

고정화 laccase에 의한 azo 염료의 연속 분해

권 신·류 원 루·*조 무 환
영남대학교 응용화학공학부
(접수 : 2002. 2. 28., 게재승인 : 2002. 4. 22.)

Continuous Degradation of azo dye by Immobilized Laccase

Sin Kwon, Won Ryul Ryu, and Moo Hwan Cho†
School of Chemical Engineering & Technology, Yeungnam University, Kyongsan 712-749, Korea
(Received : 2002. 2. 28., Accepted : 2002. 4. 22.)

Laccase produced from *Trametes* sp. was immobilized on CNBr-activated Sepharose-4B (CAS4B) and tested for degradation of azo dyes. Laccase was efficiently immobilized on CAS4B. Immobilization of laccase on CAS4B increased pH, thermal and proteolytic stabilities. Optimum pH and temperature of immobilized laccase were pH 3 and 40°C, respectively as same as those of free laccase. The $K_m(\mu\text{mol/ml})$ values of free and immobilized laccase for Reactive Blue 19 as the substrate were 0.34 and 2.07, respectively. $V_{\max}(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})$ values of them were 0.12 and 0.1, respectively. In repeated batch reactions, conditions retained high stability and degradation of dye for immobilized laccase were pH 5 and 30°C. HBT didn't decrease highly activity of immobilized laccase. Immobilized laccase was very stable for degrading dyes continuously in a packed-bed reactor containing laccase immobilized on CAS4B. For continuous degradation of 100 μM Reactive Blue 19 and 50 μM Acid Red 57 in the presence of 0.1 mM HBT under optimum conditions, immobilized laccase retained 70% of degradation ability even after 30 hours.

Key Words : laccase, immobilization, CNBr-activated Sepharose-4B, azo dyes

서 론

매년 전세계적으로 7×10^5 tons의 염료가 생산되고 있고(1), 직물산업에서는 생산된 염료의 56%를 소비한다고 보고되고 있다. 직물산업의 염색과정에서 소비되는 전체 염료의 10~15%는 폐수로 방류되고 있다(2). 이와 같은 색도를 띄는 산업폐수에는 대부분 방향족 구조를 가지고 있는 화합물이 다량 존재하기 때문에 눈에 보이는 가시적인 오염뿐만 아니라 생태계 파괴 및 인간의 건강에 많은 문제를 일으키고 있다. 전 세계에서 생산되는 염료의 약 50%는 azo계 염료이며(3), 혐기 상태에서 미생물에 의해 분해될 때 방향족 amine과 같은 발암물질로 전환되기도 하지만(4), *Phanerochaete chrysosporium*와 같은 백색부후균은 많은 수의 azo계 염료를 CO_2 와 H_2O 로 완전히 분해시킨다(5,6). Azo계 염료의 분해 시스템에서 효소의 역할이 많이 알려진 *Phanerochaete chrysosporium*의 2차 대사과정에서 생산되는 extracellular enzyme인 lignin peroxidase (LiP)와 manganese peroxidase(MnP), 그리고 *Pyricularia oryzae*,

Pleurotus ostreatus, *Trametes vesicolor* 등에서 생산되는 laccase에 관하여 많은 연구가 진행되고 있다(7-12). 백색부후균에서 생산되는 효소는 각종 화합물에 대하여 비특이적으로 작용할 수 있는 기작을 보유하기 때문에 산업폐수에 존재하는 방향족 화합물을 처리하기 위해 LiP, MnP, tyrosinase, laccase의 이용이 제안되기도 하였다(13-15). Laccase는 peroxidase와 비교하여 산화환원전위는 다소 낮지만 과산화수소수를 요구하지 않고, tyrosinase와 비해서 더욱더 넓은 기질 특이성을 가지고 있다. 따라서 산업폐수 및 기타 오염원으로부터 독성 화합물을 제거하기 위해서 최근 들어 laccase의 활용에 관한 연구가 급속히 진행되고 있다(16). 특히 free laccase의 inhibitor, 열과 pH에 따른 효소의 불활성 및 효소의 재이용성의 단점을 보완하기 위한 고정화에 대한 연구가 많이 진행되고 있다. Laccase를 alginate bead속에 가두기틀 통하여 효소의 유출 문제를 완화시키거나(17), Celite를 이용하여 공유결합을 통하여 안정성의 증가는 없었으나 재사용을 가능케 하였고(18), 다공성 glass를 이용하여 silanisation에 의해 공유결합시켜서 넓은 pH와 온도에서 효소의 안정성을 증가시켜 산업폐수나 염료의 분해에 대한 많은 연구가 진행되어왔지만, 실제 산업적인 적용을 위한 연속 분해에 관한 연구는 그리 많지 않았다(19). 본 연구에서는 *Trametes* sp.에서 생산되는 laccase를 불용성 담체인 CNBr-activated Sepharose-4B에 고정

†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

화시켜 염료의 연속 분해를 시도하였다.

