

## 재조합 Xylanase와 Cellulase의 연속처리에 의한 침엽수 Kraft 펄프의 Biobleaching\*<sup>1</sup>

김 현 주\*<sup>2</sup> · 위 승 곤\*<sup>2</sup> · 배 현 중\*<sup>2†</sup>

### Biobleaching of Softwood Kraft Pulp Using Recombinant Xylanase and Cellulase\*<sup>1</sup>

Hyun Joo Kim\*<sup>2</sup> · Seung Gon Wi\*<sup>2</sup> · Hyeun-Jong Bae\*<sup>2†</sup>

#### 요 약

효소 전처리에 의한 침엽수 Kraft 펄프의 표백 효율을 살펴보고자 *Trichoderma reesei*에서 2종류의 xylanase를 cloning하였다. Cloning된 xylanaseI과 xylanaseII 유전자를 *E. coli*에서 발현시켜 29 kDa의 재조합 단백질인 XYNI과 29.5 kDa의 XYNII를 생산하여 정제하였고, *Rumicoccus albus*로부터 cloning되어 변형된 50 kDa의 EGIV-CBDII를 동일한 방법으로 cellulase를 생산 정제하였다. 정제된 효소들을 각각 xylan과 CMC를 기질로 하여 효소 활성도를 측정한 결과 XYNI이 XYNII보다 효소활성이 더 높았으며, EGIV-CBDII 또한 높은 활성을 나타내었다. 이렇게 생산 정제된 xylanase와 cellulase를 이용하여 침엽수 Kraft 펄프를 대상으로 연속처리에 의한 biobleaching test를 실시하였다. XYNI을 처리하였을 때 백색도는 29.9% 증가하였고, XYNI을 1차 처리한 후 2차로 EGIV-CBDII를 처리하였을 때 백색도는 1차 처리구에 비해 9.1% 증가하였다. 그 후 3차 XYNI을 처리하였을 때 2차에 비해 7.3%의 bleaching의 효과를 볼 수 있었다. 또한 Kappa No.는 처리단계에 따라 8.1, 4.6 그리고 3.2% 각각 지속적으로 감소하였다. 이 실험결과를 통해 재조합 효소 XYNI과 EGIV-CBDII를 함께 이용하여 Kraft 펄프에 대한 biobleaching의 상승효과를 확인하였다.

\*<sup>1</sup> 접수 2007년 10월 20일, 채택 2007년 10월 30일

\*<sup>2</sup> 전남대학교 농업생명과학대학 BK21 목질 자원의 고도 이용팀. BK21 : Added-value utilization of lignocellulosic biomass, College of Agriculture & Life Sciences, Chonnam National University, Gwangju 500-757, Korea

† 주저자(corresponding author) : 배현중(e-mail: baehj@chonnam.ac.kr)

## ABSTRACT

To know the effect of enzymatic pre-treatment on softwood Kraft pulp, two xylanase-encoding genes, named *xynI* and *xynII* were isolated from *Thrichoderma reesei*. Structural genes of xylanase (XYNI, XYNII) and cellulase (EGIV-CBDII) were isolated from *T. reesei* and *Rumicoccus albus* respectively, and expressed in *E. coli* bacterial culture. The specific activity of purified recombinant XYNI is higher than XYNII. The brightness of XYNI treated softwood Kraft pulp increased to 29.9%. On further sequential treatment with EGIV-CBDII and XYNI the brightness of softwood Kraft pulp were improved to 9.1 and 73% respectively. As expected the Kappa number of softwood Kraft pulp also decreased 8.1, 4.6 and 3.2% respectively. Results further indicate that this sequential combination of enzyme treatment has synergic effect for improving bleaching of softwood Kraft pulp.

**Keywords:** biobleaching, cellulase, softwood Kraft pulp, recombinant protein, xylanase

## 1. 서 론

표백은 펄프로부터 잔류리그닌을 제거 혹은 무색화시키는 공정으로서, 전통적인 방법으로는 염소계 및 차아염소산계와 과량의 화학약품을 사용하며(Onysko, 1993), 고온을 필요로 하므로 많은 양의 에너지가 소모된다. 또한 화학펄프의 백색도를 향상시키기 위해 사용되는 위에 언급한 표백제는 흡착성 유기 할로젠 등의 환경오염 물질을 생성하여, 환경오염을 유발한다. 특히 염소를 함유한 표백 폐수의 환경오염은 갈수록 심각해지고 있으며, 최근에는 염소화합물의 사용량을 법적으로 규제하고 있는 실정이다. 1980년대 이후 표백 폐수로 인한 환경오염을 감소시키기 위해 크라프트 펄프의 전처리 과정 중 펄프의 표백제로 O<sub>2</sub>, O<sub>3</sub> 및 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>를 사용한 무염소(ECF) 또는 완전 무염소(TCF) 표백에 관한 연구가 진행되어 왔다. 그러나 이러한 방법은 독성물질의 생성이 낮은 환경친화적 표백제이나, 고비용이 소요되며 산소와 오존의 경우 셀룰로오스의 분해로 인한 수율과 강도가 저하되는 단점을 가지고 있다.

