

Fomitopsis pinicola 균사체로부터 Laccase의 최적생산조건

박나오미 · 박상신*

동국대학교 과학기술대학 생명공학과

Optimal Conditions for the Laccase Production from *Fomitopsis pinicola* Mycelia. Park, Naomi and Sang-Shin Park*. Department of Biotechnology, Dongguk University, Gyeongju 780-714, Korea – The culture conditions to maximize the production of laccase (EC 1.10.3.2) from *Fomitopsis pinicola* mycelia were investigated. Among the tested media for the enzyme production, mushroom complete medium (MCM ; 2% dextrose, 0.2% peptone, 0.2% yeast extract, 0.05% KH₂PO₄, and 0.05% MgSO₄·7H₂O) showed the highest activity of the enzyme. To optimize the culture condition for the laccase activity, influence of various carbon and nitrogen sources was investigated in MCM. Among various carbon and nitrogen sources, 2% glucose and 0.4% peptone showed the highest production of the enzyme, respectively. For the phosphorus and inorganic source, 0.05% NaH₂PO₄ and 0.05% CaCl₂ were best for the enzyme activity. The enzyme production was reached to highest level after the cultivation for 8 days at 25°C. Native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) followed by the laccase activity staining using 2, 2'-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid) (ABTS) as the substrate was performed to identify the laccase under culture conditions studied. Zymogram analysis of the culture supernatant showed a laccase band with molecular mass of 52 kDa. The optimum pH and temperature for the enzyme activity were 80°C and pH 3.0.

Key words : *Fomitopsis pinicola*, laccase, culture condition

서 론

Laccase(benzenediol : oxygen oxidoreductase)는 multi-copper blue oxidase의 일종으로 고등식물, 곤충, 박테리아 등에서 발견되었으나, 대부분의 laccase는 균류에서 연구되어 왔다[32]. Laccase는 목재의 주성분인 것으로 알려진 리그닌의 생분해 반응을 촉매 하는 효소이다. 리그닌은 phenylpropanoid 단위로 구성된 방향족 이형중합체로서 목재조각을 견고하게 하고 미생물의 공격으로부터 목재를 보호하는 역할을 하며[12], laccase는 이와 같은 리그닌을 탈중합화하고 무기질화한다.

Laccase와 같이 리그닌과 인공화합물을 분해하는데 관여하는 효소로는 manganese peroxidase(MnP: E.C 1.11.1.13)와 lignin peroxidase(LiP: E.C 1.11.1.14) 등이 있다. 그 중에서 리그닌 분해를 위한 LiP와 MnP의 역할이 주로 연구되었으며, 상대적으로 laccase에 대한 연구는 최근에 급속하게 진행되어 왔다[4, 13, 23, 30]. 그러나 리그닌을 분해하는 균주의 대부분이 laccase를 생산하고 MnP와 LiP에 비해 세포 밖으로 분비하는 양이 비교적 많으며[3], 이러한 균주로부터 laccase가 생산되지 않을 경우 리그닌 분해능이 상실된다는

보고 등을 볼 때[1] laccase가 리그닌 생분해에 결정적인 역할을 할 것이라고 추정되고 있다.

일반적으로 laccase는 분자상의 산소를 전자수용체로 이용하는 phenoloxidase로 작용하여 mono- 및 폴리페놀성 기질의 ortho- 및 para-hydroxyl group이나 방향족 아민을 직접적으로 산화하며[10], 산화 환원 매개체로서 작용하는 인공 기질이나 대사산물이 존재할 경우 비페놀성 리그닌 단위뿐만 아니라 몇몇 방향족 인공화합물과 지방족 인공화합물을 분해하는 것으로 보고되어 있다[8]. 다양한 기질에 대하여 촉매반응을 나타내는 특성으로 인해 laccase는 광범위한 산업분야에서 사용되며, 특히 오염된 수질 및 토양환경을 재생, 복원하는 bioremediation 산업과 리그닌 제거, 섬유소 표백 등의 펄프산업 등에서 연구가치가 매우 높다[11, 25, 31].

