

## 다공성 포화 매질에서 효소 중합반응을 이용한 페놀 제거

김원기 · 이승목<sup>†,\*</sup>

그린텍 · \*관동대학교 환경공학과

(2007년 11월 19일 접수, 2008년 9월 12일 채택)

### Phenol Removal Using Horseradish Peroxidase(HRP)-Mediated Polymerization Reaction in Saturated Porous Media

Won-gee Kim · Seung-mok Lee<sup>†,\*</sup>

GreenTech · \*Department of Environmental Engineering, Kwandong University

**ABSTRACT** : This paper reports experimental results, demonstrating the feasibility of horseradish peroxidase(HRP) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> to reduce phenol transport in saturated porous media. A laboratory-scale packed column reactor(ID: 4.1 cm, sand-bed height 12 cm) column was utilized to simulate injection of HRP and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> into an aquifer contaminated with phenol. Effluent concentrations of phenol and polymerization products were monitored before and after enzyme addition under various experimental conditions(enzyme dose: 0~2 AU/mL, [ionic strength]: 5~100 mM, pH: 5~9). The concentration of phenol in the column effluent was found to decrease by nearly 90% in the presence of HRP(2 AU/mL) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> in the continuous flow system at pH 7 and ionic strength 20 mM. The influent phenol was converted in the system to insoluble precipitate, which deposited in pore spaces. The remains were discharged as soluble oligomers. About 8% of total pore volume in column system was decreased by deposition of polymer produced.

**Key Words** : Phenol, HRP, Polymerization, Soluble and Insoluble Polymer, Saturated Porous Media

**요약** : 본 연구에서는 다공성 포화매질내에서 페놀의 제거를 위해 효소 중합반응의 적용성을 조사하였다. 페놀로 오염된 지하수의 모의실험으로 실험실 규모의 모래 충전 칼럼(ID: 4.1 cm, 충전높이: 12 cm)에 HRP와 과산화수소수를 주입하여 페놀 제거율 및 고분자 생성율에 대한 효소량(0~2 AU/mL), 이온강도(5~100 mM), pH(5~9)의 영향을 평가하였다. 페놀의 제거율은 효소량 2.0 AU/mL, 이온강도 20 mM, pH 7에서 각각 유입농도의 90% 이상을 유지하였다. 유입페놀은 다공성 매질에 축적되는 불용성 고분자와 유출되는 용해성 고분자들로 변환되었다. 최대 약 8%의 공극부피가 고분자화 반응으로부터 생산된 불용성 고분자에 의해 감소되었다.

**주제어** : 페놀, 효소, 고분자화반응, 용해성 및 불용성 고분자, 다공성 포화 매질

## 1. 서론

페놀 화합물들은 환경오염의 주요 오염물질 가운데 하나로 미국 및 여러 나라에서 인체에 대한 여러 유해성 때문에 강력하게 규제되고 있다. 미국의 경우에 페놀은 미 환경부에 의해서 우선제거대상 오염물질로 규정되었다.<sup>1)</sup> 페놀 및 페놀 파생물질들은 석유 및 석탄 정제, 의약, 플라스틱 및 합성수지, 목재 보존처리, 금속 코팅, 염색, 고무직물, 펄프 및 종이 제조, 그리고 페놀 코팅 생산물 등을 포함한 다양한 공정으로부터 배출되는 폐수들 속에서 발견된다. 이들 화학물질들은 또한 사고에 의한 유출 또는 가솔린 구성물질들과 제조체의 분해 과정을 통해 중간 물질들의 축적들을 통해 환경속으로 배출된다.<sup>2~4)</sup> 난분해성 페놀류는 생태계에서 생물학적으로 축적되고 지속되는

이들의 경향 때문에 효율적인 관리가 필요하다.<sup>5)</sup>

페놀화합물들은 과산화 효소 및 여러 효소들에 의해서 산화되어질 수 있으며 용해성 및 불용성 고분자를 생산한다.<sup>6)</sup> Horseradish peroxidase (HRP)는 기질 특이성과 안정성 그리고 넓은 범위의 온도와 pH에서의 적용성으로 페놀화합물의 산화적 고분자화를 위한 효과적인 효소로써 제시 되어왔다.<sup>6,7)</sup>

HRP는 horseradish 뿌리에서 추출되고 과산화효소제 중 ferroporphyrin 그룹에 속한다. HRP는 208개의 아미노산, 보결분자단(prosthetic group), 분자당 2개의 칼슘과 하나의 ferric heme을 가지고 있다.<sup>8)</sup> Ferric heme은 기질분자를 산화시키는 활성점을 구성한다. HRP는 pH 5.0~9.0의 범위와 40℃까지 안정한 것으로 보고되었다.<sup>9)</sup>

HRP는 수용액 내 광범위한 농도의 페놀류, 아닐린 및 PAHs 같은 방향족 화합물의 산화를 촉매시킨다.<sup>6~10)</sup> HRP는 3단계의 촉매적 순환을 통해 페놀 기질들의 산화에 관여한다. HRP에 의한 페놀 산화의 효소 매카니즘은 상대

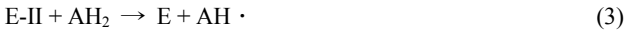
<sup>†</sup> Corresponding author

E-mail: leesm@kd.ac.kr

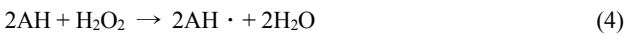
Tel: 033-649-7535

Fax: 033-642-7635

적으로 잘 알려져 있고 수학적으로 모델링 되어왔다. HRP에 의한 촉매된 폐놀 산화의 3단계 촉매순환은 다음의 화학반응식으로 나타내어진다.<sup>9)</sup>



또는



여기서 E는 과산화 효소, E-I와 E-II는 활성 효소 중간체, AH<sub>2</sub>는 폐놀 및 방향족 아민 같은 환원 기질, 그리고 AH·는 기질의 반응 라디칼이다.

