

## *Phanerochaete chrysosporium*의 액체 배양 및 Lignin Peroxidase 생산

### Submerged Culture of *Phanerochaete chrysosporium* and Lignin Peroxidase Production

박 세 근\*      정 명 선\*      김 영 관\*\*  
Park, Se-Keun    Jeong, Myoung-Sun    Kim, Yeong-Kwan

#### Abstract

This study characterizes the growth of white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249) and lignin peroxidase(LiP) activity in different submerged culture media. *P. chrysosporium* was grown in the form of pellet of various sizes from a spore inoculum under shaking liquid culture condition. While the growth of mycelia was higher under the nitrogen-sufficient culture than under the nitrogen-limited culture, ligninase activity was relatively lower. The lignin peroxidase appeared in nitrogen-limited culture and was suppressed by excess nitrogen. High level(40U/l) of lignin peroxidase activity was obtained in the growth medium containing 1.5mM veratryl alcohol, a secondary metabolite of *P. chrysosporium*. Lignin peroxidase production was not observed under conditions of nitrogen sufficiency or in balanced media, suggesting that control parameters could increase the activity by manipulating the secondary metabolism.

키워드 : *Phanerochaete chrysosporium*, 액체 배양, lignin peroxidase 활성도  
Keywords : *Phanerochaete chrysosporium*, submerged culture, lignin peroxidase activity

#### 1. 서론

최근까지 리그닌의 분해능이 뛰어난 목재 부패성 진균류(wood-rotting fungi)인 백색부후균(white rot fungi)을 이용한 생분해(biodegradation) 연구가 많이 진행되어 왔으며, 특히 액체 배양에서 잘 성장하며 담자균류(basidiomycetes)로는 특이하게 다량의 분생 포자를 형성하는 *Phanerochaete chrysosporium*에 대한 연구가 가장 많이 보고되어 있다[1,2]. *P. chrysosporium*은 lignin peroxidase(LiP)와 manganese-dependent peroxidase(MnP)라고 부르는 두 종류의 세포외(extracellular) peroxidase를 분비하고, veratryl alcohol을 매개로

하여 lignin의 중요 결합을 끊음으로써 lignin을 분해하는 것으로 알려져 있다[3]. 리그닌 분해효소(lignin degrading enzyme)는 glycosylated heme protein들로 구성되어 있으며, carbon, nitrogen, sulfur 영양분의 제한에 대응하여 2차 대사산물(secondary metabolites)로서 생산되어진다[4-7]. 그리고 비특이성 리그닌 분해 효소 시스템은 리그닌을 비롯한 다양한 종류의 난분해성 유해 화합물을 분해할 수 있는 능력을 갖고 있다[8].

지금까지 여러 연구자들에 의해 *P. chrysosporium*의 활성도에 영향을 미치는 외적인 자들이 보고되었다[6,7,9,10]. *P. chrysosporium*의 성장을 위한 최적 온도는 39°C이며, 최적 pH는 4.0~4.5이다. 또한 veratryl alcohol, Tween 80(sorbitan polyoxyethylene monoleate), 미량원소 등이 lignin peroxidase의 활성도를 증가시킨다

\* 강원대학교 환경공학과 박사과정  
\*\* 강원대학교 환경공학과 교수, 공학박사

[11-14]. 그러나 상업적인 비용 측면에서 veratryl alcohol이나 Tween 80이 프로세스에 절대적으로 필요한 것은 아니다[15].

균체의 성장과 리그닌 분해효소 생성 측면에서 배지성분의 최적화뿐만 아니라 온도, pH, 통기, 교반 등의 배양조건이 중요하다고 할 수 있다. 기존의 균류 배양은 주로 정치배양이었으나 차츰 진탕 배양으로 옮겨가고 있으며, 최근에는 대량생산을 위하여 고정화를 이용한 반응기내의 연속배양 시스템을 도입하는 등 리그닌 분해 효소의 생산을 높이기 위한 연구가 계속 진행되고 있다.

본 연구에서는 *P. chrysosporium*을 이용한 환경오염물질의 처리를 위한 전단계로서, 액체배양조건에서 배지조성에 따른 균류의 성장 특성과 아울러 lignin peroxidase 활성도를 살펴보고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 균주

실험에 사용한 균주는 백색부후균 *Phanerochaete chrysosporium*(IFO 31249)이며, YM broth agar 배지(yeast extract 3g/L, malt extract 3g/L, peptone 5g/L, dextrose 10g/L, agar 20g/L)에서 35~39°C 조건으로 2~3일 동안 배양한 후, 4°C에서 보관하면서 이용하였다.

