

산화환원 촉매에 의한 Pentachlorophenol의 Transformation

박종우 · 이윤기¹ · 김장역*

경북대학교 농화학과, ¹대구광역시 상수도사업본부 수질검사소

초 록 : Peroxidase, laccase, tyrosinase와 같은 산화환원효소와 birnessite와 같은 무기촉매로 매개되는 oxidative coupling을 통한 PCP의 효율적인 제거 가능성을 규명하고자 하였다. 산화환원 촉매를 이용하여 PCP를 반응시켰을 경우 peroxidase로 매개되었을 때 transformation이 가장 높게 나타났고, tyrosinase로 매개된 반응에서는 거의 관찰되지 않았다. 사용된 산화환원 촉매중 가장 높은 활성을 나타낸 peroxidase를 이용하여 반응조건에 따른 PCP의 transformation 정도를 조사한 결과 PCP의 transformation은 pH 5.6 그리고 16°C의 반응조건에서 가장 높았다. 그리고 PCP의 transformation은 반응 30분까지 급속하게 증가되며 30분 이후부터 180분까지는 서서히 증가되다가 180분 이후에는 transformation의 증가가 관찰되지 않았다. 또한 peroxidase의 처리량을 증가시킴에 따라서 PCP의 transformation이 증가되는 것으로 나타났다. 보조 기질물질로서 다양한 humic monomer를 이용하여 PCP의 transformation에 미치는 보조 기질물질의 영향을 조사한 결과 보조 기질물질의 존재시 PCP의 transformation은 peroxidase, laccase 또는 birnessite로 매개되었을 경우에는 대부분의 경우 PCP의 transformation이 감소되었다. 그러나 tyrosinase로 매개된 경우에는 보조 기질물질이 존재할 때 PCP의 transformation이 대부분의 경우 증가되었다. 이상의 결과들로부터 PCP는 수중에서 biotic 또는 abiotic 산화환원 촉매로 매개된 oxidative coupling을 통해 제거될 수 있는 것으로 사료된다. (1999년 9월 13일 접수, 1999년 10월 22일 수리)

서 론

다양한 경로로 자연환경 중에 도입될 수 있는 유기 독성물질들은 자연환경내에서 여러 형태로 무독화 되고 있다. 그 중 lignin의 분해로 생성된 humic 구성물질들이 중합반응을 통해 humic 물질을 생성하는 humification 과정에 관여하는 반응 중의 하나인 oxidative coupling을 통하여서도 유기 독성물질이 무독화될 수 있는 것으로 알려지고 있다.¹⁻⁶⁾ 이러한 oxidative coupling은 peroxidase, laccase 및 tyrosinase와 같은 산화환원 효소와 점토광물이나 다양한 금속산화물과 같은 무기물질에 의해서도 매개될 수 있음이 보고되었다.¹⁻¹⁰⁾ Oxidative coupling을 매개하는 산화환원 촉매들은 phenol과 방향족 amine 화합물들의 중합반응에 관여하여 이 화합물들로부터 하나의 proton과 전자를 이탈시켜 free radical 또는 quinone 화합물로 산화시킨 후 autooxidation에 의한 free radical 또는 친핵성 첨가반응을 통해 이 화합물들을 중합시켜 무독화 시키는 것으로 알려져 있다.¹¹⁻¹³⁾

한편 phenol 및 방향족 amine 화합물들의 이러한 oxidative coupling을 통한 중합반응은 방향족 화합물의 side chain에 붙어 있는 치환기의 종류에 따라 반응성의 정도가 결정되며 경우에 따라서는 전혀 반응성이 없을 수도 있다. 산화환원 촉매들에 의하여 반응성이 없는 화합물들도 다른 기질로 존재하는 반응성 화합물이 free radical을 생성하게 되면 이들과의 cross-coupling을 통해 free radical 반응이나 친핵성 첨가반응에 의하여 결합되어 무독화될 수 있다.¹⁴⁻¹⁷⁾ 실제로 PCBs, naphthalene,

azobenzene 및 질소를 함유한 농약과 같이 산화환원 촉매에 대해 반응성이 없는 물질이 반응성이 높은 보조 기질물질의 존재시 이들의 transformation이 크게 증가됨이 보고되고 있다.^{14,18,19)}