첫 번째 단계에서(Eq. 1) heme 중심 반응점의 3가 철은 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>에 의해 산화되어 활성효소 중간체(E-I)를 생산한다. 두 번째 단계에서(Eq. 2) 활성효소 중간체(E-I)는 폐놀 기질로부터 하나의 전자를 빼앗아 또 다른 활성효소 중간체(E-II)로 변환된다. E-II는 폐놀 라디칼 하나를 더 생산하기 위해 두 번째 폐놀 분자와 반응한다. 두번째와 세번째 단계에서 생산된 이들 자유 라디칼은 효소의 반응점으로부터 용액내로 확산되어 이량체(dimer), 삼량체(trimer) 그리고 최종적으로 용해도가 매우 낮은 거대 고분자를 형성하는 자가 결합(self-coupling) 및 교차 결합(cross-clupling)을 진행한다(Eq. 3).<sup>9-13)</sup> 마지막으로 효소는 세 번째 단계에서 원래의 상태로 되돌아간다. Yamazaki 등<sup>11)</sup>은 과산화 효소 일분자당 약 10<sup>3</sup>개의 폐놀 분자가 제거될 수 있다고 보고하였다. 소모된 과산화수소당 촉매순환을 바탕으로 2개의 자유 라디칼이 발생된다(Eq. 4).

HRP를 이용한 폐놀의 고분자 반응은 여러 종류의 반응 부산물을 형성하게 되는데, 이들 반응 부산물들은 분자량이 큰 불용성 고분자와 저분자량의 용해성 고분자로 구성된다.<sup>12)</sup> 폐놀의 고분자 반응 부산물들은 일반적으로 쉽게 침전되는 경향이 있다. 고분자의 이런 특성은 폐놀 오염물질을 포함하는 폐수를 재래식 생물학적 처리공정들을 통해 도달하기 어려운 수준까지 처리 가능하게 한다.

HRP를 이용한 폐놀의 고분자화 반응은 Klivanove 등<sup>6)</sup>에 의해 처음 연구된 이후 많은 적용성 검토가 이루어져왔지만 지하수 및 토양에서의 적용성 검토는 전무한 실정이다. 따라서 본 연구에서는 포화 다공성 매질에서 HRP를 이용한 폐놀의 고분자화 반응을 적용할 때 pH, HRP 주입량, 이온세기가 반응에 미치는 영향을 평가하였다. 또한 반응부산물의 축적으로 인해 발생한 다공성 매질의 물리적 특성변화에 대해 조사하였다.

## 2. 실험 장치 및 방법

### 2.1. 재료 및 방법

HRP(Type II, RZ 2.2, 181 AU/mg), 과산화수소수(30%, w/w) 그리고 폐놀(99%) 및 <sup>14</sup>C-폐놀은 Sigma Chemicals에서 구입하였다. 염화칼륨, 염화나트륨, 인산칼륨, 아세트산, 메탄올 그리고 섬광 카테일(Fisher Scintisafe, 50%)은 Fisher Scientific (Pittsburg, PA)에서 구입하였다. 폐놀용액은 HRP와 과산화수소의 반응 후에 발생된 고분자의 정량을 위해 <sup>14</sup>C-phenol (Specific activity 40.1 mCi/mmol)과 혼합하여 사용하였다.

실험에 사용된 유리칼럼(ID: 4.1 cm, L: 18 cm)은 Fig. 1에 나타난 것처럼 원통형으로 상부와 하부에 Teflon 마개로 되어있으며 하부에는 두 개의 유입구와 상부에는 하나의 유출부를 가지고 있다. 유리칼럼의 EBRT (empty bed retention time)은 290.1 min이며 215 g의 오타와(Ottawa) 모래(#20-30 mesh)를 균일하게 충전시킨 후(충진높이: 12 cm) 튜브연동식 펌프(Bulcher, Model 426-2000)를 사용하여 탈이온 증류수로 세척(20 pore volume) 및 포화시킨 후 상향 모드로 작동하였다(Fig. 2). 다공성 매질의 물리적 특성은 메스실린더를 이용하여 단위부피당 질량 및 공극률을 산출하여 Table 1에 나타내었다.

버퍼용액의 pH는 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>의 적정비율로 조절되었으며 이온 강도(5~100 mM)는 NaCl을 사용하여 조절되었다. 칼럼은 두 개의 주입구로 구성되었다(Fig. 2). 첫 번째 주입라인은 버퍼 용액(pH 5~9)내에 폐놀(0.5 mM)과 효소(0.5~2.0 AU/mL)로 혼합된 용액이 유입되었고 두 번째 주입라인은 동일 버퍼용액 내에 과산화수소수(0.5 mM)와 폐놀(0.5 mM)이 혼합된 용액이 주입되었다. 분리된 두 개의 주입라인은 고분자 반응이 포화 담체내에서 시작하도록 고안되었다.

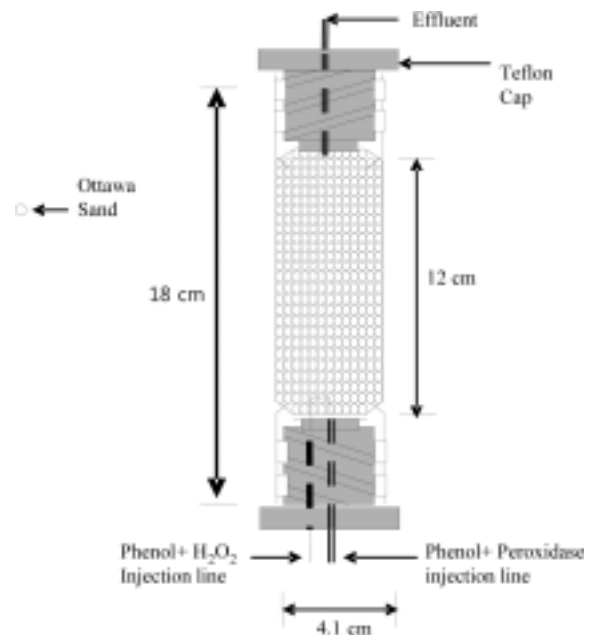
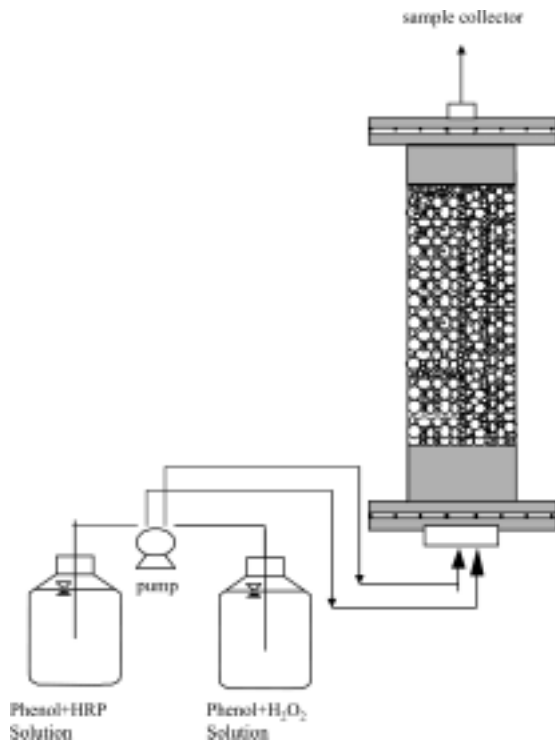


Fig. 1. Schematic diagram of upflow column.

