

회전식 통풍관 생물반응기 사용에 따른 느타리균의 manganese peroxidase 생산 및 특성

하효철*

대구한의대학교 바이오산업융합학부

Production of manganese peroxidase from *Pleurotus ostreatus* using a rotary draft tube bioreactor (RTB) and characterization of its activity

Hyo-Cheol Ha*

Department of bio-technology and convergence, Daegu Haany University

ABSTRACT: Ligninolytic enzymes were produced by *Pleurotus ostreatus* No.42, cultivated in a new kind of bioreactor that has a rotating draft tube with a helical ribbon. Maximum laccase (Lac) production (about 8,200 U/bioreactor) was reached after 3 days of incubation, then production decreased. Production of manganese peroxidase (MnP) in this fermenter reached a maximum level of about 8,400 U/bioreactor after 6 days of incubation. Lignin peroxidase (LiP) was not detected under these growth conditions. These results indicate that the rotary draft tube bioreactor (RTB) is compatible with large scale production of ligninolytic enzymes. MnP produced under these fermentation conditions was purified via a multistep process that included chromatography on Sepharose CL-6B, prep grade Superdex 75, and Mono-Q. This major isoenzyme was confirmed to have an apparent molecular weight of 36,400 by sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), and its isoelectric point (IEF) was determined to be 3.95. N-terminal sequencing of the major isoenzyme from this fermentation was identical to that reported for an MnP3 isoenzyme isolated under different cultivation conditions, including stationary and shaking culture.

KEYWORDS: Ligninolytic enzymes, Manganese peroxidase, Pellet, *Pleurotus ostreatus*, Rotary draft tube bioreactor (RTB)

서 론

일반적으로 목질 바이오매스 성분은 리그닌, 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스로 구성되어 있으며 그 중 리그닌은

모든 고등 식물에서 발견되는 불특정 방향족 중합체이며 미생물 공격에 대한 장벽 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 리그닌은 페녹시 라디칼을 생성하는 전구체 p-coumaryl alcohol, coniferyl alcohol 및 sinaryl alcohol이 차례로 합성된 다음 하나의 전자 산화에 의해 중합이 일어난다. 이러한 비특이적 반응은 고분자량의 불균일한 3차원 biopolymer를 생성하며 페닐프로판 단위의 복잡한 3차원 중합체로 완전히 무정형이며 미세 섬유를 둘러싸는 외피 역할을 한다(Eaton and Hale, 1993).

1970년대 오일쇼크 시기에 화학 공급원료로 자연계에서 풍부한 리그닌을 사용하는 것에 관심이 높아졌음에도 리그닌은 고부가가치 소재로 개발되지 않았다. 그러나 최근에 리그닌을 기능성 유기화합물로 재활용할 수 있는 리그닌 분해효소 및 촉매제의 역할과 특성에 관한 연구들이 활발하게 진행되어 오면서 리그닌 이용에 관한 관심이 높아지고 있다(Bilal *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2017; Martinez *et al.*, 2017).

J. Mushrooms 2021 December, 19(4):316-321
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2021.19.4.316>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

Ha Hyo-Cheol (Professor)

*Corresponding author

E-mail : hcha@dhu.ac.kr

Tel : +82-53-819-1498, Fax : +82-53-819-1272

Received October 31, 2021

Revised November 8, 2021

Accepted November 10, 2021

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

리그닌 분해균의 일종인 판막버섯균(*Phanerochaete chrysosporium*)으로부터 1980년대 초 리그닌 분해 관련 효소인 lignin peroxidase(LiP; EC 1.11.1.14), manganese peroxidase(MnP; EC 1.11.1.13)가 밝혀진 이후(Kuwahara *et al.*, 1984; Tien and Kirk, 1983) 지금까지 많은 연구자들에 의해 이들 효소와 관련된 연구 결과가 보고되어 왔다(Gold and Alic 1993; Pollegioni *et al.*, 2015; Wang *et al.*, 2015). 특히 이러한 리그닌 분해효소는 광범위한 독성 유기화합물인 polyhydrocarbons 및 polychlorinated biphenyls과 같은 다양한 석유화학 물질들과 농약을 무독성 대사 산물과 CO₂로 산화하는데 작용하여 최근에는 생물정화에 적용하는 연구들도 활발하게 진행되어 오고 있다(Chang *et al.*, 2021; Itoh and Kuwahara 1998; Kadri *et al.*, 2017; Steffen *et al.*, 2003; Yang *et al.*, 2011).

