

Phellinus sp.에 의한 리그닌 분해효소의 생산

윤재돈 · 하효철² · 이종숙 · 김정애¹ · 이재성*

영남대학교 자연자원대학, ¹영남대학교 약학대학, ²(주)풀무원 식문화 연구원

(2004년 1월 13일 접수, 2004년 7월 2일 수리)

Phellinus igniarius 26005에 의한 lignin peroxidase의 생산 조건의 최적화를 검토하였다. Lignin peroxidase는 진탕배양보다는 정치배양에서 생산성이 높았으며 최적 생산배지는 malt extract 1 g, yeast extract 0.4 g, glucose 0.4 g, 증류수 100 ml이었다. 효소 생산 유도 물질, Tween 80을 0.005% 수준으로 첨가하였을 때 가장 높은 효소 생산성을 보였으며 veratryl alcohol도 0.4 mM 수준에서 생산성 향상을 나타내었다.

Key words: 말뚝진흙버섯, 리그닌 분해효소, lignin peroxidase, veratryl alcohol, 유도물질

서 론

목질바이오매스는 지구상에서 가장 많이 생산되는 재생가능한 천연자원으로서 주요 구성성분으로 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌으로 구성되어 있다. 그 중 리그닌은 풍부한 방향족 화합물의 결합으로 C-C, C-O-C의 화학구조를 갖는 페닐 프로판 구조를 기본 골격으로 하는 복잡한 그물구조로 일정한 규칙성이 없으며 목재의 약 20-30%를 차지한다. 또한 리그닌은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 견고히 결합되어 있기 때문에 리그닌 분해 기작의 연구는 목질 자원의 효율적 연구에 대단히 중요하다.^{1,2)}

담자균류에 속하는 백색부후균(white rot fungi)의 경우 목질 칩, 법집, 농산폐기물 등에 포함된 리그닌을 효율적으로 분해할 수 있는 것으로 알려져 있으며 여기에는특이적인 단일 효소라기보다는 비특이적인 다양한 리그닌 분해효소들이 관여하는 것으로 보고되고 있다. 이러한 리그닌 분해효소들은 이용한 환경정화,^{3,5)} 펄프 제지산업,^{6,7)} 사료산업⁸⁾ 등에 응용 되고 있다.

리그닌 분해효소들 가운데 가장 분해력이 높을 것으로 생각되는 것으로 리그닌 페록시데이즈(lignin peroxidase; LiP),^{9,11)} 망간 퍼옥시데이즈(manganese peroxidase; MnP)¹²⁻¹³⁾ 그리고 락케이즈(laccase; Lac)^{14,15)}를 들 수 있다. 특히 리그닌 페록시데이즈는 균체의 효소의 당단백질로 복수의 isoenzyme을 가지며 과산화 수소 존재 하에서 비특이적 리그닌 모델 화합물과 여러 가지 방향족 화합물들을 분해시킬 수 있다. 망간 페록시데이즈 역시 과산화 수소 존재 하에서 Mn(II)을 산화시켜 다양한 페놀성 화합물을 분해시킬 수 있다. 리그닌 분해효소들에 대한 연구는 지금까지 *Phanerocheate chrysosporium*, *Trametes versicolor* 등 몇몇 담자균들에 국한되어져 왔다.

최근에 생물공학적인 수법이 발달하여 액체배양된 버섯균사체로부터 다양한 기능성 물질들을 생산하고자 하는 연구들이

진행되고 있으며 특히 약용버섯균사체의 대량생산 및 유용물질 생산에 대한 연구가 활발히 진행중에 있다. 국내에서도 리그닌 분해효소의 생산 및 응용 연구가 진행되고 있으나 대부분 *Phanerocheate chrysosporium* 균주에 대한 연구가 대부분이다.

상업적으로 판매되고 있는 리그닌 분해효소는 laccase뿐이며 (Novozyme, Sigma) lignin peroxidase나 manganese peroxidase는 아직까지 상업적으로 생산되지 않고 있다. 본 연구에서는 LiP의 상업적 생산의 기본 자료를 얻기 위한 실험을 수행하였다.

