

## 2,4-Dichlorophenol로 오염된 폐수의 정화를 위한 식물체의 이용

이정은 · 박종우 · 김장억  
경북대학교 농화학과

### Use of Plant Materials for Decontamination of Waste Water Polluted with 2,4-Dichlorophenol

Jung-Eun Lee, Jong-Woo Park and Jang-Eok Kim (Dept. of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea)

**ABSTRACT** : This study was performed to estimate the possibility of use of plant materials as catalytic agents for the decontamination of waste waters contaminated with organic pollutants by using 2,4-dichlorophenol(2,4-DCP) as a model pollutant. Plant materials containing high peroxidase activity were selected as catalysts for the removal of 2,4-DCP. Peroxidase activity, which plant materials were containing, was measured, and the greatest peroxidase activity was observed in shepherd's purse, followed by turnip, sweet potato, chinese cabbage and white radish. The peroxidase activity in shepherd's purse was four times higher than that of horseradish purchased in U.S.A. Using shepherd's purse and turnip, it was investigated the effect of various factors on the decontamination of 2,4-DCP through oxidative coupling. The removal of 2,4-DCP was extremely fast, and a maximal removal could be achieved within 3 min for shepherd's purse and 15min for turnip. The pH range was from 3.0 to 8.0 and the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added was 9 mM when maximal removal was achieved(over 90%). No increasing removal of 2,4-DCP was observed due to increasing the amount of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> added (over 9 mM). The initial concentration affected the transformation of 2,4-DCP incubated with plant materials. When turnip was used as catalytic agent, it was observed decreasing transformation of 2,4-DCP due to increasing initial concentration.

**Key words** : Oxidoreductive catalysts, 2,4-dichlorophenol, oxidative coupling, shepherd's purse, turnip

## 서 론

자연계에 도입된 유기독성물질들을 무독화시키는 방법 가운데 산화환원효소들을 이용하여 그 독성물질끼리 중합시키거나 co-substrate와 결합시켜 무독화시키는 연구들이 10여년전부터 연구되어 왔다.<sup>1-13)</sup> 유기독성화합물을 무독화시키는 데 관여하는 산화환원효소는 토양 내에서는 부식형성 과정(humification)에 참여하는 것으로 알려져 있으며<sup>3,4,6)</sup>, 또한 수많은 유기독성화합물이 토양환경에 노출되었을 때, 토양유기물과의 결합을 촉매해 이들 물질들을 무독화시키는 것으로 알려져 있다.<sup>3-6,9,11-13)</sup> 이러한 일련의 산화환원효소에 의한 무독화의 과정은 부식화 과정에서 가장 중요한 화학반응중의 하나인 oxidative coupling 반응이며, 이 oxidative coupling은 oxidoreductive enzymes에 의해 페놀성 화합물들의 hydroxyl기나 방향족 아민류의 amino기에서 먼저 전자와 수소이온의 손실이 야기되고 이에 따라 공명 안정화된 free

radical이나 quinone에 의해 짝지움 반응이 일어난다.<sup>15,16)</sup> polymer를 생성하거나 토양 유기물과 공유적으로 결합하여 토양에 고정된다. 이들 oxidative coupling을 매개하는 산화환원효소들은 peroxidase, laccase 그리고 tyrosinase 등이 있으며<sup>17,18)</sup> abiotic agents인 점토나 copper, lead, silver 등의 염 또는 copper, zinc, manganese 등의 금속 산화물들도 oxidative coupling을 매개하는 것으로 알려져 있다.<sup>19-22)</sup>

이들 산화환원 촉매에 의한 oxidative coupling 반응은 토양환경 뿐만 아니라 수질환경에서 수많은 phenol과 aniline 관련화합물들간의 중합반응을 촉매하여 불용성 중합체를 형성하여 생성된 중합체를 침전 혹은 여과시켜 쉽게 제거시킬 수 있다. 결과적으로 산화환원효소는 토양환경에서 뿐만 아니라 수질환경의 정화를 위한 가능성 있는 촉매제로 간주되어질 수 있는 것이다.<sup>1-13,23,24)</sup>

