

Horseradish Peroxidase와 라디칼 전달체를 이용한 Kraft 펄프의 표백

†류근갑·¹권오열
울산대학교 화학공학부, ¹서울산업대학교 환경공학부
(접수 : 2001. 3. 14., 게재승인 : 2001. 4. 17.)

Enzymatic Bleaching of Kraft-pulp with Horseradish Peroxidase and Radical Mediator

Keun-Garp Ryu† and O-Yul Kwon¹

Department of Chemical Engineering, The University of Ulsan, Ulsan 680-749,

¹Department of Environmental Engineering, Seoul National University of Technology, Seoul 139-743

(Received : 2001. 3. 14., Accepted : 2001. 4. 17.)

The use of 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS) as a radical mediator enhanced the bleaching efficiency of kraft pulp by horseradish peroxidase(HRP) and H₂O₂. High concentrations of up to 20 mM H₂O₂ were used. The bleaching of the kraft pulp increased as the amount of HRP and ABTS concentration were increased up to 0.3 mg/90 mL and 2 mM, respectively. The bleaching of the kraft pulp was closely related with the HRP's activity and its adsorption onto the pulp. The activity of HRP and bleaching of kraft pulp were maximum at pH 7 and were reduced either in a acidic or alkaline solutions. The adsorption of HRP onto pulp was low in solutions of pH 6-8 and high in an acidic(pH 5) and an alkaline solutions(pH 9). The adsorption of the enzyme was greater for alkali-lignin than for crystalline cellulose, the two major components of pulp.

Key Words : kraft pulp, bleaching, peroxidase, radical mediator, adsorption

서론

대부분의 표백펄프는 알칼리추출공정과 염소표백공정을 통해서 목재로부터 리그닌을 제거하는 kraft공정에 의해서 생산되고 있다. 따라서 펄프표백공정으로부터 다양한 염소성 유기물질들이 배출되고 있다. 그러나 염소성 유기물질은 환경에 유해한 물질로서 배출농도가 엄격히 규제되고 있으므로 펄프표백 시 염소의 사용량을 줄일 수 있는 대체공정을 개발하기 위한 연구가 수행되어 왔다(1). 이러한 대체공정에는 산소, 오존, 과산화수소등을 사용한 물리화학적 방법과 자연상태에서 목질을 분해하는 미생물 및 관련 효소를 사용하는 생물공학적 방법들이 연구되어 왔다. 그러나 물리화학적 방법은 2차 오염문제를 발생시키는 경향이 있으며 미생물을 이용하는 방법은 약 1주일의 긴 처리시간이 필요한 단점이 있다. 따라서 반응시간이 짧고 2차 오염문제를 발생하지 않는 효소를 이용한 방법이 가장 실용적이다.

펄프표백을 위하여 사용되고 있는 효소로서는 펄프내에서

셀룰로스와 리그닌을 결합시키고 있는 hemicellulose를 분해하는 효소인 xylanase가 가장 효율이 높은 것으로 밝혀졌다(2,3). 그러나 xylanase를 이용해서 펄프를 전처리 하는 경우 펄프의 수율이 감소하는 단점이 있다. 따라서 xylanase외에 리그닌과 직접 반응하는 효소인 peroxidase를 이용한 공정의 개발이 연구되고 있다(4). Peroxidase는 H₂O₂와 함께 사용하면 페놀 등의 방향성 물질을 라디칼로 산화시키는 효소로서, 이 효소를 이용해서 리그닌을 분해시킬 수 있는 반응방법이 개발될 경우 펄프수율의 감소를 줄일 수 있을 것으로 예상된다.

리그닌의 분해반응에 관련이 있는 효소로는 laccase, manganese peroxidase, lignin peroxidase 등이 있다(5). 그러나 *Phanerochaete chrysosporium*으로부터 분리된 lignin peroxidase를 사용하였을 때 펄프의 표백효율이 미약한 것으로 관찰되었다(5). 효소는 수용성이므로 비 수용성인 리그닌과의 반응성을 향상시키기 위해서 분자량이 적은 효소기질을 라디칼 전달체로 사용하는 방법이 연구되고 있다. *Phanerochaete chrysosporium*로부터 분리된 lignin peroxidase와 함께 veratryl alcohol을 라디칼 전달체로 사용하면 lignin의 분해가 증가된다(6). 또한 Paice 등(4)과 Bourbonnais와 Paice(7,8)는 *Trametes versicolor*로부터 분리된 laccase를 사용할 경우 ABTS를 첨가하면 표백 효율이 향상된다고 보고하였다. 그러

†Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
The University of Ulsan, Ulsan 680-749
Tel : +82-52-259-2822, Fax : +82-52-259-1689
E-mail : kgryu@uou.ulsan.ac.kr

나 lignin peroxidase 및 laccase는 pH 4 정도의 산성용액에서 최적활성을 가지고 있으며, H₂O₂에 의해서 쉽게 활성을 잃으므로 알칼리 용액에서 이루어지는 기존의 펄프표백공정에 적용할 경우 실용성 및 경제성이 미약하다. 반면에 HRP는 pH 5-7 범위에서 최적활성을 가지므로 lignin peroxidase 및 laccase를 이용할 경우보다 실용성이 우수할 것으로 예상된다. 류 등(9,10)은 HRP 및 H₂O₂와 함께 페놀성 물질을 라디칼전달체로 사용하여 kraft 펄프를 표백시키는 실험이 시도하였다. 이때 guaiacol (2-methoxyphenol)을 사용하였을 경우 펄프의 표백효율이 향상됨을 보였다. 그러나 H₂O₂의 농도가 0.1 mM이하로 유지될 경우에만 guaiacol이 라디칼 전달체로서 역할을 하는 문제가 있었다. 즉 0.1 mM이하의 낮은 농도의 H₂O₂만을 사용해야 할 경우 반응속도가 느리고 공정조건의 유지가 까다롭다.

본 연구에서는 peroxidase의 기질 중 ABTS가 저농도는 물론 고농도인 20 mM H₂O₂와 함께 사용될 수 있음을 밝혀내었으며 펄프전처리를 위한 최적 효소반응 조건을 구하였다. 또한 peroxidase의 펄프에의 흡착성과 표백효과와의 상관관계도 연구하였다.

재료 및 방법

시약 및 재료

미표백 펄프는 동해펄프(주)에서 제공받았다. CPZ(chlorpromazine)와 ABTS는 Aldrich에서 알칼리 리그닌(Indulin AT)과 HRP (Type II)는 Sigma에서 그리고 결정형 셀룰로즈인 avicel(PH-101)은 Fluka에서 구입하였다.

펄프의 리그닌 함량 측정

펄프의 리그닌 함량은 kappa number로 나타내며 리그닌의 함량은 kappa number를 7로 나눈값이 된다. Kappa number는 건조펄프 1 g에 의해 소비된 0.1 N KMnO₄용액의 소비된 양 (mL)으로 나타내며 TAPPI T 236 cm-85의 문헌에서 제시된 방법에 따라서 측정 하였다.

펄프의 전처리 및 알칼리 추출

증류수로 세척하고 공기중에서 건조된 펄프 200 g을 완충용액 (50 mM KH₂PO₄, pH 7.0) 2 L에 담고 40℃에서 30 분간 약 260 rpm의 속도로 교반하여 펄프를 해리한 후 원심분리기로 탈수하였다. 250 mL flask에 80 mL의 완충용액을 투입하고 H₂O₂와 CPZ 또는 ABTS를 첨가하고 약 10분간 교반하였다. 이 용액에 탈수된 펄프 15 g을 투입하고 효소가 녹아 있는 완충용액 10 mL를 첨가한 후 40℃에서 3시간 동안 교반하였다. 효소반응이 끝난 후 펄프를 증류수로 세척하고 원심분리기로 탈수 시켰다. 효소반응 후 탈수된 펄프를 0.05 N NaOH용액에 투입한 후 70℃에서 90분 동안 추출하였다. 효소반응 및 추출용액 내의 펄프건조무게 함량(consistency)은 4%였다. 추출이 끝난 후 펄프를 증류수로 세척하고 탈수시킨 후 kappa number를 측정하였다.

