

산화환원효소에 의한 휴믹산의 산화중합반응

Oxidative Coupling Reaction of Purified Aldrich Humic Acid by Horseradish Peroxidase

지상현 · 김도군* · 김정현 · 고석오[†]
SangHyun Jee · Do-Gun Kim* · Jeong-Hyun Kim · Seok-Oh Ko[†]

경희대학교 토목공학과 · *한국과학기술원 건설및환경공학과
Department of Civil Engineering, Kyung Hee University

*Department of Civil and Environmental Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology

(2010년 8월 9일 접수, 2010년 11월 26일 채택)

Abstract : Oxidative coupling reactions of humic substances (HS) can be catalyzed by a variety of natural extracellular enzymes and metal oxides. In this study, property changes of HS induced by a natural enzyme, horseradish peroxidase (HRP), and the effect of it to microfiltration (MF) were investigated. PAHA was transformed by oxidative coupling reaction with HRP and hydrogen peroxide (H_2O_2), verifying the catalytic effects of the HRP. Size exclusion chromatography (SEC) revealed that weight-average molecular weight (MW_w) of PAHA was proportionally increased with the dosages of HRP and H_2O_2 , indicating the transform action of HS into larger and complex molecules. An increase in the conformational stability of HS was achieved through the promotion of inter-molecular covalent bondings between heterogeneous humic molecules. Spectroscopic analysis (fluorescence and infrared spectroscopy) proved that functional groups were transformed by the reaction. Additionally, HS and transformed products were undergone microfiltration (MF) to examine the treatment potential of them in a water treatment facility. Original HS could not be removed by MF but larger molecules of transformed products could be removed. Meanwhile, transformed products caused more fouling on the filtration than original HS. This results proved that natural organic matter (NOM) can be removed by MF after its increase in molecular size by oxidative coupling reaction.

Key Words : Humic Acid, Oxidation Coupling Reaction, Horseradish peroxidase (HRP), Hydrogen Peroxide (H_2O_2), Catalytic Effect

요약 : 휴믹물질의 산화중합반응은 천연 효소나 금속산화물 촉매에 의해 유도될 수 있다. 본 연구에서는 천연 효소인 horseradish peroxidase (HRP)에 의한 휴믹산의 특성 변화와 이러한 변화된 특성이 정밀여과 공정에 미치는 영향을 평가하였다. 정제된 Aldrich 휴믹산(PAHA)이 HRP 및 과산화수소 존재 하에 산화중합되어 보다 크고 복잡한 분자를 형성하였으며, 크기배제크로마토그래피(SEC, size exclusion chromatography, SEC)에서도 평균분자량의 증가가 관찰되었다. 또한, HRP 및 H_2O_2 주입량이 증가함에 따라 PAHA의 분자량은 더욱 증가하였다. 휴믹물질의 화학적 안정성은 산화중합반응에 기인한 휴믹 분자 상호간의 공유결합이 촉진됨에 따라 향상되었으며, 형광 분광 및 적외선 분광 분석 결과, 산화중합반응에 의한 PAHA 분자 작용기의 변화도 확인되었다. 수처리 공정에 미치는 영향을 평가하기 위해, 정밀여과를 적용한 결과, 산화중합반응 산물은 높은 분자량으로 인해 그 제거효율이 크게 향상되었다. 이는 산화중합된 자연유기물이 정밀여과에 의해 제거될 수 있음을 증명하는 것이다.

주제어 : 휴믹산, 산화중합반응, HRP, 과산화수소, 촉매효과

1. 서론

휴믹물질(HS : Humic Substances)은 식물이나 동물조직의 분해나, 식물의 체내 생합성 과정을 통해 생성되며, 그들의 전구물질 보다 훨씬 안정한 상태로 자연계에 존재하는 유기물질이다. 이러한 물질은 생체 성장과정에서 생합성(biosynthesis) 되기도 하며, 식물조직의 리그닌이나 다가 페놀류의 자산화(auto-oxidation)나, 축합(condensation)을 통해 생성되기도 하는데, 이러한 과정을 휴믹화(humification)라고 한다. HS는 비결정질이며, 어떠한 특정 화학요소로 분리될 수 없는 비균질성 혼합체로, 방향족, 지방족 유기요소(organic fragments) 및 산소, 질소, 황과 같은 다양한 작용그룹을 가진다(phenol, carboxyl, enol, alcohol, amine 및 thiol

등). 이와 같이 복잡한 특성과 구조를 가지는 HS의 특성화를 위해, 분자량 분포, UV 흡광 스펙트럼, 및 형광검출 등이 기법이 사용되고 있으며, 더욱 발전된 방법으로는 핵자기공명 분광법(Nuclear magnetic resonance, NMR), FT-IR (fourier transform infrared spectroscopy), GC-MS (gas chromatography mass spectroscopy), 그리고 ESI-MS (electrospray-mass spectroscopy) 등이 적용되고 있다.

HS는 효소(peroxidase, laccase, tyrosinase), 금속성 산화물질 등, 다양한 촉매에 의해 산화중합반응을 일으킨다. 이러한 촉매는 자연상태에서 상대적으로 풍부하게 존재하며, 토양에 존재하는 HS와 함께 반응을 유발한다. 이 반응은 자연계에 부정적인 영향을 주지 않으며, 반응조건 또한 온화하므로, 많은 연구자들이 다가 폐물계 물질의 산화중합에

의한 독성 감소에 대한 연구를 진행하였다.¹⁻³⁾ 특히, 효소는 정수처리, 폐수처리 및 오염된 토양과 지하수 정화의 새로운 대안으로 연구되어 왔다. 효소는 특정한 목표 오염물질 처리에 사용될 수 있다고 알려져 왔으며, 최근의 생명공학 기술 발전으로 이러한 효소를 보다 경제적으로 분리·정제 및 제조할 수 있게 되었다. 이러한 이유에서, 다양한 효소들이 오염물질의 처리를 위해 사용되고 있으며, 기존의 화학적, 생물학적 처리보다 향상된 성능을 보이고 있으므로, 많은 주목을 받고 있다.

Peroxidase 중에서도 horseradish peroxidase (HRP)는 구조와 촉매 메커니즘에 대해 특별히 잘 알려진 효소이다. HRP는 서양 고추냉이(horseradish)의 뿌리에서 추출되는, 네 개의 disulfide bridge를 포함한 단일 체인 폴리펩티드이며, 분자량은 ~44kDa 정도이다. 과산화수소가 존재하는 조건에서 HRP는 페놀계 기질의 단일전자산화(single-electron oxidation)를 유도하여 phenoxy 라디칼을 형성하며, Fig. 1에 나타난 세 가지 순차적인 단계를 포함하는 촉매 사이클을 따른다.⁵⁾ 촉매 사이클은 과산화수소에 의한 HRP의 산화에 의해 시작되어, 효소 중간생성물 E_i 를 형성한다. 두 번째 단계에서 효소 중간생성물 E_i 는 페놀계 기질로부터 하나의 전자를 가져와서, 다른 효소 중간생성물인 E_{ii} 와 phenoxy 라디칼을 형성한다. 두 번째 효소 중간생성물 E_{ii} 는 세 번째 단계에서 여전히 페놀계 기질로부터 전자를 가져와서 두 번째 phenoxy 라디칼을 생성하며 본래의 효소로 되돌아가고, 이로서 효소 사이클은 완성된다. HRP 촉매 사이클에서 라디칼 생성 반응은(두 번째와 세 번째 반응) 본질적으로 가역적이다. Peroxidase로 유도된 효소 반응 사이클에서 생성된 phenoxy 라디칼은 서로 또는 다른 기질과 결합(교차결합)할 수 있으며, 수중에서 중합된 침전물을 형성하여 쉽게 제거될 수 있는데, 이러한 침전물은 퇴적토나 토양유기물질로 결합되어 그 독성이 사라지게 된다.

