

백색부후균 *Coriolus hirsutus* LD-1의 리그닌분해효소 활성과 염료탈색에 관한 연구

남은숙 · 하상우¹⁾ · 박신인*

경원대학교 식품영양학과, ¹⁾우진 중앙연구소
(2006년 7월 10일 접수, 2006년 8월 23일 수리)

Production of Lignin Degrading Enzymes and Decolorization of Dye Compounds by White-rotting Fungi *Coriolus hirsutus* LD-1

Eun-Sook Nam, Sang-Woo Ha¹⁾, and Shin-In Park* (Department of Food and Nutrition, Kyungwon University, ¹⁾Woogene Central Research Lab.)

ABSTRACT: The present research was undertaken to investigate the activities of ligninolytic enzymes and dye-decolorization capabilities of white-rotting fungi *Coriolus hirsutus* LD-1. The isolated white-rotting fungi (*Coriolus hirsutus* LD-1) produced laccase (16,388.9 U/L) and manganese-dependent peroxidase (19.81 U/L) but it did not produce lignin peroxidase. When the isolated fungi was incubated with the treatment of dyes for 8 days, the rates of decolorization of remazol brilliant blue R and bromophenol blue were 70.2% and 98%, respectively. The activity for manganese-dependent peroxidase was low, whereas that for laccase was very high. Moreover, the laccase was more effective to decolor when compared to manganese-dependent peroxidase. The results suggested that laccase of *Coriolus hirsutus* LD-1 might be playing an important role in the decolorization of the dyes.

Key Words: White-rotting fungi, Laccase, Manganese-dependent peroxidase, Decolorization

서 론

자연생태계의 미생물은 다양한 천연 또는 합성유기물을 변화, 분해시켜 성장할 수 있는 능력이 있어 자연계 물질의 재순환에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 자연과 환경의 보존적인 차원에서 미생물의 이러한 생분해능(biodegradative activity)을 증가시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다.

미생물에 의한 리그닌 분해 기작의 규명은 지구상의 탄소 사이클을 해결하는데 큰 의의가 있을 뿐 아니라 유효한 펄프 화법의 개발을 비롯, 펄프 표백 폐액의 생화학적 처리, 염색 공장 폐수, 축산폐수의 처리 등 산업적으로 이용가능성이 있다고 하였다¹⁾.

리그닌을 분해하는 능력을 가진 미생물로는 wood-rotting fungi로 *Phanerochaete chrysosporium*²⁾, *Tinctoporis* sp.³⁾,

*Schizophyllum commune*⁴⁾, *Mycelia sterilia* 등의 곰팡이에 대한 연구와 몇몇의 방선균, 또는 *Rhodococcus*⁵⁾, *Bacillus cereus*⁶⁾, *Aeromonas hydrophilia*⁷⁾, *Pseudomonas*⁸⁾ 등의 세균 및 효모에 대한 연구가 진행되고 있다. 특히 이들 미생물 중 백색부후균이 분비하는 리그닌분해효소가 주요한 역할을 하고 있으며, 이들이 생성하는 extracellular 효소로는 laccase, lignin peroxidase(LiP), manganese-dependent peroxidase(MnP) 등으로 알려져 있으며, 이들은 모두 색소 depolymerization에 관여한다고 알려져 있다⁹⁾.

미생물에 의한 탈색은 주로 *Phanerochaete chrysosporium* 을 이용하여 연구가 진행되고 있으며¹⁰⁾, 특히 세포외효소에 의하여 분해가 진행되는 것으로 알려져 있다¹¹⁾. 또한 이 균은 azo계 염료의 탈색이 가능하여 방향족의 고리를 분해시키는 것으로 보고되고 있다¹²⁾. *Flavobacterium* sp. ATCC 39723 의 경우에는 세포내효소를 분비하여 azo 염료를 산화효소에 의하여 분해시키는 것으로 보고되고 있으며¹³⁾, 방선균에 의해서도 탈색효율을 검토하여 보고하고 있다¹⁴⁾. 이외에도 *Coriolus versicolor*¹⁵⁾, *Bjerkandera austa*¹⁶⁾의 미생물이 탈색

