

論文 (Original article)

木材腐朽菌 30 株による 4 色素、レマゾールブリリアントブルー R、Poly R-478、Poly S-119、Azure B の脱色試験

高野 麻理子^{1)*}、服部 力²⁾、根田 仁³⁾

要旨

パルプ漂白菌の選抜に色素の脱色を利用するため、30 株の木材腐朽菌を、パルプと RBBR, Poly R-478, Poly S-119, Azure B の各色素を含む寒天培地で培養した。その結果、20 株が RBBR 脱色を示し、そのうちの 15 株が Poly R-478 の脱色を示した。さらに、Poly R-478 脱色株のうちの 6 株が Poly S-119 の脱色を示し、そのうちの 3 株が Azure B の脱色を示した。試験管中で、ラッカーゼ (Lac)、マンガニンペルオキシダーゼ (MnP)、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) の各酵素による RBBR、Poly R-478、Poly S-119、Azure B の脱色試験を行った。RBBR は、Lac、MnP、LiP の全酵素に対し、高い脱色性を示した。Poly R-478 は、Lac では脱色せず、MnP と LiP による脱色を示した。Poly S-119 と Azure B は、Lac と MnP による脱色性が低く、LiP による脱色性が高かった。これらの結果は、RBBR 脱色は、Lac のみを生産する株やリグニン分解酵素活性の低い株をも検出する可能性のあること、Poly S-119 および Azure B の脱色は、LiP 生産株の検出に適することを示した。一方、Poly R-478 の脱色は、RBBR、Poly S-119、Azure B の脱色と比較して、MnP 生産株の選択的な選抜に適すと考えられた。MnP は、未晒しクラフトパルプの漂白に高い効果を示すことが報告されており、パルプ漂白菌の選抜には、Poly R-478 が最も適した色素であると結論した。

キーワード：白色腐朽菌、リグニン分解、色素脱色、バイオブリーチング、スクリーニング

1. 緒言

紙パルプの主要な製造工程では、木材中のリグニンの分解除去に莫大なエネルギーと化学薬品が消費されており、環境負荷の高いことが従来、課題となっている。1990 年代には、製紙工場の廃液からダイオキシンが検出されたことが社会問題となり、無塩素漂白法の開発が急務とされた(尾鍋 1991, 飯塚 1994)。

白色腐朽菌は、木材細胞壁中のリグニンを分解する能力の高いことが知られており、環境に負荷をかけずに難分解性のリグニン分解に利用できる可能性がある。そのため、無塩素漂白法の一環として、白色腐朽菌のリグニン分解能力を、未晒しクラフトパルプの漂白に応用するバイオブリーチングの研究が行われた (Archibald et al. 1997, Kirk and Yang 1979, Tran and Chambers 1987, Paice et al. 1993, Kondo et al. 1996)。バイオブリーチングの研究では、パルプ漂白能力の高い菌株やリグニン分解力の高い菌株のスクリーニングが行われ、白色腐朽菌の代表的な試験株であったカワラタケや *Phanerochaete chrysosporium* より、パルプの漂白能力やリグニン分解能力の高い菌株が選抜された (Hirai et al. 1994, Iimori et al. 1994, Nishida et al. 1988)。

リグニン分解菌の選抜法としては、バーベンダム試験やグアヤコール着色体形成試験など、フェノール性基質の酸化重合による着色帯形成試験が用いられてきた (Hirai et al. 1994, Nishida et al. 1988, Kirk and Kelman 1964)。

一方、白色腐朽菌やリグニン分解酵素 (LPO) による色素の脱色や分解が報告されている。Glenn らは、高分子色素の脱色が、*P. chrysosporium* のリグニン分解活性に依存することを示した (Glenn and Gold 1983)。その後、リグニンペルオキシダーゼ (LiP) によるアゾ色素や複素環系色素の脱色・分解が報告されている (Ollikka et al. 1993)。Azure B 色素は、LiP 活性測定モデル基質であるベラトリルアルコールの代替基質となる可能性が提示されている (Archibald 1992a)。また、レマゾールブリリアントブルー (RBBR) は、ヒラタケの過酸化水素依存性のリグニン分解活性によって脱色することが示された (Vyas and Molitoris 1995)。色素脱色は、白色腐朽菌のリグニン分解活性やリグニン分解酵素活性を検出するため、リグニン分解菌やパルプ漂白菌の選抜に利用できる可能性がある。色素脱色法では、芳香環や複素環を含む発色構造の分解による脱色