이로 인하여 1980년대 중반부터는 미생물을 이용한 생물학적인 처리 방법이 많이 연구되고 있다. 특히 xylanase를 이용하여 셀룰로오스와 리그닌 사이에 존재하는 헤미셀룰로오스를 분해하여 리그닌의

일부를 제거한 다음 표백단계에서 탈리그닌을 용이하게 하는 전처리 방법에 관한 연구결과가 보고되고 있다(Gubitz *et al.*, 1997; 강 등, 2001). 그러나 이러한 생물학적인 공정을 도입하기 위해서는 숙련된 기술과 충분한 선행연구가 요구되며, 고비용의 효소 생산비를 절감하는 것이 요구된다.

그 외에도 펄프의 생물학적인 표백에는 주로 리그닌 분해효소(Bajpai and Bajpai, 1992; Viikari *et al.*, 1994; 최 등, 2007)와 헤미셀룰로오스 분해효소(Jimenez *et al.*, 1997; Tenkanen *et al.*, 1997; 강 등, 1998)를 사용한 연구를 수행하였다. Kraft 펄프는 헤미셀룰로오스 중 xylose를 다량 함유하고 있기 때문에 이의 분해를 촉진하는 효소는 주로 xylanase이지만 mannanase, lipase,  $\alpha$ -galactosidase와 같은 효소를 같이 처리해주면 분해 능력이 향상된다고 보고되었다(Elegir *et al.*, 1995; Gubitz *et al.*, 1997; Wong & Saddler, 1992). 최근에 Clarke 등(2000)은 침엽수 펄프를 표백하기 위해 xylanase, mannanase,  $\alpha$ -galactosidase를 동시 혼합 처리하여 그 효능을 비교 분석한 바 있다.

또한 Viikari 등(1986)은 biobleaching 산업에서 xylanase의 중요성을 인식하여 활성이 뛰어난 xylanase를 가지고 있는 미생물을 찾는데 주력하였다. Xylanase 효소들은 bacteria (Gilbert & Hazlewood, 1993; Sunna & Antranikian, 1997), actinomycetes

(Ball & McCarthy, 1989; Beg *et al.*, 2000)와 yeast (Hrmova *et al.*, 1984; Liu *et al.*, 1998; 1999) 등에 존재하며 특히 fungi (Sunna & Antranikian, 1997)에서 많은 양이 생산되는 것으로 알려졌다. 그러나 xylanase 효소를 생산하는 미생물 자체를 직접 이용하는 데는 생산비가 너무 높고, 효소 생산량이 턱없이 부족하다. 더불어 효소의 활성 또한 충분치 않아 펄프의 표백 반응속도와 효율이 매우 낮다. 따라서 산업적으로 중요한 xylanase와 같은 효소를 효과적으로 이용하기 위해서는 이러한 문제점의 해결이 필요하며, 보다 효율적인 효소 생산 시스템이 갖추어져야 한다. 그 중 한 가지 방법이 우수한 형질을 지닌 xylanase 유전자를 cloning하여, DNA 재조합 기술을 통한 효소 대량생산 방법이다.

본 연구에서는 산업적으로 유용한 효소 중의 하나인 xylanase를 *T. reesei*로부터 cloning하여 *E. coli*에서 발현시켜 다량의 재조합 효소를 생산하였고, 동일한 방법으로 생산된 cellulase를 함께 이용하여 Kraft 펄프의 표백효과를 알아보는 방법을 고찰하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 공시균주와 plasmid

본 연구에서 공시 균주는 *Trichoderma reesei*를 사용하였으며, 숙주로는 *E. coli* JM109를 사용하였고, 발현 vector로는 pRSET vector (Invitrogen, USA)를 사용하였다. 또한 *Rumicoccus albus*로부터 cloning되어 cellulose binding site가 fusion된 cellulase (EGIV-CBDII)를 실험에 함께 사용하였다 (Bae *et al.*, 2003).

