

研究報告

三種植物纖維手工紙防黴性及評估方式比較

葉若璽^{1*} 劉佩玲¹ 梁恭豪¹ 曹怡靜¹ 徐健國¹ 傅春旭²

【摘要】本研究探討不同植物纖維抽出成分對紙張防黴性的影響，選用三椏 (*Edgeworthia papyrifera*)、雁皮 (*Wikstroemia sikokiana*)、構樹 (*Broussonetia papyrifera*) 等三種常用造紙纖維，抄製成手工紙，評估抗黴菌活性，另一部分以紙張表面黴菌面積 (肉眼判讀、影像分析) 和麥角固醇濃度探討植物抽出成分對防黴性的影響。在造紙纖維植物方面以三椏的防黴性較佳，在防黴評估試驗中宜利用影像分析為主，無法判定的狀態再以肉眼判讀為輔。

【關鍵詞】三椏、雁皮、構樹、紙張防黴性、抑制面積、麥角固醇

Research paper

The antifungal ability of three kinds of papermaking fiber and the comparison of assessment methods

Ruo Yun Yeh^{1*} Pei Lin Liu¹ Gong Hao Liang¹ Yi Jing Cao¹ Jiann Gwo Shyu¹ Chuen Hsu Fu²

【Abstract】This study is divided into two parts. One is the antifungal ability of the extract of paper fiber plant. We choose three common kinds of papermaking fiber including mitsumata (*Edgeworthia papyrifera*), gampi (*Wikstroemia sikokiana*), and paper mulberry (*Broussonetia papyrifera*). After the same cooking condition, the antifungal ability of unextraction compare with alcohol-benzene extraction. Another part is the inhibitory area (visual observation, image analysis software) and the concentration of ergosterol investigate the antifungal effects of the plant extract. Mitsumata is better antifungal papermaking fiber. The inhibitory area should be determined by image analysis software, the visual observation be used in undetermined state.

【Key words】mitsumata, gampi, paper mulberry, paper antifungal ability, inhibitory area, ergosterol

1. 林業試驗所木材纖維組

Division of Wood Cellulose, Taiwan Forestry Research Institute

2. 林業試驗所森林保護組

Division of Forest Protection, Taiwan Forestry Research Institute

* 通訊作者，100台北市中正區南海路53號

Corresponding author, 53 Nan Hai Road, Taipei 100, Taiwan. Tel: +886-2-23039978 ext.3708. Fax: +886-2-23037832.

e-mail: zoeyeh@tfri.gov.tw

一、前言

紙張是人類文明發展的重要產物，承載著文化訊息傳遞的神聖使命，紙張可能經由物理、化學或生物的方式被破壞，其中真菌是生物劣化的重要因素，前人利用各種抗真菌的方法，以達到延長紙質文物壽命的目的，包括使用各種抗真菌化學試劑，醇類、烷基試劑、唑類、精油、苯酚衍生物、光催化劑、四級胺、鹽類和羧酸酯等，以及利用物理方法，脫水、伽瑪射線、高頻電流、低氧環境、紫外光、溫度 (Sequeira et al. 2012)，化學抗真菌劑可以引入製紙流程中，混入上膠劑、直接加入紙漿、做為塗料等，或是添加在手工紙的漿糊中，大多數的抗真菌方法亦可應用在已使用的紙張，包括圖書、文檔和書畫藝術品等，卻少有針對造紙纖維本身的防黴特性探討。事實上，有些造紙纖維植物就具有良好的抗生物活性而為人所知，西藏有一種狼毒紙，取瑞香狼毒 (*Stellera chamaejasme*) 的根，將其韌皮撕碎、熬煮、捶打製成紙漿，由於瑞香狼毒根具毒性，文獻亦指出根萃取物具抗微生物活性 (Ma et al. 2009)，所抄製而成的狼毒紙可防止蟲蛀鼠咬且不易發霉。

