

論文 (Original article)

**Phanerochaete crassa WD1694 株による
マンガネルオキシダーゼ反応の組織化学的観察**高野 麻理子^{1)*}、服部 力²⁾

要旨

パルプ培地で培養した *Phanerochaete crassa* WD1694 株によるマンガネルオキシダーゼ (MnP) の反応場所を検出するため、MnP の検出試薬としてテトラメチルベンジジン (TMBZ) を用いた顕微鏡観察を行った。*P. crassa* WD1694 株を、広葉樹未晒しクラフトパルプと TMBZ を含む培地で培養したところ、各培養条件下で、*P. crassa* WD1694 株はパルプ菌糸塊を生成し、その表面上に TMBZ の発色沈殿が認められることが判明した。次いで、*P. crassa* WD1694 株を培養したパルプ培地を菌糸染色用のクマシーブルー、スライム染色用のフロキシシン B で染色し、顕微鏡観察した結果、*P. crassa* WD1694 株の菌糸がパルプに絡みつくように生長し、それらをスライム層が覆う様子が観察された。TMBZ の発色沈殿の位置を、パルプ菌糸塊構造と比較検討した結果、TMBZ の発色沈殿は、主に菌糸端部と菌糸上に顕著に認められた。また、TMBZ の発色沈殿の経時変化を観察したところ、スライム層の生産時期と関連して TMBZ の発色沈殿が生じることが示された。これらの結果より、パルプ培地で培養した *P. crassa* WD1694 株には、菌糸とスライムでパルプを凝集した後、菌体上で MnP によるリグニン分解反応を効率よく進行させる組織学的な機構が存在することが示唆された。

キーワード：*Phanerochaete*、マンガネルオキシダーゼ、ペルオキシダーゼ染色、白色腐朽菌、組織化学、リグニン分解

1. 緒言

クラフトパルプ化は最も代表的な工業パルプ化法として広く用いられている。クラフトパルプのパルプ化工程では、木材チップ中のリグニンの大部分が分解除去されパルプ（未晒しクラフトパルプ）が得られるが、一部のリグニンは残留し、着色原因となる。そのため、高白色度を重視する紙・紙製品を製造する場合、未晒しクラフトパルプをさらに漂白工程に供し、残留リグニンを分解除去して、晒しクラフトパルプが製造されている。一般に、漂白工程は、多段階の漂白段を必要としており、従来、漂白段の一つに塩素段が用いられるのが一般的であったが、ダイオキシン問題（尾鍋 1991）を契機として、全く塩素を用いない漂白工程（TCF 漂白）と塩素段を用いない漂白工程（ECF 漂白）へ移行してきている。TCF 漂白や ECF 漂白に用いられる無塩素漂白の一つとして、オゾン漂白、過酸化水素漂白などの化学的漂白法に平行して、リグニンの微生物分解を模倣したバイオブリーチングが研究されている（桃原・松本 1991, 西田 1992, 坂井 1993, Reid and Paice 1994, Archibald et al. 1997）。

白色腐朽菌は、高いリグニン分解能力を持つため、これまで、バイオブリーチングの研究に供試されて

きた。たとえば、古くは、未晒しクラフトパルプを白色腐朽菌（*Phanerochaete chrysosporium*）処理とアルカリ処理することにより、パルプ中のリグニン含有量が大きく低下することが報告されている（Kirk and Yang 1979）。また、代表的な白色腐朽菌であるカワラタケにも未晒しクラフトパルプの漂白作用のあることが報告されている（Paice et al. 1989）。その後、これらの白色腐朽菌より高い漂白能力を持つ腐朽菌株のスクリーニングが精力的に行われ、IZU-154 株（Nishida et al. 1988）、*P. sordida* YK-624 株（Hirai et al. 1994）、SKB-1152 株（Iimori et al. 1994）などの菌株が選抜されている。当研究グループでも、未晒しクラフトパルプの漂白能力が高い菌として、*Phanerochaete crassa* WD1694 株を選抜し、この菌株が未晒しクラフトパルプのカッパー価を顕著に低下させる際に、高いマンガネルオキシダーゼ（MnP）活性が検出されることを報告した（Takano et al. 2001）。

一般に、白色腐朽菌は、MnP などのリグニン分解酵素を窒素制限条件の液体培地に分泌することが知られている（割石 2002）。生菌によるパルプ漂白系では、分泌されたリグニン分解酵素が菌体外酵素として単純に作用し、リグニン分解が進行している可能性が

