

Peroxidase에 의한 방향성 유해물질의 제거

류근갑·박재홍·임근호
울산대학교 화학공학과

Peroxidase-Catalyzed Removal of Aromatic Pollutants

Keungarp Ryu[†], Jaehong Park, and Keunho Im

Department of Chemical Engineering, University of Ulsan, Ulsan, Kyungnam 680-749, Korea

ABSTRACT

In the removal of phenolic precipitates formed by horseradish peroxidase (HRP) and H_2O_2 from waste water, the effects of the concentrations of phenolic compounds and H_2O_2 on the removal efficiency of various phenols were studied. More than 90% of various phenolic compounds were removed from the aqueous solutions (pH 5-7) by HRP and H_2O_2 . The removal efficiency of phenolic compounds by HRP was reduced to a great extent when the initial concentration of H_2O_2 was over 10mM. Furthermore, no phenolic compounds were removed when 50mM of H_2O_2 was used. The HRP's turnover number, which indicates the number of phenolic molecules removed per one molecule of HRP, was the largest as 18047 for *p*-ethoxyphenol while it was the smallest as 1244 for *m*-chlorophenol when the initial concentrations of phenolic compounds and H_2O_2 were the same at 1mM. HRP which was separated from the aqueous solution containing phenol and H_2O_2 after 24hr of reaction revealed structural changes and diminished activity. The Soret absorbance near 404nm of this HRP sample was decreased to 48 % of that of fresh HRP. The values of k_{cat} and k_{cat}/K_m of this HRP sample for the oxidation of guaiacol were also reduced to 41% and 51% of those of fresh HRP, respectively. The removals of nonphenolic aromatic compounds such as benzene, ethylbenzene, and toluene (BET) by HRP and H_2O_2 were enhanced when phenols were coexisting in the aqueous solutions of BET.

서 론

폐수속의 방향성 유해물질을 제거하기 위해서 시도되고 있는 생물공학적인 방법으로는 미생물을 이용한 방법과 효소를 이용한 방법이 있다. 미생물을 이용한 방향성 유해물질의 분해에는 주로 white-rot fungi인 *Phanerochaete chrysosporium*(1-3)과 *Pseudomonas* 종류(4-7)가 사용되고 있다. 미생물을 이용

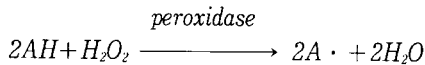
한 방법은 유해물질을 완전히 제거하기 위해서는 몇 주간의 오랜 처리시간이 소요되고, 유해물질의 농도가 높을 경우 미생물의 활성이 저해된다. 또한 폐수속에 함유되어 있는 무기물에 의해서도 미생물의 활성이 저하되기도 한다(8). 따라서 미생물을 이용한 유해물질의 분해방법은 주로 bioremediation 분야에 이용하기 위하여 연구되고 있다.

효소를 이용한 방향성 유해물질의 제거방법은 미생물을 이용한 방법과는 달리 유해물질의 농도가 높은 경우에도 적용할 수 있으며 반응시간이 미생물을

[†] Corresponding Author

이용한 방법에 비교하여 매우 짧기 때문에 산업폐수의 처리에 이용하기 적합하다. 방향성 유해물질 중 페놀을 제거하기 위하여 연구되고 있는 효소반응 방법은 크게 tyrosinase를 이용한 방법(9, 10)과 peroxidase를 이용한 방법(11-15)이 있다. Tyrosinase는 산소와 함께 페놀을 catechol 및 quinone으로 연속적으로 산화시키며(16) 생성된 퀴논은 chitin 및 chitosan흡착을 이용하여 제거한다. 그러나 이러한 방법은 퀴논이 흡착되어 있는 다량의 chitin 물질을 처리해야 하는 문제점을 발생시킨다.

Peroxidase는 H_2O_2 와 함께 페놀을 산화시켜서 페놀 라디칼을 형성시키며 전체반응식은 다음과 같다.



여기에서 AH는 페놀을, $A \cdot$ 는 페놀라디칼을 나타낸다. 반응에 의해서 생성된 페놀라디칼의 대부분은 라디칼 반응에 의하여 고분자화 된다. Peroxidase에 의해서 생성된 페놀고분자는 수용액에서 용해도가 감소하여 침전된다. 따라서 생성된 페놀침전물질은 여과 및 원심분리에 의해서 간단히 제거할 수 있다. Peroxidase를 이용한 페놀의 제거는 1983년 Klibanov에 의하여 발표된 이래로 활발히 연구되고 있다(11).

