

核菌類のフェノール酸化酵素反応および リグニン関連物質の分解反応について

(1) ボタタケ属数株のBavendamm 反応および Sundman-Näse の
平板テスト法における反応

土 居 則 子

Phenoloxidase Reaction and Lignin Degradation in the Pyrenomycetes

(1) Bavendamm Test and Sundman-Näse's Plate Test
in Some Strains of the Genus *Hypocrea*.

Noriko Doi

〔内容抄録〕 ボタタケ属の5菌株について、Bavendamm 反応の測定と、培地上での分解帯の形成をみる簡便な方法によるリグニン関連物質の分解の測定 (Sundman-Näse 法) とを行った。その結果、ボタタケ属の2菌株は強い Bavendamm 反応を示したが、市販試薬のアルカリリグニンおよびリグニンスルホン酸ナトリウムの分解はみられなかった。また、他の3菌株については、Bavendamm 反応も上記リグニン関連物質2種の分解もみられなかった。一方、ボタタケ属菌の上記の2つの反応との比較のために測定したカワラタケでは、Bavendamm 反応、リグニン関連物質の分解共に認められた。

上記2つの測定方法は、供試菌株がフェノール類の酸化酵素をもっているかどうか、およびリグニン関連物質の分解を行うかどうかをスクリーニングする目的にとっては、簡便で有用な方法であると考えられる。また、この2つのテスト方法の併用は、反応のしかたの多様なパターンをとらせることができるので、トリコデルマのような不完全菌類の分類のためにも有用であると考えられる。

ボタタケ属菌の多くの種が強いセルロース分解力をもつこと、およびセルロース分解力の強弱や酵素の性質の差異は分類学的にも有用な性質であることは、すでに報告した。^{1) 2) 3)}

ところで、これらの菌類が着生する樹木の主成分にはセルロースの他にリグニンがある。したがって、これらの菌のもつリグニン関連物質の分解力についても無視することはできない。

今回は、ボタタケ属菌数種のタンニン酸および没食子酸酸化反応の有無・強弱、ならびにリグニン関連物質の分解力の有無について検定した結果を報告する。また、検定に用いたBavendamm 反応の測定法、および Sundman-Näse のリグニン関連物質分解能力の簡便な測定法に関して、これらの方法の有用性について考察を加えた。

1. 検定方法について

(1) Bavendamm 反応

Bavendamm 反応とは、1928年に W. Bavendamm⁴⁾ によって発表された、タンニン酸や没食子酸のようなフェノール類の酸化を、簡便に検定できる示色反応である。タンニン酸や没食子酸を麦芽寒天などの適当な培地に懸濁し、この培地上に菌をうえると、タンニン酸や没食子酸を酸化できる菌の場合には、菌のコロニーの下や周辺が栗色に着色する。酸化酵素の代表的なものとしては、チロシナーゼが知られている。

この反応は、従来、菌類のリグニン関連物質の分解能力を判定する簡便な方法として用いられてきた。しかし、Sundman & Näse⁵⁾ らの研究によれば、Bavendamm 反応陽性の菌は、リグニン関連物質 (Milled wood lignin, Indulin, リグノスルホン酸など) をおおむね分解するが、中には少数例ながら没食子酸に対する Bavendamm 反応が陽性でもリグニン関連物質を分解することのできない菌 (たとえば、*Pullularia pullulans*, *Fomes roseus*, *Coniophora cerebella* など) や、反対に没食子酸に対する Bavendamm 反応が陰性でもリグニン関連物質の分解が可能な菌 (たとえば、*Polyporus dichrous*) もあることが報告されている。従って、Bavendamm 反応だけでリグニン関連物質の分解能力の有無を判定することには無理がある。しかし、フェノール類の酸化や分解の機作の差異を簡便にスクリーニングする方法としては、Bavendamm 反応は、次に述べるような方法によるリグニン関連物質の分解力の有無・強弱の測定と併用すれば有用な測定法であると考えられる。実際に Bavendamm 反応を観察するにあたっては、フェノール類の酸化とは無関係に培地に茶色の色素を生じる菌があり、これを Bavendamm 反応陽性と見まちがえないように注意することも必要である。

(2) Sundman & Näse によるリグニン関連物質分解性の簡便な検定法

リグニン関連物質の分解性の測定は、普通は、それらの物質の分解によって生じる物質を定量する方法によっているが、その操作はかなり手間がかかる。そこで、Sundman と Näse は、もっと簡便なリグニン関連物質の分解力測定方法はないかどうかを探索した。その結果、フェノール系物質の含有量の少ない培地に各種ビタミン類を加え、これにリグニン関連物質を混入して菌を接種する方法を工夫した。この培地に菌を生育させ、塩化第2鉄とフェリシアン化カリウムの混合試薬をその培地に注ぐと、リグニン関連物質を分解する菌が生育した培地では、コロニーの下やコロニーの周囲の一定範囲の培地からフェノール系物質の特異な緑色—青色などの示色反応が消えて、比較的透明無色の分解帯ができる。この無色透明な分解帯の幅や透明度などによって、供試菌のリグニン関連物質の分解力を簡便に知ることができる。

