한국생물공학회지 제17권 제1호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 17, No. 1, 14-19(2002)

회전생물반응기에 고정화된 백색부후균에 의한 리그닌 분해효소의 생산

류 원 률 · †조 무 환
영남대학교 응용화학공학부
(접수 : 2001. 7. 28., 게재승인 : 2002. 1. 19.)

Production of Lignin-Degrading Enzymes by White Rot Fungi Immobilized in a Rotating Bioreactor

Won Ryul Ryu and Moo Hwan Cho†
School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
(Received : 2001. 7. 28., Accepted : 2002. 1. 19.)

The objective of this study is to investigate optimum condition for lignin peroxidase production by white rot fungi *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249 immobilized in a rotating bioreactor. The maximum lignin peroxidase activity of batch culture in rotating bioreactor was 300 U/L. The optimum rotating speed and packing ratio of support for lignin peroxidase production in a rotating bioreactor were 1 rpm and 20%, respectively. The optimum concentration of $MnSO_4 \cdot H_2O$ for manganese-dependent peroxidase production in a rotating bioreactor was 50 ppm. The sufficient supply of oxygen was the most important factor to achieve maximum lignin peroxidase production. It was possible to produce lignin peroxidase (LiP) and manganese-dependent peroxidase (MnP) for at least 3 times successive repeated-batch cultures, respectively.

Key Words : white rot fungi, lignin peroxidase, rotating bioreactor

서 론

담자균류에 속하는 백색부후균은 리그닌을 분해할 수 있는 효소와 산을 생성하는 성질을 이용하여 최근에 오염 환경을 재생, 복원하는 bioremediation 산업에 응용이 확대되고 있다(1-3). 백색부후균은 일반적으로 리그닌 분해효소를 생성하여 리그닌을 분해하는 대사과정을 수행한다. 리그닌 분해 효소는 다양한 범주의 난분해성 유해화합물 (xenobiotics)을 분해하는 능력이 있는 것으로 알려져 있다(4-8). 이 enzyme군은 각종 화합물에 대하여 비특이적으로 작용할 수 있는 기작을 보유하여 다양한 오염물질을 분해할 수 있으며, 분해과정이 세포외에서 이루어지기 때문에 고농도의 독성화합물과 불용성화합물의 처리가 가능하고 현장적용에 있어서도 생장조건의 특이성으로 선택적인 성장을 보이므로 기타 미생물의 영향을 배제할 수 있는 장점이 있다(9,10).

따라서 백색부후균에서 생산하는 리그닌 분해효소는 기존의 화학공정을 대체하여 lignin을 분해 할수 있는 효소로서, 난분해성 물질의 분해를 위한 환경공정 등에 다양한 용도를 가지고 있다. 그러나 리그닌 분해효소의 중요성과 잠재력에도 불구하고 대량생산이 이루어지지 않아 공업적인 활용이 지연되고 있다.

리그닌 분해효소 중 lignin peroxidase (LiP)는 *P. chrysosporium*에 의해 생산될 수 있음이 잘 알려져 있는데, 야생균주의 경우 nutrient rich condition (growth medium)하에서는 세포생장이 증가하나 LiP나 MnP 등의 ligninolytic enzyme 생산은 저해되어 진다고 보고되었다. 그러나, 영양분 중 탄소나 질소, 황 성분이 결핍된 조건하에서는 ligninolytic system이 활성화되어 2차 대사과정에 의해 LiP를 생산한다(11). Lysine auxotroph인 돌연변이균주의 경우 nutrient rich condition하에서도 균주로부터 효소의 생산이 촉진되는 것으로 보고되었다. LiP는 높은 전단력에서는 효소의 생성과 활성이 저하되기 때문에, 일반적으로 낮은 전단력에서 빠른 속도로 산소를 전달할 수 있는 생물반응기가 필요하다(12).

현재 효소의 응용에 충당할 수 있는 LiP의 대량생산을 위한 다양한 연구가 많이 진행되고 있다. 균주의 교반 배양시 높은 효소 활성의 재현성이 어려우므로 이러한 점을 극복하기 위해서 pellet을 고정화하기 위해 담체를 이용한 연구가 수행되었으며 상당한 효과를 얻을 수 있다. MnP의 생산 또한 *P. chrysosporium*에 의해 생산될 수 있음이 알려져 있는데 그 조건은 LiP의 생산과 유사하며 배지 중의 $MnSO_4$의 최종 농도를 조절한다고 알려져 있다(13).