Peroxidase를 이용한 방향성 유해물질의 제거방법에는 두 가지 문제점이 있다. 첫째는, 효소반응에 의해서 생성된 페놀라디칼에 의해서 peroxidase의 활성이 저해되는 현상이다. 즉 peroxidase 한 분자당 제거될 수 있는 페놀분자의 수를 나타내는 turnover number가 반응 중 효소의 활성이 저해받지 않는 이상적인 경우에는 무한대의 값을 가질 것이나 실제적으로는 페놀의 종류에 따라서 6,000~40,000 사이의 값을 가지는 것으로 측정되었다(11, 12). 따라서 주어진 농도의 페놀을 모두 제거하기 위해서는 효소의 turnover number로부터 효소의 사용량을 결정해야 된다. 둘째는, 비 페놀성 유해물질인 BET와 nitrophenol과 같이 peroxidase와의 반응성이 없는 페놀은 peroxidase를 이용하여 제거할 수 없다는 점이다. Klibanov(1983)는 peroxidase와 peroxidase와의 반응성이 좋은 페놀을 동시에 사용하면 반응성이 미약한 polychlorinated biphenyls(PCB)을 제거할 수 있다고 보고하였다(11). 그러나 이때 사용된 H_2O_2 의 초기농도가 peroxidase의 활성이 저해되기 시작하는 H_2O_2 의 농도인 0.2mM(17)에 비하여 매우 높은 100mM로서 PCB의 제거가 peroxidase의

역할에 의한 것인지 불확실하다. Al-Kassim 등(1994)은 H_2O_2 의 농도가 2mM일 경우 두 가지 종류의 페놀이 동시에 포함되었을 경우가 각각의 페놀만이 포함되었을 경우에 비하여 제거율이 약간 증가함을 보였다(12).

본 논문에서는 대표적인 peroxidase인 HRP를 대상으로 페놀의 종류와 페놀 및 H_2O_2 의 농도가 HRP의 turnover number에 미치는 영향을 조사하여 주어진 농도의 페놀을 제거하기 위하여 필요한 HRP의 양 및 반응조건(예: H_2O_2 의 농도)을 예측할 수 있도록 하였다. 또한 HRP가 페놀에 의하여 활성의 저해를 받는 기작을 밝히고자 하였다. 최종적으로는 비페놀성 물질인 BET 및 HRP와의 활성이 미약한 페놀을 HRP와 반응성이 좋은 페놀을 첨가하여 제거하는 방법을 연구하였다.

재료 및 방법

실험재료

본 실험에서 사용한 페놀 및 BET는 Aldrich사(미국)로부터 구입하였다. 기타 시약, HRP(type II) 및 Sephadex G-25(fine grade)는 Sigma사(미국)에서 구입하였다.

분석방법

HRP의 농도는 spectrophotometer(Hewlett Packard, HP8452A)를 사용하여 404nm에서의 흡광도를 측정하고 HRP의 404nm에서의 흡광계수, $102\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 결정하였다(12).

H_2O_2 의 농도는 Few 등이 사용한 iodide 방법을 사용하여 구하였다(18). 구체적인 측정방법은 다음과 같다. 증류수 500mL에 potassium iodide 33g, sodium hydroxide 1g, ammonium heptamolybdate 0.1g을 용해시킨다(용액 A). 또 다른 증류수 500mL에 potassium hydrogen phthalate 10g을 용해시킨다(용액 B). 용액 A 1mL, 용액 B 1mL 및 증류수 2.5mL를 혼합한다. 이 혼합액에 H_2O_2 가 들어있는 용액 0.5mL를 가한 후 곧 352nm에서 혼합액의 흡광도를 측정한다. H_2O_2 의 농도는 흡광계수, $26.6\text{mM}^{-1}\text{cm}^{-1}$ 를 이용하여 계산하였다.

HRP에 의한 페놀의 제거반응

페놀이 용해되어 있는 완충용액 10mL에 HRP를 투입한 후 H_2O_2 용액을 가하여 반응을 시작하였다. 항온교반기를 이용하여 25°C에서 150rpm으로 교반

하면서 일정시간 반응시킨 후, 생성된 침전물질은 원심분리기를 이용하여 제거하였다. 이때 원심분리는 6000rpm에서 30분간 시행하였다. HRP 반응에 의한 페놀물질의 제거량은 각 페놀물질의 흡광도가 최대가 되는 파장에서, 페놀용액의 반응전 흡광도 대비, 반응 후 침전물질이 제거된 여액의 흡광도의 감소량을 측정하여 계산하였다.

