

Endo-xylanase, Exo-xylanase 및 Acetyl- esterase 효소 처리한 펄프의 특성 변화

김 병 현

중부대학교 인쇄미디어학과

(2008년 1월 11일 접수, 2008년 2월 15일 최종 수정본 접수)

The Character Variation of Wood-Pulp treated Three Enzyme ; Endo-xylanase, Exo-xylanase and Acetyl-esterase

Byong-Hyun Klm

Department of Graphic Art and Media, Joongbu University.

(Received 11 January 2008, in final from 15 February 2008)

Abstract

The wood-pulp is treated with the three enzymes; Endo-xylanase, exo-xylanase and acetyl-esterase. The maximum value of relative activity appeared 0.95 in acetyl-esterase at 40°C, 0.9 in exo-xylanase at 40°C, and 0.8 in endo-xylanase at 50°C, respectively. And it has measured 0.8 in endo-xylanase, 0.95 in acetyl-esterase at pH 6 and 0.9 in exo-xylanase at pH 5, while the maximum value of relative activity does not rely on reaction time for three enzymes treatment, and the value was about 0.9, respectively.

We have watched that decreased Kappa number and increased brightness. And it turned out that the three enzyme produced a lot of reducing sugar with wood-pulp treatment.

1. 서 론

최근 펄프 및 제지 사업에서 효소 사용에 대하여 많은 연구 결과들이 보고되고 있다.¹⁾

^{~9)} 이들 효소의 일반적인 이용 범위는 Table 1에서와 같이 여러 가지 방면으로 효소가 이용되고 있다. 리그닌의 제거에서 효소를 사용하면 헤미셀룰로오스 내부 결합이 붕괴되어 펠프 구조가 느슨해지므로 리그닌 추출량이 증가된다. 그 결과 표백 단계에서 Cl₂의 소비도 현저히 감소된다.¹⁰⁾ 크라프트 증해 과정 중에 알칼리 농도가 비교적 높으면 xylan의 일부가 펠핑 용액에 용해되고, 증해가 계속되면 짧은 체인의 xylan은 셀룰로오스 휘브릴의 표면에 다소간 결정 상태로 흡착 또는 재결정화 한다. 펠프에 재흡착된 xylan은 잔사 리그닌 추출시 장해 인자로 작용하는데, 효소를 첨가하면 재침적된 xylan은 효소에 친화성이 크므로 쉽게 반응하여 분해된다.^{11~12)} 본 연구에서는 endo-xylanase, exo-xylanase 및 acetyl-esterase 효소 처리한 펠프의 특성 변화에 대하여 고찰하고자 한다.

Table 1. Enzyme in the Pulp and Paper Industry

	Pulp Technology			Paper Technology	Waste & Water Treatment
Cellulases	Pitch control (TMP, GP)	Deinking Newsprint	Drying Fluff pulps	Dewatering of Low Freness Pulps	Sludge Dewatering
Xylanases	Porosity Laminating Papers	Deinking Newsprint	Prebleaching Kraft Pulps	Refining Aid Speciality Aapers	
Lacases Pectinases			Biopulping	Refining Aid Printing Papers	Ploymerisation Deoxidation of Chlorolignins
Ligninases Lip Fungi			Biopulping	Surface Properties Printing Papers	Ploymerisation Deoxidation of Chlorolignins
GI. Oxidases Levanases Proteases				Slime Control	

2. 실험

2-1. 펠프 제조

2-1-1. 공시 목재 칩

본 실험에 사용될 펠프를 제조하기 위한 목재 칩은 Beechwood이였다. 칩의 크기는 일반적으로 펠프의 특성에 큰 영향을 미치는 것이 아니므로 취급하기에 용이한 형태로서 대략적으로 가로×세로×높이가 각각 2~3cm 정도의 크기로 절단하여 사용하였다.

2-1-2. 목재 칩의 펄프화

준비된 칩 1000g을 10ℓ 용량의 Rotary Diegester에 넣고, 활성 알칼리 20%와 황화도 25%를 6:1의 비율로 혼합한 액을 첨가하여 180℃에서 60분간 증해한 후 증류수로 세척하였다.

2-2. 공시 효소

실험에 사용한 효소는 endo-xylanase, exo-xylanase 및 acetyl-esterase 등 3가지 이였고, 이들 3가지 효소들의 기본 특성을 Table 2에 각각 나타내었다.

Table 2. Characteristics of Enzyme

Enzyme Characteristics	Endo-xylanase	Exo-xylanase	Acetyl-esterase
Micro Organism	Trichoderma Viride	Aspergillus Niger	Orange Peel
Component Properties	1,4- β -D -xylanxylohydrolase	1,4- β -D -xylanxylohydrolase	Acetic-ester Hydrolase
Impurities	Cellulose<0.5% β -glucosidase<0.01%	β -galatosidase α -galatosidase Less Than 3%	Free

2-3. 효소의 활성도 측정

2-3-1 기질 생성

효소의 활성도를 측정하기 위하여 효소의 2% xylan 인산 완충 용액(0.1M pH6.5)을 Vortex Mixer로 혼합한 후 12,000 rpm에서 30분간 원심 분리 후 상등액을 효소 처리용 기질로 사용하였다.

2-3-2. Endo-xylanase의 활성도 측정

기질 용액 0.5mℓ를 50℃에서 10분간 예열한 후 인산 완충 용액(0.05M pH6.5)으로 희석된 효소액을 첨가 후 일정 시간 반응시켜 생성된 환원당을 DNS 방식으로 비색 정량하였으며, 이때 1분간 1m-mol의 환원당을 생성하는 효소량이 1unit이다.

2-3-3. Exo-xylanase의 활성도 측정

exo-xylanase의 활성도 측정은 Pan Bangred 방법을 변형시켜 측정하였으며, 효소액을 처리한 후 20분간 반응시켜 생성된 PNP(p-nitrophenyl)의 비색 정도를 405nm에서 측정하였다.