†Corresponding Author : School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
Tel : +82-53-810-2517, Fax : +82-53-814-8790
E-mail : mwcho@yu.ac.kr

따라서 백색부후균을 이용하여 유해물질을 처리하는 방법을 실험실 단계에서 많은 연구를 수행하고 있으나 높은 산업적 응용 가능성에도 불구하고 아직까지는 공학적인 측면들이 많이 배제되어, 이러한 효소들을 대량 생산을 위한 연구는 매우 부족한 편이다. 특히 백색부후균을 이용한 bioremediation 기술의 개발은 오염물질의 우수한 분해능력 활용을 극대화하기 위하여 생물공학적 접근을 통한 효소의 대량생산기술의 개발이 이루어져야 하며, 개발 성공시 기술적, 산업적 파급효과가 클 것으로 판단된다.

따라서 본 연구에서는 생물반응기 중 비교적 전단응력을 적게 받으며 산소와 직접 접촉하는 회전생물반응기를 이용하여 LiP 생산이 우수한 균주를 적용하여 효소를 대량 생산 할 수 있는 최적 조건을 확립하였다.

재료 및 방법

사용 균주 및 보관

실험에 사용된 균주는 LiP 및 MnP이 생산이 우수하다고 알려진 *P. chrysosporium* IFO 31249이며 균주의 보관을 위하여 YMPG 배지 (10 g/L glucose, 10 g/L malt extract, 10 g/L yeast extract, 2 g/L Bacto peptone, 1 g/L asparagine, 2 g/L KH_2PO_4, 1 g/L $MgSO_4 \cdot 7H_2O$)를 사용하였다. 균주는 glycerol stock의 형태로 보관하였으며, 균주의 활성을 유지해주기 위해 1개월에 한번씩 glycerol stock을 만들었다. Glycerol stock은 다음과 같은 방법으로 만들어 주었다. Glycerol stock 1개를 YMPG 배지 100 mL에 3일간 배양한 다음 7 mL을 취하여 멸균된 glycerol 3 mL과 합쳐 20 mL 용기에 넣고 고르게 교반한 후 -70℃ deep freezer에 보관하였다.

Growth medium

상기의 배지를 증류수 1 L에 용해한 후 고온멸균하여 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.

Production medium

LiP의 생산을 위한 2차 액체 배양 배지는 질소제한배지로 1 L의 증류수에 10 g glucose, 0.2 g ammonium tartrate, 2 g KH_2PO_4, 0.5 g $MgSO_4$, 0.1 g $CaCl_2$, 0.0001 g Thiamine · HCl, 0.0001 g Biotin, 10 mL trace solution (composition per liter: 1.5 g nitrilotriacetate, 3 g $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g $FeSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.1 g $CuSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg $Na_2MoO_4 \cdot 2H_2O$, 0.1 g $CoCl_2 \cdot 6H_2O$, 10 mg $AlK(SO_4)_2 \cdot H_2O$, 1 g NaCl, 0.1 g $ZnSO_4 \cdot 7H_2O$, 10 mg H_3BO_3)을 녹여 사용하였으며(14) LiP의 생산을 증진시키기 위한 유도 물질로 veratryl alcohol를 선택하여 실험하였다.

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(11). Lignin peroxidase의 활성 측정은 50 mM sodium tartrate (pH 2.5) 완충액에 2 mM veratryl alcohol 용액과 시료를 혼합한 후 0.4 mM의 hydrogen peroxide를 첨가하여 1분간 310 nm에서 흡광도의 차이를 측정하였다 (molar extinction coefficient=9,300 $M^{-1}cm^{-1}$). 효소의 활성단위는 분당 1 μmol의 veratryl alcohol을 veratryl aldehyde로 산화시키는 효소의 양을 1 unit로 정한다. Mn (Ⅱ)-dependent peroxidase의 활성 측정은 0.5 M sodium tartrate (pH 5.0) 완충액에 1 mM guaiacol, 1 mM $MnSO_4$와 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.

