

# 탈수소화효소 반응 및 촉매적 흡착 반응에 의한 액상 포름알데하이드의 제거 효율 연구

함규진 · 박민섭 · 최권영<sup>†</sup>

아주대학교 환경안전공학과  
(2016년 11월 3일 접수, 2016년 11월 17일 심사, 2016년 11월 24일 채택)

## Investigation of Liquid Phase Formaldehyde Removal Efficiency by Enzymatic Formaldehyde Dehydrogenase and Catalytic Chemisorption Reactions

Kyu Jin Ham, Min Seob Park, and Kwon-Young Choi<sup>†</sup>

Department of Environmental Engineering, Ajou University, Suwon, South Korea  
(Received November 3, 2016; Revised November 17, 2016; Accepted November 24, 2016)

### 초 록

포름알데하이드는 무색, 무취의 유독성 물질로 다양한 방법을 통하여 포름알데하이드를 제거할 수 있는 방법들이 많이 보고되었다. 본 논문에서는 생물학적 효소 반응 및 화학적 흡착·촉매 반응에 의한 포름알데하이드의 제거 효율을 비활성을 통해 비교하였다. 첫째, *Escherichia coli* K12 포름알데하이드 탈수소화 효소(Formaldehyde dehydrogenase, FDH)를 *Escherichia coli* BL21(DE3)에 클로닝하여 발현 및 분리하였다. FDH 효소 활성( $k_{cat}/K_m$ )은  $2.49 \times 10^3 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 로 측정되었으며, 비활성은 8.69 U/mg으로 측정되었다. 둘째, 화학적 흡착 및 화학 촉매를 이용한 포름알데하이드의 제거 효율도 동시에 진행하였다. 본 논문에서는 활성탄과 제올라이트, KI 및 KOH로 처리한 활성탄과 제올라이트를 화학적 포름알데하이드 흡착제로 사용하였으며 Pd/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매를 이용하여 포름알데하이드의 산화 반응 효율을 결정하였다. 결론적으로 본 논문에서 수행한 화학적 흡착 및 산화 촉매 반응의 경우 대략 50%의 비슷한 수준의 포름알데하이드 제거 효율을 보였으며, 특히 비활성의 경우 탈수소화효소의 비활성이 0.01-0.26 U/g 수준의 화학적 흡착 및 산화 촉매보다 월등히 높게 측정되었다.

### Abstract

Formaldehyde is one of the toxic substances without any color and smell. Several methods to remove formaldehyde has been investigated up to now. Here, both the enzymatic and chemisorptive/catalytic liquid phase formaldehyde removal were investigated, and their catalytic activities in terms of specific activities were compared. Firstly, formaldehyde dehydrogenase (FDH) enzyme from *Escherichia coli* K12 was cloned, and expressed in *Escherichia coli* BL21(DE3). And the catalytic activity was characterized as  $2.49 \times 10^3 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$  of  $k_{cat}/K_m$  with 8.69 U/mg of the specific activity. Secondly, the chemisorptive and oxidative catalytic removals were investigated simultaneously. Activated carbons and zeolites treated with heat, KI, and KOH were used as chemisorption medium. And Pd/TiO<sub>2</sub> was used as an oxidative catalyst for the formaldehyde removal. All of the tested chemicals showed similar formaldehyde removal efficiencies of around 50%. However, the specific activity of FDH dependent formaldehyde removal was absolutely higher than that of using chemisorptive and catalytic removal processes with the ranges of 0.01 to 0.26 U/g.

**Keywords:** formaldehyde removal, formaldehyde dehydrogenase (FDH), chemisorption, catalytic oxidation, specific activity

## 1. 서 론

포름알데하이드는 무색의 자극성이 강한 냄새를 가지고 있는 가장 간단한 형태의 알데하이드이며 직접 접촉에 의한 자극 및 가스 형태로 흡입을 통한 급성 독성 물질로 분류되어 있는 화학물질이다[1,2].

포름알데하이드는 산화적인 방법을 통하여 덜 자극적이고 덜 유해한 formic acid로 전환 혹은 제거할 수 있으며 이에 관련한 생물학적 효소 전환과 흡착 및 화학 촉매적 전환 등 다양한 포름알데하이드 제거 방법들이 보고되고 있다[3,4]. 특히 생물학적 효소를 이용한 포름알데하이드의 제거는 FDH 효소가 대표적이다[5,6](Figure 1). FDH 효소 반응은 아연을 포함하는 알코올 탈수소화효소(alcohol dehydrogenase) 그룹에 속하며 glutathione에 의존적인 효소로 알려져 있다[7,8]. 이 FDH 효소는 반응 메커니즘에서 산화된 상태의 NAD<sup>+</sup> 조효소를 전자 수용체로 하여 formic acid와 환원된 NADH를 생산하며, 몇몇 특정 세포에서는 메탄의 대사에 관여하는 효소로 알려져 있다[9]. 또한, FDH

<sup>†</sup> Corresponding Author: Ajou University,  
Department of Environmental Engineering, Suwon, South Korea  
Tel: +82-31-219-1825 e-mail: kychoi@ajou.ac.kr

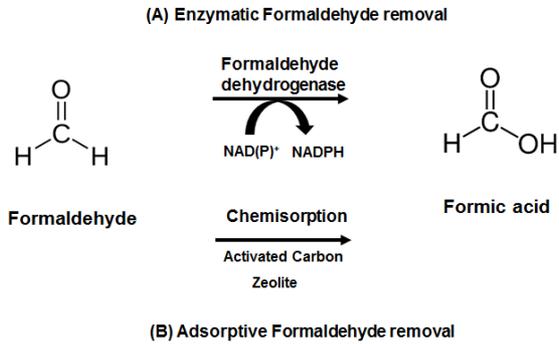


Figure 1. General scheme of oxidation of formaldehyde into formic acid by FDH enzyme and chemisorptive removal by activate carbon and zeolite.

는 대부분 포름알데하이드를 기질로 하지만 이외의 다른 형태의 알데하이드나 옥소(oxo)형태의 사슬형 기질에 활성이 있다고 보고되어 있다[10,11].

현재까지 다양한 FDH 효소가 보고되었으며, 대표적으로는 *Pseudomonas putida* 유래의 FDH가 잘 알려져 있다[12,13]. *P. putida* 유래의 이 FDH는 예외적으로 glutathione에 비의존적인 것으로 알려졌으며, FDH 발현 대장균 세포 추출 성분(crude extract)의 FDH 효소 비활성(specific activity)은 0.01 U/mg로 정제된 순수 FDH 효소의 경우 5.40 U/mg의 비활성을 보이는 것으로 보고되었다[5,7].