2. 本研究に用いた検定方法の詳細

(1) Bavendamm テスト

培養基 : Davidson et al.⁶⁾ の方法に準じた。

培養基の組成は次のとおりである。

Difco malt extract (Bacto)	15 g
Difco agar purified	20 g
Tannic or Gallic acid	5 g
Distilled Water	1000ml

土居：核菌類のフェノール酸化酵素反応およびリグニン関連物質の分解反応について

なお、タンニン酸は、国産化学製の一級試薬を、没食子酸は、和光純薬工業製の一級試薬を用いた。

培養基の調製：蒸溜水（以下「水」という）850mlに麦芽エキス末と寒天を加えたものと、水150mlとをそれぞれ別の三角フラスコに入れて、121°Cで20分間滅菌した。次に、150mlの滅菌水がまだ熱いうちにタンニン酸または没食子酸を添加し、溶解させた。そして、両者を混合した後、それを約15mlずつ滅菌ペトリ皿に流し込み、平板培地とした。^{*)}

菌の接種：保存している各供試菌を白金線で極く少量とり出し、ペトリ皿中央部に接種した。

培養：25°C定温で6日間培養した。

酸化酵素反応の判定：培地に生じる栗色の酸化帯の色調・濃さと直径を観察測定した。

(2) Sundman & Näse によるリグニン関連物質分解力の測定方法

培養基：Sundman & Näse の方法に準じた。

培養基の組成は、次のとおりである。

Glucose	5 g
NH ₄ -tartrate	5 g
Difco malt extract (Bacto)	1 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0.01 g
NaCl	0.1 g
FeCl ₃	0.01 g
Vitamin solution**)	5 ml
Difco agar purified	20 g
Lignine or Ligninesulfonic acid sodium salt ...	0.25 g
Distilled water	1000 ml

本来は、Milled wood lignin や木材組織のままのリグニンを用いるべきであるが、今回は、予備実験として、東京化成工業製のアルカリリグニン（80%）およびリグニンスルホン酸ナトリウムを用いた。東京化成工業のリグニンおよびリグニンスルホン酸は、亜硫酸パルプ廃液から回収されたもので、パルプ原木はアカマツを主とする針葉樹であるとのことである。

培養基の調製：前記組成の試薬類すべてを水1000mlに混合、溶解させた。次に、121°Cで20分間滅菌した後、リグニン添加培養基の場合には、無菌的にホモジナイザーに1分間かけてリグニンを十分に分散させた。この培養基を泡を入れないように滅菌ペトリ皿に流し込んで平板培地とした。

リグニンスルホン酸ナトリウム添加培養基は、滅菌後そのまま滅菌ペトリ皿に流し込み凝固させた。ペトリ皿は直径約9cmの大きさのもので、1枚につき培養基約15mlを分注した。

菌の接種：保存している各供試菌を白金線で極く少量とりだし、ペトリ皿中央部に接種した。

培養：25°C定温で6日間培養した。

(注)

*) 最初から麦芽寒天にタンニン酸または没食子酸を混合して高圧滅菌をした場合には、わずかな温度や時間の違いで凝固し難くなり、平板培地にならないことがしばしばあった。殊に、没食子酸においてはその程度が著しく見られた。

***) Vitamin solution: thiamine 10mg, pyridoxine 10mg, calcium pantothenate 10mg, nicotinic acid 10mg, p-aminobenzoic acid 10mg, folic acid 2mg, vitamin B₁₂ 40μg, biotin 40μg, and distilled water 200ml.

