

# 白色腐朽菌 *Flammulina velutipes*로 부터 抽出한 리그닌 分解酵素의 酵素的 特性\*<sup>1</sup>

徐達善\*<sup>2</sup>, 李在成\*<sup>2</sup>, 趙南奭\*<sup>3</sup>

## Enzymatic Characteristics of Laccase from White Rot Fungus, *Flammulina velutipes*\*<sup>1</sup>

\*<sup>2</sup> Dal Sun Suh, \*<sup>2</sup> Jae Sung Lee, and \*<sup>3</sup> Nam-Seok Cho

### Summary

The production media and the enzymatic characteristics of laccase from *Flammulina velutipes* were investigated. The activity of laccase during incubation reached to the maximum at the 40 days of incubation in the case of Barley straw medium. The maximum laccase activity in Barley straw medium was 5 and 16 times higher than those in Onion basic and Sawdust media, respectively.

The laccase from *Flammulina velutipes* has the optimum pH of 6.6 and showed to be stable at relatively broad pH range, 4.5-9.5. Temperature stability showed that above 96% activity could be preserved after holding at 40°C for 40 minutes. At the above 70°C, the laccase activity decreased very rapidly. The Km value of the laccase was estimated to be 28.0 mM which is much higher than that of the laccase from *Pleurotus ostreatus*.

Organic solvents for precipitation of the enzyme did not inactivated the laccase. Sodium azide which was added for preventing microbial deterioration affected significantly the inactivation of laccase, but this activity was recovered completely by precipitating the enzyme with acetone.

Key words : *Flammulina*, activity, inactivation, Km value

### 1. 序 論

食生活의 樣相이 菜食에서 肉食으로 바뀐에 따라 畜産物의 消費가 增大되고 그에 따른 飼料의 需要도 急激히 增加하여 草地가 부족한 우리 實情으로서는 代替飼料의 보급이 절실한 課題이다. 우리나라의 農·林産廢棄物은 大部分 燒却해 버리는데 그 一部分이 堆肥와 燃料로 쓰이고 있다.

에너지源이 될 수 있는 芻草, 보릿짚, 퉁발 등을 利用하여 飼料로 使用하고자하는 方案이 現在 研究中에 있으며, 消化率이 낮은 섬유소계자원의 消化率을 높이는데 우선적으로 解決해야할 問題는 Cellulose의 分解를 저해하는 Lignin을 먼저 分解 혹은 除去 해야 한다.

지금까지 연구된 바에 의하면 切斷, 磨碎, 壓搾

후 物理的인 方法과 가정소다, 암모니아, 酸 等에 의한 化學的인 方法과 微生物, 幼蟲, 軟體動物에 의한 生物學的 處理方法이 있는 것으로 알려져 있다.

이 論文에서는 木質纖維의 營養소 분포와 消化率, Lignin분자의 構造와 特性, 白色腐朽菌에 의한 lignin의 酵素的 分解, Laccase의 性質을 알아보고 微生物에 의한 農産廢棄物의 利用에 使用할 수 있는 white rot fungi中 *Flammulina velutipes*를 培養하여 lignin分解酵素 [Laccase]의 特性을 調査하려고 한다.

### 2. 研究史

#### 2.1 木纖維質의 營養構成과 消化率

纖維質 農産廢棄物의 營養素 含量은 農産物의 種

\*1. 接受 6月11日 Received June 11, 1986.

\*2. 嶺南大學校 食品加工學科 Department of Food Science & Technology, Yeungnam University.

\*3. 嶺南大學校 林學科 Department of Forestry, Yeungnam University.

類, 土壤, 氣候, 收穫時期 等에 따라 조금씩 差異는 있으나, 纖維質이 대단히 많아 에너지 함량이 높다. 그러나 蛋白質이나 主要 鑛物質인 Ca, P 등의 含量은 낮아서 反芻動物의 熱量飼料로서만 價値가

있다. 그러나 大部分의 纖維素가 Lignin과 結合된 Lignocellulose形態로서 되어있기 때문에 消化率이 낮고 總可消化營養素(Total digestible nutrients)는 43~46% 程度로 낮다(表1).