리그닌 분해효소의 잠재적 적용은 다음과 같은 장점 때문에 매우 중요하다고 판단된다. 첫째, 목질 바이오매스로부터 재생 가능한 바이오에탄올 생산을 위한 리그닌의 분해에 이용함으로써 화석 연료에 대한 의존도를 줄일 수 있다. 둘째, 독성 유기화합물인 다양한 환경 오염물질 및 합성염료들을 분해하는데 적용할 수 있다. 셋째, 식량 및 동물 사료의 부족을 완화하는데 도움이 되며 마지막으로 제지산업 등 생물공학 분야에 적용할 수 있다. 그러므로 리그닌 분해효소의 특성을 알고 생물공학 산업에 이용하기 위해서는 대량 생산 기술이 선행되어야 한다.

Yoshida 등이(1996) 회전식 고체 생물반응기(rotary-solid bioreactor)를 활용하여 줄버섯균(*Bjerkandera adusta*)를 6일간 배양하여 목재 부산물 180 g에서 manganese peroxidase 18U/bioreactor를 생산하였다. 한편, 펠렛 형태로 균사체를 배양하는 것이 효과가 있다는 몇몇 연구자의 보고(Leisola *et al.*, 1985; Li *et al.*, 2011; Moreira *et al.*, 1996)는 액체배양으로서 가능성을 확인할 수 있었으며, 최근에는 펠렛 형태의 균사체 배양이 산소 및 기질의 공급을 원활히 하고 집성을 낮추는 장점이 있는 것으로 보고하였다(Veiter *et al.*, 2018).

본 연구자는 식용버섯이며 리그닌 분해균인 느타리균(*Pleurotus ostreatus*)으로부터 고농도의 질소원과 Mn²⁺ 혹은 망간 이온을 킬레이팅 할 수 있는 촉매제를 첨가하여 세포의 분비효소인 manganese peroxidase(MnP3)를 연구, 보고하여 왔다. 이에 본 연구에서는 회전식 통풍관 생물 반응기(Rotary draft tube Bioreactor)를 사용하여 manganese peroxidase를 대량 생산할 수 있는 조건에 대한 결과를 보고하는 바이다.

재료 및 방법

공시균주 및 배양방법

리그닌 분해효소 활성이 우수한 느타리균(*P. ostreatus* No. 42)를 선발하여 대구한의대학교 발효공학 실험실에서

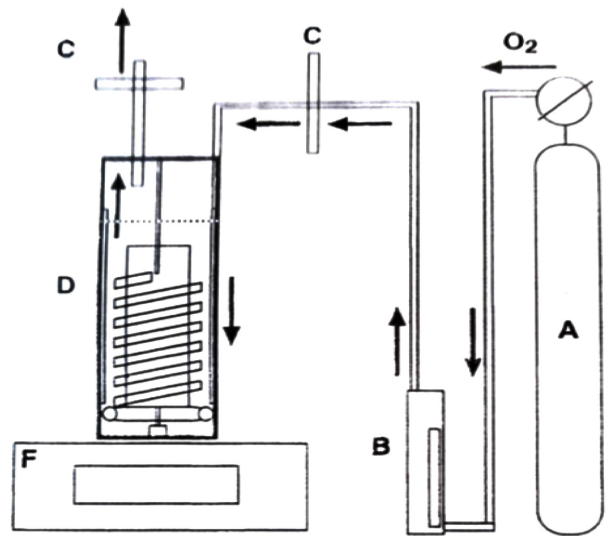


Fig. 1. Set up of the cultivation system using a rotary draft tube bioreactor (RTB). A: O₂ reservoir, B: gas flow meter, C: gas filter, D: RTB, F: speed control.