HS는 반응성 있는 작용 그룹을 풍부하게 포함하므로, 유사한 반응을 일으킬 수 있을 것으로 생각된다. 그러므로, 본 연구에서는 HRP에 의한 휴믹산(HA : Humic acid)의 산화중합반응의 가능성을 평가하였다. 또한 산화중합반응 생성물이 막(membrane)여과 공정에 미치는 영향을 평가하였다. 수중에 존재하는 NOM 제거를 위한 방법들 중, 나노여과(nanofiltration, NF)와 역삼투(reverse osmosis, RO)의 방법은 수중의 NOM을 제거하는데 좋은 결과를 보여주지만, 한외여과(ultrafiltration, UF) 및 정밀여과(microfiltration, MF)에 사용되는 분리막의 공경(pore size)은 NOM 요소들을 제거하는데 너무 크다는 단점이 있다. 그러나, NF 및 RO는 UF나 MF에 비해 동력소모가 크고 유지보수에 많은 노력이 필요하다. 또한 대부분의 NOM 요소들은 그 분자량이 막폐색을 일으키기 용이한 범위에 있으므로 NF와 RO의 운영비용이 더욱 증가할 수 있다. 이에 본 연구에서는 MF 막에 의한 HS 제거효율이 산화중합반응 후 향상될 가능성에 착안하여, 0.05 μm 공경의 MF 막을 사용하여 그 영향을 평가하였다.

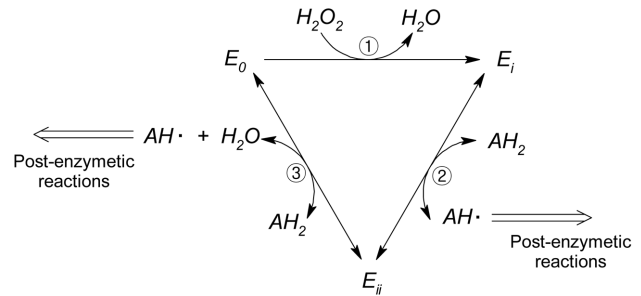


Fig. 1. Schematic representation of HRP-mediated catalytic cycle.⁵⁾

2. 실험재료 및 방법

2.1. PAHA와 HRP

실험에 사용된 HA는 humic acid sodium salt (technical grade)를 Aldrich Chemical Co.로부터 구매하여, 정제과정을 거쳐 휴민(humin)과 ash를 제거하고 HA 만을 분리한 후, 동결건조하여 사용하였다. 정제 과정을 거쳤기 때문에 PAHA (purified aldrich humic acid)로 명명하였다. 정제 과정은 Kilduff와 Weber가 제시한 방법을 따랐으며, 다음에 이를 간단히 요약하였다.⁶⁾

파우더 형태의 휴믹산을 3차 증류수에 용해시킨 후 NaOH를 이용해 pH 11로 조절하고 원심분리를 통해 침전물인 humin과 ash를 제거하였다. 상등액은 1 μm GF/C 필터와 0.45 μm PTFE 필터로 여과하였다. 이 과정을 침전물이 남지 않을 때까지 반복한 후, 1 N HCl 용액으로 HA를 침전시키고 상등액은 제거하였다. 침전물은 0.010 M NaOH 용액에 용해시켜 동결 건조하였으며 사용하기 전까지 데시케이터에 보관하였다. PAHA의 농도는 총유기탄소 측정기(TOC-V_{CP}, Shimadzu)를 이용하여 측정하였다. HRP (RZ (1.2), 113 units/mg)와 과산화수소(30% (w/w))는 Aldrich Chemical Co.로부터 구매하여 정제 없이 사용하였다. Peroxidase 효소의 활성도는 pyrogallol unit로 표현되며, pyrogallol 1 unit은 pH 6.0, 20°C에서 20초 동안 pyrogallol로부터 1.0 mg의 purpurogallin을 형성할 수 있는 활성도를 말한다.

2.2. SEC-UV 분석

HS의 분자량 변화를 살펴보기 위해 크기배제크로마토그래피(SEC) 분석을 실시하여 겔보기 무게 평균 분자량(apparent weight-average MW (MW_w))을 측정하였다. SEC 시스템은 HPLC(영린기기) 시스템의 UV 검출기(UV730D)로 검출하였으며, Waters Protein Pak 125 SEC column을 이용하였다.^{7,8)} 이동상은 pH 6.8로 조정된 인산염완충용액(0.002 M Na₂HPO₄·H₂O + 0.002 M Na₂HPO₄)을 0.1 M NaCl 용액에 첨가하였으며, 유속은 0.8 mL/min로 하였다. 모든 샘플은 0.45 μm PVDF syringe filter로 여과하여 분석하였으며, Polyscience Inc.로부터 구매한 18, 8, 4.6 및 1.8 k PSS (polystyrene sulfonate)와 acetone (58 Da)을 표준물질로 사용하였다. 공급자에 의해 보고된 PSS의 실제 분자량(MW_w)

는 각각 15,200, 6,530, 4,950, 및 1,430 Da이었다. 모든 표준물질과 샘플들은 UV 파장 254 nm에서 흡광도를 측정하였다. 각 물질의 최고 피크 점의 체류시간과 log MW_w 값을 이용하여 선형관계가 수립된 검량선을 작성하였다(R²=0.9990). 각 시료의 MW_w 값은 다음 식을 이용해서 결정하였다.

$$MW_w = \frac{\sum_{i=1}^N (h_i MW_i)}{\sum_{i=1}^N h_i} \quad (1)$$

여기서 h_i는 샘플의 UV 흡광도 값이고, MW_i는 PSS 분자량에 상응하는 값이며, 두 가지 값은 체류시간 i에서 대응하는 값이다. SEC의 재현성은 편차가 5% 미만으로 좋게 나타났다.

