

Laccase를 이용한 Chlorophene 산화전이에 관한 연구

김종오 · 김영진*

동남보건대학 환경보건과

Laccase-Catalyzed Transformation of Chlorophene

Jong-Oh Kim · Young Jin Kim*

Department of Environmental Health, Dongnam Health College

(Received November 9, 2006/Accepted February 6, 2007)

ABSTRACT

Laccase catalyzes the oxidation and polymerization of aromatic compounds in the presence of molecular oxygen. The oxidative transformation of chlorophene with laccase was conducted in a closed, temperature controlled system. The optimal pH for transformation of chlorophene was proven to be about 5-6. As the temperature rose up to 55°C, the transformation of chlorophene increased. The chlorophene transformation was not enhanced in the presence of soluble polymers. The toxicity of the reaction mixture was increased two times than that of initial reaction mixture after the enzymatic treatment. ABTS has enhanced chlorophene transformation at 0.1 mM and showed negative linear relationship with residual chlorophene by the reaction.

Keywords: laccase, chlorophene, transformation, ABTS

I. 서 론

Laccase, tyrosinase, peroxidase와 같은 산화효소들은 hydroxyl기나 amine기를 갖고 있는 여러 종류의 방향족 화합물의 산화 반응을 촉진하는 것으로 알려져 있다. 또한 이 효소들은 비교적 넓은 기질특이성을 갖고 있어 중요한 환경 오염물질을 산화시킬 수 있는 것으로 알려져 있다.¹⁻³⁾ 이 중 laccase(benzenediol:oxygen oxidoreductase, EC 1.10.3.2)는 방향족 화합물의 산화 반응에 분자상태의 산소를 산화제로 이용하기 때문에 경제적이며 안전하게 사용할 수 있는 장점을 갖고 있다.¹⁾ 최근 laccase를 이용해서 산업폐수에 포함된 난분해성 오염물질의 처리 및 이들이 갖는 독성을 제거하려는 연구가 이루어지고 있다.^{1,4)}

Chlorophene(2-Benzyl-4-chlorophenol)은 광범위하게 이용되는 항균물질로서 병원이나 가정에서 소독을 목적으로 폭 넓게 사용되고 있다. 이 화합물은 'emerging contaminants'로 분류되고 있는 물질로서 내성을 갖고 있는 세균의 출현 가능성 때문에 환경에 배출되는 것

에 높은 관심을 기울여야 한다.^{5,6)} MnO₂를 이용한 처리 방법은 생성물의 독성 때문에 새로운 처리방법에 대한 연구와 처리된 폐수의 재사용 시 깊은 배려가 필요하다.⁷⁾ 이 chlorophene은 페놀 구조를 갖는 화합물로 laccase의 좋은 기질이 될 수 있다. 그러나 이 효소는 반응 중에 쉽게 불활성화되는 경향이 있어 이를 보완하기 위해 여러 가지 수용성 첨가제를 사용하여 laccase의 안정성을 향상시키려는 연구가 이루어지고 있다.^{4,8,9)} 이러한 첨가제들은 효소의 불활성화를 막아 처리비용을 절감할 수 있는 장점을 갖고 있다.¹⁰⁾ ABTS와 같은 mediator도 laccase의 효소반응을 촉진하는 것으로 알려지고 있다.

이 연구에서는 laccase를 이용한 chlorophene의 처리 가능성, pH 및 온도에 의한 영향과 처리된 반응물의 독성 확인과 mediator 및 첨가제(polymer)에 의한 처리 효과에 대해 조사하였다.

II. 연구방법

1. 실험재료

Laccase(*Trametes versicolor*), 구연산나트륨, 구연산, glycine, ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethyl benzthiazoino-6-sulfonic acid), ficoll(Fisher, >98%), polyethylene glycol

*Corresponding author : Department of Environmental Health, Dongnam Health College
Tel: 82-31-2496-459, Fax: 82-31-2496-450
E-mail : jin2701@hanmir.com

(PEG-35000, Fluka, >95%), polyvinyl alcohol(Fisher, >95%), chlorophene은 Sigma-Aldrich(서울, 한국)에서 구입하였다. 메탄올, 초산, 가성소다는 대정화학(서울, 한국)에서 구입하여 사용하였다.

