

Horseradish Peroxidase를 이용한 리그닌-페놀계 공중합물 합성

이 성 문 · 여 주 상 · ¹박 경 문 · †유 영 제
서울대학교 공과대학 응용화학부, ¹산업자원부 화학생물산업과
(접수 : 1999. 12. 24., 게재승인 : 2000. 2. 17.)

Synthesis of Lignin-phenol Copolymers Using Horseradish Peroxidase

Seong Moon Lee, Joo Sang Yeo, Kyungmoon Park¹, and Young Je Yoo†

School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea

¹Chemicals & Biotechnology Industries Division, Ministry of Commerce, Industries & Energy, Kyonggi 427-760, Korea

(Received : 1999. 12. 24., Accepted : 2000. 2. 17.)

Kraft Lignin which is produced abundantly in pulp industry, was chemically degraded into small oligomers and polymerized using horseradish peroxidase. Lignin acidolysis was optimized by controlling reaction time and HCl concentration. Acidolyzed lignin was polymerized and copolymers of acidolyzed lignin and phenol or *p*-cresol were synthesized. 70% of kraft lignin was degraded after acidolysis. Number average molecular weight of all lignin polymers were from 8,500 to 14,000 and did not show large difference. Differential scanning calorimeter analysis showed that acidolyzed lignin polymer and copolymer of acidolyzed lignin and phenol or *p*-cresol had glass transition and melting temperature while lignin did not show any melting temperature under 300°C, which indicates that newly synthesized lignin polymers can be used in industry under mild condition.

Key Words : lignin, acidolysis, horseradish peroxidase, enzyme, phenolic polymers

서 론

Lignin은 지구상에서 cellulose 다음으로 풍부한 천연고분자로써 매년 펄프공정과 제지공정에서 약 5×10^7 톤 정도의 양이 배출되고 있다(1). 이렇게 펄프공정과 제지공정의 부산물로 생성되는 lignin은 그 자원의 풍부함에도 불구하고 유용한 물질로 활용되지 못하고 현재 생산량의 80% 이상이 연료로서 사용되고 있는 실정이다(2). 따라서 제지공정에서 폐기물로 취급되어지는 lignin을 유용한 물질로 만드는 것은 큰 의미를 지닌다. lignin이 구조가 복잡하고 규칙성이 없기 때문에 lignin을 원료로 사용하여 유용한 물질을 얻고자 하는 데에는 제한성이 있다.

그러나 Phenylpropanoid units(coniferyl alcohol, *p*-coumatyl alcohol, 그리고 sinapyl alcohol)의 aryl결합과 alkyl ether결합으로 이루어진 lignin은 phenol계 고분자의 합성에서 사용하는 단량체와 비슷한 형태의 phenol기를 갖는 단량체로 구성된 가지형태의 고분자이기 때문에 적절한 변형이 이루어진다면 그 유용성이 증가할 것으로 예상할 수 있다. 최근 HRP를 촉매로 dioxane, N,N-dimethylformamide(DMF) 등의 유기용매에서 여러 가지 phenol계 화합물에 대한 중합이 이루어지고 있다(3,4). 이러한 효소를 사

용하는 생화학적 중합방법은 반응조건에 따라 고분자의 물성을 조절할 수 있고, 화학적인 합성에서 발생하는 환경적인 문제를 야기하지 않기 때문에 lignin에 적용하고자하는 시도가 이루어지고 있으나(5,6) 지금까지의 연구는 lignin을 있는 그대로 phenol 등과 공중합시켰기 때문에 응용에 한계가 있다.

본 연구에서는 kraft공정에서 생산되는 kraft lignin을 화학적으로 분해하여 oligomer로 만든 뒤, HRP를 사용하여 *p*-cresol, phenol 등 phenol계 화합물과 공중합을 시도하였다.

재료 및 방법

Lignin의 산분해

Dioxane-water(9:1 v/v) 100 mL에 kraft lignin을 1.0 g 넣고 0.2 M HCl이 되도록 조절하여 넣어준다 용액은 재순환시켜주며 온도는 70~80°C에서 4시간 이상 교반시킨다. 이때 dioxane-water azeotrope(81.6% dioxane)은 87.8°C이므로 acidolysis로 처리하는 동안 용매가 손실되지 않도록 한다(2).

