

*Funalia trogii*에 의한 Laccase와 Manganese Peroxidase의 생산시 Zn²⁺ 및 Ferulic Acid가 미치는 영향

박철환 · 한은정 · ¹이병환 · ²이진원 · †김상용
한국생산기술연구원 청정공정팀, ¹계명대학교 화학시스템공학과, ²서강대학교 화공생명공학부
(접수 : 2005. 6. 27., 게재승인 : 2006. 2. 16.)

Effect of Zn²⁺ and Ferulic Acid on Laccase and Manganese Peroxidase Production by *Funalia trogii*

Chulhwan Park, Eun-Jung Han, Byunghwan Lee¹, Jinwon Lee², and Sangyong Kim[†]
Green Engineering Team, Korea Institute of Industrial Technology (KITECH), Chonan 330-825, Korea

¹Department of Chemical System Engineering, Keimyung University, Gaegu 704-701, Korea

²Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Sogang University, Seoul 121-742, Korea

(Received : 2005. 6. 27., Accepted : 2006. 2. 16.)

Typical property of the white-rot fungi is their ability to degrade lignin and other aromatic compounds with non-specific extracellular enzyme. In this work, the modification of the strain (*Funalia trogii* ATCC 200800) and the culture condition was performed to enhance enzyme productivity. Single cell was separated by the protoplasts formation and several putative laccase and manganese peroxidase inducers were tested. By adopting the modified strain, enzyme productivity increased comparing with that of the original strain. Extracellular enzyme formation was highly stimulated by the addition of copper and various aromatic compounds in the glucose-based culture medium.

Key Words : White-rot fungi, enzyme, protoplasts, enzyme inducer

서론

염료는 생활문화에 있어 광범위하게 사용되고 있으며, 그에 따라 대량의 염료폐수를 유발한다. 배출된 염료폐수는 색도 등의 오염부하를 유발하게 되며, 분자구조상 아조(azo), 니트로(nitro) 또는 술포(sulpho) 등의 그룹들을 포함하고 있어 자연적으로 분해되기 어렵고, 발암성 물질인 독성 방향족 아민(amine) 형성을 야기하여 환경오염과 인체건강에 유해한 물질을 포함하고 있다(1). 일반적으로 물리·화학적 처리방법으로 흡착, 침전, 여과, 산화 등이 사용되고 있지만, 낮은 경제성과 넓은 정상범위를 가지는 염료·염색 폐수처리에 부적합한 단점을 가지고 있다(2-5). 이를 극복하기 위하여 생물학적 방법을 적용한 다양한 연구들이 꾸준히 진행되어 왔으며, 최근에는 특정 미생물이나 효소를 이용한 연구들이 활발히 진행되

고 있다. 특히, 담자균류에 속하는 백색부후균은 각종 난분해성 물질을 비특이적으로 분해할 수 있는 리그닌 분해효소를 생산하는 것으로 보고되고 있으며, 이러한 리그닌 분해효소는 laccase (β -diphenol oxidase; E.C.1.10.3.2), Mn(II)-dependent peroxidase (MnP; E.C.1.11.1.13), lignin peroxidase (LiP; E.C.1.11.1.14) 등이 알려져 있다(6-8).

이와 같은 효소는 염료분해에 관여하는 경우와 관여하지 않는 경우가 모두 존재하는 것으로 알려져 있다(9-11). 예를 들어, *P. chrysosporium*에 의한 아조, 트리페닐메탄(triphenyl methane), 헤테로환(heterocyclic)과 고분자(polymeric) 염료의 색도제거의 경우, 이러한 염료분해에 LiP가 주요한 역할을 한 반면, MnP는 관여하지 않는다는 연구결과가 보고되었다(9). *T. versicolor*에 의한 아조, 안트라퀴논(anthraquinone), 금속착염(metal complex), 인디고(indigo)의 색도제거 연구에서는 염료분해에 MnP는 관여하지 않은 반면, ligninase-catalyzed oxidation이 염료의 80% 이상을 제거하였다고 보고되었다(10). 본 연구에 사용된 균주인 *Funalia trogii*의 경우, 염료분해에 크게 관여하는 효소는 MnP와 laccase로 보고되고 있으며, 이러한 백색부후균에서 분비되는 laccase는 multiple isoenzymes 형태로 생산되며, extracellular laccase로

† Corresponding Author : Green Engineering Team, Korea Institute of Industrial Technology (KITECH), Chonan 330-825, Korea

