

RBBR 탈색능을 이용한 목재부후균의 선발 및 이들 균의 Laccase 효소활성*1

최윤정*2 · 신유수*3 · 조남석*4†

Screening of Wood-Rot Fungi Based on RBBR Decolorization and Its Laccase Activity*1

Yun-Jeong Choi*2 · Yoo-Su Shin*3 · Nam-Seok Cho*4†

요약

본 연구는 Remazol Brilliant Blue R (RBBR) 염료의 탈색능을 이용, 리그닌분해능이 강한 백색부후균을 선발하고, 이들 균주들의 리그닌분해효소의 활성에 미치는 inducer, 2,5-xylydine 첨가효과를 검토하였다. 20종의 공시균주 가운데 9종이 RBBR의 탈색, glucose-1 oxidase (GOD), laccase (LAC) 및 Mn-peroxidase (MnP) 등 4가지의 활성을 모두 가지고 있었으며, 비교적 활성이 높은 5종의 균주는 *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor*, *Abortiporus biennis*, *Gleophyllum odoratum* 및 *Cerrena unicolor* 등으로 확인되었다. 이들 균주 가운데 LAC 활성이 매우 높은 *T. versicolor*, *G. odoratum* 및 *C. unicolor*에 대한 최적 생육온도, 최적 pH 및 LAC 활성에 미치는 inducer 첨가효과를 조사한 결과, *T. versicolor*가 28°C에서, *G. odoratum* 및 *C. unicolor*는 25°C에서 가장 좋은 생장을 보였으며, 모든 균주의 배양 최적 pH는 5.5로 나타났다. 공시균주 모두 2,5-xylydine 첨가에 의하여 LAC 활성의 증가를 보였는데, *T. versicolor*는 22,700 nkat/ℓ로 대조구에 대하여 11.3배, *G. odoratum*은 최대 활성이 15,400 nkat/ℓ로 9배, *C. unicolor*는 17,330 nkat/ℓ로 5.5배의 활성증가를 나타냈다.

ABSTRACT

This study was to screen white-rot fungi possessing strong lignin degrading enzymes, glucose-1 oxidase

* 1 접수 2006년 4월 5일, 채택 2006년 5월 17일

* 2 주식회사 엔비타 연구개발실, 경기도 시흥시 정왕동 시화공단 R & D Center, Enbita Co. Ltd., Siwha-Complex, Siheung, Kyonggi-do, Korea

* 3 경기도 수원시 농촌진흥청 작물과학원 인삼약초과 National Institute of Crop Science, RDA, Suwon, Korea

* 4 충북대학교 농업생명환경대학 산림과학·지역건설공학부 School of Forest Resources and Rural Engineering, Chungbuk National University, Cheongju, Korea

† 주저자(corresponding author) : 조남석(e-mail: nscho@chungbuk.ac.kr)

(GOD), laccase (LAC) and Mn-peroxidase (MnP), based on their decolorization activity of Remazol Brilliant Blue R (RBBR). In the midst of 20 tested fungi, 9 isolates were shown 4 kinds of activities such as RBBR decolorization, GOD, LAC and MnP. Relatively high active strains were identified as *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor*, *Abortiporus biennis*, *Gleophyllum odoratum* and *Cerrena unicolor*. In particular, *T. versicolor*, *G. odoratum*, and *C. unicolor*, which have high activities of LAC, were used to confirm the optimal temperature and pH and to evaluate the effect of inducer, 2,5-xylidine on their LAC activity. The optimum temperatures for mycelial growth were 28°C for *T. versicolor* and *G. odoratum*, and 25°C for *C. unicolor*. The optimum pH for mycelial growth was 5.5. Three strains showed the increase of LAC enzyme activity by the addition of 2,5-xylidine. *T. versicolor* had the highest LAC activity of 22,700 nkat/ℓ, corresponding to 113 times, *G. odoratum* 15,400 nkat/ℓ, 9 times and *C. unicolor* 17,330 nkat/ℓ, 55 times higher than those of the control.