原稿受付：平成 29 年 12 月 8 日 原稿受理：平成 30 年 2 月 15 日

1) 森林総合研究所 森林資源化学研究領域

2) 森林総合研究所 きのこ・森林微生物研究領域

3) 森林総合研究所 研究ディレクター

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

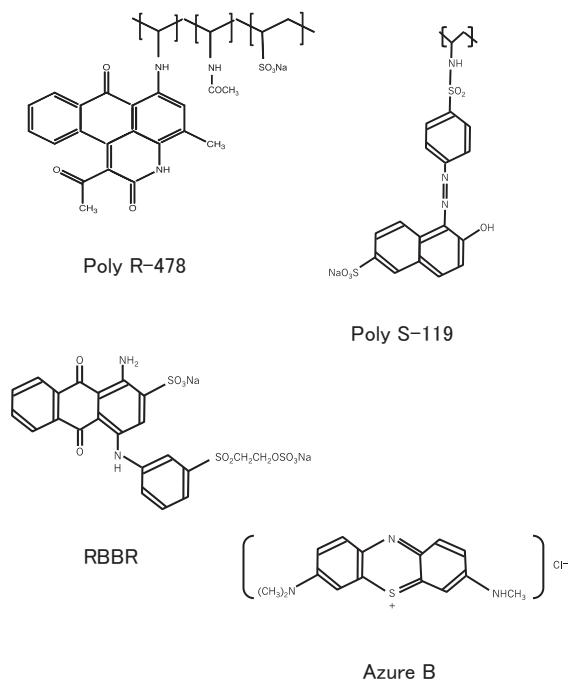


Fig. 1. 色素の化学構造

を検出するという点で、バーベンダム法やグアヤコール着色帯形成法などの、フェノール性基質の重合による着色を検出する従来法と比較して、未晒しクラフトパルプ中の着色構造の分解により近い検出法となる可能性がある。

白色腐朽菌やリグニン分解酵素による脱色が報告された色素は複数あるが、カワラタケ由来のリグニン分解酵素を用いた試験では、Poly R-478、Poly S、Azure B等の各色素種によって、脱色特性が異なることが報告されている (Archibald 1992a)。

本研究は、パルプ漂白菌の選抜試験に用いる色素を選定するため、白色腐朽菌やリグニン分解酵素による脱色試験が報告された RBBR、Poly R-478、Poly S-119、Azure B の 4 色素を用いて、白色腐朽菌による脱色試験を行った。

以前報告した木材腐朽菌のスクリーニングに関する論文は、本研究結果をもとに、Poly R-478 を用いて、パルプ漂白菌のスクリーニングを行ったものである (Takano et al. 2001)。

2. 実験方法

2.1 菌株

白色腐朽菌は、森林総合研究所腐朽病害研究室および森林総合研究所きのこ研究室より入手した。*P. chrysosporium* VKM F-1767 は、独立行政法人製品評価技術基盤機構バイオテクノロジーセンターより入手した。

2.2 パルプ

広葉樹未晒しクラフトパルプ (Kappa 価: 12.7) (日本製紙 (株) 八代工場製) を用いた。

2.3 色素

レマゾールブリリアントブルー R (RBBR、Aldrich 製)、および、Poly R-478、Poly S-119、Azure B (各色素とも Sigma 製) をそれぞれ 1% の水溶液に調製後、フィルター滅菌して使用した。

2.4 色素脱色プレート試験

滅菌シャーレ (径 90 mm) に、滅菌した精製寒天 (Sigma 製) の 2.5% 溶液 10 ml を入れ、冷却して下層を作成した。次いで、滅菌した上層用培地 (未晒しクラフトパルプ 1.0% と精製寒天 2.5% の水溶液に、フィルター滅菌した各色素を 0.03% 濃度に添加した溶液) 10 ml を下層培地上に注ぎ、冷却して色素脱色試験用のプレートを調製した。

各菌株をポテトデキストロス寒天培地 (PDA) に植菌し、26°C で培養した。PDA 上に成長した菌糸の先端を直径 6 mm のコルクボーラーで打ち抜き、一片を、色素脱色試験用のプレートの中央に植菌した。室温で 8 日間培養し、色素の脱色を評価した。

2.5 リグニン分解酵素

ラッカーゼ (Lac) は Laccase from *Agaricus bisporus* (Sigma 製) を使用した。マンガンペルオキシダーゼ (MnP) は、*P. crassa* WD1694 株より、既報に従って生産、採取した (Takano et al. 2004)。リグニンペルオキシダーゼ (LiP) 粗酵素は、*P. chrysosporium* VKM F-1767 を Kirk の培地で培養し、濾過した培養液にイオン交換樹脂を加え、酵素を吸着させて採取したものをを用いた (Tien and Kirk 1988)。

