

Heme과 Hemoglobin을 이용한 Pentachlorophenol 오염토양 정화

강구영 · 정남현*

한국의국어대학교 자연과학대학 환경생명공학부 환경학과, kanggy@hufs.ac.kr

* 고려대학교 생명환경과학대학 생명유전공학부, nchung@korea.ac.kr

요 약 문

워싱턴주 벤쿠버시 Bonneville 전력소 전주 보관 지역내 PCP와 creosote 오염토양 2g 당 0.020g heme에 0.108g H₂O₂을 혼합한 산화방법과 0.035g hemoglobin에 0.324g H₂O₂을 혼합한 산화방법을 비교·조사하였다. 오염토양에 ¹⁴C-PCP를 첨가한 다음에 ¹⁴C의 물질수지를 조사한 결과, 24시간동안 반응 후 ¹⁴CO₂는 heme 과 hemoglobin반응에서는 각각 3.50%와 3.88% 생산되었다. ¹⁴C 물질수지 분포는 heme 촉매 산화반응에서 용매 상에 43.01% 토양 상에는 46.03%이고, hemoglobin 촉매 산화반응에서는 용매 상에 39.21%와 토양 상에 51.25%로 비슷한 분포를 보였다. 실험실 규모 pan 실험에서 초기 PCP농도 273±20 mg/kg과 TPH 6379±45 mg/kg인 오염토양에서 hemoglobin 촉매 산화반응이 초기반응을 제외하고 7일 이후 반응에서 heme 촉매 산화반응보다 빠르게 분해되었고, 35일 반응 이후 PCP는 10 mg/kg 이하의 값을 나타내었고, TPH도 유사한 결과를 보여 주었다. 그러므로 건조 hemoglobin과 과산화수소에 의한 PCP 오염토양 복원기술은 분해율이 높고 경제성을 가지고 있으므로 기존의 복원공정들의 대안으로 제시될 수 있다.

Key word: heme, hemoglobin, 과산화수소, PCP 오염토양, 복원기술

1. 서 론

펜타클로로페놀 (pentachlorophenol: 이하 PCP)은 고농도 염소결합 화합물인 난분해성 물질로 동·식물류, 어류, 미생물 및 인체 등에 축적되는 독성물질이다¹⁾. 특히 PCP는 제초제, 살균제, 목재보존제로 전 세계적으로 광범위하게 사용되어 왔다. 미국의 경우 총 PCP 사용량 중 80% 이상이 목재 보존제로 사용되어 각종 산업 목재류 보관지역 내 토양은 물론 지하수가 오염되었고, PCP의 발암성 및 독성으로 인하여 미국 환경청에서는 특정오염물질로 분류하고 유해성 폐기물로 지정하고 있다^{2,3,4)}.

미국 워싱턴주 벤쿠버시에 있는 Bonneville 전력소 내의 전주 보관지역에서 PCP 유출사고와 지표토양을 조사한 결과 지표토양은 creosote와 PCP가 오염되어 오염토양 복원이 요구되고 있다.

Chen et. al⁵⁾은 PCP 오염토양을 heme과 과산화수소에 의한 촉매산화반응으로 13%의 PCP가 광물화 되고 8시간 촉매반응 이후에는 80% 이상의 PCP가 분해가 되고 있음을 발견하였다. 강구영 et al.⁶⁾은 heme과 과산화수소의 촉매반응기작이 헤모글로빈과 과산화수소의 촉매반응기작과 유사함을 5-aminosalicylic acid의 산화물 생성변화를 조사하여 간접적으로 제시하였다. 하지만 heme은 hemoglobin에서 고도 정제된 porphyrin 구조내 3

가 철이 포함된 순수한 물질로 고가이므로 오염토양 정화에 사용하는데 경제적인 문제점이 있다.

본 연구에서는 고가의 heme과 생산가격이 저렴한 건조 헤모글로빈을 촉매제와 과산화수소 산화제로 사용하여 creosote와 PCP로 오염된 토양 정화에 대한 연구로서 1) 방사선 동위원소 ^{14}C -PCP를 사용하여 PCP 광물화와 잔류 PCP 분포를 조사하고, 2) 오염 토양 내의 PCP와 석유계총탄화수소 (TPH)의 분해능을 조사하였다.

