

(12) リグニン分解酵素の活性に影響を及ぼす因子と粗酵素による アゾ染料の脱色

Factors Influencing the Activities of Ligninolytic Enzymes and
Decolorization of Azo Dyes by the Crude Enzymes

尾崎博明*, 呉 楓*, 今田敏弘*, 寺島 泰*

Hiroaki OZAKI, Feng WU, Toshihiro IMADA, Yutaka TERASHIMA

ABSTRACT; The factors influencing the activities of extracellular enzymes {lignin peroxidase (LiP) and manganese peroxidase (MnP)} synthesized by white rot fungus, *Phanerochaete chrysosporium*, were investigated by batch culture experiments. Veratryl alcohol produced as a secondary metabolite from glucose was found to be the most important substrate enhancing LiP activity. Tween80 (a surface active agent) was considered to play an important role in LiP secretion. The LiP activity was maximal under the nitrogen sufficient condition as a response to carbon starvation, compared with the activities under both conditions of the nitrogen limited and nitrogen excess. The MnP activity was highest under nitrogen limited condition and decreased with an increase of initial $\text{NH}_4^+\text{-N}$ concentration. The decolorization rate of azo dye (Reactive Red 22) by *Phanerochaete chrysosporium*, in the presence of both LiP and MnP activities under carbon limited condition, was greater than that in the presence of MnP under nitrogen limited condition. The azo dye was also decolorized by the crude enzyme mixture of LiP.

KEYWORDS; *Phanerochaete chrysosporium*, ligninolytic enzymes, extracellular enzymes, lignin peroxidase, manganese peroxidase, azo dye, decolorization

1. 序論

トリクロロエチレンなどの低沸点有機塩素化合物や各種農薬など、有害化学物質による水・土壌系汚染が問題となり、いくつかの物質については法的規制が行われるようになった。しかしながら、(多環)芳香族化合物などの有害かつ難分解な化合物は多種多様であり未規制のものが数多い。これらの物質は環境中に排出しないことが原則ではあるものの、現実には多くの汚染事例が報告され、効率的な汚染除去、修復技術の開発・確立が緊要な課題となっている。汚染除去・修復技術としては微生物処理法が有用であるが、土壌や活性汚泥中の微生物を利用する場合にあっては、有用な微生物を獲得するために馴養や単離操作が必要であり、また、得られた微生物も一般には基質特異性が大きいために分解可能な物質は限られてくる。

このような状況の中で著者ら¹⁾は、担子菌類に属する白色腐朽菌 *Phanerochaete chrysosporium* (以下 *P. chrysosporium* と表示) の利用について検討を進め、その培養条件を明らかにするとともに、芳香族有機

*京都大学工学部衛生工学科 (Dept. of Environ. & Sanitary Engr., Kyoto University)

塩素化合物やアゾ染料の分解に有効であること、白色腐朽菌が生産する酵素が分解にかかわっていることを明らかにしてきた。

白色腐朽菌はリグニン分解菌の一種であり、リグニン分解に関する研究は従来から数多く行われてきている。その検討において、白色腐朽菌はリグニネルオキシダーゼ（以下、LiP）、マンガニルオキシダーゼ（以下、MnP）、ラッカーゼといった酵素を分泌し、本研究で取上げる*P. chrysosporium*については6種類のLiPイソ酵素と4種類のMnPイソ酵素が粗酵素液中より分離、同定されたと報告されている²⁾。LiPは基質特異性が小さく、フェノール化合物のみならず非フェノール化合物に対しても作用することが一般のペルオキシダーゼと異なっている。一方、MnPはリグニンと関連するフェノール化合物を直接酸化できないが、 Mn^{2+} を H_2O_2 存在下で Mn^{3+} に酸化し、 Mn^{3+} が直接の酸化種として有機基質の酸化を行うとされている³⁾。また、リグニン分解の研究³⁾からは、リグニン分解酵素の活性は窒素源、炭素源、硫黄元素の欠乏下での二次代謝過程として発現するといわれている。しかしながら、固定化した白色腐朽菌を用いた最近の研究の中には、窒素源が十分量存在する条件でも酵素活性が見られるとする報告⁴⁾もあり、高い酵素活性が得られる条件については十分には明らかになっていない。汚濁物質分解機構についても、リグニン分解酵素による直接的酸化や、同酵素の触媒により生産されるフリーラジカルによる酸化など種々の可能性が考えられている。同酵素は菌体外酵素であり、有害物質を細胞外で分解できる特性や、芳香族化合物を中心に極めて非特異的に様々な物質を分解できる可能性を有していることから、汚濁物質分解の観点からは極めて有効であると考えられ、リグニン分解酵素がかかわる汚濁物質分解活性に関するより詳細な検討が望まれている。汚濁物質分解機構を一挙に明らかにすることは容易でないが、これらの検討により、*P. chrysosporium*を利用する際の好適条件や利用方法に関する知見が得られ、リグニン分解酵素の直接利用への道も開けるものと期待される。