目前工業上有數種防黴檢測標準，美國紙漿與造紙技術協會TAPPI T487紙和紙板的防黴性，選用的測試菌種為球毛殼菌 (*Chaetomium globosum*)、土麴菌 (*Aspergillus terreus*)、黑麴菌 (*Aspergillus niger*)，以孢子懸浮液接種試樣後培養14天，如第一週觀測到黴菌則記錄無防黴性 (not fungus-resistant)，第一週無黴菌生長但第二週有黴菌稀疏生長則記錄為普通防黴性 (moderately fungus-resistant)、經二週培養均無黴菌生長則視為具防黴性 (fungus resistant)，由於判定方法不明確，該測試標準目前已被撤回；另一個為美國材料與試驗協會ASTM D2020 紙和紙板的防黴性標準測試法，選用的菌種和TAPPI T487一致，該紙品使用不會接觸到土壤則以直接接種法測試，評定方法只能定性而於2009年撤回；目前紙

張防黴試驗多參考纖維材料或織品的防黴試驗，日本工業規格JIS Z2911防黴性試驗方法包含各種材料，第7條針對纖維製品，以孢子懸浮液接種試樣，選用菌種為黑麴菌、橘青黴 (*Penicillium citrinum*) 球毛殼菌、疣孢漆斑菌 (*Myrothecium verrucaria*)，培養2至4週，試樣無菌絲生長表示為0，菌絲生長未超過試樣全面積的1/3表示為1，菌絲生長超過試樣全面積的1/3表示為2；中華民國國家標準CNS 2690 纖維製品防黴性能及物理性能檢驗法選用六種菌種，黑麴菌、球毛殼菌、疣孢漆斑菌、哈氏木黴菌 (*Trichoderma harzianum*)、橘青黴、棒麴菌 (*Aspergillus clavatus*)，培養後測定試樣物理強度及觀察黴菌生長狀態，菌絲生長面積未達1/10防黴性為甲級，菌絲生長面積1/10至1/3防黴性為乙級，超過1/3防黴性為丙級。除了觀察黴菌生長狀況和物理強度改變，由於有些防黴機制在於抑制真菌細胞壁的主要成分幾丁質 (chitin) 或真菌細胞膜的主要成分麥角固醇 (ergosterol) 的生合成，定量麥角固醇也成為一種紙張防黴效果的評估方式，在3種紙樣上施用5種防黴劑，接種4種菌種，和空白組比較麥角固醇的含量以評估防黴劑的功效 (Fabri et al. 1997)；麥角固醇定量也被用於快速評估穀物和飼料被真菌污染的程度 (Ng et al. 2008)，以3種菌種在液態培養的菌絲生長量確實和麥角固醇為正相關，再接種在米上麥角固醇含量和幾丁質含量隨培養天數而增加 (Seitz et al. 1979)。本研究嘗試以菌絲生長面積和麥角固醇含量，評估三種植物纖維三椏、雁皮、構樹的防黴性。

二、方法

1. 植物抽出成分萃取

根據TAPPI T 204 om-88，定量造紙纖維植物樹皮或紙樣所含的醇苯萃取物。

2. 紙樣的製備

- (1) 市售紙樣：大陸淨皮宣紙S (青檀皮/沙田稻草60/40，購自蕙風堂)、棉紙M (構

樹皮，木漿，購自大昌裱褙材料)

