

송곳니구름버섯(*Irpex zonatus*) BN2에 의한 아조계, 트리페닐메탄계 및 헤테로사이클릭계 염료의 탈색

윤경하* · 최양순

*순천향대학교 생명과학부, 서강전문대학 임상병리과

Decolorization of Azo, Triphenylmethane and Heterocyclic Dyes by *Irpex zonatus* BN2

Kyung-Ha Yoon* and Yang-Soon Choi

*Division of Life Science, Soonchunhyang University, A-san, Chungnam 336-745
Department of Clinical Pathology, Seo-Kang Junior College, Kwangju 500-742, Korea

ABSTRACT: The present research was undertaken to investigate the activity of ligninolytic enzymes and the decolorization capability of some dyes with *Irpex zonatus* BN2, isolated from nature and identified. For the assay of enzyme activities, the isolate did not produce lignin peroxidase (LiP) and veratryl alcohol oxidase (VAO), but laccase and manganese dependent peroxidase (MnP). While the activity for MnP was low (61.6 nmol/mg · protein), its laccase activity was very high (1185.9 nmol/mg · protein). Moreover, laccase had appeared earlier than MnP. When the isolate was incubated with each dye for 10 days, the decolorization rates of azo dyes, such as orange II, orange G, tropaeolin O and congo red were 98.0%, 97.4%, 99.0% and 95.3%, respectively. In case of heterocyclic dyes, eosin Y, toluidine blue, methyl blue and azur B were 97.4%, 98.7%, 99.9% and 94.0% respectively. Finally the results of triphenylmethane dye such as basic fuchsin, malachite green and crystal violet were 98.5%, 95.7% and 99.4%, respectively. The results suggest that laccase of *Irpex zonatus* BN2 should be played an important role in the decolorization of the dyes.

KEYWORDS: Decolorization, Dye, *Irpex zonatus*, Laccase, Lignin peroxidase

염료는 화학 구조에 따라 아조(azo)계, 트리페닐메탄(triphenylmethane)계, 헤테로사이클릭(heterocyclic)계 및 중합체(polymeric) 염료로 분류하며(Zolliner, 1982), 이들의 대부분은 직물염색, 인쇄, 의약품, 화장품 및 식용색소 등에 사용된다. 세계적으로 연 7×10^5 톤 이상 생산되는 각종 염료는 염색과정 중 10~15%가 유실되어 생태계의 수질과 토양에 심각한 오염을 일으키고 있다(Michaela와 Lewis, 1992). 방향족 염료는 혐기적 조건하에서 몇몇 세균들에 의하여 탈색이 되지만 방향족 고리(aromatic ring)는 분해되지 않고 다만 고리에 붙어 있는 곁사슬(side chain)만이 환원에 의하여 탈색된다. 그러나 탈색된 아민방향족계 화합물들은 생

태계에 계속 축적되어 발암물질 또는 돌연변이원으로 작용하여 심각한 문제를 일으키고 있다(Fujita와 Peisch, 1977, Cerniglia 등, 1982, Manning 등, 1985). 호기적 상태 하에서 염료를 분해하는 세균류는 거의 알려져 있지 않고 다만 진균류에 속하는 일부 균류들에 의해 염료의 분해능이 밝혀지고 있다. 특히 백색부후균류 가운데 리그닌 분해 모델로 가장 널리 알려진 *Phanerochaete chrysosporium*의 경우 lignin peroxidase(LiP)와 manganese dependent peroxidase(MnP)를 세포외로 분비하여 리그닌(lignin)을 분해한다. 이러한 효소들은 리그닌 뿐만 아니라 아조계 염료(Pastigrigshy, 1992), 헤테로사이클릭계 염료(Bumpus와 Brock, 1988, Cripps 등, 1990), 중합체 염료(Glen과 Gold, 1983)를 비롯하여 다염화비닐

