

## Laccase를 이용한 Triclosan의 처리

김영진<sup>†</sup>

맥길대학교 토목공학과

## Oxidative Transformation of Triclosan by Laccase

Young Jin Kim<sup>†</sup>

Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University

(Received February 4, 2005; Accepted March 7, 2005)

### ABSTRACT

The oxidative transformation of triclosan with laccase from *Trametes versicolor* was conducted in a closed, temperature controlled system containing phosphate buffer for pH control. The optimum pH for triclosan transformation showed about 5. Despite the observation that elevated temperatures tended to inactivate the enzyme, increased transformation of triclosan was observed up to 50°C. Of the mediators studied, ABTS was most successful at enhancing triclosan transformation. About 80% of the toxicity of the initial mixture was reduced after the enzymatic treatment. In the presence of 1.0 mM of anions such as sulfite, sulfide, and cyanide, triclosan transformation was greatly inhibited. Chloride and fluoride ions exhibited inhibition of triclosan transformation at 25 mM. Ferric ion substantially inhibited triclosan transformation at 1.0 mM.

**Keywords:** laccase, triclosan, 2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether, *Trametes versicolor*, antibiotic

### I. 서 론

Laccase(benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)는 여러 개의 구리분자를 갖고 있는 polyphenol oxidase의 하나로 폴리페놀, 메톡시페놀, 디아민, 또는 안트라센과 같은 다환족 탄화수소를 산화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.<sup>1,2)</sup> 이 효소는 산화반응을 위해 분자상태의 산소를 이용하기 때문에 과산화수소를 필요로 하는 peroxidase보다 취급이 쉬운 장점을 갖고 있다. 최근 이 효소를 이용하여 산업폐수에 포함된 난분해성 오염물질의 분해 및 이들이 갖는 독성을 제거하는 연구가 이루어지고 있다.<sup>3)</sup>

Triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether)은 광범위 항균물질로서 탈취용 비누나 샤워용 젤 등 개인위생용품에 널리 사용되고 있다.<sup>4)</sup> 또한 이 화합물은 주방용 스펀지나 속옷 같은 곳에 항균성을 부여하기 위해서도 이용되고 있다.<sup>5)</sup> Triclosan은 이 화합물이 포함

된 개인위생용품의 일상적인 사용을 통해 환경생태계로 들어가고 있으며, 북미나 유럽의 하천과 폐수에서 흔히 발견되고 있다.<sup>6,8)</sup> 이 화합물은 환경에서 수생 생물에 대한 독성,<sup>9)</sup> 내성을 가진 세균의 출현<sup>10)</sup> 및 내분비계 교란물질<sup>11)</sup>로 작용할 수 있기 때문에 환경으로의 배출에 상당한 관심을 기울여야 한다. 또한, triclosan은 통상의 폐수처리방법을 사용하게 되면 광반응에 의해 다이옥신으로 전환될 수 있기 때문에 기존의 처리방법을 대체할 수 있는 새로운 처리방법과 triclosan이 포함된 폐수의 처리수의 재사용에 대해 검토할 필요가 있다.<sup>12)</sup>

따라서 본 연구에서는 (1) laccase를 이용한 triclosan의 처리 가능성; (2) pH 및 온도에 의한 영향과 처리된 용액의 독성 확인; (3) mediator와 폐수성분에 의한 처리효과에 대해 조사하였다.

### II. 재료 및 방법

#### 1. 실험재료

Laccase (*Trametes versicolor*), triclosan (2,4,4'-trichloro-2'-hydroxydiphenyl ether), ABTS (2,2'-azino-bis-(3-

<sup>†</sup>Corresponding author : Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University  
Tel: 1-514-398-6860, Fax: 1-514-398-736  
E-mail : jin2701@hanmir.com

ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), SA (syngic acid), TEMPO (2,2,6,6-tetramethoxypiperidine 1-Oxyl), HBT (1-hydroxy-benzotriazole),  $\text{Fe}(\text{NO}_3)_3$ , 구연산, 구연산나트륨은 Sigma-aldrich (Oakville, Ont.)에서 구입하였다. 메탄올, 초산, 초산나트륨, NaCl, NaF는 Fisher Scientific(Montreal, QC)에서 구입하였다.  $\text{Na}_2\text{SO}_3$ ,  $\text{Na}_2\text{S}$ ,  $\text{CuSO}_4$ , NaCN는 Anachemia (Montreal, QC)에서 구입하여 사용하였다.

