한국환경위생학회지, 제23권 제4호 (1997)
Kor. J. Env. Hlth. Soc., Vol. 23, No. 4, pp 121~126 (1997)

미나리 Peroxidase를 이용한 Phenol제거에 관한 연구

탁창준 · 최한영 · 신정식 · 나규환 · 이장훈*
연세대학교 환경학과, *호서대학교 환경공학과

A Study of Removal of Phenol by Peroxidase Extracted from *Oenanthe javanica* (Blume) DC

C. J. Tak, H. Y. Choi, J. S. Shin, K. H. Ra and J. H. Lee*
Dept. of Environmental Science, Yonsei University
**Dept. of Environ. Eng., Hoseo University*

ABSTRACT

Peroxidase as one of the organic enzyme catalyst is useful for the oxidation treatment of various aromatic compounds such as phenols. The peroxidase content of *Oenanthe javanica* was 24.85 unit/g-fw in leaf, 5.74 unit/g-fw in stem, and 34.69 unit/g-fw in root respectively. The crude peroxidase extracted from *Oenanthe javanica* can be kept under low temperature (-70℃) condition for 6 months with the maximum 1% activity reduction. The optimum conditions of removal for 100 ppm phenol was pH 6, hydrogen peroxide 3.5 mM, peroxidase activity 8 unit/m*l*, temperature 20℃ respectively. In the wide range of concentration from 50 ppm to 750 ppm phenol reveals average 54% removal rate under the same peroxidase activity (8 unit/m*l*) and different amount of hydrogen peroxide proportional to phenol concentration. Especially at the concentration of 100 ppm the maximum phenol removal rate was 72%.

Keywords : *Oenanthe javanica*, Phenol, Peroxidase, Cadmium

I. 서 론

페놀류는 resin, plastic, 석유정제, 섬유산업, 염료, 도로포장이나 철강 및 광산 관련산업의 폐수 중에 함유하는 물질로서 모두 독성을 나타낸다.[1] 페놀은 2 mg/*l* 이상의 농도에서 물고기에 치명적이며 독성기준치 이하에서도 생선비린내 같은 냄새를 내며 BOD치가 높아 수중생물에 필요한 산소를 소비한다. 페놀류의 제거방법은 추출, 활성탄흡착법, 증류, 생화학적산화 및 전기 화학적 방법 등이 이용되었으나 높은 경비와 위해한 부산물의 발생 및 낮은 효율 등의 단점을 갖고 있다. 이에 대해 생물질인 식물체를 이용한 수처리는 흥미 있고 효과적인 처리법이라고 여겨진다.[2,3] 실제로 부레옥잠 등의 수생식물을 이용한 오염물질제거방법에 대해서는 이미 많은 연구가 되어왔다. 특히 고도처리 과정에서 호소의 부영양화 성분인 영양염류(N, P)제거에 적합하다는 연구결과가 보고된 바 있다.[4] 이와 같은 배경에서 식물체내에 존재하는 peroxidase를 粗酵素液의 상태로 간단하게 추출하여 H_2O_2에 의한 방향족 화합물의 산화처리에 유기성 효소촉매로서 이용 가능하다는 사실에 근거하여 미나리를 대상물질로 하여 그 가능성을 조사하였다.[5-7] 저자 등은 peroxidase의 효율성 면에서 미나리의 각 부위별 함량을 측정하여 부레옥잠, pak-bung, horseradish 등 수생식물과 비교하였다. 또한 추출된 조효소액의 보존성과 phenol제거를 위한 최적의 반응조건을 조사하였다.

II. 실험방법

1. 재료

실험에 사용한 미나리는 1994년 8월 1일부터 11월 10일 사이 강원도 원주시 미나리 재배단지에서 구입하여 인공재배지(3×2 m)에 상시 재배하면서

실험시에 분취하여 사용하였으며 부레옥잠은 시중 수족관에서 판매하는 것을 구입하였다.