Keywords: white-rotting fungi, glucose-1 oxidase, laccase, Mn-peroxidase, decolorization activity, remazol brilliant blue R, inducer, 2,5-xylidine

1. 서 론

제지 산업체에서 야기되는 환경문제는 폐수, 배기 가스, 원료와 폐수처리에서 발생하는 폐기물, 소음 등 여러 가지가 있다. 그 중에서도 펄프 제지산업은 제조 특성상 사용 용수량이 많고(소규모 공장에서 크라프트지 생산을 위해서 40~50 m³/ton이 쓰인다), 폐지를 다량 조달해야 하는 제조업이기 때문에 폐수처리에 큰 관심을 가지고 있다. 1960년대 중반 스웨덴에서는 강과 호수의 BOD (biological oxygen demand: 생물학적 산소 요구량)가 펄프 제지산업에서 전체 BOD의 90%를 차지한다고 보고되었다(Christer, 1989). 이렇게 폐수처리 문제는 중요하여 환경적 측면에서 심한 압력과 규제를 받고 있고 여기에 대한 관심이 모아지고 있다.

전통적인 폐수처리 방법(Grader *et al.*, 1973; Bumpus & Aust, 1987; Esposito *et al.*, 1991; Lee, 1994; Charles *et al.*, 1994)으로서는 SS (suspended solids), BOD, COD (chemical oxygen demand)를 상당한 수준까지 제거하는데 성공하였지만 수중 생태계에 심각한 영향을 주고 있는 폐수의 색에 관련하여서는 30%의 미미한 제거율에 그치고 있다. 즉, 기존의 폐수처리는 제1차 처리 및 제2차 처리 등, 중화, 활성 오니법을 이용한 침전 등의 과정을 거치면서 상당한

BOD 및 COD 제거효과와 높은 SS의 제거율을 나타내고 있다. 살충제 및 방부제 등(Rappe, 1980)으로 사용되는 2,4,6-trichlorophenol, 2,4-dichlorophenol (2,4-D), 제초제(Freiter, 1979)로 많이 사용되고 있는 alachlor, metolachlor, propachlor, 2,4-D, 염색 공단으로부터의 각종 고분자염료(Eaton *et al.*, 1982), 폐수 중에 유입되는 폐놀성 독성 유기화합물(특히 염소화 유기화합물)들은 독성을 가지고 있고, 변이원성(Keith & Telliard, 1979)을 가지고 있다. 나아가서 Zn, Cd와 같은 중금속의 오염은 돌이킬 수 없는 심각한 장해를 일으키는데 주의해야 된다. 국내에서는 폐수중의 폐놀성 오염원(Leonowicz *et al.*, 1999; Cho *et al.*, 1999a; Cho *et al.*, 2001; Rogalski *et al.*, 2002; Cho *et al.*, 2005) 및 독성 제2차 산물, 중금속제거 및 폐수의 탈색에 관한 연구(Cho *et al.*, 1999b; 조남식 등, 1999; Leonowicz *et al.*, 2000; Jarosz-wilkolazka, 2004; Cho *et al.*, 2004) 등이 있다.

본 연구에서는 Remazol Brilliant Blue R (RBBR) 염료의 탈색능에 기초한 리그닌분해균을 선발하고, 이들 균주들이 분비하는 리그닌분해 효소의 활성 변화를 검토하였으며, 이러한 균주의 효소활성에 미치는 inducer의 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시균주의 선발

속리산 및 월악산 지역에서 채집한 부후균 20종을 PDA (Potato-Dextrose-Agar) 배지에서 배양하여 Remazol Brilliant Blue R (RBBR) 염료의 활성을 조사하였다. 검색배지로서는 고체배지로서 SMYA (Sucrose-Malt extracts-Yeast-Agar) 배지를 pH 5.5로 조정하여 사용하였다. 공시균의 배양은 SMYA 사면 배지에서 배양 후 균주의 효소활성과 탈색효과를 측정하기 위해 Linderberg medium (Bollag & Leonowicz, 1984)에 접종하여 사용하였다. 이 배양액 (pH 5.5)을 300 ml의 삼각후라스크에 50 ml씩 분주하고, 접종하였다. 후라스크에는 균사체들의 균질화를 위하여 유리볼을 함께 넣었다. 공시균주의 선발을 위한 효소활성으로서 다음과 같은 활성을 함께 측정하였다.

2.1.1. RBBR 활성

균체배양액에 소정량의 RBBR을 가하고 소정시간 동안 반응시킨 다음, 균체를 제거하고 여액에 대하여 0.2 M Na-succinate buffer (pH 7.0)을 사용, Staszczak *et al.* (1996)의 방법에 따라 RBBR활성을 측정하였다.

