

## 액체배양한 느타리 버섯균(*Pleurotus ostreatus*)으로부터 망간퍼옥시데이즈의 생산 및 특성

하효철\* · 이재성<sup>1</sup>

풀무원 식문화 연구원, <sup>1</sup>영남대학교 자연자원대학 생물자원공학부 식품가공학과

(2003년 10월 21일 접수, 2003년 12월 15일 수리)

리그닌 분해균인 느타리 버섯균(*Pleurotus ostreatus*) K-2946을 glucose-peptone-yeast(G-P-Y) 액체배지에서 배양하여 망간퍼옥시데이즈를 생산하였다. 본 실험조건 하에서 리그닌 퍼옥시데이즈는 생산되지 않았다. 느타리버섯균 K-2946이 생산하는 망간 퍼옥시데이즈를 이온크로마토그래피, 겔크로마토그래피를 이용하여 정제하였다. 정제된 망간 퍼옥시데이즈의 분자량은 36400 Da이었고 pH는 3.95였다. 정제된 효소의 최적 pH는 5.0이었으며 최적 온도는 55°C이었다.

**Key words:** 느타리버섯, 망간퍼옥시데이즈, 액체배양

### 서 론

백색부후균은 일반적으로 버섯이라 불리우는 담자균류에 속하는 것으로 지구상에 가장 많이 생산되는 생물자원인 목질바이오매스를 분해 할 수 있는 능력을 갖고 있다. 특히 목질바이오매스의 주요 구성성분이면서도 난분해성물질로 알려져 있는 다방향족 화합물인 리그닌을 분해할 수 있으며 이러한 분해과정에는 리그닌을 분해할 수 있는 리그닌 분해 효소들이 관여하는 것으로 알려져 있다.<sup>1-3)</sup>

백색부후균이 생산하는 리그닌 분해 효소로는 리그닌 퍼옥시데이즈(lignin peroxidase; LiP; EC 1.11.1.14), 망간 퍼옥시데이즈(manganese peroxidase; MnP; EC 1.11.1.13), 락케이즈(laccase; Lac; EC 1.10.3.2)가 일반적으로 알려져 있다. 최근에는 리그닌 퍼옥시데이즈와 망간 퍼옥시데이즈의 성질을 모두 갖는 퍼옥시데이즈도 생산되는 것으로 보고된바 있다.<sup>4,7)</sup> 또한 백색부후균의 종에 따라 생산되는 리그닌 분해 효소의 종류도 다를 뿐 만 아니라 생육 환경조건, 배지 조성 등에 따라라도 각각의 효소활성에 차이가 나는 것으로 보고되었다.<sup>8)</sup>

이러한 리그닌 분해 효소는 다양한 기질에 대해 비특이적인 반응 기작을 갖고 있어 바이오펄핑(biopulping) 등 여러 가지 산업에 유용하게 이용될 뿐 만 아니라 최근에는 리그닌 분해 효소들이 난분해성 유해화합물을 분해할 수 있는 것으로 알려짐에 따라 환경오염의 수복(bioremediation)에도 응용하려는 연구가 진행되고 있다.<sup>9,12)</sup>

MnP는 대부분의 백색부후균이 생산하는 리그닌 분해에 있어서 중요한 역할을 담당하는 리그닌 분해효소로 알려져 있다. 이 효소는 1984년 Kuwahara 등<sup>19)</sup>의 연구에서 처음 밝혀진 이래 많은 리그닌 분해균에서 발견되어져 왔다.<sup>20)</sup> 지금까지 가장 많

이 연구되어진 리그닌 분해균 *Phanerochaete chrysosporium*은 LiP, MnP를 생산하는 것으로 알려져 있으며 환경조건에 따라 Lac도 생산하는 것으로 보고 되었다.<sup>13-15)</sup> 국내에서도 리그닌 분해효소의 생산 및 응용 연구가 진행되고 있으나 대부분 *P. chrysosporium*균주에 대한 연구에 국한되었다.<sup>16-18)</sup>

느타리버섯(*Pleurotus ostreatus*)은 전세계적으로 생산량이 2위를 차지하며 국내에서는 가장 많이 재배 생산되고 있는 백색부후균이면서 식용버섯이다. 본 연구에서는 느타리버섯균으로부터 리그닌 분해효소 중 하나인 MnP를 분리 정제 하고 특성을 조사하였다.