한편 pentachlorophenol(PCP)은 목재보존제로서 주로 사용되고 있으며 이 외에도 살충제, 살균제, 살균에제, 제초제 및 소독제로서 사용된 바 있다.²⁰⁻²²⁾ PCP는 1936년 Dow Chemical사에 의해 농약으로 개발되어 Dovicide EC7로 소개되었으나 어독성이 강해 우리 나라에서는 1975년부터 농약으로서의 사용을 중지하고 있다. 그러나 PCP는 전 세계적으로 농약의 용도로서가 아니라 목재보존제로서 광범위하게 사용되고 있으며 또한 상대적 안정성 및 phenol 관련화합물들의 분해중간체로 존재할 수 있기 때문에 대기, 토양 그리고 수질환경의 오염이 우려되고 있어 식품 및 음용수를 통해 생물상에 위해를 가할 가능성이 제시되고 있다.^{1,23-25)} PCP는 중성부근의 pH 범위에서 anion, 즉 pentachlorophenate(PCP⁻)로 존재하기 때문에 non-ionized hydrophobic aromatic 화합물과는 반대로 자연환경내에서 더욱 이동성이 크고 활성탄과 같은 hydrophobic sorbent에 의해서 효율적으로 제거되기 어렵다.

따라서 본 연구에서는 수질환경 중에서 PCP를 산화환원 촉매를 이용한 oxidative coupling을 통하여 제거할 수 있는지를 밝히고자 하였다.

재료 및 방법

Pentachlorophenol

PCP는 순도 99% 이상의 것을 미국의 Aldrich사로부터 구입하여 사용하였다. PCP 표준용액은 실험을 수행하기 위하여 0.1 M의 stock solution을 제조한 후 냉암소(-20°C이하)에서 보관하면서 필요 농도로 희석하여 사용하였다.

찾는말 : pentachlorophenol, 산화환원촉매, peroxidase, laccase, tyrosinase, birnessite, oxidative coupling, free radical 반응, 친핵성 첨가반응

*연락처

Humic monomers

Lignin으로부터 분해되어 생성되는 토양 humic 물질의 전구체인 humic monomer를 보조 기질물질로 사용하였으며, 이들의 분자구조는 Table 1과 같다. 이들을 methanol에 용해하여 각각 0.1 M의 stock solution을 제조한 후 필요 농도로 희석하여 사용하였다.

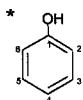
산화환원촉매

생물학적 촉매로서 peroxidase, laccase 그리고 tyrosinase를 사용하였다. 고체상태의 효소 1.0 mg당 87 units의 활성을 가진 horseradish로부터 추출한 peroxidase를 Sigma Chemical Co.(St. Louis, MO, USA)로부터 구입하여 사용하였으며, peroxidase의 activity는 pH 6.0, 20°C의 반응조건하에서 20초 동안 pyrogallol로부터 purpurogallin 1.0 mg을 생성하는데 필요한 peroxidase의 양을 1.0 unit로 정의하였다. Fungus인 *Trametes villosa*로부터 분리한 laccase는 Novo Nordisk(Danbury, CT, USA)로부터 분양 받아 사용하였으며 1.0 unit의 laccase는 0.2 M citrate-phosphate buffer(pH 3.8)에서 0.1 mM 2,6-dimethoxyphenol 용액 3.4 ml가 468 nm에서 분당 1.0의 흡광도를 변화시키는데 필요한 효소의 양으로 정의하였다. 고체상태의 효소 1.0 mg당 4,400 units의 활성을 가진 버섯으로부터 추출된 tyrosinase는 Sigma Chemical Co.로부터 구입하여 사용하였으며, tyrosinase의 1.0 unit는 L-tyrosine을 함유한 3.0 ml의 반응 용액이 pH 6.5, 25°C의 반응조건 하에서 280 nm에서 분당 0.001의 흡광도 증가를 야기시키는 효소의 양으로 정의하였다. 무기촉매로 사용된 birnessite(manganous manganite, $\delta\text{-MnO}_2$)는 McKenzie의 방법²⁶으로 제조된 것을 미국 펜실바니아 주립대학교의 Soil Biochemistry Lab으로부터 분양 받아 사용하였다.

PCP의 산화환원 촉매에 의한 transformation

Table 1. Molecular structure of humic monomers used as co-substrates

Humic monomer	Molecular structure*
Ferulic acid	2-(OCH ₃), 4-(COOH-CH=CH-)
Caffeic acid	2-(OH), 4-(COOH-CH=CH-)
Guaiacol	2-(OCH ₃)
Catechol	2-(OH)
Syringaldehyde	2-(OCH ₃), 4-(CHO), 6-(OCH ₃)
2,6-Dimethoxyphenol	2-(OCH ₃), 6-(OCH ₃)
4-Methoxyphenol	4-(OCH ₃)
Hydroquinone	4-(OH)
Vanillin	2-(OCH ₃), 4-(CHO)
Syringic acid	2-(OCH ₃), 4-(COOH), 6-(OCH ₃)
Gallic acid	2-(OH), 4-(COOH), 6-(OH)
Vanillic acid	2-(OCH ₃), 4-(COOH)
Phloroglucinol	3-(OH), 5-(OH)
Protocatechuic acid	2-(OH), 4-(COOH)
Salicylic acid	2-(COOH)
4-Hydroxybenzoic acid	4-(COOH)