**Table 1.** Properties of porous material

Granular Media	Properties
$\rho(\text{g/cm}^3)$	2.65
$\rho_b(\text{g/cm}^3)$	1.64
$\epsilon$	0.38

$\rho$  : solid density,  $\rho_b$  : bulk density,  $\epsilon$  : porosity



**Fig. 2.** Schematic diagram of upflow column system used in this study.

2.2. 실험방법

칼럼실험은 다음의 차례로 수행되었다.

- 1) 무반응성 추적자 주입(KCl, 250 mg/L)
- 2) 칼럼세척(탈이온 증류수)
- 3) 칼럼을 페놀로 포화시키기 위해 페놀 주입
- 4) 포화담체 내에서 페놀의 중합 반응을 위해 용액 I(페놀+과산화수소)과 용액 II(페놀+HRP) 주입
- 5) 칼럼 세척(탈이온 증류수)

추적자 시험은 충전 칼럼의 수리학적 특성들을 조사하기 위해 KCl을 무반응성 추적자로 사용하였다. 1 공극 부피(pore volume)는 칼럼내 총 공극 부피(칼럼부피 × 공극률)를 나타내는 것으로 추적자 시험은 2 공극 부피의 탈이온 증류수로 칼럼을 세척한 후 1.5 공극 부피의 KCl과 탈이온 증류수를 사용하여 주입 및 세척하였다. 모든 실험은 실온(20±2°C)에서 수행되었으며 보다 정확한 실시간 측정을 위해 in-line 전도도 측정기(Accument, Model AR20)를 사용하여 분석하였다. 실험결과는 공극 부피와 상대농도로써 도시되었다.

**Table 2.** Experimental conditions evaluated in column experiments

Experimental parameter	Value
Influent phenol concentration	500 μM
Influent H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> concentration	500 μM
Influent HRP concentrations	0.5, 1.0 and 2.0 AU/mL
Solution ionic strengths	5, 20, 100 mM
Solution pHs	5, 7, 9

본 연구에 사용된 다공성 포화 매질내 페놀의 고분자 반응은 지하수에 대한 모의실험으로 공극유속(1.5 m/day), 중성 pH, 20 mM의 이온강도 등을 고려하여 Table 2에 요약된 실험 조건으로 평가되었다.

칼럼실험동안 매 5분마다 10 mL의 유리 시험관이 내재된 분획 포집기를 사용하여 유출구로부터 시료를 채취하였다. 용해성 고분자를 정량하기위해 5 mL의 액체 섬광 각테일을 담은 7 mL의 시험관에 250 uL의 시료를 옮겨 액체 섬광 검출기(Beckman, Model 6500)를 이용하여 <sup>14</sup>C-phenol의 활동도를 분석하였다.

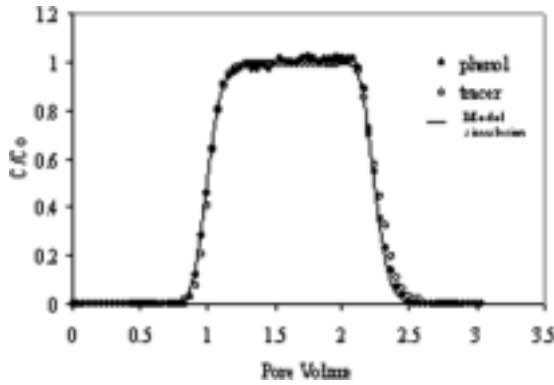
Gradient pump(Varian, Model ProStar 220 Solvent Delivery Module), 역상 칼럼(varian RES ELUT 5 u C18, 150 mm × 4.6 mm), ProStar 410 AutoSampler 그리고 photodiode array(PDA) detector(Varian, Model ProStar 335)로 구성된 HPLC(High Performance Liquid Chromatography)를 사용하여 시료내의 페놀 농도를 정량하였다. 페놀농도는 각 시험관으로부터 1 mL을 분취하여 2 mL의 HPLC vial에 옮긴 후 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 추적자 시험

Fig. 3은 추적자(KCl)에 대한 파과곡선을 보여준다. 추적자는 약 0.8 공극 부피 후의 유출수에 나타났다. Fig. 3에서 나타난 것 같이, 포화 담체에서 페놀과 추적자의 거동은 매우 유사함을 보였다. 상대농도는 약 1.2 공극 부피 후에 1의 값에 도달했으며 칼럼내의 주입 유체가 탈이온 증류수로 교체되었을 때, 유출수 내 추적자의 상대농도는 1 공극부피 주입내에 0 값으로 떨어졌다.

추적자 파과곡선의 대칭성은 칼럼내의 다공 매체의 균일성을 나타내었고 칼럼내에 이상적인 이동 특성을 나타내어 모래칼럼은 균등하게 충전되었음을 알 수 있다. Ottawa 모래에서 페놀 이동에 대한 모델 예측 또한 Fig. 3에 나타내었다. 페놀의 거동은 지연효과 없이 추적자의 분산 계수를 사용하여 예측되었다. 추적자의 분산계수는 1차원 대류-확산 모델을 기초한 CXTFIT 프로그램을 이용하여 0.004389 cm<sup>2</sup>/min(R<sup>2</sup> = 0.998)로 평가되었다. 추적자의 분산계수는 고분자물질이 축적된 후의 다공성 매질의 수리학적 특성변화를 평가하는데 이용되었다. 페놀은 다공성 포화매질을 통하여 흐르는 동안 어떤 지연효과도 보이지 않



**Fig. 3.** Transport behavior of tracer and phenol through the packed column reactor. Influent phenol concentration = 500  $\mu$ M, solution pH = 7, solution ionic strength = 20 mM.

