

발색법에 의한 Peroxidase의 신속한 스크리닝법과 2, 4-DCP 분해균주의 스크리닝

¹류 강 · † ²이 은 규

¹크레아젠 주식회사 단백질공학팀, ²한양대학교 공학대학 화학공학과
(접수 : 2008. 10. 9., 게재승인 : 2008. 12. 1.)

Rapid Screening Method of Peroxidase by Colorimetric Assay and Screening of 2, 4-DCP Degradable Strains

Kang Ryu¹ and Eun Kyu Lee^{2†}

¹Creagene Inc., Division of Protein Engineering, Sungnam, South, Korea
²Department of Chemical Engineering, Hanyang University, Ansan, Korea

(Received : 2008. 10. 9., Accepted : 2008. 12. 1.)

Chlorinated phenols are widely used by the chemical industry as intermediate products in synthesis and previously were frequently applied to various industry fields. Peroxidases catalyze the peroxide-dependent oxidation of a range of inorganic and organic compounds. Peroxidase was shown to mineralize a variety of recalcitrant aromatic compounds and to oxidize a number of polycyclic aromatic and phenolic compounds. Among monomeric phenolic and nonphenolic compounds, peroxidase is known to oxidize its compounds. In this study, a colorimetric assay was developed to quantitatively evaluate the peroxidase activity for rapid screening. Color products of different intensity were developed proportionally to the peroxidase activity on agar plate and 96-well plate. This method correlates well with the RP-HPLC result. Using this screening method, 12 colonies of strain was screened which survived at high concentration of 2,4-DCP (1000 ppm) and with peroxidase activity for the 7th round screening step on agar plate. These strains were utilized 2,4-DCP as a sole carbon source and produced peroxidase. After the screening test, four of the bacteria have significant better effect of COD removal on dye waste-water. COD removal of these was from 44% to 61%, respectively.

Key Words : Chlorinated phenols, peroxidase, colorimetric assay, rapid screening, 2,4-DCP degradation strain

서 론

화학공업의 발전에 의해 많은 유기화합물이 합성되어 사용되고 있으며, 이 중 자연환경에서 잘 분해되지 않고 활성슬러지 등 생물학적 처리과정 중에서도 분해되기 어려운 난분해성 유기물이 증가하고 있다. 이들 난분해성 유기물들은 자연계로 방출되면 생물 농축까지 일으킬 수 있는 물질까지 있으나, 기존 활성슬러지법을 기본으로 하는 기존 하수처리장에서는 처리하기가 쉽지 않다. 재래식 생물학적 처리공정이나 자연환경에서 미생물에 의한 분해가 잘되지 않는 물질을 난분해성 유기물이라고 정의하며,

이들은 방향족 벤젠고리 화합물과 할로젠화 유기화합물이 대표적이다. 미생물에 의한 환경오염물질의 생물전환 (biotransformation) 은 오염물질의 농도가 근본적으로 감소하며, 일반적으로 분해 산물의 독성이 감소한다는 점에서 환경학적으로 건전하고, 소각과 같은 물리·화학적 처리보다 경제적으로 유리하다. 다만, 제거 효율 (removal efficiency)은 물리·화학적 처리에 미치지 못하는 경우가 종종 있다. 난분해성 물질 중의 하나인 염소화 페놀은 중간 생성물을 합성하는 화학산업과 그 이전에 여러 산업분야에 적용되어 자주 사용되고 있다(1, 2). 그들은 높은 독성을 가지고 있어 자연조건에서 분해되는 것이 어렵고, 환경오염 물질로서 심각한 생태학적 문제를 야기한다(3, 4). 다중 염소화 페놀을 완벽하게 분해하여 제거할 수 있는 여러 종의 세균류가 자연계로부터 스크리닝되었고(5) 난분해성 물질인 2,4-DCP의 분해능을 가지는 균주들의 스크리닝이 근래에 여러 차례 보고되었다(6, 7, 8). 하지만 국내에서는 이처럼 난분해성 물질의

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Hanyang University, Ansan, Korea
Tel : +82-31-400-5275, Fax : +82-31-478-3779
E-mail : ekleek@hanyang.ac.kr

