

제지 공정 적용을 위한 Cellulase의 정제 특성 및 처리 조건 선정에 관한 연구

김병현¹ · 전양²

Purification Properties and Treatment Conditions of Cellulase for Papermaking Processes

Byong - Hyon Kim¹ and Yang Jeon²

ABSTRACT

The main protein peak was observed in fraction No.9 and 109 when cellulase separation was conducted by use of DEAE-Sephadex. The protein obtained from fraction No.9 has the characteristics of C_x component and that from fraction No.109 characteristics similar to C₁ component. The effective reaction condition of the enzyme used was 40°C in temperature, pH 5.0 and 90 minutes in treatment time. For the case of C₁, pH 5.5 in temperature range of 30°C 50°C, 4.0 5.5 in pH, and over 30 minutes of treatment time, the reaction was in the range of 80% of the maximum.

Affinity of enzyme increased as freeness increased, and this effect was more visible in fiber than in fines.

1. 서론

Cellulase는 서로다른 분해 특성을 갖는 단백질이 혼합되어 서로 상승작용을 함으로서 섬유소를 분해하여 당화시키는 복합효소이다 (Wood,¹⁾ 1979). Reese 등²⁾(1950)이 처음으로 cellulase를 구성하는 component중 C_x component를 분리하

고 섬유소를 분해하기위한 C₁ component에 관한 가설을 정립한후 섬유소 분해 기작을 규명코자하는 많은 연구들이 순수정제기술의 개발에 의한 순수한 components의 확보와 병행해서 이루어져 왔다. 그러나 Sui 등³⁾ (1968)이 제시한 C₁ component의 hydrogen bondase에 의한 분해 모델 및 Wood⁴⁾ 등 (1975)이 제시한 endo-glucanase에 의한 결정

*1 : 중부대학교 공과대학 인쇄공학과(Dept of Grafic Art TechNology, College of Engineering, Joong Bu University, Chungnam 312-940, korea)

*2 : 충남대학교 농과대학 임산공학과(Dept of Forest Product TechNology, College of Agriculture, Chungnam National University, Taejon 305-764, korea)

형 cellulose의 random 한 반응 및 exo-glucanase(CBH)에 의한 가수분해 반응 및 Reese⁵⁾ (1972)가 제시한 변형된 C₁ - C_x 가설등은 상이한 주장을 내포하고 있으며 이로인해 섬유소 분해 모델과 순수한 C₁ component 의 분리 및 확보에 의문점을 제기할 수 있다.

Components의 순수성에 대한 의문은 component간 상승작용의 상이성을 나타내게되고 이로인한 섬유분해 특성의 변화를 초래하게 된다. 이러한 이유로 인해 1970년대 이후 부터는 cellulase components의 cellulose분해형태에 따라 endo-cellulase, exo-cellulase로 명명하여 구분을 단순화 하였다. 또한 복합효소를 순차적으로 정제할 경우 10~15개의 components로 분류되며 이들 components는 각기 다른 특성 (분해특성, 단백질 특성) 을 갖는 것으로 확인된다. 이와같이 cellulase component 중 C₁ component에 관한 순수성 및 반응특성에 서로다른 의견들이 제시되기는 하나 본 연구에서는 exo-cellulase 분해특성을 갖는 component를 광범위한 의미에서의 C₁ component로 분류하고 시약급으로 정제된 endo-cellulase 와 exo-cellulase를 구입하여 DEAE-Sepharose를 이용하여 component 단백질의 표면 특성에 따라 2차 정제를 실시한후 주피크를 갖는 단백질을 분류하여 기질 분해 역가 등을 검토한 후 C₁ 및 C_x component와 유사성이 확인된 효소를 C₁ 및 C_x Component로 칭하여 기질 (CMC, Avicel, Xylan) 에 따르는 역가적 변화를 관찰하고 반응조건 (온도, pH, 시간) 에 따른 친화성을 검토하여 기존의 C₁, C_x component의 특성과 비교

함으로서 본실험에 사용된 component의 특성을 예측코자 한다. 아울러 제지공정중 발생하는 섬유소의 형태변화에 따른 친화성을 규명하고 섬유소의 물리화학적 변화과정을 예측하기위해 기질의 형태를 달리한 (고해도에 따른 fiber, fines) 상태에서의 효소의 친화성을 밝힘으로서 제지공정중 섬유변화를 정성적으로 예측하는 자료로 활용하고자 한다.

2. 재료 및 방법

2-1. 공시 재료

2-1-1. Cellulase

본 연구에 사용된 효소는 Chromatograph 법에 의해 정제 제조된 효소를 사용했으며 각 효소에 대한 일반적인 성질은 Table. 1 과 같다.

2-1-2. 기 질

Carboxy Methyl Cellulose (CMC) 는 Sigma 사 제품의 Medium viscosity (2% 용액의 viscosity 400-800 cps) 를 사용했으며 Avicel 은 Fluka 제품의 pH 101을 사용했고 Xylan 은 Sigma 사 제품의 Birch Wood 로 부터 추출된 Xylose 가 90% 이상 함유된 제품을 사용했다.

2-2. 실험방법

2-2-1. 효소의 Activity 측정

2-2-1-1. CMC

Table.1 Characteristics of Cellulase Samples

Enzyme	Glucocellulase	Cellulase
Characteristics		
Microorganism	Almond	Trichoderma Viride
Component properties	Exo-β-1, 4-glucanase	Endo-β-1, 4-glucanase
Activity (substrate)	20 - 40 units (Solid fiber)	0.3 - 1.0 unit (solid fiber)

1% CMC 용액 0.5mL 와 1M acetate buffer solution 0.4mL 를 혼합한후 50℃ 물중탕에서 2 분간 방치하여 평형시킨후 희석된 효소액을 0.1mL 첨가하여 30분간 효소 반응을 시킨후 생성된 환원당의 양을 glucose를 표준 물질로한 DNS 방법에 따라 측정하였다.

