

(12) 특허협력조약에 의하여 공개된 국제출원

(19) 세계지식재산권기구  
국제사무국

(43) 국제공개일  
2020년 8월 20일 (20.08.2020) WIPO | PCT



(10) 국제공개번호  
WO 2020/165882 A2

- (51) 국제특허분류:  
C07D 309/38 (2006.01) C12N 9/02 (2006.01)  
C12N 15/70 (2006.01) C12P 17/06 (2006.01)
- (21) 국제출원번호: PCT/IB2020/051457
- (22) 국제출원일: 2020년 2월 21일 (21.02.2020)
- (25) 출원언어: 한국어
- (26) 공개언어: 한국어
- (30) 우선권정보:  
10-2019-0016016 2019년 2월 12일 (12.02.2019) KR  
10-2019-0074404 2019년 6월 21일 (21.06.2019) KR  
10-2019-0109179 2019년 9월 3일 (03.09.2019) KR
- (71) 출원인: 한국화학연구원 (KOREA RESEARCH INSTITUTE OF CHEMICAL TECHNOLOGY) [KR/KR];  
34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).
- (72) 발명자: 차현길 (CHA, Hyun Gil); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 주정찬 (JO, Jeong Chan); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 김희택 (KIM, Hee Taek); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 김경안 (KIM, Kyung An); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 박제영 (PARK, Jey-oung); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 강명중 (KANG, Myung Jong); 34114 대전시 유성구 가

정로 141, Daejeon (KR). 황성연 (HWANG, Sung Yeon); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 오동엽 (OH, Dong Yeop); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR). 이민우 (LEE, Min Woo); 34114 대전시 유성구 가정로 141, Daejeon (KR).

(74) 대리인: 특허법인(유한) 대아 (DAE-A INTELLECTUAL PROPERTY CONSULTING); 06243 서울시 강남구 역삼로 123 한양빌딩 3층, Seoul (KR).

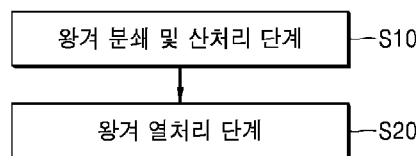
(81) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW.

(84) 지정국 (별도의 표시가 없는 한, 가능한 모든 종류의 국내 권리의 보호를 위하여): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 유라시아 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 유럽 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI,

(54) Title: METHOD OF PRODUCING HIGH-PURITY 2-PYRONE-4,6-DICARBOXYLIC ACID AND METHOD OF PRODUCING INTERMEDIATE FOR SAME

(54) 발명의 명칭: 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법

[도1]



S10 Step of grinding and acid-treating rice hulls  
S20 Step of heat-treating rice hulls

(57) Abstract: The present invention relates to a method of producing high-purity 2-pyrone-4,6-dicarboxylic acid (PDC), and a method of producing an intermediate for same, the methods comprising the steps of: 1) producing terephthalic acid (TPA) from PET; 2) inducing TPA to react with a recombinant microorganism strain; and 3) purifying the produced PDC to a high purity. By using a biomass-derived  $\text{SiO}_2$  catalyst according to the present invention, a preparation method of same, and a method of disintegration of TPA with PET using same, high-purity TPA can be produced at a faster rate than the rate of a conventional PET hydrolysis process under neutral conditions, wherein the TPA thus produced can be usefully utilized as a raw material for polyester fibers and the like. The present invention relates to a recombinant microorganism strain for PDC production, having incorporated therein nucleotide sequences that encode the enzymes TphB, TphAabc, LigAB, and LigC, and to a method of producing PDC, comprising a step of inducing the recombinant microorganism strain for PDC production to react with a substrate. The present invention provides a method of purifying PDC to a high purity by adding acetone to industrially produced or commercially available crude PDC or sodium salts thereof, to remove therefrom, by precipitation, impurities that are detectable by NMR and/or TLC analysis methods but difficult to remove or purify, thereafter extracting a resulting solution with an organic solvent and concentrating the solution, and then eluting a resulting concentrate with a solvent mixture of ethyl acetate and hexane by column chromatography.

[다음 쪽 계속]

FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK,  
MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI  
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML,  
MR, NE, SN, TD, TG).