### 재료 및 방법

**공시균주.** 본 연구에 사용한 균주는 영남대학교 식품가공학과 기능성 식품 연구실에서 보관중인 *Pleurotus ostreatus* K-2946을 사용하였다.

**배양방법.** *P. ostreatus* K-2946 균주를 potato dextrose broth(PDB, Difco Co.) 20 ml에서 28°C, 7일동안 정치배양 하여 균사체를 회수한 후 증류수 20 ml를 넣고 균질화하여 분배양을 위한 접종원으로 사용하였다.

본 배양은 300 ml 삼각플라스크에 glucose-yeast-peptone (glucose 2.0%, Yeast extract 0.2%, bacto-peptone 0.5%, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.1%, MgSO<sub>4</sub> 7H<sub>2</sub>O 0.05%) 액체배지 30 ml씩 넣어 멸균하여 냉각한 다음 전배양의 접종원을 1 ml씩 접종하여 28°C에서 정치배양 하여 실시하였다.

**효소의 활성측정.** 각각의 액체배양으로 부터 1 ml씩 취하여 4°C, 5000 rpm, 5분간 원심분리한 후 상등액을 취해 UV-visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)을 사용하여 아래의 방법을 통하여 활성을 측정하였다.

Lignin peroxidase(LiP)의 효소 활성은 Tien and Kirk<sup>21)</sup>의 방법으로 확인하였다. 활성농도는 1분간 1 nmol의 veratryl alcohol 이 veratryl aldehyde로 산화하는 정도를 310 nm의 파장에서 흡

\*연락저자

Phone: 82-2-3277-8567; Fax: 82-2-3277-8503

E-mail: hcha@pulmuone.co.kr

광도로 나타내었다.

Manganese peroxidase(MnP)의 효소 활성은 Kofujita 등<sup>22)</sup>의 방법으로 확인하였다. 활성농도는 1분간 반응으로 생성된 물질의 흡광도(465 nm)로 나타내었다.

Laccase(Lac)의 효소 활성은 Kofujita 등<sup>22)</sup>의 방법으로 확인하였다. *o*-phenylenediamine을 기질로 하여 1분간 반응으로 생성된 물질의 농도를 440 nm의 흡광도로 나타내었다. 각 효소의 활성측정은 배양중인 플라스크 3개를 선발하여 평균값으로 나타내었으며 같은 실험을 3회 반복하여 실시하였다.

**조효소의 회수 및 농축.** 조효소의 회수 및 농축은 다음과 같이 실시하였다. 본 배양액을 회수하여 amicon diaflo system의 Diaflo PM10(MW cut-off: 10,000) 박막을 이용하여 분자량 10 KDa 이상의 분획물을 농축한 다음 농축액을 4°C에서 하루 밤 투석시킨 뒤 사용하였다. 모든 효소의 분리정제 과정은 4°C에서 실시하였다.

**총단백질 정량.** 총단백질 정량은 Bradford 방법<sup>23)</sup>에 따라 reagent 1 ml을 시료와 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Bovine serum albumin(Sigma Co.)표준곡선을 기준으로 시료 중 단백질 함량을 측정하였다.

**효소의 정제.** 박막여과에 의해 농축시킨 조효소액을 20 mM succinate buffer(pH 4.5)로 평형화 시켜 놓은 이온 교환 크로마토그래피 컬럼(ion exchange chromatography column)에 주입하고 염농도를 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 N로 단계적으로 증가하여 분리하였다. MnP의 분리 정제는 DEAE-Sepharose CL-6B column (Amersham Pharmacia Biotech, UK)으로 실시하였으며 분광광도계를 이용하여 MnP 활성을 갖는 분획을 모아서 박막여과장치를 이용하여 농축하였다. 농축한 MnP 활성분획을 그 다음은 Superdex 75 prep grade column(HiLoad Amersham Pharmacia Biotech, UK)을 이용하여 분리 하였으며 최종적으로 Mono-Q anion-exchange column(Amersham Pharmacia Biotech, UK)을 이용하여 염농도에 따른 gradient방법에 따라 망간퍼옥시데이즈(MnP)를 분리 정제하였다.