2.3. 자외선 및 형광 스펙트럼 분석

자외선분광광도기(UV spectrophotometer, UV mini, Shimadzu)을 이용하여, 자외선 스펙트럼의 변화 양상을 분석하였다. 1 cm 직경의 석영 큐벳을 사용하였으며, 분석 파장의 범위는 200~800 nm이었다. UV 스펙트럼으로부터 얻을 수 있는 인자들을 Table 1에 나타내었다. 또, 형광분광광도기(spectrofluorophotometer, RF5301PC, Shimadzu)를 이용하여, 형광스펙트럼의 변화 양상을 해석하였다. 형광분광법에 의한 분석은 크게 세 가지로 구분할 수 있다. 첫 번째로, excitation (Ex) 파장을 고정하고, emission (Em) 파장을 스캔하는 방법이 있으며, 두 번째로, synchronous(동시화) 스캔하는 방법이 있다. synchronous 스펙트럼은 Ex 파장과 Em 파장의 차이를 분석하는 방법으로, 파장의 차이는 분석자에 따라 다양하게 적용되어왔다(e.g. Δλ = 18, 20, 21, 32, 40, 44, 60, 66, 77, 100 nm). 세 번째로, EEM (excitation-emission matrix) 분광법이 있다. 이 방법은 첫 번째의 방법에서 Ex 파장을 변화하여 3차원 형상의 그래프를 얻는 방법이다.⁹⁻¹¹⁾ EEM 분석 및 synchronous 분석 기법을 본 연구에 적용하였으며, Ex/Em slit은 10 nm에서 분석하였으며, EEM은 Ex 240~400 nm (5 nm 간격), Em 300~600 nm (1 nm 간격) 범위에서 분석하였다. Synchronous 스펙트럼은 Ex 220 nm 부터 Δλ 21, 32, 44, 66, 77 nm에서 Em 700nm까지 분석하였다.

Table 1. Indices of UV absorption characteristics

Index	Meaning
A280	Aromaticity indicator
A465/A665	Index of humification (Decrease with humification)
A254/A204	Aromatic carbon/Aliphatic carbon
A254/A436	Aquatic fraction/Terrestrial fraction
SUVA (specific ultraviolet absorption)	(A254/DOC) × 100

2.4. 회분식 및 동력학 실험

반응은 회분식 실험과 동력학적 실험을 실시하였으며, 선 연구자들의 실험 조건과 유사하게 PAHA 10 mg-C/L, HRP 3, 6 units/mL, H₂O₂ 2, 4 mM 조건에서 살펴보았다. 각각의 반응조 부피는 100 mL, 1 L로 하였다. 회분식 실험과 동력학적 실험의 차이는 공기와의 지속적인 접촉 유무에 있다. 동력학적 실험에서는 지속적인 샘플링으로, 반응용액과 외부 공기의 접촉이 이루어 졌다. 반응용액의 pH는 1 M NaOH 및 HCl 1 M 용액으로 7.0으로 조정하였으며, 실험실 온도 조건에서 회분식 실험은 96시간, 동력학적 실험에서 72시간 동안 이루어졌다. 시료는 0.45 μm PVDF syringe filter (Millex-HV, Millipore)로 여과하여 분석하였다.

동력학적 실험에서는 산화중합반응을 통해 크기가 증가된 PAHA 물질이 막여과 공정에 미치는 영향을 살펴보기 위해, 플릭스 실험을 실시하였다. 플릭스 실험은 교반분리용 셀장치(stirred cell, HP4750 STIRRED CELL, STERITECH™)를 사용하였으며, 플릭스 실험에 사용된 멤브레인 필터는 Isopore membrane (polycarbonate, hydrophilic, 0.05 μm, 47 mm, white, plain)이었다. MF 및 UF의 구동(압)력(driving force)은 일반적으로 0.5~10 bar 정도에서 실시되므로, 본 실험에서는 실험시간과 여액의 부피를 고려하여, N₂ (99.99%)에 의한 4 bar의 조건에서 플릭스 실험을 실시하였으며, 필터를 통과한 여액은 저울로 옮겨 시간에 따라 무게를 측정하였다.

휴믹물질의 구조적인 변화를 살펴보기 위해 회분식 실험과 같은 조건에서 채취한 시료를 동결 건조하여 FT-IR (FT-IR Spectrometer, Spectrum One, Perkin Elmer)을 이용하여 분석하였다. IR 분석 범위는 450~4,000 cm⁻¹이었으며, 동결 건조된 시료 1 mg과 KBr 300 mg으로 제조된 pellet을 분석에 사용하였다.

3. 실험결과

3.1. 회분식 실험

3.1.1. DOC 및 자외선 스펙트럼 특성

본 연구에서는 PAHA의 DOC 농도, HRP 효소 및 H₂O₂ 농도를 변화시켜 실험을 수행하였다. Reaction 1의 조건은 PAHA 10 mgC/L, HRP 3 units/mL, H₂O₂ 2 mM이었으며, Reaction 2의 조건은 PAHA 10 mgC/L, HRP 6 units/mL, H₂O₂ 4 mM이었다.

분석 결과, HRP가 첨가된 반응에서는 PAHA 뿐만 아니라 HRP에 기인하는 DOC 농도 역시 반응 후에 감소하였다. Reaction 1과 2의 초기 DOC는 각각, 18.606과 25.402 mgC/L이었으며, 이들은 반응 후, 각각 9.787과 14.120 mg-C/L로 감소하였다. 반응 후 DOC는 PAHA에 기인하는 DOC보다 낮은 값을 나타내었다. 이는 휴믹화에 의해 생성된 분자량이 크고 침전이 용이한 중합생성물이 여과에 의해 분리되었기 때문으로 판단되며, HRP 및 H₂O₂의 온도가 증가함에

Table 2. UV indices of PAHA and DOM fraction after oxidative coupling reaction

	A465/A665	A254/A204	A254/A436	SUVA
PAHA Only	7,8136	0,7786	5,3813	10,1043
Reaction1	8,2975	0,4855	6,4271	11,4084
Reaction2	7,2391	0,3738	6,7471	8,5320

PAHA 10 mg-C/L, Reaction 1; PAHA with 3 units/mL of HRP and 2 mM H₂O₂, Reaction 2; PAHA with 6 units/mL of HRP and 4 mM H₂O₂, pH 7.0

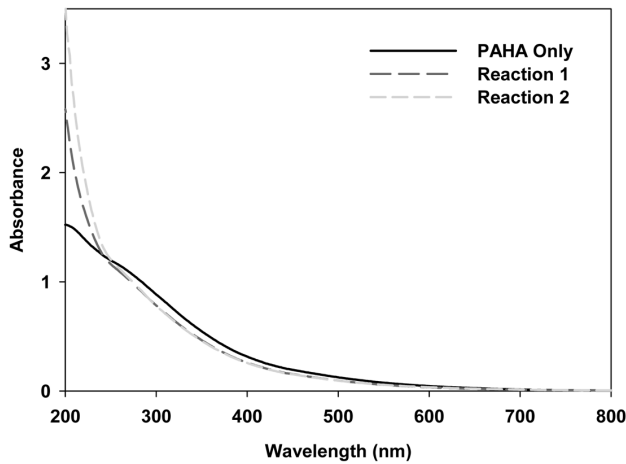


Fig. 2. UV spectrum of PAHA and DOM fraction after oxidative coupling reaction.

