

## Lignocellulose의 분해 및 이용을 위한 Lignin 분해 세균의 분리

김용균\* · 김한수 · 김근기 · 손홍주 · 이영근<sup>1</sup>

밀양대학교 생물공학과  
<sup>1</sup>밀양대학교 식품공학과

### Isolation of a Lignolytic Bacterium for Degradation and Utilization of Lignocellulose

Kim Yong Gyun\*, Son Hong Joo, Kim Keun Ki, Kim Han Su and Lee Young Guen<sup>1</sup>

Department of Biotechnology, Miryang National University, Miryang 627-703. Korea  
<sup>1</sup>Department of Food Science, Miryang National University, Miryang 627-703. Korea

#### Abstract

38 strains were isolated in order to utilize lignin degrading ability from soil and compost. A organism having high lignin degrading ability of the isolated strains determined morphological and biochemical characteristics. Enrichment technique yielded a lignin degrading bacterium characterized as *Pseudomonas* sp. LG-2. This strain was able to degrade lignin which are the true representatives of native lignin and transform lignin to a lot of aromatic compounds as HPLC analysis of culture. By polyacrylamide gel analysis, it was determined that peroxidase consisted of three enzymes, with only one, the lignin peroxidase having high activity.

**Key words** – *Pseudomonas* sp: LG2, lignin, UV-spectrum, HPLC

#### 서 론

리그닌은 식물세포의 구성분 중의 하나로서 재 이용 가능한 방향족 물질이지만, 현재 거의 재 이용되지 않는 가장 풍부한 천연자원이다.

벼짚이나 보리짚 또는 톱밥 같은 대량의 lignocellulose 폐기물이 농업을 비롯한 여러 산업에서 생산되고 있다. 이러한 재생 가능한 폐자원의 효율적 이용은 매우 중요하다[12,13, 16,22]. 브라질의 경우 폐당밀에서 얻어지는 lignocellulose

성분을 이용하여 ethanol을 생산 energy원으로 이용하고 있다. 그러나 많은 양의 폐당밀이 재 이용되지 않고 버려지는 실정이다. 보리나 밀 생산에서 얻어지는 짚은 새로운 작물을 재배하기 위하여 매년 불태우는 실정이다. 한편 pulp나 제지 산업에 있어서 목재의 20% 이하가 pulp나 종이를 만드는데 실제로 이용되고 대부분의 폐기물은 이용되지 않고 소각하고 있다. 표백 공정에서 얻어지는 폐기물은 미생물로 처리하고 있으나 리그닌을 함유하고 있는 물질로 인해 미생물적 분해에 영향을 미쳐 장시간의 작동 시간이 요구되고 있다. 부분적으로 변형되거나 화학적으로 변형된 리그닌 부산물은 미생물이 보다 더 분해할 수 있으며 또한 에너지원으로도 이용된다. 현재는 종이 생산을 위한 전처리로서 목

\*To whom all correspondence should be addressed  
Tel : 055-350-5481, Fax : 055-350-5481  
E-mail : kygyun@mnu.ac.kr