재료 및 방법

효소 및 시약

본 연구에서는 *Trametes* sp.(KFCC 10941)의 배양액에서 균사체를 여과지로 걸러 여과액에 황산암모늄을 80% 되게 처리한 후 투석시킨 후 4°C에서 보관된 효소를 사용하였다. 실험에 사용한 염료는 Reactive Blue 19 (Sigma), T시 K Co.에서 제공받은 Acid Red 57을 사용하였으며, 그 외의 기타 실험에는 특급 및 일급시약을 사용하였다.

효소의 고정화

1 g의 CNBr-activated Sepharose 4B 분말을 준비하여(1 g의 동결 건조된 분말은 약 3.5 mL의 겔 생성), 1 mM HCl 200 mL와 혼합한 후 15분간 겔화물 수행한 후 glass filter로 흡입 여과과정을 거쳐 HCl 용액을 제거하였다. 그런 후 50 mL tube에서 0.5 M NaCl을 포함하고 있는 0.1 M NaHCO₃(pH 8.3) coupling buffer가 혼합된 효소용액 10 mL을 겔 1 g과 혼합한 후 parafilm으로 덮고, 상온에서 4시간 동안 shaker로 회전 교반하였다. 교반 후 coupling buffer를 이용하여 겔을 세척하고, 잔존하는 active group을 폐쇄하기 위해 0.2 M glycine(pH 8.0) 10 mL에서 겔을 2시간 동안 보관하였다. 0.5 M NaCl을 포함하고 있는 0.1 M acetate buffer (pH 4.0)와, 0.5 M NaCl을 포함하고 있는 0.1 M Tris-buffer (pH 8.0)을 사용하여 6번의 반복 세척과정을 거쳐 고정화하였다(20).

고정화 laccase의 pH 및 온도 영향 조사

Free enzyme와 immobilized enzyme의 pH의 영향을 조사하기 위해서 기질로서 100 μ M Reactive Blue 19가 이용되었고, pH의 조절은 50 mM citrate-phosphate buffer를 이용하여 pH 2~7까지 바뀌가면서 효소의 상대적인 염료에 대한 분해 효율을 측정하였다. 온도(°C)의 영향 조사에서는 pH를 laccase의 최적 pH 3으로 고정하고, water bath를 이용하여 온도를 0~60°C로 바뀌가면서 측정하였다.

효소 정량 및 염료의 농도 측정

효소 정량은 100 μ L의 sample과 3 mL의 Bradford reagent를 혼합하고, 5분 동안 실온에서 방치한 후 595 nm에서 흡광도를 측정한 후 standard curve를 이용하여 정량하는 Bradford method를 사용하였다(21). Standard curve는 Bovine serum albumin (BSA)로 작성하였다. 염료의 농도 분석은 UV-spectrophotometer (Shimazu UV-160A)를 사용하여 각각의 염료의 최대 흡광 파장에서 standard curve를 작성한 후 농도 분석에 사용하였다.

Michaelis-Menten constants 결정

Free laccase, immobilized laccase의 기질로서 Reactive Blue 19를 사용하였고, 농도의 범위는 0.05~0.18 mM로 하여 Kinetic constants를 결정하였다. 사용된 효소는 0.0023 mg/mL이고 pH와 온도(°C) 조건은 각각 5.0, 25이다. K_m과 V_m는 Lineweaver-Burk method에 의해 구하여졌다.

Repeated-batch에서 pH, 온도, HBT의 영향

pH의 영향 실험에서는 온도 25°C, pH 4, 5, 6 조건이고, 온도의 영향 실험에서는 pH 5, 온도(°C) 20, 30, 40 조건이며, 0.1 mM 1-hydroxybenzotriazole(HBT)의 영향에서는 불활성이 일어나지 않는 온도 25°C, pH 5, 6이고, 모두 laccase의 기질로서 Reactive Blue 19를 사용하여 20번의 repeated-batch에서 안정성과 높은 분해 효율을 모두 만족하는 조건을 조사하였다. 반응 혼합물은 1.5 mL eppendorf tube에서 고정화된 효소와 기질로서 Reactive Blue 19를 사용하였고, shaker로 150 rpm에서 3분 동안 반응시킨 후, 3000 rpm에서 원심 분리하여 분해 효율을 측정하였고, 반복적으로 50 mM acetate buffer가 포함된 80 μ M Reactive Blue 19 solution(pH 5.0)을 교체하였다.

Packed-bed reactor에서 체류 시간에 따른 염료의 분해

6.63 mg의 laccase가 고정화 되어 있는 겔 1.15 mL를 packed-bed reactor(15 cm length and 7 mm I.D)에 주입하여 충진율 11%로 맞추고, 온도 25°C, pH 5.0인 50 mM acetate-buffer가 포함된 100 μ M Reactive Blue 19(100 μ M Reactive Blue 19 solution)을 Gilson peristaltic pump (Miniplus 3)를 사용하여 체류시간을 1.2분으로 하여 1시간 동안 reactor로 연속으로 공급하여 더 이상 겔에 의한 염료 흡착이 일어나지 않을 때 체류시간을 2.2, 1.2, 0.6, 0.4, 0.3, 0.2분으로 바꾸어 가며 분해 효율을 측정하였다.