## 2. 분석방법

Laccase의 활성은 ABTS 산화에 의한 발색법으로 측정하였다.<sup>13)</sup> 반응액의 조성은 2.5 mM ABTS, 100 mM citrate/phosphate 완충용액(pH 4.5)과 적정량의 효소액을 1 ml로 만들어 25°C에서 반응을 시켰다. 1 Unit는 1분 동안 1  $\mu\text{M}$ 의 ABTS의 산화에 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

소량의 초산원액을 반응액에 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 반응액에 포함된 triclosan의 분석은 ZORBAX SB-C18 컬럼(Agilent, USA)이 장착된 HPLC 1100(Agilent, USA)을 이용하여 분석하였다. 분석조건은 199 nm에서 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다(water : acetonitrile=30/70, v/v).

시료의 독성은 Microtox M500 (MICROBICS, USA)을 이용하여 측정하였다. 광도는 발광세균(*Vibrio fischeri*)의 현탁액에 시료의 투입 전과 투입 5분 후에 측정하였다. 발광세균에 대한 활성측정은 100 mg/l의 페놀표준용액을 이용하여 확인하였다. 발광세균의 페놀에 대한 EC50는 14.4±1.3 mg/l(95%의 신뢰구간)로 제작자의 권장값과 일치하였다. 시료는 독성을 측정하기 전에 NaOH(0.1%, w/v)를 이용하여 pH 6.5로 조절하였다.

## 3. 실험방법

Triclosan은 20  $\mu\text{M}$ 의 초기 농도에서 인산완충용액(25 mM)을 이용하여 정해진 온도에서 30분간 10 ml 갈색 반응조에서 반응시켰다. 반응시작 전에 완충용액이 든 반응조를 심하게 흔들여 산소를 완충용액에 용해시켰다. 반응액의 초기 효소활성은 1.5 U/ml가 되도록 조절하였다. Triclosan은 100% 메탄올에 2.0 mM의 농도로 보관용액을 제조하여 사용하였다.

Triclosan 처리에 대한 pH 실험은 pH 3-8의 범위에서 25 mM 인산완충용액을 사용하여 실험하였다. 온도에 대한 영향은 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60°C의 온도에서 실험하였다.

효소농도와 반응시간에 따른 처리효과는 20  $\mu\text{M}$ 의

triclosan을 0.15, 0.75, 1.5 U/ml의 효소활성으로 4시간 동안 측정하였다.

시료의 독성테스트를 위해 20  $\mu\text{M}$ 의 triclosan을 1.5 U/ml의 효소활성으로 4시간 동안 반응시켜 triclosan을 완전히 처리하였다. 대조군인 초기 반응액은 독성테스트 동안 반응을 막기 위해 5분 동안 열처리하여 완전히 활성을 잃은 효소를 첨가하였다.

Mediator에 의한 효과를 실험하기 위해 20  $\mu\text{M}$ 의 triclosan과 20  $\mu\text{M}$ 의 mediator를 이용하여 실험하였다. HBT, TEMPO, SA는 100% 메탄올에 용해하여 보관용액을 제조하였으며, ABTS는 탈이온수에 용해하여 보관용액을 제조하였다.

Sulfite, sulfide와 cyanide에 의한 효과를 실험하기 위해 이 이온들의 나트륨염을 탈이온수에 용해하여 보관용액을 제조하였으며, 반응액을 1.0 mM의 농도로 조절하였다.

금속이온에 의한 효과를 알아보기 위해 구리이온은 황산염을, 철이온은 질산염을 탈이온수에 용해하여 보관용액을 제조하였으며, 반응액은 1.0 mM의 농도로 조절하였다.

할로겐 이온들에 의한 효과를 실험하기 위해 염소이온과 불소이온의 나트륨염을 탈이온수에 용해하여 보관용액을 제조하였으며, 반응액의 농도는 25 mM로 조절하였다.

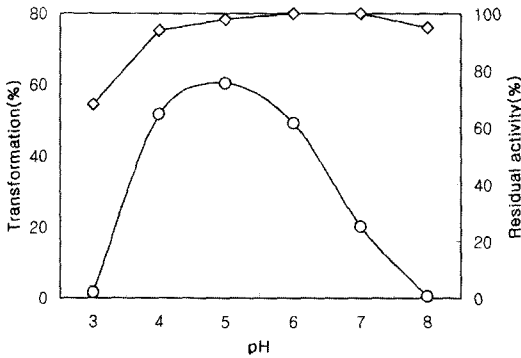
모든 실험은 2회 실시하였으며, 평균값을 사용하였다.

