

Laccase/mediator system에 의한 크라프트펄프 표백 (제1보)

– *Trichophyton sp.* LKY-7 laccase의 크라프트펄프
표백을 위한 mediator 선발 –

정현채[†] · 박서기 · 김 훈
(2006년 6월 19일 접수: 2006년 8월 18일 채택)

The Bleaching of Kraft Pulp by Laccase/Mediator System(I)

– Screening of mediator for the bleaching of kraft pulp by
Trichophyton sp. LKY-7 laccase –

Hyunchae Jung[†], Seurkee Park, and Hoon Kim
(Received on June 19, 2006: Accepted on August 18, 2006)

ABSTRACT

The analogs of cyclic hydroxamic acids containing N-OH group have been proposed to play effective laccase-mediators in kraft pulp bleaching with laccase/mediator system. The existing mediators (NHA, 1-HBT, VA), the best laccase-mediators reported so far, and selected several analogs of cyclic hydroxamic acids were evaluated as a laccase-mediator for kraft pulp bleaching. It was found that NHA was the most effective mediator for the *Trichophyton sp.* LKY-7 laccase (TrL) in kraft pulp bleaching with TrL/mediator system, increasing about 10% ISO of brightness and decreasing about 2.8 of kappa number after alkaline-peroxide bleaching. Of the cyclic hydroxamic acidstested, the NHP.1 (N-hydroxypyridone analog) was shown to enable TrL to effectively degrade lignin in kraft pulp bleaching, demonstrating approximately similar effect with that of NHA. However, the effect of substituent patterns of cyclic hydroxamic acid analogs in kraft pulp bleaching was not observed. The inhibitions of NHA and NHP.1 on TrL were not exhibited in TrL/mediator system. As a new mediator for TrL, NHP.1 was considered to be able to use in kraft pulp bleaching with TrL/mediator system.

• 본 연구는 농림부 농림기술개발사업에 의하여 지원한 연구결과의 일부임
• 순천대학교 농업생명과학대학 (College of Agriculture and Life Science, Suncheon National University)

† 주저자 (Corresponding author) : E-mail ; jhc@suncheon.ac.kr

Keywords : mediator, cyclic hydroxamic acids, laccase/mediator system, kraft pulpleaching, TrL/mediator system

1. 서론

백색부후균의 ligninolytic system에는 lignin peroxidase (LiP), manganese peroxidase (MnP) 및 laccase 등의 phenoloxidases가 관여하며 일반적으로 균주에 따라 LiP/MnP 또는 MnP/laccase 등의 효소 조합으로 리그닌분해가 이루어진다. 그중에서도 특히 LiP는 리그닌 화학구조의 약 90%를 차지하는 비페놀성 구조를 직접적으로 산화 분해시킨다고 알려져 있다. 반면에 laccase의 경우, *Parus tigrinus*의 yellow laccase가 비페놀성 구조인 β -1 model compound를 직접 산화시킨다는 보고가 있지만¹⁾ laccase 단독으로는 리그닌의 비페놀성 구조를 분해하지 못하는 것으로 받아들여지고 있다. 그러나 최근에 laccase가 특정 저분자량의 유기화합물 (mediator) 존재 하에서 리그닌의 비페놀성구조를 산화시키고 미표백펄프의 잔존리그닌을 분해하는 것으로 밝혀져²⁾ 리그닌의 생물학적 분해에 있어서 laccase의 새로운 역할에 많은 관심이 집중되고 있다. 더구나 laccase는 다른 리그닌 분해효소에 비하여 상대적으로 적은 비용으로 많은 양을 쉽게 생산할 수 있기 때문에 펄프표백이나 폐수처리, 난분해성 독성물질처리 등 다양한 산업에의 잠재적 이용가능성이 매우 크다고 할 수 있다.

Laccase-mediator 개념은 Sariaslani 등³⁾이 laccase가 chlorpromazine의 존재 하에 비페놀성 방향족 화합물인 rotenone을 산화시킬 수 있다고 처음 발표한 후, Kawai 등⁴⁾도 laccase와 syringaldehyde가 polymethoxylated benzylalcohol을 산화시킬 수 있다고 하였으나 chlorpromazine과 syringaldehyde는 단지 소수의 비페놀성 구조에서만 mediator 효과를 나타내어 리그닌의 생물학적 분해에 관심을 갖고 있는 생화학자나 목

