

Horseradish Peroxidase가 고정화된 다공성 탄소 전극을 이용한 페놀의 전기화학적 분해

조승희 · 연경호 · 김가영 · 심준목 · 문승현[†]

광주과학기술원 환경공학과

(2005년 6월 22일 접수, 2005년 12월 6일 채택)

Electrochemical Degradation of Phenol by Using Reticulated Vitreous Carbon Immobilized Horseradish Peroxidase

Seung-Hee Cho · Kyeong-Ho Yeon · Gha-Young Kim · Joonmok Shim · Seung-Hyeon Moon[†]

Department of Environmental Science and Engineering, Gwangju Institute of Science and Technology(GIST)

ABSTRACT : Horseradish peroxidase, had the phenol degradation rate of 95% in aqueous phase, was covalently immobilized on the surface of reticulated vitreous carbon(RVC) and the degradation of phenol was performed with *in situ* generated H₂O₂-immobilized HRP complex in an electrochemical reactor. The incorporation of carboxylic group on the RVC surface was confirmed by FT/IR spectrometry and 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl) carbodiimide hydrochloride(EDC) was used for peptide bonds between the carboxylic groups on the RVC surface and amine groups from HRP. The optimal conditions of *in situ* H₂O₂ generation such as concentration(10~200 mM) and pH(5.0~8.0) of electrolyte, supply of O₂(10~50 mL/min) and applied voltage(-0.2~-0.8 volt, vs. Ag/AgCl) from potentiostat/galvanostat were determined by concentration of hydrogen peroxide and current efficiency. It was observed that the RVC immobilized HRP was stable maintaining 89% of the initial activity during 4 weeks. The phenol degradation rate of 86% was attained under the optimal condition of *in situ* H₂O₂ generation.

Key Words : Horseradish Peroxidase(HRP), Reticulated Vitreous Carbon(RVC), Immobilization of Enzyme, Phenol Degradation, In Situ H₂O₂ Generation

요약 : 용액 상에서 페놀류에 대해 95%의 분해특성을 지니는 동식물세포유래의 효소(horseradish peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7)를 다공성 탄소 전극에 고정화시키고 이를 전기화학 반응기에 도입하여 전극반응에 의해 연속적으로 발생되는 과산화수소를 이용하여 페놀의 분해를 수행하였다. FT-IR 분석을 통해 다공성탄소전극 표면에 HRP의 아민기와 펩티드 결합을 위한 카르복실기가 생성되었음을 확인하였고 가교제(coupling agent)로 1-ethyl-3-(3-dimethylaminopropyl)carbodiimide hydrochloride(EDC)를 이용하여 공유결합으로 고정화시켰다. 또한 HRP를 활성화 시켜 페놀을 처리하기 위해 전해질로 사용된 인산염 완충용액의 농도(10~200 mM)와 pH(5.0~8.0), 외부 산소 주입량(10~50 mL/min) 및 potentiostat/galvanostat에 의한 외부 공급전압(-0.2~-0.8 volt, vs. Ag/AgCl)의 조건을 달리 하며 RVC 전극 표면에서 발생하는 과산화수소 농도 및 전류효율을 고려하여 최적 자체 발생조건을 결정하였다. HRP가 고정화된 RVC 전극은 초기 고정화된 HRP 활성에 대해 4주 동안 89%의 상대적 효소 활성도(relatively enzymatic activity)를 지니는 안정한 전극임을 확인하였으며 실험실 스케일의 연속식 전기화학 반응기에 도입되어 최적 과산화수소의 발생조건에서 86%의 분해 효율을 보였다.

주제어 : 동식물유래세포(HRP), 다공성탄소전극(RVC), 효소 고정화, 페놀 처리, 과산화수소 자체 발생

1. 서 론

페놀 및 페놀 유도체들은 섬유, 펄프, 제지 및 플라스틱 사업장내의 폐수에서 다량 발생하는 물질로 인체에 매우 해로우며 난분해 특성을 지니고 있는 물질이다. 이들이 포함된 유출수의 처리를 위해 활성 탄소(activated carbon), 추출(extraction) 및 화학적 산화(chemical oxidation) 등에 의한 각종 물리·화학적방법이 이용되어 왔으나 고비용, 저효율

그리고 해로운 2차 오염원이 발생하는 단점을 지니고 있었다.^{1~3)} 또한 2차 오염 물질의 발생 없이 균주나 효소, 특히 동식물세포유래의 효소(horseradish peroxidase, HRP, EC 1.11.1.7)와 주름버섯담자균유래의 효소(tyrosinase, EC 1.10.3.1)와 같은 산화·환원효소를 이용한 페놀의 고분자화(polymerization) 또는 침전(precipitation)에 의한 생물학적인 처리방법이 보고되어져 왔으나^{4,5)} 공급된 균주나 효소 회수의 어려움에 따른 공정비용의 상승, 균주나 효소 활성화를 위한 과산화수소와 같은 산화제의 지속적인 외부주입 등 실제 공정 적용에 많은 한계점을 나타내고 있다. 따라서 이러한 문제점을 극복하고 페놀과 같은 난분해성 물질의 효과적인 분해 및 제거를 위한 새로운 처리 기술의 개발이 요구되어지

[†] Corresponding author
E-mail: shmoon@gist.ac.kr
Tel: 062-970-2435

Fax: 062-970-2434

고 있다.