2.1.2. Laccase 활성

Laccase 활성은 syringaldazine (4-hydroxy-3,5-dimethoxybenzaldehyde azine)을 기질로 하여 측정하였다. 활성측정은 배양 후 10일이 지난 후 3일마다 0.1 M McIlvane buffer (pH 4.5)를 사용하여, 525 nm에서 60초간 흡광도를 측정하였다. 시료의 흡광도 ($\Delta A: 0.2 \sim 0.4$)가 직선으로 증가하는 구간에서 흡광도 차와 반응시간을 이용하여 laccase (LAC)활성을 식(1)에 의해 구하였다(Leonowicz & Grzywnowicz, 1981).

$$\text{Laccase activity (nkat/}\ell\text{)} = \frac{dA_{525} \times \text{total volume (ml)} \times 10^9}{\epsilon \times dt \times \text{sample volume (ml)}} \quad (1)$$

ϵ : 65,000(molar absorbance coefficient of syringaldazine)

dA : Absorbance at 525 nm

dt : Reaction time (min)

2.1.3. Glucose-1-oxidase (GOD) 활성

GOD 활성은 Pifferi *et al.* (1981)의 방법에 따라 H_2O_2 -titanium 복합체를 형성하는 방법을 이용, 0.1 M citrate phosphate buffer (pH 4.5)를 사용하여 측정하였으며, 몰흡광계수 $744 \ell \text{ mol}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ 를 사용하여 415 nm에서 계산하여 nkat로 표시하였다.

2.1.4. Mn-Peroxidase (MnP) 활성

MnP 활성은 470 nm에서 2,6-dimethoxyphenol (2,6-DMP)의 산화를 측정하는 것으로서 20 mM의 H_2O_2 용액 100 $\mu\ell$ 를 첨가하고 대조구에는 H_2O 100 $\mu\ell$ 를 첨가하며, 50 mM malonate buffer (pH 4.5) 3.9 ml, 5 mM $MnSO_4$ buffer (pH 4.5) 0.5 ml를 혼합하여 1분간 흡광도를 측정하였으며(Lee, 1996; Plaetz *et al.*, 1995) MnP 활성은 식 (2)에 의해 구하였다.

$$\text{Mn-P activity (unit/ml)} = \frac{dA_{470}}{11.6} \times 1000 \frac{1}{5} \times \frac{1000}{100} \quad (2)$$

2.2. 효소의 활성유도

공시균주는 Lindeberg medium에 접종한 후 10일 이후부터 LAC활성을 측정하였다. laccase활성이 점진적인 증가를 보일 때 laccase 효소의 유도제로 알려진 0.2 mM의 2,5-xylydine을 50 $\mu\ell$ 씩 주입하여 효소활성을 경시적으로 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 공시균 선발을 위한 활성측정

본 대학에서 수집 · 배양된 균주들 가운데 비교적

Table 1. Ligninolytic and decolorizing activities of various strains

Strain No.	RBBR nkat/ ℓ	LAC nkat/ ℓ	GOD nkat/ ℓ	MnP unit/ml
FCC*1 (unidentified)	0	0	205	3
FCC-2 (unidentified)	0	0	211	2
FCC-3 (<i>Phlebia radiata</i>)	1106	181	235	8
FCC-4 (unidentified)	705	815	701	3
FCC-5 (unidentified)	0	243	15	0.4
FCC-6 (unidentified)	0	0	16	0
FCC-7 (unidentified)	0	0	23	0.5
FCC-8 (<i>Trametes versicolor</i>)	1091	21030	804	8.2
FCC-9 (unidentified)	0	0	19	0.7
FCC-10 (unidentified)	0	0	15	0.8
FCC-11 (<i>Abortiporus biennis</i>)	1230	2401	350	2
FCC-12 (unidentified)	0	0	13	0.5
FCC-13 (unidentified)	310	247	195	1
FCC-14 (unidentified)	0	0	11	0
FCC-15 (<i>Gleophyllum odoratum</i>)	1109	12101	940	4
FCC-16 (<i>Cerrena unicolor</i>)	1009	65,420	1005	1
FCC-17 (unidentified)	0	0	10	0.2
FCC-18 (unidentified)	624	1316	718	0.5
FCC-19 (unidentified)	985	200	220	0.1
FCC-20 (unidentified)	0	0	23	0.2

* FCC refers to Fungal Collection of Chungbuk National University.

