

## Oxidative Coupling에 의한 Nitroaromatics와 그 환원대사산물의 전환

안 미 연·김 장 억  
경북대학교 농화학과

### Transformation of Nitroaromatics and Their Reduced Metabolites by Oxidative Coupling Reaction

Ahn, Mi Youn and Kim, Jang-Eok (Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu 702-701, Korea)

**Abstract** : To investigate the formation of bound residue with soil organic materials by oxidative coupling, nitroaromatics and their reduced metabolites, the insecticide parathion and the herbicide asulam were incubated with oxidoreductase, laccase or horseradish peroxidase, in the presence or absence of humic monomers. Most of aminotoluenes and amino-nitrophenols were completely transformed while most of nitrotoluenes and nitrophenols remained unchanged by a laccase or horseradish peroxidase in the presence or absence of humic monomers. Amino-nitrotoluenes were not transformed without humic monomers, but the addition of various humic monomers caused a considerable difference in the transformation of amino-nitrotoluenes by a laccase or horseradish peroxidase. Amino-nitrotoluenes were most transformed in the presence of catechol, syringaldehyde and protocatechuic acid. The insecticide parathion with nitro group and its metabolite were not mostly transformed in the presence or absence of humic monomers. The herbicide asulam with amino group remained unchanged without humic monomers as well, but the stimulating effect on the transformation of asulam was caused by the addition of catechol, syringaldehyde, protocatechuic acid or caffeic acid with a laccase.

**Key words** : nitroaromatics, parathion, asulam, humic monomer, oxidative coupling, oxidoreductase

### 서 론

Nitrotoluene류, nitrobenzene류 및 nitrophenol류와 같은 nitroaromatics는 군수품, 염색제, 살충제 및 제초제로 직접 또는 중간 산물로 이용되면서 환경 중으로 상당량이 방출되고 있다<sup>1)</sup>. 특히 폭발물로 다량 사용되는 nitrotoluene류는 2차 세계 대전을 치른 국가와 한국전쟁을 치른 우리나라의 경우, 그 생산 공장 지역과 사용 지역에서의 오염 정도가 상당할 것으로 추정된다. 이렇게 환경중에 유입된 nitroaromatics는 물리 화학적 특성상 물에 대한 용해도가 낮고, 낮은 휘발성으로 토양 환경 중의 이동성은 매우 적은 것으로 나타났으며 또한 미생물 공격에 저항성을 가지고<sup>2,3)</sup> 소량이 노출되어도 포유류, 어류, 조류, 미생물에 대해 발암원 및 돌연변이원으로 작용하는 것으로 알려짐<sup>3)</sup>에 따라 이들은 다른 오염 물질에 비해 생태계에 크게 영향을 끼칠 수 있을 것으로 추정된다. Yamashina 등<sup>4)</sup>에 따르면 nitroaromatics는 토양 미생물의 nitroreductase에 의해 nitro기는 nitroso와 hydroxylamino화합물을 거쳐 amino기로 환원되는 것으로 알려져 있다. 그러므로 환경으로 유입된

nitroaromatics는 구조적 변화없이 존재할 수도 있고, 상기한 미생물에 의해 nitro기가 환원된 대사산물의 형태로 존재할 수도 있을 것이다.

토양환경에 유입된 nitroaromatics와 환원된 대사산물은 생물 물리 화학적 인자에 의해 비가역적으로 토양구성 성분중 humic acid 및 fulvic acid에 결합되어 bound residue를 형성하는 것으로 알려져 있다<sup>5)</sup>. Humic acid 및 fulvic acid와 같은 부식물질은 토양 유기물로부터 미생물적 분해에 의해 생성되는 phenolic aldehyde류, phenolic acid류 및 polyphenol류가 토양에 존재하는 여러 가지 촉매들에 의한 중합반응으로 생성되는 데, 그 중에서 산화 환원 효소에 의해 중개되는 oxidative coupling반응은 이들 중합반응에 상당부분을 차지하는 것으로 알려져 있다<sup>6)</sup>. Bound residue의 형성은 xenobiotics의 생물이용성을 저하시켜 xenobiotics가 끼칠 수 있는 독성을 상당히 완화시킬 수 있을 것이며 또한 후작물에 대한 영향도 나타내지 못하는 것으로 알려져 있다. 따라서 자연적으로 발생하는 부식화는 독성물질을 무독화 시키는 데 이용될 수 있다<sup>7)</sup>. 하지만 부식은 복잡한 형태의 물질이므로 부식물질에

xenobiotics의 결합을 조사하기란 매우 힘든 작업이다. 이런 이유로 이와 관련된 연구들은 대부분 부식물질의 관능기(functional group)를 가지는 humic monomer들을 여러 가지 phenol 및 aniline 관련 화합물과 반응시키는 modeling 실험을 행하여 토양환경 중의 xenobiotics와 토양유기물질과의 bound residue의 결합양상을 예측하여 왔다<sup>8,9,10,11</sup>.

