

Fomitella fraxinea 균사체로부터 Laccase의 최적생산 및 효소적 특성

박경미 · 박상신*

동국대학교 과학기술대학 생명공학과

Optimal Production and Characterization of Laccase from *Fomitella fraxinea* Mycelia. Park, Kyung Mi and Sang-Shin Park*. Department of Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea – The culture conditions were investigated to maximize the production of laccase from *Fomitella fraxinea* mycelia. Among the tested media, mushroom complete medium (MCM) showed the highest production of the enzyme. The optimum culture medium was 2% dextrose, 0.4% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% Na₂HPO₄·7H₂O, and 0.05% KCl as carbon, nitrogen, phosphorus, and inorganic salt sources respectively. SDS-PAGE followed by laccase activity staining using 2,6-dimethoxyphenol as the substrate was performed to identify the laccase activity under culture conditions studied. Zymogram analysis of the culture supernatant showed a laccase band with a molecular mass of 50 kDa. The enzyme production from *F. fraxinea* was reached to the highest level after the cultivation for 10 days at 25°C and initial pH 8. The enzyme activity of the culture supernatant was most active at 50°C and pH 5.

Key words: *Fomitella fraxinea*, laccase, optimal production

Laccase(EC 1.10.3.2 : p-diphenol : dioxygen oxidoreductase)는 중국산과 일본산 옻나무(*Rhus sp.*)의 라텍스(latex)가 공기 중에서 빠르게 경화되는 사실로부터 1883년에 최초로 발견되었으며, 비슷한 시기에 균류로부터 laccase가 발견되어진 후 10년 후에 분리정제 되어 laccase로 명명되었다[2]. Laccase는 L-ascorbate oxidase, ceruloplasmin 등과 같은 multi-copper oxidase로서 활성자리에 4개의 구리이온을 가지고 있으며, 산소를 이용하여 diphenol 및 diamine 등의 기질을 산화시켜 물을 생성하며[26], mono- 및 폴리페놀계 기질의 *ortho*- 및 *para*- hydroxyl group이나 방향족 아민으로부터 1개의 전자를 제거하여 depolymerization, repolymerization, demethylation, 또는 컷는 형성으로 더욱 진행할 수 있도록 자유라디칼을 형성시키는 수소원자의 제거반응을 촉매한다[3, 8]. 이와 같이 laccase는 다양한 기질에 대하여 촉매반응을 나타내므로 펄프산업에서 리그닌의 제거와 섬유소의 표백작업, 그리고 오염된 물과 토양의 원래 복귀 등의 여러 응용성에서 잠재적인 산업적 효소로서 관심을 갖고 있다 [20, 24].

최근 리그닌 제거공정의 연구로는 백색부후균(white-rot fungi)에서 분비되는 laccase, LiP (lignin peroxidase), MnP (manganese-dependent peroxidase) 등의 리그닌 분해효소들을 이용하는 환경친화적인 대체공정에 관한 연구들이 진행되고 있다. 리그닌 분해효소들은 균류의 종류에 따라 다르

게 분비되며 각각의 기능에 있어서도 차이를 나타낸다[32]. 이와 같이 리그닌은 풍부한 방향족 중합체로 구성되어 산에 의해서도 쉽게 분해되지 않으나 리그닌 분해효소들이 이를 분해한다는 점에 착안하여 laccase, LiP, MnP 등의 효소를 PAHs(다중고리 방향족 탄화수소류; polycyclic aromatic hydrocarbons) 등 여러 환경오염물질의 제거 및 감소에 응용하기 위한 연구가 진행되고 있으며, 이 중에서도 특히 균류의 laccase를 이용한 연구가 더욱 활발하게 진행되고 있다. 균류의 laccase를 이용한 연구로는 *Panus tigrinus* 및 *Coriolus versicolor*에 의한 2,4,6-trichlorophenol의 해당 산화물로의 transformation[13], *Trametes hirsuta*에 의한 alkenes의 산화[15], *Trametes villosa*에 의한 bisphenol A의 분해[6], *C. versicolor*에 의한 pentachlorophenol의 제거[28], *Trametes versicolor*에 의한 PAHs의 분해, *Pleurotus ostretus*에 의한 PAHs로 오염된 토양의 복원 등이 있다.

버섯은 국내외에서 식품 및 의약품으로 널리 애용되고 있는 가운데 지금까지 많은 연구에 의하여 다양한 종류의 버섯 자실체로부터 항암, 면역증강 활성, 혈압 상승 억제 및 항균물질 등의 생리활성 물질이 보고되어 왔으며[10, 11], 또한 protease를 포함한 다양한 종류의 효소에 대한 연구가 진행되어 왔다[16, 18, 21].

