

효소반응을 이용한 폐수속의 페놀제거: 금속이온이 Peroxidase에 의해서 생성된 페놀침전물의 침강에 미치는 영향

류근갑^{*} · 권상욱 · 김영태

울산대학교 화학공학과
(1996년 9월 25일 접수, 1997년 1월 30일 채택)

Enzymatic Removal of Phenols from Wastewaters: Effects of Metal Ions on the Sedimentation Behavior of Phenolic Precipitates Formed by Peroxidase

Keungarp Ryu^{*}, Sangwook Kwon and Youngtae Kim

Department of Chemical Engineering, The University of Ulsan, Ulsan 680-749, Korea
(Received 25 September 1996; accepted 30 January 1997)

요 약

수용액에 함유되어 있는 페놀을 peroxidase 및 H_2O_2 를 이용하여 침전시킨 후 금속이온을 첨가하여 효과적으로 침강시킬 수 있는 방법에 대하여 연구하였다. Peroxidase와 H_2O_2 에 의한 반응 및 원심분리에 의해서 수용액 속의 페놀을 80% 이상 제거할 수 있었다. 또한 효소반응 후 금속이온(Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+})을 첨가하면 효소반응에 의하여 생성된 페놀침전물의 침강효율을 증가시킬 수 있었다. 페놀침전물의 침강효율은, pH 7 수용액에서 0.1 mM 이상의 Fe^{2+} 이온을 첨가할 경우 가장 우수하였다.

Abstract—The use of metal ions was studied for the efficient sedimentation of phenolic precipitates which were formed by peroxidase and H_2O_2 in aqueous solutions. Over 80% of phenol was removed from aqueous solutions by enzyme reactions using peroxidase and H_2O_2 followed by centrifugation. Adding metal ions, Al^{3+} , Fe^{2+} , Fe^{3+} , Cu^{2+} to a solution containing phenolic precipitates increased the sedimentation efficiency of the phenolic precipitates. The use of Fe^{2+} ion over 0.1 mM was most effective for the sedimentation of the phenolic precipitates.

Key words: Phenol, Peroxidase, Precipitation, Metal Ions

1. 서 론

Peroxidase는 H_2O_2 에 의해서 페놀 또는 아닐린 등의 방향성 성분들이 각각의 라디칼로 산화되는 반응의 촉매역할을 하는 효소이다. Peroxidase 반응에 의해서 생성된 라디칼은 라디칼 반응에 의하여 고분자화된다. 페놀을 기질로 한 peroxidase의 반응이 수용액에서 이루어질 경우, 생성된 페놀고분자의 용해도가 급격히 감소하게 되어 침전물질을 형성하게 된다(Scheme 1). 여기에서 AH는 페놀을 A-극은 페놀라디칼을 나타낸다. Scheme 1에 따라서 peroxidase를 이용하여 수용액으로부터 페놀성분을 제거하는 방법이 1983년 Klibanov 등에 의해서 발표된 이후 활발히 연구되고 있다[1-5].

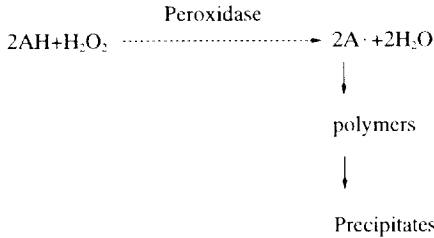
Peroxidase를 이용하여 페놀을 제거하는 방법은 형성된 페놀침전물을 원심분리에 의하여 반응액으로부터 간단히 제거할 수 있고, 고농도의 페놀(100 ppm 이상)을 포함하고 있는 경우에도 적용할 수 있으며, 페놀침전물이 매우 빠른 시간(약 10분)에 형성되는 장점이 있으므로 페놀성분을 함유하고 있는 산업폐수의 정화에 적합하다[1, 2]. Peroxidase를 이용한 페놀제거 방법을 실제 적용하기 위해서는