본 연구에서는 nitroaromatics와 그 환원산물들의 화학구조에 따라 토양구성물질중 유기물질과의 결합 양상을 밝히기 위하여 nitrotoluene류 및 nitrophenol류와 그 환원형태인 amino기를 함유하는 화합물들을 유기물을 구성하고 있는 거대 분자구조중 말단의 반응기들로 작용하는 것들인 humic monomer들과의 반응성을 laccase와 horseradish peroxidase를 산화 환원 효소로서 사용하여 그 반응 양상을 조사하였다. 또한 이러한 반응을 nitro기와 amino기를 가지고 있는 농약에 적용시켜서 nitro기를 가지는 살충제 parathion 및 amino기를 가지는 제초제 asulam과 humic monomer들과의 oxidative coupling반응을 통하여 이들 농약들의 부식 구성물질과의 bound residue 형성 가능성을 살펴 보고자 하였다.

## 재료 및 방법

### 실험재료

사용된 nitroaromatics는 2-nitrotoluene(2-NT), 3-nitrotoluene(3-NT), 4-nitrotoluene(4-NT), 2,4-dinitrotoluene(2,4-DNT), 2,6-dinitrotoluene(2,6-DNT), 3,4-dinitrotoluene(3,4-DNT), 2-nitrophenol(2-NP), 4-nitrophenol(4-NP)과 그 환원산물 2-aminotoluene(2-AT), 3-aminotoluene(3-AT), 4-aminotoluene(4-AT), 2-amino-4-nitrotoluene(2-Am-4NT), 2-amino-6-nitrotoluene(2-Am-6NT), 4-amino-3-nitrotoluene(4-Am-3NT), 2,4-diaminotoluene(2,4-DAT), 2,6-diamino toluene(2,6-DAT), 3,4-diaminotoluene(3,4-DAT), 2-amino-4-nitrophenol(2-Am-4NP), 4-amino-3-nitrophenol(4-Am-3-NP)은 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다.

Nitro기와 amino기를 가지는 농약은 살충제 parathion (O,O-diethyl O-4-nitrophenyl phosphorothioate : 순도 99.9%), 제초제 asulam(methyl-4-amino-phenyl sulfonyl carbamate : 순도 99.9%)의 표준품을 사용하였다. 부식의 monomer로 사용된 물질 syringaldehyde, syringic acid, vanillin는 Fluka AG(Buchs, Switzerland)에서 vanillic acid, catechol은 Aldrich Chemical Co.(Milwaukee, WI)에서 pyrogallol, protocatechuic acid, caffeic acid, ferulic acid, guaiacol, gallic acid, hydroquinone, salicylic acid는 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였다. 산화 환원 효소로 사용된 horseradish peroxidase(HRP)는

Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, U.S.A.)에서 구입하였고, laccase는 Myceliophthera thermophila로 부터 분리된 것을 Novo Nordisk Co.(Denmark)로부터 분양받아 사용하였다.

### 실험방법

효소의 활성 측정은 25°C, phosphate buffer(pH 7.0)에서 HRP의 경우, 1.0mM 2,6-dimethoxyphenol(DMP)를 기질로, laccase의 경우, 0.01mM DMP를 기질로 이용하여 468nm의 파장에서 10초 간격으로 흡광도를 측정하여 10초 동안 0.001의 흡광도의 변화를 야기시키는 양을 1 unit로 하였다. 흡광도는 UV spectrophotometer(Hitachi U-2000)로 측정하였다.

Nitroaromatics 또는 그 환원산물을 단독으로 0.1mM 되도록 0.2M phosphate buffer(pH 6.0) 5ml에 가하고, 6.5unit/ml의 HRP 및 9mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 넣거나, 6.5unit/ml laccase를 넣은 시험관을 25°C의 진탕배양기에서 반응시킨다. Humic monomer가 존재할 경우의 전환율 측정은 0.1mM nitroaromatics 또는 그 환원산물과 0.1mM의 humic monomer들을 함께 가하여 상기한 방법으로 반응시킨다. 대조구로는 효소를 넣지 않은 것으로 하고, 반응시간은 HRP는 4시간, laccase는 24시간으로 하고, 반응액은 0.45µm nylon filter를 이용하여 여과한 후 HPLC(Young-In HPLC-9500)로 nitroaromatics와 그 환원산물 및 parathion과 asulam의 잔류량을 분석하였다. HPLC 분석조건은 표 1과 같다.