2. 실험방법 및 재료

2.1 시약류

촉매제로 heme은 특급 hemin (Sigma Chemical Co., Mo., USA)에서 미량의 0.05N NaOH에 용해 후 50mM phosphate buffer (pH=7.0)에 용해하여 사용한다^{5,6)}. 건조 분말형 hemoglobin (American Laboratories Inc., Neb., USA)에서 기증 받아 사용하였다. 산화제로 30% 과산화수소 (Sigma Chemical Co.)를 희석시켜 사용하였다.

2.2 Creosote와 PCP가 오염된 토양의 특성

Table 1. Characteristics of the contaminated Pole yard soil.

Characteristics		Unit	Pole yard soil
PCP		mg/kg	273±20
TPH		mg/kg	6,379±45
pH			5.2
Organic carbon		%	2.85
Cl		meq/l	0.85
Particle size distribution	Sand	%	23
	Silt	%	60
	Clay	%	17
Texture			Silty loam

Bonneville 전력소 전주 보관지역 내에서 제거 보관된 토양은 creosote와 PCP로 오염되었고 오염토양 특성은 Table 1과 같다.

2.3 PCP 광물화 및 잔류 PCP 분포조사

PCP 오염토양을 대기 상태에서 건조시킨 후 2 mm 체로 걸른 시료토양 2 g을 50 mL Kimex teflon 뚜껑으로 막을 수 있는 유리병 속에 넣고, 아세톤에 용해시킨 ^{14}C -PCP 10 μl 첨가하고 대기 건조하였다. 촉매제로 50 mM phosphate buffer (pH 7.0)에 용해된 heme 과 hemoglobin을 각각 0.02과 0.035g을 투입한 뒤 과산화수소를 각각 0.108g과

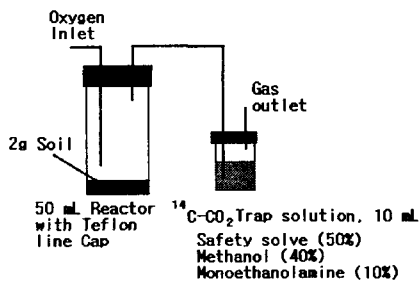


Fig. 1. Reactor design for the collection of $^{14}\text{CO}_2$ from ^{14}C -PCP spiked soil⁵⁾.

0.324g 첨가 즉시 Fig. 1과 같이 설치하고 24시간 동안 ^{14}C -CO₂를 포집·분석하였다⁵⁾. ^{14}C -CO₂는 24시간 동안 ^{14}C -CO₂ 포집용액에서 주기적으로 수집하여 liquid scintillation counter (Beckman LS 6000SE, Fullerton, CA)에서 측정하였다. 그리고 24시간 반응 후 용매 (아세톤:헥산=1:1)로 토양에 잔류된 오염물질을 추출하여, 잔류토양, 추출용매 및 누적 ^{14}C -CO₂에서의 물질수지 분포를 조사하였다. PCP 오염토양 2g 내 첨가한 초기 ^{14}C -PCP의 활성도는 약 2×10^7

disintegrations per minute (dpm) 이었다.

2.4 Pan study

Pan study는 3개의 3ℓ 스테인레스 원형 pan에 상기한 방법으로 준비된 PCP 오염토양 500g을 각각 넣고 Table 2와 같은 조건의 촉매제와 산화제를 첨가한 뒤 균일하게

Table 2. Operation conditions for the pan study

Pan 번호	실험명	촉매제	2g 건조 토양당 촉매제 첨가량 (g)	2g 건조 토양당 산화제 첨가량 (g)	수분 함량 (%)
1	Control	증류수	1.000	0.000	50
2	Heme 과 H ₂ O ₂	Heme	0.020	0.108	50
3	Hemoglobin 과 H ₂ O ₂	Hemoglobin	0.035	0.324	50

혼합하고, 수분 증발을 방지하기 위하여 미세기공이 있는 플라스틱 막으로 스테인레스 입구를 막은 뒤 암실에서 42일 동안 실험하였다. 시료채취는 주기적으로 약 6g을 취한 뒤 3개의 Soxhlet 추출장치에 각각 2g 시료토양을 넣고 24시간 추출한 뒤 gas chromatograph로 PCP 농도를 측정하였고, 스테인레스 pan내 토양 수분함량을 증류수를 첨가하여 50%로 유지시켰다.