재 원료에 리그닌을 화학적 처리로 제거하는데 반하여 미생물학적 제거는 목재 pulp 제조의 경제성을 근본적으로 바꿀 수 있을 뿐만 아니라 환경오염도 막을 수 있다. 사일리지나 건조같은 동물 사료의 영양적 가치는 리그닌의 생물학적 분해에 의해 확실히 증가될 것이다. 이는 탈 리그닌에 의해 에너지원으로 이용되지 못했던 hemicellulose나 cellulose 분자를 이탈시켜 가축의 장내에서 분해 이용될 수 있도록 함으로서 리그닌의 제거는 사료의 소화 이용 효율에 매우 중요하다. 또한 리그닌 자체는 방향족 화합물로서 다른 방향족 화합물의 합성에 있어서 화학공업에 매우 유용한 물질이다[8,13,18,20]. Biomass의 주요 형태인 lignocellulose는 cellulose, hemicellulose 및 lignin으로 구성되어 있으며 이들은 서로 결합되어 있어서 효소적 분해에 매우 저항적이다. 리그닌은 coumaryl alcohol, coniferyl alcohol, sinapyl alcohol의 화학 polymer로서 다양한 결합을 가진 heterogeneous 한 입체구조로 구성되어 있다. 배열순서는 예측할 수 없고 chirality가 없으며, polymer를 형성하기 위하여 매우 안정한 결합을 하고있어 세균이나 곰팡이의 공격에 매우 저항적이다. 그러나 lignocellulose는 미래의 생물공학에 매우 중요한 물질이다. 백색부후균인 *Phanerochaete chrysosporium*은 여러 가지 목재, 볏짚 및 목초 등의 리그닌을 분해할 수 있다[2,3,12,17]. 그러나 방선균은 목초와 짚만 분해할 수 있다[1,5,8,14,19]. Fenn과 Tien [1,7] 등은 *P. chrysosporium*은 lignocellulose를 주로 CO<sub>2</sub>로 분해한다고 했다. Fungi는 리그닌 분해에 주요한 미생물이지만, 액체 배양 시 산소의 제한, 점성 등이 실제 응용에 문제점이 있다. 이러한 lignocellulose 분해에 관한 연구는 주로 백색 부후균인 Fungi와 방선균에 대해 많은 연구가 이루어지고 있는 실정이며, 세균에 관한 연구는 극히 일부의 세균에 대해 연구가 이루어지고 있다. 따라서 본 연구는 세균에 의한 lignocellulose성 물질을 분해할 뿐만 아니라, 이용 가능성이 있는 방향족 분해 산물을 생산하는 세균의 이용을 위한 기초자료를 얻기 위하여 본 실험을 수행하였다.

## 재료 및 방법

### 균주의 분리

균주 분리에 사용된 배지는 Starr [20] 등의 배지를 사용하였다. 배지는 0.2% (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, 0.05% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub>

· 7H<sub>2</sub>O, 2% agar, pH7.0의 배지 조성에 탄소원으로 0.1% lignin (aldrich 제품) 또는 tannic acid를 첨가하여 사용했다. 리그닌 분해균 분리에 있어서, 토양, 퇴비, 늪지 등에서 채취한 시료 0.1g을 5ml 액체배지가 들어있는 시험관(φ16×160 mm)에 접종하여 30℃에서 7일간 150rpm으로 진탕 배양한 후 1ml을 고체배지에 접종하여 배양하였다. 리그닌을 탄소원으로 분해하여 생육하는 균주를 선별하였다.

### 균주의 동정

실험 균주의 형태학적, 생리학적 및 생화학적 특징을 조사한 후, 실험 결과를 Bergey's manual of systematic bacteriology [11]의 내용과 비교하여 동정하였다.

### 배지 및 배양조건

리그닌 분해연구에 사용된 배지는 0.1% glucose, 1% Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O, 0.1% KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.02% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, 0.02% NaCl, 0.005% CaCl<sub>2</sub> · 2H<sub>2</sub>O, 0.6% yeast extract, pH7.0인 배지를 1L 삼각플라스크에 250ml 분주하고 121℃에서 20분 동안 살균하였다. Filtration으로 살균한 리그닌을 최종 농도 0.5%되게 첨가하여 사용하였다. 대조구로는 위에서 언급한 기본배지와 포도당을 넣은 배지를 각각 사용하였다. 선별된 균주는 30℃에서 150rpm으로 진탕 배양하면서 배양 기간에 따라 배양액을 채취하고 whatman No.1 여과지로 여과하여 리그닌을 제거하고 여과액을 10,000xg에서 20분 동안 원심분리하여 그 상등액을 분석에 사용하였다. 단백질 함량 측정에는 Bio-Rad의 단백질 분석 Kit를 사용하여 측정하였다.