**겔 전기영동(gel electrophoresis).** 단백질의 전기영동은 Phast System(Amersham Pharmacia Biotech, UK)에 의한 SDS-PAGE에 의해 실시하였다. 분자량 마커는 다이이치사(Daiichi Pure Chemicals, Japan)의 standard mark를 사용하였다. 단백질의 등전점 측정은 Multiphor II system(Pharmacia Co.)을 이용하여 Yoshida 등<sup>24)</sup>의 방법에 의해 실시하였다. 단백질 밴드 염색은 Coomassie blue로, 활성염색은 3,3-diaminobenzidine을 기질로 염색하였다. 전기영동한 겔은 Servalyt Precoats(Serva Electrophoresis, Germany)를 사용하였으며 표준마커는 pI calibration kit(pI range 2.4-5.65, BDH

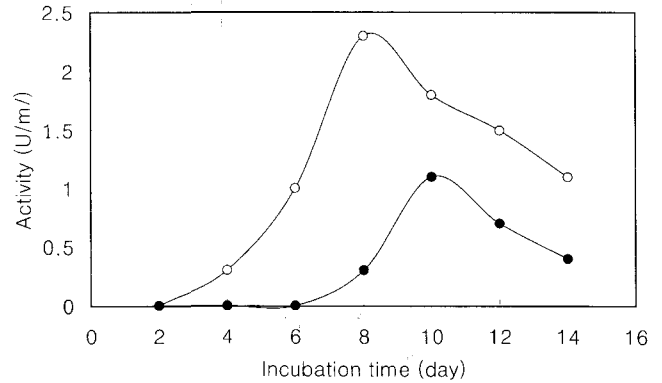


Fig. 1. Time course of ligninolytic enzyme activities produced by *P. ostreatus* K-2946 in G-Y-P liquid culture medium. ○: laccase activity; ●: manganese peroxidase activity.

BmbH, Germany)를 사용하였다.

## 결과 및 고찰

**정체배양에 의한 리그닌 분해효소의 생산.** Glucose-yeast-peptone(G-Y-P)액체배지에서 배양한 느타리 버섯균으로부터 리그닌 분해 효소의 생산에 대한 경시변화를 나타낸 결과이다(Fig. 1). G-Y-P 액체배지에서 배양하였을 때 laccase 활성은 배양개시 후 8일째, 2.3 U/m의 최대활성을 나타내었으며 MnP 활성은 10일째, 1.1 U/m의 최대활성을 나타낸 후 서서히 감소하였으나 LiP의 활성은 확인 되지 않았다. 이러한 결과는 느타리버섯균을 고체배지인 Wood meal-wheat bran배지에서 배양하였을 경우 리그닌 분해효소 중 laccase가 먼저 4.3 U/m의 최대활성을 나타낸 뒤 MnP가 0.8 U/m의 최대활성을 나타내며 리그닌 퍼옥시데이즈(LiP)는 생산되지 않았다는 이전의 결과와 일치 하였다.<sup>25)</sup> 또한 느타리버섯균은 다양한 실험 배지에서 LiP를 생산하지 않는다는 보고와도 같은 결과를 보여주었다.<sup>26-28)</sup> 따라서 느타리버섯균이 생산하는 리그닌 분해효소는 대표적인 리그닌 분해균으로서 많이 연구되어진 *P. chrysosporium*이 생산하는 리그닌 분해효소와는 다른 것으로 추측된다.