본 연구에 사용한 진흙버섯류(*Phellinus* sp.)는 담자균문, 민주름 버섯목, 소나무 비늘과에 속하는 진흙버섯속의 균류를 지칭하는 것으로 세계적으로 230여종 이상이 알려져 있고 일반적으로 상황으로 더 잘 알려져 있다. 진흙버섯류에 관한 연구는 항암, 항산화, 항돌연변이 등 다양한 생리활성규명에 초점을 둔 연구대상인 약용버섯이지만 리그닌 분해효소에 관한 연구는 미흡한 상태이다. 본 연구를 통하여 진흙버섯류 중 상대적으로 높은 리그닌 페록시데이즈 활성을 갖는 균주를 선발하고 리그닌 분해효소의 생산 조건 및 특성을 조사하였기에 보고 하고자 한다.

재료 및 방법

공시균주. 리그닌 분해효소 생산 담자균주를 선발하기 위하여 80여종의 담자균주를 대상으로 수행한 1차 스크리닝에서 *Phellinus igniarius* 26005가 가장 높은 lignin peroxidase 생산성을 보였다. 따라서 *Phellinus* 균주 8종을 수집하여 최고 생산 균주를 선발하기로 하고 농업과학기술원과 한국유전자 은행에서 분양받은 *Phellinus* sp. 8종을 대상으로 실험을 실시하였다. 이들 균주를 28°C, potato dextrose agar(PDA)에서 계대배양하면서 실험에 사용하였다.

배양방법. 8종의 *Phellinus* sp. 균주를 28°C, MYG(Malt extract 1.0%, Yeast extract 0.4%, Glucose 0.4%)배지 20 ml에서 7일동안 정치배양으로 전배양을 실시한 후 균사체를 회수하여 증류수 20 ml를 넣고 균질화를 실시하였다. 본 배양은 Table 1과 같은 배지 조성으로 각각 조제한 액체배지를 30 ml씩 넣은

*연락처자

Phone: 82-53-810-2955; Fax: 82-53-816-7365

E-mail: jslee@yumail.ac.kr

300 ml 삼각 플라스크에 전배양한 균사체를 1 ml씩 접종하여 28°C에서 정치배양 및 진탕배양(120 rpm)을 하여 실시하였다. 모든 실험은 3반복씩 실험하였다.

효소의 활성측정. 각각의 액체배양매지에서 1 ml씩 취하여 4°C, 5000 rpm으로 5분간 원심분리한 후 상등액중의 효소활성을 분광광도법으로 측정하였다.

Lignin peroxidase활성(LiP활성)은 Tien과 Kirk¹⁶⁾의 방법에 따라 측정하였는데 활성도 단위는 0°C에서 1분간 1 nmol의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산화하는 것에 해당되는 310 nm에서의 흡광도로 하였다. Manganese peroxidase의 효소 활성도(MnP활성)는 Kofujita 등¹⁷⁾의 방법으로 확인하였다. 활성 농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 465 nm에서의 흡광도로 나타내었다. Laccase의 효소 활성도(Lac활성)는 Kofujita 등¹⁷⁾의 방법으로 확인하였다. 즉 *o*-phenylenediamine을 기질로 하여 활성 농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 440 nm에서의 흡광도로 나타내었다. 각 효소의 활성 측정은 배양중인 각각의 플라스크 3개를 선발하여 평균값으로 나타내었으며 같은 실험을 3회 반복하여 실시하였다.

Glucose 측정 및 균체 성장량 측정. 균사체 성장시 탄소원인 glucose의 양을 측정하기 위하여 당 분석기(YSI Inc., 2700-D Biochem.)를 이용하여 실시하였다.

유도물질 첨가에 따른 리그닌 분해효소 생산성. 리그닌 분해효소의 생산성 향상과 유도원의 영향을 알아보기 위하여 MYG 배지를 기본으로 사용하여 Mn, Cu, Tween 20, Tween 80, veratryl alcohol 등을 농도별로 첨가하여 실험을 하였다. 유도원은 균주의 배양 4일째에 각 농도별로 첨가하였고, 2일 간격으로 배양액을 채취하여 리그닌 분해효소 활성을 측정하였다.