### 2.2 배지 및 배양

*P. chrysosporium*의 성장 특성을 알아보기 위해 사용한 medium은 sodium acetate를 생략한 것 외에는 Kang과 Stevens[16]이 사용한 배지조성과 유사하게 구성하였다. 실험에서 이용한 growth medium 형태에 따른 배지 조성을 Table 1에 나타냈다. 탄소원과 질소원으로서 56mM glucose와 0.12mM ammonium tartrate가 함유된 growth medium I을 control medium으로 사용하였고, growth medium II에는 1.5mM veratryl alcohol (3,4-dimethoxybenzyl alcohol)을 첨가하였다. 그리고 growth medium III과 IV는 질소의 농도를 변화시켜 상대적으로 질소원이 풍부한 배지로 구성하였다. 그 밖에 균류의 성장을 위해 무기염류와 vitamin을 동일하게 첨가하였으며, 배지의 pH는 별도로 조정하지 않았다.

*P. chrysosporium*의 배양을 위하여 Table 1에 제시된 growth medium을 각각 2L씩 제조하여 medium별로 준비된 10개의 250mL Erlenmeyer flask에 150mL씩 나누어 채워 멸균(121°C, 15분)한

후, YM broth agar 배지에서 2~3일 배양된 균주를 cork borer(No. 2, 직경 5mm)로 5조각씩 동일하게 취하여 medium이 채워져 있는 Erlenmeyer flask에 접종하여 진탕배양(39°C, 150rpm)하였다. 그리고 *P. chrysosporium*의 배양에 따른 성장 특성 조사는 1일 간격으로 10일 동안 growth medium 형태에 따라 Erlenmeyer flask 한 개씩으로부터 기질의 농도, pH, 균사체 건조중량 및 lignin peroxidase의 활성도를 측정하였다.

Table 1. The composition of growth medium

Components	Growth Medium			
	I	II	III	IV
Glucose	1.0	1.0	1.0	1.0
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.0	2.0	2.0	2.0
CaCl <sub>2</sub>	0.1	0.1	0.1	0.1
Veratryl alcohol	NA <sup>1)</sup>	0.252	NA	NA
MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	0.5	0.5	0.5	0.5
Thiamine	0.001	0.001	0.001	0.001
(NH <sub>4</sub> ) <sub>2</sub> C <sub>4</sub> H <sub>4</sub> O <sub>6</sub>	0.0221	0.0221	6.5	NA
NH <sub>4</sub> Cl	NA	NA	NA	5.8

<sup>1)</sup> NA : not added

### 2.3 분석

Lignin peroxidase의 활성도는 veratryl alcohol이 veratraldehyde로 산화되는 반응을 이용하여 결정하였으며[17], veratraldehyde의 생성량은 UV-visible spectrophotometer(Varian Cary 3)를 사용하여 310nm에서 측정하였다. 사용된 물 흡광계수는 9,300 M<sup>-1</sup>cm<sup>-1</sup>이었으며, 시료 500 μL에 반응 용액(220mM sodium tartrate, 3.33mM veratryl alcohol, tartaric acid(pH 3)) 450 μL와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>(10mM) 50 μL을 첨가하여 5분 동안 반응시켰다. Lignin peroxidase의 활성도 단위는 U/l이며, 1 unit(U)는 상기 조건에서 1 μmol의 veratryl alcohol이 1분 동안 veratraldehyde로 전환되는 양을 의미한다.

*P. chrysosporium*의 균사체 건조중량은 Whatman GF/C filter로 여과하여 105°C에서 2시간 동안 건조시킨 건조중량으로 측정하였다. 그리고 배양액의 COD와 NH<sub>4</sub><sup>+</sup>-N의 농도는 Standard Methods[18]에 준하여 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

*Phaenrochaete chrysosporium*을 YM broth (Difco)에서 진탕배양(39°C, 150rpm)하면서 성장 형태를 관찰하였다. *P. chrysosporium*은 교반 조건인 액체배지에서 spore inoculum으로부터 배양하는 동안 실 모양의 균사를 뿜으며 성장하고, 그

결과 균사의 망상조직인 균사체를 형성하였다(Fig. 1). 또한 *P. chrysosporium*은 균사의 신장과 분지로 구형의 pellet 형태로 성장하는 특성을 나타냈으며, 배양 기간의 경과에 따라 pellet의 수는 다양한 크기로 증가하는 경향을 보였다. Fig. 2는 진탕 배양 조건하에서 10일 경과 후 형성된 균류의 pellet을 나타낸 사진이다. Pellet의 크기는 교반 강도와 통기 정도에 따라 다르게 나타나기도 하며 [19], Leisola 등[20]은 pellet의 크기에 비례하여 ligninase의 활성도가 증가한다고 보고하였다.

