Korean J. Environ. Biol. 17(2) : 191~198 (1999)

Cephalosporium sp. RYM-202가 생산하는 알카리내성 xylanase를 이용한 크라프트 펄프의 효소적 처리

강명규 · 이영하[1] · 김병현[2] · 전 양[3]

(동해대학 환경공업과, [1]충남대학교 미생물학과,
[2]중부대학교 인쇄공학과, [3]충남대학교 임산공학과)

적 요 - 침엽수와 활엽수 펄프내의 리그닌(lignin) 제거 효과를 개선하기 위해 호알칼리성 균류인 *Cephalospotium* sp. RYM-202의 xylanase를 표백 전처리하고 이에 의한 펄프의 표백 증진 효과를 조사하였다. 두 종류의 펄프 모두 50°C에서 효소반응을 수행하였을 때 펄프내 xylan의 가수분해가 가장 높게 나타났다. 펄프내 xylan의 가수분해를 위한 효소의 최적 pH는 8.0이었으며, pH 9.0에서도 최대활성의 90% 이상이 유지되었다. 각각의 펄프 재료에 효소를 전처리한 결과 표백(리그닌 제거) 과정의 증진 효과를 보였으며, 침엽수와 활엽수의 kappa number는 각각 3.7과 2.0 ISO units 만큼 감소되었다. 아울러 효소처리 혹은 효소 미처리 펄프를 각각 표백한 후 수초지를 제조하여 종이의 물성을 상호 비교한 바, 효소처리는 종이의 섬유 구조에 큰 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다. 이러한 결과들은 호알칼리성 *Cephalospotium* sp. RYM-202의 알칼리내성 xylanase가 알칼리 조건하에서의 펄프 전처리 과정에 매우 적합함을 의미한다.

서 론

Xylan 성분은 β-(1-4)결합에 의해 연결된 D-xylose의 주골격을 지니고 있으며 cellulose 및 lignin과 함께 식물체의 주요 구성 성분을 이루고 있다(Gilbert & Hazlewood 1993). 침엽수(softwood)에서는 arabino-4-*O*-methylglucuroxylan 형태로, 활엽수(hardwood)에서는 *O*-acetyl-4-*O*-methyl-D-glucuronoxylan 형태로 존재하는 xylan 성분은 수종에 따라 다소 차이가 있지만 침엽수와 활엽수에서 대체로 건조 중량의 10~15%와 10~35%를 각각 차지하고 있다(Kuhad & Singh 1993). 이들 xylan 성분의 분해에는 D-xylose로 이루어진 xylan 주골격의 β-(1-4) 결합을 가수분해하는 β-1, 4-xylanase (xylanase, 1, 4-β-D-xylan xylanohydrolase; EC 3.2.1.8)와 xyloligomers를 xylose로 가수분해하는 β-xylosidase (1, 4-β-D-xylan xylohydrolase; EC 3.2.1.37)가 관여한다(Wong *et al.* 1988).

Kraft pulp는 세계적으로 가장 보편화된 화학적 펄프 화법인 kraft법에 의해 목재에서 제조되는 펄프이다 (Clarke *et al.* 1997). 이러한 펄프에는 잔여 리그닌이 함유되어 있는 데 다른 탄수화물과 결합된 채로 함유되어 있기도 하고 고온과 고알칼리 상태인 증해액 처리 과정에서 생성된 짧은 사슬의 xylan이 cellulose 미세섬유에 재침착하는 과정에서 포매되어 존재하게된다. 따라서 펄프 생산공정에서는 펄프 갈색화의 원인이 되는 lignin을 추출하기 위해 염소 및 이산화염소 등을 사용하는 다단계 표백과정을 수행하게 된다. 이 표백공정에서 부산물로 생성되는 여러 유기성 염화물질은 유독성임과 동시에 매우 난분해성이다. 이에 따라 이들 물질의 생성량과 방출량에 대한 환경기준이 설정되고 이러한 규제는 표백과정에서 염소사용량을 줄일 수 있는 환경친화적 대체 기술 개발을 자극해 왔다. 가장 가능성 있는 대안 중의 하나가 최근 보고되고 있는 방법인 화학적 표백 처리 전에 xylanase를 이용하여 kraft pulp를 전처리하는 방법이다(Viikari *et al.* 1994). 지금까지 알려진 기작에 의하면 xylanase 효소는 첫째, 펄프내부 xylan을 가수분해하여 표백약품이 펄프 내부로 쉽게 침투할수 있게 하거나, 둘째, 리그닌이 결합된 xylan을 분해함으로써 리그닌을 효과적으로 제거하거나, 셋째, cellulose 섬유 표면에 재침착된 xylan을 분해함으로써 포매된 리그닌 제거를 용이하게 하는 것으로 알려져 있다(Christov & Prior 1994; Paice *et al.* 1992).

일반적으로 펄프 제조 공정은 비교적 높은 알칼리성

pH에서 이루어진다. 따라서 펄프 및 제지 산업에서 보다 효율적으로 활용되기 위해서는 높은 알칼리성 pH에서 최고의 활성을 나타내며 안정성을 유지할 수 있는 xylanase가 요구된다(Senior *et al.* 1991; Nakamura *et al.* 1993). 이러한 관점에서 최근 호알칼리성(alkalophilic) 또는 알칼리내성(alkali-tolerant) 미생물을 대상으로 알칼리 내성 xylanase를 생산하기 위한 연구가 큰 관심을 모으고 있다.