- (2) 市售漿板抄製紙樣：取雁皮WsP (*Wikstroemia sikokiana*)、馬尼拉麻MtP (*Musa textilis*)、龍鬚草EbP (*Eulaliopsis binata*)、棉GsP (*Gossypium* spp.) 等四種市售漿板，加水散漿後根據CNS 11212抄製紙樣。
- (3) 實驗室蒸煮抄製紙樣：選用三椴 (*Edgeworthia papyrifera*)、雁皮、構樹 (*Broussonetia papyrifera*) 等三種造紙纖維植物樹皮，以蘇打法蒸煮抄製成如下紙樣：
 - a. 未漂白紙樣—樹皮泡水一天，以液比10:1，添加9.68 g NaOH (7.5% Na₂O) 蒸煮四小時，冷卻後以人工漂洗、篩選方式完成漿料備置，根據CNS 11212抄製為三椴EpU、雁皮WsU、構樹BpU等三種紙樣。
 - b. 漂白紙樣—以上述相同製漿方式後，次氯酸鈉溶液 (有效氯3.79 g/L) 對絕乾漿為5%，30°C下，漂白反應1.5小時，根據CNS 11212抄製為三椴EpB、雁皮WsB、構樹BpB等三種紙樣。
 - c. 醇苯萃取紙樣—樹皮經醇苯萃取後，再以相同製漿方式處理，根據CNS 11212抄製為三椴EpE、雁皮WsE、構樹BpE等三種紙樣。

3. 紙漿纖維觀測

根據CNS 11622及CNS 13355 量測纖維長度及纖維寬度。

4. 紙張白度

根據CNS 1466測定紙張白度

5. 黴菌抑制面積

參考CNS 2690以及TAPPI T487 cm-93之規定進行防黴試驗。將試驗菌株接種在適當的平板培養基上，置於28°C下培養，一星期後用10 mL無菌水洗下孢子得到孢子懸浮原液，再將其稀釋為106-108 CFU/mL孢子懸浮液備用，將

孢子懸浮液均勻的塗佈於紙樣上，於28°C下培養一星期後，觀察黴菌的生長情況，並測量生長面積，以抑制面積的百分比來表示紙張防黴活性。黴菌抑制面積 (%) = (空白組黴菌生長面積 - 實驗組黴菌生長面積) / 空白組黴菌生長面積。黴菌的生長面積利用下列二種方式進行：

- (1) 肉眼判讀：將紙樣視為10×10的100個小方格，分別判讀每一小方格是否有菌絲生長，即為紙樣菌絲生長面積的百分比。
- (2) 影像分析：拍照後將圖檔利用影像分析軟體Image J測量黴菌生長面積百分比，以色差值做為判定的基準。

4. 麥角固醇含量

將經真菌培養的紙樣自平板培養基上取下，以甲醇反覆萃取三次，再加入氫氧化鈉於70°C的水浴中皂化反應30分鐘，冷卻後再以石油醚反覆萃取二次後合併萃取液濃縮，將濃縮後的萃取物溶於異丙醇/乙腈 (1:1) 溶液中待測。配製一系列麥角固醇的標準品，以液相層析儀 (Agilent 1100) 進行分析，依據麥角固醇濃度和層析波峰的積分面積繪製檢量線，分析條件為使用C-18逆相管柱 (5 μ, 150 × 4.60 mm)，移動相為95% 甲醇溶液，流速為1 mL/min，以光二極體陣列偵測器 (Diode array detector) 進行測定，波長為282 nm。將待測溶液以液相層析進行分析，由層析波峰積分面積藉由檢量線可推算出麥角固醇濃度。

三、結果與討論

(一) 不同植物纖維手工紙防黴性評估

選用的紙樣包括自行蒸煮漂白抄製紙樣三椴EpB、雁皮WsB、構樹BpB，市售漿板抄製紙樣雁皮漿WsP、馬尼拉麻漿MtP、龍鬚草漿EbP、棉漿GsP，市售紙樣大陸淨皮宣紙S、棉紙M。裁製為5×5 cm²的試樣以影像分析進行防黴性評估，結果如圖1所示。可發現防黴活性大致上為實驗室蒸煮>市售漿板>市售紙