결과 및 고찰

배지 조건에 따른 리그닌 분해효소 생산. Malt-Yeast-Glucose (MYG)배지에서 정치 배양한 *Phellinus* sp. 8종의 리그닌 분해효소 생산성을 측정한 결과 대부분의 균주에서 LiP와 Lac를 생산하였다. 그러나 MnP는 실험한 모든 균주에서 생산되지 않았다. LiP의 경우 ASI 26005가 14일째에 2.2 U/ml로 가장 높게 나타났고, Laccase는 KCTC 16882가 18일째 0.65 U/ml로 가장

Table 1. Composition of culture medium

Ingredient	Medium (g/L)			
	M1	M2	M3	M4
Glucose	20	20	20	4
Malt ext.				10
Yeast ext.		0.2	0.2	4
Bacto-peptone	5			
Ammonium tartrate		0.22	5.53	
KH ₂ PO ₄	0.5	0.5	0.5	
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.05	0.05	0.05	
MnSO ₄ · 6H ₂ O	0.12	0.12	0.12	
0.4 N Na-phthalate		10 ml		
Kirk's salt ¹⁾		50 ml		
pH	5.4	5.4	5.4	

¹⁾Kirk's salt: MgSO₄ 3 g, MnSO₄ 0.5 g, NaCl 1.0 g, FeSO₄ · 7H₂O 0.1 g, CoCl₂ 0.1 g, ZnSO₄ 0.1 g, CuSO₄ 0.1 g, Al₄(SO₄)₂ · 12H₂O 10 mg, H₃BO₃ 10 mg, Na₂MoO₄ · 2H₂O 10 mg, nitrilotriacetate 1.5 g, distilled water 1 l

높게 나타났으며 KCTC 6655, KCTC 16888 균주에서는 생산이 되지 않았다(Table 2). Hattaka¹⁸⁾에 따르면 백색 부후균이 생산하는 리그닌 분해효소의 생산 패턴은 *Phanerochaete chrysosporium*, *Phlebia radiata*와 같은 LiP-MnP그룹, *Dichomitus squaleus*, *Pleurotus ostreatus*, *Rigidoporus lignosus*와 같은 MnP-Lac그룹, *Phlebia ochraceofulva*, *Junghuhnia separabilima*와 같은 LiP-Lac그룹으로 나누어 보고하였다. 따라서 실험한 5종 8균주의 *Phellinus* sp.의 경우 *Phlebia ochraceofulva*, *Junghuhnia separabilima*와 같은 LiP-Lac그룹에 속한다고 볼 수 있다.

배지조성에 따른 리그닌 분해효소 활성. 본 실험에서 LiP의 생산성이 가장 좋은 ASI 26005 균주를 선발하여 사용하였다. M1배지의 경우 유기질소원인 bacto-peptone을 이용한 고질소원 배지 조건하에서 실시하였다. 20일간 배양하였을 경우 균사체 생산량은 150±10 mg/flask였으나 LiP는 활성을 보이지 않았으며 Lac는 0.1 U/ml 이하로 생산되었다. M2배지의 경우 저질소원의 Kirk배지 조건하에서 실시하였다. 20일간 배양하였을 경우 균사체 생산량은 110±10 mg/flask였으나 LiP는 활성을 나타내지 않았으며 Lac생산은 0.1 U/ml 이하로 생산되었다. M3

Table 2. Production of ligninolytic enzyme by *Phellinus* sp.

Basidiomycetes	Scientific name	Enzyme activity (U/ml(days))		
		LiP	Lac	MnP
ASI 26004	<i>Phellinus linteus</i>	0.08(20)*	0.11(18)	ND
ASI 26005	<i>Phellinus igniarius</i>	2.2 (14)	0.13(18)	ND
ASI 26011	<i>Phellinus linteus</i>	0.05(20)	0.12(20)	ND
KCTC 6190	<i>Phellinus linteus</i>	ND	0.07(18)	ND
KCTC 6655	<i>Phellinus pini</i>	0.05(16)	ND	ND
KCTC 16882	<i>Phellinus baumii</i>	0.2 (12)	0.65(18)	ND
KCTC 16888	<i>Phellinus ribus fulicis</i>	ND	ND	ND
KCTC 16890	<i>Phellinus igniarius</i>	0.13(14)	0.29(20)	ND
PB	<i>Phellinus baumii</i>	ND	0.25(18)	ND