2-3-3. Acetyl esterase 활성도 측정

Methyl acetylsalicylate(Acetylsalicylic Acid Methyl Ester) 3mℓ를 효소 0.05mℓ와 인산 완충 용액 0.5mℓ를 첨가하여 40℃에서 30분간 가열하여 효소 반응을 중단시키고, 300nm에서 흡광도를 측정한 후 0.034의 O.D. 값을 1unit로 표시하였다.

2-4. Kappa number 측정

Kappa number 측정은 TAPPI T236 os-76에 의하여 실시하였다.

2-5. 펠프의 viscosity 측정

펠프의 점도는 TAPPI T230 su-66에 의거 하였는데, 먼저 CED 용액을 측정한 후 오스발트 점도계를 이용하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1. 온도, pH 및 시간에 따른 분해효소의 활성도

효소는 생화학적 작용을 하여 다른 유기 물질을 분해하는 작용을 하므로, 그 활성 능력이 온도, pH 및 반응 시간 등의 인자에 의존한다. 그러므로 이러한 인자가 효소에 미치는 최적의 조건 일 때 최고의 활성도를 갖게 되겠다.

3-1-1. 온도에 따른 활성도

온도 변화에 따른 효소의 활성도 변화를 측정하여 그 결과를 Fig. 1에 나타내었다. 이 때 온도는 실온과 유사한 20℃에서 시작하여 일반적으로 효소가 활성하기 어려울 것이라 예상하는 60℃ 범위까지 실험하였다. Fig. 1과 같이 endo-xylanase, exo-xylanase 및 acetyl-esterase 3가지 효소 모두 처음 온도에서 어느 정도까지 반응 온도가 증가할 수록 활성화 정도가 상승하였으나, 그 이상의 온도에서 감소하는 경향을 보였다. 이들 3가지 효소뿐만 아니라 기타 효소도 유사한 경향을 나타내는데, 이것은 효소도 생물 활성체 이므로 어느 온도이상에서는 효소 단백질의 변성이 급격하게 이루어져 그 활성력을 잃어버리기 때문이라 생각된다. 각각의 효소를 구분하여 그 정도를 관찰하면 상호 상이한 특성을 발견할 수 있다.

먼저 endo-xylanase의 경우 반응 온도가 초기 온도인 20℃에서 상대 활성도 값 0.5에서 시작하여 상대적으로 완만하게 상승하다가 50℃에서 상대 활성도의 최대값인 0.8을 나타내었지만, 그 이상의 온도에서 감소하였다. Exo-xylanase와 acetyl-esterase의 경우는 endo-xylanase와 다르게 20~40℃ 구간에서 반응 온도가 증가할수록 활성도 값이 급

격하게 증가하는 상호 유사성을 가지고 있었다. 특히 exo-xylanase는 20~40°C에서 상대 활동도 값이 최소 0.3에서 최대 0.9까지 나타내었고, acetyl-esterase는 20~40°C에서 0.6~0.95를 나타내었다. 한편 활성도 값이 최대치에 이르는 온도 이상에서 그 값이 하향하는 정도의 특성이 각각 다름을 확인할 수 있었다. Endo-xylanase의 경우 50°C~60°C 사이는 상대 활성도 값이 0.8에서 0.75로 매우 완만한 변화를 보였지만, exo-xylanase의 경우 40~50°C에 이르기까지 활성도 값이 0.9에서 0.8로 변화하였고, 50~60°C 사이는 0.8에서 0.2까지 아주 급격하게 하향하는 경향을 나타내었다. 또한 acetyl-esterase의 경우도 이와 유사하였는데, 40~50°C 사이는 0.95에서 0.7로 변화하였고, 50~60°C는 0.7에서 0.25까지의 값을 나타내었다.

