

# 정제된 Cellulase 구성요소간 상승작용이 펄프섬유의 특성에 미치는 영향 (제1부 Cx 구성요소비에 의한 변화)

김병현 \* , 신중순\*

\* 중부대학교 기술공학부 인쇄공학과

(1998년 11월 21일 접수, 1998년 12월 20일 최종수정본 접수)

Characteristics of Paper making fiber with Synergism  
and Combined effect of Purified two major Cellulase  
Components Treatment.

(I. The effects of Cx components contents)

*Byong-Hyon Kim \* . Jong-Soon Shin \**

\* Dept. of Graphic Art Technology College of Engineering Joong Bu University

(Received 21 November 1998, in final form 20 December 1998)

## Abstract

To investigate the most effective way of cellulase utilization on paper making process and the systematic way of how to combine its components for better use, purified two major cellulase were applied to bleached kraft pulp at various dosage in the refining process and estimated the synergism effect of each components in the characteristics of papermaking fiber.

Freeness was not changed by C<sub>1</sub> Component dosage but strongly increased by C<sub>x</sub> Component dosage.

Drop in fiber viscosity, increase in WQV, fiber shortening and fine

generation was strongly influenced by C<sub>x</sub> Component, it seems to be that C<sub>x</sub> Component works a hydrogenate that breaks hydrogen bonding in fiber and enhances pooling effect of fiber.

C<sub>1</sub> Component was little influenced these characteristics of fiber but considered to help to make fiber surface smooth.

## 1. 서 론

Cellulase는 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소의 조합효과에 의해 섬유소를 분해하는 특성을 갖는다. Wood et al.<sup>1)</sup>은 결정형 Cellulose 표면에서 random 하게 작용하는 endo-glucanase (C<sub>x</sub>)에 의해 반응성 cellulose로 변환 시킨 후 cellobio hydrolase에 의해 가수분해를 진행시킨다고 하였으며, 이와 같은 반응성은 상호 조합효과에 의해 촉진된다고 하였다.

또한 Reese<sup>2)</sup>는 C<sub>1</sub> 구성요소에 의해 결정형 cellulose를 변형된 cellulose로 변화 시킨 후 endo glucanase (C<sub>x</sub>)에 의한 oligomer단위의 가수분해와 CBH에 의한 cellobiose 단위의 가수분해 및 glucohydrolase에 의한 glucose 단위의 가수분해가 이루어 짐으로서 섬유소가 분해된다고 하였다.

이와 같이 cellulase를 구성하는 구성요소에 의한 섬유소 분해 모델이 정확하게 확립되지 않은 상태 및 각 구성요소 들이 조합효과에 미치는 영향이 예측되지 않은 상태에서 복합 상품효소를 제지 공정에 이용할 경우 정확한 결과의 예측이 어려울 뿐 아니라 부정적인 적용 결과도 초래하게 될 것으로 사료된다.

이와 같은 이유로 인해 상품효소를 공정중에 적용할 경우 적용목적에 따른 효소의 선택이 어려울 뿐만 아니라 부정적인 결과에 효과적으로 대처하기 어렵기 때문에 효소를 제지공정중에 적용하는데 있어 제약요건으로 작용되어진다.

따라서 본 연구에서는 분리 정제된 구성요소를 정량적으로 혼합하여 제지 공정중에 처리함으로써 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub>의 첨가 비율의 변화에 따른 섬유 특성변화를 관찰함으로써 각 구성요소 들이 조합효과에 어떤 영향을 미치고 있는지를 분석하고 이로 인한 섬유특성에 미치는 영향을 규명하여 제지공정 적용 목적에 따라 구성요소간 분포비를 예측 가능케 함으로서 향후 새로운 효소의 개발을 위한 자료의 제공 및 cellulase 적용시 결과를 설정 가능케 함으로서 부정적 요인을 제거함으로써 cellulase의 적용 및 응용범위를 확대하는데 기여코자 하였다.

## 2. 실험

### 2.1. 공 시재료

#### 2.1.1. Cellulase

정제된 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소를 완충용액 (pH4.8)으로 100배 희석한 후 희석된 cellulase의 구성요소를 조합비율에 따라 혼합하여 사용하였다.