산화환원 촉매에 의한 PCP의 transformation을 조사하기 위하여 PCP는 0.3 mM의 농도가 되도록 0.2 M acetate buffer (pH 5.6)로 희석하여 상온에서 산화환원 촉매와 반응시켰다. 실험에 사용된 peroxidase, laccase, tyrosinase 그리고 birnessite는 0.15, 1.5, 40 units/ml 그리고 0.5 mg/ml가 각각 사용되었고 peroxidase를 산화환원 촉매로 사용할 경우에만 전자 수용체로서 0.5 mM의 hydrogen peroxide 50 μ l를 첨가하였다. 반응액을 3시간(peroxidase) 또는 24시간(laccase, tyrosinase 그리고 birnessite)동안 반응시킨 후 12,000 rpm에서 원심 분리하여 상정액을 분리한 다음 상정액에 남아 있는 PCP의 농도를 HPLC로 정량분석하여 산화환원 촉매에 의한 PCP의 transformation 정도를 측정하였다.

반응조건에 따른 PCP의 transformation

산화환원 촉매에 의한 PCP의 transformation이 반응시간, 처리한 촉매의 양, 반응 pH 및 반응 온도와 같은 반응 조건에 따라 영향을 받는지를 peroxidase를 이용하여 조사하였다. PCP의 transformation에 대한 반응시간의 영향은 peroxidase로 매개된 반응에서 반응시간을 5, 10, 20, 30, 60, 120, 180 그리고 240분으로 하여 반응시킨 후 상정액에 남아 있는 PCP의 농도를 정량분석하여 조사하였다. Peroxidase의 처리량 변화에 따른 PCP transformation의 영향을 조사하기 위해서는 peroxidase를 0.01, 0.03, 0.05, 0.1, 0.15 그리고 0.3 units/ml의 다양한 농도로 처리하여 PCP의 transformation 정도를 조사하였다. PCP의 transformation에 미치는 반응 pH의 영향을 조사하기 위하여 0.2 M의 acetate buffer로 조제한 pH 3.6, 4.6 그리고 5.6의 용액과 0.2 M의 phosphate buffer로 조제한 pH 6.0, 7.0 그리고 8.0의 용액에서 peroxidase로 반응시킨 후 상정액에 남아 있는 PCP의 농도를 정량분석 하였다. 또한 PCP의 transformation에 미치는 반응 온도의 영향을 조사하기 위하여 반응 온도를 8, 16, 26 그리고 50°C로 하여 peroxidase에 의한 PCP의 transformation 정도를 조사하였다.

Humic monomer의 영향

수중에 존재할 수 있는 여러 형태의 humic monomer들이 PCP와 공존할 경우 PCP의 transformation에 미치는 영향을 조사하기 위하여 0.3 mM의 농도로 humic monomer를 첨가하여 peroxidase, laccase, birnessite 또는 tyrosinase로 전환한 방법으로 반응시킨 후 상정액에 남아 있는 PCP의 농도를 정량분석 하였다.

PCP의 정량분석

산화환원 촉매에 의해 매개된 반응에서 제거된 PCP의 양을 정량분석하기 위하여 high performance liquid chromatograph (HPLC)을 이용하였다. 두개의 LC-10AD solvent delivery system과 SPD-10A detector를 장착한 Shimadzu사의 HPLC System에 Waters사의 μ -Bondapak C18 column (내경 3.9 mm \times 길이 30 cm)을 연결하여 UV 280 nm에서 PCP를 정량분석 하였다. 이동상으로는 0.018 M ammonium acetate와 2% acetic acid를 함유한 Milli-Q water 20%와 methanol 80%의 혼합용

매를 사용하였다.

결과 및 고찰

산화환원 촉매에 의한 PCP의 transformation

PCP를 oxidative coupling을 유도하는 것으로 알려진 4종류의 산화환원 촉매와 반응시킨 다음 PCP의 transformation 정도를 조사한 결과를 Fig. 1에 나타내었다.

PCP의 transformation은 peroxidase로 매개되었을 경우 53.0%, laccase 23.4%, birnessite 15.6%로 나타났으나 tyrosinase로 매개된 반응에서는 PCP의 transformation이 거의 관찰되지 않았다.

