

백색부후균 *Marasmius scorodoni* 유래 laccase의 최적생산조건

임수진¹, 전승종^{1,2*}

¹동의대학교 생명공학과

²동의대학교 스마트바이오헬스학과

Received: July 4, 2014 / Revised: August 25, 2014 / Accepted: August 29, 2014

Optimal Conditions for Laccase Production from the White-rot Fungus *Marasmius scorodoni*

Su-Jin Lim¹ and Sung-Jong Jeon^{1,2*}

¹Department of Biotechnology & Bioengineering, ²Department of Smart-Biohealth, Dong-Eui University, Busan 614-714, Republic of Korea

In this study about the optimum conditions for the production of laccase, a polyphenol oxidase involved in lignin degradation, from *Marasmius scorodoni*, a white-rot fungus garlic mushroom, were determined. Amongst the tested media used for the enzyme's production, YM medium (1% dextrose, 0.5% malt extract, 0.3% yeast extract) allowed for the highest activity of the enzyme. Then, to optimize the culture conditions for laccase activity, the influence of various carbon and nitrogen sources was investigated in YM medium. Among various carbon and nitrogen sources, 1% galactose and 0.4% yeast extract resulted in the highest production of the enzyme, respectively. Enzyme production attained its highest level after cultivation for 15 days at 25°C. Zymogram analysis of the culture supernatant showed two isoenzymatic bands with molecular masses of 60-70 kDa. The optimum pH and temperature for enzyme activity were 3.4 and 75°C, respectively.

Keywords: White-rot fungus, laccase, *Marasmius scorodoni*, lignin

서 론

Laccase (EC 1.10.3.2)는 구리를 함유하는 multi-copper blue oxidase의 일종으로 고등식물, 곤충, 세균, 균류 등에서 발견되어 왔다. 이 효소는 monophenols, polyphenols, methoxy-substituted phenols, aromatic amines, lignin을 포함하는 많은 페놀 화합물들을 산화시키므로 다양한 기질 특이성을 가진다[9, 13, 26, 30]. 대부분의 laccase는 4개의 구리이온을 함유하며 단백질 구조 내에 3가지(type-1, type-2, type-3)의 구리결합자리를 가지고 있다. 효소반응에서 기질의 산화반응은 type-1 구리에 의해 촉매 되어 전자는 trinuclear cluster (1개의 type-2 copper와 2개의 type-3 copper로 구성)을 따라 이동하고, 산소분자의 환원과 물 분자의 방출을 동반하게 된다. 이런 전자이동 메커니즘을 바탕으로 laccase는 monomer의 교차연결, polymer의 분해 및 방

향속 화합물의 개열에 관여한다. 이와 같이 laccase는 다양한 기질 특이성뿐만 아니라 폭넓은 효소 반응성 때문에 염료 탈색[4], 펄프 표백[21], 생물학적 환경 정화[18], 폴리머 합성[10], 바이오센서[25] 및 바이오 연료전지[16] 등의 여러 분야에서 활용되고 있다.

리그닌은 풍부한 방향족 중합체로 구성되어 산에 의해서도 쉽게 분해되지 않는 난분해성 물질이지만 백색부후균이 생산하는 laccase, lignin peroxidase, manganese peroxidase 등의 효소들이 리그닌을 분해하는 것으로 알려져 있다. 따라서 이들 효소를 이용하여 PAHs (polycyclic aromatic hydrocarbons) 또는 chlorophenols 등 여러 환경오염물질의 제거 및 감소에 응용하고자 하는 연구가 진행되고 있다. 특히 균류의 laccase를 이용한 연구가 가장 활발하게 진행되어 *Trametes versicolor* 및 *Myceliophthora thermophila*에 의한 PAHs의 분해[1], *Panus tigrinus* 및 *Coriolus versicolor*에 의한 chlorophenols의 transformation [15], *Trametes villosa*에 의한 bisphenol A의 분해[8] 등이 보고되어 있다.