原稿受付：平成 26 年 9 月 14 日 原稿受理：平成 26 年 11 月 28 日

1) 森林総合研究所森林資源化学研究領域微生物工学研究室

2) 森林総合研究所きのこ・森林微生物研究領域森林病理研究室

* 森林総合研究所森林資源化学研究領域微生物工学研究室 〒 305-8687 茨城県つくば市松の里 1

高いものの、一方で、MnP は、触媒サイクルの関係から、過酸化水素の供給を必要とするため (Wariishi et al. 1992, 割石 2002)、任意の場所で、MnP が作用することには無理があるとも考えられる。また、生菌によるパルプ漂白系において、MnP によるリグニン分解反応の反応場所に関する組織学的な知見も乏しいのが現状である。

これまで、MnP 活性の分析には、ABTS やグアヤコールなどの発色性基質が利用されてきた (Gold and Glenn 1988, Paszczyński et al. 1988)。しかしながら、これらの発色性基質の生成物は可溶性であるため、MnP によるリグニン分解反応場所の検出には適していなかった。一方、ジアミノベンジジン (DAB) やアミノエチルカルバゾール (AEC) などのように、ペルオキシダーゼ (PO) 酸化により発色と同時に重合して沈殿を生成し、組織に沈着する発色性基質がある。実際、白色腐朽菌の研究例として、*P. chrysosporium* のリグニン分解 PO 類の分布状態をベンジジン染色によって分析した報告や *Pycnoporus cinnabarinus* のラッカーゼの分布を 2,6-ジメトキシフェノール (2,6-DMP) で分析した報告などがある (Mouhka et al. 1993, Jones and Lonergan 1999)。

そこで、本研究では、パルプ培地で培養した *P. crassa* WD1694 株の生菌が生産した MnP によるリグニン分解反応場所を探るべく、市販のテトラメチルベンジジン (TMBZ) を用いて組織化学的観察を行った。TMBZ は、DAB、AEC、2,6-DMP と同様に重合性の PO 基質であるが、DAB、AEC、2,6-DMP が褐色や赤褐色であるのに対し、TMBZ は青色に発色するため、褐色に着色した未晒しクラフトパルプ培地でも発色が明確に識別できる (Liem et al. 1979, Cattabeo and Luong 1994)。

MnP 反応の検出では、生成した Mn (III) が培地中で拡散する可能性や、反応が微量で短時間では検出できない可能性が想定された。そこで、本研究では、TMBZ を含むパルプ培地で *P. crassa* WD1694 株を培養することで、生じた MnP 反応を即時に検出し、また、培養経過中の MnP 反応を蓄積して検出する条件を設定した。

すでに報告した *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 発色試験では、TMBZ を含まないパルプ培地で菌を培養し、菌体試料を試験管に採取後に TMBZ を添加し、MnP 反応を短時間で検出した (Takano 2006, 2009, 2010)。これらの報告は、本研究結果をもとに TMBZ の発色部と MnP 反応の関連性について研究を進めたものである。

2. 実験方法

2.1 菌株

白色腐朽菌 *Phanerochaete crassa* WD1694 株 (*Porostereum crassa*) (和名：カミウロコタケ、農林水産省ジーンバンク登録番号：MAFF420737) は森林総合

研究所腐朽病害研究室より入手した。

2.2 試薬

MnP 反応の検出には、BM Blue POD Substrate, precipitating (沈殿性 3,3',5,5'-テトラメチルベンジジン溶液、ロシュ・ダイアグノスティックス製、TMBZ)、菌体およびスライムの染色には、クマシーブ リリアントブルー (CBB) R250 (フルカ製) およびフロキシシン B (ナカライテスク製) を使用した。

2.3 顕微鏡

顕微鏡観察には、Optiphot 顕微鏡 (ニコン製) または倒立顕微鏡 Nikon Eclipse TE2000-U (ニコン製) を使用した。

2.4 TMBZ 発色の予備試験

P. crassa WD1694 株由来の MnP を、既報に従って得た (Takano et al. 2004)。次いで、MnP 0.1 unit、広葉樹未晒しクラフトパルプ (LUKP) 2 %、2 mM MnSO_4 、0.02 mM 過酸化水素を含むマロン酸緩衝液 (pH3.5, 50mM) を、酵素溶液 (全容量 1.0 ml) として調製した。酵素溶液に TMBZ 0.1 ml を加え、室温で 15 分間反応後、その反応溶液を目視観察および顕微鏡観察に供した。

