(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2021-0066719
(43) 공개일자 2021년06월07일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/02 (2006.01) *C12N 9/08* (2006.01)
C12Q 1/28 (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12P 7/02 (2013.01)
C12N 9/0065 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0153764
(22) 출원일자 2020년11월17일
심사청구일자 2020년11월17일
(30) 우선권주장
1020190156105 2019년11월28일 대한민국(KR)

(71) 출원인
울산과학기술원
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(72) 발명자
김용환
울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50
(74) 대리인
리앤목특허법인

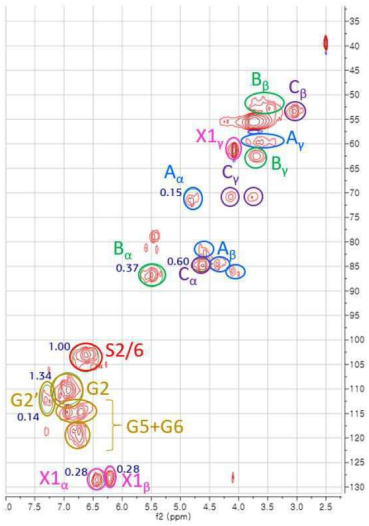
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 **인공 리그닌 합성 방법 및 이의 이용**

(57) 요 약

일 양상에 따른 인공 리그닌 제조방법 및 상기 방법으로 인해 제조된 리그닌에 따르면, 높은 수율의 리그닌을 수득할 수 있고, 합성된 리그닌의 경우 효과적으로 침엽수 및 활엽수 유래 천연 리그닌을 모사할 수 있는 효과가 있다.

대 표 도 - 도2



(52) CPC특허분류
C12Q 1/28 (2013.01)
C12Y 111/01 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호	1711081975
과제번호	2017M1A2A2087630
부처명	과학기술정보통신부
과제관리(전문)기관명	한국연구재단
연구사업명	기후변화대응기술개발(R&D)
연구과제명	바이오 · 화학 융복합 기술을 이용한 리그닌의 선택적 해중합을 통한 분해 중간체 생산 원천기술 개발
기 여 율	1/1
과제수행기관명	울산과학기술원
연구기간	2019.01.20 ~ 2020.01.19

명 세 서

청구범위

청구항 1

시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 포함하는 단량체 용액, 산화효소 및 산화제를 혼합하는 단계를 포함하는 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 인공 리그닌은 침엽수 또는 활엽수 유래 리그닌을 모사하는 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 인공 리그닌은 β-O-4 구조, β-5 구조, β-β 구조, α-O-4 구조 및 β-O-4 구조로 이루어지는 군으로부터 한개 이상의 구조를 포함하는 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 4

청구항 3에 있어서, 상기 β-O-4 구조는 인공 리그닌의 전체 방향성 단량체 대비 5% 내지 50%인 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 인공 리그닌의 합성 수율은 60% 이상인 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 혼합하는 단계는 pH 1 내지 6인 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 7

청구항 1에 있어서, 상기 혼합하는 단계는

시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 포함하는 단량체 용액에 산화효소를 드롭와이즈(dropwise) 방식으로 적가하는 단계; 및 상기 혼합액에 산화제를 드롭와이즈 방식으로 적가하는 단계를 포함하는 것인 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 8

청구항 7에 있어서, 상기 산화제를 적가하는 단계는 2시간 내지 9시간 동안 수행되는 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 9

청구항 1에 있어서, 상기 단량체 용액의 시나필 알코올 및 코니페릴 알코올의 비율은 1:9 내지 9:1인 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 10

청구항 1에 있어서, 상기 산화 효소는 과산화효소인 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 11

청구항 1에 있어서, 상기 산화제는 과산화수소(peroxidase) 또는 라카아제(laccase)인 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 산화제의 농도는 0.04 mol/L 내지 0.7 mol/L인 것인, 인공 리그닌을 제조하는 방법.

청구항 13

청구항 1의 방법으로 제조된 합성 리그닌.

청구항 14

청구항 13의 인공 리그닌과 후보 물질을 접촉시키는 단계;

상기 인공 리그닌의 화학적 또는 물리적 결합이 접촉 이전에 비해 감소한 경우, 상기 후보 물질을 리그닌 분해 효소용 물질인 것으로 결정하는 단계를 포함하는, 리그닌 분해 효소를 스크리닝하는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 인공 리그닌 합성 방법 및 이로 인해 제조된 리그닌에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 리그닌은 방향족화합물의 고분자로 이루어져 있어 선택적으로 분해하여 해중합할 경우 방향족화합물을 다량 획득할 수 있는 소중한 원료이다. 자연계에서는 매년 수십억톤의 리그닌이 생합성되고 있으며, 펄프 제지 및 바이오연료 생산공정에서도 수천만톤의 리그닌이 부산물로 발생하고 있다. 특히 현대 사회의 유가 상승과 대기 환경 오염으로 인해 화석 연료 대체 에너지의 필요성이 급증하면서, 바이오 매스가 주목받고 있다. 특히, 전분계와 당류와 같은 바이오 매스는 식량 자원으로 바이오매스로서 활용에 제약이 많으나, 목질계 바이오 매스인 리그닌은 식량자원과 경쟁하지 않으면서도 풍부한 자원으로서 이용 가치가 높아 차세대 에너지 자원으로 큰 관심을 받고 있다.

[0003] 리그닌은, 리그노 셀룰로스로부터 알칼리 처리나 산처리 등과 같은 추출 방법으로 통해서 일반적으로 생산되며, 추출 과정에서 리그닌의 활성반응 부위인 페놀성 수산기와 Cα위의 수산기(benzyl alcohol)가 반응하여 큰 변성이 일어나거나, 당과 같은 여러가지 복잡한 이물질에 오염되어 있어 정확한 구조 및 성분을 알 수 없는 어려움이 크다.

