

Polyethylene glycol (PEG) 수용액에서 laccase를 이용한 비스페놀A의 처리

김영진†

맥길대학교 토목공학과

Oxidative Conversion of Bisphenol A with Laccase in the Presence of Polyethylene Glycol

Young Jin Kim†

Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University

(Received April 20, 2005; Accepted July 10, 2005)

ABSTRACT

Laccase catalyzes the oxidation and polymerization of aromatic compounds in the presence of molecular oxygen. Studies were conducted to characterize the use of polyethylene glycol (PEG) as an additive to keep up the enzymatic stability. The enzymatic activities highly remained and bisphenol A (BPA) was rapidly converted in the presence of 5 mg/l of PEG. These effects were accomplished with PEG of molecular weight 3,350. A linear relationship was found between the quantity of BPA to be converted (10-120 μ M) and the optimum dose of PEG required for greater than 95% conversion. This result suggests that it is the interaction between the PEG and the reaction products. In the optimum dose of PEG, the aeration of reaction mixture neither enhanced the conversion of BPA nor retarded the inactivation of the enzyme.

Keywords: laccase, bisphenol A, 2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane, endocrine disrupting chemical, polyethylene glycol

I. 서 론

비스페놀A(2,2-bis(4-hydroxyphenyl)propane)는 폴리 카보네이트, 에폭시수지 및 페놀수지 등의 고분자 합성에서 작업성을 증진시키기 위해 흔히 사용되고 있는 물질의 하나이다. 이 화합물은 인간 유방암세포 (MCF-7)의 증식을 촉진하며, estrogen receptor-a (Era) 와 estrogen receptor-b (ERb) 단백질에 대해 17 β -estradiol과 경쟁하는 것으로 알려지고 있다.^{1,2)} 또한 동물실험 결과 야생동물 및 인간의 내분비계 기능을 방해할 수 있는 것으로 알려져 있다.³⁾ 따라서 이 비스페놀A는 그 독성으로 인해 환경으로 배출되면 커다란 환경적 위험성이 있다.

Laccase는 구리분자를 갖는 polyphenol oxidase

(benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)로 페놀계 화합물, 방향족 아민류 및 염료 화합물 등을 산화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.⁴⁻⁶⁾ 최근 laccase를 이용하여 산업폐수에 포함된 난분해성 오염물질의 분해 및 이들이 갖는 독성을 제거하려는 연구가 이루어지고 있다.⁷⁻¹⁰⁾ 그러나 이 효소는 반응 중 생성물에 의해 쉽게 불활성화되는 경향이 있다.¹¹⁾ 이와 같은 문제점을 보완하기 위해 여러 가지 첨가제를 사용하여 laccase의 안정성을 향상시키려는 연구가 있으나, 구체적인 연구는 제대로 이루어지고 있지 못하다.¹²⁾ 그 중에 하나가 폴리에틸렌글리콜(PEG)로서 peroxidase같은 효소에서는 비교적 연구가 자세히 이루어졌으나,^{13,14)} laccase에 대해서는 연구된 것이 거의 없다. 이 PEG는 효소활성의 저하를 막아 처리비용을 절감할 수 있으며 식용으로서 사용 가능한 화합물로 독성이 없기 때문에 비스페놀A가 첨가된 폐수처리시 응용할 있는 좋은 재료 중 하나이다.^{15,16)}

이 연구의 목적은 (1) 비스페놀A의 처리시 laccase의

†Corresponding author : Department of Civil Engineering and Applied Mechanics, McGill University
Tel : 1-514-398-6860, Fax : 1-514-398-7361
E-mail : jin2701@hanmail.net

불활성화 방지제로서 PEG의 적용가능성 확인; (2) PEG의 최적 분자량 확인; (3) 용해된 비스페놀A의 처리에 필요한 PEG의 최적량 확인; (4) PEG에 의한 산소 소모효과에 대해 조사하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

비스페놀A(BPA)는 Tokyo Chemical Industry (Palo Alto, CA, USA)에서 구입하였다. Laccase (*Trametes versicolor*), ABTS (2,2'-azinobis(3-ethyl benzthiazoin-6-sulfonic acid), 구연산나트륨, 구연산, PEG-200, PEG-600, PEG-1000 및 PEG-3350는 Sigma-Aldrich (Oakville, Ontario, Canada)에서 구입하였다. 메탄올, 초산나트륨, 초산은 Fisher Scientific (Montreal, QC, Canada)에서 구입하였다. PEG-20,000과 PEG-35,000는 Fluka Chemical Corporation (Ronkonkoma, NY, USA)에서 구입하였으며, PEG-8000과 PEG-10,000는 Aldrich Chemicals (Milwaukee, WI, USA)에서 구입하여 사용하였다.