아카시재목버섯(*Fomitella fraxinea*)은 민주릅버섯목 구멍장이 버섯과에 속하는 담자균류로서 장수버섯이라고도 명명되며 오래 전부터 민간 약재로 사용되어 왔다. 지금까지 *F. fraxinea* 자실체로부터 steroid 계통의 항산화 화합물[19]을 분리 및 정제하고 구조를 분석하여 보고된 바 있으며, *F. fraxinea* 균사체로부터 혈전용해 효소를 생산하기 위한 최적

*Corresponding author

Tel: 82-54-770-2225, Fax: 82-54-770-2210

E-mail: sspark@dongguk.ac.kr

배양조건을 조사하고, 생산된 효소의 특성을 연구하여 보고 된 바 있다[12].

본 연구에서는 다양한 생리활성물질을 함유하는 약용버섯의 산업적 활용을 위한 기초연구로 *F. fraxinea* 균사체로부터 액체배양법을 이용하여 리그닌 분해효소, laccase를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였으며, 배양액으로부터 효소적 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 실험에서 사용한 아카시재목버섯의 균주는 농촌진흥청에서 분양 받은 ASI-17015 균주로서, 보관용 배지로는 potato dextrose agar(PDA)배지를 사용하여 사면배지 상에서 25°C에서 7일 동안 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하였다.

시험배지 및 균사배양

F. fraxinea 균사체로부터 laccase의 생산성을 비교하기 위한 배지로 *Coriolus versicolor* medium(CVM), Czapek Dox medium(CDM), *Lentinulla edodes* medium(LEM), mushroom complete medium(MCM), malt yeast glucose medium(MYGM) 및 potato dextrose medium(PDM)을 사용하였으며, 각 배지의 조성은 Table 1과 같다. *F. fraxinea*를 PDA 평판 배지 상에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 한천 배지 상의 균사를 5 mm cork borer로 punching 하여 얻은 균사 disk 5개씩을 균일하게 각각의 액체배지 100 ml에 접종하여 25°C에서 10일간 120 rpm으로 진탕 배양하

였다. 모든 배지는 121°C에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다. 탄소원, 질소원, 인산원 및 무기질원 등의 영양원에 따른 효소 생산성을 관찰하기 위하여 시험배지 중 가장 높은 효소 활성을 나타내는 MCM의 조성으로부터 해당 영양원을 제거하고 2% 탄소원, 0.4% 질소원과 0.05% 인산원 및 무기질원들을 각각 첨가하여 실험하였다. 효소 생산을 위한 최적 배양온도를 결정하기 위하여 항온기의 온도를 15°C~40°C까지 5°C 간격으로 조절하여 배양하였다.

Laccase의 활성측정

F. fraxinea 배양액을 8000 rpm에서 10분 동안 원심분리 한 후 상등액을 조효소액으로 사용하였으며, Laccase 활성은 100 mM 아세트산나트륨 완충용액(pH 5.0) 상에서 5 mM ABTS를 기질로 사용하여 효소와 반응시켰으며, ABTS의 산화에 의해 생성된 초록색의 산화물을 420 nm ($\epsilon=36,000 \text{ M}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$)에서 측정하였다[29].

Staib agar plate를 이용한 활성측정

Laccase의 활성은 Staib agar plate 상에서 brown color effect(BCE)로 확인하였다. 해바라기 씨 50 g을 분말화하여 1000 ml의 증류수에 넣고 30분간 끓여 여과시킨 후, glucose 1 g, KH_2PO_4 1 g, creatinine 1 g 및 agar 15 g을 첨가하여 110°C에서 20분간 멸균시킨 후 Petri dish에 가하여 실온에서 응고시켰다. 형성된 Staib agar plate 상에 *F. fraxinea* 균주를 접종하여 25°C에서 1~5일간 배양시킨 후 형성되는 갈색 환을 확인하였다[27].

Activity staining

배양액 중의 효소활성을 확인하기 위하여 조효소액을 12% SDS-PAGE 전기영동한 후 DMPO 활성염색법을 수행하였다. 전기영동 한 겔을 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 5.0)에 5분 동안 방치한 후 20 mM 인산나트륨 완충용액(pH 5.0)으로 조제한 2.5 mM DMP와 0.2 mM CuSO_4 용액과 37°C에서 10분 동안 반응시켜 효소활성을 나타내는 단백질 band를 확인하였다[25].

최적 pH와 최적 온도

균사체로부터 생산된 효소의 활성에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 0.1 M 아세트산나트륨 완충용액(pH 3.0~6.0), 인산나트륨 완충용액(pH 6.0~9.0), carbonate bicarbonate 완충용액(pH 9.0~10.0)을 사용하였으며, 각 완충용액 1.8 ml에 5 mM ABTS 100 μl 와 효소 100 μl 를 가하여 잘 혼합한 후 420 nm에서 초기 3분 동안의 흡광도의 변화를 측정하였다. 최적 온도를 조사하기 위하여 효소 액의 반응온도를 20°C에서 70°C까지 10°C 간격으로 변화시키며 활성도를 측정하였다.