Packed-bed reactor에서 충진율에 따른 염료의 분해

Packed-bed reactor에 충진율을 각각 1.1, 2.2, 6.6, 11%로 달리하였고, 기질로서 100 μ M Reactive Blue 19 solution을 사용하였으며, 체류시간은 2.2분으로 하여 reactor로 연속으로 공급하여 더 이상 겔에 의한 염료 흡착이 일어나지 않을 때 분해 효율을 측정하였다.

Packed-bed reactor에서 Reactive Blue 19 및 Acid Red 57의 연속적인 분해

Reactive Blue 19의 연속 분해에서는 충진율을 11%로 맞추고, 체류시간을 2.2분으로 하여 100 μ M의 Reactive Blue 19 solution을 reactor로 연속적으로 공급하였고, Acid Red 57의 연속 분해 또한 앞의 실험과 같은 조건에서 50 μ M Acid Red 57 solution과, 0.1 mM HBT를 포함하는 50 μ M Acid Red 57 solution에 의한 분해 효율을 측정하였다.

결과 및 고찰

Laccase의 고정화

1 g의 CNBr-activated Sepharose 4B 겔을 coupling buffer에 녹아 있는 laccase solution 10 mL(22.23 mg)와 혼합하였다. 1시간 후에 상등액을 취하여 Bradford method(21)에 의하여 농도 분석하였을 때 3.33 mg의 laccase가 측정되었고, 85%의 laccase 고정화 효율을 나타내었다. 2시간 이후에는 상등액에서 1.02 mg의 laccase가 측정되었고, 고정화 효율은 96.4%로 일정하게 유지되었다(Figure 1). 이것은 CNBr-activated Sepharose 4B 겔의 활성화기의 부족으로 더 이상 고정화가 되지 않았

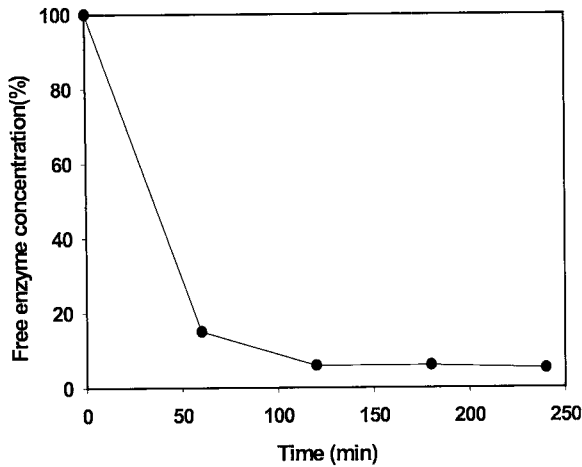


Figure 1. Binding rate of laccase on CNBr-activated sepharose 4B.

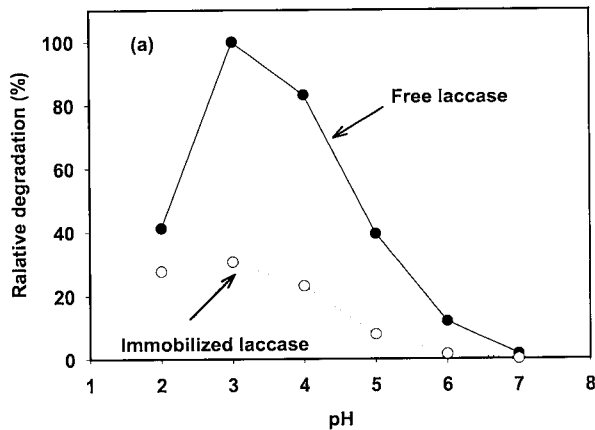


Figure 2. Effect of pH on the activities of free and immobilized laccase.

기 때문이다(20). 또한 젤을 고정화 후 세척과정에서 씻겨나간 laccase의 농도는 0.29 mg이었다. 전체적으로 살펴보면 1 g gel당 19.88 mg의 laccase가 고정화되었고, 전체 고정화 효율은 94%로 나타났다.