Table 1. Chemical composition of lignocellulosic materials

	Cotton	Hardwood (birch)	Softwood (spruce)	Rice straw	Barley Straw	Sawdust (poplar)
Cellulose	89.0	44.9	46.1	36	42	56.2
Hemicellulose	5.0	32.7	24.6			
Lignin	0.0	19.3	26.3	10.2	9.1	24.1
Crude protein	1.3	0.5	0.2	5.5	4.3	1.5
Soluble non-N fraction	2.5	2.3	2.5			
Ash	1.2	0.3	0.3	16.5	7.7	2.0

All values, Oven dried basis%

家畜에 대한 農·林産廢棄物의 섭취율과 消化率을 높이기 위한 方案으로는 Bae D.H.(1978)<sup>1)</sup>, Kay M.A.(1970.a, 1970.b)<sup>2,4)</sup>, Lloy E.W.등<sup>3)</sup>이 切斷, 磨碎 等 物理的인 方法으로 짚을 粉碎하여 pallet으로 造製, 飼料를 投與한 結果, 消化率을 26%나 增加시켰으며, Guggolz등<sup>5)</sup>은 高壓, 高溫蒸氣를 竝行하여 處理함으로써 200%의 消化率을 거두었다고 한다.

纖維素의 消化率을 높이기 爲한 化學的 處理效果는 상당하며 Lehmann(1895)<sup>6)</sup>는 2% NaOH에 짚을 끓임으로서 消化率을 37%에서 63%로 向上시켰으며, Beckmann(1919)<sup>7)</sup>은 짚류에 1.5~2% NaOH, KOH, Ca(OH)<sub>2</sub> 等의 Alkali에 3日間 常溫處理하여 消化率을 높이는 化學的 方法을 最初로 實用化하였다. NaOH量이 增加할수록 消化率은 높아지나 洗滌 혹은 中和處理가 있어야 하며 洗滌時 營養의 損失도 있게 됨으로 4~6%의 NaOH를 紛霧하여 高溫·高壓處理하기도 한다.

處理條件에 따라 多少 差異는 있으나 50%~100% 정도 消化率이 增加한다. Homb T.F.(1977) 등<sup>8)</sup>은 飼料의 消化率을 높이기 爲해 NH<sub>3</sub>處理를 하면 56%에서 69%로 증가시킬 수 있고 殘留NH<sub>3</sub>는 非蛋白窒素源으로서 蛋白質의 供給源이 될 수도 있다고 한다.

Butterbough J.W. (1974) 등<sup>9)</sup>은 粉碎된 木質을 1% 未滿의 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>로 部分加水分解한 後, 無水암모니아로 中和시켜 家畜에게 給與하면 中和된 암모니아는 蛋白質源이 될 수도 있고, 이런 處理는 嗜好性이 높으며, 飼料에 25%까지 혼합하여도 木質의 32%까지 消化率을 높일 수 있다고 보고했다. 이 木質飼料는 75%까지 給與해도 副作用이 없으며 少量이나마 增體하므로 非常時 유지사료로 적당하다고 했다.

微生物에 의한 木質廢棄物의 飼料化方案은 廢棄物의 嗜好性, 消化率, 營養素含量을 높여 給與하는

方法과 廢資源을 培地로 微生物 즉, 幼蟲, 單細胞蛋白質을 生産, 給與하는 方法이 있다. 纖維質資源에 微生物을 接種시키면 Lignin같은 消化 억제 物質을 分解할 수 있고 消化率과 蛋白質含量을 增加시킬 수 있다.

루지아니아 주립대학의 Han Y.W 등(1971)<sup>10)</sup>은 纖維性廢棄物에 *Cellulomonas* sp.와 *Alcaligenas* sp.를 培養하여 蛋白質含量을 높이는 方法을 研究開發했으며 역시 그는 1975年 NaOH處理後 짚소 등 微生物에 必要한 營養素를 첨가하고 微生物을 接種시켜 2~3일간 醱酵시킨 뒤 蛋白質含量을 12%로 증가시켜 畜牛飼料로 使用하기도 하고 菌體만 分離하여 高蛋白飼料로 使用할 수 있다고 했다.