Tel : +82-41-589-8356, Fax : +82-41-589-8580

E-mail : sykim@kitech.re.kr

생산되는 양은 매우 적은 경우도 있다. 그리고 xyloidine, p-anisidine, aliphatic alcohols과 같은 방향족이나 페놀 성분을 포함한 물질이 주입될 경우 효소의 생산성이 증가하는 현상도 보고된 바 있으며(12), 구리와 같은 금속이온 역시 효소 활성에 영향을 미치는 것으로 보고되고 있으며, 이에 대한 연구가 최근 다양한 접근 방법으로 이루어지고 있다(13). 이러한 금속이온은 곰팡이로부터 생산되어 분리되는 세포외효소와 직접적으로 상호작용을 할 수 있고, 낮은 농도의 금속이온을 첨가했을 때 효소의 활성을 증가시키며, MnP 경우, Mn 이온이 직접적으로 효소발현을 조절하는 물질로 작용하는 것으로 보고되었다. 또한, Cu 이온의 경우에는 laccase 효소의 보조인자 (cofactor)로 작용하여 촉매역할을 하는 것으로 알려져 있으며, 금속이온이 첨가될 경우 성장이 저하되며 균사형성에 영향을 받아 성장형태 (morphology)가 변화한다고 알려져 있다(13).

본 연구에서는 *F. troglia*로부터 원형질체를 분리하였고, 분리된 균주들의 유전적 변이를 통하여 균주개발을 수행하였다. 또한 이를 위하여 구리이온과 같이 효소활성 유도물질로 알려진 여러 종류의 화학물질들을 첨가하여 *F. troglia*의 효소생산성에 미치는 영향을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

본 연구에서 사용한 균주는 *F. troglia* ATCC 200800로부터 원형질체 분리를 통한 단일 균주를 선별하고, UV 돌연변이 유도를 통한 효소활성이 높은 단일균주를 선별하여 사용하였다. 선별된 균주는 PDA (potato dextrose agar)를 이용하여 계대배양 하였으며, 배양한 균주는 균사배양 상태로 20% 글리세롤 용액에 넣어 -80℃에서 냉동보관하였다.

원형질체 분리 및 형성 방법

원형질체는 세포벽이 없는 상태로, 원형질체를 형성하기 위해서는 세포벽 성분을 제거해야 하며, 본 실험에는 분해 효소로 Novozyme 234와 cellulase (Sigma-Aldrich co.)를 각각 2%의 농도로 사용하였다. 원형질체 형성에 사용되는 균사체는 성장배양할 때와는 달리 성장배양 기간을 줄여 균사성장이 완벽히 이루어지지 않은 성기고 어린 균사체를 이용하였다. 균사체 성장배양 기간은 24시간으로 하였으며, 배양한 균사체는 20% 글리세롤 용액으로 3회 세척하여 배양액 및 배양산물을 제거한 뒤 1 g (wet weight)의 균사체를 측정하여 원형질체 형성에 이용하였다. 처리효소는 삼투압 안정제가 포함된 완충제 (1.2 M MgSO₄, 0.2 M phosphate buffer, pH 5.8) 5 mL에 완전히 용해시켜 사용하였다. 원형질체 형성 반응조건은 30℃에서 2-4시간 정도 반응시켰으며, 교반속도는 50 rpm으로 천천히 교반하였다. 반응이 진행되는 동안 30분 간격으로 샘플을 채취하여 현미경으로 관찰하며 처리시간을 조절하였다. Fig. 1은 균사체로부터 원형질체가 형성되어 분리되는 것을 현미경으로 관찰한 것으로 최종 2시간 정도 반응시 핵을 하나씩 가진 원형질체를 얻을 수 있었으며, 이를 회수하여 재생시킨 결

과 99% 이상의 원형질체 형성률을 보였다.

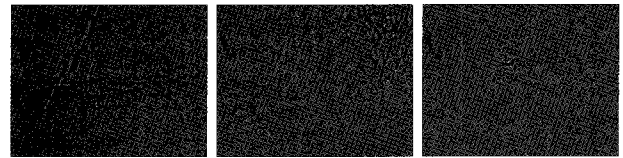


Figure 1. Micrographs of released protoplasts from *F. troglia* mycelium (X 100).