### 리그닌 분해 측정 및 HPLC

리그닌 분해 측정은 lignocellulose 분해시 생성되는 water-soluble APPL (acid-precipitable product lignin)의 함량 측정법을 응용하여 실시하였다[15]. 리그닌을 첨가한 배지에서 일정기간 배양한 배양액을 20분 동안 4℃에서 10,000xg으로 원심분리한 후 상등액을 취하여 HCl로 pH를 1~3으로 조정하였다. APPL (acid-precipitated product lignin)의 침전물을 증류수에 재 용해하여 원심분리 한 후 상등액을 재 회수하는 방법으로 3회 반복하여 APPL을 회수하여 건물량으로 측정하였다. 배양기간 중 리그닌의 분해 생성물의 경향은 위에서 얻은 상등액을 동결건조 한 것을 시료로 사

용하여 Waters 686 High Performance Liquid Chromatography (HPLC)로 조사하였다. HPLC의 분석 조건은 20% acetonitrile을 1ml/min. 유속으로 275nm에서 조사하였다.

#### Gel상의 Lignin peroxidase 염색

Gel상에서 lignin peroxidase 활성은 Adhi, T. 등의 방법에 따라 실시했다[1]. Native polyacrylamide gel 전기영동을 실시한 후, gel상의 lignin peroxidase 활성은 0.1M phosphate 완충용액 100ml에 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, 0.1g 4-aminoantipyrine, 197.2mg L-DOPA (L-3,4-Dihydroxyphenylalanine)가 함유된 용액에 gel을 37°C에서 5분간 처리 하였다. Lignin peroxidase 활성 band는 적갈색으로 염색되었다.

#### 총페놀류 함량분석

총 페놀성 물질의 함량 분석은 Folin-Ciocateau법[19]을 약간 변형 시켜 측정하였다. 배양기간별로 일정량의 배양액을 원심분리(10000xg, 10분, 4°C)하여 얻어진 배양액 1ml를 시험관에 취하고 여기에 50% Folin-Ciocateautldir 0.2ml를 첨가하여 잘 혼합하고 실온에 방치한 후 2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 1ml를 가하여 혼합하고, 실온에서 1시간 방치하여 725nm에서 흡광도를 측정하였다. 총페놀 함량은 tannic acid를 이용하여 얻어진 표준곡선으로 함량을 구하였다.

## 결과 및 고찰

#### 균주의 분리 및 동정

리그닌을 분해시키는 효소를 생산하는 균주를 선별하기 위하여 밀양 지역에서 채취한 벚짚, 토양, 퇴비, 부엽토, 등에서 채취한 원료시료를 단일 탄소원인 리그닌 혹은 tannic acid가 함유된 screenig 배지에 접종하여 30°C에 7일간 배양 하였다. Phenol oxidase의 작용에 의해 리그닌이 탈polymer 되어 기질인 리그닌이 함유된 배지에 생육한 세균 colony 주위에 dark zone을 형성하는 균주들을 1차 선별하였다. 선별된 균주를 액체배지에 5일간 배양한 후 효소활성을 측정 하였다. 이들 중에서 효소활성이 가장 높은 균주를 선정하여 형태학적 생화학적 특성을 조사하였다. 조사 결과 선정된 균주는 그람 음성균으로 간균이며, 운동성을 가지는 호기성 균주였다, Bergey's manual [11]에 의하여 동정한 결과 *Pseudomonas* 속으로 판명되어 분리 균주 LG2를 *Pseu-*

*domonas* sp. LG2로 명명하였다(Table 1).

#### 리그닌 분해 활성조사

리그닌 분해 활성을 조사하기 전에 분리 선정한 *Pseudomonas* sp. LG2를 리그닌 분해활성 연구에 이용되는 고분자색소 Poly B-411 (polyvinylamine sulfonate-anthroquinone)을 탄소원으로 사용하여 탈색화를 조사하였다. 배양은 100ml의 배양액을 함유한 500ml 삼각플스크에 Poly B-411를 최종 농도 0.02%되게 첨가한 후 배양 조건을 조사하기 위하여 2일 동안 배양한 균주 1ml를 접종하여 앞의 배양 조건에 따라 일정 기간 배양하면서 흡광도의 변화를 UV-Visible spectrophotometer으로 측정하였다. 균주 접종전 Poly B-411의 scanning 결과 480nm에서 650nm의 범위의 흡광도를 나타내었다. 배양 기간에 따라 흡광도를 측정한 결과 배양 기간이 늘어남에 따라 흡광도가 점차 감소하는 경향을 보였다. 이는 분리 선정한 *Pseudomonas* sp. LG2가 Poly B-411을 분해시킨다는 것을 알 수 있었다(자료미제시). 리그닌을 분해시킬 수 있는 곰팡이나 방선균 등이 Poly B-411을 탈색화할 수 있으며, 탈색화의 효과는 여러 가지 리그닌 모델 화합