纖維質廢棄物의 消化率이 낮은 이유는 Lignin 含量이 높기 때문이며, Basidiomycetes에 속하는 White rot fungi가 菌體外酵素를 분비하여 Lignin을 分解하는 것을 利用하려는 研究가 활발히 進行되고 있으며, 이에 관한 Eriksson(1975)<sup>11)</sup>, Kim, S.C.(1979)<sup>12)</sup>, Kirk, T.K.(1975)<sup>13)</sup>, Smith, L.W.(1970)<sup>14)</sup>의 報告도 나와 있다.

## 2.2 木材腐朽菌에 의한 Lignin 分解

木材腐朽菌에 의한 Lignin의 分解에 對하여 Henderson(1966)은 *Polystictus*와 *Trametes*속의 菌을 利用하여 腐敗시켰던 나무에서 Vanilic acid와 Syringic acid를 檢出하였다. K.Hata(1966)<sup>15)</sup>, 石川久雄(1964)<sup>16)</sup>, H.Ishikawa 等(1963)<sup>17)</sup>은 Lignin 分解와 酵素의 精製, 分解된 Lignin의 變化에 대한 研究를 報告한 바 있으며, 酵素反應에는 側鎖의 分裂, 水酸基의 導入, 脫水素 等이 있다.

石川, V.Sundman(1964)등<sup>18)</sup>은 *Coriolus versicolor*와 *Heterobasidion annosum* 等의 腐朽菌을 利用하여 소나무 및 잣나무를 썩힐 때의 分解副産物을 檢討하고, Lignin이 分解될 때 中間生成物로서 coniferyl aldehyde, p--oxycinnamic aldehyde, ferulic acid, 4-oxy-3-methoxy phenyl pyruvic acid,

p-oxy-cinnamic acid, guaiacyl glycerol, guaiacyl glycerol-β-coniferylether가 생성됨을 밝혀냈다. 더우기 침엽수 Lignin化合物에 *Coriolus versicolor*와 *Fomes fomentarius*를 작용시켜서 다음 생성물을 確認하였다(圖 1).

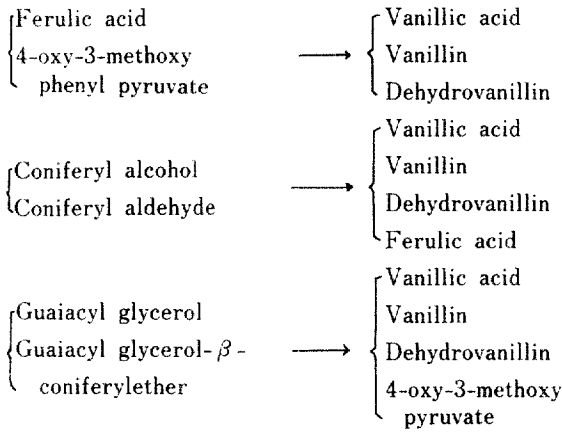


Fig.1. Biodegradation products from lignin by *Coriolus versicolor* and *Fomes fomentarius*.

木材中の Lignin에 對한 確實한 證明은 아직 充分히 밝혀져 있지 않지만 Lignin에 含有되어 있는 Alkyl aryether結合의 切斷에 대해서는 加水分解 酵素에 의한 ether結合의 分解가 豫상되고, 脫 methyl 反應에는 oxygenase型 反應으로서 NADH를 受容體로 하는 것이 推定되고 있다. T.Fukuzumi(1969)<sup>19)</sup>는 腐朽菌의 生菌에 의해 veratric acid이 脫methoxyl이 되고 p-oxy安息香酸이 生成되는 것이라고 보고하였다.

一般的으로 脫 methoxyl 反應은 일어나기 어려우므로 合成에 의한 p-oxy安息香酸의 生成을 推測하기도 했다.

따라서, 脫 methoxyl 反應의 證明에는 酵素를 꺼내어 確認할 必要가 있으며, 天然 Lignin이 木材中에서 炭水化合物과 結合하고 網狀構造를 가지고 있으며 어디에서 切斷이 始作되는가는 分明하지 않으며, 切斷에 의해서 물에 대한 溶解性이 높아지는 것만은 사실인 것 같다.