배지 및 배양방법

고체배양 실험을 위하여 PDA에서 배양하여 활성화된 균주를 약 1 cm² 크기로 절단한 후, 액체배지 (20 mL/petridish)에 접종하여 28℃에서 배양하였다. 액체배양 실험은 성장배지 (5 g/L glucose, 10 g/L dextrin, 6 g/L yeast extract, 4 g/L peptone, 2 g/L KH₂PO₄, 0.6 g/L MgSO₄)에서 4일간 배양하고, 활성화된 종배양액을 균질기 (Nissei AM-8 homogenizer, Japan)를 이용하여 2000 rpm에서 10초 균질화시킨 후, 10%를 접종하여 28℃, 120 rpm에서 진탕배양하였다(15). 사용된 배지조성은 5 g/L glucose, 0.22 g/L ammonium tartarate, 0.2 g/L KH₂PO₄, 0.05 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.01 g/L CaCl₂, 1 mg/L thiamine과 10 mL trace elements였으며, 배지의 pH는 2,2-dimethyl succinic acid를 이용하여 4.5로 조절하였다(16). Trace elements의 성분은 0.08 g/L CuSO₄, 0.05 g/L H₂MoO₄, 0.07 g/L MnSO₄ · 4H₂O, 0.043 g/L ZnSO₄ · 7H₂O와 0.05 g/L Fe₂(SO₄)₃이었다.

효소활성도 측정

플라스크에서 배양한 배양액을 10분간 원심분리한 후, 상등액을 효소원으로 하여 반응액과 반응시킨 다음 분광광도계를 이용하여 laccase와 MnP의 활성도를 측정하였다. Laccase의 효소활성도는 McIlvaine (pH 4.6) 원액 2.5 mL와 배양상등액 0.5 mL를 혼합하여 40℃에서 5분간 예열한 후, 4.47 mM syringaldazine 10 μL를 첨가하여 1분간 반응시켜 525 nm에서 흡광도를 측정하였다. MnP 효소활성은 ABTS [Diammonium 2,2-azino-bis(3-ethylbenzothiazoline-6-sulfonic acid)]에 의한 산화반응을 통해 측정하였다. 반응액 1 mL와 0.2 mM MnSO₄를 포함한 50 mM sodium lactate buffer (pH 4.5) 0.5 mL와 ABTS 80 μg/mL에 100 μM H₂O₂ 0.5 μL를 첨가하여 4분간 반응시킨 후 흡광도를 측정하였다. 1 Unit은 분당 1.0의 흡광도를 증가시키는 효소의 양으로 정의하였다(17).

결과 및 고찰

원형질체 분리 및 균주선별

원형질체 분리를 통해 다양한 단일균주를 분리해 낼 수 있었으며, 본 연구에서는 빠른 시간 내에 많은 균주를 테스트하기 위해 agar plug assay를 통해 100여종의 균주선별을 하였다. Agar plug assay 방법은 Ichikawa 등이 개발한 방법을 기초로 하여 수행하였으며, 본 실험에 적합하게 변형하여 적용하였다(18). 염료분해 효소는 세포외효소로 효소 생성 후 세포 밖으로 분비되어 작용함에 따라 agar

plug에 접종하여 배양시 배지내로 원활히 분비되어 그 주변에 분해환 (clear zone)이 형성되는 것을 확인할 수 있었다. 일반적으로 효소측정은 액체배양을 통해 상등액에 분비된 효소를 흡광도 분석을 통해 측정할 수 있으며, 여기에서는 간단한 고체배양 분석을 통해 배양과 분석에 사용되는 장치와 시간의 소모를 줄일 수 있었다. Agar plug assay 분석 결과, 염료가 분해되어 분해환을 형성한 균주와 그렇지 않은 균주가 관찰되어 균주마다 매우 다른 분해능을 확인할 수 있었다. 분리된 여러 균주 중 분해환이 선명한 균주와 분해환이 전혀 나타나지 않고 성장환만 나타난 균주들을 선별하여 액체배양을 통해 agar plug assay 결과의 경향성을 재확인하였으며, 배양시간에 따른 laccase와 MnP의 효소활성도를 Fig. 2에 나타내었다. 액체배양 결과 MnP의 경우, 분해환이 선명한 균주들은 그렇지 못한 균주에 비해 상대적으로 높은 효소생산성을 보였으며 고체배양과 비슷한 경향성을 보였다. 그러나 laccase의 경우, MnP와는 달리 고체배양에서는 분해환을 전혀 형성하지 않은 균주도 액체배양에서 효소생산성을 보이는 것으로 나타났다. 고체배양에서는 MnP에 의해서만 대부분의 염료분해 반응에 작용한 것으로 판단되며, laccase와 MnP 분비확인이 서로 상이한 결과를 나타낸 것으로 사료된다.