本研究では、白色腐朽菌による汚染水・土壌の浄化・修復のための基礎として、*P. chrysosporium*を対象に、・リグニン分解酵素の活性に影響を与える培養因子、・基質となる栄養源の濃度と酵素活性の関係、・汚染物質の例としてのアゾ染料の脱色と酵素活性との関係、等について実験的な検討を行った。

2. 実験方法

2-1. 炭素制限下における酵素活性に影響を及ぼす因子

Table 1 中のC-limitation（炭素制限）欄に示す液体培地（培地a）60mLを1,000mLの三角フラスコに分注し、オートクレーブで滅菌後、*P. chrysosporium* (BKM-F-1767) の孢子懸濁液（孢子濃度約 10^6 個/mL）100 μ Lを植菌し、下記のA～Eに示す5種類の培養条件のもと、インキュベータ内で39℃において静置培養を行った。数日後、生成したリグニン分解酵素（LiP）の活性と菌体外タンパク質量を測定し、培養条件との関係を調べた。なお、培地中のmineral solutionには0.728g/Lの $MnSO_4$ のほか、 $MgSO_4$ 、NaCl、 $CoCl_2$ 等が含まれている。

[培養条件]

A. 培地aに2.5% Tween80を4mL加え、植菌

2日後にろ過滅菌済みの0.1Mのベタトリルアルコール（以下、VAと表示）を1mL添加した。また3日後から毎日、酸素の吹き込みを行った。

B. Aの培養条件でVAを添加しない。

C. Aの培養条件でTween80を添加しない。

D. Aの培養条件で酸素の吹き込みを行わない。

E. Aの培養条件でVAとTween80を添加せず、

Table 1 Composition of the basic medium

composition	C-limitation(in 1L)	N-limitation (in 1L)
Glucose	2g	10g
Ammonium Tartrate	1.10g	0.22g~5.5g
0.1M Na-aconitate buffer (pH=4.3)	100mL	100mL
Basal Medium	100mL	100mL
KH ₂ PO ₄	2.0g	20g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5g	5g
CaCl ₂	0.1g	1g
Thiamine · HCl	0.005g	0.005g
Mineral solution	70mL	700mL

酸素の吹き込みを行わない。

これらの培養条件において、VAは菌体増殖に必要な易分解性有機物（たとえばグルコース）の二次代謝物であり、LiPの基質と考えられている物質である。Tween80の働きはあまり解明されていないが、LiPの生合成に関わる可能性も指摘されている⁵⁾。また、酸素吹き込みについては、*P. chrysosporium*が好気性微生物であり酵素活性を高める作用を果す可能性がある。なお、タンパク質量の測定はBradford法⁶⁾によった。酵素活性の測定法については後述する。

2-2. 栄養源濃度とリグニン分解酵素の活性

2-1と同様の方法により培地中の窒素濃度を変えて*P. chrysosporium*の培養を行い、培養液中の栄養源（窒素、易分解性有機物としてのグルコース）がリグニン分解酵素の活性に及ぼす影響について検討した。