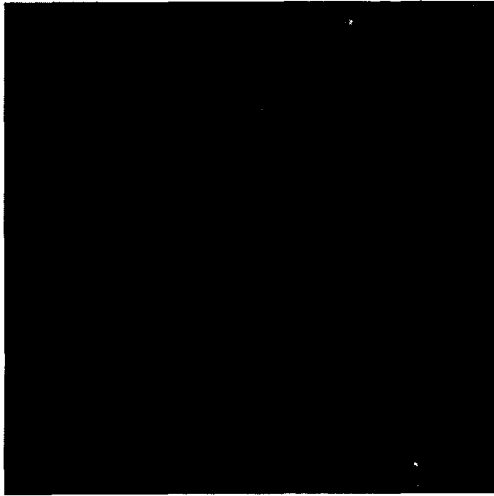


Fig. 1. Photomicrograph(10×40) of *Phanerochaete chrysosporium* mycelia grown in YM broth.

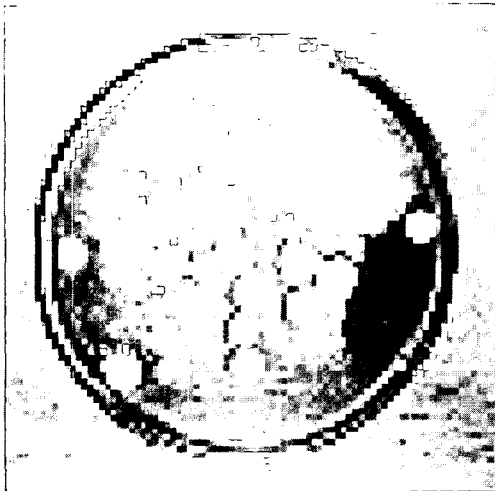


Fig. 2. Photograph of mycelial pellets formed by *Phanerochaete chrysosporium* grown under shaking submerged culture condition.

백색부후균은 성장을 위한 기질로서 리그닌을 직접적으로 이용하지는 않으며 cellulose, hemicellulose, glucose, glycerol 등 쉽게 대사될 수 있는 성장기질의 존재하에서 리그닌을 분해하고, 기질의 고갈과 함께 생장이 제한되면 1차 대사에서 2차 대사과정으로 전환되는 대사형식을 갖는다[21].

*P. chrysosporium*은 최소영양배지로 이루어진 Table 1의 growth medium 들에서도 Fig. 2와 같은 구형의 pellet 형태로 성장하였으며, 시간의 경과에 따라 기질의 감소와 함께 점차적으로 균사체 생장이 증가하는 경향을 나타냈다(Fig. 3).

기본배지로 이루어진 growth medium I을 이용한 *P. chrysosporium*의 액체 배양에서 균사체는 배양 6일까지 선형적인 증가를 보였으며, 그 이후부터는 정지기를 나타냈다. *P. chrysosporium*은 배양 4일에 최대 성장률 13mg/day를 나타냈으며, 배양 6일 경과 후의 균사체 건조중량은 330mg/L였다. 균사체 성장에 따른 유기물의 변화를 COD로 측정하여 본 결과 초기 농도 1,165mg/L에서 배양 10일 경과 후 65%정도가 감소되었으며, 질소원으로 이용된 암모니아는 초기 농도 4.8mg/L에서 24시간 배양 후 90% 이상이 소모되었다.

Veratryl alcohol은 *P. chrysosporium*의 2차 대사산물로서 phenylalanine으로부터 생성되며, lignin peroxidase의 합성을 유도하는 것으로 알려져 있다[14,22]. Lignin peroxidase의 활성도를 증가시키기 위한 veratryl alcohol의 최적농도는 연구자들마다 다소 차이는 있으나, 대략 0.4~2mM 범위인 것으로 보고되고 있다[13,14,20]. 본 연구에서는 1.5mM의 veratryl alcohol을 첨가하였다.