보관하며 본 실험에 사용하였다. 느타리균(*P. ostreatus* No. 42)을 potato-dextrose 액체배지(PDB, Difco Co.) 20 ml에서 28°C, 7일 동안 정지 배양한 후 균사체를 회수한 뒤에 증류수 20 ml를 넣고 균질화하여 glucose-peptone-yeast extractor-wheat bran 배지(GPYW) 250 ml에서 28°C, 7일 동안 120rpm의 조건으로 진탕 배양한 후 본 배양을 위한 접종원으로 사용하였다. 본 배양은 회전식 통풍관 생물반응기를 사용(Imai *et al.*, 1993)하였으며 드래프트 튜브(draft tube)를 회전시키면 배양액이 표면으로 밀려 올라와 튜브 내부에서 아래쪽으로 흐르도록 설계되어 있는 형태의 3500 ml 생물배양기(Kawasaki Heavy Industry Co.)이다. Fig. 1에 나타난 배양시스템에 따라 산소통으로부터 일정한 양의 산소 공급을 유지하기 위해 산소 유량계를 설치하고 산소공급은 Midisart 2000(Goettingen Co.) 0.2 um 박막필터를 사용하였으며, glucose-peptone-yeast extractor-wheat bran 배지(GPYW) 2000 ml에서 28°C, 120rpm의 속도를 유지하고 glucose함량이 완전히 고갈될 때까지 배양하면서 리그닌 분해 효소활성을 측정하였다.

리그닌 분해효소 측정

리그닌 분해효소의 효소활성은 이전 보고의 방법(Ha *et al.*, 2001)으로 진행하였다. 각각의 배양액으로부터 1 ml 씩 취하여 4°C, 5000rpm, 5분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 UV-Visible spectrophotometer(Shimadzu UV-1201)을 사용하여 아래 리그닌 분해효소 측정법에 의해 측정하였다. Lignin peroxidase(LiP)의 효소 활성농도는 1 분간 1 nmol의 veratryl alcohol이 veratryl aldehyde로 산

화하는 정도를 310 nm의 파장에서 흡광도로 나타내었다. Manganese peroxidase(MnP)의 효소 활성 농도는 Mn 이온 존재 하에서 1분간 반응으로 생성된 물질의 465 nm에서의 흡광도로 나타내었다. Laccase(Lac)의 효소 활성 농도는 *o*-phenylenediamine을 기질로 하여 1분간 반응으로 생성된 물질의 440 nm에서의 흡광도로 나타내었다.

용존산소 측정

용존 산소 농도 측정은 O₂ 전류 측정 전극(Ingold, Paris, France)으로 28°C에서 측정하였으며 전극의 보정은 EYELA Co.의 매뉴얼에 따라 각 측정 세트 전에 실시하였다.

글루코오스 측정

글루코오스 농도는 이전 보고한 방법(Ha *et al.*, 2001)으로 mutarotase GOD법(Glucose C-test, Wako Pure Chemical)으로 측정하였다.

총 단백질 함량

총 단백질 함량은 Bradford 방법(1976)에 준하여 Bradford reagent 1ml를 시료와 반응시킨 후 595 nm에서 흡광도를 측정하였으며, Bovine serum albumin(Sigma Co.)를 표준곡선으로 시료 중 단백질의 함량을 측정하였다.

Manganese peroxidase(MnP)의 정제

효소의 정제는 Ha 등의 방법(2001)에 준하여 실시하였다. 배양액을 회수하여 박막여과장치에 의해 농축시킨 조효소액을 20 mM succinate buffer(pH 4.5)로 평형화시켜 놓은 이온교환 크로마토그래피 컬럼(Ion-exchange chromatography column)에 적용하고 염농도를 0.1, 0.2M로 단계적으로 증가하면서 분리하였다. Manganese peroxidase 분리정제는 DEAE- Sepharose CL-6B column(Amersham Pharmacia Biotech., UK)으로 실시하였으며 분광광도계를 이용하여 manganese peroxidase의 활성을 갖는 분획을 모아서 박막여과장치를 이용하여 농축하였다. 농축한 manganese peroxidase의 활성 분획을 겔 크로마토그래피 컬럼(Gel chromatography column)인 Superdex 75(Amersham Pharmacia Biotech., UK)으로 분리한 후 최종적으로 Mono-Q anion-exchange column(Amersham Pharmacia Biotech., UK)을 이용하여 염농도에 따른 gradient방법으로 분리 정제하였다.