Glucose의 측정 및 균체 성장량 측정

균주 배양시 탄소원인 glucose의 소모량을 측정하기 위하여 DNS (3,5-dinitrosalycylic acid) 방법을 사용하여 정량하였다. Glucose를 2차 증류수에 녹여 검량선을 만든 후 각 시료의 당의 농도가 검량선 유효농도내에 들어올 수 있도록 희석한 후 시료 1 mL에 1 N HCl 40 μL를 가하고 100℃에서 30분간 가수분해시켜 환원당으로 전환시킨 후 다시 1 N NaOH 40 μL를 가해 중화시킨 후 DNS시약을 1 mL 가하여 100℃에서 10분간 발색시켜 UV-Visible spectrophotometer (Shimazu, UV-160A)를 이용하여 흡광도 550 nm에서 검량하였다(15). 균체의 성장은 건조중량으로 측정하였다. 무게를 알고 있는 건조된 여과지로 균체를 걸러, 110℃에서 2시간 건조시킨 후 건조 중량을 측정하였다.

생물반응기의 설계 및 제작

본 연구에서는 일반적으로 폐수처리에 사용되는 rotating biological contactor (RBC)를 보완한 형태의 진보적인 반응기인 회전생물반응기를 개발하여 효소의 생산을 극대화할 수 있는 공정을 개발하였다(16). 공정의 기본 개념은 균주가 고정화된 담체를 drum 모양의 원통 내부에 충진한 회전생물반응기라 할 수 있다. 기존의 RBC는 미생물의 부착 면적이 다소 제한되어 있으나, 본 연구에 사용하게 될 반응기는 최적화된 담체를 drum 내부에 충진하여 비표면적을 극대화 시켰다. 또한 반응기 자체가 회전함에 따라 담체들이 따라 회전함으로써 산소의 전달 속도 또한 우수할 것으로 예상된다. 본 반응기의 개략도는 Figure 1과 같으며 총 부피은 220 mL이며 온도조절은 water jacket, 온도조절기 등을 설치하여 조절하였다.

생물반응기를 이용한 ligninase의 생산

먼저 실험에 사용할 균사체의 농도를 높이기 위해 Table 1의 YMPG 배지 100 mL에 균을 접종하여 homogenizer를 이용하여 9,600 rpm으로 균질화한 후 300 mL 삼각플라스크에 접종하여 회전 배양기에서 200 rpm으로 3~5일간 배양하였다. 위의 1차 배양액을 homogenizer를 이용하여 9,600 rpm으

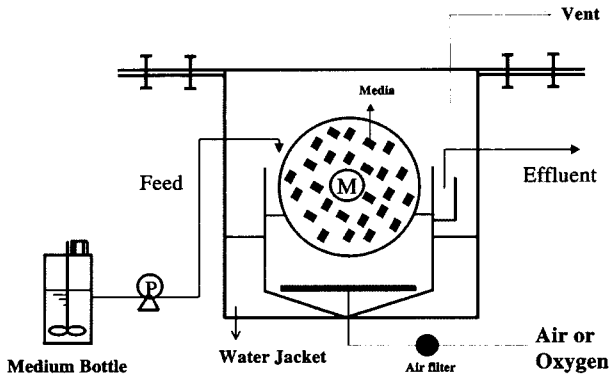

Figure 1. Schematic diagram of rotating bioreactor system.

로 균질화하고 원심분리기에서 5,000 rpm으로 15분간 원심분리하여 얻어진 균사체를 멸균증류수로 2~3회 세척한 후 100 mL의 2차 액체배양 배지로 희석한 균사체 농축용액을 2차 액체배양 배지에 5% (V/V)씩 접종하여 300 mL 삼각플라스크에서 polyurethane 재질의 sponge에 하루 동안 고정화하였다. 고정화시킨 후 sponge를 다시 회전생물반응기에 옮겨 효소의 생산을 유도하였다. *P. chrysosporium*의 배양시에 있어서 가장 중요한 산소의 농도를 결정하기 위하여 직접 산소를 주입하지 않고 공기만으로 효소 생산이 가능한지를 실험하였다. 그리고 반응기의 회전 속도에 따라서도 효소의 생산이 달라지므로 회전 속도를 달리해가며 최적의 조건을 도출하며 고정화 담체의 충진율에 따라서도 효소의 생산이 달라지므로 충진율을 달리해 가며 최적의 조건을 조사하였다.

MnP 활성은 주로 망간이온 농도에 따라 결정되어지며 망간 이온의 첨가는 LiP 활성을 억제하는 경향을 나타내므로 Mn^{2+}농도를 변화시켜 효소생산에 필요한 최대 활성도를 유지할 수 있는 조건을 확정하였다.