따라 중합반응이 더욱 향상되었음을 의미한다. 이에 따라, 자외선 스펙트럼으로부터 산정되는 여액의 휴믹화 정도를 나타내는 지표들은 Table 2에서와 같이 대부분 저분자화 경향을 나타내었다. 그러나, Reaction 2에서는 A465/A665 값이 감소하여, 보다 높은 산화제 농도에서 휴믹화가 진행되었음을 알 수 있다. 한편, Fig. 2에서 알 수 있듯이, UV 스펙트럼이 반응 후 상이한 형태를 나타내는 것으로 보아, 보다 복잡한 반응에 기인하여 분광특성의 변화가 일어났음을 알 수 있다. 이를 보다 명확히 검토하기 위하여, 각 시료에 대해 SEC 분석 및 형광분광 분석을 수행하였다.

3.1.2. 분자량 분포

Fig. 3에 PAHA와 반응 후의 SEC 크로마토그램을 나타내었다. SEC 크로마토그램에서 산화중합반응에 의한 분자량의 증가가 명확하게 나타났다. HRP 및 H₂O₂와 반응 후에, PAHA에서보다 짧은 체류시간에서 UV 흡광도가 증가하였으며, 이는 PAHA의 구성요소보다 고분자 물질의 존재를 의미한다. 표준물질인 PSS 및 acetone의 분자량을 기준으로 하여 SEC 크로마토그램의 평균 분자량 및 분자량 분포를 산정한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. PAHA의 분자량은 반응 전 1,468 Da에서, Reaction 1에서 3,061 Da, Reaction 2에서는 3,597 Da으로 2배 이상 높아졌다. 또한, Fig. 4에서 알 수 있듯이, 분자량 6 K 이상의 분포가 확연히 증가하였으므로, 산화중합반응에 의해 상등액의 PAHA 물질의 분자량이 상승하였음을 알 수 있다. 이러한 결과는 Huang 등

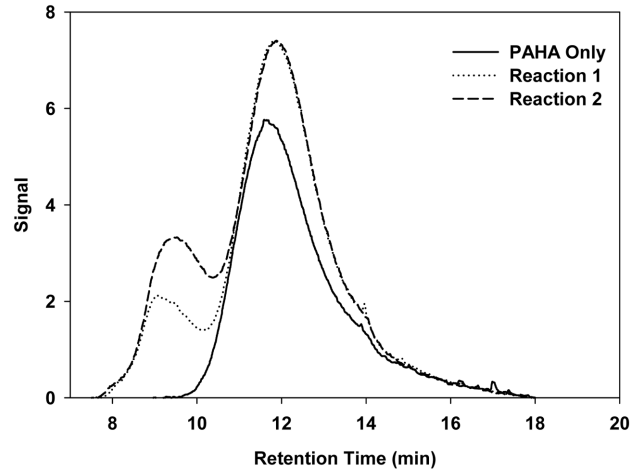


Fig. 3. MW_w, MW_n, polydispersity, and MW_w distribution of PAHA and DOM fraction after oxidative coupling reaction.

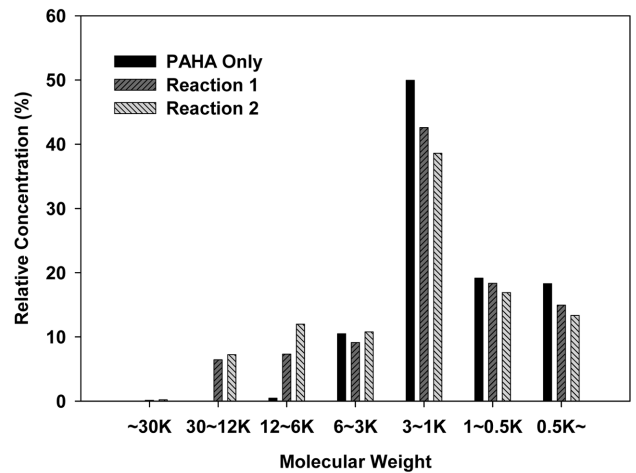


Fig. 4. MW_w distributions of PAHA and DOM fraction after oxidative coupling reaction.

과 Piccolo 등의 연구에서도 찾아볼 수 있다. 이들은 HS의 구조적 안정성이 효소에 의해 촉매된 산화반응으로부터 비균질성 휴믹분자 사이의 공유결합의 촉진에 의해 증가될 수 있다고 하였으며, SEC와 IR 분석을 통해 이들 증명하였다.^{12,13)} 이들은 또, HS 구조의 안정화가 HRP에 의해 촉매된 HA의 산화반응에 의한 aryl, alkyl ethers(에테르)의 형성과 분자크기의 증가에 기인한다고 주장하였다.¹³⁾ 한편, HRP는 증류수와 마찬가지로 흡광성을 거의 보이지 않았는데, 이는 실험에 적용된 효소 농도가 상대적으로 낮았기 때문으로 판단된다.

3.1.3. 형광 스펙트럼 특성

Figs. 5 및 6에 형광분광법에 의한 EEM 및 synchronous 스펙트럼을 나타내었다. PAHA와 HRP와 반응으로부터, EEM과 synchronous 스펙트럼이 모두 변화 하였다. EEM으로부터 반응이 진행됨에 따라 휴믹산성(humic acid-like) 물질의 존재를 나타내는 Ex 310~340 nm, Em 450~500 nm 사이의 intensity가 높아진 것을 볼 수 있다.¹⁰⁾ 이는 휴믹화가 더욱