았다. 칼럼내에 주입된 폐놀과 추적자의 파과곡선에서 보여진 것처럼 유출수에서 98% 이상 회수되었기 때문에 반응성 없음을 나타낸다. 다른 모든 실험에서 칼럼 충전은 체류시간과 유사한 형태의 파과곡선을 가지기 때문에 유사한 수리학적 특성들을 가짐을 나타낸다.

3.2. 효소량의 영향

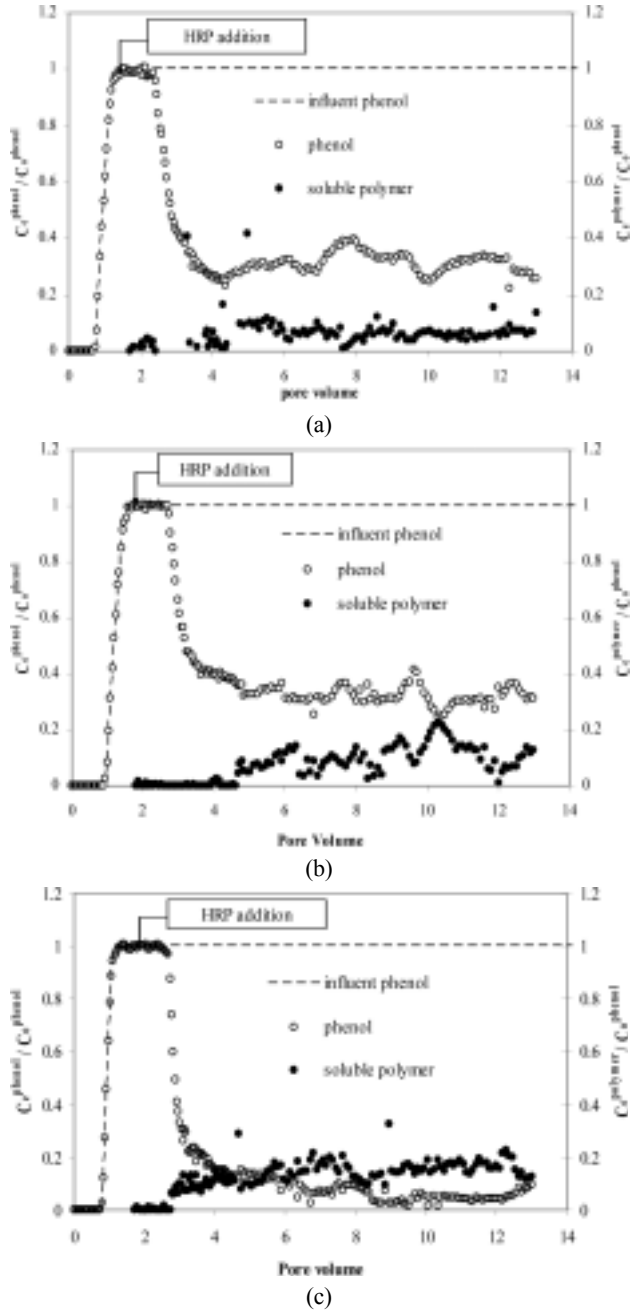
일반적으로, HRP를 매개로한 고분자화 반응을 이용한 폐놀제거는 효소량을 증가시키에 따라 증가함을 보여준다.<sup>12)</sup> 하지만, 효소를 이용한 폐놀 처리공정에서 효소의 비효율적인 사용은 높은 처리비용을 초래할 수 있기 때문에, 처리공정은 최적화 되어야만 한다.

폐놀의 고분자화 반응은 또한 문헌 검토로부터 얻어진 정보를<sup>7,10,13,20)</sup> 통하여 여러 조건들(pH: 4~11; 이온강도: 1~100 mM)하에서 평가한 회분실험에서(자료 포함 안됨) 2.0 AU/mL를 사용하여 98% 이상의 폐놀 제거가 이루어졌기 때문에, 칼럼실험에서 최적 효소량을 결정하기위해 0.5, 1.0 그리고 2.0 AU/mL의 농도로 사용하여 제거특성을 조사하였다.

연속흐름 반응기의 다공성 포화 매질내에서 효소량의 변화에 대한 폐놀의 거동 및 고분자화 반응의 결과는 Fig. 4에 나타내어졌다. 유출 폐놀농도는 0.8의 공극 부피의 주입 후에 급격히 증가하였는데 이는 폐놀이 칼럼으로 끊임 없이 공급되고 반응이 일어나지 않기 때문에, 만일 HRP가 주입되지 않는다면 충전칼럼은 폐놀로 포화된 상태인,  $C/C_0 = 1$ 로 예상된다(점선(-)으로 표시). 칼럼이 폐놀로 포화된 후에 과산화수소와 HRP는 칼럼에 주입되었다. 다공성 매질로 충전된 칼럼내의 폐놀 고분자화 반응은 HRP와 과산화수소가 주입되는 즉시 발생될 것으로 예상되었다.

0.5 AU/mL(Fig. 4(a)) 및 1.0 AU/mL(Fig. 4(b)) 농도의 HRP 칼럼 주입은 유출수에 있어서 유입 폐놀 농도의 약 70%의 제거효율을 보였다. HRP 2.0 AU/mL의 영향은 Fig. 4(c)에 나타내었다. HRP 주입 시점으로부터 약 0.8 공극 부피 후에 폐놀 파과곡선(c)의 폐놀 상대농도는 0.1 이하로 급격