Table 1. Composition of various media used for cultivation of *Fomitella fraxinea* mycelia.

Component	Media (g/100βg)					
	CVM ^a	CDM ^b	LEM ^c	MCM ^d	MYGM ^e	PDM ^f
Dextrose	2.0		2.0	2.0	0.4	2.0
Sucrose		3.0				
Starch			2.0			
Galactose						
Peptone	0.4			0.2		
Malt extract					1.0	
Yeast extract	0.6		0.6	0.2	0.4	
Potato						20.0
NaNO ₃		0.3				
KH ₂ PO ₄	0.046		0.046	0.05		
K ₂ HPO ₄	0.1		0.1			
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.05		0.05	0.05		
KCl		0.05				
FeSO ₄ ·7H ₂ O		0.001				

^aCVM (*Coriolus versicolor* medium), ^bCDM (Czapex Dox medium), ^cLEM (*Lentinulla edodes* medium), ^dMCM (mushroom complete medium), ^eMYGM (malt yeast glucose medium), ^fPDM (potato dextrose medium).

결과 및 고찰

배지의 영향

F. fraxinea 균사체로부터 laccase를 생산하기 위한 최적 배지조건을 확립하기 위하여 종류별 배지를 사용하여 균사체를 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 배지 중 MCM을 사용하여 배양하였을 때 다른 배지들에 비하여 laccase의 활성이 매우 우수함을 알 수 있었다.

탄소원의 영향

효소의 생산을 위한 탄소원의 효과를 조사하기 위하여 MCM에 2%의 각 종류별 탄소원을 첨가하여 배양한 결과, MCM 원 성분인 dextrose가 탄소원으로 첨가되었을 때 효소의 활성이 가장 우수하였다(Table 2). 또한 cellobiose를 첨가하였을 때도 효소의 활성이 우수하였으나, sucrose, cellulose 및 glycerol 등은 효소의 생산 능력을 상대적으로 감소시켰다. 이 결과는 백색부후 균으로부터 laccase를 생산하기 위한 탄소원 중 dextrose가 가장 우수한 효소생산력을 나타내는 것과 일치하였으며[5, 22], *T. versicolor*로부터 리그닌 분해효소를 생산하기 위한 탄소원으로 cellobiose를 첨가하였을 때 비교적 우수한 효소생산력을 나타내는 것과 유사하였다[14].

질소원의 영향

효소의 생산을 위한 질소원의 효과를 조사하기 위하여 MCM에 0.4%의 각 종류별 질소원을 첨가하여 배양한 결과를 Table 3에 나타내었다. 유기질소원 중 tryptone이 우수한 효소생산능력을 나타내었으며, 전체 질소원 중 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$

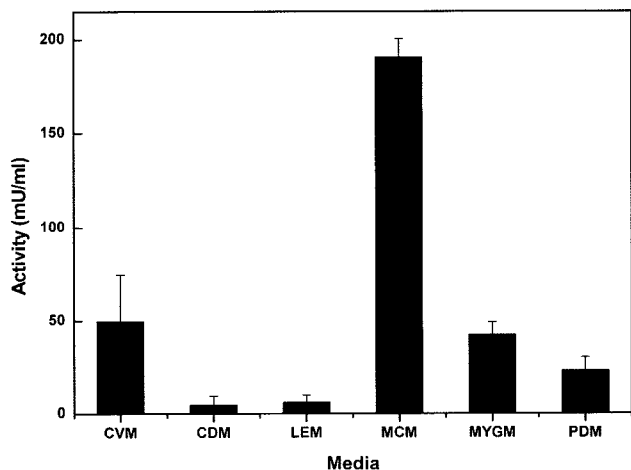


Fig. 1. Laccase activity of *F. fraxinea* cultivated in the various media. Cultivation was carried out at 25°C for 10 days. The laccase activity was assayed with culture supernatant. CVM (*Coriolus versicolor* medium), CDM (Czapex Dox medium), LEM (*Lentinula edodes* medium), MCM (mushroom complete medium), MYGM (malt yeast glucose medium), PDM (potato dextrose medium).

Table 2. Effect of carbon sources on the laccase production from *F. fraxinea* mycelia.

Carbon source (2%)	Activity (mU/ml)
MCM ^a	187
Control ^b	89
Cellobiose	166
Sucrose	11
Starch	0
Mannose	101
Galactose	74
Cellulose	29
Xylose	112
Maltose	50
Fructose	127
Lactose	63
Glycerol	24
Mannitol	42

^a Mushroom complete medium.