2.6 リグニン分解酵素による色素の脱色試験

各リグニン分解酵素による色素の脱色試験は、いずれも 500 μ l の酵素反応液中の色素の可視光領域部のスペクトル変化を、紫外可視分光光度計 UV-2400PC (島津製作所) で記録した。Lac 反応は、各色素を含む酢酸緩衝液 (10mM、pH3.5) に、ラッカーゼを加え、室温で反応させた。LiP 反応は、各色素を含む酢酸緩衝液 (10mM、pH3.5) に LiP 粗酵素を加えた後、過酸化水素を加え、室温で反応させた。LiP 粗酵素は MnP を含む可能性があったが、Mn 非存在下、酢酸緩衝液を用いることで MnP の作用を抑制した。MnP 反応は、色素と MnSO₄ (500 μ M) を含むマロン酸緩衝液 (50mM、pH3.5) に、MnP を加えた後、過酸化水素を加え、室温で反応させた。色素濃度は、RBBR および Poly R-478 は 0.01%、Azure B は 0.001%、Poly S-119 は 0.0015% になるよう反応溶液に添加した。各リグニン分解酵素

活性は、基質に2, 2'-アジノ-ビス(3-エチルベンソチアゾリン-6-スルホン酸 (ABTS)) を用い、酸化によって生じる414 nmの吸光度の増加を測定した。各酵素反応溶液の酵素量、反応時間、過酸化水素量は、グラフ中 (Fig. 4~7) に記載した。

3. 結果と考察

50株の白色腐朽菌を対象に、パルプ寒天培地でRBBR、Poly R-478、Poly S-119、Azure Bの各色素の脱色試験を行った。試験結果の例として、WD544株の色素の脱色結果をFig. 2に示した。色素脱色の面積を大中小で評価し、Table 1に、大(+++)、中(++)、小(+)および、脱色無し(-)として記載した。また、Table 1の+表示の例として、RBBR脱色結果の写真をFig. 3に示した。

色素プレート上で各菌株を8日間培養した色素の脱色結果をTable 1に示す。RBBRを脱色した株は、*P. chrysorhiza* WD544、*P. sordida*、*Trametes versicolor* WD1670、*Loweporus tephroporus* WD1602、*Irpex lacteus* WD760、*Inonotus mikadoi* WD1700、*P. crassa* WD1694、*Coriolus brevis* F148、*Pleurotus pulmonarius* PSCT、*P. pulmonarius* PSCH、*Cerrena unicolor* WD668、*T. hirsute* WD1674、*Cryptoporus volvatus* WD647、*Erythromyces crocicreas* WD1753、*P. pulmonarius* PSCM、*Lentinus edodes* WD662、*Rigidoporus lineatus* WD702、*Perenniporia fraxinea* WD1518、*T. gibbosa* WD1677、*Hydnochaete tabacinoides* WD1687、の20株であった。Poly R-478を脱色した株は、*P. chrysorhiza* WD544、*P. sordida*、*T. versicolor* WD1670、*L. tephroporus* WD1602、*I. lacteus* WD760、*I. mikadoi* WD1700、*P. crassa* WD1694、*C. brevis* F148、*P. pulmonarius*

PSCH、*C. unicolor* WD668、*T. hirsute* WD1674、*C. volvatus* WD647、*E. crocicreas* WD1753、*P. pulmonarius* PSCM、*H. tabacinoides* WD1687、の16株であった。Poly S-119を脱色した株は、*P. chrysorhiza* WD544、*P. sordida*、*T. versicolor* WD1670、*L. tephroporus* WD1602、*I. lacteus* WD760、*I. mikadoi* WD1700、の6株であった。Azure Bを脱色した株は、*P. chrysorhiza* WD544、*P. sordida*、*T. versicolor* WD1670、の3株だった。

Table 1に示したように、RBBR脱色株の一部にPoly R-478の脱色が認められた。また、Poly R-478脱色株の一部にPoly S-119の脱色が認められ、Poly S-119脱色株の一部にAzure Bの脱色が認められた。

これらの結果より、白色腐朽菌類のリグニン分解酵素活性による脱色性の最も高い色素はRBBRであり、次いでPoly R-478であり、Poly S-119とAzure Bは、RBBRやPoly R-478より脱色性が低いと考えられた。

白色腐朽菌のリグニン分解酵素 (LPO) としては、現在LiP、MnP、Lac、VPの4種類の酵素が知られている (割石 2002)。このうち、Lacはフェノール類を酸化するオキシダーゼである。他の3種の酵素は、過酸化水素を必要とするペルオキシダーゼ類である。MnPの基質はMn(II)であり、これがMnPによって酸化されMn(III)となり、Mn(III)がフェノール類を酸化する。LiPは、LacやMnPより高い酸化能力を持ち、フェノール類に加え、ペラトリアルアルコール等の非フェノール性芳香族化合物の酸化能力を持つ。VPは、Mn(II)を酸化するMnPの機能と、非フェノール性芳香族化合物を酸化するLiPの機能の両方を持つことが報告されている (割石 2002)。このような触媒機構の違いから、各LPOは、酸化できる基質に違いがあることが知られている (割石 2002)。