2. 분석방법

Laccase의 활성은 ABTS 산화에 의한 발색법으로 측정하였다. 반응액의 조성은 2.5 mM ABTS, 50 mM 구연산 완충용액(pH 4.5)에 적정량의 효소액을 첨가하여 1 ml씩 만든 후 25°C에서 측정하였다. ABTS의 산화에 의한 흡광도는 420 nm($\epsilon_{420} = 3.67 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)에서 UV/VIS spectrophotometer Cary 1C(Varian, Australia)를 사용하여 측정하였다. 1 Unit는 1분 동안 1 μM 의 ABTS의 산화에 필요한 효소의 양으로 정의하였다.

소량의 초산원액을 반응액에 첨가하여 효소반응을 중지시켰다. 반응액에 포함된 chlorophene의 분석은 ZORBAX SB-C18 컬럼(Agilent, USA)이 장착된 HPLC 1100(Agilent, USA)을 이용하여 분석하였다. 분석조건은 284 nm에서 UV detector를 사용하여 1.0 ml/min의 유속으로 분석하였다(water : acetonitrile = 30/70, v/v).

시료의 독성은 Microtox M500(MICROBICS, USA)을 이용하여 측정하였다. 광도는 발광세균(*Vibrio fischeri*)의 현탁액에 시료를 투입하기 전과 투입한 후 5분 후에 측정하였다. 발광세균에 대한 활성측정은 100 mg/l 페놀 표준용액을 이용하여 확인하였다. 페놀에 대한 EC_{50} 는 $19.82 \pm 0.52 \text{ mg/l}$ (95%의 신뢰구간)로 제작자의 권장 값과 일치하였다. 반응이 완료된 시료는 독성을 측정하기 전에 NaOH(1.0%, w/v)를 이용하여 pH 6.5로 조절하였다.

3. 실험방법

Chlorophene은 초기 농도는 반응액에서 99.9% 전환되었을 경우 사용한 HPLC의 분석 한계를 감안하여 0.1 mM로 정하였다. 이 농도에서 25 mM 완충용액을 이용하여 25°C에서 반응시켰다. 반응액의 초기 효소활성은 0.2 U/ml이 되도록 조절하였다. 반응은 10 ml 갈색 바이알에서 시켰다. 반응을 시작하기 전에 완충용액을 심하게 흔들어 산소를 용해시켰다. 반응액의 제조를 위해 chlorophene은 100% 메탄올에 용해시켜 10 mM의 보존용액을 만들어 사용하였다.

Chlorophene 처리의 최적 pH에 대한 실험은 pH 3-10의 범위에서 25 mM 초산완충용액(pH 3-5.5), 25 mM 인산완충용액(pH 6-8), 25 mM 글리신완충용액(pH 9-10)을 사용하여 실험하였다.

온도에 대한 영향은 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65°C의 범위에서 실험하였다.

효소농도에 따른 처리효과에 관한 실험은 chlorophene 0.1 mM 농도에서 0.03-2.0 U/ml 범위에서 1시간 동안 처리하였다.

시료의 독성테스트를 위해 0.1 mM chlorophene 초기 농도에서 1.0 U/ml의 효소 활성으로 4시간 동안 반응시켜 chlorophene을 완전히 처리하였다. 효소를 처리하지 않은 대조군은 독성 테스트 동안의 반응을 막기 위해 40분 동안 열처리하여 완전히 활성을 잃은 효소를 첨가하였다.

Mediator에 의한 효과를 실험하기 위해 chlorophene 0.1 mM의 농도에서 ABTS의 2.5-100 μM 농도에서 실험하였다. ABTS는 탈이온수에 용해하여 10 mM의 보존용액을 제조하여 사용하였다.

첨가제(soluble polymer)에 의한 효과를 실험하기 위해 0.1 mM chlorophene의 초기농도에서 0.2 U/ml 효소활성으로 polyethylene, polyvinyl alcohol, ficoll의 농도 25 mg/l에서 실험하였다. 첨가제는 2.5 g/l의 농도로 탈이온수에 보존용액을 만들어 사용하였다.

