

紙質類文化財の保存に関する微生物学的研究 (第8報)

— Foxing 部位の構成成分について —

新井 英夫・根本 ちひろ*・松井 紀恵*
松村 典孝*・村北 宏之**

1. はじめに

筆者らは、典型的な紙の褐色斑点 (以後 foxing と記す) の試料を、ある条件に保つと foxing 部位にのみ糸状菌が発生する現象を発見して以来、foxing の要因と形成機構を微生物学的観点から研究してきた⁽¹⁻⁸⁾。すなわち、foxing 部位から分離した糸状菌を供試して、水分に対する挙動、それら糸状菌の代謝生成する有機酸の分析と foxing 部位の有機酸の分析から、供試菌株中の絶対好稠性糸状菌の生成する有機酸と foxing 部位の有機酸が、リンゴ酸に特徴を有する点で一致した。その絶対好稠性糸状菌は、微生物分類学的研究によって、*Aspergillus penicilloides* Spegazzini と *Eurotium herbariorum* (Wiggers: Fr.) Link と同定した。この種の糸状菌が、foxing の主たる要因であることが判明したので、これを「foxing 要因糸状菌」と呼称することにした。この両種の糸状菌の水分に対する挙動、すなわちクリモグラフ (気候図) から、絵画等の foxing は、保存・収蔵環境の湿度を相対湿度70%以下に保てば防除可能であることも提言した。

Foxing の形成要因が究明できたので、次の目標を紙に発現する褐色の斑点は、どんな成分が、どんなメカニズムで形成されるのかを明らかにする必要がある。これまでの筆者らの研究により、絶対好稠性糸状菌は、紙質上に繁殖する過程でリンゴ酸等の有機酸を生成し、これらの有機酸が foxing 部位に蓄積され、セルロース繊維と長期間接触していることを明らかにした。このことは、高分子のセルロース繊維が、酸と接触している間に徐々に分解してオリゴ糖を生成している可能性がある。また、foxing 部位の有機酸を分析している過程で、有機酸以外のピークの存在を確認し、それがアミノ酸の検出位置に当たるといふ知見を得ていた。そこで、筆者らは前述の可能性と知見から、foxing 部位には構成成分としてオリゴ糖とアミノ酸が存在するかもしれないという仮説を立て、これを検証するための実験を行ったので、その結果を報告する。

2. 実験方法

2.1 供試した foxing 試料

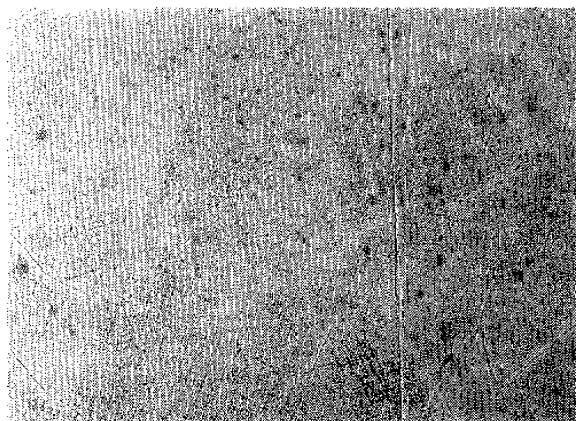
和紙 (楮^{コウゾ}) に著しい foxing の発生した試料 (図-1) を装演師連盟の得水軒から、中国紙に foxing の著しく発生した試料 (図-2) を台北の国立故宫博物院で受領しているので、本研究では主としてこれらの試料を供試した。