본 실험실에서는 pH 9.0에서 최고의 생장을 보이며 알칼리성 pH의 반응 조건에서 높은 활성을 보이는 cellulase 및 xylanase를 생성하는 호알칼리성 균류 *Cephalosporium* sp. RYM-202를 분리한 바 있으며(Kang *et al.* 1993), 정제된 효소의 특성을 살펴 본 결과 이 균주로부터 생산되는 xylanase는 펄프 전처리용 효소로서의 제반 조건을 구비하고 있음을 보고한 바 있다(Kang *et al.* 1995a, b; 1996a, b).

이에 본 연구에서는 *Cephalosporium* sp. RYM-202로부터 생산된 알칼리내성 xylanase를 펄프 및 제지 생산 공정 중 kraft pulp의 표백 전처리 과정에 활용함으로써, 기존의 화학적 표백 공정에서 발생하고 있는 환경에의 악영향을 효율적으로 감소시키고 제품의 질 향상을 이루기 위한 가능성을 모색하였다.

재료 및 방법

1. 균주 및 배양

이전의 연구(Kang *et al.* 1993)에서 토양으로부터 분리한 *Cephalosporium* sp. RYM-202를 사용하였다. 본 균주는 0.5% sodium carbonate가 함유된 potato dextrose agar(PDA) 사면 배지(pH 10.5)에 주기적으로 계대배양하여 보존하였다.

회분배양은 2%(w/v) wheat bran, 0.3% NaNO3, 0.1% K_2HPO_4, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$, 0.05% KCl, 0.001% $FeSO_4 \cdot 7H_2O$을 함유하는 변형 Czapek 배지를 2.5 L 제조한 후 5-liter jar fermentor에서 수행하였다. 발효전 배양액에 별도로 멸균하여 준비한 sodium carbonate를 최종농도 0.5%(w/v)되도록 첨가하였으며, 발효중 배양액의 pH는 자동조정기를 이용하여 적절한 양의 sodium carbonate용액(25%)을 자동적으로 유입시켜 pH 9.5로 유지되도록 하였다. 분생포자는 배지 1 ml 당 5×10^5의 수가 되도록 접종하였으며 배양은 30°C에서 3일동안 수행하였다. 공기유입량(air flow rate)은 1.0 vvm, 진탕속도(agitation speed)는 400 rpm을 유지하였다.

2. 펄 프

실험에 사용한 펄프는 충남대학교 임산공학과와 (주)동해펄프에서 제공받은 침엽수와 활엽수의 미표백 크라프트 펄프(unbleached kraft pulp)이며, 고해기(vally beater)를 이용하여 2시간 동안 해리시켜 사용하였다. 이렇게 제조된 침엽수 펄프와 활엽수 펄프의 최초 kappa number는 각각 56.2와 43.8이었다.

3. 효소의 부분정제

배양액을 4°C에서 10,000×g로 20분 원심분리한 후 그 상등액을 효소액으로 하여 효소 정제 실험을 수행하였다. 정제과정 동안은 4°C를 유지하였다. 먼저 황산암모늄 분획 실험을 수행하였는 바 30~80% 농도에서의 침전물을 수획하였다. 그 침전물을 500 ml의 20 mM 인산 완충용액(pH 7.0)에 녹인 후 완충용액을 2~3번 교체하면서 24시간 투석과정을 수행하였다. 이러한 과정으로 제조된 조효소액을 10,000-molecular weight cutoff membrane(Pellicon Lab Cassette System; Milipore)을 이용하여 효소를 3배 농축하였다. 농축된 조효소액을 DEAE-Sephadex A-50 column (4.6×25 cm)에 주입시켰다. 조효소액이 주입된 column은 400 ml의 20 mM 인산완충용액(pH 7.0)으로 세척한 후 KCl 농도 기울기(0~0.6 M)로 전개하였다. 전개 속도는 40 ml/h이었으며, 각 분획(fraction)은 8 ml씩 수획하였다. 전개 후 xylanase 활성이 높은 분획물을 모으고 Diaflo membrane YM 10(Amicon Inc.)을 이용하여 농축하였다.

4. 효소활성 측정

Xylanase 효소 활성은 50 mM 인산 완충용액(pH 7.5)에 0.5%(w/v) 되게 녹인 birchwood xylan 용액 0.9 ml와 효소액 0.1 ml을 혼합하여 정량하였다. 그 혼합액은 항온수조를 이용하여 50°C에서 20분 동안 반응시켰다. 반응 후 생성된 환원당은 dinitrosalicylic acid(DNS) 방법(Miller 1959)으로 측정하였다. 즉 1 ml의 dinitrosalicylic acid 용액을 첨가한 후 5분 중탕 가열하였다. 방냉한 다음 증류수 2 ml을 첨가하고 575 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 활성 1 unit은 분당 1 μmol의 환원당(xylose의 양으로 표현)을 생성하는 효소의 양으로 정하였다. β-Xylosidase 활성은 *p*-nitrophenyl-β-D-xylopyranoside(*p*NPX)로부터 생성되는 *p*-nitrophenol(*p*NP)양을 측정함으로써 정량하였다(Hrmova *et al.* 1989). 즉 50 mM 인산완충용액(pH 7.5)에 1 mM 되게 녹인 *p*NPX 용액 0.9 ml과 효소액 0.1 ml을 혼합하여 50°C에서 30분 반응시켰다. 반응 후 2 ml의 1 M sodium carbonate 용액