### 2.2. 배지 조성 및 배양

*T. reesei*는 액체 배지(0.5% yeast extract, 0.1% peptone, 0.1% K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 0.1% NaNO<sub>3</sub>, 0.05% MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O, pH 6.0)에 미리 계대배양한 공시균

을 접종한 다음 배양실에서 5일간 진탕배양(150 rpm, 25°C)하였다. PCR amplification products의 subcloning을 위하여 재조합된 plasmid를 포함한 *E. coli*는 ampicillin (50 µg/ml)을 첨가한 LB 배지에 전배양한 접종원을 접종한 후 shaking incubator (150 rpm, 37°C)에서 12시간 배양하였다.

### 2.3. *T. reesei* xylanase gene의 cloning

#### 2.3.1. RT PCR을 이용한 xylanase cDNA 합성

*T. reesei*에서 mRNA를 추출하여 cDNA를 합성하기 위해서 Lithium chloride 침전법으로 추출하였다. 배양된 균주를 여과지(Whatman No. 2)로 여과 후 균체를 모아 액체 질소로 급냉시킨 뒤 막자사발을 이용하여 파쇄한 후 500 µl RNA extract buffer (300 mM NaCl, 50 mM Tris-HCl (pH 8.0), 5 mM EDTA (pH 8.0), 2% (w/v) SDS, 10 mM β-mercaptoethanol)을 넣고 50°C에서 1시간 동안 반응시켰다. 3 M KCl을 70 µl 넣고 20분 동안 얼음에 놓은 다음 원심분리(7000 rpm, 10분) 하였다. 500 µl 상층액을 새 튜브로 옮긴 뒤 RNA를 침전시키기 위해서 8 M LiCl을 250 µl 넣고 4°C에서 overnight시킨 후 원심분리(7000 rpm, 15분)한 뒤 700 µl 증류수에 침전물을 녹인 다음 0.1 M Tris-HCl (pH 8.0)로 포화된 phenol을 500 µl 넣고 다시 원심분리(5000 rpm, 5분)를 실시하였다. 수용성 상층액을 새 튜브로 옮기고 동일량의 90% 에탄올을 넣어 -70°C에서 4시간 동안 반응시킨 후 원심분리(5000 rpm, 10분, 4°C)하고, 70% 에탄올로 세척한 다음 침전물을 건조시켰다. 50 µl 증류수를 넣어 RNA를 녹이고 280 nm에서 정량하였다. cDNA를 합성하기 위해 RNA 20 µg에 XYN I과 II의 ANTI primer 100 pmol을 각각 넣고 65°C에서 5분간 RNA를 변성시킨 뒤 상온에서 천천히 식혔다. Mixture buffer (5 X buffer, 25 mM dNTP, RNase inhibitor (400 U), reverse transcriptase (200 U))를 넣고 37°C에서 90분간 cDNA를 합성시켰다.

Table 1. RT-PCR-Specific primers

T. reesei xylanase (Accession NO.)	Primer
XYNI (X69573)	SEN 5' ATGGTCTCCTTCACCTC 3' ANTI 5' TTAGCTGACGGTGATG 3'
XYNII (X69574)	SEN 5' A TGGTTGCCCTTTTCAG 3' ANTI 5' CTAGTTGCTGACACTCT 3'

### 2.3.2. PCR 조건

Xylanase를 생산하는 *T. reesei*로부터 *xynI*와 *xynII*의 DNA sequence (Gene Bank)로부터 PCR을 하기 위해 *xynI* (X69573)의 *xynII* (X69573)의 primer를 Table 1과 같이 제작하였다. PCR 조건은 다음과 같다. cDNA 10  $\mu$ l, 제작된 primers (10 pmol) 50  $\mu$ l을 사용하였으며 10 $\times$  PCR 완충액(Takara, Japan) 10  $\mu$ l와 dNTP mixture (Takara, Japan) 5  $\mu$ l를 사용하고 최종 부피가 100  $\mu$ l가 되게 맞추었으며 효소는 Ex. tag polymerase (Takara, Japan)를 0.5  $\mu$ l 첨가하였다. PCR은 T1 thermocycler (Biometra)를 사용하여 수행하였다.

### 2.3.3. DNA sequencing 및 pRSET A subcloning

PCR products를 agarose를 이용한 전기영동을 한 후 agarose gel에서 잘라 정제하였다. 이렇게 얻어진 xylanase DNA를 pTa vector에 넣고, T7 specific primer로 sequencing을 하였다. sequencing 확인 후 *xynI*과 *xynII*를 제한효소 BamHI-XbaI으로 잘라 pRSET A에 넣고 9°C에서 ligation하여 *E. coli*에 transformation 시켰다.