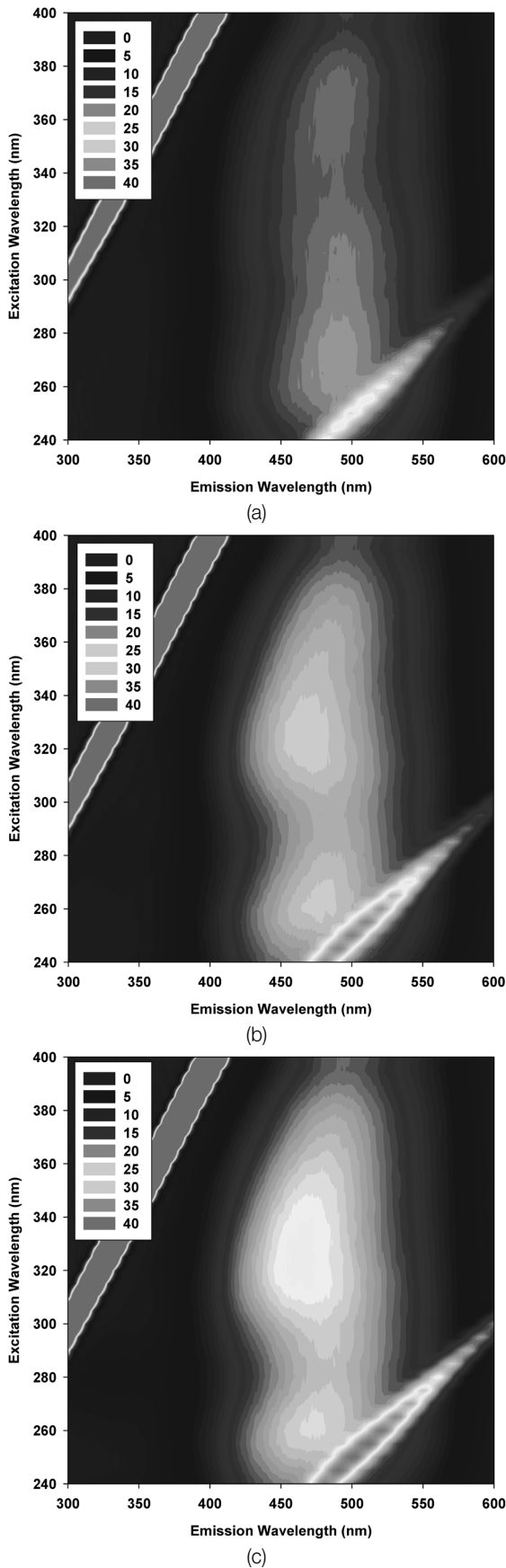


Fig. 5. EEMs of PAHA and DOM fraction after oxidative coupling reaction ((a) PAHA only, (b) Reaction 1, (c) Reaction 2).

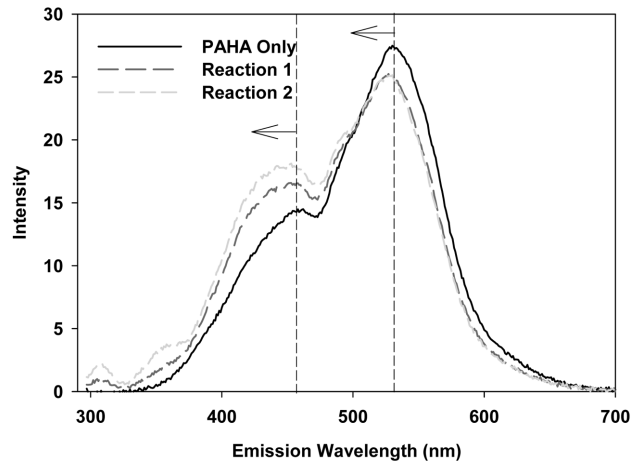


Fig. 6. Synchronous spectra ($\Delta\lambda=77$) of oPAHA and DOM fraction after oxidative coupling reaction.

진행되고, 소수성 산성(hydrophobic acid) 특성이 더욱 증가한 것을 의미한다. 한편, Ex270/Em470 영역의 피크는 펄빅산(fulvic acid) 특성을 나타내며, 이 역시 PAHA의 중합반응에 의해 상승하였으나, 휴믹산 영역의 형광강도의 증가에 비해 상승 정도는 작았다. 이는 다중 고리구조 방향족 화합물의 특성이 강해지는 휴믹화 과정으로 해석할 수 있다. Wang 등에 의하면, EEM 피크의 “red shift”(파장이 긴 쪽으로 이동)는 카르보닐을 함유하는 치환기(carbonyl containing substituents), 수산기(hydroxyl), 알코키(alkoxy), 아미노(amino) groups, 그리고 카르복실(carboxyl) 구성요소와 연관되어 있다.¹⁴⁾ 반면, “blue shift”(파장이 짧은 쪽으로 이동)는 응축된(condensed) 방향족 요소의 분해와 분자량이 큰 분자의 작은 단편(fragment)으로의 분해와 연관되며, 이는 π -전자 시스템 정도의 감소, 방향족 고리수의 감소, 체인 구조에서 복합적인 결합의 감소, 선형고리 시스템으로부터 비선형 시스템으로의 전환, 또는 carbonyl, hydroxyl, amine을 포함하는 작용 그룹의 제거로 인해 발생 한다.¹⁴⁾

EEM의 특성과 가장 잘 일치하는 $\Delta\lambda=77$ 의 synchronous 스펙트럼을 Fig. 6에 나타내었다. Synchronous 스펙트럼은 EEM을 기울기 1로 잘라 EEM을 능선 형태로 변환한 것이다. 이는 EEM 분석에 소요되는 시간을 단축하기 위한 방법이 될 수 있다. Fig. 6에서 반응이 진행됨에 따라 400~500 nm 영역의 intensity는 상승하고 540~650 nm 영역의 intensity는 다소 감소됨을 알 수 있으며, 이는 EEM 해석 결과와 일치한다. 즉, PAHA의 synchronous 스펙트럼에서 관찰되는 두 피크는 반응에 의해 “blue shift” 되었다. 이는 산화 중합반응에 의해 hydroxyl, amine을 포함하는 작용 그룹이 소모되었기¹⁴⁾ 때문으로 판단된다. 그러나, 이러한 장파장 영역의 intensity 감소가 단지 산화반응 중간생성물 등의 저분자 물질의 증가에 결과라고 볼 수는 없다. 앞서 언급하였듯이, 반응 후에 DOC가 크게 감소하였기 때문에, 장파장 영역에서 intensity를 나타내는 고분자 산화중합 생성물이 침전되어 제거되었기 때문으로 판단할 수도 있다. 또한, 분자량이 매우 높은 방향족 또는 폴리페놀(polyphenol) 등은 Em

550 nm 부근에서 형광을 나타내지 않기 때문이다.¹⁵⁾

3.1.4. FT-IR 특성

형광분석으로부터 예측된 작용그룹의 변화를 보다 자세하게 살펴보기 위해 FT-IR 분석을 수행하였으며, 그 결과를 Fig. 7에 나타내었다. Steavenson은 적외선 밴드의 특성 지표를 Table 3과 같이 제시한 바 있다.¹⁵⁾ 이에 따르면, 반응 후에는 PAHA에 비해 더 많은 작용 그룹이 확인되었으며, PAHA 특유의 밴드 역시 상대적 피크 세기에 변화를 보였다. HRP와의 반응 후, C=O 결합을 나타내는 피크와 (1,660~1,630 cm⁻¹) COO⁻ stretching의 피크(1,590~1,517 cm⁻¹)가 나타났으며, C=C 결합을 나타내는 피크(1,170~950, 1,280~1,200 cm⁻¹)의 세기가 증가하였다. 그러나, phenolic 그룹을 나타내는 구간(1,400~1,390 cm⁻¹)의 피크 세기는 상

대적으로 감소하였다. 이는 중합반응에 의해 OH 그룹이 일부 제거되었으며, 이에 따라 C=O 결합 및 C=C 결합이 두드러지게 된 것으로 판단된다. 또한, 지방족 C-H 밴드(2,940~2,900 cm⁻¹)의 상승 또한 관찰되었다.