지금까지 이러한 산화환원효소를 이용한 유기독성화합물의 무독화에 대하여 상당한 연구들이 이루어져 왔는데 대

부분의 연구에서 이미 정제되어 시판되고 있는 효소들을 사용하였다. 이러한 정제된 효소들의 이용은 이러한 무독화의 기작을 연구하고 반응 후의 물질들을 동정하는데 효율적으로 이용될 수 있다.<sup>25-28)</sup> 그러나 정제화된 효소의 실제 환경 하에서의 사용은 free enzyme이 혹은 환경과 산업적인 조건들을 극복할 수 없으며 그 처리에 있어서 비용이 막대하다는 사실에 의해 제한된다. 그러나 정제된 horseradish에 의해 촉매 되어질 수 있는 동일한 반응이 잘게 절단된 horseradish 식물체 뿌리를 직접 처리한 반응에서도 일어날 수 있음이 보고되었다.<sup>29)</sup> 즉 상당한 산화환원효소를 포함하는 식물체를 직접 처리함으로써 정제된 혹은 고정화된 효소를 이용한 무독화 반응과 동일한 반응이 일어날 수 있음이 제시되었다. 이러한 효소를 가지고 있는 식물체<sup>29,30)</sup>를 선별해 이용하게 되면 앞에서 설명된 free enzyme을 이용하는 것보다는 여러 가지 장점들이 있을 수 있다. 따라서 본 연구에서는 산화환원효소인 peroxidase를 함유한 식물체를 선별해, 선별된 식물체가 phenol 관련화합물들의 독성을 제거시킬 수 있는 가능성을 평가하기 위하여 실제로 제지, 염료 및 전자회사 등에서 배출될 수 있는 2,4-dichlorophenol를 model 독성물질로 하여 무독화 반응에 영향을 미치는 여러 반응조건(pH, 배양시간, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>농도, 반응에 요구되는 식물체의 양)을 조사하여 실제 폐수처리에 있어 식물체 이용의 가능성을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

### Peroxidase를 함유한 식물체

실험에 사용된 식물체인 냉이, 감자, 고구마, 순무 그리고 무는 시장에서 구입하였고 이를 수세한 후 2℃에 냉장 보관하면서 덩이줄기 부분을 이용하는 감자를 제외하고 모든 식물체는 뿌리부분을 0.5mm의 반지름으로 잘게 썰어 실험재료로 사용하였다.

### 기질 물질

실험에 사용된 기질인 2,4-dichlorophenol(2,4-DCP)은 Sigma Co. (St Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였으며, 이들 표준품은 methanol을 용매로 하여 모액을 조제하여 냉동고에(-20℃) 보관하면서 필요한 농도로 희석하여 실험 재료로 사용하였다.

### 식물체 내 peroxidase의 추출

식물체 20g에 phosphate buffer(pH 6.0) 100ml를 가해 homogenizer로 12,000rpm에서 1분간 고속마쇄하여 추출한 시료를 15,000rpm에서 30분간 원심 분리시켜 얻어진 상정액을 조효소액으로 사용하였다.

### 식물체 내 peroxidase의 활성 측정

식물체 내 peroxidase의 활성은 주기질로 1mM의 2,6-dimethoxyphenol(DMP)과 보조기질로 9mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 함유한 phosphate buffer(pH 6.0) 4ml에 0.1ml의 조효소액을 첨가하여 반응시켜 발색시킨 후 흡광도를 UV-spectrophotometer로 측정하였다. Peroxidase 1.0 unit는 468nm에서 20초 동안 0.001의 흡광도의 변화를 야기시키는 양으로 정의하였다.<sup>29,30)</sup>