위에서 acidolysis를 통하여 얻어진 용액에 0.2 M Tris(hydroxymethyl) aminomethane를 넣어 pH 7이 되도록 한다. pH 조절후 dioxane과 원충용액이 5:5가 되도록 dioxane 혹은 원충용액을 넣어준다.

HRP를 촉매로 한 중합반응

Kraft lignin의 acidolysis 분해산물 혹은 phenol계 화합물 0.2

† Corresponding Author : School of Chemical Engineering, Seoul National University, Seoul 151-742, Korea
Tel . 02-871-1659, Fax : 02-888-7295
E-mail : yjyoo@plaza.snu.ac.kr

Table 1. The solubility of kraft lignin in various solvents

| solvent | solubility (wt %) |
|---------|-------------------|
| water | 1.3 |
| DMSO | 10.2 |
| DMF | 16.6 |
| dioxane | 20.1 |
| THF | 4.6 |

M을 dioxane 20 mL에 용해시키고 pH 7 완충용액을 15 mL을 첨가하여 35 mL의 용액을 준비한다. 이어서 별도로 5 mL의 pH 7 완충용액에 HRP 0.001 g과 13.68 M H₂O₂(35% 용액)를 각각 준비한다. 그리고 kraft lignin의 acidolysis 분해산물 혹은 phenol계 화합물을 포함하는 용액에 H₂O₂를 HRP와 함께 첨가하여 중합반응을 시작한다. 반응온도는 25°C로 유지하고 12~18시간 동안 교반한 후, Tri-chloro acetic acid(TCA) 용액을 가하여 반응을 완료한다. 용액은 25°C에서 건조시킨 후, 물로 세척하여 반응하지 않은 phenol계 화합물의 단량체와 효소, 완충용액 등을 제거하고, 25°C에서 건조하여 시료를 얻는다

분석 방법

Kraft lignin의 산분해산물 및 phenol계 화합물로부터 생성된 고분자의 분자량은 gel permeation chromatography(GPC)로 측정하였으며 differential scanning calorimeter(DSC)를 사용하여 고분자의 열적 안정성을 알아보았다. DSC의 경우 질소가스를 사용하여 50°C에서 300°C까지 10°C/min으로 온도를 상승시키면서 측정하였다. 또한 중합된 고분자의 구조분석을 위해 500 MHz ¹³C-NMR을 사용하였으며 용매로는 1,4-dioxane-d₈을 사용하였다.

결과 및 고찰

고분자 합성의 반응조건

효소를 촉매로 하여 고분자를 합성하는 경우에는 여러 가지의 반응요소들이 고분자의 물성에 영향을 미친다. 유기용매의 종류, 유기용매와 완충용액과의 비율, 과산화수소의 농도와 양, 온도, 완충용액의 pH 등에 따라 결정이 된다. 위의 여러 가지 요소 중에서 본 실험에서 고분자의 성질에 결정적인 영향을 주는 유기용매의 종류, 유기용매와 완충용액의 비율 그리고 과산화수소의 농도를 정하는 실험을 행하였다.

효소로 고분자를 중합하는 데 있어서 유기용매를 선정할 때 제일 중요하게 고려하는 것은 기질에 대한 용해도이다. 용해도가 낮을 경우 중합반응 중 침전되어 중합반응이 중지되며 그 결과 분자량이 커지지 않기 때문이다.

Kraft lignin은 대부분의 용매에 잘 녹지 않으므로 비교적 높은 용해도를 갖는 용매를 우선적으로 선정하였다. Table 1과 같이 수용액, dioxane, DMF, tetrahydrofuran(THF), 그리고 dimethyl sulfoxide(DMSO)을 고려하였는데 DMF와 dioxane의 kraft lignin 용해도는 15~20% 정도로서 비교적 높은 용해도를 나타내었다.

