

호알칼리성 목질분해 효소를 이용한 폐지 재생(제2보)

— 알칼리성 목질분해 효소 정제 및 섬유 반응 특성 —

강석현 · 이중명* · 박성배 · 엄태진[†]
(2003년 2월 8일 접수: 2004년 1월 19일 채택)

Recycling of Waste Paper with Alkaline Cellulolytic Enzyme (II)

— Purification of alkaline cellulolytic enzymes and characteristics of reaction with fiber —

Suk-Hyun Kang, Jung-Myoung Lee,* Soung-Bae Park and Tae-jin Eom[†]

(Received on February 8, 2003; Accepted on January 19, 2004)

ABSTRACT

Alkaline cellulolytic enzymes from cultured medium of *Coprinus cinereus* 2249 were purified with gel and ion-exchange chromatography and characteristics of those enzyme proteins were investigated. A fiber length distribution and a crystallinity of cellulose and sugar composition of enzyme treated Mixed Office Wastepaper(MOW) and Unbleached Kraft Pulp(UKP) were analysed.

The conclusion could summarized as follows;

- ① Alkaline and acidic, endo- and exo-glucanases were purified from cultured medium of *Coprinus cinereus* 2249.
- ② The approximate molecular weight of alkaline endo-glucanase was 42 kDa, and also that of alkaline exo-glucanase was 50 kDa.
- ③ A fiber length distribution and a crystallization of cellulose and sugar composition of enzyme treated MOW and UKP were not so much changed with original paper and pulp.

Keywords : recycling, enzyme, deinking, bleaching, cellulose, sticky

• 경북대학교 임산공학과(Wood Sci. and Tech. Kyungbook Nat'l University, Daegu 702-701, Korea)
* Department of Paper Science, North Carolina State University, USA.
• 본 논문은 과학재단 특정기초연구(과제번호 1999-1-31700-002-2)의 지원에 의해 수행되었음.
† 주저자 (Corresponding author): e-mail; tjgom@knu.ac.kr

1. 서론

일반적으로 재생펄프를 사용하면 최종 제품의 물리적 특성이 떨어짐을 관찰 할 수 있다. 저하된 특성은 고해공정을 통하거나 화학적 처리를 통하여 어느 정도 극복 할 수 있다. 재생섬유 자체의 물성에 가장 큰 영향을 미치는 것은 종이 제조과정 중 건조공정이다. 건조공정을 거치는 횟수를 증가 시켜 보면 인장강도 등이 점차 떨어진다. 재생섬유의 물리적 성질에 미치는 중요한 인자는 섬유강도, 섬유장, 섬유의 팽윤성 및 섬유의 결합잠재력이다.

종이의 강도는 섬유자체의 강도와 섬유간의 결합에 의해 좌우되는데 섬유자체의 강도는 재생함에 따라 거의 변화가 없으나 섬유간의 결합은 섬유가 뻗뻗해지고 팽윤성 및 유연성이 떨어지는 등의 열화현상, 즉 섬유의 각질화에 의해 상당히 감소된다. 재생섬유를 사용하여 화장지를 생산하는 경우에는 섬유간의 결합력이 약해지는 것을 활용하면 티슈의 부드러움을 향상시키는데 도움이 될 수도 있으나 지분 발생은 오히려 늘어 날 수가 있다. 이와 관련하여 많은 강제 리사이클링 실험 및 강도 발현의 기본이론에 의한 재생펄프의 품질변화 특성과 원인은 대부분 파악되었으며^{1,2)} 최근에는 이러한 재생펄프의 품질향상 및 보완을 위한 연구가 많이 진행되고 있다.³⁻⁵⁾

이와 관련하여, 1997년 한해에 chemical abstract에 게재된 펄프-제지산업 분야에 있어서 효소의 응용에 관한 연구는 170여건, 특히는 45건 등으로 선진국을 중심으로 많은 연구가 활발히 진행되고 있음을 알 수 있다. 이러한 노력 중에 호알칼리성 목질분해효소의 생산과 이용에 관한 연구는 막 시작단계로서 그 역사가 길지 않음에도 불구하고 세계공업, 펄프-제지산업, 농산물 가공 등 다양한 분야에서 막대한 이용 가능성과 함께 잠재성 시장을 갖고 있는 분야로서 선진국과의 기술경쟁을 위해서 호알칼리성 목질분해 효소를 생산하는 균주의 확보 및 호알칼리성 목질분해효소를 활용한 섬유처리에 관한 연구가 많아지고 있다.⁶⁻⁹⁾

본 연구는 전보¹⁰⁾에 의해 단리된 알칼리성 목질분해 효소로부터 구성 효소단백질을 분리 정제하여 특성을 조사하고 지류물성에 미치는 영향을 분석

고찰한 것이다.