반응 후 HRP의 분리 및 활성변화 측정

완충용액(100mM sodium acetate, pH 5) 10mL에 HRP 10mg과 phenol 및 H₂O₂를 최종농도가 각각 2mM과 1mM이 되도록 첨가한 후 항온교반기에서 150rpm으로 교반하면서 25℃에서 24시간 반응시켰다. 반응 후 형성된 침전물질을 원심분리에 의해서 제거한 후 여액을 동결건조 하였다. 동결건조된 여액을 약 2mL의 증류수에 용해시킨 후 Gel Permeation Chromatography(Sephadex G-25, 2.5×35cm)를 이용하여 잔류페놀 및 염을 제거하였다. 최종 효소액은 동결건조해서 효소의 분리수율을 측정한 후 Soret 파장(404nm)에서의 흡광도 및 활성을 측정하였다. HRP의 활성은 0.2mM H₂O₂와 여러 가지 농도의 guaiacol(0.4~7mM)을 기질로 한 반응에서 Michaelis-Menten 반응상수(kcat과 Km)를 측정하여 나타냈다. HRP 및 H₂O₂에 의한 guaiacol의 초기반응속도는 436nm에서의 흡광도의 증가율로 측정하였다. 여러 가지 농도의 guaiacol과 H₂O₂(농도비 1:1)가 첨가된 효소반응에서 436nm에서의 흡광도가 시간에 따라서 더 이상 증가하지 않을 때의 최대흡광도와 이때 사용한 guaiacol의 초기농도 사이의 비례관계를 이용하여 흡광도의 증가속도를 guaiacol의 소모속도로 나타내었다.

HRP와 페놀을 이용한 BET 제거실험

BET 및 페놀이 포함되어 있는 완충용액(100mM sodium acetate pH 5) 10mL에 HRP 1mg과 H₂O₂ 5mM을 가하였다. 항온교반기에서 150rpm으로 교반하면서 25℃에서 2시간 경과후 반응혼합물을 원심분리하여 침전물질을 제거하고 여액에 포함되어 있는 BET의 잔류량을 HPLC를 이용하여 측정하였다. HPLC의 분취 column은 C¹⁸ reverse-phase column(Waters, USA)을 사용하였으며 이동상으로는 CH₃CN/H₂O(60:40 v/v) 혼합액을 1mL/min의 속도로 공급하였다. 시료는 자외선검출기를 이용하여 측정하였으며 benzene은 254nm, ethylbenzene과 toluene은 262nm에서 검출하였다.

Table 1. Removal % of phenolic compounds by HRP and H₂O₂

| pH | 3 | 5 | 7 | 9 |
|------------------------|------|------|------|------|
| <i>p</i> -Ethoxyphenol | 52.6 | 63.7 | 88.0 | 85.3 |
| <i>p</i> -Ethylphenol | 78.8 | 80.4 | 80.8 | 70.6 |
| <i>p</i> -Cresol | 67.9 | 81.0 | 81.1 | 72.5 |
| Phenol | 83.9 | 84.9 | 81.1 | 59.2 |
| <i>p</i> -Chlorophenol | 79.4 | 90.0 | 85.3 | 71.5 |
| <i>o</i> -Chlorophenol | 100 | 100 | 100 | 97.2 |
| <i>m</i> -Chlorophenol | 94.0 | 97.9 | 100 | 98.2 |
| 2,4-Dichlorophenol | 71.0 | 77.2 | 70.9 | 66.5 |
| Pentachlorophenol | — | — | 74.0 | 16.0 |
| <i>p</i> -Nitrophenol | 0 | 0 | 0 | 0 |

Buffers used were sodium acetate(pH 3, 5), sodium monophosphate(pH 7), sodium borate(pH 9) at 100mM each. Reaction conditions are described in the text.

결과 및 고찰

페놀의 구조 및 반응용액의 pH가 HRP에 의한 페놀제거에 미치는 영향

Peroxidase의 기질인 페놀은 aromatic ring의 치환기 종류에 따라서 효소와의 반응성이 변화하며 특히 치환기의 전자공여성이 클수록 반응성이 증가한다(19). 본 연구에서는 반응용액의 pH를 3~9 범위에서 변화시켰을 경우 전자적인 성질이 다른 치환기를 가지고 있는 여러 가지 페놀의 HRP에 의한 제거효율을 측정하였다. 반응용액의 부피는 10mL이고 페놀 및 H₂O₂의 초기농도는 각각 1mM이었으며 HRP의 사용량은 0.1mg/mL였다. 반응은 페놀 및 HRP가 용해된 용액에 H₂O₂를 첨가한 후 25℃에서 2시간 동안 계속되었다. H₂O₂를 첨가하자마자 진한 갈색의 미세한 침전물질이 형성되기 시작하였다. 반응 후 생성된 침전물질을 원심분리에 의하여 제거한 후 여액에 잔류하고 있는 페놀의 농도를 spectrophotometer를 이용하여 측정해서 초기 페놀농도에 대한 제거율을 구하였으며 그 결과는 Table 1에 나타내었다. HRP에 의한 페놀제거율은 최적 pH값 5 및 7에서 80% 이상이었다. 그러나 2,4-dichlorophenol 및 pentachlorophenol의 경우에는 최적 pH인 5 및 7에서의 제거율이 각각 77.2%와 74%로서 낮았다. HRP와의 반응성이 미약한 *p*-nitrophenol은 pH 3~9 사이에서 전혀 제거되지 않았다. 또한 용액의 pH 범위가 3~9 사이에서 HRP에 의한 페놀의 제거율은 용액의 pH에 민감하게 변하지 않았