Lignin이 Laccase란 酵素에 의해서 guaiacyl glycerol-β-coniferylether란 比較的 작은 單位의 分子로 된다면 木材腐朽菌에 含有되어 있는 酵素에 의해 巨大分子가 切斷되고, 그 生成된 芳香族化合物에 Laccase란 芳香核分解酵素가 作用하여 간단한 化合物로 만드는 것이라고 推測된다.

### 3. 材料 및 方法

#### 3.1 菌株 및 培養

農村振興廳 農技研에서 분양받은 *Flammulina*

*velutipes*를 FDA 斜面培地에 순수배양한 다음, 양과基本培地<sup>20)</sup>를 비롯한 3종류의 液體培地에 接種하여 26℃(室溫)에서 간헐적 진탕배양으로 培養하였다.

##### 3.1.1 양과 基本培地

KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, Peptone 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g 에 양과 100 g 을 끓인 液을 添加하여 전체양을 1 l 로 하였다.

##### 3.1.2 톱밥添加培地

양과基本培地에 참나무톱밥 끓인 液을 全體 液量의 1/2 添加하였다.

##### 3.1.3 보릿짚培地

보리짚 끓인 液에 삶은 보릿짚과 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, Peptone 2 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 0.2 g, MgSO<sub>4</sub> 0.5 g 을 가하였다.

培地의 멸균은 120℃에서 30分間 行하였으며 배양법은 500ml 삼각후라스크에 300ml씩 넣어 綿絨을 하여 26~28℃의 항온실에서 培養하였다.

#### 3.2 培養中 Laccase의 活性에 變化

各培地은 소정의 培養期間別로 無菌의으로 試料를 채취, 여과지로 신속히 여과하여 活性을 측정하였다.

#### 3.3 粗酵素液의 調製

各培地은 소정기간 培養後 가장 活性이 강한 時期에 培養液을 室溫에서 부호너핀벌로 신속히 여과하고 凍結보관하여 供試하였다.

#### 3.4 酵素活性의 測定

粗酵素液 1.9ml를 citrate-phosphate buffer(pH 6.45, 0.02M) 1.7ml와 섞어 5mM의 p-phenylenediamine 0.3ml를 添加한 즉시 525nm에서 吸光度를 매분마다 측정하였으며 아래식에 의해 arbitrary activity(A)<sup>21)</sup>를 환산하였다.

$$A > 15.3846 \times \frac{\Delta E}{\Delta t(\text{sec})} \text{ (unit/sec)}$$

ΔE: O.D.의 변화  
Δt: 反應時間

#### 3.5 最適pH

粗酵素液 1.9ml에 완충용액 1.7ml, 基質(5mM의 p-phenylenediamine) 0.3ml를 가한다음 즉시 525nm에서 吸光度를 測定하여 初期速度를 구하고 이를 기준으로 最適pH를 구하였다.

#### 3.6 pH安定性

粗酵素液 1.9ml에 완충용액 1.7ml를 가하고 各 pH에서 60分間 放量한 후 다시 最適pH로 조절한 다음 基質을 넣고 初期速度를 測定하였으며 이로부터 各 pH에서의 安定性을 구하였다.

#### 3.7 溫度安定性

粗酵素液 1.9ml에 pH 6.45의 citrate phosphate

buffer 1.7ml를 가하고 40分間 各溫度에서 放量한 후 急冷하여 初期速度를 측정하고 溫度安定性을 구하였다.

### 3.8 Km Value

基質의 농도를 5, 10, 20, 60, 100mM로 변화시키면서 各濃度別로 初期活性을 測定하고 이값으로부터 Lineweaver Busk plot를 그린다음 Km Value를 구하였다.

### 3.9 酵素活性을 阻害하는 物質

有機溶媒 阻害작용의 측정은 粗酵素液 30ml에 각각의 有機溶媒 30ml씩을 가하여 침전시킨 다음 遠心分離(3500rpm, 25分間, 4℃)하여 침전물을 회수하고, 回收된 침전물을 증류수 30ml에 分散, 溶解시킨 후 1.9ml를 취하여 酵素活性을 측정하고 이活性을 침전시키기 전의 粗酵素液의 活性과 비교하여 그 不活性化 程度로 표시하였다.