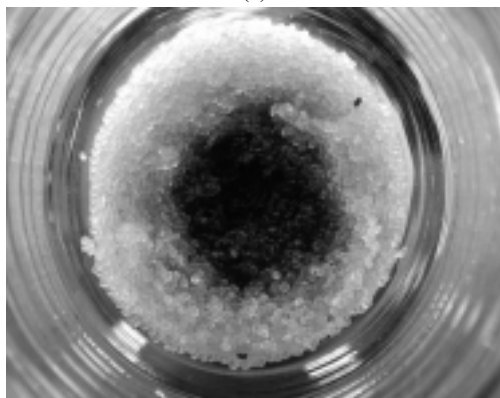
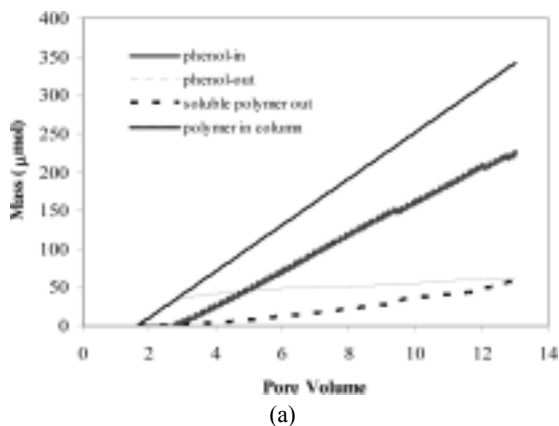
히 떨어졌다. 이것은 유입수에 있는 폐놀농도의 90% 이상이 제거되었다는 것을 의미한다. 용해성 고분자의 상대농도(그래프에서 오른쪽 y-축)는 점차 증가하여 0.2 값으로 유지되었다. 이것은 약 20%의 유입 폐놀농도가 칼럼내에 축적되지 않는 용해성 고분자로 변환되었다는 것을 의미한다. 폐놀농도는 4 공극부피의 HRP 주입 후에 초기 폐놀농도의 약 10% 이하로 감소한 후 유지되었다.



**Fig. 4.** Performance of the packed column reactor with respect to phenol removal and soluble polymer generation due to polymerization reaction. Influent phenol concentration = 500  $\mu$ M, solution pH = 7.0, solution ionic strength = 20 mM,  $H_2O_2$  concentration = 500  $\mu$ M and HRP dose = (a) 0.5, (b) 1.0 and (c) 2.0 AU/mL.

유출수의 용해성 고분자의 상대농도는 HRP 양이 증가함에 따라 증가하였다. 용해성 고분자로써 칼럼을 빠져나가는 페놀의 분율( $C/C_0$ )은 0.5, 1.0 그리고 2.0 AU/mL의 효소량에 각각 0.05, 0.1 그리고 0.2였다. 이 같은 경향은 높은 HRP 투입량에서 더 많은 페놀 고분자화에 기인한다. 많은 연구자들이 용해성 고분자물질에 대한 독성 평가 및 분석 연구를 하고 있으며 Wager와 Nicell은 HRP를 이용하여 20가지 이상의 페놀류를 수용액상에서 제거할 때 2-methylphenol, 2-chlorophenol, 4-chlorophenol의 일부 페놀류에서는 용해성 고분자의 독성이 남아있었지만 대부분의 경우 독성이 본래의 기질보다 낮거나 완전히 제거되었음을 보고하였다.<sup>13~16)</sup>

Fig. 5(a)는 2.0 AU/mL의 HRP 주입량 조건의 칼럼 실험에서 페놀의 물질 수지를 나타낸 것이다. 이 그래프는 유입 및 유출 페놀의 물수를 나타낼 뿐만 아니라 HRP와 과산화수소의 주입의 결과로서 생성된 용해성 및 불용성 고분자 생산물의 물질 수지를 나타낸다. 모래 칼럼에 축적된 고분자인 불용성 고분자는 초기 유입된 페놀로부터 유출수의 페놀과 용해성 고분자에 해당하는 페놀의 질량의 차이에 의해 계산되었다. 2.0 AU/mL의 HRP 주입의 경우에 있어

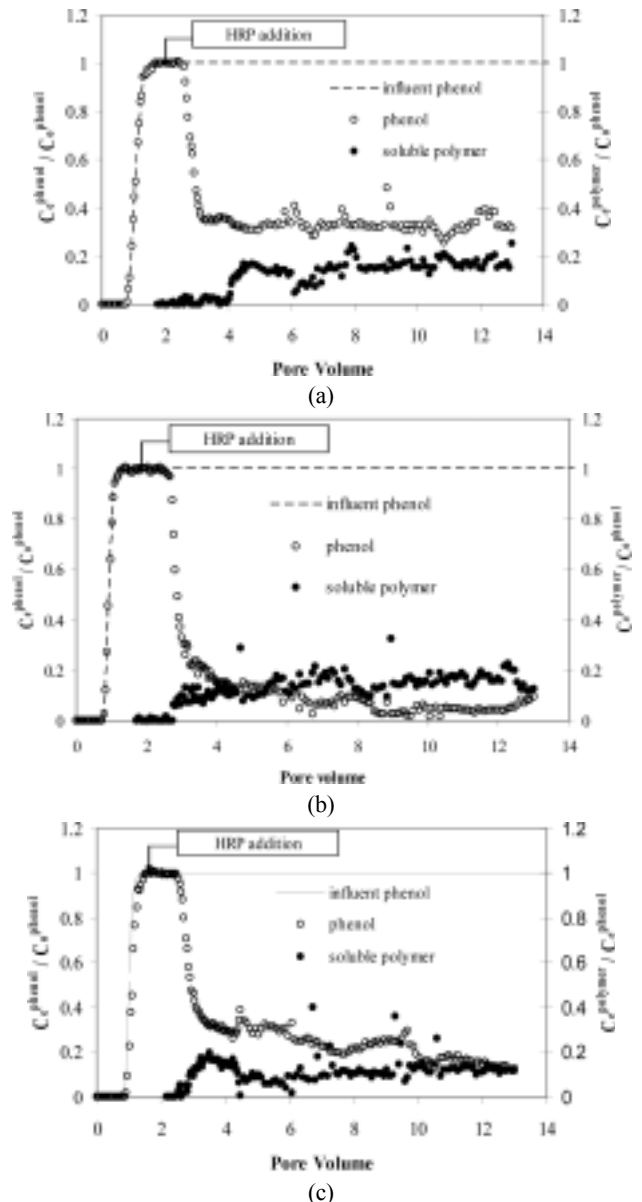


**Fig. 5.** (a) Mass balance for the packed column reactor with respect to phenol(2.0 AU/mL) (b) polymer deposition in column experiment. Influent phenol concentration = 500  $\mu$ M, solution pH=7.0, solution ionic strength = 20 mM, HRP dose = 2.0 AU/mL, and  $H_2O_2$  concentration = 500  $\mu$ M.