Table 1. The operating conditions of HPLC

Detector	UV 254nm
Column	µ-Bondapak C <sub>18</sub> (3.9mm×300mm)
Mobile phase	60% Acetonitrile : 2,4-DNT, 2,6-DNT, 3,4-DNT, 2-NT, 3-NT, 4-NT, 2-Am-4-NT, 2-Am-6-NT, 4-Am-3-NT 50% Acetonitrile : 2-NP, 4-NP 70% Acetonitrile : Parathion 80% Acetonitrile : Asulam 60% Methanol : 2,4-DAT, 2,6-DAT, 3,4-DAT, 2-AT, 3-AT, 4-AT

## 결과 및 고찰

### Nitroaromatics와 그 환원산물의 전환

Nitroaromatics가 산화 환원 효소의 촉매작용에 의하여 oxidative coupling반응이 일어나는 지를 알아보기 위해 이들 화합물들을 0.2M phosphate buffer(pH 6.0)에 0.1mM되도록 가하여 laccase의 경우 24시간, HRP의 경우 4시간 반응시켰다. 그 결과 표 2와 같이 nitro기가 있는 2-NT, 3-NT, 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 3,4-DNT와 2-NP는 전환

Table 2. Transformation of nitrotoluenes, aminotoluenes, aminophenols and amino-nitrophenols by a *Myceliophthera thermophila* laccase or horseradish peroxidase

Humic monomer	% Transformed	
	2-NT, 3-NT, 4-NT, 2,4-DNT, 2,6-DNT, 3,4-DNT, 2-NP	2-AT, 3-AT, 4-AT, 2,4-DAT, 2,6-DAT, 2,3-DAT, 2-Am-4-NP, 4-Am-3-NP
Alone	0	>99
Hydroquinone	0	>99
Pyrogallol	0	>99
Ferulic acid	0	>99
Guaiacol	<2	>99
Syringaldehyde	0	>99
Catechol	<1	>99
Protocatechuic acid	<10	>99
Caffeic acid	0	>99
Vanillin	0	>99
Vanillic acid	0	>99
Gallic acid	0	>99
Salicylic acid	0	>99
Syringic acid	0	>99

이 전혀 일어나지 않았다. 그러나 nitro기가 모두 환원된 형태인 2-AT, 3-AT, 4-AT, 2,4-DAT, 2,6-DAT 및 3,4-DAT와 nitro기의 일부가 환원된 형태인 2-Am-4-NP와 4-Am-3-NP는 전부 전환되었다.

Tatsumi 등<sup>10)</sup>의 연구에 의하면 산화 환원 효소가 촉매로 작용하고 humic monomer들이 존재할 경우, 단독으로 배양되었을 경우 보다 aniline 관련 화합물들의 전환이 더욱 촉진된다고 하였지만 본 연구에서 사용된 nitrotoluene류는 동등한 물농도로 hydroquinone, pyrogallol, ferulic acid, guaiacol, syringaldehyde, catechol, protocatechuic acid, caffeic acid, vanillin, vanillic acid, gallic acid, salicylic acid 또는 syringic acid가 존재하는 반응 조건에서 laccase와 HRP가 촉매로 작용하였을 때, humic monomer들의 종류와 nitrotoluene류에 결합된 nitro기의 결합위치와 수에 관계없이 10% 이하의 낮은 전환율을 나타내었다. 그러나 aminotoluene류와 amino-nitrophenol류는 단독으로 반응한 경우와 마찬가지로 humic monomer들이 존재하는 반응 조건에서도 전부 전환되었다. Dec 등<sup>12)</sup>은 산화 환원 효소에 의해 발생하는 phenol 관련 화합물들의 전환은 이들 화합물이 free radical이나 quinone류와 benzoquinone imine류로 산화되어 결국 서로 cross-coupling되거나 친전자성 치환반응(electrophilic substitution reaction)으로 중합을 하는 oxidative coupling반응이라고 밝힌 바 있다. 이러한 cross-coupling반응이나 친전자성 치환 반응은 화합물의 구조 중 전자밀도에 따라 큰 영향을 받는다<sup>13,14)</sup>. 따라서 nitrotoluene류와 amino-nitrotoluene류 및 amino-nitrophenol류의 전환율의 차이는 이런 화합물의 벤젠환에 결합된 nitro기와

amino기의 영향으로 발생하는 전자밀도의 분포가 다르기 때문에 발생하는 것으로 생각되어진다<sup>10)</sup>. 즉 벤젠환에 nitro기와 같은 강하게 전자를 끄는 기(electron withdrawing group)가 결합되어 있으면 벤젠환은 산화 환원 효소에 의해 생성되는 humic monomer의 친전자성 공격(electrophilic attack)에 대해 불활성화되고, 이런 영향을 상쇄시킬 수 있는 amino기와 같은 전자를 주는 기(electron donating group)가 존재할 경우, 벤젠환은 활성화되어 전환율이 높게 나타난다. 벤젠환에 결합된 nitro기의 일부가 환원된 형태인 amino-nitrotoluene류의 경우, humic monomer가 존재하지 않는 조건에서는 전환이 전혀 일어나지 않았지만, humic monomer가 존재하는 조건에서는 humic monomer의 종류에 따라 전혀 반응성이 없는 것부터 76%까지 전환되는 것으로 나타났다. 이러한 반응결과는 laccase와 HRP에서 비슷한 반응양상을 나타내었다. 즉 효소종류에 관계없이 토양 환경에 nitrotoluene류가 유입되었을 경우, 환원 작용에 의해 nitro기의 일부 또는 전부가 amino기로 환원되어 자연적으로 생성된 부식의 말단을 구성하는 humic monomer들과 산화 환원 효소에 의한 oxidative coupling반응을 통한 bound residue의 생성<sup>15)</sup>가능성을 보여주는 결과라고 할 수 있다.