수용액에 비해 유기용매 내에서 효소 활성은 현저히 감소하는데, 유기용매를 사용한 효소반응에서 반드시 고려되어야 한다. 유기용매에 의한 효소 활성 저하는 사용하는 유기용매의 극성, 소수성 등의 다양한 물성에 의해 동시에 영향을 받으므로 하나의 인자를 가지고 일반화하기는 매우 어렵지만 효소의 활성에

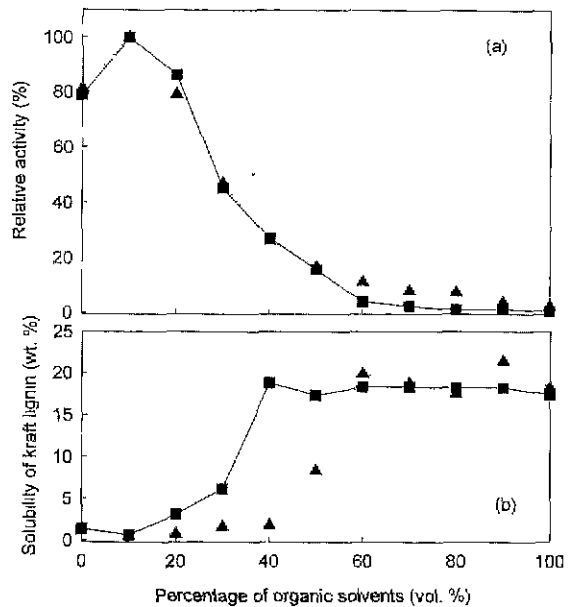


Figure 1. The effect of percentage of organic solvent on activity of HRP and solubility of Kraft lignin (a) relative activity of HRP (b) solubility of Kraft lignin(■ : Dioxane, ▲ : DMF).

매우 큰 작용을 한다고 알려져 있는 log P값을 용매 선정의 기준으로 삼았다. dioxane과 DMF의 log P는 각각 -1.1과 -1.0으로 비슷한 반면 THF는 0.40로서 훨씬 소수성이 크기 때문에 효소 활성의 저하가 빠를 것으로 예측할 수 있다. 그래서 dioxane 및 DMF를 본 실험에서 사용할 유기용매로서 고려하였다.

수용액과 유기용매의 비율에 따른 kraft lignin 용해도 및 효소의 활성을 측정한 결과는 Figure 1에서와 같이 유기용매의 비율이 증가함에 따라 효소의 활성이 급격하게 감소하였으나, 용해도의 경우 유기용매의 비율이 40% 이상일 경우 유기용매의 비율이 증가하여도 용해도가 더 이상 증가하지 않았다. Kraft lignin의 용해도와 효소 활성을 동시에 고려하여 유기용매 비율을 50%로 결정하였다. 유기용매에서 고분자를 합성하는 경우에는 유기용매와 수용액의 비율이 80:20(v/v)에서 고분자의 분자량이 제일 높다는 보고가 있다(3). 이는 효소의 활성이 낮아지면 자유라디칼(free radical)의 수가 적어지기 때문이다. 그러나 본 연구에서는 효소의 상대활성도가 10% 미만인 80% 용액보다는 효소의 상대활성도가 상대적으로 높으면서 kraft lignin 용해도도 높은 50% 용액을 반응조건으로 정하였다.

HRP로 고분자를 합성하는 경우 과산화수소의 농도는 분자량에 직접적인 영향을 미친다. HRP는 H₂O₂를 H₂O로 전환하면서 라디칼(radical)을 형성시키는데, 초기에 과량의 H₂O₂가 투입되면 compound-I, compound-II, compound-III, P-670 등의 비활성의 단계를 거치게 된다. 특히 P-670의 단계에서는 고분자 합성을 방해하는 depolymerization과 깊은 관련이 있다고 알려져 있는 superoxide anion이 H₂O₂로부터 생성되는 데(7), 이는 고분자 분자량을 낮추는 데 결정적인 영향을 미친다. 그러므로 최대의 HRP 활성을 얻기 위해 H₂O₂의 농도는 조절되어야 한다. H₂O₂의 농도에 따른 HRP의 활성은 Figure 2와 같으며, H₂O₂의 농도가 13.68 mM까지는 HRP의 활성은 증가하지만 20.51 mM보다