버섯은 우수한 맛과 독특한 향을 지니고 있어 국내외에서 즐겨 찾는 건강식품으로 식품적 가치와 더불어 항암, 면역증강, 혈압 상승 억제 및 항균 등의 약리적 효능이 우수함이 밝혀져 있으며, 자연생태계의 물질순환과정에서 생성되는 각종 부산물을 분해하는 기능이 있어 산업적으로도 중요한 역할을 수행 가능하여 버섯이 생산하는 다양한 종류의 효소에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다[15, 19, 20, 24].

민주름버섯목 구멍장이 버섯과에 속하는 담자균류인 소나무잔나비버섯(*Fomitopsis pinicola*)은 항균, 항암, 혈당강하, 면역증강 등에 효과가 있는 것으로 알려져 있으며[14, 16], DDT 등의 살충제를 분해하고 셀룰로오스, 리그닌을 분해하

*Corresponding author

Tel: 82-54-770-2225, Fax: 82-54-770-2287

E-mail: sspark@dongguk.ac.kr

는 것으로 보고된 바 있다[9, 26, 27, 36].

본 연구에서는 다양한 생리활성물질을 함유하는 버섯의 산업적 활용을 위한 기초연구로 *F. pinicola* 균사체로부터 액체배양법을 이용하여 laccase를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였으며 배양액으로부터 효소적 특성을 조사하였다.

재료 및 방법

사용균주

본 연구에서 사용된 소나무잔나비버섯의 균주(MKACC 54347)는 한국농생명과학연구정보센터에서 분양받았으며, potato dextrose agar(PDA, Difco, Lab.) 배지에 접종하여 25°C 상에서 7일 동안 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하였으며 약 1개월마다 계대배양하였다.

시험배지 및 균사배양

F. pinicola 균사체로부터 laccase의 생산성 비교를 위해 *Coriolus versicolor* medium(CVM), *Czapex Dox* medium(CDM), *Lentinus edodes* medium(LEM), mushroom complete medium(MCM), malt yeast glucose medium(MYGM), potato dextrose medium(PDM), yeast malt extract medium(YM), laccase production medium(LPM) 및 YpSs medium(YSM)을 사용하였으며, 각 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다. *F. pinicola*를 PDA 평판배지 상에 접종하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 한천배지 상의 균사를 직경 5 mm의 cork borer로 agar plug를 만들어 각각의 액체배지 100 mL

에 5개씩 접종하여 25°C에서 9일간 80 rpm으로 진탕배양 하였다. 탄소원, 질소원, 인산원 및 무기질원 등의 영양원에 따른 효소 생산성 관찰을 위하여 복합배지 중 가장 높은 효소 활성을 나타내는 MCM의 조성으로부터 해당 영양원을 제거하고 2% 탄소원, 0.4% 질소원, 0.05% 인산원 및 무기질원을 각각 첨가하여 실험하였다. 실험에 사용한 모든 배지는 121°C에서 15분 동안 멸균하여 사용하였다.

효소 활성 측정

Laccase의 효소활성은 Ullrich 등[33]의 방법을 인용하여 측정하였다. Laccase의 활성 측정을 위한 조효소액으로 *F. pinicola*의 배양액을 8000 rpm에서 20분간 원심분리한 상등액을 사용하였으며, laccase 활성은 2 mM ABTS를 기질로 사용하여 100 mM 아세트산나트륨 완충용액(pH 3.0) 상에서 효소와 반응시켜 생성되는 양이온 라디칼을 420 nm($\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1}\text{cm}^{-1}$)에서 초기 3분 동안 측정하였다. 효소활성의 단위는 분당 1 μmole 의 기질을 산화시키는 효소의 양을 1 unit(U)로 정의하였다.

Activity staining

배양액 중의 효소활성을 확인하기 위하여 10% native PAGE에 의한 ABTS 활성염색법을 수행하였다. 전기영동 한 10% 겔을 0.5 M 구연산나트륨 완충용액(pH 3.0)에 10분 동안 방치 한 후 동일한 완충용액으로 제조한 2 mM ABTS 용액과 상온에서 20분 동안 반응시켜 효소 활성을 나타내는 띠를 확인하였다[6].

Table 1. Composition of various media used for cultivation of *Fomitopsis pinicola* mycelia.