2.5 *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 添加 LUKP 培地での培養

既報に従って (Takano et al. 2004)、*P. crassa* WD1694 株を培養し、ハンディホモジナイザーで粉碎して種菌を得た。3 種類の TMBZ 添加 LUKP 培地 (パルプ濃度 25 %、2.5 %、0.5 %) を調製、滅菌後、種菌を植菌し、Table 1 の条件で、所定期間培養を行った。その後、培地試料を目視観察および顕微鏡観察に供した。

Table 1. *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 添加 LUKP 培地の培養条件

培養条件	A	B	C
パルプ濃度 (%)	25	2.5	0.5
TMBZ (ml)	3	2	6
蒸留水 (ml)	1	10	50
種菌量 (ml)	6	10	10
培養温度 (°C)	26	26	34
攪拌条件 (rpm/min)	0 (静置)	0 (静置)	100 (振盪)

2.6 CBB 染色

0.1% CBB R250 染色液（エタノール：25%、酢酸：8%、蒸留水：67%、体積比）を調製した。培養した培地試料を 500 μ l 採取し、染色液（1ml）を加え室温で 30 分間放置した。次いで、培地試料を上清の着色がなくなるまで蒸留水で静かに洗浄し、顕微鏡観察に供した。

2.7 フロキシシン B 染色

20% フロキシシン B 水溶液を調製した。上述の培地試料を 500 μ l 採取し、染色液 1ml を加え室温で 30 分間放置した。菌体試料を上清の着色がなくなるまで蒸留水で静かに洗浄し、顕微鏡観察に供した。

3. 結果と考察

3.1 TMBZ 発色の予備試験

市販の PO 染色用試薬 TMBZ は、PO 類による酸化によって発色と同時に重合沈殿する性質があり、これにより、PO 類の反応場所を特定することが期待される。そこで、培養実験に先立ち、*P. crassa* WD1694 株が分泌する MnP と TMBZ の反応性を検討した。最初に、*P. crassa* WD1694 株から採取した MnP、LUKP、硫酸マンガン、過酸化水素を含むマロン酸緩衝液に TMBZ を加えた反応液を調製し、室温で 15 分間反応させた

ところ、反応液全体が均一に呈色した（Fig.1a）。また、反応液の一部を採取し、顕微鏡観察したところ、パルプが分散している反応液中に、TMBZ の発色した沈殿が多数認められた（Fig.1b）。これにより、TMBZ が、*P. crassa* WD1694 株の MnP により発色沈殿を生じることが確認された。

3.2 TMBZ 発色試験

P. crassa WD1694 株を TMBZ とともに、3 種類の培養条件で 3 日間培養した。なお、培養条件 A はパルプを多く含む固体培地、B は液体培地（静置培養）、C は液体培地（振盪培養）のモデルとして設定した。3 条件の培養結果を Fig. 2 に示す。培養条件 A では、*P. crassa* WD1694 株とパルプが小塊状に固まり、TMBZ の発色沈殿は、その小塊表面に認められた（Fig. 2a）。一方、培養条件 B では、パルプを含む溶液部のほぼ全体がゲル化し、TMBZ の発色沈殿は、ゲル化しなかった少量の溶液部には認められず、ゲルの上部表面に観察された（Fig. 2b）。また、培養条件 C では、直径 1.0 -1.5 mm 程度のパルプ小塊が多数生成し、TMBZ の発色沈殿は、培地溶液中には認められず、その小塊の表面に存在していた。なお、各培養条件において、TMBZ 無添加の系、および、*P. crassa* WD1694 株無添加の系を対照実験として実施したが、培地に発色は認められなかった。

次に、所定日数培養後の TMBZ 発色沈殿を含む菌体試料を採取し、光学顕微鏡で観察した。その結果を Fig. 3 に示す。培養条件 A, B, C の全てにおいて、*P. crassa* WD1694 株とパルプが凝集し、パルプ菌糸塊を生成した様子が観察された。培養条件 A では、培養 1 日目に菌糸端部に顕著な TMBZ の発色沈殿が検出された（Fig. 3a）。培養条件 B の TMBZ 発色沈殿は、培養 2 日後に菌糸端部に、培養 4 日後はパルプ菌糸塊内部の菌糸に沿った菌糸上に認められた（Fig. 3b, c）。培養条件 C の場合、TMBZ の発色沈殿は、パルプ菌糸塊の表面、および菌糸端部に認められた（Fig. 3d）。これらの結果より、TMBZ の発色沈殿は、各培養条件下で、パルプ菌糸塊上、特に菌糸端部と菌糸上に局在して存在する