#### 2.1.2. 펄프

Western Pulp사에서 제조한 침엽수 표백 크라프트 펄프를 사용하였다.

### 2.2. 실험방법

#### 2.2.1. 효소처리

본 실험에 사용한 효소는 chromatograph법에 의해 정제된 사양급 효소를 DEAE-Sephadex CL-6B를 사용 재정제한 후, 단백질이 주 피크를 갖는 fraction No. 9와 fraction No. 109에서 분리한 시료를 기질을 달리한 역가 측정 결과를 기초로 기질 분해능력에 따라 C<sub>1</sub> 구성요소와 C<sub>x</sub> 구성요소로 칭하여 사용하였으며 기질에 따른 역가는 Table 1과 같다.

Table 1. Activity of cellulase component

Substrates	Activity (U/mL)	
	C <sub>1</sub>	C <sub>x</sub>
Carboxymethyl cellulose ( CMC )	5	120
Avicel ( Crystalline cellulose fiber )	18	-
Xylan ( Hemicellulose )	4	0.2

#### (가) C<sub>1</sub> Component

Sephadex G-75에 의해 정제된 효소 C<sub>1</sub> + C<sub>x</sub> +  $\beta$ - glucosidase를 DEAE-Sephadex를 이용 단백질 표면특성을 이용 재정제하여 분리된 시료를 기질변화한 역가 측정 결과 fraction No. 109에서 분리된 시료가 C<sub>1</sub> 기질 분해특성과 가장 유사함을 확인하고 C<sub>1</sub> 구성요소로 칭하여 acetate buffer solution pH 4.5을 이용 100배 희석하여 사용하였으며 이 시료에는 Table에서 보는 바와 같이 미량의 C<sub>x</sub> 구성요소

activity 와 헤미셀룰라아제 activity를 함유한 상태로 광범위한 의미에서의 C1 구성요소로서의 순수성이 인정되는 상태다.

(나) Cx Component

Sephades G-75에 의해 fraction No. 9에서 정제된 저분자량 Cx 구성요소로서 DEAE-Sepharose에 의한 재정제에서도 단백질의 순수성을 확인할 수 있었으며 기질 분해 특성 또한 Cx의 특성을 갖는 구성요소로 확인되며 이 효소를 acetate buffer solution pH 4.5에 100배 희석한 후 사용하였다.

2.2.2. 펄프

캐나다의 Western Pulp Co.에서 제조한 침엽수 표백 크라프트 펄프 Sw-BKP를 사용했으며 펄프에 대한 일반적인 성질은 Table 2와 같다.

Table 2. Characteristics of pulp samples

Species	Western hemlock Western red cedar White spruce
Weihgted averagellulose fiber length (mm)	2.16
Brightness (% ISO)	90
Alcohol-benzen	0.2
Acid lignin	2.1
Ash	0.7
<i>a</i>	77.6
cellulose <i>β</i>	15.8
<i>γ</i>	6.6

2.2.3. 효소처리

리파이닝 전 펄프를 해리한 후 40℃ 온도를 유지케하여 효소를 처리하여 펄프의 농도가 10%가 되도록 물을 첨가하여 밀폐된 비닐 봉지에 담아 40±1℃ 물중탕에서 1시간 동안 반응시키고 리파이닝을 실시하였으며 시료는 5℃ 냉장보관하였다.

2.2.4. 고해

TAPPI Standard T 248 hm-85에 준하여 PFI mill 방식을 채택하였다.

### 2.2.5. 섬유 점도 측정

효소처리된 섬유의 리파이닝에 의한 중합도 변화를 관찰하기 위해 TAPPI Standard T 230 om-85에 준하여 실험하였다.

### 2.2.6. 섬유장 분포 측정

효소처리후 55° SR로 고해된 시료를 Kajaani FS-100을 이용 섬유장 분포를 측정하였다. 섬유장 분포 변화를 용이하게 확인하기 위해 1mm 이하, 1-2mm, 2mm 이상으로 구간을 설정하여 구간내의 값을 합산하여 무게비로 환산하였다.

### 2.2.7. 미세섬유 함량 측정

각 처리에 대한 동일 고해도 55° SR에서의 미세섬유함량을 dynamic drainage & retention jar(Britt jar)를 이용 TAPPI Standard T 261 pm-79에 의거 측정하였다.