공개:

- 국제조사보고서 없이 공개하며 보고서 접수 후 이를 별도 공개함 (규칙 48.2(g))
- 하나 또는 그 이상의 우선권주장과 관련된 우선권 회복 신청에 관한 정보와 함께 (규칙 26의2.3 및 48.2(b)(vii))
- 명세서의 서열목록 부분과 함께 (규칙 5.2(a))

**(57) 요약서:** 본 발명은 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법으로; 1) PET로부터 TPA를 제조하는 단계; 2) TPA를 제조함 균주와 반응시켜 PDC를 생성하는 단계; 및 3) 제조된 PDC를 고순도로 정제하는 단계를 포함한다. 본 발명에 의한 바이오 매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매, 그 제조방법, 및 이를 이용한 PET의 TPA 분해방법을 이용하면, 종래의 중성 조건하에서 PET 가수분해 속도 보다 빠른 시간에 고순도 테레프탈 산(TPA)의 제조가 가능하며, 제조된 테레프탈 산은 다시 폴리에스테르 섬유의 원료 등으로 유용하게 사용할 수 있다. 본 발명은 TphB 효소, TphAabc 효소, LigAB 효소 및 LigC 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 도입된, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC) 생산용 제조함 균주 및 상기 PDC 생산용 제조함 균주와 기질을 반응시키는 단계를 포함하는 PDC의 생산방법에 관한 것이다. 본 발명은 공업적으로 제조되거나 상업적으로 입수가 가능한 조질(crude) 2-피론-4,6-디카르복실산 또는 이의 소듐염에서, NMR 및/또는 TLC 분석법으로 확인되지만 제거 및 정제가 곤란한 불순물을, 아세톤을 첨가하여 석출시켜 제거하고, 결과된 용액을 유기용매로 추출 및 농축하고, 결과된 농축물을 컬럼 크로마토그래피에서 에틸아세테이트와 헥산의 혼합용매로 용리함으로써, 2-피론-4,6-디카르복실산을 고순도로 정제하는 방법을 제공한다.

## 명세서

### 발명의 명칭: 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법

#### 기술분야

- [1] 본 발명은 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법에 관한 것이다.
- [2] 본 발명에 따르면 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)로부터 바이오 매스 촉매를 이용하여 테레프탈산(TPA)을 생성하고, 상기 TPA를 재조합 균주와 반응시켜 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)을 생산할 수 있다. 또한 상기 PDC의 불순물을 제거하여 고순도의 PDC를 제공할 수 있다.
- [3] 또한, 본 발명은 구체적으로는 바이오 매스로부터 유래된 SiO<sub>2</sub> 촉매와 마이크로파를 이용하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate)를 테레프탈 산으로 가수분해하는 방법에 관한 것이다.
- [4] 또한, 본 발명은 보다 구체적으로 본 발명은 TphB 효소, TphAabc 효소, LigAB 효소 및 LigC 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 도입된, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC) 생산용 재조합 균주 및 상기 PDC 생산용 재조합 균주와 기질을 반응시키는 단계를 포함하는 PDC의 생산방법에 관한 것이다.
- [5] 또한, 본 발명은 2-피론-4,6-디카르복실산을 고순도로 정제하는 방법에 관한 것이다.

[6]

#### 배경기술

- [7] 대한민국을 비롯한 아시아 지역의 주요한 곡물인 벼는 국내의 경우 2009년을 기준으로 약 468 만 톤(재배 면적 약 92 만 ha)으로 매년 500 만 톤 정도가 생산되고 있다. 왕겨는 벼의 탈곡 과정에서 발생하는 농업폐기물이며 일반적으로 무게비로 벼의 약 20 %를 차지하는 바, 국내에서만 매년 약 90 내지 100 만 톤의 왕겨가 도정과정의 부산물로 발생되고 있다.
- [8] 그러나 1900년대 중반부터 왕겨의 다양한 활용 연구에도 불구하고 국내에서는 대부분 소, 돼지 등의 축산시설 깔개, 인테리어용 보온재 등, 왕겨의 자체적인 활용만 되고 있는 실정이다.
- [9] 왕겨는 크게 유기물과 무기물 성분으로 나뉘며 유기물이 약 80 %, 무기물은 약 20 %를 차지하고 있다. 유기물은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스 및 리그닌 등의 식물성 고분자로 구성되며 무기물은 대부분 실리카로 구성되어 있다. 왕겨에 포함된 실리카 성분을 리그닌과 같이 물리적, 화학적 저항성이 큰 고분자가 보호하고 있는 형태를 띠고 있다.
- [10] 따라서 이러한 왕겨의 활용성을 높이기 위해 왕겨를 원료로 활용하기 위한 연구와 왕겨를 소재로 활용하여 목질재료 또는 합성목재 등을 제조하는

기술개발, 그리고 왕겨 내에 존재하는 실리카를 분리/추출하여 활용하는 연구 등 다양한 연구개발들이 지속적으로 행하여져 왔다.