3.2. 동력학 실험

3.2.1. DOC, 자외선 스펙트럼 특성

HRP로 매개된 PAHA의 산화중합반응에 시간에 따른 영향을 평가하기 위해 동력학적 실험을 실시하였다. PAHA, 과산화수소 및 HRP의 농도는 각각 10 mg-C/L, 2 mM 및 3 units/mL로 하였으며, 초기 pH는 7.0으로 조정하였고, 반응 용액은 1 L 비커에서 자석식 교반기를 이용하여, 교반하면서 72시간 동안 그 특성 변화를 살펴보았다. PAHA 단독, 그리고 PAHA와 HRP 만으로 준비한 용액을 컨트롤 시료로 하여 동시에 동일한 실험을 수행하였으며, 반응 종료 후에 용액으로 플럭스 실험을 실시하여 막여과 공정에 미치는 영향을 살펴보았다. 동력학적 실험은 회분식 실험과 달리, 시료채취에 따라, 반응물이 정기적으로 공기중의 산소에 노출된 상태에서 진행되었으므로, 동일한 조건의 회분식 실험과는 상이한 결과를 나타내었다. Wang과 Huang은 공기중에 노출되는 경우에는 반응생성물의 지방족성이 증가하고, 불활성인 질소에만 노출되는 경우에는 방향족성이 증가한 반응산물이 생성됨을 보고하였다.¹⁷⁾

본 실험에서, 전체 반응기간에 걸쳐, DOC는 12.452±1.415 mg-C/L로 그 변화가 미미한 수준이었으며, 이는 PAHA 물질이 CO₂로 변환되거나, 침전에 의해 제거되지 않았음을 나타낸다. Dec 등은 폐놀계 물질이 다양한 폐놀분해효소나 금속산화물에 의해 매개된 산화중합반응에 의해 HS와 같은 중합체를 형성하며, 이러한 반응을 통해 중합이나 SOM으로의 결합이 유도된다고 하였다.¹⁸⁾ 또한 산화중합반응의 다른 영향으로는 기질의 dehalogenation, decarboxylation, 또는 demethoxylation 등이 있다. 이러한 현상을 조사하기 위해 peroxidase, laccase tyrosinase 및 birnessite (δ-MnO₂)를 이용하여 다양한 폐놀계 물질의 반응을 유도하여, Cl 방출, CO₂ 방출, methanol 또는 methane 생성을 모니터링하였다. Carboxyl 그룹, aromatic 그룹, aliphatic 그룹에서의 각기 다른 위치에 ¹⁴C로 라벨된 요소를 사용한 실험에서 ¹⁴CO₂의 방출은 주로 카르복실 그룹과 연관됨을 발견하였다. 이는 -COOH와 -Cl과 같은 electron-withdrawing substituent(전자를 물러나게 하는 치환기)는 -OCH₃, -CH₃와 같은 electron-donating substituent(전자를 기증하는 치환기)에 비해 치환기를 방출하기 용이하며, 이러한 유기치환기의 방출은 CO₂ 생성을 일으킬 수 있다고 설명하였다. HS 역시 폐놀계 물질과 유사한 작용그룹을 가지고 있으므로 DOC 감소를 예상할 수 있으나, 본 연구에서는 주목할 만한 변화가 없었다. 이는 HS 구조의 복잡성에 기인한 결과로 판단된다.

UV 분석으로부터 얻은 지표를 나타낸 Fig. 8에서 볼 수 있듯이, DOC의 변화는 없으나 A254 값이 감소함에 따라 SUVA 값은 감소하고 있으며, A254/A436 값의 증가는 A436

Table 3. Main IR absorption bands of humic substances¹⁵⁾

Frequency (cm ⁻¹)	Assignment
3400-3300	O-H stretching, N-H stretching (trace)
2940-2900	Aliphatic C-H stretching
1725-1720	C=O stretching of COOH and ketones (trace)
1660-1630	C=O stretching of amide groups (amide I band), quinone C=O and/or C=O of H-bonded C=O of conjugated ketones
1620-1600	Aromatic C=C, strongly H-bonded C=O of conjugated ketones?
1590-1517	COO ⁻ symmetric stretching, N-H deformation + C=N stretching (amide II band)
1460-1450	Aliphatic C-H
1400-1390	OH-deformation and C-O stretching of phenolic OH, C-H deformation of CH ₂ and CH ₃ groups, COO ⁻ antisymmetric stretching
1280-1200	C-O stretching and OH deformation of COOH, C-O stretching of aryl ethers
1170-950	C-O stretching of polysaccharide or polysaccharide-like substances, Si-O of silicate impurities

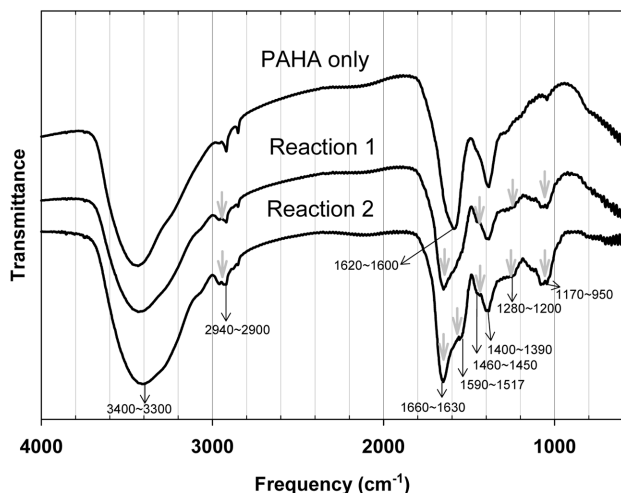


Fig. 7. FT-IR spectra of PAHA and DOM fraction after oxidative coupling reaction.

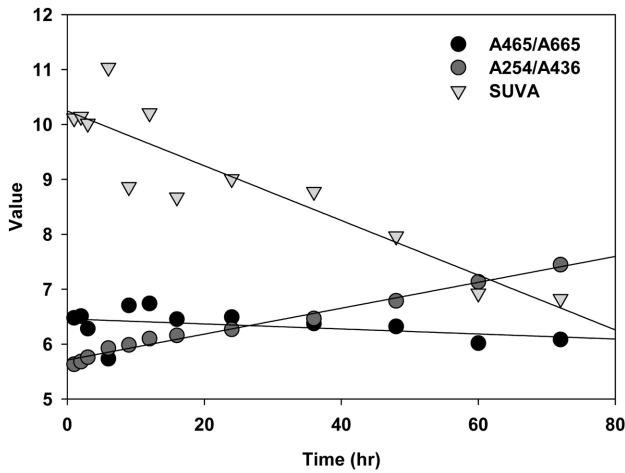


Fig. 8. UV indices of DOM fraction during oxidative coupling reaction (10 mg-C/L PAHA, 3 units/mL HRP, 2 mM H₂O₂, pH 7.0).

값이 상대적으로 많이 감소한 것에 기인한다. 그러나, A465/A665의 humification 지표의 감소는 휴믹화가 진행되고 있음을 나타내고 있다. 이는 단 하나의 UV 지표만을 사용해 휴믹화 과정을 평가할 수 없음을 의미하는 것이다. 한편, 거대분자의 형성 및 이들의 침전에 의한 DOC 감소가 관찰되지 않았기 때문에, 회분식 반응에서보다 휴믹화 정도는 오히려 감소되었다고 볼 수 있다.