ND: not detected

*KCTC: 생명공학연구소 유전자원센터 유전자은행 *ASI: 농업과학기술원

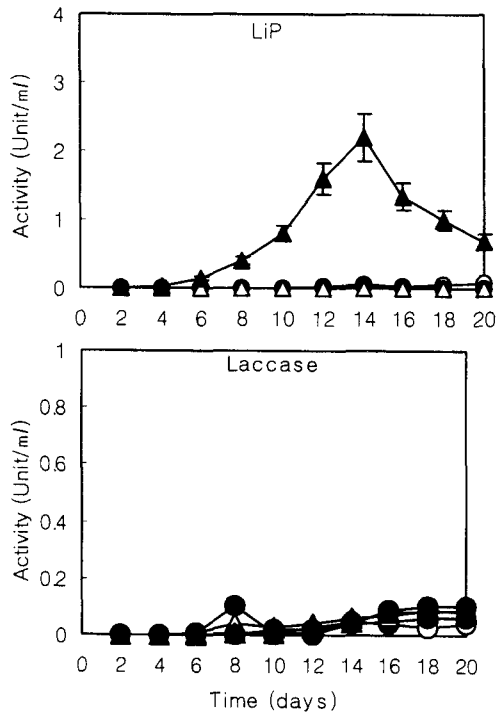


Fig. 1. Ligninolytic enzymes production by *Phellinus igniarius* in various media. ○: M1, ●: M2, △: M3, ▲: M4.

배지의 경우 무기질소원인 ammonium tartrate을 이용한 고질소 원 배지조건하에서 실시하였다. 20일간 배양하였을 경우 균사체 생산량은 120 ± 10 mg/flask였으나 LiP는 활성을 나타내지 않았으며 Lac은 16일 이후 0.1 U/ml 정도 생산하였다. M4배지의 경우 유기질소원인 malt extract를 이용한 고질소원 배지조건하에서 생산하였다. 20일간 배양하였을 경우 균사체 생산량은 140 ± 10 mg/flask였으며 LiP는 6일째부터 활성을 보이기 시작하여 14일째 최대 활성인 2.2 U/ml를 나타내었으며 이후 점차 감소하는 경향을 나타내었다(Fig. 1). 유기질소원인 peptone 과 무기질소원인 ammonium tartrate을 이용한 고질소 조건인 M1, M3 배지조성의 경우 Kaal 등¹⁹⁾이 *Bjerkandera BOS55*균의 액체배양에서 LiP활성이 높았다고 보고하였으며, Ha²⁾는 *Pleurotus ostreatus*의 액체배양에서 LiP활성은 나타나지 않았으며 MnP활성이 높았다고 보고한 바 있다. Kirk배지를 이용한 저질소 조건인 M3배지의 경우 여러 연구자들에 의해 리그닌 분해효소 생산균주인 *Ph. chrysosporium*균의 액체배양에서 LiP, MnP활성이 높았다고 보고²⁰⁻²³⁾하였으며 Rothschild 등²⁴⁾은 같은 배지 조건에서 *Irpex lacteus*균의 배양에서 LiP, MnP가 생산되었다고 보고하였다. 본 연구에서 사용한 *Phellinus igniarius* 26005의 경우 지금까지 연구되어져 온 *Ph. chrysosporium*의 LiP를 생산하는 배지조건에서 LiP활성을 나타내지 않았으며 malt extract 배지조건에서 LiP활성을 나타내므로 LiP생산 배지조건이 다른 것을 알 수 있었다. 그러나 *Phellinus igniarius*의 리그닌 분해효소의 생산조건에서 유기질소원인 malt extract 배양조건에서 LiP활성이 높게 나타나는지 명확하게 알 수는 없으나 기존에 알려져 있는 veratryl alcohol과 같은 LiP활성을 유도하는 물질에 기인하는 것으로 사료된다.

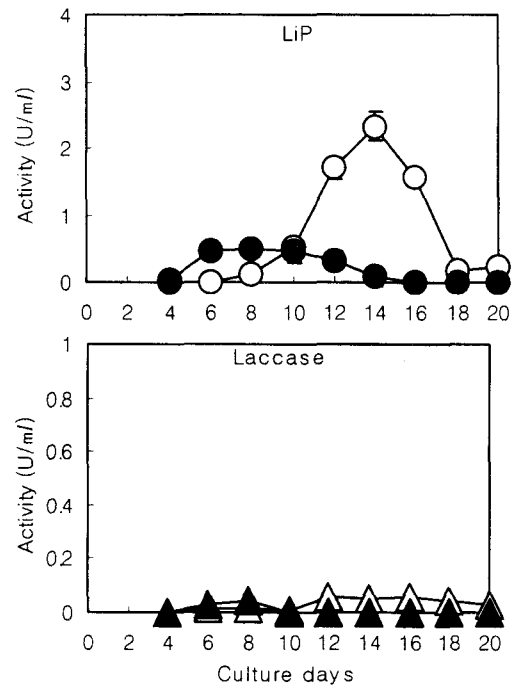


Fig. 2. Ligninolytic enzymes production by *Phellinus igniarius* in stationary culture and shaking culture. ○: LiP activity in stationary culture, △: Lac activity in stationary culture, ●: LiP activity in shaking culture, ▲: Lac activity in shaking culture.