- [11] 한편, 테레프탈 산과 에틸렌 글리콜을 축중합하여 얻을 수 있는 PET(Polyethylene Terephthalate)는 강성, 전기적 성질, 내후성, 내열성이 좋고, 고온하에서 장기 폭로하여도 인장강도의 저하가 상당히 적으며 또한 결정성 플라스틱에 속하기 때문에 기름에 대한 내성도 좋다.
- [12] 이에 따라 생활용품, 장난감, 전기절연체, 가전제품 케이스, 포장재 등으로 사용되고 있으며 특히, 가볍고 맛과 냄새가 없기 때문에 플라스틱 음료수병의 대부분을 차지하고 있다.
- [13] 그러나 이러한 장점에도 불구하고 대기 및 생물학적 물질에 대한 내성이 크기 때문에 매우 느리게 분해되어 폐PET 수지는 환경문제를 야기하고 있다.
- [14] 이러한 폐PET 수지를 재활용하는 방법으로 글리콜리시스(Glycolysis), 하이드롤리시스(Hydrolysis), 메타놀리시스(Methanolysis) 등 화학적 재활용 방법이 개시되어 있다.
- [15] 글리콜리시스 방법은 에틸렌 글리콜 등의 글리콜에 의한 PET 해중합 방식으로 상업적으로 널리 사용되고 있는 방식이다. 본 방법은 조업비용이 적게 들고 원료 물질인 폐PET가 약간 오염되었어도 무방한 장점이 있으나, 해중합물의 분자량이 높아 정제가 곤란한 단점이 있다.
- [16] 하이드롤리시스 방법은 물, 알칼리 등에 의한 PET 분해 방법으로 테레프탈 산(Terephthalic Acid)의 제조 용도로 많이 쓰이고 있는 방법이나 제조비용이 많이 드는 단점이 있다.
- [17] 메타놀리시스는 메탄올에 의한 해중합 방법으로 가장 널리 쓰이고 있으며, 폐PET의 오염 상태와 관계가 없는 장점이 있는 반면에 높은 온도와 압력에서 운전되어야 하기 때문에 제조비용이 많이 든다는 단점이 있다.
- [18] 상기 방법 중에서 테레프탈 산은 다시 폴리에스테르 섬유의 원료 등으로 사용할 수 있으므로, 폐PET 수지로부터 테레프탈 산과 에틸렌 글리콜을 분리해 내는 하이드롤리시스 방법에 대한 연구가 많이 진행되어 왔다.
- [19] 폴리에틸렌 테레프탈산은 가벼운 무게, 질감, 화학적 안정성, 쉬운 성형 등의 장점들을 가지고 있어 합성 섬유나 포장 등에 널리 사용되고 있다. 2015년의 경우 연간 폴리에틸렌 테레프탈산의 생산량이 33만 톤 정도로 폴리에스테르 중 가장 많은 양이 생산되었지만, 자연적으로 분해되기 어려워 미세플라스틱의 오염, 해양 생태계의 플라스틱 침전 등의 환경오염을 야기 하고 있다.
- [20] 폴리에틸렌 테레프탈산을 친환경적인 플라스틱으로 대체 하기 위해 폴리에틸렌 푸란디카복실산 같은 자연분해 플라스틱이 개발되고 있다. 그러나 이러한 자연분해 플라스틱들은 현재의 폴리에틸렌 테레프탈산을 물성이나 비용적인 측면에서 대체하기엔 많은 어려움이 있다. 이런 이유로, 폴리에틸렌 테레프탈산의 재활용을 강화 하여 자연으로 나오게 되는 폐 플라스틱을 줄이는 연구가 활발히 진행되고 있다.