또한 Pan 실험 기간 중 14일과 42일에 채취된 시료에서는 PCP와 THP를 분석하였다.

2.5 분석방법

PCP 광물화 실험에서 발생한 ¹⁴C₂는 ethanolamine-methanol-safety 포집용액에 포집하여 LSC로 ¹⁴C₂ 발생량을 측정하였다. 반응시간 24시간에 ¹⁴C-PCP시료 2g에 1 ml catalase를 첨가하여 시료 내 잔류중인 과산화수소를 제거하여 촉매반응을 중단시키고 U.S EPA Method 3540A 방법에 따라 Soxhlet 추출장치로 24시간동안 추출하였다. 추출 용매 2ml를 15ml Ready Gel에 넣은 뒤 LSC로 추출된 용매 소기 ¹⁴C를 분석하였다. 마지막으로 Soxhlet 추출 후 잔류토양을 대기에서 건조시킨 뒤 1g 건조토양을 Harvey Biological Oxidizer OX600 (Harvey, Hillsdale, NJ)에서 발생한 연소가스를 50% Ready Gel, 40% methanol 및 10% methanolamine 혼합용액 속에 포집한 뒤 LSC로 토양 내 잔류 ¹⁴C를 분석하였다. 그러므로 ¹⁴C-PCP를 첨가한 PCP 오염토양 내 촉매반응 후 공기,

용매 및 토양 내 ¹⁴C를 분석하여 물질수지 분포율을 조사하였다. Pan study에서 채취한 시료를 U.S EPA Method 3540 A와 U.S. EPA

Table 3. Operation conditions for gas chromatograph.

Operation condition	Compound	
	PCP	TPH
Gas chromatograph	HP 5880 A	Shimadzu 14A
Detector	ECD	FID
Column	30m DB5.625 fused silica capillary column	25cm Supelco C18
Temperature Program	initial 100°C for 1min, 10°C/min for 21.4min	254°C
Gas flow	2ml/min	1.5ml/min

Method 3650 산/염 세척 후 PCP를 GC/ECD로 분석하였다. Pan study에서 14일과 42일 반응 후 채취한 시료는 추출 후 methylene chloride층 시료 10ml를 무수황산나트륨 컬럼을 통과하여 불순물과 잔류 수분을 제거한 뒤 GC/FID로 TPH를 분석하였다. GC 분석조건은 Table 3과 같다.

3. 결론

Fig. 2는 방사선 동위원소인 ^{14}C -PCP를 PCP와 creosote로 오염된 전지보관지역 토양에 균일하게 혼합한 후 heme과 hemoglobin 촉매제와 과산화수소를 첨가한 뒤 24시간 동안 누적된 $^{14}\text{CO}_2$ 의 발생 양을 보여준다. 6시간 동안 $^{14}\text{CO}_2$ 의 발생이 급격히 일어나다가 이후에는 더 이상 발생하지 않았다. 이는 촉매반응에서 산화제로 첨가한 과산화수소의 소진되어 반응이 중단되었기 때문일 것이다⁵⁾. 촉매반응 24시간에서 ^{14}C 의 분포를 조사한 물질수지는 heme과 hemoglobin 첨가시 $^{14}\text{CO}_2$ 의 생산량은 각각 3.5%와 3.88%이고, 용매 상에는 각각 43%와 39%이고, 토양 상에는 각각 46%와 51%이다.

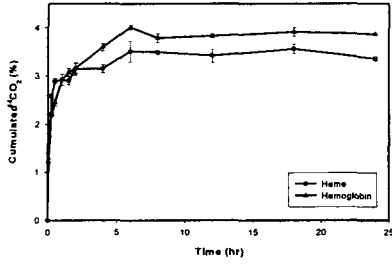


Fig. 2. Cumulated $^{14}\text{CO}_2$ vs. time.