생장이 우수하고, 순수분리가 가능하였던 20종의 균주들을 정리하였으며, 이들 균주에 대하여 Remazol Brilliant Blue R (RBBR)의 탈색활성, glucose-1 oxidase (GOD), laccase (LAC) 및 Mn-peroxidase (MnP)의 활성을 조사하였으며, 그 결과를 Table 1에 요약하였다.

리그닌의 분해에 직접적으로 영향하는 효소로서 lignin peroxidase가 있으나, 본 연구에서는 폐수의 탈색에 주로 기여하는 균주를 선발할 목적과, 그러한 효소 가운데서도 특히 LAC 효소의 영향을 구명하려는 연구목적에 따라 LAC 및 Mn-P의 활성만을 측정하였다. 펄프의 다단 표백단계 사이에 행해지는 세척으로 발생하는 대부분의 폐수는 재사용되지만, 염소화단 후 알칼리 추출에서 발생하는 폐수(E1)는 진한 암갈색을 띠는데, 착색주성분이 미표백펄프에 잔존하던 리그닌이 염소화되어 알칼리추출단계에서 용해되면서 리그닌의 방향핵이 퀴노이드구조로 되면서 발색하여 폐수에 색깔을 부여하게 된다(Eaton *et al.*, 1982; Schoemaker *et al.*, 1991). 따라서 폐수의 탈색처리는 바로 리그닌의 분해를 뜻한다. 한편 GOD 활성이 없는 균주들은 리그닌을 분해하지 못한다는 사실

(Leonowicz *et al.*, 1986; Srinivasan *et al.*, 1995; Leonowicz *et al.*, 1999)이 밝혀지면서 리그닌을 분해시키는 LAC 및 GOD가 긴밀하게 협동하는 연구결과로부터 GOD의 활성도 아울러 조사하였다(Leonowicz *et al.*, 1999).

표에서 알 수 있는 바와 같이 20종의 균주 가운데 약 반에 해당하는 9종의 균주가 대소의 차이는 있지만 4가지의 활성을 모두 가지고 있는 것으로 나타났다. 그리고 이들 가운데 비교적 활성이 높은 FCC-3, FCC-4, FCC-8, FCC-11, FCC-15, FCC-16, FCC-18 및 FCC-19 등에 대한 균주 확인 결과, FCC-3 *Phlebia radiata*, FCC-8 *Trametes versicolor*, FCC-11 *Abortiporus biennis*, FCC-15 *Gleophyllum odoratum*, FCC-16 *Cerrena unicolor* 등으로 밝혀졌으며, 그 나머지는 아직 확인되지 못하였다. 동정이 끝난 균주 가운데 LAC 활성이 매우 높으면서 RBBR 및 GOD 활성이 특히 높은 *T. versicolor*, *G. odoratum* 및 *C. unicolor*를 효소활성 실험에 사용하였다.

3.2. 공시균주의 생육 적정 pH 및 온도

T. versicolor, *G. odoratum*, *C. unicolor* 3가지 공시균주의 적정 성장 온도와 적정 pH 조사를 위하여 pH를 4.0, 4.5, 5.0, 5.5, 6.0으로 조절한 후 7일간 배양한 다음 균사의 성장정도를 측정하여 최적 pH를 구하였다. 온도는 18, 23, 25, 28, 33°C로 조절하여 7일간 배양 후 처리 적정 온도를 구하였다(Choi, 1993).