## III. 결과 및 고찰

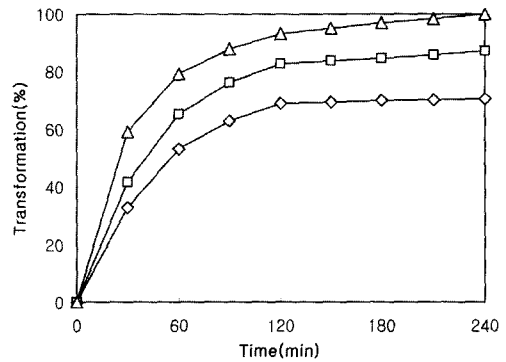
Triclosan은 수용액에서 비교적 용해도(20°C에서 35  $\mu\text{M}$ )가 낮기 때문에 높은 농도의 보관용액을 제조하기 위해서는 유기용매를 사용하여야 한다. 따라서, triclosan을 용해하기 위해 사용되는 유기용매에 의한 처리효과를 실험할 필요가 있다. 반응액에 포함된 1%의 메탄올은 통계적으로 유의하지 않는 수준에서 triclosan의 처리를 저해하였다(미발표 자료).

Laccase를 이용하여 triclosan을 처리할 때 처리효율은 pH, 온도 및 효소의 농도 등에 따라 영향을 받을 수 있으므로 이들의 효과를 확인하는 것이 필요하다.

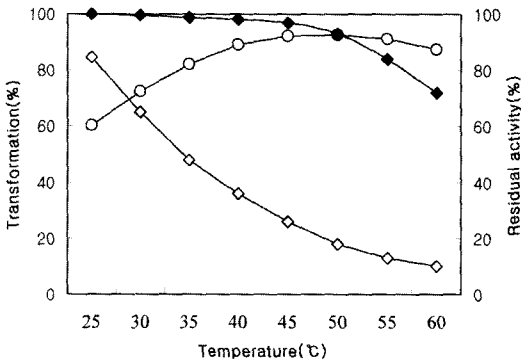
Fig. 1은 pH에 의한 triclosan의 처리효율과 laccase의 불활성화를 보여주고 있다. Laccase를 이용한 triclosan의 처리는 산성조건에서 효율이 높았으며, 최적의 pH는 대략 5였다. 이 최적값은 보고된 laccase의 등전위점보다 약간 높은 값을 보여주고 있다.<sup>14)</sup> 또한, Fig. 1을 보면 laccase는 triclosan이 용해되지 않은 반응액의 pH 4-8 사이에서 비교적 활성이 안정적인 것을



**Fig. 1.** Effect of pH on triclosan transformation (○) and residual activity when incubated without triclosan (◇). Reaction conditions: 20 μM triclosan, 1.5 U/ml laccase, 25 mM phosphate buffer, 25°C, with a reaction time of 30 min.



**Fig. 3.** Time course of laccase-catalyzed triclosan transformation on the concentration of the enzyme (◇; 0.15 U/ml, □; 0.75 U/ml, △; 1.5 U/ml). Reaction conditions: 20 μM triclosan, 25 mM phosphate buffer (pH 5.0), 25°C, with a reaction time of 4 hours.



**Fig. 2.** Effect of temperature on triclosan transformation (○) and residual activity of laccase when treating triclosan (◇) and when incubated without triclosan (◆). Reaction: 20 μM triclosan, 1.5 U/ml laccase, 25 mM phosphate buffer (pH 5.0), with a reaction time of 30 min.

볼 수 있다. 이 결과는 *Trametes versicolor*에서 유래된 laccase로 triclosan을 처리할 때 반응이 완충용액의 pH에 좌우된다는 것을 보여주고 있다. 또한, 높은 pH에서 triclosan이 독성이 강한 다이옥신으로 전환될 수 있기 때문에 산성조건에서 triclosan을 처리하는 것이 바람직하다고 생각된다.<sup>12)</sup>

Fig. 2는 triclosan 처리 시 온도의 영향을 보여주고 있다. 결과를 보면 처리효율은 50°C까지 증가되다가 50°C를 넘으면 처리효율이 감소하고 있다. 50°C를 넘으면 효소의 불활성화 속도가 반응속도의 증가보다 커서 결과적으로 처리 효율이 감소하고 있다. 또한, 높은 온도에서의 처리효율이 떨어지는 것은 높은 온도에서 용존산소의 감소에 의해서도 영향을 받을 수 있다.<sup>14)</sup> 특

히 반응액에서의 잔류효소활성은 25 °C 이상에서 크게 감소하고 있다. 따라서, laccase로 triclosan을 처리할 때 상온이나 상온에 유사한 조건에서 처리하는 것이 효소의 불활성화를 최소화할 수 있기 때문에 바람직하다고 생각된다.