2. 재료 및 방법

2.1 효소의 정제

2.1.1 Gel 여과에 의한 정제

전보¹⁰⁾에 의해 단리된 조효소를 50 mM의 KH₂P O₄-NaOH(pH 7.5) 완충용액에 용해시키고 Sephadex G-25(glass column, 2 cm × 80 cm)가 충전된 column에 주입한 후 동일 완충용액을 0.6 mL/min.의 유속으로 용출 시켜 3 mL씩 분취 하였다. 단백질 농도는 UV Spectrophotometer (UNIKON 930, Japan)로 280 nm에서의 흡광도에 의해 검출하였다. 각 분획의 효소활성은 전보¹⁰⁾와 같이 측정하였다. 즉 pH 5.0와 pH 9.0의 완충용액에 용해된 CMC 및 pH 5.0와 9.0에서의 Filter paper로부터 생성된 환원당을 DNS법으로 정량 하였다. 또한 Sephadex G-25를 이용하여 얻어진 분획을 Amicon ultra-filter (YM10, U.S.A)으로 농축한 후 Bio-Gel P-6 DG (2 cm × 80 cm, glass column)에 주입하여 동일 완충용액으로 0.6 mL/min.의 유속으로 용출 시켜 3.5 mL씩 분취하여 분획을 실시하였다.

2.1.2 이온교환수지에 의한 정제

Bio-Gel P-6 DG를 이용하여 분리된 단백질을 농축한 후 DEAE-Sepharose CL-6B(3 cm × 40 cm, Pharmacia Biotech column)을 이용하여 동일 완충용액으로 0.6 mL/min.의 유속으로 0.5 M NaCl의 농도 기울기법에 의해 용출 시켜 9 mL씩 분취하였다.

2.1.3 전기영동

정제된 효소는 SDS-PAGE(Pharmacia Biotech. Hofer. SE250) 전기 영동법에 의해 전기영동 하였다. 10% SDS, 10% Ammonium persulfate, TEMED, 0.02% Bromo-phenol Blue, 20% Glycerol, 0.2 M DTT, acrylamide, bisacrylamide, n-butanol 완충용액을 사용하였으며 LMW Calibration kit를 이용한 은염색법에 의해 염색하였다.

2.2 효소처리 pulp의 물성

2.2.1 섬유장 변화

해섬된 MOW를 다양한 농도의 Sephadex G-25에 의해 정제된 효소로 처리하여 Kajaani FS-200(Finland)에 의해 섬유장 변화를 측정하였다.

2.2.2 결정화도 분석

LUKP를 sephadex G-25를 통하여 정제된 효소를 처리하여 동결건조시킨 후 X-선 회절분석기(Enraf Nonius, rotating anode X-ray generator, Nederland)을 사용하였다. 분석 조건은 12~28°에서 scan하였고, 30 mA, 20 KV로 하였다. 결정화도는 Segal 등¹¹⁾의 방법에 따라 구하였다.

2.2.3 지료(의) 조성당(분석)

UKP 6%의 펄프 슬러리를 NaOH 용액을 이용해 pH 9.0로 조절한 후 0.4 IU와 1.0 IU의 효소를 첨가하여 50°C에서 20분간 처리하고 여과, 동결건조된 UKP의 조성당 변화를 3% 황산가수분해 후 alditol acetate법을 이용하여 G.L.C에 의해 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 조효소의 Gel 여과정제

Fig. 1은 조효소액을 Sephadex-G25 column에 분리한 결과이다. 그림에서 보는바와 같이 조효소액은 두 개의 단백질 피크로 분리된다. 첫 번째 나타

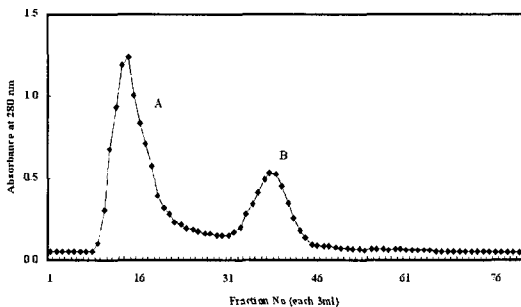


Fig. 1. Purification of crude enzyme on Sephadex-G25.