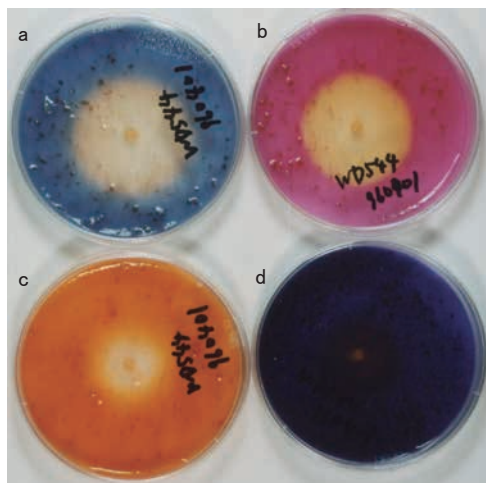


Fig. 2. パルプ寒天培地を用いた色素の脱色試験試験株 *P. chrysorhiza* WD544 株、培養10日間、a, RBBR; b, Poly R-478; c, Poly S-119; d, Azure B

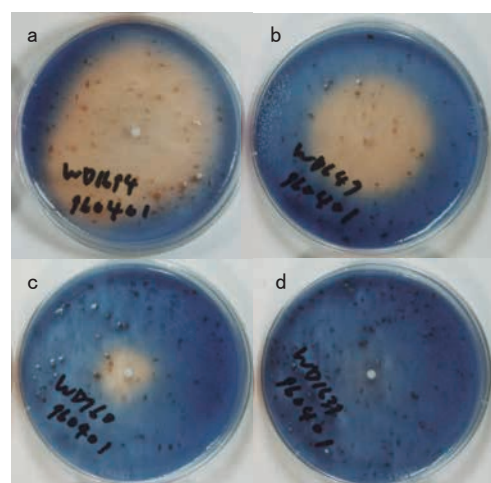


Fig. 3. 白色腐朽菌によるRBBR色素の脱色試験例 a, WD1694株、+++ (Table 1)、b, WD647株、++ (Table 1)、c, WD760株、+ (Table 1)、d, WD1637、- (Table 1)。

Table 1. パルプ寒天培地を用いた白色腐朽菌の色素脱色試験

Strains			Dyes			
			RBBR	Poly R-478	Poly S-119	Azure B
<i>Phanerochaete</i>	<i>chrysohiza</i>	WD544	++	++	+	+
<i>Phanerochaete</i>	<i>sordida</i>	60999	++	+	+	+
<i>Trametes</i>	<i>versicolor</i>	WD1670	+++	+++	+	+
<i>Loweporus</i>	<i>tephroporus</i>	WD1602	++	++	+	—
<i>Irpex</i>	<i>lacteus</i>	WD760	+	+	+	—
<i>Inonotus</i>	<i>mikadoi</i>	WD1700	+	+	+	—
<i>Phanerochaete</i>	<i>crassa</i>	WD1694	+++	+++	—	—
<i>Coriolus</i>	<i>brevis</i>	F148	+++	+	—	—
<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	PSCT	++	++	—	—
<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	PSCH	++	++	—	—
<i>Cerrena</i>	<i>unicolor</i>	WD668	++	++	—	—
<i>Trametes</i>	<i>hirsuta</i>	WD1674	++	+	—	—
<i>Cryptoporus</i>	<i>volvatus</i>	WD647	++	+	—	—
<i>Erythromyces</i>	<i>crocioreas</i>	WD1753	+	+	—	—
<i>Pleurotus</i>	<i>pulmonarius</i>	PSCM	+	+	—	—
<i>Lentinus</i>	<i>edodes</i>	WD662	+	—	—	—
<i>Rigidoporus</i>	<i>lineatus</i>	WD702	+	—	—	—
<i>Perenniporia</i>	<i>fraxinea</i>	WD1518	+	—	—	—
<i>Trametes</i>	<i>gibbosa</i>	WD1677	+	—	—	—
<i>Hydnochaete</i>	<i>tabacinoides</i>	WD1687	+	—	—	—
<i>Ischnoderma</i>	<i>resinosum</i>	WD1637	—	+	—	—
<i>Heterobasidium</i>	<i>insulare</i>	WD651	—	—	—	—
<i>Fomes</i>	<i>fomentarius</i>	WD725	—	—	—	—
<i>Lentinellus</i>	<i>ursinus</i>	WD727	—	—	—	—
<i>Auricularia</i>	<i>mesentrica</i>	WD750	—	—	—	—
<i>Pycnoporus</i>	<i>cinnabarinus</i>	WD1563	—	—	—	—
<i>Abortiporus</i>	<i>biennis</i>	WD1564	—	—	—	—
<i>Xylobolus</i>	<i>annosus</i>	WD1534	—	—	—	—
<i>Ganoderma</i>	<i>australe</i>	WD1614	—	—	—	—
<i>Schizophyllum</i>	<i>commune</i>	WD1638	—	—	—	—

