

〔報告〕 デンプン糊で裏打ちされる文化財への α -アミラーゼ適用方法に関する検討

早川 典子・山中 勇人*・山田 祐子・趙 依寧・
上垣 浩一**・大本 貴士*

1. はじめに

文化財の修復において、作品から安全に不要な物質を除去する作業であるクリーニングは、主要な要素の一つであり、より安全で効果的なクリーニング方法に関する研究が行われている。近年は、酵素によるクリーニングが選択肢の一つとなっている。酵素は生物が生産するタンパク質の一種であり、目的とする物質にのみ作用して分解するため、それ以外の物質には影響を与えない。そのため、薬剤を使用した場合の予期せぬ副反応による作品本体への影響を懸念する文化財分野では、適用検討が以前から行われてきた。欧米では、1970年代初頭に、既に多用されていた洗濯用の酵素を標本資料の作製に使用する検討¹⁾を端緒に、その後は過去に使用されたデンプン接着剤に対しては α -アミラーゼ、脂質に対してはリパーゼ、タンパク質についてはプロテアーゼなどの適用模索がなされてきた。工業的には洗濯用酵素の使用が先行していたことから、これらの適用検討は染織品を対象とすることが多かったものの、紙資料、油画などへの適用も報告されている²⁾³⁾。近年は、これらの酵素の適用については汎用化したため、局所的な使用方法の適用検討に移り、ゲルに含ませるなどの報告が続いている⁴⁾⁵⁾。

一方、我が国では、文化財への酵素利用の報告はそれほど多くはない。近年では、ポリビニルアルコール分解酵素を利用しての過去に使用された接着剤（ポリビニルアルコール）の除去⁶⁾や、微生物の発生痕に対する溶菌酵素によるクリーニング⁷⁾など、やや特殊な酵素を利用した事例が報告されているが、基本的な酵素の一種である α -アミラーゼの適用については、日本では慎重であった。

α -アミラーゼの日本の紙への適用報告としては、Whistler が日本の紙に描いた作品をデンプン糊で装丁したものに対して α -アミラーゼを用いて剥離した報告が1979年と1988年に2件ある⁸⁾⁹⁾が、伝統的な形態に装潢した文化財修復に用いられることはなく、このような装潢文化財における利用については、1998年によく竹上らが科学的な検討を報告している¹⁰⁾。その中で、酵素適用後にカビが発生しやすくなる傾向と、洗浄しても酵素の残存があり、その後の裏打ち接着力が低下することが述べられている。装潢において、裏打紙の接着力が低下することは最も忌避されるべきことであるため、ここにおいて、 α -アミラーゼの装潢文化財への適用に慎重にならざるを得なかった。これには、工業的に利用される酵素は安定で失活しにくいものが選抜されており、装潢作品での使用においては使用後に速やかに失活する酵素が望まれる状況とは相反するという背景がある。中国の装潢作品については、2002年に α -アミラーゼを用いた修理について報告されている¹¹⁾が、剥離の成功については記載されているものの使用後の再接着についての詳細は述べられていない。これらの結果を踏まえて α -アミラーゼ使用後にもデンプン糊での再接着を可能にするために、酵素の使用濃度と其後の洗浄回数を

* 地方独立行政法人大阪産業技術研究所、** 近畿大学

指針化しようとする試みを桶らが行っており、ナガセケムテックス製結晶型 α -アミラーゼを使用し、 $1.0 \times 10^{-3}\%$ 濃度以下の酵素塗布であれば 100 cm^2 あたり 100 mL 程度の洗浄水量で効果的な洗浄が可能という結果を得ている¹²⁾。しかし、このような複数回の水洗浄を行うことができる作品が、酵素の処置を必要とすることは極めて少ない。実際に酵素の使用が検討される作品は、大量の水を使用すると脆弱化してしまうような状態であることが多い。このため、現在に至るまで、再度の裏打ち接着が必要な作品に α -アミラーゼが使用されることはほとんどなかったようである。欧米で酵素の使用が普及したのは、装潢の裏打ちのように使用後に同じ材料で接着するような場面が少なく、分解したい材料を酵素で除去した後は、別の材料で接着する、あるいは除去だけが目的、といった事例が多いことも影響していると考えられる。