동식물세포유래의 효소는 과산화수소에 의해 활성화되고 활성화된 내부의 보결군(prosthetic group)이 특정 오염물질을 산화시킬 수 있으며 방향족 화합물질에 대해 기질 특이성(substrate specificity)을 갖는 대표적인 산화·환원 효소(oxidoreductase)이다. HRP를 이용한 폐놀 분해에 관한 연구는 여러 차례 보고되어졌는데 Rodriguez-Lopez 연구그룹에서는 H₂O₂-HRP의 촉매 반응 사이클에 의한 폐놀의 분해 메커니즘을 설명하였고,⁶⁾ Palligarnai T. 연구그룹에서는 폐놀을 효과적으로 처리하는 데 필요한 과산화수소와 HRP의 화학양론비에 관한 연구를 진행하였다.⁴⁾ 전기분해(electrolysis)에 의한 수처리용 화학물질의 첨가 없이 전기장 하에서 오염물질을 처리하므로 2차 오염원이 발생되지 않는 친환경적인 공정으로 특히 전극반응을 통하여 산화제인 과산화수소가 자체 발생되므로 실제 공정 적용 가능성이 매우 높은 공정이다. 이러한 두 공정의 혼합 공정인 전기효소법(electroenzymatic method)은 전극반응으로 생성된 과산화수소(H₂O₂)에 의해 전극에 고정화된 효소가 활성화되고 활성화된 효소가 폐놀과 같은 오염물질을 산화시키고 자신은 본래 상태로 환원되므로 기존의 폐놀 처리 방법에서 단점으로 지적되어진 2차 오염물질의 발생 및 고가의 효소 회수 문제점을 극복할 수 있는 고도산화 수처리 기술이다.^{7~9)}

본 연구에서는 폐놀의 효과적인 처리를 위해 폐놀 처리에 적합하다고 보고되어진 HRP를 고정화 시약(coupling agent)인 1-ethyl-3-(3-dimethylamino propyl) carbodiimide hydrochloride (EDC)와 가수분해 저항물질(hydrolysis-resistant active intermediate)인 N-hydroxy succinimide(NHS)를 사용하여 다공성 탄소 전극(reticulated vitreous carbon, RVC) 표면에 고정화시켜 전기화학반응기에 도입하고자 하였다. 고정화된 HRP 내부의 보결군 활성을 위해 전해질로 사용되어진 인산염 완충용액(phosphate buffer solution, PBS)의 농도, pH, 외부 산소 주입량 및 공급전압을 변화시켜 전기화학반응기 내부에서 발생하는 과산화수소 농도 및 이에 대한 전류효율을 고려하여 최적 조건을 결정하였다. 또한 최적 과산화수

소 자체 발생조건에서 HRP가 고정화된 RVC 전극을 이용하여 폐놀의 분해 특성에 관한 연구를 수행하였다.

2. 실험재료 및 방법

2.1. 실험재료

오염물질 분해를 위한 산화·환원 효소로 동식물세포유래의 효소(HRP, type VI-A, EC 1.11.1.7, Sigma, USA)를 선정하여 폐놀(Sigma Aldrich Co.)을 분해하였다. HRP는 pH 6.0~9.0 사이에서 큰 변성없이 안정한 상태로 활성을 유지하게 되는데¹⁰⁾ pH를 조절하기 위해 인산염 완충 용액(phosphate buffer solution, PBS)이 전기화학 반응기 내의 전해질로서 사용되었다. 과산화수소(H₂O₂)의 농도를 결정하기 위해 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline(DMP)와 CuSO₄의 혼합 용액을 이용하였으며 효소 고정화를 위한 담체로 다공특성을 갖는 RVC(Duocel[®], ERG Materials and Aerospace Corp., USA, 100 ppi(pores per linear inch), 유효전극면적: 7.07 cm²) 전극을 사용하여 전기화학반응기에 도입하였다 (Fig. 1).

2.2. 실험 방법

2.2.1. 용액상의 HRP를 이용한 폐놀류의 분해

HRP의 전기효소법의 적용 가능성을 보이기 위해 용존 HRP를 이용하여 폐놀의 분해 특성을 조사하였다. 100 mM 고체상의 HRP를 100 mM PBS에 용해시켜 1 mM 폐놀을 포함하고 있는 용액에 넣고 일정 시간 후에 UV/VIS spectrometer(Shimadzu Corp., Japan)을 이용하여 270 nm 범위에서 흡광도를 측정하여 폐놀의 농도를 결정하였다.

2.2.2. HRP의 고정화

N-(3-dimethylaminopropyl)-N'-ethylcarbodiimide hydrochloride(EDC), N-cyclohexyl-N'-(b-[N-methylmorpholino]ethyl)carbodiimide p-toluenesulfonate(CMC)와 같은 carbodiimide는 펩티드 결합 동안에 잔류물 생성을 억제하는 가교

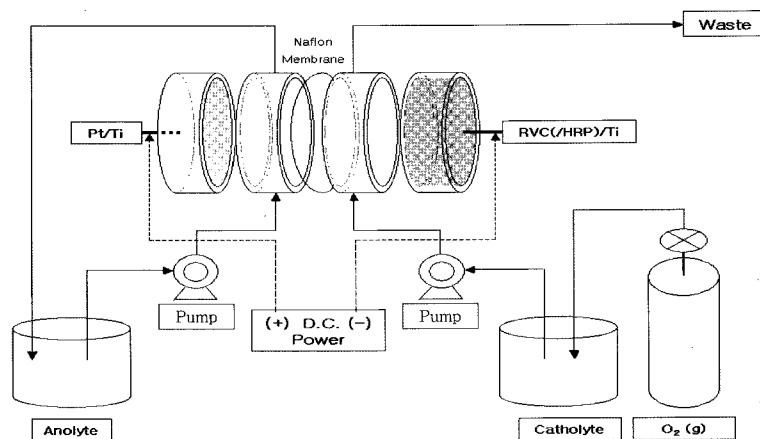


Fig. 1. Scheme of the circular electrochemical reactor in continuous system(material of reactor; acrylic plate, inner diameter of reactor; 3 cm, thickness of each compartment: 1.05 cm).