Veratryl alcohol을 배양 초기에 첨가한 growth medium II의 경우 *P. chrysosporium*의 생장은 growth medium I에서의 성장과 유사한 경향을 보였다. *P. chrysosporium*은 medium에서 성장하여 배양 4일 경과 후 300mg/L의 균사체 성장을 나타냈으며 최대 성장률은 10mg/day였다. 배양액에서의 COD 농도는 10일 경과 후 초기 농도 1,610mg/L에서 1,070mg/L로 감소하였으며, 이때 대부분의 잔류 COD는 첨가된 veratryl alcohol인 것으로 판단된다. 또한 암모니아는 24시간 경과 후 약 94%가 제거된 0.25mg/L를 나타냈다.

질소원으로 6.5g/L의 ammonium tartrate를 첨가한 growth medium III에서의 균사체 생장은 배양 4일에 최대 성장률인 41mg/day를 나타냈으며, 배양 10일 경과 후 467mg/L로 다른 medium에 비해서 높은 균사체 성장을 보였다. 그리고 배양액에서의 COD와 암모니아의 초기 농도는 각각 3,880mg/L와 1,320mg/L였으며, 배양 10일 경과 후 각각 33%와 20%의 감소율을 나타냈다.

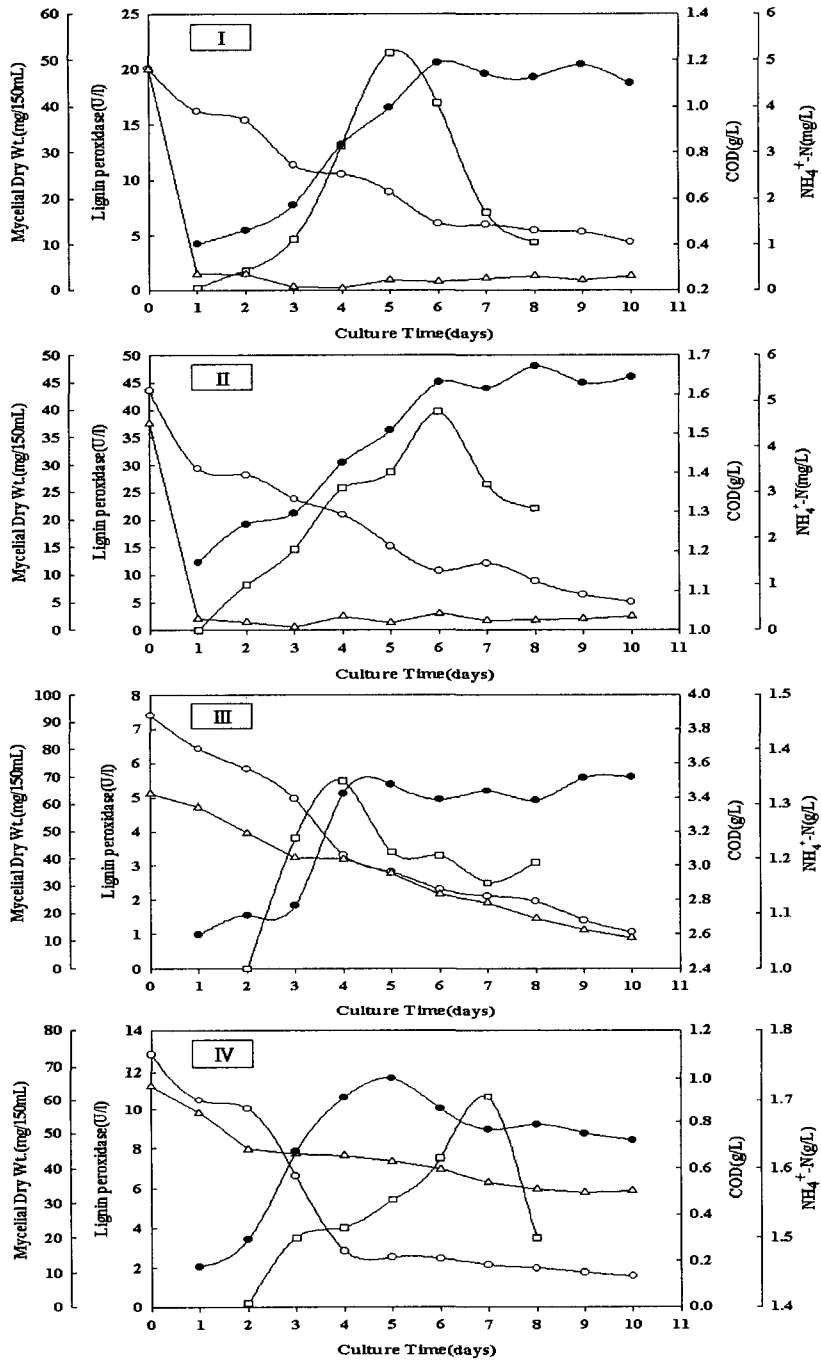


Fig. 3. Variations of mycelial growth, lignin peroxidase, COD, and  $\text{NH}_4^+\text{-N}$  during the cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* in growth media I, II, III, and IV. (● : Mycelial Dry Weight, □ : Lignin peroxidase, ○ : COD, △ :  $\text{NH}_4^+\text{-N}$ )

Growth medium IV는 탄소원에 비해 암모니아가 높은 농도로 구성된 medium으로서 배양액의 COD 농도는 초기 농도 1,100mg/L에서 배양 10일 경과 후 88%가 감소된 135mg/L를 나타냈으나 암모니아의 소모율은 10% 미만이었다. Growth medium IV에서의 균사체 생장은 배양 4일에 최대 성장률 24mg/day를 나타냈으며, 배양 6일까지 447mg/L의 균사체 성장을 보였으나 그 이후부터는 사멸기를 나타냈다.