대량으로 생성된 페놀침전물을 효과적으로 제거할 수 있는 방법이 개발되어야 한다. 페놀침전물을 수용액으로부터 분리하기 위한 방법으로는 원심분리, 여과 및 침강법 등을 사용할 수 있으며 본 연구에서는 사용방법이 가장 용이하고 쉽게 scale-up이 가능한 침강법을 이용할 경우, 금속이온이 peroxidase에 의해서 형성된 페놀침전물의 침강효율에 미치는 영향을 조사하였다. 효소로서는 대표적인 peroxidase인 horseradish peroxidase(HRP)를 사용하였으며 페놀을 함유하고 있는 실제의 산업폐수 대신 인위적으로 조성된 페놀을 함유하고 있는 수용액을 대상으로 실험을 수행하였다. 그러나 peroxidase를 이용하면 실제 산업폐수 속의 페놀을 효과적으로 제거할 수 있는 것으로 보고되었으므로[1] 본 연구결과도 실제의 경우에 적용할 수 있을 것으로 생각된다.

2. 실험

2-1. 실험재료

본 연구에서 사용한 HRP(type II)는 Sigma(미국)에서 구입하였으



Scheme 1. Peroxidase catalyzed oxidation of phenols and subsequent formation and precipitation of phenolic polymers in aqueous solutions.

며 페놀은 Aldrich(미국)에서 구입하였다. Aluminun sulfate hydrate [$\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3 \cdot x\text{H}_2\text{O}$], iron sulfate heptahydrate($\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$), ferric sulfate [$\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$] 및 cupric sulfate pentahydrate($\text{CuSO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$) 등은 Sigma(미국)에서 구입하였으며 H_2O_2 는 35% 용액을 구입하여 사용하였다.

2-2. 실험방법

HRP에 의한 페놀의 제거는 다음과 같은 방법으로 실험하였다. 주어진 농도의 페놀이 함유되어 있는 완충용액 10 mL에 HRP를 투입한 후 H_2O_2 를 가하여 반응을 시작하였다. 항온교반기에서 150 rpm으로 교반하면서 25 °C에서 반응을 계속하였다. 반응개시 후 2시간이 지난 뒤 반응용액을 원심분리(6000 rpm, 30분)하여 생성된 페놀 침전물을 제거하였다. 페놀제거율은 UV/VIS spectrophotometer(HP 8452, Hewlett Packard)를 사용하여 270 nm에서의 흡광도의 감소율로서 측정하였다. 즉 H_2O_2 를 가하기 전 반응용액의 흡광도 대비 반응 및 원심분리 후 여액의 흡광도의 감소율로서 페놀 제거효율을 나타내었다.

HRP에 의해서 생성된 페놀물질의 침강에 미치는 금속이온의 영향은 다음과 같은 방법으로 측정하였다. 페놀 1 mM이 포함되어 있는 완충용액(100 mM sodium acetate, pH 5) 100 mL를 250 mL 크기의 Erlenmeyer flask에 넣었다. 여기에 HRP를 4 mg 투입한 후 H_2O_2 를 가하여 반응을 시작하였다. 이때 H_2O_2 의 초기농도는 1 mM이었다. 반응은 25 °C 항온교반기에서 150 rpm으로 교반하면서 2시간 동안 계속하였다. 반응 후 용액의 pH를 조정하고 금속이온 염을 첨가한 후 25 °C에서 150 rpm으로 10분간 교반하였다. 페놀물질의 침강을 측정하기 위해서 반응용액을 100 mL graduated cylinder에 옮긴 후 20 °C의 항온기에 교반하지 않고 방치하였다. 30분 경과 후 상부의 50 mL를 취하여 vortexing하여 침전물질을 균질하게 하였다. 곧 침전물질이 균질화된 용액을 취하여 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 페놀물질의 침강정도를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 반응용액의 pH 및 HRP의 사용량이 페놀제거에 미치는 영향

본 실험에서 사용한 HRP의 활성은 반응용액의 pH 변화에 크게 좌우되지 않는 것으로 알려져 있다[6]. 따라서 HRP는 비교적 넓은 범위의 pH에서 사용할 수 있다. 본 실험에서는 다음과 같이 용액의 pH 변화에 따른 페놀의 제거효율을 비교하였다. 페놀 1 mM, HRP 0.1 mg/mL 및 H_2O_2 1 mM이 혼합된 수용액 10 mL를 25 °C에서 2시간 동안 150 rpm에서 교반시켰다. 반응에 사용한 완충용액은 sodium acetate(pH 3, 5), sodium monophosphate(pH 7), sodium borate(pH 9, 10)였으며 각각 완충염의 농도는 100 mM이었다. H_2O_2 첨가 직후 반응용액에는 진한 갈색의 미세한 침전이 생성되었으며 시간이 지나갈수록 침전물이 보다 큰 입자로 응집되었다. 2시간 반응 후