用いた液体培地の組成をTable 1中のN-limitation（窒素制限）欄に示す。この液体培地100mLを1,000mLの三角フラスコに分注した。上記2-1で用いた炭素制限培地と比較してグルコースは5倍量添加し、それに伴い他の一部の成分も増量した。窒素源には酒石酸アンモニウムを用い、アンモニア性窒素濃度として60mM、24mM、2.4mMの3段階に異ならせた。この窒素濃度の条件を以後、濃度の高いものから順にN-Excess, N-Sufficient, N-Limitingと表示することにする。なお、植菌量は200 μ Lとし、植菌時に酸素を90秒間吹き込み、以後3日おきに同操作を行った。また培養2日後に、ろ過滅菌済みのベラトリルアルコールを2mL添加した。培養3日後から培養液を採取し、NH₄-N濃度とグルコース濃度、並びにLiP活性とMnP活性を測定した。ここで、グルコースはアンスロン法、NH₄-Nはオートアナライザー法により測定し、LiP及びMnP活性の測定は下記の方法によった。

(1) LiP活性の測定

*P. chrysosporium*の培養液1.2mLを採取し、4℃下で遠心分離を行い上澄み液を試料とした。30～35℃下において、この上澄み液200 μ Lに基質としての0.1MのVAを40 μ L、0.1M酒石酸ナトリウム緩衝液(pH3)を3mLのほか、0.025M過酸化水素水60 μ Lを添加した。LiPはH₂O₂存在下でリグニンとそのモデル化合物の酸化分解を触媒するので、反応は過酸化水素水の添加により始まり、VAの酸化によるベラトリルアルデヒドの生成に伴う波長310nmにおける吸光度の直線的増加を吸光度計により測定した。なお、LiP活性測定にはリグニン基質を用いるべきであるが定量的解析が困難であるため、基質としてベラトリルアルコールを用いた。ここで、1分間に1 μ molのベラトリルアルデヒドを生成することができる酵素量を1Uとする。なお、MnPはベラトリルアルコールを酸化することができないことが報告されている⁷⁾。

(2) MnP活性の測定

LiP活性測定時と同様に、30～35℃下において、試料液100 μ Lに基質としての1mMのパニルアセトン0.1mL、0.5M酒石酸ナトリウム緩衝液(pH5)0.6mL、1mMのMnSO₄0.3mL、蒸留水1.8mLのほか、0.025M過酸化水素水12 μ Lを添加した。反応は過酸化水素水の添加により始まり、パニルアセトンの酸化に伴う波長336nmにおける吸光度の直線的減少を吸光度計により測定した。ここで、1分間に1 μ molのパニルアセトンを酸化することができる酵素量を1Uとする。なお、パニルアセトンはLiPによっても若干量が分解されうるが、その量は少量であるとして、ここでは上記の方法によって得られた酵素量をもってMnP活性とした。

2-3 *P. chrysosporium*によるアゾ染料の脱色

Table 1に示した炭素制限培地及び窒素制限培地を用い、2-1節あるいは2-2節の方法に従って*P. chrysosporium*の植菌と培養を行った。なお、炭素制限培地には2.5%のTween80を4mL添加し、窒素制限培地の酒石酸アンモニウム濃度は2.4mMとした。いずれの培地の場合でも酸素の吹き込みを毎日行い、培養開始2日目にVAを1.6mMになるように添加した。培養開始後5日目に、難分解性物質の1つであるアゾ染料Reactive Red22(以下、Red Bと表示)をそれぞれに投入した。Red Bの構造式をFig. 1に示す。Red B投入後

一定時間ごとに1mLずつ試験液を採取し、12,000rpmで5分間遠心分離を行い、上澄み液について分光光度計（波長512nm）を用いてRed B濃度を測定した。

2-4 粗酵素液によるアゾ染料の脱色

(1) 粗酵素液添加量の影響

アゾ染料Red Bを対象として、その分解に対する*P. chrysosporium*が生産する酵素の効果について検討した。Table 1の炭素制限培地を用いて2-1節の実験と同様に*P. chrysosporium*を培養した。植菌5日後に培養液を0.45μmのメンブランフィルターによりろ過し、ろ液を4℃以下で限外ろ過器(ADVANTEC LHP-761C, 分画分子量10,000)を用いて濃縮した。

次に、Red B濃度30mg/L、H₂O₂濃度0.45mM、酒石酸ナトリウム0.9mMになるように測定液（総量3.3mL, pH 3.0）を調整し、酵素添加量を3通りに変えてRed B濃度の経時変化を測定した。測定は吸光度計に設置したセル内で行い、波長512nmで吸光度の変化を追跡した。