Growth medium의 조성에 따라 *P. chrysosporium*으로부터 생성되는 lignin peroxidase의 활성도를 측정된 결과는 Fig. 3과 같다. Growth medium I에서의 lignin peroxidase 활성도는 배양 5일 경과 후 21.5U/l를 나타냈으며, medium II는 배양 6일 경과 후 40U/l로 가장 큰 활성도를 보였다. 그러나 질소원의 초기 농도가 높았던 growth medium III와 IV는 5~10U/l의 낮은 활성도를 나타냈다. Growth medium II에서의 높은 lignin peroxidase 활성도는 첨가된 veratryl alcohol에 의한 것으로 2차 대사과정에서 veratryl alcohol은 lignin peroxidase의 유도 기질로 작용하여 lignin peroxidase 생성을 촉진시킨 것으로 판단되며[11], 반면에 veratryl alcohol은 *P. chrysosporium*의 생장에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다. Growth medium I과 II에서 *P. chrysosporium*의 배양 기간에 따른 lignin peroxidase 생성 과정을 살펴보면, lignin peroxidase 활성도는 대부분 medium으로부터 암모니아가 결핍되는 시기와 균사체의 성장률이 최대를 나타낸 기간 이후부터 나타나는 경향을 보였다. Keyser 등[5]은 질소제한배지에서 *P. chrysosporium*을 정지배양했을 때 배지내의 질소가 고갈된 후 리그닌 분해 효소 시스템의 출현을 조절한다고 보고하였고, Jeffries 등[7]은 *P. chrysosporium*을 질소제한배지에서 배양했을 때 질소원이 고갈됨에 따라 생장이 중단되고 2차 물질대사가 일어나 이때에 리그닌을 분해한다고 하였다. Faison과 Kirk[22]은 *P. chrysosporium*에 의한 lignin peroxidase 활성도는 탄소원에 비해 질소원이 제한되는 조건에서 더욱 높은 활성도를 나타낸다고 하였다. 따라서 growth medium III와 IV에서 질소원으로 사용된 암모니아는 1차 성장을 위한 고정 질소로는 사용되었으나, 1차 성장 이후 높은 농도로 잔류되어 있는 암모니아는 *P. chrysosporium*의 2차 대사과정을 제한하여 LiP 생성을 억제한 것으로 보인다. 문헌에 따르면 균류의 2차 대사과정에 질소를 첨가할 경우 리그닌 분해와 veratryl alcohol의 합성이 감소되는 것으로 보고되었다[9,22].