### 2,4-DCP의 제거에 미치는 반응조건의 영향

#### 반응시간

Phosphate buffer(pH 6.0) 100ml에 800ppm의 농도가 되게 2,4-DCP를 처리하고 0.5mm의 반지름으로 잘게 썬 식물체 10g을 넣은 후 9 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 반응을 개시하고 1, 3, 5, 10, 15, 30 그리고 60분 동안 반응 시켰다. 각 반응시간마다 반응액 1ml에 1 M-HCl 200μl를 넣어 반응을 정지시킨 후 HPLC를 이용하여 반응액에 잔류하는 2,4-DCP의 양을 정량분석 함으로서 각 반응시간 동안 제거된 2,4-DCP의 양을 분석하였다.

#### 반응 pH

각각 1,200ppm이 되게 2,4-DCP를 처리한 0.2M acetate buffer(pH범위 3.0 - 5.0)와 0.2 M phosphate buffer(pH범위 6.0 - 8.0) 5ml에 식물체 1g을 각각 넣은 후 9 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하여 3시간 동안 반응시켜 반응 pH에 따른 2,4-DCP의 제거량을 측정하였다.

#### H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 농도

800ppm의 농도로 2,4-DCP를 처리한 phosphate buffer(pH 6.0) 5ml에 식물체 1g을 넣은 후 다양한 농도(3, 6, 9, 12, 20, 24mM)의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가시켜 3시간 동안 반응시켜 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에 따른 2,4-DCP의 제거량을 측정하였다.

#### 기질의 초기농도

2,4-DCP를 400, 600, 800, 1,000, 1,200, 1,400 그리고 1,600ppm의 다양한 농도로 처리한 phosphate buffer(pH 6.0) 5ml에 각각 식물체 1g을 첨가하고 9 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 처리하여 3시간 동안 반응시켜 기질의 초기농도에 따른 2,4-DCP의 제거량을 측정하였다.

### High performance liquid chromatography(HPLC) 분석

식물체로 반응시킨 반응액을 pH 1.0이하로 산성화시킨 후 12,000rpm으로 30분간 원심 분리시켜 그 상정액 1ml에 methanol 5ml를 가해 희석시키고 희석액을 0.45μm nylon filter를 이용하여 여과한 후 20μl를 분취하여 HPLC로 정량 분석 하였으며 이때의 HPLC 분석조건은 Table 1과 같다.

Table 1. The operating conditions of HPLC for analysis of substrate

Model	SHIMADZU-10A
Detector	UV 280nm
Column	$\mu$ -Bondapak C18 (3.9×300mm reverse phase)
Temp.	Room temp.
Flow rate	1.0ml/min
Sample size	20 $\mu$ l

이동상으로 methanol과 H<sub>2</sub>O(2% acetic acid, 0.018 M ammonium acetate, pH 3.3)의 비율이 5.5 : 4.5로 구성된 혼합 용매를 이용하였다.

### 결과 및 고찰

#### Peroxidase 활성이 우수한 식물체 선발

내분비계 장애물질로 알려져 있는 대표적인 phenol 화합물인 2,4-DCP로 오염된 폐수 처리를 위한 식물체를 선발하기 위하여 우리 나라에서 자생하거나 재배되고 있는 식물체중 현재까지 가장 우수한 peroxidase 활성을 가진 것으로 알려진 미국의 horseradish와 같거나 이와 비슷한 속에 속하는 식물과 peroxidase의 활성을 가졌다고 알려진 식물체를 선별하여 실험에 이용하였다. 실험에 사용된 식물체의 부위는 덩이줄기를 이용한 감자를 제외하고는 모든 식물체는 뿌리 부분을 이용하였다. Phosphate buffer(pH 6.0)상에서 주 기질물질로서 1mM의 2,6-dimethoxyphenol과 보조기질로 9 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 이용해 측정된 이들 식물체가 함유하고 있는 peroxidase의 활성 정도는 Table 2에 나타내었다.