[0004] 이로 인하여 현재 표준 리그닌은 존재하지 않으며, 목재에서 추출해도 어떠한 화합물이 생성될 지 예측할 수가 없어 연구에 어려움이 있다. 따라서 리그닌을 분해하여 향후 유용한 분해화합물을 만들 수 있는 효소 개발 역시 어려운 난관에 봉착해 있다.

[0005] 위와 같은 어려움으로 인해 현재 리그닌은 그 풍부함과 가능성에도 불구하고 별다른 용도를 찾지 못하고 연소 폐기되고 있는 실정이다. 화학 구조상 매우 가치가 높은 방향족 화학구조를 가지고 있음에도 불구하고 폐기되는 이유는 리그닌의 정확한 화학 구조, 화학 결합 양식을 알지 못하기 때문으로, 이는 곧 표준 리그닌을 만들 수 있다면 해결되는 문제로 생각된다.

[0006] 본 발명자들은 위와 같은 리그닌 분야의 문제점을 해결하기 위하여, 효소를 이용하여 인공 리그닌을 합성하고 이를 정성, 정량적으로 결합구조를 분석할 수 있는 방법을 제시하여 표준품으로의 인공 리그닌을 제시하였다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0007] 일 양상은 시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 포함하는 단량체 용액, 산화효소 및 산화제를 혼합하는 단계를 포함하는 인공 리그닌을 제조하는 방법을 제공한다.

[0008] 다른 양상은 상기 방법으로 제조된 인공 리그닌을 제공한다.

[0009] 다른 양상은 상기 방법으로 제조된 인공 리그닌과 후보 물질을 접촉시키는 단계; 및 상기 인공 리그닌의 화학적 또는 물리적 결합이 접촉 이전에 비해 감소한 경우, 상기 후보 물질을 리그닌 분해 효소용 물질인 것으로 결정

하는 단계를 포함하는, 리그닌 분해 효소를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

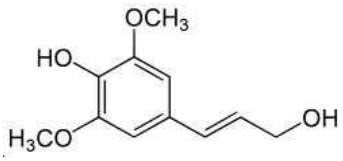
[0010] 일 양상은 시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 포함하는 단량체 용액, 산화효소 및 산화제를 혼합하는 단계를 포함하는 인공 리그닌을 제조하는 방법을 제공한다.

[0011] 다른 양상은 상기 방법으로 제조된 인공 리그닌을 제공한다.

[0012] 본 명세서에서 용어 "리그닌(lignin)은 식물의 목질부에서 주로 발견되는 3차원 구조의 지용성 페놀고분자를 의미한다. 상기 리그닌은 비균일성 및 무정형성을 가지고 있는 것이 특징으로, 구조와 성분이 다양한 것일 수 있다.

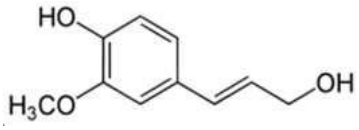
[0013] 본 명세서에서 용어 "시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA)"이란, 모노리그놀(monolignols)의 일종으로, 리그닌의 단량체이다. 시나필 알코올은 하기 화학식 1의 구조를 포함하는 것일 수 있다.

[0014] [화학식 1]

[0015] 

[0016] 본 명세서에서 용어 "코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)"이란, 모노리그놀(monolignols)의 일종으로, 리그닌의 단량체이다. 코니페릴 알코올은 하기 화학식 2의 구조를 포함하는 것일 수 있다.

[0017] [화학식 2]

[0018] 

[0019] 상기 방법은, 시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 포함하는 단량체 용액, 산화효소 및 산화제를 혼합하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0020] 상기 방법은, 시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 포함하는 단량체 용액을 제조하고, 상기 단량체 용액에 산화효소를 연속적으로 혼합하는 단계; 및 상기 혼합액에 산화제를 2시간 내지 9시간 동안 연속적으로 주입하는 단계를 포함할 수 있다.

[0021] 본 명세서에서 용어 "연속적 주입"이란, 용액을 장기간 동안 소량씩 주입하는 것을 의미할 수 있으며, 일정한 속도로 스탭와이즈 또는 드롭와이즈 방식으로 투여하는 것일 수 있다.

[0022] 일 구체예에 있어서, 상기 혼합하는 단계는 시나필 알코올(Sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 포함하는 단량체 용액에 산화효소를 드롭와이즈(dropwise) 방식으로 적가하는 단계; 및 상기 혼합액에 산화제를 드롭와이즈 방식으로 적가하는 단계를 포함하는 것인 인공 리그닌을 제조하는 것일 수 있다.

[0023] 본 발명의 "연속적으로 주입하는 방법"이 드롭와이즈 방식이 맞는지 확인 부탁 드립니다.

[0024] 상기 단량체 용액을 제조하는 단계는, 시나필 알코올 및 코니페릴 알코올 단량체를 유기용매에 용해한 후, 상기 용해액을 버퍼에 혼합하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0025] 일 구체예에 있어서, 상기 시나필 알코올 및 코니페릴 알코올의 몰 비율은 1:9 내지 9:1인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 몰 비율은 1:8 내지 8:1, 1:2 내지 1:9, 1:3 내지 1:9, 1:2.5 내지 1:8, 1:3 내지 1:7, 1:3.5 내지 1:6.5, 1:3.5 내지 1:6, 1:3.5 내지 1:5, 0:10 내지 4:6일 수 있고, 1:3.5 내지 1:4.5일 수 있다.