버섯은 자실체로부터 항암, 면역증강, 항균 및 혈압 상승 억제 등의 효능이 밝혀져 식품 및 의약품으로 이용되고 있

*Corresponding author

Tel: +82-51-890-2278, Fax: +82-51-890-2632

E-mail: jeon.sj@deu.ac.kr

© 2014, The Korean Society for Microbiology and Biotechnology

으며[12, 14], 자연생태계의 물질순환과정에서 생성되는 다양한 부산물을 분해하는 기능이 있어 산업적인 활용에 대한 연구가 지속적으로 진행되고 있다[20, 24].

마늘낙엽버섯(*Marasmius scorodoni*)은 주름버섯목 송이버섯과에 속하는 담자균류로서 강한 마늘 향기가 나서 galic mushroom이라고도 명명되며 활엽수림내 나뭇가지, 토막, 그루터기 위에서 군생한다. *M. scorodoni*은 새로운 항생 물질인 scorodinin을 생산하는 것으로 처음 보고되었고[2], 이후 β -carotene을 분해하는 peroxidase의 생산 및 효소학적 특성에 대하여 보고된 바[28] 있으나, 그밖에 다른 특성에 대해서는 알려진 것이 없다.

본 연구에서는 마늘낙엽버섯(*M. scorodoni*)로부터 리그닌 분해활성을 확인하고, 액체배양법을 이용하여 리그닌 분해효소인 laccase의 분비 생산성을 증가시키기 위한 최적 배양조건을 조사하였으며, 이 균주 배양액으로부터 생산된 laccase의 효소학적 특성을 연구하였다.

재료 및 방법

사용 균주

본 연구에서 사용한 *M. scorodoni*는 농촌진흥청 농업유전자원정보센터에서 분양받아 사용하였고, 보관용 배지는 potato dextrose agar (PDA) 사면배지를 사용하여 25°C에서 7일 동안 배양한 후 4°C 냉장고에 보관하였다. 본 균주의 리그닌 분해능을 조사하기 위하여 0.2% lignin (Sigma-Aldrich, USA) 및 0.1% guaiacol (Sigma-Aldrich)을 첨가한 PDA 배지에 균주를 접종하고 25°C에서 14일 동안 배양시킨 후 형성된 갈색환을 확인하였다.

배양 조건

M. scorodoni 균사체로부터 laccase의 최적 생산을 위한 배지조성을 조사하기 위해 *Coriolus versicolor* medium (CVM), *Czapex dox* medium (CDM), *Lentinus edodes* medium (LEM), mushroom complete medium (MCM), malt yeast glucose medium (MYGM), yeast malt extract medium (YM), laccase production medium (LPM) 및 YpSs medium (YSM)을 사용하였으며, 각 배지의 조성은 Table 1에 나타내었다. *M. scorodoni*을 PDA 평판배지 상에 접종하여 25°C에서 5일 동안 배양한 후 한천배지 상의 균사를 직경 5 mm의 cork borer로 agar plug를 만들어 각각의 액체배지 100 ml에 접종하여 25°C에서 100 rpm으로 15일간 진탕배양 하였다. 탄소원 및 질소원의 영양원에 따른 효소 생산량을 조사하기 위하여 복합배지 중 가장 높은 효소 활성을 나타내는 YM 배지의 조성으로부터 해당 영양원을 제거하고 2% 탄소원 및 0.4% 질소원을 각각 첨가하여 실험하였다.

실험하였다.

효소활성측정

M. scorodoni 배양액을 whatman No. 1 filter paper을 사용하여 여과하고 원심분리(10,000 ×g, 10분)를 통하여 균체를 완전히 제거한 후 상등액을 회수하여 조효소액으로 사용하였다. Laccase 활성은 50 mM sodium acetate buffer (pH 3.4)에서 2 mM 2,2'-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) (ABTS)을 기질로 사용하여 75°C에서 5분간 조효소와 반응시켰으며, ABTS의 산화에 의해 생성된 산화물은 420 nm ($\epsilon = 36,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$)에서 측정하였다. 효소활성의 단위는 분당 1 μM 의 기질을 산화시키는 효소의 양을 1 unit (U)로 정의하였다.