**망간 퍼옥시데이즈의 분리 및 정제.** 느타리버섯균 *P. ostreatus* K2946로부터 리그닌 분해효소인 MnP를 분리 정제한 결과는 Table 1 및 Fig. 2, 3과 같다. 액체 배양을 통해 MnP를 생산한 뒤 조효소액을 Amicon PM-10 박막여과장치를 이용하여 분자량 10 KDa 이상의 분획물을 농축하였다. 농축한 분획물을 20 mM Na-succinate buffer(pH4.5)로 평형화 시켜놓은 이온 교환크로마토그래피에서 분획한 결과 염농도가 0.1N의 분

Table 1. Purification of MnP produced by *P. ostreatus* K-2946

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (units/mg)	Yield (%)	Purification (fold)
Crude enzyme	830	40.1	20.7	100	1.0
Ultrafiltration	750	32.5	23.1	90.4	1.1
DEAE-Sepharose	360	1.9	189.5	43.4	9.2
Superdex 75	265	0.63	420.6	31.6	20.3
Mono Q	63.5	0.13	488.5	7.7	23.6

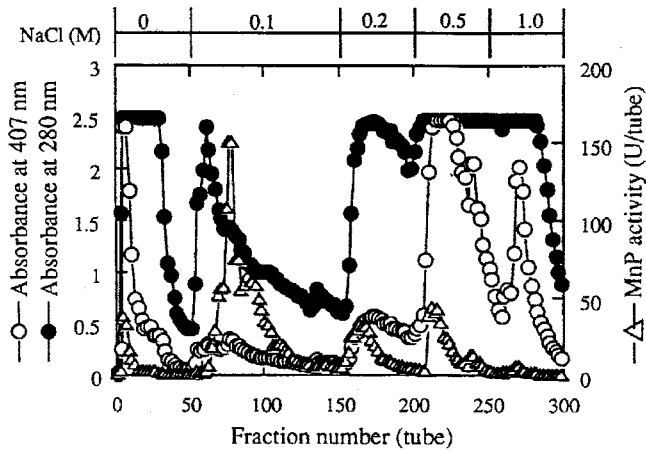


Fig. 2. Fractionation of MnP from *P. ostreatus* K-2946 by DEAE-Sepharose ion exchange chromatography. ●: absorbance at 280 nm; ○: absorbance at 407 nm; △: MnP activity (U/tube).

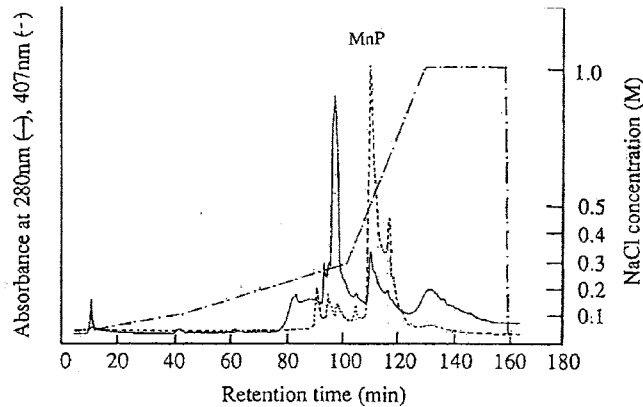


Fig. 3. Separation of MnP from *P. ostreatus* K-2946 by Mono-Q column chromatography. —: absorbance at 280 nm; .....: absorbance at 407 nm; - - - - -: NaCl concentration.

획에서 MnP 활성이 나타남을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 이러한 실험 결과는 느타리 균주의 wood meal-wheat bran 고체배지 배양체로부터 생산된 MnP의 부분 정제 결과와 일치한다.<sup>25)</sup> 이온교환크로마토그래피를 통해 분리 정제한 MnP 활성을 다시 박막여과장치에 의해 농축한 다음 superdex 75 prep grade 겔 칼럼 크로마토 그래피를 이용하여 분리 정제 하였으며 최종적으로 Mono-Q 음이온 칼럼 크로마토그래피를 이용하여 MnP를 분리 정제한 결과 retention time 110분경에 큰 peak의 MnP가 분리 정제됨을 확인 할 수 있었다(Fig. 3). 조효소액으로부터 4단계의 정제 과정을 거쳐 얻은 망간 퍼옥시데이즈의 수율은 7.7%, 정제도는 23.6배였다(Table 1).