결과 및 고찰

회전생물반응기를 이용한 LiP의 생산

백색부후균의 배양시 균주가 생산하는 리그닌 분해효소들(lignin peroxidase, manganese dependent peroxidase)은 전단력(shear stress)에 상당히 민감하므로 일반적인 교반식 발효조를 이용한 연속배양 시 교반속도가 일정속도 이상으로 증가하게 되면 활성도가 감소한다. 또한, *P. chrysosporium*의 배양시에는 산소가 다량 소비되는 것을 확인할 수 있었는데 회전생물반응기를 이용한다면 전단력을 받지 않을 뿐만 아니라 산소와 직접 접촉하고 또한 산소를 직접 공급할 수 있으므로 효율적인 생산이 될 수 있을 것으로 추정되어 회전생물반응기를 이용하여 LiP 및 MnP의 생산을 시도하였다(17).

Figure 2는 회전생물반응기를 이용하여 회분식 실험을 한 결과이다. 질소원은 배양한지 2일 후 모두 소모하였으며, 배양한지 6 일째 LiP는 300 U/L로 최대 활성을 보였다. 배양 6일후 생산된 LiP의 활성도가 급속하게 감소되었으며 이러한 원인으로 배양액내 생성되는 protease, H_2O_2, 그리고 곰팡이에서 분비되는 여러 가지 대사산물, 교반속도에 따른 효소의 변성 등 여러 복합적인 원인에 의하여 LiP의 활성도가 감소된다고 보고되고 있다(18).

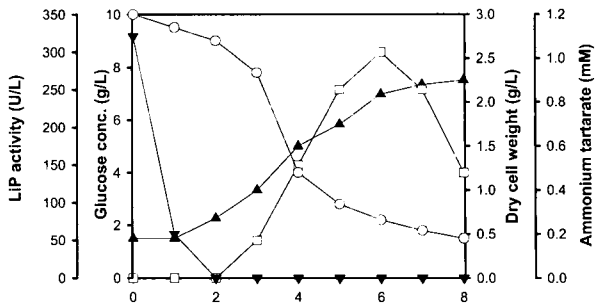

Figure 2. LiP production in a rotating bioreactor with immobilized *P. chrysosporium* IFO 31249 □ LiP activity (U/L), ○ Glucose conc. (g/L), ▲ Dry cell weight (g/L), ▼ Ammonium tartrate (mM).

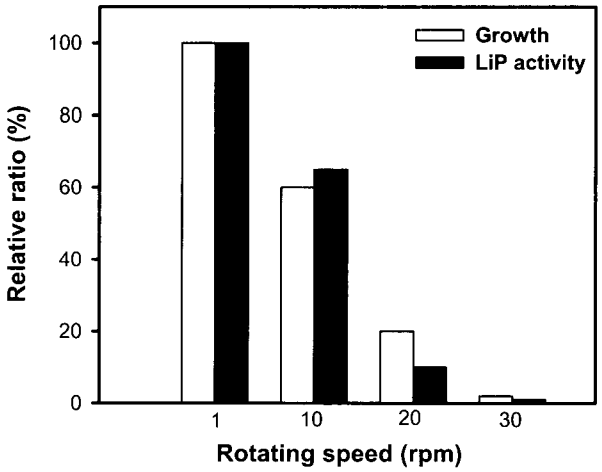

Figure 3. Effect of rotating speed on the mycelial growth and LiP activity in a rotating bioreactor.

그러나 생물반응기를 이용한 많은 보고 (air lift를 이용하여 Leisola과 Fiechter 등(19)은 최고 17 U/L의 LiP를 생산, Janshckar 등(20)은 stirred tank를 이용하여 102 U/L의 LiP를 생산하였으며 Michel 등(21)도 stirred tank를 이용하여 LiP를 생산하였는데 최고 활성도가 175 U/L)와 비교하여 비교적 높은 활성도의 LiP를 생산하였다. 그리고 Kirk 등(22)이 본 반응기와 비슷한 형태의 rotating contactor를 이용하여 130 U/L의 LiP를 생산한 보고와 비교하여도 본 연구에서 이용한 회전생물반응기가 우수함을 알 수 있다. 또한 repeated-batch culture가 가능하다면 대량 생산을 용이하게 함으로 산업적으로 이용할 수 있으리라 판단된다.