겔 전기영동 및 등전점

최종 컬럼을 통해 분리된 manganese peroxidase를 겔 전기영동 장치를 이용하여 실시하였다. 단백질 전기영동은 Phast System(Amersham Pharmacia Biotech. UK)에 의한 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis)에서 실시하였으며 등전점(Isoelectric point; IEF) 측정은 Servalyt precoats polyacrylamide

gels(Serva Fine Biochemical Inc., pH 3-5)을 구입하여 사용하였으며 전기영동이 끝난 후 0.1% Coomassie blue R-250로 단백질 밴드를 염색하였으며 MnP활성은 3,3'-diamino-benzidine을 기질로 염색하였다. 분자량 마커는 standard mark(Daiichi Pure Chemicals, Japan)를 사용하였으며 등전점 마커는 calibration kit(pI 2.4~5.65, BDH BmbH, Germany)를 사용하여 실시하였다.

N-말단 아미노산 서열분석

N-말단 아미노산 서열분석은 최종 분리한 manganese peroxidase를 SDS-PAGE 상에서 전개하여 단일 밴드를 확인하여 semi-dry electrophoretic transfer를 실시하였다. 즉, 전기영동 상에서 확인된 단일밴드를 0.05% SDS용액, 25 mM Tris, 20% methanol, 40 mM ϵ -Amino-n-caproic acid를 함유한 전이용매를 이용하여 1.2 mA/cm², 120분간 polyvinylidene difluoride(PVDF, Bio-red con.)막에 옮긴 후 전이된 단백질 부분을 절단하였다. 절단한 단백질 부분을 단백질 자동서열 분석기를 이용하여 아미노산 서열을 분석하였다(Model 491A, Applied Biosystems, USA).

결과 및 고찰

회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)를 사용한 느타리균의 리그닌 분해효소 생산

이전 연구에서 느타리균(*P. ostreatus* No. 42) 액체 배양시 펠렛(pellet) 크기 및 적절한 용존산소량을 유지하는 것이 manganese peroxidase활성을 높이고 대량 생산에 관여한다고 보고하였다(Ha *et al.*, 2001). 이에 본 연구에서는 회전식 통풍관 생물반응기(RTB)에서 펠렛 직경이 1~2 mm가 되도록 임펠러속도(impeller speed)와 용존산소량(5~15 ppm)을 조절하였다. 그리고 이전 연구보다 10 배 배지량이 증가한 2000 ml 조건에서 manganese

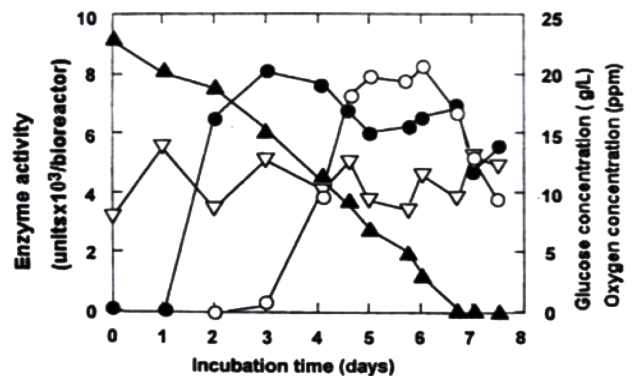


Fig. 2. Time course of the ligninolytic enzymes production by a rotary draft tube bioreactor(RTB).

●: laccase activity, ○: manganese peroxidase activity, ▲: glucose conc., △: dissolved oxygen

Table 1. Comparison of the ligninolytic enzymes produced by *P. ostreatus* No.42

White-rot fungi name	Growth type	Vol. of medium(ml)	Dissolved oxygen concentration(ppm)	Lac (U/bioreactor)	MnP (U/bioreactor)	Reference
<i>P. ostreatus</i> No.42	pellet	2000	5~15	8,200(3) ^{a)}	8,400(6) ^{a)}	This study
<i>P. ostreatus</i> No.42	pellet	200	5~10	560(6)	780(7)	Ha <i>et al.</i> (2001)
<i>P. ostreatus</i> No.42	pellet	200	< 5	500(6)	0	Ha <i>et al.</i> (2001)
<i>P. ostreatus</i> No.42	mycelium	20	N.D ^{b)}	50(9)	80(11)	Ha(2019)

a) The number in parentheses indicate the culture days which showed the maximum activity.

b) Not determined

peroxidase의 대량 생산 가능성을 확인하였다. 실험 결과, Fig. 2에서 나타난 바와 같이 laccase는 3일째 8200(4.1)U/bioreactor(ml)의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 경향을 나타내었으며 manganese peroxidase는 6일째 8400(4.2)U/bioreactor(ml)의 최대 활성을 나타낸 후 감소하는 것을 확인할 수 있었다.