분해에 관련된 균주의 스크리닝 연구와 산업적 개발이 미진한 상태이다. 미생물의 다양한 물질변환능력을 이용한 생물학적 처리방법은 물리·화학적 처리방법에 비하여 환경친화적 특징이 있어 향후 기술개발이 기대된다. Peroxidase는 유기화합물과 무기화합물의 여러 범위에서 과산화물 의존성 산화작용을 촉매한다. Peroxidase는 여러 종류의 난분해성 방향족 화합물을 분해하고, 다중성 방향족 화합물과 페놀 화합물의 대다수를 산화시키는 것으로 보고되어왔다. 아울러 peroxidase는 단량체의 페놀 화합물과 비페놀 화합물을 산화시키는 것으로 알려져 있다. 그리고 peroxidase들은 세포내 생체 기작과 과정에서 중요한 역할을 하는 세포내 효소중의 하나이다[9]. 또한 페놀 또는 방향성 amine 등을 포함하여 여러가지 물질의 단일 전자의 산화를 가져와서 H₂O₂의 존재하에 활성화 산소의 전이를 촉매한다[10, 11]. Peroxidase는 진단분야에서 과산화수소에 의해 매개되는 색상 형성작용을 이용하여 광범위하게 사용되고 있다[12, 13, 14]. 환경 미생물로부터 스크리닝의 주된 문제중의 하나는 짧은 시간에 많은 균주를 테스트하여 스크리닝하는 것의 어려움이다. 이 문제를 극복하는 목적으로, 빠르고 효율적인 선택 또는 스크리닝 전략은 설계되어야 하고 건설되어야 한다[15]. 그러므로 발색법에 의한 스크리닝 전략은 발색성의 기질에 대한 생체물질의 반응에 기초를 두어 colony 표현형이 쉽게 관찰되어야 한다[16]. 이러한 목적을 위하여 보다 빠르게 적합한 배지 위에서 쉽게 페놀화합물을 분해할 수 있는 스크리닝법이 필요하다. 따라서 본 연구에서는 peroxidase 활성과 페놀 화합물 분해 균주를 선별하여 스크리닝할 수 있는 신속한 발색법의 개발을 목적으로 하였다.

재료 및 방법

재료

2,4-dichlorophenol, 4-antiaminopyrine, horseradish peroxidase, soybean peroxidase, 과산화수소는 시그마에서 구입하였다. 모든 화학제품은 순수한 등급의 시약을 사용하였다.

선별배지

2,4-DCP 분해 활성의 스크리닝을 위해서 두가지 형태의 스크리닝 배지를 사용하였다. 1차 스크리닝 배지는 glucose (2 g/L), 2,4-DCP (20 ppm), K₂HPO₄ (10.5 g/L), KH₂PO₄ (4.5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (1 g/L), 그리고 citric acid (0.5 g/L)가 포함되어 있는 최소배지로 25℃에서 150 rpm으로 진탕 배양하였다. 2차 스크리닝 배지에는 glucose를 제외하고 2,4-DCP (50 ppm), K₂HPO₄ (10.5 g/L), KH₂PO₄ (4.5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (1 g/L) 그리고 citric acid (0.5 g/L)가 포함되어 있었다. 3번째부터 7번째까지의 스크리닝 배지는 유일 탄소원으로 2,4-DCP를 사용하였고 농도를 증가 (100-1000 ppm) 하면서 스크리닝하였다.

발색법에 의한 peroxidase 활성을 위한 신속한 스크리닝법 개발

2,4-DCP 분해능을 갖는 균주를 스크리닝하기 위한 발색법은 이미 보고된 Ryu와 Lee의 실험방법을 변형하여 실시하였으며 한천 배지와 96-well plate에서 수행하였다[17]. 처음에, 2,4-DCP

100 ppm, 4-antiaminopyrine 200 μM이 포함된 한천 배지위에 soybean 또는 여러 농도의 horseradish peroxidases를 다양한 농도를 점적하고 25℃에서 H₂O₂증기에 노출시켰다. 한천 배지와 96-well plate에서 peroxidase의 유무에 따라 색상이 검출되고 활성화에 비례하여 색상의 감도가 증가하는 것을 확인하였다. 수용액상에서의 활성을 스크리닝하는 방법을 개발하기 위하여 790 μL sodium phosphate buffer (pH 4.2)에 100 μL 2,4-DCP (500 ppm) 그리고 다양한 농도의 peroxidase 용액 100 μL를 혼합한 후 발색 반응은 3% 과산화수소 (w/w) 10 μL의 첨가에 의해서 개시하였다. 흡광도 스펙트럼은 UV spectrometer (Ultrospec 2000, Pharmacia Biotech., Uppsala, Sweden)로 상온에서 0.5 nm scan width와 20 nm/s의 scan 속도로 측정하였다.