Drum 회전속도의 영향

회전생물반응기의 drum 회전 속도에 따른 영향을 알아보기 위하여 담체를 20% 충진시키고 순산소를 1.5 mL/min의 속도로 공급하였으며 37℃에서 배양하면서 회전속도만을 달리하여 비교하였다. 전단응력에 약한 효소의 문제점과 회전속도가 너무 빠르며 고정된 세포의 탈착 때문에 회전생물반응기 drum의 적정 회전 속도를 결정해줄 필요가 있다. Figure 3에서와 같이 회전 속도가 10 rpm 이상에서 빠르게 회전할수록 부착된 세포의 양도 줄어들었으며 30 rpm 이상에서는 세포가 거의 다 탈착되었다. 이에 따라 LiP의 활성이 떨어지는 것을 볼 수 있다. 그러나 1 rpm 미만으로 속도를 유지하였을

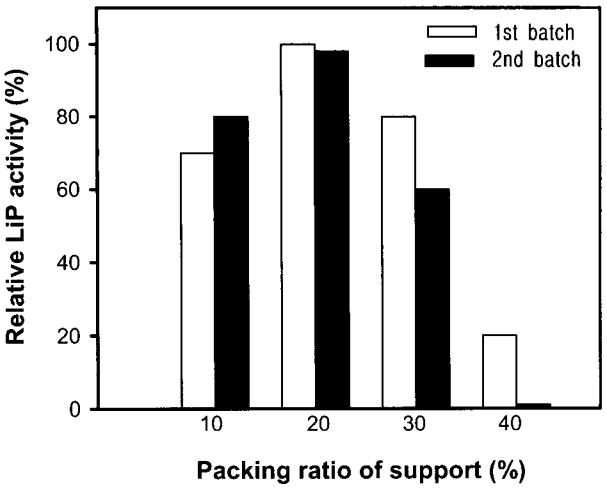

Figure 4. Effect of packing ratio of support on the mycelial growth and LiP activity in a rotating bioreactor.

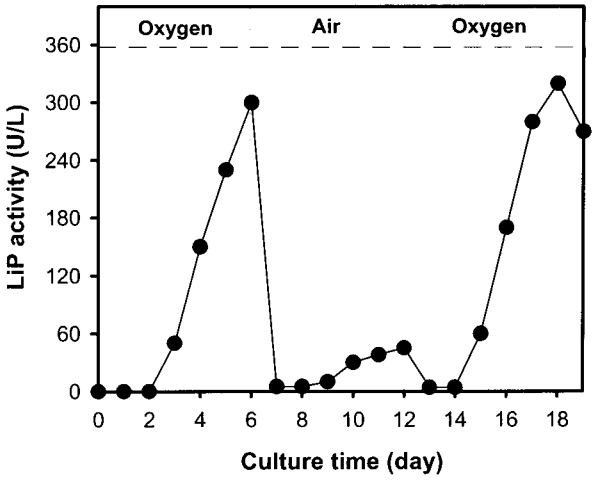

Figure 5. Effect of oxygen on LiP production in a rotating bioreactor.

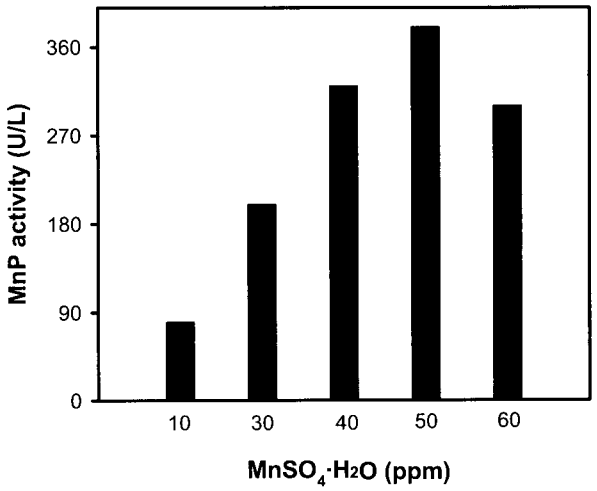

Figure 6. Effect of $MnSO_4 \cdot H_2O$ concentration on MnP production in a rotating bioreactor.

경우 LiP의 생산은 우수하였다. 따라서 대량의 LiP를 생산하는 공정에서는 1 rpm 미만의 속도를 유지하여야 된다고 판단된다.