[0026] 상기 인공 리그닌의 제조 방법은 상기 몰 비율을 포함함으로서, 침엽수 또는 활엽수 유래의 인공리그닌과 비슷한 구조를 가지면서도, 합성 수율이 높은 장점이 있다.

[0027] 상기 단량체 용액을 제조하는 단계는, 추가적으로 파라쿠우머릴 알코올(para-coumaryl alcohol) 단량체를 연속적으로 주입하여 단량체 용액을 제조하는 단계를 포함하는 것일 수 있고, 이후 산화효소를 연속적으로 주입하여

혼합하는 단계를 포함할 수 있다.

[0028] 상기 혼합하는 단계는, pH 1 내지 6에서 수행되는 것일 수 있다. 구체적으로, pH 1 내지 5, pH 1 내지 4, pH 1.5 내지 6, pH 1.5 내지 5, pH 1.5 내지 4.5, pH 2 내지 6, pH 2 내지 5, pH 2 내지 4.5 또는 pH 2 내지 4에서 수행되는 것일 수 있다.

[0029] 상기 인공 리그닌의 제조 방법은 상기 pH에서 제조함으로서, 침엽수 또는 활엽수 유래의 인공리그닌과 비슷하게, β-O-4 구조의 비율이 높은 장점이 있다.

[0030] 상기 산화제 주입 단계는, 상기 단량체-산화효소 혼합액에 산화제를 연속적으로 주입하여 산화제 혼합 용액을 제조하는 단계를 포함하는 것일 수 있다.

[0031] 상기 주입하는 단계는, pH 1 내지 6에서 수행되는 것일 수 있다. 구체적으로, pH 1 내지 5, pH 1 내지 4, pH 1.5 내지 6, pH 1.5 내지 5, pH 1.5 내지 4.5, pH 2 내지 6, pH 2 내지 5, pH 2 내지 4.5 또는 pH 2 내지 4에서 수행되는 것일 수 있다.

[0032] 상기 주입 단계의 속도는, 0.08 mmol H2O2/hr 내지 0.20 mmol H2O2/hr 인 것일 수 있다. 예를 들어, 0.10 mmol H2O2/hr 내지 0.19 mmol H2O2/hr, 0.09 mmol H2O2/hr 내지 0.18 mmol H2O2/hr, 0.11 mmol H2O2/hr 내지 0.17 mmol H2O2/hr, 0.12 mmol H2O2/hr 내지 0.16 mmol H2O2/hr 일 수 있다. 바람직하게는 약 0.13 mmol H2O2/hr 내지 0.15 mmol H2O2/hr일 수 있다.

[0033] 상기 방법은, 산화제 주입 이후에 상기 혼합액에서 고체를 침전시키는 단계; 및 상기 고체의 수분을 제거하는 단계를 추가적으로 포함할 수 있다.

[0034] 상기 고체를 침전시키는 단계는 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm 10 분 내지 20 분 동안 분리하는 단계를 포함하는 것일 수 있고, 분리 후 남은 고체를 진공건조기에서 처리하여 수분을 제거하는 단계를 추가적으로 포함하는 것일 수 있다. 상기 단계로 인해, 인공 리그닌이 수득되는 것일 수 있다.

[0035] 본 명세서에서 용어 "산화효소(oxidase)"란, 산화효소반응을 매개하여 기질의 산화를 돕는 효소를 의미한다. 상기 산화효소는 반응 내의 산소가 과산화수소로 변하는 것일 수 있다.

[0036] 일 구체예에 있어서, 상기 산화효소는 과산화효소일 수 있다.

[0037] 일 구체예에 있어서, 상기 산화효소의 활성도는 15 내지 30 U/ml일 수 있다. 구체적으로, 상기 활성도는 18 내지 28, 20 내지 27 또는 23 내지 27 U/ml일 수 있다.

[0038] 본 명세서에서 용어 "산화제"란, 상기 단량체 혼합 용액의 단량체를 산화시키거나, 단량체의 수소 또는 전자를 빼앗는 물질을 의미할 수 있다. 보다 구체적으로, 산기 산화제는 수소 수용체로서 과산화수소를 이용해 기질을 탈수소화시키는 반응을 촉매하는 효소를 의미하는 것일 수 있다.

[0039] 일 구체예에 있어서, 상기 산화제는 과산화수소(peroxidase) 또는 라카아제(laccase)일 수 있다.

[0040] 상기 산화제의 농도는 50 mmol H2O2/L 내지 65 mmol H2O2/L 일 수 있다. 예를 들어, 51 mmol H2O2/L 내지 64 mmol H2O2/L, 52 mmol H2O2/L 내지 63 mmol H2O2/L, 53 mmol H2O2/L 내지 62 mmol H2O2/L, 54 mmol H2O2/L 내지 61 mmol H2O2/L, 52 mmol H2O2/L 내지 60 mmol H2O2/L, 52 mmol H2O2/L 내지 58 mmol H2O2/L, 52 mmol H2O2/L 내지 57 mmol H2O2/L, 52 mmol H2O2/L 내지 56 mmol H2O2/L 일 수 있다.

[0041] 일 구체예에 있어서, 상기 방법은 인공 리그닌의 합성 수율이 60% 이상인 것일 수 있다. 구체적으로, 70% 이상, 72% 이상, 75% 이상, 77% 이상, 78% 이상, 80% 이상일 수 있다. 상기 제조 방법은, 특정 비율의 시나필 알코올 및 코니페릴 알코올의 몰 비율을 포함함으로서, 높은 합성 수율로 인공 리그닌을 제조할 수 있다.