脱色強+++、脱色中++、脱色弱+、脱色無—、(脱色程度の例を Fig. 3 に示した。)

白色腐朽菌の多くはこれらの4種のLPOのうち、1-3種を生産することが知られている(Hatakka 1994)。Table 1の色素脱色結果は、各菌株が生産するLPOの種類や量に違いがあり、それに基づいて異なる試験結果が得られたことを示唆している。

そこで、次に各リグニン分解酵素による色素の脱色を分析するため、経時的に各酵素反応液中の色素の吸光波形を分光光度計で測定した。

Fig. 4は、Lac、MnP、LiPの各酵素反応による、色素RBBRの脱色を、可視光領域のスペクトル変化として測定したものである。RBBRは、Lac、MnP、LiPの各酵素によって反応時間150分以内に明確に可視光領域のスペクトルの吸光度の減少を示した(Fig. 4 A、B、C)。

Fig. 5は、Lac、MnP、LiPの各酵素反応による、色素Poly R-478の脱色に伴う可視光領域のスペクトル変化を経時的に測定したものである。Poly R-478は、Lac (3225 mAbs/min)を用いて24時間反応させても波形に変化が認められなかった(Fig. 5 A)。一方、MnP (3240 mAbs/min)を用いた場合は、反応120分間で波形に変化が生じ始め、19時間および24時間反応後には、極大吸収を示すスペクトル範囲に明確な減少が生じた(Fig. 5 B)。LiP (966 mAbs/min)を用いた場合に

は、反応後30分で、顕著な吸光度の減少が確認された(Fig. 5 C)。これらの結果より、Poly R-478は、脱色性が、Lac、MnP、LiPの各酵素種により段階的に異なることが示唆された。

次に、Poly S-119をLac、MnP、LiPで、酵素反応させた結果をFig. 6に示した。Poly S-119は、Lacで24時間反応させても殆ど波形に変化が生じなかった(Fig. 6 A)。また、MnPにより反応させた場合も、24時間処理後の波形変化は、極大吸収領域に、わずかな吸光度減少が確認されたにとどまった(Fig. 6 B)。一方、LiPを用いた場合は、反応1時間後から、極大吸収領域の吸光度減少が確認され、反応20時間後には、明確な吸光度の減少が確認された(Fig. 6 C)。

上述の実験と同様に、Azure BをLac、MnP、LiPで、酵素反応させた結果をFig. 7に示した。Azure Bは、Lacで24時間反応させても殆ど波形に変化が生じなかった(Fig. 7 A)。Azure BをMnPにより反応させた場合は、極大吸収領域の吸光度の減少がわずかに確認された(Fig. 7 B)。LacやMnPの場合とは対照的に、Azure BをLiPにより反応させた場合は、反応2時間後には、顕著な波形の変化と吸光度の減少が生じた(Fig. 7 C)。

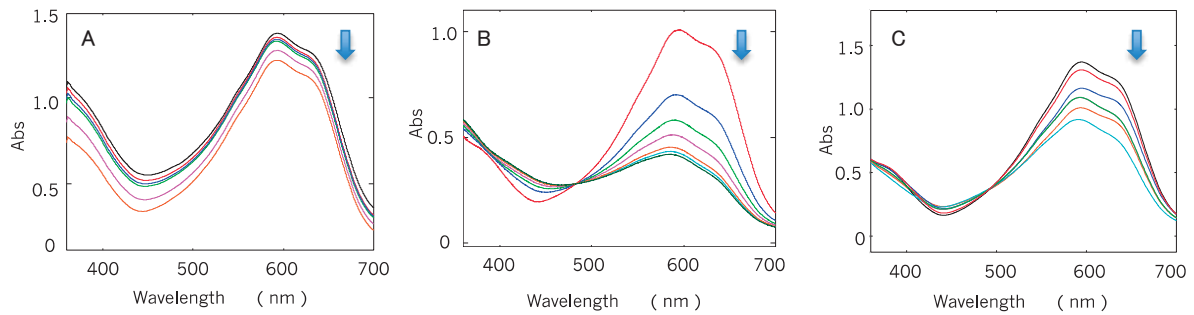


Fig. 4. リグニン分解酵素による RBBR 色素の可視領域スペクトルの変化

A, Lac 活性 3225 mAbs/min、反応時間 0, 30, 60, 90, 120, 150 分；
 B, MnP 活性 3240 mAbs/min、反応時間 0,15,30,45,60,105,120 分；1mM H₂O₂ 50 μl を 2 回添加
 C, LiP 活性 966 mAbs/min、反応時間 0, 3, 10, 20, 30, 60 分；1mM H₂O₂ 10 μl を 2 回添加

