

백색부후균을 이용한 다환방향족 탄화수소(PAHs)의 분해

류원률 · 서윤수 · 장용근 · 조무환
영남대학교 응용화학공학부, ¹한국과학기술원 화학공학과
(접수 : 2000. 5. 10., 게재승인 : 2000. 6. 19.)

Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by White Rot Fungi

Won Ryul Ryu, Youn Soo Seo¹, Yong Keun Chang¹, Moo Hwan Cho[†]

School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea

¹Dept. of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

(Received : 2000. 5. 10., Accepted : 2000. 6. 19.)

The white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium*(IFO 31249), *Trametes sp.*, and *Pleurotus sp.* were studied for their ability to degrade Polycyclic Aromatic Hydrocarbons(PAHs) using anthracene and pyrene as model compounds. The disappearance anthracene and pyrene of from cultures of wild type strains *P. chrysosporium*, *Trametes sp.* and *Pleurotus sp.* was observed. However, the activities of ligninolytic enzymes were not detected in *P. chrysosporium* cultures during degradation while ligninolytic enzymes were detected in both culture of *Trametes sp.* and *Pleurotus sp.*. Therefore, our results showed that PAHs was degraded under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions. The results also indicate that lignin peroxidase(LiP), manganese peroxidase(MnP), and laccase are not essential for the biodegradation of PAHs by white rot fungi.

Key Words : polycyclic aromatic hydrocarbons, biodegradation, white rot fungi, ligninolytic enzymes

서론

PAHs (Polycyclic Aromatic Hydrocarbons)는 2개 이상의 벤젠 고리로 이루어져 있는 화합물인데 암 또는 돌연변이를 유발하는 등의 유해성이 있는 것으로 알려져 있다(1). PAHs는 유기물이 탈 때 언제든지 형성될 수 있는 물질로서 자연적인 화재 등에 의해서도 발생되며 석탄의 건류공정, 화력 발전소, 제철공정, 타이어, 아스팔트 생산공정, 석유 정제공정, 쓰레기 소각공정 등에서 흔히 배출되고 있다. 특히 목재보관용으로 사용되는 액체 피치유(타르유)와 anthracene oil에는 약 85%의 PAHs가 포함되어 있다. 자연상태에서 PAHs는 물리적으로 흡착 및 휘발에 의해 토양에 고정화되거나 대기 중에 확산되며 또는 지하수 등에 오염되기도 한다(2). PAHs는 종류에 따라 생물학적 분해정도에 차이가 있는데 현재까지 연구가 많이 된 *Pseudomonas* 속의 경우 4개 이상의 고리를 가지는 PAHs는 2개 혹은 3개의 고리를 가지는 PAHs가 존재할 때만 분해되는 즉, cometabolism에 의해서만

분해되는 것으로 알려지고 있으며 완전분해도 어렵다고 한다(3). 반면에 백색부후균(WRF)은 cometabolism이 필요 없으며 뛰어난 친수성과 높은 분해 능력을 지닌 것으로 알려져 있다(4,5). 백색부후균은 lignin을 분해할 수 있는 lignin peroxidase를 분비하는데 이는 기질 특이성이 매우 낮아 다양한 종류의 오염물질 즉 phenolic compound를 분해하는 것으로 보고되고 있다(6-12). 특히 이 enzyme군은 one electron oxidation에 의해 PAHs를 PAH-quinone으로 전환시키고 계속적으로 분해시켜 acid와 aldehyde를 생성하여 CO₂와 H₂O로 분해한다. 이러한 백색부후균은 목재성분의 부패에 관여하는 진균성 점균류로 일반적으로 많은 방향성 및 할로젠 탄화수소 등이 결합된 리그닌을 분해하는 효소를 생성하여 다양한 범주의 복합, 독성 화합물을 분해한다고 알려져 있다(13-15). 현재까지는 주로 *Phanerochaete chrysosporium*을 대상으로 연구가 진행되어 왔다. 그러나 다른 여러 종류의 백색부후균들도 lignin peroxidases 및 기타 효소들을 보유하고 있기 때문에 본 연구에서는 *Phanerochaete chrysosporium* 외에 자연계에서 분리한 *Trametes sp.*, *Pleurotus sp.* 등을 이용하여 PAHs의 분해능력과 효소활성과의 관계 등을 비교함으로써 향후 PAHs 등 난분해성 물질의 생물학적 처리에 대한 응용가능성을 검토하고자 하였다(16-18).