樣，由於市售的紙樣除了主要的樹皮纖維外常混充其他不同的植物纖維，再加上填料及加工處理，較難在同一基準上互相比較；市售漿板抄製的紙樣，雖蒸煮漂白過程不盡相同，但就各種漿板均達到一定紙漿性質標準下可相互比較其防黴性，以雁皮漿WsP具有較佳的防黴性；而實驗室自樹皮蒸煮漂白的自製紙樣，與工廠大量生產相較下蒸煮漂白條件較為溫和，而保有較佳的防黴性，但可發現實驗室自製的漂白雁皮紙樣WsB的防黴性，略遜於市售漿雁皮紙樣WsP，進一步測定其白度，自製的漂白雁皮紙樣WsB白度為 67.56 ± 0.50 ，市售漿紙樣

WsP白度為 56.71 ± 0.19 (表1)，可能是漂白造成雁皮紙防黴性的消滅。此外，由圖1自製漂白紙樣三桠EpB、雁皮WsB、構樹BpB和表3未漂紙樣三桠EpU、雁皮WsU、構樹BpU對綠色木黴的防黴活性相比，亦可發現雁皮在漂白過程中損失了大部分的抗真菌(黑麴菌)活性(從89.77%降至13.45%)，而三桠、構樹則保留較高的防黴活性，三桠從77.21%降至67.59%，構樹從81.07%降至63.67%。未能呈現漂白紙漿的抽出成分減少的數據，實因漂白紙漿的抽出成分含量極少，以目前的醇萃萃取方式定量不易。

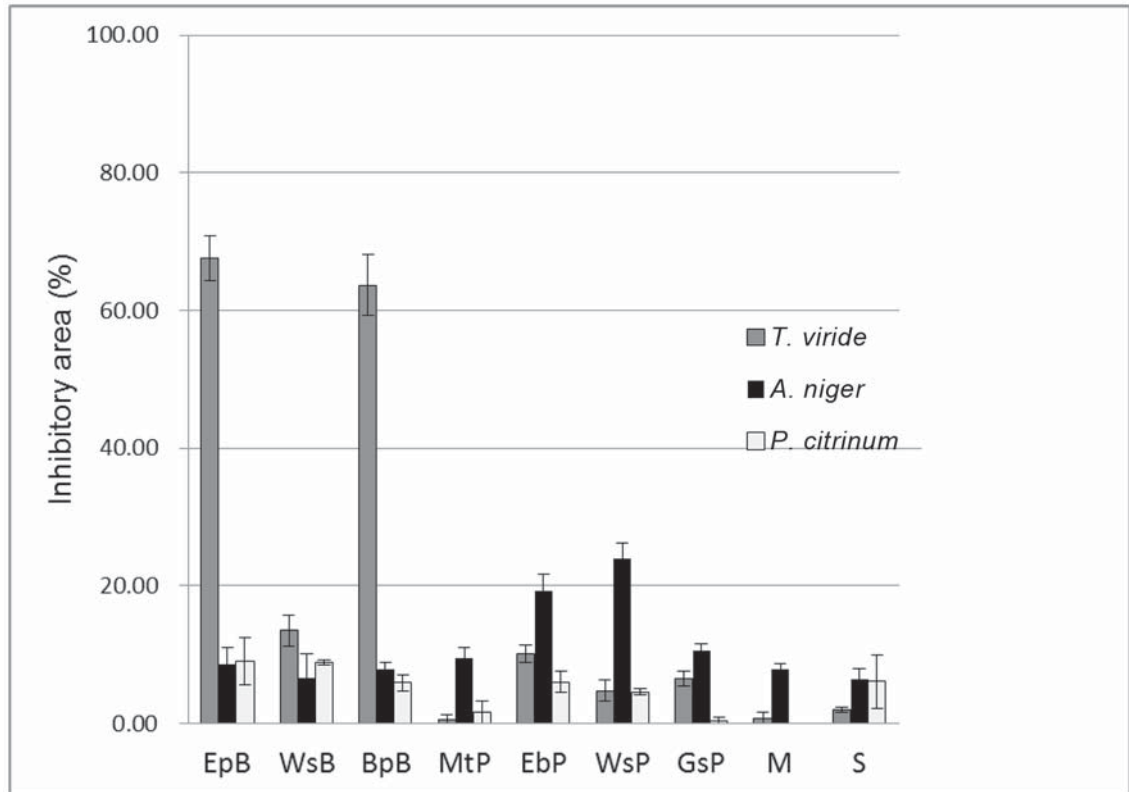


圖1. 九種紙樣的黴菌抑制面積 (%)