Table 1. Morphological and biochemical characteristics of the isolated strain LG-2.

Characteristics	Results
Shape	rod
Mobility	+
Gram's stain	-
Oxygen requirement	+
Growth at 41°C	+
KOH test	-
Casein hydrolysis	+
Starch hydrolysis	-
Gelatin liquefaction	+
Utilization of carbohydrates	+
Urease test	+
Catalase test	+
Indole production	-
Poly-β-hydroxybutyrate (PHB) accumulation	-
Tween 80 hydrolysis	-
Catechol cleavage	+
Protocatechuate cleavage	+

물이나 리그닌의 분해 활성과 상호 관련되어있다고 Kelly와 Monties 등이 보고하였다[12,15]. 그래서 우리는 분리 선정한 *Pseudomonas* sp. LG2가 Poly B-411이 함유된 배지에 배양했을 때 흡광도를 변화시킨 결과로 보아 리그닌 모델 화합물이나 리그닌을 분해 시킬 수 있을 것으로 생각되어 리그닌이 함유된 배지에 *Pseudomonas* sp. LG2를 접종하여 배양기간에 따른 리그닌 분해정도를 흡광도의 변화로 조사하였다(Fig. 1). 균주를 접종하기 전 리그닌 함유 배지의 상등액을 취하여 200nm에서 400nm까지의 흡수 스펙트럼을 조사하였다. Monties 등[15]은 리그닌이 UV 지역인 약 280nm 부근에서 특정 흡광도를 나타낸다고 했으며, 또한 Uma 등[23]이 몇 종류의 원료 리그닌으로 조사한 흡수 스펙트럼과 본 실험에서 사용한 리그닌의 흡수 스펙트럼이 매우 유사하였다. 일정 기간 연속 배양한 배양액을 취하여 원심분리 한 후 상등액에 대하여 흡광도의 변화를 조사한 결과 배양기간

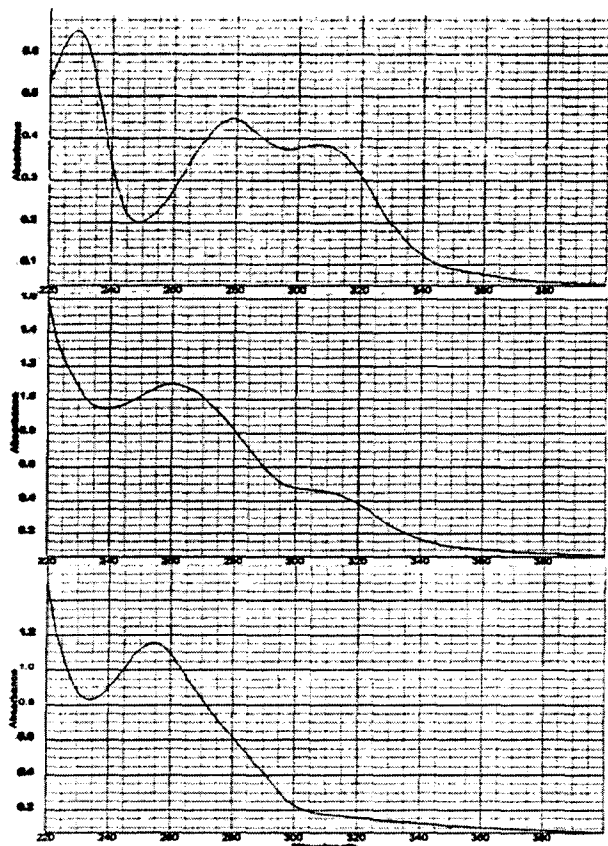


Fig. 1. Changes in UV spectrum of lignin during cultivation period by *Pseudomonas* sp. LG-2.  
top: control, middle: after 15 days, bottom: after 30 days

이 증가함에 따라 280nm 부근의 흡광도가 점차 감소하였다. 배양 동안에 *Pseudomonas* sp.LG2에 의해 리그닌이 분해되어 280nm의 흡광도가 감소하고 있는데 이는 리그닌의 방향족환이 분해된 것으로 생각된다.