[†]Corresponding Author : School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
Tel : 053-810-2517, Fax : 053-814-8790
E-mail : mwcho@yu.ac.kr

재료 및 방법

사용 균주

실험에 사용된 균주는 wild type의 *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249, 그리고 *Pleurotus sp.* CJ-212 KFCC 10943, *Trametes sp.* CJ-105 KFCC 10941 등 3종을 사용하였다(19). *Pleurotus sp.* CJ-212, *Trametes sp.* CJ-105은 (주)J사의 연구소가 국내에서 분리한 것으로 분양 받아 사용하였다.

Model PAHs

본 연구에 사용한 PAHs는 벤젠 고리가 3개인 anthracene과 4개인 pyrene이며, 이는 Sigma chemical Co. 및 Aldrich chemical company, Inc.에서 각각 구입하여 사용하였다.

균주의 보관

균주의 보관을 위하여 Table 1의 YMPG 배지를 사용하였다. 균주는 glycerol stock의 형태로 보관하였으며, 균주의 활성을 유지해 주기 위해 1개월에 한번씩 glycerol stock을 만들었다. Glycerol stock은 다음과 같은 방법으로 만들어 주었다. Glycerol stock 1개를 YMPG medium 100 mL에 3일간 배양한 다음 7 mL을 취하여 멸균된 glycerol 3 mL과 합쳐 20 mL 용기에 넣고 고르게 교반한 후 -70°C deep freezer에 보관하였다.

1차 성장 배지

상기의 배지를 증류수 1 L에 용해한 후 고온멸균(121°C, 15 분)하여 petri dish에 agar를 포함한 고체평판배지를 만들고 1 cm × 1 cm 코크보러로 접종하여 15일 마다 계대배양하였다. 1차적으로 균주를 충분히 성장시키기 위한 액체배지의 조성도 Table 1과 동일하다. 또한 실험에 사용된 모든 시약은 Sigma chemical Co. 및 Aldrich chemical company, Inc.에서 구입한 1급 시약을 사용하였다.

효소 생산 배지

효소의 생산을 위한 2차 액체 배양 배지의 조성은 Table 2와 같이 질소제한배지를 사용하였고 basal medium은 1 L의 증류수에 KH₂PO₄ 20 g, MgSO₄ 5 g, CaCl₂ 1 g을 녹여 사용하였다. Trace solution은 800 mL 증류수에 nitrotriacetic acid 1.5 g을 녹이고 1 N KOH로 pH를 6.5로 맞춘 다음 각각의 시약을 녹인 뒤 총 부피를 1 L로 맞춘다. 각각의 stock solution은 고압증기멸균 또는 0.45 μm 막으로 흡입 여과하여 4 °C로 냉장 보관하여 사용하였다.

Table 1. Composition of growth medium(YMPG).

Component	Concentration (g/L)
Malt extract	10
Bacto peptone	2
Glucose	10
Yeast Extract	10
Asparagine	1
MgSO ₄ · 7H ₂ O	1
KH ₂ PO ₄	2
pH	5.8

Table 2. Composition of enzyme production medium.