2-2-1-2. Avicel

1M acetate buffer solution에 용해시킨 1% Avicel 용액 1mL를 50℃ 물중탕에서 2분간 방치하여 평형시킨후 C₁ 및 C_x component가 5:5로 혼합희석된 효소액 1mL를 첨가하여 30분간 효소반응시킨후 생성된 환원당의 양을 glucose를 표준물질로하는 DNS 방법에 따라 측정하였다.

2-2-1-3. Xylan

1M acetate buffer solution에 용해시킨 1% Xylan용액 0.5mL를 50℃ 물중탕에서 2분간 방치하여 평형시킨후 0.5mL의 희석된 효소액을 첨가하여 30분간 효소반응후 생성된 당의 양을 Xylose 를 표준물질로하는 DNS 방법에 따라 측정하였다.

2-2-2. 효소의 분리 및 정제

Column Chromatography법을 사용하여 효소를 분리정제 하였으며, 효소액을 0.1M acetate buffer solution (pH 4.5) 에 녹여 평형시킨후 DEAE-Sephrose CL-6B chromatography Column (2.5×7cm)에 주입하여 0.0 - 0.5M KCl로 linear gradient를 용출시켰으며 용출된 효소액을 SDS-PAGE (8%)로 단백질확인을 실시하였다.

2-2-3. 최적 반응조건 선정실험

온도, pH, 반응시간은 2-2-1의 효소 activity 측정조건과 동일한 조건 (50℃, pH4.5, 30분) 을 기준으로 하여 이중 최적조건선정을 위한 항목만을 변화시킨 조건하에서 효소의 activity 측정조건을 변형시켜 효소 반응을 실시한후 생성된 glucose의 양의 상대값을 환산하는 방법으로 실시하였다.

2-2-4. 리파이닝에 따른 영향

고해도를 변화시킨 시료를 1g 채취하여 1M acetate buffer solution 999mL에 혼합한후 50℃ 물중탕에서 평형시킨후 0.05% (시료 고형분대비) 효소액을 처리하여 30분간 반응시킨후 고형분을 여과한후의 잔류 용액을 이용 Somogi - Nelson 법에 따라 환원당값을 측정하였다.

2-2-5. Fiber 및 Fines 의 반응효과

15,000 PFI mill revolution 조건으로 고해한 시료를 100mesh shive를 통과하는 시료와 잔류하는 시료로 분리하여 잔류하는 시료를 fiber 로 분류하고 통과한 시료는 150mesh sieve에 잔류하는 시료만을 fines로 분류하여 2-2-4와 같은 방법에 의해 친화성을 실험하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1 효소의 정제 및 단백질 특성 분석

Nisizawa 등⁶⁾ (1973)은 *Trichoderma Viride* 로 부터 배양된 효소액을 CG-50 Column Chromatography와 DEAE-Sephadex A-50 Column Chromatography법을 이용 정제한 결과 세구간의 단백질 피크를 얻었으며 이를 이용 기질에 따른 역가를 측정한 결과 fraction 20 부근에서 분리된 단백질의 경우 Avicel 역가는 거의 관찰되지 않고 CMC 역가만을 확인할 수 있었다. 반면에 fraction 80-120 부근에서 분리된 단백질의 경우 CMC, Avicel activity를 균등하게 나타내고 있음을 확인하고 이 단백질을 다시 DEAE-Sephadex A-50을 이용 재정제한 결과 fraction 10 이내에서 분리된 단백질의 경우 CMC 역가만을 나타내고 있음을 확인하였고 Fraction 50-80 부근에서 분리된 단백질의 경우 Avicel 역가를 다량 함유한 반면 CMC 역가는 미량 확인할 수 있었으며 이 단백질을 이용하여 등전점 분리 등을 순차적으로 진행 함으로서 C₁ component를 순수하게 분리 할 수 있었다. 이와같은 정제에 의한 component 분리 방법은

Halliwell⁷⁾ (1970), Berghem⁸⁾(1973) Wood⁴⁾ 등 (1975), Wood (1979)⁹⁾ 등에 의해서 사용된 colum의 변화 및 미생물원 (microorganism)의 변화 등은 있었으나 결과는 거의 유사함을 보여준다. 즉, 단백질의 분자량에 의한 분리방법인 Sephadex를 이용한 1차 정제의 경우 저분자량의 C_x component와 고분자량의 C₁, C_x 혼합 component를 분리할 수 있었으며, 혼합 component를 DEAE-Sephadex 등 Ion-Chromatography 법을 이용할 경우 단백질 표면전하의 차이에 의해 초기에 C_x component를 분리하고 이후 C₁ component 및 미량의 C_x component의 혼합 분리가 가능 하였다.

Wood (1979)⁹⁾는 이와 같은 순차적인 정제 방법에 의해 cellulase로부터 10종의 C_x component와 2종의 C₁ component, 2종의 β-glucosidase를 순수 분리 할 수 있었으며 이렇게 순수 분리된 component를 단독 및 혼합 처리한 결과 상이한 상승작용을 확인할 수 있었으며 이로 인한 기질 (섬유소) 분해 특성의 상이함도 확인할 수 있었다.