*Corresponding author

(polychlorinated biphenyls)계 (Eaton, 1985) 및 다환방향족 탄화수소(polycyclic aromatic hydrocarbon)계 화합물(Field *et al.*, 1992) 등과 같은 방향족계 화합물들도 분해한다. 백색부후균류 가운데 LiP를 생산하지 않는 일부 균류는 페놀계 화합물을 분해하는 laccase를 생산하여 리그닌을 분해하는 것으로 알려져 있다(Martin과 Manzanders, 1994). 최근 대부분의 리그닌 분해 연구는 백색부후균류 가운데 *P. chrysosporium* 위주로 국한되었을 뿐만 아니라 야생분리균주를 이용한 연구는 소수에 불과한 실정이다(Field 등, 1993). 따라서 본 연구에서는 우리 나라 자연환경에서 분리 동정된 송곳니구름버섯(*Irpex zonatus*) 가운데서 poly(vinylamine) sulfonate-anthrapyridone(poly R-478) 염료의 탈색능이 가장 우수한 균주를 선정하여 아조계 염료, 트리페닐메탄계 염료 및 헤테로싸이클릭계 염료의 탈색능과 리그닌분해에 관여하는 몇몇 효소의 활성을 조사하였다.

재료 및 방법

균 주

본 실험에 사용된 균주는 우리 나라 자연환경에서 분리 동정된 18균주의 송곳니구름버섯(*Irpex zonatus*) 가운데 poly(vinylamine)sulfonate-anthrapyridone(poly R-478) 염료 탈색능 실험에서 가장 우수한 탈색율을 나타낸 송곳니구름버섯 BN2 균주였다.

균주의 보존은 potato dextrose agar(PDA, Difco Lab.) 배지에 균사체를 접종하여 28°C에서 7일간 배양한 후 4°C에서 보존하였다. 균주의 접종은 PDA 배지의 중앙에 소량의 균사체를 접종하여 28°C에서 7일간 배양한 후 배양 접시 가장자리로부터 1 cm 떨어진 부위에서 직경 6 mm의 cork borer로 agar plug를 만들어 사용하였다.

배 지

본 실험에 사용한 기본배지는 Tien과 Kirk(1988)의 배지에서 veratryl alcohol과 미량 원소를 생략한 배지(1% 포도당, 0.04% 요소, 2% KH_2PO_4 , 0.5% $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1% $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 0.002%

Thiamine-HCl, 10 mM 2,2-dimethylsuccinate (DMS; pH 4.5)를 사용하였다.

Poly R-478 염료 탈색능 우수균주 선정

분리 동정된 송곳니구름버섯 가운데 poly R-478 염료의 탈색능이 가장 우수한 균주를 선정하기 위하여 기본배지에 poly R-478 염료를 가한(최종농도 0.02%) 후, 균주를 접종하여 28°C에서 7일간 정지 배양하였다. 탈색의 정도는 배양액을 11,000×g로 5분간 원심분리한 후 상등액을 이용하여 uv-vis spectrophotometer(Shimadzu UV-1201, Japan)로 측정하였다. 탈색의 정도는 poly R-478 염료의 최대 흡수 파장인 520 nm과 350 nm에서(Fig. 1) 흡광도를 측정하여 A_{520}/A_{350} 로 산출하여 백분율로 나타냈다.

효소 활성도 측정

기본배지에 0.4 mM의 veratryl alcohol을 첨가하고 균주를 접종하여 28°C에서 10일간 배양한 후 배양액을 11,000×g로 5분간 원심분리하여 배양상등액으로 세포의 효소 활성도를 30°C에서 측정하였다. 단백질량은 bovine serum albumin(Sigma chem. Co.)을 표준물질로 사용하여 Bradford(1976) 방법으로 측정하였다. 효소 활성도는 1분 동안 1 mg의 단백질이 생성하는 대사산물의 양을 nmol로 나타냈다.