### 2.2.8. 섬유의 WRV 측정

각 처리 조건에 따른 섬유의 보수성 변화를 관찰하기 위해 효소 C<sub>1</sub> 구성요소 및 C<sub>x</sub> 구성요소의 농도를 달리 처리한 시료를 동일 고해도 55° SR를 유지케 한후 채취하여 각 시료를 원심 분리기에서 3000g, 온도 20±1°C 로 15분간 탈수시킨 후 원심 분리한 후의 섬유 무게와 전건된 후의 섬유 무게를 이용하여 보수성값을 계산하였다.

(가) 구성요소 처리 농도에 따른 WRV 변화

C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소의 처리농도에 따른 섬유의 보수성 변화를 관찰하기 위해 각 구성요소를 처리농도를 달리하여 고해전에 처리한 후 동일한 고해도 55°C SR 조건하에서 WRV를 측정하였다.

(나) 리파이닝에 따른 WRV의 변화

고해전 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소를 각 0.05% 처리한 후 리파이닝중 각각의 고해도 조건하에서 시료를 채취하여 WRV를 측정하였다.

### 2.2.9. 여수도 변화 관찰

동일한 고해조건에서 각 구성요소가 여수에 미치는 영향을 관찰하기 위해 구간을 설정하여(5,000 Revolution, 10,000 Revolution, 15,000 Revolution) 각 구간별 여수도 값의 변화를 관찰하였다.

### 2.2.10. 주사 전자 현미경 촬영

각 처리 조건에 따른 시료를 에탄올 시리즈 방식에 의해 탈수시킨 후 400mmHg, 60°C의 조건으로 진공 건조한 다음 주사 전자현미경으로 관찰하였다.

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1. C<sub>x</sub> 구성요소 비에 의한 변화

##### 3.1.1. 섬유 점도

각 효소 처리량에 따른 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소를 조합하여 고해전 처리한 후 같은 고해도 조건 (55° SR)에서 채취한 시료의 점도값을 측정후 C<sub>x</sub> 구성요소 처리량을 변화시킨 변수를 X축으로 한 변화 경향을 관찰하였다.

C<sub>x</sub> 구성요소 조합 농도가 증가할수록 점도 저하현상이 비례적으로 나타나는 경향을 확인할 수 있었다. 특히 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소를 과량 조합할 경우 (C<sub>1</sub> 0.1%, C<sub>x</sub> 0.1%)의 점도는 10.4cp로서 무처리 시료의 점도 13.05cp값에 비해 25% 이상 저하하는 결과가 확인되었으며, 이와 같은 결과는 C<sub>x</sub> 구성요소 단독처리 (0.1%)시 15%의 점도 저하율과 비교할 때 10% 이상이 C<sub>1</sub> 구성요소 에 의한 조합효과에 의한 결과임을 확인할 수 있었다.

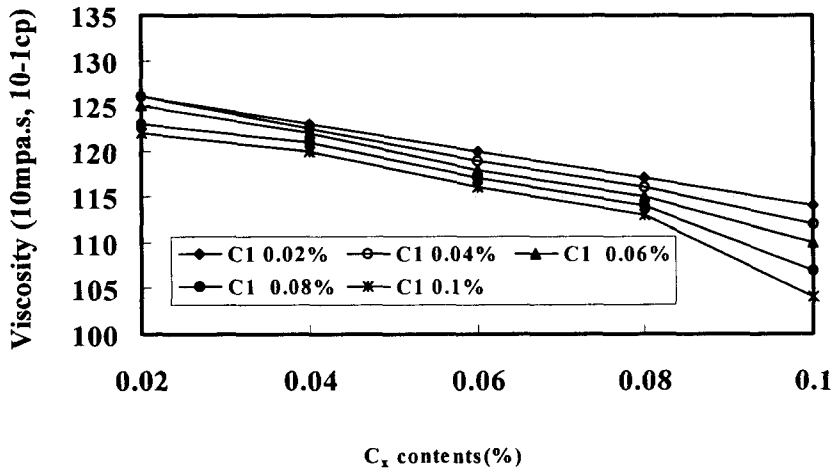


Fig. 1. Combined effect of C<sub>1</sub> and C<sub>x</sub> component on viscosity.