제(zero length crosslinker)로^{11,12)} 효소-지지체 간의 화학적 결합을 위한 가교제로 널리 사용되고 있다. EDC를 이용하여 HRP의 아미노기(-NH₂)와 펩티드 결합을 위한 카르복실기(-COOH) 생성을 위해 지름 3 cm의 RVC를 6 N 염산 용액이나 진한 황산(98%)과 질산(65%)의 3:1 혼합용액에 넣고 2시간 동안 초음파 처리 후에 하루 동안 방치하였다.^{13,14)} 산성 처리된 RVC를 증류수를 이용하여 수차례 세척 시킨 후에 80°C 오븐에서 하루 정도 건조시켰다. 산성 처리된 RVC를 4°C 하에서 5 mM EDC와 12.5 mM NHS를 포함하는 pH 4.5, 50 mL 용액에 넣고 반응시켰다.¹³⁾ 정해진 양의 HRP가 포함된 100 mM PBS(pH 6.5) 용액에 넣고 4°C에서 하루 동안 천천히 교반시켜 주었다. 반응이 완료된 효소 전극을 차가운 100 mM PBS(pH 6.5) 용액으로 세척한 후 보관하여 사용하였다.

2.2.3. HRP의 활성 측정

HRP의 활성은 과산화수소(H₂O₂) 존재 하에서 HRP와 (2,2'-azino-bis(3-ethyl benzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)의 반응 산물인 ABTS⁺ 라디칼을 측정하여 판별한다. 5 wt% ABTS 용액 0.32 mL, 0.5 wt% H₂O₂ 용액 0.16 mL과 0.05 M acetate buffer-0.1 M NaCl 용액 2.42 mL을 혼합한 후 적당히 희석된 HRP가 포함된 샘플 0.1 mL을 주입하여 재빨리 교반한 뒤 UV/VIS spectrometer(Shimatzu Corp., Japan)의 「time-course mode」를 이용하여 420 nm에서 흡광도를 측정한다. 시간에 따른 흡광도 값의 변화를 측정한 뒤, 초기 1차 선형 부분의 기울기를 계산하여 다음 식에 대입하였다.

$$(A_{HRP}) = \frac{\Delta s}{v \times \epsilon} * d \tag{1}$$

A_{HRP} = HRP의 활성(U/mL), Δs = 스펙트럼의 기울기
 v = 효소 샘플의 부피, ε = 몰 흡광계수(36.8×10³ M/cm),
 d = 희석 배율

2.2.4. 과산화수소(H₂O₂)의 자체 발생

양이온교환막(Nafion 450, Aldrich, USA)에 의해 분리된 2-compartment 회분식 전해장치(부피: 150 cm³)의 전극반응을 이용하여 과산화수소의 자체 발생 실험을 실시하였다. 전해 장치 내의 작업 전극(working electrode)은 RVC 전극, 상대 전극(counter electrode)으로는 백금이 도금된 티타늄 판을 기준 전극(reference electrode)으로는 Ag/AgCl 전극을 사용하였다. 과산화수소는 전극의 양단에서 일정한 전위(potentiostatic method)를 공급해 줌으로써 양극 표면에서 생성된 H⁺이 음극으로 이동하여 외부 주입된 산소와 만나 전해장치 내에서 자체적으로 발생하게 된다. 일정한 전압의 공급과 이때 발생하는 전하량의 기록은 potentiostat/galvanostat (PGSTA 30, Autolab, Netherland)에 의해 공급·기록되었고, 과산화수소의 농도를 결정하기 위해 DMP 방법을 이용하였다.¹⁵⁾ 1 wt% DMP 용액 1 mL, 0.01 M CuSO₄ 1 mL, PBS(pH 7.0) 1 mL를 혼합하고 샘플 1 mL을 넣은 뒤 증

류수를 가해 10 mL로 맞춘 후 UV/VIS spectrometer를 이용하여 파장 454 nm에서 흡광도를 측정하여 농도를 결정하였다. 또한 측정된 과산화수소의 농도와 potentiostat/galvanostat에 기록된 전하량의 값을 이용하여 아래 식에 대입함으로써 전류효율(CE_{H₂O₂})을 계산하였다.^{16,17)}

$$CE_{H_2O_2} (\%) = \frac{2FC_{H_2O_2}V}{Q} \times 100 \tag{2}$$

F = Faraday constant(96,485 Coulombs/mol), V = 전해질 부피(L), Q = 전하량(Coulombs), C_{H₂O₂} = 발생된 과산화수소 농도(M)

위 실험은 전해질의 농도(10~100 mM) 및 pH(5.0~8.0) 등의 내부 조건과 공급되는 일정전위(-0.8~-0.2 volt, vs. Ag/AgCl) 및 외부 산소 주입량(10~50 mL/min) 등의 외부 조건을 조절하여 1시간 후에 발생한 과산화수소의 농도와 전류효율을 측정하였다.

