假にD₂とする)は優良なる成績を認めた。従つて以後は本菌のみを使用して実験を進めた。

(2) 混合培養による精練効果 500cc内容及び1L内容の平底フラスコに前記同様の桑皮25gを入れて乾熱殺菌し、別に0.5%大豆粕液500ccを加圧殺菌し、両者を合して尙一回常圧殺菌を施し、pHを7.0に調節した後各細菌を次の如く移植した。

- (a) K17号細菌の玉蜀黍培養液25cc
- (b) 同 5cc
- (c) K17号細菌5cc及びD₂細菌のブイヨン培養液5cc
- (d) K17号細菌5cc及び*B. subtilis*のブイヨン培養液5cc
- (e) K17号細菌5cc及び*B. mesentericus*のブイヨン培養液5cc
- (f) D₂細菌5cc
- (g) *B. subtilis* 5cc
- (h) *B. mesentericus* 5cc

醱酵状況は第3表に、又醱酵後の液のpH、酸変等の分析結果は第4表に示す通りであつた。

第3表 混合培養の醱酵状況

番号	接種した細菌	醱 酵 状 況	細菌の繁殖状況	
			K17	好氣性細菌
a	K17- $\frac{1}{20}$ 容量 K17- $\frac{1}{100}$ 容量	1時間後湧付、24~48時間発泡盛	冊	} 最初は皮膜状に繁殖振れば沈み塊状となる
		5時間後湧付、発泡少量	冊	
c	K17及びD ₂	2時間後湧付、(a)同様発泡盛、液の濁濁著し、12時間後皮膜形成、振れば沈み以後形成せず	冊	
d	K17及び <i>B. subtilis</i>	(c)と全く同様	冊	
e	K17及び <i>B. mesentericus</i>	(c)と同様なるも液の濁濁著しからず	冊	
f	D ₂	12時間後厚い白色皮膜を形成、振れば沈降するも何回も形成する		
	<i>B. subtilis</i>	(f)と同様なるもやゝ薄い皮膜を形成		冊
	<i>B. mesentericus</i>	(g)と同様		冊

第4表 醱酵後の成績

番号	pH	酸度	開 織 状 況	バクテ ン 酸 石 灰 %
a	4.4	3.4	冊	0.61
b	4.4	3.0	冊	1.15
c	4.2	4.8	冊	0.64
d	4.4	3.2	冊	
e	4.4	3.4	冊	
f	6.2	1.2	—	
g	6.6	1.3	—	
h	6.4	1.4	—	

実験結果によれば、K17号細菌と好気性細菌との混合培養によればK17号細菌の繁殖を著しく促進せしめ従つて精練効果も良好である。好気性細菌の種類としてはD₂細菌が特に良好なる結果を示したが、*B. subtilis*及び*B. mesentericus*に属する菌株も又効果を示した。

(3) 混合培養による好気状態の醱酵 内容3Lの三角フラスコを使用して前記同様25gの桑皮及び500ccの井水を使用して、(a)はK17号細菌単独接種した醱酵、(b)はK17、D₂細菌の両株を混合培養した醱酵を実施した。醱酵液の底の直径は19cm、深さ1.7~2.2cmにして著しく好氣的条件下にある。実験結果は第5表に示す如くであつた。

第5表 好氣的醱酵の成績

番号	接種した細菌	pH	酸度	開織状況
a	K17 $\frac{1}{20}$ 容量	4.3	2.9	冊
b	K17 $\frac{1}{100}$ 容量 + D ₂ $\frac{1}{100}$ 容量	4.1	3.3	冊