##### 3.1.2. 섬유장 분포

각 효소 처리량에 따른 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소를 조합하여 고해전에 처리한 후 같은 고해도 조건 (55° SR)에서 채취한 시료의 섬유장 분포값을 측정하여 구간별 (1mm 이하, 1-2mm, 2mm 이상)로 구분하여 합산한 무게비로 섬유장 분포 경향을 관찰한 결과는 Fig.1, Fig.2, Fig.3과 같다. 이때에 동일한 고해도를 유지하기 위해 소요된 고

해 시간 (PFI mill revolution)은 효소처리 농도가 높을수록 증가하였으며, 이로 인해 각 시료의 고해 시간에는 변화가 있었다.

이와 같은 고해 시간의 차이에 의해 발생된 오차를 보완하기 위해 동일한 고해 시간 (PFI mill 18,000 revolution)에 따른 섬유장 분포 변화값은 Table1과 같다.

Table 1. Fiber length distribution of refined pulp(PFI mill 18,000 revolutions).

섬유장	C <sub>1</sub> Component			
	C <sub>x</sub> Component	0.005	0.01	0.05
1mm 이하	0.02	57.9	58.4	60.4
	0.08	58.1	58.7	60.7
1-2mm	0.02	25.6	25.6	23.6
	0.08	25.2	25.4	23.6
2mm 이상	0.02	16.5	16.0	16.0
	0.08	16.7	15.9	15.7

Control : 1mm 이하 : 57%, 1-2mm : 25%, 2mm 이상 : 18%

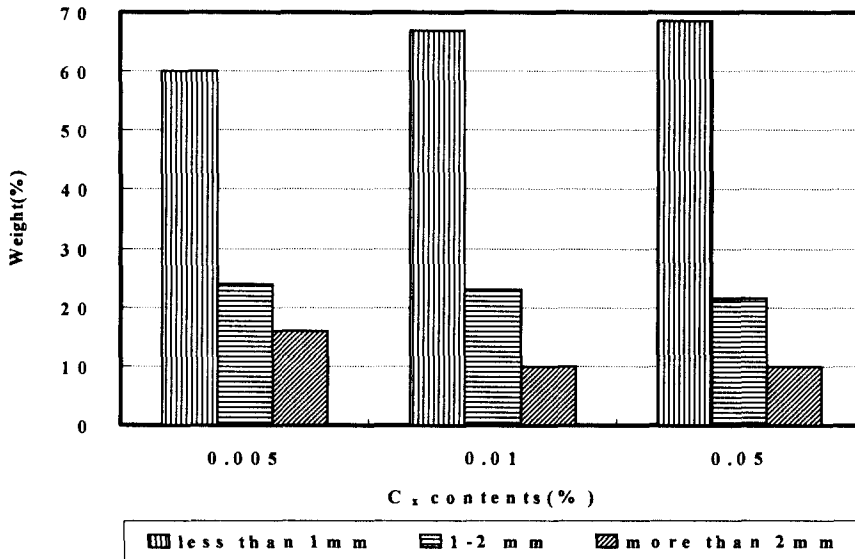


Fig. 2.(A). Combined effect of different C<sub>x</sub> content at 0.02% .  
C<sub>1</sub> component on fiber length distribution