선발된 식물체 뿌리에 대한 peroxidase의 활성을 비교해 본 결과 냉이가 활성이 가장 높게 나타났고 그 다음이 순무, 고구마, 감자, 배추 그리고 무 뿌리 순으로 나타났다. 냉이의 peroxidase 활성은 미국의 farm market에서 구입한 horseradish의 활성보다 무려 4배나 더 높은 활성을 가지고 있음이 관찰되었다. 따라서 이 후의 본 연구에서는 peroxidase의 활성이 가장 우수한 냉이와 순무를 이용하여 실험을 수행하였다.

식물체를 이용한 2,4-DCP의 제거에서 처리한 식물체 입자의 크기는 제거율에 영향을 줄 수 있는 요인으로 생각되나 Bollag 등<sup>2)</sup>의 연구 결과에 의해 제시된 처리한 식물체의

Table 2. Peroxidase activity of various plant materials

Plant materials	Activity(unit/ml)
Shepherd's purse	16.6
Horseradish*	4.4
Turnip	1.8
Sweet potato	1.4
Potato	0.5
Chinese cabbage	0.3
White radish	0.1

\* Horseradish was obtained from farm market in United States

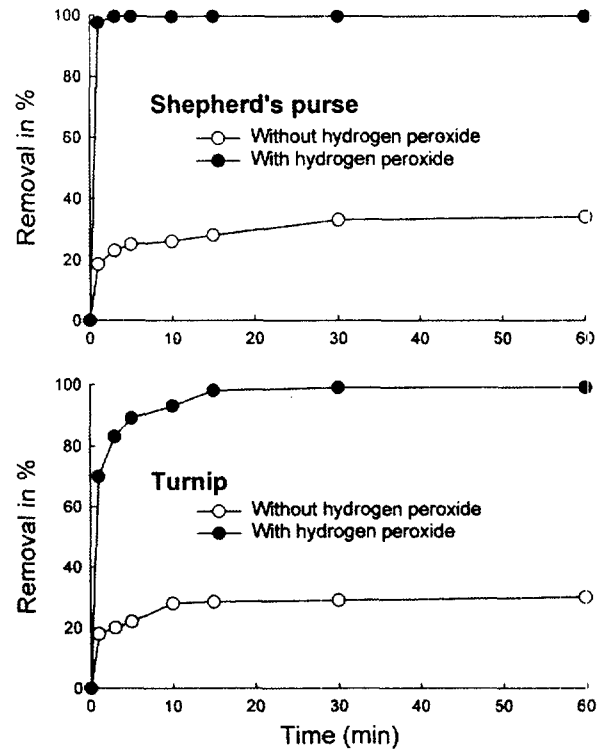


Figure 1. Time course for the removal of 2,4-DCP incubated with shepherd's purse or turnip

크기는 오염물질을 제거시키는 정도에 결정적인 영향을 주지 못한다는 사실에 근거해 본 실험에서는 제거율에 있어서 식물체 크기의 효과에 대한 실험을 배제하였다.

#### 2,4-DCP의 제거에 미치는 반응조건의 영향

Phosphate buffer(pH 6.0)용액 100ml에 800ppm의 농도로 2,4-DCP를 처리하고 선발된 식물체인 냉이 또는 순무 10g과 9 mM의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가한 후 반응시간대 별로 2,4-DCP의 제거율을 조사한 결과를 Figure 1에 나타내었다.

냉이 또는 순무 두 식물체 모두의 경우 2,4-DCP 제거가 신속하게 이루어져 냉이를 처리한 경우 3분 이내에 2,4-DCP의 최대 제거량에(99%이상) 도달하였고 순무의 경우 15분 동안의 반응으로 99%이상의 최대 제거량에 도달하였다. 따라서 반응시작 후 15분 이내에 2,4-DCP의 최대 제거량에 도달하여 15분간의 처리 시간은 미생물 분해에 의한 정화방법에 요구되는 수 주 혹은 수 개월 간의 기간과 비교해 볼 때 아주 짧은 것이라 할 수 있다. 이러한 짧은 처리 시간은 오염된 폐수를 처리하는 데 있어서 식물체의 이용을 가능하게 해주는 중요한 요소로 작용될 것으로 생각된다.