정지배양과 진탕배양에서의 리그닌 분해효소 생산 및 glucose 함량. MYG배지에서 배양방법에 따른 리그닌 분해효소의 생산성을 실험하였다. 정지배양의 경우는 배양 8일째부터 LiP활성을 나타내어 배양 14일째 최대 활성(2.2 U/ml)을 나타낸 뒤 점차 감소하는 경향을 보였으며 Lac활성은 12일째 최대 활성(0.1 U/ml)을 나타낸 뒤 감소하는 경향을 보였다.

진탕배양의 경우 6일째부터 LiP활성을 나타내어 배양 8일째 최대 활성(0.6 U/ml)을 나타낸 뒤 점차 감소하는 경향을 보였으며 Lac활성은 8일째 최대 활성(0.1 U/ml)을 나타낸 뒤 감소하였다(Fig. 2). *Phellinus igniarius* 26005의 배양방법에 따른 리그닌 분해 효소의 생산은 진탕배양보다는 정지배양에서 높은 활성을 갖는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 지금까지 보고된 *Ph. chrysosporium*²⁵⁾, 여러 백색부후균의 LiP, MnP 생산 결과와 비슷한 경향을 나타내었으며 리그닌 분해효소 생산에 있어서 진탕배양의 경우 플라스크당 30 ml의 소량에서 균사체 생산량이 정지배양보다 적었기 때문이기도 하지만 균사체의 성장형태²⁶⁾, 크기²⁷⁾, 전단력에 의한 스트레스 증가²⁸⁾, 용존산소함량²⁹⁾ 등 다양한 원인에 의해 활성이 떨어진 것으로 생각된다.

균사체 생산량 및 glucose 함량을 측정된 결과 진탕배양 및 정지배양의 경우 2일 이후 균사체가 계속 증가하다가 8일, 10일 이후 정지됨을 알 수 있었으며 이때 glucose함량은 거의 고갈된 상태였으며 리그닌 분해효소의 생산도 최대를 보이는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 *P. igniarius* 26005의 경우 균사가 성장한 뒤 탄소원인 glucose함량이 급격히 감소하였을 때 2차 대사산물로 LiP를 생산하는 것으로 생각되며 *Ph. chrysosporium*의 보고^{22,28)}와도 비슷한 결과를 나타내었다.

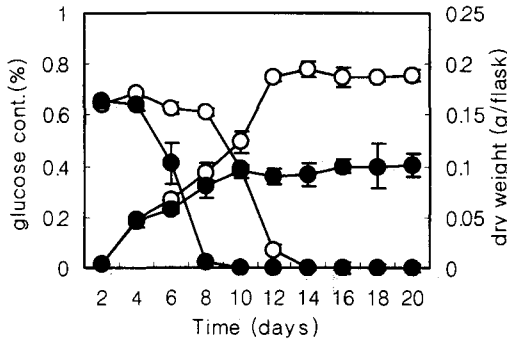


Fig. 3. Profiles of glucose content and dry weight of mycelia by *Phellinus igniarius* in stationary culture and shaking culture. ○: stationary culture, ●: shaking culture.

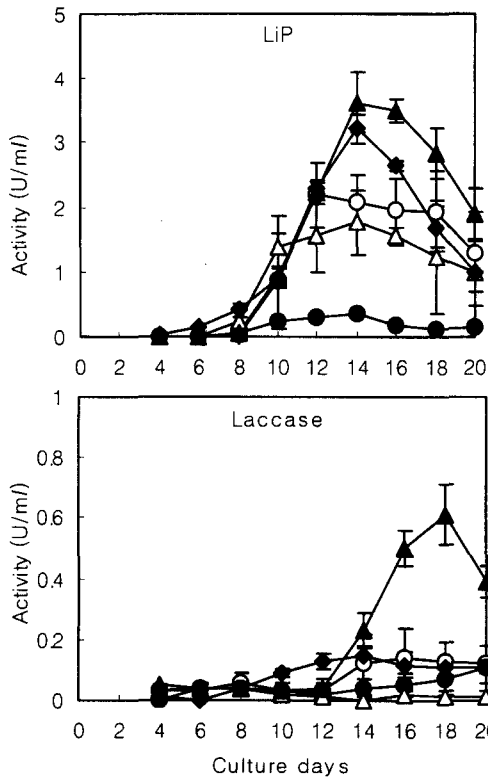


Fig. 4. Ligninolytic enzymes activity by various inducer. ○: Control, ●: Mn (0.1 mM), △: Cu (0.1 mM), ▲: Tween 80 (0.001%), ◆: Veratryl alcohol (0.4 mM).