Fig. 4는 *P. chrysosporium*의 배양을 통해 액체 배지에서의 pH 변화를 조사한 결과이다. Growth

medium I, II, III, IV의 초기 pH는 각각 4.8, 4.7, 5.66, 4.5였으며 배양 10일 경과 후 pH는 각각 4.0, 3.85, 4.8, 3.6으로 감소하는 경향을 나타냈다. 그러나 Roch 등[20]의 연구에서는 *P. chrysosporium* INA-12를 질소가 풍부한 배지 조건에서 6일 동안 정지배양했을 때 액체 배지내의 pH는 다소 증가하는 경향을 보였으며, 특히 초기 pH 5.0에서 최대 활성도를 나타냈다. 이러한 결과로 볼 때 *P. chrysosporium*은 pH에 대한 적응력이 우수하고, 생장에 필요한 액체 배지의 pH를 조절하는 능력이 있는 것으로 판단된다. 일반적으로 균류는 선택적으로 이온을 흡수하고 교환하는 방법으로 주위의 pH를 변화시켜 어느 정도 생장에 적합한 환경을 만든다[1]. 예를 들면  $\text{NH}_4^+$ 의 흡수는  $\text{H}^+$ 과의 교환으로 외부 pH를 4 또는 그 이하로 저하시키고, 반대로  $\text{NO}_3^-$ 의 흡수는 외부 pH를 1정도 증가시킨다[1].

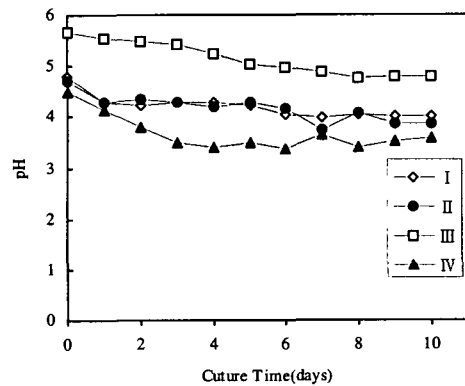


Fig. 4. Changes of pH during the culture of *Phanerochaete chrysosporium* in growth media I, II, III, and IV.

이상의 결과에 의하면 액체 배지에서 대부분의 COD 감소는 *P. chrysosporium*의 생장에 필요한 기질로 사용된 glucose의 소모에 의한 것으로 판단되며, *P. chrysosporium*은 질소원의 초기 농도가 높은 배양 조건에서 높은 균사체 성장과 COD 제거율을 보였으나 LiP의 활성도는 낮게 나타나는 경향을 나타냈다. 본 연구에서는 균류의 성장과 리그닌 분해 효소의 활성도에 영향을 미치는  $\text{O}_2$ , 미량원소, Tween 80 등의 외적 인자들을 고려하지 않은 최소영양배지를 이용하였으나, 효소 활성도를 높이고 활성을 유지하기 위해서는 적절한 inducer와 cofactor의 첨가가 필요할 것으로 생각되었다.

## 4. 결론

*Phanerochaete chrysosporium*의 액체 배양을 통하여 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

- 1) *P. chrysosporium*은 최소영양배지의 진탕 액체 배양조건에서 직경이 약 1~5mm 크기의 작은 구형 pellet을 형성하며 성장하는 특성을 나타냈다.
- 2) *P. chrysosporium*은 질소제한 배지보다 질소가 풍부한 배지 조건에서 약 40% 정도 높은 균사체 건조중량을 나타내며 성장하였으나, 상대적으로 5~10U/l의 낮은 lignin peroxidase 활성도를 나타냈다.
- 3) Lignin peroxidase의 유도 기질로 작용하는 veratryl alcohol은 lignin peroxidase 활성도를 촉진시키는 역할을 하는 것으로 조사되었으며 *P. chrysosporium*의 성장에는 별다른 영향을 미치지 않는 것으로 분석되었다.
- 4) *P. chrysosporium*의 1차 성장을 위해서는 쉽게 이용할 수 있는 탄소원 및 고정 질소원이 필수적인 것으로 판단되며, *P. chrysosporium*의 2차 대사와 lignin peroxidase 활성도를 위해서는 질소원의 제한이 필요할 것으로 판단된다.