2.2 Foxing 抽出液の調製

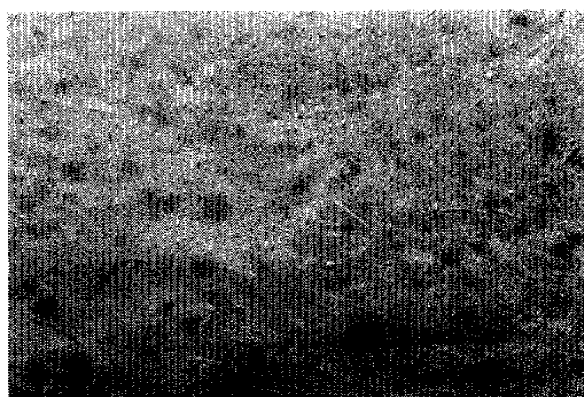
供試試料の foxing 部位は、直径 3 mm の円形に切り抜き、その 100~250 個を小試験管に

* 日本大学農獣医学部農芸化学科

** 島津製作所東京分析センター



図一1 供試した foxing 試料 (1)
(Fig. 1) 和紙 (楮) に発生した foxing



図一2 供試した foxing 試料 (2)
(Fig. 2) 中国紙に発生した foxing

とり、これに10%のアンモニア水を1~3 ml 加え、25°C で40時間抽出した。その後、遠心分離機で3,000 RPM, 15分間処理してその上澄液を凍結乾燥した。これを再蒸留水50~100 μ l に再溶解して、foxing 抽出液を調製した。同時に、各供試試料の白色部位の同量を、上記と同一方法で調製して foxing 抽出液の対照とした。

この foxing 抽出液は、foxing 部位に存在する有機酸、アミノ酸、オリゴ糖等全ての水溶性成分を含有している。そこで、オリゴ糖は、foxing 抽出液をイオン交換樹脂で処理してから分析した。すなわち、foxing 抽出液は、Amberlite 200 C と Dowex 1 でイオンに解離している有機酸とアミノ酸を順次吸着除去して分析に供した。オリゴ糖の標準試料には、0.7% セロオリゴ糖水溶液と1.0% マルトオリゴ糖水溶液(明治製菓(株)生物科学研究所提供)を供試した。

さらに、オリゴ糖の構成糖を確認するために、イオン交換樹脂処理した foxing 抽出液を酸で加水分解した。すなわち、foxing 抽出液 200 μ l に4%塩酸 200 μ l を加え、100°C で1時間加水分解して中和した。そして、再びイオン交換樹脂処理して、foxing 抽出液の加水分解処理液とした。構成糖の標準試料には、キシロース、グルコース、マルトースの0.2% 水溶液を供試した。

2.3 分析 方法

(1) オリゴ糖

オリゴ糖は、薄層クロマトグラフィー(以後 TLC と略記も併用する)で分析した。すなわち、シリカゲル60の HPTLC (E. Merck, Darmstadt 製)の薄層プレート上に、foxing 抽出液と標準試料を1~7 μ l の範囲でスポットして展開した。薄層プレートは、クロロホルム:酢酸:水=3:10:1と6:7:1及びアセトニトリル:水=8:2の混合溶剤で、それぞれ4重展開した。オリゴ糖の検出は、ジフェニルアミン2gとアニリン2mlをアセトン100mlに溶解し、噴霧前に使用量の約1/10量のリン酸を加えて調製したジフェニルアミン・アニリン・リン酸試薬を噴霧・加熱して発色させた。

(2) アミノ酸

アミノ酸は、薄層クロマトグラフィーと高速液体クロマトグラフィーで分析した。すなわち、薄層クロマトグラフィーは、シリカゲル60の HPTLC (E. Merck, Darmstadt 製)の薄層プレート上に foxing 抽出液をスポットして、クロロホルム:酢酸:水=6:7:1の混合溶媒で4重展開した。アミノ酸の検出は、ニンヒドリン試薬(東京化成製)を十分噴霧し、100

°C に加熱して発色させた。

高速液体クロマトグラフィーは、島津 LC-6 A アミノ酸分析システムで実施した。すなわち、イオン交換クロマトグラフィーで分離後、OPA ポストカラム誘導体化法による蛍光検出を行った。アミノ酸標準試料混合液は 20 μ l を、foxing 抽出物は希釈液 (0.2 N クエン酸リチウム緩衝液, pH 2.2) 1 ml で溶解後、その 20 μ l を注入して分析した。分析条件は、次の通りである。

