

T. LKY-7 laccase/mediator system에 의한 화학펄프의 표백 (mediator 선발)

정현채 · 박서기 · 김훈

순천대학교 농업생명과학대학

1. 서론

지금까지 효과적인 laccase-mediator로 밝혀진 N-OH group을 포함하는 화합물들은 natural cyclic hydroxamic acid (1, Figure 1 ; $R^1 = -CH_2CH(CH_3)_2$, $R^2 = H$, $R^3 = -CH(CH_3)C_2H_5$)에서 유래하며 *Aspergillus flavus*로부터 처음으로 분리되었다(3). 그 후로 똑같은 고리구조를 갖는 다양한 cyclic hydroxamic acid가 다양한 미생물로부터 분리되었다. N-hydroxypyridone(2, Figure 1)과 같은 기본적인 구조를 갖는 많은 cyclic hydroxamic acid가 미생물로부터 분리된 반면 N-hydroxy-1,4-benzoxazin-3-one (3, Figure 1)의 analogues는 식물(Gramineae)로부터 분리되었고, 또한 흥미롭게도 지금까지 펄프표백에 가장 효과적인 laccase mediator로 밝혀진 N-hydroxy-acetanilide (NHA) (4, Figure 1 ; $R^1 = R^2 = H$)는 포유동물의 조직과 식물세포로부터 합성될 수 있다고 보고되었다 (4, 5). Figure 1에 나타낸 natural cyclic hydroxamic acid중에서 N-hydroxypyrazinone(1, Figure 1)과 N-hydroxypyridone(2, Figure 1) analogues는 펄프표백을 위한 laccase-mediator로서 아직 검토가 되지 않았으며 이들도 N-OH group의 N이 방향핵고리에 결합되어 있어 NHA와 매우 유사한 구조적 특징을 나타내므로 효과적인 mediator로 작용할 가능성이 있을 것으로 예측할 수 있다.

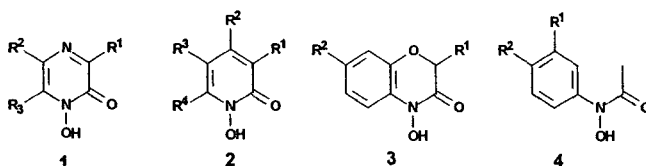


Figure 1. Characteristic structure of natural cyclic hydroxamic acid.

2. 재료 및 방법

ca-alginate beads에 고정된 *Trichophyton* sp. LKY-7을 참나무 목분을 1% (W/W) 첨가한 glucose-peptone medium에서 5 cycle 반연속 배양 후 회수한 배지를 조효소액으로하여 Q-sepharose column(Pharmacia)에서 one step 정제한 laccase solution을 사용하였다.

50 mM sodium acetate buffer (pH=4.5)로 pH를 조절한 10%농도의 침엽수 미표백 크라프트펄프 5.0 g(o.d)에 mediator (10 mg per gram o.d pulp)와 TrL (15 units per gram o.d pulp)을 투입하여 60°C에서 4시간 처리하여 세척하였다. 세척된 펄프의 1/2은 70°C에서 90분간 알카리추출 (2% NaOH on pulp, 10% consistency)하였고 1/2은 90°C에서 4시간동안 알카리-과산화수소표백 (2%NaOH and 0.05% MgSO₄ on pulp, 2% H₂O₂ on Pulp)을 실시하였다. 알카리추출 및 알카리-과산화수소 표백된 펄프는 micro kappa number method에 의하여 kappa number를 측정하고 TAPPI test method T218 om-83에 의하여 handsheet를 제조한 다음 TAPPI test method T525 om-86에 의하여 handsheet의 백색도(Brightness)를 측정하였다.

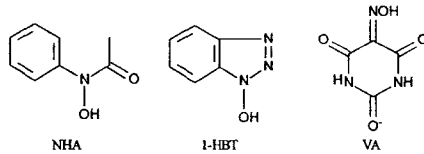


Fig. 2. Chemical structure of laccase mediators.

- laccase와 N-hydroxypyrazinone 치환체에 의한 펄프 표백

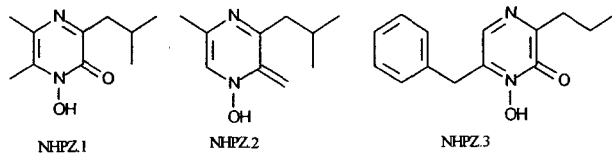


Fig. 3. Chemical structure of N-hydroxypyrazinone analogues.