## 참 고 문 헌

- [1] J. W. Deacon, *Modern Mycology*, 3th ed., Blackwell Science Ltd., Oxford, 1997.
- [2] 송연홍, 최철민, 김창진, 신광수, "흰구름버섯 (*Colrotus hirsutus*)에 의한 방향족 염료의 탈색", *미생물학회지*, Vol. 33, pp. 252-256, 1997.
- [3] M. Tien, and T. K. Kirk, "Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*", *Methods Enzymol.*, Vol. 161, pp. 238-249, 1988.
- [4] A. Paszczynski, V. -B. Huynh, and R. Crawford, "Comparison of ligninase-1 and peroxidase-M2 from the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", *Arch. Biochem. Biophys.*, Vol. 244, pp. 750-765, 1986.
- [5] P. Keyser, T. K. Kirk, and J. G. Zeikus. "Ligninolytic enzyme system of *Phanerochaete chrysosporium* : synthesized in the absence of lignin in response to nitrogen starvation". *J. Bacteriol.* Vol. 135, pp. 790-797, 1978.
- [6] T. K. Kirk, E. Schultz, W. J. Connors, L. F. Lorenz, and J. G. Zeikus. "Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*". *Arch. Microbiol.*, Vol. 117, pp. 277-285, 1978.
- [7] T. W. Jeffries, S. Choi, and T. K. Kirk, "Nutritional regulation of lignin degradation by *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 42, pp. 290-296, 1981.
- [8] A. B. Orth, E. A. Pease, and M. Tien, "Properties of lignin-degrading peroxidases and their use in bioremediation", pp. 345-363, In G. R. Chaudhry(ed.), *Biological Degradation and Bioremediation of Toxic Chemicals*. Chapman & Hall, London, 1994.
- [9] P. Fenn, and T. K. Kirk, "Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity in *Phanerochaete chrysosporium*", *Arch. Microbiol.*, Vol. 130, pp. 59-65, 1981.
- [10] M. Leisola, D. C. Ulmer, and A. Fiechter. "Factors affecting lignin degradation in lignocellulose by *Phanerochaete chrysosporium*", *Arch. Microbiol.*, Vol. 137, pp. 171-175, 1984.
- [11] B. D. Faison, T. K. Kirk, and R. L. Farrell. "Role of veratryl alcohol in regulating ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 52, pp. 251-254, 1986.
- [12] A. Jager, S. Croan, and T. K. Kirk, "Production of ligninase and degradation of lignin in agitated submerged cultures of *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.* Vol. 50, pp. 1274-1278, 1985.
- [13] T. K. Kirk, S. Cora, and M. Tien. "Production of multiple ligninase by *Phanerochaete chrysosporium* effect of selected growth conditions and use of a mutant strain", *Enzyme Microbiol. Technol.*, Vol. 8, pp. 27-32, 1986.
- [14] F. Tonon, and E. Odier. "Influence of veratryl alcohol and hydrogen peroxidase on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 54, pp. 466-472, 1988.
- [15] G. A. Lewandowski, M. Armenante, and D. Pak. "Reactor design for hazardous waste treatment using a white rot fungus", *Wat. Res.*, Vol. 24, pp. 75-82, 1990.
- [16] G. Kang, and D. K. Stevens, "Degradation of phentachlorophenol in bench scale bioreactors using the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*", *Hazardous Waste & Hazardous Materials*, Vol. 11, pp. 397-410, 1994.

- [17] M. Tien, and T. K. Kirk, "Lignin-degrading enzyme from *Phanerochaete chrysosporium*: purification, characterization, and catalytic properties of a unique H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-requiring oxygenase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, Vol., 81, pp. 2280-2284, 1984.
- [18] APHA, AWWA, WEF (1995) *Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater*, 19th ed., American Public Health Association, Washington, D.C.
- [19] S. Linko, "Production of *Phanerochaete chrysosporium* ligninase", *Biotech. Adv.*, Vol. 10, pp. 191-236, 1992.
- [20] M. S. A. Leisola, Thanei-Wyss, and A. Fiechter. "Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerochaete chrysosporium*", *J. Biotechnol.*, Vol. 3, pp. 97-107, 1985.
- [21] T. K. Kirk, W. J. Connors, and J. G. Zeikus, "Requirement for a growth substrate during lignin decomposition by two wood-rotting fungi", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 32, pp. 192-194.
- [22] B. D. Faison, and T. K. Kirk. "Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete chrysosporium*", *Appl. Environ. Microbiol.*, Vol. 49, pp. 299-304, 1985.
- [23] P. Roch, J. A. Buswell, R. B. Chain, and E. Odier, "Lignin peroxidase production by strains of *Phanerochaete chrysosporium* grown on glycerol", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, Vol. 31, pp. 587-591, 1989.