Na-Azide의 경우는 2mM되도록 첨가하여 活性을 比較하였다.

## 4. 結果 및 考察

### 4.1 各培地에서 菌絲의 生育期間 동안 酵素活性의 變化

各培地에서 菌絲를 培養하여 任意의 經過기간별 試料를 採取하여 酵素活性의 變化를 觀察하였다.

圖 2은 各種 培地에서 측정한 Laccase 活性변화를 徑時的으로 나타낸것으로서 그림에서 보는 바와같이

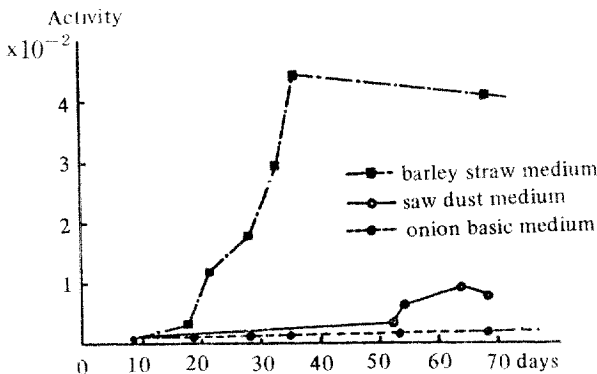


Fig. 2. Change in Laccase activity from saw dust medium and barley straw medium

菌絲接種後 보릿짚 培地에서는 20日後부터 活性이 나타나서 36日째에 最大活性值를 나타내고 서서히 減少하나 높은 活性值를 유지한다.

톱밥 培地는 보릿짚보다 酵素活性 增大에 큰 影響을 미치지 않는 것 같으나 培養後 40日경부터 서서히 增加하여 53日째부터 急激히 增加하여 63日

째에 最大活性을 갖는다. 그 以後 서서히 減少하여 어느 程度의 活性值를 오랜 期間 經과 후까지도 持續한다.

보릿짚 培地의 最大活性值는 양과 培地에서의 最大活性值의 16배 더 높게 나타나며 톱밥 培地보다는 5倍以上 높았다.

톱밥 培地의 最大活性值는 양과 培地의 最大活性值보다 3.3倍以上의 活性值를 나타내었다.

*Pleurotus ostreatus*와 比較<sup>22)</sup>하여 보면 *Pleurotus ostreatus*는 最大活性이 培養初期(10~20日 經過後)에 나타나는 反面에, 이 strain의 最大活性은 接種한 지 30~40日 經過 후에 나타나는 점이 顯격히 달랐으며 菌絲成長 모양도 이 strain은 주로 모여서 成長하고 *Pleurotus ostreatus*는 培養器 全體에 分散되어 자라난다.

以上の 結果를 통하여 보면 *Flammulina velutipes*는 接種後 약40日後부터 活性이 나타나며 보릿짚은 活性을 促進시켜주는 좋은 inducer임을 알 수 있다.

### 4.2 最適 pH

[圖 3]은 Laccase의 最適 pH를 2種의 완충용액을 사용, 測定한 결과이다. 그림에서 보는 바와같이 *Flammulina velutipes*의 最適 pH는 6.6으로서 *Pleurotus ostreatus*의 6.0에 비해 다소 높았다. 基質이나 酵素源, 酵素濃度에 따라 最大活性이 pH 6.0~6.5의 범위에서 나타났것은 D.C.Gregg(1940)<sup>23)</sup> 및 D.Bertrand(1947)<sup>24)</sup>의 報告와 거의 일치하였으며, Leonowicz등에 의한 *Trametes versicolor*의 pH 5.3과는 다소 差異가 있었다.

citrate phosphate buffer와 Clark lub's buffer는 酵素活性에 크게 影響하지 않는것으로 나타났다.