FDH 효소의 활성을 측정하는 방법으로는 반응 산물인 formic acid를 직접적으로 측정하는 방법과 앞에서 언급한 *P. putida* FDH의 비활성 측정방법과 같이 NAD<sup>+</sup>로부터 환원되어 생성되는 NADH 조효소를 340 nm 흡광 과장 변화를 통해 간접적으로 측정하는 방법이 있다[14]. 특히 NADH의 간접적 측정 방법은 상대적으로 간단하여 빠르게 측정할 수 있지만, 전자 전달 과정에 있어서 uncoupling effect를 고려하지 않기 때문에 FDH 효소 활성이 높게 측정되어 정확한 효소 활성을 측정하기 힘들다는 단점이 있다. 또한 포름알데하이드 제거를 목적으로 할 경우, 제거되는 포름알데하이드와 효소 활성의 상관관계를 직접적으로 측정할 수 없다는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 FDH의 효소 활성을 측정함에 있어서 포름알데하이드를 직접적으로 검출하는 방법을 통하여 포름알데하이드의 제거 관점에서의 FDH 효소 활성을 측정하고자 한다. 본 연구에서는 포름알데하이드와 반응하여 색변화를 일으키는 pararosaniline과 purpald를 사용하였다. 이 방법을 통하여 제거되는 포름알데하이드의 양을 정확히 측정할 수 있었고 기질 감소 속도를 통하여 FDH 효소 활성 및 비활성을 결정할 수 있었다[15]. Pararosaniline과 purpald는 포름알데하이드와 반응하게 되면 포름알데하이드의 농도에 따라 다양한 농도의 보라색으로 발색하게 된다(Figure 1). 우선 pararosaniline 발색 강도와 포름알데하이드의 농도 의존성에 대한 실험 결과를 토대로 농도 의존성 상관 관계식을 유도하였으며, 이 관계식을 이용하여 FDH 효소 반응을 통한 포름알데하이드 제거 효율의 결정에 응용할 수 있었다. 본 실험을 진행하기 위하여 대장균(*Escherichia coli* K12)의 유전자에 존재하는 *fdh* 유전자를 확보하고 발현용 대장균인 *Escherichia coli* BL21(DE3)에서 T7 promoter 조절 하에 FDH 효소를 발현하고 정제하였다. 그리고 FDH 효소와 다양한 농도의 포름알데하이드를 in-vitro에서 반응하고 연속적으로 pararosaniline 기반의 정량 방법 적용하여 FDH 효소의 kinetic 수치들과 동시에 제거되는 포름알데하이드의 비활성을 측정하였다.

포름알데하이드를 제거하기 위한 방법으로 생물학적 효소 이외에

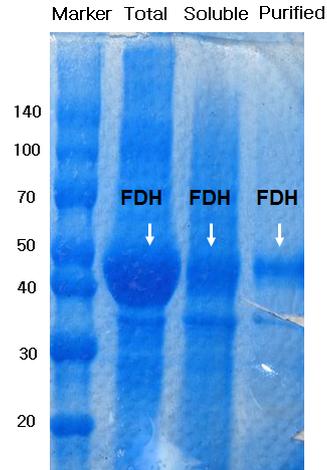


Figure 2. SDS-PAGE analysis of purified FDH protein. Lane 1, marker; Lane 2, total cell extract; lane 3, soluble fraction; lane 4, purified fraction.

다양한 화학적 흡착 제거 및 촉매를 이용한 산화 반응 등이 알려져 있다[16,17]. 특히 흡착을 통해 포집하는 방법으로는 활성탄(activated carbon), 제올라이트(zeolite)가 많이 보고되었으며, 산화 촉매를 통한 산화 전환 방법으로는 Pd/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매(oxidative catalyst)가 많이 보고되었다[18,19]. 현재는 이러한 화학적 흡착제들의 효율을 높이거나 저온에서 높은 효율을 유지하기 위한 Pd/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매의 다양한 전처리 및 화학적 구조 변경을 통한 연구가 상당히 진행되고 있다[20,21].

본 연구에서는 앞서 언급한 생물학적 FDH 효소 기반의 포름알데하이드 제거 연구와 더불어 활성탄, 제올라이트 흡착제와 Pd/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매를 도입하여 액상 형태의 포름알데하이드를 제거 및 산화하는 반응 연구를 동시에 수행하였다. 이러한 연구 과정들을 통하여 본 연구의 궁극적인 목표인 pararosaniline-포름알데하이드 정량 검출 기반의 FDH 효소 활성 측정 및 화학적 흡착/산화 촉매 전환 효율의 정량적 비교를 연구하고자 한다[22].

## 2. 실험

### 2.1. *fdh* 유전자의 pET-28a(+)-*fdh* 플라스미드 구축

FDH 효소 생산을 위해 FDH 발현하는 *fdh* 유전자를 클로닝하였다. *fdh* 유전자는 *E. coli* K12 균주의 genome에서 각각의 제한효소를 포함하는 아래의 primer를 제작하여 PCR 방법을 통하여 증폭하였다. Forward primer; AAA GGA TCC ATG AAA TCA CGT GCT GCC GTT, Backward primer; AAA AAG CTT GTA ACG AAT TAC GGT TCG AAT. PCR 반응 조건은 다음과 같다. 95 °C에서 5 min 이후, 95 °C에서 1 min, 58 °C에서 1 min, 72 °C에서 1 min (30사이클), 60 °C에서 5 min. 그리고 증폭한 *fdh* 유전자는 EcoRI과 HindIII 제한효소를 이용하여 양 말단을 효소 반응 처리하고 동일한 제한 효소로 처리한 pET-28a(+) 클로닝 벡터에 ligation하여 pET-28a(+)-*fdh* 플라스미드를 구축하였다.