Component	Media (g/100 mL)								
	CVM ^a	CDM ^b	LEM ^c	MCM ^d	MYGM ^e	PDM ^f	YM ^g	^h LPM	ⁱ YSM
Dextrose	2.0		2.0	2.0	0.4	2.0	1	1	2
Sucrose		0.3							
Starch			2.0						
Peptone	0.4			0.2			0.5		0.5
Malt extract					1.0		0.3		
Yeast extract	0.6		0.6	0.2	0.4		0.3	0.5	0.2
Potato						20.0			
NaNO ₃		0.3							
KH ₂ PO ₄	0.046		0.046	0.05				0.2	0.1
K ₂ HPO ₄	0.1	0.1	0.1						
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	0.05	0.05	0.05				0.05	0.05
KCl		0.05						0.05	
CaCl ₂								0.01	
FeSO ₄ · 7H ₂ O		0.001							
Urea								0.5	

^aCVM (*Coriolus versicolor* medium), ^bCDM(*Czapex Dox* medium), ^cLEM (*Lentinus edodes* medium), ^dMCM (mushroom complete medium), ^eMYGM (malt yeast glucose medium), ^fPDM (potato dextrose medium), ^gYM (yeast malt extract medium), ^hLPM (laccase production medium), ⁱYSM (YpSs medium)

최적 pH와 최적 온도

효소활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해 0.1 M 글리신 완충용액(pH 1.5-3.0), 0.1 M 구연산나트륨 완충용액(pH 3.0-5.0), 0.1 M 인산나트륨 완충용액(pH 5.0-8.0)을 사용하여 효소활성을 측정하였다. 효소활성에 대한 온도의 영향은 효소액의 반응온도를 40°C에서 90°C까지 5°C 간격으로 변화시키며 활성도를 측정하였다.

결과 및 고찰

배지의 영향

F. pinicola 균사체로부터 laccase를 생산하기 위하여 여러 종류의 합성배지를 사용하여 균사를 배양한 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 실험에 사용된 합성배지 중 MCM을 사용하여 25°C에서 8일 동안 배양하였을 때, 114 mU/mL로 다른 배지에 비해 활성이 가장 우수함을 알 수 있었다. 이 결과는 Park 등[22]이 보고한 *F. fraxinea* 중의 laccase가 MCM 배지에서 최대의 활성을 나타낸 결과와 일치하였다.

탄소원의 영향

다양한 종류의 탄소원이 *F. pinicola* laccase의 생산에 미치는 영향을 조사하기 위하여 복합배지 중 최대 활성을 나타낸 MCM으로부터 dextrose를 제거한 후 각각의 2% 탄소원을 첨가한 배지에 버섯 균사체를 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 MCM의 원 조성인 dextrose가 탄소원으로 첨가되었을 때 다른 탄소원에 비하여 효소활성이 가장 높

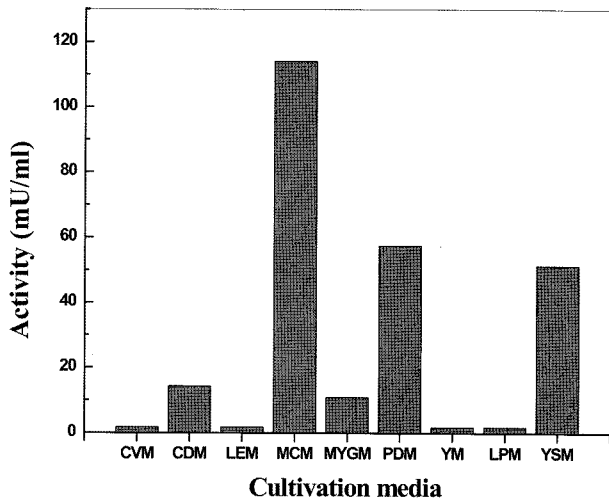


Fig. 1. Laccase activity of *F. pinicola* cultivated in the various media. Cultivation was carried out at 25°C for 8 days. The laccase activity was assayed with culture supernatant. CVM (*Coriolus versicolor* medium), CDM (*Czapex Dox* medium), LEM (*Lentinus edodes* medium), MCM (mushroom complete medium), MYGM (malt yeast glucose medium), PDM (potato dextrose medium), YM (yeast malt extract medium), LPM (laccase production medium), YSM (YpSs medium).