### 2.3.4. *E. coli*의 transformation

Competent cell (JM109)을 녹인 후 DNA와 혼합하여 얼음에 2분간 방치한 후 42°C로 데워진 항온수조에서 45초간 반응시킨 다음 얼음에서 2분간 냉각시켰다. 미리 준비한 SOC media 0.9 ml를 첨가하고 37°C에서 60분간 shaking incubation 하였다. LB (50  $\mu$ g ampicillin/ml) agar plate에 도말하여 transformants를 얻었다. 이렇게 얻어진 colony를 mini-

prep (Maniatis *et al.*, 1989)으로 DNA를 추출하여 agarose gel 전기 영동하여 PCR 산물이 cloning 되었는지 확인하고, 확인된 형질 전환체는 glycerol stock하여 -70°C 저온 냉동고에 보관하였다.

## 2.4. 효소 생산 및 정제

형질전환 된 cell을 키운 LB agar plate에서 colony를 선택하여 5 ml LB (50  $\mu$ g ampicillin/ml) 액체 배지에 접종하였다. 진탕배양기(150 rpm, 37°C)에서 8시간 동안 전배양한 후 배양액을 250 ml LB (50  $\mu$ g ampicillin/ml) 액체배지에 접종하여 진탕배양기 (150 rpm, 37°C)에서 15시간 배양하였다. 배양 후 원심분리하여 세포 침전물에 lysis 완충액을 넣고 20 kHz에서 20분간 초음파로 파쇄처리한 후 3500 rpm에서 20분간 원심분리하였다. 상등액을 미리 준비된 Ni-NTA matrix에 binding시킨 후 완충액으로 충분히 세척한 후 용출하여 단백질을 얻었다.

## 2.5. 단백질 정량 및 효소 활성 측정

### 2.5.1. 단백질 정량

Enzyme의 정제 및 모든 실험 과정에 필요한 단백질의 정량은 Bradford법 (Bradford, 1976)을 사용하였다. 표준시료는 bovine serum albumin (BSA)를 사용하였다.

### 2.5.2. 효소 활성도 측정

정제된 효소를 조효소액으로 사용하였다. 기질용액으로 1% CMC를 첨가한 0.1 M 인산완충액(pH 6.0) 500  $\mu$ l와 조효소액 500  $\mu$ l (100  $\mu$ g enzyme)를 혼합하여 50°C에서 1시간 반응시킨 후 100°C에서 5분간 가열하여 반응을 정지시켰고 생성된 환원당은 3,5-dinitrosalicylic acid (DNS)방법에 따라 550 nm에서 흡광도를 측정하였다. 효소 1 Unit는 ml당, 분당, 1  $\mu$ mol의 환원당을 생성하는 효소량으로 정의하였다.

### 2.5.3. SDS-polyacrylamide gel (PAGE) 전기영동

Laemmli (1970) 방법에 따라 polyacrylamide gel 전기영동과 같은 조건에서 2% SDS를 포함하고 있는 12%의 acrylamide stacking gel로 0.75 mm의 slab gel을 만들었으며 시료 완충용액 5  $\mu$ l에 효소 시료 5  $\mu$ g씩을 녹여 2분간 100°C에서 증탕하였다. 이 시료를 slab gel에 가하여 120 V 직류 전기로 전기영동한 후 coomassie brilliant blue-R 250 (0.1%)용액으로 염색하여 단백질을 검증하였다. 또한 표준은 SDS low molecular weight marker (Sigma)를 사용하여 분자량을 측정하였다.

## 2.6. 생물학적 표백

### 2.6.1. 효소처리

준비된 시료는 총 3차에 걸쳐 처리를 하였다. 즉 미표백 침엽수 Kraft 펄프 1 g을 conical flask에 넣고 인산완충액(10 mM, pH 6.0) 10 ml로 해리시킨 후, 동일 완충액으로 희석된 효소액(20 U enzyme/g of oven dry pulp)을 시료에 첨가하여 표백처리를 실시하였다. XYNI 단독처리는 동일한 양의 효소량을 11시간 동안 반응시켜 연속처리 공정과 비교하였다. 연속처리는 1차로 XYNI를 flask에 넣어 40°C에서 5시간 동안 처리하였다. 그리고 2차 효소처리는 1차 처리된 시료에 EGIV-CBDII을 넣어 40°C에서 1시간 반응은 시켰으며, 3차 처리는 2차 처리된 시료에 XYNI을 넣어 40°C에서 5시간 반응시켰다.