2,4-DCP 분해능을 갖는 균주의 스크리닝

시료는 수원 폐수종합처리장에서 채취하여 사용하였다. 첫째로, 슬러지는 potassium phosphate 완충용액으로 (pH 7.4) 1차 세척을 하고 마이크로필터 (pore size 5 μm)로 여과하였다. 여과된 미생물은 4℃에서 9000 X g로 10분 동안 원심분리하였다. 원심분리된 침전물은 다시 한번 potassium phosphate 완충용액 (pH 6)으로 세척하였고, 4℃에서 9000 X g로 10분 동안 원심분리 하였다. 세포 침전물은 potassium phosphate 완충용액으로 (pH 7.4)로 현탁을 하였고 세척, 재현탁을 3회 반복하였다. 재현탁된 용액은 1차 분리배지 glucose (2 g/L)와 2,4-DCP (20 ppm)와 함께 한천 배지에 도말하였다. 그리고 도말된 플레이트는 25℃에서 3일간 배양하였다. Colony를 형성한 균주들을 2차 스크리닝 배지에 옮기고 25℃에서 2일간 배양되었다. 이 단계에서의 균주들은 탄소원으로 2,4-DCP를 이용한다. 살아남은 균주들은 다음 단계의 고농도 2,4-DCP 스크리닝 배지로 옮겨지고 발색법에 의한 peroxidase 활성 분석 평가는 최종 2,4-DCP (1000 ppm) 스크리닝 단계에서 실시하였다. 스크리닝된 2,4-DCP 분해균주는 2,4-DCP (400 ppm)와 20% glycerol이 함유된 배지에 현탁하고 -80℃에 보관하며 실험에 사용하였다.

스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주의 분해능 분석

스크리닝된 균주의 2,4-DCP 분해 활성은 C₁₈RP-HPLC에 의해 측정되었다. 반응 혼합액은 sodium phosphate 완충용액 (pH 4.2) 790 μL, 2,4-DCP (500 ppm) 100 μL과 스크리닝된 2,4-DCP 분해균주 배양액 100 μL를 혼합한 후 3% (w/w) H₂O₂ 10 μL를 투입함으로써 반응을 개시하였다. 1시간 동안 반응을 시킨 후 잔존 2,4-DCP의 농도와 선별된 2,4-DCP 분해 균주의 활성은 C₁₈RP-HPLC를 이용하여 280 nm에서 분광 측정법으로 분석하였다. 유동상은 80%의 메탄올 용액을 사용하였으며 1 mL/min의 유속으로 15분 동안 분석하였다.

스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주를 이용한 염색 폐수의 분해

스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주는 2,4-DCP가 없는 LB 배지에서 25℃, 18시간 동안 전배양하여 사용하였다. 2,4-DCP에 의한 분해효소 유도를 실험하기 위해, 2종류의 비교 실험을 실시하였다. 첫째로, K₂HPO₄ (10.5 g/L), KH₂PO₄ (4.5 g/L), (NH₄)₂SO₄ (1 g/L) 그리고 citric acid (0.5 g/L)가 포함되어 있는 최소 배지에서 유일 탄소원으로 2,4-DCP와 함께 25℃에서 18시간 동안 배양하였다. 두 번째로, 상기의 최소배지에서 동일

한 조건으로 배양하고 4°C에서 9000 X g로 10분 동안 원심분리하여 균주를 회수하여 LB 배지에서 다시 한번 30°C에서 18시간 동안 배양하여 양쪽 실험의 결과를 비교하였다. 스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주에 의한 염색폐수의 COD 분해능을 실험하기 위하여 500 mL 플라스크에 각각의 50 ml 배양액과 100 ml의 염색폐수와 H₂O₂를 10 ppm으로 첨가하였다. 혼합 배양액을 25°C, 150 rpm으로 4시간 동안 교반하여 COD 분해능을 측정하였다. 시료는 COD 표준 분석법에 따라서 분석하였다[18]. 염색폐수의 초기 COD 값은 945.5 ppm이었으며 염색폐수는 반일 염색공단의 폐수를 직접 사용하였다.