이러한 결과는 리그닌 분해효소의 생산 패턴도 laccase가 먼저 세포외로 생산된 후 manganese peroxidase가 생산된다는 이전 보고(Camassola *et al.*, 2013; Elisashvili *et al.*, 2008; Ha 2019)들과 일치하였으며, 특히 manganese peroxidase의 경우 glucose농도가 급격히 감소한 4일 이후에 활성이 증가하여 80% 이상 감소한 시점인 6일째 최대 값을 나타내었는데 이러한 결과는 manganese peroxidase가 glucose와 같은 영양소가 고갈되면서 발현되는 이차 대사산물을 나타내는 결과라는 이전 보고들과 일치하였다(Ha *et al.*, 2001; Orth *et al.*, 1991). 따라서 manganese peroxidase와 같은 이차 대사산물의 경우 생산 기간을 단축시키기 위해 탄수화물인 glucose의 초기 소비량도 중요한 인자라고 생각된다. 한편, Table 1과 같이 이전 보고에서 실험실 수준에서 20 ml 정지 배양한 경우 laccases는 9일째 50U/flask, manganese peroxidase는 11일째 80U/flask을 나타내었으며 본 연구 결과 laccase는 16.4배, manganese peroxidase는 105배 증가하였으며 최대 생산일도 각각 6일, 5일을 단축시킨 것으로 나타났다. 이전 보고에서 200 ml 진탕 배양한 펠렛 형태로 용존 산소량이 5 ppm 미만일 경우 laccase는 6일째 500U/flask, manganese peroxidase는 생산되지 않았으며, 본 연구결과 laccase는 16.4배, manganese peroxidase는 8400배 증가하였다. 또한 동일 조건인 200 ml 진탕 배양한 펠렛 형태로 용존 산소량이 5~10 ppm 경우 laccase는 6일째 560U/flask manganese peroxidases는 7일째 780U/flask을 나타내었으며, 본 연구 결과 laccase는 14.6배, manganese peroxidase는 10.8배 증가하였다. 따라서 본 연구결과는 배지량을 증가시키더라도 리그닌 분해효소 대량 생산은 가능하며 특히 manganese peroxidase 대량생산에는 용존산소 농도가 가장 중요한 인자이며, 펠렛 형태 및 크기를 조절하여 배양하는 것이 점성을 낮추고 효소량을 증대시키며 생산 기간

을 단축시킬 수 있을 것으로 판단된다.

리그닌 분해효소의 일종인 manganese peroxidase의 대규모 생산은 교반(agitation)에 대한 균사체의 민감성으로 인해 많은 연구자들은 실험실 수준에서 정지배양을 통해 기질 표면에 균사(hypha)형태로 배양하면서 리그닌 분해효소를 생산했다. 따라서, manganese peroxidase를 대량 생산하기 위해 나일론(Laugero *et al.*, 1996), 폴리우레탄(Moreira *et al.*, 1997), 스테인레스 스틸(Herpoël *et al.*, 1999) 등과 같은 다양한 지지체에 고정된 바이오매스를 사용하거나 다양한 형태의 생물반응기(bioreactor)를 적용하였는데 가장 일반적인 형태인 교반형(Stirred type), 에어리프트 혹은 버블형(air-lift type or bubble type), 고정 지지층형(fixed bed type), 유동층형(fluidised bed type), 실리콘막형(silicone-membrane type)등이 보고된 바 있다(Asses *et al.*, 2009; Aragão *et al.*, 2020; Babič *et al.*, 2012; Méndez-Hernández *et al.*, 2015). 그러나 지금까지 보고된 많은 연구 결과들은 실험에 적용한 생물반응기(bioreactor)로 인해 점성이 높아지거나 균사체 형태 그리고 규모 확대(scale-up)에 있어 한계점을 가지고 있는 것이 사실이다. 본 연구에 적용한 회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)는 교반 탱크 반응기와 비교하여 전단력을 줄일 수 있고 에어-리프트 혹은 버블형과 같이 높은 에너지 효율을 갖는 장점이 있으며 산소 및 기질의 공급을 원활하게 할 수 있는 반응기이므로 배양 시간이 경과 하더라도 일정한 크기의 펠렛 형태를 유지하면서 균사체 배양이 가

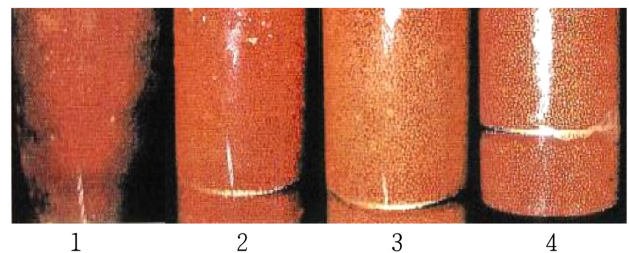


Fig. 3. Formation of mycelial pellets in a rotary draft tube bioreactor(RTB).