### 2.2. FDH 효소의 *E. coli* BL21(DE3)에서의 발현 및 정제

FDH 효소 발현용 대장균은 *E. coli* BL21(DE3)를 사용하였고 발현 조건은 다음과 같다. pET-28a(+)-*fdh* 플라스미드를 *E. coli* BL21(DE3)에 형질 전환하여 *fdh* 발현 균주를 구축하였다. LB 복합 배지 2 mL에

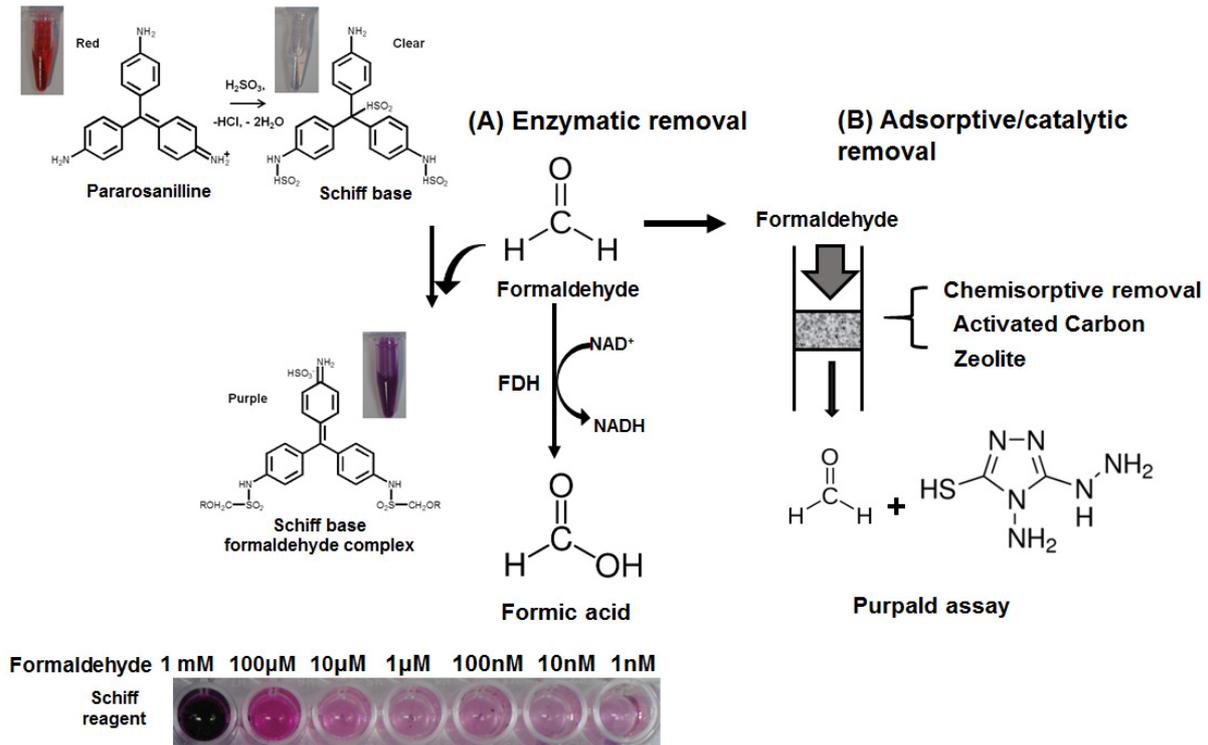


Figure 3. Scheme of formaldehyde detection using pararosaniline schiff base and enzymatic/chemisorptive removal of formaldehyde.

FDH 발현 균주를 집중하여 37°C에서 12 h 배양하고, 250 mL 플라스크에 50 mL LB 복합배지를 멸균하여 초기 배양액 0.5 mL를 집중하였다. 이후 37°C, 200 rpm에서 optical density ( $OD_{600}$ ) 0.6에 이를 때까지 배양하고, 0.1 mM IPTG를 배양액에 추가하여 *fdh* 유전자 발현을 유도하였다. IPTG 유도 후 30°C, 200 rpm에서 추가적으로 12 h 더 배양하였다. 배양 완료 후 4,500 rpm에서 15 min 동안 원심 분리하여 배양액에서 전세포를 분리하였다. 분리된 세포를 PBS (phosphate buffered saline) 용액으로 2번 세척하고, 최종적으로 50 mM, pH 7.0 phosphate 완충용액 5 mL에 세포를 최종 재부유하였다.

획득한 세포는 SDS-PAGE 단백질 분리를 통하여 단백질 발현을 확인하는데 사용하였다. 초음파 분쇄기를 통하여 세포를 파쇄한 이후 세포 파쇄 총 부분과 13,500 rpm 원심분리 이후 수용성 상층액 부분을 회수하여 단백질 전기 영동법을 통하여 분리하였다. FDH 효소를 분리 정제하기 위하여 동일하게 발현 유도된 세포를 lysis 완충용액 (20 mM Tris-HCl, pH 8.0, 150 mM NaCl)에 재부유하고 이어서 초음파 파쇄를 통하여 세포를 파쇄하였다. 세포 파쇄 후 획득한 수용성 단백질 부분은 Ni-NTA resin과 결합 후 다양한 농도의 imidazole 수용액으로 세척 및 분리를 통하여 최종적으로 수용성으로 발현된 FDH 단백질만을 분리 정제하였다. 이렇게 분리 정제한 단백질은 아래와 같은 in-vitro 효소 반응을 통하여 포름알데하이드 산화 반응 검출에 최종적으로 사용되었으며 단백질 농도는 Bradford assay를 통하여 정량하였다.

### 2.3. FDH 효소 활성 측정

FDH 효소 반응은 정제된 단백질을 사용하여 활성을 측정하였다. FDH 활성 측정 방법은 기존의 NADH 생성 속도로 측정하는 방법이 아닌 pararosaniline을 이용하여 검출하였다. 정제된 FDH 단백질과 0.1 μM에서 0.1 mM의 다양한 농도의 포름알데하이드 기질을 이용하여

다음과 같은 조건에서 in-vitro 효소 반응을 진행하였다. 96-well plate에 100 μL 반응 부피 기준으로 최종 농도 5 μg/mL FDH 효소, 3 mM glutathion 조효소, 기질 10 μL를 50 mM potassium phosphate 완충용액 (pH 7.5)에서 37°C, 1 min간 배양하였다. 그리고 1 mM  $NAD^+$ 를 반응기에 주입함과 동시에 반응을 시작하였다.