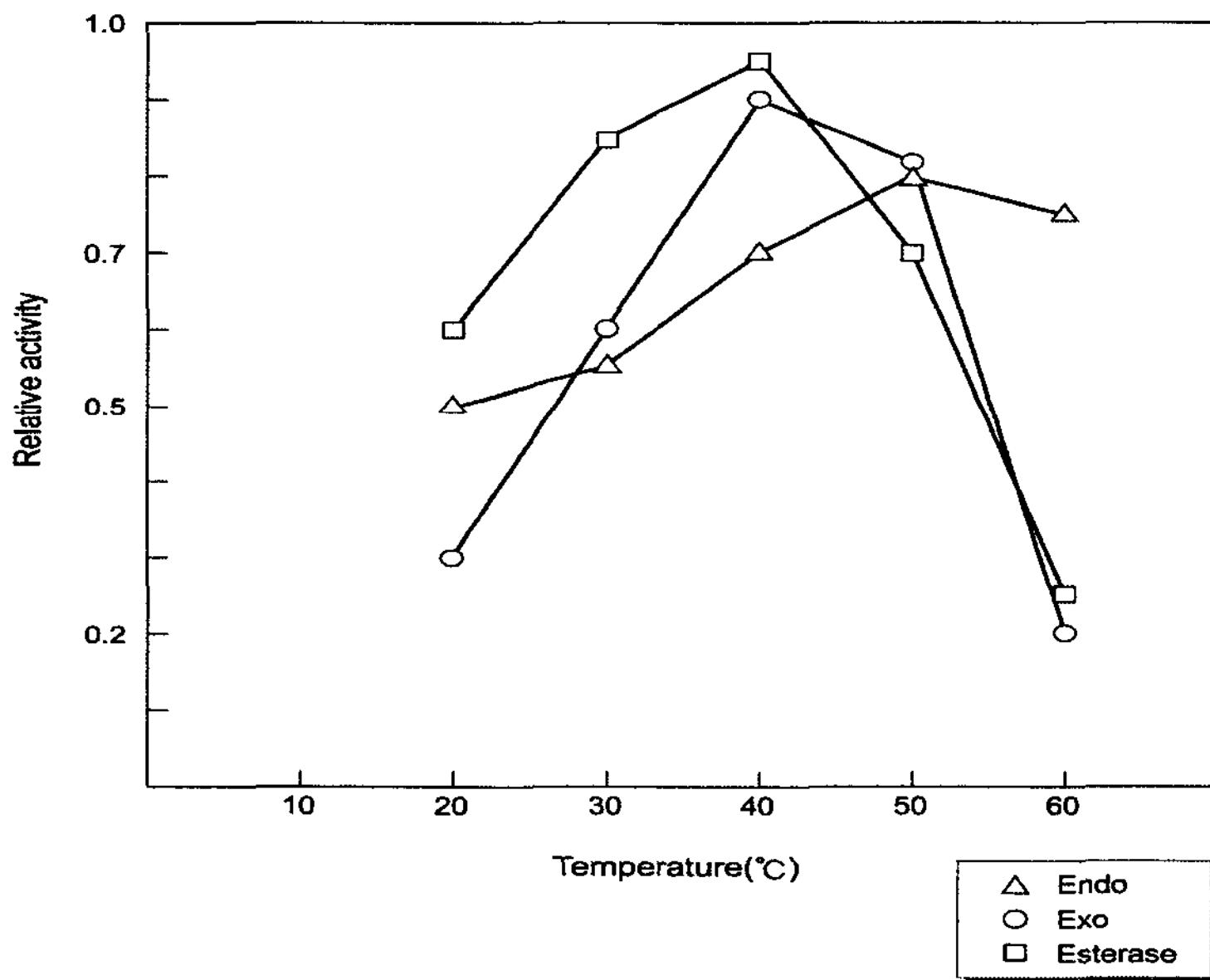


Fig. 1. Effect of temperature on activity of Enzyme.

따라서 본 실험의 조건에서 이들 3가지 효소의 전반적인 특성은 endo-xylanase의 경우 온도에 따른 상대적 활성화 값의 변화가 급격하지 않았고, 최대값이 상대적으로 낮은 편이였지만, 다른 효소보다 고온에서 안정하게 활용할 수 있을 것이라 판단된다. 그러나 exo-xylanase와 acetyl-esterase의 경우 온도에 따른 활성화 값이 비교적 급격하게 변화하였고, 최대값이 상대적으로 높은 편이였으며, 또한 고온에서 불안정함을 알 수 있었다.

3-1-2. pH 변화에 따른 활성도

Cellulase의 적정 pH는 약산성인데 비해 hemicellulase의 적정 pH는 약알칼리이다. 일반적으로 적정 pH가 약알칼리인 경우의 특성은 제지 공정이 중성에서 이루어지는 점을 감안할 때, cellulase의 경우 제지 공정의 적용에 있어서 한계성을 갖지만, hemicellulase의 경우 효율성이 높다는 점에서 제지 공정에 다양하게 적용할 수 있는 장점이 있다.

Endo-xylanase, exo-xylanase 및 acetyl-esterase 3가지 효소에 대하여 pH 범위에 따른 상대 활성값을 Fig. 2에 나타내었다. Fig. 2와 같이 endo-xylanase의 경우 약산성인 pH 6에서 상대 활성값이 최대 0.8을 나타내었지만, 중성 및 약알칼리성 범위에서 상대 활성값이 하향하는 경향을 보였다. Acetyl-esterase의 경우 pH 6.0에서 최대 상대 활성값이 0.95를 나타내었다. 이러한 현상은 endo-xylanase보다 적용 pH 범위를 보다 더 넓게 적용할 수 있음을 제시하고 있다. 특히 pH 9.0에서도 상대 활성값이 0.8이였으므로 알칼리 영역에서도 사용 가능함을 확인하였다.

한편 exo-xylanase의 경우 pH 5에서 상대 활성값이 최대 0.9를 나타내었으나, pH 7.0 이상의 알칼리 영역에서는 활성도 값이 0.65이하로 급격하게 감소하는 현상을 보였다. 따라서 3가지 효소중 exo-xylanase인 경우 알칼리 영역의 사용에 있어서 신중한 고려가 필요하다고 사료된다.