Lane 1: after 1day, Lane 2: after 2days, Lane 3: after 4days, Lane 4: after 7days.

Table 2. Purification of MnP3 produced by a rotary draft tube bioreactor(RTB)

Purification step	Total activity (units)	Total protein (mg)	Specific activity (Units/mg)	Yield(%)	Purification(fold)
Crude enzyme	2099.0	77.90	26.9	100.0	1.0
Ultrafiltration	1757.0	43.90	40.0	84.0	1.5
DEAE-Sepharose	1176.0	7.93	148.3	56.0	5.5
Superdex 75	915.3	3.35	273.2	43.6	10.2
Mono Q	611.2	1.70	359.5	29.0	13.4

능하며 향후 더 큰 규모의 manganese peroxidase 대량 생산에 적용할 수 있을 것으로 판단된다(Fig. 3).

Manganese peroxidase 분리 및 정제

느타리균(*P. ostreatus* No. 42)을 회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)를 사용하여 대량 생산한 리그닌 분해효소인 manganese peroxidase를 분리 정제하였다. Table 2와 같이 manganese peroxidase 조효소액 2099 unit를 박막여과 장치, 이온교환 컬럼, 겔 컬럼 및 Mono Q 이온교환 컬럼 순으로 분리 정제하였으며 최종적으로 비활성도 359.5 units/mg, 13.4배의 정제도를 갖는 manganese peroxidase (MnP3)를 29% 회수하였다.

겔 전기영동 및 등전점

느타리균(*P. ostreatus* No. 42)을 회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)를 사용하여 대량 생산한 리그닌 분해효소인 manganese peroxidase를 분리 정제한 결과 전기영동장치를 이용하여 SDS-PAGE(A) 및 Servalyt Precoats polyacrylamide gels(B)로 분리하여 단백질 염색을 진행한 결과 분자량 약 36.4 KDa, 등전점(pI)은 3.95를 나타내었다. 또한 과산화효소의 특징인 활성 염색을 실시한 결과 갈색으로 산화되는 것을 확인하였다(Fig. 4). 이러한 결과

는 이전에 보고한 MnP3와 분자량 및 등전점이 동일한 것을 확인하였다(Ha *et al.*, 2001). 한편 아미노산 염기서열 분석 결과, 정제한 manganese peroxidase의 N-말단으로부터 총 19개의 아미노산 배열은 ATCADGRTTANAACCVLFP으로 밝혀졌으며 이전에 보고한 manganese peroxidase MnP3인 것으로 확인하였다(Ha, 2019).

적 요

리그닌 분해효소의 생산은 나선형 리본이 있는 새로운 형태의 회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)를 사용하여 느타리(*Pleurotus ostreatus*) No.42에 의해 실시하였다. 락케이즈(laccase)의 최대 생산량은 배양 3일 후 약 8,200 U/bioreactor 수준에 도달한 후 감소하였다. 반면에, 망간퍼옥시데이즈(MnP)의 최대 생산은 6일 배양 후 약 8,400 U/bioreactor의 수준에 도달하였다. 그러나 이 발효조에서 리그닌퍼옥시데이즈(LiP)는 검출되지 않았다. 그 결과 회전식 통풍관 생물 반응기(RTB)가 리그닌 분해효소를 대규모 생산을 위해 성공적으로 생산할 수 있음을 보여주었다. 이 발효기에서 망간퍼옥시데이즈의 정제 과정은 Sepharose CL-6B, Superdex 75 prep grade 및 Mono-Q에 대한 크로마토그래피를 포함하여 정제하였다. 이 주요 효소는 sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide 겔 전기영동(SDS-PAGE)에서 분자량 36,400, pI 3.95의 등전점(IEF)으로 각각 확인되었다. 이 발효기의 주요 효소 N-말단 서열은 정치 및 진탕배양과 같은 다른 배양조건에서 보고된 MnP3 효소와 동일하였다.