재화학자들의 주목을 받지 못하였다. 그러나 1990년대 초에 Bourbonnais 등^{5,6)}이 laccase/ABTS (2,2'-azinobis-(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate)가 veratryl alcohol과 같은 리그닌 모델화합물의 비페놀성구조를 분해시킬 뿐만 아니라 펄프의 kappa number를 감소시킨다고 보고하고 Call과 Mücke⁷⁾는 효과적인 laccase-mediator로 1-hydroxybenzotriazole (1-HBT)를 개발하여 laccase/1-HBT system을 pilot plant규모의 펄프 표백공정에 적용한 이후로 보다 효과적인 laccase-mediator 개발에 관심이 집중되었다. Amann⁸⁾은 violuric acid (VA), N-hydroxy acetanilide (NHA), 1-nitroso-2-naphthol-3,6-disulfonic acid (NNDS), 3-nitrosoquinolin-2,4-diol (NC) 등과 같은 N-OH group을 함유하는 효과적인 laccase-mediator를 선별하였으며 이 중에서도 NHA는 비교적 짧은 반응시간에 효과적으로 펄프의 잔존리그닌을 분해시킬 수 있어서 지금까지 가장 효과적인 laccase-mediator로 인정받고 있다. 이외에도 새로운 laccase-mediator로서 promazine (PZ), remazol brilliant blue (RBB), 1-nitroso-2-naphthol-4-disulfonic acid (HNNS) 등 몇 가지 다른 유기화합물들이 보고되어 있고⁹⁾ NHA의 화학적 변환을 통하여 탈리그닌 향상을 시도하거나 안정한 금속이온에서 유래되는 mediator들도 제시되고 있다.¹⁰⁾ 또한 최근에 *Pycnoporus cinnabarinus*가 LiP나 MnP 분비없이 laccase 단독으로 리그닌을 분해하는 것으로 밝혀져¹¹⁻¹³⁾ *P. cinnabarinus*의 리그닌 분해기구에 대한 관심이 증대되고 있다. *P. cinnabarinus*가 laccase만으로 약 90%가 비페놀성 구조로 구성되어 있는 리그닌을 효과적으로 분해시키기 위해서는 대사과정중에 특정의 laccase-mediator를 생산할 것으로 예측할 수 있다. *P. cinnabarinus*는 ky-

nurenine pathway의 중간 생성물 (intermediate)인 3-hydroxyanthranilic acid (3-HAA)의 laccase 산화에 의하여 색소인 cinnabarinic acid를 생산한다.¹⁴⁾ 이 3-HAA 존재하에 laccase가 합성 리그닌 DHP를 해중합시키는 것으로 나타나¹⁵⁾ 리그닌 분해에 있어서 3-HAA의 실제 역할, 즉 천연 laccase-mediator로서의 작용 가능성을 높혀주었다. 그러나 laccase는 생산하나 3-HAA를 생산하지 않는 *P. cinnabarinus*의 mutant도 wild-type과 똑같이 크라프트펄프의 잔존리그닌을 효과적으로 분해하는 것으로 밝혀져¹⁶⁾ 아직까지 *P. cinnabarinus*의 리그닌분해에 대한 정확한 기작 (mechanism)은 규명되지 않고 있지만 백색부후균의 대사과정에서 (in vivo) 천연 laccase-mediator 생성 가능성은 널리 인정되고 있다. 특히 이러한 천연의 cyclic hydroxamic acids는 mold나 fungi와 같은 미생물¹⁷⁻¹⁹⁾과 식물²⁰⁻²²⁾ 등에 널리 분포하고 있고 그 화학구조 내에 N-OH group를 함유하고 있으며 더구나 지금까지 가장 효과적인 laccase-mediator로 인정 받고 있는 NHA도 천연의 cyclic hydroxamic acid로서 포유동물세포와 식물세포에서 합성될 수 있다고 알려져 있어서^{23,24)} cyclic hydroxamic acids가 laccase의 효과적인 mediator로 작용할 가능성이 높을 것으로 생각할 수 있다.

따라서 자연에서 발견되는 다양한 cyclic hydroxamic acids 중에서 N-OH group를 함유하는 N-hydroxypyrazinone과 N-hydroxypyridone의 치환체들을 선정, 이들을 mediator로 한 laccase/mediator system으로 크라프트펄프의 표백을 실시하여 *Trichophyton* sp. LKY-7 laccase (TrL)에 적합한 우수한 mediator를 선발하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시균주 및 재료

Laccase 생산균주로는 본 실험실에서 분리하여 GC-FAME (gas chromatography-fatty acid methyl ester) technique (Microbe Inotech Labs,

Inc., St Louis, MO)에 의해 *Trichophyton* sp. LKY-7 (T. LKY-7)으로 잠정적으로 동정한²⁵⁾ 목재부후균을 potato-dextrose agar (PDA)에 유지시켜 4°C에서 보관하며 사용하였다. Laccase-mediator는 미국 Oregon State University의 Kaichang Li 교수로부터 제공 받았으며 표백용 펄프는 침엽수 미표백 크라프트펄프 (Pope and Talbot 사, Oregon)를 사용하였다.