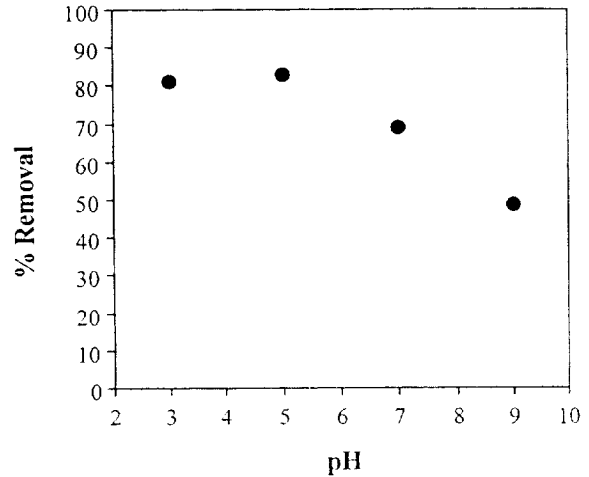


Fig. 1. Removal of phenol by HRP and H_2O_2 in aqueous solutions of different pH values.

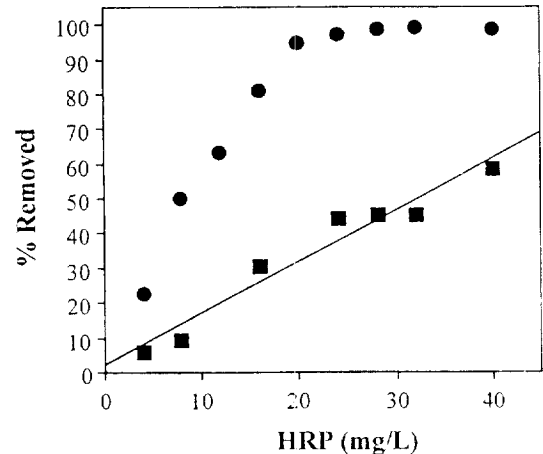


Fig. 2. Effects of the amount of HRP used on the removal of phenol. The initial concentration of phenol was 1 mM(●) or 5 mM(■). The straight line in the figure was obtained by a least square fit of the experimental data.

침전물은 원심분리(6000 rpm, 30분)에 의하여 제거되었으며 각 완충용액에서의 페놀의 제거효율은 Fig 1과 같았다. 산성용액인 pH 5에서 제거효율이 가장 높았고 용액의 pH가 9일 경우 페놀의 제거율이 급격히 감소하였다. 이는 효소의 활성이 pH 9 용액에서 저하되었기 때문인 것으로 추측되었다[6].

효소는 촉매로서 작용을 하므로 이론적으로는 반응에 의하여 소모되지 않고 단지 반응속도만을 증가시키는 역할을 한다. 그러나 실제로는 반응에 의하여 효소의 불활성화가 발생하며 Klibanov 등에 의한 실험에서와 같이 효소 한 분자당 약 10,000분자의 페놀이 제거됨을 보인다[1]. 본 연구에서도 이러한 현상을 관찰하기 위하여 HRP의 사용량을 변화시키면서 페놀침전효율을 측정하여 그 결과는 Fig. 2에 나타내었다. H_2O_2 의 초기농도는 각각의 페놀 초기농도와 같았다(1:1). 이는 페놀과 과산화수소의 소모된 몰비율이 이론상의 비율인 2:1이 아니고 약 1.5:1에 가까운 것을 보이기 때문이다[2, 3, 7]. 따라서 과산화수소의 초기농도를 페놀의 초기농도와 같게 함으로서 과산화수소의 부족현상에 의한 페놀침전 형성에의 영향을 없애고자 하였다. 수용액으로서는 HRP에 의한 페놀제거율이 가장 높은 100 mM sodium acetate(pH 5)를 사용하였다. 반응용액의 부피는 10 mL