- [21] 많은 플라스틱 중 폴리에틸렌 테레프탈산과 폴리에틸렌은 물리적으로 재활용 되고, 재활용 플라스틱을 만들 수 있는 플라스틱 중 하나이다. 미국에서는 수십년 간 폴리에틸렌 테레프탈산의 재활용 공정이 이루어지고 있지만 재활용률은 겨우 21 %에 불과하다. 이는 재활용된 폴리에틸렌 테레프탈산이 새로 생산된 폴리에틸렌 테레프탈산 보다 품질이 낮고, 재활용 과정의 비용이 비싸기 때문이다. 일례로, 새로 생산된 폴리에틸렌 테레프탈산은 킬로그램 당 1.1에서 1.3 달러이지만, 폴리에틸렌 테레프탈산을 재활용하는 비용은 킬로그램 당 1.3에서 1.5 달러이다.
- [22] 한편, 플라스틱을 가스나 연료로 바꿀 수 있는 화학적 혹은 열 화학적 플라스틱 재활용은 플라스틱과 비교하였을 때 에너지 비용 측면과 생성물의 낮은 가격 때문에 널리 사용되고 있지 않다. 요약하자면, 현재 사용되고 있는 재활용 방법들은 폐 폴리에틸렌 테레프탈산을 줄이기에 바람직한 해결방법이 아니다. 이러한 이유로 볼 때 폴리에틸렌 테레프탈산의 재활용 방법을 업사이클링, 즉 재활용품을 이용하여 고부가가치의 물질을 만드는 재활용 방법이 필요하다.
- [23] 2-피론-4,6-디카르복실산(PDC)은 극성 유사-방향족 고리에 2개의 카르복실산기가 부착된 구조를 가지고 있으며, 중부가반응(polyaddition) 및 중축합반응(polycondensation)이 가능한 2관능성 단량체로서 작용할 수 있기 때문에, 다양한 기능성 폴리에스터의 제조에 유용한 단량체 등의 고부가가치 활용이 제안되었다. 2-피론-4,6-디카르복실산(PDC)은 리그닌으로부터 효소공학적으로 대량으로 생산되고 일반적으로 활성탄으로 정제되고 있지만, 고부가가치 활용을 위해 고순도로 정제할 수 있는 기술이 필요하여 많은 연구가 행해졌다.
- [24] 그러나, 기존 선행방법으로 정제된 2-피론-4,6-디카르복실산 뿐만 아니라 다른 상업적으로 입수가 가능한 2-피론-4,6-디카르복실산에는 NMR과 TLC 분석 결과 미량의 불순물이 함유되어 있다고 추정되는데, 이들 불순물은 전통적인 2-피론-4,6-디카르복실산 정제 방법(예. 재결정, 양이온 석출법, 용해도법 등)으로는 제거하기가 곤란하여, 2-피론-4,6-디카르복실산의 고부가가치 활용이 공업적인 관점에서 제한되고 있다. 또한, 이들의 제거 및 정제에는 많은 비용과 노력이 필요하므로, 이러한 불순물을 간단하고 효율적이고 경제적으로 제거할 수 있는 방법이 요구되고 있다.

[25]

### 발명의 상세한 설명

#### 기술적 과제

- [26] 본 발명의 목적은 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)로부터 바이오 매스 축매를 이용하여 테레프탈산(TPA)을 생성하고, 상기 TPA를 재조합 균주와 반응시켜 2-피론-4,6-디카르복실산(PDC)을 생산하며, 상기 PDC의 불순물을 제거하여 고순도의 PDC를 제공하는 데 있다.

- [27] 또한, 본 발명은, 왕겨를 이용하여  $\text{SiO}_2$  촉매를 제조하고, 이를 이용하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate)를 마이크로파 반응기에서 반응시켜 고체상 테레프탈 산을 용이하게 제조할 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.
- [28] 또한, 본 발명은 중성 조건하에서 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate)를 가수분해할 때 테레프탈 산 중의 불순물 함량을 낮추어 고순도의 테레프탈 산을 제조하는 방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.
- [29] 또한, 본 발명의 목적은 TphB 효소, TphAabc 효소, LigAB 효소 및 LigC 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 도입된 2-피론-4,6-디카복실산(PDC) 생산용 제조합 균주를 제공하는 데 있다.
- [30] 본 발명의 다른 목적은 상기 PDC 생산용 제조합 균주와 기질을 반응시키는 단계를 포함하는 PDC의 생산방법을 제공하는 것이다.
- [31] 또한, 본 발명의 목적은 공업적으로 제조되거나 상업적으로 입수가 가능한 조질(crude) 2-피론-4,6-디카복실산 또는 이의 소듐염에서, NMR 및/또는 TLC 분석법으로 확인되지만 제거 및 정제가 곤란한 불순물을 제거하여 고순도의 2-피론-4,6-디카복실산을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [32] 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제(들)로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제(들)는 이하의 기재로부터 당업자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