Figure 2는 냉이와 순무에 의한 2,4-DCP의 제거에 대한 pH의 영향을 나타낸 결과이다. 2,4-DCP의 제거에 있어서 pH의 영향은 pH 3.0과 8.0의 범위에서 조사되었으며, 2,4-DCP를 1,200ppm으로 첨가한 용액 5ml와 식물체 1g을 반응시킨

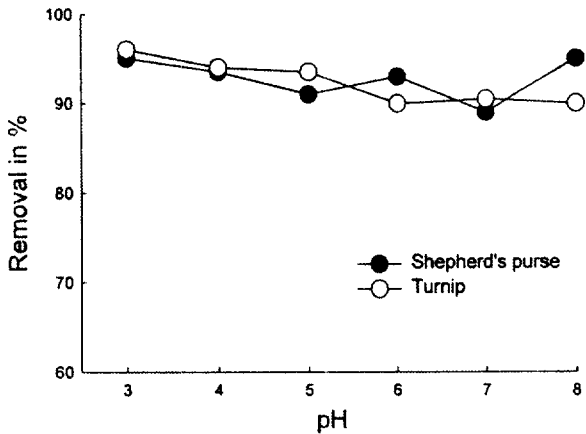


Figure 2. Effect of the removal of 2,4-DCP incubated with shepherd's purse or turnip

결과, pH 3.0과 8.0의 전 범위에서 90% 이상의 제거가 관찰되었다.

식물체를 직접 처리하였을 때 사용된 pH 범위에서 동일한 제거 효과를 가지는 것은 세포벽, 액포 및 세포질 등과 같은 식물체내 여러 조직 속에 산재하고 있는 peroxidase가 세포벽에 부착되거나 세포 입자 혹은 기관에 함입되어 서서히 활성을 나타내기 때문에 외부의 변화에 크게 영향을 받지 않은 것으로 생각된다. 이와 같은 추론은 직접 처리된 식물체내에 있는 peroxidase가 점토광물과 같은 지지체 위에 고정화된 효소와 마찬가지로 어느 정도의 보호작용을 가지고 있다고 제시한 Bollag 등<sup>2)</sup>과 Robinson<sup>17)</sup>의 연구 결과로 뒷받침된다. 따라서 산업현장에서 배출되는 폐수의 pH가 다양하기 때문에 처리하여야 할 폐수의 pH 범위에 관계없이 제거 효과가 우수한 점은 오염물질을 처리하는 데 있어서 식물체의 이용 가능성을 높여 준다고 할 수 있다.

전자수용체로 작용하는 보조 기질물질인 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 농도별로 처리하여 2,4-DCP의 제거율을 조사한 결과는 Table 3과 같았다.

2,4-DCP 용액에 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 첨가하지 않고 잘게 절단한 냉이 또는 순무를 첨가한 결과, 식물체 조직에 2,4-DCP의 물리적인 흡착(physical sorption) 또는 흡수가 관찰되었으며, 효소활성을 제거하기 위하여 끊인 식물체를 동일한 반응 조건으로 실험한 결과 동일한 양상이 관찰되었다. 즉, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의

Table 3. Effect of H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration on the removal of 2,4-DCP

Addition of H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> (mM)	% Removal of 2,4-DCP	
	Turnip	Shepherd's purse
0	41.7	60.1
3	70.0	84.0
6	87.2	93.9
9	>99	>99
12	>99	>99
20	>99	>99
24	>99	>99