2. Peroxidase 粗酵素液의 추출

미나리를 수돗물로 깨끗이 씻은 후 다시 증류수로 씻은 다음 부위별로 5 cm길이로 자르고 냉실에서 homogenize하였다. 다시 25000 rpm로 4℃에서 10분간 원심 분리한 후 상등액을 peroxidase(POD) 조효소액으로 하였다.[8]

3. POD 조효소액의 활성도 측정

조효소추출액을 0.01 M phosphate buffer(pH 6.0)로 일정한 비율로 희석한 후 o-aminophenol을 반응의 수소공여체로 한 Yamada법에 준하여 활성도를 측정하였다.[8] 0.2 M phosphate buffer(pH 7.0) 2 m*l*, 0.01 M o-aminophenol · HCl 1 m*l*, 0.004 M H_2O2 1 m*l*를 각각 가하고 25℃에서 5분간 반응한 후 조효소액 0.5 m*l*를 첨가한 다음 다시 25℃에서 3분간 반응하고 1 N HCl을 첨가하여 반응을 정치시킨 다음 1 cm 층장셀로 480 nm에서 흡광도를 측정하였으며 POD 활성도(units/m*l*)는 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{units/m}l = OD_{480} \times 0.48 \times DF$$

OD_{480} : (absorbance of the sample) − (absorbance of the blank)

0.48 : molecular extinction coefficient at 480 nm

DF : dilution factors of the enzyme solution

4. 조효소액의 온도에 따른 안정성

희석 조제하여 1 m*l*당 효소활성이 확인된 조효소액을 15개의 effendorf tube에 1 m*l*씩 분취한 후 4℃와 -70℃로 각각 보관하면서 6개월간 2개월 간격으로 효소활성도를 측정하였다.

5. 조효소액의 페놀제거

페놀농도는 50~750 mg/*l*에 POD 조효소 추출액을 2~12 unit/m*l*가 되도록 첨가한 후 반응액의 pH가 최적조건이 되도록 0.1 N HCl로 조정하였다. 여기에 30% H_2O_2를 2.5 mM~3.5 mM범위로 희석한 다음 각 반응계를 20℃ 항온조에서 5~24시간 반응시켜 페놀의 제거 실험을 하였다. 이때 잔류페놀농도를 측정시 상등액이 혼탁하면 4000 rpm으로 10분간 원심 분리하여 상등액을 취하였다. 페놀의 농도는 상등액 5 m*l*를 증류수로 100 m*l*로 희석한 후 미국 Standard method[9] 및 공정시험법(수질편)에 준하여 4-aminoantipyrine법으로 측정하였다.[10]

Table 1. Composition of synthetic nutrient solution

Ingredient	Concentration (mg/*l*)
KNO_3	41.48
$NaNO_3$	25.80
KH_2PO_4	5.63
Na_2HPO_4	2.53
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	1.33
$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	1.60
$HOOC(CHOH)_4COOH$	1.20
$FeCl_3 \cdot 6H_2O$	0.24
H_3BO_3	0.21
$NaMoO_4 \cdot 2H_2O$	0.19

6. Cd이 활성도 및 페놀제거에 미치는 영향

$CdCl_2$ stock solution을 사용하여 Cd으로서 0.1 ppm, 0.5 ppm, 1.0 ppm 및 5.0 ppm의 농도로 조제한 후 Table 1과 같은 인공배양액으로 NO_3-N이 30 ppm이 되도록 첨가하였다. 여기에 미나리를 각각 7.0 kg/m^2씩 수경 재배하였다. 이 때 각 농도별로 잎 1 g씩을 취해 초기효소활성을 측정하고 1일, 2일, 3일 및 4일 후에 동일방법으로 활성을 측정하였다. 미나리생체중에 함유된 Cd에 의한 조효소추출액의 페놀제거 영향을 알기 위해 H_2O_2 3.5 mM, 페놀 100 ppm, POD 활성도 8 unit/m*l* 및 20℃의 조건에서 미나리생체의 Cd 흡수정도를 기준으로 하여 Cd 농도를 5 ppm, 10 ppm, 30 ppm, 50 ppm 및 70 ppm으로 조정하였다. 이를 5시간과 24시간 후 제거율을 측정하여 Cd이 함유되지 않은 배양액에서 성장한 미나리 조효소 추출액에 의한 페놀제거율과 비교하였다.

III. 결과 및 고찰

1. 미나리의 peroxidase 함량

단위생체 무게당 POD의 활성이 높은 것이 유용하므로 수처리에 많이 이용되며 연구되어 온 부레옥잠과 pak-bung 및 horseradish와 상호 비교하였다.