(2) MnPの脱色に及ぼす影響

Red B濃度30mg/L、H₂O₂濃度0.1mM、酒石酸ナトリウム0.1mMに調整した測定液（総量2.8mL, pH 5.0）に、上記(1)で得た粗酵素液(MnPとして0.0025U/L)と0.1mMのMnSO₄を添加してRed B濃度の経時変化を測定し、MnSO₄無添加の場合の結果と比較した。なお、実験は上記(1)の実験と同様に吸光度計に設置したセル内で行った。

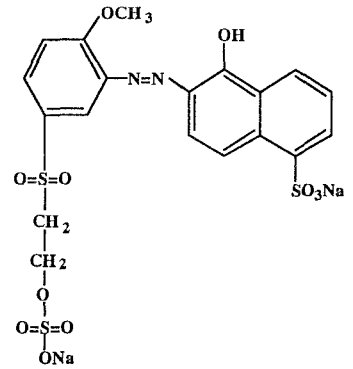


Fig.1 The chemical structure of Red B.

3. 実験結果と考察

3-1. 炭素制限下における酵素活性に影響を及ぼす因子

各種の培養条件（A～E）におけるLiP活性の経日変化をFig. 2に、また菌体外タンパク質量の経日変化をFig. 3に示す。Fig. 2とFig. 3の結果より、VAを添加しない条件下におけるLiP活性は著しく抑制された。菌

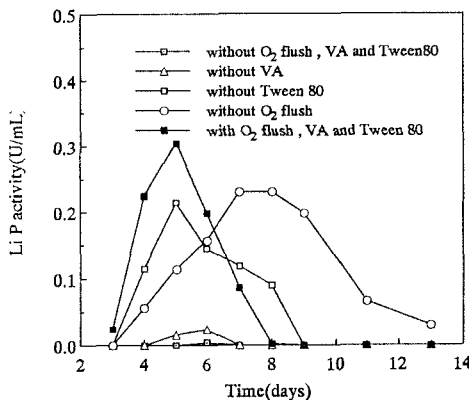


Fig.2 Effect of O₂ flush, additions of veratryl alcohol (VA) and Tween 80 on LiP production in C-limiting medium by *P. chrysosporium*

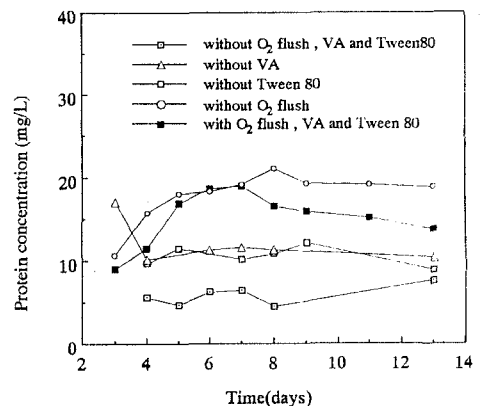


Fig.3 Extracellular Protein profile from the C-limiting media.

体外タンパク質量もVAを添加したものの半分程度であり、少なくともVAがLiP活性を高めるための必須因子であると言える。本実験は炭素制限下で行われたことから、グルコースの二次代謝物であるVAの生産量がもとと少ないうえ、VAを添加しない培養条件下ではLiP生産の誘導がされにくいために菌体外タンパク質量が少なく、活性もほとんど出現しなかったと考えられる。また、リグニン分解酵素は、培養中に菌体により生産される H_2O_2 により不活性化され、VAがリグニン分解酵素を保護することによりLiP活性が高まるとも考えられており⁸⁾、本実験でもこのような作用が働いた可能性がある。

Tween80については、LiPを保護して不活性化することをふせぎ、LiPと相互に関係してその活性を高める、などの効果を指摘する報告⁵⁾がある。Fig. 2とFig. 3より、Tween80を添加しない菌体外タンパク質量がVAを添加しない条件下とほぼ同じであるのに対し、酵素活性はVAを添加しない条件下のそれと比べて高く、すべての条件をそろえた場合と比較して低いことがわかる。この結果は、Tween80が酵素活性よりはタンパク質濃度とかかわっていることを示しており、Tween80は界面活性剤であることから、タンパク質の細胞外への分泌や基質の細胞内への取り込みに役立つことが考えられる。