*연락처:

Tel: +82-31-750-5969 Fax: +82-31-750-5974
E-mail: psin@kyungwon.ac.kr

능을 가지고 있는 것으로 보고되고 있다. 그러나 세포내효소를 생성하는 미생물에 비해 세포외효소를 생성하는 담자균류(Basidiomycetes)에 속하는 백색부후균은 리그닌분해 효소군(ligninolytic enzymes)에 의해 다양한 범주의 난분해성 화합물을 비특이적으로 분해할 수 있기 때문에 이를 환경에 응용하려는 연구가 활발히 진행되고 있다. 그 중 *Coriolus versicolor*, *Phanerochaete chrysosporium* 등이 리그닌분해 미생물로 가장 잘 알려져 있다. 그러나 같은 fungi라도 리그닌 분해능이나 세포외효소의 특성이 다르게 나타난다고 하였다¹⁷⁾.

따라서 본 연구는 리그닌 분해능이 있는 wood-rotting fungi를 선발하여 이들의 염료탈색율과 효소 활성을 비교함으로써 향후 난분해성 물질의 생물학적 처리에 대한 이용가능성을 검토하고자 하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양조건

목재부후균 23균주를 농업과학 연구원에서 분양받아 사용하였다. 동결건조 상태의 균주를 증류수에 30분 이상 현탁시킨 후에 실험을 위해 wood powder로 0.05% lignin(Kraft indulin)과 0.01% guaiacol이 들어있는 glucose-peptone(GP) 액체배지(glucose 30 g/L, peptone 10 g/L, KH_2PO_4 1.4 g/L, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.05 g/L, Thiamine-HCl 0.002 g/L, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 0.02 g/L, MnSO_4 0.02 g/L, Agar 15 g/L, pH 5.0)에 접종하여 28°C에서 7일간 배양하여 red colored zone width로 선발하였다¹⁸⁾. 효소분석을 위해 glucose-peptone 액체배지에 코르크보러로 절단된 균사조각을 접종하여 28°C에서 10일간 배양한 후 15,000 rpm에서 5분간 원심분리하여 배양상등액으로 세포의 효소 활성도를 측정하였다. 균주의 활성을 유지하기 위해 2주마다 계대배양을 하고 4°C의 냉장고에서 보관하였다.

시약 및 분석

본 연구에 사용한 염료는 아조계인 bromophenol blue(이하 BB로 약함), 반응성 염료인 안트라퀴논계 remazol brilliant blue R(이하 RBBR로 약함)을 Sigma사에서 구입하였고, 기타 실험에는 특급 및 일급시약을 사용하였다. 이들 성분은 UV-3100 Spectrophotometer(Shimadzu, Japan)를 이용하여 정량분석하였다.

염료탈색 분석

염료탈색능을 관찰하기 위해 0.2%의 염료 BB와 염료 RBBR을 각각 첨가한 GP 고체배지에서 균사체가 성장하면서 나타나는 염료 탈색영역의 크기로 측정하였다. 염료의 탈색율을 조사하기 위해서는 균사체의 상단을 코르크보러로 취하여 곰팡이 배지인 Potato dextrose agar(Potato infusion 200 g/L, Bacto dextrose 20 g/L, Agar 15 g/L, pH 6.8)

평판배지의 중앙에 접종하여 25-28°C의 항온기에서 7일동안 배양하였다. 그 후 증류용 평판배지에서 배양된 균사체를 코르크보러로 절단하여 취하여 250 mL 플라스크에 50 mL의 PDA 액체배지에 접종하여 28°C, 150 rpm으로 10일간 배양한 후, 배양액을 4°C에서 5,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 제거한 후 증류수로 2회 세척하여 사용하였다. 세척된 균액 5%와 0.2% 염료를 GP 액체배지에 접종한 후 28°C에서 10일간 150 rpm으로 진탕 배양한 다음 배양액을 4°C에서 15,000 rpm으로 원심분리하여 상등액을 채취하여 탈색 정도를 염료의 최대흡수파장에서 흡광도를 측정하였다²¹⁾.