Table 2에서 보는 바와 같이 각 식물의 잎의 효소활성은 미나리는 pak-bung의 경우와 비슷하였으나 부레옥잠은 10배정도 낮았다. 미나리와 부레옥잠의

Table 2. Peroxidase content of *Oenanthe javanica*, Pak-bung (*Ipomoea aquatica*), and Water hyacinth (unit/g-fw)

Part of body	*Oenanthe javanica*	Waterhyacinth	Chinese pak-bung	Thai pak-bung	Horseradish
leaf	24.85±0.41	2.67±0.10	26.9	19.0	33.11
stem	5.74±0.59	2.17±0.19	28.1	19.0	-
root	34.69±6.10	11.04±0.41	41.6	37.0	-

줄기부분의 효소활성은 pak-bung의 경우보다 약 5배 및 10배 이상 낮았다. 이는 두 식물의 줄기 부분에 수분함량이 많은 때문으로 사료된다. 뿌리의 경우는 부레옥잠이 제일 낮게 나타났다. 잎과 줄기부분보다 뿌리부분의 POD 활성도가 높았으며 pak-bung의 경우는 생체 g당 효소활성은 비교적 높았으나 일부지역에 자생하는 식물로서 우리나라의 여건상 다량재배가 실질적으로 어려울 것으로 생각된다. 미나리의 경우 여러 조건에서 다른 식물과 비교할 때 비교적 높은 활성을 나타냈으며 오수에서의 강한 생존력과 환경적응 등을 고려할 때 적합한 식물로 사료된다.

2. POD 조효소액의 온도에 따른 안정성

저온하에서의 POD 조효소액의 보존안정성은 Fig. 1에서 보는 바와 같다.

초기 활성도를 17.42 unit/m*l*로 하여 2개월 간격으로 6개월간 각각 3회에 실시하였다. 4℃에서의 조효소액은 시간이 경과함에 따라 활성도가 감소되어 안정성이 저하되었으나 -70℃의 낮은 온도에서는 6개월이 경과된 후에도 활성이 거의 완전한 상태이었다. 그러나 실용적인 면에서 볼 때 -70℃보다 높은 온도에서의 보존 안정성도 검토하고져 한다.

3. 미나리 및 부레옥잠의 POD 조효소액의 페놀 제거능

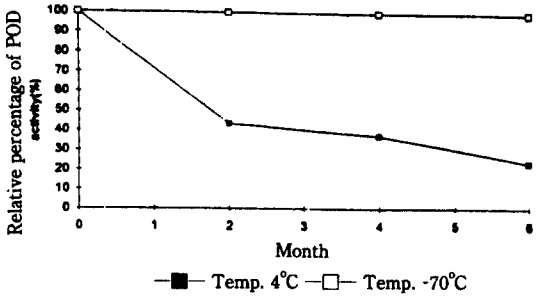

Fig. 1. Changes of peroxidase activity in cold storage condition.

phenol 100 ppm, H_2O_2 2.5 mM, pH 3.5 POD 활성도 3.5 unit/m*l* 및 온도 20℃의 조건하에서의 phenol제거능은 Fig. 2에서 보는 바와 같다. 미나리는 5시간 경과 후 약 38%로 제거율이 올라갔으며 시간이 경과하여 24시간 후에도 거의 유사한 경향성을 나타내어 부레옥잠 및 horseradish보다 높은 제거율을 나타내었으나 반응조건을 최적으로 할 경우 더욱 제거율이 높을 것으로 사료된다.

미나리에 비해 부레옥잠은 단위생체 g당 POD 활성은 함량이 낮으며 같은 조건에서의 phenol제거율도 떨어지는 것을 알 수 있다. 또한 문헌상의 보고에 의하면 동일한 조건에서 horseradish의 POD를 이용할 때 5시간 경과시 10% 정도로 낮은 제거율을 나타냈으나 24시간 경과 후는 약 35%로 미나리와 유사하였다.[6-8] pak-bung은 pH 5, POD 3.5 unit/m*l*의 조건에서 제거율이 5시간 경과후 약 89%로 상당히 높은 것으로 보고 되었다.[11]

4. POD 반응에 대한 각 영향인자의 조건[12]

1) 최적 pH조건; Fig. 3에서 보는 바와 같이 시간경과에 따라 전체적으로 제거율이 증가하나 pH 3.5~5범위에서는 평균 약 50%의 제거율을 나타내며 10시간 이후부터는 제거율이 낮아졌다가 다시 증가하는 경향을 나타냈다.