実験結果によれば、好氣的条件下に於ても混合培養によれば順調なる醱酵経過を示し、繊維の開織状況もK17号細菌単独接種に比較して著しく良好であつた。

(4) 混合培養による接種容量の節減 内容1Lの平底フラスコを使用して前記同様25gの桑皮、500ccの井水及び助成量と

して0.5%の大豆粕を使用して次の如く種々の量のK17号細菌の玉蜀黍膠を接種した。尚D₂細菌は何れも5cc宛のブイヨン培養液を接種した。

K17号細菌の接種量

(a) 5cc (b) 2.5cc (c) 1cc (d) 0.4cc

実験結果は第6表に示す通りであつた。

第6表 接種細菌量と醱酵成績

番号	K17号細菌の接種量cc	pH	酸度	開織状況
a	5.0	4.2	2.3	冊
b	2.5	4.2	2.8	冊
c	1.0	4.2	2.6	冊
d	0.4	4.2	2.6	冊

実験結果によれば、混合培養によりK17号細菌の接種量を醱酵液の $\frac{1}{200}$ 容量に減少しても尚96時間後には順調なる開織状況を示し、120時間の醱酵によれば $\frac{1}{1000}$ 容量以下の接種量にて尚充分なる開織状況を示した。

總 括

(備考) (a)及び(b)は醱酵時間96時間、(c)及び(d)は120時間 (1) 桑皮の醱酵精練を実施するに当り、液中にビタミンB₂を1000r(液100cc当り)添加した醱酵に於ては初期に明確なる好影響を認めた。

(2) ビタミンB₂を添加すれば通気を施すが如き著しい好気性下に於ても尚桑皮の精練状況は良好であり、片桐がアセトン・ブタノール醱酵に於て発見したと同類の結果が醱酵精練に於ても観察出来た。

(3) アセトン・ブタノール醱酵細菌K17号と一好気性細菌D₂との混合培養によればK17号細菌の繁殖極めて良好であり、従つて桑皮の精練効果も良好であつた。

(4) 混合醱酵を行う好気性細菌は特にD₂細菌に於て優良なる効果を認めたが、*B. subtilis*及び*B. mesentericus*等の菌株にても充分効果を認め得た。

(5) 混合培養によれば、K17号細菌の接種容量を著しく少量となし得、又好氣的醱酵条件下に於てもK17号細菌の繁殖は順調であり、従つて精練効果も良好であつた。

(6) これ等の実験結果より考慮すれば、桑皮のアセトン・ブタノール醱酵細菌K17号による醱酵精練を工業化する場合には、助成料の選択に当り第1報(1)に於て報告した如く発酵液を含有する上に尚

且ビタミン B₂ を共に含む如き物質を選択すれば确实なる醸酵が遂行されるべく、尙又 D₂ 細菌の如き好気性細菌と混合培養すれば、操作甚だ簡單となり、しかも極度の嫌気状態を選択する必要もなく、确实に醸酵が遂行される。

終りに本実験中終始御懇篤なる御指導を賜わつた、京都大学農学部片桐英郎教授に深甚の謝意を表する。

文 献

- (1) 梶、三野：香川農専研究報告， 1, 57 (昭和24年)
- (2) 梶、三野：同上， 1, 64 (昭和24年)
- (3) 梶：香川農大術報告， 2, 130 (昭和26年)
- (4) 片桐、今井、立花：日本農芸化学会関西支部講演会 (昭和24年7月)
- (5) 片桐、立花：ビタミンB総合研究委員会紀事37 (昭和25年3月)
- (6) 中浜：農化， 23, 245 (昭和25年)
- (7) 中浜、原田：農化， 23, 206 (昭和24年)

Résumé

We have studied the effect of vitamin B₂ and aerobic bacteria on the fermentation retting of the barks of Mulberry-tree by *Clostridium acetobutyricum* (K 17).

The results summarized as follows:

1. When 1000 γ B₂ was added into 100cc medium, separation of fibers was very much advanced.
2. We observed that refined fiber was obtained by anaerobic bacteria *Cl. acetobutyricum* under aerobic condition in the presence of B₂.
3. The fermentation retting proceeded normally in the mixed culture of *Cl. acetobutyricum* and a strain of aerobic bacteria.

In these mixed cultures, complete fermentation occurred with such a small amount of inoculation as 1/1000 of *Cl. acetobutyricum*.

4. It was found that by these mixed cultures, satisfiable separation of fibers was attained aerobically as well as anaerobically.