고정화 laccase의 pH, 온도 영향 조사

Immobilized laccase와 free laccase의 pH의 영향은 Froehner 등(20)의 결과와 같이 immobilized laccase와 free laccase 모두 똑같이 pH 3에서 가장 높은 분해 효율을 나타내었다(Figure 2). 최적 온도 역시 pH의 영향에서와 같이 40℃에서 최적을 나타내었다(Figure 3). 또한 immobilized laccase는 free laccase와 비교해서 최적 pH, 온도에서 상대적인 분해 효율은 30%로 나타났다. Immobilized laccase가 free laccase에 비해서 다소 낮은 분해 효율을 나타내지만 효소의 재사용이 가능할 뿐 아니라 연속적으로 사용할 수 있기 때문에 공정의 경제성을 높일 수 있다는 이점이 있다. 또한 생성물과 효소가 분리되어 사용할 수 있어 생성물의 정제가 간편해지고 반응 정도를 우리가 원하는 만큼 제어할 수 있다.

Michaelis-Menten constants 결정

Michaelis-Menten constants K_m 과 V_{max} 는 효소와 기질의 상

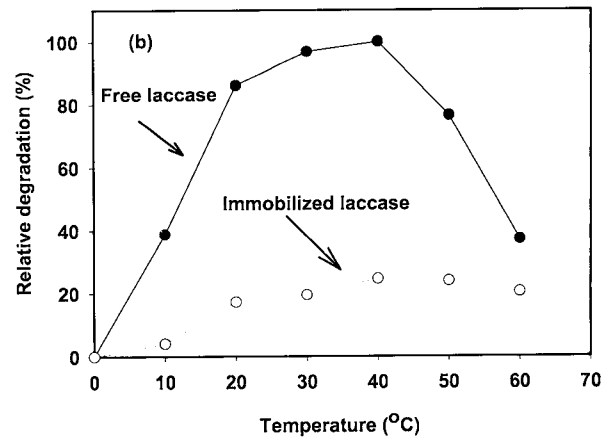


Figure 3. Effect of temperature on the activities of free and immobilized laccase.

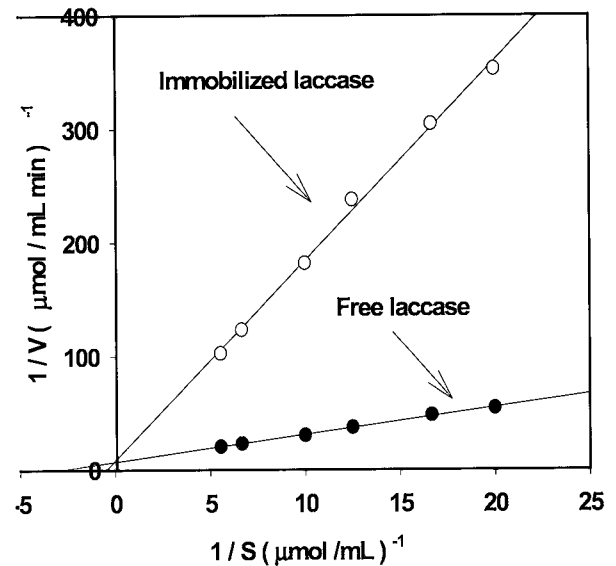


Figure 4. Comparison of the Michaelis-Menten constants for reactive blue 19 between free and immobilized laccase.

호작용의 특성을 나타내며, 초기 효소 농도에 비례하여 증가되는 값으로 효소의 최대 반응속도를 나타내는 중요한 매개 변수들이다. Free laccase의 경우는 V_{max} 는 $0.12(\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})$, immobilized laccase는 $0.10(\mu\text{mol}/\text{mL} \cdot \text{min})$ 이고, K_m 은 free laccase의 경우는 $0.34(\mu\text{mol}/\text{mL})$, immobilized laccase는 $2.07(\mu\text{mol}/\text{mL})$ 로 약 6배의 증가가 하는 것을 볼 수 있다(Figure 4). 이것은 효소의 지지체에 공유결합으로 기질 확산 저항(16,22), 기질 분배의 문제점, 단백질의 구조적인 변화(23), 단백질의 유동성의 감소 등으로 활성도의 감소로 인해서 일어난 것으로 생각된다(24).

Repeated-batch에서 pH, 온도, HBT의 영향

고정화 laccase에 의한 안정적이고 연속적인 염료의 분해에 앞서 효소의 안정성과 높은 분해 효율을 모두 만족하는 조건을 확립하기 위해서 repeated-batch로 Reactive Blue 19의 분해 실험을 행하였다. pH 2, 3, 온도 50, 60℃에서 immobilized laccase는 급격한 불활성을 나타내기 때문에 연속적인 염료의