유도물질 첨가에 따른 리그닌 분해효소 생산성. 다음은 *P. igniarius* 26005균주에 대한 리그닌 분해효소의 생산에 있어서 각각의 유도물질첨가에 따른 리그닌 분해효소의 생산성을 살펴 보았다. 그 결과 Cu, Tween 20을 첨가하였을 경우 LiP활성을 높이는데 영향을 미치지 않았으나 veratryl alcohol의 경우 control 보다 1.1배 높은 활성인 3.2 U/ml, Tween 80의 경우 1.5배정도 높은 활성인 3.6 U/ml을 나타내었다. Lac의 활성의 경우 Cu, Tween 20, veratryl alcohol을 첨가하였을 경우 활성을 증가하는데 영향을 미치지 않았으나 Tween 80을 첨가하였을 경우 control보다 3배가량 높은 0.6 U/ml를 나타내었다.

Veratryl alcohol은 LiP활성의 킬레이트로서 *Ph. chrysosporium*의 2차 대사산물로 보고되어져 있다.^{30,31} Veratryl alcohol을 첨

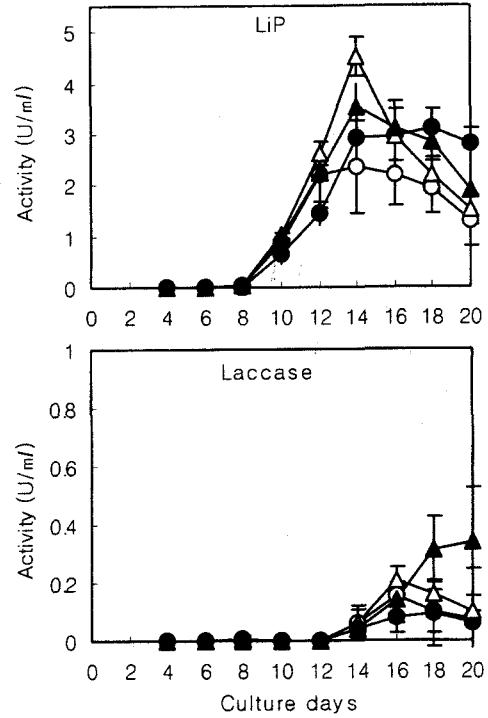


Fig. 5. Time course of ligninolytic enzymes activity by concentration of tween 80. ○: Control, ●: 0.01%, △: 0.005%, ▲: 0.001%.

가하였을 경우, Faison and Kirk³²는 액체배양에서 LiP활성을 증가시키는 것으로 보고한 바 있으며 Dodson 등³³은 *T. versicolor*의 LiP의 활성을 증가시키며 Gianfreda 등³⁴은 *T. versicolor*, *P. radiata*의 Lac의 활성을 증가시켰다고 보고한 바 본 연구에 있어서도 비슷한 결과를 나타내었다.

Tween 80의 경우 비이온 계면활성제로서 세포외로 리그닌 분해효소의 방출을 높여 활성을 증가시켜 주는 것으로 보고되어져 있으며^{35,36}, 본 연구에 있어서도 높은 리그닌 분해효소 활성을 나타내었다. 그러나 *P. igniarius* 26005균주에 있어서 MnP활성의 킬레이트인 Mn이나 Lac활성의 킬레이트인 Cu에 대해서는 리그닌 분해효소의 활성을 증가시키지는 않았다.