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

Carbon source (2%)	Activity (mU/mL)
Control ^a	0.0
MCM ^b	114.0
Fructose	46.5
Galactose	11.3
Mannose	40.3
Xylose	72.3
Maltose	1.2
Sucrose	42.1
Lactose	74.1
Cellobiose	10.1
Starch	37.3
Cellulose	0.0
Mannitol	9.0
Glycerol	3.5

^a The MCM without carbon source

^b Mushroom complete medium.

은 것으로 확인되었다(Table 2). 이 결과는 담자균류로부터 laccase를 생산하기 위한 탄소원중 glucose를 이용한다는 보고와 일치함을 알 수 있었다[7, 17, 21].

질소원의 영향

각 종류별 질소원이 *F. pinicola*의 laccase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 MCM의 질소원을 제거한 후 각 종류의 질소원을 0.4% 농도로 조정한 배지에 균사체를 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 peptone이 질소원으로 첨가되었을 때 효소활성이 가장 높은 것으로 확인되었다(Table 3). MCM의 원 성분인 혼합질소원(0.2% peptone과 0.2% yeast extract)을 첨가하였을 때와 0.4% yeast를 질소원으로 첨가하였을 때 효소활성이 비교적 우수하였으나, 기

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

Nitrogen source (0.4%)	Activity (mU/mL)
Control ^a	0.0
MCM ^b	114.0
Sodium nitrate	0.8
Ammonium tartrate	0.4
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.0
(NH ₄) ₂ HPO ₄	0.8
(NH ₄) ₂ NO ₃	2.1
(NH ₄) ₂ Cl	0.0
Peptone	162.2
Malt extract	2.1
Tryptone	49.4
Yeast extract	71.9
Casamino acid	0.0

^a The MCM without nitrogen source

^b Mushroom complete medium.

타 다른 질소원을 첨가하였을 때 효소활성이 나타나지 않았다. 이는 Mikiashvili 등[17]이 *T. versicolor*로부터 리그닌 분해효소 생산을 위한 질소원으로 peptone이 가장 우수하다고 보고한 결과와 일치하였다. 그러나 *F. fraxinea*로부터 laccase[22]를 생산하기 위한 질소원 중 $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ 가 가장 우수하다고 보고한 결과와는 상치함을 알 수 있었다.

인산원 및 무기질원의 영향

각 종류별 인산원 및 무기질원이 *F. pinicola*의 laccase 생산에 미치는 영향을 조사하기 위해 MCM의 인산원 및 무기질원을 각각 제거한 후 각 종류별 인산원과 무기질원을 0.05% 농도로 조정된 배지에 균사체를 배양하여 효소활성을 측정하는 결과를 Table 4에 나타내었다. 인산원 중 $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ 가 첨가되었을 때 효소활성이 가장 우수함을 확인하였으며, 이 결과는 *F. fraxinea*의 laccase[22]가 $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 에 의하여 생산량이 증가한다는 결과와 상이하였다. 무기질원의 경우 CaCl_2 가 첨가되었을 때 효소활성이 가장 우수함을 알 수 있었다.

Activity staining

F. pinicola 배양액 중의 효소 활성을 확인하기 위하여 Native-PAGE 수행 후 기질인 ABTS로 activity staining 한 결과 laccase 활성을 나타내는 band가 43~55 kDa 사이에서 확인되었다(Fig. 2). 이 결과는 *F. fraxinea* 중의 laccase[22] 및 Cambria 등[5]이 보고한 laccase와 유사하였으나, Yoon 등[36]이 보고한 *F. pinicola* 중의 laccase 분자량이 32 kDa 인 결과와는 상이하였다.

배양시간에 따른 효소 생산

이상의 실험결과에 따라 *F. pinicola*로부터 laccase를 생산

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

Phosphorus source (0.05%)	Activity (mU/mL)
MCM ^a	114.0
Control ^b	54.5
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$	135
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$	43.3
K_2HPO_4	94.8
$(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$	51.6
Inorganic source (0.05%)	
MCM ^a	114.0
Control ^c	100.2
NaCl	88.6
CaCl_2	172.4
$\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$	8.1
KCl	122.9

^a Mushroom complete medium

^b The MCM without phosphorus source

^c The MCM without inorganic source.