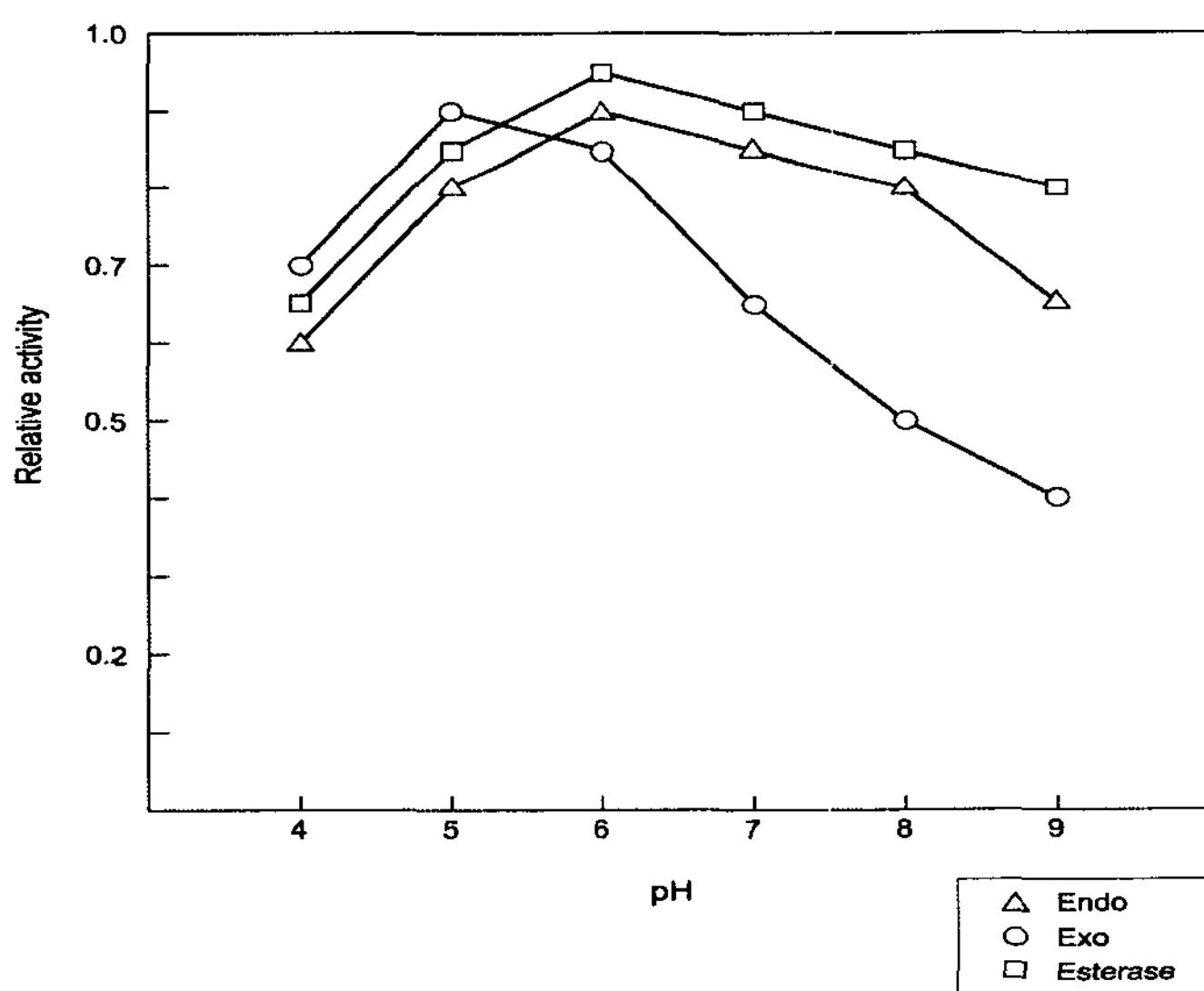


Fig. 2. Effect of pH on activity of Enzyme.

3-1-3. 반응시간에 따른 활성도

Fig. 3은 효소처리의 반응시간에 따른 활성도 변화를 나타낸 것이다. Fig. 3과 같이 효

소 처리 후 반응시간별 역가 변화를 관찰한 결과 처리 후 30분 이내에 활성도 값이 0.9 부근에서 최대값을 나타내었고, 이 후 반응시간이 증가하여도 활성도 값은 거의 평형을 이루었다. 이런 현상은 효소의 반응이 기질에 흡착되는 시점에서 급격하게 반응이 진행되는 것과 유사하고, 또한 효소를 제거 공정에 적용하고자하는 다른 연구 결과와도 유사한 경향임을 알 수 있었다.