しかし、日本の装潢文化財において、劣化した絹本などから安全にデンプン糊を除去する必要性は高く、酵素の使用に関する潜在的な需要は大きいと考えられる(図1)。本研究では、装潢文化財での適用を考え、劣化したデンプン糊への作用の確認と、使用後に安全に失活処理ができる方法を模索したため、ここに報告する。

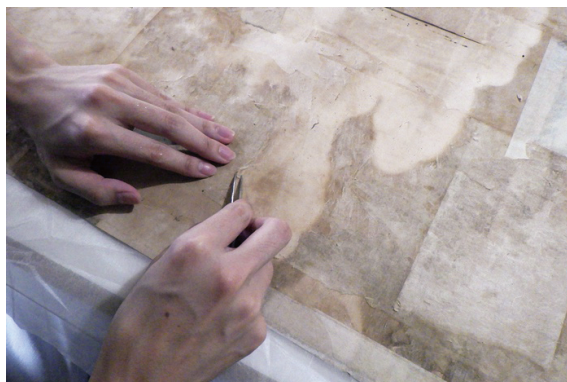


図1 装潢作品の裏打紙除去作業

裏側からピンセットにて少しずつほぐすように除去することが多いが、本紙や裏打紙が劣化して泥状化するなど剥離しにくい場合もある。

2. 使用酵素

細菌の一種 *Arthrobacter psychrolactophilus* は α -アミラーゼを産生することが知られており、産生された α -アミラーゼは至適温度が $40\text{--}50^\circ\text{C}$ と一般的な工業用 α -アミラーゼより低く、耐熱性のある酵素に比べて作用後になんらかの処置で失活させやすい可能性が期待された¹³⁾。

本研究では *A. psychrolactophilus* JCM12399を理化学研究所バイオリソース研究センター(理研BRC)から入手して使用した。

菌株を 17 g/L ポリペプトン(日本製薬製)、 3 g/L ポリペプトンS(日本製薬製)、 3 g/L 酵母エキス(日本製薬製)、 5 g/L 塩化ナトリウム、 2.5 g/L リン酸水素二カリウム、 10 g/L 可溶性デンプンを含む培地(pH 7.0)で 22°C 、45時間培養した。培養液を遠心分離して得た培養上清に、40%飽和になるよう硫酸アンモニウムを添加し、 4°C 、1日間静置した。遠心分離は 4°C 、 $13,600 \times g$ の条件で行なった。遠心分離して沈殿を除いた後の上清に、80%飽和となるよう硫酸アンモニウムを添加し、 4°C 、1日間静置した。遠心分離して沈殿を回収し、最少量の 20 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.0)に溶解した。これを 20 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.0)で透析し、得られた粗酵素液を以降の実験で使用した。なお、1%可溶性デンプン、 50 mM Tris-塩酸緩衝液(pH 7.0)、 3 mM 塩化カルシウム、および粗酵素液を含む反応液を 37°C 、10分間インキュベートした後、反応液中の還元糖をジニトロサリチル酸法¹⁴⁾で定量することにより粗酵素液のアミラーゼ活性を測定したところ、 36 U/mL であった。ここで、1分間に $1 \mu\text{mol}$ の還元糖を生成する酵素量を1単位(U)とした。

3. 実験

酵素の使用による接着力への影響を剥離強度試験にて評価し、酵素を使用することによる色の変化を色差測定を用いて確認した。

3-1. 装潢における裏打紙除去と酵素使用後の再度の裏打ちについて

装潢において、今回の酵素使用に関連する作業を図2に模式図として示す。デンプン糊によって裏打紙が接着された作品に対し、酵素を用いて剥離し、剥離後に洗浄や本紙修理などを行なった上で、新しい裏打紙をまたデンプン糊で接着する必要がある。この最後の接着の際に、使用した酵素の活性が残存して作用してしまうと接着力が低下するため、この段階までに使用した酵素が失活していることが望まれる。