**겔 전기영동.** 분리 정제한 MnP를 SDS-PAGE젤에서 전기영동하여 단백질 염색을 한 결과 36.4 KD 분자량을 갖는 것으로 판명되었다(Fig. 4). 본 연구에서 분리한 MnP는 Asada 등<sup>29)</sup>이 느타리 버섯인 *P. ostreatus* IFO30160 으로부터 분리 정제한 MnP와 분자량이 비슷하였다. 또한 *Trametes versicolor*, *Bjerkandera adusta*, *Ceriporiopsis subvermispora*, *Phlebia radiata*와 같은 백색 부후균들이 다양한 배지 조건에서 생산되

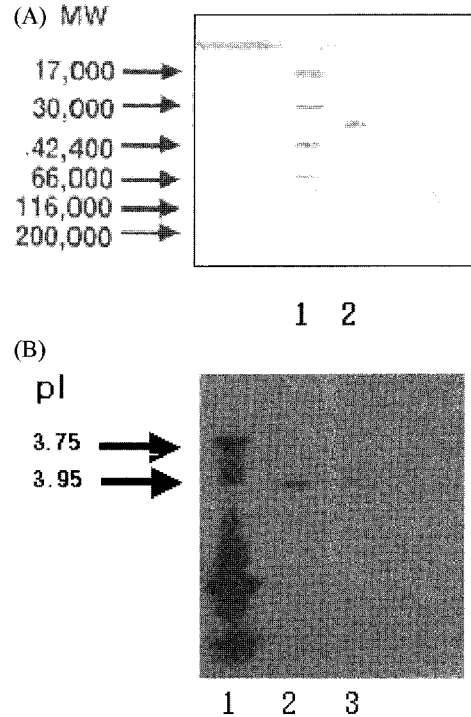


Fig. 4. Electrophoresis of purified MnP from *P. ostreatus* K-2946. A, SDS-PAGE Gel; lane 1: standard mark (MW); lane 2: MnP B, IEF; lane 1: pI mark; lane 2: MnP; lane 3: active stain of MnP.

는 MnP의 분자량과도(36-44 KDa) 비슷하였다.<sup>20)</sup> 본 연구에서 분리정제한 MnP의 등점점은 3.95로 이전에 Ha와 Lee<sup>25)</sup>가 *P. ostreatus* No. 26을 고체배지인 wood meal-wheat bran에 배양한 후 부분 분리 정제하여 얻은 두개의 MnP의 등전점(각각 3.75, 3.95)과 비슷하였다. 이를 통해 G-Y-P 액체배지에서 배양하여 생산된 MnP는 고체배지에서 생산된 MnP의 isoenzyme으로 생각된다. 지금까지 밝혀진 느타리 버섯균 MnP의 isoenzyme과 비교할 때 본 연구에서 분리한 MnP는 isoenzyme 3와 등전점이 같고 분리조건이 일치하는 것으로 보아 역시 isoenzyme 3일 것으로 추정된다.<sup>30)</sup> 그러나 본 연구에서 실험한 느타리버섯 균주인 K-2946의 경우 Asada 등<sup>29)</sup>, Giardina 등<sup>31)</sup>에 의해 보고된 MnP isoenzyme 1, 2의 생산을 하지 않았다. 이에 대해 단백질 수준에서 효소가 세포외로 배출되지 않았는지 혹은 유전자 수준에서 발현되지 않았는지, 또는 MnP isoenzyme 1,2 유전자를 갖고 있지 않은지는 분명하지 않다.