Medium composition
The following items are added per liter of cultures;
10% Glucose 100 mL
0.8% Ammonium Tartrate 25 mL
Basal Medium(L) 100 mL
- KH ₂ PO ₄ 20 g, MgSO ₄ 5 g, CaCl ₂ 1 g
0.1M DMS (2,2-Dimethylsuccinate) buffer 100 mL
¹ Tracer element solution 10 mL
1000ppm Thamine · HCl 1 mL
400mM Veratryl alcohol 1 mL
¹ Trace element solution (/liter);
Nitrotriacetate 1.5 g, MgSO ₄ · 7H ₂ O 0.5 g, NaCl 1.0 g,
MnSO ₄ · H ₂ O 0.5 g, FeSO ₄ · 7H ₂ O 0.1 g, CoCl ₂ · 6H ₂ O 0.1 g,
ZnSO ₄ · 7H ₂ O 0.1 g, H ₃ BO ₃ 10 mg, CuSO ₄ · 5H ₂ O 0.1 g,
AlK(SO ₄) ₂ · 12H ₂ O 10 mL, Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O 10 mg

효소의 활성 측정

배양한 균주와 배지를 mechanical stirrer로 5분간 급속 교반한 후 Whatman filter paper (No. 4)로 여과하여 mycelia를 제거한 후 0.2 μm membrane으로 여과하여 spore를 제거하여 균주로부터 생산한 효소의 활성도를 측정하였으며 측정방법은 Tien 등의 방법을 인용하였다(20-21).

Lignin peroxidase(E.C. 1.11.1.14)의 활성 측정

50 mM sodium tartrate (pH 2.5)완충액에 2mM veratryl alcohol 용액과 시료를 혼합한 후 0.4 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 1분간 310 nm에서 흡광도의 차이를 측정한다 (molar extinction coefficient=9,300M⁻¹ cm⁻¹). 효소의 활성단위는 분당 1 μmol의 veratryl alcohol을 veratryl aldehyde로 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정한다(21).

Laccase(ρ-diphenol oxidase, E.C. 1.10.3.2)의 활성 측정

0.1 M sodium acetate (pH 5.0)완충액 2.5 mL, 시료 0.17 mL을 혼합한 후 5mM ABTS (2,2-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate) 0.33 mL를 첨가하여 1분간 420 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다(molar extinction coefficient = 36,000 M⁻¹ cm⁻¹). 효소의 활성단위는 분당 1 μmol의 ABTS를 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정한다(20).

Mn(II)-dependent peroxidase(E.C.1.11.1.13)의 활성 측정

0.5 M sodium tartrate (pH 5.0)완충액에 1mM guaiacol, 1mM MnSO₄와 시료를 혼합한 후 1 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 1분간 525 nm에서 흡광도의 차이를 측정한다(molar extinction coefficient=121,000 M⁻¹ cm⁻¹). 효소의 활성단위는 1 μmol의 guaiacol을 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정한다(21).

PAHs 분석방법

배양 중 PAHs의 추출은 250 mL의 분획 여두에 배양액과 methylene chloride를 혼합하여 강하게 진탕한 후 정지하여 유기물 층만 분리하였으며 회수율을 높이기 위해 동일한 방법으로 3번 반복하였다. 회수된 유기물 층의 혼합액은 진공증류장치를 이용하여 농축하였으며 이를 다시 cyclohexane으로 전환시켰다.

는 생산을 못하지만 배양 10일째 laccase가 75 U/L로 최대 활성을 보였다. 따라서 본 연구에서 사용하는 3가지의 균주 모두 PAHs를 분해한다고 알려진 ligninolytic enzymes을 생산하였으며, 이와 동일한 조건에서 PAHs의 분해 실험을 행하였다.