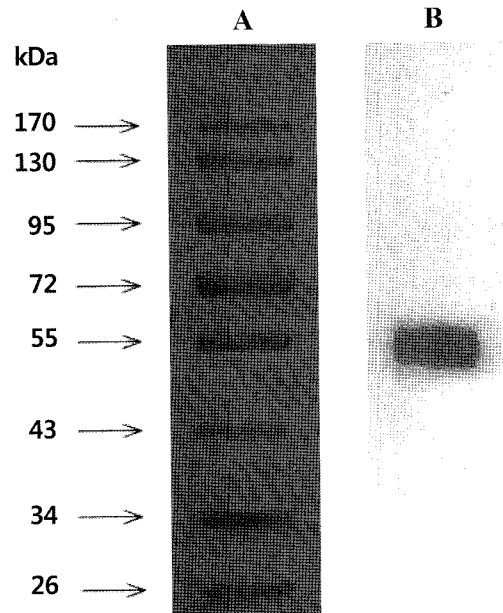


Fig. 2. Zymogram analysis of laccase *F. pinicola*. (A); Molecular weight marker by SDS-PAGE. (B) The activity staining of laccase from *F. pinicola* using 10% PAGE was run under non-denaturing conditions in the absence of 2-mercaptoethanol and stained at 37°C with a solution of 2 mM ABTS in 0.5 M citrate buffer, pH 3.0.

하기 위한 최적배지 조건을 2% glucose, 0.4% peptone, 0.05% $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$, 0.05% CaCl_2 로 결정하여 이를 포함하는 배지에 균사체를 시간 별로 배양한 결과, 배양 7일째 효소활성이 증가하여 배양 8 일째 효소활성이 200 mU/mL로서 가장 우수한 것으로 나타났으며, 이후에는 효소활성이 급격히 감소하였다(Fig. 3). 균사체를 MCM에서 배양했을 때 효소활성이 114 mU/mL인 결과(Fig. 1)와 비교할 때, 최적배

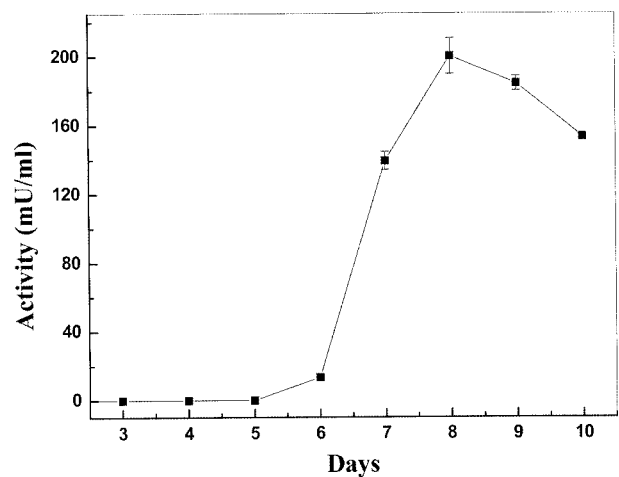


Fig. 3 Time course of the laccase production from *F. pinicola* mycelia. Cultivation was carried out at 25°C in the optimal culture medium. The laccase activity was assayed with culture supernatant.

Table 5. Substrate specificity of the laccase from *F. pinicola*.

Substrate ^a	Activity (mU/mL)	Relative activity (%)
ABTS ^b	200	100
Syringaldazine	42.1	21.1
Guaiacol	21.8	10.9
2, 6-DMP ^c	13.2	6.6
<i>o</i> -tolidine	9.9	5.0

^aThe reaction mixtures contained 2 mM substrate in 0.1 M citrate buffer (pH 3.0)

^bABTS. 2, 2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolinesulfonic acid)

^c2, 6-DMP. 2, 6-dimethoxyphenol

Activity was measured after addition of 0.1~ of culture supernatant.