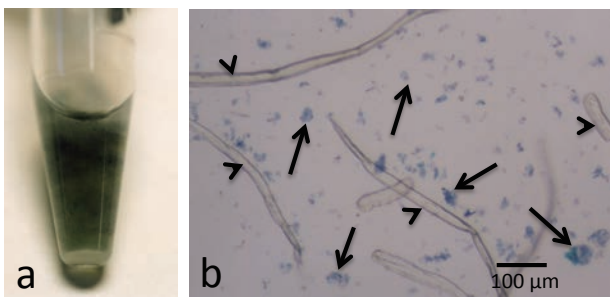


Fig. 1. *P. crassa* WD1694 株から採取した MnP と TMBZ の発色予備試験結果

(a) 反応液全体の様子、(b) 反応液の顕微鏡観察結果

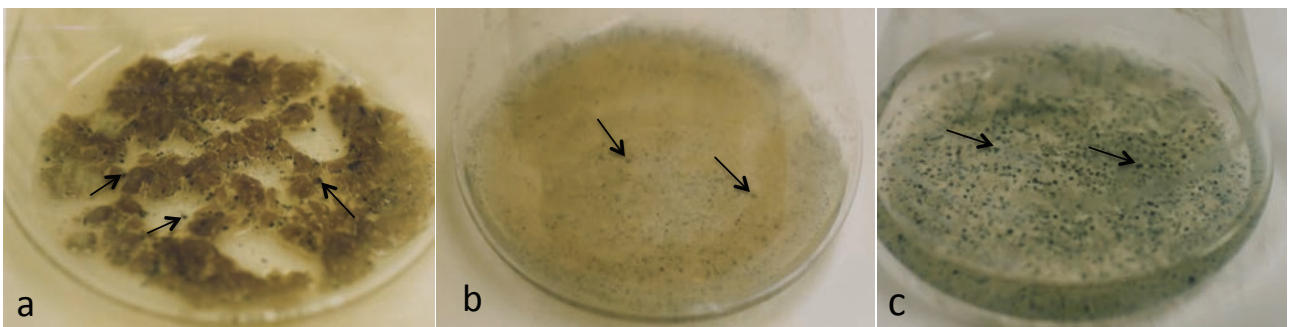


Fig. 2. *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 添加 LUKP 培地培養の全体の様子