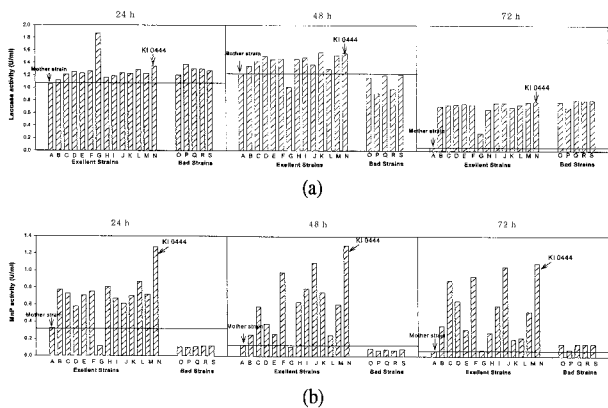


Figure 2. Enzyme activity according to the culture period ((a) Laccase and (b) MnP).

Inducer 첨가가 효소생산성에 미치는 영향

원형질체 분리를 통해 선별된 균주 (*F. troglia* KI 0444)를 적용하여 다양한 inducer 물질들을 첨가하여 그 영향을 조사하였다. 첨가농도는 200 μM로 동일하게 첨가하였으며, 첨가시기는 접종과 동시에 배양액 내에 주입하였다. 액체 배양 조건에서 여러 종류의 inducer를 첨가해 본 결과, 각 성분이 효소활성에 미치는 영향은 매우 다르게 나타났다 (Table 1). 금속이온 중 Zn²⁺의 경우 주로 laccase의 생산성을 증가시키는 것으로 나타났으며, MnP의 경우에는 방향족 화합물의 첨가시 생산성이 미량 향상되는 것으로 나타났다. 그러나 대부분의 경우에 Zn²⁺를 첨가했을 때 오히려 효소생산성이 떨어지는 것으로 나타났으며, 이것은 첨가농도가 높거나 낮다는 것을 암시해 주는 결과로, 실제 균체 농도를 측정하였을 때 대부분이 균체성장의 저해를 받은 것으로 나타났다. Cu²⁺의 경우, 적정 Cu²⁺의 첨가농도가 200 μM이라는 연구결과가 있으며, ferulic acid의 경우에도

150 μM이 적정 첨가농도라는 연구결과가 있다(19). 따라서 inducer의 적정 첨가농도를 조사하기 위해 금속이온 중 가장 효율이 좋은 것으로 판단되는 Zn²⁺와 방향족 화합물 중 ferulic acid를 선정하여 농도별 영향을 조사하였다.

Table 1. Effect of inducer on laccase and MnP production (LSAa: lignin sulfonic acid (alkali), LSA: lignin sulfonic acid)

Inducer	Specific activity of laccase (U/g cell)	Specific activity of MnP (U/g cell)
LSAa	0.1883	0.0380
Ferulic acid	0.2174	0.1562
LSA	0.1970	0.0223
Cu ²⁺	0.2005	0.0211
Zn ²⁺	0.2627	0.1667
Mn ²⁺	0.1853	0.1411
Catechol	0.0219	0.0295
H ₂ O ₂	0.1896	0.1481
Control	0.1520	0.1261