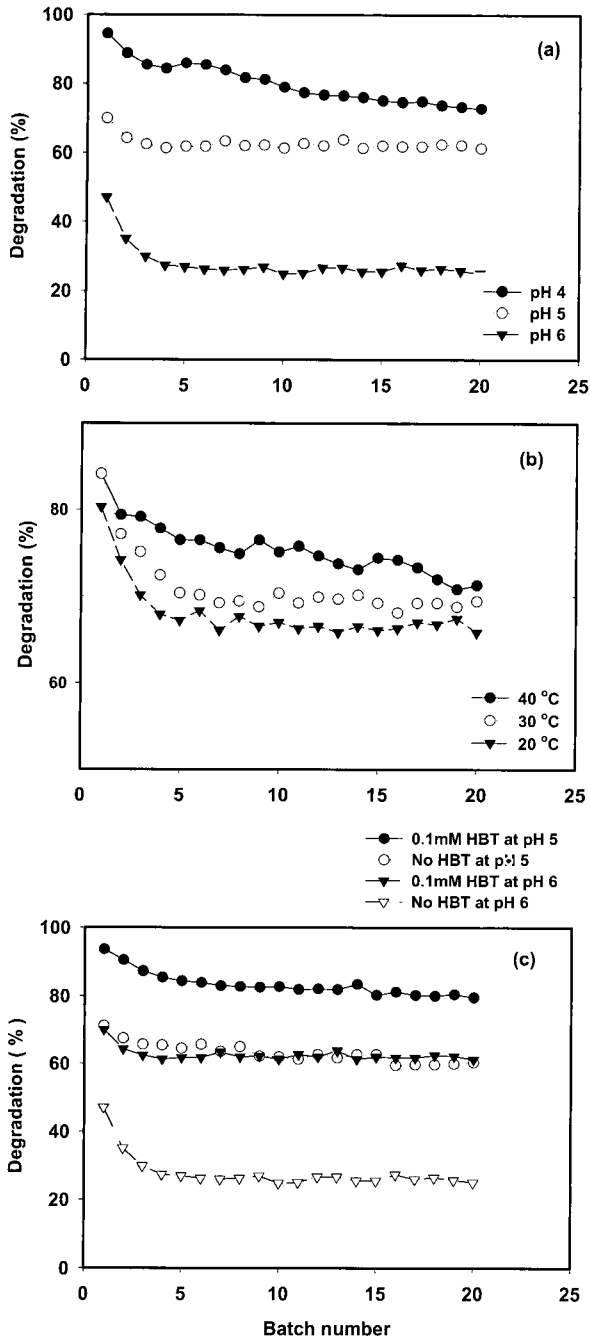


Figure 5. Effect of various factors on degradation of reactive blue 19 by immobilized laccase in repeated-batch. (a): pH, (b): temperature, (c): HBT

분해를 위한 안정성 조건을 만족시키지 못하기 때문에 본 실험에서는 제외되었다.

Repeated-batch에서 pH의 영향 실험에서는 20번의 repeated-batch 결과 pH 4에서 85%의 분해제거를 보이는 반면에 20 batch 동안 약 13%의 분해 효율의 감소가 일어났고, 분해 효율은 그대로 유지되는 pH 5, 6에서는 62%, 27%로 pH에 따라 상당히 큰 차이를 나타내었다 (Figure 5(a)). pH 5에서는 활성과 안정성 모두를 만족하여서 온도의 영향 실험에서 활성과 안정성 모두를 만족하는 pH 5로 설정하여 실험하였다.

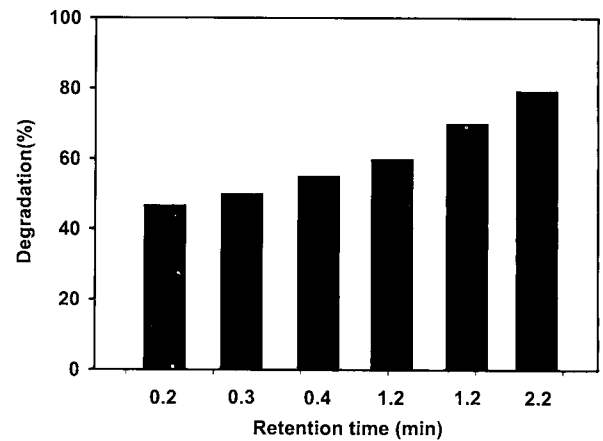


Figure 6. Effect of retention time on degradation of reactive blue 19 for continuous packed-bed reactor.

40°C에서 76%로 가장 높은 분해 효율을 보이는 반면에 약 6%의 분해 효율의 저하가 일어났고, 20와 30°C에서는 각각 70%, 68%로서 pH의 결과와는 달리 큰 차이를 나타내지 않았다(Figure 5(b)).

끝으로 laccase의 free radical mediator인 HBT를 사용하여 분해 효율을 조사하였다. HBT가 효소 불활성을 일으킨다는 보고에 따라 다소 안정한 조건 pH 5~6에서 분해 효율을 조사했다(25). pH 5 조건에서 분해는 62%이고, HBT를 투입했을 때는 84%로 24%의 분해 효율 향상을 가져왔고, pH 6에서는 HBT가 존재하지 않을 때 분해 효율은 27%이고, HBT를 투입했을 때 65%로 38%의 분해 효율 향상을 가져왔고, 20번의 repeated-batch 동안 두 조건 모두 약 5% 정도의 분해 효율의 감소를 일으키는 것으로 보아 연속적인 염료의 분해 시 HBT의 적용이 가능하리라 생각된다(Figure 5(c)). 따라서 연속적인 염료 분해 실험에서는 pH 5에서 온도 20~30°C로 유지한다면 오랜 시간동안 염료를 분해할 수 있고 경우에 따라 mediator가 필요할 때 HBT의 적용 또한 가능한 것으로 나타났다.