활성 염색

배양액 중에 생산된 laccase의 존재유무를 알아보기 위하여 조효소액을 10% Native-PAGE를 사용하여 비변성 조건에서 전기영동한 후 활성염색법을 수행하였다. 전기영동한 겔은 0.5 M citrate buffer (pH 3.4)에서 30분간 방치한 후 새로운 buffer로 교환하는 과정을 3회 반복하였다. 이후에 전기영동 겔은 0.5 M citrate buffer (pH 3.4)에서 조제한 2 mM ABTS 용액과 50°C에서 2분간 반응시켜 생성되는 단백질 band를 확인하였다.

최적 pH와 최적 온도

효소활성에 대한 pH의 영향을 조사하기 위해 50 mM potassium chloride-HCl buffer (pH 1.0-2.2), 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.2-3.4), 50 mM sodium acetate buffer (pH 3.4-5.5), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5-7.5), 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5-9.0)을 사용하여 75°C에서 효소활성을 측정하였다. 효소활성에 대한 온도의 영향은 효소액의 반응온도를 40°C에서 95°C까지 5°C 간격으로 변화시키며 50 mM acetate buffer (pH 3.4)에서 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

리그닌 분해능 확인

본 실험에 사용된 *M. scorodoni*의 균사체에 대한 리그닌 분해능을 확인하기 위하여 리그닌과 guaiacol이 첨가된 agar 배지상에서 균사체를 배양하면서 형성되는 갈색환의 유무를 확인하였다. 그 결과 배양 시간 8일째에 4 cm, 14일째에 6 cm의 갈색환을 형성하여 *M. scorodoni*는 리그닌을 분해하는 것으로 나타났고, 배양시간이 경과함에 따라 리그닌 분해 활성이 증가하는 것으로 확인되었다. *Marasmius*

Table 1. Composition of various media used for cultivation of *M. scorodoni* mycelia and laccase activity in the various media.

Component and laccase activity	Media (g/100 ml)							
	CVM ^a	CDM ^b	LEM ^c	MCM ^d	MYGM ^e	YM ^f	LPM ^g	YSM ^h
Dextrose	2.0		2.0	2.0	0.4	1.0	1.0	2.0
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
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	
Laccase activity (U/ml)	20.6	48.0	74.2	83.3	37.0	96.1	85.2	78.4

^aCVM (*Coriolus versicolor* medium).

^bCDM (*Czapex dox* medium).

^cLEM (*Lentinus edodes* medium).

^dMCM (mushroom complete medium).

^eMYGM (malt yeast glucose medium).

^fYM (yeast malt extract medium).

^gLPM (laccase production medium).

^hYSM (YpSs medium).

속 균주 중에서는 *M. quercophilus* 균주가 laccase를 생산하는 것으로 처음 보고되었고[6], 그 이후에 리그닌을 분해하는 *Marasmius* 속 균주는 보고된 것이 없다. 본 연구 결과를 바탕으로 *M. scorodoni*는 리그닌을 분해하는 백색부후균인 것으로 처음 판명되었다.

배지의 영향

M. scorodoni 균사체로부터 리그닌 분해에 관여하는 laccase를 생산하기 위하여 Table 1에 나타낸 여러 종류의 복합배지를 사용하여 최적배지조건을 조사하였다. 각각의 배지조건에서 25°C로 15일간 균사체를 배양한 후 배양 상등액의 laccase 활성을 조사한 결과, YM 배지를 사용하여 배양하였을 때 96.1 U/ml로 가장 높은 laccase 활성을 나타내었다(Table 1).

탄소원의 영향

효소 생산을 위한 탄소원의 효과를 알아보기 위하여 복합배지 중에서 최대 활성을 나타낸 YM 배지의 조성으로부터 dextrose를 제거하고 각 종류의 탄소원을 각각 1%씩 첨가하여 버섯 균사체를 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결

Table 2. Effect of carbon sources on the laccase production from *M. scorodoni* mycelia.

Carbon source (1%)	Activity (U/ml)
Control ^a	0.0
YM ^b	97.8
Fructose	92.2
Galactose	126.0
Mannose	83.4
Xylose	68.9
Maltose	6.7
Lactose	70.1
Cellobiose	88.2
Starch	68.3
Cellulose	81.8
Mannitol	91.9
Glycerol	88.0

^aThe YM without carbon source.