그림 1에서와 같이 2-Am-6-NT(0.1mM)의 경우를 보면 여러 종류의 humic monomer들 중에서 laccase와 HRP로 배양시킬 경우, 각각 catechol은 75%, 70%, syringaldehyde는 64%, 67%, protocatechuic acid는 68%, 60%로 비교적

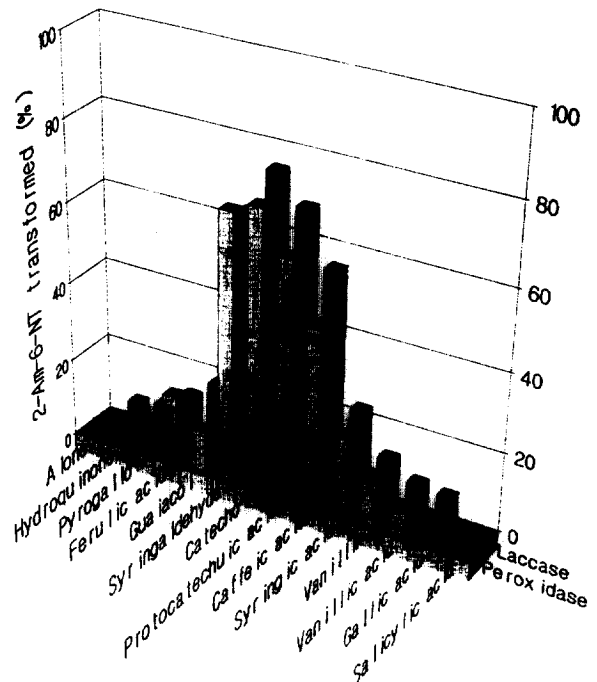


Fig.1. Transformation of 2-amino-6-nitrotoluene with humic monomers by a *Myceliophthera thermophila* laccase or horseradish peroxidase

높은 전환율이 나타났다. Humic monomer의 구조에 hydroxyl기, methoxyl기 및 alkyl기와 같이 벤젠환으로 전자를 주어서 친전자성 공격에 벤젠환을 활성화시키는 기의 수가 많으면 전환율이 상대적으로 높은 것으로 나타났는데 salicylic acid 보다 활성화기인 hydroxyl기를 하나 더 가지고 있는 protocatechuic acid가 존재할 경우, 2-Am-6-NT의 전환율이 더 높고 역시 활성화기인 methoxyl기를 vanillic acid와 vanillin 보다 하나 더 가지는 syringic acid와 syringaldehyde가 존재할 경우, 2-Am-6-NT의 전환율이 각각 더 높았다. 그리고 catechol 보다 활성화기가 상대적으로 적은 salicylic acid가 존재할 경우가 catechol이 존재할 경우 보다 더 낮은 전환율을 보였다. 이러한 결과의 일부는 Kim 등<sup>8)</sup>과 Tatsumi 등<sup>9)</sup>의 결과에서 활성화기가 많은 humic monomer들을 phenol 및 aniline 관련 화합물 또는 제초제 bentazon과 반응시켰을 경우, 높은 전환율을 나타낸 것과 동일하게 나타났다.

Berry와 Boyd의 phenol 및 aniline 관련 화합물의 oxidative coupling 반응성연구<sup>16)</sup>에서 이들 화합물이 불활성화기인 carboxyl기로 치환된 경우, 전환율이 크게 감소되는 것으로 보고하였는데 2-Am-6-NT의 전환은 carboxyl기가 있는 humic monomer인 syringic acid, vanillic acid, salicylic acid가 존재할 경우, 다른 humic monomer들이 존재할 경우 보다 비교적 낮은 전환율을 나타내었고 carboxyl기 보다 불활성 정도가 낮은 carbonyl기를 가진 syringaldehyde, vanillin과 guaiacol이 각각 더 높은 전환율을 나타내었다. Berry와 Boyd의 peroxidase에 의한 phenol 및 aniline 관련 화합물의 oxidative coupling 반응성연구<sup>17)</sup>에 따르면 벤젠환에 결합된 hydroxyl기의 수가 많을수록 이들의 전환율이 높아진다고 보고하였다. 활성화기로 작용하는 hydroxyl기가 2개 이상 존재하는 화합물인 catechol, pyrogallol 및 hydroquinone 중에서는 catechol이 존재할 경우에만 2-Am-6-NT의 높은 전환율을 나타내었고, pyrogallol과 hydroquinone이 존재할 경우에는 매우 낮은 전환율을 나타내었다. 이러한 현상은 hydroxyl기가 2개 이상 존재하는 humic monomer들의 산화 환원 효소에 의해서 생성된 중간체나 자체적인 결합산물이 amino-nitrotoluene류를 전환할 수 있는 능력의 차이일 것으로 추측된다. 그러므로 quinone구조를 쉽게 취할 수 있는 humic monomer들에서는 amino-nitrotoluene류의 전환은 humic monomer에 결합된 hydroxyl기의 수와 결합위치로 결정되는 않는다는 것을 알 수 있다.