우리는 분리한 *Pseudomonas* sp. LG2의 리그닌 분해에 대한 보다 정확한 결과와 향후 이 균주의 천연 lignocellulose의 분해 가능성을 조사하기 위하여 앞에서의 균주 배양에 따른 리그닌 함량의 변화 및 총phenol 함량을 조사하고 분해 생성물 중 방향족 물질의 생성을 확인하기 위하여 HPLC를 이용하여 조사한 결과를 Fig. 2와 Fig. 3에 각각 나타내었다.

Fig. 2는 배양기간에 따른 APPL 함량 및 총 페놀 함량의 변화를 알아보기 위하여 30℃에서 30일간 배양하면서 3일간격으로 측정된 결과를 나타낸 것이다. APPL 함량은 배양기간 12일 까지는 약간 증가하였으나 그 이후부터는 점차 감소하여 배양 20일 부터는 약  $20 \pm 5\text{mg/ml}$ 이 유지되었다. 한편 페놀류의 축적 여부를 알고자 조사한 결과 *Pseudomonas* sp. LG2가 리그닌을 분해 시키면서 배양 7일까지는 페놀류의 함량이 증가하였으나, 배양 12일까지는 감소하였으며 다시 15일까지 증가하고 그 이후부터는 감소하는 경향을 보였

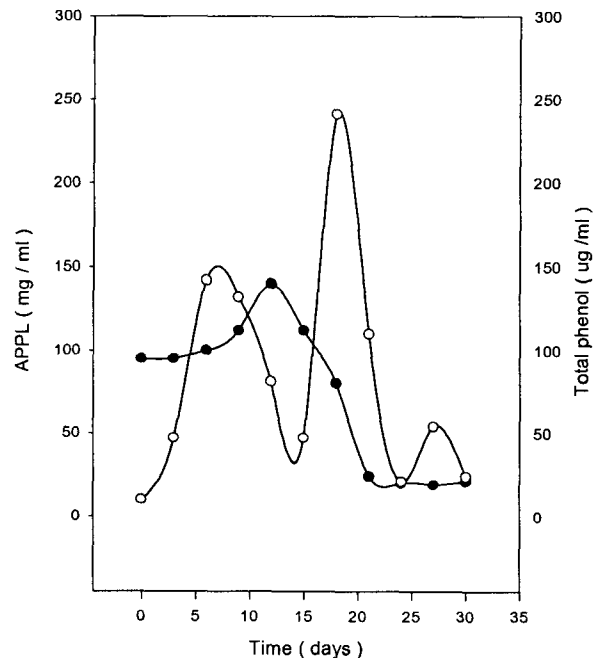


Fig. 2. Changes of APPL and total phenol by *Pseudomonas* sp. LG-2 during growth on media contained lignin.  
●: APPL as determined by measurement of dry weight, ○: Total phenol.