[0042] 일 양상의 인공 리그닌 제조 방법은, 상기 단량체 혼합 용액 및 산화효소를 혼합함으로서, 다량의 과산화수소를 투여하지 않고도 혼합물 내에서 과산화수소가 공급되어 바로 공급되어 리그닌 중합효소의 활성을 장기간 동안 유지할 수 있는 특징이 있다.

[0043] 상기 인공 리그닌은 자연 유래 리그닌과 유사한 구조를 가지는 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 인공 리그닌은 침엽수 또는 활엽수 유래 리그닌을 모사하는 것일 수 있다.

[0044] 본 명세서에서 용어 "모사"란, 비슷한 구조를 가지는 것을 의미할 수 있다. 자연 유래 리그닌을 모사한 일 양상의 인공 리그닌은 침엽수 또는 활엽수 유래 리그닌과 비교하여 단량체 비율이 유사한 것일 수 있다.

[0045] 상기 인공 리그닌은 β-O-4 구조, β-5 구조, β-β 구조, α-O-4 및 β-O-4 구조로 이루어지는 군으로부터 한 개 이상의 구조를 포함하는 것일 수 있다. 예를 들어, β-O-4 구조, β-5 구조를 포함하는 것일 수 있으며, 보다 구체적으로 β-O-4 구조, β-5 구조, β-β 구조를 포함하는 것일 수 있다.

[0046] 일 구체예에 있어서, 상기 인공 리그닌은β-O-4 구조, β-5 구조, β-β 구조, α-O-4 및 β-O-4 구조를 포함하는 것일 수 있다.

[0047] 일 구체예에 있어서, 상기 β-O-4 구조는 인공 리그닌의 전체 방향성 단량체 대비 5% 내지 50%인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 구조의 비율은 5 내지 45, 5 내지 40, 5 내지 35, 5 내지 30, 7 내지 45, 7 내지 40, 7 내지 35, 7 내지 30, 10 내지 45, 10 내지 40, 10 내지 35, 10 내지 30%일 수 있다.

[0048] 상기 인공 리그닌은 특정 단량체 비율을 가지거나, 특정 pH에서 제조하거나, 연속적 방식으로 용액을 주입함으로서, 상기 β-O-4 구조의 비율이 높은 것일 수 있다. 따라서, 상기 인공 리그닌은 자연 유래 리그닌을 효과적으로 모사하는 장점이 있는 것일 수 있다.

[0049] 일 구체예에 있어서, 상기 β-5 구조는 전체 방향성 단량체 대비 7 내지 25%인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 구조의 비율은 8 내지 24% 9 내지 24%, 10 내지 23%, 11 내지 22%, 12 내지 21%, 13 내지 20%, 14 내지 19.5%, 15 내지 19%, 16 내지 19%, 17 내지 19% 일 수 있다. 바람직하게는 15 내지 19% 일 수 있다.

[0050] 일 구체예에 있어서, 상기 β-β 구조는 전체 방향성 단량체 대비 10 내지 18% 인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 구조의 비율은 11 내지 18%, 12 내지 17.5%, 13 내지 17%, 13.5 내지 16.5%, 14 내지 16% 일 수 있다. 바람직하게는 13.5 내지 16.5 %일 수 있다.

[0051] 일 구체예에 있어서, 상기 α-O-4 또는/및 β-O-4 구조는 전체 방향성 단량체 대비 5 내지 11%인 것일 수 있다. 구체적으로, 상기 구조는 5.5 내지 10%, 6 내지 9%, 6.5 내지 9%, 7 내지 9%, 7.5 내지 9%, 8 내지 9%일 수 있다.

[0052] 상기 비율은 단량체가 가지고 있는 방향성 단량체 결합 중 특정 결합의 비율을 측정한 것일 수 있다. 상기 측정은 분자 광학적 방법을 이용한 것일 수 있고, 구체적으로는 2D NMR을 이용하여 측정된 피크의 면적을 정량적으로 환산하거나, 공지된 계산식에 의하여 계산된 것일 수 있다.

[0053] 상기 인공 리그닌은 상기 구조를 상기 수치 범위 비율로 포함함으로서, 자연 유래의 인공 리그닌과 비슷한 구조를 가지는 것일 수 있다. 따라서, 일 양상의 인공 리그닌은 자연 유래 리그닌을 효과적으로 모사하면서도, 구조가 명확하여 리그닌의 표준품으로서 사용될 수 있다.

[0054] 상기 인공 리그닌의 중량 평균 분자량은 1300 내지 3000Mv일 수 있고, 수평균 분자량은 900 내지 1600 Mn 일 수 있다.

[0055] 상기 인공 리그닌의 중량 평균 분자량은, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv, 1300 내지 3000Mv 일 수 있다. 예를 들어, 1600 내지 1500Mv일 수 있다.

[0056] 상기 인공 리그닌의 수평균 분자량은 900 내지 1600 Mn, 1000 내지 1500 Mn, 1050 내지 1450 Mn, 1100 내지 1400 Mn, 1150 내지 1450 Mn, 1200 내지 1400 Mn, 1200 내지 1450 Mn, 900 내지 1500 Mn 일 수 있다.

[0057] 상기 리그닌의 분자량은 나무 유래 리그닌(milled wood lignin)과 비교하여 나무 유래 리그닌이 1.5배 내지 4배 정도 더 큰 것일 수 있다. 2배 내지 3배일 수 있다. 상기 리그닌은 나무 유래 리그닌과 비교하여 상대적으로 저분자인 것일 수 있다. 따라서, 일 양상의 인공 리그닌은 자연 유래 리그닌과 비슷한 구조를 가지면서도, 저분자의 특징을 가져 연구 및 합성에 유용한 장점이 있다.