2.2 T. LKY-7으로부터 laccase 생산과 정제

T. LKY-7 균사체 일정량을 glucose-peptone medium (glucose 20 g, peptone 10 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$ 20 mg, thiamine HCl 2 mg per liter)에서 균일하게 마쇄한 다음, 2%의 Ca-alginate 용액과 혼합하여 2% CaCl_2 용액에 무균적으로 떨어뜨려 encapsulation 시켰다. Ca-alginate에 고정된 T. LKY-7을 laccase inducer로서 참나무 (*Quercus variabilis*) 목분을 1% (W/W) 첨가한 glucose-peptone medium에 접종하여 29°C에서 7일간 교반하면서 (120 rpm) 배양한 후, 배지만 교체하는 방법으로 5 cycle 반연속 배양을 실시하였다. 회수한 배지를 조효소액으로 하여 stirred cell (Amicon Corp.)에서 10배 농축하였다 (10-kDa cut off). 농축액은 90% 포화도의 ammonium sulfate로 단백질을 침전시킨 후 소량의 20 mM sodium acetate buffer (pH 5.0)에 용해하고 다시 동 buffer에 대하여 dialysis한 다음, Q-sepharose column (Pharmacia)에서 1단계 정제하였다. laccase activity는 ABTS ($\epsilon_{\text{max}}=3.6 \times 10^4 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$)를 기질로 하여 420 nm에서 측정하였다.

2.3 TrL/mediator에 의한 크라프트펄프 표백

2.3.1 TrL과 NHA, 1-HBT 및VA에 의한 크라프트펄프 표백

500 ml flask에 50 mM sodium acetate buffer (pH=4.5)로 pH를 조절한 2%농도의 침엽수 미표백 크라프트펄프 5.0 g (o.d)을 넣고 Fig. 1의 mediator (10 mg per gram of o.d pulp)와 1단계 정제한 TrL (15 units per gram of o.d pulp)을 투입

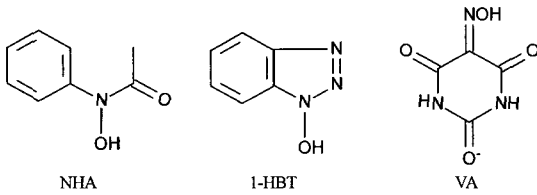


Fig. 1. Chemical structures of mediators.

하여 60°C에서 4시간동안 교반하면서 (150 rpm) 처리한 후 여과하여 세척하였다. 세척된 펄프는 5%의 농도로 ziploc bag에 투입하여 90°C에서 4시간동안 알카리-과산화수소표백 (2% NaOH and 0.05% MgSO₄, 2% H₂O₂ on o.d pulp)을 실시하였다. 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. 비교를 위한 크라프트펄프는 TrL/mediator 처리를 하지 않고 알카리-과산화수소 표백만 실시하여 백색도와 kappa number를 측정하였다

2.3.2 TrL과 N-hydroxypyrazinone 치환체에 의한 크라프트펄프 표백

Fig. 2의 N-hydroxypyrazinone 치환체들을 laccase mediator로 하여 전향에서와 같은 방법으로 펄프 표백을 실시하고 N-hydroxypyrazinone의 치환형태가 펄프 표백에 미치는 영향을 조사하였다.

2.3.3 TrL과 N-hydroxypyridone 치환체에 의한 펄프 표백

Fig. 3의 N-hydroxypyridone의 치환체들을 laccase mediator로 하여 전향에서와 같은 방법으로 펄프 표백을 실시하고 N-hydroxypyridone의 치환형태가 펄프 표백에 미치는 영향을 조사하였다.

2.4 표백시간에 따른 펄프특성

50 mM sodium acetate buffer (pH=4.5)로 pH를 조절한 2% 농도의 침엽수 미표백 크라프트펄프 5.0 g (o.d)에 전향에서 선발된 mediator (10 mg per gram o.d pulp)와 1단계 정제한 TrL (15 units per gram o.d pulp)을 투입하여 60°C에서 16시간 동안 교반하면서 처리하였다. 반응시간에 따라 처

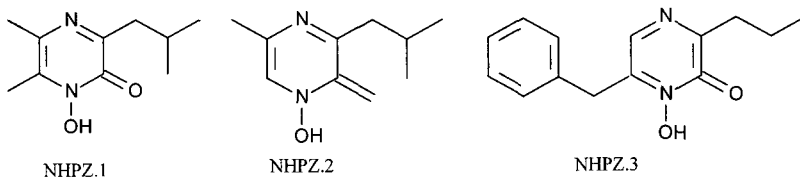


Fig. 2. Chemical structures of N-hydroxypyrazinone analogs.

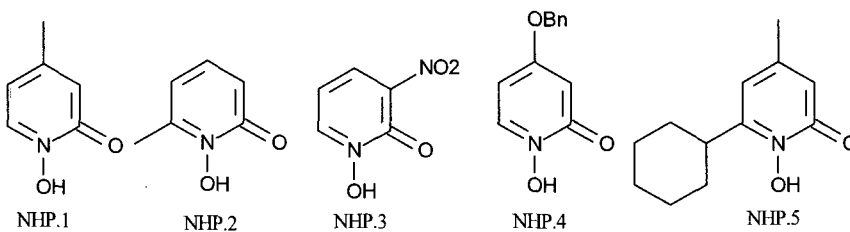


Fig. 3. Chemical structures of N-hydroxypyridone analogs.