說明：實驗室蒸煮漂白紙樣：三桠EpB、雁皮WsB、構樹BpB，市售漿板紙樣：馬尼拉麻MtP、龍鬚草EbP、雁皮WsP、棉花GsP，市售紙樣：棉紙M、宣紙S

Fig. 1. Inhibitory area (%) of nine handmade papers

Note. Self-made bleached pulp: Mitsumata EpB, Gampi WsB, Paper mulberry BpB. Commercial pulp board: Abaca pulp MtP, Sabaigrass pulp EbP, Gampi pulp WsP, Cotton pulp Gsp. Commercial paper: Mien paper M, Shuan paper S.

表1. 九種紙樣的纖維觀測及白度

Table 1. Observation of fibers and whiteness of nine handmade papers

Papers	Fiber length (mm)	Fiber width (μm)	Length-width ratio	Whiteness (% ISO)
Mitsumata bark, EpB	3.672 (1.55-7.10)	13.73 (6.1-22.4)	267	66.12 ± 0.50
Gampi bark, WsB	4.418 (2.60-6.30)	7.07 (4.1-12.2)	625	67.56 ± 0.31
Paper mulberry, BpB	8.140 (4.20-12.40)	15.35 (9.2-22.5)	530	57.89 ± 0.52
Abaca pulp, MtP	4.375 (2.80-7.20)	16.44 (8.2-25.5)	266	71.42 ± 0.10
Sabaigrass pulp, EbP	1.785 (0.60-3.55)	9.15 (6.1-12.2)	195	68.46 ± 0.22
Gampi pulp, WsP	4.305 (2.40-6.10)	7.18 (6.1-12.2)	600	56.71 ± 0.19
Cotton pulp, Gsp	2.901 (1.30-4.85)	18.31 (10.2-26.5)	158	87.81 ± 0.14
Mien paper, M	-	-	-	83.57 ± 1.19
Shuan paper, S	-	-	-	72.99 ± 0.20

(二) 不同植物纖維抽出成分對防黴性的影響

不同植物纖維手工紙表現出不同的防黴特性，是否和纖維本身的尺寸有關，表1測量了不同植物纖維手工紙的纖維長度、寬度、長寬比、白度，在實驗室蒸煮部分以構樹BpB纖維長度最長，三桠EpB和構樹BpB的纖維寬度較寬，市售漿板部分以馬尼拉麻MtP和雁皮WsP的纖維長度較長，馬尼拉麻MtP和棉花GsP的纖維寬度較寬，未能發現和防黴的相關性，實驗室蒸煮的雁皮WsB和市售漿板WsP纖維長寬一致。

白度可反應製漿漂白過程保留纖維素成分的程度，表1可看到在實驗室蒸煮部分以雁皮WsB白度最高，其防黴性最差，市售漿板部分以尼拉麻MtP和棉花GsP的白度較高，防黴性亦較差，實驗室蒸煮的雁皮WsB和市售漿板WsP纖維長寬一致，但自製的漂白雁皮紙樣WsB白度較高，防黴性也不如市售漿紙樣WsP，可能是製漿漂白過程去除了大部分植物纖維所含的抽出成分。