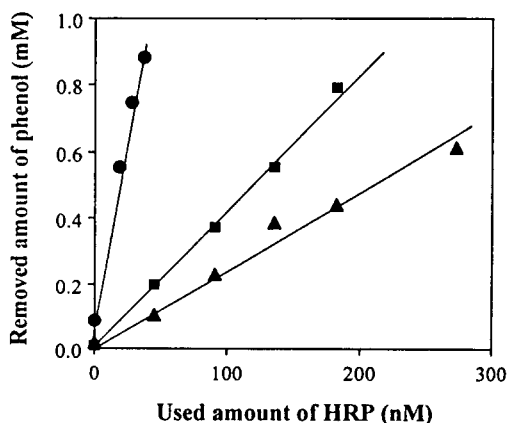


Fig. 1. Effects of HRP concentration on the removal of selected substituted phenols; (●), *p*-ethoxyphenol; (■), *p*-chlorophenol; (▲), phenol. Reaction conditions are described in the text.

다. 따라서 HRP를 이용한 페놀의 제거방법은 비교적 넓은 범위의 폐수처리에 사용 가능할 것으로 생각된다.

페놀제거를 위한 HRP의 turnover number 측정 위의 실험에서 사용한 반응시간은 2시간으로서 효소반응이 완결될 수 있는 충분한 시간이었다(12). 그러나 2시간 이내에 반응이 완결될 수 없을 정도로 반응시간이 느릴 가능성이 있으므로 반응시간을 12시간으로 증가시켰다. 이때 HRP의 사용량을 12 μ g/mL(272.7nM) 이하로 줄였을 경우 다양한 페놀에 대하여 효소 사용량의 변화에 따른 페놀의 제거량을 측정하였다. 페놀 및 H₂O₂의 초기농도는 각각 1mM이었다. 반응 중 효소의 활성이 저하되지 않는 이상적인 경우에는 충분히 오랫동안 반응을 할 경우 효소의 사용량에 관계없이 페놀의 제거율이 100%가 되어야 한다. Fig. 1에 *p*-ethoxyphenol, *p*-chlorophenol 및 phenol의 경우 예를 들어서 나타낸 것과 같이 페놀의 제거율은 효소사용량에 비례함을 보였다. 특히 phenol의 경우 반응시간을 24시간으로 증가시켜도 제거율은 반응시간이 12시간일 때와 거의 비슷하였다. 따라서 HRP가 12시간 이내에 반응용액 내에서 활성을 잃는 것을 알 수 있었다.

페놀제거량과 HRP 사용량의 비례관계로부터 HRP의 turnover number를 9종류의 페놀물질에 대하여 구했다(Table 2). HRP의 turnover number는 *p*-

Table 2. The turnover numbers of HRP to remove various phenols.

| Phenol | Turnover number |
|--------------------------------|-----------------|
| <i>p</i> -Ethoxyphenol | 18047 |
| <i>p</i> -Ethylphenol | 7983 |
| <i>p</i> -Cresol | 3109 |
| Phenol ^a | 2220 |
| Phenol ^b | 1996 |
| Phenol ^c | 2348 |
| <i>p</i> -Chlorophenol | 4330 |
| <i>o</i> -Chlorophenol | 3062 |
| <i>m</i> -Chlorophenol | 1244 |
| 2,4-Dichlorophenol | 3188 |
| Pentachlorophenol ^d | 7611 |

The initial concentrations of phenol and H₂O₂ were the same at 1mM. Various concentrations of HRP between 18 to 273nM were used in a 10mL of a buffer(100mM sodium acetate, pH 5).

^a: Phenol and HRP were added prior to the addition of H₂O₂.

^b: Phenol and H₂O₂ were added prior to the addition of HRP.

^c: Reaction time was increased to 24 h.