Lignin peroxidase(LiP) 활성도 Tien과 Kirk(1988)의 방법에 따라 2 mM veratryl alcohol

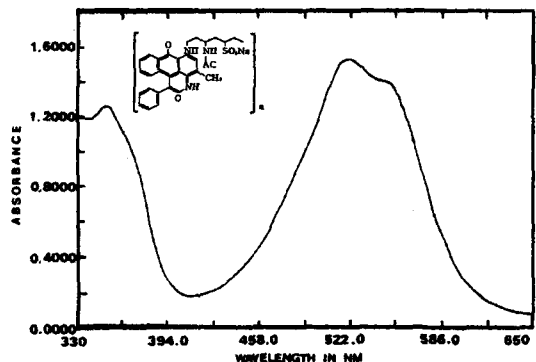


Fig. 1. Visible spectrum and chemical structure of poly R-478.

200 μl , 50 mM sodium tartrate(pH 2.5) 200 μl , 520 μl 의 배양상등액을 혼합한 후 4 mM H_2O_2 80 μl 를 가한 즉시 310 nm에서 1분간 활성도를 측정하였다. Veratryl alcohol oxidase(VAO)의 활성에 의해서도 veratraldehyde로 전환되므로(Archibald, 1992) 총 활성도에서 VAO의 활성도를 제한 것을 순수한 LiP의 활성도로 산정하였다($\epsilon_{310\text{ nm}} 9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Manganese peroxidase(MnP) 활성도 Paszczyński 등(1988)의 방법에 따라 50 mM sodium malonate(pH 4.5) 200 μl , 1 mM 2,6-dimethoxyphenol(DMP) 100 μl , 1 mM MnSO_4 100 μl 와 배양상등액 520 μl 를 각각 혼합한 후 4 mM H_2O_2 80 μl 를 가한 즉시 568 nm에서 1분간 효소 활성도를 측정하였다. 고농도의 laccase도 DMP를 기질로 이용하므로 총 효소 활성도에서 laccase의 활성도를 제한 것을 순수한 MnP의 활성도로 산정하였다($\epsilon_{568\text{ nm}} ca 10,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Veratryl alcohol oxidase(VAO) 활성도 Bourbonnais와 Paice(1988)의 방법에 따라 50 mM dimethylsuccinate(pH 4.5) 200 μl 와 2 mM veratryl alcohol 200 μl 그리고 600 μl 의 배양상등액을 혼합하여 반응액을 조제하였으며 310 nm에서 1분간 효소 활성도를 측정하였다($\epsilon_{310\text{ nm}} 9300 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

Laccase 활성도 de Jong 등(1992)의 방법에 따

라 50 mM 2,2-dimethylsuccinate(DMS)(pH 4.5) 200 μl , 1 mM의 DMP 100 μl 및 700 μl 의 배양상등액을 혼합하여 총 1 ml의 반응액을 조제한 다음 468 nm에서 1분간 효소 활성도를 측정하였다($\epsilon_{468\text{ nm}} ca 10,000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$).

염료의 탈색 측정

Poly R-478 염료 탈색능이 가장 우수한 균주로 선정된 송곳니 구름버섯 BN2 균주의 각종 염료 탈색능을 조사하기 위하여 Table 1과 같이 여러 종류의 염료를 적절한 농도로 기본배지에 첨가하고 균주를 접종하여 배양하였다. 배양후 각 염료의 탈색 측정은 Poly R-478 염료와 동일한 방법으로 각 염료의 최대흡수파장과 선택된 흡수파장의 흡광도를 측정하여 흡수치의 흡수비율로 산정하였다.

결 과

염료 탈색 우수 균주의 선정

자연환경에서 분리동정된 송곳니구름버섯의 poly R-478 염료 탈색능의 결과는 Table 2와 같이 나타났다. Table에서 보는 바와 같이 소수의 균주를 제외한 대부분의 균주는 서로 유사한 탈색효과와 생장을 나타냈고 BN2 균주가 82.8%의 가장 높은 탈색율과 높은 성장을 나타내어 탈색 우수균주로 선정되었다.