Flask배양에서 PAHs의 분해

Lignin peroxidase는 영양성분이 결핍된 상태에서 생성되며 비기질적 특성으로 인하여 PAHs, PCP, dye 등 여러 가지 오염물질을 분해하는데 일반적으로 유해물질류는 곰팡이의 성장을 억제한다고 알려져 있다. 따라서 1차적으로 영양풍부배지에서 성장시킨 후 anthracene 및 pyrene를 각각 30 ppm 첨가한 질소제한배지로 교체하였다. *P. chrysosporium*이 anthracene 및 pyrene를 분해하는 경향은 Figure 4에 나타내었다. *P. chrysosporium*이 30 ppm의 anthracene 및 pyrene를 완전히 분해하는데 각각 10~12일 정도가 소요되었다. 그러나 균주에서 분비되는 lignin peroxidase (LiP), Mn(II)-dependent peroxidase (MnP) 등의 ligninolytic enzymes는 검출되지 않았다. 이는 균을 배양하는데 있어서 산소가 충분히 전달되지 않아서 효소의 생성이 되지 않은 것으로 추정된다. 일반적으로 lignin peroxidase에 의해 여러 유해물질류를 분해하는 것으로 알려져 있지만, 본 실험에서는 Shrikrishna W. Dhawale(23)의 연구 결과와 일치하게 lignin peroxidase가 생산되지 않는 nonligninolytic conditions에서도 PAHs를 분해하였다. 또한 Shrikrishna W. Dhawale(23)의 연구 결과에서는 ligninolytic conditions에서도 분해되는 것을 보여 주고 있으며 질소가 충분한 조건에서도 분해가 가능한 것을 보여주었다.

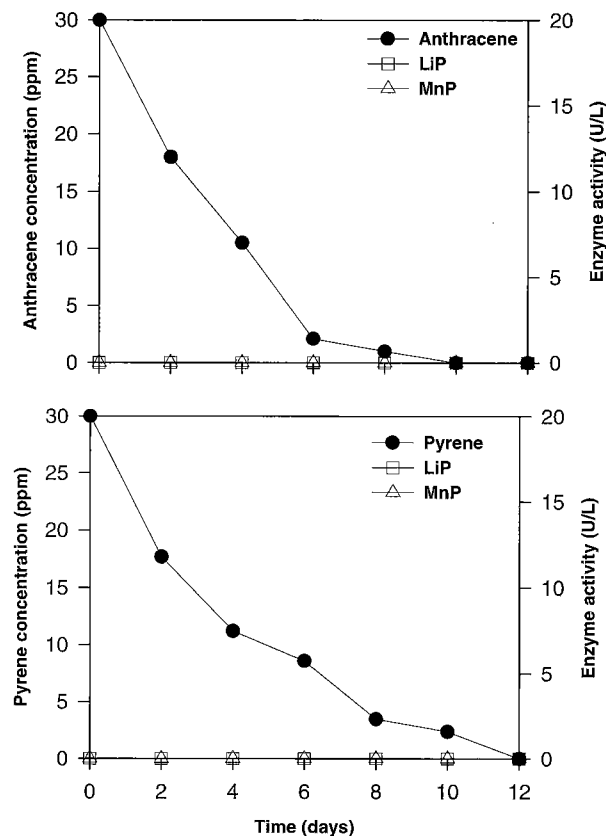


Figure 4. Biodegradation of anthracene and pyrene in *P. chrysosporium* cultures.

Figure 5에서 보면 *Trametes sp.*의 PAHs 분해정도를 보여 주고 있다. 30 ppm의 anthracene 및 pyrene를 분해하는데 6일 정도가 소요되었다. *P. chrysosporium*과 비교해 보면 상당히 빠르게 분해가 됨을 알 수 있다. 효소의 생산은 LiP의 경우는 생산이 되지 않았지만 MnP의 경우에는 PAHs를 투입하지 않았을 때보다 30 U/L로 오히려 더 높은 활성을 나타내었다. 이는 PAHs가 오히려 효소를 생산하는 유도물질로 작용한 결과라고 할 수 있다. Laccase 경우도 78 U/L에서 161 U/L로 2배 이상이 향상되었다. *P. chrysosporium*과 비교해 보면 MnP와 laccase가 생산되는 ligninolytic conditions에서 훨씬 빠른 분해를 보이고 있음을 알 수 있다.