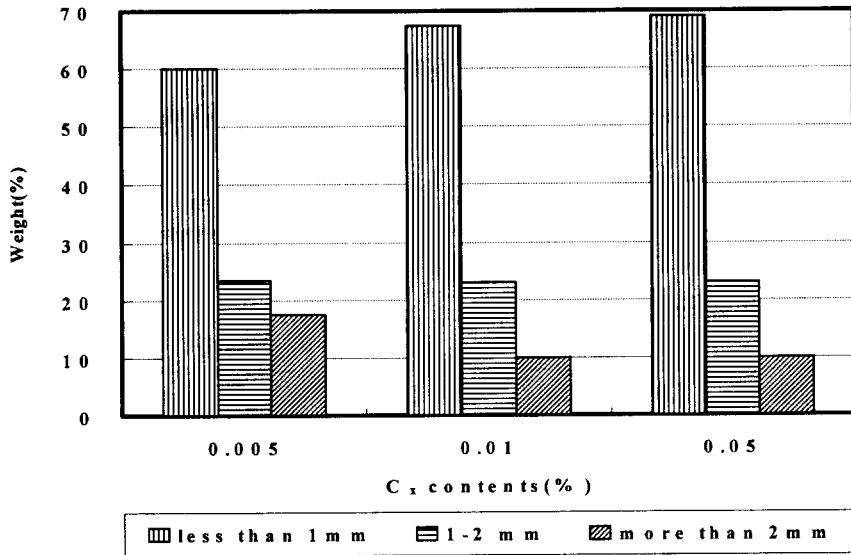


Fig.2.(B) Combined effect of different C<sub>x</sub> content at 0.08% C<sub>1</sub> component on fiber length distribution.

C<sub>x</sub> 구성요소 소량 조합 시는 단섬유 함량이 약간 증가하는 반면 장섬유, 중간섬유 순으로 함량이 저하하는 경향이며 C<sub>x</sub> 구성요소의 조합농도가 증가할수록 단섬유 함량의 증가 추세와 단섬유 함량의 감소 추세는 현격하게 커지는 경향을 나타낸다. 반면에 중간 섬유의 함량은 약간씩 감소하는 경향이나 감소폭은 크지 않았다.

이와 같이 단섬유 함량이 C<sub>x</sub> 구성요소의 조합 농도에 따라서 변화하는 경향은 이 효소가 조합효과에 의한 섬유의 분해작용에 주된 영향을 미치는 요인인 것으로 생각되며 같은 고해도를 유지하기 위해 고해 시간 이 많이 소요된 것도 단섬유함량을 증가시킨 원인으로 판단된다.

이와 같은 고해 시간의 차이에 의한 변화 요인을 배제하기 위해 같은 고해 시간에서의 섬유장 분포를 검토한 결과 단섬유 함량의 증가는 크게 둔화되어 1% 정도의 상승현상을 확인하였다. 반면에 중간섬유장 분포는 크게 증가하여 무처리 시료보다 약간씩 증가한 결과를 나타내는데, 이와 같은 결과로 미루워 효소처리에 의한 섬유장 저하는 장섬유에서 단섬유화로 진행되는 현상보다는 장섬유의 섬유표면 박리현상과 병행하여 점진적인 섬유장 저하가 이루어지는 것으로 판단되며, 이와 같은 결과는 미세섬유분의 함량증가에서도 확인할 수 있었다. 또한 같은 고해 시간을 기준으로 C<sub>x</sub> 구성요소 단독처리시와 비교할 경우에 섬유장 분포의 변화가 큰 차이를 나타내지 않았으며, 다만 C<sub>x</sub> 구성요소의 반응은 단독 및 조합처리시 모두 섬유내 개질에 작용되



며 C<sub>1</sub> 구성요소에 의한 조합효과는 섬유표면에 노출된 부분에서의 반응을 유도하는 것으로 판단되었다.

### 3.1.3. WRV

처리 농도에 따라 조합한 효소를 고해전에 처리하여 같은 고해 시간에서의 구성요소간 상승 작용에 의한 WRV 변화값을 관찰하였다. C<sub>x</sub> 구성요소의 조합농도가 증가할수록 WRV값이 저하하는 경향을 나타내는데 C<sub>1</sub> 구성요소 조합 농도를 변화 시켜도 비슷한 경향을 나타내고 있다.

특히 C<sub>x</sub> 구성요소가 미량 조합된 경우에는 C<sub>1</sub> 구성요소 조합농도가 낮을수록 WRV가 증가하는 경향이나 과량 조합된 경우에는 C<sub>1</sub> 구성요소 조합농도와 관계없이 전반적으로 저하하는 경향이며 특히 C<sub>x</sub> 구성요소가 0.1% 조합된 경우에는 10% 이상의 WRV 저하현상을 확인할 수 있었다.