**Table 3.** Mass balance with enzyme dose

HRP Dose (AU/mL)	Total phenol in ( $\mu$ M)	Total phenol out ( $\mu$ M)	Total soluble polymer out ( $\mu$ M as phenol)	Total insoluble polymer in column ( $\mu$ M as phenol)
0.5	337.5	136.7	28.3	172.5
1.0	342.4	119.9	19.32	203.2
2.0	342.4	61.1	57.23	224.1

서는 주입된 페놀의 65.5%가 불용성 고분자로 칼럼내에 축적되었으며, 1.0과 0.5 AU/mL의 HRP 주입량에 있어서는 59.3%와 51.1%의 유입 페놀이 다공성 매질에 축적되었



**Fig. 6.** Effect of pH on performance of the packed column reactor with respect to phenol removal and soluble polymer generation due to polymerization reaction: (a) pH 5; (b) pH 7; (c) pH 9. Influent phenol concentration = 500  $\mu$ M, HRP dose = 2.0 AU/mL, solution ionic strength = 20 mM and  $H_2O_2$  concentration = 500  $\mu$ M.

다(Table 3). 높은 효소 주입량을 사용시 유입 페놀의 상대적으로 높은 고분자화로 인한 많은 불용성 고분자가 생산되어 다공성 매질에 축적되었다. 이 고분자 물질의 축적은 용액 I (페놀 + HRP)와 용액 II(페놀 + H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>)이 칼럼내에서 혼합되는 즉시 반응부산물로 축적되기 시작하며 Fig. 5(b)에 칼럼실험 동안 축적된 고분자 물질에 대한 결과를 나타내었다. 칼럼내의 페놀 고분자의 축적은 다공성 매질의 수리동력학적 특성을 변화시키는 결과를 초래할 것으로 예상되었다.

3.3. pH의 영향

많은 학자들은 효소를 매개체로한 고분자화 반응에 대한 용액 pH의 중요성에 대해 보고하여왔다.<sup>13~25)</sup> 용액의 pH는 효소반응 시스템의 촉매 효율과 약산 페놀 분자들의 해리에 영향을 줄 수 있다.

Fig. 6은 (a) pH 5.0, (b) pH 7.0 및 (c) pH 9.0에서 페놀의 거동, 제거율 및 고분자 발생 경향을 보여준다. 유출수 내의 용해성 고분자의 농도는 pH 7.0에서 가장 높았고 다음으로 pH 5.0과 pH 9.0 순이었다. 이것은 용액의 pH가 생산된 고분자의 결합구조에 영향을 주었기 때문이라고 사료된다. 이는 Huang 등이<sup>24)</sup> 보고한 것처럼 낮은 pH에서 양성자가 분리된 반응점들(proton-disassociated sites)의 양성자화(protonation)가 감소하여 고분자 생성을 증가시킨 것으로 사료된다.

Fig. 7은 칼럼내에 축적된 불용성 고분자가 pH 7에서 가장 높았고 9에서 가장 낮음을 나타낸다. 페놀의 제거효율은 HRP가 매개된 고분자화 반응의 최적 pH인 7.0에서 가장 높았다. 또한 페놀의 제거효율은 pH 9.0에서보다 5.0에서 더 높았다. 이러한 결과들은 Huang 등<sup>24)</sup>의 결과들과 일치한다. pH 7.0에서는 주입된 페놀의 65.5%가 불용성 고분자로써 칼럼내에 축적되었고 pH 5와 9에서는 각각 51.7%와 48.2%가 축적되었다(Table 4).

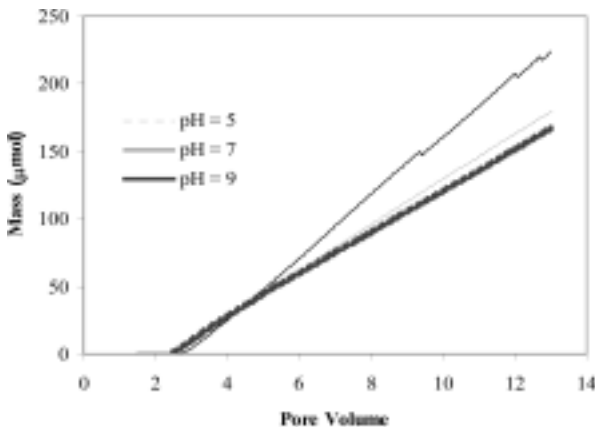


Fig. 7. Accumulation(mass as phenol) of insoluble polymer(pH 5, 7 and 9). Influent phenol concentration = 500 μM, solution pH = 5, 7 and 9, solution ionic strength = 20 mM, HRP dose = 2.0 AU/mL, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration = 500 μM.

Table 4. Mass balance with pH

Solution pH	Total phenol in(μM)	Total phenol out(μM)	Total soluble polymer out(μM as phenol)	Total insoluble polymer in column(μM as phenol)
5	347.5	133.3	34.48	179.7
7	342.4	61.1	57.23	224.1
9	347.5	133.2	45.9	167.4