그림 2를 보면 humic monomer가 있는 반응 조건에서 2-Am-4-NT(0.1mM)는 2-Am-6-NT의 humic monomer의 종류에 따른 전환율이 비슷한 경향으로 나타났다. Laccase와 HRP를 촉매로 하였을 경우, 각각 catechol이 존재할 경우, 76%, 70%, syringaldehyde는 71%, 58%, protocatechuic

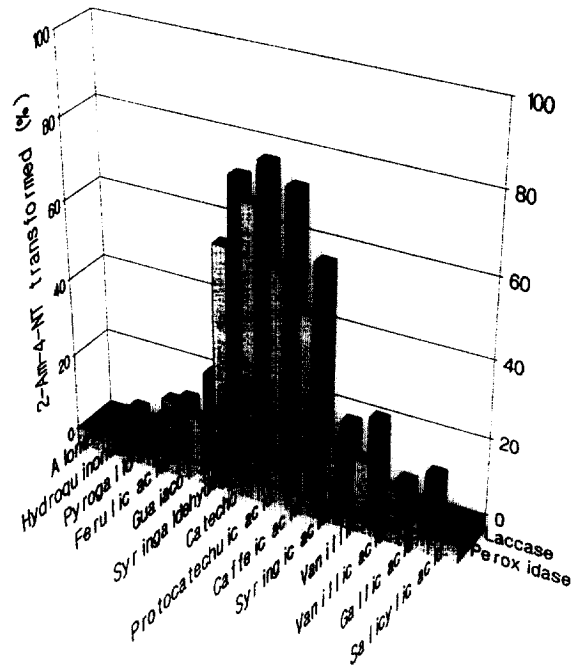


Fig.2. Transformation of 2-amino-4-nitrotoluene with humic monomers by a *Myceliophthera thermophila* laccase or horseradish peroxidase

acid는 72%, 55%로 이들 humic monomer가 존재할 경우에 2-Am-4-NT의 전환율이 다른 humic monomer가 존재하는 반응조건에서 보다 비교적 높게 나타났다.

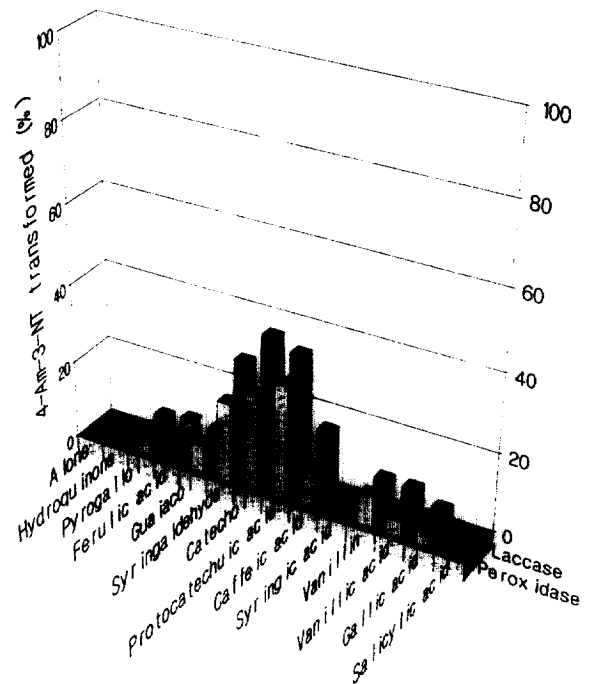


Fig.3. Transformation of 4-amino-3-nitrotoluene with humic monomers by a *Myceliophthera thermophila* laccase or horseradish peroxidase

4-Am-3-NT(0.1mM)의 전환율도 그림 3에서와 같이 catechol이 존재할 경우에 36%, 24%, syringaldehyde는 27%, 20%, protocatechuic acid는 33%, 29%로 이들이 존재할 경우 가장 높게 나타났지만, 2-Am-4-NT와 2-Am-6-NT의 전환율에 비해 상대적으로 낮게 나타났다. 이는 nitro기, amino기 및 alkyl기를 같은 수로 갖고 있지만, 4-Am-3-NT의 경우 nitro기와 amino기가 2-Am-4-NT와 2-Am-6-NT에서 보다 가까이 결합하고 있어서 전기적 반발력을 최소화하기에는 상대적으로 불리함<sup>14)</sup>에 기인하는 입체효과(steric effect)로 인해 free radical 및 quinone형태 또는 그 중합체 형태인 humic monomer 중간체의 접근이 방해되어 낮은 전환율을 나타내는 것으로 사료된다. 그러므로 humic monomer들이 존재하는 반응 조건에서 amino-nitrotoluene류의 전환은 벤젠환에 결합된 잔기의 종류 뿐만 아니라 nitro기와 amino기의 결합위치에도 영향을 받는다는 것을 알 수 있다.