Table 1. One step purification of TrL

Fungi	Purification step	Volume (ml)	Activity (unit)	Yield (%)
T. 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

리된 펄프는 각각 여과하여 반응여액에서 잔존 laccase activity를 측정하고 펄프는 전향과 같은 방법으로 알카리-과산화수소 표백한 다음, 백색도와 kappa number를 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 TrL 생산과 정제

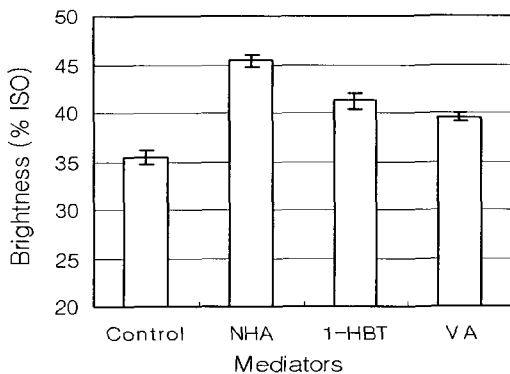
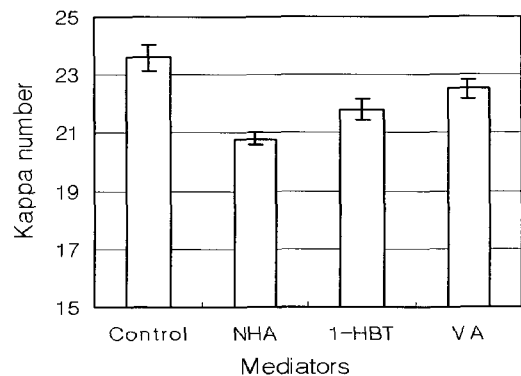
Table 1에서와 같이 Ca-alginate beads에 encapsulation 시킨 T. LKY-7을 참나무 목분 1% (W/W)가 첨가된 glucose-peptone medium에서 5회 반연속 배양하여 약 4,800 ml의 조효소액을 회수하였고 이때 laccase activity는 총 72,000 unit 정도였다. 조효소액을 농축한 다음, 90% 포화도의 ammonium sulfate로 침전, dialysis 단계를 거쳐 total volume 15 ml (laccase activity 약 51,000 unit)의 조효소액을 Q-sepharose column (Pharmacia)에서 1 단계 정제하여 수율 약 60%,

laccase activity 43,000 unit의 효소액을 얻어 펄프 표백용 TrL로 이용하였다.

3.2 TrL/mediator에 의한 크라프트펄프 표백

3.2.1 TrL과 NHA, 1-HBT 및 VA에 의한 크라프트펄프 표백

Laccase/mediator system에 의한 펄프 표백은 laccase에 의하여 mediator가 산화되고 생성된 free radical이 펄프 속으로 침투하여 리그닌을 산화, 분해시키는 과정으로 이루어지며 laccase의 산화능과 free radical의 안정성 및 redox potential 등에 영향을 받는다. 지금까지 우수한 laccase mediator로 알려진 NHA와 1-HBT를 비롯하여 VA는 그 화학구조 내에 N-OH group를 함유하고 있으며 laccase의 산화에 의하여 생성된 free radical N-O가 리그닌을 분해하는 실질적인 산화제로 믿어지고 있다. TrL과 NHA, 1-HBT 및 VA를 mediator로 하여 침엽수 미표백 크라프트펄프를 처리

**Fig. 4. Brightness of kraft pulp after alkaline-peroxide bleaching.****Fig. 5. Kappa number of kraft pulp after alkaline-peroxide bleaching.**

한 다음 알카리-과산화수소 표백을 실시하여 백색도와 kappa number를 측정하여 표백성을 검토하였다.

Fig. 4와 5에서와 같이 TrL/NHA의 경우 알카리-과산화수소 표백 후 약 10% ISO 백색도 증가와 2.8 정도의 kappa number 감소로 가장 효과적인 표백성을 나타내 TrL에 대하여 기존의 mediator중에서는 NHA가 가장 효과적인 mediator로 작용하였다. 반면에 1-HBT에 있어서는 백색도가 약 5.5% ISO 정도 증가하였고 kappa number는 1.8 정도 감소하였다. 전보²⁵⁾에서 측정한 TrL의 Km 값은 VA가 가장 높았고 Kcat은 VA와 ABTS가 비슷한 수준으로 VA의 기질에 대한 kinetic property는 다른 mediator에 비하여 우수하였으나 TrL/VA에 의한 크라프트펄프 표백에서는 약 4% ISO정도의 백색도 증가와 1.2 정도의 kappa number 감소로 NHA나 1-HBT에 비하여 표백효과는 크게 나타나지 않았다.