Figure 6은 *Pleurotus sp.*가 PAHs를 분해하는 경향이다. 효소의 경우에는 anthracene 및 pyrene 분해 모두에서 laccase만이 검출되었고, LiP와 MnP는 검출되지 않았다. Anthracene의 경우 비교적 빠르게 6일만에 분해가 되었지만, pyrene의 경우에는 배양한지 10일이 되어야 완전히 분해되었다. 이는 laccase가 anthracene을 분해하는 데에는 중요한 효소로서 작용하나 pyrene의 경우에는 별 관여를 하지 않는 것으로 추측된다. 이는 anthracene과 benzo(a)pyrene같은 7.5 eV의 이온화에너지를 가지는 PAHs는 laccase에 의해 산화되지만 반면에 fluorene과 phenanthrene은 산화되어지지 않는다는 보고와 일치하였다(25).

이상의 결과로 보아 백색부후균을 이용한 PAHs의 분해 실험에서는 nonligninolytic condition에서도 PAHs가 분해되기도 하나

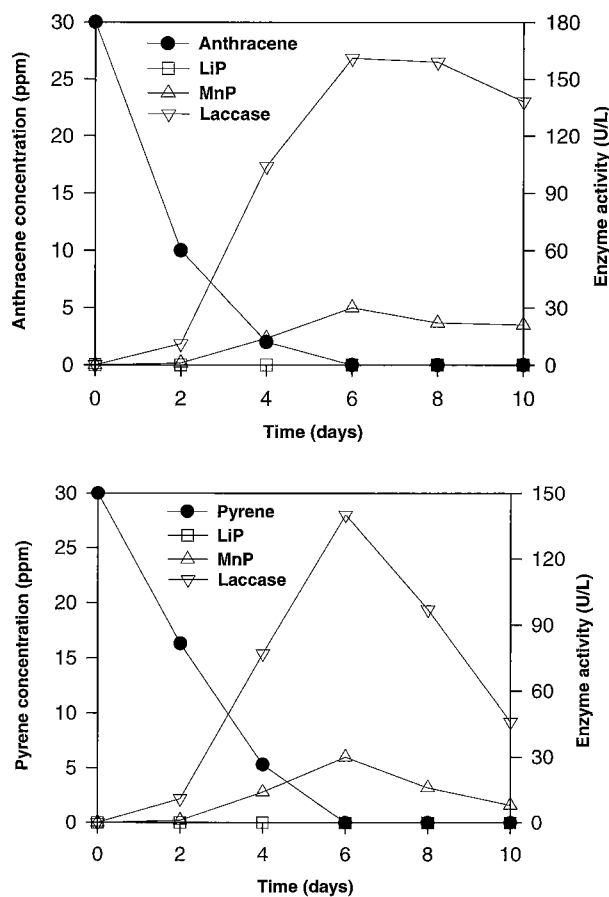


Figure 5. Biodegradation of anthracene and pyrene in *Trametes sp.* cultures.