カラム : Shim'pack ISC-07/S 1504 (内径 4 mm, 長さ 15 cm)

移動相 : A, B, C によるグラジエント溶離法

A : 0.2 N クエン酸リチウム緩衝液 (pH 2.56, 7%メチルセロソルブを含む)

B : 0.6 N クエン酸リチウム緩衝液 (pH 10.0)

C : 0.2 N 水酸化リチウム

カラム温度 : 38°C \rightarrow 58°C \rightarrow 38°C

流量 : 0.4 ml/min \rightarrow 0.3 ml/min \rightarrow 0.4 ml/min

検出 : オルトフタルアルデヒド ポストカラム誘導体化法による蛍光検出

Ex=348 nm, Em=450 nm

反応槽温度 : 55°C

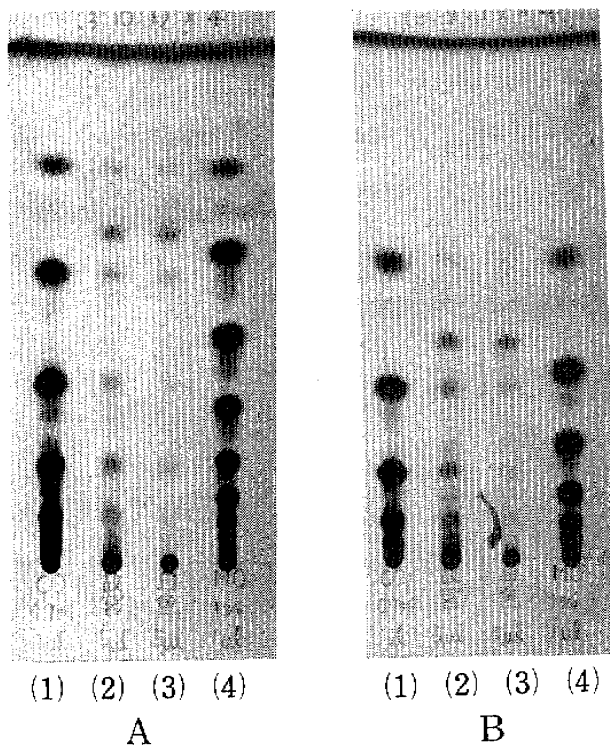


図-3 Foxing 抽出液の TLC によるオリゴ糖分析 (イオン交換樹脂処理液)

A : 展開溶媒は

クロロホルム : 酢酸 : 水 = 3 : 10 : 1

B : 展開溶媒は

クロロホルム : 酢酸 : 水 = 6 : 7 : 1

試料 (スポット量) :

- (1) 0.7% セロオリゴ糖標準液 (1 μ l)
- (2) 中国紙の foxing 抽出液 (5 μ l)
- (3) 中国紙の白色部位抽出液, 対照 (5 μ l)
- (4) 1.0% マルトオリゴ糖標準液 (1 μ l)

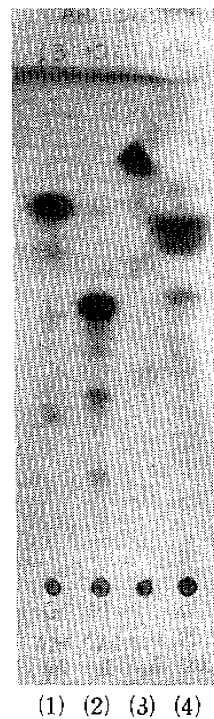


図-4 Foxing 抽出液のオリゴ糖の TLC (Fig. 4) による構成糖分析

展開溶媒は

クロロホルム : 酢酸 : 水 = 3 : 10 : 1

試料 (スポット量) :

- (1) 0.2% グルコース標準液 (1 μ l)
- (2) 0.2% マルトース標準液 (1 μ l)
- (3) 0.2% キシロース標準液 (1 μ l)
- (4) 中国紙の foxing 抽出液の加水分解液 (5 μ l)