본 실험에서는 구입된 시약효소 (정제효소)의 정제 특성을 확인하고 아울러 component의 순수성을 확인하기 위해 구입효소의 상품명으로 판단컨대 1차 정제 (Sephadex)를 거친 효소로 생각하고, 각각의 효소를 Ion-Chromatography법인 DEAE-Sephadex CL-6B를 이용 단백질 표면전하 특성을 이용한 정제를 실시 하였다.

Fig.2-A 는 endo-cellulase 를 정제한 것으로 정제초기 (fraction 9) 에 단백질의 주 피크를 확인할 수 있었으며 이때의 역가 측정 결과로 높은 CMC activity 만을 확인 하였으며 Avicel activity 는 거의 확인되지 않았다. 이때의 단백질을 SDS-PAGE 법을 이용한 단백질 분자량을 확인한 결과 (Fig.1) 다양한 분자량 분포의 순수한 단백질 띠를 확인할 수 있었다. 단백질의 띠 분포로 미루워 endo-cellulase는 Wood 등¹⁰⁾ (1978)이 확인한 저분량의 C_x component 와 유사한 것으로 사료 되어 진다.

Mandel 등¹¹⁾(1976) 은 exo-cellulase는 비환원성 말단기로 부터 glucose 단위로 분해하는

glucocellulase 와 cellobiose 단위로 분해하는 cellobiohydrolase (CBH) 와 C₁ component 를 광범위한 의미에서 동일시 취급하였으나 Reese (1972)⁵⁾는 C₁ component 와 CBH 및 glucocellulase를 분류하여 C₁ component 는 C_x component와 작용하여 결정형 cellulose를 분해하기 위한 component로 정의하고 CBH 와 glucocellulase는 활성화된 결정형 cellulose를 cellobiose 와 glucose로 가수분해하는 component 로 정의 하였다.

Fig.2-B 는 exo-cellulase를 정제한 것으로 전해질 (Kcl) 에 의한 강제 분리에 의해 추출된 단백질로서 fraction 109 에서 주피크를 확인할 수 있었으며 121 과 130 부근에서도 단백질 피크가 확인되고 있으나 기질에 따른 역가 측정결과 및 분리 단백질의 농도 등을 감안할 때 109에서 분리된 단백질이 C₁ component와 유사함을 확인할 수 있었다. 그러나 이 경우 CMC activity도 미량 확인되고 있음으로 미루워 Wood (1979)⁹⁾ 가 정제한 C₁ 및 미

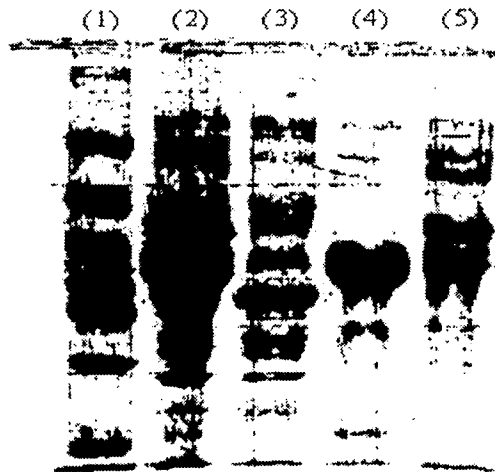


Fig. 1. SDS - PAGE (8%) of the purified Cellulase
 ① Standard Maker
 ② Crude enzyme (protein Con. 13μg)
 ③ Fraction No. 9 (protein Con. 9.95μg)
 ④ Fraction No. 129 (protein Con. 11μg)
 ⑤ Fraction No. 109 (protein Con. 7.18μg)

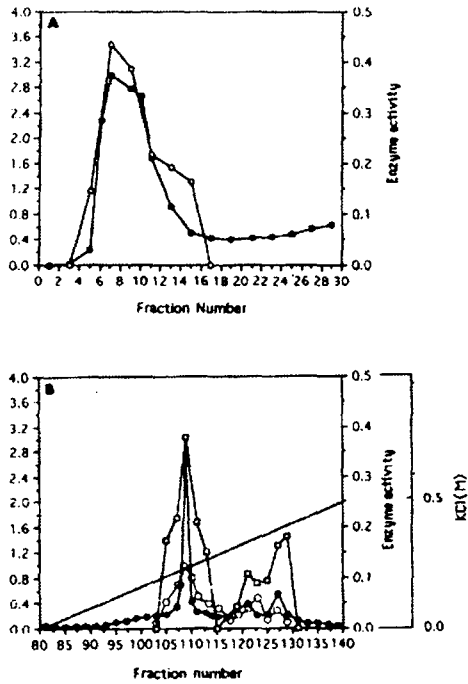


Fig. 2. purification of components with DEAE - Sepharose CL - 6B chromatography
 -●- : A 280nm, -○- : CMCase, -□- : Avicelase

량의 C_x component가 복합된 component임을 예측할수 있으며 순수한 C₁ component로 분리하기 위해서는 등전점분리등 몇차례의 정제를 병행 해야 하나, 회수된 단백질의 양 등을 감안하여 이 단백질을 광범위한 C₁ component로 설정하여 실험코자 한다. 분리된 component의 단백질 확인결과 (Fig.1) 도 단백질 때가 정제되지 않은 상태로 존재 하고 있음으로도 순수한 정제가 미비되었음을 짐작 할수 있었다.