(a) Table 1-A、培養 3 日目、(b) Table 1-B、培養 2 日目、(c) Table 1-C、培養 3 日目

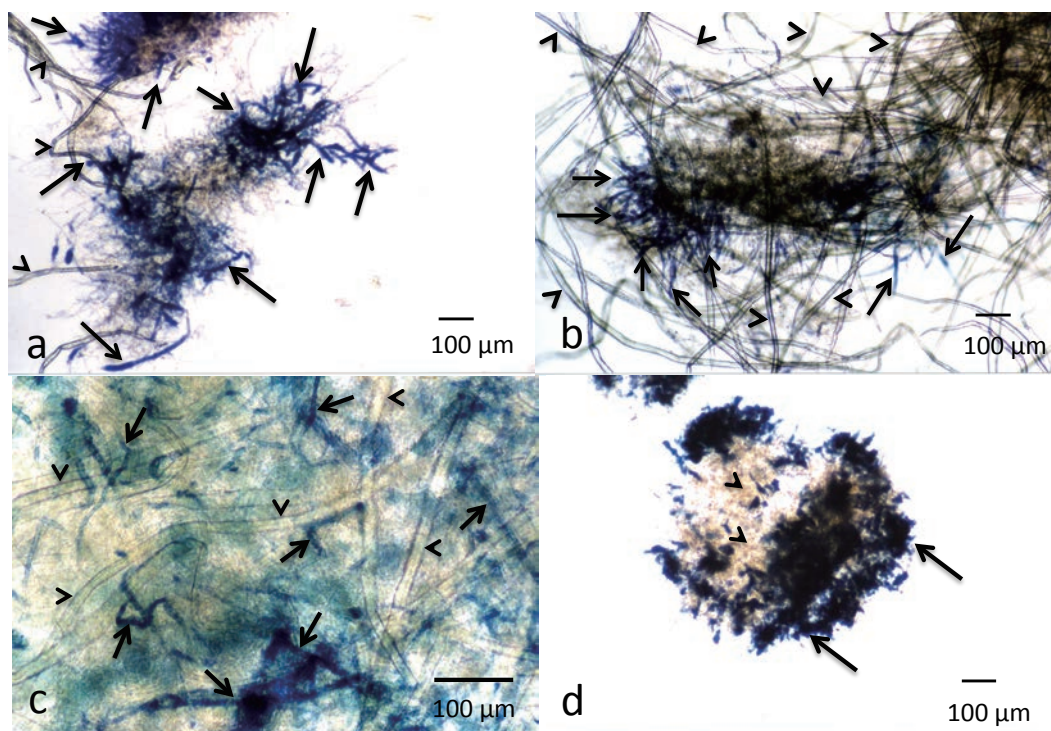


Fig. 3. *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 添加 LUKP 培地培養の顕微鏡観察結果
(a) 培養条件 A (1 日目)、(b) 培養条件 B (2 日目)、(c) 培養条件 B (4 日目)、(d) 培養条件 C (3 日目) 図中、矢印は TMBZ の発色沈殿、矢頭はパルプを示す。

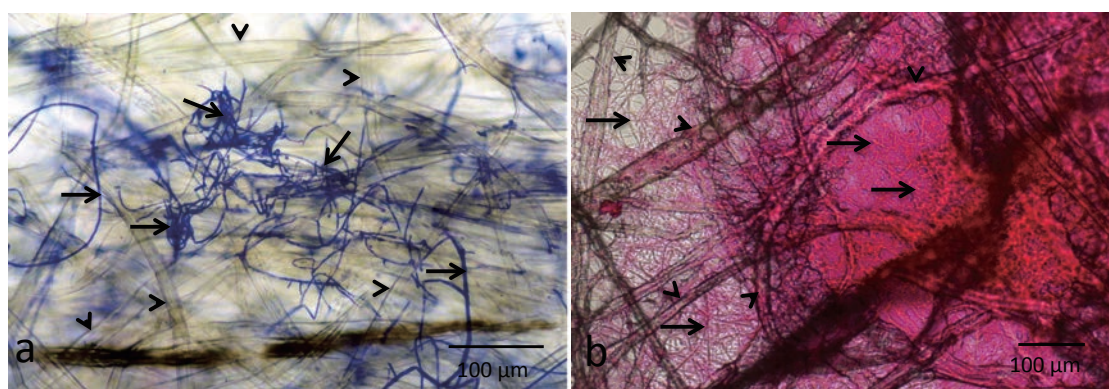


Fig. 4. *P. crassa* WD1694 株の LUKP 培地培養 (培養条件 B、TMBZ 無添加) の顕微鏡観察結果
培養 3 日目。(a) CBB 染色、(b) フロキシシン B 染色。
図中、矢印は TMBZ の発色沈殿、矢頭はパルプを示す。

ことが判明した。この結果は、*P. crassa* WD1694 株によるリグニン分解反応は、分泌された MnP が菌体外酵素として培養液中で均一に働くのではなく、菌体近傍部で局在的に効率よく進行することを示唆した。

3.3 TMBZ 発色と他の染色法の併用

タンパク質の染色法である CBB 染色は、パルプを染色せず、菌糸のみを染色することが可能である。また、筆者らは、*P. crassa* WD1694 株の菌糸表面はスライム層によって覆われており、スライム層の染色にフロキシシン B が有効であることを報告した (Takano et al. 2008)。そ

こで、パルプ菌糸塊中の TMBZ の発色沈殿の場所をより明確に解析するために、最初に、*P. crassa* WD1694 株を培養条件 B で 3 日間培養した培地試料について、パルプ菌糸塊を構成する菌糸を CBB 染色、スライムをフロキシシン B 染色した後、顕微鏡観察した (Fig. 4a, b)。Fig. 4a では、青く染色された菌糸がパルプに絡みつくように生長する様子が観察された。一方、Fig. 4b では、パルプ菌糸塊全体が赤く染色され、スライム層が菌糸とパルプを覆っている様子が観察された。これらのパルプ菌糸塊とスライムの様子は、培養条件 A と C でも認められた。これらの結果より、パルプ培地で培養した *P. crassa*

WD1694 株は、菌糸とスライムでパルプを凝集して、パルプ菌糸塊を生成することが示唆された。スライム層は白色腐朽菌の菌糸表層に存在し、古くから菌体外酵素の保持輸送などの生理機能に関与する可能性が報告されている (Palmer et al. 1983, Ruel and Joseleau 1991)。また一方、LiP, MnP の分布を免疫染色し、電子顕微鏡で観察した結果では、スライム層に菌体外酵素の存在が報告されている (Daniel, 1994)。そのため、白色腐朽菌の菌糸表層のスライム層で MnP によるリグニン分解反応が進行している可能性が考えられた。しかしながら、Fig. 3 と Fig. 4 の比較からは、MnP によるリグニン分解反応を示す TMBZ の発色沈殿が、パルプ菌糸塊全体を覆うスライム層に特異的に生じる明確な結果は得られなかった。