담체 충진율의 영향

순산소를 1.5 mL/min의 속도로 공급하였으며 37℃에서 배양하면서 drum의 회전속도를 1 rpm으로 고정하여 담체의 충진율만을 달리하여 비교하였다(Figure 4). 회전생물반응기에 충진하는 담체가 20%일 때 가장 우수하였으며 충진율이 많아지자 오히려 효소의 생산이 저하되었다. 이는 담체의 충진율이 많아지자 담체 사이의 공간이 줄어들어 오히려 물질 전달이 잘 이루어지지 않았으며 또한 균체의 과다한 성장으로 인하여 drum 자체가 막혀버려 물질 전달이 제대로 되지 않았다고 판단된다.

산소의 영향

일반적으로 *P. chrysosporium*를 이용한 LiP, MnP의 생산에는 고농도의 산소가 요구된다. 따라서 회전생물반응기에 담체를 20% 충진시키고 drum의 회전 속도를 1 rpm, 배양온도 37℃에서 배양하면서 공기와 산소를 교체하면서 산소의 영향을 알아보았다. 이 때 공기는 15 mL/min의 속도로 공급하였으며 산소는 1.5 mL/min의 속도로 공급하였다. Figure 5에서 보면 순산소를 공급하였을 때는 300 U/L의 높은 활성도를 보였지만 공기로 바꾸어서 공급하자 45 U/L 정도로 활성도가 이주 낮았다. 그러나 다시 산소를 공급하자 LiP의 활성도가 다시 높아졌다. 이것으로 보아 *Phanerochaete chrysosporium* IFO 31249가 LiP를 생산하는데 고농도의 산소가 요구된다는 사실을 알게 되었다.

Mn(II)의 농도의 영향

Mn(Ⅱ)이온을 첨가하면 MnP의 생산성을 증가시키고 LiP의 생산성을 감소시킨다고 보고되고 있다(13). 따라서 $MnSO_4 \cdot H_2O$의 농도를 달리하여 MnP의 생산성 변화를 조사하였다. Figure 6에서 보면 $MnSO_4 \cdot H_2O$의 농도가 10에서 50 ppm으로 증가함에 따라 배양 4일 후 최대 activity가 각각 80, 120, 320, 380 U/L로 MnP의 생산이 증가되고 있음을 알 수 있다. 이는 Mn(Ⅱ)이온을 첨가시 LiP의 생산 mechanism이 저해되고 MnP의 생산을 촉진시킨다는 것을 나타내고 있다. Brown 등(13)이 Mn(Ⅱ)이온은 MnP의 생산을 촉진시키며 manganese peroxidase gene을 전사 조절에 관계한다는 연구결과와 일치하다. 이는 또 Bonnarme와 Jeffries 등(23)의 $MnSO_4$ 투입후 LiP의 생산성은 감소하고 MnP가 증가한다는 연구결과와 일치하다. 그러나 $MnSO_4 \cdot H_2O$의 농도가 과량으로 첨가된 60 ppm인 경우 오히려 300 U/L로 감소하였다.

회전생물반응기를 이용한 repeated-batch culture

LiP나 MnP를 연속적으로 생산하기는 어렵다고 알려져 있다. 이는 곰팡이에서 나오는 H_2O_2, protease, 독성 물질 그리고 전단력에 의한 효소 활성의 저하 등 여러 가지 복합적인 요인에 의해 연속적으로 생산하기는 어렵다. 따라서 본 연구에서는 먼저 연속적으로 생산이 가능한지를 확인하였다. 연속적인 배양이 가능한지를 확인하기 위하여 수리학적 체류시간을 변화하여 실험을 한 결과 LiP 및 MnP의 생산은 거의 되지 않았다. (data not shown) 백색부후균을 이용하여 LiP를