Fig. 3은 laccase를 이용한 triclosan의 처리 시 triclosan의 처리효율이 효소의 농도에 의존하고 있는 것을 보여주고 있다. 효소활성이 1.5 U/ml인 경우, triclosan은 4시간 동안 100% 처리 되었으나, 0.15 U/ml의 경우 triclosan의 71% 만이 처리되었다. 산화환원 효소의 이 같은 불활성화는 폐놀계 화합물의 산화반응시 흔히 발생하는 현상으로 알려져 있다.<sup>14,15)</sup> 따라서, 반응 중 효소의 불활성 메커니즘에 대한 연구와 이를 막을 수 있는 적절한 방법을 개발하는 것이 필요하다.

폐기물처리에 효소를 사용하는 주된 목적 중에 하나는 처리된 오염물질을 처리 후 독성을 갖지 않는 생성물로 전환시키는 것이다. 따라서, 처리된 반응액의 독성이 증가하는 지를 확인하였다. Table 1은 처리된 반응액의 독성테스트 결과를 보여주고 있는데, 처리된 반응액은 초기 반응액에 비해 독성이 약 80% 감소하였

**Table 1.** Comparison of toxicities between the initial mixture and the treated mixture

Sample	Transformation (%)	Relative toxicity (%)
Initial mixture	0	100
Reaction mixture treated <sup>a</sup>	100	21

<sup>a</sup>: Reaction conditions: 20 μM triclosan, 1.5 U/ml laccase, 25 mM phosphate buffer (pH 5.0), 25°C, with a reaction time of 4 hours.

**Table 2.** Effect of mediators on laccase catalyzed triclosan transformation

Mediator	Concentration ( $\mu\text{M}$ )	Transformation (%)
Control	-	59
SA	20	57
ABTS	20	100
TEMPO	20	35
HBT	20	59

Reaction conditions: 20  $\mu\text{M}$  triclosan, 20  $\mu\text{M}$  mediator, 1.5 U/ml laccase, 25 mM phosphate buffer (pH 5.0), 25°C, with a reaction time of 30 min. (SA; syringic acid, ABTS; 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), TEMPO; 2,2,6,6-tetramethoxypiperidine 1-Oxyl, HBT; 1-hydroxy-benzotriazole)

다. 이와 같은 결과는 laccase가 triclosan이 포함된 폐수처리에 효과적으로 사용될 수 있는 것을 보여주고 있다.

Laccase에 의한 처리효율은 mediator를 사용하여 향상시킬 수 있다. Table 2는 laccase/ABTS 시스템이 triclosan의 처리에 가장 효과적임을 보여주고 있다. 그러나, HBT, TEMPO와 SA 같은 mediator들은 다른 화합물의 처리에 효과적이라고 알려져 있으나,<sup>16)</sup> triclosan의 처리에는 효과가 없는 것으로 나타나고 있다. 따라서, 이 laccase/ABTS는 triclosan의 처리를 촉진하여 효소의 사용을 줄일 수 있기 때문에 산업현장에서의 적용 가능성을 검토할 필요가 있다.

Sulfite, sulfide, cyanide, ferric, copper, chloride, fluoride 이온들에 의한 triclosan의 처리효과에 대해 실험하였다. 이 이온들은 laccase에 의한 비스페놀A 처리시 효소반응을 억제한다고 알려져 있다.<sup>17)</sup> Table 3는 이들 이온들에 의한 실험결과를 보여주고 있다. Sulfide와 sulfite는 1.0 mM의 농도에서 triclosan의 처리효율을 크게 저해하였다. 이 sulfite와 sulfide 이온들은 비스페놀A 처리시 용존산소에 대해 효소와 경쟁적으로 작용하는 것으로 알려져 있으며, triclosan의 처리에서도 같은 작용을 하는 것으로 생각된다.<sup>17)</sup> Cyanide, Cu(II), Fe(III) 이온들도 1.0 mM의 낮은 농도에서 triclosan의 처리를 저해하였다. 이 이온들은 laccase의 전자전달시스템에 영향을 주는 것으로 알려지고 있으며, 결과적으로 전자전달시스템이 제대로 작동하지 않아 triclosan의 처리가 저해되는 것으로 생각된다.<sup>18,19)</sup> 또한, Table 3을 보면 chloride과 fluoride 이온들은 25 mM의 농도에서 triclosan의 처리를 저해하고 있다. 특히 fluoride 이온에 의한 저해효과가 크게 나타나고 있다. Fluoride 이온에