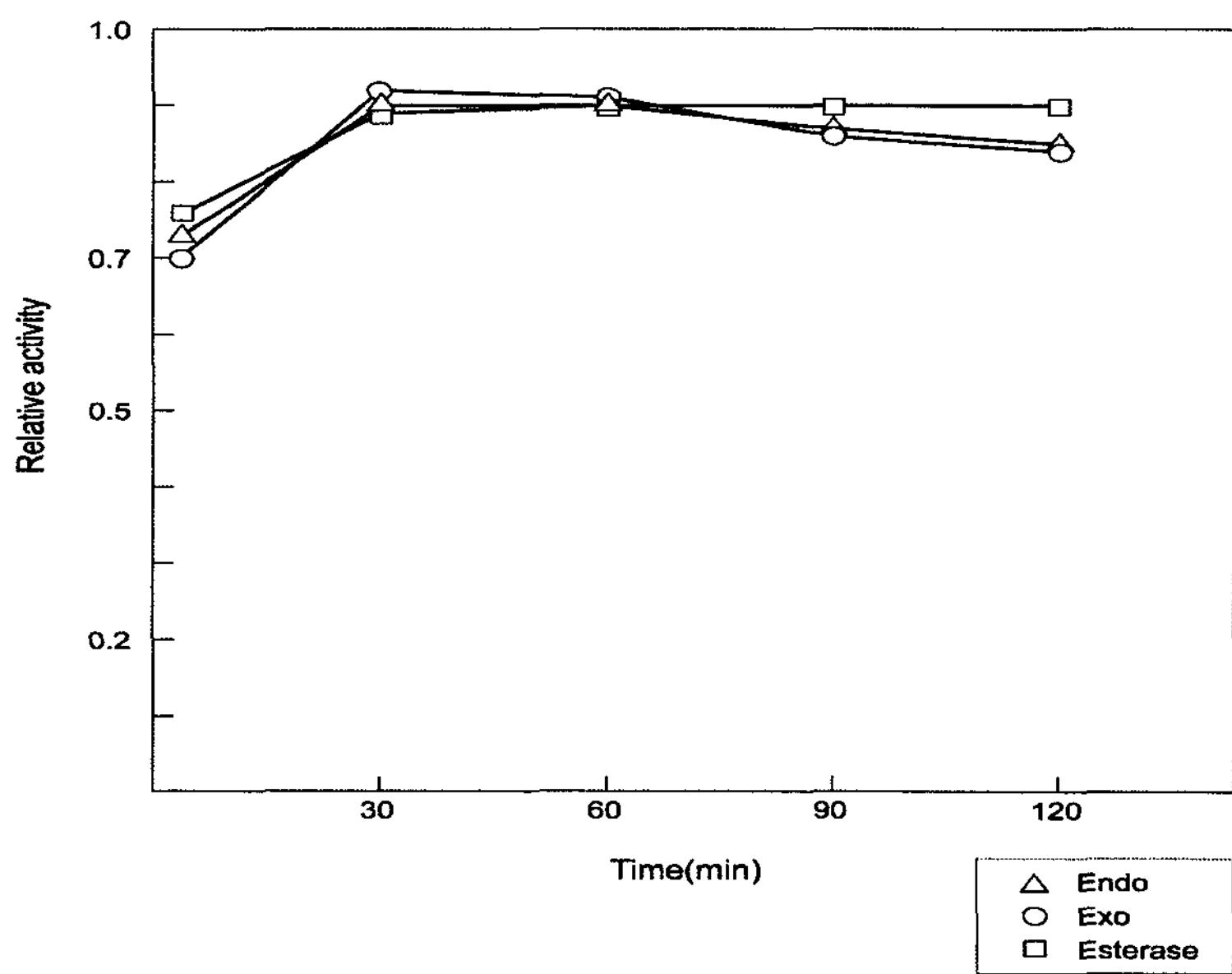


Fig. 3. Effect of reaction time on activity of Enzyme.

3-2. 효소 전처리에 의한 펠프의 특성 변화

현재 일반적으로 사용되고 있는 펠프화 공정에서 상당수의 lignin은 분해되어 제거되지만, 그 중 일부는 hemicellulase와 결합된 상태로 cellulose fiber의 표면 또는 microfibril 간 공극 층에 분포하는 것으로 알려져 있다. 그리고 hemicellulase와 결합되어 노출된 상태에서 lignin은 hemicellulase 분해효소 처리에 의하여 hemicellulase가 분해될 경우 hemicellulase와 같이 용출되어 제거된다.

효소 처리에 의한 표백전 펠프의 전처리 효과를 확인하기 위하여 온도, pH 및 반응시간에 따른 효소 처리 후 미표백 펠프의 특성 변화를 검토하였다. 이때 온도, pH 및 반응시간은 각각의 효소에 따라 활성도가 가장 높은 상태의 조건을 상기 실험의 결과에 근거하여 endo-xylanase의 경우 온도 50°C, pH 6, 반응시간 30분, exo-xylanase는 온도 40°C, pH 5, 반응시간 30분, acetyl- esterase는 온도 40°C, pH 6, 반응시간 30분으로 각각 선택하였다.

3-2-1. Kappa number의 변화

Kappa number는 미표백 펠프 중 lignin 함량의 감소 현상을 확인할 수 있는 방법으로 펠프의 표백처리 전에 lignin 함량을 감소시킨다면 표백처리 공정에서 표백 약품의 소비량 감소와 더불어 환경문제 및 경제적인 측면에서 상당히 고무적으로 받아들여 질 수 있다. 또한 이것에 의하여 표백 효과의 증대와 과도한 표백 약품 처리에 의한 열화현상을 줄일 수 있으므로 펠프의 품질 향상에도 크게 기여할 것이다.

Fig. 4는 펠프에 endo-xylanase, exo-xylanase, acetyl-esterase 처리한 후 Kappa number의 변화 정도를 나타낸 결과이다. Fig. 4와 같이 3가지 효소의 경향을 살펴보면, endo-xylanase는 1unit 처리시 Kappa number가 19이였지만, 6unit 처리시 17.5로 감소하였으며, 같은 기준으로 exo-xylanase인 경우 18.8에서 17.9로 그리고, acetyl- esterase인 경우 19.1에서 18.3으로 각각 감소하였다. 따라서 이러한 경향은 이들 효소 처리에 의하여 lignin이 제거되고 있음을 확인할 수 있는 근거라 생각된다.