효소의 활성측정

Laccase 효소활성은 Eggert 등¹⁹⁾의 방법에 따라 ABTS(2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazolin-6-sulfonate))를 기질로 사용하여 ABTS의 산화량을 420 nm에서 측정하였다. 반응용액은 0.1 mM ABTS, 20 mM의 초산완충용액(pH 4.0)을 섞어 3 mL 되게 하여 1분간 반응시키면서 420 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient=36,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). 효소활성 단위는 분당 1 μmol 의 ABTS를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다. 한편, manganese-dependent peroxidase(MnP)의 활성은 de Jong 등²⁰⁾의 방법을 이용하여 2,6-dimethoxyphenol(DMP)을 기질로, 효소 반응액은 1 mM DMP와 1 mM EDTA, 20 mM 초산완충용액(pH 4.5)을 혼합한 후 0.1 mM H_2O_2 를 첨가하여 1분간 반응시키면서 470 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient=65,000 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). 효소의 활성 단위는 분당 1 μmol 의 Mn(II)를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

Lignin peroxidase(LiP)는 Kirk와 Connors²¹⁾의 방법을 사용하였으며, 효소 활성은 기질로 10 mM veratryl alcohol, 0.1 M sodium tartrate buffer(pH 3.0), 효소용액을 첨가하고 5 mM H_2O_2 를 혼합하여 최종부피가 3 mL가 되게 한 후 1분간 반응시키면서 310 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient=9,300 $\text{M}^{-1} \text{cm}^{-1}$). 효소의 활성 단위는 분당 1 μmol 의 veratryl alcohol을 veratryl aldehyde로 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정의하였다.

단백질 정량은 Lowry 방법²²⁾을 이용하여 측정하였으며, 표준단백질로는 bovine serum albumin(Sigma Chemical Co.)을 사용하였다.

결과 및 고찰

리그닌분해균의 선발

목재부후균 중 리그닌 분해능이 있는 균주를 선발하기 위해서 wood meal(Kraft indulin)배지에 guaiacol을 넣어 배지상에서 갈색환(brown zone) 형성 유무를 조사하였다²³⁾. Table 1은 갈색환의 크기를 측정할 것으로서 23균주 중 형

성된 갈색환의 크기가 70 mm 이상인 균주 2균주, 30-50 mm는 3균주, 10-30 mm은 8균주, 10 mm 이하는 3균주. 갈색환을 전혀 생성하지 못한 균주는 7균주로 나타났다. Figure 1은 0.05% lignin을 함유한 리그닌 배지에서 갈색환이 형성

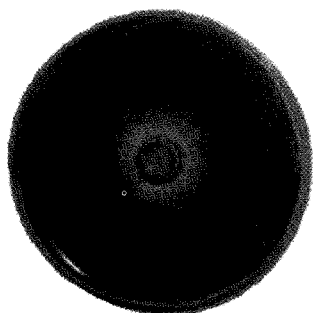


Fig. 1. The formation of brown-zone by ligninolytic enzyme in guaiacol medium*. (* Induline 0.2%, Guaiacol 0.01%, Agar 1.5% L)