Table 1. Absorption wavelength and initial concentration of dyes used for decolorization

Group	Dyes	Wavelength*	Init. conc.	Remarks
		(nm)	(%)	
Azo dye	Orange II	483/400	0.02	Sigma chem. Co.
	Orange G	478/334	0.02	Fluka chem. Co.
	Tropaeolin O	393/340	0.02	Aldrich chem. Co.
	Congo red	497/345	0.02	Sigma chem. Co.
Heterocyclic dye	Toluidine blue O	626/325	0.02	BDH lab. supplies
	Azur B	643/330	0.02	Sigma chem. Co.
	Methyl blue	586/372	0.02	BDH lab. supplies
	Eosin Y	506/345	0.02	Sigma chem. Co.
Triphenyl methane dye	Basic fuchsin	540/440	0.02	Aldrich chem. Co.
	Crystal violet	589/320	0.005	Fisher scien. Co.
	Malachite green	614/424	0.02	Aldrich. chem. Co.

*Maximum absorbance/selected wavelength (nm).

Table 2. Rate of decolorization and dry weight of *Irpex zonatus* BN2 in basal medium with 0.02% Poly R-478 dye for 7 days incubation at 28°C

Strains	Abs. ratio*	Decolor.**	D.W.***
	(A520/A350)	(%)	(mg)
BB1	0.36	71.8	64
BB2	0.28	78.1	77
BB3	0.42	67.1	51
BB4	1.02	20.8	47
BB5	0.55	56.9	58
BB6	0.27	78.8	72
BB7	0.34	73.4	53
BC4	0.30	76.4	60
BC5	0.26	79.6	61
BS2	0.85	33.3	49
BS3	0.44	65.5	59
BS5	0.71	44.3	54
BS6	1.21	5.2	45
BN1	0.25	80.4	55
BN2	0.22	82.8	67
BN3	0.34	73.4	53
BN4	0.39	69.4	43
BN5	0.26	79.6	61

Initial absorbance ratio (A520/A350) of dye solution was 1.276.

*Absorbance ratio, **Decolorization (%), ***Dry weight (mg)

효소 활성도

Poly R-478 염료의 탈색능이 가장 우수한 BN2 균주의 효소활성도는 Table 3과 같이 laccase와 MnP만 생산하였고 LiP와 VAO는 생산하지 않았다. Laccase는 배양 초기부터 생산되어 배양 3일째에 1185.9 nmol/mg · protein의 가장 높은 수치를 보였으며 그 이후 서서히 감소하였다. MnP는 배양 3일부터 활성을 나타내기 시작하였고 배양 6일째에

61.6 nmol/mg protein의 수치를 보였고 그 이후에는 감소되었다.

염료의 탈색

기본배지에 각종 염료를 첨가하고 균주를 접종하여 10일 동안 배양하여 각 염료의 탈색능을 측정한다. 결과, 아조계 염료의 탈색능은 Fig. 2와 같으며 모노아조계 염료인 orange II, orange G 및 tropaeolin O의 탈색율은 각각 98.0%, 97.4% 및 99.0%였으며 평균 98.1%의 탈색율을 나타냈고 디아조계 염료인 congo red는 95.3%의 조금 낮은 탈색율을 나타냈다. 헤테로사이클릭계 염료의 탈색능의 결과는 Fig. 3과 같으며 eosin Y, toluidine blue, methyl blue 및 azur B의 탈색율은 각각 97.4%, 98.7%, 99.9% 및 94.0%였으며 평균 탈색율은 97.4%였다.

트리페닐메탄계 염료의 탈색능의 결과는 Fig. 4와 같으며 basic fuchsin, malachite green 및 crystal violet의 탈색율은 각각 98.5%, 95.7% 및 99.4%였으며 평균 탈색율은 97.9%로 헤테로사이클릭계 염료의 탈색율과 유사하게 나타났다.