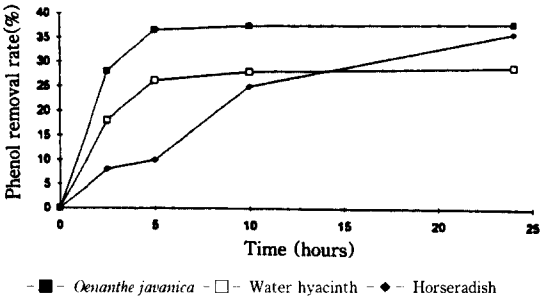

Fig. 2. Phenol removal with *Oenanthe javanica*, water hyacinth and horseradish peroxidase.
Reaction condition : phenol 100 ppm, H_2O_2 2.5 mM, pH 3.5, POD activity 3.5 unit/m*l*, Temp. 20℃

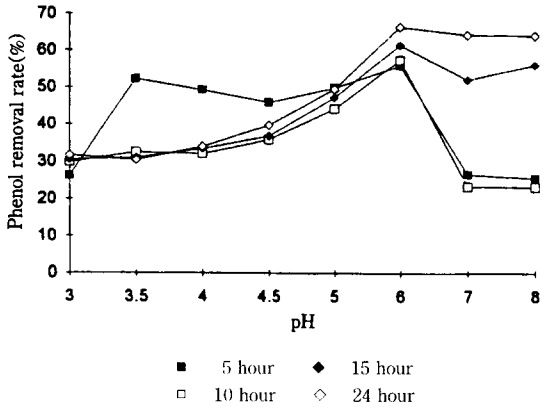

Fig. 3. Effect of pH on phenol removal rate.
Initial condition : phenol 100 ppm, H_2O_2 2.5 mM, POD 11 unit/m*l*, Temp. 20°C

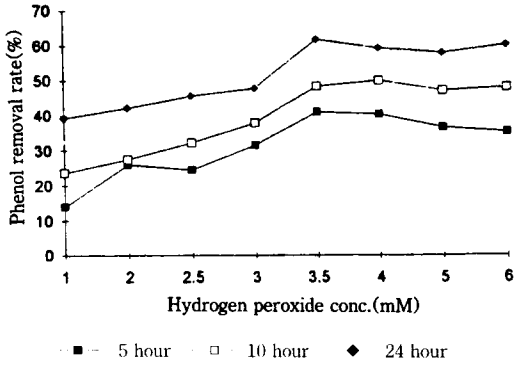

Fig. 4. Effect of H_2O_2 concentration on phenol removal rate.
Initial condition : phenol 100 ppm, POD 12.8 unit/m*l*, pH 6, Temp. 20°C

시간의 경과에 따른 제거율이 순차적이고 15시간 이후의 제거율이 가장 높은 pH 6이 적절한 조건이라고 사료된다. pak-bung과 horseradish에서 추출한 조효소액의 phenol제거시 최적 pH 5 및 3.5와 비교할 때 중성에 가까운 것으로 보아 좋은 조건이라고 생각된다. 또한 최초 pH와 24시간 반응 후의 pH변화는 Table 3에서 보는 바와 같이 다소 낮아지는 경향을 나타냈다.

2) H_2O_2 농도 조건; 무촉매 반응에서 기질의 농도와 반응속도는 1차 함수의 관계를 가지나 효소반응에서는 기질의 농도가 증가함에 따라 반응속도가 증가하다가 어느 한계에서 더 이상 증가하지 않고 포화상태를 나타낸다. Fig. 4의 조건하에서 기질인 H_2O_2 농도에 따른 phenol 제거율은 Fig. 4에서 보는 바와 같다. 효소반응의 경향을 확실히 나타내고 있으며 H_2O_2 농도가 필요 이상 높아지면 효소의 불활성화가 이루어지므로 제거율이 저하된다고 사료된다.