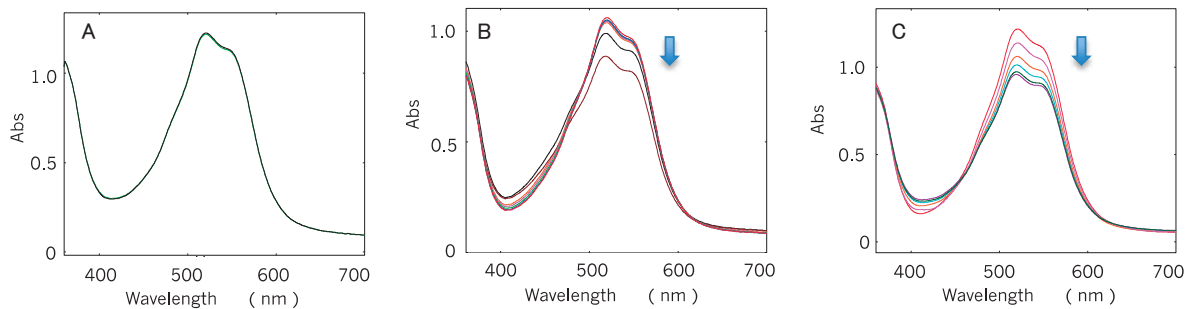


Fig. 5. リグニン分解酵素による Poly R-478 色素の可視領域スペクトルの変化

A, Lac 活性 3225 mAbs/min、反応時間 0, 24 時間；
 B, MnP 活性 3240 mAbs/min、反応時間 0, 30, 60, 90, 120 分、19, 24 時間；1mM H₂O₂ 10 μl を 2 回添加
 C, LiP 活性 966 mAbs/min、反応時間 0, 5, 9, 14, 18, 30 分；1mM H₂O₂ 10 μl を 2 回添加

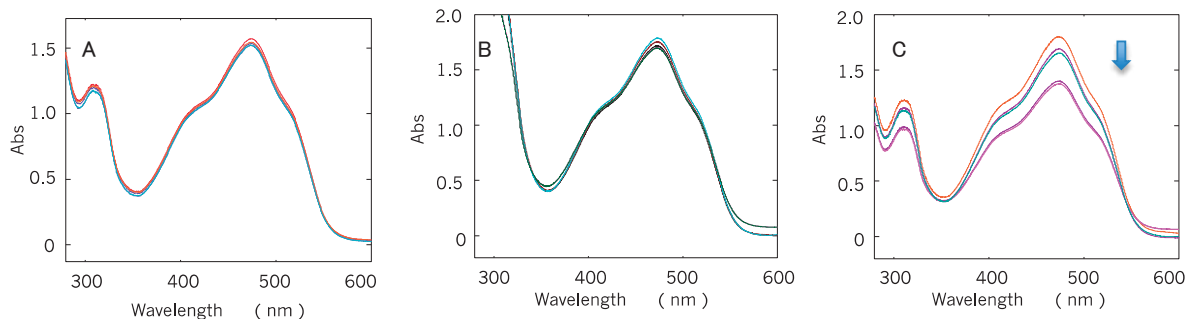


Fig. 6. リグニン分解酵素による Poly S-119 色素の可視領域スペクトルの変化

A, Lac 活性 3126 mAbs/min、反応時間 0, 2, 5, 22, 24 時間；
 B, MnP 活性 4900 mAbs/min、反応時間 0, 1, 3, 20, 24 時間；1mM H₂O₂ 10 μl を 2 回添加
 C, LiP 活性 1360 mAbs/min、反応時間 0, 1, 3, 20, 24 時間；1mM H₂O₂ 10 μl を 2 回添加