3.2.2 TrL과 cyclic hydroxamic acids에 의한 크라프트펄프 표백

*Aspergillus flavus*로부터 aspergillilic acid가 분리된 이후로 같은 고리구조를 갖는 다양한 cyclic hydroxamic acid가 많은 미생물로부터 분리되었다. 그중에서도 N-hydroxypyridone의 기본구조를 갖는 cyclic hydroxamic acid가 다양한 균(fungi)에서 발견되고 있어 laccase-mediator로

작용할 가능성이 크다. 천연의 cyclic hydroxamic acids 중에서 N-hydroxypyrazinone과 N-hydroxypyridone은 아직까지 laccase-mediator로 검토된 바가 없어 이들 두가지 타입의 cyclic hydroxamic acid 중에서 N-OH 그룹을 갖고 있는 대표적인 몇가지 치환체를 대상으로 laccase-mediator로서 작용여부를 검토하였다.

Fig. 2와 같은 화학구조를 갖는 3종의 N-hydroxypyrazinone 치환체를 mediator로 하여 TrL/mediator system에 의한 크라프트펄프 표백을 실시한 결과, Fig. 6과 7에서와 같이 전체적으로 3% ISO 정도의 백색도 증가와 0.7 정도의 kappa number 감소로 그 표백효과는 크지 않았고 또한 pyrazinone링의 치환체 결합형태가 펄프 표백에 미치는 영향도 크게 나타나지 않았다.

TrL과 N-hydroxypyridone 치환체에 의한 크라프트펄프 표백에서는 Fig. 8과 9에서 같이 NHP.1의 표백성이 가장 우수하였으며 다음은 NHP.5로 나타났다. NHP.1의 경우 알카리-과산화수소 표백 후에 백색도는 약 9% ISO 증가하고 kappa number는 약 2.5 정도 감소하였으며, NHP.5의 경우 백색도는 약 5.8% ISO 정도 증가하였고 kappa number는 1.6 정도 감소하였다. 그러나 다른 치환체에 있어서는 그 표백효과가 미미하였고 NHP.1과 NHP.5의 경우를 제외하고 그 차이가 뚜렷하게 나타나지 않아 N-hydroxypyrazinone 치환체와 마찬가지로 N-hydroxypyridone

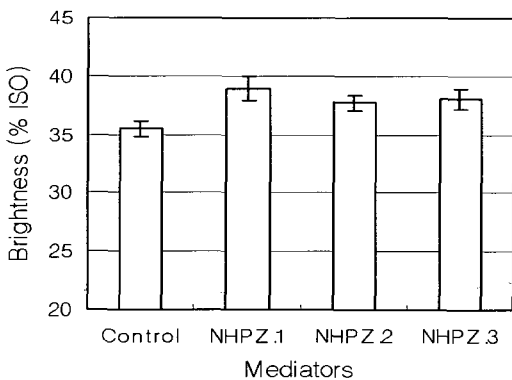


Fig. 6. Brightness of kraft pulp after alkaline- peroxide bleaching.

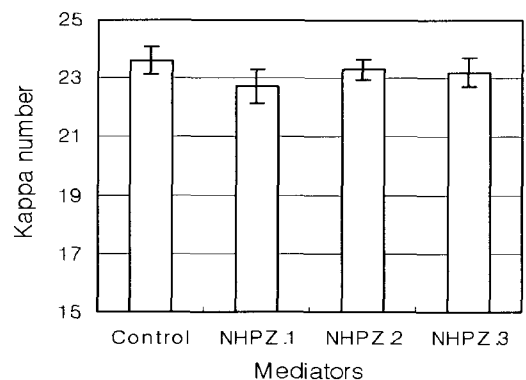


Fig. 7. Kappa number of kraft pulp after alkaline- peroxide bleaching.

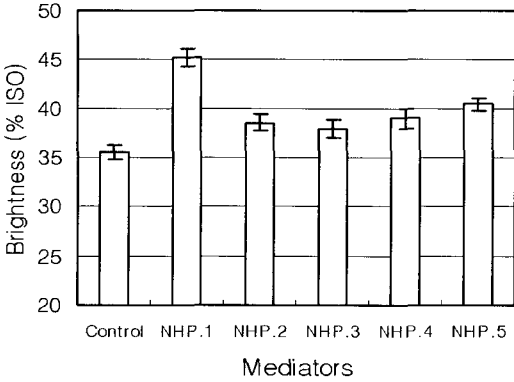


Fig. 8. Brightness of kraft pulp after alkaline- peroxide bleaching.