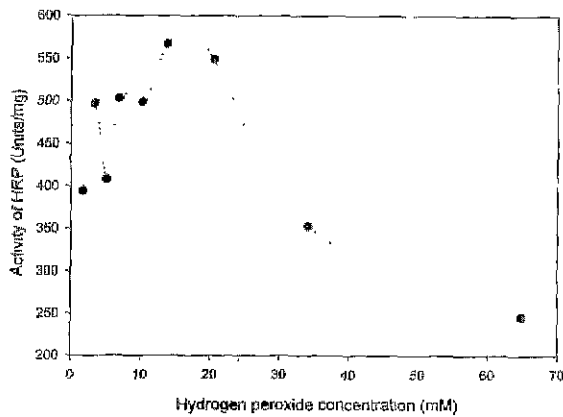


Figure 2. Activity of HRP at various H₂O₂ concentrations

Table 2. Decomposition of kraft lignin at various HCl concentrations (reaction time, 4 hours)

| HCl concentration (mol/L) | Acidolysis decomposition (%) |
|---------------------------|------------------------------|
| 0.2 | 41 |
| 0.4 | 67 |
| 2.0 | 71 |
| 4.0 | 71 |

높은 경우 활성은 점점 감소하게 됨을 알 수 있다. 적정농도 이상의 H₂O₂이 존재할 경우 과량으로 생산되는 라디칼로 인하여 효소가 손상되어 비활성화될 수도 있고 H₂O₂ 자체가 효소를 비활성화시킬 수도 있다 따라서 분자량이 높은 고분자를 생성할 때에는 H₂O₂를 적정농도로 조절하는 것이 중요하다.

Lignin의 산분해

Lignin을 산분해할 경우 분해수율은 시간 및 HCl 농도의 함수이며, 온도를 증가시키면 분해되는 양이 증가하는 것은 알려져 있다(8). lignin 거대 분자 내에 존재하는 여러 결합들이 분해되어 β-O-4, β-5, β-β, β-1, glyceraldehyde-2-aryl ether 등을 가지는 oligomer로 분해되며, 이러한 사실은 HPLC 측정을 통해 확인할 수 있다. 분해된 화합물들은 다양한 형태를 나타내고 있으며, lignin 내에 포함된 단량체 coniferyl alcohol, p-coumatyl alcohol, sinapyl alcohol emd과 비슷한 구조를 나타내고 있다. 위의 단량체들과 산분해산물과의 가장 큰 차이점은 benzene ring에 붙어있는 aliphatic group에 있다. 위의 세 가지 단량체는 aliphatic group에 이중결합을 포함하고 있는 반면, 산분해산물은 대부분 단일 결합으로 구성되어 있다. 이중결합을 포함하는 경우, 라디칼 중합반응을 할 때 -OH기와 benzene ring뿐만 아니라 이중결합에도 고분자 생성에 관련된 결합을 함으로써 가지형 고분자가 얻어진다. 그러나 aliphatic group에 단일결합만을 포함하고 있는 경우, 라디칼 중합 결과 -OH와 benzene ring만이 반응에 참여함으로써 선형고분자를 형성한다.

본 연구에서는 HCl의 농도와 반응시간에 따른 산분해의 결과를 살펴보았다. Table 2에서 보듯이 HCl의 농도가 0.5 M 이하의 경우 HCl의 농도가 높아질수록 분해수율이 증가했으나, 0.5 M 이상의 경우 70% 정도의 비슷한 값을 보였다. Figure 3은 반응시간에 따른 분해수율을 나타내고 있다. 그림에서 보듯이 반

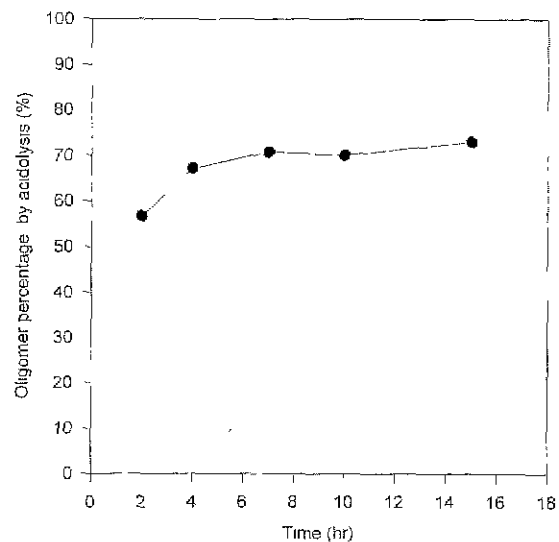


Figure 3. Time courses of acidolysis decomposition of Kraft lignin(HCl concentration 0.4 M, reaction time : 4 hours)