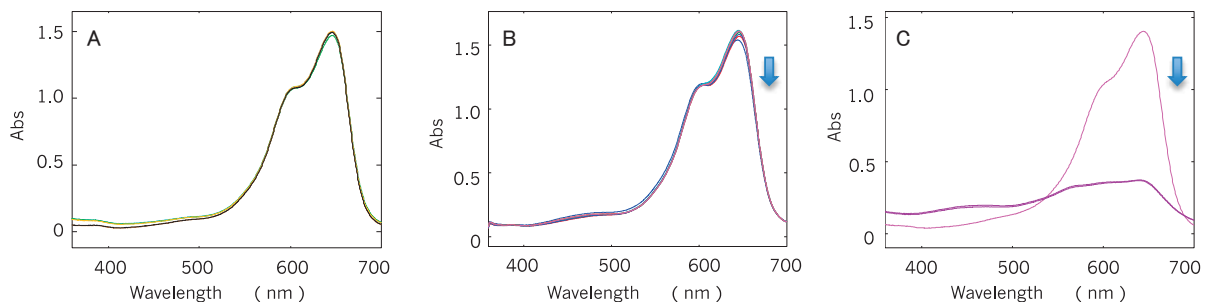


Fig. 7. リグニン分解酵素による Azure B 色素の可視領域スペクトルの変化

A, Lac 活性 3126 mAbs/min、反応時間 0, 2, 5, 22, 24 時間；
 B, MnP 活性 3240 mAbs/min、反応時間 0, 0.5, 1, 1.5, 2, 22 時間；1mM H₂O₂ 50 μl を 1 回添加
 C, LiP 活性 680 mAbs/min、反応時間 0, 2, 5 時間；1mM H₂O₂ 10 μl を 2 回添加

RBBR は、Lac、MnP、LiP の全ての酵素に対する脱色性が高かったことから、リグニン分解活性を示すすべての株を選出するのに適していた。しかし、リグニン分解活性の低い株も陽性になる可能性があるため、パルプ漂白菌の選抜には適さないと考えられた。

Poly R-478 は、Lac には陰性の結果を示し、また、MnP と LiP とで、脱色性に相違が認められた。本研究では、*P. crassa* 由来の MnP を使用したが、Poly R-478 は、*P. chrysosporium* および *Bjerkandera* sp. 由来の MnP による脱色も確認されている (Moreira et al. 2001)。

Poly S-119 と Azure B は、Lac と MnP には脱色性が低い一方、LiP には高い脱色性を示したことから、LiP 生産菌の選抜に適すると考えられた。Azure B は、ヴェラトリルアルコールと同程度に LiP を迅速に検出することが報告されている (Archibald 1992a)。

パルプ漂白に作用するリグニン分解酵素種が分析されており、パルプ漂白能力と MnP 活性量とに相関のあることが示された (Hirai et al. 1994)。また、単離した MnP によるパルプ漂白も確認されている (Kondo et al. 1994, Paice et al. 1993)。一方、カワラタケのラッカーゼは、ABTS 存在下ではパルプ漂白に作用するが、酵素単独ではパルプ漂白には寄与しないことが報告された (Bourbonnais et al. 1995, Archibald et al. 1997)。LiP に関しては、*P. chrysosporium* 由来の LiP が、パルプ漂白に寄与することが示されたが (Katagiri et al. 1995)、カワラタケの LiP は、パルプ漂白に作用しないことが報告された (Archibald 1992b)。これらの背景より、パルプ漂白活性の高い株を選抜するには、MnP 活性を指標とすることが効率的であると考えられた。

本研究の結果では、RBBR では、Lac のみを生産する株や、リグニン分解活性の低い株も選抜されるため、パルプ漂白菌の選抜には適さないと考えられた。Poly S-119 および Azure B は、LiP 生産株の選抜には適するが、パルプ漂白との関連性が明らかである MnP 高生産菌の選抜には適さないと考えられた。Poly R-478 は、単離した MnP による脱色が複数の菌由来の MnP で確認されている (Moreira et al. 2001)。また、Poly R-478 を使用した場合は、酵素単独ではパルプ漂白活性を示さないとされた Lac 活性は陰性になるため、RBBR を使用した場合と比較して、MnP 生産株の選択的な選抜に適すると考えられる。

以上の結果より、パルプ漂白菌の選抜には、MnP 活性の検出に適した Poly R-478 が最適であると結論した。

引用文献

Archibald, F. S. (1992a) A new assay for lignin-type peroxidases employing the dye Azure B. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3110-3116.
 Archibald, F. S. (1992b) Lignin peroxidase-activity is not important in biological bleaching and delignification of

unbleached kraft pulp by *Trametes versicolor*. *Applied and Environmental Microbiology*, 58, 3101-3109.

- Archibald, F. S., Bourbonnais, R., Jurasek, L., Paice, M. G., and Reid, I. D. (1997) Kraft pulp bleaching and delignification by *Trametes versicolor*. *Journal of Biotechnology*, 53, 215-236.
- Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P. and Yaguchi, M. (1995) Lignin oxidation by laccase isozymes from *trametes-versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 1876-1880.
- Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 45, 1741-1747.
- Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi - production and role in lignin degradation. *Fems Microbiology Reviews*. 13. 125-135.
- 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., Yoshikawa, 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.
- Katagiri, N., Tsutsumi, Y. and Nishida, T. (1995) Correlation of brightening with cumulative enzyme-activity related to lignin biodegradation during biobleaching of kraft pulp by white-rot fungi in the solid-state fermentation system. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 617-622.
- Kirk, T. K. and Kelman, A. (1964) Color formation on phenol-containing media as related to lignin breakdown by wood-rotting basidiomycetes. *Phytopathology*, 54, 897-and.
- Kirk, T. K. and Yang, H. H. (1979) Partial delignification of unbleached kraft pulp with ligninolytic fungi. *Biotechnology Letters*, 1, 347-352.
- Kondo, R., Harazono, K. and Sakai, K. (1994) Bleaching of hardwood kraft pulp with manganese peroxidase secreted from *Phanerochaete sordida* YK-624. *Applied and Environmental Microbiology*, 60, 4359-4363.
- Kondo, R., Harazono, K., Tsuchikawa, K., Sakai, K., Jeffries, T., and Viikari, L. (1996) Biological bleaching of kraft pulp with lignin-degrading enzymes. *Enzymes For Pulp and Paper Processing*, 655, 228-240.
- 飯塚 堯介 (1994) 無塩素漂白法. *繊維学会誌*, 50, 25-29.