次に、パルプ菌糸塊上に生じた TMBZ の発色沈殿の経時変化を追うために、培養日数の異なる TMBZ 添加 LUKP 培地試料に、フロキシシン B 染色を行った。培養条件 C のパルプ培地試料の染色結果を Fig. 5 に示す。フロキシシン B 由来の赤色染色は、培養 6 時間後には、すでに認められたが、培養 2 日後に変色が起こり、培養 3 日後に退色が認められた。一方、TMBZ 由来の濃青色の発色は、培養 1 日後に検出され、培養 2 日目にも観察されたが、培養 3 日以降には退色が認められた。これらの結果は、スライムの生成と MnP の分泌に関連性があることを示唆していた。試験した A, B, C の全培養条件下で、培養開始後 15 時間以内に菌糸の成長とともにパルプの凝集が生じ、その後培養 1 日以降に TMBZ の発色がパルプ菌糸塊上に検出されることが確認された。

P. chrysosporium のリグニン分解活性は二次代謝であり、窒素源の欠乏によって開始することが知られており、MnP タンパク質も、窒素制限条件下で検出されることが示されている (Keyser et al. 1978, Kirk et al. 1978, Brown et al. 1990)。Keyser らは、*P. chrysosporium* の培養初期に菌体量の増加とともに培地中の窒素量が低下し、その後、菌体量増加の抑制と窒素源欠乏が認められた

時期に、リグニン分解活性が検出されることを示した (Keyser et al. 1978)。同様に、培養初期の菌体量増加が鈍化した時期に、リグニン分解活性と MnP 活性が検出されることが報告されている (Kirk et al. 1978, Brown et al. 1990)。

P. crassa WD1694 株の TMBZ 発色試験では、パルプの凝集は菌体量が増加する培養初期に生じており、TMBZ 発色は菌がパルプを凝集した後に生じていた。以前の報告で、*P. crassa* WD1694 株の菌糸端部に生じる TMBZ 発色は、MnP 反応によることを報告した (Takano et al. 2006)。窒素制限液体培地とパルプ培地で培養した *P. crassa* WD1694 の MnP 活性を経時的に測定した結果では、MnP は培養後 2 日後と 3 日後に検出されることを報告したが (Takano et al. 2001, 2004)、同時期には菌体量増加の停止が観察された。これらの結果は、*P. crassa* WD1694 株の TMBZ 発色試験で検出された MnP 反応は、パルプが菌に凝集された後に生じることを示唆している。

以上の結果より、*P. crassa* WD1694 株は、単純に MnP を培地の溶液中に分泌して、リグニン分解を進行させるのではなく、菌糸とスライムでパルプを凝集した後、菌体上で MnP によるリグニン分解反応を効率よく進行させる組織学的な機構が存在することが示唆された。

引用文献

- Archivald, F. S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M. G. and Reid, I. D. (1997) Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *J Biotechnol* 53, 215-236.
- Brown J. A., Glenn J. K. and Gold M. H. (1990) Manganese regulates expression of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*. *J Bacteriol* 172, 3125-3130.
- Cattaneo, M. V. and Luong, J. H. T. (1994) A stable water-soluble tetramethylbenzidine-2-hydroxypropyl- β