현재까지의 연구^{8,27-31)}를 통해 알려진 바에 의하면 phenol 화합물들은 peroxidase, laccase 또는 birnessite가 촉매로 작용한 반응에서 먼저 1개의 proton과 electron을 소실하여 free radical을 생성하고 그 후부터는 촉매의 작용없이 autooxidation 반응을 통해 free radical들끼리의 중합반응으로 polymer를 생성하는 것으로 알려져 있다. 그러나 tyrosinase로 매개된 반응에서 phenol 화합물들은 반응 초기에 먼저 ortho-hydroxylation이 일어난 후 촉매의 작용으로 1개의 proton을 소실하여 phenoxide anion을 생성하고 더 산화되어 quinone을 생성한 후 이들 quinone들의 phenoxide anion과 같은 nucleophile들의 친핵성 공격에 의한 첨가반응을 통해 polymer를 생성하는 것으로 알려져 있다.^{8,27,31,32)}

따라서 실험에 사용된 다른 산화환원 촉매들과는 달리 tyrosinase가 매개된 반응에서 PCP의 transformation이 관찰되지 않은 것은 PCP의 산화환원 촉매에 의한 oxidative coupling 반응에서 반응기작의 차이로 설명할 수 있다. 즉, peroxidase, laccase 또는 birnessite로 매개된 반응에서 PCP는 proton과 electron이 떨어져 나간 후 free radical을 생성하여 자체적으로 polymer를 생성하기 때문에 비록 electron withdrawing group인 치환된 염소 원자들이 존재하기는 하지만 이들은 단지 transformation 속도에만 영향을 미치는 것으로 사료된다. 그러나 tyrosinase로 매개된 반응에서 PCP는 polymer를 생성하기 위해 먼저 ortho-hydroxylation이 일어나야 하지만 PCP의 ortho 위치

에 이미 염소 원자가 존재하기 때문에 ortho-hydroxylation이 일어나지 않아 반응이 종결됨으로서 tyrosinase에 의한 PCP의 transformation은 관찰되지 않은 것으로 사료된다. Park 등¹⁷⁾의 보고에서도 보조 기질물질로서 tyrosinase를 제외한 다른 산화환원 촉매에 대해 반응성이 아주 큰 syringaldehyde의 존재시 tyrosinase로 매개된 반응에서 기질물질들(phenol류 및 aniline류)의 transformation이 감소되거나 아무런 영향을 받지 못한 결과가 관찰된 것은 syringaldehyde의 ortho 위치에 치환된 methoxy group에 의해 syringaldehyde가 활성화 되지 못했기 때문으로 제시한 바 있다.

반응조건에 따른 PCP의 transformation

산화환원 촉매로 매개된 PCP의 transformation에 미치는 반응조건의 영향을 조사하기 위하여 각기 다른 배양 조건에서 peroxidase와 반응시켜 PCP의 transformation 정도를 조사하였다.

반응시간에 따른 PCP의 transformation은 Fig. 2와 같았다. Peroxidase로 촉매된 반응에서 PCP의 transformation은 반응 30분 정도까지 급격하게 일어나며 반응 30분 이후부터 180분까지는 transformation이 느리게 증가되다가 반응 180분 이후에는 거의 transformation의 증가가 관찰되지 않았다. 이러한 경향은 반응초기 단계에서는 peroxidase에 의해 생성된 PCP의 free

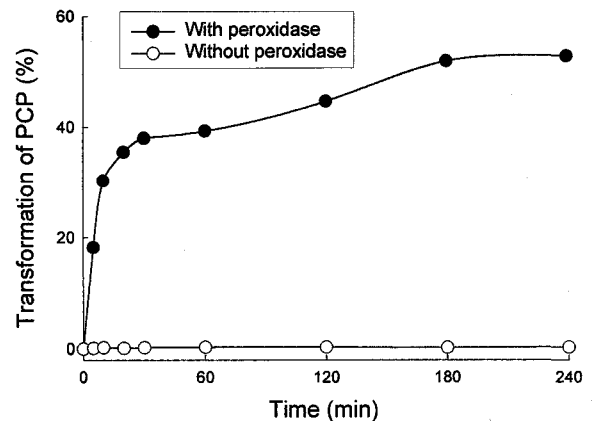


Fig. 2. Time course for the transformation of PCP incubated with peroxidase.

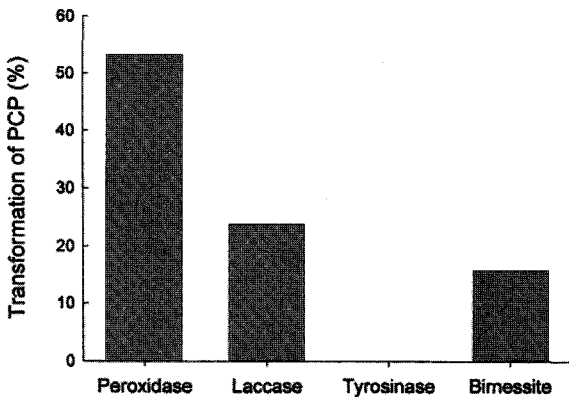


Fig. 1. Transformation of pentachlorophenol incubated with various oxidoreductive catalysts. PCP was incubated with peroxidase for 3 hour and laccase, tyrosinase and birnessite for 24 hour.