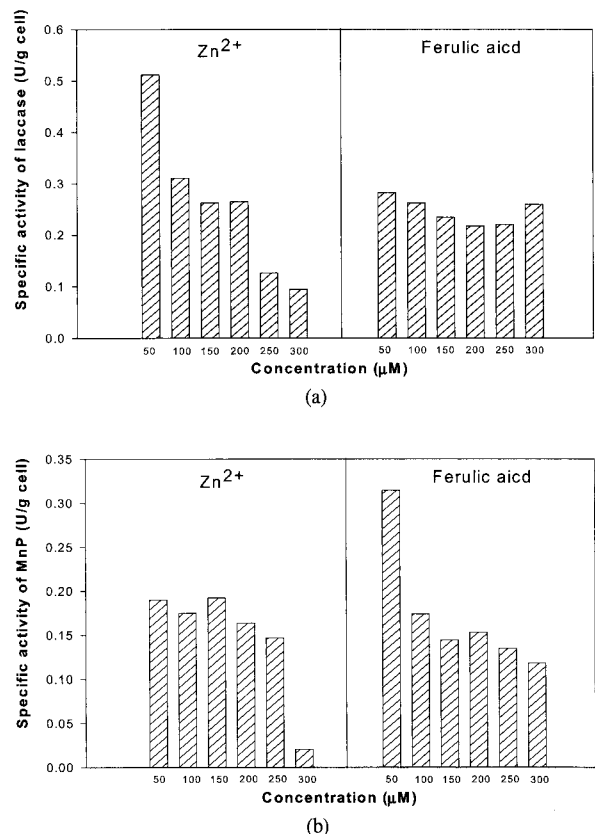
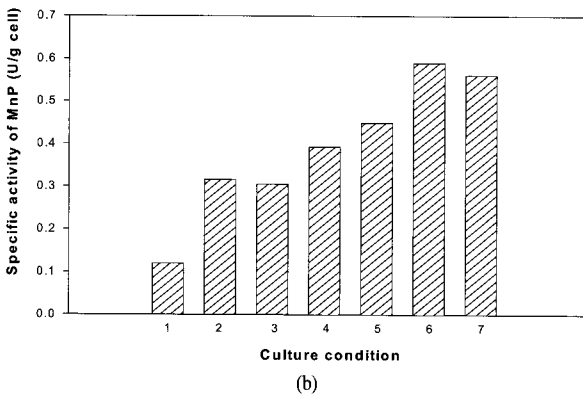
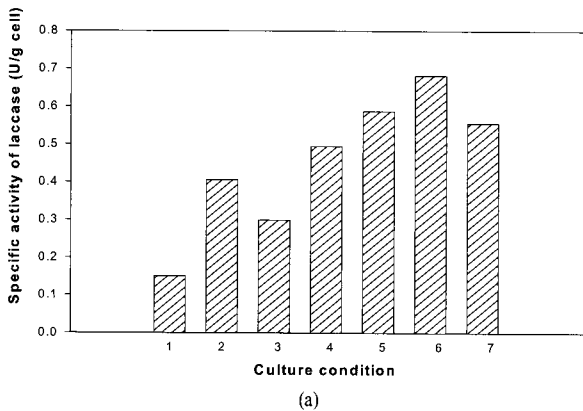


Figure 3. Enzyme production according to the different concentration of inducer ((a) Laccase and (b) MnP).

Inducer의 적정 첨가농도를 확인하기 위해 각각의 inducer에 대해 첨가농도를 50-300 μM 범위로 하여 영향을 조사하였다. 두 종류의 inducer 모두 가장 소량인 50 μM을 첨가 했을 때 가장 높은 효소활성을 보였다(Fig. 3). 또한, Zn²⁺와 ferulic acid가 작용하는 효소가 상이함을 재확인 할 수 있었으며, 다량의 inducer 첨가는 균체에 독성으로 작용해 오히려 효소생산을 저해하는 것으로 나타났다. 금속이온을 첨가하였을 때, 세포외로 분비되는 효소에 직접적으

로 작용할 수 있으며 이것이 액체상태일 때 훨씬 용이하다는 연구결과가 보고된 바 있다(20). 이러한 금속이온은 주로 laccase 단백질의 유전자 전사를 조절하며, 합성되어 분비된 laccase를 배양액 내의 단백질 분해효소 (protease)로부터 분해되는 것을 저해함으로써 안정성에도 관여한다고 알려져 있다(21-23). Ferulic acid와 같은 방향족 화합물에 경우 laccase 뿐만 아니라 laccase의 isoforms 유도에 관여하며, 효소가 작용하는 과정에서 유도될 수 있는 효소활성 저해물질들의 작용을 방어해 준다고 알려져 있다(24-26). 따라서 곰팡이의 성장에 저해하지 않을 정도의 미량의 금속이온과 방향족 화합물을 첨가할 경우 효소생합성 향상과 효소안정화에 긍정적 효과를 미칠 것으로 판단된다.



- 1 : Control (without addition)
 2 : Ferulic acid 25 μ M (addition at 0 h)
 3 : Ferulic acid 25 μ M + Zn²⁺ 25 μ M (addition at 0 h)
 4 : Ferulic acid 25 μ M + Zn²⁺ 25 μ M (addition from 0 h)
 5 : Ferulic acid 25 μ M + Zn²⁺ 25 μ M (addition from 24 h)
 6 : Ferulic acid 25 μ M + Zn²⁺ 25 μ M (addition from 48 h)
 7 : Ferulic acid 25 μ M + Zn²⁺ 25 μ M (addition from 72 h)

Figure 4. Effect of the Zn²⁺ and ferulic acid at different addition time on the enzyme production (a) Laccase and (b) MnP.