Packed-bed reactor에서 체류시간에 따른 염료의 분해

염료의 연속적인 분해의 최적조건을 도출하기 위한 첫번째 조건으로 6.63 mg의 laccase가 함유되어있고, 충진율이 11%인 packed-bed reactor에서 체류시간에 따라 분해 효율을 살펴보기 위하여 기질 유입 속도를 높여 체류시간을 각각 2.2, 1.2, 0.6, 0.4, 0.3, 0.2 분으로 바꾸었을 때 분해 효율은 각각 79.3, 70, 60.1, 55, 50, 46.8%으로 체류시간에 따라 분해 효율은 증가하는 것으로 나타내었다(Figure 6).

Packed-bed reactor에서 충진율에 따른 염료의 분해

충진율의 실험에서는 분해 효율이 가장 높은 체류시간 2.2 분으로 고정하고, 충진율을 1.1, 2.2, 6.6, 11%으로 하였을 때 분해 효율은 각각 42, 53, 68, 79.3%로 나타났다(Figure 7). 충진율이 높아질수록 분해 효율은 증가하는 경향을 나타내었다. 충진율과 체류시간의 증가만큼 분해 효율이 비례적으로 증가하지 않는 것으로 보아 Davis and Burns(17)에 의한 페놀 유출수의 처리에서와 같이 packed-bed reactor에 의한 물

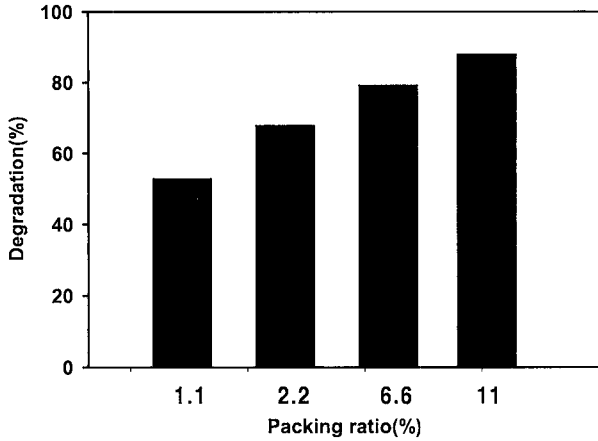


Figure 7. Effect of packing ratio on degradation of reactive blue 19 for continuous packed-bed reactor.

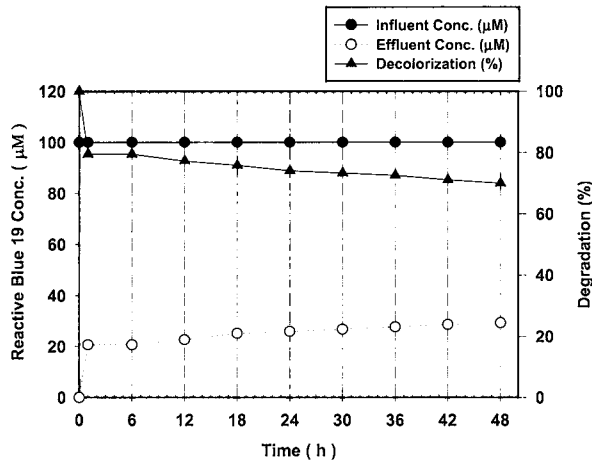


Figure 8. Continuous degradation of 100 μM reactive blue 19 by packed-bed reactor.

질전달의 문제점으로 생각된다.

Packed-bed reactor에서 Reactive Blue 19의 연속적인 분해

앞에서 조사한 packed-bed reactor의 결과에서 높은 효율을 나타내는 조건인 충진율을 11%로 맞추고, 체류시간 2.2분 100 μM의 Reactive Blue 19 solution을 reactor로 연속적으로 공급하여 얻은 data를 Figure 8에 나타내었다. Reactive Blue 19 solution의 완전한 흡착이 일어나는 1시간 후에 유출수의 농도는 20.6 μM이고, 79.4%의 분해 효율을 나타내었다. 반응 6시간 이후로는 조금씩 불활성이 일어나 48시간 후에는 유출수의 농도는 30 μM이었고, 70%의 분해를 나타내었다 (Figure 8).