2.2.5. HRP가 고정화된 RVC 전극이 도입된 전기화학반응기를 이용한 페놀의 분해

페놀 분해를 위해 RVC 전극이나 HRP가 고정화된 RVC 전극이 도입된 원형 전기화학반응기를 Fig. 1에 나타내었다. 양극(Anode)은 티타늄 표면에 백금이 도금된 전극을 사용하였으며 음극(Cathode)은 RVC 전극이나 HRP가 고정화된 RVC 전극을 사용하였다. 양극실(anolyte compartment)에서 생성된 H⁺을 음극 표면으로 이동시켜 과산화수소의 발생을 촉진하기 위해 수소이온에 대해 선택성이 높은 Nafion 450 (유효 막 면적: 7.07 cm², Aldrich, USA) 양이온교환막을 사용하였다. 연동펌프를 이용하여 양극실의 인산염 완충용액은 순환시켰고 페놀을 포함하고 있는 음극실 용액은 연속 운전 후 방류되었다. 2.4절의 과산화수소 발생실험에서 potentiostat/galvanostat에 의해 측정된 전압 값을 근거로 하여 전력공급 장치(Power supply, Agilent 6613 C, USA)를 이용하여 반응기의 양 끝단에서 전압을 공급해 주었으며 최적 결정된 PBS의 농도 및 pH 조건의 전해질을 사용하였다. 페놀의 농도를 UV/VIS spectrometer를 이용하여 270 nm 범위에서 흡광도를 측정하여 결정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 용액 상 HRP를 이용한 페놀류의 분해특성

페놀은 과산화수소 존재 하에 HRP와 반응하여 라디칼(phenoxy radical)을 생성하고 생성된 라디칼이 중합체를 형성하여 분해된다.¹⁸⁾ 100 mM 인산염 완충용액(pH 7.0)에 녹아 있는 150 mL의 1 mM 페놀류를 외부 주입된 1 mM 과산화수소와 HRP의 촉매 반응을 이용하여 분해시켰다. 충분한 과산화수소 존재는 활성화된 HRP가 페놀과 반응 후 비활성화되는 것을 방지하고 다시 원래 상태로 환원시켜 촉매반응에

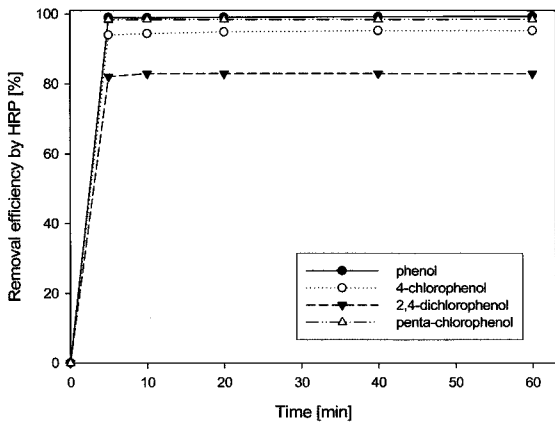


Fig. 2. Removal efficiency of phenolic compounds by suspension of HRP and H₂O₂: 4.05 U/mL HRP, 1 mM phenolic compound and 1 mM H₂O₂ at pH 7.0, 25°C.

기여하게 되며¹⁹⁾ pH 6.0~7.0 범위에서 빠른 분해 반응 속도를 지니고 있어²⁰⁾ 초기 5분 내에 모든 반응이 완료되어 초기 페놀 농도에 대해 95% 이상 분해되었다. 이를 통해 HRP는 페놀류에 대해 우수한 분해 특성을 지니고 있으며 전기화학반응기내에서 고정화된 효소 전극으로 존재할 경우 과산화수소의 외부 주입 없이 반응기내에서 자체발생 되는 과산화수소를 이용하여 페놀류에 대해 높은 처리 효율을 기대할 수 있어 전기효소법의 적용가능성이 확인되었다.

3.2. 다공성 탄소 전극을 이용한 HRP 고정화

오염물질 처리에 쓰이는 효소는 뛰어난 분해특성에도 불구하고 용액 상태로의 주입에 따른 회수의 어려움 그리고 산화제로 쓰이는 과산화수소의 지속적인 공급 및 수송·저장의 문제점을 안고 공정 적용에 많은 제약이 따른다. 효소의 고정화는 이러한 단점을 극복하여 효소의 재이용을 가능하게 하며 효소 안정성을 증대시켜 용액 상 효소에 비해 장기간 활성을 유지할 수 있으며 이로 인한 공정비용의 감소 효과를 기대할 수 있다. RVC 표면에 효소를 고정화시키기 위해서는 탄소 표면에 카르복실기를 생성하여 효소의 아미노기와 펩티드 결합을 통해 화학적으로 결합시킨다. N. Peña 연구 그룹에서는 6 N 염산을 이용하여 RVC 표면에 tyrosinase를 고정화시켜 페놀류의 검출을 위한 센서를 보고하였다.¹³⁾ 또한 K. E. William 연구그룹에서 DNA 인식을 위해 탄소 나노튜브(carbon nanotube)에 PNA(peptide nucleic acid)를 고정화시키기 위해 진한 황산과 질산의 3:1 혼합용액을 이용한 방법을 제안하였다.¹⁴⁾ 두 가지 방법에 의해 처리된 탄소 표면의 카르복실기 생성 여부를 확인하기 위해 4,000~400 cm⁻¹ 범위에서 KBr pellet을 이용하여 FT/IR(Fourier transform infrared, 460 plus, Jasco, Japan) spectrometer를 측정하였다. 카르복실기는 1,740~1,720 cm⁻¹ 범위에서 발견되는데 6 N 염산 용액으로 처리된 RVC의 경우(Fig. 3(a))는 카르복실기 생성과 관련된 특정 피크가 발견되지 않았지만 진한 황산과 질산의 3:1 혼합용액으로 처리된 RVC 표면에서는(Fig. 3(b)) 1,730 cm⁻¹에서 카르복실기 피크가 나