### 2.4. Pararosaniline을 이용한 포름알데하이드의 검출 및 FDH 효소 kinetics

FDH 효소 활성은 pararosaniline Schiff base를 사용하여 직접적인 포름알데하이드 감소량을 정량하여 결정하였다. Pararosaniline Schiff base의 제조는 다음과 같다. 1 mL의 1N HCl에 1 mg pararosaniline을 용해한다. 이때 pararosaniline이 붉은색을 나타내는 것을 확인할 수 있다. 그리고 50 mM sulfurous acid 수용액을 준비하여 pararosaniline-HCl 수용액의 색이 붉은색에서 투명하게 될 때까지 소량씩 혼합하여 준다. 완전히 pararosaniline-HCl의 붉은색이 소멸되는 순간의 수용액을 pararosaniline Schiff base-포름알데하이드 검출 지시약으로 사용하였다. 이렇게 준비한 pararosaniline Schiff base를 FDH와 포름알데하이드의 효소반응 종료 후 준비한 반응기에 혼합하였고, 5 min간 상온에서 반응시킨 후 UV/vis spectrometry를 이용하여 540 nm 흡광도를 관찰하였다. 흡광 세기와 포름알데하이드 농도와의 상관 관계를 구하기 위하여 동일한 조건에서 포름알데하이드 농도를 10 nM에서 1 mM 농도 구간에서 흡광도를 측정하여 FDH 효소 반응에 사용한 기질 농도 범위에서 가장 근접한 비례 상수를 도입하여 포름알데하이드를 정량하였다 (Figure 3). 포름알데하이드 정량 결과를 토대로 FDH 효소 kinetics를 결정하였다.  $K_m$ ,  $k_{cat}$  및  $k_{cat} / K_m$ 의 FDH kinetic 상수들은 5 μg/mL FDH 단백질과 각각 0.1 μM, 1.0 μM, 50 μM, 100 μM의 기질에 대해서 측정된 포름알데하이드 제거 속도를 통하여 결정하였다.

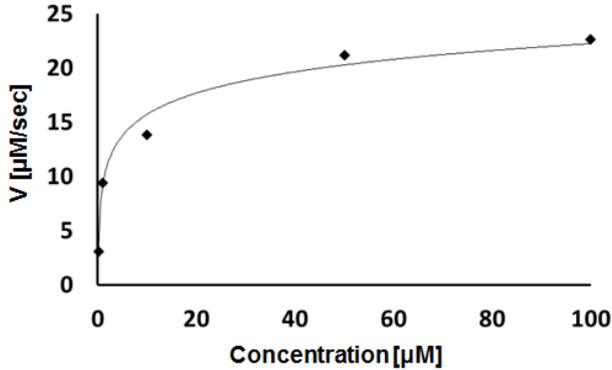


Figure 4. Michaelis-menten plot of FDH enzyme against various concentration of formaldehyde.

2.5. 흡착제 및 산화 촉매의 준비

본 연구에서 사용한 흡착제 활성탄은 AC pellet 2 mm 및 4-8 mesh AC이며 그리고 제올라이트 흡착제는 zeolite 5A와 zeolite X (13X)를 사용하였다. 그리고 활성탄, 제올라이트를 지지체로 하여 alkaline 처리한 흡착제의 경우 각각 지지체 1 g당 0.00125 mol의 KI, KOH가 입혀진 촉매를 제조하기 위해 활성탄, 제올라이트 100 g에 KI 20.75 g, KOH 7.01 g을 impregnation하여 활성탄과 제올라이트 표면에 골고루 입혀주었다. 그리고 100 °C에서 수분을 제거해준 후 110 °C에서 완전 건조하고 촉매 실험 전 증류수로 여러 번 씻어주어 촉매에 남은 불순물을 제거하고 건조하여 각각의 흡착제를 준비하였다.

Pd 1 wt%, Na 1 wt%의 Pd/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매 100 g을 만들기 위해 TiO<sub>2</sub> 98 g, Pd(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub> 2.165 g, Na(NO<sub>3</sub>) 3.697 g을 impregnation을 통해 TiO<sub>2</sub> 표면에 골고루 입혀준다. 그 후 60 °C에서 남아있는 수분을 제거하였다. 수분이 제거된 촉매를 110 °C에서 20 h 동안 완전 건조시킨 후 400 °C에서 2 h 동안 calcination하고 촉매 실험 전 증류수로 여러 번 씻어주어 촉매에 남은 불순물을 제거하고 건조기에 말려주어 Pd/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매를 준비하였다.

2.6. Purpald assay를 통한 화학적 흡착 및 촉매 반응 후 잔류 포름알데하이드의 측정

기존의 pararosaniline을 이용한 포름알데하이드의 검출의 경우 높은 민감도 및 저농도의 검출이 용이하였으나, 화학적 흡착 및 산화 촉매 반응의 경우 고농도의 포름알데하이드 검출에 효율적인 purpald 검출을 이용하여 흡착 및 산화 반응 이후 반응기의 잔류 포름알데하이드를 검출하였다. Purpald (4-amino-3-hydrazino-5-mercapto-1,2,4-triazole, CAS 1750-12-5) 시약은 Sigma-Aldrich Korea (Suwon, Korea)에서 구입하여 사용하였다. Purpald 시약은 기존의 pararosaniline과 동일하게 포름알데하이드와 반응 후 보라색으로 발색하는 성질이 있으며 540 nm에서 흡광도를 측정하여 정량할 수 있다. 이와 같은 검출 방법을 통하여 잔류 포름알데하이드 농도를 정량하였고 각각의 흡착제 및 산화 촉매의 포름알데하이드 제거 효율을 결정할 수 있었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. FDH 단백질 발현 및 분리

FDH 효소를 발현하는 재조합 E. coli BL21(DE3)-FDH로부터 세포 총 단백질 및 수용성 부분들을 Figure 2의 SDS-PAGE 결과로부터 확인할 수 있었다. 기존에 보고된 대부분의 FDH 효소들이 대장균에서 발현

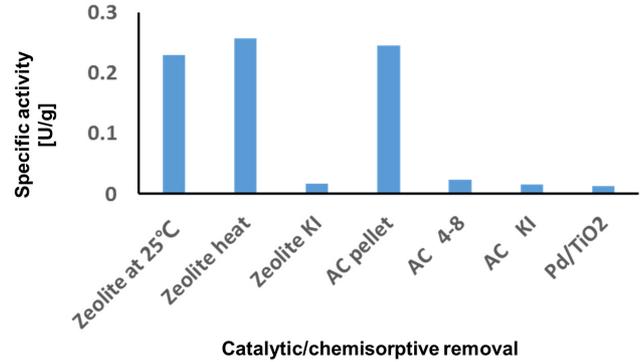


Figure 5. Comparison of formaldehyde removal activity between catalytic and chemisorptive processes.