3.2.2. 분자량 분포

A465/A665의 감소로 휴믹화가 진행되었음은 예측가능하나, 보다 명확한 분석을 위해 SEC-UV에 의한 분자량 분석이 실시되었다(Fig. 9). Fig. 10에서 볼 수 있듯이 UV 254 nm에서 측정된 크로마토그램은 PAHA 자체가 가지는 흡광도보다 훨씬 크게 나타나고 있다. 이는 자외선분광광도계에 의한 UV 스캐닝 분석이 휴믹화를 평가하는데 오류를 범할 수 있음을 다시 한 번 증명해 준다고 할 수 있다. Fig. 10에서 볼 수 있듯이 반응 초기에 급격한 분자량의 상승을

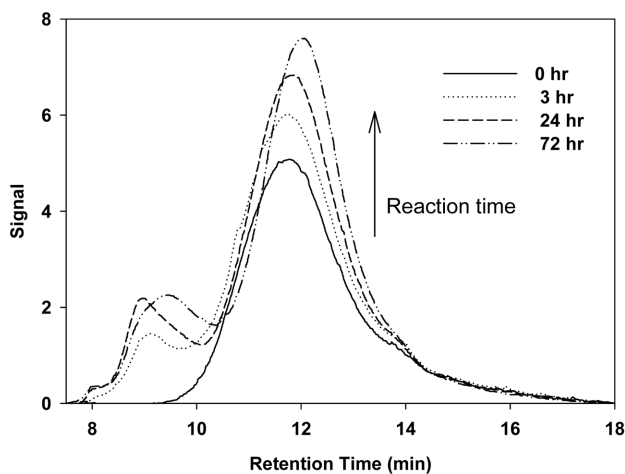


Fig. 9. SEC-UV chromatograms of DOM fraction during oxidative coupling reaction.

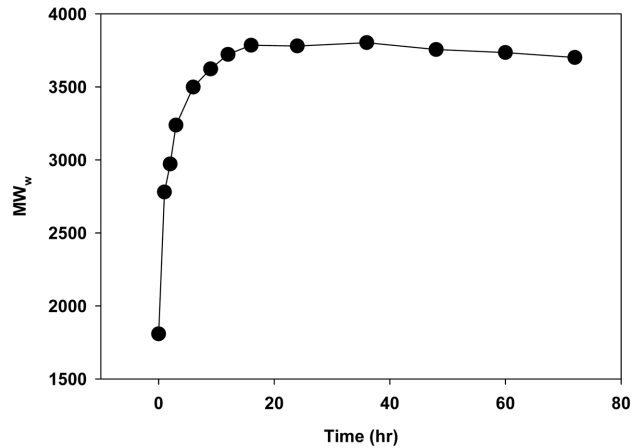


Fig. 10. MW_w of DOM fraction during oxidative coupling reaction, estimated from SEC chromatograms.

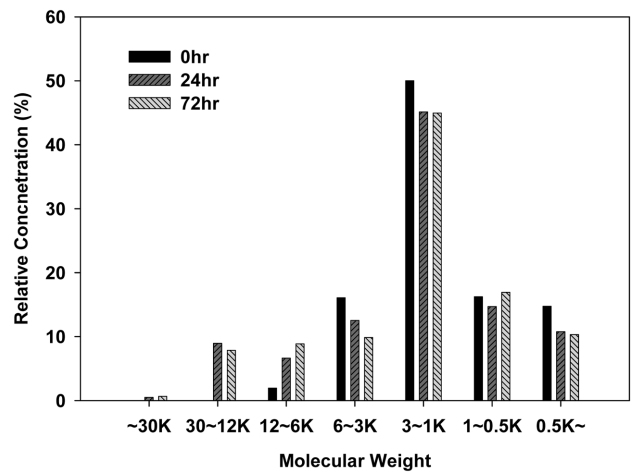


Fig. 11. MW_w distribution of DOM fraction during oxidative coupling reaction.

보이고 있으며, MW_w 값은 1,800 Da부터 3,800 Da까지 2배 이상 증가하였다. SEC 결과로부터 산정한 분자량 분포를 Fig. 11에 나타내었다. 분자량 분포는 6 K 이상에서 두드러지게 상승하였으며, 그 이하에서는 분포가 다소 줄어들면서 MW_w 값이 상승한 것을 알 수 있다.

3.2.3. MF 막의 플럭스에 미치는 영향

산화중합반응에 의해 분자량이 증가한 HS 물질이 정밀여과에 미치는 영향을 살펴보기 위해, stirred cell을 이용한 플럭스 실험을 실시하였다. Fig. 12에서 볼 수 있듯이, 산화중합반응이 진행된 PAHA 용액은 플럭스가 크게 감소하였으며, 이는 HRP와 과산화수소를 동시에 주입하였을 때 더욱 증가하였다. 실험 종료 후, 반응용액과 여과된 반응용액의 UV 스펙트럼을 살펴 보면, PAHA 역시 여과 후 흡광도가 다소 감소하였지만, HRP와 과산화수소가 첨가된 시료에서 흡광도 감소가 가장 크게 나타났다(Fig. 13).

이는 MF 막으로 제거하기 어려웠던 용존유기물질이 중합반응에 의한 분자량 증가로 인해 부분적으로 제거될 수 있음을 간접적으로 시사하고 있다. Piccolo 등은 HS의 산화

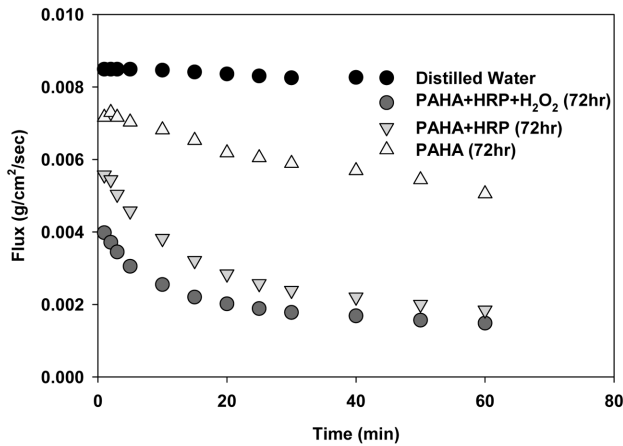


Fig. 12. Flux changes of polymerized PAHA solution (10 mg-C/L PAHA, 3 units/mL HRP, 2 mM H₂O₂, pH 7.0).