3-2. 기질에 따른 효소의 Activity 변화

Cellulase의 역가 측정 방법은 기질을 CMC (Carboxy Methyl Cellulose)를 이용하는 방법과 Avicel, Filterpaper등을 이용하는 방법으로 나눌 수 있다. CMC를 기질로 이용하는 경우는

cellulose의 비결정영역과 수용성 cellulose, 팽윤된 (H₃PO₄ 등) cellulose등에 작용하는 Activity를 측정하는 방법으로 주로 C_x component의 역가 측정 방법으로 이용된다⁴⁾. (Wood et al, 1975) 반면에 Avicel 및 Filter paper와 같이 결정형 cellulose를 기질로 이용하는 경우에는 결정형 cellulose를 분해하는 능력을 측정하는 방법으로 C₁ 및 C_x의 상승작용을 평가하기위한 방법으로 이용된다.¹¹⁾ (Mandels, et al, 1976)

3-2-1. 기질에 따른 효소의 activity 측정

정제된 각 component의 분해특성을 확인하기 위해 기질을 달리한 역가 측정 결과는 Table. 2 와 같다.

Table 2. Enzyme activity with different substrates

Substrates	Activity (u/mL)	Component	
		C1	CX
CMCase	5	120	
Xylanase	2		-
Avicelase	18		0.2

C₁ component의 경우 CMC 를 기질로 했을 경우에도 미량 (5u/mL)의 역가를 나타내고 있는 것으로 미루워 미정제된 C_x component가 함유되어 있음을 확인할 수 있다. 또한 xylan (hemicellulose)분해 능력도 미량 (2u/mL)포함된 상태임을 확인할 수 있었고 결정형 cellulose인 Avicel 분해 능력을 (18u/mL)이 가장높게 나타내고 있음을 알수 있다. 이로 미루워 본 실험에 사용한 C₁ component는 정확한 규명은 어려우나 결정형 cellulose를 분해하는 능력을 가지는 것으로 미루워 광범위한 의미의 C₁ component의 특성을 내포하는 것으로 판단된다. C_x component의 경우 대부분 CMC 분해능력 (120u/mL) 을 나타내며 xylan 분해능력은 전혀 관찰되지 않으며 Avicel 분해 능력이 극미량 (0.2u/mL) 관찰 되는 것으로 미루워 비

교적 순수하게 정제된 C_x componentt 임을 확인할 수 있다.

3-2-2. 효소 처리량에 따른 Activity 변화

정제된 component에 미량 포함된 미정제 component가 효소의 역가에 어떻게 작용하는지를 관찰하고 C_1 및 C_x component를 혼합처리할 경우에 기질에 따른 효소상승작용이 어떻게 변화하는지를 확인하기 위해 C_1 , C_x component의 처리 농도를 변화시키고 기질을 변화 시킨후의 역가 변화를 관찰 하였다.

Mandels 등¹¹⁾ (1976)은 순수하게 정제된 component의 농도를 변화시켜 기질 (CMC, Filter paper)에 따라 처리 할 경우 역가의 변화는 처리량에 직선적으로 비례한다는 것을 확인하였다.

3-2-2-1. CMC Activity 변화

CMC를 기질로 하여 C_x component의 조합농도를 (0.005~0.01%) 로 변화 시키고 C_1 component의 조합농도를 (0.02~0.1%) 로 변화 시킬 경우 C_1 component의 조합농도 변화와 무관하여 C_x component의 조합농도에 비례해서 역가가 증가하고 있음을 알 수 있다. 그러나 C_x component의 증가율에 정비례한 역가 증가율이

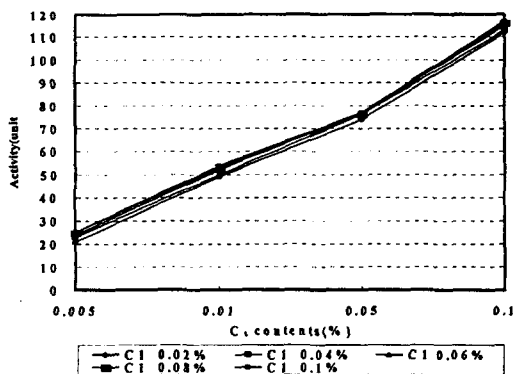


Fig. 3 CMC activity at different contents of cellulase components

관찰되지 않는 결과는 효소반응에 의해 생성된 glucose가 이 효소의 반응을 억제하는 억제제로 작용한 결과로 판단되며 이와 같은 결과는 본 연구에서 공통적으로 발생되는 결과이다. 또한 C_1 component의 조합농도가 증가하여도 역가의 증가는 거의 관찰되지 않는 것으로 미루워 C_1 component에 포함된 미량의 C_x component의 영향이 크지 않음을 확인할 수 있다.

3-2-2-2. Avicel activity 변화

Avicel 을 기질로 하여 C_x component의 조합농도와 C_1 component의 조합농도를 변화 시켰을 경우의 역가 변화는 Fig. 4 와 같다. 이 경우에도 C_x component의 조합농도에 비례해서 역가가 증가하고 있으나 CMC 를 기질로 했을 경우와 비교해서 증가비율은 직선적이지 못했다. 아울러 C_1 component의 조합농도에 비례해서 역가가 증가하고 있음을 확인할 수 있는데, 이는 결정형 cellulose 를 분해하는 C_1 및 C_x component의 상승작용에 의한 것으로 본실험에 사용된 component가 순수성을 갖는 결과로 확인된다. (Fig. 4)