모든 실험은 2회 실시하였으며 평균값을 그림과 표에 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 반응조건에 의한 영향

Laccase를 이용하여 chlorophene을 처리할 때 처리 효율은 pH, 온도 및 효소의 농도 등에 따라 영향을

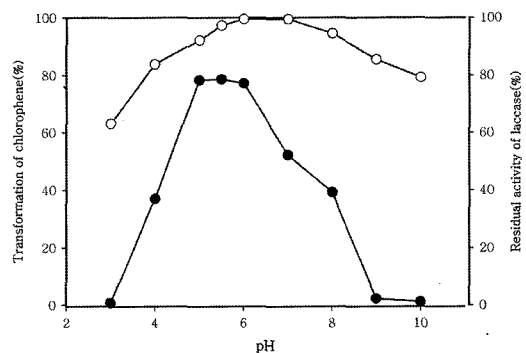


Fig. 1. Effect of pH on chlorophene transformation (●) and residual activity when incubated without chlorophene (○). Reaction conditions: 0.1 mM chlorophene, 0.2 U/ml laccase, 25 mM buffer (acetate buffer: pH 3-5.5), phosphate buffer (pH 6-8), glycine buffer (pH 9-10), 25°C, with a reaction time of 1 hour. All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

받을 수 있으므로 이들의 효과를 확인하는 것이 필요하다.

Fig. 1은 pH에 의한 chlorophene의 처리효율과 완충 용액에서의 laccase의 불활성화를 보여주고 있다. Laccase를 이용한 chlorophene의 산화전이는 pH 4-8의 범위에서 일어났으며 pH 5-6에서는 약 80%의 산화전이율로 다른 구간보다 높은 전이율을 보이고 있어 반응을 위한 최적 pH는 약 5-6임을 알 수 있다. 이 최적값은 보고된 laccase의 등전위점보다 약간 높은 값을 보여주고 있다.¹²⁾ 그러나 Fig. 1에서 보면 chlorophene이 첨가되지 않은 반응액에서 laccase의 활성은 pH 4-8 사이에서 80% 이상 안정적으로 유지되는 것을 볼 수 있다. 이 결과는 *Trametes versicolor*에서 유래된 laccase로 chlorophene을 처리할 때 그 효율은 완충용액의 pH에 좌우된다는 것을 보여주고 있다.

Chlorophene 처리에 대한 온도에 대한 영향은 Fig. 2에서 볼 수 있다. 결과를 보면 처리효율은 55°C에서 93%까지 산화전이율이 증가하다가 55°C를 넘으면 처리 효율이 감소하고 있다. 55°C를 넘으면 효소의 불활성화 속도가 반응속도의 증가보다 커서 결과적으로 처리 효율이 감소하고 있다. 또한 높은 온도에서의 처리 효율은 용존산소의 감소에 의해서도 영향을 받을 수 있다.¹³⁾ 특히 반응액에서 laccase의 잔류 활성은 25°C 이상에서 크게 감소하고 있으며 가장 처리 효율이 높은 55°C에서는 약 10%의 활성만이 남아 있었다. 따라서 laccase로 chlorophene을 처리할 때 상온이나 상온에 유사한 조건에서 처리하는 것이 불필요한 효소의 불활성화를 최소화할 수 있다고 생각된다.^{4,14)}

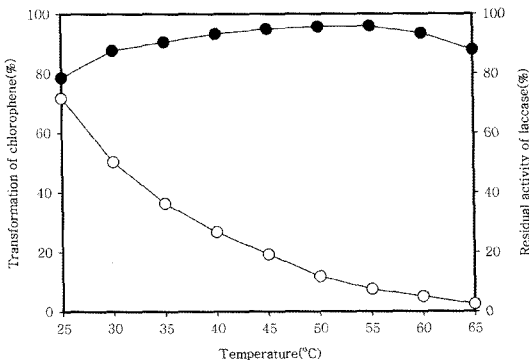


Fig. 2. Effect of temperature on chlorophene transformation (●) and residual activity of laccase when treating chlorophene (○). Reaction: 0.1 mM chlorophene, 0.2 U/ml laccase, 25 mM acetate buffer (pH 5.5), with a reaction time of 1 hour. All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