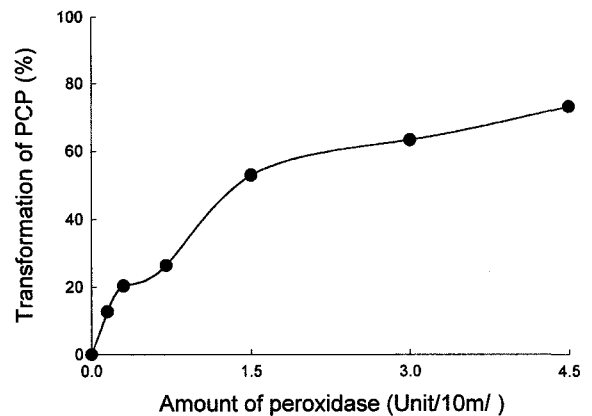


Fig. 3. Effect of peroxidase amount on the transformation of PCP.

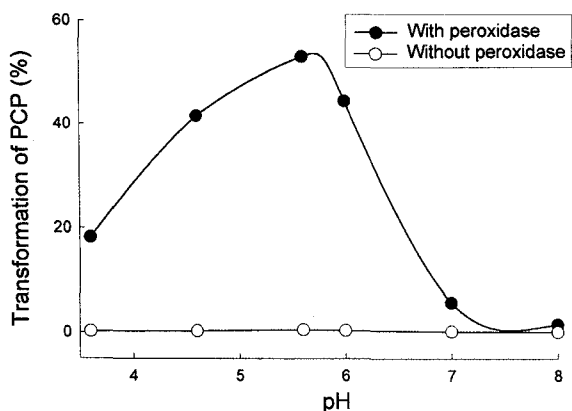


Fig. 4. Effect of pH on the transformation of PCP incubated with peroxidase. pH 3.6-5.6, Acetate buffer; pH 6.0-8.0, Phosphate buffer.

radical이 빠르게 coupling되지만 이후 peroxidase의 activity가 점차 소실됨에 따라 반응속도가 감소하여 반응 180분 이후에는 반응이 거의 종결된 것으로 추정된다. 이러한 가정은 Dec과 Bollag의 연구⁶⁾에서 peroxidase의 활성은 기질물질이 존재할 때 빠르게 소실된다는 보고로 설명할 수 있다.

Peroxidase의 처리량을 0.01에서부터 0.45 units/ml까지 증가시키며 따른 PCP의 transformation은 Fig. 3과 같았다. 처리한 peroxidase의 양이 증가함에 따라 PCP의 transformation도 증가하는 양상이 관찰되었다. PCP의 transformation에 대한 반응 pH의 영향을 조사하기 위해 0.2 M의 acetate buffer로 조제한 pH 3.6, 4.6 그리고 5.6의 용액과 0.2 M의 phosphate buffer로 조제한 pH 6.0, 7.0 그리고 8.0의 용액에서 peroxidase로 매개시킨 후 PCP의 transformation 정도를 조사한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. pH 5.6 부근에서 peroxidase에 의한 PCP의 transformation이 가장 높았고 pH 7.0 이상의 알칼리 조건에서는 PCP의 transformation이 급격히 감소됨이 관찰되어 peroxidase의 경우 PCP를 기질물질로 사용하였을 때 pH 5.6 부근이 최적 pH임을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 기질에 따라 차이가 있는 기질특이성이지만 이전 연구^{6,27)}에서 조사된 phenol 화합물과 aniline 화합물의 최적 pH 조사에서도 비슷한 결과가 보고된 바 있다.

Fig. 5는 PCP의 oxidative coupling을 통한 transformation에 미치는 반응온도의 영향을 나타내었다. 반응온도 8, 16, 26 그리고 50°C에서 peroxidase에 의한 PCP의 transformation을 조사한 결과 PCP를 기질물질로 사용하였을 경우 peroxidase는 16°C 부근에서 가장 높은 transformation을 나타내었고 온도가 증가함에 따라 PCP의 transformation이 감소됨이 관찰되었다. 다른 기질물질의 경우 peroxidase의 활성이 30°C 부근의 온도에서 가장 높은 활성을 보인 결과와는 다른 양상으로 나타났으나^{6,27)} 그 원인은 아직 까지 명확하게 밝혀지지 않았다.