### 2.6.2. Kappa값과 백색도 측정

각각의 단계별로 처리된 펄프의 잔류리그닌양의 지수인 Kappa값은 TAPPI방법(TAPPI T236 cm-85)에 따라 실시하였다. 또한 백색도는 각각의 단계별로 효소 처리된 시료를 여과지로 여과하고 충분히 세척한 후 건조시켜 백색도(DU 800 spectrophotometer, Beckman)를 측정하였다(Chung *et al.*, 2005).

### 2.6.3. 중성당분석

Blakeney 등(1983)의 alditol-acetate방법을 일부 변형시켜 기체크로마토그래피를 사용하여 중성당을 정량하였다. 즉 효소 처리된 시료 20 mg을 72% 황산으로 45분간 전가수분해시킨 후, 증류수를 가하여 황산 농도를 4%로 맞춘 후 121°C에서 2시간 동안 가수분해 하여 myo-inositol을 내부 표준물질로 하여 NH<sub>4</sub>OH와 NaBH<sub>4</sub>를 사용하여 중화 후 환원시켰다. 다시 초산, methylimidazole과 무수초산을 사용하여 아세틸화시켜 alditol acetate 유도체를 만들고 dichloromethane으로 alditol acetate를 추출하였다. 기체크로마토그래피(Chrompack, CP9000)로 정량하였다. 이때 컬럼과 검출기는 DB225 (J&W Scientific)와 F.I.D. detector를 사용하였다. 주입기, 검출기 및 컬럼온도는 각각 250°C, 250°C과 220°C이었다.

### 2.6.4. 주사전자현미경(SEM) 관찰

주사전자현미경 관찰을 위해 각각 처리 단계별로 시료를 채취한 후, 3% glutaraldehyde (pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer, 4°C)에서 4시간 동안 각각 고정하였다. 그 후 고정된 조직을 동일한 완충용액으로 세척하고, 1% osmium tetroxide (pH 7.4, 0.1 M phosphate buffer, 4°C)로 1시간 동안 후고정을 실시하였다. 다시 같은 완충용액으로 세척한 후 50, 70, 90, 95, 100% (3회) 에탄올용액에서 각 15분간 점진적으로 탈수시켰으며, iso-amylacetate (2회)에서 각 15분간 치환시킨 후 임계점 건조(Hitachi, HCP-2)를 사용하여 건조하였다. 건조된 시료에 금 코팅을 실시한 후 주사전자현미경(Hitachi, S-2400) 관찰을 실시하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. Xylanase 유전자의 cloning

*T. reesei*는 다양한 종류의 cellulase와 xylanase를 생산하는 filamentous mesophilic fungus로 알려

Table 2. Enzyme production and activity

Enzymes	Protein concentration (mg/ml)	Activity (U)	Specific activity (U/mg)
XYNI	0.880	0.300	6.97 ± 0.9
XYNII	0.226	0.226	4.42 ± 0.5
EGIV-CBDII	3.850	0.100	2.66 ± 0.4

져 있다. 특히 xylanase는 XYNI, XYNII, XYNIII가 발견되었으며, 알려진 xylanase의 DNA sequence (Gene Bank)로부터 PCR을 하기 위한 primer를 디자인 하였다(Table 1). *T. reesei*의 XYNI와 XYNII의 mRNA로부터 cDNA를 합성하여 제작한 primer를 이용하여 PCR 증폭한 결과 *xynI* (669 bp)와 *xynII* (690 bp)의 유전자를 cloning하였다(Fig. 1A). 확인된 유전자는 pRSET-A 발현 벡터를 이용하여 *E. coli*에서 발현시켰다.

### 3.2. 제조합 효소 정제와 활성

*E. coli*에서 발현된 제조합 효소 단백질의 정량에는 Bradford법을 사용하였다(Bradford, 1976). 생산된 제조합 효소들은 affinity chromatography에 의해 농축하였고 xylan과 CMC를 기질로 하여 각각의 xylanase와 cellulase의 활성을 측정하였다(Table 2). Xylanase 효소의 경우 XYNI의 효소활성이 XYNII보다 높게 나타났고, cellulase EGIV-CBDII 또한 CMC를 기질로 하여 높은 효소활성을 나타내었다(Bae et al., 2003). 이렇게 농축된 제조합 단백질 XYNI, XYNII, EGIV-CBDII를 대상으로 SDS-PAGE 전기영동을 실시하였다. 그 결과 XYNI과 XYNII는 29 kDa와 29.5 kDa의 분자량이 확인되었고, 50 kDa 크기의 EGIV-CBDII도 각각 확인되었다(Fig. 1B).