^bYeast malt extract medium.

과 galactose가 탄소원으로 첨가되었을 때 효소 활성이 가장 우수하여 원 성분인 dextrose와 비교하여 약 1.3배 정도 효

소 활성이 증가하였다(Table 2). 이것은 백색부후균으로부터 laccase를 생산하기 위한 탄소원 중에서 dextrose가 가장 우수한 효과를 나타낸다는 기존 보고와는 다른 결과를 나타내었다[5, 17]. 일반적으로 곰팡이 유래의 extracellular laccase는 galactose, mannose, N-acetyl-glucosamine 등을 포함하는 당단백질을 형성하는 것으로 보고된 바 있다[11, 29]. 따라서, 본 균주의 탄소원으로 첨가한 galactose는 균체의 성장과는 별도로 laccase의 당쇄부가에 영향을 주어 효소 활성이 증가하였을 것으로 추측된다.

질소원의 영향

효소 생산을 위한 질소원의 효과를 알아보기 위하여 복합 배지 중에서 최대 활성을 나타낸 YM 배지의 조성으로부터 혼합질소원(0.5% peptone, 0.3% malt extract 및 0.3% yeast extract)을 제거한 후 각 종류의 질소원을 각각 0.4%씩 첨가하여 버섯 균사체를 배양한 후 효소활성을 측정하였다. 그 결과 0.4% yeast extract가 질소원으로 첨가되었을 때 효소 활성이 143.7 U/ml로 가장 높은 값을 나타내었다(Table 3). 이것은 YM 배지의 원 성분인 혼합질소원(0.5% peptone, 0.3% malt extract 및 0.3% yeast extract)과 비교하여 약 1.5배 정도 효소활성이 우수하였다. 이 결과는 *botryosphaeria* sp. 유래 laccase를 생산하기 위한 질소원으로 yeast extract가 가장 우수하다고 보고한 결과[31]와는 일치하지만, *T. versicolor*로부터 리그닌 분해효소 생산을 위한 질소원으로 peptone이 가장 우수하다고 보고한 결과[17]와는 상이하였다.

배양 시간에 따른 균체 성장 및 효소 생산

M. scorodonius 균사체로부터 laccase 생산을 위한 최적 배지를 1% galactose 및 0.4% yeast extract로 결정하고, 이 배지 조건에서 균사체를 배양하면서 시간대별로 건조 균체량 및 효소활성을 측정하였다. 그 결과 성장곡선의 대수증식

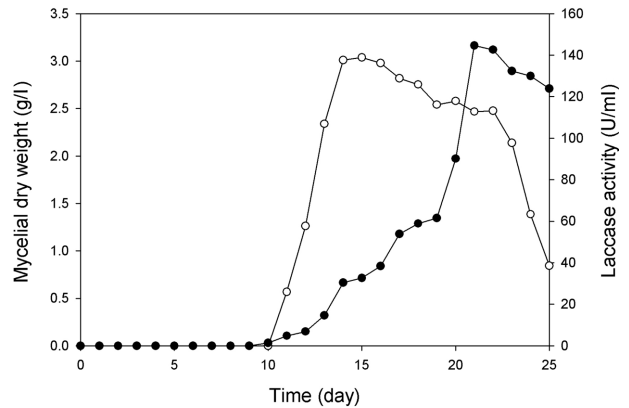


Fig. 1. Time course of mycelial dry weight and laccase production by *M. scorodonius*. Cultivation was carried out at 25°C in the optimized medium. The laccase activity was assayed with culture supernatant. ●, mycelial dry weight; ○, laccase activity.