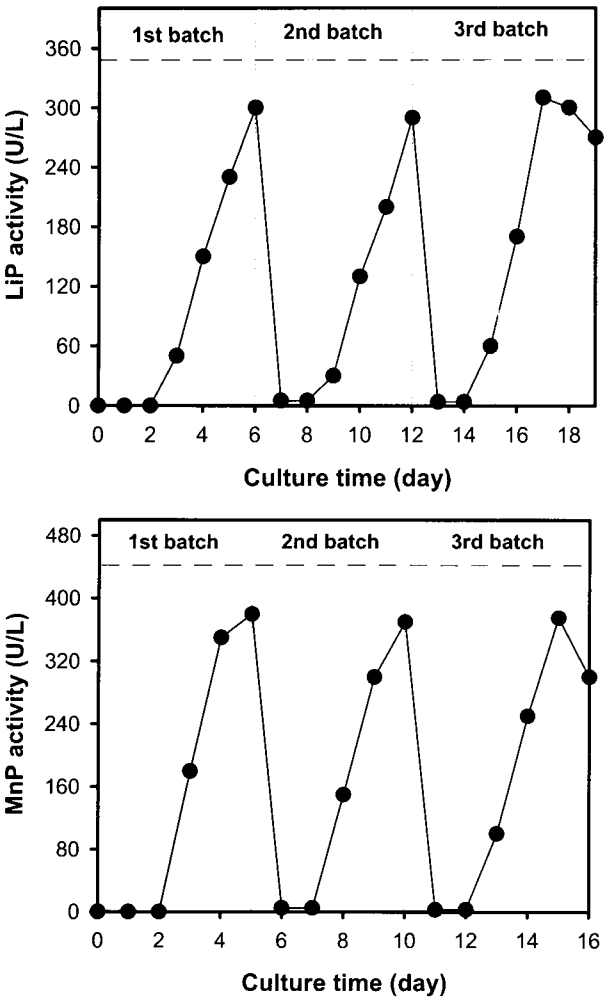

Figure 7. LiP and MnP production from repeated-batch cultures in a rotating bioreactor.

생산하기 위해서는 균을 먼저 1차 배양으로 충분히 키운 후 다시 질소 제한배지로 2차 배양을 해야함으로 그 과정이 매우 복잡하다. 따라서 LiP를 한번 생산 후에도 다시 그 cell을 이용할 수 있다면 효소 생산에 있어서 비용이 매우 절감될 뿐만 아니라 1차 배양이 필요하지 않으므로 그 시간 또한 매우 단축된다. 따라서 본 연구에서는 효소를 한번 생산 후에도 다시 효소의 생산이 가능한지 repeated-batch culture를 통하여 그 가능성을 확인하여 보았다. 따라서 회전생물반응기에서 담체를 20% 충진시키고 drum의 회전 속도를 1 rpm, 배양온도 37℃, 산소를 1.5 mL/min의 속도로 공급하면서 repeated- batch로 LiP를 생산하였다.

Figure 7에서 보면 repeated-batch culture가 가능하다는 것을 알 수 있다. 균주의 성장은 질소제한배지에서 비교적 천천히 성장하였지만 LiP의 생산은 3번째 culture에서도 처음과 비교하여 별로 감소하지 않고 높은 활성도를 유지하였다. 또한 MnP의 생산도 repeated-batch culture가 가능한지를 확인하여 보았다. 그림에서와 같이 LiP에 비해서 비교적 빠르게 생산되었으며, 역시 3번째 batch에서도 370 U/L로 높은 활성도를 보였다. 따라서 ligninase의 중요성과 잠재력에도 불구하고 대량생산이 이루어지지 않아 공업적인 활용이 지연되었지만 본 반응기를 이용하여 repeated-batch culture를 통한 LiP 및 MnP의 대량 생산을 가능하게 함으로 산업적으로 많이 이용할 수 있으리라 판단된다.

요 약

본 연구의 목적은 회전생물반응기에 고정화한 *P. chrysosporium* IFO 31249를 이용하여 LiP 생산의 최적 조건을 조사하는 것이다. 회전생물반응기에서 batch culture시 최대 LiP 활성도는 300 U/L이었다. LiP 생산의 최적 조건은 드럼의 회전 속도는 1 rpm, 담체 충진율은 20%이었다. MnP 생산을 위한 $MnSO_4 \cdot H_2O$의 최적 농도는 50 ppm이었다. 그리고 산소의 충분한 공급은 LiP 생산의 가장 중요한 인자이었다. 또한 LiP 및 MnP의 생산에 있어 repeated-batch culture가 3번이나 가능하였다.