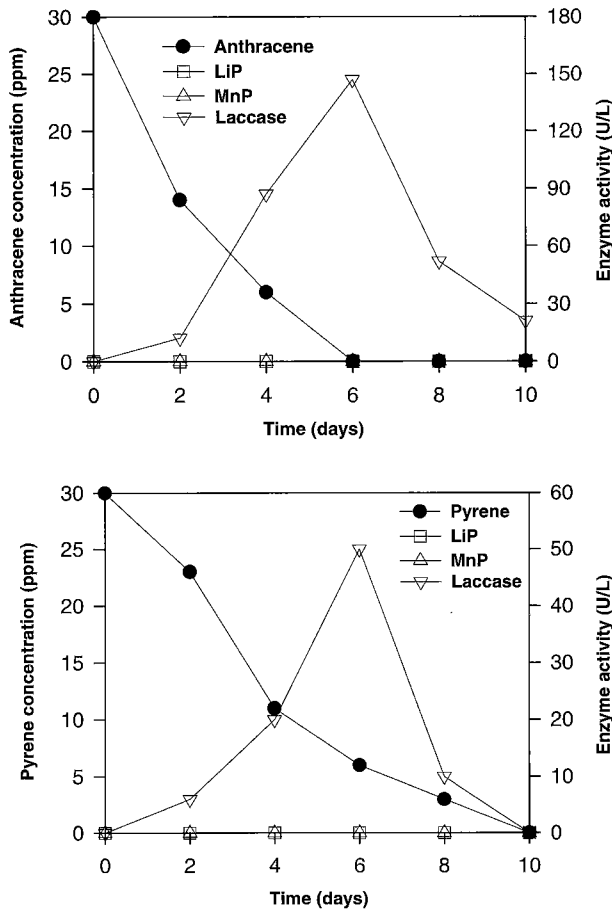


Figure 6. Biodegradation of anthracene and pyrene in *Pleurotus sp.* cultures.

ligninolytic condition에서 훨씬 더 우수한 분해를 보임을 알 수 있었다.

또한 배양 초기 PAHs가 급격하게 감소를 보인 이유는 균체의 표면에 흡착된 것으로 판단되어 균체에 흡착된 정도를 확인하였다.

균체 흡착된 PAHs의 확인

PAHs는 소수성을 가지므로 세포 표면이 소수성일 경우 PAHs가 세포 표면에 흡착할 수 있다. 일반적으로 PAHs는 배양 초기 세포표면에 잘 흡착되며 시간이 경과함에 따라 탈리되어서 분해된다고 보고되어 있다. 본 연구에서도 배양 초기 PAHs가 급격히 감소한 것은 세포표면에 상당량이 흡착된 것으로 추측된다. 따라서 세포 표면에 붙어 있을지도 모르는 PAHs를 검출하기 위하여 배양액에서 PAHs가 완전히 분해되고 난 뒤 곰팡이를 균질화시킨 후 세포벽에 흡착된 PAHs를 추출하여 분석하였다. 그러나 Table 3에서와 같이 PAHs가 미량으로 검출되는 것으로 보아 PAHs가 분해효소에 의해 단계적으로 분해되고 있음을 확인할 수 있었다.

Flask배양에서 anthracene과 pyrene의 동시 분해

Anthracene과 pyrene을 flask에 동시에 20 ppm씩 넣어준 것 외에 다른 조건들은 앞의 실험과 같이 행하였다. Figure 7에 *P. chrysosporium*, *Trametes sp.*, *Pleurotus sp.*가 각각 anthracene과 pyrene을 동시에 분해하는 것을 비교해 보았다.

Table 3. Concentrations of PAHs after 12 days culture.

	Remained PAHs concentrations (ppm)			
	Anthracene		Pyrene	
	Extracellular	Mycelia	Extracellular	Mycelia
<i>P. chrysosporium.</i>	0	0.8	0	1.0
<i>Trametes sp.</i>	0	0.5	0	0.6
<i>Pleurotus sp.</i>	0	0.8	0	0.9

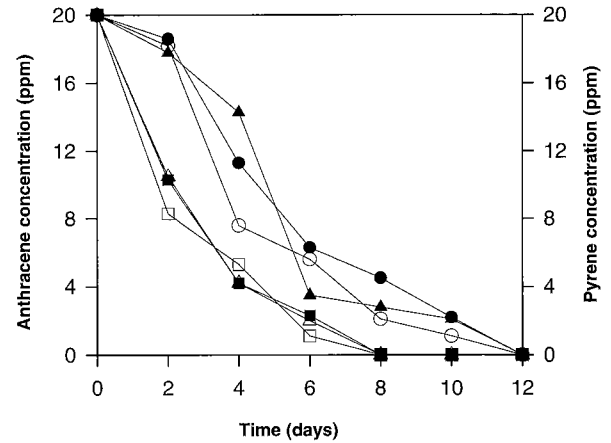


Figure 7. Biodegradation of anthracene and pyrene at the same time in *P. chrysosporium*, *Trametes sp.*, and *Pleurotus sp.* cultures. ○ : Anthracene - *P. chrysosporium*, ● : Pyrene - *P. chrysosporium*, ○ : Anthracene - *Trametes sp.*, ● : Pyrene - *Trametes sp.*, ○ : Anthracene - *Pleurotus sp.*, ● : Pyrene - *Pleurotus sp.*