3) POD 농도 조건; phenol 100 ppm, H_2O_2 3.5 mM, pH 6 및 온도 20°C 조건하에서 POD 활성도에 따른 제거율은 Fig. 5에서 보는 바와 같다.

일반적인 효소반응의 특성과 같이 기질이 충분할 때 효소의 농도를 증가시키면 반응의 속도도 이에 따라 증가하였다. 그러나 효소농도를 더 이상 증가시키면 반응 속도의 증가율이 점차 둔화되다가 결국 최대 반응속도인 POD 8 unit/m*l*에서 포화되며 오히려 기질이 제한요소가 된다.

4) 반응온도조건; Fig. 6의 조건하에서 반응온도를 20~40°C로 하고 5시간 및 10시간 후의 제거율 경향성은 큰 차이는 없으나 점차 시간이 지나 24시

Table 3. Final pH after pH and H_2O_2 concentration dependent experiment for 24 hours

Initial pH	24 hours later pH	Initial H_2O_2 conc.	24 hours later pH
3	2.9±0.04	1	5.3±0.03
3.5	3.4±0.04	2	5.3±0.03
4	3.9±0.04	2.5	5.3±0.03
4.5	4.5±0.03	3	5.3±0.03
5	5.0±0.04	3.5	5.3±0.02
6	5.3±0.04	4	5.3±0.02
7	5.2±0.02	5	5.3±0.02
8	5.4±0.04	6	5.3±0.03

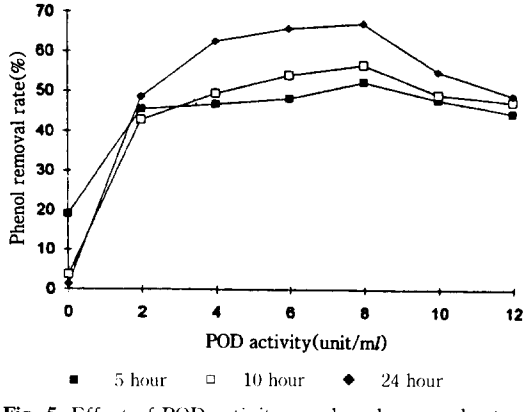

Fig. 5. Effect of POD activity on phenol removal rate.
Initial condition : phenol 100 ppm, H_2O_2 3.5 mM, pH 6, Temp. 20°C

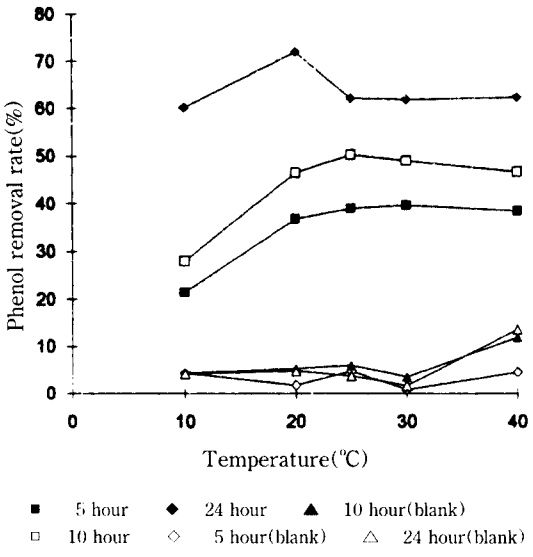

Fig. 6. Effect of temperature on phenol removal rate. Initial condition : phenol 100 ppm, H_2O_2 3.5 mM, pH 6, POD 8 unit/m*l*

간 경과 후는 20℃에서의 제거율이 약 72%로 높아지는 경향을 나타내었다. 대조군에서는 40℃에서 약간의 제거율을 나타냈으나 미미하였다.

5. phenol농도별 영향

효소반응의 최적 조건인 pH 6, POD 활성도 8 unit/m*l*, 반응온도 20℃로 한 후 phenol의 각종 농도에서의 제거경향을 기질인 H_2O_2 농도를 달리하면서 측정한 결과는 Table 4에서 보는 바와 같다. 각 농도별에서 POD를 첨가하지 않은 대조군에서는 24시간 경과후에도 5% 미만의 자연분해현상을 보였으나 본 실험에서는 전 농도범위에서 52% 이상의 제거율을 나타냈으며 특히 phenol 100 ppm에서는 72%의 높은 제거율을 나타내었다.

