

炭化産物の品質に関する研究 (I)

竹酢液が口腔内細菌の培養に及ぼす影響について

中島 俊 本多 琢己

Study on quality of carbonized products (I)

Toshi NAKAJIMA and Takumi HONDA

要旨：県内及び県外産の竹酢液並びにその分画成分（フェノール類、酸類、中性・塩基類）を寒天培地に添加して、口腔内細菌の培養試験を行った。竹酢液の成分の比較はTLC（薄層クロマトグラフ）で行った。竹酢液の添加率が1%の培地では、細菌は活発に増殖し、添加率が5%の培地では、細菌の増殖は全く観察されなかった。フェノール分画を1%添加した培地では、細菌は活発に増殖したが、原液を添加した培地ほどではなかった。フェノール分画を5%添加した培地では、細菌の増殖は全く観察されなかった。酸類、中性・塩基類はフェノール分画ほどの影響は見られなかった。竹酢液の抗菌性と生理活性はフェノール分画の濃度に起因し、生理活性作用は他の分画との複合効果が大きい。

1. はじめに

近年、健康志向や環境問題の高まりから木炭や木酢液に対して消費者の関心が高まり、様々な方面で使われるようになった。しかし、これらの中には厳密なデータに基づかない風聞や個人的な経験による用い方がされている例も多く、製品の中には粗悪なものも見受けられる。こうした背景から厳密なデータに基づいた竹酢液の有効性の解明や品質に関する研究が関係者から強く求められている。

本研究は、このような要望から木炭や木酢液等の炭化産物の品質に関して研究を行う。竹酢液には酢酸を主とする有機酸のほか、多くのフェノール化合物、中性・塩基化合物があり、主なものだけでも40種近く含まれている。こうした化合物が抗菌作用や生理活性等様々な作用を与えているが、明確にはなっていない。本報は、竹酢液の抗菌作用と生理活性作用を調べることを目的に、竹酢液とその分画成分を寒天培地に添加して、口腔内細菌の培養試験をした結果を報告する。

2. 方 法

2. 1. 竹 酢 液

実験には、表1に示す性状の竹酢液を使用した。O社の竹酢液は pH2.7、比重 1.06、固形分 0.36%で琥珀色、

静置期間は1.5年で比重の割には固形分が少ない。I社の竹酢液は pH2.6、比重 1.03、固形分 0.40%で琥珀色、静置期間は3年で、使用した竹酢液の中では一番静置期間が長い。M社の竹酢液は pH2.9、比重 1.04、固形分 2.25%で赤褐色、静置期間は7ヶ月で、使用した竹酢液の中では静置期間が短く固形分が一番多かった。M蒸留は、M社の竹酢液をロータリーエバポレータで蒸留した竹酢液である。pH2.3、比重 0.98、固形分 0.04%で蒸留することによって、pHと比重、固形分、色等の性状が大きく変化している。M残液は、M社の竹酢液を蒸留した残液で蒸留液とは反対に pH が高く色も濃くなっている。

2. 2. 竹酢液の分画法

竹酢液を分配法で分離した。分配法による分離は、同一の分画に属する分画物だけでなく、他の分画に属すべき成分が多少なりとも混入するのが普通である。従って、

表1. 竹酢液の性状

竹酢液	ph	比重	固形分(%)	液の色	静置期間
O社	2.7	1.06	0.36	琥珀色	1.5年
I社	2.6	1.03	0.40	琥珀色	3年
M社	2.9	1.04	2.25	赤褐色	7ヶ月
M蒸留	2.3	0.98	0.04	淡黄色	—
M残液	3.7	—	—	黒褐色	—

カルボン酸分画に少量のフェノール成分が混入したり、逆に、フェノール分画に酸が多少含まれる。しかし、竹酢液に含まれる成分やその機能の概略を知る為には有効な方法と思われるのでこの方法を用いて分画した。

竹酢液を塩析後、次の操作手順でカルボン酸分画、中性・塩基性分画、フェノール分画に分画した。

- ① エーテルを加えて、静置すると水層とエーテル層に分離する。水層は捨てる
- ② ①のエーテル層に5%炭酸水素ナトリウムを加えて、静置すると水層とエーテル層に分離する
- ③ ②の水層に30%硫酸を加えて、エーテルを加えて静置すると水層とエーテル層に分離して、エーテル層にカルボン酸分画が得られる
- ④ ③のエーテル層に2N水酸化ナトリウムを加えて静置すると水層とエーテル層に分離して、エーテル層に中性・塩基性分画が得られる。
- ⑤ ④の水層に30%硫酸を中和するまで加えて、エーテルで抽出すると、エーテル層にフェノール分画が得られる。水層はすてる