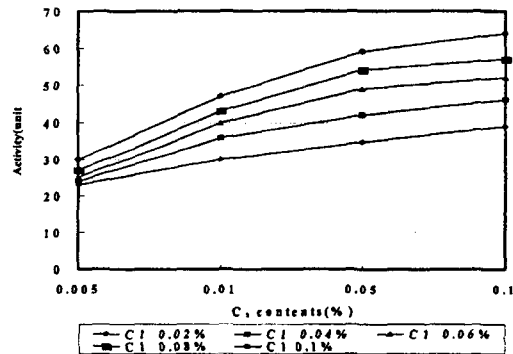


Fig. 4 Avicel activity at different contents of cellulase components

3-2-2-3. Xylan activity 변화

정제된 component에 함유된 hemicellulase 역

가가 C₁, C_x component 조합에 의한 변화성을 관찰하기 위해 침엽수 펄프의 주요성분인 xylan 을 기질로 하여 C₁ 및 C_x component의 조합농도를 달리한 역가 변화를 관찰한 결과는 Fig. 5 와 같다. C_x component의 조합농도 변화에 의한 역가 변화는 거의 관찰 되지 않으나 C₁ component의 조합농도 변화에 의해서는 역가의 변화가 관찰되며 특히 C₁ component 0.02%~0.04% 처리구간에서 폭이 크게 관찰됨을 확인할 수 있다. 이것은 C₁ component가 함유한 미량의 xylan 역가 분포에 의한 것으로 판단되며 C₁ 및 C_x component의 상승작용에 의해서는 영향 받지 않는 것으로 확인된다.

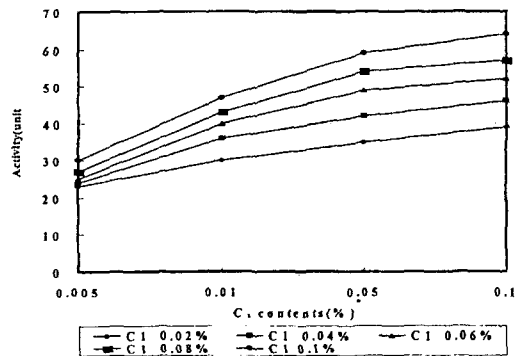


Fig. 5 Xylan activity at different contents of cellulase components

3-3. 최적 반응 조건

효소는 분비된 미생물원 (microorganism) 및 반응 특성에 따라 최대의 활성값을 갖는 반응조건 (온도, pH, 반응시간) 을 갖는다. 특히 자연계의 대부분의 미생물이 분비하는 cellulase는 산성의 pH 조건에서 최적의 활성값을 갖는 특성을 지니고 있다¹⁾. (Wood, 1969)

Wood¹⁾ (1969)는 *Fusarium Solani* 로부터 정제된 cellulose 분해 효소의 최적 pH를 측정된 결과 C_x component의 경우 pH4.5 - pH5.5 범위에서 최적 값을 나타냈으며 그밖의 범위에서는 급격

한 역가의 저하를 확인했다. 반면에 C₁ component의 경우 pH5.0 - pH6.0 범위에서 최적값을 갖는 것으로 보고 하였다.

Halliwell²⁾ (1970)은 *Trichoderma koningii* 로부터 순수 정제된 C₁ component의 경우 pH4.0 - pH6.0 범위에서 완만한 최대값을 확인 하였고 온도 30℃ - 40℃ 의 범위에서 최대 활성값을 갖는 것으로 보고 하였다.

Wood⁴⁾ (1975)는 *Trichoderma koningii* 로부터 정제된 component의 반응시간을 측정된 결과 처리 후 2시간 이후에는 거의 변화가 확인되지 않았다는 것을 확인 하였다. 특히 처리후 급격한 반응효과는 1시간 이내에서 관찰되고 있음을 보고 하였다.

Chanzy¹²⁾ (1984)는 *Trichoderma reesei* 로부터 정제된 CBHI 을 금(Au)과 복합체를 만든후 결정형 cellulose에 처리하고 전자 현미경으로 관찰한 결과 처리후 30분 이내에 CBHI의 대부분이 cellulose 표면에 흡착하고 있음을 확인 하였다.

이와 같은 결과로 볼 때 cellulase 의 최적 값은 미생물원 및 component에 따라 차이가 있을 것이나, 일반적으로 온도 30℃~50℃ 범위 및 pH4.0 - pH6.0 의 범위 일 것으로 판단되며 반응시간은 2시간 이내 일 것으로 판단된다. 정제된 components와 기 발표된 component 들과의 유사성을 확인하고 아울러 최적 처리 조건을 설정하기 위해 온도, pH, 반응시간에 따른 최적 조건 선정 실험을 실시하였다.

3-3-1. 온 도

효소는 단백질 복합체로서 저온 (10℃이하) 에서 는 활성이 중지되며 고온 80℃ 이상에서는 변성이 일어나 그활성이 소멸하는 특성을 갖는다. 이와같은 효소의 온도적 특성으로 인해 제지 공정에서 효소를 이용할 경우 지필에 흡착된 효소의 경우 건조 공정 (100℃ 이상) 을 거치는 동안 그활성이 소멸 될것으로 판단된다.

효소처리의 최적온도 조건을 선정하고 각 component간 상이성을 확인하기위해 기질을 CMC 로한 역가의 변화를 각각의 component별로 최적조건에서의 값을 100으로 할 경우의 상대적 역

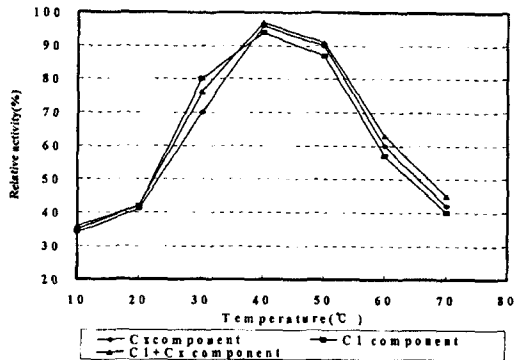


Fig. 6 Optimum reaction temperature of cellulase components

가값을 환산한 결과는 Fig. 6 과 같다. 그림에서와 같이 온도 40°C 부근에서 최대값을 확인할 수 있었으며 30°C-50°C 부근에서 완만한 최적값을 확인하였다.