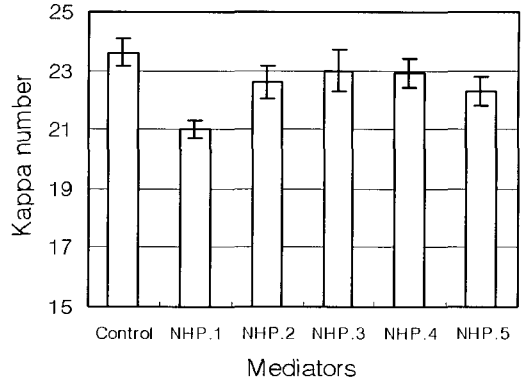


Fig. 9. Kappa number of kraft pulp after alkaline- peroxide bleaching.

idone 치환체의 형태가 크라프트펄프 표백에 미치는 영향은 크게 나타나지 않았다. NHP.1은 지금까지 가장 효과적인 mediator로 인정되고 있는 NHA와 거의 유사한 크라프트펄프 표백효과를 나타내 TrL뿐만 아니라 다른 균주에서 유래한 다양한 laccase에 대한 우수한 mediator로서의 적용 가능성을 보여 주었다.

이상의 결과에서 natural cyclic hydroxamic acid에서 유래한 N-OH group을 함유한 N-hydroxypyrazinone과 N-hydroxypyridone analogs의 표백성은 치환체의 형태에서 뚜렷한 차이를 발견할 수가 없었고 차라리 화합물의 electron-withdrawing group과 electron-donating group에 대한 검토가 필요할 것으로 생각되었다.

3.3 TrL/mediator system의 반응시간에 따른 크라프트펄프 표백효과

지금까지 우수한 laccase mediator로 알려진 화합물과 천연의 cyclic hydroxamic acid에서 유래한 N-OH group을 포함한 화합물 중에서 N-hydroxypyrazinone 및 N-hydroxypyridone 치환체의 표백특성을 검토한 결과 TrL의 mediator로서는 기존의 NHA와 N-hydroxypyridone 치환체중에서 NHP.1이 가장 우수한 표백효과를 나타냈다. 따라서 TrL과 NHA 및 NHP.1을 mediator로 하여 TrL/mediator system의 반응시간에 따른 크라프트펄프의 표백성을 검토하였다. Fig. 10, 11에서와 같이 NHA의 경우 백색도 증가와 kappa

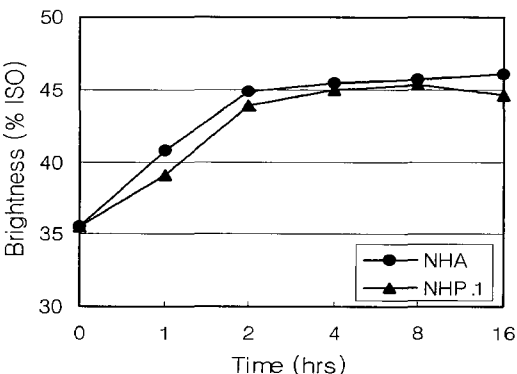


Fig. 10. The effect of bleaching time on brightness of kraft pulp.

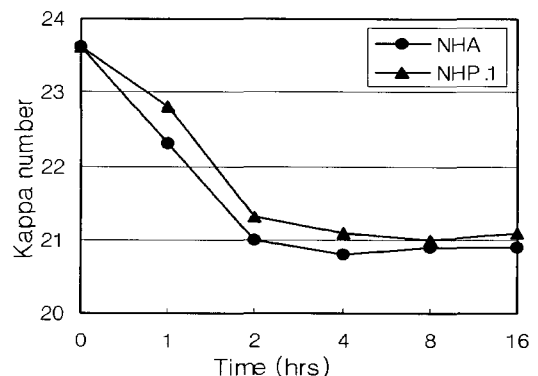


Fig. 11. The effect of bleaching time on kappa number of kraft pulp.

number 감소는 2시간 동안의 반응에서 가장 크게 나타났고 4시간까지의 반응에서는 어느정도 표백 효과가 인정되었으나 4시간 이상의 반응시간은 표백효과에 거의 작용하지 않았다. NHP.1의 경우에도 마찬가지로 표백효과는 2시간에서 4시간째 반응에서 가장 크게 나타났고 그 이상의 반응시간은 표백효과에 크게 영향하지 않는 것으로 검토되었다. 생물화적인 펄프표백에서 가능한 한 짧은 표백시간이 산업적 이용 측면에서 훨씬 유리하다. 다양한 반응온도와 펄프농도 등이 함께 검토되어야 하겠지만 2%의 펄프농도와 60°C의 반응온도에서 4시간 이하의 반응은 laccase/mediator system에 의한 크라프트펄프 표백에서 상당히 효율적인 반응시간으로 사료된다.