Kraft-pulp에 대한 효소흡착 실험

Peroxidase를 0-1 mg/mL 포함하고 있는 완충용액 1.5 mL

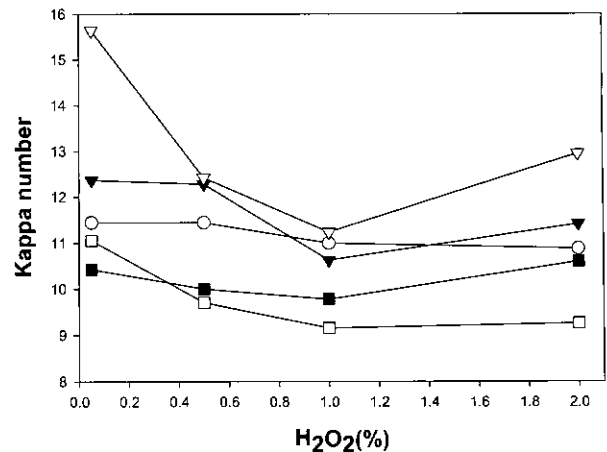


Figure 1. Effects of radical mediators, CPZ and ABTS, on the alkaline extraction of kraft pulp in the presence of horseradish peroxidase(1 mg/90 mL) and H₂O₂ at various concentrations. Buffer used was 50 mM KH₂PO₄ at pH 7.0. The concentration of radical mediator was 0 mM (○), 0.2 mM CPZ(▼), 2.0 mM CPZ(▽), 0.2 mM ABTS(■), and 2.0 mM ABTS(□).

에 세척한 펄프 15 mg을 투입하였다. 이 용액을 40℃에서 1 시간 동안 교반한 후 원심분리하여 여액을 취하였다. 여액에 남아있는 peroxidase의 양은 403 nm에서의 흡광도를 측정하여 구하였다.

결과 및 고찰

Peroxidase와 라디칼 전달체를 이용한 펄프의 표백

Peroxidase의 기질이 라디칼 전달체의 역할을 하는 것은 기존의 여러 연구자들에 의해서 보고되었다. 예를 들면 hydrazine은 HRP와의 반응성이 미약하지만 반응용액에 효소가질인 CPZ를 같이 사용하면 hydrazine의 산화속도가 증가된다(11). 본 실험에서는 라디칼전달체로서 CPZ 또는 ABTS를 사용하고 여러 가지 농도의 H₂O₂를 사용했을 때 HRP에 의한 펄프로부터 리그닌의 알칼리 추출효율을 실험하였다. Figure 1에서와 같이 CPZ를 사용하였을 경우 표백효율이 오히려 감소하였다. 그러나 ABTS를 사용할 경우 넓은 범위의 H₂O₂농도에서 표백효율이 증가하였으며, H₂O₂의 농도가 건조펄프무게의 1%(11 mM)일 때 리그닌의 추출효율이 가장 높았다. 따라서 kraft 펄프 표백을 위해서 peroxidase를 사용할 경우 H₂O₂의 농도를 약 0.1 mM 이하로 낮게 유지해야 하는 문제점을 해결할 수 있었다. 또한 Figure 2에서와 같이 kraft펄프의 전처리에서 사용된 완충용액의 pH를 5-9 사이에서 변화시켰을 경우 pH 7용액에서 펄프의 표백효율이 가장 높았다. 또한 HRP의 활성 역시 pH 7에서 가장 높았다. 따라서 기존의 알칼리 용액에서 이루어지는 펄프표백 방법인 kraft 공정에 HRP를 이용할 경우 용액의 pH를 조절하기 위한 산 및 알칼리의 사용량을 최소화 할 수 있을 것이다.

다음에는 효소사용량이 펄프의 표백에 미치는 영향을 조사하였다. 효소의 사용량을 완충용액 90 mL당 0-30 mg 범위에서 변화시켰을 경우 Figure 3에서와 같이 효소의 양이 0.3 mg 이상일 경우 펄프의 표백정도는 더 이상 증가하지 않았다.

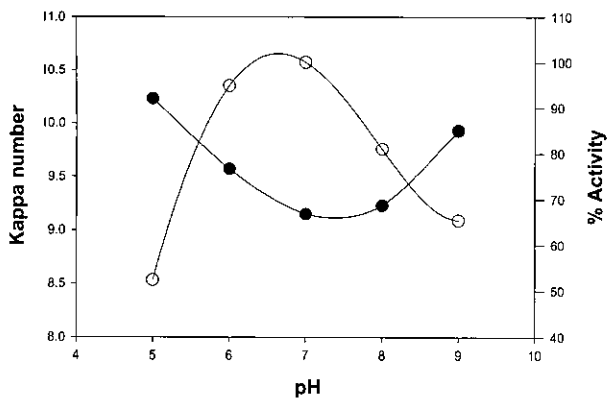


Figure 2. Dependence on solution pH of horseradish peroxidase's activity(○) and the enzymatic pretreatment efficiency of kraft pulp (●). Buffers (50 mM) used were sodium acetate (pH 5), potassium phosphate (pH 6, 7, 8), and sodium carbonate (pH 9). Pretreatment conditions (40°C, 3h): H₂O₂, 1% of dry pulp; HRP, 1 mg/90 mL buffer; ABTS, 2 mM.