^b The MCM without carbon source.

Table 3. Effect of nitrogen sources on the laccase production from *F. fraxinea* mycelia.

Nitrogen source (0.4%)	Activity (mU/ml)
MCM ^a	187
Control ^b	0
NaNO_3	0
Ammonium tartrate	0
$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$	0
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	195
NH_4NO_3	0
NH_4Cl	0
Peptone	0
Malt extract	0
Tryptone	157
Yeast extract	123
Casamino acid	0

^a Mushroom complete medium.

^b The MCM without carbon source.

가 가장 높은 효소활성을 나타내었다. MCM 원 성분인 peptone과 yeast extract를 혼합하여 첨가하였을 때도 비교적 우수한 활성을 나타내었다. 그러나, NaNO_3 , malt extract 등의 질소원을 첨가하였을 때 효소활성은 나타나지 않았다. laccase는 질소가 충분한 상태에서 생산되는 특징을 가지고 있다[7]. 이는 Mikiashvili 등[14]이 *T. versicolor*로부터 리그닌 분해효소를 생산하기 위한 질소원으로 peptone이 가장 우수하다고 보고한 결과와 Vasconcelos 등[30]이 *Botryosphaeria sp.*로부터 laccase를 생산하기 위한 질소원 중 yeast extract가 가장 우수하다고 보고한 결과와는 상이하였다.

인산원 및 무기질원의 영향

효소의 생산을 위한 인산원과 무기질원의 효과를 조사하기 위하여 MCM에 0.05%의 각 종류별 인산원 및 무기질원을 첨가하여 배양한 결과를 Table 4에 나타내었다. 인산원 중 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 의 첨가가 효소의 생산성을 증가시켰으며, 무기질원의 경우 KCl이 효소의 생산을 가장 증가시켰다. 그러나 $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 은 효소의 활성을 완전히 억제하였다. 이 결과는 *Fomes sclerodermeus*[17] 및 *P. ostreatus* [22] 중의 laccase가 CuSO_4 에 의하여 생산량이 크게 증가된다는 결과와 상이하였다.

Laccase의 활성 확인

배양액 중의 효소의 활성을 확인하기 위하여 배양액 시료를

Table 4. Effect of phosphorus sources and inorganic salts on the laccase production from *F. fraxinea* mycelia.

Phosphorus source (0.05%)	Activity (mU/ml)
MCM ^a	187
Control ^b	178
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	175
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	190
KH_2PO_4	187
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	7
Inorganic source (0.05%)	
MCM ^a	187
Control ^c	6
NaCl	146
$\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	187
CaCl_2	205
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	0
KCl	281

^a Mushroom complete medium.

^b The MCM without phosphorus source.

^c The MCM without inorganic source.

SDS-PAGE 한 후 2,6-DMP를 기질로 하여 activity staining한 결과 laccase 활성을 나타내는 band가 45~66 kDa 사이에서 확인되었다(Fig. 2). 이는 Solano 등[25]이 *E. coli*로부터 laccase 활성을 확인한 결과와 유사하였다. 또한 Staib agar(*Guizotia abyssinica* creatinine agar plate) 상에서 균사체를 배양할 때 형성되는 갈색 환의 크기가 하루 배양 후 20 mm이었으며 5일 배양 후 55 mm를 나타냄으로써 *F. fraxinea* 중의 laccase의 활성이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다(Fig. 3).

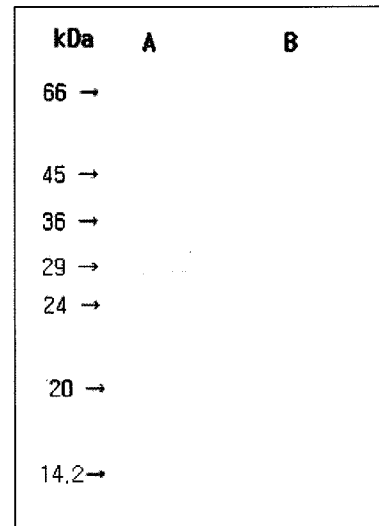


Fig. 2. Activity staining of laccase from *F. fraxinea* cultivated in MCM. (A): Molecular weight standard marker proteins; bovine serum albumin (66 kDa), ovalbumin (45 kDa), glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (36 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), trypsinogen (24 kDa), trypsin inhibitor (20 kDa), α -lactalbumin (14.2 kDa). (B): The activity staining of laccase from *F. fraxinea*. 12% SDS-PAGE was run under dissociating conditions in the absence of 2-mercaptoethanol and gel was stained at 37°C with a solution of 2.5 mM DMP in 20 mM sodium phosphate pH 5.0 and 0.2 mM of copper sulfate.