반응온도 60°C에서 처리시간에 따른 TrL activity 변화를 검토한 결과, Fig. 12에서와 같이 펄프와 mediator없이 TrL만 반응온도 60°C에서 유지시켰을 경우 TrL activity는 1시간 반응에 약 50%가 감소하였으며 2시간의 반응에서 80%이상 이 소실되는 것으로 나타났다. 펄프 없이 TrL과 mediator를 60°C에서 유지시켰을 때는 TrL만 유지했을 경우보다 activity는 다소 낮았으나 NHA와 NHP.1에 의한 TrL activity의 저해작용 (inhibition)은 크게 나타나지 않았다. 반면에 TrL/mediator에 의한 펄프표백 시 TrL activity는 1시간 반응에서 약 60% 이상 감소하였고 2시간 반응에서 90% 이상 감소하였다. 이는 반응 중에 TrL이 펄프섭유에 어느정도 흡착되어 용액 중의

activity가 감소하는 것으로 생각된다. TrL activity는 2시간 반응 이후에는 거의 소실되고 NHA와 NHP.1 공히 laccase활성이 거의 없는 2시간에서 4시간의 반응에서도 어느정도 백색도 증가와 kappa number 감소가 관찰되는 것(Fig. 10, 11)은 반응초기에 TrL에 의해 쉽게 N-O radical이 생성되고 이 radical은 안정적이고 용이하게 섬유 내로 침투하여 계속 반응이 일어나는 것으로 생각된다. 그러나 TrL은 50°C이하의 온도에서는 매우 안정적이거나 70°C 이상의 온도에서는 급격하게 activity가 감소되고 80°C에서는 10분 안에 불활성화되어 지기 때문에²⁵⁾ TrL/mediator system에 의한 펄프 표백에서 적정 반응온도에 대한 검토가 다시 실시되어야 할 것으로 생각된다.

4. 결론

TrL에 효과적인 mediator를 선별하고자 기존의 mediator인 NHA, 1-HBT, VA와 cyclic hydroxamic acids중에서 N-hydroxypyrazinone analogs 및 N-hydroxypyridone analogs를 laccase-mediator로 하여 TrL/mediator system에 의한 침엽수 미표백 크라프트펄프의 표백성을 검토하였다. 기존의 mediator중에서는 NHA의 표백 특성이 가장 우수하여 TrL/NHA의 경우 알카리-과산화수소 표백 후 백색도는 약 10% ISO 증가하였고 kappa number는 약 2.8 정도 감소하였다. 반면 N-hydroxypyrazinone analogs에서는 표백효과가 크게 나타나지 않았고 N-hydroxypyridone analogs 중에서도 NHP.1 만이 약 8.8% ISO 백색도 증가와 약 2.5 정도의 kappa number 감소를 가져와 NHA와 비슷한 표백효과를 나타냈다. N-hydroxypyrazinone analogs와 N-hydroxypyridone analogs의 치환형태가 표백에 미치는 영향은 나타나지 않았으며 검토한 cyclic hydroxamic acids중에서 NHP.1이 TrL에 가장 효과적인 mediator로 작용하였다. TrL/NHA 및 TrL/NHP.1 system에 의한 침엽수 미표백 크라프트펄프의 최적 표백시간은 약 2시간이었으며 4시간 이상의 표백시간은 표백 효과에 크게 작용하지 않았다. TrL activity는 60°C온도에서 2시간 반응

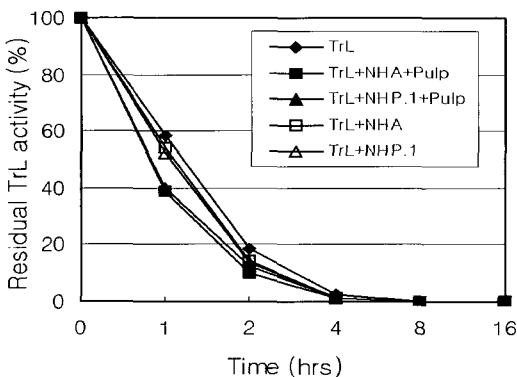


Fig. 12. TrL stability in TrL/mediator bleaching.

으로 거의 소실되었으나 NHA와 NHP.1에 의한 저해작용은 나타나지 않았다.