[0058] 다른 양상은 상기 방법으로 제조된 인공 리그닌과 후보 물질을 접촉시키는 단계; 및 상기 인공 리그닌의 화학적 또는 물리적 결합이 접촉 이전에 비해 감소한 경우, 상기 후보 물질을 리그닌 분해 효소용 물질인 것으로 결정하는 단계를 포함하는, 리그닌 분해 효소를 스크리닝하는 방법을 제공한다.

[0059] 상기 리그닌은 전술한 바와 동일하다.

[0060] 상기 스크리닝 방법에 있어서, 상기 스크리닝 방법은 인공 리그닌과 후보 물질을 접촉시켜 후보물질이 인공 리그닌 내로 들어가 리그닌의 결합을 분해하는 것으로써 수행될 수 있다. 또한, 상기 접촉 및/또는 인큐베이션은 시험관 내(in vitro)에서 수행되는 것일 수 있으며, 일정 시간 이상을 요구하는 것일 수 있다. 상기 인큐베이션

단계는 예를 들면, 인공 리그닌에 후보물질을 가하는 단계 및/또는 후보물질이 처리된 인공 리그닌을 배양하는 단계를 포함할 수 있다.

[0061] 이후, 상기 방법은 접촉 이전의 리그닌 또는 대조군 리그닌에 비하여 후보 물질 접촉 이후의 리그닌의 결합이 분해된 경우, 후보물질을 선별하는 단계를 제공한다. 상기 선별하는 단계는 상기 후보물질을 리그닌 분해 효소용 물질로 선택하는 단계를 더 포함할 수 있다.

발명의 효과

[0062] 일 양상에 따른 인공 리그닌 제조방법 및 상기 방법으로 인해 제조된 리그닌에 따르면, 높은 수율의 리그닌을 수득할 수 있고, 합성된 리그닌의 경우 효과적으로 침엽수 및 활엽수 유래 천연 리그닌을 모사할 수 있는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0063] 도 1은 시나필 알코올과 코니페릴 알코올의 첨가 비율을 달리한 샘플에서 리그닌의 수득률을 비교한 그래프이다.

도 2는 합성된 시나필 알코올과 코니페릴 알코올의 첨가 비율을 달리한 샘플별로 인공 리그닌을 2D NMR로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

도 3은 도 2의 2D NMR 분석 결과에서 나타낸 결합구조의 종류를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0064] 이하 본 발명을 실시예를 통하여 보다 상세하게 설명한다. 그러나, 이들 실시예는 본 발명을 예시적으로 설명하기 위한 것으로 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

[0065] **실시예 1. 단량체 비율에 따른 인공 리그닌의 합성 방법**

[0066] **1.1. 인공 리그닌 합성을 위한 용액 준비**

[0067] 단량체의 비율에 따른 인공 리그닌의 합성 및 수율을 확인하기 위하여, 시나필 알코올(sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA) 단량체를 포함하는 용액 3가지를 준비하였다.

[0068] 첫번째 용액을 제조하기 위하여, pH 6의 25 mM 인산화 칼슘 버퍼(potassium phosphate buffer, 시그마알드리치) 100 ml을 준비하였다. 다음으로, 상기 버퍼에 겨자무 과산화효소(horseradish peroxidase, 시그마알드리치)를 25 U/ml 활성으로, 즉, 1 ml에서 1분에 25 μmol의 H_2O_2를 소비하도록 첨가하여 준비하였다. 제조된 용액은 이하에서 "과산화효소 용액"또는"용액 1"으로 명명하였다.

[0069] 두번째 용액을 제조하기 위하여, 리그닌의 대표적 단량체인 시나필 알코올(sinapyl alcohol: SA) 및 코니페릴 알코올(coniferyl alcohol: CA)을 준비하였다. SA 및 CA 비율을 달리하여 리그닌을 제조하는 경우, 리그닌 수율을 비교하기 위하여, SA 및 CA를 0:10, 2:8, 4:6, 6:4 또는 8:2으로 설정하면서, 총 단량체양이 0.35 mmol이 되도록 조절하여 10 ml 다이옥사인(dioxane)에 용해하였다. 다음으로, 이를 pH 6 인 25 mM 인산화 칼슘 버퍼 50 ml에 혼합하여 준비하였다. 제조된 용액은 이하에서 "단량체 용액" 또는"용액 2"로 명명하였다.

[0070] 세 번째 용액을 제조하기 위하여, pH 6의 25 mM 인산화 칼슘 버퍼 (potassium phosphate buffer) 50 ml을 준비하였다. 상기 버퍼 50 ml에 2.86 mmol의 과산화수소를 첨가하여 혼합하였다 제조된 용액은 이하에서 "과산화수소 용액" 또는"용액 3"으로 명명하였다.

[0071] **1.2. SA 대 CA 비율이 0:10 인 인공 리그닌의 합성**

[0072] SA 및 CA의 비율이 0:10인 인공 리그닌을 합성하기 위하여, 상기 실시예 1,1 에서, SA 및 CA 몰 비율을 0:10으로 혼합한 용액 2, 용액 1 및 3을 준비하였다.

[0073] 먼저, 상기 용액 1과 용액 2를 혼합하였고 상기 혼합물에 용액 3을 주사기 펌프를 이용하여 약 5시간 동안 천천히 추가하면서 반응을 유도하였다.

[0074] 이후, 상기 혼합물을 10시간 동안 반응시킨 다음, 침전물의 형성을 눈으로 확인하였다. 침전물이 생긴 경우 침전물을 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm 강도로 15 분 동안 분리하였다. 분리 후, 상등액을 천천히 따라 버리

고, 증류수로 3번 세척하였다.