2. 분석방법

Laccase의 활성은 ABST 산화에 의한 발색법으로 측정하였다. 반응액의 조성은 2.5 mM ABTS, 50 mM 구연산 완충용액(pH 4.5)에 적정량의 효소액을 첨가하여 1 ml로 만든 후 25°C에서 측정하였다. ABTS의 산화에 의한 흡광도는 420 nm($\epsilon_{420} = 3.67 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)¹⁷에서 spectrophotometer 8453 (Hewlett-Packard, Waldbronn, Germany)를 사용하여 측정하였다.

소량의 초산원액을 반응액에 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 반응액에 포함된 triclosan의 분석은 ZORBAX SB-C18 컬럼(Agilent, San Diego, CA, USA)이 장착된 HPLC 1100(Agilent, USA)을 이용하여 분석하였다. 분석조건은 277 nm에서 UV detector를 사용하여 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다(water:acetonitrile = 40/60, v/v).

3. 실험방법

비스페놀A의 농도는 비스페놀A가 반응액에서 99.9% 전환되었을 경우 사용한 HPLC의 분석 한계를 감안하여 120 μM 로 정하였다. 이 농도에서 25 mM 초산완충용액(pH 5.0)을 이용하여 25°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 반응액의 초기 효소활성은 0.3 U/ml이 되도록 조절하였다. 반응액의 제조를 위해 비스페놀A를 100% 메탄올에 용해시켜 12 mM의 보존용액을 만들었으며,

PEG는 탈이온수에 1.0 g/l의 농도로 보존용액을 만들어 사용하였다.

비스페놀A의 처리시 PEG의 최적 분자량과 최적량, 효소의 안정성에 대한 PEG의 효과의 평가는 2 ml의 반응조를 사용하였다. 최적 분자량을 평가하기 위해 사용된 PEG의 농도는 50 mg/l이었다. 초기 농도 120 μM 의 비스페놀A를 처리하기 위한 최적량의 PEG에 대한 실험에서 사용된 PEG의 농도는 0.1~10 mg/l이었으며, 효소의 안정성에 대한 최적량의 PEG 실험에 사용된 PEG의 농도는 5~50 mg/l이었다.

PEG와 비스페놀A의 양적관계를 확인하기 위한 실험에서 사용된 PEG와 비스페놀A의 농도는 각각 0.5~5.0 mg/l과 10~120 μM 이었다.

반응 중 일어나는 laccase의 불활성화와 교반에 의한 용존산소효과를 측정하기 위해 2시간 동안 반응을 시키면서 효과를 측정하였다. 교반효과의 측정은 10 ml 반응조를 사용하였으며 마그네틱바를 이용하여 교반하였다.

모든 실험은 2회 실시하였으며, 평균값을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. PEG 분자량 및 투입량의 최적화

비스페놀A의 처리에 대한 PEG의 최적 분자량을 확인하기 위해 각각의 분자량의 PEG를 과량의 농도인 50 mg/l을 반응액에 투입하였고,¹²⁾ Fig. 1은 그 결과를 보여주고 있다. 사용된 PEG는 분자량이 200~35,000이었고, 초기 비스페놀A의 농도와 효소활성은 각각 120 μM 과 0.3 U/ml이었다. PEG에 의한 비스페놀A의 처리