기 초기에 해당하는 배양 10일째부터 효소활성이 급격히 증가하기 시작하여 15일째에 가장 높은 활성을 나타내었다(Fig. 1). 또한 정지기에 해당하는 배양 22일째부터는 효소 활성이 급격하게 감소하였다. 따라서 배양시간에 따른 laccase 생산량은 균체량과 비례하지 않았고, 대수증식기 초기에 일정량의 효소가 생산되면 그 이후로는 효소 생산이 억제되는 것으로 확인되었다. *Pycnoporus cinnabartinus* 및 *Monotospora* sp. 유래 laccase가 각각 7일 및 8일 배양 후에 최대 활성을 나타낸 결과와 비교하면 본 효소가 최대 활성을 나타내는 배양 시간은 비교적 긴 것을 알 수 있었다[22, 32], 그러나, *Phlebia floridensis* 유래 laccase는 배양 후 20일, *Cyathus bulleri* 유래 laccase는 배양 후 21일에 최대활성을 나타낸 것으로 보아 본 균주의 laccase 생산을 위한 배양시간은 곰팡이로부터 laccase 생산을 위한 일반적인 배양시간의 범주에 속하는 것으로 생각된다[3, 27].

활성 염색

M. scorodonius 균사체로부터 생산된 배양액 중의 효소 활성을 확인하기 위하여 조효소액을 Native-PAGE로 전기영동한 후 기질인 ABTS를 사용하여 활성염색을 수행하였다. 그 결과 laccase 활성을 나타내는 2개의 band가 약 60-70 kDa 사이에서 확인되었다(Fig. 2). 이것은 *M. quercophilus* 유래 laccase가 60 kDa의 분자량 부근에서 2종류의 isozyme 형태로 존재한다는 보고와 유사한 결과를 나타내었다[7].

최적 pH와 최적 온도

M. scorodonius 균사체로부터 생산된 배양액 중의 효소활성에 대해 pH 및 온도의 영향을 조사하였다. 효소는 pH 3.4에서 최대 활성을 나타내었고 pH 3.0-3.8 사이에서 80% 이

Table 3. Effect of nitrogen sources on the laccase production from *M. scorodonius* mycelia.

Carbon source (0.4%)	Activity (U/ml)
Control ^a	0.0
YM ^b	97.8
Sodium nitrate	8.7
(NH ₄) ₂ SO ₄	12.2
(NH ₄) ₂ HPO ₄	18.6
(NH ₄) ₂ NO ₃	8.0
Peptone	42.4
Malt extract	15.9
Tryptone	59.1
Yeast extract	143.7

^aThe YM without nitrogen source.

^bYeast malt extract medium.

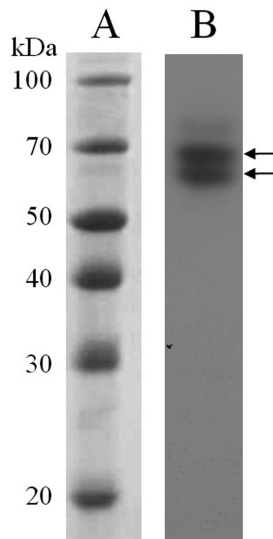


Fig. 2. Zymogram analysis of laccase from *M. scorodoni*. (A) Molecular mass marker by SDS-PAGE. (B) The activity staining of laccase from *M. scorodoni* using 10% Native-PAGE was run under non-denaturing conditions and stained at 50°C with a solution of 2 mM ABTS in 0.5 M citrate buffer, pH 3.4.

상의 활성을 나타내었으며, pH 4.6 이후로는 효소의 활성도가 40% 이하로 급격히 감소하였다(Fig. 3A). 이 결과는 Salony 등[27]이 보고한 *Cyathus bulleri*로부터 분리정제한 laccase의 최적 pH 3.5-4.0과 유사하였으며, *Trametes* sp. AH28-2의 laccase [33] 및 *Fomitella fraxinea*의 laccase [23]가 각각 pH 4.5와 pH 5.0에서 최대 활성을 나타내는 결과와는 상이함을 알 수 있었다. 또한, *M. quercophilus*의 laccase는 같은 *Marasmius* 속 균주 유래의 효소임에도 불구하고 본 효소와 다른 최적 pH (pH 5-6)를 나타내었다[7]. 한편, 본 효소는 75°C에서 최대 활성을 보였고 55°C 이하에서는 활성도가 50% 이하로 나타났다(Fig. 3B). *Trametes* sp. AH28-2로부터 생산된 laccase의 최적온도는 70°C이고[33], *Lentinula edodes* laccase [19]의 최적온도는 40°C이며 *C. bulleri* laccase [27]의 최적온도는 30°C이었다. 또한, *M. quercophilus*의 laccase는 75°C에서 최적온도를 나타내어 본 효소의 최적온도와 동일하였다[6]. 따라서, *Marasmius* 속 균주 유래의 laccase는 다른 곰팡이 유래의 laccase와 비교하여 매우 높은 온도에서 최적 활성을 가지는 것으로 확인되었다. 이와 같은 특성을 이용하여 본 효소를 오염 우려가 없는 고온 하에서 산업적으로 적용할 경우 매우 유용할 것으로 생각된다.