인용문헌

1. Leontievsky, A., Myasoedova, N., Pozdnyakova, N. and Golovleva, L., Yellow laccase of *panus tigrinus* oxidizes non-phenolic substrates without electron-transfer mediators, *FEBS Lett.*, 413:446-448 (1997).
2. Bourbonnais, R. and Paice, M. G., Oxidation of non-phenolics substrates : An expended role for laccase in lignin biodegradation, *FEBS Lett.*, 267:99-102 (1990).
3. Sariaslani, F. S., Beale, J. M., and Rosazza, J. P., Oxidation of retonone by *Polyporus anceps* laccase, *J. Nat. Prod.*, 47(4):692-697 (1984).
4. Kawai, S., Umezawa, T. and Higuchi, T., Oxidation of methoxylated benzyl alcohols by laccase of *Coriolus versicolor* in the presence of syringaldehyde, *Wood Research*, 76:10-16 (1989).
5. Bourbonnais, R., Paice, M. G., Reid, I. D., Lanthier, P. and Yaguchi, M., Lignin oxidation by laccase isozymes from *Trametes versicolor* and role of the mediator 2,2'-azinobis(3-ethylbenzthiazoline-6-sulfonate) in kraft lignin depolymerization, *Appl. Environ. Microbiol.*, 61:1876-1880 (1995).
6. Bourbonnais, R. and Paice, M. G., Enzymatic delignification of kraft pulp using laccase and a mediator, *Tappi J.* 79(6):199-204 (1996).
7. Call, H. P and Mücke, I., State of the art of enzyme bleaching, Disclosure of breakthrough process. Tappi conference, Sandiego, USA (1994).
8. Amann, M., The lignozym process - coming closer to the mill, 9th International Symposium on Wood and Pulping Chemistry, Montreal, Canada, F(4-1) (1997).
9. Bourbonnais, R., Paice, M. G., Freiermuth, B., Bodie, E. and Boreman, S., Reactivities of various mediators and laccases with kraft pulp and lignin model compound, *Appl. Environ. Microbiol.*, 63:4627-4632 (1997).
10. Li, K., Prabhu, N. G., Cooper, D. A., Xu, F., Elder, T. and Eriksson, K.-E. L., Development of new laccase-mediators for pulp bleaching, ACS symposium series 785, American Chemical Society, Washington DC. pp. 400-412 (2002).
11. Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K.-E. L., Laccase-producing white-rot fungus lacking lignin peroxidase and manganese peroxidase, In ACS Symposium Series 655, Enzymes for pulp and paper processing. American Chemical Society, Washington, D. C. pp. 130-150 (1996).
12. Eggert, C., Temp, U. and Eriksson, K.-E. L., Laccase is essential for lignin degradation by the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, *FEBS Lett.*, 407:89-92 (1997).
13. Bermek, H., K. Li, and Eriksson, K.-E. L., Laccase-less mutants of the white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus* can not delignify kraft pulp, *J. Biotechnol.*, 66:117-124 (1998).
14. Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. and Eriksson, K.-E. L., Laccase-mediated formation of the phenoxazinone derivative, cinnabarinic acid, *FEBS Lett.* 376:202-206 (1995).
15. Eggert, C., Temp, U., Dean, J. F. and Eriksson, K.-E. L., A fungal metabolite mediates degradation of non-phenolic lignin structures and synthetic lignin by laccase, *FEBS Lett.*, 391:144-148 (1996).
16. Li, K., Horanyi, P., Collins, R., Philips, R. S. and Eriksson, K.-E. L., Investigation of the role of 3-hydroxyanthranilic acid in the degradation of lignin by white-rot fungus *Pycnoporus cinnabarinus*, *Enzyme Microb. Technol.*, 66:2052-2056 (2000).
17. Baker, W. R., Callaghan, L., Hill, D., Noble, P., and Fletton, A., A new cyclic hydroxamic acid antibiotics, isolated from culture broth of *Pseudomonas alcaligenes*, *J. Antibiotics*, 32:1096-1103 (1979).
18. Hosoya, R., Yugami, T., Yosida, S., Yaguchi, T., Komuro, K. and Sasaki, T., Fungicide PF1140 manufacture with *Eupenicillium*, *Chem. Abstr.*, 124:1437-1444 (1996).
19. Middleton, A., Cole, D. S. and Macdonald, K. D., A hydroxamic acid from *Aspergillus nidurans* with antibiotic activity against *Proteus* species, *J. Antibiotics*, 31:1110-1115 (1978).
20. Hofman, J. and Hofmanova, O., 1,4-benzoxazine derivatives in plants, sephadex fractionation and identification of a new glucoside, *Eur. J. Biochem.*, 8:109-112 (1969).
21. Leighton, V., Niemeyer, H. M. and Jonsson, L. M.

- V., Substrate specificity of a glucosyltransferase and an N-hydroxylase involved in the biosynthesis of cyclohydroxamic acids in gramineae, *Phytochemistry*, 36:887-892 (1997).
22. Otsuka, H., Hirai, Y., Hagao, T. and Yamasaki, K., Anti-inflammatory activity of benzoxazinoids from roots of *Coix lachryma-jobi* var. *ma-yuen*, *J. Nat. Prod.*, 51(1):74-79 (1988).
23. Yoshioka, T., Ohno, H. and Uematsu, T., Pyruvate dehydrogenase complex-catalyzed formation of N-arylaceto hydroxamic acids from nitroso aromatic compounds in rat isolated cells and perfused organs, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 279:1282-1289 (1996).
24. Yoshioka, T. and Uematsu, Formation of N-arylaceto hydroxamic acids from nitroso aromatic compounds in isolated spinach leaf cells, *J. Agric. Food Chem.*, 46:606-610 (1998).
25. Jung, H. C., Xu, F. and Li, K., Purification and characterization of laccase from wood-degrading fungus *Trichophyton rubrum* LKY-7, *Enzyme Microb. Technol.*, 30:161-168 (2002).