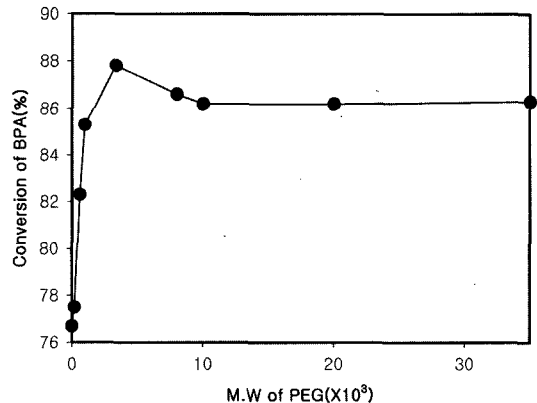


Fig. 1. Conversion of BPA as a function of PEG molecular weight (120 μM BPA, 50 mg/l PEG, 0.3 U/ml laccase, 1 h batch reactions). All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

효과는 분자량 3,350까지 증가($p < 0.05$)하였다가, 분자량 3,350 이상에서는 분자량 3,350과 통계적으로 유의하지 않는 수준($p > 0.05$)에서 처리효율이 감소하였다. 따라서 비스페놀A를 처리하는데 PEG의 최적 분자량은 3,350이며, 이 분자량은 horseradish peroxidase로 페놀을 처리할 때와 동일한 결과이다.¹³⁾ 그러나 soybean peroxidase로 페놀을 처리할 때 최적의 분자량은 35,000이었다.¹⁴⁾ 따라서 최적의 분자량은 사용하는 효소나 처리하는 기질에 따라 차이가 있는 것으로 생각된다.

비스페놀A의 처리시 PEG의 최적량을 결정하기 위해 120 μM 의 비스페놀A와 0.3 U/ml의 효소활성을 갖는 반응액에 PEG-3,350을 첨가하여 실험하였다. PEG는 합성 첨가물로 생물학적 산소요구 등 잠재적으로 환경에 영향을 미칠 수 있는 물질이다. 따라서 비스페놀A의 처리시 그 사용량을 최소화하는 것이 바람직하다. Fig. 2에서 비스페놀A의 초기 농도 120 μM 에서 PEG-3,350이 5 mg/l까지는 처리효율을 증가시키는 것을 보여주고 있다($p < 0.05$). 그러나 5 mg/l 이상의 농도에서는 더 이상 처리효율이 증가하고 있지 못하다. Fig. 1과 Fig. 2에서 비스페놀A 처리시 효과는 PEG 분자량과 사용량에 의해 영향을 받는다는 것을 보여주고 있다. 따라서 제한된 양의 효소를 사용하여 비스페놀A를 처리할 때 PEG의 최적량은 최대의 처리효율을 얻을 수 있는 최소량으로 정의할 수 있다.

2. 효소활성에 대한 PEG 효과

PEG의 첨가에 의해 효소활성이 안정적으로 유지되면

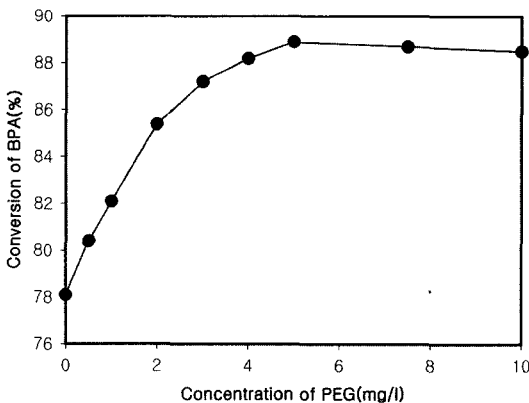


Fig. 2. Conversion of BPA as a function of PEG dose using PEG-3350 (120 μM BPA, 0.3 U/ml laccase, 1 h batch reactions). All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

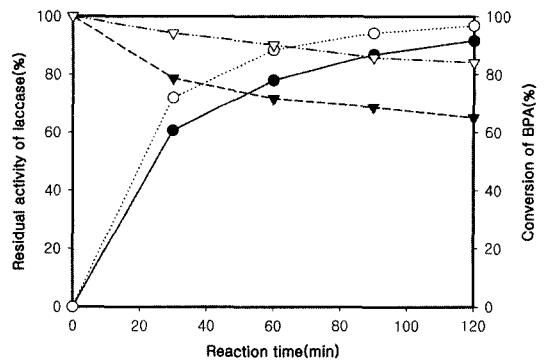


Fig. 3. Conversion of BPA with (○) and without PEG (●) and residual activity of laccase with (△) and without PEG (▲) (120 μM BPA, 5 mg/l PEG-3350, 0.3 U/ml laccase, 2 h batch reactions). All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