기질 특이성

M. scorodoni 균사체로부터 생산된 laccase의 기질 특이성을 조사하기 위하여 비페놀계 기질인 ABTS와 페놀계

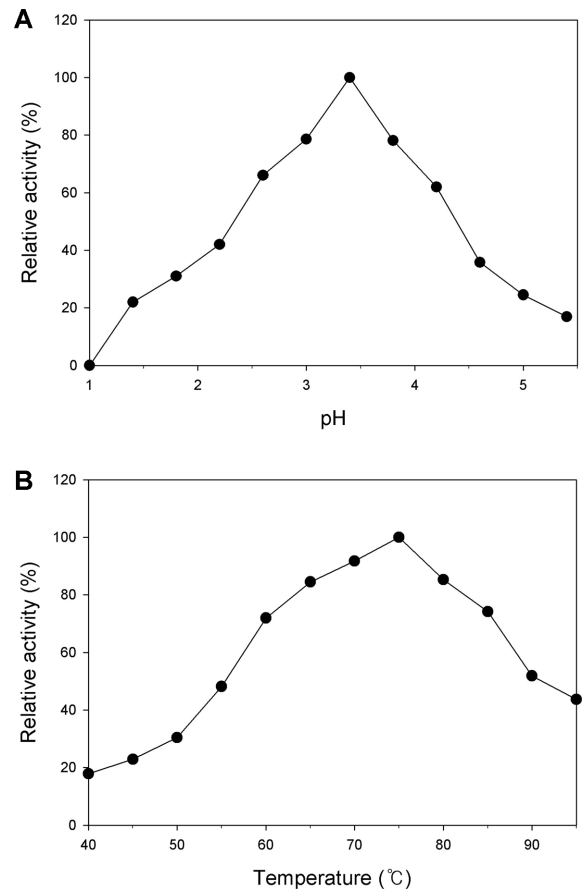


Fig. 3. Effects of pH and temperature on the enzyme activity.

(A) The assay was carried out at 75°C with ABTS as a substrate, using 50 mM potassium chloride-HCl buffer (pH 1.0-2.2), 50 mM glycine-HCl buffer (pH 2.2-3.4), 50 mM acetate buffer (pH 3.4-5.5), 50 mM sodium phosphate buffer (pH 5.5-7.5), or 50 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5-9.0). (B) Enzyme was assayed at a temperature range of 40 to 95°C and pH 3.4 with ABTS as a substrate.

Table 4. Substrate specificity of the laccase from *M. scorodoni* mycelia.

Substrate ^a	Activity (U/ml)	Relative activity (%)
ABTS ^b	143.7	100.0
Catechol	118.5	82.4
2,6-DMP ^c	63.1	43.9
Guaiacol	27.3	19.1
Syringaldazine	3.3	2.3

^aThe reaction mixtures contained 2 mM substrate 50 mM sodium acetate (pH 3.4).

^b2,2'-azino bis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate).

^c2,6'-dimethoxyphenol.

기질인 catechol, 2,6'-dimethoxyphenol, guaiacol 및 syringaldazine을 사용하여 효소 활성을 측정하였다. 그 결

과 효소는 다양한 기질에 대하여 활성을 보였고, ABTS에 대하여 가장 높은 활성을 나타내었다(Table 4). 이것은 *M. quercophilus* 유래 laccase [6]가 ABTS에 대해 가장 높은 효소 활성을 나타낸 결과와 일치하였다.