었으며 HRP의 사용량은 4.40 mg/L 범위에서 변화시켰다. 반응은 25 °C에서 150 rpm으로 교반하면서 2시간 동안 계속한 후, 생성된 페놀침전물질을 원심분리에 의하여 제거하였다. 페놀 및 H₂O₂의 초기농도가 5 mM일 경우 사용한 HRP의 범위에서 페놀은 완전히 제거되지 않았으며 페놀의 제거율은 HRP의 사용량에 비례하였다. 따라서 이때의 비례상수로부터 효소 한 분자가 제거할 수 있는 페놀분자의 수가 3410으로 계산되었다(HRP의 분자량은 44,000[6]). 또한 페놀의 초기농도가 1 mM이고 HRP의 사용량이 20 mg/L 이하일 경우에도 페놀의 제거율이 HRP의 사용량에 비례하였으며 이때의 비례상수로부터 효소 한 분자당 약 2078분자의 페놀이 제거되는 것을 알 수 있었다. 즉 페놀의 초기농도가 높을수록 HRP의 페놀제거 효율이 증가하는 것을 나타내며 이는 페놀분자에 의해서 HRP의 불활성화가 지연되기 때문인 것으로 생각된다[6]. HRP의 환성은 H₂O₂ 농도가 높으면 저해되는 경향이 있다[8]. 따라서 페놀 초기농도가 5 mM일 경우 페놀의 제거효율이 60%로 낮은 원인은 HRP의 환성이 H₂O₂에 의하여 저해되었을 가능성이 있다. 그러나 H₂O₂를 1 mM씩 25분마다 5회 가한 실험을 행하였을 경우에도 페놀제거율은 증가하지 않았다. 따라서 페놀제거율이 낮은 원인은 H₂O₂의 초기농도가 높기 때문이 아닌 것을 알았다. 또한 반응시간을 2시간에서 5시간으로 증가시켰을 경우에도 페놀의 제거율은 증가하지 않았다. 이와 같은 결과를 종합하면 페놀과의 반응 중 HRP가 2시간 이내에 활성을 잃는 것으로 생각되었다. Ator 등의 실험에 의하면 HRP와 phenyl hydrazine과의 반응에 의해서 생성된 phenyl 라디칼이 HRP의 활성부위에 있는 heme과 반응하여 공유결합하며 동시에 HRP의 환성을 저해하는 것을 밝혔다[9, 10]. 따라서 페놀과의 반응에서도 반응에 의해서 생성된 페놀라디칼에 의해서 HRP의 환성이 저해되는 것으로 유추할 수 있다.

3.2. 금속이온이 페놀침전물의 침강속도에 미치는 영향

침전물을 수용액으로부터 제거하기 위하여 사용되고 있는 방법으로는 침강법, 원심분리법, 여과법 등이 있다. 이들 방법 중 원심분리법은 폐수처리와 같이 대량의 수용액을 처리해야 하는 대규모 공정에는 사용하기 어렵다. 따라서 실제의 폐수처리 공정에서는 침강법 및 여과법이 주로 사용될 것이다. 이 두 가지 방법 중 침강법은 간단하며 여과법의 전 단계로서 사용되면 여과공정의 효율을 향상시킬 수 있다.

본 연구에서는 HRP에 의하여 생성된 페놀침전물의 침강 효율을

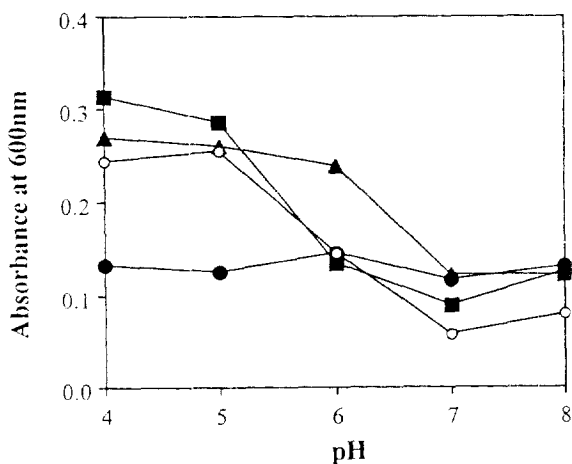


Fig. 3. Effects of metal ions on the sedimentation of phenolic precipitates in aqueous solutions of different pH values. Metals ions are Al³⁺(○), Fe²⁺(■), Fe³⁺(▲), and Cu²⁺(●).