혹은 수용성 발현이 잘 되지 않아 P. putida FDH 효소의 경우와 같이 chaperon 등의 발현 보조 단백질들을 추가적으로 이용하였으나, 본 연구에서 사용된 E. coli K12균주의 FDH 효소는 E. coli BL21(DE3)에서 상당히 발현이 잘 이루어졌다. 특히 Figure 2의 total cell extract에서 보이는 것과 같이 세포 전체 단백질에서 발현된 FDH 효소의 비율이 상당히 높은 것을 확인할 수 있었다. FDH 효소는 총 380개의 아미노산으로 이루어져 있으며, 예상되는 단백질의 크기는 40 kDa으로 Figure 2의 marker 크기와 비교할 때 동일한 크기의 FDH 단백질이 발현되는 것을 확인할 수 있었다. 또한 Ni-NTA resin을 이용하여 imidazole 농도에 따라 정제한 FDH 효소의 경우 Figure 2의 purified fraction과 같이 동일한 40 kDa 크기로 순수한 FDH 효소만을 분리할 수 있었다. FDH 효소의 농도는 Bradford assay방법으로 정량하였으며 그 결과 FDH 최종 농도는 0.5 mg/mL로 분자량을 고려하였을 때 최종적으로 순수한 12.7 µM의 FDH 단백질을 분리할 수 있었다.

3.2. Pararosaniline을 이용한 포름알데하이드의 검출 및 FDH 효소 활성 측정

Figure 2의 포름알데하이드 농도에 따른 pararosaniline의 발색 농도 변화 및 흡광도의 상관 관계를 살펴보면 100 µM에서 100 nM 수준의 농도에서는 선형적인 포름알데하이드의 검출이 가능하였으나 1 mM 이상 혹은 100 nM 이하의 포름알데하이드 농도에서는 흡광도가 너무 높게 측정되거나 너무 낮게 측정되어 정확한 포름알데하이드의 농도를 검출하기 힘들었다. 포름알데하이드의 검출 최적 농도를 고려하여 FDH 효소 반응의 기질 농도의 범위를 결정하였다. 분리한 FDH 단백질 용액으로부터 다양한 농도의 포름알데하이드 기질에 대해 측정된 포름알데하이드 소멸 속도를 Michaelis-Menten equation에 대입하여 K<sub>m</sub>, k<sub>cat</sub> 및 k<sub>cat</sub>/K<sub>m</sub> 상수들을 결정하였다. 포름알데하이드 제거 최고 속도 V<sub>max</sub>는 24.51 µM/sec로 측정이 되었다. 그리고 Lineweaver-Bulk plotting을 이용하여 결정한 K<sub>m</sub> 상수는 77.49 µM, k<sub>cat</sub> 상수는 1.93 × 10<sup>2</sup> sec<sup>-1</sup>로 측정되었다. 기존에 보고된 P. putida 유래의 FDH 효소의 경우 포름알데하이드 기질에 대한 K<sub>m</sub> 수치가 0.09 mM 수준임을 고려할 경우 P. putida 유래 FDH 효소와 기질 친화도는 비슷한 수준임을 확인할 수 있었다. 또한 정제한 FDH 효소의 specific activity는 8.69 U/mg으로 측정되었다.

효소의 specific activity 측정 결과는 포름알데하이드를 기질로 하여 결정하였으나, 정확한 효소의 특성을 판단하기 위해서는 다양한 탄소 길이를 갖는 알데하이드를 기질로 하여 효소 활성을 측정하고 각각의 기질에 대해서 활성을 비교하는 연구가 필요할 것으로 생각된다. 이

**Table 1. Purification of Recombinant *E. coli* K12 FDH from *E. coli* BL21(DE3) Harboring pET28a(+)-FDH and its Kinetic Parameters**

Purification	Total protein (mg/mL)	Specific activity (U <sup>a</sup> /mg)	K <sub>m</sub> (μM)	k <sub>cat</sub> (sec <sup>-1</sup> )	k <sub>cat</sub> /K <sub>m</sub> (sec <sup>-1</sup> mM <sup>-1</sup> )
Ni <sup>2+</sup> His tag	0.50	8.69	77.49	1.93 × 10 <sup>2</sup>	2.49 × 10 <sup>3</sup>

<sup>a</sup> One unit of specific activity is defined as the amount of mg formaldehyde converted per mg FDH enzyme in one minute with standard reaction condition.

**Table 2. Formaldehyde Removal Efficiency Catalytic and Chemisorptive Process**

Chemical Process	Chemisorption					Catalytic oxidation	
	Zeolite at 25 °C	Zeolite heat	Zeolite KI	°AC pellet	AC 4-8	AC KI	Pd/TiO <sub>2</sub>
<sup>a</sup> [FA] <sub>0</sub> (μg/mL)	100	100	10	100	100	10	100
<sup>b</sup> [FA] <sub>10</sub> (μg/mL)	53.9	48.6	3.3	50.9	54.2	3.9	73.6
<sup>c</sup> R.E. (%)	45.9	51.4	67.7	49.1	45.8	61.3	26.4
<sup>d</sup> C.C (mg/g)	0.23	0.26	0.02	0.25	0.23	0.02	<sup>f</sup> 0.13

<sup>a</sup> [FA]<sub>0</sub> : initial concentration of formaldehyde, <sup>b</sup> [FA]<sub>10</sub> : final concentration of formaldehyde, <sup>c</sup> RE: removal efficiency of formaldehyde, <sup>d</sup> SA : specific activity of chemisorbant, <sup>e</sup> CC : chemisorption capacity, <sup>f</sup> AC : activated carbon, <sup>f</sup> 0.13 : unit of removed mg formaldehyde/used g [Pd/TiO<sub>2</sub>] in case of catalytic oxidation.