2-Am-4-NP(0.1mM)와 4-Am-3-NP(0.1mM)는 humic monomer들이 없는 조건에서 효소에 의한 전환율은 99% 이상이고, humic monomer가 존재하는 조건에서도 그 종류에 상관없이 99% 이상의 전환율을 보인다. Amino-nitrotoluene류와 amino-nitrophenol류를 비교해 볼 때 같은 수의 nitro기와 amino기가 존재하지만 amino-nitrophenol류의 hydroxyl기의 비공유전자쌍의 유도효과(inductive effect)<sup>15)</sup>가 amino-nitrotoluene의 alkyl기 보다 더 커서 상대적으로 벤젠환에 전자밀도를 더 증가시켜 친전자체인 humic monomer 중간체의 접근이 유리하게 되어 amino-nitrophenol류가 amino-nitrotoluene류 보다 더 높은 전환율을 나타내는 것으로 사료된다. 4-Am-3-NP는 2-Am-4-NP의 전환과 비교했을 때, 4-Am-3-NT와 같은 입체효과에 따른 전환율 감소현상은 나타나지 않았다.

Shuttleworth 등<sup>16)</sup>과 Kim 등<sup>17)</sup>이 보고한 바에 따르면 humic monomer들의 농도가 높을수록 저해현상이 기질 전환이 일정수준까지 증가하는 결과가 나타나는 데, 이러한 결과로 유추해 보면, amino-nitrotoluene류는 토양 환경에 유입될 경우 이들과 반응할 수 있는 반응기를 가지는 부식 물질이 많을수록 oxidative coupling반응을 통한 bound residue형성이 활발하고 aminotoluene류와 amino-nitrophenol류는 amino-nitrotoluene류의 경우보다 이러한 부식을 구성하는 물질이 적은 조건에서도 쉽게 bound residue형성이 될 수 있을 것으로 사료된다.

### 함질소 농약의 전환

Nitro기를 함유한 농약의 bound residue의 형성사실은 널리 알려져 왔다<sup>18)</sup>. Spinler 등<sup>20)</sup>은 <sup>14</sup>C-fenitrothion과 그 대사산물이 대부분 humic acid와 fulvic acid에 결합되어 있음을 밝혔고, 2,6-dichloro-4-nitroaniline(DCNA), <sup>14</sup>C-

parathion의 bound residue형성사실이 보고된<sup>21,22,23)</sup> 바 있다. 그림 4에서와 같이 Katan 등<sup>24)</sup>의 <sup>14</sup>C-parathion과 미생물 활동에 의해 생성되는 parathion의 대사산물, <sup>14</sup>C-aminoparathion, <sup>14</sup>C-paraoxon, <sup>14</sup>C-aminoparaoxon, <sup>14</sup>C-4-nitrophenol 및 <sup>14</sup>C-4-aminophenol의 bound residue형성에 대한 실험은 토양에 처리된 후 비교적 짧은 시간(2시간)의 경과 후 평가된 결과이지만 <sup>14</sup>C-parathion과 그 대사산물의 상대적인 결합능(binding capacity)은 nitro기가 amino기로 환원된 화합물이 <sup>14</sup>C-parathion 보다 상대적으로 높게 나타났다.

Table 3. Transformation of parathion, 4-nitrophenol and asulam by a *Myceliophthera thermophila* laccase

Humic monomer	% Transformed		
	Parathion	4-NP	Asulam
Alone	0	0	3
Catechol	0	3	74
Syringaldehyde	5	0	98
Protocatechuic acid	2	17	98
Caffeic acid	0	0	54
Vanillin	0	0	19
Ferulic acid	0	0	6
Pyrogallol	0	0	2

Humic monomer들이 존재하는 반응 조건에서 laccase에 의한 살충제 parathion과 그 분해산물 4-nitrophenol(4-NP) 및 amino기를 가지고 있는 제초제 asulam의 전환율을 비교한 결과는 표 3과 같다. Parathion의 경우 syringaldehyde와 protocatechuic acid가 존재하는 반응조건에서 각각 5%, 2%의 전환을 보인 것 외에는 catechol, caffeic acid, vanillin, ferulic acid 및 pyrogallol이 존재하는 반응 조건에서는 전환되지 않았다. Parathion의 대사산물 중의 하나인 4-NP의 전환은 protocatechuic acid가 존재할 경우에 17%, catechol의 경우는 3%였고 그 외의 humic monomer가 존재하는 반응 조건에서는 전환되지 않았다. 이러한 결과는 Katan 등<sup>24)</sup>의 실험결과인 그림 4에서 parathion과 4-NP의 상대적인 bound residue 형성율을 비교해 볼 때, 비슷한 비율로 결합됨을 알 수 있다. 그리고 4-NP의 환원분해산물인 4-aminophenol(4-AP)의 humic monomer과의 반응은 앞서 기술한 바와 같이 4-AT의 경우에 humic monomer들의 종류와 유무에 관계없이 전부 전환되고 4-AP의 hydroxyl기가 4-AT의 caboxyl기 보다 humic monomer와의 oxidative coupling반응성이 낮다<sup>10)</sup>는 사실로 볼 때, 4-AP는 4-NP 보다 훨씬 높은 전환율을 나타낼 것으로 기대된다.