[0075] 다음으로, 남은 고형물을 35 ℃ 설정한 진공건조기(제이오텍, 한국)에서 처리하여 수분을 제거하여 인공 리그닌을 수득하였다.

[0076] **1.3. SA 대 CA 비율이 2:8 인 인공 리그닌의 합성**

[0077] SA 및 CA의 비율이 2:8인 인공 리그닌을 합성하기 위하여, 상기 실시예 1.1 에서, SA 및 CA 몰 비율을 2:8으로 혼합한 용액 2, 용액 1 및 3을 준비하여 상기 실시예 1.2과 동일한 방법으로 인공 리그닌을 수득하였다.

[0078] **1.4. SA 대 CA 비율이 4:6 인 인공 리그닌의 합성**

[0079] SA 및 CA의 비율이 4:6인 인공 리그닌을 합성하기 위하여, 상기 실시예 1.1 에서, SA 및 CA 몰 비율을 4:6으로 혼합한 용액 2, 용액 1 및 3을 준비하여 상기 실시예 1.2과 동일한 방법으로 인공 리그닌을 수득하였다.

[0080] **1.5. SA 대 CA 비율이 6:4 인 인공 리그닌의 합성**

[0081] SA 및 CA의 비율이 6:4인 인공 리그닌을 합성하기 위하여, 상기 실시예 1.1 에서, SA 및 CA 몰 비율을 6:4으로 혼합한 용액 2, 용액 1 및 3을 준비하여 상기 실시예 1.2과 동일한 방법으로 인공 리그닌을 수득하였다.

[0082] **1.6. SA 대 CA 비율이 8:2 인 인공 리그닌의 합성**

[0083] SA 및 CA의 비율이 8:2인 인공 리그닌을 합성하기 위하여, 상기 실시예 1.1 에서, SA 및 CA 몰 비율을 8:2으로 혼합한 용액 2, 용액 1 및 3을 준비하여 상기 실시예 1.2과 동일한 방법으로 인공 리그닌을 수득하였다.

[0084] **1.7. 단량체 비율에 따라 합성된 인공 리그닌의 수율 확인**

[0085] 상기 실시예 1.2 내지 1.6에서 제조한 인공 리그닌의 수율을 확인하기 위하여, 각 제조 시 투입된 단량체 질량 대비 획득된 인공 리그닌의 중량을 측정하여 계산하였다. 수율 100 %는 결과적으로 투입된 단량체가 모두 인공 리그닌으로 합성된 경우를 의미하고, 수율 0 %는 투입된 단량체가 모두 합성되지 않았음을 의미한다.

[0086] 도 1은 시나필 알코올과 코니페릴 알코올의 첨가 비율을 달리한 샘플에서 리그닌의 수득률을 비교한 그래프이다.

[0087] 그 결과, 도 1에 나타낸 것과 같이, 합성 시 투입한 단량체의 CA 비율이 커질수록 수율이 커지는 것을 확인하였다. 특히, SA 및 CA의 비율이 2:8인 경우 최대 84.1 %로 가장 높은 수율을 얻을 수 있음을 확인하였다. 반면에, 합성 시 투입한 단량체의 SA 비율을 증가시킬 경우에는 수율이 감소함을 확인할 수 있었다. 더불어, SA 및 CA의 비율이 8:2인 경우 41 %으로 수율이 가장 낮은 것을 확인하였다. 즉, SA의 크기가 CA에 비하여 상대적으로 커서 과산화수소에 의한 중합시 기질크기에 의한 저해를 많이 받는 것으로 보인다.

[0088] 일반적으로 소나무와 같은 침엽수 유래 리그닌에서는 SA 비율이 적고, 포플라와 같은 활엽수 유래 리그닌은 SA의 비율이 60 % 이상임이 알려져 있기 때문에, 이러한 결과는, 상기 실시예 1.3 또는 1.5의 리그닌은 침엽수 유래 리그닌을 모사하고, 상기 실시예 1.6 내지 1.7의 리그닌은 활엽수 유래 리그닌을 효과적으로 유래 리그닌을 모사할 수 있으며, 합성 수율은 상기 실시예 1.3에서 가장 높은 것을 의미한다.

[0089] **실시예 2. 합성된 인공 리그닌의 결합구조 분석**

[0090] 상기 실시예 1.3에서 합성한 인공 리그닌의 결합 구조와 결합 비율을 분석하기 위하여, 2D NMR을 실시하였다.

[0091] 발명설명서에 도 2가 상기 실시예 1에서 합성한 인공 리그닌의 분석 결과라고 알려 주셨으나, 정확히 어떤 SA:CA 비율로 수득한 리그닌인지 기재가 없습니다. 확인을 부탁 드립니다.(SA:CA = 2: 8) 입니다.

[0092] 상기 실시예 1.3 에서 합성된 인공 리그닌 20 mg을 500 ml DMSO-d6 용매에 용해하였다. 상기 용액을 400 MHz Bruker FT-NM 2D NMR 기기를 이용하여 구조 분석을 실시하였다. 기기에 사용된 파라미터는 하기 표 1과 같다.