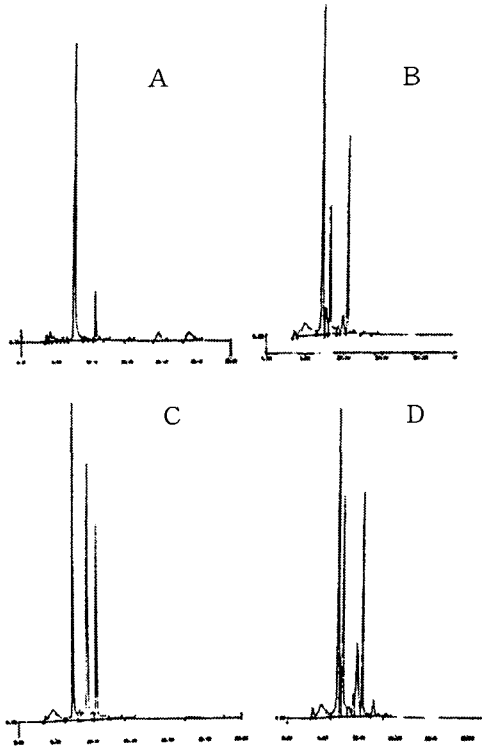


Fig. 3. High performance liquid chromatography analysis of lignin degradation product extracted from a culture of *Pseudomonas* sp. LG-2. The samples were applied to  $\mu$  Bondapak C<sub>18</sub> 3.9×300mm column and eluted with 20% acetonitrile, flow rate 1ml/min. A: 5 days, B: 14 days, C: 21 days, D: 30 days.

다. 이러한 경향을 리그닌 분해와 비교해 볼 때 배양 12일까지는 리그닌 분해와 페놀류의 증가는 상호 관련이 있는 것으로 보여지지만, 약 20일 이후부터는 리그닌의 분해는 거의 정지 상태이나 페놀의 함량이 증가되는 것은 앞의 재료 및 방법에서 *Pseudomonas* sp. LG2의 배양액을 산으로 침전시켰을 때 산에 침전되지 않는 수용성 polymeric 중간체가 *Pseudomonas* sp. LG2가 생산하는 효소에 의해 페놀류로 전환되어 *Pseudomonas* sp. LG2가 탄소원으로 이들 페놀류를 이용한 것으로 생각된다. 이러한 것은 Uma [23] 등이 *Pseudomonas*가 페놀류를 meta 분해 경로를 통하여 pyruvate 나 acetaldehyde로 혹은 ortho 분해 경로를 통하여 succinic acid 나 coenzyme A로 대사하여 탄소원으로 이용할 수 있다는 점으로 미루어 볼 때, 본 연구에 사용된 *Pseudomonas* sp. LG2도 리그닌을 분해 이용하는 것으로 생각된다.

리그닌 분해에 있어서 백색 부후균인 *Phanerochaete chrys-*

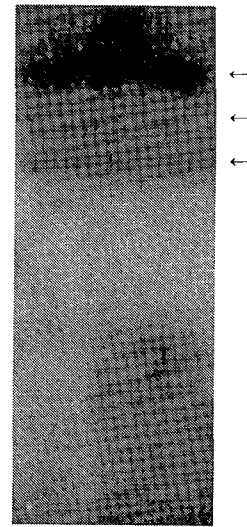


Fig. 4. Native polyacrylamide gel electrophoresis showing three isoforms of lignin peroxidase (arrowheads at right) produced by *Pseudomonas* sp. LG-2. The gel treated with solution containing 197.2mg of L-dopa, 0.1g of 4-aminoantipyrine and 4ml of 0.3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in 100ml of 0.1M phosphate buffer for 4 min at 37°C. Lignin peroxidase bands stained red.

*osporium* 등과 같은 담자균은 리그닌을 CO<sub>2</sub>로 분해하지만, 방선균이나 일부의 세균류는 리그닌을 분해하여 water-soluble APPLs이나 APPL 유사 물질을 생산하여 lignocellulose를 분해 한다는 다수의 연구 결과가 알려져 있다[3-7,11]. 이들 APPL은 aromatic acids가 ester결합하여 이루어진 리그닌 거대분자로서 산가수분해나 alkaline ester 가수분해에 의해 vanillic acid, syringic acid, ferulic acid 등과 같은 여러 가지 주요한 방향족 화합물을 얻을 수 있다[1,2,8,9,13,17,21]. 그래서 우리는 리그닌 분해산물로 얻어지는 방향족 물질의 이용을 위한 기초 자료를 얻고자 배양액 시료를 HPLC를 수행하여 실험한 결과를 Fig. 3에 나타냈다. 배양기간이 지속됨에 따라 다양한 pattern의 peak를 볼 수 있었으며, 이는 *Pseudomonas* sp. LG2가 배양기간 중 다양한 형태의 리그닌 분해 산물을 생산한다는 것을 추정할 수 있었으며, 이에 대한 연구는 계속 진행되어야 할 것으로 생각된다.