PCP의 transformation에 미치는 humic monomer의 영향

지금까지의 연구^{14-16,18,19)}에 의하면 oxidative coupling을 매개하는 촉매들에 대하여 상대적으로 활성이 없는 기질물질 즉, transformation이 일어나지 않는 물질도 이들 촉매에 활성이 있

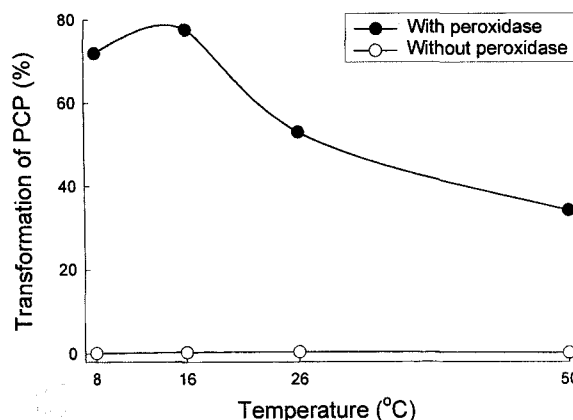


Fig. 5. Effect of incubation temperature on the transformation of PCP incubated with peroxidase.

는 보조 기질물질의 첨가로 상호반응이 일어나는 것으로 알려지고 있다. 따라서 본 실험에서도 이러한 촉매들에 대해 다양한 활성을 나타내는 보조 기질이 있을 때 PCP의 transformation에 미치는 영향을 조사하여 그 결과를 Table 2에 나타내었다.

보조기질로서 humic monomer들의 존재 시 peroxidase로 매개된 반응에서 PCP의 transformation은 대부분의 경우 감소되는 경향을 나타내었고 일부 예외로서 salicylic acid의 존재시 PCP의 transformation이 약간 증가됨이 관찰되었다. Humic monomer의 존재가 peroxidase로 매개된 PCP의 transformation에 미치는 영향은 laccase로 매개된 경우에도 비슷하게 관찰되어 salicylic acid 또는 4-hydroxybenzoic acid의 존재시 약간의 증가를 보이는 반면 이외에 다른 humic monomer가 존재할 경우 PCP의 transformation은 대부분 감소되었다. 또한 birnessite로 매개되었을 경우에도 humic monomer의 존재 시 PCP의

Table 2. Transformation of pentachlorophenol incubated with various catalysts in the presence of various humic monomers

Humic monomer	Transformation of PCP (%) ¹⁾			
	Peroxidase	Laccase	Birnessite	Tyrosinase
Control	53.0	23.4	15.6	0.0
Ferulic acid	25.5	14.2	20.1	7.5
Caffeic acid	16.3	10.9	11.2	9.5
Guaiacol	39.2	19.3	7.0	2.4
Catechol	6.2	7.2	4.5	0.0
Syringaldehyde	22.3	7.7	13.0	11.9
2,6-Dimethoxyphenol	32.9	23.5	9.6	10.3
4-Methoxyphenol	45.4	17.9	3.1	5.1
Hydroquinone	32.6	14.3	1.4	7.7
Vanillin	30.6	22.0	17.1	5.1
Syringic acid	1.1	18.0	9.0	6.9
Gallic acid	7.8	9.4	11.3	12.8
Vanillic acid	12.6	13.4	9.8	6.5
Phloroglucinol	9.7	10.0	15.8	10.8
Protocatechuic acid	2.4	9.5	4.4	15.1
Salicylic acid	63.9	29.5	10.4	7.0
4-Hydroxybenzoic acid	35.0	33.3	3.1	9.9

PCP was incubated with peroxidase for 3 hour and laccase, tyrosinase and birnessite for 24 hour.

¹⁾ The SD for transformation of PCP (%) ranged between 0.1 and 2.4.

transformation이 대부분의 경우 감소되는 경향을 나타내었다. 그러나 tyrosinase로 매개된 반응에서 catechol을 제외하고는 대체로 humic monomer가 존재할 때 PCP의 transformation을 증가시켜 peroxidase, laccase 또는 birnessite로 매개되었을 경우에 관찰된 결과와는 다른 경향을 나타내었다.