요약

마늘낙엽버섯(*Marasmius scorodoni*)에 대하여 리그닌 분해 여부를 조사한 결과, 본 균주는 laccase를 생산하는 백색부후균으로 확인되었다. 마늘낙엽버섯 균사체로부터 laccase를 생산하기 위한 최적배지조건을 조사한 결과, 다양한 합성 배지 중에서 YM (1% dextrose, 0.5% malt extract, 0.3% yeast extract) 배지가 가장 높은 laccase 활성을 나타내었다. 또한 YM 배지의 조성 중에서 탄소원과 질소원을 각각 1% galactose와 0.4% yeast extract로 대체하였을 때 가장 높은 효소활성을 나타내었다. 본 균주는 최적배지조건에서 25°C로 15일 동안 배양하였을 때 효소의 활성이 최대치에 도달함을 확인하였다. 균사체 배양 상등액을 Native-PAGE로 전기영동한 후 활성염색을 수행한 결과, 분자량 약 60-70 kDa 사이에서 laccase 활성을 가지는 2개의 밴드를 확인하였으며, 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 3.4과 75°C 이었다.

Acknowledgments

This work was supported by Dong-eui University Grant (2013AA164).

References

- Alcalde M, Bulter T, Arnold FH. 2002. Colorimetric assays for biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by fungal laccases. *J. Biomol. Screen* **7**: 547-553.
- Anke T, Kupka J, Schramm G, Steglich W. 1980. Antibiotics from basidiomycetes. X. *Scorodonin*, a new antibacterial and antifungal metabolite from *Marasmius scorodoni* (Fr.) Fr. *J. Antibiot* (Tokyo). **33**: 463-467.
- Arora DS, Fill PK. 2000. Laccase production by some white rot fungi under different nutritional conditions. *Bioresour Technol.* **73**: 283-285.
- Claus H, Faber G, Konig H. 2002. Redox-mediated decolorization of synthetic dyes by fungal laccases. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **59**: 672-678.
- Dong JL, Zhang YW, Zhang RH, Huang WZ, Zhang YZ. 2005. Influence of culture conditions on laccase production and isozyme patterns in the white-rot fungus *Trametes gallica*. *J. Basic Microbiol.* **45**: 190-198.
- Dedeyan B, Klonowska A, Tagger S, Tron T, Lacazio G, Gil G, et al. 2000. Biochemical and molecular characterization of a Laccase from *Marasmius quercophilus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **66**: 925-929.
- Farnet AM, Criquet S, Taqger S, Gill G, Le Petit J. 2000. Purification, partial characterization, and reactivity with aromatic compounds of two laccases from *Marasmius quercophilus* strain 17. *Can. J. Microbiol.* **46**: 189-194.
- Fukuda T, Uchida H, Takashima Y, Uwajima T, Kawabata T, Suzuki M. 2001. Degradation of bisphenol A by purified laccase from *Trametes villosa*. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **284**: 704-706.
- Höfer C, Schlosser D. 1999. Novel enzymatic oxidation of Mn²⁺ to Mn³⁺ catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Lett.* **451**: 186-190.
- Huttermann A, Mai C, Kharazipour A. 2001. Modification of lignin for the production of new compounded materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **55**: 387-394.
- Koroljova OV, Stepanova EV, Gavrilova VP, Biniukov VI, Jaropolov AI, Varfolomeyev SD, et al. 1999. Laccase of *Coriolus zonatus*: isolation, purification, and some physicochemical properties. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **76**: 115-127.
- Kweon MH, Jang H, Lim WJ, Chang HI, Kim CW, Yang HC, et al. 1999. Anticomplementary properties of polysaccharides isolated from fruit bodies of mushroom *Pleurotus ostreatus*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **9**: 450-456.
- Larrondo LF, Salas L, Melo F, Vicuña R, Cullen D. 2003. A novel extracellular multicopper oxidase from *Phanerochaete chrysosporium* with ferroxidase activity. *Appl. Environ. Microbiol.* **69**: 6257-6263.
- Lee JH, Cho SM, Kim HM, Hong ND, Yoo ID. 1997. Immunostimulating activity of polysaccharides from mycelia of *Phellinus linteus* grown under different culture conditions. *J. Microbiol. Biotechnol.* **7**: 52-55.
- Leontievsky AA, Myasoedova NM, Baskunov BP, Evans CS, Golovleva LA. 2000. Transformation of 2,4,6-trichlorophenol by the white rot fungi *Panus tigrinus* and *Coriolus versicolor*. *Biodegradation* **11**: 331-340.
- Liu X, Gillespie M, Ozel AD, Dikici E, Daunert S, Bachas LG. 2011. Electrochemical properties and temperature dependence of a recombinant laccase from *Thermus thermophilus*. *Anal. Bioanal. Chem.* **399**: 361-366.
- Mikiashvili N, Elisashvili V, Wasser S, Neve E. 2005. Carbon and nitrogen sources influence the ligninolytic enzyme activity of *Trametes versicolor*. *Biotechnol. Lett.* **27**: 955-959.
- Murugesan K. 2003. Bioremediation of paper and pulp mill effluents. *Ind. J. Exp. Biol.* **41**: 1239-1248.
- Nagai M, Sato T, Watanabe H, Saito K, Kawata M, Enei H. 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.
- Nonaka T, Ishikawa H, Tsumuraya Y, Hashimoto Y, Dohmae N. 1995. Characterization of a thermostable lysinespecific metallopeptidase from the fruiting bodies of a basidiomycete,