지조건으로 배양하였을 때 효소활성이 175% 증가함을 알 수 있었다. *P. cinnabartinus* 및 *Monotospora* sp. 중의 laccase가 각각 7일 및 8일 배양 후 최대 활성을 나타낸 결과[21, 34]와 유사하였으며, Sadhasivam 등[28]이 보고한 *T. Harzianum* 중의 laccase가 배양 4일 후 효소 활성이 가장 크다는 결과와 비교하였을 때는 배양시간이 비교적 긴 것을 알 수 있었다. 그러나 *Cyathus bulleri* 중의 laccase[29]는 배양 후 21일, *Phlebia floridensis* 중의 laccase[2]는 배양 후 20일에 최대활성이 나타난 것으로 보아 본 균주의 laccase 생산을 위한 배양기간은 버섯류로부터 laccase 생산을 위한 일반적인 배양기간 범주에 속하는 것으로 사료된다.

기질특이성

F. pinicola 균사체로부터 생성된 배양액 중의 laccase에 대한 기질특이성을 조사하기 위하여 비폐놀계 기질인 ABTS와 폐놀성 기질인 2, 6-dimethoxyphenol, syringaldazine, guaiacol 및 *o*-tolidine을 기질로 사용하여 활성을 측정된 결과, ABTS에 대하여 활성이 가장 우수하였다(Table 5). 이는 *F. fraxinea* 중의 laccase[22]가 ABTS에 대하여 가장 높은 효소활성을 나타낸 결과와 일치하였다.

최적 pH와 최적 온도

F. pinicola 균사체로부터 생산된 laccase의 배양액 중의 효소활성을 위한 pH 및 온도의 영향을 Fig. 4와 Fig. 5에 나타내었다. 효소는 pH 3에서 최대 활성을 나타내었으며 pH 4에서는 활성도가 30% 이하로 급격히 감소하여 pH 5 이상에서는 활성을 나타내지 않았다. 한편 효소는 40°C 이하에서 활성도가 50% 이하로 나타났으며 80°C에서 최대 활성을 나타내었다. 이는 Park 등[21]이 보고한 *P. cinnabarinum* laccase의 최적 pH 3.0과 일치하였으며, Xiao 등[35]이 보고한 *Trametes* sp. laccase 및 *F. fraxinea* laccase[22]가 각각 pH 4.5, pH 5.0에서 최대 활성을 나타내는 결과와 상이함을 알 수 있었다. 한편, *Trametes* sp.로부터 생산된 laccase[35]의 최적 온도는 70°C, *F. fraxinea* laccase[22]의 최적 온도는 50°C이며, Nagai 등[18]이 보고한 *L. edodes*로부터 생산

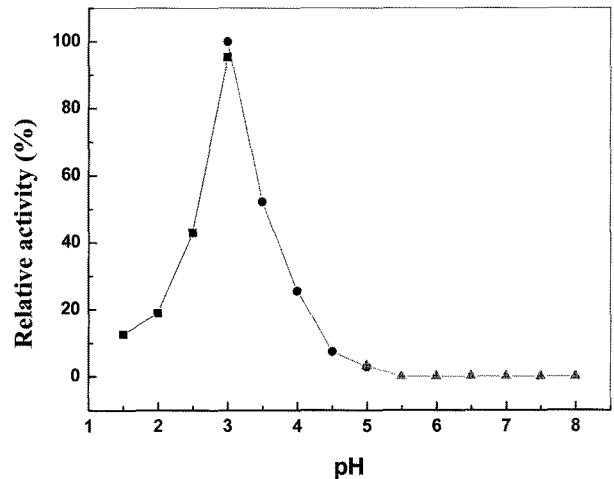


Fig. 4. Effect of pH on the laccase activity from *F. pinicola*. The enzyme activity was assayed in the pH range of 1.5-8.0 (0.1 M glycine HCl buffer for pH 1.5-3.0, 0.1 M citrate buffer for pH 3.0-5.0, 0.1 M sodium phosphate buffer for pH 5.0-8.0) at 25°C.