PCP 오염토양에 대한 pan 연구는 on-situ 복원기술에 적용할 실험실 규모의 실험으로 스테인레스 pan내 500g 건조토양을 넣고 대조구, heme 촉매제, hemoglobin 촉매제를 각각 균일 혼합 후 대조구를 제외한 pan내 최적 과산화수소를 첨가한 뒤 토양내 잔류 PCP와 TPH를 조사하였다. 오염토양내 PCP 분해율은 초기반응 기간동안 heme에 의한 분해가 hemoglobin에 의한 분해보다 약간 상회하고 있고, 토양내 pH는 대조구를 제외하고 모두 4.2이하로 감소되었다. Pan 실험에서 7일 반응 후 수분함량을 phosphate buffer (pH 7.0) 용액으로 50%로 조절한 후, hemoglobin 사용 시 PCP의 분해속도가 증가되었다. 7일 이후 토양내 hemoglobin과 과산화수소와 촉매반응시 분리된 globin이 미생물의 활성도를 증가시키기 때문인 것으로 사려된다 (Fig. 3). 반응 35일 이후 heme과 hemoglobin에 의한 오염토양 내 잔류 PCP는 10mg/kg soil 이하였다.

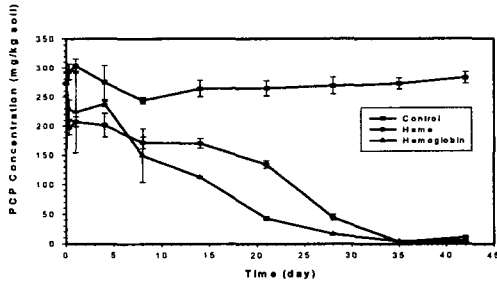


Fig. 3. PCP degradation of the pole yard soil which was run under the optimal dose heme.

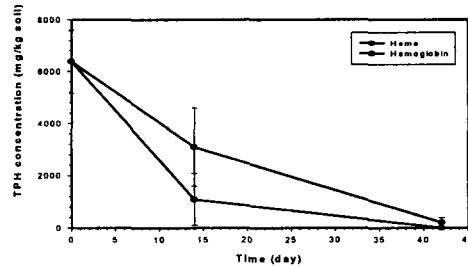


Fig. 4. Results of the TPH degradation on the pole yard soil.

본 실험에서 사용된 오염토양은 PCP와 creosote가 혼합된 토양인데, 반응일 14일과 42일의 토양에서 잔류 토양의 TPH도 hemoglobin 촉매제 사용 시 heme 촉매제 사용보다 빠르게 분해가 되고 있다 (Fig. 4). Heme은 kg당 \$1,000-\$3,000이나 hemoglobin은 \$25의 싼 가격에 구입할 수 있다. 따라서 hemoglobin을 촉매제로 사용시 PCP와 TPH로 오염된 토양을 신속하고 경제성있게 복원하는 기술을 구축할 수 있을 것으로 사료된다.

4. 참고문헌

1. Rao, R.K., "Pentachlorophenol, chemistry, pharmacology and environmental toxicology", Plenum Press, 402p (1978).
2. Fenster, D.E., "Hazardous waste laws, regulations, and taxes for the U.S. petroleum refining industry", PennWell Publishing Co., 215p (1990).
3. Keith, L.H. and W.A. Telliard, "Priority pollutants: A perspective view", Environmental Science and Technology, 13, pp 416-423 (1979).
4. Bauchinger, M., J. Dresp, E. Schmid, and R. Hauf, "Chromosome changes in lymphocytes after occupational exposure to pentachlorophenol (PCP)", Mutation Research, 102, pp 83-88 (1982).
5. Chen, S. D.K. Stevens, and G. Kang, "Pentachlorophenol and crystal violet degradation in water and soils using heme and hydrogen peroxide", Water Research, 33(17), pp 3657-3665 (1999).
6. Kang, G., J. Jung, K. Park, and D.K. Stevens, "Mineralization of hazardous chemicals by heme reaction", Emerging Technologies in Hazardous Waste Management 7, Edited by Tedder and Pohland, Plenum Press, pp 69-77 (1997)