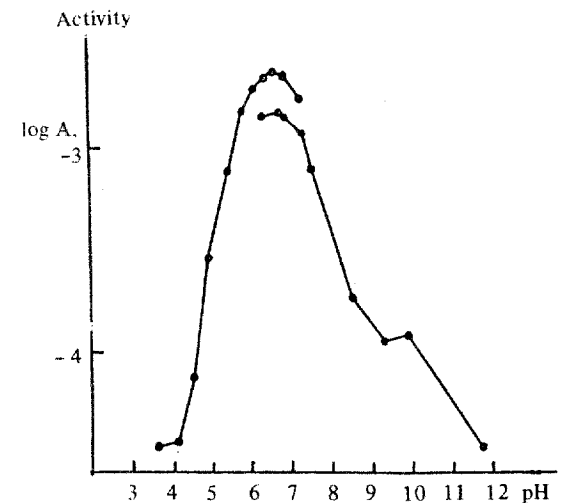


Fig. 3. pH Optimum of Laccase from *Flammulina velutipes*

○— citrate phosphate buffer  
●— clark lub's buffer

4.3 pH 安定性

圖 4는 *Flammulina velutipes*로 부터 추출한 Laccase의 pH 安定性을 측정 한 결과이다. pH 4.5~9.5에서 60分間 放置한 酵素의 活性은 不變하였으며, *Pleurotus ostreatus*<sup>22)</sup>의 4.7~8.7에 비하여 比較的 넓은 pH 安定性을 結果하였다.

또한 初期反應速度와 40分間의 平均速度에 의해 산출된 活性을 比較하였을때 pH 4.5~9.5의 영역에서는 거의 差異가 없는 것으로 나타났다.

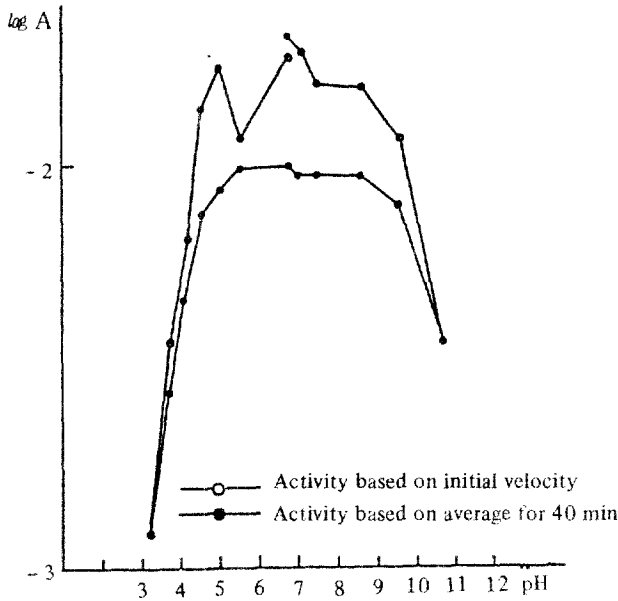


Fig. 4. pH Stability of Laccase from *F. velutipes* based on initial velocity and based on the average activity for 40 min.

4.4 溫度 安定性

各溫度에서 酵素液을 40分間 放置한 다음 activity를 측정 한 결과 圖 5에서 보는 바와같이 40℃까지는 酵素活性이 거의 변하지 않고 100% 유지하였으며, 溫度를 50℃까지 올리더라도 약78%나 남아 있어 本酵素가 溫度에 비교적 安定함을 알 수 있었다. 溫度가 70℃ 이상이되면 급격히 活性이 감소되어 失活현상을 보여주었다.