#### Gel상의 Lignin peroxidase 활성 조사

*Pseudomonas* sp. LG2가 생산하는 extracellular 효소의 단백질의 pattern을 조사하기 위하여 polyacrylamide gel 전기영동을 실행하고, 또한 native polyacrylamide gel 전기영동

을 실시하여 앞의 실험 방법에 따라 lignin peroxidase의 활성을 조사한 결과를 Fig. 4에 나타냈다. Native polyacrylamide gel의 peroxidase 활성 염색 결과 갈색의 3개의 band가 확인되어 3개 band 모두가 lignin peroxidase 활성을 가지는 것으로 추정되었다. 그러나 Native polyacrylamide gel의 peroxidase 활성을 측정된 결과 3개의 band중 한 개의 band가 리그닌 분해 활성이 높은 것으로 나타나 *Pseudomonas* sp. LG2의 리그닌 유도 peroxidase의 주된 효소라고 생각된다. 이러한 것은 Pometto 및 Ramachandra 등[18]이 *Streptomyces viridosporus*와 *Streptomyces* spp.를 이용한 lignin peroxidase에 대한 polyacrylamide gel 전기영동으로 활성 염색시킨 결과 4개의 peroxidase 활성이 확인되었으나 이들 중 한 개의 band가 매우 높은 활성을 나타내 이 효소를 리그닌 유도 peroxidase의 주된 효소로 규정한 결과와 거의 유사한 것으로 생각된다.

## 요 약

Lignocellulose 분해 이용을 위해 토양 등에서 lignin분해 능력이 우수한 세균을 분리 및 동정함으로써 방향족 화합물의 이용을 위한 생물전환의 기초를 확보하고자하였다. 토양 등의 시료로부터 38주의 리그닌 분해 균주를 분리하였다. 분리된 LG2를 공시 균주로 선정하여 형태학적, 배양학적 및 생리학적 특성을 조사한 결과 *Pseudomonas* sp. LG2로 명명하였다. 이 균주는 리그닌을 분해 할 수 있었으며, 리그닌 함유 배지에 배양하여 배양 분해 산물을 HPLC로 분석한 결과 다수의 방향족 화합물을 생산하였다. Polyacrylamide gel 활성 분석에 의해서 3종류로 구성된 peroxidase가 조사되었다.

## 감사의 글

본 연구는 밀양대학교 기성회재원 학술연구지원비에 의해 연구되었습니다.

## 참 고 문 헌

1. Adhi, T. P., R. A. Korus and D. L. Craword. 1989. Production of Major extracellular enzymes during lignocellulose degradation by two streptomycetes in