Table 3. Number average molecular weight(Mn) of Kraft lignin and acidolyzed lignin copolymers.

| | molecular weight (Mn) |
|----------------------------------------------|-----------------------|
| Kraft lignin | 15,000 ~ 17,000 |
| Acidolyzed lignin | 9,000 ~ 13,000 |
| Acidolyzed lignin and p-cresol copolymer | 8,500 ~ 12,000 |
| Coniferyl alcohol and p-cresol copolymer | 9,500 ~ 14,000 |
| Poly p-cresol | 9,300 ~ 13,500 |
| Acidolyzed lignin and phenol copolymer | 9,200 ~ 13,200 |
| Acidolyzed lignin and Kraft lignin copolymer | 9,500 ~ 14,000 |

응시간이 4시간 이상일 경우에는 전체 lignin의 약 70%정도의 분해수율을 유지하고 있었다. 그러므로 lignin을 산분해할 때의 반응조건은 HCl농도는 0.4 M로 반응시간은 4시간으로 하였다

HRP를 이용한 고분자 합성

단량체, 이량체, 올리고머(oligomer)로 분해된 kraft lignin의 산분해산물을 phenolic 화합물중 하나인 p-cresol과 공중합하였다. 비교를 위해서 p-cresol을 중합하였고, kraft lignin의 단량체중 하나인 coniferyl alcohol과 p-cresol을 공중합하였다. 그리고 kraft lignin의 acidolysis 분해산물을 kraft lignin 및 phenol과 중합하였다. 이렇게 합성된 중합체들의 분자량(수평균분자량, number average molecular weight)은 gel permeation chromatography(GPC)로 측정하였다. 유기용매와 수용액의 비율을 달리하면 분자량의 변화를 가져올 수 있으므로 같은 용매를 사용하였고 유기용매의 비율이 50%로 고정하였다. 중합체들의 분자량 분포는 Table 3에서 보이는 바와 같이 kraft lignin의 경우 15,000~17,000이었고 HRP로 phenolic compounds를 합성하는 경우에는 8,500~14,000이었다.

고분자의 열분석은 kraft lignin, kraft lignin의 산분해산물을 HRP로 중합한 고분자, kraft lignin의 산분해산물과 p-cresol과의 공중합체, kraft lignin의 산분해산물과 phenol과의 공중합체에 대해 이루어졌다. Figure 4에서 보는 바와 같이 Kraft lignin의 경