Table 4. Treatment results of phenol solution by *Oenanthe javanica* peroxidase

Initial phenol	Initial H_2O_2 conc. (ppm)	5 hours later removal (%)	24 hours later removal (%)
50	1.75	34.3±3.82	54.8±3.09
100	3.50	36.8±0.76	72.1±0.48
200	7.00	38.0±0.76	56.0±3.67
300	10.50	42.3±2.55	52.1±0.98
400	14.00	37.8±2.51	56.0±3.94
500	17.50	38.7±0.95	52.9±0.93
750	26.25	37.5±2.10	53.9±3.73

IV. 결 론

1. 미나리의 각 생체부위별 단위 g당 peroxidase 조효소 활성도를 측정한 결과 잎은 24.85 unit/m*l*, 줄기부분은 5.74 unit/m*l*, 뿌리부분은 34.69 unit/m*l*이었으며 부레옥잠은 뿌리부분이 11.04 unit/m*l* 이었으나 잎 및 줄기부분은 각각 2.67 unit/m*l* 및 2.17 unit/m*l*로 낮았다.

2. 추출 조효소액의 저온에서의 보존 안정성은 6개월이 지난 후 4℃에서는 효소활성이 76.5% 저하되었으나 -70℃에서는 0.79%의 활성도 저하를 나타내어 보존안정성이 우수하였다.

3. 미나리 POD 촉매반응에 대한 각 영향인자별 최적 조건은 pH 6, H_2O_2 3.5 mM, POD 활성도 8 unit/m*l* 및 반응온도 20℃이었다.

4. phenol을 50~750 ppm 범위로 하고 효소활성을 공통적으로 8 unit/m*l*, 기질인 H_2O_2 농도를 phenol 농도와 같은 배수로 했을 때 24시간 경과 후 전농도 범위에서 평균 54% 제거율을 나타냈으며 특히 phenol 농도 100 ppm에서 72%의 제거율로 가장 높았다.

참고문헌

1) Ren Der Yang and Arthur E. Humphrey : Dynamic and steady state studies of phenol biodegradation in pure and mixed cultures. Biotechnology and Bioengineering, 17, 1211-1235, 1975.
2) K. Jamil, P.V.R. Rao and M.I. Jamil : Studies on efficacy of *Eichhornia crassipes* (Mart) Solms in removing heavy metal from aquatic medium and their effects on the plant tissues. Aquatic Plants for Water Treatment and Recovery, 1987.
3) Barbara N. Alberti and Alexander M. Klibanov : Enzymatic removal of dissolved aromatics from industrial aqueous effluents. Biotechnology and Bioengineering symp. 11, 373-379, 1981.
4) 권성환 : 미나리를 이용한 수질정화에 관한 연구, 39-45, 1994, 석사논문.
5) Martin Morrison and Gregory R. Schonbanm: Peroxidase-catalyzed halogenation, 861-883, 1976.
6) Tadashi Sawahata and Robert A. Neal : Horseradish peroxidase-mediated oxidation of phenol. Biochemical and Biophysical research communications, 109(3), 988-994, 1982.
7) Dean J. Danner, Paul J. Brignac, JR., David Arceneaux and Vyomeschandra Patel : The oxidation

of phenol and its reaction product by horseradish peroxidase and hydrogen peroxide, Archives of Biochemistry and Biophysics, 156, 759-763, 1973.
8) Yasuyuki Yamada, Setsuo Kobayashi, Kazuo Watanabe, Uzo Hayashi : Production of Horseradish peroxidase by plant cell culture, J. Chem. Tech. Biotechnol., 38, 31-39, 1987.
9) APHA, AWWA, APCF : Standard method for the examination of water and wastewater, American Public Health Association, 1989.
10) 동화기술 : 공정시험방법(수질편), 1992.
11) Kenji Furukawa, Keiko Tada and Masanori Fujita : Treatment of phenolic wastewater by Pak-bung Peroxidase, Japan Society on Water Environment, 13(12), 834-842, 1990.
12) D. A. Eastmond, M. T. Smith, I. O. Ruzo and D. Ross : Molecular Pharmacology, 30, 674-679, 1986.