樹皮先經醇苯萃取以去除植物纖維所含的抽出成分，經蒸煮並抄製紙樣三桠EpE、雁皮WsE、構樹BpE，以及未經醇苯萃取逕行蒸

煮所抄製的紙樣三桠EpU、雁皮WsU、構樹BpU，以影像分析進行防黴性的比較，結果如表3，三桠、雁皮、構樹樹皮分別含有4.81%、8.05%、4.02%的抽出成分，但經過蒸煮後均低於2%的抽出成分(表2)，發現經醇苯萃取消除構樹的抽出成分可提高防黴性，適當的保留三桠、雁皮的抽出成分確實有助於防黴性，三桠的抽出成分對黑麴菌、橘青黴的效果較明確。

(三) 防黴性評估方式的比較

參考CNS 2690以及TAPPI T487 cm-93之規定進行防黴試驗是以肉眼判讀紙張表面黴菌面積，實務上這不是件容易的工作，菌絲本身

表2. 三種植物纖維醇苯萃取物收率 (%)

Table 2. Yield (%) of alcohol-benzene extract of

three paper fiber plants

Material	Bark	Unbleached pulp
Mitsumata	4.81 ± 0.54	1.76 ± 0.04
Gampi	8.05 ± 0.82	1.51 ± 0.16
Paper mulberry	4.02 ± 0.88	1.90 ± 0.15

表3. 三種植物纖維紙樣的黴菌抑制面積 (%)

Table 3. Inhibitory area (%) of handmade paper of three paper fiber plants

Fungus	Mitsumata		Gampi		Paper mulberry	
	EpU	EpE	WsU	WsE	BpU	BpE
<i>T. viride</i>	77.21 ± 0.47	80.42 ± 3.80	89.77 ± 0.67	88.09 ± 5.46	81.07 ± 1.48	86.07 ± 2.21
<i>A. niger</i>	4.89 ± 0.56	2.10 ± 1.14	4.47 ± 3.28	13.15 ± 2.08	5.41 ± 2.01	17.48 ± 2.73
<i>P. citrinum</i>	18.45 ± 0.40	14.52 ± 1.25	17.22 ± 6.29	12.14 ± 2.02	0.64 ± 0.56	0.87 ± 1.05

的顏色、生長的密度、是否產孢等因素均會造成外觀的顏色差異，如何建立一致的判讀基準減少人為的誤差，本研究利用影像分析軟體 Image J 測量黴菌生長面積百分比，以特定的色差值做為判定的基準，此種做法能否和肉眼判讀有一致性的趨勢？我們利用統計軟體 SPSS 17，根據 66 次實驗的數據，進行相關係數 (Correlation Analysis) 的評估，結果如表 4，由綠色木黴、黑麴菌的雙變數相關分析 P-value 值 < 0.01 表示二個方法具有顯著的相關，Pearson 相關係數分別為 0.993，0.955，表示影像分析

軟體和肉眼判讀方式具有高度的正相關，然而在橘青黴的雙變數相關分析結果顯示 P-value 值 > 0.01，表示影像分析軟體和肉眼判讀方式不具有顯著的相關，橘青黴並不適用於 Image J 的判讀方式，可能是因為橘青黴的菌絲顏色並不明顯，影響到後續的判讀。事實上，影像分析無法判讀的狀況下，肉眼判讀亦為勉強為之，在肉眼可判讀的結果之下，影像分析可迅速達到理想一致的分析，在防黴評估試驗中可利用影像分析為主，無法判定的狀態再以肉眼判讀為輔。

表4. 肉眼判讀和影像分析軟體的相關性分析

Table 4. Correlation analysis of naked eye and image analysis software

Fungus	Pearson coefficient	Significance (two-tailed)
<i>T. viride</i>	0.993**	0.000
<i>A. niger</i>	0.955**	0.000
<i>P. citrinum</i>	0.305	0.013