REFERENCES

- Aragão MS, Menezes DB, Ramos LC, Oliveira HS, Bharagava RN, Romanholo Ferreira LF, Teixeira JA, Ruzene DS, Silva DP. 2020. Mycoremediation of vinasse by surface response methodology and preliminary studies in air-lift bioreactors. *Chemosphere* 244: 125432-125441.
- Asses N, Ayed L, Bouallagui H, Ben Rejeb I, Gargouri M, Hamdi M. 2009. Use of *Geotrichum candidum* for olive mill wastewater treatment in submerged and static culture. *Bioresour Technol* 100: 2182-2188.
- Babič J, Pavko A. 2012. Enhanced enzyme production with the pelleted form of *D. squalens* in laboratory bioreactors using

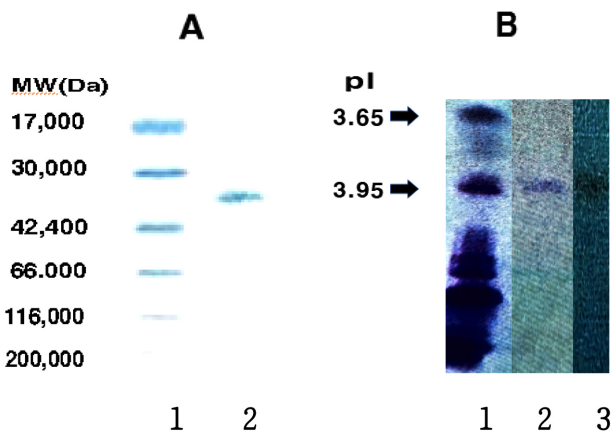


Fig. 4. Electrophoresis of purified MnP3 isoenzyme. A, SDS-PAGE; Lane 1; MW marker, Lane 2; MnP3 B, IEF; Lane 1; pI marker, Lane 2; MnP3, Lane 3; active stain of MnP3