分離した酸分画、中性・塩基性分画、フェノール分画を細菌の培養試験及びTLC分析に使用する。

2. 3. 口腔内細菌の培養

1) 菌の採取

爪楊枝で歯の表面及び歯茎部分をこすって細菌を採取し、これを2mlの蒸留水を入れた試験管の中ですすぐようにして爪楊枝を洗い、シリコン栓をして保管した。

2) 培地の調製と殖菌手順は、次の通り。

- ① 市販の寒天培地を適量の水を入れたビーカーに入れる
- ② このビーカーを水の入った鍋に入れてガラス棒でゆすり攪拌しながら加熱する
- ③ 寒天培地が溶解したところで火を止めて、約40度になるまで放冷する
- ④ 冷めた寒天培地をシャーレに適量分注する
- ⑤ 竹酢液及び分画成分を適量寒天培地の入ったシャーレに入れて寒天培地と竹酢液が良くなじむように攪拌する
- ⑥ 1)で採取した菌の入った液をピペットで1滴培地の入ったシャーレに落として良く攪拌する
- ⑦ 蓋をして常温下で培養

3) 供試用寒天培地

殖菌寒天培地は、次の通り。

- ① 寒天培地だけのシャーレ (Blank) : 比較対照のため

② エーテル入りシャーレ : 分画成分にエーテルが混入しているため、その影響を調べるため

③ 竹酢液入りシャーレ : 竹酢液1%、竹酢液5%添加

④ フェノール類入りシャーレ : フェノール分画1%、フェノール分画5%添加

⑤ 酸類入りシャーレ : 酢酸などのカルボン酸分画添加

⑥ 中性・塩基類入りシャーレ : 中性・塩基性分画添加

2. 4. TLC分析

展開用の基盤は、50×100の大きさのガラス板にシリカを薄く塗布した市販品を用いた。展開液は、ブタノール、エタノール、1Nアンモニア水を6:2:3の割合で混合した液を用いた。基盤の下端から10mmの所に竹酢液及び分画成分をスポットして、展開液を5mmの深さに入れた展開槽に入れて蓋をし、90分間展開した。

3. 結 果

3. 1. 培養試験結果

写真1~10に培養結果を示した。写真1はBlankの寒天培地だけのシャーレで、小さな円形のコロニー (S) を形成する細菌、大きな円形のコロニー (L) を形成する細菌、不定形のコロニー (F) を形成する細菌が観察された。このうち大きな円形を形成するコロニーは顕微鏡で観察の結果、運動性のある細菌群であった。

写真2~5はO社、I社、M社の竹酢液及びM社の蒸留竹酢液1%を培地に添加したもので、いずれのシャーレもBlankと比較して大幅な細菌の繁殖が観察された。また、各細菌群の繁殖状況はO社、I社、M社それぞれ異なる繁殖状況を示した。O社の竹酢液は、いずれの細菌とも良く繁殖している。I社の竹酢液は、不定形のコロニーを形成する細菌の繁殖が良く、円形のコロニーを形成する細菌の繁殖はBlankとほぼ同じ程度であった。M社の竹酢液は、円形のコロニーを形成する細菌の繁殖が特に良く、不定形のコロニーを形成する細菌の繁殖は、Blankと同程度であった。