- laccase와 N-hydroxy-2-pyridone 치환체에 의한 펄프표백

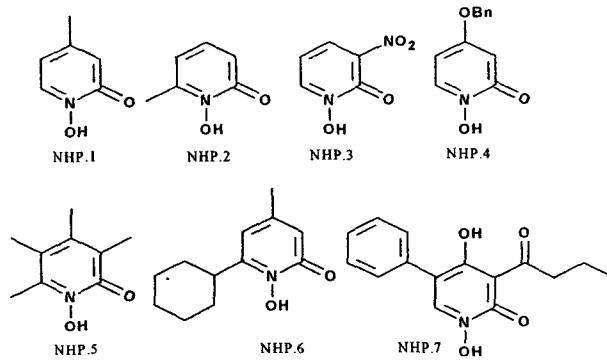


Fig. 4. Chemical structure of N-hydroxy-2-pyridone analogues.

3. 결과 및 고찰

3.1. 표백용 laccase 생산과 정제

Table 1에서와 같이 ca-alginate beads에 encapsulation 시킨 *Trychophyton* sp. LKY-7을 참나무 목분 1%(W/W) 첨가된 glucose-peptone medium에서 5회 반연속 배양(1)하여 회수한 약 4,800ml의 조효소액을 Q-sepharose column (Pharmacia)에서 one step 정제하여 수율 약 60% laccase activity 43,000 unit의 효소액을 얻어 펄프표백용 laccase로 이용하였다.

Table 2. One step purification of extracellular laccase

Fungi	Purification step	Volume (ml)	Activity (unit)	Yield (%)
<i>Trychophyton</i> sp. LKY-7	Culture filtrate	4,800	72,000	100
	Concentration(>10 kDa)	450	62,000	86
	Ammonium sulfate precipitation	15	51,000	78
	Q-sepharose	20	43,000	60

3.2. laccase/mediator에 의한 펄프표백

1) TrL과 NHA, 1-HBT 및 VA에 의한 펄프 표백

Table 3에서와 같이 TrL/NHA의 경우 알카리 추출에서 3, 알카리-과산화수소 표백에서는 3.2 정도의 Kappa number 감소와 약 10.5% 백색도 증가로 가장 효과적인 표백성을 나타냈다. 반면 1-HBT와 VA의 경우 약 2점도의 Kappa number 감소와 약 6% 정도의 백색도 증가를 나타내 TrL에 대하여 기존의 mediator중에서는 NHA가 효과적인 mediator로 작용함을 보여주었다.

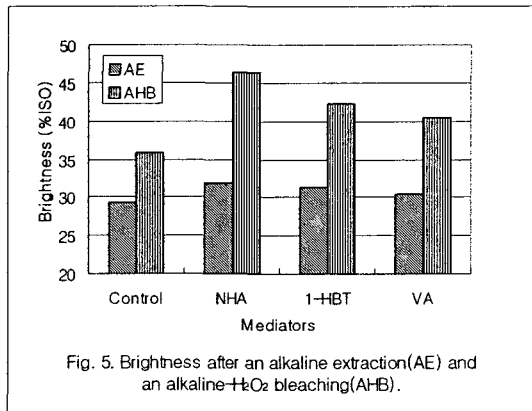


Fig. 5. Brightness after an alkaline extraction(AE) and an alkaline+ H_2O_2 bleaching(AHB).

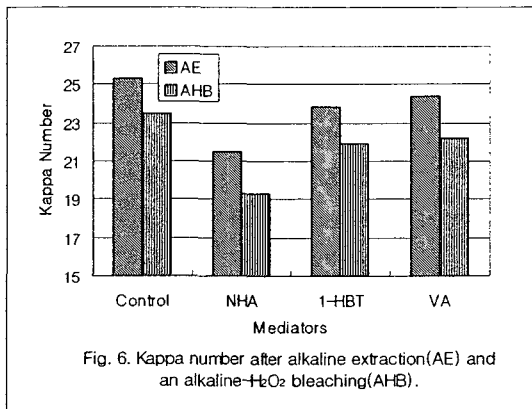


Fig. 6. Kappa number after alkaline extraction(AE) and an alkaline+ H_2O_2 bleaching(AHB).