** 在顯著水準為 0.01 時 (雙尾)，相關顯著。

利用黴菌抑制面積的百分比來表示紙張防黴活性無論是肉眼判讀或影像分析代表的是視覺上的黴菌生長量，而非實質的黴菌生長量，故試以麥角固醇含量來做為評估黴菌生長量的指標。麥角固醇是真菌細胞壁的主要成份，然而不同的真菌細胞壁麥角固醇的含量也有所差異，以往的研究上常做為真菌生物量的估算，或做為評估穀物遭受真菌污染的程度。利用麥

角固醇含量做為防黴性的評估指標不會受到肉眼判讀的人為因素干擾，可數值化對於微量的防黴效果差異也比較敏感。表 5 未經醇萃萃取不同植物纖維手工紙的麥角固醇含量，和濾紙的比較上，可明顯的看出雁皮具最佳的防黴性，三椏次之，構樹的防黴性甚至比對照組濾紙還差。利用麥角固醇含量評估防黴性，和紙張表面黴菌面積未呈現一致結果 (如圖 2)，是

表5. 三種植物纖維手工紙的麥角固醇濃度

Table 5. Concentration of ergosterol in handmade paper of three paper fiber plants

Papers	Ergosterol conc. (ppm)		
	<i>T. viride</i>	<i>A. niger</i>	<i>P. citrinum</i>
Mitsumata, EpU	0	2.39	2.06
Gampi, WsU	0	0	0
Paper mulberry, BpU	4.01	10	6.82
Filter paper (No. 1)	4.31	6.99	4.18