공시균주 *T. versicolor*, *G. odoratum*, *C. unicolor*의 최적 pH를 조사한 결과, 균사 성장량에서는 pH에 따라 모든 균주가 서로 다른 성장을 보였으며, 모든 균주의 배양 최적 pH는 5.5로 나타났다. *T. versicolor*와 *G. odoratum*은 각각 7.5, 7.3 cm의 균사생장을 보였으며 *C. unicolor*는 다소 생장이 적은 5.8 cm의 균사 성장을 나타냈다. 최적 pH 5.5 조건에서 배양에 적합한 균주의 적정온도를 조사한 결과, *T. versicolor*가 28°C에서 최대 성장을 보였고 *G. odoratum* 및 *C. unicolor*는 25°C에서 가장 좋은 성장을 보였다. 33°C에서는 *T. versicolor*, *G. odoratum*, *C. unicolor* 모두 생장이 억제되었다. 23~28°C의 온도 영역에서 세 균주 모두 균사 생장이 좋은 것으로 나타났다. *T. versicolor*, *G. odoratum*, *C. unicolor*의 최적 성장 pH는 5.5였으며 최적 생육 온도는 25~28°C였다. 이는 Nishida 등(1988a; 1988b)이 백색부후균을 사용하여 수행한 연구에서 리그닌의 분해 및 미표백펄프의 표백능을 가지는 균주로서 판막버섯(*P. chrysosporium*)과 IZU-154를 사용하였는바, 이들 균주들은 리그닌 분해효소를 분비하며, 성장온도가 각각 25~44°C와 25~38°C라고 보고하였고, *T. versicolor*의 경우도 적정 배양온도를 28°C로 고정하고 pH에 따른 균사 성장을 조사한 결과, 최적 pH가 4~6이라고 보고한 결과와 비교(Bollag & Leonowicz, 1984)하였을 때 본 실험에서 사용한 백색부후균의 생육실험 결과와 유사한 경향을 보여주었다.

3.3. 효소의 활성유도

Fig. 1, 2, 3에서 볼 수 있듯이 모든 균주가 inducer 첨가에 의하여 LAC활성의 증가를 보였다. Fig. 1은

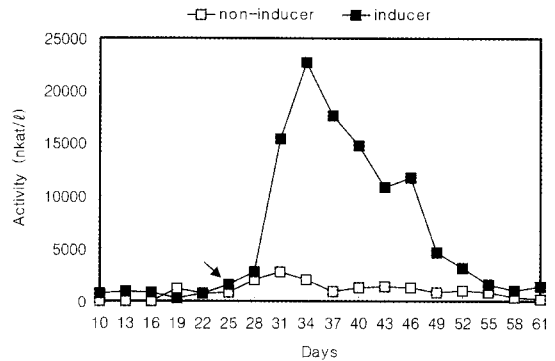


Fig. 1. Changes in laccase activity of *Trametes versicolor* by inducer addition. Arrow refers to the addition of an inducer.

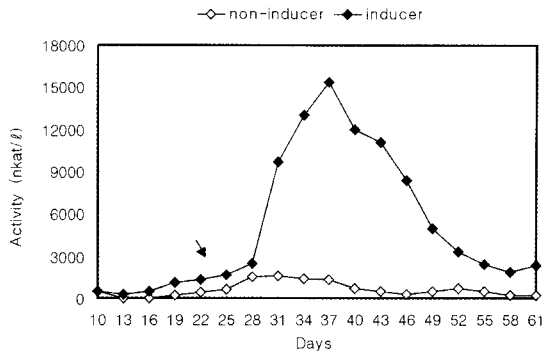


Fig. 2. Changes in laccase activity of *Gleophyllum odoratum* by inducer addition.

inducer 첨가에 의한 *T. versicolor*의 LAC활성의 변화를 나타내었다. 25일째 LAC활성의 증가 추이를 확인한 후 0.2 mM의 2,5-xylydine를 첨가하였으며 28일 이후 inducer 첨가에 의한 LAC 활성 증가를 확인할 수 있었다. 34일째 LAC활성이 최고 22,700 nkat/ℓ 까지 증가하였으며 그 후 점차 감소하여 55일 이후로는 매우 낮은 활성을 보였다.

Inducer를 첨가하지 않은 배양액에서는 LAC활성의 뚜렷한 증가를 확인할 수 없었으며, 2,5-xylydine이 *T. versicolor*의 효소분비 유도에 효과적임을 알 수 있었다. 이는 Leonowicz 등(1984; 1997)의 보고에서도 다른 inducer에 비해 2,5-xylydine의 첨가효과가 가장 높았었으며, 본 실험에서 특히 *T. versicolor* 균주가 2,5-xylydine 첨가에 따른 가장 높은 LAC 활

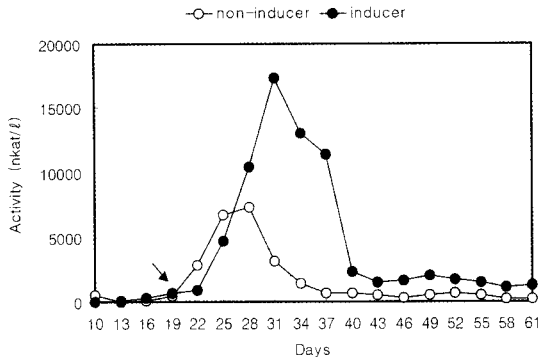


Fig. 3. Changes in laccase activity of *Cerrena unicolor* by inducer addition.