2) TrL과 N-hydroxypyrazinone 치환체에 의한 펄프 표백

N-OH 그룹을 갖고 있는 화합물 중에서 2종의 N-hydroxypyrazinone 치환체를 이용하여 pyrazinone링 치환체의 결합형태가 펄프표백에 미치는 영향을 조사였다. Table 4

에서와 같이 TrL/N-hydroxypyrazinone 치환체에 의한 펄프표백은 NAPZ.2에서 가장 크게 나타나 전체적으로 약 5% 정도의 백색도 증가와 1.5 정도의 kappa number 감소를 나타냈으나 기존의 mediators에 비하여 표백효과가 크지 않았고 또한 pyrazinone링의 치환체 결합형태가 펄프 표백에 미치는 영향도 크게 나타나지 않았다.

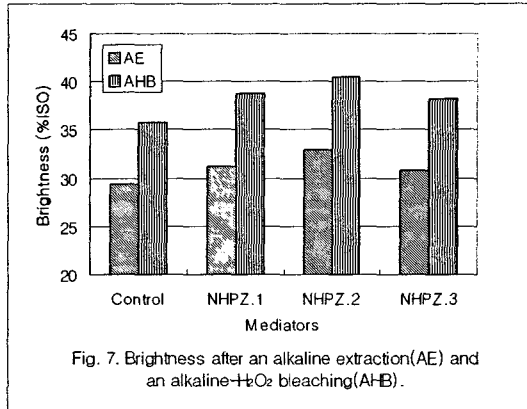


Fig. 7. Brightness after an alkaline extraction(AE) and an alkaline-H₂O₂ bleaching(AHB).

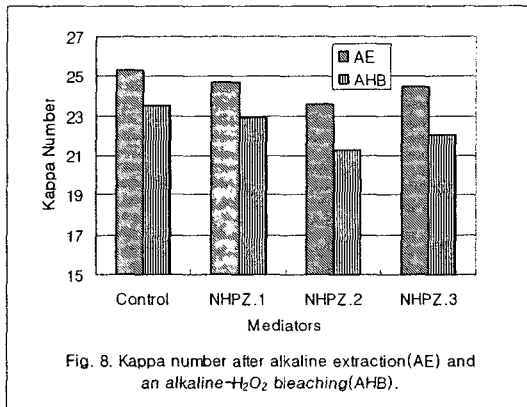
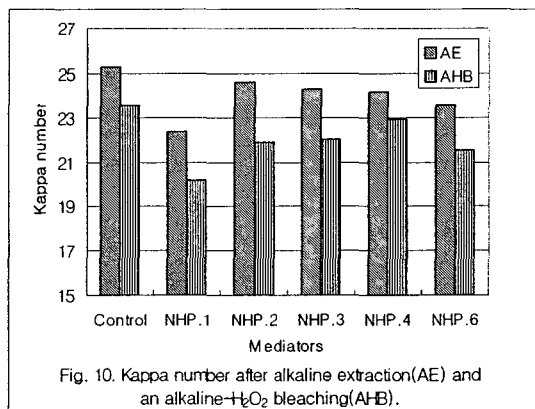
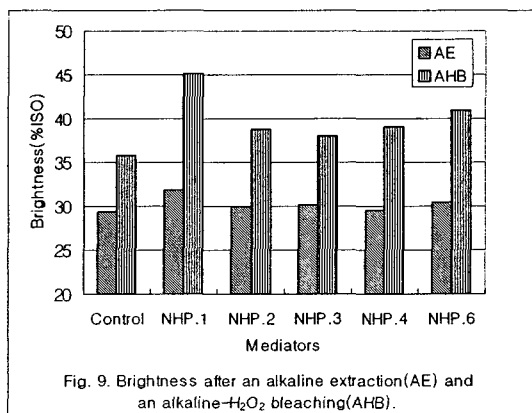


Fig. 8. Kappa number after alkaline extraction(AE) and an alkaline-H₂O₂ bleaching(AHB).

3) TrL과 N-hydroxy-2-pyridone 치환체에 의한 펄프표백

TrL과 N-hydroxy-2-pyridone 치환체에 의한 펄프표백 결과, Table 5에서와 같이 NHP.1의 표백성이 가장 우수하였으며 그다음은 NHP.6로 나타났다. 즉 NHP.1의 경우 알카리 추출이나 알카리-과산화수소 표백에 의하여 Kappa number는 약 3 정도 감소하고 백색도는 약 10% 정도 증가하여 NHA와 유사한 펄프 표백 효과를 나타냈다. NHP.6의 경우, 알카리 추출이나 알카리-과산화수소 표백에 의하여 Kappa number는 2

정도 감소하였고 백색도는 약 6% 정도 증가하였으나 다른 치환체에 있어서는 그 표백 효과가 미미하였고 NHP.1과 NHP.6의 경우를 제외하고 그 차이가 크지 않아 N-hydroxy-2-pyridone 치환체의 형태에 의한 펄프표백 효과에서는 일정한 경향을 발견할 수 없었다.