**Table 3.** Triclosan transformation as a function of the dissolved ions

Dissolved ions	Concentration (mM)	Transformation (%)
Control	-	59
Sulfite	1.0	7
Sulfide	1.0	6
Cyanide	1.0	3
Ferric	1.0	31
Cupric	1.0	53
Chloride	25	35
Fluoride	25	5

Reaction conditions: 20  $\mu\text{M}$  triclosan, 1.5 U/ml laccase, 25 mM phosphate buffer (pH 5.0), 25°C, with a reaction time of 30 min.

의한 효소반응의 저해는 여러 종류의 laccase를 이용한 난분해성 오염물질의 처리에서 보고되고 있으며, laccase의 copper centre를 저해하는 것으로 알려지고 있다.<sup>17,20,21)</sup>

따라서, triclosan이 포함된 산업폐수의 처리시 이와 같은 이온들의 확인과 이들의 효소반응에서의 잠재적인 영향에 대해 자세한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

#### IV. 결 론

이 연구는 *Trametes versicolor*에서 유래된 laccase가 triclosan의 처리에 효과적으로 사용될 수 있다는 것을 보여주고 있다.

Triclosan 처리의 최적 pH는 대략 5였으며 산성조건에서 효과적으로 처리되었다. 처리효율은 50°C까지 증가하였다. Laccase는 triclosan이 포함된 반응액의 독성을 상당히 감소시킬 수 있으므로 triclosan 처리에 유용하게 사용될 수 있다. Laccase/ABTS 시스템은 triclosan의 처리효율을 증가시킬 수 있으며, 비스페놀A의 처리시와는 달리 반응액의 색변화를 초래하지 않기 때문에 산업현장에서 적용될 수 있을 것이라고 생각된다.

Sulfite와 sulfide 같은 환원성 이온들은 1.0 mM의 농도에서 용존산소에 대해 laccase와 경쟁적으로 작용하여 효소반응을 저해하고 있어 이들이 포함된 triclosan 폐수를 효과적으로 처리하기 위해서는 충분한 양의 용존산소가 공급되어야 한다. 어떤 폐수성분들은 효소반응에 대해 부정적인 영향을 줄 수 있다. 특히, cyanide, Cu(II) 및 Fe(III)와 같은 전자전달 제해제는 1.0 mM의 농도에서 효소반응을 상당히 저해하고 있으며 cyanide는 97%의 저해를 나타냈다. 또한, fluoride와 chloride

같은 할로젠 이온들도 25 mM의 농도에서 triclosan의 처리 시 laccase의 반응을 억제하고 있다. 따라서, laccase로 triclosan이 포함된 폐수를 처리할 때 이들에 의한 저해를 막기 위해 이들 이온들의 농도에 대해 모니터링을 하는 것이 필요하다.

Laccase를 이용한 triclosan의 처리는 기존의 처리방법을 사용할 때 발생하는 다이옥신의 생성을 막을 수 있고, 고농도의 triclosan을 처리할 수 있는 장점을 갖고 있으나 특정 이온들에 의해 효소반응이 저해되는 문제점을 갖고 있어 고정화효소와 같은 방법을 사용하여 이들 이온들에 의한 저해를 극복할 수 있는 연구가 필요할 것으로 사료된다.