성의 증가를 보였다.

Fig. 2는 inducer 첨가에 따른 *G. odoratum*의 LAC 효소활성 변화를 나타낸 결과로써 배양 22일에 2,5-xylydine을 첨가하였으며 첨가 후 LAC 효소활성이 점차적인 증가를 보여 37일에 최대 활성(15,400 nkat/ℓ)을 보였다. *T. versicolor*는 inducer 첨가 후 9일만에 최대 LAC 활성을 나타낸데 대하여 *G. odoratum*은 inducer 첨가에 의한 최대 활성 증가일 까지 15 일 정도 소요되었다. 최대 활성 이후 완만한 활성의 감소를 보였다.

Fig. 3은 *C. unicolor*의 경우로 19 일째에 2,5-xylydine을 첨가하였으며 2,5-xylydine 첨가 후 12 일 이 되는 배양 31 일째 LAC 활성이 최대에 이르렀다. *C. unicolor*는 2,5-xylydine를 첨가하지 않은 배양액에서도 28 일에 이르러 7,300 nkat/ℓ의 LAC 효소 활성을 보였다. 2,5-xylydine 첨가에 의한 최대 LAC 활성은 17,330 nkat/ℓ로 나타났다. 37 일 이후 LAC 활성이 다른 균과 다르게 10 일 동안 계속적으로 감소하여 40 일부터 낮은 활성을 나타내었다.

4. 결 론

본 연구에서는 Remazol Brilliant Blue R (RBBR) 염료의 탈색능을 이용하여 리그닌분해 활성이 강한 백색부후균을 선발하고, 이들 균주들이 분비하는 리그닌분해 효소의 활성 변화를 검토하였으며, 이러한

균주의 효소활성에 미치는 inducer의 영향을 조사하였다.

공시한 20종의 균주 가운데 9종의 균주가 RBBR의 탈색 활성, glucose-1 oxidase (GOD), laccase (LAC) 및 Mn-peroxidase (MnP) 등 4가지의 활성을 모두 가지고 있는 것으로 나타났다. 그리고 이들 가운데 비교적 활성이 높은 FCC-3, FCC-8, FCC-11, FCC-15, FCC-16 등에 대한 균주 확인 결과, 각각 *Phlebia radiata*, *Trametes versicolor*, *Abortiporus biennis*, *Gleophyllum odoratum* 및 *Cerrena unicolor* 등으로 밝혀졌으며, FCC-4, FCC-18 및 FCC-19는 아직 확인되지 못한 상태이다. 동정이 끝난 균주 가운데 LAC 활성이 매우 높으면서 RBBR 및 GOD 활성이 특히 높은 *T. versicolor*, *G. odoratum* 및 *C. unicolor*를 사용하여 최적온도 및 pH, LAC 활성에 미치는 inducer 첨가효과를 조사한 결과, *T. versicolor*가 28°C에서 최대 성장을 보였고 *G. odoratum* 및 *C. unicolor*는 25°C에서 가장 좋은 성장을 보였으며, 모든 균주의 배양 최적 pH는 5.5로 나타났다. 3가지 공시균주 모두 2,5-xylydine 첨가에 의하여 LAC 활성의 증가를 보였으며 최대 활성 이후 level off에 이르기까지 급격한 감소는 보이지 않았다. *T. versicolor*는 22,700 nkat/ℓ로 대조구에 대하여 11.3배의 활성증가를 보였고, *G. odoratum*은 최대 활성이 15,400 nkat/ℓ로 9배, *C. unicolor*는 3,100 nkat/ℓ에서 17,330 nkat/ℓ로 5.5배의 활성증가를 나타냈다.