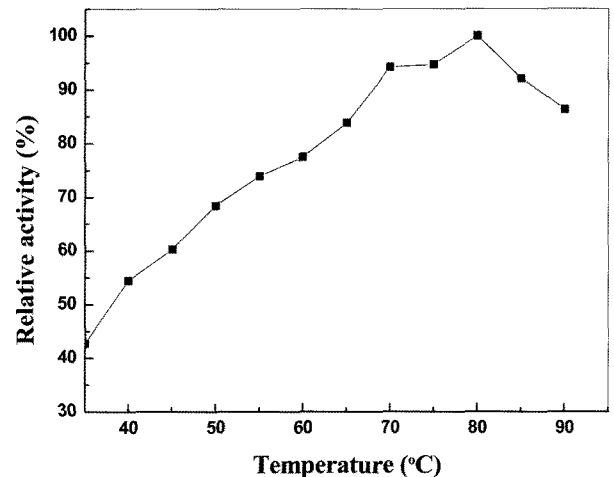


Fig. 5. Effect of temperature on the laccase activity from *F. pinicola*. The enzyme activity was assayed at various temperatures of 40-90°C in 0.1 M citrate buffer (pH 3.0).

된 laccase의 최적 온도는 40°C로, 균류로부터 생산되는 laccase의 최적온도가 매우 다양함을 알 수 있었다.

요 약

소나무잔나비버섯(*Fomitopsis pinicola*) 균사로 부터 laccase를 생산하기 위한 최적 배양조건을 조사하였다. 합성 배지 중 MCM이 가장 높은 laccase 활성을 나타내었으며, MCM의 조성을 2% dextrose, 0.4% peptone, 0.05% NaH₂PO₄·H₂O, 0.05% CaCl₂로 각각 대체하였을 때 효소활성이 가장 우수하였다. 따라서 *F. pinicola*로부터 laccase를 생산하기 위한 최적 배지조건은 2% dextrose, 0.4% peptone, 0.05% NaH₂PO₄·H₂O, 0.05% CaCl₂이다. 이상의 배지를 사

용하여 25°C에서 8일 동안 배양하였을 때 효소의 활성이 최대에 도달함을 확인하였다. ABTS를 기질로 사용한 activity staining을 통해 소나무잔나비버섯 균사체의 laccase 활성의 분자량이 43-55 kDa임을 확인하였으며, 배양액 중의 최적 pH와 온도는 각각 pH 3.0과 80°C이었다.