고 찰

Glenn과 Gold 등(1983)이 *P. chrysosporium*을 이용하여 poly R-478 염료의 탈색과 리그닌분해 효소활성과의 상관관계를 밝힌 이후 de Jong 등(1992)은 poly R-478 염료가 리그닌 분해활성의 정량적인 측정방법으로써 유리한 점은 비용이 저렴하고 이 염료가 균사체의 성장에 영향을 미치지 않고 사용이 용이하며 안정성이 있기 때문이라고 하였다. 또한 Field 등(1992)도 poly R-478 염료의 탈색과 polycyclic aromatic hydrocarbons(PAHs) 화합

Table 3. The extracellular enzyme activity of *Irpex zonatus* BN2 grown in basal medium during 10 days at 28°C (unit : nmol/mg · protein)

Enzymes	Days									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
LiP	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
MnP	0	0	11.1	34.3	42.3	61.6	43.8	26.5	19.6	11.8
VAO	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Laccase	255	514.7	1185.9	924.5	864.3	654.0	521.3	514.7	501.7	375.8

LiP: lignin peroxidase, MnP: manganese-dependent peroxidase, VAO: veratryl alcohol oxidase.

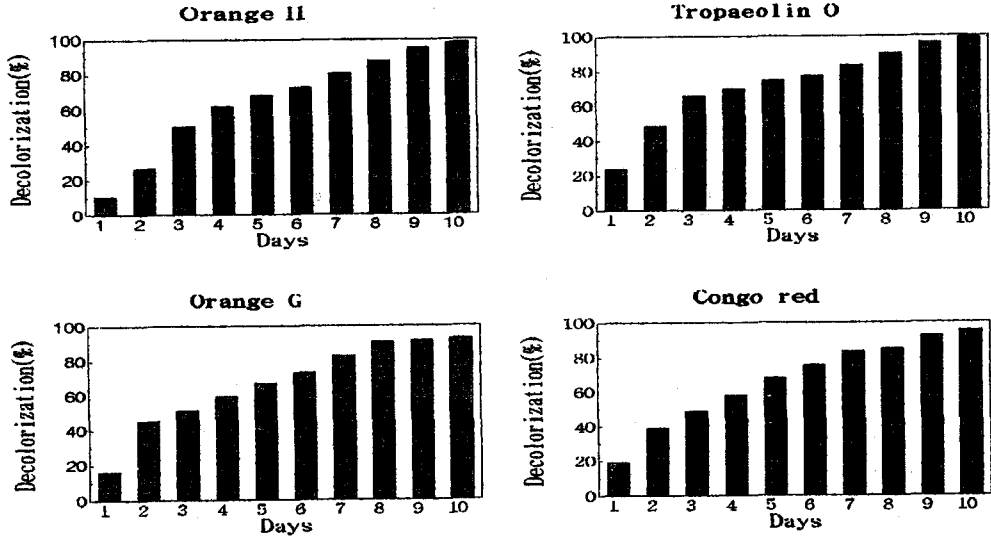


Fig. 2. Decolorization rate of azo dyes by *I. zonatus* BN2 for 10 days incubation.