결과 및 고찰

한천배지에서 발색법에 의한 2,4-DCP 분해 균주의 고속 스크리닝

시료는 수인 폐수종합처리장에서 채취하여 사용하였다. 분리된 재현탁용액은 포도당 (2 g/L)과 2,4-DCP (20 ppm)가 포함된 1차 분리동정용 배지에 도말하였고 25°C에서 3일간 배양하였다. 1차 스크리닝이 진행되는 동안, 2010개의 선별된 균주들을 스크리닝하였다(Fig. 1, Table 1). 스크리닝된 균주들을 탄소원으로 50 ppm의 2,4-DCP가 포함된 2차 스크리닝 배지에서 25°C, 2일간 배양하였다. 2차 스크리닝 결과로 1050 균주들이 스크리닝 되었고 이 단계부터의 균주들은 탄소원으로서 2,4-DCP만을 이용한다. 탄소원으로 100 ppm의 2,4-DCP만을 포함하는 3차 스크리닝에서 선별된 균주들은 962개 였으며 최종 스크리닝에서 1000 ppm의 2,4-DCP를 단일탄소원으로 사용하였다. 최종적으로 탄소원으로서 2,4-DCP를 대사하는 균주는 84개였다. 그리고 최종 활성 스크리닝은 한천배지에서 발색법 (colorimetric assay)을 이용하여 peroxidase 활성을 가지는 균주를 선별하였다. 결과적으로 peroxidase에 대한 고효성을 가지는 균주는 12개가 스크리닝되었다. 선별된 균주들은 고체배지상 발색법 (agar plate colorimetric assay)에서 진한 적색을 띠는 peroxidase 활성을 가지는 균주들이다(Fig. 1).

Table 1. Isolation of strains in 2,4-DCP media

Screening round	1 st	2 nd	3 rd	4 th	5 th	6 th	7 th
Glucose (g/L)	2	0	0	0	0	0	0
2,4-DCP (ppm)	20	50	100	200	500	800	1000
No. of colonies	2010	1050	962	303	109	84	12

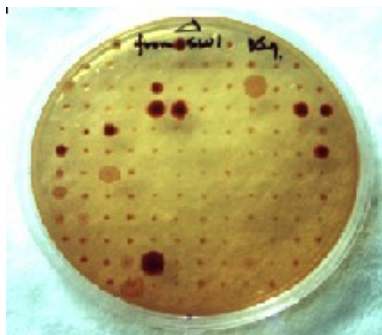
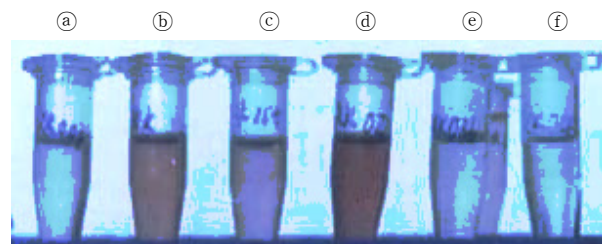


Figure 1. Peroxidase activity determination of isolated strains on agar plate medium using colorimetric detection method.