### 3.3. 미표백 펄프의 표백

생물학적 방법에 의한 Kraft 펄프 표백효율을 높이기 위해 연속적 효소 처리방법을 실험하였다. 펄프 전처리효소로서 많이 연구되고 있는 xylanase효소와 셀룰로오스 분해효소인 EGIV-CBDII 효소를

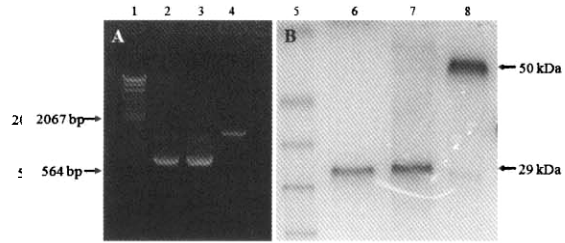


Fig. 1. Agarose gel electrophoresis of the PCR fragment and SDS-PolyAcrylamide Gel Electrophoresis protein gel. lane A. 1: DNA maker, lane 2: PCR products of *xynI*, lane 3: PCR products of *xynII*, lane 4: PCR products of *egIV-cbdII*. B. lane 5: Protein maker, lane 6: XYNI recombinant protein, lane 7: XYNII recombinant protein, lane 8: EGIV-CBDII recombinant protein.

Table 3. Brightness of softwood Kraft pulp treated with xylanase

Enzymes	Samples	Brightness (%)
	Control	21.1
XYNI	Treated	28.3
XYNII	Treated	27.5

생산 정제하여 침엽수 Kraft 펄프에 적용하였다. 본 실험에 앞서 표백 효율이 높은 xylanase효소를 선별하고자 XYNI과 XYNII 효소를 Kraft 펄프에 각각 처리하여 백색도의 변화를 관찰하였다(Table 3). 이 실험의 결과 XYNI의 표백효율이 XYNII보다 뛰어난 것을 관찰할 수 있었다. 따라서 이후의 실험에서는 XYNI과 EGIV-CBDII 효소를 가지고 연속적 효소처리에 의한 표백실험을 실시하였다.

침엽수 Kraft 펄프를 대상으로 1차 XYNI 처리 시 침엽수 펄프의 백색도는 21.1%에서 27.4%로 약 30% 정도 증가하였다(Fig. 2). 1차 XYNI이 처리된 펄프를 EGIV-CBDII를 이용하여 2차 처리한 후에는 백색도가 29.9%로 1차 처리에 비해 약 9% 증가하게 나타났다. XYNI과 EGIV-CBDII로 연속처리된 펄프에 XYNI으로 재처리 시 펄프의 백색도는 32.1%로 2차 처리된 펄프에 비해 7% 정도 증가하였다. 리

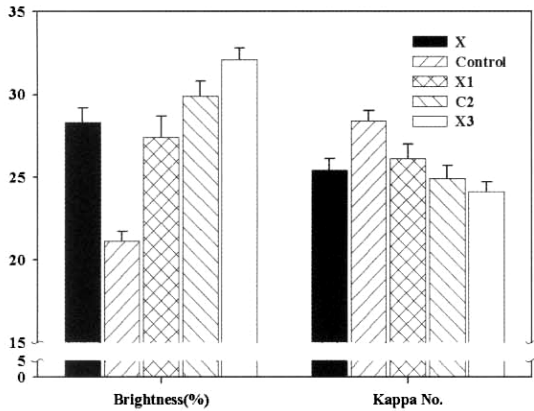


Fig. 2. Effect of enzyme treatment on brightness and Kappa number of softwood Kraft pulp. X, xylanase treatment on pulp for 11 h; X1, xylanase treatment with 20 Ug<sup>-1</sup> moisture free pulp with 20 Ug<sup>-1</sup> (40°C for 5 h; pH 6.0); C2, cellulase treatment on xylanase treated pulp; X3, xylanase treatment with on xylanase and cellulase series treated pulp.

그런 함량 지표인 Kappa 값의 변화를 살펴보면 XYNI을 단독 처리할 때 10.6% 감소하는 것에 비해 XYNI과 EGIV-CBDII를 연속 처리할 때 15.9% 하락 함으로써 연속처리가 훨씬 효과적임을 보여주었다. 침엽수 Kraft 펄프는 xylanase와 cellulase 효소의 연속처리단계에 따라 8.1%, 4.6% 그리고 3.2%로 순차적으로 감소하였다(Fig. 2). 일반적으로 xylanase 효소 전처리에 의한 펄프표백 효과는 많이 연구되어 있으나 cellulase 처리에 의한 표백효과는 아직도 잘 알려져 있지 않다. 그럼에도 불구하고 최종 처리된 펄프의 백색도는 xylanase와 cellulase의 효소 조합군의 처리에서 xylanase만을 처리한 펄프보다 표백