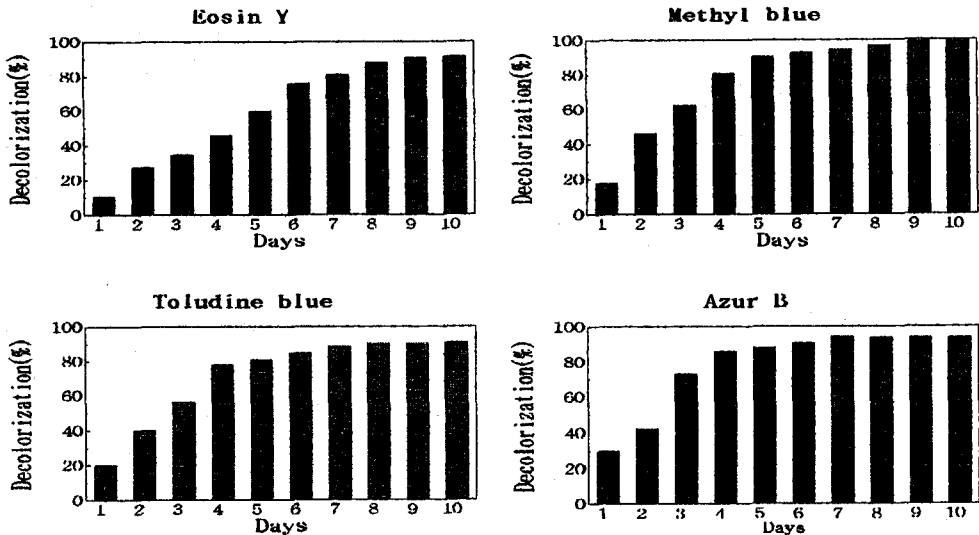


Fig. 3. Decolorization rate of heterocyclic dyes by *I. zonatus* BN2 for 10 days incubation.

물의 분해율이 비례함을 보고하였다. 따라서 poly R-478 염료의 탈색효과가 리그닌분해 검색에 매우 유용하리라 판단되었기에 본 실험에서도 탈색우수 균주 선정시 본 염료를 이용하였다.

염료의 탈색 측정 시 일부 염료는 용액 내의 pH에 의해 최대 흡수파장이 변하므로 Pasti-Grigsby 등(1992)과 Olikka 등(1993)은 등흡수점(isosbestic point)을 이용하여 단일 파장에서 흡수치의 변화

로 탈색율을 산정하였다. 그리고 Archibald(1992)는 염료의 표준 물질을 사용하여 최대 흡수파장을 선택하여 단일파장에서 탈색율을 측정하였다. 그러나 Glenn과 Gold(1983)는 염료를 배양액에 첨가하면 일부는 균사체에 흡수되거나 전환되므로 단일 파장에서 측정된 염료의 강도(intensity)는 당연히 감소된다고 하였다. 따라서 두 파장을 선택하여 측정하면 각 파장의 흡수치는 시간이 경과함에 따라

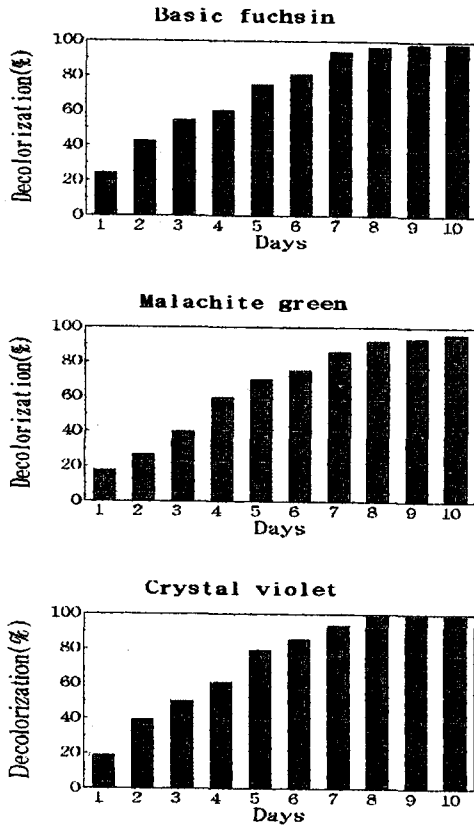


Fig. 4. Decolorization rate of triphenylmethane dyes by *I. zonatus* BN2 for 10 days incubation.

현저하게 감소하나 두 파장의 흡수율은 거의 일정하기 때문에 염료의 탈색 측정은 두 파장의 흡수율로 측정해야 한다고 주장하였다. 따라서 본 실험도 각 염료의 최대 흡수파장과 가시광선파장 범위 내의 2번째 peak의 흡수치와의 흡수비율로 탈색율을 산정하였다.