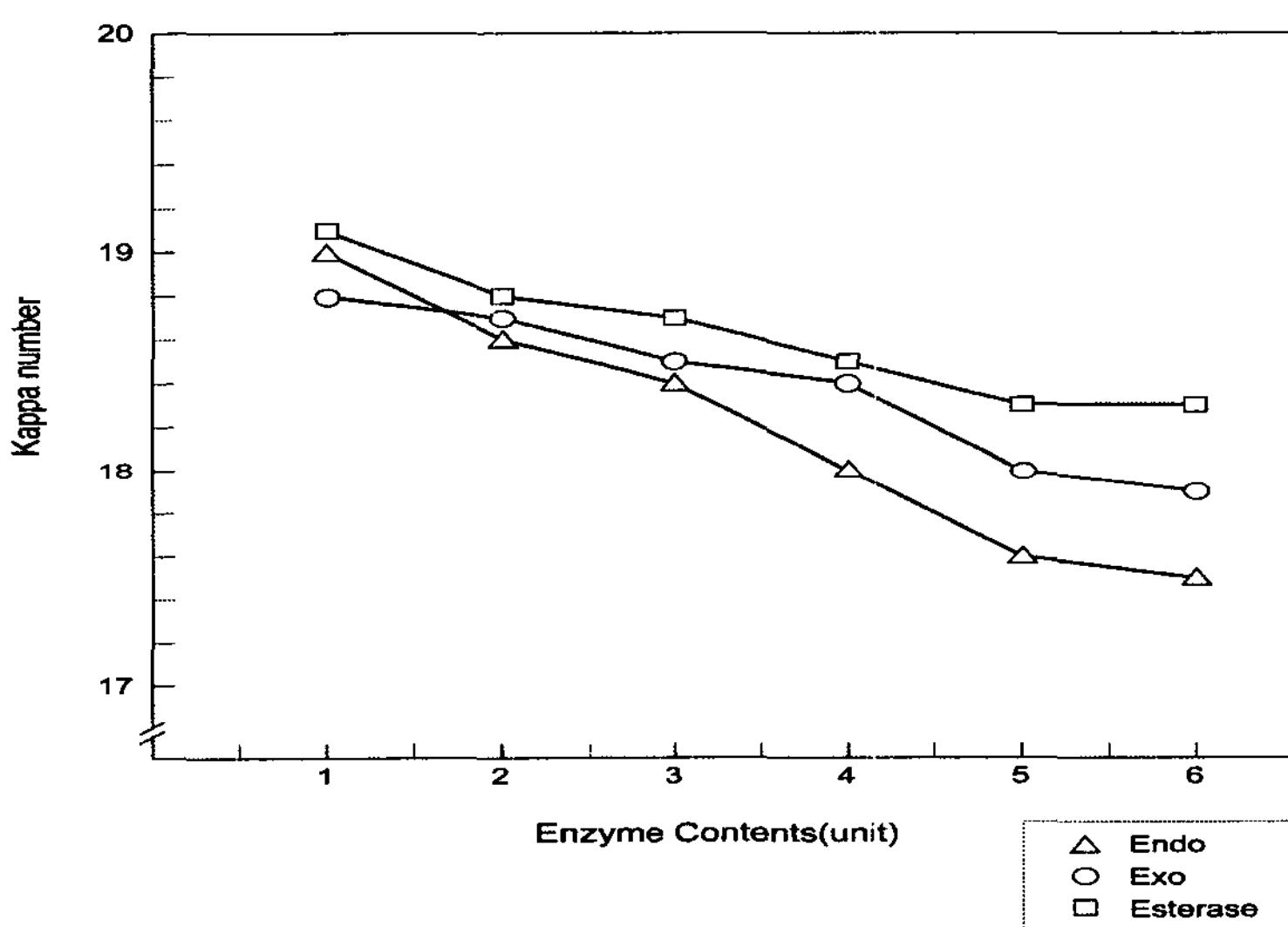


Fig. 4. Effect of Enzyme dosage on kappa number.

특히 endo-xylanase 처리에 의해 Kappa number의 감소 효과가 exo-xylanase와 acetyl-esterase에 비하여 비교적 크게 나타났는데, 이러한 현상은 cellulase에 효소를 처리할 때 효소 입자의 크기에 따라 cellulase fiber의 공극 사이로 침투하는 용이성이 달라지기 때문이며, 이로 인해 효소의 기질 흡착성 변화에 의해 분해 효과가 달리 나타난다는 Kin 등의 연구와도 유사한 결과를 확인할 수 있었다.

3-2-2. Brightness의 변화

미표백 페르의 백색도는 lignin 함량에 큰 영향을 받음으로 효소(hemicellulose) 처리에 의해 lignin 함량 변화를 예측하기 위한 brightness 측정 결과를 Fig. 5에 나타내었다. Fig. 5와 같이 endo-xylanase 량을 증가시킬수록 brightness의 변화가 비례적으로 증가하는 경향을 보였다. 1unit로 처리했을 때, brightness가 32.8%(ISO)이였고, 6unit 처리시 34.0%(ISO)로 증가하였다. 한편 exo-xylanase와 acetyl-esterase로 처리한 경우는 brightness가 각각 1unit에서 33.0%(ISO), 6unit에서 33.5%(ISO), 또한 1unit에서 32.9%(ISO), 6unit에서 33.1%(ISO)인 결과를 나타내었다.