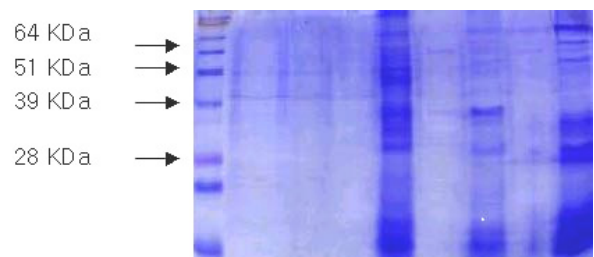
선별된 2,4-DCP 분해 균주의 Peroxidase 생산

스크리닝된 균주의 세포 배양액은 peroxidase 발현을 확인하기 위해 발색법에 의한 분석과 SDS-PAGE 분석을 실시하였다. 결과적으로, 탄소원으로 사용된 1000 ppm의 2,4-DCP에서 스크리닝된 12개의 균주는 액체상 발색법에 의해 peroxidase의 활성에 대한 스크리닝을 실시 하였으며 그 중 8개의 균주는 강한 peroxidase 활성이 보여졌지만 4개의 균주는 보여지지 않았다(Fig. 2). peroxidase 활성을 가지는 선별된 8개의 균주들은 SDS-PAGE에 의해 peroxidase 생산을 분석하였다. SDS-PAGE 상에서 스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주들은 horseradish peroxidase와 유사한 위치에서 단백질이 과발현됨을 확인하였다(Fig. 3). 배양액을 원심분리 후 상층액은 낮은 활성의 peroxidase를 가지고 있었지만, 균주세포체는 비교적 높은 수준의 peroxidase 활성을 보였다. 스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주의 과발현된 단백질 분자량은 야생형의 Lignin Peroxidase 분자량인 약 40 kDa보다 작은 약 38 kDa로 예상된다. 이것은 prokaryotes와 eukaryotes 사이의 transcriptional modification의 차이를 보여주는 것으로 사료된다. 이 결과는 물론 각각 다른 종의 peroxidase가 약간의 분자량 차이가 있지만 Lignin Peroxidase는 곰팡이 유래의 peroxidase로 transcriptional modification에 따른 당쇄의 증가가 일어나 분자량이 증가되지만 선별된 균주는 세균류로 이러한 당쇄의 형성이 일어나지 않아서 분자량의 차이가 있는 것으로 보인다.



a - f : strain number (RK008, 012, 009, 022, 036, 049)

Figure 2. Peroxidase activity determination of isolated strains in liquid medium using colorimetric detection method.



Lane 1: size marker (seeblueplus, Novex, Co.),
 Lane 2, 3: Lignin peroxidase,
 Lane 4: supernatant of isolated strain RK012,
 Lane 5: whole cell protein in isolated strain RK012,
 Lane 6: supernatant of isolated strain RK009,
 Lane 7: whole cell protein in isolated strain RK009,
 Lane 8: supernatant of isolated strain RK022,
 Lane 9: whole cell protein in isolated strain RK022.

Figure 3. SDS-PAGE of protein produced by isolated strains.

스크리닝된 균주의 성장과 2,4-DCP 분해능

스크리닝된 균주를 27시간동안 배양하면서 600 nm에서 OD값

에 의해 성장곡선을 측정하였고 배양시작 후 24시간에 2,4-DCP 분해 활성을 RP-HPLC에 의해 검출하였다. 스크리닝배지에서 균주의 성장은 3가지의 형태군을 보였다. 성장이 빠른 균주 (RK009, 012, 022)와 성장이 거의 없는 경우 (RK008, 023, 041, 045), 그리고 20시간 이후에 성장이 미약하게 시작되는 균주 (RK020)의 3가지의 형태군을 보였다(Fig. 4, Table 2). 스크리닝 배지에서 균주의 성장이 활발한 균주의 2,4-DCP 분해 활성은 성장이 느린 균주에 비해 더 높은 활성을 보여주었다. 이 결과는 스크리닝된 균주의 성장 속도가 2,4-DCP 분해 활성과 연관 관계가 있다는 것을 보여준다. 이는 최종 스크리닝 단계에서 고농도 (1000 ppm)의 2,4-DCP를 유일 탄소원으로 사용하였기 때문에 스크리닝된 균주 중 성장이 빠른 균주 (RK009, 012, 022) 들은 탄소원으로서 2,4-DCP를 분해하여 세포 성장에 관련된 대사에 이용할 수 있기 때문이라고 판단된다. 스크리닝된 균주들의 2,4-DCP 분해 비율은 61%에서 93%이었으며 성장이 빠른 균주들은 81%에서 93% (RK009=81%, RK012=89%, RK022=93%) 였다. 스크리닝된 균주의 2,4-DCP 분해능은 Kirk등의 연구 결과 보다 1.2-1.5배 높았다[19]. 아울러 2,4-DCP의 분해능은 높았지만 성장이 빠른 균주 (RK009, 012, 022)보다는 성장이 더딘 RK020의 경우는 탄소원으로서 2,4-DCP를 분해하여 세포 성장에 관련된 대사에 이용하지 못하는 것으로 생각된다.