금속이온 등의 inducer 물질을 첨가할 경우, 효소생산성은 증가하나 균체 성장에 저해를 받는 것으로 나타났다. 따라서 균체 성장 저해를 최소화하기 위해 inducer의 첨가는 생장이 어느 정도 진행된 뒤에 각 배양시기를 달리하여 주입하여 결과를 비교하였다(Fig. 4). Fig. 4의 1번은 inducer를 전혀 첨가하지 않은 경우이고 2번과 3번은

ferulic acid 단독으로 또는 Zn²⁺와 동시에 첨가하였으며, 4번-7번의 경우는 7일간의 배양기간 동안 1일 간격으로 동일량을 나누어 첨가한 결과이다. 균체의 접종과 동시에 inducer를 첨가하였을 경우 보다는 천천히 동일량을 나눠 첨가했을 때 효소활성이 높은 것으로 나타났으며, 배양 초기에 첨가했을 때 보다 48시간 이후에 첨가한 경우 효소활성이 높은 것으로 나타났다. Laccase와 MnP는 이차대사 산물로 배지 내에 탄소원이 고갈되는 시점부터 발현되기 시작하여 최대 성장 시점인 24시간 이후에 탄소원이 급격히 줄어드는 시점으로 효소 역시 24시간 이후에 최대활성을 보였다. 따라서 이와 비슷한 시점부터 Zn²⁺와 ferulic acid가 소비되는 것으로 판단되며, 미량의 Zn²⁺와 ferulic acid를 일정 기간 주입함에 따라 균체 성장의 저해에 의한 효소생산성의 저해 및 영양분 과잉공급에 따른 이차대사 저해를 막을 수 있었다.

요 약

F. troglis ATCC 200800으로부터 원형질체 분리를 통해 단일균주들을 선별하였으며, 선별된 균주들의 고체배양 및 agar plug assay를 통해 효소생산을 위한 균주를 대량 선별하였다. Agar plug assay를 통해 4일 동안 100여종 이상의 균주를 동시에 배양, 분석이 가능하였으며, 염료분해환을 형성하지 않은 균주는 액체배양 확인 결과 MnP의 생산이 거의 일어나지 않는 것으로 나타났다. 이러한 방법으로 선별된 균주를 이용하여 UV 돌연변이를 통해 모균주로부터 유전적 변이를 유도해 새로운 균주선별을 시도하였으며, 이로부터 모균주와 비교하여 효소생산성이 향상되고 안정성이 증대된 균주를 선별할 수 있었다. 모균주와 선별된 균주의 명확한 유전적 차이를 규명하기보다는 배양시 형태학적 특성이 상이함을 확인하였다. 또한, 선별된 균주를 이용하여 배양액내에 다양한 종류의 inducer를 첨가에 따라 효소생산에 미치는 영향을 확인하였다. 과량의 inducer 물질이 첨가될 경우, 균체생장은 물론 효소생산성도 크게 떨어졌으며, 균체생장이 어느 정도 이루어진 상태 즉, 이차대사가 이루어지는 시점에서 inducer를 첨가할 경우 그 효율이 최대였으며, 동시에 inducer를 첨가할 경우 보다 미량씩 일정량을 나누어 주입할 경우 효소생산에 더 유리한 것으로 나타났다.

감 사

본 연구는 과학기술부에서 지원한 국가지정연구실사업 (과제번호: M1-0203-00-0055)의 결과이며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Fu, Y. and T. Viraraghavan (2001), Fungal decolorization of dye wastewaters: a review, *Biores. Technol.* **79**, 251-262.