反応液：

a : 0.04% (w/v) 次亜塩素酸ナトリウム溶液

b : 0.08% (w/v) オルトフタルアルデヒド溶液

a, bとも炭酸-ホウ酸緩衝液 (pH 10) に溶解させる

反応液流量：a, bとも 0.2 ml/min

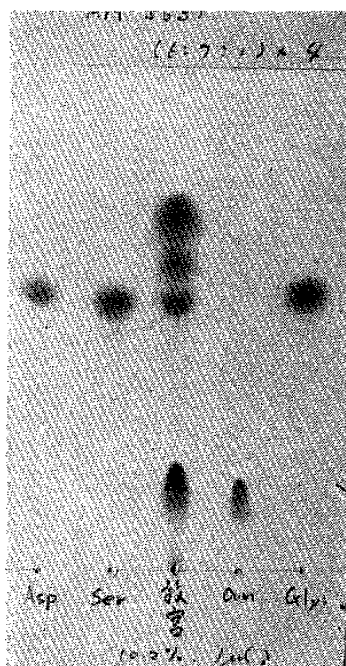
反応管体積：反応管1 内径 0.5 mm×長さ 20 cm

反応管2 内径 0.5 mm×長さ 70 cm

3. 結 果

3.1 オリゴ糖

Foxing抽出液のオリゴ糖の薄層クロマトグラムは、著しいテーリングを示したが、 G_1 , G_2 , $G_3 \sim G_6$ 糖相当の位置にグルコースとオリゴ糖のスポットが認められた。次いで、イオン交換樹脂処理した foxing 抽出液の薄層クロマトグラムは、テーリングが消え G_1 , G_2 , G_3 , G_4 , G_5 , G_6 糖相当の位置に明瞭なスポットが、クロロホルム：酢酸：水=3：10：1と6：7：1の混合溶媒で展開した薄層プレート上に検出された (図-3)。これらのスポットは、同時に展開したセロオリゴ糖標準試料のスポットの位置とよく一致し、マルトオリゴ糖でないことも明らかとなった。そして、同一試料を混合溶媒アセトニトリル：水=8：2で展開しても、



(1) (2) (3) (4) (5)

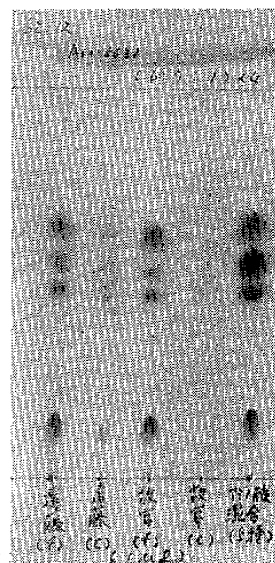
図-5 Foxing 抽出液の TLC による (Fig. 5) アミノ酸分析

展開溶媒は

クロロホルム：酢酸：水=6：7：1

試料 (スポット量)：

- (1) 0.2% アスパラギン酸標準液 (1 μ l)
- (2) 0.2% セリン標準液 (1 μ l)
- (3) 中国紙の foxing 抽出液 (1 μ l)
- (4) 0.2% オルニチン標準液 (1 μ l)
- (5) 0.2% グリシン標準液 (1 μ l)



(1) (2) (3) (4) (5)

図-6 Foxing 抽出液中のアミノ酸の TLC (Fig. 6) による同定

展開溶媒は

クロロホルム：酢酸：水=6：7：1

試料 (スポット量)：

- (1) 和紙の foxing 抽出液
- (2) 和紙の白色部位抽出液, 対照 (1 μ l)
- (3) 中国紙の foxing 抽出液 (1 μ l)
- (4) 中国紙の白色部位抽出液, 対照 (1 μ l)
- (5) 5種類の標準アミノ酸の混合溶液
 γ -アミノ酪酸, アスパラギン酸,
 グルタミン酸, オルニチン,
 β -アラニン

表-1 Foxing 抽出液の LC によるアミノ酸分析
(Table-1)