이와 같은 경향은 PCP의 oxidative coupling을 야기하는 peroxidase, laccase 그리고 birnessite와 tyrosinase 사이의 반응 기작의 차이로 사료된다. 즉 humic monomer가 존재 시 peroxidase, laccase 그리고 birnessite로 매개되었을 때 상대적으로 반응성이 큰 humic monomer가 free radical 연쇄반응의 초기 단계에서 free radical을 생성한 후 radical transfer를 통해 상대적으로 반응성이 낮은 기질물질에 radical을 생성하게 하여 이들 free radical들 사이의 coupling을 통해 polymer를 생성하는 것으로 알려져 있다.^{8,27-31} 그러나 PCP의 경우 aromatic ring에 치환되어 있는 5개의 염소 원자에 의한 입체 장애로 원활한 radical transfer가 일어나지 못함으로서 반응 초기단계에서는 humic monomer들 끼리의 oxidative coupling이 주로 일어나고 이 반응이 거의 종결되고 난 다음 비로소 PCP의 oxidative coupling이 일어날 것으로 추정된다. 그러나 Dec 등⁶이 기질물질의 존재 시 peroxidase의 활성이 급격히 감소된다고 보고한 결과로 미루어 볼 때 반응후기에서는 산화환원 촉매의 활성이 급격히 감소됨으로서 결과적으로 humic monomer의 존재 시 반응후기 단계에서 주로 일어날 것으로 추측되는 PCP의 transformation은 감소된 것으로 사료된다. 반면에 tyrosinase로 매개되었을 경우에는 peroxidase, laccase 및 birnessite로 매개되었을 경우와는 다른 반응 경로를 통해 polymer를 생성함으로써 상이한 transformation 경향이 나타난 것으로 추정되며 이 반응에 관련된 정확한 반응 경로는 앞으로 더 연구되어야 할 것으로 사료된다.

참고문헌

- McBride, M. B. (1987) Adsorption and oxidation of phenolic compounds by iron and manganese oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **51**, 1466-1472.
- Wang, M. C. and Huang, P. M. (1991) Nontronite catalysis in polycondensation of pyrogallol and glycine and the associated reactions. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **55**, 1156-1161.
- Lehmann, R. G., Cheng, H. H. and Harsh, J. B. (1987) Oxidation of phenolic acids by soil iron and manganese oxides. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **51**, 352-356.
- Bollag, J. -M. (1992) Decontaminating soil with enzymes: An in situ method using phenolic and anilinic compounds, *Environ. Sci. Technol.* **26**, 1876-1881.
- Bollag, J. -M., Dec, J. and Huang, P. M. (1997) Formation mechanisms of complex organic structures in soil habitats. *Adv. Agron.* **63**, 237-266.
- Dec, J. and Bollag, J. -M. (1990) Detoxification of substituted phenols by oxidoreductive enzymes through polymerization reactions. *Arch. Environ. Contam. Toxicol.* **19**, 543-550.
- Bollag, J. -M. (1983) In Aquatic and Terrestrial Humic Substances; Christman R. F., Gjessing E. T., Eds.; Ann Arbor Science Publishers: Ann Arbor, MI, pp127-141.
- Sjogblad, R. D. and Bollag, J. -M. (1981) Oxidative coupling of aromatic compounds by enzymes from soil microorganisms, In *Soil Biochemistry*; Paul, E. A., Ladd, J. N., Eds., Marcel Dekker, New York, Vol. 5, pp 113-152.
- Solomon, D. H. (1968) Clay minerals as electron acceptors and/or electron donors in organic reaction. *Clays Clay Miner.* **16**, 31-39.
- Wang, T. S. C., Wang, M. C., Ferng, Y. L. and Huang, P. M. (1983) Catalytic synthesis of humic substances by natural caly, silts and soils. *Soil Sci.* **135**, 350-360.
- Bollag, J. -M. and Loll, M. J. (1983) Incorporation of xenobiotics into soil humus. *Experientia* **39**, 1221-1231.
- Sarkar, J. M., Malcolm, R. L. and Bollag, J. -M. (1988) Enzymatic coupling of 2,4-dichlorophenol to stream fulvic acid in the presence of oxidoreductases. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**, 688-694.
- Bollag, J. -M. and Myers, C. (1992) Detoxification of aquatic and terrestrial sites through binding of pollutants to humic substances. *Sci. Total. Environ.* **117/118**, 357-366.
- Bollag, J. -M., Chen, C. -M., Sarkar, J. M. and Loll, M. J. (1987) Extraction and purification of a peroxidase from soil. *Soil Biol. Biochem.* **19**, 61-67.
- Bollag, J. -M. and Leonowicz, A. (1984) Comparative studies of extracellular fungal laccases. *Applied Environ. Microbiol.* **48**, 849-854.
- Shuttleworth, K. L., Postie, L. and Bollag, J. -M. (1986) Production of induced laccase by the fungus *Rhizoctonia praticola*. *Can. J. Microbiol.* **32**, 867-870.
- Park, J. -W., Dec, J., Kim, J. -E. and Bollag, J. -M. (1999) Effect of humic constituents on the transformation of chlorinated phenols and anilines in the presence of oxidoreductive enzymes or birnessite. *Environ. Sci. Technol.* **33**, 2028-2034.
- Klibanov, A. M. (1982) Enzymatic removal of hazardous pollutants from industrial aqueous effluents. *Enzyme Engineering* **6**, 319-323.
- Kim, J. -E., Wang, C. -J. J. and Bollag, J. -M. (1998) Interaction of reactive and inert chemicals in the presence of oxidoreductases : Reaction of the herbicide bentazone and its metabolites with humic monomers. *Biodegradation* **8**, 387-392.
- Bronstein, A. C. and Sullivan, J. B. (1992) Fungicides and biocides. In *Hazardous Materials Toxicology. Clinical Principles of Environmental Health*, Sullivan, J. B., Jr. and Krieger, G. R., Eds, Williams & Wilkins, Baltimore, 1070-1072.
- Crosby, D. G., Benyon, K. I., Greve, P. A., Korte, F., Still, G. G. and Vouk, J. W. (1981) Environmental chemistry of pentachlorophenol. *Pure Appl. Chem.* **53**, 1051-1080.
- IPCS (1987) Pentachlorophenol, Environmental Health Criteria, Vol. 71, WHO, Geneva.
- Kutz, F. W., Murphy, R. S. and Strassman, S. C. (1978) Survey of pesticide residues and their metabolites in urine from the general population. In *Pentachlorophenol; Chemistry, Pharmacology and Environmental Toxicology*, Rao, K. R. Ed., Plenum, New York, 363-369.
- Grimm, H. -G., Schellman, G., Schaller, K. -H and Gossler, K. (1981) Pentachlorophenol concentrations in tissues and body fluids of normal persons. *Zbl Bakt, Hyg., I Abt., Orig. B.* **174**,