는 기존에 보고된 다양한 FDH 효소의 경우 short/medium/long-chain의 알데하이드에 대한 기질 특이성이 탄소 길이에 따라 다르기 때문이다. 그리고 이러한 기질 특이성을 기반으로 FDH의 class가 결정이 되며 아미노산 서열 유사도 분석을 통해 FDH 효소의 class를 예상할 수 있다. 본 연구에서 진행한 *E. coli* K12 유래의 FDH 효소를 BLASTP (<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>)를 통하여 아미노산 서열을 분석해 본 결과 S-(hydroxymethyl)glutathione dehydrogenase 효소로 구분되며 이는 class III alcohol dehydrogenase 효소에 해당하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 Class III에 해당되는 FDH 효소의 경우 일반적으로 medium-chain family (MDR)에 해당된다고 알려져 있다[5,7]. 이는 본 연구에서 사용한 *E. coli* K12 유래의 FDH 효소를 포름알데하이드를 기질로 활성을 측정하였을 때 glutathione 의존성을 확인하였던 결과와 일치하며 *E. coli* K12 유래의 FDH 역시 다양한 chain 길이에 따른 알데하이드에 활성이 있을 것으로 예상된다.

### 3.4. 화학적 흡착을 통한 포름알데하이드의 제거 효율 측정

본 연구에서는 앞서 진행한 FDH 효소 기반의 생물학적 포름알데하이드 전환 연구를 진행함과 동시에 화학적 흡착 및 산화적 촉매 반응을 통한 포름알데하이드 제거 연구를 함께 진행하였다. 화학적 흡착제로는 가장 많이 사용되는 활성탄과 제올라이트를 선정하였으며 열처리 및 alkaline 전처리 방법을 추가하여 액상 포름알데하이드의 제거 효율을 측정하였다. 제거된 포름알데하이드의 농도 Δ[FA]는 초기 반응에 사용한 포름알데하이드의 농도 [FA]<sub>0</sub>에서 흡착 이후 배출되는 포름알데하이드의 농도 [FA]<sub>10</sub>를 purpald assay를 통하여 정량하였다.

초기 포름알데하이드의 농도는 100 μg/mL 및 10 μg/mL에 대해서 상온 흡착 실험을 진행하였고, 제올라이트 5A, 고온 열처리를 한 제올라이트, KI 처리를 한 제올라이트, pellet활성탄, 4-8 mesh 활성탄, KI 처리를 한 활성탄에 대해서 각각 흡착 실험을 진행하였고, 상온에서 Pd/TiO<sub>2</sub> 촉매에 의한 산화 반응의 총 7가지 포름알데하이드 흡착 및 산화 실험을 진행하였다. Table 2의 결과와 같이 Pd/TiO<sub>2</sub>를 제외한 제올라이트, 활성탄 전부 45-70% 수준의 포름알데하이드 제거 효율을 나타냄을 확인할 수 있었다. 특히 제올라이트 및 활성탄의 경우 모두 KI를 처리하였을 때 포름알데하이드 제거 효율이 제올라이트가 47.5%, 활성탄이 24.8% 증가하는 결과를 얻을 수 있었다. 가장 높은 포름알데하이드 제거 효율은 제올라이트를 KI처리를 한 흡착제였으며 67.7%

의 최고 제거 효율을 나타내었다. 특히 Pd/TiO<sub>2</sub>의 산화 촉매 반응의 경우 제거 효율이 26.4%로 가장 낮게 측정이 되었다. 이는 Pd/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매 특성상 상온에서 반응이 상당히 더디게 진행되기 때문으로 생각된다. 특히 촉매의 경우 온도 의존성이 높기 때문에 상온에서 포름알데하이드의 높은 전환 효율을 관찰할 수 없었다. 기존에 보고된 논문에서 따르면 상온에서 산화 촉매를 사용하여 포름알데하이드를 100% 수율로 전환시킨 경우는 1% Pt/TiO<sub>2</sub>, Pt/MnOx-CeO<sub>2</sub>, Pt/Fe<sub>2</sub>O<sub>3</sub>를 이용한 경우로 보고되고 있으며 대부분의 0.01~0.6% Pt/TiO<sub>2</sub> 산화 촉매의 경우 40% 이하의 낮은 전환 효율을 갖는 것으로 보고되었다 [23-26]. 더 높은 포름알데하이드 전환 효율을 확보하기 위해서는 상온보다는 고온에서 다양한 금속 산화제 및 첨가물에 대한 심도 있는 촉매 반응 연구가 필요할 것으로 생각된다. 특히 이 과정에서 더 정확한 촉매 활성을 평가하기 위해서는 다양한 구간의 온도에서 다양한 범위의 포름알데하이드 기질 농도와 반응한 결과를 측정해야 하는 오랜 연구가 필요할 것이다.

### 3.5. 생물학적 FDH 효소 및 화학적 흡착을 통한 포름알데하이드의 제거 효율의 비교

FDH 효소를 통하여 포름알데하이드의 제거 연구를 통해 FDH 효소 활성 측정 결과 Table 1과 같이 비활성이 8.69 U/mg으로 측정이 되었다. 이와 동시에 활성탄 및 제올라이트를 이용한 포름알데하이드 제거 효율을 측정하여 chemisorption capacity와 산화 반응 효율을 우선 결정하였다. 초기 포름알데하이드의 농도가 100 μg/mL 수준일 경우 대부분의 흡착 결과 흡착도는 0.2~0.3 mg/g 수준으로 측정이 되었다. 초기 농도를 10 μg/mL로 낮추었을 경우 흡착도 역시 대략 0.02 mg/g 수준으로 낮게 측정되었다.

기존의 생물학적 효소 FDH를 이용한 포름알데하이드의 제거 효율과 화학적 흡착 및 촉매 전환 공정은 상대적인 비교가 되지 못하였다. 특히 비활성 수준의 단위에서도 상당한 차이를 보였다. 생물학적 처리 반응의 비활성은 U/mg 단위로 측정되었으나 화학적 처리 공정의 경우 U/g으로 측정되어 생물학적 제거 공정이 월등히 높게 측정되었다. 화학적 흡착 및 산화 촉매 반응 역시 제거 효율을 동일한 기준의 비활성으로 전환하여 비교하였다(Figure 5). 비활성 단위의 정의를 표준 반응 조건에서 1 mg의 포름알데하이드를 제거하기 위해서 필요한 화학 흡착제 혹은 촉매의 g양으로 정의하였고 이는 FDH의 효소 비활