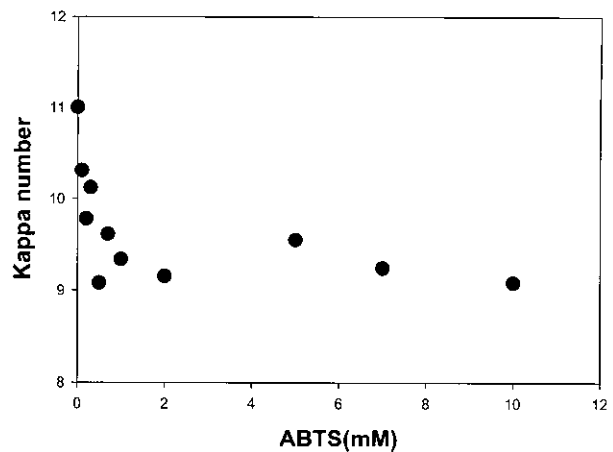


Figure 4. Effects of ABTS concentration on the enzymatic pretreatment efficiency of kraft pulp. Pretreatment conditions (40°C, 3h): 50 mM potassium phosphate, pH 7; H₂O₂, 1% of dry pulp; HRP, 1 mg/90 mL buffer.

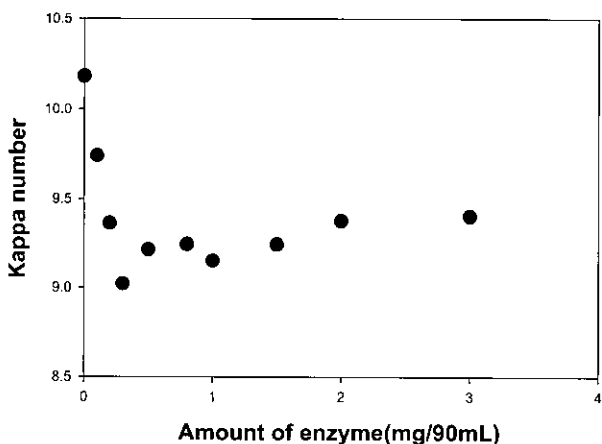


Figure 3. Effect of enzyme amount on the enzymatic pretreatment efficiency of kraft pulp. Pretreatment conditions (40°C, 3h): 50 mM potassium phosphate, pH 7; H₂O₂, 1% of dry pulp; ABTS, 2 mM.

또한 펄프의 효소반응 중 매 1시간마다 1 mg의 효소를 추가로 공급해서 총 3 mg을 사용했을 경우에도 kappa number의 감소정도는 효소반응 초기에 일시에 효소를 3 mg 투입했을 경우와 비슷하였다. 이러한 결과는 효소가 펄프의 전처리 도중에 활성을 잃었기 때문인 것은 아닌 것으로 추측되었다. 또한 Figure 4에서와 같이 라디칼 전달체인 ABTS의 사용농도를 0-10 mM 범위에서 변화시켰을 경우 ABTS의 초기농도가 1 mM 이상에서 펄프의 kappa number는 더 이상 감소하지 않았다. 위의 결과로부터 효소와 ABTS의 사용량에 따른 펄프 리그닌의 추출효과는 일정한 수준 이상으로 증가하지 않음을 알 수 있었다. 이러한 결과로부터 효소반응에 의해서 생성된 ABTS 라디칼과 펄프 리그닌 사이의 반응속도가 일정한 수준 이상으로는 증가하지 않는 것을 알 수 있었다. 이는 펄프의 구조로 인해서 ABTS 라디칼이 펄프 리그닌에 접촉할 수 있는 정도가 제한을 받는 것으로 해석할 수 있었다. 특히 펄프 리그닌은 알칼리 용액에서 용해도가 증가하므로 전 처리시 알칼리 용액을 사용하면 ABTS 라디칼과의 반응