[33]

### 과제 해결 수단

- [34] 본 발명은 고순도 2-피론-4,6-디카복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법으로; 1) PET로부터 TPA를 제조하는 단계; 2) TPA를 제조합 균주와 반응시켜 PDC를 생성하는 단계; 및 3) 제조된 PDC를 고순도로 정제하는 단계를 포함한다.
- [35]
- [36] 본 발명에 따른 1) PET로부터 TPA를 제조하는 단계 중  $\text{SiO}_2$  촉매는, 바이오 매스로부터 추출된 것을 특징으로 한다.
- [37] 상기 바이오 매스는 왕겨인 것이 바람직하다.
- [38] 상기  $\text{SiO}_2$  촉매는 티올 작용기(-SH)에 의해 표면이 개질된 것이 바람직하다.
- [39] 상기  $\text{SiO}_2$  촉매의 비표면적은  $151.92 \sim 281.02 \text{ m}^2/\text{g}$ 이고, 기공의 크기는  $0.57 \sim 0.66 \text{ nm}$ 인 것이 바람직하다.
- [40] 본 발명의 바람직한 다른 실시예에 따른, 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법은, 가) 왕겨를 분쇄한 후 산처리하는 단계; 및 나) 상기 가) 단계의 산처리된 왕겨를 열처리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.
- [41] 다른 실시예에 있어서, 상기 가) 단계의 상기 산처리는, 황산, 염산, 질산, 인산, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1 종을 포함하는 산성용액을

- 사용하여, 40 ~ 150 °C에서 10 분 ~ 3 시간 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [42] 상기 가) 단계의 산처리 후, 상기 산처리된 왕겨를 여과 및 세척하는 단계를 더 포함하는 것이 바람직하다.
- [43] 상기 나) 단계의 열처리는 600 ~ 700 °C의 온도에서 분당 3.5 °C씩 하강시키면서 2 ~ 3 시간 동안 수행되는 것이 바람직하다.
- [44] 상기 나) 단계 후 SiO<sub>2</sub> 촉매의 표면을 개질시키는 단계를 더 포함하며, 상기 SiO<sub>2</sub> 촉매의 표면을 개질시키는 단계는, 상기 SiO<sub>2</sub> 촉매와 머캡토프로필 트리메톡시실란(Mercaptopropyl trimethoxysilane)을 톨루엔(Toluene) 용매에 투입하여 혼합물을 제조하는 단계; 상기 혼합물을 세척하는 단계; 및 상기 세척된 혼합물을 건조시키는 단계;를 포함하는 것이 바람직하다.
- [45] 본 발명의 또 다른 바람직한 실시예에 따른 바이오 매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매를 이용한 PET의 TPA 분해방법은, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate), 바이오매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매, 및 물을 혼합하고 마이크로파를 조사하여 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산(Terephthalic acid)으로 가수분해하는 것을 특징으로 한다.
- [46] 또 다른 실시예에 있어서, 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산으로 가수분해하는 방법은, a) 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 바이오매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매 및 물을 마이크로파 반응기에서 반응시켜 테레프탈 산이 침전된 혼합물을 제조하는 단계; b) 상기 혼합물에 수산화나트륨을 혼합하여 테레프탈 산을 용해시키는 단계; c) 상기 테레프탈 산이 용해된 혼합물을 여과하여 잔여물과 촉매를 제거하는 단계; d) 상기 잔여물과 촉매가 제거된 혼합물에 산성용액을 투입하여 침전물을 형성시키고 수득하는 단계; 및 e) 상기 수득된 침전물을 건조시키는 단계;를 포함하는 것이 바람직하다.
- [47] 상기 산성용액은, 황산, 염산, 질산, 인산, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1 종인 것이 바람직하다.
- [48]
- [49] 본 발명의 2) TPA를 재조합 균주와 반응시켜 PDC를 생성하는 단계의 일 실시예는 1,2-디하이드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카복실레이트 디하이드로게네이즈(1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylate dehydrogenase; TphB) 효소; 테레프탈레이트 1,2-디옥시게네이즈 (terephthalate 1,2-dioxygenase; TphAabc) 효소; 프로토크테추에이트 4,5-디옥시게네이즈 (Protocatechuate 4,5-dioxygenase; LigAB) 효소; 4-카복시-2-하이드록시뮤코네이트-6-세미알데하이드 디하이드로게네이즈 (4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase; LigC) 효소 및 이들의 조합으로 구성된 군으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 도입된, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC) 생산용 재조합 균주를 제공한다.
- [50] 상기 TphB 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열 (*tphB*)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열로 구성될 수 있고; 상기