4) 표백시간에 따른 표백효과

TrL과 NHA와 NHP.1을 mediator로 하여 표백시간에 따른 표백성을 조사하였다. NHA의 경우 투입된 laccase는 4시간 반응에서 대부분 활성을 잃었으며(data not shown) Kappa number 감소와 백색도 증가는 Table 5에서와 같이 반응시간 2시간에서 4시간째에 가장 크게 나타났고 그 이후 16시간까지 처리에는 표백효과가 크지 않았

다. NHP.1의 경우에는 2시간의 반응에서 이미 laccase의 활성은 거의 나타나지 않았고 표백효과는 마찬가지로 2시간에서 4시간째 반응에서 가장 크게 나타났고 그이상의 표백시간은 표백효과에 크게 영향하지 않는 것으로 검토되었다.

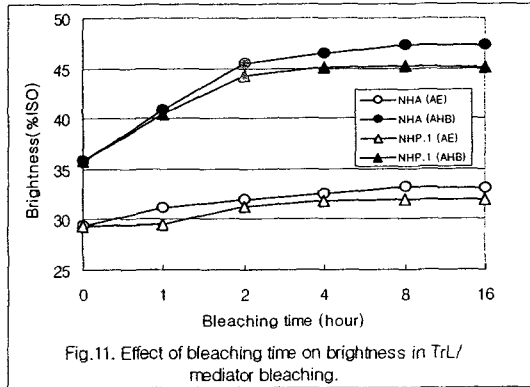


Fig.11. Effect of bleaching time on brightness in TrL/mediator bleaching.

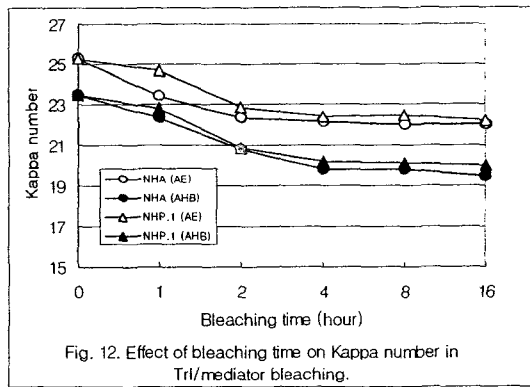


Fig. 12. Effect of bleaching time on Kappa number in TrL/mediator bleaching.

4. 결론

Trl laccase에 효과적인 mediator를 선발하고자 N-hydroxypyrazinone analogues와 N-hydroxy-2-pyridone analogues에 대하여 펄프 표백특성을 조사한 결과, N-hydroxy-2-pyridone analogues 중에서 NHP.1이 우수한 mediator로 검토된 기존의 NHA와 비슷한 표백효과를 나타내었으며 약 10(%ISO)의 백색도 증가와 약 3 정도의

Kappa number 감소를 가져왔다. N-hydroxy-2-pyridone analogues와 N-hydroxy-2-pyridone analogues의 치환체가 표백에 미치는 영향은 나타나지 않았다. 표백시간은 2시간에서 4시간이 가장 효과적이었으며 그이상의 표백시간은 표백 효과에 크게 작용하지 않았다.

참고문헌

1. Jung, H. C., F. Xu and K. Li. 2002. Purification and characterization of *Trichopyton rubrum* LKY-7 laccase. *Appl. Environ. Microbiol.* 30:161-168.
2. Xu, F., J. J. Kulys, K. Duke, K. Li, K. Krikstopaitis, H. J. Deussen, E. Abbate, V. Galinyte, and P. Schneider. 2000. Redox chemistry in laccase-catalyzed oxidation of N-hydroxy compounds. *Appl. Environ. Microbiol.* 66:2052-2056.
3. White, E.C., and J.H. Hill. 1943. Studies on antibacterial products formed by molds. I. Aspergillic acid, a product of a strain of *Aspergillus glaucus*. *J. Bacteriol.* 176(3):656-664.
4. Yoshioka, T., H. Ohno, and T. Uematsu. 1996. Pyrurate dehydrogenase complex-catalyzed formation of M-arylaceto hydroxamic acids from nitroso aromatic compounds in rat isolated cells and perfused organs. *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 279(3):1282-1289.
5. Yoshioka, and T. Uematsu. 1998. Formation of N-arylhydroxamic acids from nitroso aromatic compounds in isolated spinach leaf cells. *J. Agric. Food Chem.* 46(2):606-610.