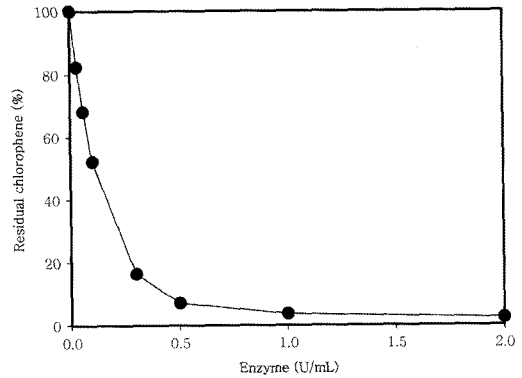


Fig. 3. Effect of enzyme dose on chlorophene transformation. Reaction: 0.1 mM chlorophene, 0.03-2.0 U/ml laccase, 25 mM acetate buffer (pH 5.5), with a reaction time of 1 hour. All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

Fig. 3은 laccase를 이용한 chlorophene의 처리는 효소농도에 의존하고 있는 것을 보여주고 있다. 효소의 활성이 1.0 U/ml 이상인 경우, chlorophene은 1시간 동안 95% 이상처리 되었으나, 0.3 U/ml의 경우 83%, 0.1 U/ml의 경우는 chlorophene의 49%만이 처리되었다. Laccase와 같은 oxidoreductase의 이와 같은 불활성화는 폐놀계 화합물의 산화반응에서 생성물에 의해 흔히 발생하는 현상으로 알려져 있다.¹⁴⁾ 따라서 반응 중에 일어나는 불활성화를 막을 수 있는 적절한 방법을 개발하는 것이 필요하다.

2. 첨가제에 의한 처리효과

첨가제는 효소활성을 안정적으로 유지시키면서 첨가하지 않을 때보다 상대적으로 효소활성이 높아 처리효율을 증가시킬 수 있다고 알려져 있다.⁸⁾ Ficoll, Polyethylene glycol(PEG), polyvinyl alcohol 등은 비스페놀A, naphthol 같은 폐놀계 화합물의 처리시 효소활성의 저하를 막는 것으로 알려지고 있다.^{8,9)} 이들 첨가제들이 chlorophene 처리시 효소활성의 저하를 막는 것을 확인하기 위해 0.1 mM의 chlorophene과 0.2 U/ml의 효소활성을 갖는 반응액에 첨가제를 첨가한 반응액과 첨가하지 않은 반응액에서 처리효율을 1시간 동안 측정하였다. Table 1은 이들 첨가제들이 처리효율을 증가시키지 못하고 있다는 것을 보여주고 있다.

비슷한 구조를 갖는 비스페놀A의 처리시 효소활성의 감소는 효소와 반응 중에 생긴 생성물과의 반응에 의한 것으로 알려지고 있다.¹⁴⁾ 구조분석연구에 의하면 PEG 같은 폴리머 분자의 둥근 공 모양이 laccase의 불활성화를 막을 수 있는 것으로 알려지고 있다.¹⁵⁾ 그러

Table 1. Effect of soluble polymers on the transformation of chlorophene

Polymer	Concentration (mg/l)	Transformation (%)
Control	0	78.8
Ficoll	25	80.0
Polyethylene glycol	25	77.9
Polyvinyl alcohol	25	79.9

Reaction conditions: 0.1 mM chlorophene, 0.2 U/ml laccase, 25 mM acetate buffer (pH 5.5), 25°C, with a reaction time of 1 hr. All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

나 naphthol, phenol, 비스페놀A은 PEG의 첨가에 의해 처리효율이 증가하나 chlorophene은 처리효율이 증가하고 있지 않았다.^{8,10)} 따라서 chlorophene의 처리 시 첨가제에 의한 처리효과가 나타나지 않은 것은 chlorophene의 분자구조와 밀접한 관계가 있는 것으로 생각되고 있다.

3. Mediator에 의한 처리효과

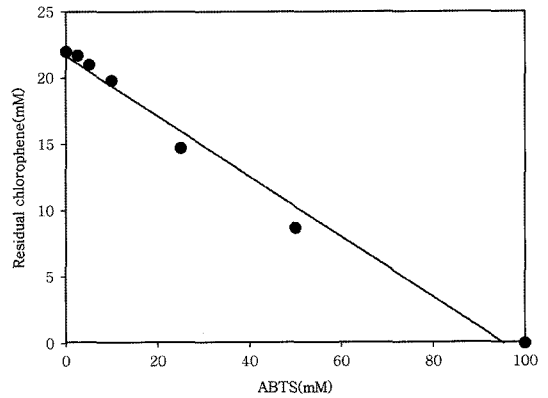
Laccase에 의한 처리효율은 mediator를 사용하여 향상시킬 수 있다.¹⁾ Table 2는 laccase/ABTS 시스템이 chlorophene의 처리에 효과적임을 보여주고 있다. 그러나 HBT, TEMPO와 SA 같은 mediator들은 다른 화합물의 처리에 효과적이라고 알려져 있으나,¹⁶⁾ triclosan이나 비스페놀A의 처리에는 효과가 없는 것으로 나타나고 있다.¹⁴⁾ 이와 같은 현상은 chlorophene의 처리에서도 동일한 결과를 보여주고 있다.