리그닌분해에 관여하는 효소로는 *P. chrysosporium*의 경우에 LiP, MnP, glyoxal oxidase, veratryl alcohol oxidase 및 aryl alcohol oxidase 등이 관여하고(Kersten과 Kirk 1987, Daniel 등, 1994), 구름버섯(*Coriolus versicolor*)의 경우에는 MnP와 laccase 등이 관여한다고 알려져 있다. *P. chrysosporium*의 경우에 리그닌은 주로 LiP와 MnP에 의해 분해되고 이들을 생산하지 않는 종에서는 laccase에 의해 분해되어 진다(Martin과 Manzanders, 1994). 또한 Hutakka(1994)는 담

자균류가 생산하는 리그닌 분해효소의 종류를 조합하여 LiP-MnP균과 MnP-laccase균 및 LiP-laccase균으로 분류하였으며 MnP-laccase균이 가장 리그닌 분해활성이 높다고 하였다. 본 실험에 사용된 *I. zonatus* BN2 균주는 MnP-laccase균에 속하며 LiP를 생산하지 않아도 높은 탈색율을 보이는 것은 laccase에 의한 것으로 판단된다.

리그닌분해 및 염료의 탈색 과정에서 veratryl alcohol은 매우 중요한 역할을 한다. *P. chrysosporium*을 이용한 실험에서 veratryl alcohol은 질소 제한 조건 배양시 2차 대사산물로 생산되는 LiP를 안정시키며 여러 기질의 산화 반응을 촉진하는 물질로 알려져 있다(Harvey 등, 1986). Olikka 등(1993)은 정제된 LiP를 이용한 염료 탈색 실험에서 veratryl alcohol이 없는 조건에서는 20%의 탈색율을 보이지만 veratryl alcohol을 첨가한 실험에서는 탈색율이 60%까지 증가함을 보고하였다. 그러나, 본 염료의 탈색실험에는 veratryl alcohol을 첨가하지 않았음에도 불구하고 높은 수치를 보이는 것은 탈색이나 대사 과정 중 균주 스스로가 veratryl alcohol을 합성하였거나 리그닌 분해 효소기구가 서로 다르게 조절되기 때문이라고 생각된다.

적 요

우리 나라 자연 환경에서 분리 동정된 송곳니구름버섯(*Irpex zonatus*) BN2 균주의 리그닌분해효소활성과 아조(azo)계, 트리페닐메탄(triphenylmethane)계 및 헤테로싸이클릭(heterocyclic)계에 속하는 몇몇 염료의 탈색능을 조사하였다. 송곳니구름버섯 BN2 균주는 lignin peroxidase(LiP)와 veratryl alcohol oxidase(VAO)를 생산하지 않고 laccase와 manganese dependent peroxidase(MnP)를 생산했다. MnP는 배양 3일부터 생산되었으나 효소활성은 매우 낮았다. 반면 laccase는 배양 초기부터 지속적으로 생산되었고 활성은 대단히 높았다. 균주를 염료와 함께 10일간 배양했을 때 아조계 염료인 orange II, orange G, tropaeolin O 및 congo red의 탈색율은 각각 98.0%, 97.4%, 99.0% 및 95.3%로 나타났고 트리페닐메탄계 염료인 basic fuchsin, malachite green 및 crystal violet 들은

98.5%, 95.7% 및 99.4%로, 헤테로사이클릭계 염료에 속하는 eosin Y, toluidine blue, methyl blue 및 azur B는 각각 97.4%, 98.7%, 99.9% 및 94.0%의 탈색율을 보였다.

송곳니구름버섯 BN2 균주에 의한 염료의 탈색은 주로 laccase에 의하여 이루어진다고 생각된다.

감사의 글

본 실험에 사용된 균주를 동정해 주신 농촌진흥청 농업유전공학연구소 자원유전과의 김양섭 박사께 감사드립니다.