분해 거동은 앞의 실험들과 유사하였다. *P. chrysosporium*의 경우는 비교적 다른 균들에 비해 분해가 오래 걸렸다. 배양 초기에는 anthracene의 분해가 빨랐지만 시간이 갈수록 비슷한 양상을 보이며 배양한지 12 일 후에는 모두 분해되었다. *Trametes sp.*의 경우에도 앞의 실험과 유사한 양상을 보였으며 배양후 8 일만에 모두 분해되었으며 균들 중에서 분해가 가장 우수하였다. *Pleurotus sp.*는 anthracene의 경우는 배양한지 8일만에 분해가 이루어졌으나 pyrene는 배양한지 12일만에 분해가 되었다. 이때 효소는 laccase만이 생산되었다. 또한 비교적 고리수가 적은 anthracene이 좀 더 빨리 분해가 되었으나 분해가 진행됨에 따라 그렇게 되지 않는 경우도 있었다. 이는 분해효소가 비기질적 특이성으로 작용하기 때문에 구조의 차이가 벤젠 고리의 수가 하나 다른 것밖에 없는 anthracene이나 pyrene의 경우 어느 것이 다른 것에 비하여 그렇게 분해가 우세하지 않았다. 본 연구 결과는 두 가지 PAHs 혼합물이 존재하더라도 그 성분을 동시에 분해할 수 있다는 예를 보여 주었다. 실제 PAHs 함유 폐수는 여러 종류의 PAHs 화합물이 섞여 있으므로 백색부후균을 이용한 공정이 효과적인 처리 공정이 될 것으로 판단된다.

요 약

Phanerochaete chrysosporium (IFO 31249), *Trametes sp.*와 *Pleurotus sp.* 등 3종류의 백색부후균으로 Polycyclic Aromatic Hydrocarbons (PAHs)의 분해 능력을 실험하였다. PAHs의 모델 물질로는 anthracene과 pyrene을 선택하였다. 먼저 PAHs, PCP, dye 등 유해물질류의 분해에 관계한다고 알려진 lignin peroxi-

dases를 생산하는지를 알아보기 위하여 실험한 결과 세 균주 모두 생산하는 것으로 나타났다. 그리고 PAHs의 분해 또한 세 균주 모두 가능하였는데, *Trametes sp.*가 6일만에 좀더 빠른 분해를 보였다. 특이하게도 *P. chrysosporium*의 경우는 10일만에 분해가 되었는데 lignin peroxidases는 검출되지 않았다. 또한 균체에 흡착된 PAHs의 양도 극소량이어서 먼저 균체에 흡착된 후 서서히 탈리되면서 분해가 되는 것으로 여겨진다. 따라서 본 연구 결과 백색부후균의 PAHs 분해는 ligninolytic conditions 뿐만 아니라 nonligninolytic conditions에서도 분해가 가능함을 알 수 있었다. 그러나 lignin peroxidases가 분비되는 조건에서 좀 더 빠른 분해가 이루어짐을 알 수 있었다.