난 피크를 Fraction-A라고하고 두 번째 나타난 피크를 Fraction-B라고 하였다. Fraction-A의 단백질량은 Fraction-B보다 2배정도 높게 나타난다.

Sephadex G25 column에 의해 분획된 Fraction-A와 B를 pH 5.0, 7.0, 9.0에서 각각 CMCase 및 FPase 활성을 측정한 결과는 Table 1에 나타내었다.

CMCase와 FPase 모두 Fraction-A는 fraction-B에 비해 높은 활성을 나타내고 있으며 Fraction-A의 경우 FPase의 활성이 CMCase와 보다 상대적으로 높은 것을 알 수 있다. Fraction-A의 경우 CMCase는 pH 상승에 따라 조금씩 증가하는 것을 관찰할 수 있으며 FPase의 경우는 pH가 올라가면서 활성이 떨어지는 것으로 관찰되었다. 이러한 결과를 볼 때, Fraction-A가 주로 효소 단백질로 구성되어 있으며 Fraction-B는 일부효소와 기질분해 잔사로 부터 유래하는 것으로 생각된다.

Fig. 2는 Fraction-A를 농축하여 다시 Bio-Gel p-6DG를 이용하여 용출 분획하고 각 분획의 단백질 농도 및 효소활성을 측정한 결과를 나타낸 것이다.

Fraction number 12를 정점으로 하여 CMCase 활성이 나타나며 pH 9.0에서의 활성이 pH 5.0의 경우보다 높게 나타났다. FPase 활성은 Fraction

Table 1. Enzyme activity of Fraction-A and B

	Absorbance at 550 nm					
	CMCase			FPase		
	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0	pH 5.0	pH 7.0	pH 9.0
Fraction A	0.117	0.137	0.138	0.207	0.187	0.157
Fraction B	0.003	0.005	0.012	0.021	0.006	0.015

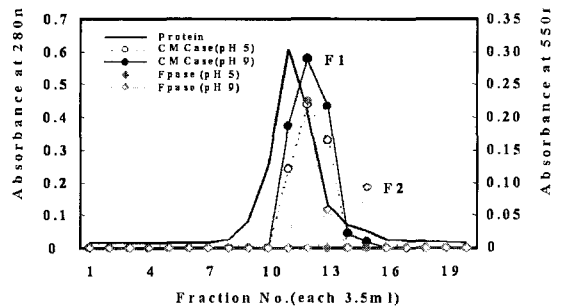


Fig. 2. Purification Fraction A on Bio-Gelp6DG.

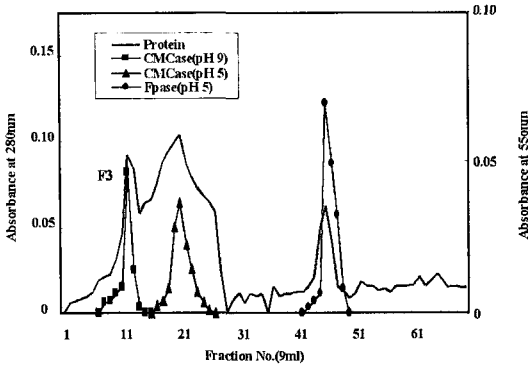


Fig. 3. Ion-exchange chromatography of F1 on DEAE-Sepharose CL-6B.

12에서 pH 5.0의 활성이 보이고 pH 9.0에서의 FPase 활성은 Fraction 13, 15에서 나타나며 pH 5.0에서보다 약한 효소활성을 보였다.

3.3 DEAE-Sepharose CL-6B column에 의한 정제

Fig. 3은 Fig. 2의 fraction 10, 11, 12를(F1) Amicon filter로 3배 농축하여 DEAE-Sepharose CL-6B gel로 다시 여과 분획한 결과를 나타낸 그림이다.

