

## Hydrogen peroxide, its measurement and effect during enzymatic decoloring of Congo Red

우성환, 조정숙, 김갑정, 김은기\*

인하대학교 생물공학과 생물환경소재 연구실

Tel:032-872-2978, Fax:032-875-0827

### Abstract

The color of textile-wastewater hindered spectrometric measurements of  $H_2O_2$  and enzyme activity during enzymatic decoloring. By using ABTS, we developed a new method for measuring peroxidase activity and  $H_2O_2$  concentration. The ratio of enzyme and  $H_2O_2$  was optimized as 1:150 by investigating the effects of  $H_2O_2$  on enzymatic decoloring. Pulse feeding of  $H_2O_2$  upon depletion, significantly increased the decoloring of Congo Red.

### Introduction

산업발달에 따라 수 많은 염료들이 각종 산업에 이용되고 있으며, 이로인해 발생하는 염색폐수가 자연계로 유출되어 심각한 환경오염문제를 야기하고 있다.(1) 유출된 염료들은 그 색도 자체가 지니는 특성으로 인하여 시각적인 문제 뿐만 아니라 미생물등에 의해 분해되기 어려운 화학구조를 가졌기 때문에 장기간 자연계에 잔존하여 여러 가지 문제를 파생시키고 있다.(1, 2)

염색폐수 처리하는방법으로 리그닌을 분해하는 백색부후균인 *Phanerochate Chrysosporium* 이 생산하는 lignin peroxidase 와 식물체 유래의 Horseradish Peroxidase(HRP)를 이용한 염료분해가 보고되고 있다.(3)

HRP를 이용하여 hydrogen peroxide 를 측정하는 기존의 방법은 HRP와 4-aminoantipyrine(4-AAP) 또는 N,N-diethylaniline(DEA) 와 반응시켰을 때 생성되는 산화물인 Phenolic derivatives 또는 N,N-dialkylaniline의 생성정도, 즉  $H_2O_2$ 의 양에 따라, 생성물의 양에 의해 555nm에서 흡광도 값이 변화하는 것을 측정함으로써 과산화수소의 양을 측정하였다.(4) 그러나 Congo red, Orange II를 비롯한 수 많은 화학물질들은 555nm 주변 영역에서 빛을 흡수하는 고유의 특성을 지니므로 기존의 555nm에서 측정하는 과산화수소 정량법으로는 흡광도 값이 4-aminoantipyrine 또는 N,N-diethylaniline 의 산화물과 겹쳐지게 되어 과산화수소의 양을 측정하기가 곤란하다.

그러므로 Peroxidase를 이용한 염료의 탈색과정등과 같이 흡수대가 겹치는 염료가 존재하는 반응물 중에 존재하는 과산화수소의 정확한 정량을 위해서는 새로운 방법이 요구되어 진다.

이에 본 연구에서는 Hoerseradish Peroxidase를 이용하여 azo계 염료인 Congo Red 의 탈색을 시도하였으며 이 과정에서 pH, 온도, 과산화수소, 기질, 효소와의 상호관계를 살펴보고, Congo Red 탈색시 734 nm에서 과산화수소의 소모를 추적는 새로운 과산화수소 정량법을 이용하여 소량의 효소를 이용하여 최대 탈색효과를 얻을 수 있는 방법을 모색하고자 하였다.(5)

### Materials & Methods

#### 1. 효소활성측정

HRP의 활성은 ABTS와  $H_2O_2$ 를 기질로 사용하여 측정하였다. HRP 효소활성은 420nm 와 734 nm에서 ABTS 라디칼이 생성되는 속도를 측정하여 결정하였다.

이때 HRP활성은 기존의 효소측정법과 같이 420nm에서 흡광도를 측정하여 ABTS 1 $\mu$ M 의 산화에 작용하는 효소의 양을 1 Unit 으로 정의하였다. 또한, 734nm에서 흡광도를 측정하여

ABTS 산화시 흡광도값 0.01 증가에 작용하는 효소의 양을 1 Unit 이라 정의하였다.

## 2. 과산화수소의 정량

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 정량을 위한 표준곡선의 작성을 위해 HRP와 ABTS가 함유된 반응액에 각각 여러 농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하고 734nm에서의 흡광도변화를 측정하여 표준곡선을 작성하였다.

## 3. HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 Congo Red 의 탈색

인산염완충액(100mM, pH7) 에 Congo Red, HRP 그리고 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 각각의 반응조건에 맞도록 조정하여 30℃에서 반응시킨후 488 nm에서의 흡광도 변화를 측정하였다.