성 단위와 비교하였을 때 동일한 1 mg의 포름알데하이드를 제거하기 위해서 필요한 효소의 양을 mg으로 정의한 것에 비해 친분의 일 수준으로 낮게 정의된 단위이다. 이 단위를 활용하여 화학 흡착 및 촉매의 비활성을 비교하면 활성탄 및 zeolite의 경우 KI를 처리하지 않았을 때 0.01~0.26 U/g 수준의 비활성을 나타내었고 열처리한 제올라이트의 경우 0.26 U/g의 가장 높은 비활성을 나타내었다. 그러나 이 수준의 비활성은 FDH 효소의 비활성과 비교할 경우  $10^4$  수준으로 절대적으로 낮은 수치이고 상대적으로 비교하기에는 무리가 있다고 판단되었다. 위와 같은 결과는 화학 촉매 반응과 효소 반응의 활성 비교 기준이 다르기 때문이며 두 반응을 효과적으로 동시에 적용하기에는 한계점이 있다고 생각된다. 그러나 위와 같은 문제를 해결할 경우 화학 촉매와 효소 반응의 장점만을 적용하는 chemo-enzymatic 공정 개발이 가능하다. 예를 들면, 효소의 위치특이적 반응(regio-selective reaction)은 촉매를 이용한 화학 합성 과정에서 반응 위치의 미세한 활성화 에너지 차이에 따른 위치특이성을 조절하기 힘든 단점을 극복해 줄 수 있는 해결 방법이 될 수도 있으며, 반응 조건의 제약으로 인하여 효소 반응으로 진행할 수 없는 복잡한 반응을 화학적 촉매 반응을 통하여 해결할 수 있는 방법도 역시 가능하다. 위와 같은 chemo-enzymatic 공정이 최근 많이 시도되고 있으나, 다양한 한계점으로 인하여 극복해야 하는 문제점 역시 존재한다[27-29]. 우선 대부분의 효소 반응은 촉매 반응과 다른 온도 및 압력의 최적 조건을 갖고 있으며 이에 대한 최적화 과정이 필요하며, 특히 효소 반응의 경우 NAD(P)H, ATP, FAD(H)와 같은 조효소를 필요로 하는 경우 경제성을 포함한 공정 효율 역시 고려해야 한다. 이 경우 조효소 재생산 시스템이나 조효소 대체 공정이 없을 경우 효소가 아닌 세포 반응 공정이 또 다른 해결책이 될 수 있으나 이 역시 세포 배양 및 기질/산물의 전달 등 다양한 변수를 고려해야 하는 문제점이 있다.

#### 4. 결 론

생물학 촉매인 FDH 효소의 포름알데하이드 반응 속도는  $2.49 \text{ sec}^{-1} \text{ mM}^{-1}$ 의  $k_{cat}/K_m$  수치로 결정되었으며 이는 기존에 보고된 다양한 FDH 효소 활성과 크게 다르지 않는 범위에 속한다. 특히 본 연구에서 사용한 FDH 효소는 비활성이 8.69 U/mg으로 측정되었으며, 이를 화학적 흡착 및 산화 촉매 활성과 상대적으로 비교하는 수치로 적용하고자 하였다. 활성탄 및 제올라이트를 이용한 화학적 흡착의 경우 대략 50% 수준의 비슷한 포름알데하이드 제거 효율을 보였으며 흡착도의 경우 0.2 mg/g 수준으로 측정되었다. 특히 비활성의 경우 평균적으로  $< 0.3 \text{ U/g}$  수준으로 측정되어, FDH기반의 생물학적 포름알데하이드 제거 활성이 월등히 높음을 알 수 있었다.

본 연구 결과를 통하여 포름알데하이드 제거 혹은 전환 실험에 있어서 화학적 흡착 및 촉매 전환 공정보다 생물학적 효소 전환 활성이 월등히 더 높다는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 효소 반응과 흡착/촉매 화학 반응은 반응 시스템에 있어서 근본적인 차이점을 내재하고 있다. 우선 반응 부피에 있어서 효소 반응 화학 반응에 비해 상대적으로 작은 부피 반응을 사용하였다. 이 경우 효소반응은 0.1 mL 수준의 반응이지만 흡착/촉매 반응의 경우 실험실 벤치 수준에서조차 최소 50 mL 수준으로 500배의 큰 부피 공정이다. 이는 효소의 경우 대량 생산하여 반응에 이용하기 힘들다는 점에 있어서 두 공정을 비교하여 활성을 비교하는 것이 동일한 수준에 이루어져야 한다는 것을 의미한다. 따라서 본 연구에서는 포름알데하이드 제거에 사용된 효소, 흡착제, 산화 촉매제의 동일한 질량을 기준으로 비활성을 측정하고자 하

였다. 결과적으로는 FDH 기반의 생물학적 효소의 비활성이 월등히 높게 측정이 되었는데, 이는 또한 효소 반응과 흡착/촉매 반응 조건에 영향을 받았을 것으로 생각된다.

본 연구는 chemo-enzymatic 융합 공정을 최종 목표로 생물학적 효소, 화학 흡착제 및 촉매의 활성에 대한 연구 결과를 비교하고자 하였다. 앞서 언급한 상이한 반응 스케일 및 반응 조건에 대한 최적화 연구가 추가적으로 진행이 된다면 생물학적인 촉매 방법과 화학적 흡착 처리를 동시에 적용하여 효율적으로 포름알데하이드를 제거할 수 있을 것이다. 이상적으로는 생물학적/화학적 공정의 각각의 장점들을 융합 적용한 복합 연속 공정을 시도하여 다양한 변수들을 최적화하고, 비단 포름알데하이드 뿐 아니라 다양한 기질의 처리 및 전환 공정에 응용할 수 있는 모델 시스템으로서 개발이 가능할 것으로 생각된다.

#### 감 사

본 연구는 에너지기술연구원에서 지원하는 에너지기술 개발사업(산업현장의 독성가스 누출사고 피해 저감을 위한 응급처리 기술 개발 과제, 과제번호 : 20162220100260)의 지원을 받아 수행되었습니다.