각 구성요소를 단독으로 처리할 경우에는 WRV값이 증가하는 경향을 나타냈으나 구성요소 조합에 의해 전반적으로 WRV가 저하하는 경향은 이 효소의 조합효과에 의한 것으로 판단되며, 이로 인해 섬유의 peeling 현상등의 촉진으로 섬유 두께의 저하등이 원인으로 작용된 것으로 판단되며 Table 2에서와 같이 C<sub>1</sub> 및 C<sub>x</sub> 구성요소의 조합 처리에 의해 섬유의 결정화도가 증가한 결과로 미루워 상대적으로 비결정영역의 분포비가 저하하여 물을 함유할 수 있는 섬유내 공간이 저하한 결과로 판단된다.

아울러 결과는 Montencourt et al<sup>3)</sup>이 do-cellulase 단독 처리에 의한 WRV 증가 현상은 결정형 표면에 작용하여 cellulose의 수화 능력을 향상시킨 결과이며 exo-cellulase 혼합 처리에 의한 WRV 감소 현상은 수화된 부위의 가수분해에 의한 결과로 설명한 것과 유사한 경향으로 판단된다.

Table 2. Change of crystallinity index by combined cellulase components treatment

C <sub>x</sub> component (%) \ C <sub>1</sub> component (%)	0.005	0.01	0.05	0.1
0.02	69.6	70.9	71.4	71.7
0.04	69.8	71.7	71.9	72.6
0.06	70.2	73.0	74.1	73.9
0.08	70.3	73.5	74.4	75.3

Control : 69.4%

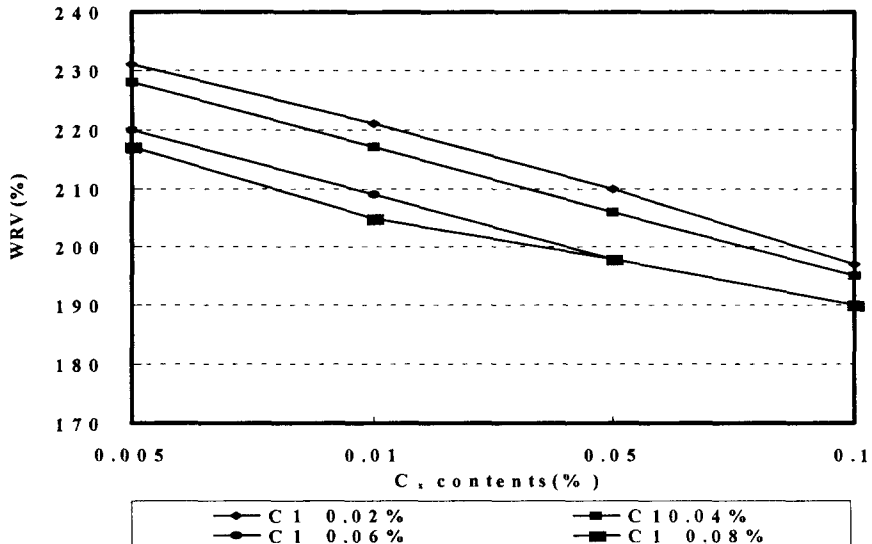


Fig. 3 Combined effect of C<sub>1</sub> and C<sub>x</sub> component on WRV.

### 3.1.4. 밀도

동일한 PFI mill revolution에서의 밀도 변화를 관찰한 결과, C<sub>x</sub> 구성요소 조합 농도가 증가할수록 밀도가 증가하는 경향을 나타낸다. 그러나 C<sub>1</sub> 구성요소의 조합 농도에 의한 영향은 나타나지 않았다. 반면에 C<sub>1</sub> 구성요소가 과량 혼합된 경우에는 밀도가 저하하는 경향을 확인하였다.

또한 C<sub>x</sub> 구성요소 단독처리시 보다도 C<sub>1</sub> 구성요소와의 조합처리에 의해 밀도가 저하하는 결과를 얻을 수 있었는데 그 원인은 C<sub>x</sub> 구성요소 단독처리의 경우에는 섬유내 침투 및 반응에 의해 섬유의 유연성 증가에 주로 작용되지만 C<sub>1</sub> 구성요소와 조합할 경우 가수분해 반응의 촉진으로 섬유 표층 박리가 촉진되며 이로 인한 섬유 두께의 저하등 인 것으로 예견되며, 이와 같은 예견은 WRV값의 저하 현상으로도 설명이 가능할 것으로 판단된다.