3.4. 이온강도의 영향

Fig. 8은 연속 흐름 충전 칼럼내에서 페놀의 고분자화와

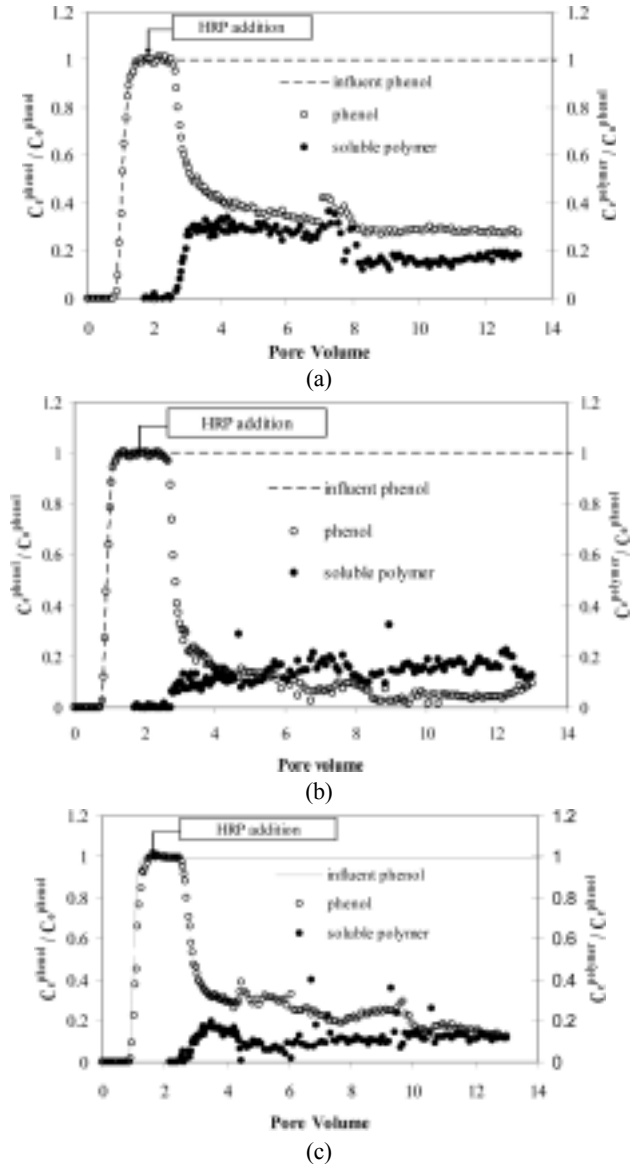


Fig. 8. Effect of ionic strength on performance of the packed column reactor with respect to phenol removal and soluble polymer generation due to polymerization reaction: (a) solution ionic strength = 5 mM; (b) solution ionic strength = 20 mM; (c) solution ionic strength = 100 mM. Influent phenol concentration = 500 μM, solution pH = 7.0, HRP dose = 2.0 AU/mL, and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> concentration = 500 μM.

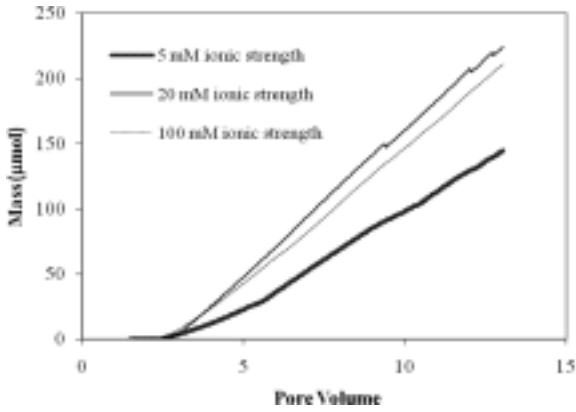


Fig. 9. Mass(as phenol) balance of insoluble polymer(IS 5, 20, and 100 mM).

Table 5. Mass balance with ionic strength

Ionic strength (mM)	Total phenol in (µM)	Total phenol out (µM)	Total soluble polymer out (µM as phenol)	Total insoluble polymer in column (µM as phenol)
5	347.5	129.2	73.5	144.8
20	342.4	61.1	57.2	224.1
100	347.5	99.2	37.3	211.1

고분자 생산에 대한 이온강도의 영향을 나타낸다. 지역적인 영향으로 지하수의 차이가 있으나 일반 지하수의 이온강도(20 mM)를 기준으로 낮을 경우 그리고 매우 높은 경우를 실험하기 위해 3개의 다른 이온강도(5, 20 그리고 100 mM)를 선택하여 페놀, 용해성 및 불용성 고분자의 거동을 조사하였다(Fig. 9). 이온강도의 가장 높은 페놀 제거율은 20 mM의 이온 강도에서 관측되었다. 5 mM의 이온강도의 경우, 페놀 제거효율은 약 70%까지 감소하였고(Fig. 8(a)) 유출수의 페놀 농도는 시간이 지남에 따라 계속하여 감소하였다. 칼럼 유출수의 용해성 고분자의 농도는 100 mM 이온강도에서 가장 낮았는데 이것은 높은 이온강도의 용액에서 염석효과와 거대 고분자의 구조적 변화의 영향이라고 판단된다.<sup>25)</sup> Huang 등<sup>24)</sup>은 HRP를 사용하여 페놀의 고분자 실험에서 이온강도를 증가시켰을 때 유사한 결과들을 관측했다. 그들은 페놀의 고분자변환 자체는 첨가된 염의 종류와는 관계없다는 것을 보고했다. 용해된 결합 고분자가 배경 이온 농도가 증가함에 따라서 침전성이 높아지는 것으로 사료된다.

포화담체의 총 공극부피의 약 8%가 100 mM의 이온강도의 용액에서의 고분자화 반응후에 감소되었다. 공극부피의 감소는 Table 5에서 보이는 것처럼 이온강도가 낮을 때는 고분자의 생성 또한 적었지만 20 mM 이상의 이온강도에서는 포화 담체내에 고분자의 축적에 많은 영향을 나타내지 않았다.

#### 4. 결론

본 연구는 연속흐름 포화 담체내의 고분자화 반응 조건

의 영향을 조사하였다. 이들 실험에 대한 결과들은 지하수 조건들을 토대로 모의실험한 충전 칼럼에 주입된 페놀이 유체 흐름속으로 HRP와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 주입함에 의해서 액상의 페놀을 제거할 수 있음을 보여준다. HRP와 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>의 반응으로부터 페놀제거와 고분자의 생산은 효소 주입량, 용액의 pH 그리고 이온강도에 영향을 받았다.

페놀의 제거효율은 HRP의 주입량을 증가시키기에 따라 증가하였다. 유입수내의 총 페놀농도의 90% 이상이 2.0 AU/mL의 HRP 주입으로부터 약 1.5 공극부피 후에 제거되었다. 연속흐름 포화 담체내에서 HRP를 이용한 페놀 제거는 용해성과 불용성 고분자 생산물을 발생시켰다. 용해성 및 불용성 반응생산물 또한 HRP의 첨가량에 따라 증가되었다. 유입 페놀의 약 20%가 용해성 고분자 생산물로써 전환된 반면, 총 유입 페놀의 약 62.6%가 침전 생산물로써 다공성 담체에 축적되었다.

생산된 고분자의 포화담체내 축적율은 pH 7.0에서 주입된 페놀의 65.5%가 불용성 고분자로서 칼럼내에 축적되었고 pH 5와 9에는 각각 51.7%와 48.2%로 pH 7이 최적 pH로 선택되어 일반지하수에서의 적용성을 확인하였다.