- agitated submerged culture. *Applied and Environmental Microbiology* **55(5)**, 1165-1168.
2. Ander, P., A. Hataka, and K.K. Erikson. 1980. Degradation of lignin and lignin related substances by *Sporotricum pulventum* (*Phanerochaete chrysosporium*). In: *Lignin biodegradation: Microbiology, chemistry and potential applications*, I. 2-15. Florida CRC Press.
3. Copa-patino, J.L., Y. G. Kim and P. Broda. 1993. production and initial characterisation of the xylan-degrading system of *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Microbiol. Biotechnol* **40**, 69-76.
4. Crampton, E. W and L.A. Maynard. 1981. Estimation of lignin. In: *Laboratory Manual of Nutrition Research*. 105-107. Vikas Publishing House Pvt. Ltd.
5. Donnelly, P. K. and D. L. Craword. 1988. Production by *Streptomyces vidisporus* T7A of an enzyme which cleaves aromatic acids from lignocellulose. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**. 2237-2244
6. Dorrestijn, E., J. J. Lucas and L. Laarhoven. 2000. The occurrence and reactivity of phenoxyl linkages in lignin and low rank coal. *J. Anal. Appl. Pyrolysis.* **54**. 153-192.
7. Fenn, P. and T.K. Kirk. 1984. Effect of C $\alpha$ -oxidation in the fungal metabolism of lignin. *J. Wood. Chem. Technol.* **4**. 131-148
8. Gonzalez, J. M., W. A. Whitman, R. E. Hodson, and M. A. Moran. 1996. Identifying numerically abundant culturable bacteria from complex communities: an example from lignin enrichment culture. *Appl. Environ. Microbiol.* **62(12)**, 4433-4440.
9. Hernandez, C. M. J., M. Hernandez, J. Rodriguez and M. E. Arias 1998. Gas chromatography/mass spectrometry as a suitable alternative technique to evaluate the ability of streptomycetes to degrade lignin from lignocellulosic residues. *Rapid Commun. Mass Spectrum.* **12**, 1774-1748.
10. Hiroshi, M., N. Kunichika, and K. Shinichi. 1995. Isolation of a lignin-decolorizing bacterium. *J. of Fermentation and Bioengineering* **80(3)**, 296-299.
11. Holt, G., N. R. Krieg, P. H. A. Sneath, J. T. Staley and S. T. Williams (ed). 1984. In: Bergy' s manual of systematic bacteriology I. 140-217. Williams and Wilkins Co.
12. Kelly, R. L. 1988. Lignolytic activity of *Phanerochaete chrysosporium* measured as ethylene production from  $\alpha$ -keto- $\gamma$ -methyl thiolbutyric acid. In: *Methods in Enzymology.* **161**, 79-82 Academy press, New York.

13. Lobbes, J. M., H. P. Fitznar, and G. Kattner. 1999. High performance liquid chromatography of lignin-derived phenols in environmental samples with diode array detection. *Anal. Chem.* **71**, 3008-3012.
14. McCarthy, A. J., A. Paterson and P. Broda 1986. Lignin solubilisation by *Thermomonospora mesophlia*. *Appl. Environ. Microbiol.* **24**, 347-352.
15. Monties, B. 1988. Preparation of dioxane lignin fractions by acidolysis In: *Methods in Enzymology.* **161**, 31-35. Academy press, New York.
16. Perestelro, F., M .A. Falcon, Ana Carnicero, Ana Rodriguez and G. de la Fuente. 1994. Limited degradation of industrial, Synthetic and natural lignins by *Serratia marscescens*. *Biotechnology Letters.* **16(3)**, 299-302.
17. Pometto, A. L.,III, and D.L. Craword. 1986. Catabolic fate of *Streptomyces viridosporus* T7A-produced. Acid-precipitable polymeric lignin upon incubation with lignolytic 15. *Streptomyces* species and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **51**, 171-179.
18. Rhamachandra, M., D. L. Craword, and A. L. PumettoIII. 1987. Extracellular enzyme activation during lignocellulose degradation by *Sterptomyces* spp.: a comparative study of wild-type and genetically manipulated strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **53**, 2754-2760.
19. Salunkhe, D. K., J. K Chavan., and S. S. Kadam, 1989. In: Dietary tannin: consequences and remedies. **I**, 84. CRC press.
20. Starr, M. P., Stolp, H., H. G. Truper, A. Balows and H. G. Sclegel. 1981. The Procaryotes. A hand book on habitats, isolation and identification of bacteria. **I**, 719-741, Springer-Verlag.
21. Temp, U., C. Eggert, and K. E. L. Ericsson. 1998. A small-scale method for screening of lignin-degrading microorganims. *Appl. Environ. Microbiol.* **64(4)**, 1548-1549.
22. Tuomela, M., M. Vikman, A. Hatakka and M. Itavaara. 2000. Biodegradation of lignin in a compost environment: a review. *Bioresource Technology* **72**, 169-183.
23. Uma, L. R. Kalaiselvi and G. Subramanian. 1994. Isolation of a lignolytic bacterium for the degradation and possible utilization of coir waste. *Biotechnology Letters* **16(3)**, 303-308.

(Received April 20, 2002; Accepted July 12, 2002)