을 첨가하여 발색시켜 증류수 7 ml로 희석한 다음 420 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소활성 1 unit은 분당 1 μmol의 *p*NP를 생성하는 효소의 양으로 정하였다. Avicel, carboxymethyl cellulose (CMC), soluble starch, polygalacturonic acid 혹은 laminarin에 대한 xylanase 효소액의 활성의 경우 50 mM 인산완충용액 (pH 7.5)에 0.5% 되게 녹인 각 기질용액 0.9 ml에 0.1 ml의 효소액을 혼합하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후 환원당을 측정하였다 (Hrmova *et al.* 1989; Kim *et al.* 1993). β-Glucosidase 활성은 앞서 기술한 바와 같이 *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside (*p*NPG)로부터 생성되는 *p*NP의 양을 측정하여 정량하였다.

단백질의 농도는 280 nm에서의 흡광도 혹은 bovine serum albumin (Sigma)을 표준시료로 하여 Lowry 등 (1951) 이 기술한 방법으로 정량하였다.

5. Kraft pulp 의 가수분해

인산완충용액 (50 mM, pH 6.5～9.5)에 용해시킨 kraft pulp (25～50 g/l)에 xylanase (10～30 units/g pulp)를 처리하여 20～60°C의 범위에서 반응시켰다. 이 때 생성되는 환원당은 앞에서 기술한 바와 같이 DNS 방법으로 정량하였다.

6. Pulp의 표백

xylanase에 의해 전처리된 펄프 혹은 미처리된 펄프는 증류수로 세척한 후 0.2% ethylenediaminetetraacetic acid로 50°C에서 1시간 동안 처리하였다. 이 펄프 용액에 H_2O_2 표백제 (H_2O_2, 3%; NaOH, 1.5%; diethylenetriamine pentaacetic acid, 0.2%; $MgSO_4$, 0.5%)를 처리한 후 50°C에서 1시간 동안 반응시켰다(리그닌 제거 과정). 이러한 리그닌 제거과정 수행 후 그 펄프 용액에 황산을 가하여 중화한 다음 TAPPI standard 205 om-88 (TAPPI 1991)에 준하여 수초지 (handsheet)로 제작하였다.

7. Kappa number의 측정

표백과정의 수행후 리그닌 제거율을 살펴보기 위해 펄프 내 리그닌 함량 지표인 kappa number를 측정하였는 데, TAPPI 236 hm-85에 준하여 300～400 mg의 펄프를 시료로 하여 과망간산 칼륨 적정법으로 측정하였다.

8. 수초지의 물성 측정

TAPPI standard 205 om-88에 의해 평량 60 g/m^{3}의 수초지 (handsheet)를 제조한 후 이 수초지의 제반 물성을 아래의 방법에 의해 측정하였다. 즉 인장강도 (tensile strength)는 TAPPI standard T 404 om-87, 파열강도 (burst strength)는 TAPPI standard T 403 om-85에 준해 측정하였으며, 인열강도 (tear strength)는 TAPPI standard T 414 om-88, 백색도 (brightness)는 TAPPI standard T 217 wd-72에 의해 각각 측정하였다. 한편 밀도 (density)는 수초지의 평량 (TAPPI standard T 410 om-88)과 두께 (TAPPI standard T 410 om-89)를 측정하여 구하였다.

결과 및 고찰

1. Xylanase 효소액의 제조

Cephalosporium sp. RYM-202의 회분 배양 결과 14,373 units의 효소활성을 지닌 2.5 L의 배양액이 수획되었다. 원심분리 후 상등액의 황산암모늄 분획 (30～80%) 과정을 통해 수획한 침전물을 500 ml의 20 mM 인산 완충용액 (pH 7.0)에 녹인 후 투석과정을 수행하였다. 이러한 과정을 거쳐 제조된 조효소액은 15.0의 specific activity를 나타냄으로써 7.8의 specific activity를 지닌 효소배양액과 비교하여 볼 때 1.9배의 정제도를 나타내었다. 이 조효소액을 3배 농축한 후 DEAE-Sephadex A-50상에서의 음이온 교환 크로마토그라피를 수행한 결과는 Fig. 1에 나타내었다. Xylanase 활성은 3개의 주요 peak으로 분리되었으며, 이는 *Cephalosporium* sp. RYM-202으로부터 적어도 3개의 주요 동위효소가 생산됨을 의미한다. 이들 3개 peak에 해당하는 효소 분획물을 수획한 후 이 효소액을 농축하였다. 이러한 일련의 정제과정으로 획득된 효소액의 specific activity는 25.6으로써 효소배양액에 비해 3.3배로 높아졌으며 이 효소액 (4,538 units)을 본 실험과정에서의 부분정제된 xylanase 효소액으로 사용하였다. 한편 이 효소액은 Avicel, carboxymethyl cellulose, 그리고 *p*-nitrophenyl-β-D-glucopyranoside에 대해 분해 활성을 거의 나타내지 않음으로써 cellulase 활성이 없는 것으로 확인되었고, 또한 β-xylosidase 활성은 물론 몇몇 구조적 인접 물질에 대한 활성도 보이지 않는 것으로 나타났다 (Table 1). 이러한 결과는 제조된 xylanase 효소액이 cellulose fibre의 손상을 가져오는 cellulase 활성을 지니지 않아 본 실험 조건에 적합함을 보여준다.