Table 1. Colored zone width(CZW) of 23 species of wood-rotting fungi

No.	Strains isolated	CZW (mm)
LD- 1	<i>Coriolus hirsutus</i> KACC 500148	78
LD- 2	<i>Phallus</i> sp.	14
LD- 3	<i>Volvariella bombycina</i> KACC 7736	-
LD- 4	<i>Daedalea dickinsii</i> KACC 500118	70
LD- 5	<i>Pleurotus abalonus</i> KACC	28
LD- 6	<i>Morchella esculenta</i> KACC 500271	-
LD- 7	<i>Cordyceps nutans</i> KACC 500169	-
LD- 8	<i>Hericium erinaceum</i> KACC 7528	20
LD- 9	<i>Pholiota adiposa</i> KACC 7969	45
LD-10	<i>Hydropus</i> sp. KACC 7636	25
LD-11	<i>Stropharia rugosoannulate</i> KACC 7674	32
LD-12	<i>Callistosporium</i> sp. KACC 7607	16
LD-13	<i>Phellinus</i> sp. KACC 7537	34
LD-14	<i>Leucoagricus bresadolae</i> KACC 7675	25
LD-15	<i>Cordyceps militarius</i> KACC 7845	-
LD-16	<i>Lentinus edodes</i> KACC 500044	10
LD-17	<i>Fomes fomentarius</i> KACC 500023	-
LD-18	<i>Coriolus brevis</i> KACC 500061	7
LD-19	<i>Laetiporus sulphureus</i> var. <i>miniatus</i> KACC 500048	-
LD-20	<i>Microporus affinis</i> KACC 500099	-
LD-21	<i>Fomitella fraxinea</i> KACC 500020	14
LD-22	<i>Lampteromyces japonicus</i> KACC 500057	12
LD-23	<i>Coriolus hirstus</i> KACC 500066	8

-: No detect

된 것을 나타내었다. Nishida 등²⁴⁾의 보고에 의하면 갈색환의 크기는 리그닌 분해능과 관계가 있다고 하였으므로 갈색환을 형성한 16균주는 크기에 차이가 있기는 하지만 리그닌 분해능이 있는 것으로 보이며, 그 중에서 크기가 70 mm 이상인 것은 LD-1과 LD-4로 리그닌 분해능이 가장 큰 것으로 추정되었다.

효소 활성측정

갈색환을 형성하는 16균주의 리그닌 분해능과 효소 활성의 관계를 조사하기 위하여 GP 액체배지에 접종하여 28°C에서 7일간 배양하여 효소 활성을 측정하였다. 선발된 균주는 대부분 GP 액체배지에서 잘 자랐으며, 그 중 LD-1, LD-11, LD-18과 LD-21은 Laccase와 MnP 활성을 모두 가지고 있는 것으로 나타났으며, LD-4와 LD-20은 laccase활성만 있는 것으로 나타났다. 나머지 10균주는 갈색환을 형성하였지만 리그닌 분해 효소 활성은 거의 없는 것으로 나타났으며, LiP 효소 활성은 Laccase나 MnP 효소 활성이 있는 균주에서 모두 없는 것으로 나타났다(Table 2). LiP, MnP 및 laccase는 자연계 리그닌을 분해할 수 있는 효소로 알려져 있으나 배양 중에 생산되는 효소 양과 갈색환의 크기에 따른 리그닌 분해정도는 비례적으로 증가하지 않는 것으로 나타났다.

정 등²⁵⁾의 보고에 의하면 리그닌 분해력이 높다고 해서 laccase나 MnP의 활성이 높은 것은 아니라고 하였으며, Kim 등²⁶⁾은 리그닌 분해에 관련된 효소는 laccase보다는 MnP라고 보고하였으나 본 실험에서는 효소 활성을 갖는 6균주 모두 MnP보다는 laccase 효소활성이 더 높게 나타났으며, 특히 LD-1의 laccase 효소 활성은 16,388.9 U/L, MnP의 효소활성은 19.81 U/L로 각각 나타났으며 LiP의 활성은 나타나지 않았다. 따라서 갈색환의 크기가 70 mm 이상이고 높은 리그닌 분해 효소 활성을 가지고 있는 LD-1을 이용하여 염료 탈색을 조사하였다.