PEG를 사용하지 않을 때보다 상대적으로 효소활성이 높아 비스페놀A의 처리효율이 증가할 수 있다. 반응 동안 PEG가 효소활성의 저하를 막는 것을 확인하기 위해 120 μM 의 비스페놀A와 0.3 U/ml의 효소활성을 갖는 반응액에 PEG를 첨가한 반응액과 첨가하지 않은 반응액에서 처리효율과 잔류효소활성을 2시간 동안 측정하였다. Fig. 3은 PEG-3350가 반응시 효소의 불활성을 지체시키며, 처리효율을 증가시키는 것을 보여주고 있다.

비스페놀A의 처리시 효소활성의 감소는 효소와 반응 중에 생긴 생성물과의 반응에 의한 것으로 알려져 있다.¹¹⁾ 구조분석연구에 의하면 PEG 같은 폴리머 분자의 구형 모양이 laccase의 불활성화를 막을 수 있는 것으

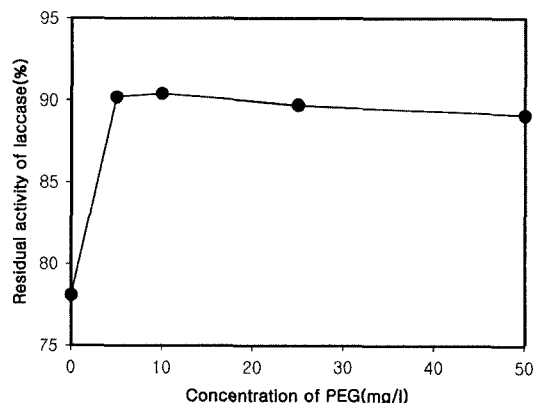


Fig. 4. Laccase activity as a function of PEG-3350 (120 μM BPA, 0.3 U/ml laccase, 1 h batch reactions). All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

로 알려지고 있다.¹²⁾ PEG는 자기 자신이 뭉쳐지면서 물분자와 결합하여 비교적 큰 수화물을 만들 수 있는 것으로 알려지고 있으며, 이와 같은 메커니즘이 laccase의 불활성화를 막는 것으로 생각된다.^{16,19)}

PEG와 laccase 사이의 상호작용을 확인하기 위해 과량의 PEG를 반응액에 첨가시켰다. 만일 PEG에 의한 방어기작이 효소와의 직접 반응에 의한 것이라면 PEG의 첨가 농도를 증가시키면 잔류효소활성도 증가할 것이다. 그러나, Fig. 4를 보면 PEG-3350를 최적량 이상으로 첨가해도 5 mg/l 이상에서는 잔류효소활성이 증가하고 있지 않다.

또한 Fig. 2의 결과에서도 5 mg/l 이상의 PEG 첨가에도 처리효율이 증가하고 있지 않아 비스페놀A와 PEG 사이에 양적관계가 있다는 것을 암시하고 있다.

3. 비스페놀A와 PEG의 양적관계

비스페놀A의 농도 10~120 μM에서 PEG-3350와의 양적관계를 확인하는 실험을 실시하였다. PEG는 환경에 부담을 줄 수 있기 때문에 처리하는 비스페놀A에 대해 사용량을 최적화하는 것이 필요하다. 각각의 비스페놀A의 농도에서 사용되는 최적의 PEG 양은 95% 이상의 비스페놀A의 처리효율을 얻기 위한 농도로 정의하였다. Fig. 5는 초기 비스페놀A의 농도와 최적량의 PEG 농도와의 직선관계가 있음을 보여주고 있다. Fig. 5의 기울기는 43 mg[PEG]/mM[비스페놀A]로 페놀에 대한 soybean peroxidase의 값보다 조금 높은 값을 보이고 있다.¹⁴⁾ 이와 같은 차이는 효소의 종류와 처리하는 기질의 차이에 의한 것으로 생각된다.