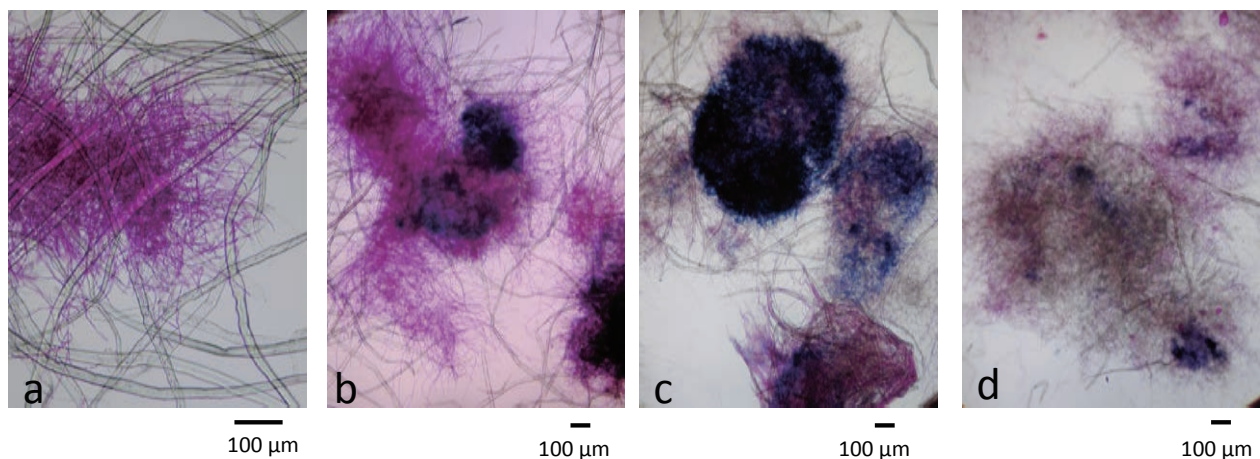


Fig. 5. *P. crassa* WD1694 株の TMBZ 添加 LUKP 培地培養の顕微鏡観察結果 (フロキシシン B 染色併用) 培養条件 C、培養期間 (a) 6 時間後、(b) 1 日目、(c) 2 日目、(d) 3 日目。

- cyclodextrin inclusion complex and its applications in enzyme assays. *Anal Biochem* 223, 313-320.
- Daniel, G. (1994) Use of electron microscopy for aiding our understanding of wood biodegradation. *FEMS Microbial Rev*, 13, 199-233.
- Gold, M. H. and Glenn, J. K. (1988) Manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. In Wood, W. A. and Kellogg, S. T. (eds.) "Methods in Enzymology Volume 161 Biomass PartB Lignin, Pectin, and Chitin" . Academic Press, 258-264.
- Hirai, H., Kondo, R. and Sakai, K. (1994) Screening of lignin-degrading fungi and their ligninolytic enzyme activities during biological bleaching of kraft pulp. *Mokuzai Gakkaishi* 40, 980-986.
- Iimori, T., Kaneko, R., Yoshihara, H., Machida, M., Yoshioka, H. and Murakami, K. (1994) Screening of pulp-bleaching fungi and bleaching activity of newly isolated fungus SKB-1152. *Mokuzai Gakkaishi* 40, 733-737.
- Jones, C. L. and Lonergan, G. T. (1999) Histochemical detection of laccase in *Pycnoporus cinnabarinus* using microwave-enhanced colloidal gold microcrystallization. *Biotechnol Techniq*, 13, 871-875.
- Keyser, P., Kirk, T. K. and Zeikus, J. G. (1978) Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium*-synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation. *J Bacteriol* 135, 790-797.
- Kirk, T. K., Schultz, E., Connors, W. J., Lorenz, L. F. and Zeikus, J. G. (1978) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch Microbiol* 117, 277-285.
- Kirk, T. K. and Yang, H. H. (1979) Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnol Lett* 1, 347-352.
- Liem, H. H., Cardenas, F., Tavassoli, M., Poh-Fitzpatrick, M. B. and Muller-Eberhard, U. (1979) Quantitative determination of hemoglobin and cytochemical staining for peroxidase using 3,3',5,5'-tetramethylbenzidine dihydrochloride, a safe substitute for benzidine. *Anal Biochem* 98, 388-393.
- 桃原 郁夫、松本 雄二 (1991) パルプ化工程における生物学的プロセスの適用 . 紙パルプ技術協会誌 45, 1297-1315.
- Moukha, S. M., Wösten, H. A. B., Asther, M. and Wessels, J. G. H. (1993) In situ localization of the secretion of lignin peroxidases in colonies of *Phanerochaete chrysosporium* using a sandwiched mode of culture. *J General Microbiol*, 139, 969-978.
- 西田 友昭 (1992) 微生物によるリグニン分解とパルプ漂白 . 木材学会誌 , 38, 811 - 819.
- Nishida, T., Kashino, Y., Mimura, A., and Takahara, Y. (1988) Lignin biodegradation by Wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi. *Mokuzai Gakkaishi* 34, 530-536.
- 尾鍋 史彦 (1991) 紙・パルプ産業におけるダイオキシン問題の現状と将来の展望 . 紙パルプ技術協会誌 , 45, 462-474.
- Paice, M. G., Jurasek C., Ho, C., Bourbonnais, R. and Archibald, F. (1989) Direct biological bleaching of hardwood kraft pulp with the fungus *Coriolus versicolor*. *Tappi J* 72, 217-221.
- Palmer, J. G., Muranis, L. and Highly, T. L. (1983) Visualization of hyphal sheath in wood-decay hymenomycetes. II. White-rotters. *Mycologia*, 75, 1005-1010.
- Paszczyński, A., Crawford, C. and Huynh, V.B. (1988) Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, purification. In Wood, W. A. and Kellogg, S. T. (eds) "Methods in Enzymology Volume 161 Biomass PartB Lignin, Pectin, and Chitin" . Academic Press, 264-270.
- Reid, I. D. and Paice, M. G. (1994) Biological bleaching of kraft pulps by white-rot fungi and their enzymes. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 369-376.
- Ruel, K. and Joseleau, J. P. (1991) Involvement of an extracellular glucan sheath during degradation of *Populus* wood by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol*, 57, 374-384.
- 坂井 克己 (1993) パルプ化プロセスへのリグニン分解菌の応用 . 紙パルプ技術協会誌 , 47, 933-943.
- Takano, M., Abe, H., and Hayashi, N. (2006) Extracellular peroxidase activity at the hyphal tips of the white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. *J Wood Sci* 52: 429-435.
- Takano, M., Hayashi, N. and Kuroda, K. (2008) Selective staining and visualization of hyphal sheath of a white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694 with Phloxine B. *J Wood Sci*, 54, 76-80.
- Takano, M., Hayashi, N., Nakamura, M. and Yamaguchi, M. (2009) Extracellular peroxidase reaction at hyphal tips of white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694 and in fungal slime. *J Wood Sci* 55:302-307.
- Takano, M., Nakamura, M., Nishida, A. and Ishihara, M. (2004) Manganese peroxidase from *Phanerochaete crassa* WD1694. *Bulletin of FFPRI*, 3, 7-13.
- Takano, M., Nakamura, M. and Yamaguchi, M. (2010) Glyoxal oxidase supplies hydrogen peroxide at hyphal tips and on hyphal wall to manganese peroxidase of a white-rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694. *J Wood Sci* 56: 307-313.
- Takano, M., Nishida, A. and Nakamura, M. (2001) Screening of wood-rotting fungi for kraft pulp bleaching by the Poly R decoloration test and biobleaching of hardwood kraft pulp