- Moreira, M. T., C. Palma, I. Mielgo, G. Feijoo and J. M. Lema (2001) In vitro degradation of a polymeric dye (poly R-478) by manganese peroxidase. *Biotechnology and Bioengineering*, 75, 362-368.
- 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.
- Ollikka, P., Alhoniemi, K., Leppänen, V. M., Glumoff, T., Rajola, T. and Suominen I. (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 4010-4016.
- 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., Reid, I. D., Bourbonnais, R., Archibald, F. S., and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase, produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Applied and Environmental Microbiology*, 59, 260-265.
- Takano, M., Nakamura, M., Nishida, A. and Ishihara, M. (2004) Manganese peroxidase from *Phanerochaete crassa* WD1694. *Bulletin of the Forestry and Forest Products Research Institute*, 3, 7-13.
- Takano, M., Nishida, A. and Nakamura, M. (2001) Screening of wood-rotting fungi for kraft pulp bleaching by the Poly R decolorization test and biobleaching of hardwood kraft pulp by *Phanerochaete crassa* WD1694. *Journal of Wood Science*, 47, 63-68.
- Tien, M. and Kirk, T. K. (1988) Lignin peroxidase of *Phanerochaete-chrysosporium*. Wood, W. a. and S. T. Kellogg (ed.) "Methods in Enzymology, Vol. 161. Biomass, Part B: Lignin, Pectin, and Chitin." Academic Press, Inc.: San Diego, California, USA; London, England, Uk. Illus, 238-249.
- Tran, A. V. and Chambers, R. P. (1987) Delignification of an unbleached hardwood kraft pulp by *Phanerochaete chrysosporium*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 25, 484-490.
- Vyas, B. R. M. and Molitoris, H. P. (1995) Involvement of an extracellular h₂O₂-dependent ligninolytic activity of the white-rot fungus *Pleurotus ostreatus* in the decolorization of Remazol-Brilliant-Blue-R. *Applied and Environmental Microbiology*, 61, 3919-3927.
- 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.

Decolorization of 4 dyes, Remazol Brilliant Blue R, Poly R-478, Poly S-119, and Azure B by 30 wood-rotting fungi.

Mariko TAKANO^{1)*}, Tsutomu HATTORI²⁾ and Hitoshi NEDA³⁾

Abstract

Decolorization of RBBR, Poly R-478, Poly S-119, and Azure B by 30 wood-rotting fungi was evaluated for screening of wood-rotting fungi for bleaching of unbleached kraft pulp. Decolorization of RBBR was observed for 20 strains, in which 15 strains also showed decolorization of Poly R-478. Among the 15 strains that showed Poly R-478 decolorization, 6 strains decolorized Poly S-119, and in the 6 strains, 3 strains decolorized Azure B.

Decolorization of each dye *in vitro* by laccase (Lac), manganese peroxidase (MnP), and lignin peroxidase (LiP) were studied. RBBR was decolorized extensively by all of the enzymes. Poly R-478 was decolorized by MnP and LiP, but was not decolorized by Lac. Poly S-119 and Azure B were decolorized effectively by LiP; however, MnP and Lac were not efficient for decolorization of Poly S-119 and Azure B. The results suggested that decolorization of RBBR detected strains that produced only laccase, or strains that showed low ligninolytic activity, and decolorization of Poly S-119 or Azure B was suitable for detection of strains that produce lignin peroxidase. Compared with these 3 dyes, decolorization of Poly R-478 was more appropriate for selection of strains that produce MnP. These results showed that Poly R-478 was most suitable dye for screening of biobleaching fungi of unbleached kraft pulp because MnP was reported to be effective enzyme for bleaching of unbleached kraft pulp.

Key words : white-rot fungi, lignin degradation, decolorization of dyes, biobleaching, screening

Received 8 December 2017, Accepted 15 February 2018

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

2) Department of Mushroom Science and Forest Microbiology, FFPRI

3) Principal Research Director, FFPRI

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