Asulam의 경우는 humic monomer들이 존재하지 않는 반응 조건에서 3%의 전환율을 나타내었지만 humic monomer들이 존재하는 반응 조건에서 ferulic acid와

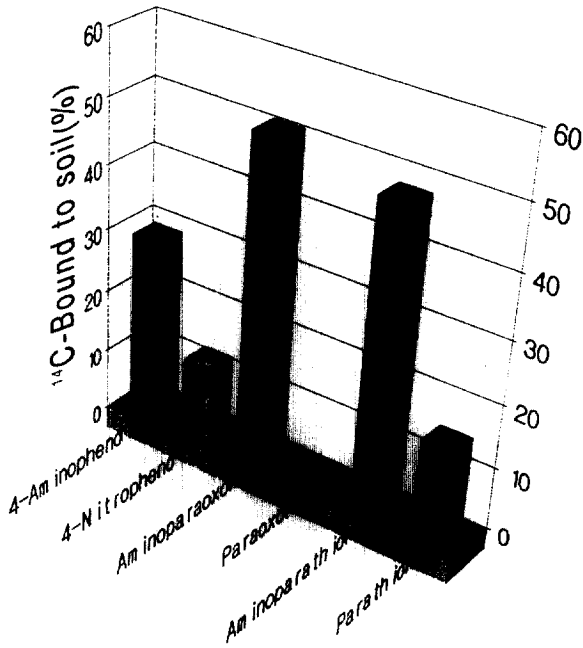


Fig. 4. Amounts of <sup>14</sup>C-bound residues in soils(Katan, et al., 1977, J. Agric. Food Chem., 1404-1408)

pyrogallol이 존재하는 조건에서 각각 6%, 2%의 전환율을 보였고 그 외에 catechol 74%, syringaldehyde 98%, protocatechuic acid 98%, caffeic acid 54%, vanillin 19%로 비교적 높은 전환율을 나타내었다. 이러한 결과로 미루어 볼 때, amino기를 가지거나 그러한 화합물로 분해될 수 있는 농약은 soil-bindable compounds로 볼 수 있다<sup>24,25</sup>. 이러한 결과를 뒷받침하는 실험은 Hsu 등<sup>26</sup>에 의해 행해졌는데 4-chloroaniline의 실험에서도 높은 bound residue형성이 나타난 바 있다. 하지만 pentachloroaniline의 경우에는 pentachloroaniline 뿐만 아니라 그 환원분해산물이 토양에서 쉽게 추출되는 결과가 보고된 바 있다<sup>27</sup>. 이러한 보고는 amino 화합물들의 bound residue형성에는 amino기 이외의 치환체의 영향을 간과할 수 없다는 사실을 뒷받침해준다.

상기한 결과에 따르면 nitroaromatics는 부식화 과정에서 자연스럽게 환원되어 존재할 때, nitroaromatics와 그 환원 대사산물은 충분히 bound residue의 형태로 존재할 수 있다. 이는 곧 이들로 오염된 토양을 단지 부식화 시킴으로써 정화 효과를 기대할 수 있음을 암시한다. 하지만 형성된 환원산물의 bound residue를 최적으로 형성시킬 수 있는 여러 가지 인자에 대한 조사와 실제 토양에서 bound residue형성 이후의 동태 등은 앞으로 더 연구해 나가야 할 것이다.

## 요 약

부식형성과정에서 nitroaromatics와 그 환원산물들의 구

조에 따른 bound residue형성 양상을 밝히기 위하여 nitrotoluene류, nitrophenol류와 그 환원형태의 화합물 및 nitro기를 가진 살충제 parathion과 amino기를 가진 제초제 asulam을 단독으로 또는 부식을 구성하는 humic monomer들이 존재하는 반응 조건에서 laccase와 HRP를 촉매로 사용하여 그 반응 양상을 조사하였다. Laccase와 HRP를 촉매로 하여 반응시킨 경우, humic monomer의 유무, 종류, nitro기의 결합위치와 수에 관계없이 nitrotoluene류와 nitrophenol류는 laccase와 HRP에 의해 거의 전환되지 않았고, aminotoluene류 및 amino-nitrophenol류는 전부 전환되었다. 일부가 환원된 형태인 amino-nitrotoluene류는 humic monomer에 따라 다른 전환율을 나타내는 데, catechol, syringaldehyde와 protocatechuic acid에서 가장 높은 전환율을 나타내었다. Nitro기가 있는 살충제 parathion은 humic monomer가 존재하는 반응 조건에서 거의 전환되지 않았고, 그 분해산물 4-nitrophenol의 경우도 protocatechuic acid를 제외하고는 거의 전환되지 않았다. Amino기가 있는 제초제 asulam의 경우, humic monomer가 존재하지 않는 조건에서는 거의 전환되지 않았지만 catechol, syringaldehyde, protocatechuic acid 및 caffeic acid의 경우, 비교적 높은 전환율을 나타냈다.