Packed-bed reactor에서 azo계의 염료인 Acid Red 57의 연속적인 분해

Acid Red 57의 연속적인 분해에서는 HBT를 투입하지 않았을 때 최초 1시간 뒤의 유출수의 농도는 22.6 μM, 분해 효율은 54.7%이었고(Figure 9), HBT를 투입하였을 때는 유출수의 농도는 2.1 μM, 분해 효율은 95.6%로 HBT에 의한 free radical의 생성으로 인한 분해 효율의 증가를 가져왔다(Figure

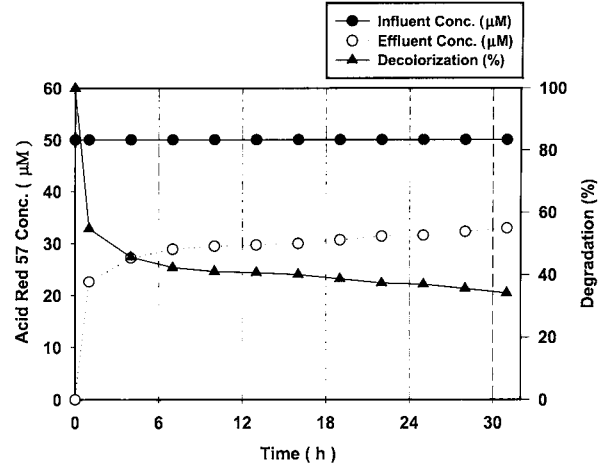


Figure 9. Continuous degradation of 50 μM acid red 57 by a packed-bed reactor in the absence of HBT.

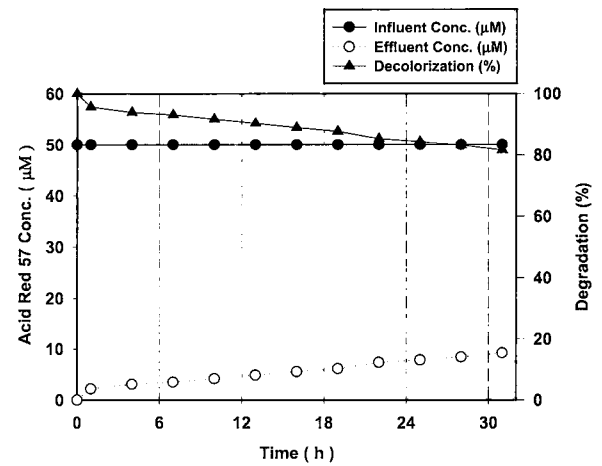


Figure 10. Continuous degradation of 50 μM acid red 57 by a packed-bed reactor in the presence of 0.1 mM HBT.

10). HBT를 투입하였을 때 반응 31시간 후 유출수의 농도는 9.2 μM, 분해 효율 81.5%로 약 14%의 분해 효율의 감소가 일어났지만(Figure 10), HBT를 투입하지 않았을 때 유출수의 농도는 32.9 μM, 분해 효율은 34.1%이었다(Figure 9). HBT가 효소를 불활성 시킨다는 보고와는 달리 HBT를 투입한 reactor에서는 더욱 높은 분해 효율과 안정성을 보여주었다. 반응 시간동안 reactor밖으로 씻겨 나간 효소의 양은 Bradford method에 의해서 검출되지 않았다. 전체적인 결과에 비추어 볼 때 경제적으로 고가의 효소인 laccase를 고정화를 통하여 재이용이 가능하고, 연속적인 조작을 통한 공정의 경제성을 높이는 데 기여할 수 있을 것이라 생각된다.

요 약

Trametes sp.에서 생산되는 laccase는 CNBr-activated Sepharose-4B(CAS4B)에 고정화 되었고, 염료의 연속적인 분해를 위하여 테스트되었다. Laccase는 CAS4B에 효율적으로 고정화되었고, CAS4B에 고정화 된 laccase는 pH, 열, 단백질 구조적인 안정성 면에서 상당히 증가하였다. CAS4B에 고정화 된

laccase의 최적 pH는 5, 온도는 40℃로서 free laccase와 비교하여 변화가 없었다. 기질로서 Reactive Blue 19를 사용하였을 때 free laccase와 고정화 laccase의 $K_m(\mu\text{mol/mL})$ 값은 각각 0.34와 2.0이었고, $V_{max}(\mu\text{mol/mL} \cdot \text{min})$ 값은 각각 0.12, 0.1이었다. Repeated-batch 반응에서 효소의 안정성과 높은 분해 효율 만족하는 조건은 pH 5, 30℃이었다. 또한 HBT에 의한 효소의 불활성은 크게 나타나지 않았다. Packed-bed reactor에서 최적으로 운전되었을 때 100 μM Reactive Blue 19과 0.1 mM HBT가 존재하는 50 μM Acid Red 57의 연속적인 분해에서 30시간 후에도 분해 효율이 70%로 유지되었다. 고정화 laccase는 Packed-bed reactor에서 azo 염료의 연속적인 분해를 매우 안정적으로 수행하였다.