Table 2. Extracellular enzyme activities of the strains of wood-rotting fungi

No.	Strains	Laccase (U/L)	MnP (U/L)	LiP (U/L)
LD- 1	<i>Coriolus hirsutus</i> KACC 500148	16,388.9	19.81	0
LD- 4	<i>Daedalea dickinsii</i> KACC 500118	1,611.1	0	0
LD-11	<i>Stropharia rugosoannulate</i> KACC 7674	2,150	41.55	0
LD-18	<i>Coriolus brevis</i> KACC 50006	132.81	0.080	0
LD-20	<i>Microporus affinis</i> KACC 500099	11.95	0	0
LD-21	<i>Fomitella fraxinea</i> KACC 500020	1.33	0.016	0

염료 탈색을 측정

LD-1의 염료 탈색능을 조사하기 위해 염료 BB와 염료 RBBR를 각각 0.2%씩 첨가한 GP 고체배지에 배양하여 형성된 투명환의 크기로 색도 제거능을 확인하였다. Figure 2에서 보면 LD-1은 염료 BB와 염료 RBBR에 대해 염료 탈색능이 뚜렷한 것으로 나타났다.

따라서 LD-1의 색소 탈색을 조사하기 위해 액체배지에서 배양하면서 각 색소의 최대흡수파장에서의 흡광도의 변화를 조사하였고, 탈색율(%)과 효소 활성과의 관계를 조사하기 위해 laccase 및 MnP 효소 활성을 측정하였다. Figure 3은 염료 RBBR의 최대흡수파장 595 nm에서 배양에 따른 흡광도의 변화를 나타낸 것으로 배양 4일까지는 흡광도의 변화가 없다가 배양 6일째에 O.D.가 0.68로 떨어지기 시작하여 7일째는 O.D.가 0.2로 떨어지는 것으로 나타났다. Figure 4는 염료 탈색율과 효소 활성을 나타낸 것으로 Figure 3의 흡광도의 변화와 같이 배양 4일까지는 탈색율에 전혀 변화가 없다가 배양 6일째에 23% 감소하기 시작하여 배양 7일째는 70%, 8일째는 또한 71.2%의 탈색율을 나타내었고, 효소 활성의 경우 laccase의 활성은 배양 4일부터 나타나 배양 8일

째는 1,380 U/L로 급격히 증가한 반면, MnP의 경우는 배양 6일째에 활성을 나타내어 배양 8일째는 20 U/L로 나타났다. 따라서 LD-1을 이용한 염료 RBBR의 색도제거에 관여하는 효소는 MnP보다는 laccase인 것으로 나타났다.

Figure 5는 LD-1을 이용한 염료 BB의 최대흡수파장 592 nm에서 배양에 따른 흡광도의 변화를 나타낸 것으로 배양 2일까지는 흡광도의 변화가 없다가 배양 4일째에 O.D.가 0.75로 떨어지기 시작하여 8일째는 O.D.가 0에 가깝게 떨어지는 것으로 나타났다. Figure 6은 색도 제거율과 효소 활성을 나타낸 것으로 Figure 5의 흡광도의 변화와 같이 배양 2일까지는 제거율에 전혀 변화가 없었으나 배양 4일째에 42.4%가 감소하였고 배양 6일째는 98%의 탈색율을 나타내었으며, 효소 활성의 경우 laccase의 활성은 배양 2일부터 서서히 증가하여 배양 8일째는 1,200 U/L로 급격히 증가한 반면, MnP의 경우는 배양 2일째부터 서서히 증가하여 배양 8일째는 18 U/L로 나타났다.

LD-1은 색도제거능에 있어 염료 RBBR보다 염료 BB에 더 효과적인 것을 알 수 있었으며, 색도 제거에 관여하는 효소는 MnP보다는 laccase에 의한다는 것을 알 수 있었다.