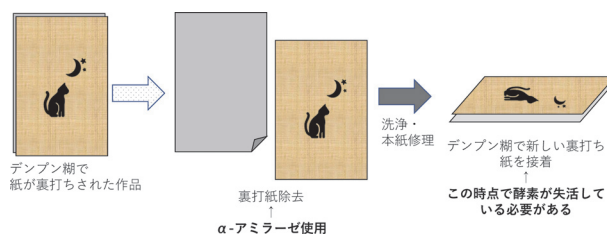


図2 酵素を使用する場合の作業模式図

ここで、評価すべき項目は下記の3点に整理される。

そこで、評価すべき項目は下記の3点に整理される。

① 劣化したデンプン糊への酵素作用の評価

文化財への適用を考える場合、劣化したデンプン糊への作用が期待されるが、一般的な α -アミラーゼの活性は新鮮な状態のデンプンに対して評価されていることから、作製直後の試料のみならず、それを強制劣化させた試料についても剥離強度試験を用いて酵素の効果を確認した。実作業に合わせて酵素液を塗布した直後の湿潤状態での剥離強度を測定した。

② 酵素作用後、2週間乾燥後の再剥離性

作業性を考える上で、酵素作用後にすぐに全面的剥離作業をせずに作業終了まで時間がかかる可能性もあることから、酵素作用後すぐには裏打紙を除去せず2週間程度乾燥させた試料を用意し、再剥離性を評価した。

③ エタノールによる酵素失活効果

事前テストにおいて、溶液中でエタノール混合を行うと酵素活性がほぼ0になることが確認されたため、実際の文化財修復作業に即した形で、酵素使用後にエタノールを塗布し、再度の裏打紙接着を施し、乾燥後の接着強度（剥離強度）の変化を比較した。

3-2. 剥離強度試験試料と剥離強度評価方法

3-2-1. 剥離強度試験試料

- ・楮紙： 機械漉き楮紙（鹿敷製紙製土佐信風550）。
- ・小麦デンプン糊：乾燥した小麦デンプン（ナカガワ胡粉絵具製鳳凰）に水を加え実際の修復現場と同様の手法で十分に加熱攪拌し14 wt%程度のデンプン糊を調製した。得られたデンプン糊を少量だけ精秤し、105℃で完全乾燥させた後に再度精秤し、その値から元のデンプン糊の濃度を算出した。この値を元に、小麦デンプン糊を8 wt%に希釈し、試料の接着に用いた。
- ・接着方法：楮紙を紙繊維方向に32 cm×23 cmに裁断し、刷毛を用いて小麦デンプン糊で