2. Kraft pulp의 가수분해

pH 변화에 따른 xylanase에 의한 kraft pulp 가수분해율을 살펴보기 위해 침엽수와 활엽수의 kraft pulp (2.5 g/l)에 xylanase (10 units/g pulp)를 처리하여 각각의 pH

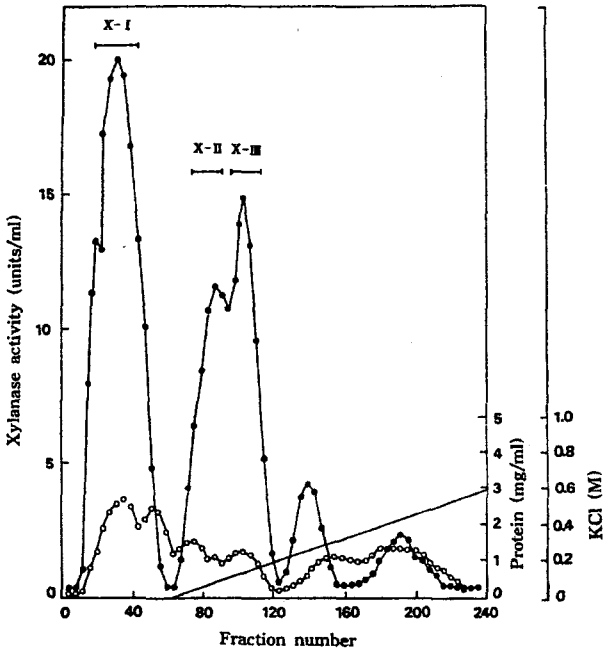

Fig. 1. Partial purification of xylanase of *Cephalosporium* sp. RYM-202 on DEAE-Sephadex A-50. The column (4.6×25 cm) was eluted with 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.0), followed by a KCl gradient (0~0.6 M). ●, xylanase activity; ○, protein.

Table 1. Activities of partially purified xylanase towards various substrates

Substrates	Activities	
	Total (units)	Relative (%)
Birchwood xylan	4,538	100
p-Nitrophenyl-β-D-xylopyranoside	ND	ND
Avicel	5.4	0.12
Carboxymethyl cellulose	ND	ND
p-Nitrophenyl-β-D-glucopyranoside	ND	ND

ND: not detected

별로 50°C에서 반응시켰다. Fig. 2에 나타난 바와 같이 펄프내 xylan의 최대 분해율은 두 종류 pulp 모두 pH 8.0의 범위에서 나타났으며, pH 8.5~9.0에서도 최대치의 90%에 근접하는 분해율을 보였다. 크라프트 증해 과정의 초기 pH는 14 부근이나 증해과정에서 많은 알칼리가 소모되어 증해 과정의 최종 pH는 10~12로 강하되며, 또한 증해 과정 후에는 알칼리 회수과정을 거치게 된다. 이런 이유로 인해 펄프 생산 공정에서 크라프트 펄프의 제조 직후 즉 표백 과정 직전의 펄프 pH는 일반적으로 8.0~9.5의 범위에 있다(Nakamura *et al.* 1993). 따라서 이 범위의 pH에서 최대 활성을 보이는

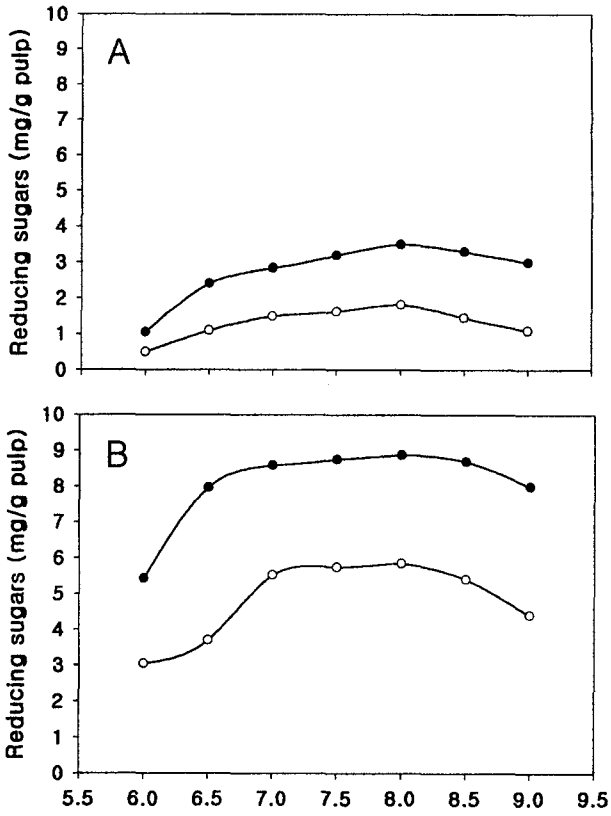

Fig. 2. Effect of pH on the hydrolysis of softwood (A) and hardwood (B) kraft pulps. The reaction mixtures containing kraft pulp (2.5% consistency) and xylanase (10 units/g pulp) in 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.5) were incubated at 50°C for 8 h (○) or 16 h (●).

xylanase는 펄프 전처리용으로 매우 유리하며 본 실험에서 *Cephalosporium* sp. RYM-202의 xylanase는 이 범주에 속하는 것으로 나타났다. 현재 이러한 범위의 최적 pH를 보이는 xylanase는 균류에서는 보고된 바 없으며, 단지 일부 *Bacillus* 속(Nakamura *et al.* 1993; Okazaki *et al.* 1985; Ratto *et al.* 1992; Lundgren *et al.* 1994), *Streptomyces* 속(Vyas *et al.* 1990; Rhyum *et al.* 1993)과 *Aeromonas* 속(Ohkoshi *et al.* 1985) 등 제한된 종류의 세균에서만 발견되고 있을 뿐이다.