감사의 글

본 연구는 동국대학교 논문게재연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Ander, P. and K. E. Eriksson. 1976. The importance of phenoloxidase activity in lignin degradation by the white-rot fungus *Sporotrichum pulberulentum*. *Arch. Microbiol.* **109**: 1-8.
- Arora, D. S. and P. K. Gill. 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresource Technol.* **73**: 283-285.
- Bollg, J. M. and A. Leonowicz. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Appl. Environ. Microbiol.* **48**: 849-854.
- Bumpus, J. A. 1989. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **55**(1): 154-158.
- Cambria, M. T., A. Cambria, S. Ragusa, and E. Rizzarelli. 2000. Production, Purification, and Properties of an Extracellular Laccase from *Rigidoporus lignosus*. *Protein Expression and Purification* **18**: 141-147.
- Diana, L., B. Hemming, P. Thilo, N. Manfred, G. B. Ralf, and Z. Holger. 2005. Laccase of *Pleurotus sapidus* : Characterization and Cloning. *J. Agric. Food Chem.* **53**: 9498-9505.
- 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.
- Eggert, C, U. Temp, J. F. Dean, and K. E. Eriksson. 1996. A fungal metabolite mediates degradation of nonphenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase. *FEBS letter.* **391**: 144-148.
- Ferrey, M. L., W. C. Koskinen, R. A. Blanchette, and T. A. Burnes. 1994. Mineralization of alachlor by lignin-degrading fungi. *Can. J. Microbiol.* **40**(9): 795-798.
- Field, J. A., E. De Jong, G. Feijoo-Costa, and J. A. M. De Bont. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *Trends Biotechnol.* **11**: 44-49.
- Gianfreda, L., F. Xu, and J. M. Bollag. 1999. Laccase : A useful group of laccase oxidoreductive enzymes. *Bioremediation J.* **3**: 1-25.
- Higuchi, T. 1990. Lignin biochemistry : Biosynthesis and biodegradation. *Wood Sci. Technol.* **24**: 23-63.
- Jager, A., S. Croan, and T. K. Kirk. 1985. Production of ligninases and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**(5): 1274-1278.
- Keller, A. C., M. P. Maillard, and K. Hostettmann. 1996. Antimicrobial steroids from the fungus *Fomitopsis pinicola*. *Phytochemistry.* **41**(4): 1041-1046.
- 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, S. I., J. S. Kim, S. H. Oh, K. Y. Park, H. G. Lee, and S. D. Kim. 2008. Antihyperglycemic effect of *Fomitopsis pinicola* extracts in streptozotocin-induced diabetic rats. *J. Med. Food.* **11**(3): 518-524.
- Mikiashvili, N., V. Elisashvili, S. Wasser, and E. Neve. 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Lett.* **27**: 955-959.
- Nagai, M., T. Sato, H. Watanabe, K. Saito, M. Kawata, and H. Enei. 2002. Purification and characterization of an extracellular laccase from the edible mushroom *Lentinula edodes*, and decolorization of chemically different dyes. *Appl. Microbiol biotechnol.* **60**: 327-335.
- Nielini, L., C. V. Hunolstein, and N. Orsi. 1986. Production of laccase A and B by a mutant strain of *Trametes versicolor*. *J. Gen. Appl. Microbiol.* **32**: 185-191.
- Nonaka, T., H. Ishikawa, Y. Tsumuraya, Y. Hashimoto, and N. Dohmae. 1995. Characterization of a thermostable lysinspecific metalloproteinase from the fruiting bodies of a basidiomycete, *Grifola fromdosa*. *J. Biochem. (Tokyo)* **118**: 1014-1020.
- Park, E. H. and K. H. Yoon. 2003. Characterization of Laccase Purified from Korean *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3. *J. Microbiol.* **31**(2): 59-66.
- Park, K. M. and S. S. Park. 2006. Optimal Production and Characterization of Laccase from *Fomitella fraxinea* Mycelia. *Kor. J. Microbiol. Biotechnol.* **34**(3): 228-234.
- Pease, E. A., A. Andrawis, and M. Tieb. 1989. Manganese dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **264**(23): 13531-13535.
- 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.
- Prerez, 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.
- Purnomo, A. S., I. Kamei, and R. Kamei. 2008. Degradation of 1, 1, 1-trichloro-2, 2-bis (4-chlorophenyl) ethane (DDT) by brown-rot fungi. *J. Biosci. Bioeng.* **105**(6): 614-621.
- Ren, G., X. Y. Liu, H. K. Zhu, S. Z. Yang, and C. X. Fu. 2006. Evaluation of cytotoxic activities of some medicinal

- polypore fungi from China. *Fitoterapia*. **77**(5): 408-410.
28. Sathasivam, S., S. Savitha, K. Swaminathan, and F. H. Lin. 2008. Production, Purification and characterization of mid-redox potential laccase from a newly isolated *Trichoderma harzianum* WL1. *Process biochemistry*. **43**: 736-742.
 29. 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.
 30. Sayadi, S. and R. Ellouz. 1995. Roles of lignin peroxidase and manganese peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in the decolorization of olive mill wastewaters. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**(3): 1098-1103.
 31. 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.
 32. Solomon, E. I., F. Xu, W. Shin, S. H. Brown, J. A. Wahleithner, and U. M. Sundaram, 1996. A study of a series of recombinant fungal laccases and bilirubin oxidase that exhibit significant differences in redox potential, substrate specificity, and stability. *Machoukin Chem. Rev.* **96**: 3563-2565.
 33. 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.
 34. Wang, J. W., J. H. Wu, W. Y. Huang, and R. X. Tan. 2005. Laccase production by *Monotropa* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Bioresource Technol.* **97**: 786-789.
 35. 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 AH 28-2. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **60**: 700-707.
 36. Yoon, J. J., C. J. Cha, Y. S. Kim, and W. Kim. 2008. Degradation of cellulose by the major endoglucanase produced from the brown-rot fungus *Fomitopsis pinicola*. *Biotechnol. Lett.* **30**(8): 1373-1378.

(Received Feb. 13, 2009/Accepted March 9, 2009)