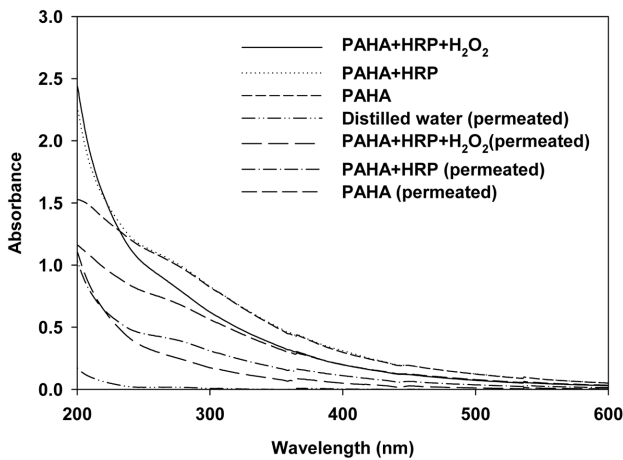


Fig. 13. UV spectra of PAHA solutions and their filtrates.

중합반응을 통해 반응생성물이 본래의 물질 특성에 비해 좀 더 축합되고(condensed), 화학적인 강성(rigidity)이 증가 된다고 하였다.¹⁹⁾ 이 결과를 바탕으로, MF 막으로 제거가 불가능 했던 HS는 산화중합반응 후에 보다 효과적으로 제거할 수 있을 것으로 판단되며, 뒤 이은 소독 공정에 NOM 물질이 미치는 영향도 저감될 수 있을 것으로 판단한다. 그러나, 분자량이 증가한 HS에 의해 막의 폐색이 촉진될 가능성도 있다.

4. 결론

HRP와 과산화수소에 의해 PAHA의 특성이 변환되었으며, 산화중합반응이 유도되었음을 증명할 수 있었다. 반응 후 자외선 흡광 스펙트럼에서 얻은 A465/A665 값의 감소, SEC 분석에 의한 분자량의 증가 등이 관찰되어 산화중합반응에 의한 휴믹화가 진행되었음을 알 수 있었다. 또한, 효소에 의해 촉매 된 산화중합반응으로부터 비균질성 휴믹 분자 사이의 공유결합의 촉진되었음이 확인되었다. 형광분석에 의한 분광학적 분석을 통해, 중합반응에 의한 폐색기

및 아민 그룹이 소모에 따른 형광 스펙트럼의 변화가 관찰되었으며, 적외선 분광 분석으로부터 수산기 그룹의 손상과 지방족 화합물의 증가가 관찰되었다.

동력학적 실험 결과, PAHA 물질의 분자량 상승은 20시간 이내에 급격히 이루어졌으며, 반응 생성물에 의한 MF 여과 실험에서 중합반응을 겪은 시료가 중합반응을 겪지 않은 시료에 비해 막 폐색이 더욱 급격히 진행되었다. 이러한 결과는 분자량 상승에 기인하는 것이며, 중합반응이 이루어진다면, MF에 의해서도 휴믹분자를 제거할 수 있음을 나타내고 있다.

사 사

이 논문은 2008년도 정부(교육과학기술부)의 재원으로 한국연구재단의 지원을 받아 수행된 기초연구사업 연구임(521-2008-1-D00225).

KSEE

참고문헌

1. Šmejkalová, D., P. Conte and Piccolo, A., "Structural characterization of isomeric dimers from the oxidative oligomerization of catechol with a biomimetic catalyst," *Biomacromolecules*, **8**, 737~743(2007).
2. Bollag, J.-M., "Decontaminating soil with enzymes," *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 1876~1881(1992).
3. Shindo, H. and Huang, P. M., "Catalytic effects of manganese (IV), iron (III), aluminum, and silicon oxides on the formation of phenolic polymers," *Soil Sci. Soc. Am. J.*, **48**, 927~934(1984).
4. Matocha, C. J., Sparks, D. L., Amonette, J. E. and Kukkadapu, R. K., "Kinetics and mechanism of birnessite reduction by catechol," *Soil. Sci. Soc. Am. J.*, **65**, 58~66(2001).
5. Huang, Q. and Weber, Jr. W. J., "Peroxidase-catalyzed coupling of phenol in the presence of model inorganic and organic solid phases," *Environ. Sci. Technol.*, **38**, 5238~5245(2004).
6. Kilduff, J. and Weber, Jr. W. J., "Transport and separation of organic macromolecules in ultrafiltration processes," *Environ. Sci. Technol.*, **26**, 569~577(1992).
7. Kilduff, J. E., Karanfil, T., Chin, Y.-P. and Weber, Jr. W. J., "Adsorption of natural organic polyelectrolytes by activated carbon: a size-exclusion chromatography study," *Environ. Sci. Technol.*, **30**, 1336~1343(1996).
8. Hur, J. and Schlautman, M. A., "Molecular weight fractionation of humic substances by adsorption onto minerals," *J. Colloid Interface Sci.*, **264**, 313~321(2003).
9. 허진, 김미경, 박성원, "상류 오염원 추적을 위한 용존 유기물질 Synchronous 형광스펙트럼 분석 연구," *대한환경공학회지*, **29**(3), 317~324(2007).
10. Chen, W., P. Westerhoff, J. A. Leenheer and Booksh, K.,

- “Fluorescence citation-emission matrix regional integration to quantify spectra for dissolved organic matter,” *Environ. Sci. Technol.*, **37**, 5701~5710(2003).
11. Zarruk, K. K., Scholer, G. and Dudal, T., “Fluorescence fingerprints and Cu²⁺-complexing ability of individual molecular size fractions in soil-and waste-borne DOM,” *Chemosphere*, **69**, 540~548(2007).
 12. Huang, Q., Pinto, R. A., Burlingame, D. J., Tang, J. and Weber, Jr. W. J., “Enhanced removal of natural organic matter via peroxidase-mediated oxidative coupling,” *Water Sci. Technol.; Water Supply*, **4**(4), 33~40(2004).
 13. Piccolo, A., Cozzolino, A., Conte, P. and Spaccini, R., “Polymerization of humic substances by an enzyme-catalyzed oxidative coupling,” *Naturwissenschaften*, **87**, 391~394(2000).
 14. Wang, Z., Wu, Z. and Tang, S., “Characterization of dissolved organic matter in a submerged membrane bioreactor by using three-dimensional excitation and emission matrix fluorescence spectroscopy,” *Water Res.*, **43**, 1533~1540(2009).
 15. Uyguner, C. S. and Bekbolet, M., “Evaluation of humic acid photocatalytic degradation by UV-vis and fluorescence spectroscopy,” *Catal. Today*, **101**, 267~274(2005).
 16. Stevenson, F. J., *Humus chemistry*, John Wiley & Sons, Inc., New York(1994).
 17. Wang, M. C. and Huang, P. M., “Ring cleavage and oxidative transformation of pyrogallol catalyzed by Mn, Fe, Al, and Si oxides,” *Soil Sci.*, **165**(12), 934~942(2000).
 18. Dec, J., Haider, K. and Bollag, J-M., “Release of substituents from phenolic compounds during oxidative coupling reactions,” *Chemosphere*, **52**, 549~556(2003).
 19. Piccolo, A., Conte, P. and Tagliatesta, P., “Increased conformational rigidity of humic substances by oxidative biometric catalysis,” *Biomacromolecules*, **6**, 351~358(2005).