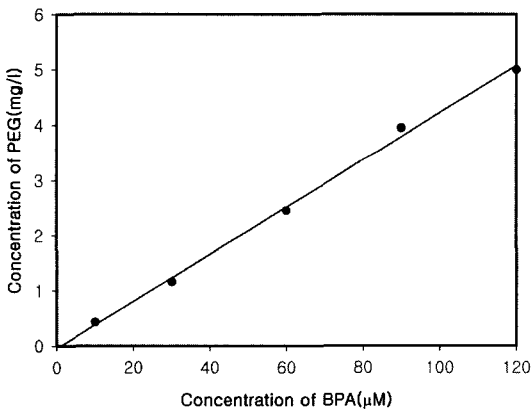


Fig. 5. Minimum PEG-3350 doses at minimum laccase which are required to accomplish >95% BPA conversion as a function of initial BPA concentration (2 h batch reactions). (slope = 43 mg//mM, R² = 0.997) All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

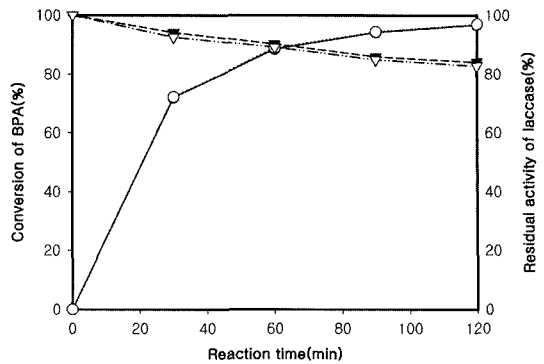


Fig. 6. BPA conversion BPA with (○) and without aeration (●) and laccase activity with (△) and without aeration (▲) (120 μM BPA, 5 mg// PEG-3350, 0.3 U/ml laccase, 2 h batch reactions). All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

4. PEG 첨가시 교반효과

PEG는 기질에 대한 초기 반응속도에는 영향을 주지 않으면서 총산소 소모량을 증가시키는 것으로 알려져 있다.¹²⁾ 만일 첨가된 PEG가 효소반응에 필요한 용존산소를 모두 소모하게 되면 용존산소의 부족으로 혹은 감소로 처리효율이 감소할 것이다. 따라서 PEG를 현장에 적용하는데 앞서 이에 대한 실험이 필요하며, 대조군으로 반응조를 완전히 개방한 상태에서 마그네틱바를 이용하여 충분히 교반시켜 용존산소의 부족이 일어나지 않도록 유지하면서 2시간 동안 반응을 시켰다.

Fig. 6을 보면 교반시키거나 아니한 어느 경우에도 비스페놀A의 처리효율이나 잔류효소활성에는 차이가 없었다. 따라서 PEG를 비스페놀A가 포함된 폐수를 처리하는데 사용해도 PEG에 의한 용존산소의 부족은 발생하지 않을 것으로 생각된다.

IV. 결 론

이 연구는 PEG가 laccase로 비스페놀A를 처리할 때 효소의 불활성을 억제하며 반응시간을 줄여 주기 때문에 비스페놀A 처리에 유용하게 사용될 수 있음을 보여주고 있다. PEG는 가격이 저렴하고 독성이 없으므로 현장적용이 가능하며, 효소 사용량을 줄임으로써 처리 비용을 절감할 수 있는 이점을 가지고 있다. 비스페놀A의 처리시 PEG의 최적 분자량은 3,350으로 나타났다. 비스페놀A의 농도 10~120 μM에서 95% 이상의 처리효율을 얻기 위해 사용되는 최적 PEG의 양은 초기 비스페놀A와 직선적인 관계가 있는 것으로 확인되었다. 이 결과는 PEG가 반응 중에 생기는 생성물과

반응하여 효소의 불활성화를 막고 있으며 PEG와 처리하는 비스페놀A와는 양적관계가 있다는 것을 암시하고 있다. PEG는 laccase 처리시 반응액 중의 용존산소의 소모를 촉진하는 것으로 알려져 있으나 현장 적용시 충분한 폭기를 통해 이와 같은 문제를 극복할 수 있다. 그러나 PEG는 효소의 불활성화를 막아 사용량을 줄일 수 있다는 이점을 갖고 있으나 다음 처리공정이나 처리수가 방출되는 환경에 영향을 줄 수 있으므로, 이들에 대한 영향을 최소화하기 위해 공장규모의 적용실험이 선행되는 것이 필요하다.