### 참고문헌

- Motoda, S. : Purification and Characterization of Polyphenol Oxidase from *Trametes* sp. MS39401. *J. Bios. Bioen.*, **87**(2), 137-143, 1999.
- Johannes, C. and Majcherczyk, A. : Natural Mediators in the oxidation of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Laccase Mediator Systems. *Appl. Environ. Microbiol.*, **66**(2), 524-528, 2000.
- Gianfreda, L., Sannio, F., Rao, M. A. and Bollag, J. -M. : Oxidative transformation of phenols in aqueous mixtures. *Water Res.*, **37**, 3205-3215, 2003.
- Bhargava, H. N. and Leonard B. S. : Triclosan : Applications and safety. *Am. J. Infect. Control.*, **24**, 209-218, 1996.
- Adolfsson-Erici, M., Pettersson, M., Parkkonen, J. and Sturve, J. : Triclosan a commonly used bactericide found in human milk and in the aquatic environment in Sweden. *Chemosphere*, **46**, 1485-1489, 2002.
- Sabaliunas, D., Webb, S. F., Hauk, A., Jacob, M. and Eckhoff, W. S. : Environmental fate of Triclosan in the River Aire Basin, UK. *Water Res.*, **37**, 3145-3154, 2003.
- Boyd, G. R., Reemtsma, H., Grimm, D. A. and Mitra, S. : Pharmaceuticals and personal care products (PPCPs) in surface and treated waters of Louisiana, USA and Ontario, Canada. *Sci. Total Environ.*, **311**(1-3), 135-149, 2003.
- Wind, T., Werner, U., Jacob, M. and Hauk, A. : Environmental concentrations of boron, LAS, EDTA, NTA and Triclosan simulated with GREAT-ER in the river Itter. *Chemosphere*, **54**(8), 1145-1154, 2004.
- Ishibashi, H., Matsumura, N., Hirano, M., Matsuoka, M., Shiratsuchi, H., Ishibashi, Y., Takao, Y. and Arizono, K. : Effects of triclosan on the early life stages and reproduction of medaka *Oryzias latipes* and induction of hepatic vitellogenin. *Aquatic Toxicol.*, **67**(2), 167-179, 2004.
- Braoudaki, M. and Hilton, A. C. : Adaptive resistance to biocides in *Salmonella enterica* and *Escherichia coli* O157 and cross-resistance to antimicrobial agents. *J. Clin. Microbiol.*, **42**, 73-78, 2004.
- Foran, C. M., Bennett, E. R. and Benson, W. H. : Developmental evaluation of a potential non-steroidal estrogen: triclosan. *Mar. Environ. Res.*, **50**, 153-156, 2000.
- Mezcua, M., Gómez, M. J., Ferrer, I., Aguera, A., Hernando, M. D. and Fernández-Alba, A. R. : Evidence of 2,7,8-dibenzodichloro-p-dioxin as a photodegradation product of triclosan in water and wastewater samples. *Anal. Chim. Acta*, **524**(1-2), 241-247, 2004.
- Wolfenden, B. S. and Wilson, R. L. : Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis of 2,2-azino-bis-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Perkin. Trans.*, **2**, 805-812, 1982.
- Kim, Y. J. : Reaction Conditions for Laccase Catalyzed Degradation of Bisphenol A. *Kor. J. Env. Hlth.*, **30**(2), 79-83, 2004.
- Chan, H. C., Holland, R. D., Bumpus, J. A., Churchwell, M. I. and Doerge, D. R. : Inactivation of *Coprinus cinereus* peroxidase by 4-chloroaniline during turnover: comparison with horseradish peroxidase and bovine lactoperoxidase. *Chem. Biol. Inter.*, **123**, 197-217, 1999.
- Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. and Dalboge, H. : Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Appl. Environ. Microbiol.*, **62**, 834-841, 1996.
- Kim, Y. J. : Impact of Dissolved Wastewater constituents on Laccase-Catalyzed Treatment of Bisphenol A. *Kor. J. Env. Hlth.*, **30**(2), 161-166, 2004.
- Ragusa, S., Cambria, M. T., Pierfederici, F., Scirè, A., Bertoli, E., Tanfani, F. and Cambria, A. : Structure-activity relationship on fungal laccase from *Rigidoporus lignosus*: A Fourier-transform infrared spectroscopic study. *Biochim. Biophys. Acta*, **1601**, 155-162, 2002.
- Baldrian, P. : Interactions of heavy metals with white-rot fungi. *Enzyme Microb. Technol.*, **32**(1), 78-91, 2002.
- Ryan, S., Schnitzhofer, W., Tzanov, T., Cavaco-Paulo, A. and Gübitz, G. M. : An acid-stable laccase from *Sclerotium rolfsii* with potential for wool dye decolorization. *Enzyme Microb. Technol.*, **33**, 766-774, 2003.
- Höfer, C. and Schlosser, D. : Novel enzymatic oxidation of Mn<sup>2+</sup> to Mn<sup>3+</sup> catalyzed by a fungal laccase. *FEBS Letters*, **451**, 186-190, 1999.