참 고 문 헌

1. Bollag, J. M. and A. Leonowicz. 1984. Comparative studies of extracellular fungal laccase, Applied Environ. Microbiol. 48(4): 849~854.
2. Bumpus, J. A. and S. D. Aust. 1987. Biodegradation of environmental pollutions by the white-rot fungus, *Phanerocheate chrysosporium*: Involvement of the lignin degrading system, Bioassays 6: 166~170.
3. Charles, J. J., J. Gloria, and J. P. Michel. 1994. Evidence for a role of manganese peroxidase in the decolorization of kraft pulp bleach plant

- effluent by *Phanerochaete chrysosporium*: Effect of initial culture condition on enzyme production, *J. Biotechnology* 37: 229~234.
4. Cho, Nam-Seok, Hee-Yeon Cho, and H. T. B. Pham. 2005. Degradation of pentachlorophenol by lignin degrading fungi and their laccases. *Mokchae Konghak* 33(5): 76~85.
 5. Cho, Nam-Seok, J. Rogalski, M. Jaszek, J. Luterek, M. W. Wasilewska, E. Malarczyk, M. F. Boots, and A. Leonowicz. 1999a. Effect of coniferyl alcohol addition on removal of chlorophenols from water effluents by fungal laccase, *J. Wood Sci.* 45(2): 174~178.
 6. Cho, Nam-Seok, J. H. Nam, J. M. Park, C. D. Koo, S. S. Lee, N. Nataliya, S. Ohga, and A. Leonowicz. 2001. Transformation of chlorophenols by white-rot fungi and their laccase. *Holzforchung* 55(6): 579~584.
 7. Cho, Nam-Seok, J. M. Park, T. H. Choi, A. Matuszewska, M. Jaszek, K. Grzywnowicz, E. Malarczyk, K. Trojanowski, and A. Leonowicz. 1999b. The effect of wood rotting fungi and laccase on destaining of dyes and KP bleaching effluent. *Mokchae Konghak* 27(4): 72~79.
 8. Cho, Nam-Seok, Tae-Ho Choi, Woon-sup Shin, and A. Leonowicz. 2004. Role of fungal laccase and low molecular mediators on decolorization of aromatic dyes in paper mill effluents. *J. Tianjin Univ. Sci. Technol.* 19 (Supp.2): 148~155.
 9. Choi, D. H. 1993. The Degradation of lignin by laccase from *Pleurotus cornucopia* (Pers. Rolland, Ph.D. Dissertation of Seoul National University.
 10. Christer, J. 1989. Water pollution control in the paper industry based on Swedish experience, *J. TAPPIK* 21(1): 48~51.
 11. Eaton, D., H. M. Chang, T. W. Joyce, T. W. Jeffries, and T. K. Kirk. 1982. Method obtains fungal reduction of the color of extraction-stage kraft bleach effluents, *Tappi* 65(6): 89~92.
 12. Esposito, E., P. C. Vanderlei, and N. Duran. 1991. Screening of lignin degrading fungi for removal of color from kraft mill wastewater with no additional extra carbon-source, *Biotechnol. Lett.* 13: 571~576.
 13. Freiter, E. R. 1979. Chlorophenols, pp.864~872. In: H. F. Mark, D. F. Othmer, C. G. Overberg, and G. T. Seaborg (ed.), *Encyclopedia of Chemical Technology*, 3rd ed., Vol. 5, John Wiley & Sons. Inc., New York.
 14. Grader, R. J., W. D. South, and V. B. Djordje. 1973. The activated sludge process using high-purity oxygen for treating kraft mill wastewater, *Tappi* 56(4): 103~107.
 15. Jarosz-Wilkolazka, A., E. Malarczyk, A. Leonowicz and Nam-Seok Cho. 2004. Effect of cadmium ions on the activity of fungal laccase and its decolorization of dye, RBBR. *Mokchae Konghak* 32(6): 14~22.
 16. Keither, L. H. and W. A. Telliard. 1979. Priority pollutants. I. A perspective view. *Environ. Sci. Technol.* 13: 416~423.
 17. Lee, J. W. 1996. Decolorization of kraft pulp mill effluent using the white-rot fungi. MS Thesis of Chungbuk National University.
 18. Lee, S. H. 1994. Studies on the treatment of kraft bleaching effluents with lignin-degrading fungi, Kyushu University, Ph.D. dissertation.
 19. Leonowicz A., J. Rogalski, M. Jaszek, J. Luterek, M. W. Wasilewska, E. Malarczyk, G. Ginalska, M. Fink-Boots, and Nam-Seok Cho. 1999. Cooperation of fungal laccase and glucose 1-oxidase in transformation of Björkman lignin and some phenolic compounds. *Holzforchung* 53: 376~380.
 20. Leonowicz, A. and K. Grzywnowicz. 1981. Quantitative estimation laccase forms in some white-rot fungi using syringaldazine as a substrate, *Enzyme Microbiol. Technol.* 3(1): 55~58.
 21. Leonowicz, A., R. V. Edgehill, and J. M. Bollag. 1984. The effect of pH on the transformation of syringic vanillic acids by the laccase of *Rhizoctonia praticolar* and *Trametes versicolor*, *Arch Microb.* 137: 89~96.
 22. Leonowicz, A., J. Rogalski, E. Malarczyk, K. Grzywnowicz, G. Ginalska, J. Lobarzewski, S. Ohga, N. Pashenova, S. S. Lee, and Nam-Seok Cho. 2000. Demethoxylation of milled wood lignin and lignin related compounds by laccase from white-rot fungus, *Cerrena unicolor*. *Mokchae Konghak* 28(4): 29~40.