- 77-90.
25. Toxicological Profile for Pentachlorophenol (1989) Agency for Toxic Substances and Disease Registry, *U.S. Public Health Service*, 81-99.
 26. McKenzie, R. M. (1971) The synthesis of birnessite, cryptomelane, and some other oxides and hydroxides of manganese. *Mineral Mag.* **38**, 493-502.
 27. Dec, J. and Bollag, J. -M. (1995) Effect of various factors on dechlorination of chlorinated phenols and anilines during oxidative coupling. *Environ. Sci. Technol.* **29**, 657-663.
 28. Dec, J. and Bollag, J. -M. (1994) Dehalogenation of chlorinated phenols during oxidative coupling. *Environ. Sci. Technol.* **28**, 484-490.
 29. Liu, S. -Y., Minard, R. D. and Bollag, J. -M. (1981) Oligomerization of syringic acid, a lignin derivative, by a phenoloxidase. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **45**, 1100-1105.
 30. Simmons, K. E., Minard, R. D. and Bollag, J. -M. (1988) Oxidative coupling and polymerization of guaiacol, a lignin derivative. *Soil Sci. Soc. Am. J.* **52**, 1356-1360.
 31. Nonhebel, D. C. and Walton, J. C. (1974) *Free-radical Chemistry : Structure and Mechanism.*, Cambridge University Press, London.
 32. Stafford, H. A. and Dresler, S. (1972) 4-Hydroxycinnamic acid hydroxylase and polyphenolase activities in *Sorghum vulgare*. *Plant Physiol.* **49**, 590-595.

Transformation of Pentachlorophenol by Oxidoreductive Catalysts

Jong-Woo Park, Yun-Ki Lee¹ and Jang-Eok Kim* (¹Taegu Water Quality Examination Office; Department of Agricultural Chemistry, Kyungpook National University, Taegu, 702-701, Korea)

Abstract : Pentachlorophenol(PCP), which is very persistent in soil and water environment, was tried to detoxify with oxidoreductive catalysts(peroxidase, laccase, tyrosinase and birnessite). To find out detoxification of PCP, the transformation of PCP through oxidative coupling was investigated in the presence of various oxidoreductive catalysts. PCP incubated with peroxidase was significantly transformed, however, in case of tyrosinase, the transformation was negligible. Using peroxidase, the optimal reaction condition was pH 5.6 and 16°C. The transformation of PCP was very fast, in initiation step until 30 min but, that was not observed after 180 min. The transformation of PCP was increased by increasing peroxidase amount. When the effect of humic monomer was investigated as co-substrate on the transformation of PCP, the transformation of PCP was mostly decreased in the incubation with peroxidase, laccase, and birnessite. The transformation of PCP, however, was slightly increased by the incubation with tyrosinase in the presence of humic monomers as co-substrate, except catechol. On the basis of the results obtained, it may be suggested that PCP is able to be effectively detoxified through oxidative coupling mediated with oxidoreductive catalysts.

Key words : oxidoreductive catalysts, peroxidase, laccase, tyrosinase, birnessite, oxidative coupling, free radical reaction, nucleophilic addition

*Corresponding author