감 사

이 논문은 1999년도 한국학술진흥재단 학술연구조성비에 의해 지원되었습니다. 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Paszcynski, A., M. B. Pasti-Grigsby, D. L. Goszcynski, and R. L. Crawford (1992), Mineralization of sulfonated Azo Dyes by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus, Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 13531-13535.
2. Ryu, W. R., Y. S. Seo, Y. K. Chang, and M. H. Cho (2000), Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by White Rot Fungi, *Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **15**(3), 262-267.
3. Baker, W. L., K Sabapathy, M. Vibat, and G. Lonergan (1996), Laccase Catalyzes Formation of an Indamine Dye between 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone and 3-dimethylaminobenzoic acid, *Enzyme and Microbial Technology*, **18**, 90-94.
4. Bollag, J. M., K. L. Shuttleworth, and D. H. Anderson (1988), Laccase-mediated Detoxification of Phenolic Compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 3086-3091.
5. Seo, Y. S., W. R. Ryu, Y. K. Chang, and M. H. Cho (2000), Biodegradation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons using Immobilized Cells of *Phanerochaete chrysosporium, Kor. J. Biotech. Bioeng.*, **15**(3), 247-253.
6. Bumpus, J., M. Tien, D. Wright, and S. Aust (1985), Oxidation of Persistent Environmental Pollutants by a White Rot Fungus, *Science*, **228**, 1434-1436
7. Collins, P. J., M. J. J. Kotterman, J. A. Field, and A. D. W. Dobson (1996), Oxidation of Anthracene and Benzo[a]pyrene by Laccase from *Trametes versicolor, Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 4563-4567.
8. Ryu, W. R., S. H. Shim, M. Y. Jang, Y. J. Jeon, K. K. Oh, and M. H. Cho (2000), Biodegradation of Pentachlorophenol by White Rot Fungi under Ligninolytic and Nonligninolytic Conditions, *Biotechnol. Bioprocess Eng.*, **5**, 211-214.
9. 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.
10. Field, J. A., E. de Jong, G. F. Costa, and J. de Bont (1992), Biodegradation of by New Isolates of White Rot Fungi, *Appl. Environ. Microbiol.*, **58**, 2219-2226.
11. Tien, M. and T. K. Kirk (1988), Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*, *Methods of Enzymology*, **161**, 238-249.
12. Leisola, M., U. Thanei-Wyss, and A. Fiechter (1985), Strategies for Production of High Ligninase Activities by *Phanerochaete chrysosporium, J. Biotechnol.*, **3**, 97-107.
13. Brown, J. M., J. K. Glem, and M. H. Gold (1990), Manganese Regulates Expression of Manganese Peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*, *J. Bacterial*, **172**, 3125-3140.
14. Tien, M. and T. K Kirk (1987), Selection and Improvement of Lignin-Degrading Microorganisms, *Appl Environ. Microbiol.*, **53**(2), 242-245.
15. Gold, M. H. and M. Alic (1993), Molecular biology of the Lignin-Degrading Basiomycete *Phanerochaete chrysosporium*, *Microbiol. Rev.*, **57**, 605-622.
16. Shuler, M. L. and F. Kargi (1992), Bioprocess Engineering Basic Concept, 1st ed., Prentice-Hall International Editions.
17. Orth, A. B. and M. Tien (1991), Overproduction of Lignin-Degrading Enzymes by an Isolate of *Phanerochaete chrysosporium, Appl. Environ. Microbio.*, **57**(9), 2591-2596.
18. Frederick, C. M., E. A. Grulke, and C. A. Reddy (1991), Role of Manganese Peroxidase and Lignin Peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* in the Decolorization of Kraft Bleach Effluents, *Appl. Environ. Microbiol.*, **57**, 2368-2375.
19. Leisola, M. S. A. and Fiechter (1985), Ligninase Production in Agitated Conditions by *Phanerochaete chrysosporium, FEMS Microbiol. Lett.*, **29**, 33-36.
20. Janshckar, H. and Fiechter (1988), Cultivation of *Phanerochaete chrysosporium* Production of Lignin Peroxidase in Submerged Stirred Tank Reactors, *J. Biotechnol*, **8**, 97-112.
21. Michel, F. C., E. A. Grulke, and C. A. Reddy (1990), Development of a Stirred Tank Reactor System for the Production of Lignin Oxidases by *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F-1767, *J. Ind. Microbiol.*, **5**, 103-112.
22. Kirk, T. K., S. Croan, M. Tien, and R. E. Farrell (1986), Production of Multiple Ligninases by *Phanerochaete chrysosporium*, *Enzyme Microbiol. Technol.*, **8**, 27-32.
23. Bonnarme, P. and T. W. Jeffries, (1990), Selective Production of Extracellular Peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium* in a Airlift Bioreactor, *J. Ferment Bioeng.*, **70**, 158-163.