타났다. 이는 진한 황산과 질산의 3:1 혼합용액의 작용에 의해 카르복실기가 RVC 표면에 효과적으로 생성되어 효소의 아미노기와 펩티드 결합을 통해 화학적으로 고정화 될 수 있음을 보이고 있다. Table 1은 HRP의 투여량에 따른 RVC의 HRP 고정화율 및 단위 부피당 고정화된 양을 나타내고 있다. RVC는 부피당 면적 비율이 높기 때문에 큰 HRP 고정화율을 보이고 있으나 1,000 U/mL 이상의 HRP를 투여 하더라도 고정화율 및 단위 부피당 고정화된 양이 크게 증가하지 않았다. 이는 HRP 1,000 Units을 진한 황산과 질산의 3:1 혼합용액에 의해 처리된 RVC에 고정화 했을 때, 단위 부피당 470 Units, 35% 정도의 효소를 고정화할 수 있음을 나타낸다. Fig. 4에서는 HRP의 투여량에 따른 RVC에 고정화된 HRP의 활성 및 초기 활성에 대한 상대적 효소 활성도(relatively enzymatic activity)를 4주 동안 조사하여 비교하였다. 효소 투여량에 상관없이 초기 5일 동안은 RVC 표면에 고정화된 초기 HRP의 양(Table 1의 세 번째 열)에 대해 10~15% 정도 감소하였다. 이는 탄소 매질 표면에 생성

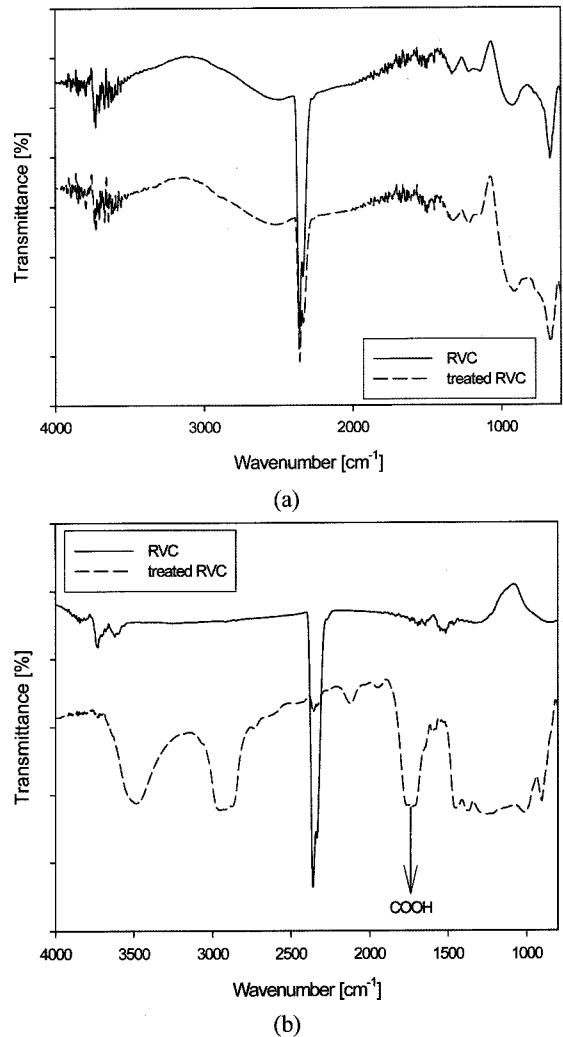


Fig. 3. FT-IR spectrum, solid line: RVC surface, dashed line: RVC treated by (a) 6 N HCl, (b) 3:1 mixture of concentrated H₂SO₄(98%) and HNO₃(65%).

Table 1. Percentage and amount of HRP immobilized on treated RVC surface according to adding amount of HRP

	HRP		
	Amount of adding (U/mL)	Percentage of uptake (%)	Amount of uptake (U/mL cm ³ material)
RVC	581.17	8.38	52.71
	1,045.45	35.40	469.11
	1,366.88	34.20	483.99

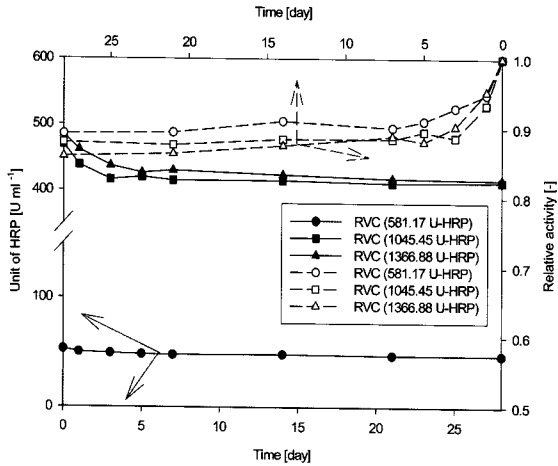


Fig. 4. Immobilized units of HRP (solid line) on the treated RVC surface according to adding of (●): 581.17 U HRP, (■): 1045.45 U HRP, (▲): 1366.88 U HRP and relative activity (dotted line) for initial activity adding of (○): 581.17 U HRP, (□): 1045.45 U HRP, (△): 1366.88 U HRP during 4 weeks.

된 카르복실기와 HRP의 아미노기 사이에 완전한 펩티드 결합을 형성하지 못하고 약한 공유결합 때문에 RVC 표면에 누출되는 HRP가 존재함을 의미한다. 그러나 5일 후에, 약한 공유결합이 제거되고 RVC 표면과 강한 펩티드 결합을 생성하고 있는 HRP만 남게 되므로 탄소 전극 표면에서 누출되는 HRP의 양은 초기 5일에 비해 감소하게 되며 4주 후의 최종 활성은 초기 고정화된 HRP 활성에 대해 0.85~0.89의 값을 보이게 되었다.