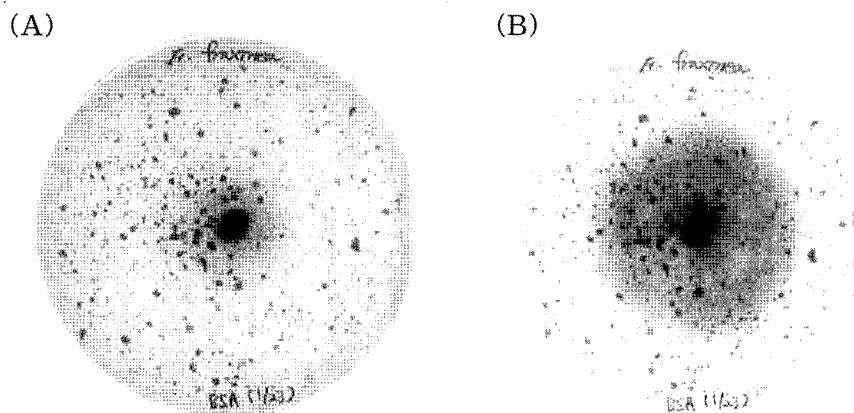


Fig. 3. Mycelia of *F. fraxinea* were cultivated on Staib agar (*Guizotia abyssinica* creatinine agar) plate. (A): after 1 day of cultivation (diameter 20 mm) brown color zone. (B): after 5 days of cultivation (diameter 55 mm) brown color zone.

배양시간에 따른 효소의 생산

이상의 실험결과로부터 *F. fraxinea* 균사체 중의 laccase를 생산하기 위하여 최적 조건인 2% dextrose, 0.4% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% Na₂HPO₄ · 7H₂O 및 0.05% KCl 를 포함하는 배지를 이용하여 *F. fraxinea* 균사체를 시간별로 배양한 결과는 Fig. 4 와 같다. 배양 7일째부터 효소의 활성이 증가하기 시작하여 배양 10일째 가장 높았으며, 그 이후에는 점차 감소하였다. 이는 *Monotospora sp.* 중의 laccase가 8일 배양 후 최대의 효소활성을 보인 결과[31]와 유사하였다. de Souza 등[4]이 보고한 *Pleurotus pulmonarius* 중의 laccase가 120시간 배양 후 효소의 활성이 가장 크다는 결과와 비교할 때 *F. fraxinea* 균사체로부터 laccase를 생산하기 위한 배양시간이 비교적 길다는 것을 알 수 있었다. 한편 Arora 등[1]은 *Phlebia floridensis* 중의 laccase 활성이 20일 배양 후에, 그리고 Hou 등[9]은 *P. ostreatus* 중의 효소활성이 14일 배양 후에 가장 우수하다고 보고한 바 있다. 이와 같이 다양한 버섯 균사체로부터 laccase 효소활성을 얻기 위한 배양기간은 7일 내지 14일 정도의 시간이 소요되는 것으로 보아 본 효소의 생산을 위한 배양기간 역시 이 범주에 속하는 것으로 사료된다.

배양온도 및 pH의 영향

Laccase의 생산을 위한 최적 배양기간인 10일 동안 배양할 때 효소의 생산을 위한 최적 배양온도를 조사한 결과를 Fig. 5에 나타내었다. *F. fraxinea* 균사체를 25°C, 초기 pH 8.0에서 10일 동안 배양하였을 때 효소의 활성이 가장 증가함을 알 수 있었다. 이 결과는 *Monotospora sp.*를 30°C, pH 8.5에서 배양하였을 때 효소활성이 가장 우수하다는 Wang 등[31]의 결과와 유사하였다.

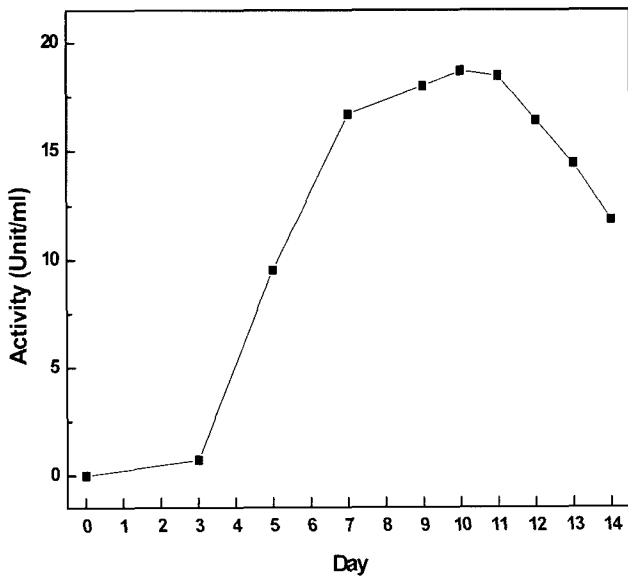


Fig. 4. Time course of laccase production from *F. fraxinea* mycelia. Cultivation was carried out at 25°C for 14 days in the MCM. Laccase activity was assayed with culture extract.