M社の蒸留竹酢液は、不定形のコロニーを形成する細菌の繁殖が非常に良く、円形のコロニーを形成する細菌の繁殖はBlankよりも劣る結果となった。

写真10は、O社の竹酢液5%を添加したもので、細菌の繁殖は全く観察されなかった。O社以外のI社、M社の竹酢液についてもO社と同様細菌は全く繁殖しなかった。

写真6~9は、フェノール分画を1%培地に添加したも



写真1. Brank

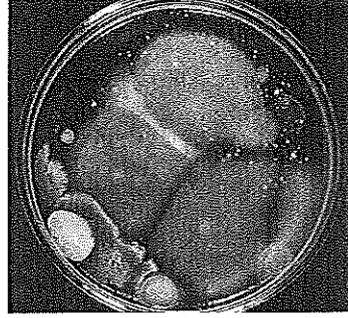


写真2. O社竹酢液1%添加

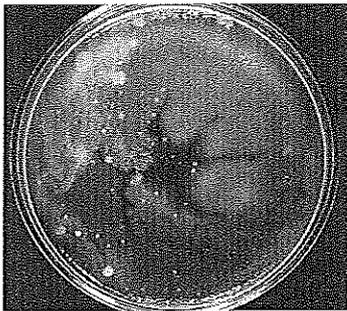


写真3. I社竹酢液1%添加

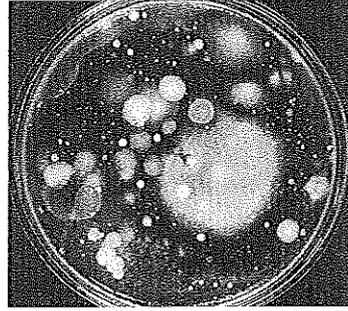


写真4. M社竹酢液1%添加

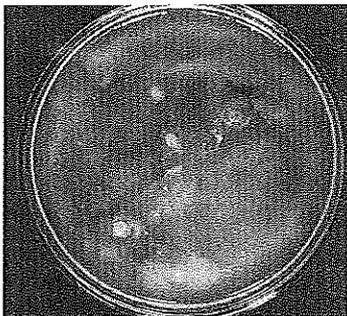


写真5. M社蒸留液1%添加

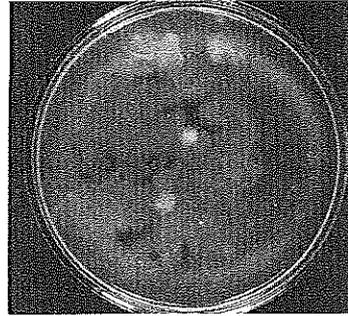


写真6. O社フェノール分画1%添加



写真7. I社フェノール分画1%添加

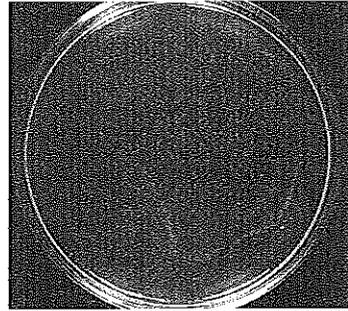


写真8. M社フェノール分画1%添加

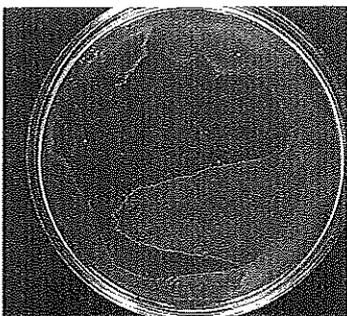


写真9. M社蒸留液フェノール分画1%添加

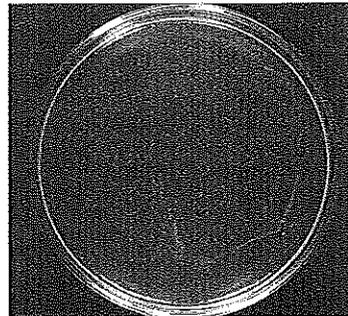


写真10. O社竹酢液5%添加

表1. 竹酢液の性状

	1%原液 L S F	5%原液 L S F	1%フェノール L S F	5%フェノール L S F	中性・塩基類 L S F	酸 類 L S F
O社	+++	---	+++	---	--+	--+
I社	+++	---	+++	---		+++
M社	+++	---	+-	---	--+	--+
M蒸留	*+++	*---	+-	---	+++	+++
M残液		---		+++	--+	+-

L:比較的大きくて丸いコロニー, S:小さくて丸いコロニー, F:不定形のコロニー

+, -:+は増殖, -は増殖なし

*:Brank より増殖が弱い

ので、いずれの培地とも不定形のコロニーを形成する細菌の繁殖状況は良好であったが、円形のコロニーを形成する細菌の繁殖はBrankと同じかそれよりも劣っていた。

中性・塩基性分画及び酸分画についてもフェノール分画同様、不定形のコロニーを形成する細菌の繁殖が非常に良く、円形のコロニーを形成する細菌の繁殖は、Brankと同程度か少し良い程度であった。表2に培養試験の結果をまとめて示した。