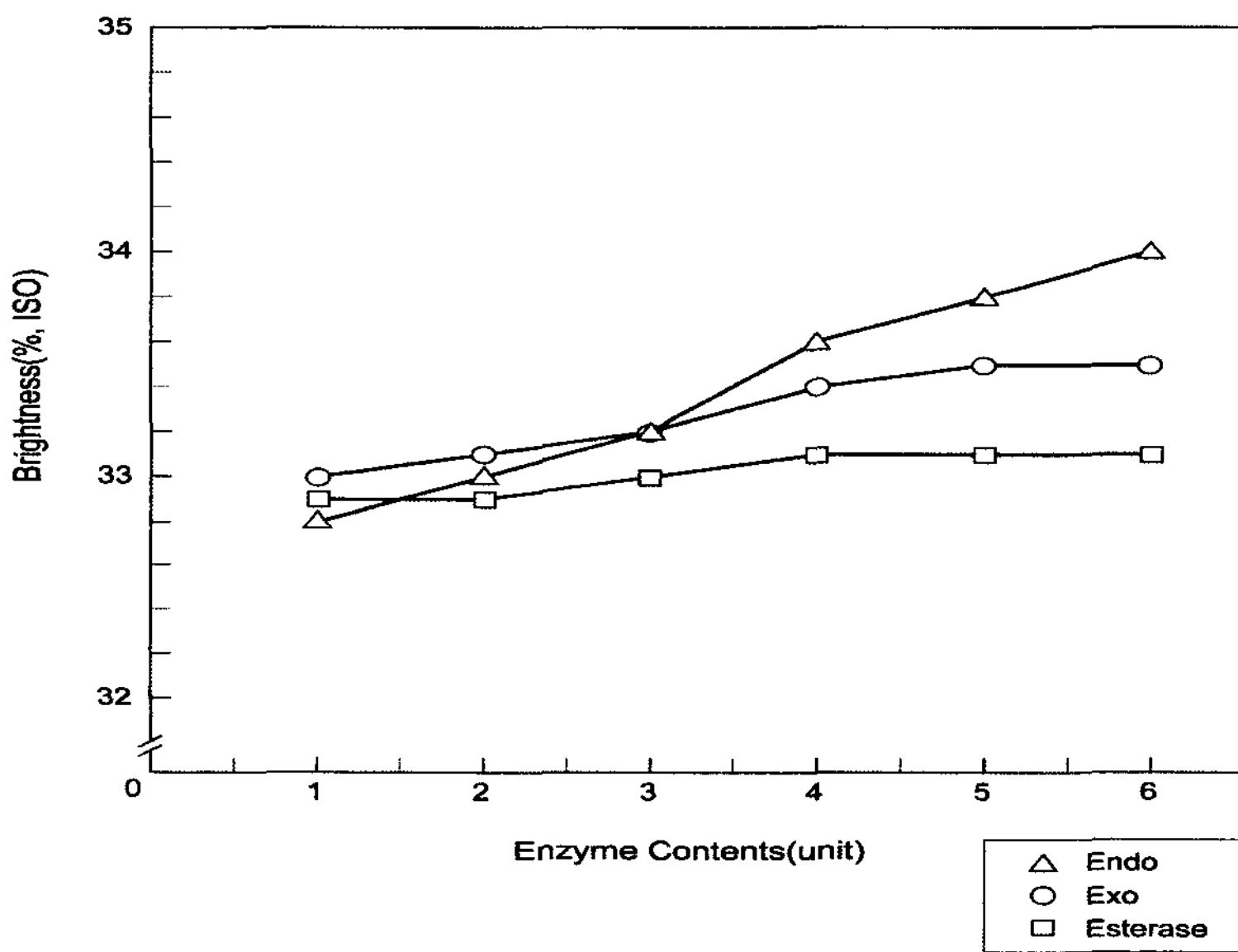


Fig. 5. Effect of Enzyme dosage on the brightness

따라서 exo-xylanase와 acetyl-esterase은 endo-xylanase에 비하여 brightness가 크게 변하지 않았고, 다소 낮은 값을 가졌는데, 이러한 경향은 Kappa number 값의 변화와도 유사하였을 뿐만 아니라 이것은 endo-xylanase에 비해 exo-xylanase와 acetyl- esterase는 미표백 페르의 lignin 제거 효과가 다소 낮은 결과 때문이라 생각된다.

3-2-3. 환원당(reducing sugar)의 변화

효소 처리 후 환원당 값의 변화는 분해된 hemicellulase의 함량을 정량적으로 예측할 수 있는 방법으로 hemicellulase의 분해성과 관련이 있으며, Yang 등은 효소의 처리량이 증가할수록 환원당 값이 증가한다고 발표하였다.

Fig. 6은 펄프에 endo-xylanase, exo-xylanase, acetyl-esterase 처리한 후 환원당 값의 변화를 나타낸 결과이다. Fig. 6과 같이 exo-xylanase 처리의 경우 1unit에서 0.090mg, 3unit에서 0.096mg, 6unit에서 0.098mg으로 환원당 생성량은 크게 증가하지 않았다. 특히 4~5unit 구간은 0.097mg으로 거의 변화가 없었고, 유사하게 acetyl-esterase 처리의 경우도 환원당 생성량이 효소 처리량에 크게 의존하지 않았으며, 3unit에서 6unit 까지 0.095로 변화가 거의 없음을 확인할 수 있었다. 그러나 endo-xylanase 처리인 경우 첨가량의 증가에 비례하여 환원당 생성량이 상당히 증가하는 경향을 나타내었다. 이때 1unit에서 5unit 까지는 0.092mg에서 0.106mg으로 첨가량에 비례하여 환원당 생성량이 증가하였으나, 6unit에서는 0.107mg으로서 증가율이 둔화되는 것을 볼 수 있었다.

따라서 효소 첨가량을 환원당에 관련지어 경제적 측면으로 고려한 효율성에서 본다면, endo-xylanase인 경우 5unit, exo-xylanase와 acetyl-esterase인 경우 4unit 첨가를 고려 할 수 있다고 사료된다.