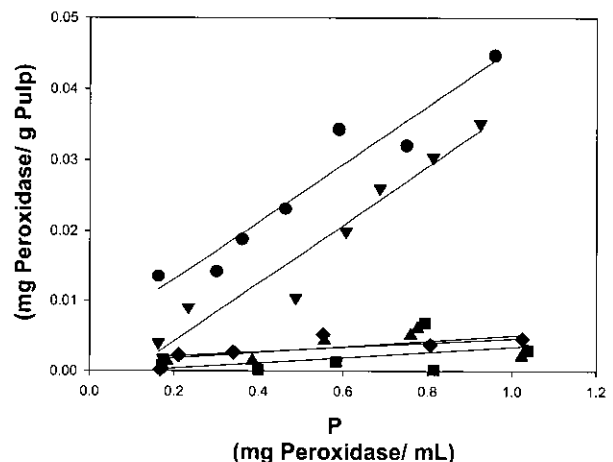


Figure 5. Adsorption isotherms of horseradish peroxidase on kraft pulp at various pH at 40°C. Buffers (50 mM) used were sodium acetate, pH 5(●); potassium phosphate, pH 6(◆) and 7(■); Tris-HCl, pH 8(▲); sodium carbonate, pH 9(▼).

성을 증가시킬 수 있을 것으로 추측된다. 따라서 향후 알칼리 용액에서 활성이 우수한 peroxidase를 개발할 필요가 있다.

Horseradish Peroxidase의 펄프에의 흡착성과 펄프 표백 효율과의 상관관계

효소는 펄프를 구성하고 있는 성분인 셀룰로스와 리그닌에 흡착한다(12). 따라서 본 연구에서도 HRP의 펄프 흡착도를 40°C에서 측정하고 흡착도와 표백효과와의 상관관계를 측정하였다. Figure 5의 흡착등온선에서 보듯이 kraft 펄프에 대한 HRP의 흡착강도는 용액의 pH에 민감하게 의존하였다. Figure 5에서와 같이 펄프에 대한 효소의 흡착등온선은 본 실험범위 내에서 Langmuir흡착 곡선이 아닌 선형이었으므로 흡착등온선의 기울기로부터 흡착강도의 값을 구하였다. 이때 효소의 흡착강도는 평형상태에서 펄프에 흡착되어 있는 효소의 양(mg 효소/g 펄프)과 용액에 용해되어 있는 효소의 양

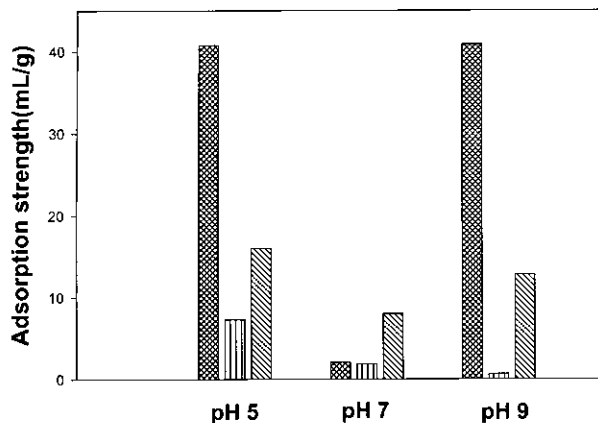


Figure 6. Adsorption strength of horseradish peroxidase on kraft pulp(▨), crystalline cellulose(▧) and alkali-lignin(▩) at various pHs.

(mg 효소/mL 용액)의 비(mL 용액/g 펄프)로 나타내었다. 효소의 펄프에 대한 흡착강도는 pH 5인 산성용액과 pH 9인 알칼리성 용액에서 각각 40.8 mL/g과 40.9 mL/g이었으며 pH 6, 7, 8인 중성 부근의 용액에서는 각각 3.08, 2.04, 및 3.94 mL/g로 pH 5 및 pH 9인 용액에서의 흡착강도의 약 1/10 정도로 감소하였다. Figure 2에서 보듯이 효소의 활성 역시 pH 6-8 용액에서 최대 값을 가지므로 HRP를 이용한 kraft 펄프의 표백효율은 효소의 활성과 펄프에의 효소흡착강도와 상관관계가 매우 높은 것을 알 수 있었다. 즉 효소활성이 높을수록 그리고 펄프에의 효소흡착강도가 낮을수록 효소에 의한 펄프표백 효율이 증가하였다.