참고문헌

- Archibald, F. S. 1992. A new assay for lignin-type peroxidase employing the dye Azur B. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3110-3116.
- Bourbonnais, R. and Paice, M. G. 1988. Veratryl alcohol oxidase from the lignin degrading Basidiomycetes *Pleurotus sajor-caia*. *Biochem. J.* **255**: 445-450.
- Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* **72**: 248-254.
- Bumpus, J. A. and Brock, B. J. 1988. Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **54**: 1143-1150.
- Cerniglia, C. E., J. P. Freeman, W. Franklin, and L. D. Pack. 1982. Metabolism of benzidine a benzidine-conger based dyes by human, monkey and rat intestinal bacteria. *Biochem Biophys. Res. Commun.* **107**: 1224-1229.
- Cripps, J., Bumps, J. A. and Aust, S. D. 1990. Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **56**: 1114-1118.
- Daniel, G., Volc, J. and Kubatova, E. 1994. Pyranose oxidase, a major source of H₂O₂ during wood degradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *Trametes versicolor* and *Oudemansiella mucida*. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 2524-2532.
- de Jong, E., de Vires, F., Field, J. A., Vann-derzwan, R. P. and de Bong, Z. A. M. 1992. Isolation and screening of basidiomycetes with high peroxidative activity. *Mycol. Res.* **12**: 1098-1104.
- Eaton, D. C. 1985. Mineralization of polychlorinated biphenyls by *Phanerochaete chrysosporium*. *Enzyme Microb. Technol.* **7**: 194-196.
- Field, J. A., de Jong, E., Feijoo-Costa, G. and de Bont, J. A. M. 1992. Biodegradation of polycyclic aromatic hydrocarbons by new isolates of white rot fungi. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 2219-2226.
- Field, J. A., de Jong, E., Feijoo-Costa, G. and de Bont, J. A. M. 1993. Screening for ligninolytic fungi applicable to the biodegradation of xenobiotics. *TIBTECH.* **11**: 44-49.
- Fujita, S., and Peisch, J. 1977. Electron transfer between liver microsomal cytochrome b5 and cytochrome P-450 in the azo reductase reaction. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **78**: 328-335.
- Glenn, J. K. and Gold, M. H. 1983. Decolorization of several polymeric dyes by the lignin-degrading Basidiomycete *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **45**: 1741-1747.
- Harvey, P. J., Schoemaker, H. E. and Palmer, J. M. 1986. Veratryl alcohol as mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*. *FEBS.* **195**: 242-246.
- Hutakka, A. 1994. Lignin-modifying enzymes from selected white rot fungi production and role in lignin degradation. *FEMS Microbiol. REVIEWS.* **13**: 125-135.
- Kersten, P. J., and Kirk, T. K. 1987. Involvement of a new enzyme, glyoxal oxidases, in extracellular H₂O₂ production by *Phanerochaete chrysosporium*. *Arch. Microbiol.* **169**: 2195-2201.
- Manning, B. W., Cerniglia, C. E. and Federle, T. W. 1985. Metabolism of the benzidine-based azo dye direct black 38 by human intestinal microflora. *Appl. Environ. Microbiol.* **50**: 10-15.
- Martin, C. and Manzanders, P. 1994. A study of the decolorization of straw soda-pulping effluents by *Trametes versicolor*. *Bioresource Technol.* **47**: 209-214.
- Michaels, G. B. and Lewis, D. L. 1992. Microbial

- transformation rates of azo and triphenylmethane dyes. *Environ. Toxicol. Chem.* **5**: 161-166.
- Olikka, P., Alhonmaki, K., Leppanen, V., Glumoff, T., Rajola, T., and Suominen, I., 1993, Decolorization of azo, triphenylmethane, heterocyclic and polymeric dyes by lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. environ. Microbiol.* **59**: 4010-4016.
- Pasti-Grigshy, M. B., Paszczynski, A., Goszczynski, S., Crawford D. L. and Crawford, R. L. 1992. Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* spp. and *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**: 3605-3613.
- Paszczynski, A., Crawford, R. L. and Huynh, V. B. 1988. Manganese peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*: purification. *Method in Enzymol.* **161**: 264-270.
- Tien, M. and Kirk, T. K. 1988. Lignin peroxidase of *Phanerochaete chrysosporium*. *Method in Enzymol.* **23**: 238-249.
- Zollner, H. 1982. Color chemistry-syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. PP. 92-102. VH Publishers, New York.