3. 2. TLC分析の結果

写真11~14にTLC分析結果を示した。写真11の(a)はO社の、写真11の(b)はI社の、写真11の(c)はM社の、竹酢液のTLC分析結果で、O社、I社、M社の竹酢液は展開パターンと成分量に多少の相違は認められるが、ほぼ同じ分析結果であった。M社の蒸留残液は、元の竹酢液に比べて展開パターンや成分量が大きく異なっていた。

写真12にフェノール分画のTLC分析結果を示した。写真12の(a)はO社の、写真12の(b)はI社の、写真12の(c)はM社の、フェノール分画のTLC分析結果で、O社、I社、M社とも成分構成はほぼ同じであるが、成分の含有量はO社、I社、M社でそれぞれ違っていた。写真12の(d)はM社の蒸留竹酢液のフェノール分画を、写真12の(e)はM社の蒸留残液のフェノール分画である。蒸留することによって蒸留液と残液に成分がそれぞれ分配されるため、蒸留竹酢液と元の竹酢液とは成分の構成と含有量が大きく異なる。

写真13に酸分画のTLC分析結果を示した。O社とI社の酸分画は写真13の(a)及び(b)から分かるようにO社とI社の違いはほとんどなかったが、M社とは成分構成及び含有量ともに大きな違いが生じた。写真

13の(d)はM社の蒸留竹酢液の、写真13の(e)はM社の蒸留残液の酸分画のTLC分析結果で、蒸留することによって、フェノール分画と同様、元の竹酢液と比べて成分構成と含有量は大きく異なる。

写真14に中性・塩基性分画のTLC分析結果を示した。中性・塩基性分画は酸分画と同様O社、I社、M社の違いはほとんど見られなかった。写真14の(d)のM社の蒸留液の酸分画は分画成分の含有量の違いはあるものの成分構成は元の竹酢液とそれほど違っていなかった。

竹酢液を蒸留することによって、蒸発しやすい成分を蒸留液に、蒸発しにくい成分を残液に、分配することや成分の濃縮が可能である。

4. 考 察

竹酢液の成分は基本的にほぼ同じと考えられる。竹酢液の違いは、主に竹酢液に含まれている成分の違いからくるものと思われる。竹酢液の成分の違いは、竹酢液を製造する時の原料や熱分解条件、静置期間、蒸留等の製造条件の違いに起因している。竹酢液は使用する濃度によって抗菌性や生理活性等の効果が異なることが、経験的に知られている。従って、使用目的に応じておおむね希釈倍率が決められている。

今回の実験で、竹酢液は使用量によって全く異なる作用結果になることが、口腔内細菌の培養試験から明らかになった。竹酢液及びフェノール分画を1% (約100倍希釈) 添加した寒天培地では、竹酢液を添加しない寒天培地と比較して大幅な細菌の増殖が観察された。他方、竹酢液及びフェノール分画を5% (約20倍希釈) 添加した寒天培地では、細菌の増殖が全く観察されなかった。このように竹酢液は、使用する濃度に応じて全く相反す