각 Fraction의 단백질농도와 CMCase 및 FPase의 활성을 측정하였다.

단백질농도는 Fraction 13번과 22번, 46번을 중심으로 하여 세 개의 피크를 나타내었다. 첫 번째 피크(Fraction 12, 13, 14)는 알칼리 영역의 CMCase의 활성을 나타내고 두 번째(Fraction 21, 22, 23, 24)는 산성영역에서의 CMCase의 활성을 나타낸다. 산성 CMCase(pH 5.0)와 알칼리성

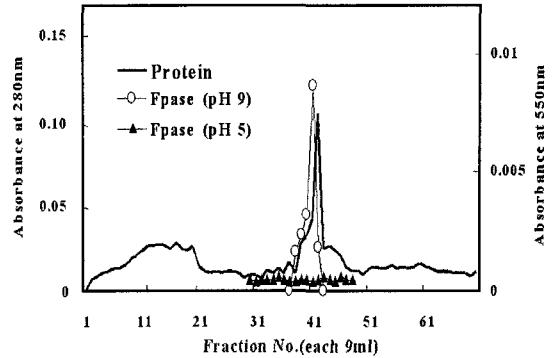


Fig. 4. Ion-exchange chromatography of DEAE-Sepharose CL-6B.

CMCase(pH 9.0)의 단백질이 확실히 분리되었으며 이는 산성과 알칼리성에서 작용하는 효소단백질이 엄격히 다른 것임을 증명하는 것이다. 또 Fraction 46번을 중심으로 한 peak는 pH 5.0에서의 FPase 활성을 나타내었으며 pH 9.0에서의 FPase 활성은 보이지 않았다.

또 Fig. 4는 Fig. 2의 Fraction 14, 15, 16 (F2)를 Amicon filter로 3배 농축하여 DEAE-Sepharose CL-6B gel로 분획한 후 각 Fraction의 단백질 농도와 효소활성을 측정하여 결과를 나타낸 것이다.

Fig. 2의 F2는 pH 9.0에서의 FPase의 활성이 높게 나타난 분획이다. Fig. 2의 F2를 DEAE-Sepharose CL-6B gel로 이온교환 정제한 결과 Fraction 42번을 중심으로 하여 한 개의 피크를 이루며 pH 9.0의 FPase의 높은 활성을 나타내었다. 또 이 분획에서는 pH 5.0에서의 FPase의 활성은 보이지 않았다. 이상의 결과를 종합하면 Coprinus cinereus 2249가 비결정형 CMC (Carboxymethyl

Table 2. Purification and specific activity of alkaline CMCase protein

Step	Total protein (mg)	Total activity(IU) CMCase pH 9.0	Specific Activity (IU/mg)
Crude extract	4592	128	0.03
Acetone precipitation	3474	310	0.09
Sephadex G-25(Fraction-A)	1650	1234	0.74
Sephadex G-25(Fraction-B)	540	-	-
Bio-Gel P6-DG	80	727	1.1
DEAE-Sepharose CL-6B	5	79.4	6.3

cellulose)를 분해하는 endo- glucanase와 결정형 cellulose인 filter paper (Whatman No.1)를 분해하는 exo- glucanase를 분비하며 산성과 알칼리 영역활성을 갖는 endo-glucanase와 exo-glucanase 를 각각 분비하고 있음을 나타낸다.

Table 2는 먹물버섯 조효소액의 정제에 따른 총 단백질 양과 총 활성을 나타낸 것이다. Bioreactor 에서 배양된 배양액을 전술한 분획 방법으로 정제한 결과 조효소액 보다는 정제정도에 따라 비활성도는 증가함을 알 수 있고, 조효소액에 비하여 이온 교환하여 정제한 분획이 200배정도 비활성이 증가하였다.

3.4 정제 단백질의 전기영동

Fig. 5는 pH 9.0에서의 CMCase 효소활성을 보이는 Fig. 3의 12, 13, 14의 분획을 농축한 것(F3)과 pH 9.0에서 FPase의 효소활성을 보이는 Fig. 4의 F2를 농축한 것의 SDS-PAGE의 전기영동 결과를 나타낸 것이다. 두 단백질 모두 순수하게 정제되어진 단일 밴드를 나타내었으며 분자량이, F3는 42 kDa 정도, F2는 50 kDa 정도인 알칼리성 효소단백질임을 알 수 있다.