유출수의 용해성 반응 생성물의 농도는 100 mM의 이온강도에서 가장 낮았으며, 불용성 고분자의 축적은 5 mM의 이온강도에서보다 20과 100 mM의 이온강도에서 현저하게 높았다. 충전칼럼내의 불용성 페놀 고분자 생산물의 축적은 다공성 담체의 물리적 개량을 초래하였다. 최대 약 8%의 공극부피(20 mM의 이온강도)가 고분자화 반응으로부터 생산된 불용성 고분자로 대체되어 불투수성 차단막 형성의 가능성을 보였다.

따라서 본 연구의 결과는 HRP를 이용하여 지하수 내에서 페놀화합물의 제거할 때 반응조건들과 반응부산물로 생성된 고분자물질의 축적에 따른 다공성매질의 수리학적 특성 변화들을 고려해야함을 보여준다. 또한 페놀화합물의 고분자 반응의 적용시 불용성 고분자화합물의 다공성 매질내 축적을 이용하여 불투수성 차단막 생성 및 흡착기작으로 인한 오염물질의 확산 방지 및 이동성을 저감할 수 있는 방안에 대한 연구가 필요할 것이다.

#### 사사

본 연구는 지식경제부 지방기술혁신사업(RTI05-01-02) 지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

#### 참고문헌

1. Clean Water Act. section 307. In environmental statutes, Rockville, MD(1985).
2. Prpich, G. P. and Daugulis, A. J., "Biodegradation of a phenolic mixture in a solid - liquid two-phase partitioning bioreactor," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **72**, 607~615 (2006).

3. Gisi, D., Stucki, G., and Hanselmann, K. W., "Biodegradation of the pesticide 4, 6-dinitro-ortho-cresol by microorganisms in batch cultures and in fixed-bed column reactors," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **48**, 441~448(1997).
4. Heitkamp, M. A. and Cerniglia, C. E., "Mineralization of polycyclic aromatic hydrocarbons by a bacterium isolated from sediment below an oil field," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **54**, 1612~1614(1988).
5. Karam, J. and Nicell, J. A., "Potential applications of enzymes in waste treatment," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **69**, 141~153(1997).
6. Klivanov, A. M., Alberti, B. N., Morris, E. D., and Felshin, L. M., "Enzymatic removal of toxic phenols and anilines from water," *J. Appl. Biol. Chem.*, **2**, 414~421(1980).
7. Ghiourelotis, M. and Nicell, J. A., "Toxicity of soluble products from the Peroxidase-catalyzed polymerization of substituted phenolic compounds," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **70**, 98~106(2000).
8. Shannon, M. J. R. and Bartha, R., "Immobilization of leachable toxic soil pollutants by using oxidative enzymes," *Environ. Microbiol.*, **54**, 1719~1723(1998).
9. Dunford, H. B., "Horseradish peroxidase: structure and kinetic properties," *Peroxidases in Chemistry and Biology*, II. CRC press, Boca Raton, FL, **2**, 1~24(1991).
10. Klivanov, A. M. and Morris, E. D., "Horseradish peroxidase for the removal of carcinogenic aromatic amines from water," *Enzyme Microb. Technol.*, **3**, 119~122(1981).
11. Yamazaki, I., Mason, S., and Piette, L., "Identification by electron paramagnetic resonance spectroscopy of free radicals generated from substrates by peroxidase," *J. Biol. Chem.*, **235**, 2444~2449(1960).
12. Davidenko, T. I., Oseychuk, O. V., Sevastyanov, O. V., and Romanovskaya, I. I., "Peroxidase oxidation of phenol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **140**, 542~546(2004).
13. Wagner, M. and Nicell, J. A., "Detoxification of phenolic solution with horseradish peroxidase and hydrogen peroxide," *Water Res.*, **36**, 4041~4052(2002).
14. Bollag, J.-M., Shuttleworth, K. L., and Anderson, D. H., "Laccase-mediated detoxification of phenolic compounds," *Appl. Environ. Microbiol.*, **54**, 3086~3091(1998).
15. Aitken, M. D., Massey, J. I., Chen, T., and Heck, P. E., "Characterization of reaction products from the enzyme catalyzed oxidation of phenolic pollutants," *Water Res.*, **28**(9), 1879~1889(1994).
16. Ghiourelotis, M. and Nicell, J. A., "Toxicity of soluble products from the Peroxidase-catalyzed polymerization of substituted phenolic compounds," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **70**, 98~106(2000).
17. Everse, J., Everse, K. E., and Grisham, M. B.(Editors), *Peroxidases in Chemistry and Biology*, Volume, II. CRC Press, Inc. Boca Raton, FLA(1991).
18. Rodriguez-Lopez, J. N., Escribano, J., and Garcia-Canovas, F., "A continuous spectrophotometric method for the determination of monophenolase activity of tyrosinase using 3-methyl-2-benzothiazolinone hydrazone," *Anal. Biochem.*, **216**, 205~212(1994).
19. Davidenko, T. I., Oseychuk, O. V., Sevastyanov, O. V., and Romanovskaya, I. I., "Peroxidase oxidation of phenol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **140**, 542~546(2004).
20. Nicell, J. A., Bewtra, J. K., Pierre, C.C. St., Biswas, N., and Taylor, K. E., "Enzyme catalyzed polymerization and precipitation of aromatic compounds from wastewater," *Water Sci. Technol.*, **25**, 157~164(1992).
21. Aitken, M. D., "Stability testing of ligninase and Mn peroxidase from *Phanerochaete chrysosporium*," *Biotechnol. Bioeng.*, **34**, 1251~1260(1989).
22. Wu, Y., Taylor, K. E., Biswas, N., and Bewtra, J. K., "A model for the protective effect of additives on the activity of horseradish peroxidase in the removal of phenol," *Enzyme Microb. Technol.*, **22**, 315~322(1983).
23. Nicell, J. A., Al-Kassim, L., Bewtra, J. K., and Taylor, K. E., "Treatment of wastewaters by enzyme catalyzed polymerization and precipitation," *Biodeterioration Abstracts*, **7**, 1~8(1993b).
24. Huang, Q., Tang, J., and Weber, Jr. W. J., "Precipitation of enzyme-catalyzed phenol oxidative coupling products: Background ion and pH effects," *Water Res.*, **39**, 3021~3027(2005).
25. Schwarzenbach, R. P., Gschwend, P. M., and Imboden, D. M., *Environmental Organic Chemistry*. Wiley, New York, 437~484(1993).