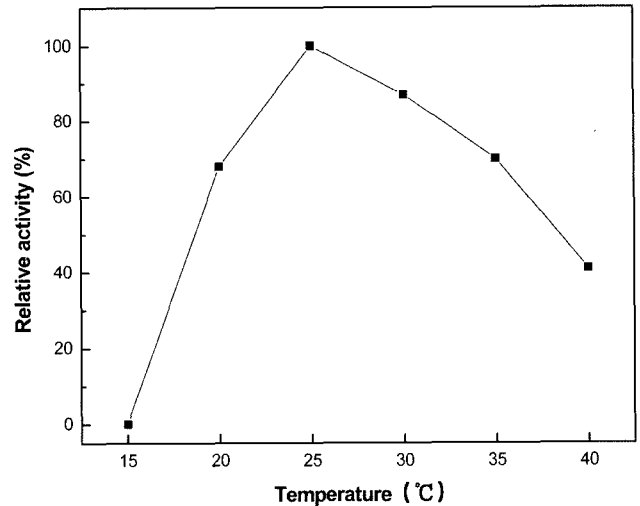


Fig. 5. Effect of temperature on the laccase production from *F. fraxinea* mycelia. Cultivation was carried out for 10 days in the MCM. Laccase activity was assayed with culture extract.

효소 활성의 최적 pH와 최적 온도

균사체 배양액 중의 효소활성을 위한 pH 및 온도의 영향은 Fig. 6 및 7과 같다. 효소의 활성은 pH 5.0에서 최대 활성을 나타내었으며, pH 8.0 이후로는 효소의 활성도가 60% 이하로 감소하였으며 pH 4.0~6.0 사이에서 비교적 높은 효소 활성을 나타내었으며, 50°C에서 각각 최고의 활성도를 나타내었다. 이 결과는 Xiao 등[33]이 보고한 *Trametes sp.* strain AH28-2로부터 분리정제한 laccase의 최적 pH 4.5와는 유사하였으며, *Cyathus bulleri*로부터 분리정제한 laccase가 기질 ABTS에 대해 pH 3.5~4.0에서 최고의 효소

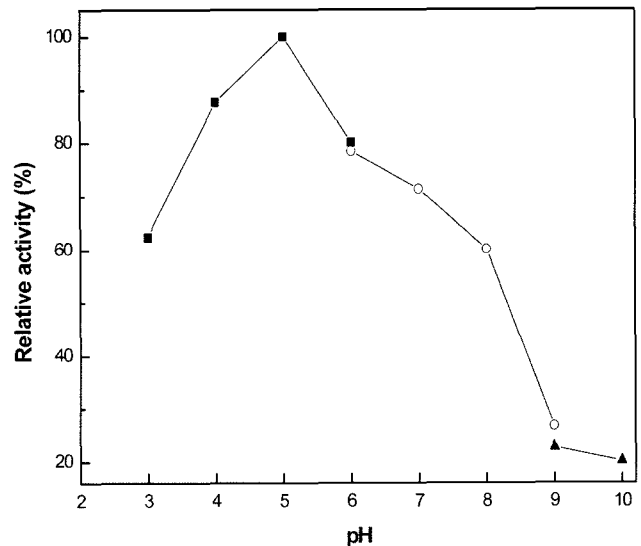


Fig. 6. Effect of pH on the activity of laccase from *F. fraxinea*. The enzyme activity was assayed in the pH range 3~10 (-■-; 0.1 M sodium acetate buffer for pH 3~6, -○-; 0.1 M sodium phosphate buffer for pH 6~9, and -▲-; 0.1 M carbonate bicarbonate buffer for pH 9~10) at 25°C.