표 1

[0093]

Parameter		Value	Unit
Size of fid	TD	1096	
Size of fid(F1)	1TD	256	
Pulse	P1	10	μsec
Pulse	P3	10	μsec
Delays	D24	0.00089	

Transmitter frequency offset	O1P	5.5	ppm
Frequency offet of 2nd nucleus	O2P	105	ppm
Rotation frequency of sample	RO	0	Hz
Acquisition time	AQ	0.124506	sec
Spectral Width(F1)	1SW	210	ppm
Spectral Width(F2)	2SW	10.9974	ppm
Number of Scans	NS	100	
Delays	D1	1	sec
Temperature	TE	300	K
Number of dummy scans	DS	32	
Spectral Width	SWH	4401.41	Hz
Transmitter frequency offset	O1	2201.21	Hz

[0094] 도 2는 합성된 시나필 알코올과 코니페릴 알코올의 첨가 비율을 달리한 샘플별로 인공 리그닌을 2D NMR로 분석한 결과를 나타낸 그래프이다.

[0095] 도 3은 도 2의 2D NMR 분석 결과에서 나타낸 결합 구조의 종류를 나타낸 것이다.

[0096] 도 3의 A는 β-O-4 결합, A2는 α-O-4 구조를 동시에 가지는 β-O-4 결합, C는 β-β 결합을 의미한다. 또한, S, S, S', G, G' 및 X1 는 도 3에 나타낸 구조를 의미한다.

[0097] 그 결과, 도 2 및 3에 나타낸 것과 같이, 2D NMR 결과, A, A2, B, C, S, S', G, G' 및 X1의 결합구조를 포함하는 것을 확인하였다.

[0098] 다음으로, 상기 2D NMR 결과를 바탕으로 하기 수학식 1 내지 5를 이용하여, 합성 리그닌 내의 결합 구조의 양을 정량적으로 계산하였다.

[0099] 수학식 1은 A 구조의 양을 정량적으로 나타낸 것이다.

[0100] 수학식 2는 B 구조의 양을 정량적으로 나타낸 것이다.

[0101] 수학식 3은 C 구조의 양을 정량적으로 나타낸 것이다.

[0102] 수학식 4는 A2 구조의 양을 정량적으로 나타낸 것이다.

[0103] 수학식 5는 X1구조의 양을 정량적으로 나타낸 것이다.

[0104] [수학식 1]

[0105] $$\beta - O - 4 = \frac{A\alpha}{\frac{S2/6}{2} + \frac{S'2/6}{2} + G2 + G'2}$$

[0106] [수학식 2]

[0107] $$\beta - 5 = \frac{B_\alpha}{\frac{S2/6}{2} + \frac{S'2/6}{2} + G2 + G'2}$$

[0108] [수학식 3]

[0109] $$\beta - \beta = \frac{C_\alpha}{\frac{S2/6}{2} + \frac{S'2/6}{2} + G2 + G'2}$$

[0110] [수학식 4]

[0111] $$\alpha\text{-}O\text{-}4, \beta\text{-}O\text{-}4 = \frac{A2_\alpha}{\frac{S2/6 + S'2/6}{2} + G2 + G'2}$$

[0112] [수학식 5]

$$X1 = \frac{X1_{\alpha}}{\frac{S2/6 + S'2/6}{2} + G2 + G'2}$$

[0113]

[0114] 수학식 1의 A 구조를 계산하기 위해서는 도 2에서 보이는 Aa, S2/6, S'2/6, G2, G'2의 면적값을 이용한다. Aa는 도면 3에서 보이는 A의 a탄소에 결합되어 있는 수소원자, S2는 도 3에서 보이는 S의 구조에서 2번 탄소에 결합되어 있는 수소원자, S'2는 도 3에서 보이는 S'구조에서 2번 탄소에 결합되어 있는 수소원자, G2는 도 3에서 보이는 G의 구조에서 2번 탄소에 결합되어 있는 수소원자, G'2는 도 3에서 보이는 G'의 구조에서 2번 탄소에 결합되어 있는 수소원자를 의미한다. 각 구조의 정량은 도 2에서 보이는 각 면적값을 이용한다.

[0115] 표 2는 합성된 리그닌에서, 100개의 방향성 단량체에 존재하는 각 결합 구조의 개수를 나타낸 표이다.

표 2

[0116]

SA:CA(mol/mol)	Number of linkages per 100 aromatic subunits			
	A구조(β-O-4)	B구조(β-5)	C구조(β-β)	A2구조(α-O-4, β-O-4)
0:10	4.85	22.33	10.68	8.74
2:8	7.59	18.73	15.19	8.10
4:6	6.60	13.21	18.40	5.66
6:4	3.43	8.00	16.00	2.29
8:2	2.23	4.47	17.32	6.70

[0117] 그 결과, 도 3 및 표 2에 나타낸 것과 같이, 2D NMR 피크의 면적이 각 결합 구조의 정량적인 특성과 비례관계를 가짐을 확인하였으며, SA:CA 비율이 2:8인 실시예 1.3이 A구조가 가장 높음을 확인하였다. A의 결합구조인 β-O-4 가 실제 침엽수에서는 50 %가 넘는 비율로 존재한다고 추정되기 때문에, A의 비율이 높으면 침엽수 유래 리그닌의 구조와 유사하고 결과적으로 화학적, 물리적 특성도 유사함을 의미한다. 이러한 결과는, 일 양상의 합성 리그닌이 높은 A 구조를 포함함으로서, 침엽수 또는 활엽수 유래 리그닌과 유사함을 의미하는 것이다.

[0118] **실시예 3. 반응 pH별 인공 리그닌의 결합 구조 분석**

[0119] 상기 실시예 1과 같은 조건 및 제조방법을 이용하여, 반응 pH를 다르게 하여 인공 리그닌을 합성하여 각 결합구조별 비율을 분석하였다.

[0120] 표 3은 반응 pH 별 합성된 리그닌에서, 100개의 방향성 단량체에 존재하는 각 결합 구조의 개수를 나타낸 표이다.