23. Leonowicz, A., J. Rogalski, J. Szczodrak, and J. Fiedurek. 1986. The possible key role of glucose oxidase in transformation of lignocellulose. Proc. 3rd International Conference of Biotechnology in Pulp and Paper Industry. Stockholm, Sweden. June 16~19, pp.160~162.
24. Leonowicz, A., L. Gianfreda, M. W. Wasilewska, J. Rogalski, J. Luterek, E. Malarczyk, A. Dawidowicz, M. Fink-Boots, G. Ginalska, M. Staszczak, and Nam-Seok Cho. 1997. Appearance of laccase in wood-rotting fungi and its inducibility. *Mokchae Konghak* 25(3): 29~36.
25. Nishida, T., Y. Kashino, A. Mimura, and Y. Takahara, 1988a. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi I. Screening of lignin-degrading fungi, *Mokuzai Gakkaishi* 34(6): 530~536.
26. Nishida T., Y. Kashino, A. Mimura, and Y. Takahara. 1988b. Lignin biodegradation by wood-rotting fungi II. Degradation of phenolic and non-phenolic, β -0-4 lignin substructure compounds by fungus IZU-154, *Mokuzai Gakkaishi* 35(2): 144~151.
27. Pifferi, P. G., G. Lanzarini, and M. Biancani. 1981. Glucose oxidase determination by means of the formation of the hydrogen peroxide-titanium complex. *Anal. Chim.* 18: 729~734.
28. Plaez, F., M. J. Martinez, and A. T. Martines, 1995. Screening of 68 species of basidiomycetes for enzymes involved in lignin degradation, *Mycol. Res.* 99(1): 37~42.
29. Rappe, C. 1980. Chloroaromatic compounds containing oxygen: phenols, diphenylethers, dibenzo-*p*-dioxins and dibenzofurans, pp. 157~179. In: Hutzinger (ed.), *The Handbook of Environmental Chemistry*, Springer-Verlag K.G, Berlin.
30. Rogalski, J., Nam-Seok Cho, J. Zadora, M. Prendecka, A. Choma, T. Urbanik-Sypniewska, and A. Leonowicz. 2002. Influence of aromatic compounds on biodegradation of 14 C-labeled xylan and mannan by the white-rot fungus, *Phlebia radiata*. *J. Industrial Microbiol. Biotechnol.* 28: 168~172.
31. Schoemaker, H. E., U. Tuor, A. Muheim, H. W. H. Schmidt, and M. S. A. Leisola. 1991. White-rot degradation of lignin and xenobiotics in biodegradation : Natural and Synthetic Materials (ed. Betts, W.B), Springer-Verlag, London, 157~174.
32. Srinivasan, C. D., T. M. Souza, K. Boominathan, and C. A. Reddy. 1995. Demonstration of laccase in the white-rot Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium* BKM-F1767. *Appl. Environ. Microbiol.* 61: 4274~4277.
33. Staszczak, M., G. Nowak, K. Grzywnowicz, and A. Leonowicz. 1996. Proteolytic activities in cultures of selected white-rot fungi. *J. Basic Microbiol.* 36: 193~ 203.
34. 조남석, 이재원, 박종문, 최태호, 안드레레오노비치. 1999. 백색부후균에 의한 크라프트 펄프 표백폐수의 탈색. *펄프종이기술* 31(4): 58~68.