## 참 고 문 헌

- Schmidt, S. K. (1987). Kinetics of *p*-nitrophenol mineralization by a *Pseudomonase* sp. : Effects of second substrates, *Appl. Environ. Microbiol.*, 53:2617-2623.
- Spadaro, J. T., Gold, M. H. and Renganathan, V. (1992). Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Pseudomonase chrysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 58:2397-2401.
- Rieger, P. G. and Knackmuss, H. J. (1995). Biodegradation of nitroaromatics. : Basic knowledge and perspectives on biodegradation of 2,4,6-TNT and related nitroaromatic compounds in contaminated soil, Plenum press, New York, p.1-66.
- Yamashina, I., Shikata, S. and Egami, F. (1954). Studies on enzymatic reduction of aromatic nitro, nitroso and hydroxylamino compounds, *Bull. Chem. Soc. Jpn.*, 27:42-45.
- Calderbank, A., (1989). Reviews of environmental contamination and toxicology, Springer-Verlag, New York, p.71-102.
- Dec, J. and Bollag, J.-M. (1990). Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes

- through polymerization reactions, *Arch. Environ. Contam. Toxicol.*, 19:543-550.
7. Bollag, J.-M., Suttleworth, K. L. and Anderson, D. H. (1988). Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54:3086-3091.
  8. Kim, J.-E., Fernandes, E. and Bollag, J.-M. (1997). Enzymatic coupling of the herbicide bentazon with humus monomer and characterization of reaction products, *Environ. Sci. Technol.*, 31:2392-2398.
  9. Kim, J.-E., Wang, C. J. and Bollag, J.-M. (1998). Interaction of reactive and inert chemicals in the presence of oxidoreductases: Reaction of the herbicide bentazon and its metabolites with humic monomers, *Biodegradation*, 8:387-392.
  10. Tatsumi, K., Freyer, A. and Bollag, J.-M. (1994). Enzymatic coupling of chloroaniline with syringic acid, vanillic acid and protocatechuic acid, *Soil Biol. Biochem.*, 26:735-742.
  11. Kwon, T. D. and Kim, J. -E. (1998). Transformation of propanil and DCA by oxidative coupling reaction, *The Korean Society of Agricultural Chemistry and Biotechnology*, 41:384-389.
  12. Dec, J. and Bollag, J.-M. (1994). Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols, *Biotech. Bioengin.*, 44:1132-1139.
  13. Feuer, H. (1969). The chemistry of the nitro and nitroso groups, *Interscience publishers*, New York, p.49-70.
  14. Solomons, T. W. G. (1992). *Organic chemistry*, John Wiley & Sons, 5th ed., p.636-679.
  15. Bollag, J.-M. (1992). Decontaminating soil with enzymes, *Environ. Sci. Technol.*, 26:1876- 1881.
  16. Berry, D. F. and Boyd, S. A. (1985). Reaction rates of phenolic humus constituents and anilines during cross-coupling, *Soil Biol. Biochem.*, 17:613-636.
  17. Berry, D. F. and Boyd, S. A. (1984). Oxidative coupling of phenols and anilines by peroxidase : Structure-activity relationships, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48:565-569.
  18. Shuttleworth, K. L. and Bollag, J.-M. (1986). Soluble and immobilized laccase as catalysts for the transformation of substituted phenols, *Enzyme Microb. Technol.*, 8:171-177.
  19. Lichtenstein E. P. (1980). "Bound" residues in soils and transfer of soil residues in crops, *Residue Review*, 76:149-153.
  20. Spillner, C. J., De Baun, J. R. and Menn, J. J. (1979). Degradation of fenitrothion in forest soil and effects on Forest microbes, *J. Agric. and Food Chem.*, 27:1054-1060.
  21. Van Alfen, N. K. and Kosage, T. (1976). Metabolism of fungicide 2,6-dichloro-4-nitroaniline in soil, *J. Agric. and Food Chem.*, 24:584-592.
  22. Fuhremann, T. W. and Lichtenstein, E. P. (1978). Release of soil-bound methyl [<sup>14</sup>C] parathion residues and their uptake by earthworms and oat plants, *J. Agric. and Food Chem.*, 26:605-610.
  23. Racke, K. D. and Lichtenstein, E. P. (1985). Effects of soil microorganisms on the release of bound [<sup>14</sup>C] residues from soils previously treated with [<sup>14</sup>C] parathion, *J. Agric. and Food Chem.*, 33:938-943.
  24. Katan, J. and Lichtenstein, E. P. (1977). Mechanisms of production of soil-bound residues of [<sup>14</sup>C] parathion by microorganisms, *J. Agric. and Food Chem.*, 25:1404-1408.
  25. Helling, C. S. and Krivonak, A. E. (1978). Biological characteristics of bound dinitroaniline herbicides in soils, *J. Agric. and Food Chem.*, 26:1164-1172.
  26. Hsu, T. S. and Bartha, R. (1974). Interaction of pesticide-derived chloroaniline residues with soil organic matter, *Soil Sci.*, 116:444-452.
  27. Ko, W. H. and Farley, J. D. (1969). Conversion of pentachloronitrobenzen to pentachloroaniline in soil and effect of these compounds on soil microorganisms, *Phytopathology*, 59:64-67.