3.3. HRP 활성화를 위한 in situ H₂O₂ 발생

전기효소법을 이용한 난분해성 물질을 처리하는데 있어서 산화제인 과산화수소의 발생은 효소내부의 보결군(prosthetic group)을 산화시켜 오염물질을 분해하는 기능을 지니고 있다.²¹⁾ 전기화학반응기에서는 높은 산화력에도 불구하고 불안정성에 의해 저장과 보관의 단점을 지니고 있는 과산화수소를 반응기에서 발생시켜 실제 현장에서의 응용가능성을 높일 수 있다. 과산화수소는 전기화학반응기 내의 양극 표면의 물분해(water dissociation) 현상에 의해 생성된 H⁺이 수소이온 선택성을 갖는 Nafion 450 양이온교환막(cation exchange membrane)을 통과하여 음극 표면에 외부 주입된 산소와 결합하여 생성된다. Fig. 5와 Fig. 6은 본 연구에서 사용되어

진 RVC 전극에서의 자체 과산화수소 발생 특성에 관한 결과를 나타내고 있다. 일정 pH 조건에서(pH 7.0) 전해질인 인산염 완충용액의 농도를 10~200 mM로 변화시켜 가며 자체 발생되는 과산화수소의 농도 및 전류 효율을 측정하여 비교하였고(Fig. 5(a)), 일정 전해질 농도 하에서 pH 조건을 달리하여 과산화수소 발생 및 그에 따르는 전류효율을 측정하였다(Fig. 5(b)). 모든 조건에서 연속적으로 과산화수소가 자체 발생하였고 과산화수소의 발생량 및 전류효율을 고려했을 때 과산화수소 발생의 최적 전해질 농도 및 pH 조건은 100 mM, pH 7.0임을 확인 할 수 있었다. 수소이온농도의 변화는 효소 내 반응 사이트의 이온 특성을 변화시켜 활성을 결정지를 뿐 아니라 효소의 3차원 구조를 변화시켜 분해특성을 변화시킬 수 있는 인자이다. 본 연구에서 사용된 HRP의 경우 약산성이나 중성 조건에서 최적 활성을 나타내므로^{22,23)} 자체발생 되는 과산화수소의 최적 pH 조건에서 큰 변성(denaturation) 없이 활성을 유지할 것으로 예상되어진다. 또한 외부 실험 조건인 공급 전압(Fig. 6(a)) 및 공급 산소량(Fig. 6(b))에 의한 과산화수소의 자체 발생량 및 전류효율을 측정

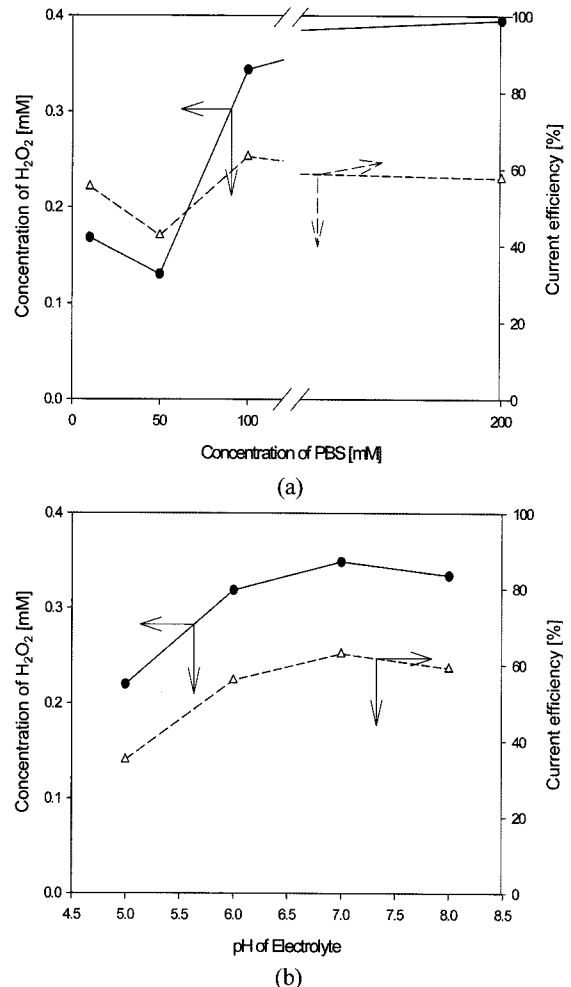


Fig. 5. Amount of electrochemical in situ generation of H₂O₂ (solid line) and these current efficiency(dashed line) on the RVC surface in electrochemical reactor according to (a) concentration of PBS and (b) pH of PBS.