침엽수와 활엽수의 kraft pulp (2.5 g/l)에 xylanase (10 units/g pulp)를 각각 처리하여 pH 7.5에서 20~60°C 범위의 각 온도 별로 가수분해 변화를 살펴보았다(Fig. 3). 두 종류 kraft pulp 모두 50°C에서 최대 분해율을 보였으며 55°C에서는 침엽수와 활엽수 각각 최대치의 80%와 84%에 달하는 분해율을 유지하였다. Kraft pulp의 생산 공정상 고온에서 최적 활성을 나타내는 xylanase가 잇점을 지니며 지금까지 *Bacillus* 속(Dey *et al.* 1991;

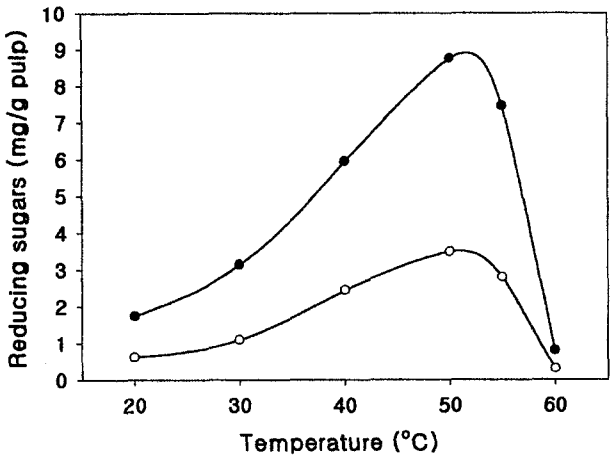

Fig. 3. Effect of temperature on the hydrolysis of softwood (○) and hardwood (●) kraft pulps (2.5% consistency). The xylanase dosage was 10 units/g pulp at pH 8.0 for 16 h.

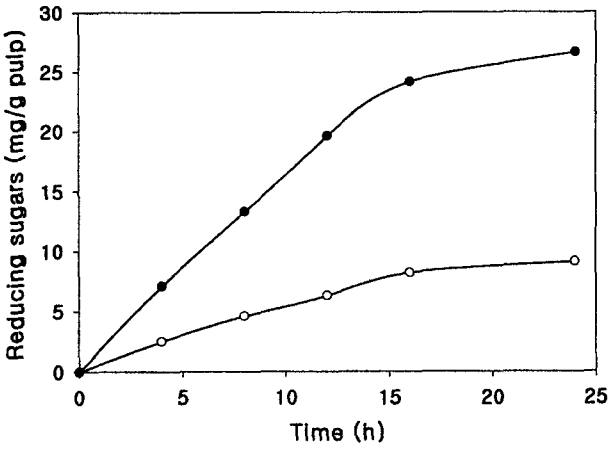

Fig. 4. Time course of hydrolysis of softwood (○) and hardwood (●) Kraft pulps by partially purified xylanase. The reaction mixture contained kraft pulp (5% consistency) and xylanase (30 units/g pulp) in 50 mM sodium phosphate buffer.

Lundgren *et al.* 1994)과 *Clostridium* 속(Berenger *et al.* 1985). *Dictyoglomus* 속(Ratto *et al.* 1994; Mathrani & Ahring 1992), *Streptomyces* 속(Tsujibo *et al.* 1992), *Thermotoga* 속(Simpson *et al.* 1991)을 비롯한 일부 세균과 극히 제한된 수의 균류 *Humicola* 속(Anand *et al.* 1990), *Thermomyces* 속(Gomes *et al.* 1993; Gubitz *et al.* 1997), *Thermoascus* 속(Tan *et al.* 1987)에서 보고되고 있다. 한편 현재까지 효소 생산성, 내열성 및 내알칼리성 등을 겸비한 효소는 아직 보고된 바 없다. 그러나 현재 세계적으로 몇몇 xylanase가 펄프의 전처리용으로 상품화되어 있으며, 그 중 가장 널리 알려진 Ecopulp (Alko Ltd.)의 경우 최적 pH는 5.0~6.0, 최적 온도는 50~55 °C이며, Pulpzyme HB (Novo-Nordisk Co.)는 pH 6~8과 온도 50~55°C에서 최적으로 적용할 수 있다(Viikari *et al.* 1994; Vicuna *et al.* 1997).