P. chrysosporium は好気性生物であることから、高酸素分圧下で培養した方がリグニン分解に適していると言われている。しかし、実験結果をみると、酸素吹き込みを行わない条件下ではLiP活性が幾分抑制され、最大活性値を示す時点も他と比較して二日ほど遅れたものの十分な活性が存在し、また、活性の存在する日数が長かった。

以上の結果より、VAはLiPの生産量及び活性を高めるのに必要不可欠であることがわかった。Tween80については少なくともLiPの細胞外への分泌を促す働きがあると考えられる。酸素の吹き込みはLiP活性の出現を早める作用があるものの、活性自体を増加させる効果はないものと推察される。

3-2 栄養源濃度とリグニン分解酵素の活性

窒素制限培地（アンモニア性窒素濃度2.4mM）におけるリグニン分解酵素（LiP, MnP）の活性及び栄養源濃度の経日変化をFig. 4のaとbに示す。同様に、N-Sufficientの培地（24mM）とN-Excessの培地（60mM）におけるそれらの濃度を、それぞれFig. 4のcとd及びeとfに示す。

窒素制限の条件では培養4日目にアンモニア性窒素が完全に消失し、グルコースの減少は緩やかであった。これは窒素の消失により菌体増殖が妨げられグルコースの消費が少なくなった結果と考えられる。まずMnP活性が培養8日目に認められ、LiP活性は培養16日目にわずかに認められるに留まった。N-Sufficientの条件では、培養8日目にグルコースは完全に消失したが、アンモニア性窒素は10日目までに初期の70%が消費されてその後増加した。このアンモニア性窒素の増加は菌体の自己分解によるものと考えられる。MnPは培養11日目に活性が認められ、13日後に最大値を示したが、N-limitingの条件下における活性と比較すると低下していた。一方、LiPは13日目に急激に活性が現れ、3種の条件の中では最も高い値が得られた。N-Excessの条件では、培養9日目にグルコースが消失した。アンモニア性窒素は培養9日目までに初期の28%が消費されその後増加し、3種の条件の中では残留濃度が全体的に最も高かった。MnPは培養11日目に活性が認められ、14日後に最大値を示し、LiPは13日目に急激に活性が表われた。しかし、N-Sufficientの場合と比較するといずれの活性も低いものであった。

以上の結果から、MnPの活性はグルコースまたはアンモニア性窒素のどちらかの栄養源が欠乏した頃に、すなわち菌体の成長が停止した頃に発現し、初期アンモニア性窒素濃度の増加とともに活性が低下する傾向にあることがわかった。一方、LiP活性はグルコースの欠乏とともに出現する傾向があった。従来、多くの実験が窒素源を制限した不均衡な培地で行われていたこともあり、リグニン分解酵素の活性は、漠然と窒素源または炭素源の欠乏下において活発化されるとされてきた。しかし、Dosoretzら⁴⁾は、*P. chrysosporium*をpolyurethane foam上に固定して培養を行った結果、LiP活性は初期アンモニア性窒素濃度が2.4mMから