**pH 및 온도에 따른 최적반응조건.** 분리 정제한 MnP의 온도 및 pH에 따른 효소반응 최적조건을 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. 정제한 MnP를 가지고 반응조건을 검토한 결과 Fig. 5, 6에 나타난 것처럼 pH 5.0에서 100%의 활성을 나타내었으며 pH 2.0 이하 혹은 pH 8.0 이상의 경우에 효소 활성을 완전히 잃어버리는 것으로 확인 되었다. 정제한 MnP의 최적온도는 55°C였으며 60°C에서는 약 70%정도의 활성만을 나타내었고 65°C에서는 활성이 급격하게 떨어져 25% 정도 밖에는 나타나지 않았다. 이러한 결과는 Sarkar 등<sup>32)</sup>에 의해 *P. ostreatus*로부터 분리 정제된 MnP의 pH 및 온도에 따른 최적 반응조건과 같으며, Yoshida 등<sup>24)</sup>에 의해 *B. adust*로부터 분리된 MnP의 반

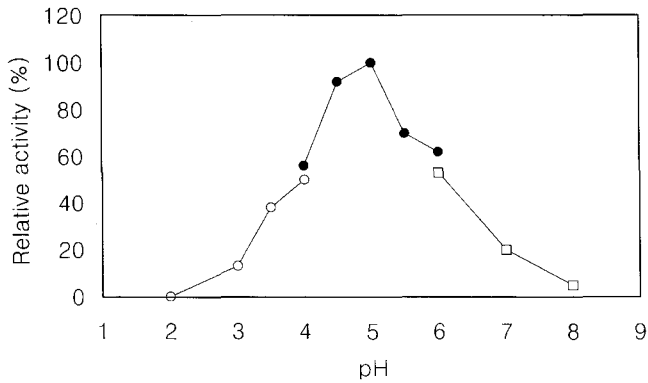


Fig. 5. Effect of pH on the activity of manganese peroxidase produced by *P. ostreatus* K-2946. ○: Na-tartrate buffer (pH2.0-4.0); ●: Na-lactate buffer (pH4.0-6.0); □: Phosphate buffer (pH6.0-8.0).

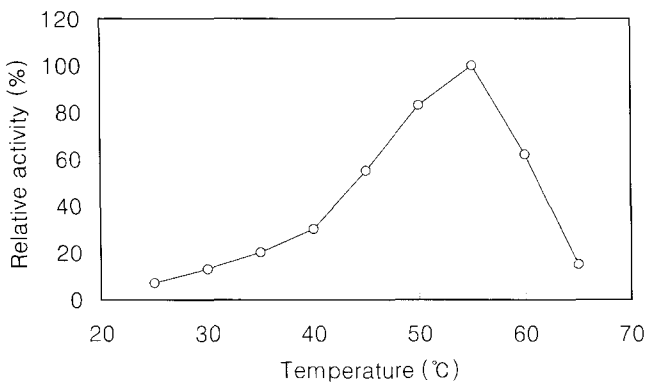


Fig. 6. Effect of temperature on the activity of manganese peroxidase produced by *P. ostreatus* K-2946.

Table 2. Effect of various organic acids on purified MnP of *P. ostreatus* K-2946

Organic acids <sup>a)</sup> (50 mM)	Relative activity (%)
Lactic	100
Tartaric	65
Acetic	51
Malonic	68
Citric	12
Succinic	27
Formic	41

<sup>a)</sup>The MnP activity was measured in the presence of each organic acid buffer at the concentration of 50 mM.

The pH of each organic acid buffer was adjusted to 5.0 by the addition of 10 N NaOH.

응 조건과도 유사한 것으로 확인되었다.

**유기산의 영향.** MnP에 의한 guaiacol의 산화에 유기산의 영향을 알아보기 위하여 실험을 실시하였다. Table 2와 같이 lactic acid 존재하에서 MnP의 활성이 가장 높았다. 반면 Tartaric, malonic acid를 첨가한 경우 효소는 65-68%의 활성을 나타내었으며 citric, succinic acid 첨가의 경우 상대적으로 낮은 활성을 나타내었다. 이러한 결과는 MnP의 경우 lactic acid를 chealator로 이용할 때 효소활성이 높았다는 Wariishi 등<sup>33)</sup>, Yoshida 등<sup>24)</sup>의 결과와 일치하였다.

## 감사의 글

이 논문은 2001년 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었기에 이에 감사를 드립니다(KRF-2001-037-GA0003).