アミノ酸	和紙		中国紙	
	foxing 抽出液	対照	foxing 抽出液	対照
フォスフォセリン (phosphoserine)	23.11	14.65	14.45	—
タウリン (taurine)	26.38	7.73	17.08	—
アスパラギン酸 (aspartic acid)	224.84	16.66	350.00	—
セリン (serine)	10.47	5.17	10.69	—
グルタミン酸 (glutamic acid)	104.08	6.29	218.74	—
グリシン (glycine)	25.61	8.86	25.10	—
アラニン (alanine)	181.13	4.89	9.45	—
シスタチオニン (cystathionine)	—	—	13.68	—
フェニルアラニン (phenylalanine)	—	—	8.43	—
β -アラニン (β -alanine)	25.68	1.33	41.86	—
γ -アミノ酪酸 (γ -aminobutyric acid)	873.26	48.48	1,410.47	2.85
ヒスチジン (histidine)	—	—	0.41	—
ヒドロキシリジン (hydroxylyline)	6.97	—	9.35	—
オルニチン (ornithine)	638.32	13.79	651.89	—
リジン (lysine)	18.21	—	16.90	—
アルギニン (arginine)	12.59	—	12.84	—

LC: 高速液体クロマトグラフィーの略

(n mol/ml)

同様な結果が得られた。これにより foxing 抽出液中には、グルコース、セロビオース、セロトリオース、セロテトラオース、セロペンタオース、セロヘキサオースの存在が確認された。

加水分解処理した foxing 抽出液は、標準試料のキシロース、グルコース、マルトースの 0.2% 水溶液と共に展開すると、主スポットは、2 つに別れたが、標準試料のグルコースのスポットとほぼ一致した位置に発色した (図-4)。これにより foxing 部位には、グルコースを構成糖とするセロオリゴ糖の存在が実証された。

Foxing 抽出液の対照とした白色部位の抽出液も、同様に処理して展開すると、セロオリゴ

糖の位置にかすかなスポットが認められたが、foxing 抽出液のスポットと比較すると著しく微量であった。

3.2 アミノ酸

Foxing 抽出液のアミノ酸の薄層クロマトグラムは、4～5個のスポットの存在を示した(図-5)。これらのスポットは、アミノ酸標準試料と共に展開して検討すると、 β -アラニン、アスパラギン酸、グルタミン酸、オルニチンと一致していると判断された(図-6)。対照の白色部位の抽出液には、アミノ酸が検出されなかった。

Foxing 抽出液のアミノ酸は、高速液体クロマトグラフィーでも分析し、その結果を表-1に示した。すなわち、13または16種類のアミノ酸が検出され、なかでも γ -アミノ酪酸、アスパラギン酸、グルタミン酸、オルニチンが100 nmol/ml以上含まれていた。特に、 γ -アミノ酪酸は、870と1,400 nmol/mlという高い含有量を示し、他のアミノ酸に比べて著しい特徴を示していた。その他 β -アラニン、グリシン、リジン等の存在も確認された。

4. 考 察

Foxing 部位は、どんな成分で構成されているかを実験的に解明する試みを実施した。これによって、Foxing 部位にはグルコース及びオリゴ糖が存在し、そのオリゴ糖はセルロース由来のセロオリゴ糖であることが判明した。この事実は、今後 foxing 形成機構の解明に重要な資料を提供すると思われる。たとえば、紙のセルロース繊維が、foxing 要因糸状菌の繁殖したところにセロオリゴ糖を生成している原因として、2つの可能性が考えられる。第1は、foxing 要因糸状菌が分泌するセルラーゼによるセルロース繊維の分解であり、第2は、foxing 要因糸状菌の代謝生成する有機酸によるセルロース繊維の分解である。筆者らは、7菌株の foxing 要因糸状菌のセルラーゼ活性の測定を試みたが、検出不能であった。従って、foxing 要因糸状菌の生成する有機酸が、セルロースを分解してセロオリゴ糖やグルコースを生成するという説が、最も無理のない説明となる。これで foxing 部位に比較的量の多いリンゴ酸やその他フマル酸、乳酸、酢酸等の存在している役割を、合理的に解釈できる段階に達した。