첨가 없이 식물체에 의해 흡착 또는 흡수되어진 양은 냉이의 경우 54.1%, 순무의 경우 41.7%였다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 3에서 24mM까지의 변화를 주면서 반응시킨 결과, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 증가함에 따라서 2,4-DCP의 제거율도 증가하였다. 정제된 peroxidase로 매개된 반응에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>가 반응개시에 필수적인 전자수용체로 작용함으로써 효소 활성부위 내에 nucleophilic group을 형성시키고 이 nucleophilic group이 2,4-DCP의 hydroxyl group의 H를 이탈시켜 free radical들을 생성 시킴으로써 free radical들간의 auto-oxidation에 의한 중합으로 2,4-DCP가 제거될 수 있다. 따라서 Table 3에 제시된 식물체로 매개된 반응에서 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 증가함에 따라서 2,4-DCP의 제거정도가 증가한다는 결과들은 2,4-DCP의 제거가 식물체내에 존재하는 peroxidase에 의해 매개되었음을 제시한다. 그리고 저농도의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>는 충분히 전자수용체로서의 작용을 하지 못하여 2,4-DCP의 제거 정도가 낮은 것으로 생각된다. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도가 9mM일 때부터 최고 제거율을 나타내었고 이 후 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도를 증가시킨다 하더라도 더 이상의 제거율의 증가는 관찰되지 않았다. Bollag 등<sup>2)</sup>에 의하면, 과량의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 양을 처리하였을 경우, 제거율에 있어서 아주 작은 감소가 관찰되었고 이 현상을 과량의 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의한 효소의 부분적인 불활성화로 설명하고 있으나, 이런 불활성화의 현상이 본 실험에서 사용된 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 농도에서는 나타나지 않았다.

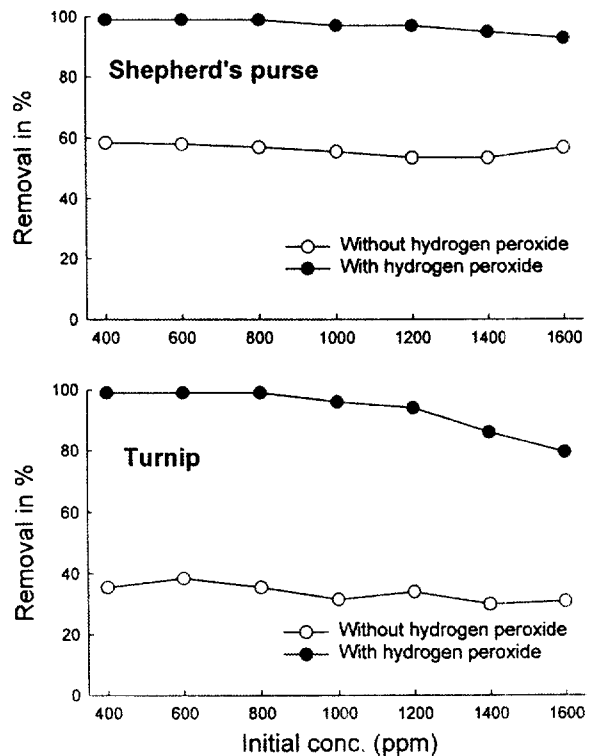


Figure 3. Effect of initial concentration on the removal of 2,4-DCP incubated with shepherd's purse or turnip

냉이 및 순무에 의한 2,4-DCP의 제거에 대한 기질의 초기 농도의 영향은 Figure 3에 나타내었다.

초기 농도가 높아짐에 따라서 2,4-DCP의 제거율은 감소되어, 냉이의 경우 초기농도 1,600ppm까지 90%이상의 제거율을 나타내었고, 순무의 경우, 초기 농도 1,200ppm까지 90%이상의 제거가 나타났으나 초기 농도가 1,600ppm로 증가됨에 따라서 제거율은 78.8%로 감소되는 결과를 나타내었다. 2,4-DCP에 있어서의 식물체에 의한 제거 정도는 초기 농도에 다소 영향을 받고 있지만 여전히 높은 제거율을 나타내어 생물학적 처리에 의한 실제 폐수 처리시 제거될 수 있는 물질의 농도가 제한될 수 있으나 식물체를 이용한 제거에 있어서는 폐수 처리농도에 크게 제한 받지 않을 것으로 사료된다.