표 3

[0121]

반응 pH	Number of linkages per 100 aromatic subunits			
	A구조	B구조	C구조	A2구조
6.0	7.59	18.73	15.19	8.10
5.0	14.53	19.19	13.95	2.33
4.0	22.22	19.75	15.74	0
3.0	27.10	13.55	16.77	0

[0122] 그 결과, 표 3에 나타낸 것과 같이, 낮은 pH에서 반응을 진행할수록 A구조의 함량이 증가하는 경향이 있는 것을 확인하였다. 특히, 산성도가 높은 pH3에서 A 구조의 결합이 높은 것을 확인하였다. 따라서, A구조의 함량을 증가시키기 위해서는 약 pH 3에서 진행하는 것이 바람직한 것으로 판단된다.

[0123]

[0124] **실시예 4. 반응물 주입하는 방식 별 인공 리그닌 결합 구조 분석**

[0125] 상기 실시예 1의 용액 1, 용액 2 및 용액 3의 주입 방식 별 리그닌 결합 구조를 분석하기 위하여, 상기 실시예 2에서 가장 적합하다고 판단된 pH 3 조건에서 상기 용액의 연속주입 여부를 다르게 설정하여 리그닌을 합성하였

다.

[0126] 구체적으로, 상기 용액 1, 2 및 3을 모두 연속으로 주입하여 리그닌을 제조하는 경우, 용액 1 및 2를 연속으로 주입하여 리그닌을 제조하는 경우, 상기 용액 1 및 3을 연속으로 주입하여 리그닌을 제조하는 경우 또는 용액 3을 연속으로 주입하여 리그닌을 제조하는 경우, 리그닌의 결합구조 비율을 분석하였다.

[0127] 표 4는 각 반응물 주입 조건별 인공 리그닌의 결합구조를 분석하여 나타낸 표이다.

표 4

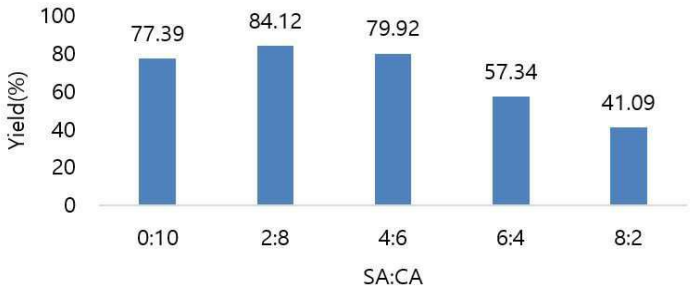
[0128]

반응 pH	Number of linkages per 100 aromatic subunits			
	A구조	B구조	C구조	A2구조
과산화수소, 효소, 단량체 용액 연속 주입	35.52	15.30	15.03	0
과산화수소와 단량체 용액 연속 주입	34.00	13.50	15.25	0
과산화수소와 효소 용액 연속 주입	29.56	13.21	17.30	0
과산화수소 용액 연속 주입	27.10	13.55	16.77	0

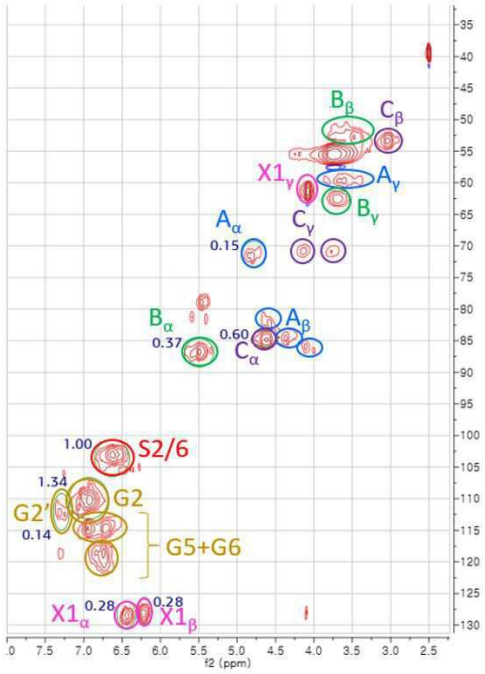
[0129] 그 결과, 표 4에 나타낸 것과 같이, 모든 기질을 연속해서 주입하여 반응시킬 때 A구조의 함량이 크게 증가하는 것을 확인할 수 있었다. 이러한 결과는, 일 양상의 제조방법에 의해 수득된 인공 리그닌이 높은 A구조 비율을 가지고 있으므로, 자연계에서 발견되는 리그닌과 유사도가 높음을 의미한다.

도면

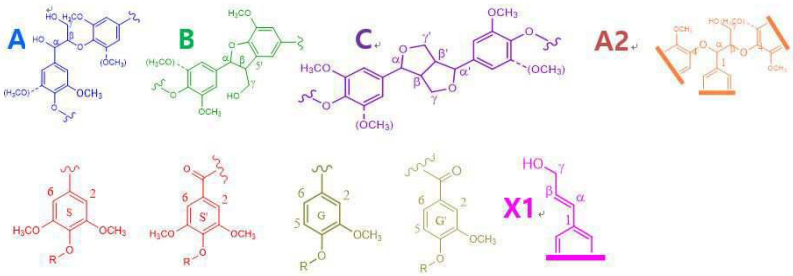
도면1



도면2


Bβ
Cβ
X1γ
Aγ
Bγ
Cγ
Aα
0.15
Bα
0.37
0.60
Aβ
Cα
1.00
S2/6
1.34
G2
G2'
0.14
G5+G6
X1α
0.28
0.28
X1β
f2 (ppm)

도면3


A
B
C
A2
X1