3.5 효소에 의한 섬유 반응

Fig. 6은 MOW를 효소처리 한 탈목펄프의 섬유장의 Kajjani FS 200으로 측정된 결과로서 효소 첨가량(0.1, 0.4, 0.7, 1 IU)에 따른 섬유장의 변화는 거의 나타나지 않았다. 이러한 이유로서는 사용한 지료가 virgin pulp처럼 세포벽이 팽윤되어 있지 않고, 건조공정을 거쳐 섬유화가 각질화가 일어남에 따라 효소

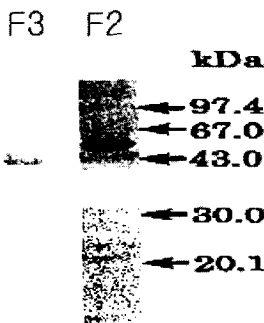


Fig. 5. SDS-PAGE of F2 and F3.

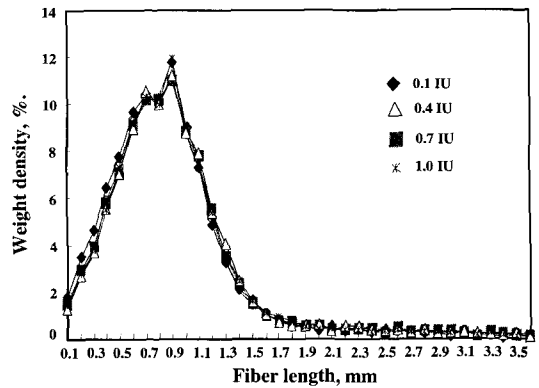


Fig. 6. Profile of fiber length with different enzyme loading.

의 작용에 의해 단섬유가 발생하기 어렵기 때문이라고 생각된다.

또, 효소로 처리된 UKP지료 결정화도 변화를 보기 위해 X-선 회절도를 측정하였다. X-선 회절은 12°~28°에서 scintillation counter에 의해 30 mA, 20 KV로 측정하여 segal 법으로 결정화도를 구하였다(Fig. 7). 결정화도가 증가하면 항장력, Young율, 경도, 밀도, 치수안정성은 증가하지만 흡습성, 팽윤성, 착색성, 거침성, 유연성을 감소시키는 역할을 한다.

효소를 첨가하지 않고 처리한 지료인 대조구의 경우에는 51.4% 정도의 결정화도를 보이고 있으며 이에 대하여 0.1 IU ~ 0.4 IU의 첨가량으로 처리한

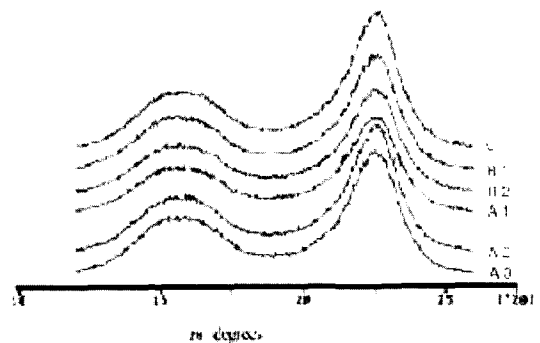


Fig. 7. X-ray diffractography of enzyme treated UKP.

C : UKP
 R1 : DenimaxBT 0.4 IU
 R2 : Denimax992L 0.4 IU
 A1 : Fraction-A 0.1 IU
 A2 : Fraction-A 0.4 IU
 A3 : Fraction-A 0.7 IU

지료의 결정화도는 거의 변화가 없으며, 상업용 효소 Denimax BT와 비교하여도 큰 차이가 관찰되지 않았다. 이는 0.4 IU의 효소량으로는 섬유 외부의 극히 제한된 영역에서 가수분해반응이 일어나며 전체적인 cellulose의 결정화도에는 심각한 영향을 주지 않는다는 사실을 시사하고 있다.