증가시키기 위하여 금속이온인 Al³⁺(Al₂(SO₄)₃·xH₂O), Fe²⁺(Fe₂(SO₄)₃), Fe³⁺(FeSO₄·7H₂O) 및 Cu²⁺(CuSO₄·H₂O) 등의 사용에 대하여 실험하였다. 효소반응 용액의 부피는 100 mL로 증가시켰으며 페놀의 최적 세기 반응조건인 pH 5 용액에서 페놀 및 H₂O₂의 초기농도를 각각 1 mM(약 94 ppm)로 HRP의 농도는 40 µg/mL로 하였다. 효소반응 후 반응용액의 수소이온농도를 HCl 및 NaOH용액을 이용하여 pH 4-8까지 변화시키면서 각 금속이온의 농도가 0.066 mM일 경우 침강 정도를 측정하였다. 침강정도는 금속이온을 반응용액에 가한 후 100 mL graduated cylinder에 옮기고 나서 20 °C 항온조에서 30분간 방치한 후 상부용액 50 mL를 취하여 교반에 의해서 침전물을 균질화 한 후 이 시료의 600 nm에서의 흡광도를 측정하여 나타내었다. Fig. 3에서와 같이 각각의 금속이온에 의한 침강효과가 pH 7 용액에서 가장 우수하였다.

다음에는 각각의 금속이온의 첨가량이 페놀침전물의 침강효율에 미치는 영향을 조사하기 위하여 각 금속이온의 농도를 0.0033-0.33 mM의 범위에서 변화시키면서 침강정도를 측정하여 Fig. 4에 나타냈으며 각 이온의 경우 침강을 위한 최적농도 및 침강효율을 Table 1에 나타냈다. 효소반응 직후 균질화된 페놀침전물의 600 nm에서의 흡광도는 0.634였으며 금속이온을 첨가하지 않고 30분간 방치한 후의 흡광도는 0.327로서 48.4% 감소하였다. 그러나 금속이온을 첨가할 경우에는 흡광도가 0.327 이하로 줄어들어서 침강효율이 증가하였다. Al³⁺ 이온의 경우, 첨가한 이온의 농도가 0.017 mM일 때 흡광도가 최소값인 0.171로서 초기흡광도의 약 73%가 감소한 후, 이온

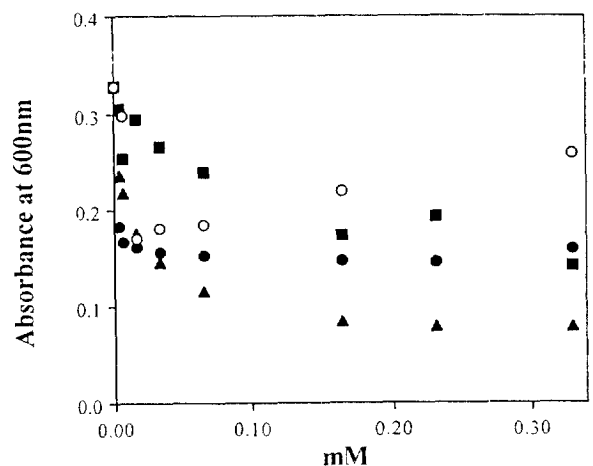


Fig. 4. Effects of the metal ion concentrations on the sedimentation of phenolic precipitates. Metals ions are Al³⁺(○), Fe²⁺(■), Fe³⁺(▲), and Cu²⁺(●). Data are the averages of triplicated measurements.