Fig. 4의 결과를 보면 처리 후 남아있는 chlorophene의 양과 첨가된 ABTS의 양은 음의 상관관계가 있음

Table 2. Effect of mediators on laccase-catalyzed chlorophene transformation

Mediator	Concentration (mM)	Transformation (%)
Control	-	79.5
SA	0.1	75.8
ABTS	0.1	>99.9
TEMPO	0.1	47.4
HBT	0.1	79.2

Reaction conditions: 0.1 mM chlorophene, 0.1 mM mediator, 0.2 U/ml laccase, 25 mM acetate buffer (pH 5.5), 25°C, with a reaction time of 1 hour. (SA; Syringic acid, ABTS; 2,2'-Azino-bis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid), TEMPO; 2,2,6,6-Tetramethoxypiperidine 1-Oxyl, HBT; 1-Hydroxybenzotriazole) All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

**Fig. 4.** Effect of mediator on chlorophene transformation. Reaction: 0.1 mM chlorophene, 0.2 U/ml laccase, 25 mM acetate buffer (pH 5.5), with a reaction time of 1 hour. ($y = -0.23x + 21.65$, $R^2 = 0.985$). All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

을 나타내고 있다. 이 결과는 적절한 양의 ABTS를 사용함으로써 처리에 사용되는 효소의 양을 감소시켜 처리공정에서의 비용을 절감할 수 있다는 것을 보여주고 있다.

4. 반응물의 독성 테스트

폐기물 처리에 효소를 사용하는 주된 목적 중에 하나는 처리된 오염물질이 처리 후 독성을 갖지 않는 생성물로 전환시키는 것으로 chlorophene의 처리용액의 독성이 증가하는 지를 확인하였다. Table 3을 보면 불활성화된 효소를 첨가한 후 초기 반응액의 독성과 효소를 처리한 후 반응생성물의 독성을 비교한 결과 독성이 2.4배 증가하였다. 이것은 반응 후의 생성물이 본래의 구조인 p-chlorophenol보다 독성을 갖는 hydroquinone 구조를 갖는 생성물이 생긴 것으로 생각된다.⁷⁾ Horseradish peroxidase을 이용하여 2-chlorophenol과 2-methylphenol 같은 페놀계 화합물을

Table 3. Comparison of toxicities between the initial mixture and the treated mixture

Sample	Transformation (%)	Relative toxicity (%)	EC ₅₀
Initial mixture	0	100	4.36 μM
Reaction mixture treated ^a	>99.9	236	-

^aReaction conditions: 0.1 mM chlorophene, 1.0 U/ml laccase, 25 mM acetate buffer (pH 5.5), with a reaction time of 4 hours. All data in the figure are expressed as averages of duplicate data.

처리하는 경우에도 효소반응의 결과 본래보다 독성을 갖는 생성물이 생길 수 있어 이들 산화효소에 의한 폐놀계 화합물의 처리에는 자세한 연구가 필요한 것으로 생각된다.¹⁷⁾

IV. 결 론

이 연구는 *Trametes versicolor*에서 유래된 laccase가 chlorophene의 처리에 효과적인 것으로 보여주고 있다. Chlorophene 처리의 최적 pH는 5-6였으며 산성조건에서 효과적으로 반응하였다. 온도에 의한 처리효율은 55°C까지 증가하였으나 온도가 상승함에 따라 laccase의 잔류활성이 감소하고 있어 처리온도가 실제 적용시 중요한 인자로 작용할 수 있다. 반응 중에 발생하는 효소의 불활성화를 방지하기 위해 첨가된 ficoll, polyethylene glycol(PEG), polyvinyl alcohol은 효소의 불활성을 방지하지 못했다. 따라서 반응 중 효소의 불활성을 막을 수 있는 적절한 첨가제를 개발하는 것이 필요하다고 생각된다. Laccase/ABTS 시스템은 chlorophene의 처리효율을 상당히 증가시킬 수 있으며 효소의 사용량을 감소시킬 수 있을 것이다. 그러나 laccase를 이용한 chlorophene의 처리에 있어 처리된 용액의 독성이 증가하므로 이를 막을 수 있는 적절한 처리방법에 대한 연구가 필요할 것으로 생각된다.