2. Lin, S. H. and F. C. Peng (1994), Treatment of textile wastewater by electrochemical methods, *Water Res.* **28**, 277-282.
3. Kim, S., C. Park, T.-H. Kim, J. Lee, and S.-W. Kim (2003), COD reduction and decolorization of textile effluent using a combined process, *J. Biosci. Bioeng.* **95**, 102-105.
4. Calabro, V., E. Drioli, and F. Matera (1991), Membrane distillation in the textile wastewater treatment, *Desalination.* **83**, 209-224.
5. Ramakrishna, K. R. and T. Viraraghavan (1997), Dye removal using low cost adsorbents, *Water Sci. Technol.* **36**, 189-196.
6. Rodriguez, E., M. A. Pickard, and R. Vazquez-Duhalt (1999), Industrial dye decolorization by laccase from ligninolytic fungi, *Curr. Microbiol.* **38**, 27-32.
7. Kirby, N., R. Marchant, and G. McMullan (2000), Decolorisations of synthetic textile dyes by *Phlebia tremillosa*, *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 93-96.
8. Robinson, T., B. Chandran, and P. Nigam (2001), Studies on the production of enzymes by white-rot fungi for the decolourisation of textile dyes, *Enzyme Microb. Technol.* **29**, 575-579.
9. Ollikka, P., K. Alhoniemi, V. Leppanen, T. Glumoff, T. Rajjola, and I. Suominen (1993), Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic, and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **59**, 4010-4016.
10. Young, L. and J. Yu (1997), Ligninase-catalysed decolorization of synthetic dyes, *Water Res.* **31**, 1187-1193.
11. Zhang, F.-M., J. S. Knapp, and K. N. Tapley (1999), Decolourisation of cotton bleaching effluent with wood rotting fungus, *Water Res.* **33**, 919-928.
12. Arora, D. S., M. Chander, and P. K. Gill (2002), Involvement of lignin peroxidase, manganese peroxidase and laccase in degradation and selective of wheat straw, *Int. Biodeter. Biodegrad.* **50**, 115-120.
13. Galhaup C. and D. Haltrich (2001), Enhanced formation of laccase activity by the white-rot fungus *Trametes pubescens* in the presence of copper, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **56**, 225-232.
14. Lilly, W. W., G. J. Wallweber, and T. A. Lukefahr (1992), Cadmium absorption and its effects on growth and mycelial morphology of the basidiomycete fungus *Schizophyllum commune*, *Microbios.* **72**, 227-237.
15. Park, C., Y. Lee, T. H. Kim, M. Lee, B. Lee, J. Lee, and S. Kim (2003), Enzyme decolorization of various dyes by *Trametes versicolor* KCTC 16781, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **18**, 398-403.
16. Kapdan, I., F. Kargi, G. McMullan, and R. Marchant (2000), Comparison of white-rot fungi cultures for decolorization of textile dyestuffs, *Bioprocess Eng.* **22**, 347-351.
17. Criquet, S., S. Tagger, G. Vogt, G. Iacazio, and J. L. Petit (1999), Laccase activity of forest litter, *Soil Biol. Biochem.* **31**, 1239-1244.
18. Ichikawa, T., M. I. Date, and A. Ozak (1971), Improvement of kasugamycin-producing strain by the agar piece method and the prototroph method, *Folia Microbiol.* **16**, 218-224.
19. Shicheng, C., M. Dengbo, G. Wei, and A. B. John (2003), Induction of laccase activity in the edible straw mushroom *Volvarella volvacea*, *FEMS Microbiol. Lett.* **218**, 143-148.
20. Baldrian, P. (2003), Interactions of heavy metals with white-rot fungi, *Enzyme Microb. Technol.* **32**, 78-91.
21. Palmieri, G., P. Giarduna, C. Bianco, B. Fontanella, and G. Sammia (2000), Copper induction of laccase isoenzymes in the ligninolytic fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol.* **63**, 3444-3450.
22. Soden, D. M. and A. D. W. Dobson (2001), Differential regulation of laccase gene expression in *Pleurotus sajor-caju*, *Microbiol.* **147**, 1755-1763.
23. Baldrian, P. and J. Gabriel (2002), Copper and cadmium increase laccase activity in *Pleurotus ostreatus*, *FEMS Microbiol. Lett.* **206**, 69-74.
24. Eggert, C., U. Temp, and K. E. Eriksson (1996), The ligninolytic system of the white rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*: purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1151-1158.
25. Faison, B. D. and T. K. Kirk (1985), Factors involved in the regulation of a ligninase activity in *Phanerochaete Chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **49**, 299-304.
26. Gold, M. H., M. Kuwahara, A. A. Chiu, and J. K. Glenn (1984), Purification and characterization of an extracellular H₂O₂-requiring diarylpropane oxygenase from the white-rot basidiomycete, *Phanerochaete chrysosporium*, *Arch. Biochem. Biophys.* **234**, 353-362.