3-3-2. pH

각 component별 상대 pH 값 및 C₁ component와 C_x component를 5:5로 혼합한 component의 상대 pH 값은 Fig. 7 과 같다. 여기에서 C_x component의 경우 pH4.5 - pH5.0 범위에서 최대값을 나타내고 pH4.0 - pH5.5 범위에서 상대역가 80% 이상을 나타내고 있다. 반면에 C₁ component의 경우 pH5.0 - pH6.0 범위에서 최

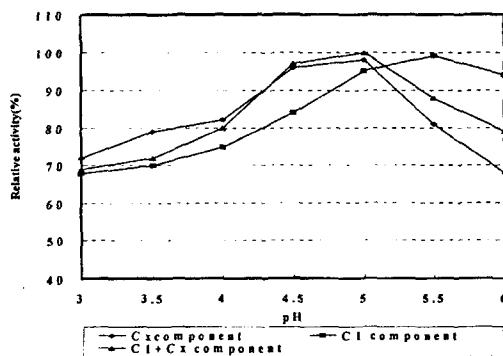


Fig. 7 Optimum reaction pH of cellulase components

대값을 가지며 pH4.5 - pH6.0 범위에서 상대역가 80% 이상을 나타내고 있다. 이와같이 C₁ component가 C_x component에 비해 최대값 범위가 중성 부근으로 이동하는 현상은 Wood 등이 정제된 component를 이용한 최적 pH 확인 결과와도 유사함을 보여주는데 이것은 기질을 CMC로 할 경우 C₁ component가 역가에 미치는 영향이 거의 관찰되지 않은 결과에서 비롯한 것으로 예측된다.

3-3-3. 반응시간

제지 공정중에 효소를 처리코자 할 경우에 효소의 반응시간은 투여 위치를 결정짓는 중요한 지표가 될 것이다. 일반적인 제지 공정에서 refining을 필요로 하는 지종의 경우 machine chest의 용량에 따라 차이는 있으나 펄프의 해리 공정에서 건조 공정까지 이르는 데 대략 2시간 이내의 시간이 소요 될 것으로 예측된다. 반응시간에 따른 효소의 역가 변화를 관찰한 결과 처리후 30분 이내에 최대의 역가를 나타내며 90분 이후에는 평형에 이르는 것을 확인할 수 있었다. 이와 같은 결과로 미루어 펄프의 해리 공정에서 효소를 투입할 경우 refining 공정을 거치는 동안 효소의 반응은 거의 완료 될 수 있을 것으로 판단된다.

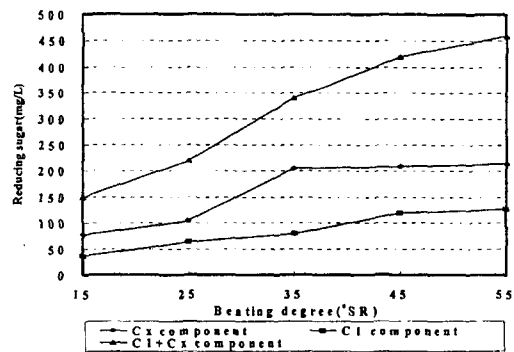


Fig. 8 Optimum reaction pH of cellulase components

3-4. 펄프 섬유형태 변화에 따른 효소반응

Lee 등¹³⁾ (1983)은 cellulase의 기질친화성은 비표면적이 증가할수록 효소에 의한 가수분해가 증

가되며 cellulose의 비결정영역이 증가할수록 증가된다고 하였다.

Mandels¹³⁾ (1976)도 비결정영역과 비표면적을 증가시키기 위해 신문용지를 이용한 milling 방법을 달리(Hammer, Ball)한 경우 Ball Mill에 의해 효과적인 전처리가 이루어 졌으며 이로 인한 효소 가수분해 효과의 증가를 확인하였다.

Fengel¹⁴⁾ (1971)은 섬유소의 microfibril 주변에 lignin이 축진되어 있으며 이로인해 효소에 의한 cellulose의 가수분해를 방해하는 현상을 초래하며, 전처리 공정에 의해 Lignin을 제거할 경우 효소에 의한 가수분해가 촉진되는 현상을 확인 하였다.

King¹⁵⁾ (1966)은 효소에 의한 가수분해는 섬유소의 중합도가 낮을수록 촉진되며 이로인해 산(H₃PO₄)등에 의해 섬유소의 중합도를 저하시킬 경우 효소 가수분해 효과는 증가된다는 결과를 확인 하였다.

Ogiwara¹⁶⁾ (1968)는 고해도가 다른 시료(11° SR, 21° SR, 37° SR) 에 cellulase를 처리한 결과 고해도에 비해서 효소의 가수분해 효과가 증가하는 현상을 확인할 수 있었다.

본 연구에서는 refining전에 효소를 처리하기 때문에 refining에 따라 섬유소의 형태 변화가 (fibrillation, fines 생성) 예측되며 이로인한 효소의 친화성을 검토 함으로서 refining 중에 발생하는 효소 가수분해의 복잡성을 예측하기 위해 고해도에 따른 시료와 fiber 와 fine의 시료를 분리 처리하여 처리효과를 확인 하였다.