참고문헌

1. Kim, Y. J. : Reaction conditions for laccase catalyzed degradation of Bisphenol A. *한국환경위생학회지*, **30**(2), 79-83, 2004.
2. Wagner, M. and Nicell, J. A. : Evaluation of horseradish peroxidase for the treatment of estrogenic alkylphenols. *Water Quality Research Journal of Canada*, **40**(2), 145-154, 2005.
3. Wong, Y. and Yu, J. : Laccase-catalyzed decolorization of synthetic dyes. *Water Research*, **33**(16), 3512-3520, 1999.
4. 김영진 : Laccase를 이용한 Triclosan의 처리. *한국환경보건학회지*, **31**(1), 61-65, 2005.
5. Mary A. Soliman, Joel A. Pedersen and I. H. (Mel) Suffet : Rapid gas chromatography-mass spectrometry screening method for human pharmaceuticals, hormones, antioxidants and plasticizers in water. *Journal of Chromatography A*, **1029**(1-2), 223-237, 2004.
6. María J. Lopez de Alda, Silvia Díaz-Cruz, Mira

- Petrovic and Damiá Barceló : Liquid chromatography-(tandem) mass spectrometry of selected emerging pollutants (steroid sex hormones, drugs and alkylphenolic surfactants) in the aquatic environment. *Journal of Chromatography A*, **1000**(1-2), 503-526, 2003.
7. Zhang, H. and Huang, C. H. : Oxidative transformation of triclosan and chlorophene by manganese oxides. *Environmental Science Technology*, **37**, 2421-2430, 2003.
8. Kulys, J., Vidziunaite, R. and Schneider, P. : Laccase-catalyzed oxidation of naphthol in the presence of soluble polymers. *Enzyme and Microbial Technology*, **32**, 455-463, 2003.
9. 김영진 : Polyethylene glycol (PEG) 수용액에서 laccase를 이용한 비스페놀A의 처리. *한국환경보건학회지*, **31**(4), 241-245, 2005.
10. Cooper, V. A. and Nicell, J. A. : Removal of phenols from a foundry wastewater using horseradish peroxidase. *Water Research*, **30**, 954-964, 1996.
11. 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). *Journal of Chemical Society Perkin Transact*, **2**, 805-812, 1982.
12. Yaropolov, A. I., Skorobogatko, O. V., Vartanov, S. S. and Varfolomeyev, S. D. : Laccase properties, catalytic mechanism and applicability. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **49**, 257-279, 1994.
13. Akatas, N. and Tanyolac, A. : Reaction conditions laccase-catalyzed polymerization of catechol. *Bioresource Technology*, **87**, 207-214, 2003.
14. Chang, H. C., Holland, R. D., Bumpus, J. A., Churchwell, M. I. and Doerge, D. R. : Inactivation of *Coprinus cinereus* peroxidase by 4-chloroaniline during turnover: comparison with horseradish peroxidase and bovine lactoperoxidase. *Chemico-Biological Interactions*, **123**, 197-217, 1999.
15. Nakamoto, S. and Machida, N. : Phenol removal from aqueous solution by peroxidase-catalyzed reaction using additives. *Water Research*, **26**, 49-54, 1992.
16. Yaver, D. S., Xu, F., Golightly, E. J., Brown, K. M., Rey, M. W., Schneider, P., Halkier, T., Mondorf, K. and Dalboge, H. : Purification, characterization, molecular cloning, and expression of two laccase genes from the white rot basidiomycete *Trametes villosa*. *Applied and Environmental Microbiology*, **62**, 834-841, 1996.
17. Wagner, M. and Nicell, J. A. : Detoxification of phenolic solutions with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide. *Water Research*, **36**, 4041-4052, 2002.