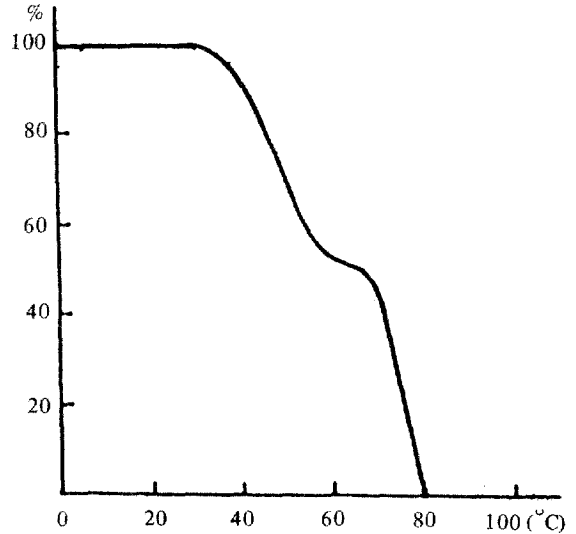


Fig. 5. Temperature Stability of Laccase from *Flammulina velutipes*

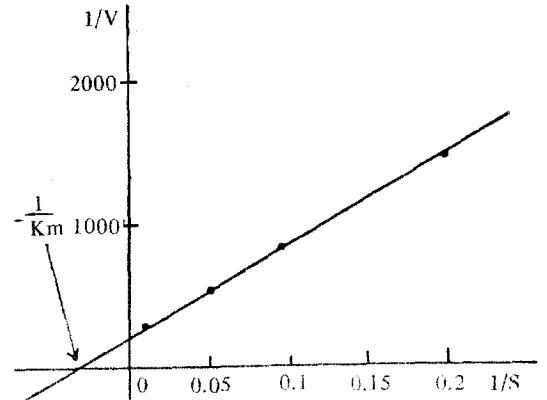


Fig. 6. Km Value of Laccase from *Flammulina velutipes*

4.5 Km Value

基質의 농도를 5, 10, 20, 60, 100mM로 변화시키면서 測定한 Km Value는 表 2와 圖 6에 나타낸 것과 같다.

*Flammulina velutipes*의 Km値는 28.0mM로서 *Pleurotus ostreatus*<sup>22)</sup>의 3.2mM보다 약 9배정도 높게 나타났다.

Table 2.  $K_M$  Value of Laccase from *Flammulina velutipes*

Substrate con.(mM)	$\Delta E$ (O.D)	$\Delta t$ (sec)	Activit (velocity)	1/subst.	1/veloc.	備考
100	0.055	240	$3.53 \times 10^{-3}$	0.01	283	
60	0.043	240	$2.76 \times 10^{-3}$	0.0167	363	
20	0.022	180	$1.88 \times 10^{-3}$	0.05	532	
10	0.014	180	$1.20 \times 10^{-3}$	0.1	836	
5	0.008	180	$6.84 \times 10^{-4}$	0.2	1463	

## 4. 6저해물질

침전에 사용되는 유기용매 및 부패방지를 위하여 사용되는 Na-Azide에 의한 酵素의 不活性化를 測定하였으며 그 결과는 Table 3. 같다.

*Flammulina velutipes*로부터 추출한 Laccase의 活性은 大部分의 溶媒에 큰 阻害를 받지 않았고, Na-Azide에는 100%저해를 받았으나 다시 ace-

tone으로 沈澱을 시켰을 경우, activity가 상승되는 것을 보아 液自體에도 약간의 阻害水物質이 포함되어 있으며, 이들 물질이 acetone 沈澱으로 除去되는 것으로 추정된다.

以上の 結果에서 同一한 酵素 Laccase일지라도 strain에 따라 特性의 差異가 있으며 Laccase는 比較的 넓은 pH 領域과 熱에 安定함을 알 수 있다.

Table 3. The effect of various solvents and inhibitors on the Laccase activity

種 類	Activity (unit / sec)	Activity 지수	阻害率 (%)
粗酵素液	$1.2820 \times 10^{-3}$	1	0
acetone 沈澱物	$1.4641 \times 10^{-3}$	1.28	0
methanol "	$1.1794 \times 10^{-3}$	0.92	8
ethanol "	$1.2307 \times 10^{-3}$	0.96	4
iso-propyl alcohol "	$1.0769 \times 10^{-3}$	0.84	16
Na-Azide 添加液	0	0	100
Na-Azide 添加液의 acetone 침전물	$1.4871 \times 10^{-3}$	1.16	0

## 5. 結 論

木質系資源으로 부터 酵素의 方法으로 Lignin을 除去하기 위한 기초적 연구의 하나로서 白色腐朽菌 (white rot fungus)인 *Flammulina velutipes*로부터 抽出한 Laccase의 酵素의 特性을 究明하기 위하여 本研究을 실시하였다.