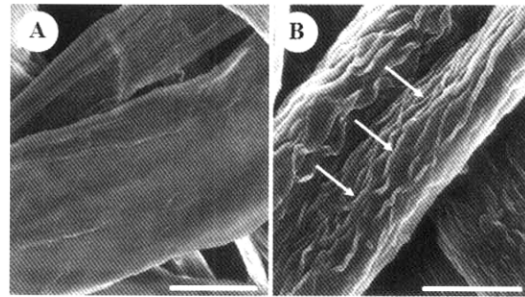


Fig. 3. SEM observation to study the effect on Enzyme treated pulp fiber. A: Control section. Microfibrils are not present. The surface was very smooth and glossy, B: Xylanase treated section. Microfibrils were visible and a wave due to the extraction of xylan and lignin (arrows). Scale bar = 10 nm.

효과가 높았으며 xylanase와 cellulase의 효소 조합군의 상승효과를 나타냈다. 이 같은 결과는 Verench 등(2007)도 cellulase효소를 이용한 전처리 표백 효과에 보고한 바 있다.

Xylanase와 cellulase의 효소 조합군으로 처리한 섬유의 표면 상태를 SEM으로 관찰한 결과 대조구의 섬유 표면은 외형적으로 평활하고 매끈한 반면 효소 처리된 펄프의 표면은 표면이 갈라지고 요철이 있으며 마이크로피브릴이 외부로 노출되어 나타났다. 아울러 효소 처리한 펄프를 기체크로마토그래피를 이용한 당 분석 결과 처리구의 총당함량은 대조구의 총당함량에 비해 약 6% 정도 더 감소한 것으로 나타났다(Table 4). 또한 펄프의 헤미셀룰로오스와 셀룰로오스의 주성분인 자일로오스와 글루코오스의 상대적인 비율(Xyl/Glu)은 0.10과 0.09로 나타났다. 이러한 결과는 XYNI과 EGIV-CBDII의 효소 처리에 의해 셀룰로오스보다는 자일란의 분해가 더 촉진된

Table 4. Effect of xylanase treatment on the softwood Kraft pulp

(g/kg)	Monosaccharides					Total	Xyl/Glu
	Ara	Xyl	Man	Glu	Gal		
Control	83	80.9	60.8	824.9		974.9	0.10
XYNI	63	71.7	54.8	781.6		914.4	0.09

것으로 나타났으며, 이 결과로서 헤미셀룰로오스와 결합하고 있는 잔류 리그닌의 단리가 촉진된 것으로 생각된다. Paice 등(1998)도 xylanase를 활용한 표백에 대한 긍정적인 효과에 대해 보고한 바 있다.

## 4. 결 론

산업효소인 xylanase를 분비하는 *T. reesei*로부터 xylanase gene을 cloning하여 재조합 DNA 기법을 사용하여 *E. coli*에 발현시켜 단백질을 정제하여 그 양과 활성을 측정한 결과 XYNII보다 XYNI의 활성이 더 높게 나타났다. 그리고 cellulase의 경우 CMC를 기질로 하여 활성을 측정한 결과 EGIV보다는 EGIV-CBDII의 활성이 더 높게 나타났다. 또한 이 효소들을 침엽수 Kraft 펄프에 처리하여 생물학적 표백 실험을 한 결과 xylanase와 cellulase의 효소 조합군인 XYNI와 EGIV-CBDII의 연속처리 공정이 XYNI 단독처리 공정보다 훨씬 효과적인 것으로 나타났다.

## 사 사

본 연구는 농촌진흥청 바이오그린21사업(과제번호: 20070301034013)의 지원에 의해 이루어진 것임.