- added natural lignin inducer. *J Ind Microbiol Biotechnol* 39: 449-457.
- Bilal M, Asgher M, Iqbal HMN, Hu H, Zhang X. 2017. Biotransformation of lignocellulosic materials into value-added products-A review. *Int J Biol Macromol* 98: 447-458.
- Bradford MM. 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.
- Camassola M, da Rosa LO, Calloni R, Gaio TA, Dillon AJ. 2013. Secretion of laccase and manganese peroxidase by *Pleurotus* strains cultivate in solid-state using *Pinus* spp. sawdust. *Braz J Microbiol* 44: 207-213.
- Chang Y, Yang D, Li R, Wang T, Zhu Y. 2021. Textile Dye Biodecolorization by Manganese Peroxidase: A Review. *Molecules* 26: 4403-4418.
- Eaton RA, Hale MDC. 1993. Wood cell wall chemistry. In Wood: decay, pests and protection. Chapman and Hall London, 23-24.
- Elisashvili V, Penninckx M, Kachlishvili E, Tsiklauri N, Metreveli E, Kharziani T, Kvesitadze G. 2008. *Lentinus edodes* and *Pleurotus* species lignocellulolytic enzymes activity in submerged and solid-state fermentation of lignocellulosic wastes of different composition. *Bioresour Technol* 99: 457-462.
- Gold MH, Alic M. 1993. Molecular biology of the lignin-degrading basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Microbiol Rev* 57: 605-622.
- Ha HC, Honda Y, Watanabe T, Kuwahara M. 2001. Production of manganese peroxidase by pellet culture of the lignin-degrading basidiomycete, *Pleurotus ostreatus*. *Appl Microbiol Biotechnol* 55: 704-711.
- Ha HC. 2019. N-terminal amino acid sequencing analysis of major manganese peroxidase (MnP3) produced by static culture of *Pleurotus ostreatus*. *J Mushrooms* 17: 185-190.
- Herpoël I, Asther M, Sigoillot JC. 1999. Design and scale-up of a process for manganese peroxidase production using the hypersecretory strain *Phanerochaete chrysosporium* I-1512. *Biotechnol Bioeng* 65: 468-473.
- Imai Y, Suzuki M, Masamoto M, Nagayasu K. 1993. Amylase production by *Aspergillus oryzae* in a new kind of fermentor with a rotary draft tube. *J Ferment Technol* 76: 459-464.
- Itoh H, Kuwahara M. 1998. Biodegradation of chemical pollutants by using white-rot fungi. *Bioindustry* 15: 5-13.
- Kadri T, Rouissi T, Kaur Brar S, Cledon M, Sarma S, Verma M. 2017. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) by fungal enzyme: A review. *J Environ Sci* 51: 52-74.
- Kuwahara M, Glenn JK, Morgan MA, Gold MH. 1984. Separation and characterization of two extracellular H₂O₂-dependent oxidase from ligninolytic cultures of *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS Lett* 169: 247-250.
- Laugero C, Sigoillot JC, Moukha S, Frasse P, Bellon-Fontaine M, Bonnarne P, Mougou C, Asther M. 1996. Selective hyperproduction of manganese peroxidases by *Phanerochaete chrysosporium* I-1512 immobilized on nylon net in a bubble-column reactor. *Appl Microbiol Biotechnol* 44: 717-723.
- Leisola MSA, Fiechter A. 1985. Ligninase production in agitated conditions by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEMS Microbiol Lett* 29: 33-36.
- Li X, Zheng Y. 2017. Lignin-enzyme interaction: Mechanism, mitigation approach, modeling, and research prospects. *Biotechnol Adv* 35: 466-489.
- Li ZM, Liu Y, Chi ZY, Chen SL. 2011. Effects of Pluronic F68 on manganese peroxidase production by pelletized *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Biochem Biotechnol* 164: 487-496.
- Martinez AT, Ruiz-Duenas FJ, Camarero S, Serrano A, Linde D, Lund H, Vind J, Tovborg M. 2017. Oxidoreductases on their way to industrial biotransformations. *Biotechnol Adv* 35: 815-831.
- Méndez-Hernández JE, Eibes G, Arca-Ramos A, Lú-Chau TA, Feijoo G, Moreira MT, Lema JM. 2015. Continuous removal of nonylphenol by versatile peroxidase in a two-stage membrane bioreactor. *Appl Biochem Biotechnol* 175: 3038-3047.
- Moreira MT, Sanromán A, Feijoo G, Lema JM. 1996. Control of pellet morphology of filamentous fungi in fluidized bed bioreactors by means of a pulsing flow. Application to *Aspergillus niger* and *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb Technol* 19: 261-266.
- Moreira MT, Feijoo G, Palma C, Lema JM. 1997. Continuous production of manganese peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on polyurethane foam in a pulsed packed-bed bioreactor. *Biotechnol Bioeng* 56: 130-137.
- Orth AB, Tien, M. 1991. Overproduction of lignin-degrading enzymes by an isolate of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl Environ Microbiol* 57: 2591-2596.
- Pollegioni L, Tonin F, Rosini E. 2015. Lignin-degrading enzyme (review). *FEBS J* 282: 1190-1213.
- Steffen KT, Hatakka A, Hofrichter M. 2003. Degradation of benzo[a]pyrene by the litter-decomposing Basidiomycete *Stropharia coronilla*: role of manganese peroxidase. *Appl Environ Microbiol* 69: 3957-3964.
- Tien M., Kirk T.K. 1983. Lignin-degrading enzyme from the Hymenomycete *Phanerochaete chrysosporium* Burds. *Science* 221: 661-663.
- Veiter L, Rajamanickam V, Herwig C. 2018. The filamentous fungal pellet-relationship between morphology and productivity. *Appl Microbiol Biotechnol* 102: 2997-3006.
- Wang X, Yao B, Su X. 2018. Linking enzymatic oxidative degradation of lignin to organics Detoxification (review). *Int J Mol Sci* 19: 3373-3390.
- Yang X, Wang J, Zhao X, Wang Q, Xue R. 2011. Increasing manganese peroxidase production and biodecolorization of triphenylmethane dyes by novel fungal consortium. *Bioresour Technol* 102: 10535-10541.
- Yoshida S, Yonehara S, Minami S, Ha HC, Iwahara K, Watanabe T, Honda Y, Kuwahara M. 1996. Production and characterization of ligninolytic enzymes of *Bjerkandera adusta* grown on wood/wheat bran culture and production of these enzymes using rotary-solid fermenter. *Mycoscience* 37: 417-425.