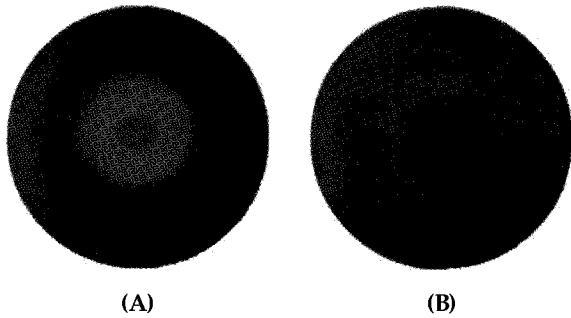


Fig. 2. Decolorization of bromophenol blue(A) and remazol brilliant blue R(B) by LD-1. Note the halo-zone formed after mycelial growth.

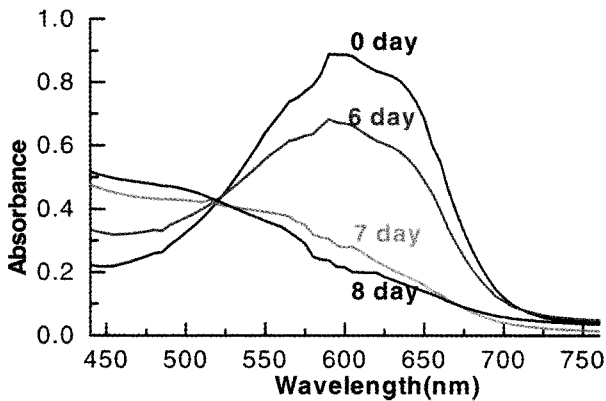


Fig. 3. UV-visible spectra of RBBR according to the culture ages of LD-1. The spectra were taken with a Shimadzu UV-3100 spectrophotometer.

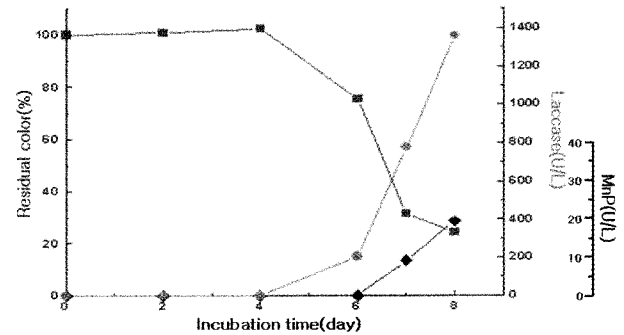


Fig. 4. Dependence of dye decolorization on the laccase and MnP activities of LD-1. Cultures were collected and the decolorization of RBBR(■), and the activities of laccase(●) and MnP(◆) were determined as described in the text.

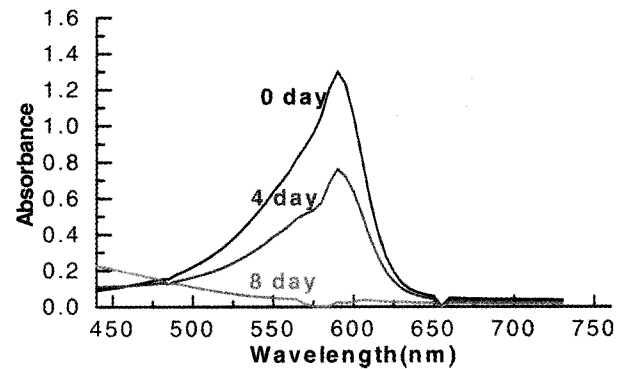


Fig. 5. UV-visible spectra of BB according to the culture age of LD-1. The spectra were taken with a Shimadzu UV-3100 spectrophotometer.

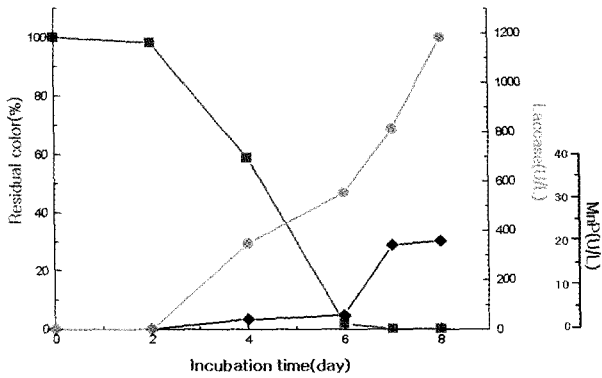


Fig. 6. Dependence of dye decolorization on the laccase and MnP activities of LD-1. Cultures were collected and the decolorization of BB(■), and the activity of laccase (●) and Mn-peroxidase(◆) were determined as described in the text.