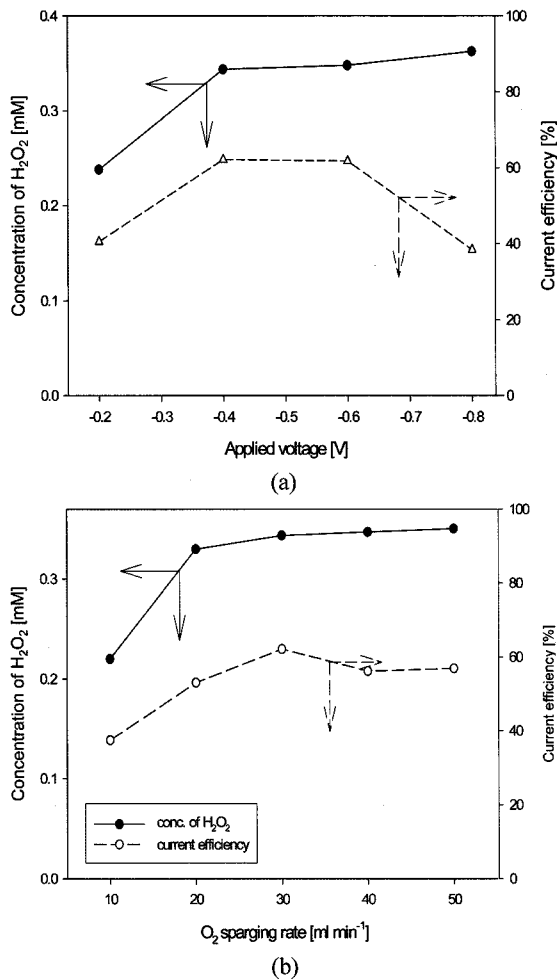


Fig. 6. Amount of electrochemical *in situ* generation of H₂O₂ (solid line) and these current efficiency(dashed line) on the RVC surface in electrochemical reactor according to (a) applied voltage and (b) oxygen sparging rate.

하였다. 공급전압 -0.4 volt(vs. Ag/AgCl) 이상의 범위에서는 전압 증가에 따른 과산화수소의 자체 발생량이 그다지 크게 증가하지 않았으며 -0.4~-0.6 volt의 범위에서 가장 높은 전류효율을 보였다. 또한 외부 산소 주입량 20 mL/min 이상 조건에서는 거의 일정한 농도의 과산화수소가 자체 발생되었으며 30 mL/min에서 가장 효과적으로 전류를 이용하고 있었다. 이는 30 mL/min의 외부 산소 주입량에 의해 전해질이 충분히 포화되었으며 과포화조건에서는 약간의 전류효율 감소가 나타남을 확인할 수 있었다.

3.4. HRP가 고정된 RVC를 도입한 전기화학반응기의 페놀 분해

Fig. 1에서 보인 전기화학반응기를 이용하여 효소가 고정화되지 않은 RVC 전극과 HRP가 고정화된 RVC 전극간의 1 mM 페놀에 대한 처리 특성을 비교한 결과를 Table 2에 제시하였다. 공급 전압이 증가할수록 초기 페놀 농도에 대한 전기화학반응기내에서 60분 동안 운전한 페놀의 잔류 농도 비율(C₆₀/C₀)이 감소하였다. 이는 전기화학반응기 내의 전압 증

Table 2. The ratio of residual concentration of phenol at 60 min to initial concentration of phenol in electrochemical reactor

Applied voltage(volt)	C ₆₀ / C ₀	
	RVC	HRP/RVC
2.0	0.842	0.514
10.0	0.751	0.320
20.0	0.694	0.237
40.0	0.612	0.141

C₀, C₆₀: Residual concentration of phenol in electrochemical reactor at initial time and 60 min

가에 따른 반응기 내에서 자체 생산되는 과산화수소의 양이 증가하여 HRP를 활성화시킴으로 인해 페놀의 분해에 적절하게 사용되었기 때문이다. 또한 공급전압 조건에 상관없이 HRP가 고정화된 RVC 전극을 이용한 전기화학반응기가 RVC 전극만을 사용한 전기화학반응기에 비해 높은 분해효율을 나타내었다. 특히 전기화학반응기 내의 과산화수소 자체 발생량이 가장 많은 40 V 공급 전압 조건에서는 RVC 전극만을 이용한 전기화학반응기가 38.8% 분해효율을 보이는데 반해 HRP가 고정화된 RVC 전극을 이용한 전기화학반응기는 85.9%의 분해효율을 보이고 있다. 이는 전기장 하에서 자체 발생된 과산화수소에 의해 HRP의 활성이 높아져 페놀의 분해에 촉매로 작용하여 RVC 전극만을 사용한 전기화학반응기에 비해 높은 분해특성을 지니고 있다. 이로써 HRP를 고정화 시킨 다공성 탄소 전극을 도입한 전기화학반응기는 페놀에 대해 효과적인 분해특성을 지니고 있는 것을 알 수 있었다.

4. 결론

용액 상에서 페놀류에 대해 95%의 분해효율을 갖는 동식 불세포유래의 효소를 진한 황산과 진한 질산의 3:1 혼합용액의 처리에 의해 RVC 표면에 생성된 카르복실기와 펩티드 결합에 의해 화학적으로 고정화되었다. 처리된 RVC 전극에 1,000 U/mL 이상의 HRP를 투여했을 때 투여량에 대해 35%, RVC 단위 부피당 470 U/mL의 HRP가 고정화 되었고, 4주 동안 초기 활성도에 대해 85% 이상의 상대적 효소 활성도를 나타내었다. RVC가 도입된 원형 전기화학반응기에서 효소를 활성화 시킬 수 있는 과산화수소를 반응기에서 발생시키기 위한 최적 외부 조건은 -0.4~-0.6 volt(vs. Ag/AgCl), 외부 산소 주입량 30 mL/min이었으며 전해질로 이용되는 PBS의 최적 pH 및 농도 조건은 각각 7.0, 100 mM이었다. 페놀은 전기화학반응기내에 공급되는 전압이 증가할수록 내부에서 자체 생산되는 과산화수소의 양의 증가에 따라 분해효율이 높아졌으며 RVC 전극을 도입한 전기화학반응기의 경우 38.2%의 분해 효율을 나타내는데 비해 HRP를 고정화시킨 RVC 전극을 도입한 전기화학반응기는 85.9%의 분해 효율을 나타내었다. 이를 통해 HRP를 다공성 탄소 전극에 고정화시킨 전기화학반응기가 페놀에 대해 우수한 분해 특성을 지니고 있음을 알 수 있었다.