^d: Buffer was 100 mM sodium phosphate (pH 7).

ethoxyphenol의 경우 18047로서 가장 컸으며 *m*-chlorophenol의 경우 1244로서 가장 적었다. 또한 HRP의 turnover number는 치환기의 위치에 따라서 변화하였다. 즉 *p*-chlorophenol의 경우 HRP의 turnover number는 4330로서 *m*-chlorophenol의 경우보다 약 3.5배 증가하였다. 이러한 결과는 효소 반응에 의하여 생성된 페놀라디칼들의 반응성이 강할수록 효소의 활성이 더욱 감소하는 것을 나타낸다. 즉 *p*-ethoxyphenol의 경우 전자공여성이 있는 ethoxyl기를 가짐으로서 효소반응에 의해서 생성된 페놀라디칼의 라디칼기는 분자내에서 비편재화됨(delocalized)으로서 라디칼의 안정성이 증가하는 동시에 반응성이 감소한다. 반면에 *m*-chlorophenol의 경우 전자친화성이 큰 chloro기를 가짐으로서 라디칼이 편재되어(localized) 효소반응에 의해서 생성된 페놀라디칼의 반응성이 증가하여 생성된 후 효소분자와 반응하여 효소의 활성을 잃게 할 것이다. HRP의 turnover number는 반응물질의 투입순서에 따라서 변화하였다. 즉 phenol의 경우, HRP의 turnover number는 phenol이 함유되어 있는 용액에 HRP를

Table 3. Effects of the initial concentration of phenol and H₂O₂ on the turnover number of HRP.

| Initial concentration of phenol(mM) | Initial concentration of H ₂ O ₂ (mM) | Turnover number |
|-------------------------------------|---|-----------------|
| 0.5 | 1 | 1971 |
| 1 | 1 | 2220 |
| 2 | 1 | 1923 |
| 3 | 1 | 2730 |
| 4 | 1 | 2729 |
| 10 | 1 | 4015 |
| 20 | 1 | 4662 |
| 1 | 0.5 | 2440 |
| 1 | 2 | 2496 |
| 1 | 3 | 2156 |
| 1 | 5 | 2535 |
| 1 | 8 | 2320 |
| 1 | 10 | 1982 |
| 1 | 15 | 1603 |
| 1 | 20 | 1044 |
| 1 | 30 | 532 |
| 2 | 2 | 3989 |
| 5 | 5 | 3962 |
| 6 | 6 | 4248 |
| 8 | 8 | 1242 |
| 10 | 10 | 0 |

Various concentrations of HRP between 45.5 to 182nM were used in a 10mL of a buffer(100mM sodium acetate, pH 5).

H₂O₂보다 먼저 투입할 경우 2220으로 H₂O₂를 HRP보다 먼저 투입할 경우의 값인 1996에 비하여 약간 증가하였다. 이는 기질에 의한 효소의 안정화 경향을 보여주는 것이었다. 반응시간이 24시간일 경우 phenol 제거를 위한 HRP의 turnover number는 2348로서 반응시간이 12시간일 경우보다 약간 증가하였으나 이는 추가적인 효소반응에 의한 결과이기 보다는 생성된 페놀침전물에 의한 응집현상 혹은 효소반응에 의해서 생성된 페놀라디칼들의 추가적인 반응등 비효소적인 현상에 의한 것으로 추측된다.

Al-Kassim 등(1994)의 실험에 의하면 HRP의 turnover number가 *p*-cresol의 경우 42500이었으며 *m*-chlorophenol의 경우 5700으로서 본 실험에서 측정한 값보다 컸다(12). 그러나 이들은 하나의 효소농도에 대한 turnover number를 구하였으므로

본 논문에서와 같이 여러 범위의 효소농도를 사용하였을 경우의 비례관계로부터 구한 값보다 정확성이 떨어진다고 생각된다.

페놀 및 H₂O₂의 농도가 HRP의 turnover number에 미치는 영향

페놀제거를 위한 효소의 turnover number는 주어진 페놀량을 제거하기 위하여 필요한 효소의 사용량을 결정하기 위하여 중요하다. 따라서 페놀 및 H₂O₂의 농도가 HRP의 turnover number에 미치는 영향을 phenol을 대상으로 조사하였다(Table 3). H₂O₂의 초기농도가 1mM로 일정하고 phenol의 초기농도가 1mM(94ppm)~20mM(1882ppm) 범위에서 변화했을 때 HRP의 turnover number는 1971~4662 사이였으며 phenol의 초기농도가 증가함에 따라서 HRP의 turnover number도 증가하였다. Phenol의 초기농도를 1mM로 일정하게 하고 H₂O₂의 초기농도를 변화시켰을 경우에는 H₂O₂의 초기농도가 10mM 이상으로 증가하면 HRP turnover number는 급격히 감소하였으며 50mM 이상일 경우에는 phenol이 제거되지 않았다. 또한 phenol과 H₂O₂의 초기농도를 1:1로 유지하면서 각각의 농도를 2mM~6mM로 변화시켰을 경우 HRP의 turnover number는 3989~4248로 증가하였다. 이는 빠른 반응속도로 인하여 HRP의 활성감소정도가 크지 않은 반응초기에 많은 phenol이 제거되기 때문인 것으로 생각된다. 그러나 phenol과 H₂O₂의 초기농도를 각각 8mM로 증가시켰을 경우 peroxidase의 turnover number는 1242로 감소하였으며 10mM로 증가시켰을 경우 페놀은 거의 제거되지 않았다. 따라서 peroxidase를 효율적으로 사용하기 위해서는 반응용액 중 H₂O₂의 농도를 10mM 이하로 유지해야 함을 알 수 있었다. Phenol과 H₂O₂의 농도가 각각 2mM과 5mM이고 HRP의 양이 1mg/10mL이었을 때, 반응(25°C, 2시간) 및 원심분리 후 여액에 잔류하는 페놀성분의 양을 HPLC를 이용하여 측정한 결과 phenol은 완전히 제거되었고 여액에는 약간의 phenol oligomer들이 잔류하였으며 그 양은 peak 면적을 기준하였을 때 초기 페놀의 약 7%였다.