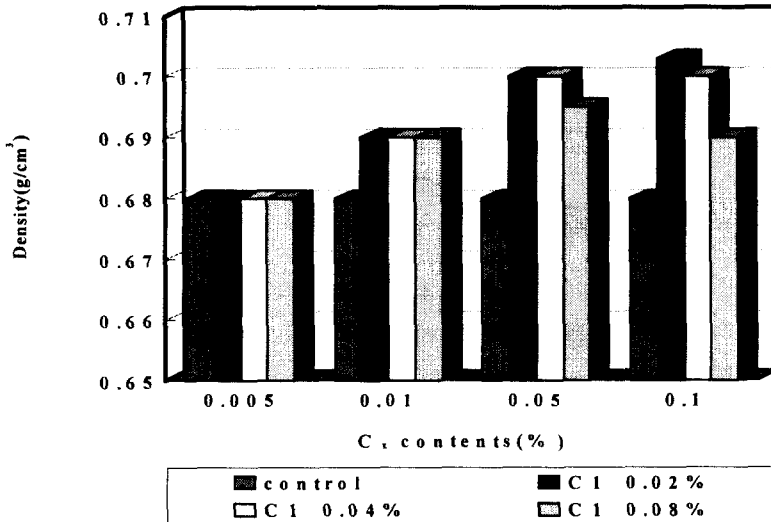


Fig. 4. Combined effect of C<sub>1</sub> and C<sub>x</sub> component on density.

### 3.1.5. 미세섬유 함량

PFI mill 18,000 revolution에서의 fines 함량 변화를 관찰한 결과, C<sub>x</sub> 구성요소 조합 농도가 증가할 수록 비례해서 미세섬유분이 증가하는 경향을 확인하였으며 C<sub>1</sub> 구성요소 조합농도 변화에 의해서는 크게 영향받지 않는 경향을 나타낸다.

특히 C<sub>x</sub> 구성요소가 과량 조합된 경우에는 무처리 시료에 비해 미세섬유함량이 9% 증가하는 결과를 나타냈으며, 이것은 C<sub>x</sub> 구성요소 단독처리의 경우와 비교해도 증가율이 높게 나타난 결과로 구성요소간 조합효과 및 이로 인한 섬유 세포벽 박리 현상이 촉진된 것으로 생각된다.

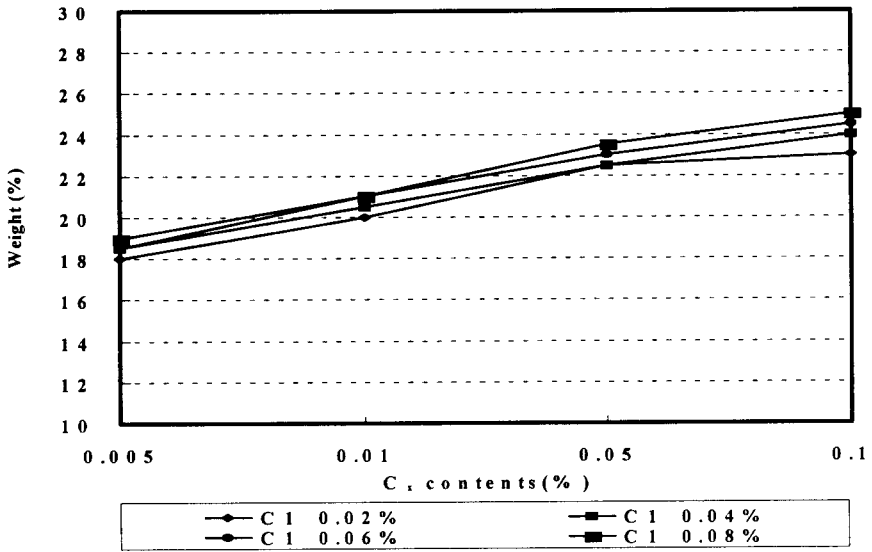


Fig. 5 Combined effect of C<sub>1</sub> and C<sub>x</sub> component on fines content.