筆者らは、当初 foxing 部位にアミノ酸が存在しているとは考えていなかった。それが、foxing 抽出液の有機酸分析中にアミノ酸を含有しているらしいという知見が得られ、薄層クロマトグラフィーによるアミノ酸分析は、foxing 抽出液に有機酸やオリゴ糖より多量のアミノ酸を検出した。さらに、高速液体クロマトグラフィーによる定量分析によれば、13～16種類のアミノ酸が存在していた。なかでも、 γ -アミノ酪酸を大量に含有している点で、供試した2種類の foxing 試料は一致した結果を示し、その他のアミノ酸の種類と含有量についても類似の傾向を示した。これらのアミノ酸は、foxing 要因糸状菌によって供給されたと考えられる。しかし、これが foxing 要因糸状菌の代謝生成物なのか、それら糸状菌の自己消化によって生成したのかは、今後に残された問題である。

筆者らは、foxing 部位の構成成分の分析によって、foxing 部位にはセロオリゴ糖とグルコース及び γ -アミノ酪酸その他15種類のアミノ酸の存在を明らかにした。セロオリゴ糖とグルコース及び γ -アミノ酪酸等のアミノ酸が、同一範囲内に共存しているならば、そこでアミノカルボニル反応(Maillard 反応)の起る可能性がある。Foxing の褐色物質が、アミノカルボニル反応で形成されるメラノイジンであるならば、世界の各地で発生している foxing が、各地域の気候風土に関係なく褐色を呈しているのは、自然の摂理に基づく現象といえよう。なお、アミノカルボニル反応は、食品工業の分野では著名な現象で、各種の食品がその加工や

保存中に褐変する現象として知られている。しかし、反応全体が複雑なこともあり、褐変反応の機構及び褐変物質メラノイジンの構造については、まだ解明すべき多くの問題が残されている。

おわりに、本研究を遂行するに当り、明治製菓(株)生物科学研究所所長日高秀昌博士並びに主任研究員平山匡男博士から、セロオリゴ糖とマルトオリゴ糖の標準試料を分与して頂き、かつオリゴ糖分析について懇切に指導して頂いたことを銘記して、両博士に深甚の謝意を表します。

参 考 文 献

- 1) 新井英夫・金子博・伊藤賀子「紙の褐色斑病究明への細管式等速電気泳動法の試み」『島津科学器械ニュース』**191**, pp. 24-27 (1983)
- 2) 新井英夫「紙質類文化財の保存に関する微生物学的研究(第1報)紙の褐色斑(foxing)から糸状菌の分離」『保存科学』**23**, pp. 33-39 (1984)
- 3) 新井英夫「同上(第2報) Foxing 要因糸状菌について」日本菌学会第29回大会講演会要旨集, p. 24 (1985)
- 4) 新井英夫・松浦洋一「同上(第3報)水分環境が紙の含水率と糸状菌の繁殖に及ぼす影響」第7回古文化財科学研究会大会講演要旨集, p. 8 (1985)
- 5) 新井英夫・見城敏子・鈴木俊明「文化財保存科学における走査電子顕微鏡の利用(II), 紙の褐色斑解明への試み(紙質類文化財の保存に関する微生物学的研究 第4報)」『日本電子ニュース』, **26**(2), pp. 2-5 (1986)
- 6) Kenjo, T., Arai, H. and Suzuki, T., 'Application of Scanning Electron Microscope in the Field of Conservation Science of Cultural Properties', "JEOL news", **25 E**(1), pp. 13-17 (1987)
- 7) 新井英夫「紙質類文化財の保存に関する微生物学的研究(第5報) Foxing から分離した糸状菌の生理的・形態学的性質, foxing 形成機構および防除対策について」『保存科学』, **26**, 43-52 (1987)
- 8) Arai, H., 'On The Foxing-Causing Fungi (Microbiological studies on the conservation of paper and related cultural properties, Part 6)' in *ICOM Committee for Conservation, 8th Triennial Meeting, Sydney* (1987), 1165-1167
- 9) Arai, H., Matsui, N., Matsumura, N. and Murakita, H., 'Biochemical Investigations on the Formation Mechanisms of Foxing (Microbiological studies on the conservation of paper and related cultural properties, Part 7)', in *12th IIC-Kyoto Congress* (1988), 11-12