또한 펄프의 주요 구성성분인 셀룰로스와 리그닌의 모델물질로서 결정형 셀룰로즈인 avicel과 알칼리 리그닌인 Indulin AT를 각각 이용해서 pH 5, 7, 9인 용액에서 HRP의 흡착등온실험을 수행하였다. Avicel 및 Indulin AT에 대한 효소흡착등온선 역시 선형이었으며 Figure 6에서와 같이 일반적으로 avicel에 대한 효소흡착강도는 리그닌에 대한 효소흡착강도보다 낮았다. 또한 avicel에 대한 효소흡착강도는 용액의 pH가 증가할수록 감소하였으나 리그닌에 대한 효소흡착강도는 pH 5 및 pH 9인 용액에서 높았고 pH 7용액에서 가장 낮았다. 따라서 HRP는 펄프에 포함되어 있는 리그닌에 대부분 흡착하며 중성용액을 이용하면 효소의 흡착을 최소화할 수 있었다. 이와 같이 결정형 셀룰로즈보다 리그닌에 대한 HRP의 흡착강도가 높은 현상은 xylanase의 경우와 같으므로(12) 효소를 이용한 kraft pulp의 표백효율 향상 연구시 고려해야 할 중요한 현상이다.

요 약

Horseradish peroxidase(HRP) 및 H₂O₂와 함께 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonic acid)(ABTS)를 라디칼 전달체

로서 사용하면 kraft 펄프의 표백효율이 증가하였다. 이때 반응에 사용할 수 있는 H₂O₂의 농도는 약 20 mM까지 증가시킬 수 있었다. Kraft 펄프의 표백효율은 효소의 사용량을 0.3 mg/90 mL 까지, ABTS의 농도를 2 mM 까지 높일 수록 증가하였으나 이후에는 더 이상 증가하지 않았다. 또한 HRP에 의한 펄프표백 효율은 효소의 활성 및 펄프에의 흡착강도와 밀접한 관련이 있었다. HRP의 활성과 kraft 펄프의 표백효율은 pH 7에서 가장 높았으며 산성용액과 알칼리성 용액에서는 감소하였다. 또한 HRP의 펄프흡착 강도는 pH 6-8에서 가장 낮았고 산성용액(pH 5) 및 알칼리성 용액(pH 9)에서 가장 높았다. 펄프의 주요구성 성분인 결정형 셀룰로스와 리그닌 중 리그닌에 대한 효소의 흡착강도가 더욱 높았다.

REFERENCES

- Hileman, B (1993), Concerns broaden over a chlorine and chlorinated hydrocarbons, *C&E News*, **17**, 11-20.
- Bajpai, P. and P. K. Bajpai (1992), Biobleaching of kraft pulp, *Process Biochemistry*, **27**, 319-325.
- Daneault, C., C. Leduc, and J. L. Valade (1994), The use of xylanases in kraft pulp bleaching: a review, *Tappi J.* **77**(6), 125-131.
- Paice, M. G., R. Bourbonnais, and I. D. Reid (1995), Bleaching kraft pulps with oxidative enzymes and alkaline hydrogen peroxide, *Tappi J.* **78**(9), 161-168.
- Eriksson, K.E.L. (1993), Concluding remarks: Where do we stand and where are we going? Lignin biodegradation and practical utilization, *J. Biotechnol.* **30**, 149-158
- Harvey, P. J., H. E. Schoemaker, and J. M. Palmer (1986), Veratryl alcohol as a mediator and the role of radical cations in lignin biodegradation by *Phanerochaete chrysosporium*, *FEBS Lett.* **195**(1,2), 242-246.
- Bourbonnais, R. and M. G. Paice (1990), Oxidation of non-phenolic substrates. An expanded role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Lett.* **267**(1), 99-102.
- Bourbonnais, R. and M. G. Paice (1992), Demethylation and delignification of kraft pulp by *Trametes versicolor* laccase in the presence of 2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulphonate), *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **36**, 823-827.
- Ryu, K. (1995), The effect of radical carriers on the enzymatic bleaching of kraft pulp, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.*, **10**(2), 183-190.
- Ryu K. and S. Rho (1996), Enhancement of the bleaching efficiency of kraft pulp by enzymatic pretreatments, *Hwahak Konghak*, **34**(6), 778-782.
- Goodwin, D. C., T. A. Grover, and S. D. Aust (1997), Roles of efficient substrates in enhancement of peroxidase-catalyzed oxidations, *Biochemistry*, **36**(1), 139-147.
- Ryu, K. and Y. Kim (1998), Adsorption of a xylanase purified from pulpzyme HC onto alkali-lignin and crystalline cellulose, *Biotechnol. Lett.* **20**(10), 987-990.