페놀 및 H₂O₂와의 반응에 의한 HRP의 구조 및 활성 변화

페놀제거 시 HRP가 유한한 turnover number를 가지는 결과로부터 반응에 의하여 HRP의 활성이 감소함을 알 수 있다. 본 연구에서는 반응 후 잔류반

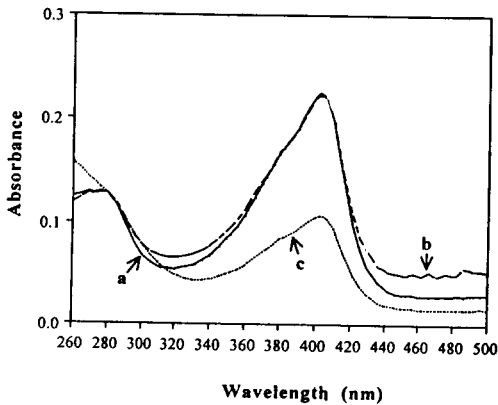


Fig. 2. The Soret-absorbance of fresh HRP (a) and HRP after storing at 25°C for 24h in the presence of phenol only (b) or both of phenol and H_2O_2 (c). The initial concentrations of phenol and H_2O_2 were 2mM and 1mM, respectively.

응물로부터 분리된 HRP의 구조변화와 활성변화를 측정하였다. Fig. 2에는 원래의 효소 (a), phenol이 2mM 첨가된 완충용액(100mM sodium acetate, pH 5)에서 25°C, 24시간 경과 후 (b), 그리고 phenol 2mM 및 H_2O_2 1mM이 첨가된 완충용액에서 25°C, 24시간 경과 후 (c) 각각 반응물에서 분리된 효소의 404nm에서의 Soret 흡광도를 측정된 결과를 나타내었다. HRP의 사용량은 1mg/mL이었다. Phenol이 2mM 첨가된 완충용액에서 25°C, 24시간 동안 경과한 후에도 반응용액에서 분리된 HRP의 흡광도는 원래효소의 흡광도와 거의 같았다. 이는 HRP의 기질인 phenol이 효소의 안정성을 향상시키는 것을 보여주는 것이다. 그러나 완충용액에 phenol 및 H_2O_2 가 이론적 반응비인 2mM과 1mM로 각각 첨가된 완충용액에서 분리된 HRP는 404nm에서의 흡광도가 원래효소의 흡광도의 48%로 크게 감소하였다. 또한 반응용액으로부터 분리된 HRP를 이용하여 guaiacol의 산화반응에 대한 Michaelis-Menten 반응상수를 구하여 Table 4에 나타내었다. Phenol만 첨가된 완충용액으로부터 분리된 HRP의 k_{cat}/K_m 값은 원래 HRP의 값의 약 95%였다. 그러나 phenol 및 H_2O_2 가 동시에 첨가된 반응용액으로부터 분리된 HRP의 k_{cat}/K_m 값은 원래 HRP의 값의 약 51%로 감소하였으며 k_{cat} 값은 원래 HRP의 값의 약 41%였다. Phenol 제거에 대한 HRP의

Table 4. Kinetic constants of HRP samples separated from buffers containing phenol or H_2O_2 after 24 h at 25°C.

| Phenol (mM) | H_2O_2 (mM) | k_{cat} (sec^{-1}) | K_m (mM) | k_{cat}/K_m ($sec^{-1}M^{-1}$) |
|-------------|---------------|--------------------------|------------|------------------------------------|
| fresh HRP | | 16252 | 0.93 | 1.747×10^7 |
| 2 | 0 | 16225 | 0.98 | 1.654×10^7 |
| 2 | 1 | 6636 | 0.74 | 8.972×10^6 |

Michaelis-Menten kinetic constants were obtained by a nonlinear regression method for the oxidation of guaiacol (0.4~7mM) in the presence of 0.2mM H_2O_2 and 36.5mM of HRP in a buffer solution(100mM sodium phosphate, pH 7).