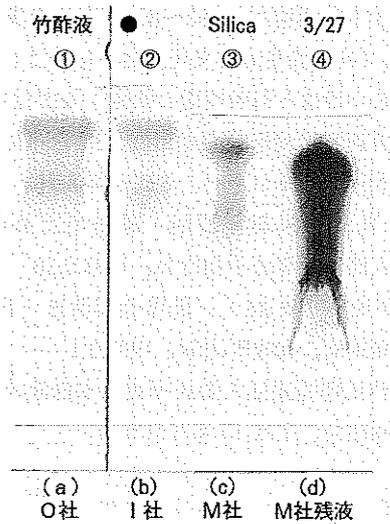


写真11. 竹酢液 TLC分析

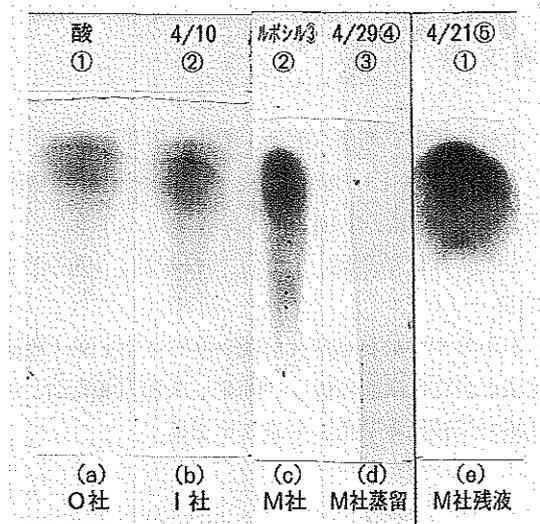


写真13. 酸分画 TLC分析

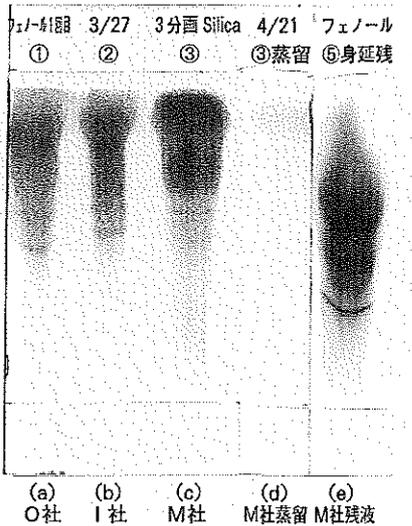


写真12. フェノール分画 TLC分析

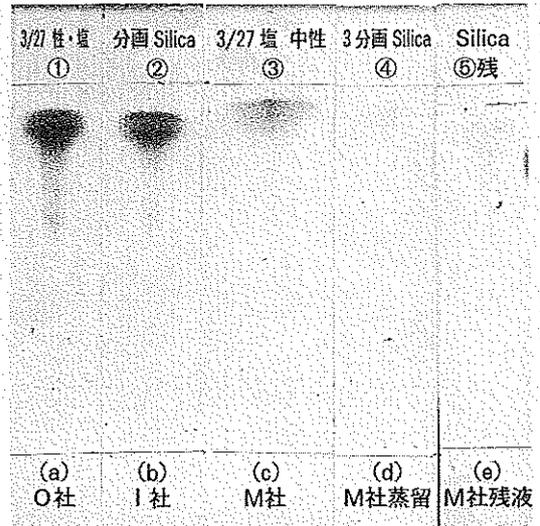


写真14. 中性・塩基性分画

る働きをすることが分かり、経験を裏付ける結果となった。
竹酢液の抗菌作用及び生理活性作用は、主にフェノール分によるところが大きく、フェノール分が少ないと細菌の増殖活性が高く、多くなると抗菌作用が強くなる。フェノール分画程の強い効果は認められなかったが、酸分画にもフェノール分画と同様な作用がある。中性・塩基性分画には強い抗菌作用や増殖の活性化は見られなかった。円形のコロニーを形成する運動性のある細菌は、フェノール分画や酸、中性・塩基分画だけでは増殖性が悪く、他の分画成分との複合作用によって増殖性が増すものと思われる。フェノール分画の抗菌性は、蒸留竹酢液のフェノール分画が最も強く、蒸留残液のフェノール分画が最も弱かった。しかし、増殖性については逆であった。

今回の研究で竹酢液には濃度に応じて、口腔内細菌に対して強い抗菌作用があることが分かった。虫歯や歯肉炎の予防に期待がもてる。また、強い生理活性作用もあることから、菌類の培養助剤としても期待がもてる。しかし、竹酢液の有効成分やその作用機構、毒性等については不明な点も多く、今後、これらの点を明らかにするために、次の実験を行いたい。

- ①口腔内細菌の同定
- ②有効成分の分析と作用機構
- ③安全性の確認 (毒性試験)

参考文献

- 1) 木材化学：三浦伊八郎他、昭和8年4月27日
- 2) 木材化学（下）：p93～95、右田伸彦他、共立出版（株）、昭和56年3月10日
- 3) 13599の化学商品、化学工業日報社、1999年1月27日
- 4) わかりやすい林業研究解説シリーズ No.98「簡易炭化法と炭化生産物の新しい利用」、矢田貝光克他、（財）林業科学技術振興所、平成3年2月
- 5) 最新・木酢活用法（p52～80）：現代農業、第70巻第4号、（社）農産漁村文化協会、1991.4.1
- 6) 木酢液の特性と利用技術の開発：矢田貝光克、木質廃棄物再資源化技術開発総集編、P94～97、（財）日本住宅・木材技術センター、平成9年3月
- 7) ポリ乳酸－医薬・製剤・環境のために－p44：辻 秀人他、（株）高分子刊行会、1997.9.20
- 8) 「炭が地球を救う」世界の炭焼き・日本の炭焼き：杉浦銀治、（株）牧野出版、1997.3.1
- 9) 特用林産物需要拡大委託事業「木酢液の規格」、日本木酢液協会、平成13年2月9日