## Results and Discussion

### I. 과산화수소의 정량

#### (1) 반응 물질 흡수스펙트럼 및 반응에 따른 변화

ABTS와 HRP 가 존재할 때 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 첨가됨에 의해 일어나는 화학반응을 측정하였다.(Fig. 1) HRP- H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 에 의한 ABTS의 산화반응에서 420 nm 와 734 nm 에서 peak값이 관찰되었다.

#### (2) 기존 효소활성측정방법과의 활성비교

420nm, 734nm 에서의 흡광도가 첨가된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 비례하여 증가하는가를 알기 위해서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 변화시켰다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 비례하여 증가하였다.

#### (3) 과산화수소의 정량을 위한 표준곡선 작성

HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 를 이용하여 ABTS 의 산화시 나타나는 734nm에서의 흡광도 변화속도를 이용하여 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 정량하는 조건을 조사하였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>측정 범위는 80 μM 까지였으며 Oxidation Rate( $\Delta$  OD734/30sec) = 0.0245(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentration; μM )의 관계식을 얻을 수 있었다.(Fig.3)

### II. Congo Red 의 탈색 특성 조사

#### (1) Congo Red 의 특성

Azo 계 염료중 하나인 Congo Red는 흡수스펙트럼으로 200nm~600nm 의 영역에서 고유 흡수치를 나타내는 광화학적 특성을 지닌다.(Fig. 4) 따라서, Congo Red 탈색시 555nm에서 측정하는 기존의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 측정법으로는 Congo Red 와 파장이 겹치게되어 반응중 일어나는 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 의 양의 변화를 측정할 수 없었다.

#### (2) Kinetics of decoloring by HRP-H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>

HRP에 의한 효소반응은 두 개의 기질(H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>와 Congo Red)이 관여한다. 따라서, Peroxidase의 초기반응속도식은 두 개의 기질에 대한 농도항으로 나타낼 수 있다. 따라서 이 효소반응의 속도식은 하나의 기질농도를 일정하게 하고 또 다른 하나의 기질의 농도를 변화시킴에 의해 효소반응식을 얻을 수 있다.

### Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Concentrations on Initial Rates of the Reaction

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>농도의 변화를 기준으로 한 Kinetics 값을 non-linear regression 에 의해 나타냈다.(Data not shown)

$$V = \frac{V'_{\max} [H_2O_2]}{K'_m + [H_2O_2]}$$

위 model 에 의해 얻어진 V'max(apparent maximum reaction rate)는 0.259 OD/5min 이었으며 K'm(apparent Michaelis constant) 은 7.165 μM 이었다.

### Effect of Congo Red Concentrations on Initial Rates of the Reaction

HRP의 농도는  $4.5 \times 10^{-4}$  mM,  $H_2O_2$ 의 농도는  $80 \mu M$ 로 유지하면서 Congo Red의 농도를 변화시켜서 초기 산화속도를 얻었다. (Data not shown)

$$V = \frac{V'_{\max} [CR]}{K'_m + [CR]}$$

위 model에 의해 얻어진  $V'_{\max}$ (apparent maximum reaction rate)는 0.69 OD/5min 이었으며  $K'_m$ (apparent Michaelis constant) 은  $91.01 \mu M$  이었다. 그러므로, HRP와  $H_2O_2$ 에 의한 Congo Red 의 산화반응은 각각 Michaelis-Menten Kinetics를 잘 따르는 것으로 확인되었다.

두 식을 종합하면 다음과 같은 식을 얻을 수 있다.

$$V = V'_{\max} \left[ \frac{[H_2O_2]}{K_{H_2O_2} + [H_2O_2]} \right] \left[ \frac{[CR]}{K_{CR} + [H_2O_2]} \right]$$

### (3) Congo Red 의 최대 탈색방법 탐색

Congo Red 탈색 반응 1시간 후 약 30%, 2시간후 약 40%정도가 탈색되었고 반응시간이 계속 되어도 더 이상 탈색율이 증가되지 않았는데 탈색이 정지된 이 시점에서  $H_2O_2$ 의 농도를 측정할 결과 시료내  $H_2O_2$ 가 완전히 소모되었고, HRP의 활성은 거의 그대로 유지되어 Congo Red 의 탈색반응의 정지원인이  $H_2O_2$ 의 부족임을 확인하였다.(Fig 5)

### (4) $H_2O_2$ Pulse Feeding 효과 측정

Congo Red 의 탈색의 정지 원인이  $H_2O_2$ 의 소모로 인한 것임을 알고  $H_2O_2$ 를 주기적으로 공급한 결과 처음 약 20%을 탈색율을 보이던 것이  $H_2O_2$ 의 공급으로 약 30%, 40%로 증가하는 것을 확인하였다.(Fig. 6)

그러므로, 본 연구에서 제시한 효소활성측정법과  $H_2O_2$ 농도측정법을 이용하여 염색폐수 탈색시 효소와  $H_2O_2$ 의 농도를 추적하고 반응시간을 고려한다면 고가인 효소를 최소로 사용하면서 최대의 탈색효과를 얻을 수 있는 반응 조건을 찾을 수 있을 것이다.