- Grifola frondosa*. *J. Biochem.* (Tokyo) **118**: 1014-1020.
21. Palonen H, Viikari L. 2004. Role of oxidative enzymatic treatments on enzymatic hydrolysis of softwood. *Biotechnol. Bioeng.* **86**: 550-557.
 22. Park EH, Yoon KH. 2003. Characterization of laccase purified from Korean *Pycnoporus cinnabarinus* SCH-3. *J. Microbiol.* **31**: 59-66.
 23. Park KM, Park SS. 2006. Optimal Production and Characterization of Laccase from *Fomitella fraxinea* Mycelia. *Korean J. Microbiol. Biotechnol.* **34**: 228-234.
 24. Perry CR, Smith M, Britnell CH, Wood DA, Thurston CF. 1993. Identification of two laccase genes in the cultivated mushroom *Agaricus bisporus*. *J. Gen. Microbiol.* **139**: 1209-1218.
 25. Peter MG, Wollenberger U. 1997. Phenol-oxidizing enzymes: mechanisms and applications in biosensors. *EXS.* **80**: 63-82.
 26. Sánchez-Sutil MC, Gómez-Santos N, Moraleda-Muñoz A, Martins LO, Pérez J, Muñoz-Dorado J. 2007. Differential expression of the three multicopper oxidases from *Myxococcus xanthus*. *J. Bacteriol.* **189**: 4887-4898.
 27. Salony, Mishra S, Bisaria VS. 2006. Production and characterization of laccase from *Cyathus bulleri* and its use in decolorization of recalcitrant textile dyes. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **71**: 646-653.
 28. Scheibner M, Hülsdau B, Zelena K, Nimtz M, de Boer L, Berger RG, et al. 2008. Novel peroxidases of *Marasmius scorodonium* degrade beta-carotene. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **77**: 1241-1250.
 29. Stepanova EV, Pegasova TV, GavriloVA VP, Landesman EO, Koroleva OV. 2003. Comparative study of the extracellular laccases from *Cerrena unicolor* 059 0784 and *Pleurotus oastreatus* 0432. *Prikl. Biokhim. Mikrobiol.* **39**: 427-434.
 30. Thurston CF. 1994. The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**: 19-26.
 31. Vasconcelos AFD, Barbosa AM, Dekker RFH, Scarminio IS, Rezende MI. 2000. Optimizaton of laccase production by *Botryosphaeria* sp. in the presence of veratryl alcohol by the response-surface method. *Process Biochem.* **35**: 1131-1138.
 32. Wang JW, Wu JH, Huang WY, Tan RX. 2005. Laccase production by *Monotospora* sp., an endophytic fungus in *Cynodon dactylon*. *Bioresource Technol.* **97**: 786-789.
 33. Xiao YZ, Tu XM, Wang J, Zhang M, Cheng Q, Zeng WY, et al. 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.