3-4-1. 리파이닝에 따른 영향

고해가 진행됨에 따라 섬유는 섬유외층의 제거에 의한 fibrillation이 증가 되면서 섬유의 유연성의 증가와 이로인한 표면적의 증가가 기대된다. 또한 섬유의 중합도는 섬유의 절단 및 fibrillation의 증가로 저하하게 되며 미세 섬유분의 함량이 증가하게 될 것으로 예견된다. 이와 같은 섬유의 형태 변화는 효소에 의한 친화성을 증가시키는 요인으로 작용되며 이로인한 효소 가수분해의 증가현상을 예측할수 있다.

동일한 고해 조건으로 제조된 시료 (15° SR, 25° SR, 35° SR, 45° SR, 55° SR) 에 일정량의 components (0.05%) 을 처리한후 생성된 환원당의 양은 Fig. 9 와 같다. 이 경우 C₁ 및 C_x component 혼합효소의 분해 효과가 가장 우수하게 관찰되며 이는 C₁ 및 C_x component의 상승작용에 의한 가수분해가 촉진된 것으로 판단된다. 또한 고해도가 증가 할수록 비례해서 분해 효과가 증가하는 것은 효소의 친화성에 따른 것으로 짐작 할수 있다.

C_x component의 경우 35° SR 에서의 효과가 급격히 상승하는 현상은 이 component의 분해 특성으로 미루워 짐작컨대 노출된 섬유의 비결정 부위에서의 반응이 증가한 현상으로 예측 된다. 또한 C₁ 및 C_x component의 단독 처리에 의한 가수분해 효과를 합산한 것보다 C₁ 및 C_x 혼합 효소의 처리에 의한 효과가 높게 나타나는 것은 상승작용에 따른 것으로 생각되며 이는 Wood 등의 실험 결과에서도 확인 할수 있었다.

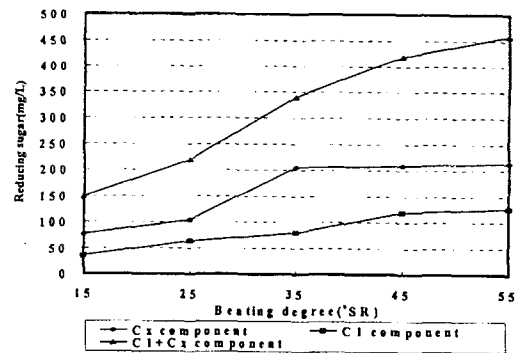


Fig. 9 Affinity of cellulase components to cellulose fiber at different degree of beating

3-4-2. Fiber 및 fines 의 반응효과

같은 고해조건 (PFI mill, 15,000 revolution) 으로 고해한 시료를 100mesh shive를 통과하고 150mesh sieve에 퇴적된 시료를 fines 으로 100mesh sieve 에 퇴적된 시료를 fiber 로 분류하여 각 component 의 처리농도를 변화시키후 환원당 생성량을 측정 한 결과는 Fig. 10 과 같다. fiber에

효소를 처리한 경우는 C₁ 및 C_x 단독처리시는 환원당 생성량이 150mg/L 이내로 효소에 의한 가수분해 효과가 크지 않은 것을 확인할 수 있었다. 반면에 fines의 경우는 C₁ 및 C_x component 혼합 처리시 효소처리 농도에 거의 직선적으로 비례해서 효소의 가수분해가 진행됨을 확인할 수 있었다. 이와같은 결과는 고해가 진행될 때 처리된 효소의 반응은 친화성이 우수한 미세섬유에서 우선적으로 진행될 것으로 예측되며, 이로인한 fines의 표면 개질이 효과적으로 이루어질 것으로 짐작된다. 또한 C₁ component 단독처리시는 fiber 및 fines의 환원당 생성량의 변화가 크지 않은 것으로 미루워 이 component에 의한 섬유의 가수분해 효과는 크지 않은 것으로 판단된다. 이런현상은 Jackson 등¹⁷⁾ (1993)이 효소 처리에 의해 미세 섬유분의 함량이 증가 하는데도 여수도가 증가하는 현상을 효소처리에 의한 미세 섬유의 표면개질 및 이로인한 물과의 친화성(저항성) 감소 현상으로 설명한 결과와도 유사성이 확인된다.

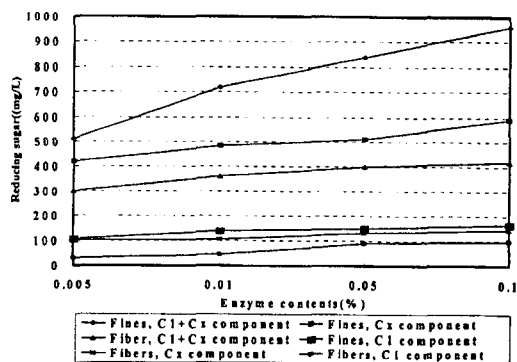


Fig.10 Affinity of cellulase components to fiber and fines

4. 결론

정제된 시약효소를 DEAE-Sephrose CL-6B를 이용하여 2차 정제를 실시한 결과 endo-cellulase는 fraction No.9에서 단백질 피크를 확인할 수 있었으며 기질에 따른 역가 변화와 단백질

역가를 확인한 결과 C_x component와 유사성을 확인하였다. 또한 exo-cellulase의 경우 Fraction No.109와 121, 130 부근에서 단백질 피크를 확인하였으며 이중 109에서의 단백질이 결정형 cellulose (Avicel)을 분해하는 능력을 확인하고 C₁ component와의 유사성을 확인할 수 있었다. 그러나 결정형 cellulose의 분해능력이 크지 않은 점으로 미루워 Reese 등이 주장한 C₁ component의 기능보다는 Mendels 등이 주장한 CBH 및 Gluco cellulase를 포함하는 포괄적인 의미에서의 C₁ component와 유사함을 확인할 수 있었다. 기질에 따른 효소 역가를 측정된 결과도 C_x component의 경우 CMC 역가가 크게 나타난 반면 (120u/mL) Xylan 및 Avicel 역가는 거의 관찰되지 않았다. 또한 CMC를 기질로한 C₁ 및 C_x component 처리 농도에 따른 역가 변화를 관찰한 결과 C_x component 처리 농도에 비례해서 증가하는 경향을 보였으며 C₁ component에 의해서는 거의 영향이 없음을 확인하였다.