### Reference

1. Meyer, U., 1981, Biodegradation of Synthetics Organic Colorants, FEMS Symp., Vol. 12, p 371-385
2. Anliker R., 1979, Ecotoxicology of dyestuffs-a Joint Effort by industry, Ecotoxicol. Environ. Saf., Vol. 3, p59-74
3. Bumpus, J. A. and S. D. Aust, 1986, Biodegradation of Environmental Pollutants by the White Rot Fungus *Phanerochate Chrysosporium* : Involvement of the Lignin degrading System, BioEssays, Vol. 6, p166-170
4. Yingping Huang, Ruxiu Cai, Luyuan Mao, Zhihong Liu and Houping Huang, 1999, Spectrophotometric Determination of Hydrogen Peroxide Using  $\beta$ -CD-Hemin as a Mimetic Enzyme of Peroxidase, Analytical Sciences, Vol. 15, p889-894
5. A. Majcherczyk, C. Johannes and A. Huttermann, 1999, Oxidation of aromatic alcohols by Laccase from *Trametes versicolor* mediated by the 2,2'-azino-bis-(3-ethylbenzothiazoline-6-sulphonic acid) cation radical and dication, Appl. Microbial Biotechnol., Vol 51, p267-276

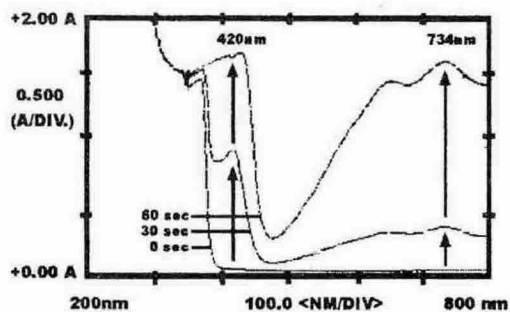


Fig. 1 Changes of absorption spectra.

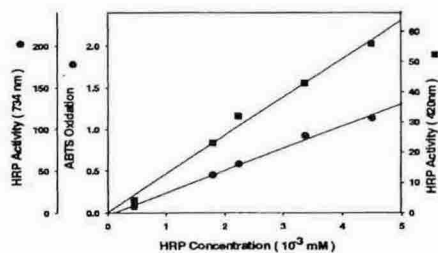


FIG. 2 Horseradish peroxidase activity at 734 nm and 420 nm

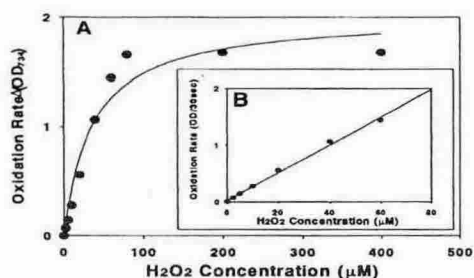


Fig. 3 Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> on the oxidation of ABTS by HRP.

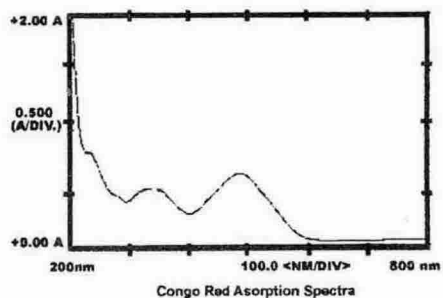


Fig. 4 Absorption spectra of Congo Red

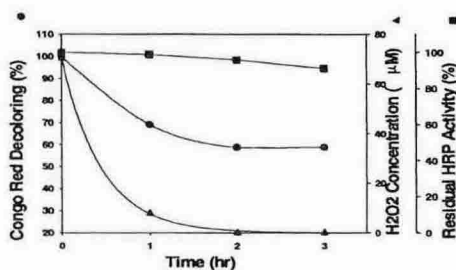


Fig. 5 Time course of decoloring

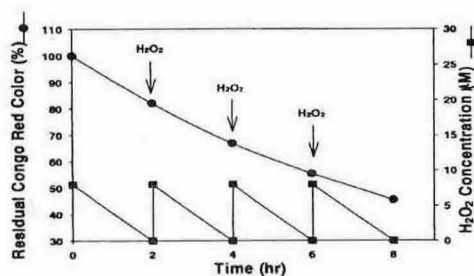


Fig. 6 Decoloring by H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> Pulse Feeding