Table 2. Degradation rate of 2,4-DCP by screened strains

No. of strains	The degradation rate of 2,4-DCP (%) ^a by cultured broth in 2,4 DCP medium for 24 hours
RK008	72
RK009	81
RK012	89
RK020	84
RK022	93
RK023	63
RK041	65
RK045	61

2,4-DCP degradation activities of screened strains were measured by C18 RP-HPLC. The initial concentration of 2,4-DCP was 500 ppm.

$$a; \frac{(\text{Initial concentration of 2,4-DCP}) - (\text{residual concentration of 2,4-DCP})}{\text{Initial concentration of 2,4-DCP}} \times 100$$

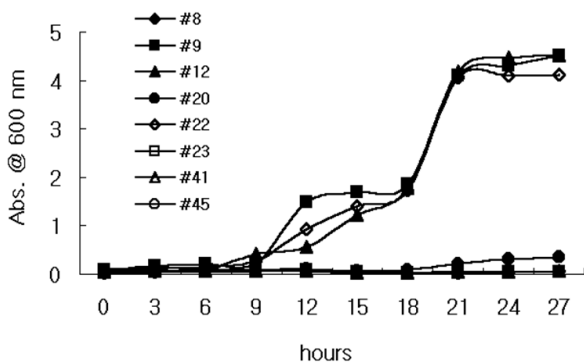


Figure 4. The growth curves of screened strains.

스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주에 의한 염색폐수의 분해
스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주를 직접 폐수처리에 응용이

가능한 지를 알아보기 위해 4개의 균주 (RK008, RK009, RK012, RK041)를 선택하여 2,4-DCP가 없는 LB 배지에서 30℃, 18시간 배양 후에 이용하였다. 2,4-DCP에 의한 분해효소의 유도 효과를 실험하기 위해 2 종류의 비교 실험을 실시하였다. 첫 번째로 최소 배지에서 유일 탄소원으로 2,4-DCP와 함께 30℃에서 18시간 동안 배양하였다. 두 번째로, 상기의 최소배지에서 동일한 조건으로 배양하고 4℃에서 9000 X g로 10분 동안 원심 분리하고 균주를 회수하여 LB 배지에서 다시 한번 30℃에서 18시간 동안 배양하여 양쪽 실험의 결과를 비교하였다. 스크리닝된 2,4-DCP 분해 균주에 의한 염색폐수의 COD 분해능을 실험하기 위하여 500 mL 플라스크에 각각의 50 ml 배양액과 100 ml의 염색폐수와 H₂O₂를 10 ppm으로 첨가하였다. 혼합 배양액을 25℃, 150 rpm으로 2시간과 4시간 동안 교반하여 COD 분해능을 측정하였다. 샘플은 Mn법에 의해 COD 측정을 하였다. 염색폐수의 COD 제거 효율은 LB 배지에서 배양된 배양액에 의해 43.7% 에서 50.7% 그리고 2,4-DCP 배지에서 배양액에 의해 40.8%에서 60.5%였다(Table 3).

Table 3. The removal of dye wastewater's COD by screened strains

No. of strains	The removal of dye wastewater's COD (%)	
	Culture broth in LB medium	Culture broth in 2,4 DCP medium
RK008	50.7	52.9
RK009	43.7	57.0
RK012	50.7	48.8
RK041	43.7	60.5

(The reaction conditions are dye waste water 100 ml, sample broth 50 ml and H₂O₂ 10 ppm for 4 hours at room temperature. The Initial COD of dye waste water was 945.45 ppm)

요약

본 연구에서는 peroxidase 활성의 신속한 스크리닝을 위해 peroxidase의 활성을 정량적으로 평가할 수 있는 분석으로 agar plate와 96-well plate에서 peroxidase의 활성에 비례하여 색상감도를 측정할 수 있는 colorimetric 분석법을 개발하였다. 이 방법은 RP-HPLC 결과와 매우 비례적으로 상관적인 결과를 보였다. 이 colorimetric 분석법을 사용하여, 폐수에서 한천 고체배지에서 7회에 걸친 스크리닝으로 높은 농도의 2,4-DCP (1000 ppm)에서 생존하는 균주를 스크리닝하였고 선별된 이들 균주들은 탄소원으로 2,4-DCP 만을 대사할 수 있으며 높은 peroxidase 생산량을 보였다. 분리된 균주들 중 높은 peroxidase 활성을 가지는 2,4-DCP 분해 균주를 분리하였고 최종 분리된 균주는 염색폐수의 COD를 4시간 동안 44%에서 61%까지 제거하였다. 상기의 결과에 의해 본 연구에서 개발된 발색법이 폐놀화합물 분해 균주 스크리닝법이 빠르고 쉬운 난분해성 물질인 폐놀 혼합물의 분해 균주 탐색에 대하여 성공적으로 적용될 수 있기를 기대한다.