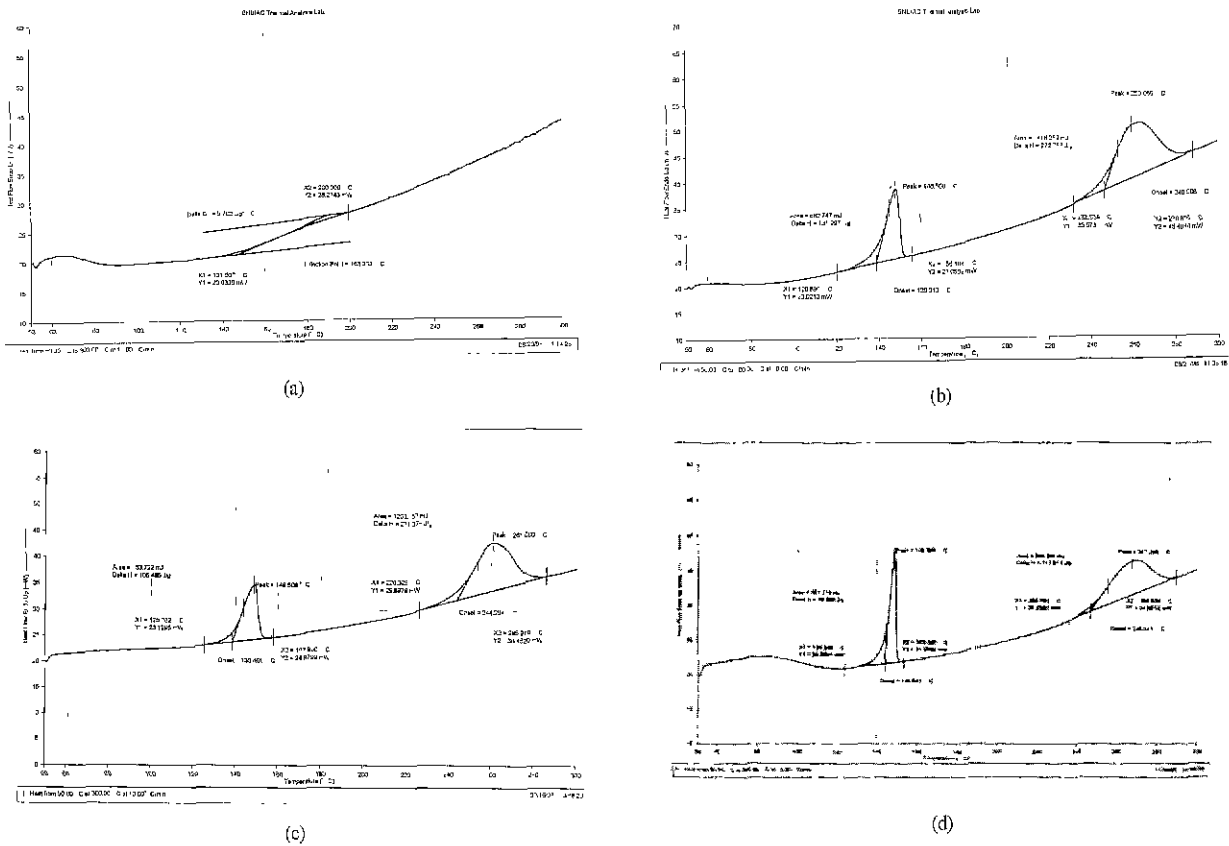


Figure 4. DSC traces of polymers produced by HRP (a) Kraft lignin, (b) acidolyzed lignin, (c) acidolyzed lignin and p-cresol copolymer, (d) acidolyzed lignin and phenol copolymer.

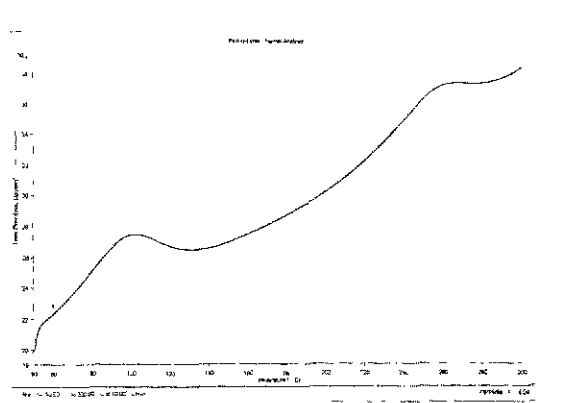


Figure 5. DSC trace of acidolyzed lignin polymer catalyzed by HRP.