- by *Phanerochaete crassa* WD1694. J Wood Sci 47, 63-68.
- 割石 博之 (2002) リグニン分解酵素. 穴戸和夫編 “キノコとカビの基礎科学とバイオ技術” アイピーシー, 141-153.
- Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. J. Biol. Chem. 267, 23688-23695.

Histochemical analysis of manganese peroxidase reaction of a white rot fungus *Phanerochaete crassa* WD1694

Mariko TAKANO¹⁾ and Tsutomu HATTORI²⁾

Abstract

Manganese peroxidase reaction of *P. crassa* WD1694 cultivated in pulp culture was detected and visualized with tetra-methylbenzidine (TMBZ), a peroxidase substrate for histochemical detection. *P. crassa* WD1694 was cultivated in fungal media containing unbleached kraft pulp, distilled water and TMBZ. After cultivation for 2 days, flocs including *P. crassa* WD1694 and pulp were generated in each cultivation condition of solid-state fermentation, an agitated suspension of pulp, and a stationary suspension of pulp. TMBZ staining was observed on the flocs in each culture. Fungal hyphae intimately associated with pulp fibers in the flocs were stained with Coomassie Brilliant Blue, and slime layer covered the fungal hyphae and the pulp in the flocs was visualized with Phloxine B. The TMBZ staining observed in each culture was mainly observed on the hyphal end and along the hyphae in the flocs. Time course analysis of TMBZ and Phloxine B staining revealed that fungal hyphae and slime gathered pulp and made flocs, and the TMBZ staining occurred on the flocs. These results suggest a histological system that MnP reaction occurs on the end of hyphae and along the hyphae in the flocs and that could cause efficient and effective degradation of lignin in pulp.

Key words : Phanerochaete, manganese peroxidase, peroxidase staining, white rot, histochemistry, lignin degradation

Received 14 September 2016, Accepted 28 November 2016

1) Department of Forest Resource Chemistry, Microbial Technology Laboratory, Forestry and Forest Products Research Institute (FFPRI)

2) Department of Mushroom Science and Forest Microbiology, Forest Pathology Laboratory, FFPRI

* Department of Forest Resource Chemistry, Microbial Technology Laboratory, FFPRI, 1 Matsunosato, Tsukuba, Ibaraki, 305-8687 JAPAN;
e-mail: marin@ffpri.affrc.go.jp