Glenn과 Gold⁹⁾는 *Phanerochaete chrysosporium*을 이용한 염료의 탈색과 리그닌분해 효소 활성과의 상관관계에 대해 보고하였으며, Manzanders 등²⁷⁾은 리그닌분해에 관여하는 효소로 *Coriolus versicolor*의 경우는 MnP와 laccase 등이 관여한다고 하였다. 또한 Hatakka²⁸⁾는 담자균류가 생산하는 리그닌분해효소의 종류를 조합하여 LiP-MnP MnP-laccase 및 LiP-laccase군으로 분류하였으며 MnP-laccase 군이 가장 분해 활성이 높다고 하였다.

따라서 목재부후균이 생성하는 리그닌 분해효소는 미생물의 종류에 따라 효소의 종류 및 효소 활성도 다른 것으로 나타났다. LD-1인 *Coriolus hirsutus*의 경우는 염료의 탈색에는 laccase가 더 효과적임을 알 수 있었다.

요 약

Coriolus hirsutus LD-1 균주의 리그닌분해효소 활성과 몇몇 염료의 탈색능을 조사하였다. 백색부후균인 LD-1 균주는 laccase(16,388.9 U/L)와 manganese-dependent peroxidase (19.81 U/L)는 생산하였으나 lignin peroxidase를 생산하지 않았다. 균주를 염료와 함께 8일간 배양했을때 염료 RBBR과 염료 BB의 탈색율은 각각 70.2%와 98%로 나타났다. Manganese-dependent peroxidase는 8일간 배양 중 효소 활성은 매우 낮은 반면 laccase는 지속적으로 생산되어 대단히 높은 활성을 나타내었다. 백색부후균인 *Coriolus hirsutus* LD-1에 의한 염료의 탈색은 주로 laccase에 의한 것으로 사료되었다.

참고문헌

1. Belsare, D. K. and Prasad, D. Y. (1988) Decolorization of effluent from the bagasse-base pulp mills by white-rot fungus, *Schizophyllum commune*. *Appl.*

Microbiol. Biotechnol. 28, 301-309.

2. Cripps, C., Bumpus, J. A. and Aust S. D. (1990) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1114-1118.

3. Fukuzumi, T. (1982) Microbial decolorization and defoaming of pulping waste liquors. In: Kirk, T. K., Higuchi, T. and Chang, H. M. (eds) Lignin degradation : microbiology, chemistry and potential applications, Vol. 1, RC Press, Boca Raton, Fla., p.215.

4. Blanchette, R. A. (1984) Screening wood decayed by white rot fungi for preferential lignin degradation. *Appl. Environ. Microbiol.* 46, 647-653.

5. Heiss, G. S., Gowan, B. and Dabbs, E. R. (1992) Cloning of DNA from *Rhodococcus* strain conferring the ability to decolorize sulfonated azo dyes. *FEMS Microbiol. Lett.* 99, 221-226.

6. Han, S. and Yang, H. (1988) Decolorization of acid red B by immobilized cells of *Bacillus cereus* No.45. *Huanjing Kexue Xuebao.* 8, 93-98.

7. Idaka, E., Ogawa, T., Horitsu, H. and Tomoyeda, M. (1978) Degradation of azo compounds by *Aeromonas hydrophilia* var. 24B. *J. Soc. Dyes Colour.* 94, 91-94.

8. Zimmermann, T., Kulla, H. G. and Leisinger, T. (1982) Properties of purified orange II azo reductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *J. Biochem.* 129, 197-203.