Table 1. Optimum concentrations of metal ions and corresponding sedimentation efficiencies of phenolic precipitates

Ions	Concentrations (mM)	Absorbance at 600nm	% Decrease of absorbance*
None		0.327	48.4
Al ³⁺	0.017	0.171	73.0
Fe ²⁺	0.33	0.142	77.6
Fe ³⁺	0.33	0.079	87.5
Cu ²⁺	0.23	0.148	76.7

*: % Decrease of absorbance was determined based on the initial absorbance of the homogenized solution containing phenolic precipitates. Absorbance of the samples prepared as described in the text was measured after 30 minutes of standing still at 20 °C.

의 농도를 더욱 증가시킬 경우에는 흡광도가 다시 증가함으로서 오히려 침강효율이 낮아졌다. 따라서 Al^{3+} 이온은 폐놀침전물의 침강을 위하여 적절하지 않음을 알 수 있었다. Fe^{3+} 이온의 경우에는 이온농도가 증가함에 따라서 흡광도가 서서히 감소하였으며 이온농도가 0.33 mM일 때 흡광도가 0.142로서 초기흡광도의 약 77.6%가 감소하였다. Fe^{3+} 이온의 경우에는 이온의 농도가 0.1 mM로 증가할 때까지 흡광도가 급격히 감소하다가 이온의 농도가 더욱 증가하면 흡광도가 서서히 감소하였으며 이온의 농도가 0.33 mM일 때 흡광도가 0.079로서 초기 흡광도의 87.5%가 감소하였다. Cu^{2+} 이온의 경우, 이온의 농도가 매우 낮은 0.0066 mM로 증가할 때까지 흡광도가 급격히 감소한 후 이온의 농도가 더욱 증가하더라도 흡광도는 거의 일정하였다. 흡광도의 최저값은 Cu^{2+} 이온의 농도가 0.23 mM일 때 0.148로서 초기 흡광도의 76.7%가 감소하였다. 폐놀침전물의 침강효율을 증가시키기 위해서는 낮은 농도에서도 침강효율이 우수한 침강제가 바람직하다. 따라서 HRP에 의해서 생성된 폐놀침전물의 침강을 위해서는 Fe^{3+} 및 Cu^{2+} 이온이 가장 적절할 것으로 생각되며 각 이온의 바람직한 사용농도는 각각 0.1 mM과 0.0066 mM 이상이였다. 특히 Cu^{2+} 이온의 경우에는 극히 소량을 첨가하더라도 침강효율이 우수하였다.

4. 결 론

본 연구결과 수용액에 함유되어 있는 폐놀은 HRP와 H_2O_2 에 의해서 침전물로 변화하며 원심분리 등의 방법을 이용하여 효과적으로 제거될 수 있었다. 이러한 폐놀제거율은 pH 5의 수용액에서 가장 높았다. 효소반응에 의해서 생성된 폐놀침전물을 포함하고 있는 pH 7 수용액에 Al^{3+} , Fe^{3+} , Fe^{2+} , Cu^{2+} 과 같은 금속이온을 첨가하면 침강효

율이 증가하였으며 특히 Fe^{3+} 이온의 경우 침강효율이 가장 우수하였다.

감 사

본 연구는 "95년도 울산대학교 교내연구비"에 의하여 지원되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Klibanov, A. M., Tu, T. M. and Scott, K. P.: *Science*, **221**, 259(1983).
2. Al-Kassim, L. and Taylor, K. E.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **61**, 179(1994).
3. Nicell, J. A.: *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **61**, 331(1994).
4. Al-Kassim, L., Taylor, K. E., Bewtra, J. K. and Biswas, N.: *Enzyme Microb. Technol.*, **16**, 120(1994).
5. 김영미, 한달호, 정연호, 이상영, 이해익: 한국물공학회지, **10**, 335 (1995).
6. Saunders, B. C., Holmes-Siedle, A. G. and Stark, B. P.: "Peroxidase", Butterworths, London(1964).
7. Rao, A. M., John, V. T., Gonzalez, R. D., Akkara, J. A. and Kaplan, D. L.: *Biotechnol. Bioeng.*, **41**, 531(1993).
8. Ryu, K. and Dordick, J. S.: *Biochemistry*, **31**, 2588(1992).
9. Ator, M. A. and Ortiz de Montellano, P. R.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 1542(1987).
10. Ator, M. A., David, S. K. and Ortiz de Montellano, P. R.: *J. Biol. Chem.*, **262**, 14954(1987).