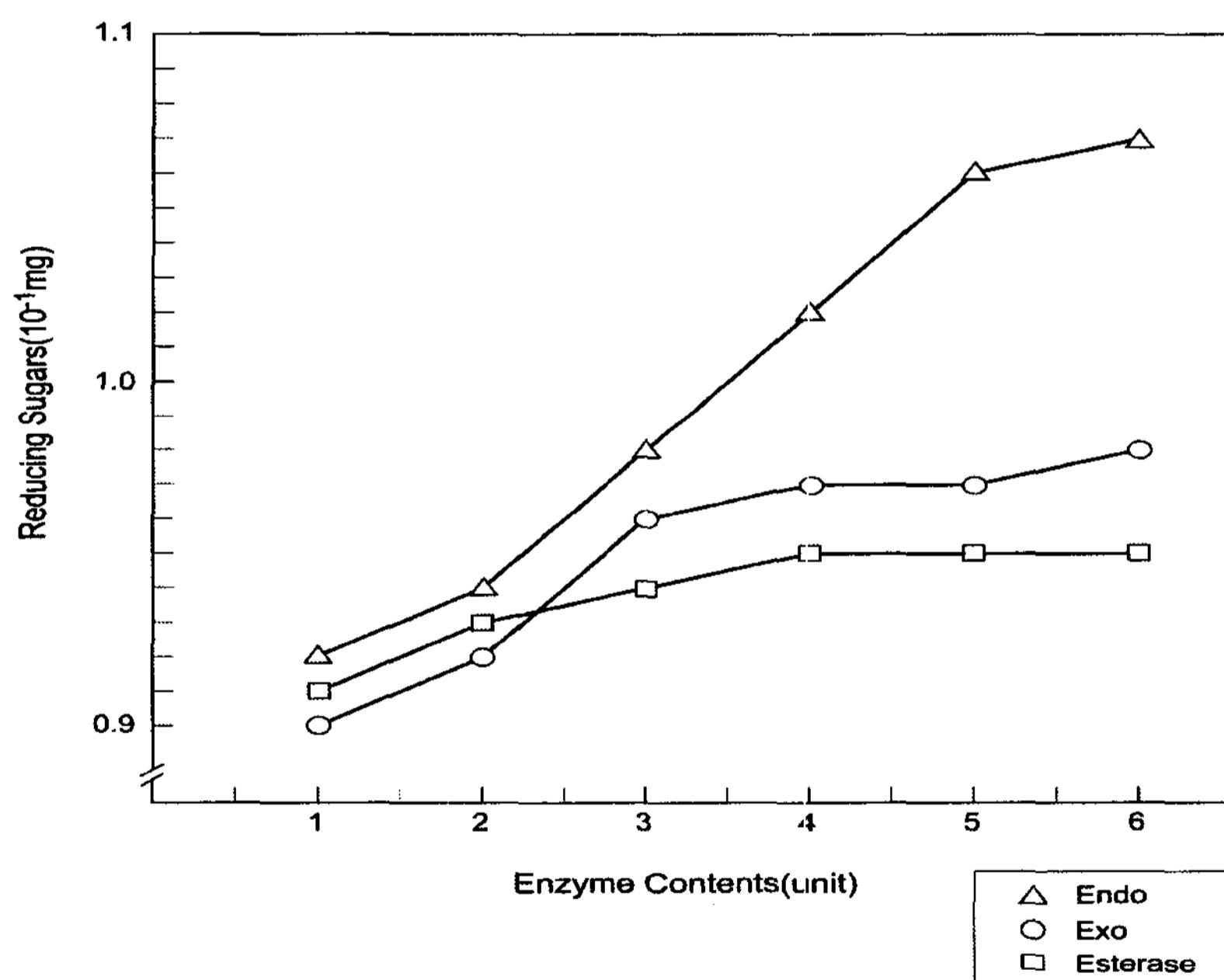


Fig. 6. Effect of enzyme dosage on reducing sugars.

4. 결 론

본 연구에서는 endo-xylanase, exo-xylanase 및 acetyl-esterase 효소 처리한 펄프의

특성 변화에 대하여 고찰한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

- (1) 온도에 따른 3가지 효소의 상대적 활성도 비교는 endo-xylanase의 경우 50°C에서 상대 활성도의 최대값이 0.8을 나타내었고, exo-xylanase는 40°C에서 최대값 0.9, 그리고 acetyl- esterase는 40°C에서 최대값 0.95를 나타내었다.
- (2) pH 변화에 따른 상대 활성도 값은 endo-xylanase의 경우 pH 6에서 0.8을 나타내었고, acetyl-esterase의 경우 pH 6에서 0.95, 그리고 exo- xylanase의 경우 pH 5에서 0.9를 나타내었다.
- (3) 반응시간에 따른 3가지 효소의 활성도는 효소의 종류에 거의 의존하지 않았고, 모두 처리 후 30분 이내에 활성도 값이 0.9정도로 대동소이하게 나타났다.
- (4) Kappa number의 변화는 효소량 1unit에서 6unit까지 endo-xylanase 처리인 경우 19에서 17.5로 감소하였고, exo-xylanase 처리인 경우 18.8에서 17.9, 그리고 acetyl-esterase 처리인 경우 19.1에서 18.3으로 감소하였다.
- (5) Brightness의 변화 정도는 endo-xylanase 경우 효소량을 1unit로 처리하였을 때 32.8%(ISO)이였고, 6unit 처리시 34.0%(ISO)로 증가하였다. 또한 exo-xylanase로 처리한 경우 brightness가 각각 1unit에서 33.0%(ISO)이였고, 6unit에서 33.5% (ISO)을 나타내었으며, acetyl-esterase인 경우 1unit에서 32.9%(ISO), 6unit에서 33.1%(ISO)를 각각 나타내었다.
- (6) 각각의 효소 첨가량 6unit를 기준으로 하여 exo-xylanase로 처리한 경우 0.098mg의 환원당이 생성되었고, acetyl-esterase는 0.09mg, endo-xylanase는 0.107mg의 환원당이 생성되었다.

참 고 문 헌

- 1) Ahlgren, Elisabeth, Erriksson, K. E. and vestsrberg Olof. Characterization of cellulase and related enzymes by Isoelectric focusing, Gel filtration and zone Electrophoresis, *Acta Chemical Scandinavica* 20 : 937 (1967).
- 2) Call, H. P. Waste paper processing using lignolytic enzyme for deinking comprises adding to paper pulp treated with reducing and oxidizing agent to adjust redox potential in flotation cell, patent Ep 447672 (1991).
- 3) Caulfield, D. F, Wayne. and Moore E. Effect of varying crystallinity of cellulose on enzymic hydrolysis, *Wood Science* 6(4) : 375 (1974).
- 4) Clark, T, Mcdonald, A. and Senior, D. Mannase and xylanase treatment of soft

- wood chemical pulps, Boston, Chapter 14, pp. 153 (1989).
- 5) Cowling, E. B. Properties of cellulose and lignocellulosic Materials as substrates for enzymatic conversion processes, Biotechmol and Bioeng. symp.(6) : 95 (1976).
 - 6) Cowlling, E. B. and Brown. Wynford. Structure features of cellulosic materials in relation to enzynertic hydrolysis, cellulase and their applications chapter 10 pp. 153
 - 7) Farrell, R. L, Skerker, P. and Chang, H. M. Im-vitro chemical pulp bleaching with enzyme acting on hemicellulose with exo-xylanase., patent GB 2248075 (1992).
 - 8) Enzymatic treatment of paper pulp using cellulase patent Ep 262040 (1988).
 - 9) Enzyme exhibiting cellulase activity at endo-glucanase from Bacillus Sp., parent WO 9110732 (1991).
 - 10) Kazutosi Nisizawa, Yoshimi Tomita, Takahisa kanda, Hiroshi suzuki and Kazumase Wakabayash. Substrate specificity of C1 and CX cellulase components from fungi, Fermenr. Technology, Today 719 (1972).
 - 11) Kirk, T. K. and change, H. Holzforschung 29 : 56, 1975 Halliwell, G. and Griffin, M. The nature and mode of action of the cellulolytic component C1 of trichoderma koningii on native cellulose, *Biochem. J.*, 135 : 587 (1973).
 - 12) Kruus, I., Laine J. and Koljonene, M. Improbement oxygen bleaching of pulp by treatment of pulp with gemicellulose-hydrolysing enzyme, patent Wo 9102840 (1991).
 - 13) Kulshreshtha, A. K. and Dweltz, N. E. Paracrystalline lattice disorder in cellulose, *J. f polymer science. II* : 487 (1973).