接着し、仮張を用いて乾燥させ、その後、幅25 mm、長さ190 mmに裁断した。

・酵素濃度：水（対照），0.5 vol%（0.18 U/mL），1.0 vol%（0.36 U/mL），2.0 vol%（0.72 U/mL）。

・酵素塗布方法：刷毛を用いて試料全面に塗布。

剥離強度試験については実験①～③の3つの観点で行なった。図3に各試料の調製工程を示す。

実験① 劣化したデンプン糊への酵素作用の評価

A. デンプン糊試料：機械漉き楮紙を小麦デンプン糊で貼り合わせ112時間以上乾燥させ、酵素処置後、完全に乾燥する前（23℃、50% rh 環境下10分経過後）に試験に供した。修復の現場での使用方法と同様の湿潤試料である。

B. 強制劣化試料：上記試料Aに強制劣化処置（80℃、65% rh、4週間）を施した。酵素処置後、完全に乾燥する前（23℃、50% rh 環境下10分経過後）に試験に供した。修復の現場での使用状況と同様の湿潤試料である。

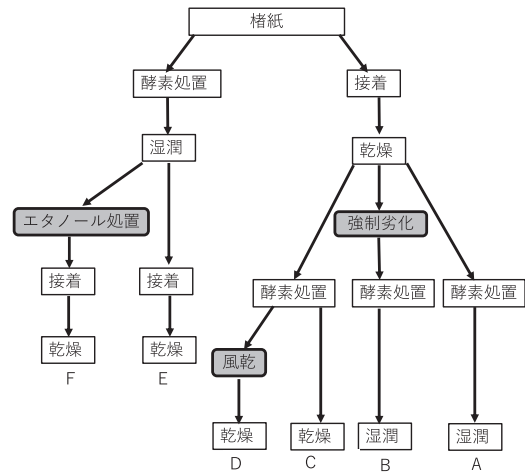


図3 試料調製工程

実験② 酵素作用後、2週間乾燥後の再剥離性

C. 機械漉き楮紙を小麦デンプン糊で貼り合わせたものを、112時間以上乾燥させた後に酵素液を塗布した。酵素液を塗布して48時間乾燥させた状態での剥離性を確認する試験試料である。

D. 試料Cを室温環境に2週間静置した。乾燥状態で長期間経過させた場合に剥離強度の変化を確認する試験試料である。

実験③ エタノールによる酵素失活効果の確認

E. 機械漉き楮紙に酵素液を塗布し、23℃、30% rhで1時間後（完全に乾燥する前）に裏打ちを施し48時間以上乾燥させた。

F. 機械漉き楮紙に酵素液を塗布し、23℃、30% rhで1時間後（完全に乾燥する前）にエタノール70 vol%を1回刷毛で塗布した。さらに23℃、30% rhで1時間後（完全に乾燥する前）に裏打ちを施し48時間以上乾燥させた。

3-2-2. 剥離強度試験評価方法

試料を剥離強度試験に供し、その値を接着強度と考え評価した。剥離強度試験は、T形はく離（JISK6854-3）に従い実施した。

使用機材：（株）島津製作所製オートグラフ AGS-G

試験片：幅25 mm、長さ190 mm

試料数：7本。このうち最大、最小の値を除いた5本の平均値をその条件での剥離強度とした。

試験条件：ロードセル10 N, 速度；10 mm/min, 温湿度；23℃, 80% rh (実験①), 23℃, 50% rh (実験②, ③), 測定範囲；50 mm (60 mmを剥離したが開始後10 mmを除いた値の平均値を使用した)

試料調湿：乾燥させた試料 (C～F) については測定の前に, 約100% rh 環境下で40時間程度の調湿を行なった。

3-3. デンプン糊への水の浸透状況の確認

剥離強度試験を踏まえて, 劣化したデンプン糊への水の浸透状況と, 劣化していないものとの比較が必要と考えられたため実施した。剥離強度試験の試料Aと試料Bと同様の接着試料を調製し, 酵素液は塗布せずに130時間以上乾燥させた。この2種類の試料に水を塗布し, その直後の変化を観察した。

3-4. 色差測定

酵素の使用による作品の色みの変化について確認した。

3-4-1. 色差測定試料

- ・楮紙： 機械漉き楮紙 (鹿敷製紙製土佐信風550)
- ・小麦デンプン糊： 3-2-1と同様の方法で調製し, 13 wt%に調整したものをを用いた。
- ・作製方法：

裂肌の裏など濃い糊を適用した部分を念頭に13 wt%の糊を楮紙に塗布し試料とした。また, 劣化したデンプン糊への評価を再現するため, 80℃, 65% rh で4週間強制劣化させた試料も作製した。

- a. デンプン糊未塗布
- b. デンプン糊塗布
- c. デンプン糊塗布後強制劣化

以上のa～cの試料に対して酵素液 (酵素濃度：水 (対照), 0.5 vol% (0.18 U/mL), 1.0 vol% (0.36 U/mL), 2.0 vol% (0.72 U/mL)) を塗布し, 3時間以上乾燥させたものを測定に供した。

3-4-2. 色差測定方法

使用機材：コニカミノルタ株式会社製分光測色計 CM-2600d

試験片：幅25 mm, 長さ190 mm

測定条件：視野；10°, 光源；D65。試料の下に校正用セラミック板 (株式会社エバーズ製：EVER-WHITE No.9582) を敷いて測色した。1試料につき5回計測し, その平均値をその試料の測定値とした。試料は光沢がないため正反射込み (SCI) 方式を用いた。