9. Glenn, J. K. and Gold, M. H. (1983) Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degradation basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 45, 1741-1747.

10. Pauli, O., Kirsi, A., Veli-Matti, L., Tuomo, G., Timo, R. and Ilari, S. (1993) Decolorization of azo, triphenyl methane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 59, 4010-4016.

11. Colleen, C., John, A. B. and Steven, D. A. (1990) Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56, 1114-1118.

12. Griselda, G. D. and Eduardo, A. T. (1990) Screening of white-rot fungi for efficient decolorization of bleach pulp effluents. *Biotechnol. Lett.* 12, 869-872.

13. Cao, W., Mahadevan, B., Crawford, D. L., Goszczynski, S., Crawford, D. L. and Crawford, R. L. (1992) Characterium of an extracellular azo dyeoxidizing

- peroxidase from *Flavobacterium* sp. ATCC 39723. *Enzyme Microb. Technol.* 15, 810-817.
14. Zhou, W. and Zimmerman, W. (1993) Decolorization of industrial effluents contacting reactive dyes by *Actinomecetes*. *FEMS Microbiol. Lett.* 107, 157-162.
 15. Fredrick, S. A., Michael, G. P. and Lubomir, J. (1990) Decolorization of kraft bleachery effluent chroco phores by *Coriolus (Trametes) versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.* 12, 846-853.
 16. Kotterman, M. J. J., Heesseis, E., Jong, E. D. and Field, J. A. (1994) The physiology of anthraene biodegradation by the white-rot fungus *Bjerkandera* sp. strain BOS55. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 42, 179-186.
 17. Arora, D. S. and Sandu, D. K. (1986) Degradation of lignocellulotic residues by polyporus versicolor and the effect of moisture contents and phenolic compounds. *Acta Biotechnol.* 6, 293-297.
 18. Ritter, D., Jaklin-Farcher, S., Messner, K. and Stachellberger, H. (1990) Polymerization and depolymerization of lignosulfonates by *Phanerochaete chrysosporium* immobilized on foam. *J. Biotechnol.* 13, 229-241.
 19. Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K. L. (1996) The lignolytic system of the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium* : Purification and characterization of the laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 62, 1151-1158.
 20. de Jong, E., Field, J. A. and de Bont, J. A. M. (1992) Evidence for a new extracellular peroxidase manganase-inhibited peroxidase from the white rot fungus *Bjerkandera* sp. BOS55. *FEBS Lett.* 299, 107-110.
 21. Kirk, T. K. and Connors, W. J. (1987) Influence of culture parameters on lignin metabolism by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* 117(3), 277-285.
 22. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L. and Randall, R. L. 1951. Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* 193, 265-275.
 23. Jung H. C., Park, S. K., Kim, B. S. and Park, C. Y. (1995) Screening and evaluation of wood-rotting fungi for linin degradation and ligninolytic enzyme production (1). *Mokchae Konhak* 23(4), 108-116.
 24. Nishida, T., Kashino, Y., Mimura, A. and Takahara, Y. (1998) Lignin biodegradation by wood-rotting fungi. I. Screening of lignin-degrading fungi. 161, 264-27.
 25. 정형재, 박서기, 김병수, 박중열. (1996) 리그닌분해와 리그닌분해 효소생산을 위한 목재 부후균의 선발과 평가 (II). *목재공학* 24(4), 74-81.
 - 26 Kim, S. J., Ishikawa, K., Hirai, M. and Shoda, M. (1995) Characteristics of a newly isolated fungus, *Geotrichum candidum* Dec I, which decolorizes various dyes. *J. Ferment. Bioeng.* 79, 601-607.
 27. Manzanares, P., Fajardo, S. and Martin, C. (1995) Production of ligninolytic activities when treating paper pulp effluents by *Trametes versicolor*. *J. Biotechnol.* 43, 125-132.
 28. Hatakka, A. (1994) Lignin-modifying enzymes from selected white-rot fungi: production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. Rev.* 13, 125-135.