## 요 약

수중에서 유기합성화합물의 oxidative coupling을 통한 제거에 촉매제로서 식물체의 직접적인 이용 가능성을 검토하기 위하여 제지, 염료 및 전자회사 등에서 배출되고 있는 phenolic 화합물인 2,4-DCP를 이용하였다. 이 제거반응은 식물체에 포함된 산화환원효소에 의해 매개되어지는 oxidative coupling반응에 의해 유기독성화합물들간의 중합반응으로 생성된 polymer가 침전됨으로서 야기되었다. 여러 식물체들을 선별하여 이들 식물체가 가지고 있는 peroxidase의 활성을 측정하고 냉이에서 가장 높은 peroxidase의 활성이 관찰되었고 순무, 고구마, 배추 그리고 무 뿌리의 순이었다. Peroxidase의 활성이 비교적 높은 것으로 나타난 순무와 냉이를 이용해 다양한 실험조건하에서 2,4-DCP의 제거정도를 조사한 결과 2,4-DCP의 최대제거는 냉이의 경우 3분 이내, 순무의 경우 15분 이내로 아주 신속하게 이루어졌으며, 실험을 수행한 pH 전 범위(pH 3.0 - 8.0)에서 높은 제거율(90% 이상)을 유지하였다. 전자수용체로 작용하는 hydrogen peroxide를 9mM 첨가하였을 때 최대 제거율을 보였으며, 그 농도를 증가시키더라도 제거율은 더 이상 증가되지 않았다. 초기농도를 달리하여 냉이와 순무에 의한 2,4-DCP의 제거율을 조사한 결과 냉이로 매개된 2,4-DCP의 제거율은 초기농도 1,600ppm까지 90% 이상의 제거율을 나타내었으나, 순무로 매개된 2,4-DCP의 경우 초기농도 1,200ppm까지 90%이상의 제거율을 나타내다가 초기농도가 1,600ppm로 증가되었을 때 78.8%로 제거율이 감소되어 유기독성물질의 초기농도는 식물체를 이용한 유기독성물질의 제거에 약간의 영향을 미치는 것으로 나타났다.