培養期間동안 Laccase의 活性은 培地의 종류에 따라 달랐으며, Laccase의 최대활성은 보리짚培地의 경우 40일경에, 톱밥培地의 경우 65일경에 나타났다. 보리짚培地의 最大活性은 톱밥배지의 5배, 양과培地보다는 16배 더 높았다.

이 酵素의 最適pH는 6.6이었으며, pH4.5에서 9.5의 비교적 넓은 pH영역에서 安定하였다. 溫度安定성은 40℃에서 40分間 放置하였을때 96%의 活性이 보존되었으며 60℃에서는 58% 유지되었다. Km Value는 28.0mM로서 *Pleurotus ostreatus*로부터 추출한 Laccase의 3.209mM에 비해 현저히 높은 값을 보여주었다.

침전에 사용되는 有機溶媒는 酵素活性을 전혀 阻害하지 않았으며, Na-Azide는 酵素活性을 阻害하였으나 다시 아세트산으로 침전시켰을때 活性의 회복을 보여주었다.

## 引用文獻

- 1) Bae, D.H., Y.H.Chah, W.J.Shin, and T.H.Kang., 1978. Improvement of nutritive values of rice straw by physical treatment, Annual Report of Live Stock Exp.Sta., p186
- 2) Kay, M.A., Mac Dearnid, and N.A.Macled., 1970. Replacement of cereals with chopped straw, Animal Prod., 12:261
- 3) Lloyd, E.W., E.W.Crampton, E.Donefer, and E.Beacon., 1960. J.Animal Sci., 19:859
- 4) Kay, M.A., Mac Dearnid, and R.Massie., 1970. Replacement of cereals with ground straw, Animal Prod., 12:419
- 5) Guggolz, J., G.O.Kohler, and T.S.Klopfenstein., 1971. J.Animal Sci., 33(1):151
- 6) Lehman, F., 1895. Land Wirtschaftliche Jahrbucher 24, Ergänzungsband 1:118
- 7) Beckmann, E., 1919. Deutsche Land Press, 46:12
- 8) Homb, T.F., 1977. Chemical treatment of straw at commercial and farm levels, FAO Animal Prod. & Health Paper, 4:25
- 9) Butterbaugh, J.W, and R.R.Johnson., 1974. J.Animal Sci., 38:294
- 10) Han, Y.W., C.E.Dunlap, and C.D.Callihan., 1977. Single cell protein from cellulosic waste, Food Tech., 25:32
- 11) Eriksson, K.E., and K.Lasson., 1975. Biotech. Bioeng., 17:327
- 12) Kim, C.S., and S.S.Lee., 1979. Study on the seed development for the production of straw silage, KIST Rep.B.S.E, 461~1337
- 13) Kirk, T.K., 1975. Effect of brown rot fungus on lignin in spruce wood, Holzforschung, 29:99
- 14) Smith, L.W., H.K.Goerking, and C.H.Gordon.,

1970. In vitro digestability of chemically treated feces, *J. Animal Sci.*, 31:1205
- 15) Hata, K., 1966. *Holzfor schung*, 20:142
- 16) 石川久雄, 冲妙, 1964. *木材學會誌* 10:207
- 17) H.Ishikawa., 1963. *Achiv. Biochem. Biophys.*, 100:131 and 147
- 18) Sundmann, V., 1964. *Acta Agri. Scand.* 14:229
- 19) Fukuzumi, T., 1969. *Achiv. Biophys.*, 129:396
- 20) Iwahara, H., T.Yoshimoto, and T.Fukuzumi., 1981. *木材學會誌* 27(4):331
- 21) Leonowicz, A. and K.Graynowicz., 1981. *Enzyme Microb.Technol.*, 3(1):55
- 22) Lee, J.S., U.J.Lee, and D.S.Suh., 1985. Production, partial purification and physico-chemical characteristics of laccase from *Pleurotus ostreatus*, *Kor.J.Appl.Microbiol.Bioeng*, 13(1):65
- 23) Gregg, D.C., and W.H.Miller., 1940. *J.Am.Chem.Soc.*, 62:1374
- 24) Bertrand, D., 1947. *Compt.Rend.*, 224:605, 224:1591