## 4. 결 론

구성요소간 조합효과에 의한 섬유점도의 저하 현상은  $C_x$  구성요소의 조합 농도가 지배하는 것으로 확인되었다. 즉, 이 효소의 조합농도가 증가할수록 비례해서 섬유점도 저하 현상을 확인 할 수 있었다. 이와 같은 결과는  $C_1$  구성요소를 단독으로 처리할 경우 점도 저하가 거의 관찰되지 않은 결과와 비교할 때 구성요소간 조합효과에 의한 결과로 판단되며 Chanzy et al이 각 구성요소간 섬유점도 특성의 상이함으로 인해  $C_x$  구성요소 단독 및  $C_1$ ,  $C_x$  구성요소 혼합처리에 의한 상이한 결과를 초래한다는 주장을 근거로 판단할 때,  $C_1$  구성요소는  $C_x$  구성요소에 의한 효소반응이 진행된 후 노출된 부위를 가수분해함으로써 조합효과를 하는 것으로 판단된다.

섬유장 분포 변화는 같은 고해도를 기준으로 고해를 실시할 경우, 고해 시간의 차이에 의해 단섬유 함량이 크게 증가하는 경향이었으며, 이와 같은 단섬유의 증가 비율은 장섬유의 감소 비율로 상쇄되는 경향이었다. 이 경우 단섬유화를 주도하는 요인은  $C_x$  구성요소의 조합 농도였으며, 특히 0.005%~0.01% 구간에서 큰폭의 변화가 확인되었다. 일정조합농도 이상에서 조합효과로 인한 섬유장 저하에 영향을 미치는 것으로 생각된다.

반면에 동일 고해시간에서는 섬유장 분포의 변화폭이 크게 둔화되어  $C_x$  구성요소 단독 처리에 의한 변화와 유사한 값을 얻을 수 있었다. 그러나 이때에 미세 섬유함량은  $C_1$ ,  $C_x$  조합처리의 경우  $C_x$  구성요소 단독 처리에 비해 2.5% 이상 증가하는 결과를 확인하였는데, 이와 같은 결과로 볼때 섬유장 분포의 단섬유화는  $C_x$  구성요소에 의해 주도되며  $C_1$  및  $C_x$  구성요소간 조합효과는 미세섬유 생성을 증가시키는 결과를 유도한 것으로 판단된다.

## 參 考 文 獻

1. Wood, T. M. Properties and mode of action of cellulase, *Biotechnol. and Bioeng.symp.*,(5),1975
2. Resse, E. T., Mandels, M. and Weiss, A. H. *Adv. in Biochem. Eng.* 2:181, 1972
3. Montencourt, B. S., Schamhart, D. H. J. and Eveleigh, D. E. *Microbial polysaccharides and polysaccharases*, Academic press, 1979
4. Chanzy, H., Henrissat, Bernard., Vuong, Roger. and Schulein, Martin. The action of 1,4-B-D-glucan cellobiohydrolase on valonia cellulose microcrystals : An electron microscopic Study, *FEBS LETTERS* 153(1) : 113, 1983
5. Lee, S. B. and Kim, I. M. Structureal properties of cellulose and cellulases reaction mechanism, *Biotechnol. and Bioeng.* Vol. X X V P.33, 1983
6. Kirk, T. K. and Chang, H. *Holzforschung* 29 : 56, 1975 Halliwell, G. and Griffin, M. The nature and mode of action of the cellulolytic component C<sub>1</sub> of *trichoderma koningii* on native cellulose, *Biochem.J.*135 : 587, 1973
7. Chanzy, H. and Henrissat, B. Unsiirectional degradation of valonia Cellulose microcrystals subjected to cellulase action, *FEBS* 184(2), 1985
8. Kirt, T. K. and Chang, H. *Holzforschung*, 29(56), 1975
9. Pommier, J. C., Fuentes, J. L. and Goma, G. Using enzymes to improve the process and the product quality in the recycled paper industry, *TAPPI J.*72(7), 1989
10. Pilon, L., Destrochers M., Jurasek, L. and Neumann, P. J. Increasing Water retention of mechanical pulp by biological treatments, *TAPPI J.* 65(6), 1982  
Polymeric materials : Penetration versus molecular size, *Forest products J* 16(10) : 61,1966
11. Jackson, L. S., Heitmann, J. A., and Joyce, T.W. Enzymatic modifications of secondary fiber, *TAPPI J.* 76(3), 1993