Tween 80의 농도에 따른 리그닌 분해효소 생산성. *P. igniarius* 26005균주에 있어서 Tween 80 첨가에 의해 리그닌 분해효소의 활성이 높게 나타났으므로 Tween 80의 농도에 따른 LiP활성의 영향을 관찰하였다. 그 결과, LiP의 경우 0.005%의 농도에서 가장 높은 활성인 4.5 U/ml을 나타내었으며 0.01%의 농도에서 3.6 U/ml, 0.001%의 농도에서 3.2 U/ml의 활성을 나타내었다. 그러나 0.1%이상의 농도일 경우 급격하게 효소활성이 떨어지는 것으로 나타났다. Lac의 경우 0.001%의 농도에서 가장 높은 활성인 0.6 U/ml의 결과를 나타내었다. Tween 80의 농도가 0.1%이상일 경우 급격하게 효소활성이 떨어지는 이유는 최근에 Huang 등³⁷이 낮은 농도에서 Tween 80에 의한 LiP활성은 증가하나 5×10^{-5} M보다 높은 농도에서는 LiP활성이 감소하였으며 이러한 이유는 Tween 80의 농도가 높으면 LiP가 Tween 80와 결합하여 VA의 결합을 저해하는 때문으로 보고한 바 있다. 본 실험에 있어서도 0.1%이상의 농도에서 LiP활성이 떨어진 것도 이러한 이유에 기인하는 것으로 생각된다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린 사업의 일환으로 수행된 연구결과의 일부로 농촌진흥청의 연구비지원에 감사드립니다.

참고문헌

- Kirk, T. K. and Farrell, R. L. (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 465-505.
- Ha, H. C. (2001) Production of ligninolytic enzymes by the edible basidiomycete *Pleurotus ostreatus*, Ph.D. Thesis, Kyoto University, Japan.
- Bumpus, J. A., Tien, M., Wright, M. and Aust, S. D. (1985) Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus. *Science* **228**, 1434-1436.
- Barr, D. P. and Aust, S. D. (1994) Mechanisms white rot fungi use to degrade pollutants. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 78-87.
- Torres, E., Bustos-Jaimes, I. and Borgne, S. L. (2003) Potential use of oxidative enzymes for the detoxification of organic pollutants. *Appl. Catal. B: Environmental* **46**, 1-15.
- Paice, M. G., Raid, I. D., Bourbonais, R., Archibald, F. S. and Jurasek, L. (1993) Manganese peroxidase produced by *Trametes versicolor* during pulp bleaching, demethylates and delignifies kraft pulp. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 260-265.
- de Jong, E., Richard, P. C. and Saddler, J. N. (1997) Effects of a fungal treatment on the brightness and strength properties of a mechanical pulp from douglas-fir. *Bioresorce Technol.* **61**, 61-68.
- Basu, S., Gaur, R., Gomes, J., Sreekrishnan, T. R. and Bisaria, V. (2002) Effect of seed culture on solid-state bioconversion of wheat straw by *Phanerocheate chrysosporium* for animal feed production. *J. Biosci. Bioeng.* **93**, 25-30.
- Tien, M. and Kirk, T. K. (1984) Lignin degrading enzyme from *Phanerocheate chrysosporium*: purification, characterization and catalytic properties of a unique H₂O₂-requiring oxygenase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **81**, 2280-2284.
- Gold, H. and Alic, M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete. *Microbiol. Rev.* **57**, 605-622.
- Purification and characterization of a novel lignin peroxidase from white-rot fungus *Phanerocheate sordida* YK-624. *FEMS Microb. Lett.* **224**, 285-290.
- Gold, M. H. and Glenn, J. K. (1988) Manganese peroxidase from *Phanerocheate chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **161**, 258-264.
- Ha, H. C. and Lee, J. S. (2002) Production of ligninolytic enzymes from *Pleurotus ostreatus* grown on wood meal-wheat bran culture. *J. Korean Soc. Agric. Chem. Biotechnol.* **45**, 124-127.
- Thurston, C. F. (1994) The structure and function of fungal laccases. *Microbiology* **140**, 19-26.
- Barreca, A. M., Fabbrini, M., Galli, C., Gentili, P. and Ljunggren, S. (2003) Laccase mediated oxidation of a lignin model for improved delignification procedures. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **26**, 105-110.
- Tien, M. and Kirk, T. K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenomycete *Phanerocheate chrysosporium*. *Science* **221**, 660-661.
- Kofujita, H., Asad, Y. and Kuwahara, M. (1991) Alkyl-aryl cleavage of phenolic β -o-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Mokuzai Gakkaishi* **37**, 555-561.
- Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 125-135.
- Kaal, E. E. J., Field, J. A. and Thomas, W. J. (1995) Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Technol.* **53**, 133-139.
- Glenn J. K. and Gold M. H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading basidiomycete *Phanerocheate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 1741-1747.
- Gold, M. H. and Alic, M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerocheate chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* **57**, 605-622.
- Tien, M. and Kirk, T. K. (1988) Lignin peroxidase of *Phanerocheate chrysosporium*. *Methods Enzymol.* **161**, 238-249.
- Ruggeri, B. and Sassi, G. (2003) Experimental sensitivity analysis of a trickle bed bioreactor for lignin peroxidases production by *P. chrysosporium*. *Process Biochem.* **38**, 1669-1676
- Rothschild, N., Novotny, C., Sasek, V. and Dosoretz, C. (2002) Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (Polyporus tulipiferae): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Tech.* **31**, 627-633.
- Leisola, MSA, Thanei-Wyss, U. and Fiechter, A. (1985) Strategies for production of high ligninase activities by *Phanerocheate chrysosporium*. *J. Biotechnol.* **3**, 97-107.
- Leisola, MSA and Fiechter, A. (1985) Ligninase production in agitated conditions by *Phanerocheate chrysosporium*. *FEMS Microbiol. Lett.* **29**, 33-36.
- Moreira, M. T., Sanroman, A., Feijoo, G. and Lema, J. M. (1996) Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow. Application to *Aspergillus niger* and *Phanerocheate chrysosporium*. *Enzyme Microb. Tech.* **19**, 261-266.
- Ryu, W. R. and Cho, M. H. (2002) Production of lignin-degrading enzymes by white rot fungi immobilized in a rotating bioreactor. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **17**, 14-19.
- Dosoretz, C. G., Chen, AH-C. and Grethlein, H. E. (1990) Effect of oxygenation conditions on submerged cultures of *Phanerocheate chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **34**, 131-137.
- Lundquist, K. and Kirk, T. K. (1978) De novo synthesis and decomposition of veratryl alcohol by a lignin-degrading basidiomycete. *Phytochemistry* **17**, 1676.
- Fenn, P. and Kirk, T. K. (1981) Relationship of nitrogen to the onset and suppression of ligninolytic activity and secondary metabolism in *Phanerocheate chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **130**, 59-65.
- Faison, B. D. and Kirk, T. K. (1985) Factors involved in the regulation of ligninase activity in *Phanerocheate chrysosporium*.

- Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 299-304.
33. Dodson, P. J., Evans, C. S., Harvey, P. J. and Palmer, J. M. (1987) Production and properties of an extracellular peroxidase from *Coriolus versicolor* which catalyses C α -C β , cleavage in a lignin model compound. *FEMS Microbiol. Lett.* **42**, 17-22.
34. Gianfreda, L., XU, F. and Bollag, J. (1999) Laccase: A useful group of oxidoreductive enzymes. *Bioremed. J.* **3**, 1-25.
35. Venkatadri, R. and Irvine, R. L. (1990) Effect of agitation on ligninase activity and ligninase production by *Phanerocheate chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 2684-2691.
36. Kirk, T. K., Croan, S., Tien, M., Murtagh, K. E. and Farrell, R. C. (1986) Production of multiple ligninases by *Phanerocheate chrysosporium*: effect of selected growth conditions and use of a mutant strain. *Enzyme Microb. Tech.* **8**, 27-31.
37. Huang, X., Wang, D., Liu, C., Hu, M., Qu, Y. and Gao, P. (2003) The roles of veratryl alcohol and nonionic surfactant in the oxidation of phenolic compounds by lignin peroxidase. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **311**, 491-494.

Ligninolytic Enzyme Activity Produced by *Phellinus igniarius* 26005

Jae Don Yoon, Hyo Cheol Ha², Jong suk Lee, Jung-Ae Kim¹ and Jae Sung Lee* (College of Natural Resources and ¹College of Pharmacy, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea; ²Institute of Food & Culture, Pulmuone Co. Ltd, Seoul 120-600, Korea)

Abstract: The optimum conditions for lignin peroxidase production were studied. Lignin peroxidase was produced almost exclusively in stationary culture with the optimum media composition of malt extract 1 g, yeast extract 0.4 g, glucose 0.4 g and distilled water 100 ml. Tween 80 at 0.005% concentration and veratryl alcohol at 0.4 mM were very effective inducers for lignin peroxidase production.

Key words: *Phellinus igniarius*, ligninolytic enzyme, lignin peroxidase, veratryl alcohol, inducer

*Corresponding author