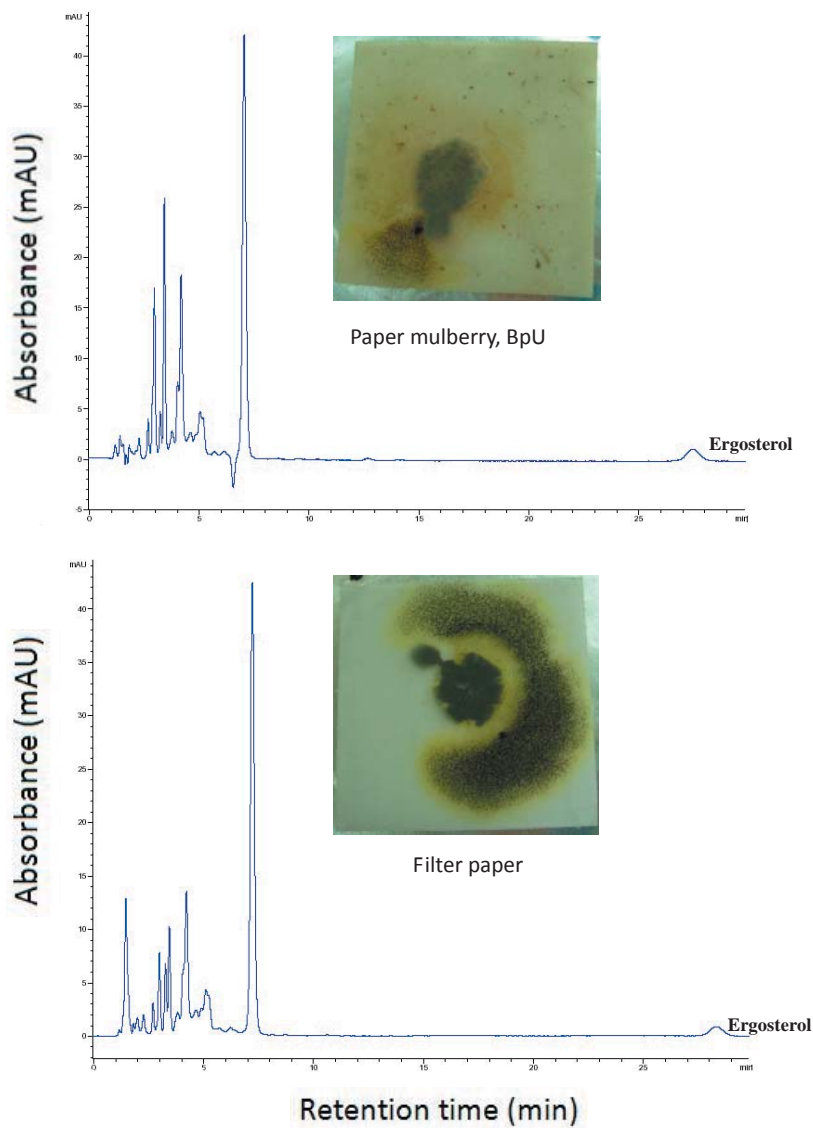


圖2. 橘青黴 (*Penicillium citrinum*) 防黴實驗麥角固醇之液相層析圖譜

Fig. 2. The HPLC profiles of ergosterol in *Penicillium citrinum*.

因為麥角固醇所顯示的是菌絲的總量，紙張表面黴菌面積則會因菌絲的密度、是否產孢影響判讀，此外，因不同菌種細胞壁所含的麥角固醇比例不一，所以不同的菌種的數值是不能夠互相比較的。選用何種方式評估防黴效果視紙品的用途而定，本研究的手工紙用於書畫用途，以黴菌生長面積為先。

四、結論

植物纖維的抽出成分確實會影響紙張防黴性，三椏、雁皮纖維所含的抽出成分具抗真菌活性，而構樹所含的抽出成分對防黴性無正面效益，蒸煮過後抽出成分均降到2%以下，漂白後會更低。雁皮在漂白過程中損失了大部分的抗真菌(黑麴菌)活性，而三椏、構樹則保留較高的活性。

綠色木黴、黑麴菌的防黴評估試驗，影像分析和肉眼判讀具高度的正相關，故在防黴評估試驗中可利用影像分析為主，無法判定的狀態再以肉眼判讀為輔。以麥角固醇含量評估防黴性，和紙張表面黴菌面積無一致性，應以紙品用途所著重的性質加以選擇。

五、參考文獻

- CNS 11212 物理試驗用手抄紙抄造法
 CNS 11622 紙漿纖維長度投影試驗法
 CNS 13355 紙漿纖維粗細度試驗法
 CNS 1466 紙漿、紙及紙板白度試驗法
 CNS 2690 纖維製品防黴性能及其物理性能檢驗法
 夏滄琪、張豐吉 (2002) 紙質文物著生褐斑真菌類之分類與鑑別 林業研究季刊 24 (4) :

29-44。

- ASTM D2020 Standard test method for mildew (fungus) resistance of paper and paperboard
 TAPPI T 204 om-88 Solvent extractives of wood and pulp
 TAPPI T 487 cm-93 Fungus resistance of paper and paperboard
 Fabbri, A. A., Ricelli, A., Bransini, S., & Fanelli, C. (1997). Effect of different antifungals on the control of paper biodeterioration caused by fungi. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 39 (1), 61-65.
 Ma, L., Kang, X., Huang, Y., Hou, D., & Hou, T. (2009) Antimicrobial activity of root extracts of *Stellera chamaejasme* L. from China. *World Applied Sciences Journal*, 6 (5), 664-668.
 Ng, H. E., Raj, S. S. A., Wong, S. H., Tey, D., & Tan, H. M. (2007) Estimation of fungal growth using the ergosterol assay: a rapid tool in assessing the microbiological status of grains and feeds. *Letters in Applied Microbiology*, 46, 113-118.
 Seitz, L. M., Sauer, D. B., Burroughs, R., Mohr, H. E., & Hubbard, J. D. (1979) Ergosterol as a measure of fungal growth. *Physiology and Biochemistry*, 69 (11), 1202-1203.
 Sequeira, S., Cabrita, E. J., & Macedo, M. F. (2012) Antifungals on paper conservation: An overview. *International Biodeterioration & Biodegradation*, 74, 67-86.
 JIS Z2911:2010 かび抵抗性試験方法