Avicel을 기질로 하였을 경우는 C₁ 및 C_x component의 처리량에 비례해서 분해성이 증가하는 경향을 확인하였으며 이것은 component 간 상승 작용에 따른 것으로 판단되었다. 정제된 효소의 최적 조건 선정 결과 온도의 경우는 각 component 및 혼합 component 모두 40°C에서 최대 반응값을 나타냈으며 30°C~50°C 범위에서 상대역가 80% 이상을 나타내는 경향을 확인하였다. 또한 pH의 경우는 pH4.0 - pH5.5 범위에서 상대역가 80% 이상을 확인하였으며 특히 C₁ component의 경우 pH4.0 - pH6.0 범위에서 상대역가 90% 이상을 확인했으며 이는 Wood 등이 C₁ component의 최적 pH가 중성 부근으로 이동하는 경향과도 유사성을 확인할 수 있었다. 반응시간은 각효소가 30분 이내에 상대역가 95%이상의 급속한 반응 현상을 확인할 수 있었으며 90분 이상에서는 상대역가 100%로 안정화 하는 경향을 확인할 수 있었는데 이러한 현상은 Wood, Chanzy 등이 확인한 결과와도 유사함을 확인하였다. 고해도에 따른 기질 친화성을 분석한 결과는 고해도가 높을수록 효소에 의한 가수분해가 촉진되는 현상을 확인하였으며 특히

C₁ 과 C_x component를 혼합처리한 경우는 각각 단독 처리한 값의 합산값보다도 높은 가수분해 효과를 확인하였는데 이는 component간 상승작용에 의한 것으로 판단된다.

Fiber 및 fines을 분리하여 효소처리 결과 fiber에서의 반응 보다는 fines에서의 분해 반응이 높은 값을 나타냈으며 특히 C₁, C_x 혼합 component에 의한 분해효과가 높게 나타나는 경향을 확인할수 있었는데 이런경향으로 미루워 고해중 효소의 반응은 미세섬유에서 효과적으로 이루어 질 것으로 예측되며 이로인해 미세섬유의 섬유표면 개질이 기대되는 섬유특성 변화 및 여수도 변화가 예견된다.

參考文獻

- 1) Wood T. M. The cellulase of fusarium solani : Resolution of the enzyme complex, Biochemical J of 115 : 457, 1969
- 2) Resse, E. T., Siu, R. G. H. and Levinson, H. S. J. Bacteriol 59 : 485, 1950
- 3) Sui, R. G. H. Advances in enzymic hydrotsis of cellulose and related materials, pergamon New York p257, 1968
- 4) Wood T. M. Properties and mode of action of cellulase, Biotechnol. and Bioeng. symp., (5), 1975
- 5) Resse, E. T., Mandels, M. and Weiss, A. H. Adv. in Biochem. Eng. 2 : 181, 1972
- 6) Nisizawa, Kazutosi. Mode of the action of cellulases, J. Ferment. Technol. 51(4) : 267, 1973
- 7) Halliwell, G. and Riaz M. The formation of short fibers from native cellulose by component of trichoderma koningii cellulase, Biochem. J. 116 : 35, 1907
- 8) Berghem, Lar E. R. and Pettersson, L.

- G. The mechanism of enzymatic cellulose degradation : Purification of a cellulolytic enzyme from trichoderma virid active on highly ordered cellulose, Eur. J. Biochem. 37 : 21 , 1973
- 9) Wood T. M. and McCrae, Sheila. I. Synergium between enzymes Involved in the solubilization of native cellulose, American Chemical Society Chpter 10 : 181, 1979
- 10) Wood T. M., Sheila. and Mccrae, I. The cellulase of trichoderma Koningii, Biochem. J. 171 : 61, 1978
- 11) Mandels, M. and Andreotti, R. and Roche, C. Measurement of saccharifying cellulase, Biotechnol. and Bioeng. Symp. 6 : 21, 1976
- 12) Chanzy H., Henrissat B. and Vuong, R. Colloidal gold labelling of 1,4 β - D-glucan Cellobiohydrolase absorbed on cellulose substrates, FEBS - 172(2), 1984
- 13) Lee, S. B. and Kim, I. M. Structural properties of cellulose and cellulases reaction mechanism, Biotechnol. and Bioeng. Vol. X X V P.33, 1983
- 14) Fengel, D. Ideas on the ultrastructural organization of the cell wall components, J. Polymer Sci. : part C, 36 : 383, 1971
- 15) King, K. W. Enzymic degradation of crystalline hydrocellulose, Chemical and Biochemical research communication 24(3) : 295, 1966
- 16) Ogiwara, Yoshitaka, and Arai, Kenichiro. Swelling degree of cellulose materials and hydrolysis rate with cellulase, Textile Reseach J. p885 september, 1968
- 17) Jackson, L. S., Heitmann, J. A., and Joyce, T. W. Enzymatic modifications of secondary fiber, TAPPI J. 76(3), 1993