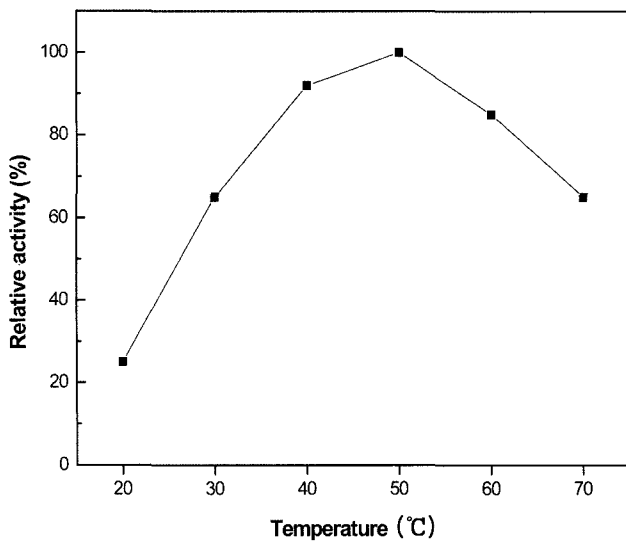


Fig. 7. Effect of temperature on the activity of laccase from *F. fraxinea*. The enzyme activity was assayed at various temperatures of 20~70°C and pH 5.0 in 0.1 M sodium acetate buffer.

활성을 보인다는 Salony 등[23]의 결과와는 상이함을 알 수 있었다. 한편, *Trametes sp.* strain AH28-2로부터 분리정제한 laccase의 최적 온도는 70°C, *Cyathus bulleri*로부터 분리정제한 laccase의 최적 온도가 30°C로써 본 효소의 특성과 상이함을 나타내었다. 이상의 결과를 토대로 배양액으로부터 효소를 분리 및 정제하여 생화학적 특성에 관한 연구가 진행되어야 할 것으로 판단된다.

요 약

장수버섯(*Fomitella fraxinea*)의 균사체 배양액으로부터 laccase를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였다. 복합 배지 중에서 MCM이 laccase의 생산에 가장 우수하였으며, laccase를 생산하기 위한 최적 배지조건은 탄소원, 질소원, 인산원 및 무기질원으로 각각 2% dextrose, 0.4% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% Na₂HPO₄ · 7H₂O 및 0.05% KCl의 첨가에 의하여 효소의 생산이 가장 높았다. 따라서 *F. fraxinea*로부터 laccase를 생산하기 위한 최적 배지조건은 2% dextrose, 0.4% (NH₄)₂HPO₄, 0.05% Na₂HPO₄ · 7H₂O 및 0.05% KCl 이다. 이상의 배지를 사용하여 배양온도 25°C, 초기 pH 8.0에서 10일 동안 배양하였을 때 효소의 생산이 가장 증가함을 알 수 있었다. Staib agar plate 상에서 장수버섯(*Fomitella fraxinea*) 균사체의 laccase활성여부를 확인 할 수 있었으며 배양액 중의 효소 활성의 최적 pH와 온도는 pH 5.0 과 50°C 이었다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 논문게재연구비 지원에 의하여 수

행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Arora, D. S. and P. K. Gill. 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technol.* **73**: 283-285.
- Call, H. P. and I. Mucke. 1997. History, overview and applications of mediated lignolytic systems, especially laccase-mediator-systems (Lignozymprocess). *J. Biotechnol.* **53**: 163-202.
- Das, N., S. Sengupta, and M. Mukhrjee. 1997. Importance of laccase in vegetative growth of *Pleurotus florida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 4120-4122.
- de Souza, C. G. M., G. K. Tychanowicz, D. F. Souza, and R. M. Peralta. 2004. Production of laccase isoforms by *Pleurotus pulmonarius* in response to presence of phenolic and aromatic compounds. *J. Basic Microbiol.* **44**: 129-136.
- Dong, J. L., Y. W. Zhang, R. H. Zhang, W. Z. Huang, and Y. Z. Zhang. 2005. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *J. Basic Microbiol.* **45**: 190-198.
- Fukuda, T., H. Uchida, Y. Takashima, T. Uwajima, T. Kawabata, and M. Suzuki. 2001. Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 704-706.
- Garzillo, A. M. V., and M. C. Colao. 1998. Laccase from the white rot fungus *Trametes trogii*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **49**: 545-551.
- Heinzkill, M. L. Bech, T. Halkiler, P. Schneider, and T. Anke. 1998. Characterization of laccases and peroxidases from wood-rotting fungi (family *Coprinaceae*). *Appl. Environ. Microbiol.* **64**: 1601-1606.
- Hou, H., J. Zhou, J. Wang, C. Dua, and B. Yan. 2004. Enhancement of laccase production by *Pleurotus ostreatus* and its use for the decolorization of anthraquinone dye. *Process Biochem.* **39**: 1415-1419.
- Kweon, M. H., H. Jang, W. J. Lim, H. I. Chang, C. W. Kim, H. C. Yang, H. J. Hwang, and H. C. Sung. 1999. Anticomplementary properties of polysaccharides isolated from fruit bodies of mushroom *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 450-456.
- Lee, J. H., S. M. Cho, H. M. Kim, N. D. Hong, and I. D. Yoo. 1997. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 52-55.
- Lee, J. S., H. S. Baik, and S. S. Park. 2006. Purification and Characterization of two novel fibrinolytic proteases from mushroom, *Fomitella fraxinea*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **16**: 262-271.
- Leontievsky, A. A., N. M. Myasoedova, B. P. Baskunov, C. S. Evans, and L. A. Golovleva. 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white-rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation* **11**: 331-340.