REFERENCES

1. J. Balfanz and H. J. Rehm (1991), Biodegradation of 4-chlorophenol

- by adsorptive immobilized *Alcaligenes* sp.A-72 in soil, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **35**, 662-668.
- M. M. Häggblom and R. J. Valo (1995), Bioremediation of chlorophenol wastes, in : L. Y. Young, and C. E. Cerniglia (Eds.), *Microbial transformation and degradation of toxic organic chemicals*. Wiley-Liss Inc., NewYork, pp389-434.
 - M. Salkinoja-Salonen, P. Middeldorp, M. Briglia, R. Valo, M. Häggblom, and A. McBain (1989), Cleanup of old industrial sites, in : D. Kamely, A. Chakrabarty, and G. S. Omenn (Eds.), *Biotechnology and bio-degradation*. Portfolio Publishing Company, The Woodlands, Texas, pp347-365.
 - H. A. Sharma, J. T. Barber, H. E. Ensley, and M. A. Polito (1997), A comparison of the toxicity and metabolism of phenol and chlorinated phenols by *Lemnagibba*, with special reference to 2,4,5-trichlorophenol, *Environ. Toxicol. Chem.* **16**, 346-350.
 - C. A. Bellin, G. A. O'Connor, and Y. Jin (1990), Sorption and degradation of penta-chlorophenol in sludge-amended soils, *J. Environ. Qual.* **19**, 603-608.
 - R. H. Don and J. M. Pemberton, (1981) Properties of six pesticide degradation plasmids isolated from *Alcaligene sparadoxus* and *Alcaligenes eutrophus*, *J. Bacteriol.* **145**, 681-686.
 - B. Gonzalez, P. Clement, R. Cespedes, J. Valenzuela, V. Matus, A. Maturana, and N. Ehrenfeld (1996), Degradation of environmental pollutants by *Alcaligenes eutrophus* JMP 134 (pJP4). *Environ. Toxicol. Water Qual.* **11**, 205-211.
 - L. Xun (1996), Purification and characterization of chlorophenol 4-monooxygenase from *Burkholderia cepacia* AC1100, *J. Bacteriol.* **178**, 2645-2649.
 - J. Everse, K. E. Everse, and M. B. Grisham (1990), Peroxidases in chemistry and biology, **vol.1**.CRC Press, Boca Raton, Fla.
 - R. J. Lewis Sr. (1993), *Hawley's Condensed Chemical Dictionary*, **12th ed.**, Van Nostr and Reinhold Co., NewYork, U.S.A., p888.
 - J. M. Orten and O. W. Neuhaus (1970), *Biochemistry*, 8th ed., The C.V. Mosby Co., U.S.A., pp250-251.
 - J. E. Frew, P. Jones, and G. Scholes (1983), Spectrophotometric determination of hydrogen peroxide and organic hydroperoxides at low concentrations in aqueous solution, *Anal. Chim. Acta*, **155**, 139-150.
 - D. Arseguel and M. Baboulene (1994), Removal of phenol from coupling of talc and peroxidase. application for depollution of waste water containing phenolic compounds, *J. Chem. Tech. Biotech.*, **61**, 331-335.
 - P. R. Adler, R. Arora, A. E. Ghaouth, D. M. Glenn, and J. M. Solar, (1994), Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidases, *J. Environ. Qual.* **23**, 1113-1117.
 - S. Harayama (1998), Artificial evolution by DNA shuffling, *Trends Biotech.* **16**, 76-82.
 - J. H. Zhang, G. Dawes, and W. P. Stemmer (1997), Directed evolution of a fucosidase from a galactosidase by DNA shuffling and screening, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 4504-4509.
 - K. Ryu and E. K. Lee (2002), Rapid colorimetric assay and yeast surface display for screening of highly functional fungal lignin peroxidase, *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **35**(6), 527-532.
 - APHA (1998) *Standard Methods for Examination of Water and Waste Water*, 20th ed. American Public Health Association, Washington D.C., USA.
 - T. K. Kirk (1984), Degradation of Lignin, in: D. T. Gibson (Eds), *Biochemistry of Microbial Degradation*, Marcel Dekker. New York, pp399-437.