## 참 고 문 헌

1. Bae, H.-J., G. Turcotte, H. Chamberland, S. Karita, and L. -P. Vezina. 2003. A comparative study between an endoglucanase IV and its fused protein complex Cel5-CBM6. *FEMS Microbiol. Lett.* 227: 175~181.
2. Bajpai, P. and P. K. Bajpai. 1992. Biobleaching of kraft pulp. *Process Biochem.* 27: 319~325.
3. Ball, A. S. and A. J. McCarthy. 1989. Production and properties of xylanases from actinomycetes. *J. Appl. Bacteriol.* 66: 439~444.
4. Beg, Q. K., B. Bhushan, M. Kapoor, and G. S. Hoondal. 2000. Production and characterization of thermostable xylanase and pectinase from a *Streptomyces* sp. QG-11-3. *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* 24: 369~402.
5. Blakeney, A. B., P. J. Harris, R. T. Henry, and B. A. Stone. 1983. A simple and rapid preparation of alditol acetates for monosaccharide analysis. *Carbohydr. Res.* 113: 291~299.
6. Bradford, M. M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* 72: 248~254.
7. Chung, M.-J., J.-H. Wu, and S.-T. Chang. 2005. Green colour protection of makino bamboo (*Phyllostachys makinoi*) treated with ammoniacal copper quaternary and copper azole preservatives. *Polym. Degrad. Stabil.* 90: 167~172.
8. Clarke, J. H., K. Davidson, J. E. Rixon, J. R. Halstead, M. P. Fransen, H. J. Gilbert, and G. P. Hazlewood. 2000. A comparison of enzyme-aided bleaching of softwood paper pulp using combination of xylanase, mannanase and  $\alpha$ -galactosidase. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 53: 661~667.
9. Elegir, G., M. Sykes, and T. W. Jeffries. 1995. Differential and synergistic action of streptomyces endoxylanases in prebleaching of kraft pulp. *Enzyme Microb. Technol.* 17: 954~959.
10. Gilbert, H. J. and G. P. Hazlewood. 1993. Bacterial cellulases and xylanases. *J. Gen. Microbiol.* 139: 187~194.
11. Gubtiz, G. M., T. Lisching, D. Stebbing, and J. N. Saddler. 1997. Enzymatic removal of hemicellulose from dissolving pulps. *Biotechnol. Lett.* 19: 491~495.
12. Hrmova, M., P. Biely, M. Vrsanka, and E. Petrakova. 1984. Induction of cellulose- and xylan-degrading enzyme complex in yeast *Trichosporon cutaneum*. *Arch. Microbiol.* 161: 371~376.
13. Jimenez, L., C. Martinez, I. Perez, and F. Lopez. 1997. Biobleaching procedures for pulp and agri-cultural residues using *Phanerochaete chrysosporium* and enzymes. *Process Biochem.* 4: 297~304.
14. Laemmli, V. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of Bacteriophage T<sub>4</sub>. *Nature* 227: 680~685.
15. Liu, W., Y. Lu, and G. Ma. 1999. Induction and



- glucose repression of endo- $\beta$ -xylanase in the yeast *Trichosporon cutaneum* SL 409. *Process Biochem.* 34: 67~72.
16. Liu, W., W. Zhu, Y. Lu, J. Kong, and G. Ma. 1998. Production, partial purification and characterization of xylanase from *Trichosporon cutaneum* SL409. *Process Biochem.* 33: 331~326.8.
  17. Onysko, K. A. 1993. Biological bleaching of chemical pulps: a review. *Biotechnol. Adv.* 11: 179~198.
  18. Paice, M. G., R. Bernier, and L. Jurasek. 1988. Viscosity enhancing bleaching of hardwood Kraft pulp with xylanase from a cloned gene. *Biotechnol. Bioeng.* 32: 235~239.
  19. Sunna, A. and Antranikian, G. 1997. Xylanolytic enzymes from fungi and bacteria. *Crit. Rev. Biotechnol.* 17: 39~67.
  20. Tenkanen, M., L. Viikari, and J. Buchert. 1997. Use of acid tolerant xylanase for bleaching of kraft pulp. *Biotechnol. Tech.* 11: 935~938.
  21. Verenich, S., K. Arumugam, E. Shim, and B. Pourdeyhimi. 2007. Effect of cellulase pretreatment of raw and bleached cotton fibers on properties of hydroentangled nonwoven fabrics. *J. Appl. Polymer Sci.* 105: 492~499.
  22. Viikari, L., M. Pauna, A. Kantelinen, J. Sandquist, and M. Linko. 1986. Bleaching with enzymes. *In*: Third international conference in biotechnology in pulp and paper industry, Stockholm, pp. 67~69.
  23. Viikari, L., A. kantelinen, J. Buchert, and J. Puls. 1994. Enzymatic accessibility of xylans in ligno-cellulosic materials. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 41: 124~129.
  24. Wong, K. K. Y. and J. N. Saddler. 1992. *Trichoderma* xylanases, their properties and purification. *Crit. Rev. Biotechnol.* 12: 413~435.
  25. 강규영, 조병목, 오정수. 2001. 백색부후균 생물 전처리에 의한 Kraft Pulp화의 특성. *목재공학* 29(4): 103~110.
  26. 강진하, 박성중, 정인수. 1998. 효소를 이용한 크라프트 펄프의 무염소표백. *펄프종이기술* 30(3): 84~94.
  27. 최윤정, 신유수, 조남석. 2007. RBBR 탈색능을 이용한 목재부후균의 선발 및 이들 균의 Laccase 효소 활성. *목재공학* 34(4): 46~53.