감 사

이 논문은 1998년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비(생물화학공학, 1998-020-E3106)에 의해 지원되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Jones, K. C., J. A. Stratford, K. S. Waterhouse, E. T. Furlong, W. Giger, R. A. Hites, C. Schaffner, and A. E. Johnston (1989), Increase in the polynuclear aromatic hydrocarbon content of an agricultural soil over the last century, *Environ. Sci. Technol.*, **23**, 95-101.
- Andelman, J. B., and J. E. Snodgrass (1974), Incidence and significance of polynuclear aromatic hydrocarbons in the water environment, *Crit. Rev. Environ. Control*, **5**, 69-83.
- Cerniglia, C. E. (1981), Aromatic hydrocarbons: metabolism by bacteria, fungi and algae, *Rev. Biochem. Toxicol.*, **3**, 321-361.
- John B. Sutherland, Allison L. Selby, and Carl E. Cerniglia (1991), Metabolism of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. and environmental microbiology*, **57**(11), 3310-3316
- Bumpus, J. A. (1989), Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. and environmental microbiology*, **55**(1), 154-158
- Field, J., E. de Jong, G. Feijoo-Costa, and J. de Bont (1993), Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics, *Trends in Biotech*, **11**, 44-49.
- Bumpus, J. A., M. Tien, D. Wright and S. Aust (1985), Oxidation of persistent environmental pollutants by a white rot fungus, *Science*, **228**, 1434-1436.
- Bumpus, J. A. (1989), Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 154-158.
- Lamar, R. T., M. J. Larsen, and T. K. Kirk (1991), Sensitivity to and degradation of pentachlorophenol by *Phanerochaete spp.*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2085-2090.
- Bumpus, J. A., and B. Brock (1988), Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 3598-3604.
- Fenando, T., Bumpus, J. A., M. Tien, D. Wright, and Aust, S. D. (1990), Biodegradation of TNT by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **56**, 1666-1671.
- Köhler, A., Jäger, A., Willershausen, H., and Graf, H. (1988), Extracellular ligninase of *Phanerochaete chrysosporium* Burd-sall has no role in the degradation of DDT, *Appl. Environ. Microbiol.*, **29**, 618-620.
- Kay-Shoemaker, J. L. and M. E. Watwood (1996), Limitations of the lignin peroxidase system of the white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **46**, 438-442.
- Hammel, K. E., B. Kalyanaraman, and T. K. Kirk (1986), Oxidation of polycyclic aromatic hydrocarbon and dibenzo[p]-dioxins by *Phanerochaete chrysosporium* ligninase, *J. Biol. Chem.*, **261**, 16948-16951.
- Spadaro, J., M. Gold, and V. Renganathan (1992), Degradation of dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Microbiol. Biotech.*, **58**, 3598-3604.
- Bezarel, L., Y. Hadar, and C. E. Cerniglia (1996), Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by the white rot fungus *Pleurotus ostreatus*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 292-295.
- Bergbauer, M., C. Eggert, and Kraepelin (1991), Degradation of chlorinated lignin compounds in a bleach plant effluent by the white rot fungus *Trametes versicolor*, *Appl. Micro. Biotechnol.*, **35**, 105-109.
- Cerniglia, C. E., P. P. Fu and S. K. Yang (1983), Regio and stereoselective metabolism of 4-methylbenz[a]anthracene by the fungus *Cunninghamella elegans*, *Biochem. J.*, **216**, 377-384.
- Oh, K. K., Kim, H. S., Lee, J. H., and Jeon, Y. J. (1999), Production of laccase by *Trametes sp.* Cj-105, *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **27**(6), 477-483.
- Pedro, M. Coll, Jose M. Fernandez-abalos, and Pilar Perez (1993), Purification and Characterization of Phenoloxidase (Laccase) from the Lignin-Degrading Basidiomycete PM1 (CECT 2971), *Appl. and environ. micro.*, **59**(8), 2607-2613.
- M. Tien, and T. K. Kirk (1988), Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods of Enzyme*, **161**, 238-249.
- AWWA (1995), Standard Methods for the Examination of Water and Wastewater, 19th ed, p6-103, United Book Press, Maryland.
- Shrikrishna W. Dhawale, Shree S. Dhawale, and Deborah Dean-ross (1992), Degradation of Phenanthrene by *Phanerochaete chrysosporium* occurs under ligninolytic as well as nonligninolytic conditions, *Appl. and environ. microbiology*, **58**(9), 3000-3006.
- T. K. Kirk, S. Croan, M. Tien, and Farrell R. E. (1986), Production of multiple ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **8**, 27-32.
- Cerniglia CE. (1997), Fungal metabolism of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons - Past, Present and Future applications in bioremediation, *Jour. of Indust. Microbiol. & Biotech.*, **19**(5), 324-333.