참고문헌

- Krishnan, A. V., Stathis, P., Permeth, S. F., Tokes, L. and Feldman, D. : Bisphenol-A: an estrogenic substance is released from polycarbonate flasks during autoclaving. *Endocrinology*, **132**, 2279-2286, 1993.
- Takemura, H., Ma, J., Sayama, K., Terao, Y., Zhu, B. T. and Shimoi, K. : In vitro and in vivo estrogenic activity of chlorinated derivatives of bisphenol A. *Toxicology*, **207**(2), 215-221, 2005.
- Tyler, C. R. and Routledge, C. R. : Oestrogenic effects in fish in English rivers with evidence of their causation. *Pure Appl. Chem.*, **70**, 1795-1804, 1998.
- Wong, Y. X. and Yu, J. : Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*, **33**(16), 3512-3520, 1999.
- Swamy, J. and Ramsay, J. A. : Effects of glucose and NH_4^+ concentrations on sequential dye decoloration by *Trametes versicolor*. *Enzyme Microb. Technol.*, **25**(3-5), 278-284, 1999.
- Krastanov, A. : Removal of phenols from mixtures by co-immobilized laccase/tyrosinase and Polyclar adsorption. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.*, **24**(6), 383-388, 2000.
- D'Annibale, A., Ricci, M., Quarantino, D., Federici, F. and Fenice, M. : *Panus tigrinus* efficiently removes phenols, color and organic load from olive-mill wastewater. *Res. Microbiol.*, **155**(7), 596-603, 2004.
- Durante, D., Casadio, R., Martelli, L., Tasco, G., Portaccio, M., De Luca, P., Bencivenga, U., Rossi, S., Di Martino, S., Grano, V., Diano, N. and Mita, D. G. : Isothermal and non-isothermal bioreactors in the detoxification of waste waters polluted by aromatic compounds by means of immobilised laccase from *Rhus vernicifera*. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic*, **27**(4-6), 191-206, 2004.
- 김영진 : Laccase를 이용한 Triclosan의 처리. 한국환경보건학회지, **31**(1), 61-65, 2005.
- Kim, Y. J. : Impact of Dissolved Wastewater Constituents on Laccase-Catalyzed Treatment of Bisphenol A. 한국환경보건학회지, **30**(2), 161-166, 2004.
- Kim, Y. J. : Reaction Conditions for Laccase Catalyzed Degradation of Bisphenol A. *Kor. J. Env. Hlth.*, **30**(2), 79-83, 2004.
- Kulys, J., Vidziunaite, R. and Schneider, P. : Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers. *Enzyme Microb. Technol.*, **32**, 455-463, 2003.
- Nakamoto, S. and Machida, N. : Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalyzed reaction using additives. *Water Research*, **26**, 49-54, 1992.
- Kinsley, C. and Nicell, J. A. : Treatment of aqueous phenol with soybean peroxidase in the presence of polyethylene glycol. *Biores. Technol.*, **73**, 139-146, 2000.
- Cooper, V. A. and Nicell, J. A. : Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research*, **30**, 954-964, 1996.
- Harris, J. M. : Poly(Ethylene Glycol) Chemistry. Plenum Press, New York, 1-28, 1992.
- Wolfenden, B. S. and Wilson, R. L. : Radical cations as reference chromogens in kinetic studies of one-electron transfer reactions: pulse radiolysis of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenz-thiazoline-6-sulphonate). *J. Chem. Perkin. Trans.*, **2**, 805-812, 1982.
- Nicell, J. A., Saadi, K. W. and Buchanan, I. D. : Phenol polymerization and precipitation by peroxidase and an additive. *Biores. Technol.*, **54**, 5-16, 1995.
- Donato, I. D., Magazu, S., Maisano, G., Majolino, D., Migliardo, P. and Pollicino, A. : Hydration phenomena and hydrogen bond connectivity in polymeric aqueous solutions. *Mol. Phys.*, **87**, 1463-1469, 1995.