사 사

본 연구는 한국환경기술진흥원(KIEST)의 차세대핵심환경 기술개발(Eco-Technopia-21) 사업(Project No. 071-051-080)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Rengaraj, S., Moon, S. H., Sivabalan, R., Arabindoo, B., and Murugesan, V., "Removal of phenol from aqueous solution and resin manufacturing industry wastewater using an agricultural waste: rubber seed coat," *J. Hazard. Mater.*, **89**, 185~196(2002).
- Roop, R. K., Brenda, A. A., Dexter, J., and Irvin, T. R., "Extraction of phenol from water with supercritical carbon dioxide," *The Journal of Supercritical Fluids*, **2**, 51~56(1989).
- Santos, A., Yustos, P., Durbán, B., and García-Ochoa, F., "Oxidation of phenol in aqueous solution with copper catalysts," *Catalysis Today*, **66**, 511~517(2001).
- Vasudevan, P. T. and Li, L. O., "Peroxidase catalyzed polymerization of phenol," *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **60**, 73~82(1996).
- Seetharam, G. B. and Saville, B. A., "Degradation of phenol using tyrosinase immobilized on siliceous supports," *Water Research*, **37**, 436~440(2003).
- Gilabert, M. A., Hiner, A. N. P., García-Ruiz, P. A., Tudela, J., García-Molina, F., Acosta, M., García-Cánovas, F., and Rodríguez-López, J. N., "Differential substrate behaviour of phenol and aniline derivatives during oxidation by horseradish peroxidase: kinetic evidence for a two-step mechanism," *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Proteins & Proteomics*, **1699**, 235~243(2004).
- Lee, K. B., Gu, M. B., Moon, S. H., "In situ generation of hydrogen peroxide and its use for enzymatic degradation of 2,4,6-trinitrotoluene," *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **76**, 811~819(2001).
- Lee, K. B., Gu, M. B., Moon, S. H., "Kinetics of veratryl alcohol oxidation by lignin peroxidase and in situ generated hydrogen peroxide in an electrochemical reactor," *Engineering in Life Science*, **1**(6), 237~245(2001).
- Kim, G. Y., Degradation of Pentachlorophenol by an Electroenzymatic Method Using Immobilized Peroxidase Enzyme, Master's Thesis, GIST, Korea(2004).
- Shinmen, Y., Asami, J., Amach, T., Shimizu, S., and Yamada, H., "Crystallization and characterization of extracellular fungal peroxidase," *Agric. Biol. Chem.*, **50**, 247~249(1986).
- Kunkel, G. R., Mehrabian, M., and Martinson, H. G., "Contact-site cross-linking agents," *Mol. Cell Biochem.*, **34**, 3~13(1981).
- Garbarek, Z. and Gergely, J., "Zero-length crosslinking procedure with the use of active esters," *Anal. Biochem.*, **185**, 131~135(1990).
- Pena, N., Reviejo, A. J., and Pingarron, J. M., "Detection of phenolic compounds in flow systems based on tyrosinase-modified reticulated carbon electrodes," *Talanta*, **55**, 179~187(2001).
- Williams, K. A., Veenhuizen, P. T. M., de la Torre, B. G., Eritja, R., and Dekker, C., "Carbon nanotubes with DNA recognition," *Nature*, **420**, 761(2002).
- Kosaka, K., Yamada, H., Matsui, S., Echigo, S., and Shishida, K., "Comparison among the methods for hydrogen peroxide measurements to evaluate advanced oxidation processes: application of a spectrometric method using copper (II) ion and 2,9-dimethyl-1,10-phenanthroline," *Environ. Sci. Technol.*, **32**, 3821~3824(1998).
- Lee, K. B. and Moon, S. H., "Electroenzymatic oxidation of veratryl alcohol by lignin peroxidase," *Journal of Biotechnology*, **102**, 261~268(2003).
- Sudoh, M., Kodera, T., Sakai, K., Zhang, J. Q., and Koide, K., "Oxidative degradation of aqueous phenol effluent with electrogenerated Fenton's reagent," *Journal of Chemical Engineering of Japan*, **19**, 513~518(1986).
- Klibanov, A. M., Tu, T. M., and Scott, K. P., "Peroxidase-catalyzed removal of phenols from coal-conversion waste waters," *Science*, **221**, 259~261(1983).
- Enzo, L., Elena, G., Silvia, A., and Rosa, P. F., "Oxidation of 2,4-chlorophenol catalyzed by horseradish peroxidase; characterization of reaction mechanism by UV-visible spectroscopy and mass spectroscopy," *Journal of Inorg. Biochem.*, **95**, 171~176(2003).
- Nicell, J. A., Bewtra, J. K., Biswas, N., and Taylor, E., "Reactor development for catalyzed polymerization and precipitation of phenols from wastewater," *Water Research*, **27**, 1629~1639(1993).
- Yamazaki, I., "Free radical mechanisms in enzyme reactions," *Free Radical Biology and Medicine*, **3**, 397~404(1987).
- Iqbal, M., Mercer, D. K., Miller, P. G. G., and McCarthy, A. J., "Thermostable extracellular peroxidases from *Streptomyces thermoviolaceus*," *Microbiology*, **140**, 1457~1465 (1994).
- Cao, W., Mahadevan, B., Crawford, D. L., and Crawford, R. L., "Characterization of an extracellular azo dye-oxidizing peroxidase from *Flavobacterium* sp. ATCC 39723," *Enzyme Microb. Technol.*, **15**, 810~817(1993).