3. Kraft pulp의 표백과정에 대한 효소 전처리의 영향

표백 전처리 과정에 있어서 xylanase 효소는 비교적 적은 양으로 투여되는 데 펄프 함유 xylan의 10% 이하로만 용해되어도 효능이 나타나는 것으로 알려지고 있다(Buchert *et al.* 1992). 또한 Ratto 등(1994)은 침엽수와 활엽수의 펄프에 30 units/g pulp의 양으로 *Dictyoglomus* xylanase를 처리하였을 때 kraft pulp 건조 무게의 0.96%와 3.62%의 xylan 즉 펄프 함유 xylan 대비로는 15.5%와 14.5%가 용해되었다고 한 바 있다.

본 실험에서는 침엽수와 활엽수의 kraft pulp (50 g/l)에 *Cephalosporium* sp. RYM-202이 생산하는 xylanase (30 units/g pulp)를 처리 한 후 50°C에서 반응시켰다. 반응 시간별 가수분해 양상은 Fig. 4에서와 같이 반응 개시 후 16시간까지는 지속적으로 증가하였으나 이후의 분해율은 다소 둔화되었다. 이 시기 침엽수와 활엽수에서의 xylan 용해율은 각각 8.2 mg/g pulp와 24.6 mg/g pulp로 나타났으며, 활엽수의 경우에서 높은 용해율을 보였는 바 이는 침엽수에 비해 pulp 단위 무게 당 xylan 비율이 높기 때문으로 사료된다(Kuhad & Singh 1993). 한편 *Cellulomonas*와 *Pseudomonas*의 몇몇 xylanase (50 units/g pulp, 16 h, 37°C)의 경우에는 침엽수와 활엽수의 펄프에 대해 각각 2~4.5 mg/g pulp와 2~24 mg/g pulp의 용해율을 보였는데(Clarke *et al.* 1997), 본 실험에서의 *Cephalosporium* xylanase는 이에 비해 다소 높은 용해율을 보였다.

Table 2. Effect of pretreatment (16 h, 50°C) with *Cephalosporium* sp. RYM-202 xylanase (30 units/g pulp) on the delignification of softwood and hardwood kraft pulps (In references the enzyme preparation was replaced by the buffer)

Pulp	Treatment	Reducing sugars (mg/g pulp)	Kappa number
Softwood	Xylanase	8.2	54.2
	Reference	1.5	57.9
Hardwood	Xylanase	24.6	30.6
	Reference	1.7	32.6

한편 펄프 생산공정에서의 표백과정은 매우 다양하며 다단계의 표백과정 즉 lignin 제거과정이 수반되고 있다.

Table 3. Effect of pretreatment (16 h, 50°C) with *Cephalosporium* sp. RYM-202 xylanase (30 units/g pulp) on the physical properties of paper handsheets (In references the enzyme preparation was replaced by the buffer)

Pulp	Treatment	Density (g/cm^3)	Breaking length (Km)	Burst index (Kpa · m^2/g)	Tear index (mN · m^2/g)	Brightness (%)
Softwood	Xylanase	0.51	2.25	0.023	135.9	32.7
	Reference	0.49	1.96	0.020	172.2	31.8
Hardwood	Xylanase	0.55	1.31	0.018	87.8	41.2
	Reference	0.51	1.45	0.016	109.7	40.0

하지만 일반적으로 실험실내에서 표백 과정에 대한 효소 전처리의 효과를 조사하기 위해서는 H_2O_2를 표백제로 하는 일단계 표백과정(single-stage peroxide delignification)을 주로 사용하고 있다(Ratto *et al.* 1994; Clarke *et al.* 1997). 이에 본 실험에서는 xylanase 효소에 의해 전처리된 kraft pulp와 미처리된 kraft pulp(대조구)를 H_2O_2로 표백한 후 kappa number를 측정하였다. Table 2에서 보는 바와 같이 대조구에 비하여 전처리된 kraft pulp에서 보다 높은 lignin 제거효과가 나타났는데 침엽수에서는 3.7, 활엽수에서는 2.0 단위가 향상되어 각각 약 6.3%과 6.1% 정도 효과가 향상된 것으로 나타났다. Clarke 등(1997)은 xylanase 처리 농도와 kappa number의 감소 효과와의 관계는 50 units/g pulp의 효소 농도까지 직선 비례한다고 하였으며, 또한 처리시간의 경우 16시간까지는 표백효과 상승을 나타내지만 더 이상의 반응시간은 표백 증진 효과가 나아지지 않았다고 기술하였다.

4. 수초지의 물성에 대한 xylanase 효소 전처리의 영향

xylanase에 의한 전처리가 종이 물성에 미치는 영향을 조사하기 위해 효소 전처리 후 표백과정을 거친 침엽수와 활엽수 pulp를 재료로 수초지를 제조하였다. 이들 수초지는 일련의 표준과정에 준해 제조된 후 그 물성 측정이 이루어졌으며, 그 결과는 효소 전처리 과정 없이 표백한 pulp 수초지의 측정 결과와 비교하였다(Table 3). 백색도의 결과를 살펴보면 xylanase 전처리 과정을 통해 침엽수 kraft pulp로 제조된 수초지의 경우에는 0.9 points, 활엽수 pulp 수초지의 경우에는 1.2 points 각기 증진된 것으로 나타났다. Ratto 등(1994)은 본 실험과 유사한 조건으로 *Dictyoglomus* xylanase를 처리함으로써 침엽수 pulp에서 2.0 points 상승효과를 획득한 바 있다.