turnover number 2220을 기준으로 했을 경우 2mM의 phenol을 완전히 제거하기 위해서는 완충용액 10mL당 약 0.4mg의 HRP를 사용하면 충분하다. 그러나 본 실험에서는 반응 후 HRP의 분리시 발생할 수 있는 수율손실을 감안하여 10mg의 HRP를 사용하였다. 따라서 phenol 반응 용액으로부터 분리된 HRP의 일부는 활성을 잃지 않은 것으로 생각된다. 또한 Phenol만이 포함된 용액으로부터의 HRP 분리수율은 88%였으며 phenol과 H_2O_2 가 포함된 페놀침전 반응용액으로부터 페놀침전물의 원심 분리 후 분리된 HRP의 수율은 약 25%였다. 따라서 사용한 HRP의 약 63%가 페놀침전물질과 함께 제거되었음을 알 수 있었다.

Ator 등(20)과 Ator와 Ortiz de Montellano (21)는 HRP가 H_2O_2 와 함께 각각 alkylhydrazines 혹은 phenylhydrazine과 반응하면 효소의 활성부위인 heme이 반응에 의해서 생성된 alkyl radical 및 phenyl radical과 공유결합을 함으로서 효소활성 및 Soret 파장(404nm)에서의 흡광도가 감소한다고 보고하였다. 따라서 페놀물질의 침전반응 중 반응에 의해서 생성된 페놀라디칼의 반응성이 클수록 HRP 효소의 활성이 더욱 감소할 것을 알 수 있다. 이러한 결과는 Table 2에 나타난 페놀의 종류에 따른 HRP의 turnover number값의 차이를 설명할 수 있게 한다.

HRP를 이용한 비페놀계 유해물질의 제거

BET는 대표적인 방향성 유해물질이다. 그러나 이러한 물질은 HRP와의 반응성이 없다. 그러나 Klivanov는 HRP와 H_2O_2 에 의해서 제거되지 않는 4,4'-dichlorobiphenyl과 2,4,5-trichlorobiphenyl

Table 5. Removal % of BET by HRP and H₂O₂ in the presence of phenols.

| BET | No | <i>p</i> - | Phenol | <i>p</i> - |
|--------------|--------|--------------|--------|--------------|
| | phenol | Ethoxyphenol | | Chlorophenol |
| Benzene | 28.3 | 32.6 | 40.9 | 73.6 |
| Ethylbenzene | 34.9 | 50.9 | 55.4 | 53.8 |
| Toluene | 44.6 | 60.7 | 72.8 | 71.1 |

The initial concentrations of benzene, toluene, and phenols were 2mM, respectively while those of ethylbenzene and H₂O₂ were 0.5mM and 5mM, respectively.

(각각의 농도는 10ppm과 3ppm)는 효소반응액에 페놀성분을 첨가할 경우 85% 이상 제거될 수 있음을 밝혔다(11). 그러나 이때 사용한 H₂O₂의 농도는 100mM였다. 이는 본 연구에서 밝혀진 것과 같이 HRP의 페놀제거 효율이 급격히 감소하기 시작하는 H₂O₂ 농도인 10mM보다 매우 높은 농도이다. 따라서 이들의 결과는 HRP의 HRP 활성에 의한 결과라고 생각할 수 없다. 우리는 HRP 및 H₂O₂과 함께 페놀을 첨가할 경우 BET가 제거될 수 있는가를 실험하였으며 그 결과를 Table 5에 나타냈다. Benzene, toluene 및 페놀의 초기농도는 각각 2mM이었고 ethylbenzene의 초기농도는 0.5mM이었으며 H₂O₂의 초기농도는 5mM이었다. HRP의 사용량은 1mg/10mL이었으며 반응은 25°C에서 2시간 동안 계속되었다. 반응 후 형성된 침전물질을 원심분리에 의해서 제거한 후 여액에 남아있는 BET의 양은 HPLC를 이용하여 분석하였다. Benzene의 경우 HRP 및 H₂O₂에 의해서 약 28.2%가 제거되었으며 반응용액에 phenol 및 *p*-chlorophenol을 첨가했을 경우 각각 40.9%와 73.6%가 제거되었다. Ethylbenzene 및 toluene의 경우 phenol과 같이 반응을 시킬 경우 제거율이 각각 72.8%와 55.4%로 증가하였다. 이때 BET와 함께 첨가한 phenol은 모두 제거되었다. *p*-Nitrophenol은 BET와는 달리 HRP 및 H₂O₂와 함께 페놀을 첨가하더라도 제거되지 않았다. Klibanov 등(11)은 HRP, H₂O₂ 및 phenol을 사용하여 polychlorinated biphenyls (PCB)을 제거한 실험에서 HRP의 기질이 아닌 PCB는 페놀침전물과 함께 응집되어 제거된 것으로 추측하였다. 본 실험에서도 HRP, H₂O₂ 및 BET 포함하고 있는 용액에 페놀성 물질을 첨가할 경우 BET의 제거율이 증가하는 현상은 효소반응에 의한 BET의 산화반응보다는 BET가 phenol 침전물과 함께 응집되어 제거되었을 것으로 생각된다.