色差の算出方法：塗布処置していない試料との色差 ΔE^* を $(\Delta L^{*2} + \Delta a^{*2} + \Delta b^{*2})^{1/2}$ として算出した。

4. 結果と考察

剥離強度試験から得られた結果を図4～6に示す。

図4に示す実験①の結果により, 強制劣化させたデンプン糊の試料は, 劣化させないものに比べて剥離強度が高いことが明らかになった。これは文化財に使用されているようなデンプン

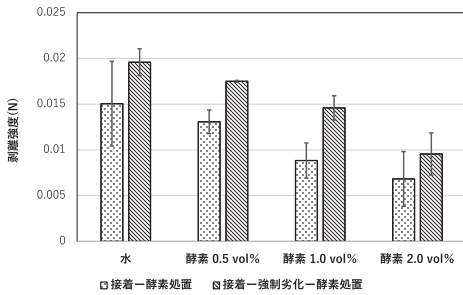


図4 実験① 劣化処置による剥離強度の変化

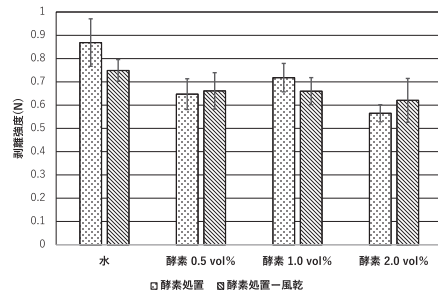


図5 実験② 風乾による剥離強度の変化

糊に酵素を使用する場合は、現代に作製されたデンプン糊より効果が発現しにくいことを意味しているが、未劣化試料に比べて剥離強度は高いものの、酵素の濃度が上昇するにつれ、剥離強度は低下しており、酵素の効果が得られることは明らかとなった。ただし、通常の工業用のデンプンへの反応より効果が若干発現しにくいことについては、今後の文化財修復の現場では留意すべきことであろう。

また、実験②では、2週間程度乾燥させた後でも一度酵素を作用させると剥離強度は大きな変化がないことが明らかになった(図5)。酵素使用後にすぐに剥離させなくとも再接着の懸念はないことを意味する。酵素作用後にゆとりを持って作業をする工程を検討できると考えられる。

実験③からは、エタノール水溶液の塗布により、酵素を失活させられる可能性が示された(図6)。特に酵素0.5 vol% (0.18 U/mL) 塗布試料と1.0 vol% (0.36 U/mL) 塗布試料では、エタノール水溶液処置後には、水塗布の試料とほぼ同程度まで剥離強度が回復している。

この効果は、2.0 vol% (0.72 U/mL) の酵素液を塗布した試料では低下しており、この濃度の場合、エタノール水溶液未塗布の試料よりは剥離強度は高いものの、依然として低い剥離強度である。この結果から、エタノール水溶液が酵素に作用して酵素を変性、失活させることができると考えられるが、酵素濃度が高く、残存酵素量が多い場合は、一回程度の塗布では変性させきれず、再度の裏打ちに使用されたデンプンを分解させて接着力を低下させると考えられる。

ここで、剥離強度試験①に関連し、水の浸透状態の画像を図7に示す。

デンプン糊で接着した劣化させていない試料は、水を塗布するとすぐに浸透し、塗布直後には全体に湿っているが、劣化させた試料は同じような状態を示すのは10秒後であった。5秒後の画像では、まだ不均一にしか浸透していない様子が見られている。この浸透性の低さが、酵