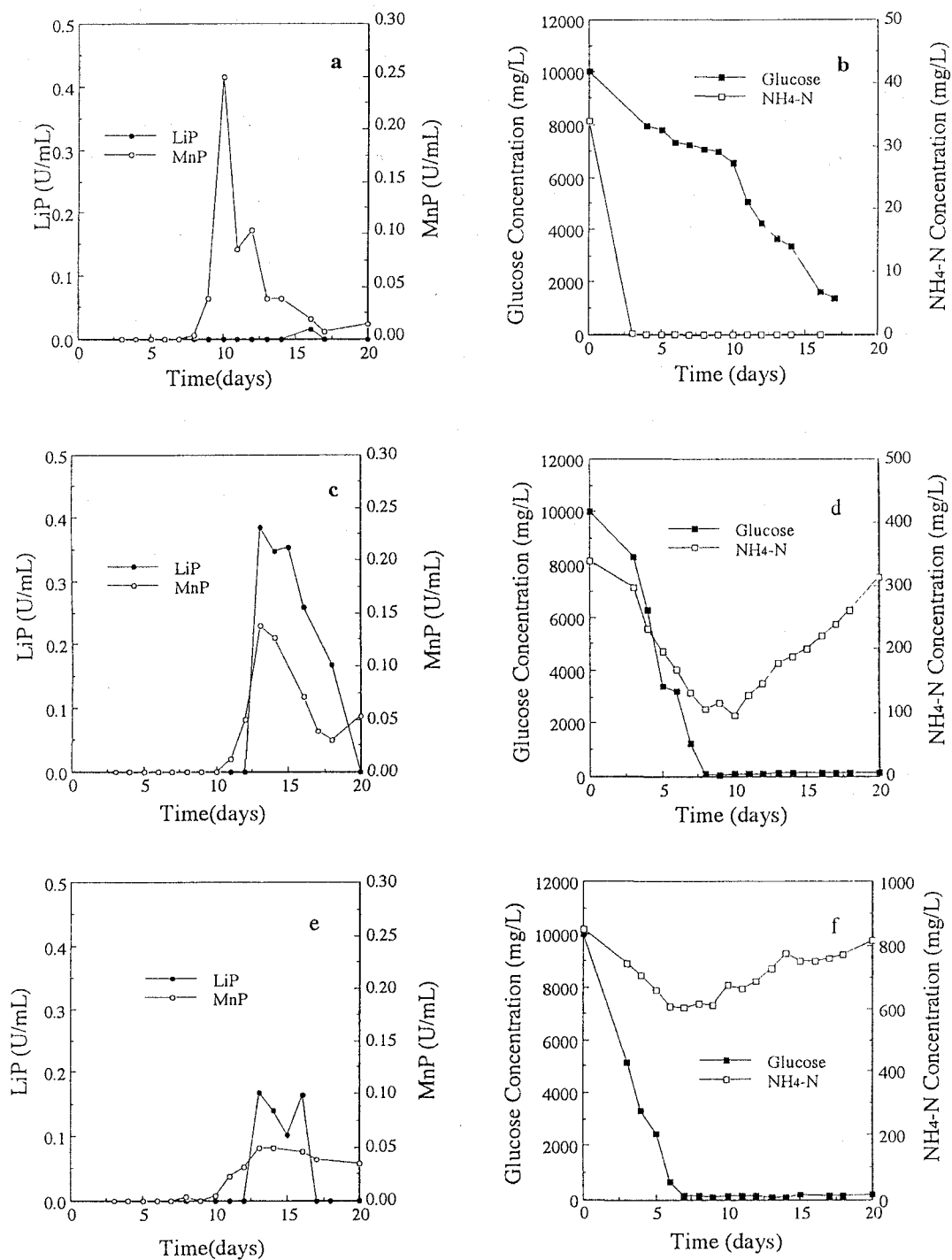


Fig.4 Time course study of ligninolytic enzyme activities and nutrient consumption under (a and b) N-limiting(2.4mM), (c and d)N-sufficient (24mM) and (e and f)N-excess(60mM) conditions.

14mMの範囲では濃度増加とともに減少し、それを越えると初期濃度の増加とともに活性値が増加することを報告している。他にもN-limiting下よりもN-Sufficient下の方がLiP活性が増大したという報告⁹⁾があり、これらの結果は、初期アンモニア性窒素濃度がある程度高い方が高いLiP活性を得るのに有利であることを示唆している。培養方法や培地量などの培養条件が異なっているため一概に比較することはできないが、本研究では、LiP活性はグルコースの欠乏とともに現われ、またN-Sufficientで活性値が最も大きいという結果が得られた。この結果は、アンモニア性窒素濃度については、ある好適な初期濃度が存在することを示している。

3-3 *P.chrysosporium* によるアゾ染料の脱色

炭素制限及び窒素制限培地におけるRed B 濃度の経時変化をFig. 5 に示す。炭素制限培地ではRed B 濃度が急激に減少しているのに対し、窒素制限培地でのRed B 濃度の減少は緩やかであった。それぞれの培地での酵素活性を測定すると、炭素制限培地では、LiP活性は0.2347U/mL（初期）、0.2008U/mL（最終）であり、MnP活性は0.0520U/mL（初期）、0.0864 U/mL（最終）であった。また窒素制限培地では、MnP活性は0.0028U/L（初期）、0.0025 U/mL（最終）のように存在したが、LiP 活性は認められなかった。以上の結果はFig. 4の結果と一致するものであり、栄養源の条件によって*P. chrysosporium*が生産する酵素の一方または両方がRed Bのような難分解性物質に作用することを示している。