#### References

1. T. H. Ma and M. M. Harris, Review of the genotoxicity of formaldehyde, *Mutat. Res.*, **196**, 37-59 (1988).
2. C. L. Wiedemann, Formaldehyde toxicity, *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, **78**, 554-555 (1994).
3. A. Talaiekhazani, M. Salari, M. R. Talaei, M. Bagheri, and Z. Eskandari, Formaldehyde removal from wastewater and air by using UV, ferrate(VI) and UV/ferrate(VI), *J. Environ. Manag.*, **184**, 204-209 (2016).
4. Z. Xu and H. Hou, Formaldehyde removal from air by a biodegradation system, *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, **85**, 28-31 (2010).
5. K. Ito, M. Takahashi, T. Yoshimoto, and D. Tsuru, Cloning and high-level expression of the glutathione-independent formaldehyde dehydrogenase gene from *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.*, **176**, 2483-2491 (1994).
6. R. D. Barber, M. A. Rott, and T. J. Donohue, Characterization of a glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase from *Rhodobacter sphaeroides*, *J. Bacteriol.*, **178**, 1386-1393 (1996).
7. W. Zhang, S. Chen, Y. Liao, D. Wang, J. Ding, Y. Wang, X. Ran, D. Lu, and H. Zhu, Expression, purification, and characterization of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas aeruginosa*., *Protein Expr. Purif.*, **92**, 208-213 (2013).
8. M. Koivusalo and L. Uotila, Glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase/class III alcohol dehydrogenase: further characterization of the rat liver enzyme, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **328**, 465-474 (1993).
9. R. N. Patel, H. R. Bose, W. J. Mandy, and D. S. Hoare, Physiological studies of methane- and methanol-oxidizing bacteria: comparison of a primary alcohol dehydrogenase from *Methylococcus capsulatus* (Texas strain) and *Pseudomonas* species M27, *J. Bacteriol.*, **110**, 570-577 (1972).
10. W. G. Gutheil, E. Kasimoglu, and P. C. Nicholson, Induction of glutathione-dependent formaldehyde dehydrogenase activity in *Escherichia coli* and *Hemophilus influenzae*, *Biochem. Biophys. Res.*

- Commun.*, **238**, 693-696 (1997).
11. L. Lessmeier, M. Hoefener, and V. F. Wendisch, Formaldehyde degradation in *Corynebacterium glutamicum* involves acetaldehyde dehydrogenase and mycothiol-dependent formaldehyde dehydrogenase, *Microbiology*, **159**, 2651-2662 (2013).
  12. S. Ogushi, M. Ando, and D. Tsuru, Formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: a zinc metalloenzyme, *J. Biochem.*, **96**, 1587-1591 (1984).
  13. N. Tanaka, Y. Kusakabe, K. Ito, T. Yoshimoto, and K. T. Nakamura, Crystal structure of formaldehyde dehydrogenase from *Pseudomonas putida*: the structural origin of the tightly bound co-factor in nicotinoprotein dehydrogenases, *J. Mol. Biol.*, **324**, 519-533 (2002).
  14. N. Wen, W. Liu, Y. Hou, and Z. Zhao, The kinetics behavior of the reduction of formaldehyde catalyzed by alcohol dehydrogenase (ADH) and partial uncompetitive substrate inhibition by NADH, *Appl. Biochem. Biotechnol.*, **170**, 370-380 (2013).
  15. K. Y. Choi *et al.*, Development of colorimetric HTS assay of cytochrome p450 for ortho-specific hydroxylation, and engineering of CYP102D1 with enhanced catalytic activity and regioselectivity, *Chembiochem*, **14**, 1231-1238 (2013).
  16. H. Huang and D. Y. C. Leung, Complete oxidation of formaldehyde at room temperature using TiO<sub>2</sub> supported metallic Pd nanoparticles, *ACS Catal.*, **1**, 348-354 (2011).
  17. T. Kawai *et al.*, Removal of formaldehyde by hydroxyapatite layer biomimetically deposited on polyamide film, *Environ. Sci. Technol.*, **40**, 4281-4285 (2006).
  18. S. Tanada, N. Kawasaki, T. Nakamura, M. Araki, and M. Isomura, Removal of formaldehyde by activated carbons containing amino groups, *J. Colloid Interface Sci.*, **214**, 106-108 (1999).
  19. A. M. Ewlad-Ahmed, M. A. Morris, S. V. Patwardhan, and L. T. Gibson, Removal of formaldehyde from air using functionalized silica supports, *Environ. Sci. Technol.*, **46**, 13354-13360 (2012).
  20. S. Shin and J. Song, Modeling and simulations of the removal of formaldehyde using silver nano-particles attached to granular activated carbon, *J. Hazard. Mater.*, **194**, 385-392 (2011).
  21. H. Dong, Y. H. Ding, and C. C. Sun, C<sub>2</sub>H<sub>4</sub>+H<sub>2</sub>CO: a new route for formaldehyde removal, *J. Chem. Phys.*, **122**, 204321 (2005).
  22. M. S. Quesenberry and Y. C. Lee, A rapid formaldehyde assay using purpald reagent: application under periodation conditions, *Anal. Biochem.*, **234**, 50-55 (1996).
  23. J. Pei and J. S. Zhang, Critical review of catalytic oxidization and chemisorption methods for indoor formaldehyde removal, *HVAC&R Res.*, **17**, 476-503 (2011).
  24. C. B. Zhang, H. He, and K. Tanaka, perfect catalytic oxidation of formaldehyde over a Pt/TiO<sub>2</sub> catalyst at room temperature, *Catal. Commun.*, **6**, 211 (2005).
  25. C. B. Zhang, H. He, and K. Tanaka, Catalytic performance and mechanisms of a Pt/TiO<sub>2</sub> catalyst for the oxidation of formaldehyde at room temperature, *Appl. Catal. B*, **65**, 37-43 (2006).
  26. X. Tang, J. Chen, X. Huang, Y. Xu and W. Shen, Pt/MnO<sub>x</sub>-CeO<sub>2</sub> catalysts for the complete oxidaiton of formaldehyde at ambient temperature., *Appl. Catal. B*, **81**, 115-121 (2006).
  27. T. Li *et al.*, Efficient, chemoenzymatic process for manufacture of the Boceprevir bicyclic [3.1.0]proline intermediate based on amine oxidase-catalyzed desymmetrization, *J. Am. Chem. Soc.*, **134**, 6467-6472 (2012).
  28. M. Oslaj, J. Cluzeau, D. Orkić G. Kopitar, P. Mrak, and Z. Časar, A highly productive, whole-cell DERA chemoenzymatic process for production of key lactonized side-chain intermediates in statin synthesis, *PLoS One*, **8**, e62250 (2013).
  29. L. Werner, A. Machara, B. Sullivan, I. Carrera, M. Moser, D. R. Adams, T. Hudlicky, and J. Andraos, Several generations of chemoenzymatic synthesis of oseltamivir (Tamiflu): evolution of strategy, quest for a process-quality synthesis, and evaluation of efficiency metrics, *J. Org. Chem.*, **76**, 10050-10067 (2011).