Xylanase 전처리 과정이 pulp 섬유 구성(fibre integrity)에 미치는 영향을 조사하기 위하여 수초지의 밀도(density), 열단장(breaking length), 파열강도(burst index), 인열강도(tear index)에 대한 측정을 수행하였다. 이러한 수초지 물성 측정은 표백과정에의 xylanase 적용 가능성을 가늠하는 데도 중요하지만 종이의 최종 용도를 결정하는 중요한 인자이다. 그 결과를 살펴보면 효소 전처리 과정을 거친 수초지에 있어 종이 내구성의 척도인 열단장은 활엽수의 경우에 다소 감소하였으나 침엽수의 경우에는 다소 증가하는 양상을 보였다. 침엽수와 활엽수 pulp의 수초지 모두 비록 인열강도에 있어서는 다소 감소하는 경향이 있었으나 파열강도는 큰 변화가 없는 것으로 나타났다.

이상의 결과들을 고려하여 볼 때 호알칼리성 *Cephalospotium* sp. RYM-202의 알칼리내성 xylanase는 표백효과 증진을 위한 알칼리 조건하에서의 펄프 전처리 과정에 적합한 특성을 지니고 있는 것으로 나타났다. 따라서 본 *Cephalospotium*xylanase는 향후 펄프 제지 산업에서 유용하게 사용될 수 있는 잠재성을 지닌 것으로 판단되며, 이를 위해서 효소의 생산성 향상 등을 위한 제반 연구가 필요하다고 사료된다.

사 사

이 논문은 1997년 한국학술진흥재단의 공모과제(1997-004-D00021) 연구비의 지원에 의하여 수행되었으며, 이에 감사드린다.

참 고 문 헌

Anand L, S Krishnamurthy & PJ Vithayathil (1990) Purification and properties of xylanases from the thermophilic fungus, *Humicola lanuginosa* (Griffon and Maublanc) Bunce. *Arch. Biochem. Biophys.* **276** : 546-553.

Berenger JF, C Frixon, J Bigliardi & N. Creuzet (1985) Production, purification, and properties of thermostable xylanase from *Clostridium stercorarium*. *Can. J. Microbiol.* **31** : 635-643.

Buchert J, M Ranua, A Kantelinen & L Viikarii (1992) The

role of two *Trichoderma reesei* xylanases in the bleaching of pine kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37** : 825-829.

Christov LP & BA Prior (1994) Enzymatic prebleaching of sulphite pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **42** : 492-498.

Clarke JH, JE Rixon, A Ciruela, HJ Gilbert & GP Hazlewood (1997) Family-10 and Family-11 xylanase differ in their capacity to enhance the bleachability of hardwood and softwood paper pulps. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **48** : 177-183.

Dey D, J Hinge, A Shendye & M Rao (1991) Purification and properties of extracellular endoxylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* sp. *Can. J. Microbiol.* **38** : 436-442.

Gilbert HJ & GP Hazlewood (1993) Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* **139** : 187-194.

Gomes J, H Purkarthofer, M Hayn, J Kapplmuller, M Sinner & W Steiner (1993) Production of a high level of cellulase-free xylanase by the thermophilic fungus *Thermomyces lanuginosus* in laboratory and pilot scales using lignocellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **39** : 700-707.

Gubitz GM, T Lischnig, D Stebbing & JN Saddler (1997) Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps. *Biotechnol. Lett.* **19** : 491-495.

Hrmova M, P Biely & M Vrsanska (1989) Cellulose and xylan-degradading enzymes of *Aspergillus terreus* and *Aspergillus niger*. Enzyme Microb. Technol. 11:610-616.

Kang MK & YH Rhee (1995a) Carboxymethyl cellulases active and stable at alkaline pH from alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202. *Biotechnol. Lett.* **17** : 507-512.

Kang MK, TI Kwon, YK Yang & YH Rhee (1995b) Purification and characterization of a xylanase from alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202. *Jour. Microbiol.* **33** : 109-114.

Kang MK, HM Park, YH Rhee, YS Kim & YK Kim (1993) Partial purification and some properties of carboxymethyl cellulases from *Cephalosporium* sp. RYM-202. *Kor. J. Mycol.* **21** : 301-309.

Kang MK, PJ Maeng & YH Rhee (1996a) Mode of action and chemical modification of a xylanase (CX-III) from alkalophilic *Cephalosporium* sp. RYM-202. *Kor. J. Mycol.* **24** : 255-264.

Kang MK, PJ Maeng & YH Rhee (1996b) Purification and characterization of two xylanases from alkalophilic *Cephalosporium* sp. strain RYM-202. *Appl. Environ. Microbiol.* **62** : 3480-3482.

Kim HJ, SO Kang & YC Hah (1993) Production and characterization of xylanase II from from *Trichoderma koningii* ATCC 26113. *Kor. J. Microbiol.* **31** : 157-165.

Kuhad RC & A Singh (1993) Lignocellulose biotechnology : current and future prospects. *Crit. Rev. Biotechnol.* **13** : 151-172.

Lowry OH, NJ Rosebrough, AL Farr & RJ Randall (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **19** : 265-275.

Lundgren KR, L Bergkvist, S Hogman, H Joves, G Eriksson, T Bartfai, J van der Laan, E Rosenberg & Y Shoham (1994) TCF mill trial on softwood pulp with Korsnas thermostable and alkaline stable xylanase. *FEMS Microbiol. Rev.* **13** : 365-368.