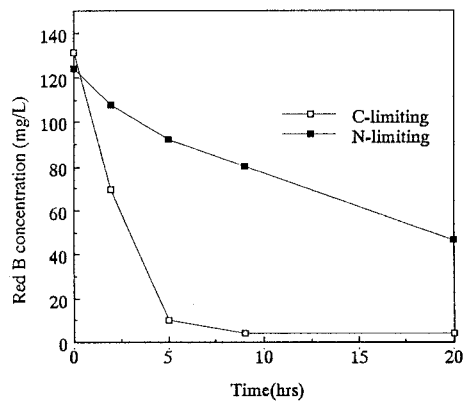


Fig. 5 Decolorization of Red B in C-limiting and N-limiting medium by *P.chrysosporium*.

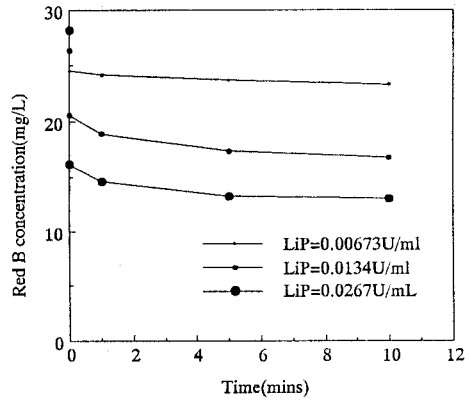


Fig.6 Effect of LiP concentration on decolorization of Red B in crude ligninolytic enzyme system containing 0.45mM H₂O₂, 0.9mM Na-tartrate buffer (pH3.0) and 0.00673-0.0267U/mL LiP.

3-4 粗酵素液によるアゾ染料の脱色

添加する酵素濃度を異ならせた時のRed B 染料の経時変化をFig. 6 に示す。図中には示していないが、酵素を含まない反応系では染料濃度に変化は見られなかった。酵素を添加すると初期の数秒間に染料濃度は急減し、酵素濃度が高いほど減少量が多くなった。染料濃度の減少速度は通常の酵素反応によるよりも速く、この結果より、染料の脱色は粗酵素液に含まれる酵素によってつくられたフリーラジカル反応に可能性がある。後述するようにMnSO₄無添加の系ではMnPの活性が現れないことから、本実験ではLiPが作用したものと考えられる。

脱色に及ぼすMnPの影響について調べた実験結果をFig. 7に示す。MnSO₄を添加した場合は無添加の場合と比較して大幅にRed B 濃度が低下している。「1. 序論」において記述したように、MnPの活性はMnSO₄存在時にのみ生じるので、MnSO₄添加時のRed B 濃度の減少は、生成したMn³⁺がRed Bを直接酸化した結果と考え

られる。一方、 MnSO_4 無添加の場合もRed B 濃度は若干減少しているが、MnPは関与せず、LiPの作用によるものと考えられる。

4. 結言

本研究では、白色腐朽菌*P. chrysosporium* が生産するリグニン分解酵素（リグニンペルオキシダーゼ (LiP) とマンガンペルオキシダーゼ (MnP)）の活性について、影響を及ぼす培養因子や栄養源との関わり、同酵素のアゾ染料分解に対する関与等について実験的な検討を行った。得られた主な結果を以下に列挙する。