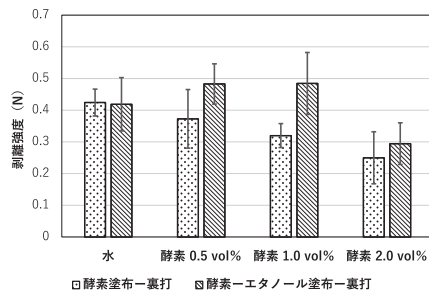


図6 実験③ エタノール塗布による剥離強度の変化

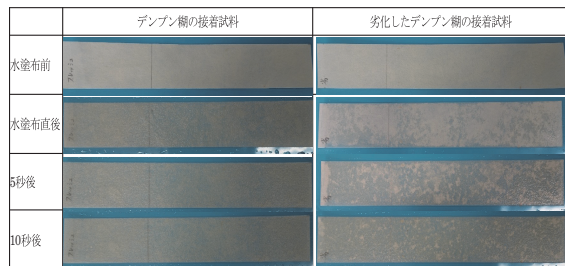


図7 水塗布後の浸透状態の変化

素の作用性にも影響し、劣化したデンプン糊試料（試料B）の接着力が高い傾向を示したと関連していると考えられる。

色差測定について、液体塗布する前の楮紙との色差を図8に示す。

水を塗布しただけでも ΔE^* は1程度の変化を示しており、酵素を含まなくても水が浸透することにより若干の色差の変化が生じると考えられるが、酵素を塗布した場合でもいずれの試料でも1.6以内の変化に収まっている。

色彩科学ハンドブックによる指標では ΔE^* 1.2以上で「隣接して判定した場合に、ほとんどの人が色差を認めることができる」、 ΔE^* が2.5以内で「離間して判定した場合に、ほぼ同一と認めることができる」との指標がある。1.2以内は測色機材間の差を含む誤差範囲内であることから、今回の結果では、酵素の使用による変化はほぼないと判断してよいと考えられる。ただ、全体的な傾向として、酵素を塗布した場合は、劣化した糊の色差が若干、大きい傾向があり、これは劣化した糊の色が未劣化の場合よりも濃く、これが酵素により分解されることにより色みが薄くなるからと考えられるが、基本的な変化の程度が小さいため、酵素の使用にあたって大きく留意するほどの変化ではない。

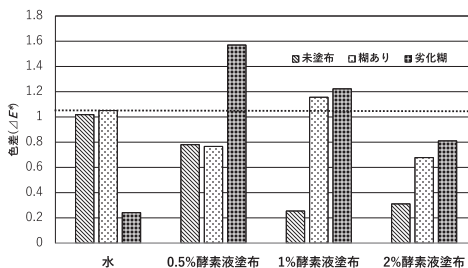


図8 色差測定結果

5. まとめ

本報告では、 α -アミラーゼを利用した装飾文化財のクリーニングに関して、現場での実際の適用を念頭に検討した。

劣化したデンプン糊への効果としては、未劣化デンプン糊よりも効果がやや発現しにくいことが明らかになり、その理由として浸透性が落ちていることが推察された。ただ、劣化したデンプン糊でも酵素の作用は得られることから、逆に、反応が遅いために、作用時間を制御しやすいとも言える。酵素作用後に乾燥させた試料についても再接着の懸念はないことも明らかになった。

また、エタノールの塗布により、残存酵素の作用を軽減できることも明らかになり、特に酵素1.0 vol% (0.36 U/mL) 程度までの濃度では、再度のデンプン糊による接着にほぼ影響がない程度にまで低減させられることが明らかになった。従来は、洗浄により酵素を除去する方法しかなかったが、今回の手法は酵素自体の活性に直接影響を与えられる上に、比較的簡便に用いることができるため、今後、エタノールを用いた酵素失活を利用して、文化財修復現場に α -アミラーゼを活用していく可能性が期待される。ただし、酵素の使用濃度によっては、1回のエタノール塗布では十分に失活しない結果も得られているため、酵素濃度やエタノール塗布回数などについては、さらに詳細な検討が必要である。また、エタノールを使用することで、 α -アミラーゼ使用後に懸念されるカビの発生への抑止効果も併せて期待され今後の検討課題と考えられる。

謝辞 本研究の遂行にあたり、酵素の調製および諸性質の検討について、近畿大学農学部応用生命化学科の森田浩輝氏、阪口芽衣氏（当時）に実験のご助力を賜りました。ここに記して感謝申し上げます。