## 참 고 문 헌

1. Klivanov A. M., Tu T.-M. and Scott K. P. (1983) Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters. *Science.*, 221 : 259-261
2. Dec J. and Bollag J.-M. (1994) Use of plant material for the decontamination of water polluted with phenols. *Biotech. Bioengin.*, 44 : 1132-1139
3. Park J.-W., Dec J., Kim J.-E. and Bollag J.-M. (1999) Effect of humic constituents on the transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of oxidoreductive enzymes or birnessite. *Environ. Sci. Technol.*, 33, 2028-2034.
4. Kim J.-E., Fernandes E. and Bollag J.-M. (1997) Enzymatic coupling of the herbicide bentazon with humus monomers and characterization of reaction products, *Environ. Sci. Technol.*, 31, 2392-2398.
5. Tatsumi K., Freyer A., Minard R. D. and Bollag J.-M. (1994) Enzymatic coupling of chloroanilines with syringic acid, vanillic acid and protocatechuic acid, *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 735-742
6. Bollag J.-M., Liu S.-Y. and Minard R. D. (1980) Cross coupling of phenolic humus constituents and 2,4-dichlorophenol, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 44 : 52-56
7. Nannipieri P. and Bollag J.-M. (1991) Use of enzymes to detoxify pesticide-contaminated soils and waters, *J. Environ. Qual.*, 20 : 510-517
8. Tatsumi K., Wada S., Ichikawa, H., Liu S.-Y. and Bollag J.-M. (1992) Cross-coupling of a chloroaniline and phenolic acids catalyzed by a fungal enzyme, *Water Sci. Tech.*, 23 : 115-121
9. Simmons K. E., Minard R. D. and Bollag J.-M. (1989) Oxidative co-oligomerization of guaiacol and 4-chloroaniline, *Environ. Sci. Technol.*, 23 : 115-121
10. Simmons K. E., Minard R. D., Freyer A. and Bollag J.-M. (1986) Structural and quantitative analyses of 4-chloroaniline derived oligomers, *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 26 : 209-227
11. Simmons K. E., Minard R. D. and Bollag J.-M. (1988) Oxidative coupling and polymerization of guaiacol, a lignin derivative, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 52 : 1356-1360
12. Bollag J.-M. and Dec J. (1990) Naturally-produced organohalogens, *Kluwer Academic publisher, New York*, p. 161-169.
13. Bollag J.-M. and Bollag W. B. (1990) A model for enzymatic binding of pollutants in the soil. *Intern. J. Environ. Anal. Chem.*, 39 : 147-157.
14. Stevenson, F. J. (1994) *Humus Chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York, p.188-208.
15. Bollag J.-M. and Myres C. (1992) Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances, *Sci. Total Environ.*, 117/118 : 357-366

16. McBride M. B (1994) *Environmental Chemistry of Soils*. Oxford University Press, Inc., New York.
17. Robinson D. S. (1992) *Oxidative Enzymes in Foods*, Elsevier applied science, London and New York, p.1-47.
18. Mayer A. M. (1987) Polyphenol oxidase in plant-recent progress, *Phytochemistry*, 26 : 11-20.
19. McBride M. B. and Kung K.-H. (1991) Adsorption of phenol and substituted phenols by iron oxides. *Environ. Toxicol. Chem.*, 10 : 441-448
20. Shindo H. and Huang P. M. (1984) Catalytic effect of manganese(IV), iron(III), aluminum and silicon oxide on the formation of phenolic polymers, *Soil Sci. Soc. Am. J.*, 48 : 927-934
21. Shindo H. and Huang P. M. (1982) Role of Mn(IV) oxide in abiotic formation of humic substance in the environment, *Nature*, 298 : 363-365
22. Pal S., Bollag J.-M. and Huang P. M. (1994) Role of abiotic and biotic catalysts in the transformation of phenolic compounds through oxidative coupling reactions, *Soil Biol. Biochem.*, 26 : 813-820
23. Maloney S. W., Manem J., Mallevalle J. and Fiessinger F. (1986) Transformation of trace organic compounds in drinking water by enzymatic oxidative coupling, *Environ. Sci. Technol.*, 20 : 249-253
24. Alder P. R. and Splar J. M. (1994) Bioremediation of phenolic compounds from water with plant root surface peroxidase, *J. Environ. Qual.*, 23 : 1113-1117
25. Shannon M. J. R. and Bartha R. (1988) Immobilization of leachable toxic soil pollutants by using oxidative enzymes, *Appl. Environ. Microbiol.*, 54 : 1719-1723
26. Klibanov A. M., Alberti B. N., Morris E. D. and Felshin L. M. (1980) Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from waste waters, *J. Appl. Biochem.* 2 : 414-421
27. Klibanov A. M. and Morris E. D. (1981) Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water, *Enzyme Microb. Technol.* 3 : 119-122.
28. 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.
29. Pathak S. U., Vikram S. K., Ghole S. and Hegde M. U. (1992) Effect of activation methods on affinity chromatography of potato polyphenoloxidase, *Phytochemistry*, 31 : 1481-1483
30. Janovitz-Klapp A., Richard F. and Nicolas J. (1989) Polyphenoloxidase from apple, partial purification and properties, *Phytochemistry*, 28 : 2903-2907