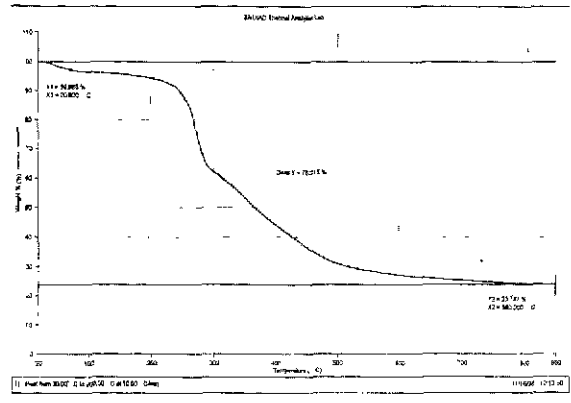


Figure 6. TGA diagram of acidolyzed lignin polymer catalyzed by HRP

우 무정형인 가지형 구조로 인해 150°C 근처에서 단지 미세한 유리전이를 보이고 있었다. 그러나 kraft lignin의 산분해 산물, kraft lignin의 산분해산물과 p-cresol 공중합체, kraft lignin의 산분해산물과 phenol과의 공중합체의 경우에는 이변에 중합된 중합체들은 150°C 근방에서 유리전이가 시작되고, 250°C 근방에서 높은점이 존재함을 알 수 있었다. 이는 기존의 lignin이 고온에서도 가공하기가 어려운 반면, 새롭게 중합된 lignin의 변형체들은 비교적 낮은 온도에서도 가공하기가 용이함을 나타낸다.

Acidolysis의 분해산물이 HRP와 반응하여 새로운 고분자가 생성되었음을 확인하기 위해 acidolysis후에 남은 고분자에 대해

열 특성을 관찰하였다. 이 중합체가 Figure 5에서와 같이 두 개의 Tm을 갖는 것으로 보아, 산분해산물을 HRP를 이용하여 중합시키면 기존의 lignin과는 다른 새로운 고분자가 생성됨을 알 수 있다. 새로운 고분자를 TGA로 분석한 결과는 Figure 6에서 보는 바와 같으며, 두 가지의 고분자가 존재한다는 간접적인 증거를 제시하고 있다.

그러므로 이러한 산처리된 lignin과 p-cresol의 공중합체는 기존의 lignin에 비하여 열적가공성이 용이하기 때문에 산업적으로 충분히 이용될 수 있을 것으로 판단된다.

요 약

Kraft lignin을 산분해한 후 HRP를 이용하여 다시 중합시키거나, phenol과 *p*-cresol과 공중합을 시도하였다. lignin은 구조가 복잡하고 여러 가지 단량체로 이루어져 있어서 그 변형이 용이하지 않기 때문에, 구조를 보다 단순하게 하기 위하여 산분해라는 화학적인 방법을 통하여 lignin을 분해하였다. 반응시간과 HCl의 농도를 조절하여 최적의 분해수율을 유지하였다. 산분해를 통하여 얻은 고분자와 *p*-cresol 및 phenol을 HRP를 이용하여 공중합하여 수평균 분자량이 8,500~14,000인 공중합체가 얻어졌다. DSC 검사 결과 새롭게 중합된 고분자들은 250℃ 근방에서 녹는점을 가지고 있었으며 열적 가공성이 용이함을 알 수 있었다.

참 고 문 헌

- 1 Sakanen K. V., and C. H. Ludwig (1971), Lignins : Occurrence, formation, structure and reaction Part 1 and 2, p. 259, John Wiley & Sons, New York.
- 2 Kratz K., and G. Billek (1957) Synthesis and testing of lignin precursors., *Tappi*, **40**, 269-285.
- 3 Dordick J. S., M. A. Marletta, and A. M. Klibanov (1987), Polymerization of phenols Catalyzed by Peroxidase in Nonaqueous Media, *Biotech. Bioeng.*, **30**, 31.
- 4 Rao L. N., F. J. Aranda, and C. F. Cheng (1994), Third Order nonlinear Optical Interactions in Some Biocengineered Polymers, *Frontiers Polym. Adv. Materials*, 219.
- 5 Popp J. L., T. K. Kirk, and J. S. Dordick (1991), Incorporation of *p*-Cresol into Lignins via Peroxidase-Catalysed Copolymerization in Nonaqueous Media, *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 964-968.
- 6 Blinkovsky A. M., and J. S. Dordick (1993), Peroxidase-Catalyzed Synthesis of Lignin-phenol Copolymers, *J. Polym. Sci.*, **31**, 1839-1846.
- 7 Joo H., Y. J. Yoo, and J. S. Dordick (1998), Polymers from Biocatalyst, *Kor. J. Chem. Eng.*, **15**, 362-374.
- 8 Popp J. L., T. K. Kirk, and J. S. Dordick (1991), Incorporation of *p*-Cresol into Lignins via Peroxidase-Catalysed Copolymerization in Nonaqueous Media, *Enzyme Microb. Technol.*, **13**, 964-968.