감 사

본 연구는 2001년도 한국과학재단 지역 우수과학자 지원연구 과제번호(2001-1-30700- 011-1)의 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Hutzinger, O. (1980), The Handbook of Environmental Chemistry, Vol. 3, p188. Springer-Verlag, Berlin.
- Brown, D. H., H. R. Hitz, and L. Shafer (1981), The assessment of the possible inhibitory effect of dyestuffs on aerobic wastewater bacteria. Experience with a screening test. *Chemosphere* **10**, 245-261.
- Kulkarni, S. V., C. D. Blackwell, A. L. Blackarm, C. W. Stackhose, and M. W. Alexander (1985), Textile dyes and dyeing equipment, classification, properties and environmental aspect. US Environmental Protection Agency, Research Triangle Park, NC, EPA-600/2-85/010.
- Chung, K. T. and E. Stevens (1992), The reduction of azo dyes by the intestinal microflora, *Crit. Rev. Microbiol.* **18**, 175-190.
- Paszczynski, A., M. B. Pasti-Grigsby, S. Goszczynski, R. L. Crawford, and D. L. Crawford (1992), Mineralization of sulfonated azo dyes and sulfanilic acid by *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3598-3600.
- Spadaro, J. T., M. H. Gold, and V. Renganathan (1992), Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 2397-2401.
- Chivukula, M., J. T. Spadaro, and V. Renganathan (1995), Lignin peroxidase-catalyzed oxidation of sulfonated azo dyes generates novel sulfophenyl hydroperoxides, *Biochemistry* **34**, 7765-7772.
- Bumpus, J. A. and S. D. Aust (1990), Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **56**, 1114-1118.
- Goszczynski, S., A. Paszczynski, M. B. Pasti-Grigsby, R. L. Crawford, and D. L. Crawford (1994), New pathway for degradation of sulfonated azo dyes by microbial peroxidases of *Phanerochaete chrysosporium* and *Streptomyces chromofuscus*, *J. Bacteriol.* **176**, 1339-1347.
- Pasti-Grigsby, M. B., A. Paszczynski, S. Goszczynski, D. L. Crawford, and R. L. Crawford (1992), Influence of aromatic substitution patterns on azo dye degradability by *Streptomyces* sp. and *Phanerochaete chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.* **58**, 3605-3613.
- Paszczynski, A. and R. L. Crawford (1991), Degradation of azo compounds by ligninase from *Phanerochaete chrysosporium*: involvement of veratryl alcohol, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **178**, 1056-1063.
- Spadaro, J. T. and V. Renganathan (1994), Peroxidase-catalyzed oxidation of azo dyes: mechanism of disperse yellow 3 degradation, *Arch. Biochem. Biophys.* **312**, 301-307.
- Altow, S. C., A. L. Bonadonna, and A. M. Klibanov (1984), Dephenolization of industrial waste water catalyzed by polyphenol oxidase, *Biotechnol. Bioeng.* **26**, 599-603.
- Klibanov, A. M., T. M. Tu, and K. P. Scott (1983), Peroxidase-catalyzed removal of Phenols from coal-conversion waste waters, *Science* **221**, 259-261.
- Maloney, S. W., J. Manem, J. Mallevalle, and F. Fiessinger (1986), Transformation of trace organic compounds in drinking water by enzymatic oxidative coupling, *Environ. Sci Technol.* **20**, 249-253.
- Davis, S and R .G. Burns (1992), Covalent immobilisation of laccase on activated carbon for phenolic effluent treatment, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37**, 474-479.
- Davis, S and R. G. Burns (1990), Decolorization of phenolic effluent by soluble and immobilized phenol oxidase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **32**, 721-726.
- Shuttleworth, K. L. and J. M. Bollag (1986), Soluble and immobilized laccase for the transformation of substituted phenols, *Enzyme Microb. Technol.* **8**, 171-178.
- Leonowicz, A., J. M. Sarkar, and J. M. Bollag (1988), Improvement in stability of an immobilized fungal laccase, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **29**, 129-135.
- Froehner, S. C. and K. Eriksson (1975), Properties of the glycoprotein laccase immobilized by two methods, *Acta. Chem. Scand.* **29**, 691-694.
- Bradford, M. M. (1976), A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* **72**, 248-254.
- Wilson, S. A., K. Peek, R. M. Daniel (1994), Immobilization of proteinase from the extremely thermophilic organism *Thermus RT41A*. *Biotechnol. Bioeng.* **43**, 235-239.
- Gottschalk, N. and R. Jaenicke (1991), Authenticity and reconstitution of immobilized enzymes: characterization and denaturation: renaturation of glucomylase II, *Biotechnol. Appl. Biochem.* **14**, 324-335.
- Clark, D.S. (1994), Can immobilization be exploited to modify enzyme activity?, *Trends Biotechnol.* **12**, 439-443.
- Li, K., F. Xu, and K. Eriksson (1999), Comparison of fungal laccase and redox mediator in Oxidation of a Nonphenolic lignin Model compound, *Appl. Environ. Microbiol.* **65**, 2654-2660.