Microbiological Studies on the Conservation of
Paper and Related Cultural Properties
(Part 8) On the Components Found in Foxing

Hideo ARAI, Chihiro NEMOTO*, Norie MATSUI*,
Noritaka MATSUMURA* and Hiroyuki MURAKITA**

Since it was made clear earlier that absolute tonophilic fungi were the main causes of foxing, the next target for research was what components induced brown spots by what mechanism. The authors studied on a hypothesis that oligosaccharides, glucose and amino acids may be found on the foxed areas as components of foxing.

Samples of foxing used in this experiment were from Japanese paper supplied by Endo Paper Restoring Atelier (Fig. 1) and Chinese paper received from the National Palace Museum (Fig. 2) on which marked foxing could be found. After 100—250 pieces of foxed areas were cut out (3 mm diameter), components in these pieces were extracted into 10% ammonium solution at 25°C for 40 hours. The extracts were lyophilized and redissolved in 50—100 μ l of distilled water. For the analysis of oligosaccharides, these extracts were purified using ion-exchange resins, Amberlite 200 C and Dowex 1. The same amount of white areas of paper were extracted by the same method and used as control.

Oligosaccharides were analyzed by thin layer chromatography (hereafter referred to as TLC) on HPTLC Plates of silica gel 60 (E. Merck, Darmstadt) by developing them four times with solvent mixtures, chloroform : acetic acid : water (3 : 10 : 1 and 6 : 7 : 1) and acetonitril : water (8 : 2). For the detection of oligosaccharides, diphenylamine-aniline-phosphoric acid reagent were employed. TLC of amino acids was carried out, using quadruple development with a solvent mixture, chloroform : acetic acid : water (6 : 7 : 1) and the amino acids were analyzed by using a Shimadzu LC-6 A amino acid analyzing system.

Six spots of oligosaccharides were clearly detected on the TLC plates (Fig. 3), and these spots coincided with the components of glucose and cello-oligosaccharides—cellobiose, cellotriose, cellotetraose, cellopentaose and cellohexaose. When the acid decomposition products of the extracts of foxed areas were developed on TLC plates alongside xylose, glucose and maltose, the oligosaccharides in foxed areas were found to be composed of glucose (Fig. 4).

When the extracts of foxed areas were developed by TLC alongside standard amino acids, amino acids in foxed areas could be specified as γ -aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid, ornithine and β -alanine (Fig. 6). Sixteen amino acids

* College of Agriculture and Veterinary Medicine Department, Nihon University

** Analytical Applications Department, Shimadzu Corporation

were detected in the same sample by liquid chromatography (Table-1). In particular, γ -aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid and ornithine were contained in the samples in concentrations of 100 n mol/ml or more. Of these four amino acids, a large amount of γ -aminobutyric acid, about 1,400 n mol/ml, was found.

Analysis of extracts of foxed areas showed that cello-oligosaccharides, glucose, γ -aminobutyric acid, aspartic acid, glutamic acid and ornithine were the characteristic features of foxed areas. When the formation mechanism of foxing is discussed from these results, it can be said that foxing is related to amino-carbonyl reaction (or Maillard reaction), since cello-oligosaccharides, glucose, γ -aminobutyric acid and 15 other amino acids exist in foxed areas. If browning on paper is due to melanoidine caused by amino-carbonyl reaction, it may be possible to explain reasonably that foxing can appear as brown spots on paintings and books at any place in the world regardless of climates or regions.