- (1) リグニン分解酵素の内、LiPは一次代謝用の易分解性有機物であるグルコースが欠乏した頃に発現し、一方、MnPはグルコースまたはアンモニア性窒素のどちらか一方が欠乏した頃に発現する傾向がある。
- (2) 炭素制限下においてLiP活性が高まるためには、培地中にグルコースの二次代謝物であるベラトリルアルコール (VA) が必須である。界面活性剤Tween80は、酵素の細胞外への分泌や基質の細胞内への取り込みを促す効果を有していると考えられる。酸素の吹き込みはLiP活性の出現を早める作用があるが、活性自体を増加させる効果はないと推定される。
- (3) アンモニア性窒素濃度2.4~60mMの範囲において、LiP活性はN-sufficient (24mM) 下において最も高く、高いLiP活性を得るにはある程度窒素濃度が高い方が有利であった。また、MnP活性はN-limiting (2.4mM) 下において最も高く、初期アンモニア性窒素濃度が高くなるにつれ活性が低下する傾向がみられた。
- (4) *P. chrysosporium*によるアゾ染料 (Red B) の脱色は、窒素制限下よりも炭素制限下において顕著であった。窒素制限下ではMnP活性が、また炭素制限下ではLiP活性とMnP活性の両方が認められた。
- (5) *P. chrysosporium*の培養液を濃縮した粗酵素液はRed B 染料を脱色し、粗酵素液濃度が高いほど脱色が促進された。染料の脱色は酵素が関与するフリーラジカル反応による可能性がある。

リグニン分解酵素は基質に対して非特異的な特性を有し、酵素自体あるいはそれを生産する*P. chrysosporium*などの白色腐朽菌の土壌浄化や廃水処理への利用が期待されている。しかし、リグニン分解酵素の作用や分解機構については十分な知見がなく、今後さらに検討していかなければならない。

最後に、本研究で用いた*P. chrysosporium*の元株は、京都大学木質科学研究所の島田幹夫教授、梅沢俊明助教授より分与いただいたものであることを付記し、深謝致します。

〈参考文献〉

- 1) 尾崎博明ら；白色腐朽菌*P. chrysosporium*の増殖特性と難分解性物質分解性に関する基礎的研究，環境工学研究論文集，Vol. 31, pp. 359-367 (1994)。
- 2) Farrell R.L., et. al.; Physical and enzymatic properties of lignin peroxidase isoenzymes from *Phanerochaete chrysosporium*, Enzyme Microb. Technol., Vol. 11, June, pp. 322-328 (1989)。
- 3) 志水一允ら；木質バイオマスの利用技術，文永堂出版 (1991)。
- 4) Dosoretz C.G., et. al.; Overproduction of lignin peroxidase by *Phanerochaete chrysosporium*

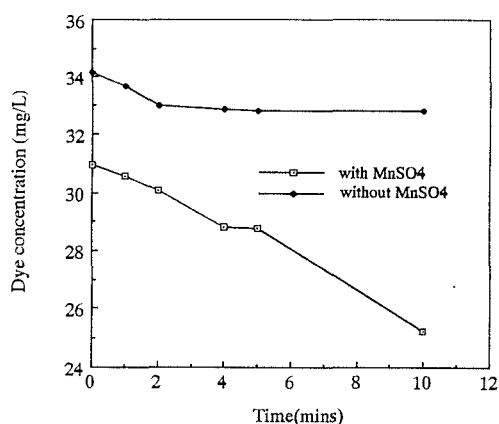


Fig.7 The contribution of the MnP to the decolorization of Red B in crude enzyme system containing 0.1mM H_2O_2 , 0.1M Na-tartrate (pH 5), 0.1mM or 0mM MnSO_4 and 0.0025U/mL MnP.

- (BKM-F-1767) under nonlimiting nutrient conditions, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 59, No. 6, pp. 1919-1926 (1993).
- 5) Asther M., et. al.; Effect of Tween 80 and oleic acid on ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium* INA-12, Enzyme Microb. Technol., Vol. 9, April, pp. 245-249 (1987).
 - 6) Bradford M. M.; A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, Anal. Biochem, Vol. 72, pp. 248-254 (1976).
 - 7) Paszczynski A., et. al.; Enzymatic activities of an extracellular, manganese-dependent peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*, FEMS Microbiology Letters, Vol. 29, pp. 37-41 (1985).
 - 8) Tonon F., et. al.; Influence of Veratryl alcohol and hydrogen peroxidase on ligninase activity and ligninase production by *Phanerochaete chrysosporium*, Applied and Environmental Microbiology, Vol. 54, No. 2, pp. 466-472 (1988).
 - 9) Buswell J. A., et. al.; Ligninolytic enzyme production by *Phanerochaete chrysosporium* under conditions of nitrogen sufficiency, FEMS Microbiology Letters, Vol. 25, pp. 295-299 (1988).