## 참고문헌

- Hammel K. E., Jensen, K. A., Mozuch, M. D., Landucci, L. L., Tien, M. and Pease, E. A. (1993) Ligninolysis by a purified lignin peroxidase. *J. Biol. Chem.* **268**, 12274-12281.
- Kirk, T. K. and Farrell, R. L. (1987) Enzymatic "combustion": The microbial degradation of lignin. *Annu. Rev. Microbiol.* **41**, 465-505.
- Wariishi, H., Valli, K., Renganathan, V. and Gold, M. H. (1989) Thiol-mediated oxidation of nonphenolic lignin model compounds by manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **264**, 14185-14191.
- Arora, D. S., Chander, M. and Gill, P. K. (2002) Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective ligninolysis of wheat straw. *Int. Biodeter. Biodegr.* **50**, 115-120.
- Rothschild, N., Novotny, C., Sasek, V. and Dosoretz, C. G. (2002) Ligninolytic enzymes of the fungus *Irpex lacteus* (*Polyporus tulipiferae*): isolation and characterization of lignin peroxidase. *Enzyme Microb. Tech.* **31**, 627-633.
- Martínez, A. T. (2002) Molecular biology and structure-function of lignin-degrading heme peroxidases. *Enzyme Microb. Tech.* **30**, 425-444.
- Mester, T. and Field, J. A. (1998) Characterization of a novel manganese peroxidase-lignin peroxidase hybrid isozyme produced by *Bjerkandera* species strain BOS55 in the absence of manganese. *J. Biol. Chem.* **273**, 15412-15417.
- Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot-fungi production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* **13**, 125-135.
- Nagarathamma, R., Bajpai, P. and Bajpai, P. K. (1999) Studies on decolorization, degradation and detoxification of chlorinated lignin compounds in kraft bleaching effluents by *Ceriporiopsis subvermispora*. *Process Biochem.* **34**, 939-948.
- Reddy, C. A. (1995) The potential for white-rot fungi in the treatment of pollutants. *Curr. Opin. Biotechnol.* **6**, 320-328.
- Mester, T. and Tien, M. (2000) Oxidation mechanism of ligninolytic enzymes involved in the degradation of environmental pollutants. *Int. Biodeter. Biodegr.* **46**, 51-59.
- Heinfling, A., Martínez, M. J., Martínez, A. T., Bergbauer, M. and Szewzyk, U. (1998) Purification and characterization of peroxidases from the dye-decolorizing fungus *Bjerkandera adusta*. *FEMS Microbiol. Lett.* **165**, 43-50.
- Tien, M. and Kirk, T. K. (1983) Lignin-degrading enzyme from the hymenonycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Science* **221**, 660-661.
- Gold M. H. and Alic, M. (1993) Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol. Rev.* **57**, 605-622.
- Srinivasan, C., D'Souza, T. M., Boominathan, K. and Reddy, C.