参考文献

- 1) Clair Ossian: Preparation of disarticulated skeletons using enzyme-based laundry "presoakers", *Environmental science*, 1, 199-200, 1970
- 2) Pia C. DeSantis: Some Observations on the Use of Enzymes in Paper Conservation, *Journal of the American Institute for Conservation*, 23-1, 7-27, 1983
- 3) Dare Hartwell: Cleaning Natural Resin, *Newsletter of Western Association for Art Conservation*, 8-2, 4-6, 1986
- 4) Paolo Cremonesi: Regid Gels and Enzyme Cleaning, New insights into the cleaning of paintings. *Proceedings from the Cleaning 2010 International Conference*. Universidad Politécnic de Valencia and Museum Conservation Institute, 179-183, 2013
- 5) Yana, Van Dyke: Agarose-enzyme gels in paper conservation, *GELS in the Conservation of Art*, 101-106, 2017
- 6) 早川典子, 酒井清文, 貴田啓子, 坪倉早智子, 大河原典子, 岡田祐輔, 藤松仁, 川野邊渉: 文化財修復に用いられたポリビニルアルコール除去における酵素利用の検討, *文化財保存修復学会誌*, 567-36, 2013
- 7) 佐藤嘉則, 木川りか, 貴田啓子, 川野邊渉, 早川典子: 高松塚・キトラ古墳壁画上の微生物汚れの除去—酵素の選抜とその諸性質—, *保存科学*, 57, 11-21, 2018
- 8) Catherine Nicholson: The conservation of three Whistler prints on Japanese paper: The conservation of Far Eastern art: preprints of the contributions to the Kyoto Congress, 39-43, 1988
- 9) Shelly Fletcher and Judith Walsh: The treatment of three prints by Whistler on fine Japanese tissue, *Journal of the American Institute of Conservation*, 18-2, 1979
- 10) 竹上幸宏, 君嶋隆幸, 岡岩太郎, 木川りか, 川野邊渉: 装潢技術における酵素利用の可能性について, *保存科学*, 37, 76-83, 1998
- 11) Yuancheng Chen: Study of detaching the mounted old Chinese painting with α -amylase, *Wen wu bao hu yu kao gu ke xue*, 14, 2002
- 12) 楠京子, 山田祐子, 君嶋隆幸, 加藤雅人: 裏打ち紙除去に使用した酵素の除去確認方法について, *文化財保存修復学会第34回大会要旨集*, 312-313, 2013
- 13) Michael R. Smith and James C. Zahnley: Production of amylase by *Arthrobacter psychrolactophilus*, *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 32, 277-283, 2005
- 14) 福井作蔵: 還元糖の定量法Ⅱ, *化学と生物*, 3, 484-490, 1965

キーワード: α -アミラーゼ (α -amylase); 裏打ち (backing); 失活 (deactivation); 再接着 (re-pasting); デンプン糊 (starch paste)

An Attempt to Apply α -Amylase for Conservation Works on Paintings to Be Reassembled with Starch Paste After the Treatment

HAYAKAWA Noriko, YAMANAKA Hayato*, YAMADA Yuko,
CHO Inei, UEGAKI Koichi** and OHMOTO Takashi*

In the conservation of East Asian paintings, most conservators deal with treatments which involve removing backing paper without any damage to the objects. As some paintings show their backing paper seriously deteriorated with paste, conservators need to take more time than in normal conditions to remove such backing paper. Enzyme treatment, especially α -amylase treatment is a possibility to remove the backing paper in this situation. On the other hand, it is necessary to consider the treatment of deactivation of the enzyme, because most paintings are re-pasted to be reassembled by starch paste after enzyme treatment. If α -amylase is still active after removing the old backing paper, the new backing paper cannot be pasted.

This study aimed to apply α -amylase for mounted paintings and documents, for which starch paste is intended to be used after the treatment. First, the effectiveness of α -amylase in artificially aging paste was examined. Next, applications of ethanol to deactivate α -amylase were attempted. The enzyme acted on the sample of artificially aging paste, but the effect was slightly weaker than the samples with fresh paste. The ethanol treatment completely deactivated the enzyme in the case of an under the 1 vol% concentration enzyme solution. However, in the sample with the 2 vol% enzyme solution, the new backing paper sample shows lower adhesive strength even after the ethanol treatment.

*Osaka Research Institute of Industrial Science and Technology

**Kindai University