リグニン関連物質分解度の判定：供試菌のコロニーが直径数 cm 程度からペトリ皿全面に広がる少し前程度まで生育した時に、メスでコロニー表面の菌叢を取り除き、試薬を加えて反応を調べた。

試薬は、塩化第2鉄($FeCl_3$) 1%溶液とフェリシアン化カリウム($K_3[Fe(CN)_6]$) 1%溶液とを使用直前に等容量混合し、菌の生育したペトリ皿に10 ml ずつ加えて培地の表面を浸した。反応は10分~30分後に明確になるが、数日後に試薬を加えた培地上で菌がさらに生育して、判定しやすい透明ゾーンをつくることもある。数時間から1日後には、リグニン関連物質の分解されていない部分の培地の色は、緑色または濃青色になる。

3. 供 試 菌 株

用いた菌株は、野外で子実体をつくっていたボタンタケ属菌の子のう胞子をマイクロマニプレーターで分離し、麦芽寒天培地を用いて培養した菌株で、下記の5株である。

D. 47 : *Hypocrea nigricans* (Imai) Doi

(三重県産), 分生子型は, 典型的な *Trichoderma* である。

D. 2010 : *Hypocrea* sp. (*H. centri-sterilis* Doi に近似)

(屋久島産), 分生子型は, *Gliocladium virens* に近い分生子梗をもつ *Trichoderma* である。

D. 2023 : *Hypocrea tawa* Dingley f. *tawa*

(屋久島産), 不完全型は, *Verticillium* 型の分生子梗と緑色の分生子をもつ *Trichoderma* である。

D. 2042 : *Hypocrea* sp. (*H. muroiana* に近似)

(屋久島産), 分子型は, やや不規則に曲った分生子柄をもつ緑色 *Trichoderma* である。

D. 2441 : *Hypocrea lutea* (Tode) Petch

(西表島産), 分生子型は, *Gliocladium deliquescens* である。

以上の菌株の反応の有無・強弱を比較するための基準菌株として、リグニン分解菌であり、かつ Bavendamm 反応陽性菌として知られているカワラタケ *Coriolus versicolor* (Fr.) Qué! (青島—Pa4a 株) を用いた。

4. 結 果

Bavendamm テストならびにリグニン関連物質分解力テストの結果を表1に示した。

Table 1. Results of Bavendamm test on tannic acid and gallic acid, and Sundman-Näse's test for lignin degradation.

Fungus	Bavendamm test		Sundman—Näse's test	
	tannic acid	gallic acid	alkaline lignine	ligninesulfonic acid sodium salt
D. 47	ng*	±	—	—
D. 2010	ng	±	—	—
D. 2023	ng	—	—	—
D. 2042	+++	+	—	—
D. 2441	++~++++	—	—	—
Aoshima-Pa4a	+	++	+	++

*Code : —=negative result +=positive result ±=questionable ng=no growth

5. 考 察

1) ポタンタケ属菌の Bavendamm 反応は、菌株により反応の有無および強さにかかなりの差がみられた。この差が種のレベルに相関したものであれば、Bavendamm 反応の有無・強弱は、*Trichoderma*属菌の分類に有用な形質であると考えられる。このような化学反応による *Trichoderma* 菌群の分類の従来の試みには、CS₂ ガスに対する耐性度や、光の分生子形成に対する効果の差などが検定されたことがあるが、⁷⁾ 今回用いた5菌株の結果をみるとそれらよりもっと検定しやすく、かつ、分類学的に有意である可能性が強い。今後多くの菌株についての資料を集積したい。

2) 今回検定した菌株に関する限り、ポタンタケ属は、Bavendamm 反応もリグニン関連物質分解反応も示さないか、あるいは Bavendamm 反応の強い菌株であってもリグニン関連物質に対しては全く分解反応を示さないかのどちらかであった。Bavendamm 反応では陽性の菌があっても、リグニン関連物質分解力は全ての種・菌株について陰性というパターンが、ポタンタケ菌群の性質である可能性が強いが、この点についても今後できるだけ多くの菌株について検定して確認する必要がある。

3) タンニン酸と没食子酸の酸化反応には、菌の種類による差異が認められた。すなわち、カワラタケの Bavendamm テストでは、タンニン酸培地において明確な反応がみられ、没食子酸培地ではさらに強い反応がみられた。一方、ポタンタケ菌群では、タンニン酸培地で極めて強い反応がみられたにもかかわらず、没食子酸培地では反応がみられないか、あるいは明確ではなかった。このような反応のパターンと分類群との相関関係についても今後の研究課題である。

4) 培地の種類による反応の差について

カワラタケの場合は、ツェベック・ドックス培地（日水製薬製）では、リグニン関連物質の分解帯が、Sundman-Näse の培地の分解帯よりも幅はせまいが非常に明確であった。反応がより明確に見られる培地の選定について、今後工夫の余地があると思われる。

なお、フェノール類含有量の多い培地では、リグニン関連物質の分解反応の観察は困難になることが考えられる。フェノール類含有量の少ない寒天・麦芽エキス末としては、Difco 社の製品が最も良かった。日水製薬の麦芽寒天培地もフェノール類の含有量はやや多いようであるが、リグニン関連物質の分解を示す無色透明の分解帯を見る目的にならさほど支障はないようである。