Mathrani IM & BK Ahring (1992) Thermophilic and alkalophilic xylanases from several *Dictyoglomus isolates*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **38** : 23-27.

Miller GL (1959) Use of dinitrosalicylic acid reagent for determination of reducing sugar. *Anal. Chem.* **31** : 426-428.

Nakamura S, K Wakabayashi, R nakai, R Aono & K Horikoshi (1993) Purification and some properties of an alkaline xylanase from alkalophilic *Bacillus* sp. strain 41M-1. *Appl. Environ. Microbiol.* **59** : 2311-2316.

Ohkoshi A, T Kudo, T Mase & K Horikoshi (1985) Purification of three types of xylanases from an alkalophilic *Aeromonas* sp. *Agric. Biol. Chem.* **49** : 3037-3038.

Okazaki W, T Akiba, K Hirikoshi & R Akahoshi (1985) Purification and characterization of xylanases from alkalophilic thermophilic *Bacillus* spp. *Agric. Biol. Chem.* **49** : 2033-2039.

Paice MG, N Gurnagul, DH Page & L Jurasek (1992) Mechanism of hemicellulose-directed prebleaching of kraft pulps. *Enzyme Microb. Technol.* **14** : 272-276.

Ratto M, IM Mathrani, B Ahring & L Viikari (1994) Application of thermostable xylanase of *Dictyoglomus* sp. in enzymatic treatment of kraft pulp. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **41** : 130-133.

Ratto M, K Poutanen & L Viikari (1992) Production of xylanolytic enzymes by an alkalitolerant *Bacillus circulans* strain. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **37** : 470-473.

Rhyum SB, MK Kang, PJ Maeng, HM Park & YH Rhee (1993) Purification and characterization of xylanases from alkalophilic *Streptomyces* sp. S-510. *Kor. J. Microbiol.* **31** : 436-444.

Senior DJ, PR Mayers & JN Saddler (1991) The interaction of xylanases with commercial pulp. *Biotechnol. Bioeng.* **37** : 274-279.

Simpson HD, UR Haufler & RM Daniel (1991) An extremely thermostable xylanase from the thermophilic eu-

bacterium *Thermotoga*. *Biochem. J.* **277** : 413-417.

TAPPI (1991) TAPPI test methods. TAPPI press, Atlanta.

Tan LUL., P Mayers & JN Saddler (1987) Purification and characterization of a thermostable xylanase from a thermophilic fungus Thermoascus aurantiacus. *Can. J. microbiol.* **33** : 689-692.

Tsujibo H, K Miyamoto, T Kuda, K Minami, T Sukamoto, T Hasegawa & Y. Inamori (1992) Purification, properties and partial amino acid sequences of thermostable xylanases from *Streptomyces thermoviolaceus*. *Appl. Environ. Microbiol.* **58** : 371-375.

Vicuna R, F Escobar, M Osses & A Jara (1997) Bleaching of eucalyptus kraft pulp with commercial xylanases. *Biotechnol. Lett.* **19** : 575-578.

Viikari L, A Kantelinen, J Sundquist & M. Linko (1994) Xylanases in bleaching: From an idea to the industry. *FEMS Microbiol. Rev.* **13** : 351-364.

Vyas P, V Chauthaiwale, S Phadatare, V Deshpande & M. C. Srinivasan (1990) Studies on the alkalophilic *Streptomyces* with extracellular xylanolytic activity. *Biotechnol. Lett.* **12** : 225-228.

Wong KKY, LUL Tan & JN Saddler (1988) Multiplicity of β-1, 4-xylanase in microorganisms: function and applications, *Microbiol. Rev.* **52** : 305-317.

Application of Alkaline Xylanase of *Cephalosporium* sp. RYM-202 in Enzymatic Treatment of Kraft Pulps

Myoung-Kyu Kang, Young-Ha Rhee[1], Byong-Hyun Kim[2] and Yang Jeon[3]

(Department of Environmental Technology, Tonghae College, Tonghae 240-150, Korea
[1]Department of Microbiology, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea
[2]Department of printing Technology, Joong Bu University, Kumsan 312-940, Korea
[3]Department of Forest Products, Chungnam National University, Taejeon 305-764, Korea)

Abstract - Enzyme-aided bleaching of softwood and hardwood kraft pulps by a xylanase preparation from an alkalophilic fungus *Cephalospotium* sp. RYM-202 was studied. Maximal solubilization of pulp xylan was obtained at 50°C in both kraft pulps. The optimum pH of the enzyme for the hydrolysis of pulp xylan was 8.0 and more than 90% of the maximal activity was detected at 9.0. The positive effects of xylanase pretreatment on bleachability of softwood and hardwood kraft pulps were observed. The kappa number of softwood and hardwood kraft pulps was decreased by 3.7 and 2.0 units, respectively. The pulp fibre integrity was not significantly affected by xylanase pretreatment when the physical properties of handsheets made from xylanase-treated pulps were compared with those of handsheets from untreated pulps. These results indicate that the alkaline xylanase of *Cephalospotium* sp. RYM-202 is well suitable for application in enzymatic prebleaching of softwood and hardwood kraft pulps under the alkaline conditions. [Enzyme-aided prebleaching, Kraft pulp, Xylan solubilization, Alkaline xylanase, Alkaline condition].