효소처리에 따른 UKP의 조성당 변화를 alditol acetate법으로 측정된 결과를 Table 3에 나타내었다. 무처리 UKP의 구성당이 glucose, xylose와 소량의 mannose인 점으로 미루어 활엽수 펄프임을 알 수 있으며 효소처리 펄프의 중성당 조성에는 그다지 변화를 보이지 않았다. 이와 같은 결과는 Sephadex G-25에 의해 분리된 효소액 중에는 cellulose 이외에도 Xylanase를 중심으로하는 hemicellulose 분해 효소도 상당량 존재하여 cellulose와 hemicellulose의 분해 정도가 비슷하게 되기 때문인 것으로 생각된다.

Table 3. The changes of sugar composition with UKP(relative content)

Sample	Yield	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	
Reference	92.0	-	12.3	1.1	-	86.6	
Loading activity	0.4 IU	91.2	-	12.3	1.2	-	86.5
	2.0 IU	89.4	-	12.4	1.4	-	86.2

4. 결론

먹물버섯 배양액 중에 포함된 목질 분해효소를 분리하고 그로부터 알칼리성 효소단백질을 분리정제하고 단백질 특성을 조사함과 동시에 지류 물성에 미치는 영향을 조사하였다.

① 먹물버섯은 산(pH 5.0)과 알칼리 영역(pH 9.0)에서 활성을 갖는 endo-glucanase와 exo-glucanase를 각각 분비한다.

② 정제된 알칼리성 endo-glucanase는 42 kDa, exo-glucanase는 50 kDa 정도의 분자량을 갖는 단백질이다.

③ 효소처리 된 지류의 섬유장, cellulose 결정화도 및 조성당은 큰 변화를 보이지 않았다.

인용문헌

1. Clarke, J.H., K. Davidson, J.E. Rixon, J.R. Halstead, M.P. Fransen, H.J. Gilbert and G.P. Hazlewood, A comparison of enzyme aided bleaching of softwood paper pulp using combination of xylanase, mannanase and galactosidase, *Appl Microbiol Biotechnol*, Vol.53, 661-667 (2000).
2. Bisaria, V. S. and Ghose, T. K. Biodegradation of cellulosic materials: Substrate, microorganisms, enzyme and products, *Enzyme and microb. Technol.*, 3, 90-104(1981).
3. Sreenath, H. K., Yang, V. W., Burdsall, H. H. Jr., Jeffries, T. W., Toner removal by alkaline active cellulase from desert *Bisdiomycetes*, ACS Symposium series 655, American Chemical Society, 267-279 (1996).
4. Nishi, K., Pratima, B. and Pramod, K.B., Separation by flotation of contaminants from recycled fiber, *Appita* . 48(5), 378-380(1995).
5. Jeffries, T.W., Klungness, J.H., Sykes, M. S. and Rutledge-cropsey, K.R, Comparienzyme enhance with conventional deinking of xerographic and laser printed paper, *Tappi Journal* Vol.77(4), 173-179(1994).
6. Mansfield, Shawn D. Swa주, D. Jason, Roberts, Norm, Olson, James A., Saddler, John N., Enhancing douglas-fir pulp properties with a combination of enzyme treatments and fiber fractionation, *Tappi Journal*, Vol. 82(5), 152-158(1999).
7. Jackson, L.S., Heitmann, J.A. and Joyce. T. W.,Enzymic modification of secondary fibers, *Tappi journal* Vol.76(3), 147-154 (1993).
8. Morgan, B.R., Enzymatic deinking of offset waste, *Pulp and paper*, Vol. 9, 119- 121(1996).
9. Abukakr, M., Rutledge-Copsey, K. and Klungness, J.H.,Alkaline cellulases and enzymatic deinking of mixed office waste, *Tappi pulping conf.*, 639-643, Atlanta (1995).
10. Kang, S-H., J-M. Lee, S-B Park, T-J. Eom, Recycling of waste paper with alkaline cellulolytic enzyme(1) *Korea TAPPI*, 35(3). 66-73(2003).
11. Iwanczyk, J.S., and Debrowski, A.J., The effect of charge trapping on the spectrometric performance of n- type cardnium detectors, *Nucl. Instr. and Meth. in Phys. Res. A*, Vol. 380, 288-294(1976).