요 약

페놀이 포함되어 있는 수용액에 HRP 및 H₂O₂를 첨가하여 페놀을 침전 및 제거시키는 방법에서, 페놀의 종류와 페놀 및 H₂O₂의 농도가 HRP의 페놀제거 효율에 미치는 영향을 조사하였다. 여러 가지 페놀성분은 최적 완충용액(pH 5~7)에서 HRP와 H₂O₂를 사용해서 90% 이상 제거할 수 있었다. H₂O₂의 농도가 10mM 이상일 때 HRP의 페놀제거 효율이 급격히 감소하였으며 H₂O₂의 농도가 50mM 이상일 때 HRP의 페놀제거 효율은 거의 없었다. HRP 한 분자당 제거할 수 있는 페놀의 분자수(turnover number)는 H₂O₂ 및 페놀물질의 초기농도가 각각 1mM일 때, *p*-ethoxyphenol의 경우 18047로 가장 컸으며 *m*-chlorophenol의 경우 1244로서 가장 적었다. 페놀과 반응 후(25°C, 24h) 반응물질로부터 분리된 HRP의 Soret 파장(404nm)에서의 흡광도는 원래효소의 48%로 감소하였고 kcat 및 kcat/Km값은 각각 원래효소의 41%와 51%로 감소함으로써 페놀 제거시 HRP의 구조변화 및 활성저하가 초래되었음을 알 수 있었다. 페놀과 함께 비 페놀계 방향성 물질인 벤젠, 에틸벤젠, 톨루엔(BET)을 포함하고 있는 용액에 HRP 및 H₂O₂를 첨가하면 BET의 제거율이 증가하였다.

감 사

본 연구는 1995년도 교육부 생물화공 중점연구 지원(과제번호: E-13)에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. J. A. Bumpus, M. Tien, D. Wright, and S. D. Aust(1985), *Science*, **228**, 1434.
2. S. D. Haemmerli, M. S. A. Leisola, D. Sanglard, and A. Fiechter(1986), *J. Biol. Chem.*, **261**, 6900.
3. J. A. Field, E. de Jong, G. F. Costa, and J. A. M. de Bont(1992), *App. Env. Microbiol.*, **58** (7), 2219.
4. S. Irie, S. Doi, T. Yorifujii, M. Takagi, and K. Yano(1987), *J. Bacteriol.*, **169**, 5174.
5. K. T. O'Reilly and R. Crawford(1989), *Appl. Environ. Microbiol.*, **55**, 866.

6. G. J. Zylstra and D. T. Gibson(1989), *J. Biol. Chem.*, **264**, 14940.
7. K. H. Jung, J. Y. Lee, and H. S. Kim(1995), *Biotechnol. Bioeng.*, **48**, 625.
8. A. G. Livingstone(1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 927.
9. W. Q. Sun, G. F. Payne, M. S. G. L. Moas, J. H. Chu, and K. K. Wallace(1992), *Biotechnol. Prog.*, **8**, 179.
10. S. Wada, H. Ichikawa, and K. Tatsumi (1993), *Biotechnol. Bioeng.*, **42**, 854.
11. A. M. Klibanov, T. M. Tu, and K. P. Scott (1983), *Science*, **221**, 259.
12. L. Al-Kassim, K. E. Taylor, J. A. Nicell, J. K. Bewtra, and N. Biswas(1994), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **61**, 179.
13. D. Arseguel and M. Baboulene(1994), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **61**, 331.
14. J. A. Nicell(1994), *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **60**, 203.
15. 김영미, 한달호, 정연호, 이상영, 이해익(1995), *한국생물공학회지*, **10**(3), 335.
16. R. Z. Kazandjian and A. M. Klibanov(1985), *J. Am. Chem. Soc.*, **107**, 5448.
17. K. Ryu(1991), "Peroxidase Catalysis in Nonaqueous Media", Ph. D. Thesis, Dept. of Chem. Biochem. Eng., The University of Iowa, Iowa City, Iowa, U.S.A.
18. J. E. Few, P. Jones, and G. Scholes(1983), *Analytica Chimica Acta*, **155**, 139.
19. K. Ryu and J. S. Dordick(1992), *Biochemistry*, **31**, 2588.
20. M. A. Ator and P. R. Ortiz de Montellano (1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 1542.
21. M. A. Ator, S. K. David, and P. R. Ortiz de Montellano(1987), *J. Biol. Chem.*, **262**, 14954.