5) 今回の検定中に、ペトリ皿上の培地に *Aspergillus niger* および *Penicillium* spp. が混入生育した例が少数あった。*A. niger* の1株は、Bavendamm 反応は陽性、かつ Sundman-Näse の培地上では強いリグニン関連物質の分解反応を示した。また、*Penicillium* sp.-1 は、明確な Bavendamm 反応を示し、一方、*P. sp.-2* は、タンニン酸添加培地（白濁している）上の菌のコロニーの周辺に透明な分解帯を形成した。*P. sp.-2* はタンナーゼをもつと考えられる。かつ、*P. sp.-1* のつくった酸化帯に *P. sp.-2* のコロニーが生育して接近すると、栗色の酸化帯は透明化した。これらのことから、Bavendamm 反応を検定する培地を用いて、タンニン酸分解菌のスクリーニングも極めて簡便に行えることが予測された。この透明な分解帯が、タンニン酸分解を意味するかどうかを明確にするには、今後、この反応の有無や強さが、従来のタンニン酸分解力測定法の結果と一致するかどうかを確認する必要がある。

以上のように、Bavendamm テストや Sundman-Näse のテスト方法のようなペトリ皿上での物質分解性の検定法は、単に菌株の物質酸化能力や分解能力をスクリーニングするだけの目的のためには、大変簡単かつ有用で応用範囲も広いと思われる。

6) 今回のリグニン関連物質分解の測定には、東京化成工業製のアルカリリグニン(80%)およびリグニンスルホン酸ナトリウムを用いたが、今後は、特定樹種のいわゆる milled wood lignin (MWL) や十分に精製した Indulin やリグノスルホン酸などを用いて検定する必要がある。さらにまた、菌による木材組織中のリグニンの分解を簡便に測定する方法の考案も必要と思われる。

本研究にあたり、数々の助言を賜わり、またカワラタケなどの培養菌株を分譲戴きました農林省林業試験場保護部樹病科長 青島清雄博士 ならびに研究員小林正氏に厚くお礼申し上げます。

なお、本報告は、昭和51年度文部省科学研究費補助金(一般研究C, 課題番号154234)の筆者による分担研究の結果の一部である。

SUMMARY

The Bavendamm test and the simple plate test for direct visualization of lignin degradation proposed by Sundman and Näse are applied to five strains of *Hypocrea* (Ascomycetes). The results of these two tests to five strains of *Hypocrea* were compared with those of a strain of *Coriolus versicolor* which has been known to possess phenoloxidases and abilities of lignin degradation.

Two strains of *Hypocrea* showed strong Bavendamm reaction. But these strains did not show any degradations of alkaline lignin and lignosulphonate by the Sundman-Näse's testing method.

The other three strains showed neither Bavendamm reaction nor degradation of alkaline lignin and lignosulphonate.

The strain of *Coriolus versicolor* showed clear Bavendamm reaction to both tannic acid and gallic acid. The strain also showed clear degradations of alkaline lignin and lignosulphonate by the Sundman-Näse's testing method.

An application of both the Bavendamm test and Sundman-Näse's test is considered to be much convenient method for screening of fungi which possess phenoloxidases and abilities of lignin degradation. These tests are also considered to be useful for an identification of *Trichoderma* and its allied imperfect fungi.

文 献

- 1) 土居則子, 倉田宣威: ボタタケ菌群のセルラーゼについて(1), 東京家政大学研究紀要, 10, 27~36, (1970)
- 2) 土居祥兎, 土居則子: 菌類セルラーゼ諸形質の分類学的形質としての評価の試み, 国立科学博物館研究報告, 14(2), 273~297 (1971)
- 3) 土居則子, 山口順子, 倉田宣威: ボタタケ菌群のセルラーゼについて(2), 東京家政大学研究紀要, 12, 37~45 (1972)
- 4) Bavendamm, W.: Über das Vorkommen und den Nachweis von Oxydasen bei holzzerstörenden Pilzen. Zeitsch. für Pflanzenkrankh. 38. 257-276. (1928)
- 5) Sundman, V., & L. Näse.: A simple plate test for direct visualization of biological lignin degradation. Paperi Puu, 53 (2). 67-71. (1971)
- 6) Davidson, R. W., Campbell, W. A., and D. J. Blaisdell.: Differentiation of wood-decaying fungi by their reactions on gallic or tannic acid medium, J. Agr. Research, 57 (9), 683-695 (1938)
- 7) Webster, J.: Culture studies on *Hypocrea* and *Trichoderma* I. Comparison of perfect and imperfect states of *H. gelatinosa*, *H. rufa* and *Hypocrea* sp. 1., Trans. Brit. Mycol. Soc., 47, 75-96, (1964)