- A. (1995) Demonstration of laccase in the white rot basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**, 4274-4277.
16. Seo, Y. S., Ryu, W. R., Chang, Y. K. and Cho, M. H. (2000) Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons using immobilized cells of *Phanerochaete chrysosporium*. *Kor. J. Biotech. Bioeng.* **15**, 247-253.
17. Sang, B. I., Kim, Y. H. and Yoo, Y. J. (1995) Induction and stabilization of lignin peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Microbiol. Biotechnol.* **5**, 218-223.
18. Ryu, W. R., Shim, S. H., Jang, M. Y., Jeon, Y. J., Oh, K. K. and Cho, M. H. (2000) Biodegradation of pentachlorophenol by white rot fungi under ligninolytic and nonligninolytic conditions. *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **5**, 211-214.
19. Kuwahara, M., Glenn, J. K., Morgan, M. A. and Gold, M. H. (1984) Separation and characterization of two extracellular H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>-dependent oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett.* **169**, 247-250.
20. Hofrichter, M. (2002) Review: lignin conversion by manganese peroxidase (MnP). *Enz. Microb. Tech.* **30**, 454-466.
21. Tien, M and Kirk, T. K. (1984) 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* **81**, 2280-2284.
22. Kofujita, H., Asada, Y. and Kuwahara, M. (1991) Alkyl-aryl cleavage of phenolic  $\beta$ -*o*-4 lignin substructure model compound by Mn(II)-peroxidase isolated from *Pleurotus ostreatus*. *Mokuzai Gakkaishi* **37**, 555-561.
23. Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein dye binding. *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
24. Yoshida, S., Yonehara, S., Minami, S., Ha, H.-C., Iwahara, K., Watanabe, T., Honda, Y. and Kuwahara, M. (1996) Production and characterization of ligninolytic enzymes of *Bjerkandera adusta* grown on wood meal/wheat bran culture and production of these enzymes using a rotary-solid fermenter. *Mycoscience* **37**, 417-425.
25. 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.
26. Kaal, E. E. J., Field, J. A. and Joyce, T. W. (1995) Increasing ligninolytic enzyme activities in several white-rot basidiomycetes by nitrogen-sufficient media. *Bioresource Technol.* **53**, 133-139.
27. Fu, S. Y., Yu, H.-S. and Buswell, J. A. (1997) Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Pleurotus sajor-caju*. *FEMS Microbiol. Lett.* **147**, 133-137.
28. Iwamoto, K., Ha, H.-C., Honda, Y., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (1997) Isolation and characterization of manganese (II) peroxidase (MnP) produced by *Pleurotus ostreatus*. *Wood Res.* **84**, 34-36.
29. Asada, Y., Watanabe, A., Irie, T., Nakamura, Y. and Kuwahara, M. (1995) Structures of genomic and complementary DNAs coding for *Pleurotus ostreatus* manganese (II) peroxidase. *Biochem. Biophys. Acta* **1251**, 205-209.
30. Irie, T., Honda, Y., Ha, H.-C., Watanabe, T. and Kuwahara, M. (2000) Isolation of cDNA and genomic fragments encoding the major manganese peroxidase isoenzyme from the white rot basidiomycete *Pleurotus ostreatus*. *J. Wood Sci.* **46**, 230-233.
31. Giardina, P., Palmieri, G., Fontanella, B., Riviaccio, V. and Sannia, G. (2000) Manganese peroxidase isoenzymes produced by *Pleurotus ostreatus* grown on wood sawdust. *Arch. Biochem. Biophys.* **376**, 171-179.
32. Sarkar, S., Marti`nez, A. T. and Marti`nez, M. J. (1997) Biochemical and molecular characterization of a manganese peroxidase isoenzyme from *Pleurotus ostreatus*. *Biochim. Biophys. Acta* **1339**, 23-30.
33. Wariishi, H., Valli, K. and Gold, M. H. (1992) Manganese (II) oxidation by manganese peroxidase from the basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *J. Biol. Chem.* **267**, 23688-23695.

### Production and Characterization of Manganese Peroxidase from the White Rot Fungus *Pleurotus ostreatus* in Liquid Culture

Hyo-Cheol Ha\* and Jae-Sung Lee<sup>1</sup> (Institute of Food & Culture, Pulmuone Co. Ltd., Seoul 120-600, Korea; <sup>1</sup>Department of Food Science and Technology, Yeungnam University, Kyungsan 712-749, Korea)

**Abstract:** The ligninolytic basidiomycete, *Pleurotus ostreatus* K-2946, was produced a manganese peroxidase (MnP) activity when grown in liquid culture with glucose-yeast-peptone (G-Y-P) medium. However, lignin peroxidase (LiP) was not detected in this culture medium. The purification progress of MnP was purified that included chromatography on Sepharose CL-6B, Superdex 75 prep grade and Mono-Q. MnP purified by column chromatography, was 36400 dalton and a pI of 3.95. The optimal pH and temperature of the purified MnP activity were 5.0 and 55°C. The characteristics of MnP produced was quite similar to those of MnP 3 isoenzyme produced by other strains of *P. ostreatus*.

**Key words:** *Pleurotus ostreatus*, manganese peroxidase, liquid culture

\*Corresponding author