14. Mikiashvili, N., V. Elisashvili, S. Wasser, and E. Nevo. 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Lett.* **27**: 955-959.
15. Niku-Paavola, M. -L., and L. Viikari. 2000. Enzymatic oxidation of alkenes. *J. mol. Catal., B Enzym.* **10**: 435-444.
16. Nonaka, T., H. Ishikawa, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, and N. Dohmae. 1995. Characterization of a thermostable lysine-specific metallopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Grifola frondosa*. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**: 1014-1020.
17. Papinutti, V. L. and F. Forchiassin. 2003. Optimization of manganese peroxidase and laccase production in the South American fungus *Fomes sclerodermeus (Lev.) Cke.* *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **30**: 536-541.
18. Park, S. S. and S. M. Hwang. 1999. Purification and characterization of a iron-containing superoxide dismutase from *Lentinus edodes*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 854-860.
19. Park, S. S., J. S. Lee, K. G. Bae, K. H. Yu, H. C. Han, and T. J. Min. 2001. Antioxidative activity and structural Analysis of the steroid compound from *Fomitella fraxinea*. *Kor. J. Mycol.* **29**: 67-71.
20. Perez, J., J. Martinez, and T. de la Rubia. 1996. Purification and partial characterization of a laccase from the white rot fungus *Phanerochaete favido-alba*. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**: 4263-4267.
21. Perry, C. R., M. Smith, C. H. Britnell, D. A. Wood, and C. F. Thurston. 1993. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1209-1218.
22. Prasad, K. K., S. V. Mohan, Y. V. Bhaskar, S. V. Ramanaiah, V. L. Babu, and P. N. Sarma. 1804. Laccase production using *Pleurotus ostreatus* immobilized on PUF cubes in batch and packed bed reactors: Influence of culture conditions. *J. Microbiol.* **43**: 301-307.
23. Salony, S. Mishra, and V. S. Bisaria. 2006. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolourization of recalcitrant textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 646-653.
24. Solano, F., E. Garcia, D. Perez, and A. Schez-Amat. 1997. Isolation and characterization of strain MMB-1 (CECT 4803), a novel melanogenic marine bacterium. *Appl. Environ. Microbiol.* **63**: 3499-3506.
25. Solano, F., P. Lucas-Elio, D. Lopez-Serrano, E. Ferandez, and A. Sanchez. 2001. Dimethoxyphenol oxidase activity of different microbial blue multicopper proteins. *FEMS Microbiol.* **204**: 175-181.
26. Solomon, E. I., U. M. Sundaram, and T. E. Machonkin. 1996. Multicopper oxidase and oxygenases. *Chem. Rev.* **96**: 2563-2605.
27. Staib, F., M. Seibold, E. Antweiler, B. Frohlich, S. Weber, and A. Blisse. 1987. The brown colour effect (BCE) of *Cryptococcus neoformans* in the diagnosis, control and epidemiology of *C. neoformans* in AIDS Patients. *Zentralbl. Bakteriol. Mikrobiol. Hyg. [A]* **266**: 167-177.
28. Ullah, M. A., C. T. Bedford, and C. S. Evans. 2000. Reactions of pentachlorophenol with laccase from *Coriolor Versicolor*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **53**: 230-234.
29. Ullrich, R., M. Huong Le, N. L. Dung, and M. Hofrichter. 2005. Laccase from the medicinal mushroom *Agaricus blazei*: production, purification and characterization. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **67**: 357-363.
30. Vasconcelos, A. F. D., A. M. Barbosa, R. F. H. Dekker, I. S. Scarmínio, and M. I. Rezende. 2000. Optimizaton of laccase production by *Botryosphaeria sp.* in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochem.* **35**: 1131-1138.
31. Wang, J. W., J. H. Wu, W. Y. Huang, and R. X. Tan. 2005. Laccase production by *Monotospora sp.*, an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Bioresource Technol.* **97**: 786-789.
32. Wolf, S. L. 1993. *Molecular and Cellular Biology*, Wandsworth, Inc., California. pp. 287-292.
33. Xiao, Y. Z., X. M. Tu, J. Wang, M. Zhang, Q. Cheng, W. Y. Zeng, and Y. Y. Shi. 2003. Purification, molecular characterization and reactivity with aromatic compounds of a laccase from basidiomycete *Trametes sp.* strain AH28-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 700-707.

(Received July 26, 2006/Accepted Sep. 12, 2006)