TphAabc 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(*tphAabc*)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열로 구성될 수 있으며; 상기 LigAB 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(*ligAB*)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열로 구성될 수 있고; 상기 LigC 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(*LigC*)은 특별히 이에 제한되지 않으나, 일 예로서, 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열로 구성될 수 있다.

- [51] 상기 실시의 구체적인 예시로서, 본 발명의 PDC 생산용 재조합 균주는 뉴클레오티드 서열번호 1의 *tphB*, 뉴클레오티드 서열번호 2의 *tphAabc*, 뉴클레오티드 서열번호 3의 *ligAB* 및 뉴클레오티드 서열번호 4의 *ligC*가 도입된 재조합 균주; 뉴클레오티드 서열번호 1의 *tphB* 및 뉴클레오티드 서열번호 2의 *tphAabc*가 도입된 제1 재조합 균주와 뉴클레오티드 서열번호 3의 *ligAB* 및 뉴클레오티드 서열번호 4의 *ligC*가 도입된 제2 재조합 균주를 포함하는 혼합균주; 뉴클레오티드 서열번호 3의 *ligAB* 및 뉴클레오티드 서열번호 4의 *ligC*가 도입된 재조합 균주 등이 될 수 있다.
- [52] 상기 뉴클레오티드 서열의 도입은 발현벡터를 통해 수행될 수 있고, 상기 뉴클레오티드 서열이 도입된 균주는 상기 뉴클레오티드 서열이 발현되도록 형질전환된다.
- [53] 상기 발현벡터란 적당한 숙주세포에서 목적 단백질 또는 목적 RNA를 발현할 수 있는 벡터로서, 유전자 삽입물(상기 폴리뉴클레오티드)이 발현되도록 작동가능하게 연결된 필수적인 조절 요소를 포함하는 유전자 작제물을 의미한다. 발현벡터는 일단 숙주 세포 내에 있으면 숙주 염색체 DNA와 무관하게 복제할 수 있으며 삽입된 외래 DNA가 발현될 수 있다. 플라스미드가 현재 벡터의 가장 통상적으로 사용되는 형태이므로, 본 발명의 명세서에서 플라스미드(plasmid) 및 벡터(vector)는 때로 상호 교환적으로 사용된다.
- [54] 상기 벡터는 플라스미드 벡터, 코즈미드 벡터, 박테리오파아지 벡터 및 바이러스 벡터 등을 포함하나 이에 제한되지 않는다. 적합한 발현벡터는 프로모터, 오퍼레이터, 개시코돈, 종결코돈, 폴리아데닐화 시그널 및 인핸서 같은 발현 조절 엘리먼트 외에도 막 표적화 또는 분비를 위한 시그널 서열 또는 리더 서열을 포함하며 목적에 따라 다양하게 제조될 수 있다. 벡터의 프로모터는 구성적 또는 유도성일 수 있다. 또한 발현벡터는 벡터를 함유하는 숙주 세포를 선택하기 위한 선택 마커를 포함하고, 복제 가능한 발현벡터인 경우 복제 기원을 포함할 수 있다.
- [55] 상기 형질전환은 DNA를 숙주로 도입하여 DNA가 염색체외 인자로서 또는 염색체 통합완성에 의해 복제가능하게 되는 것을 의미한다. 본 발명에 따른 형질전환에 사용될 수 있는 숙주 세포는 원핵 또는 진핵 세포 모두를 포함할 수 있으며, DNA의 도입효율이 높고, 도입된 DNA의 발현효율이 높은 숙주가 사용될 수 있다. 예를 들어, 에스케리키아, 슈도모나스, 바실러스, 스트렙토마이세스, 진균, 효모와 같은 주지의 진핵 및 원핵숙주들, 스포도프테라



프루기페르다(SF9)와 같은 곤충 세포, CHO, COS 1, COS 7, BSC 1, BSC 40, BMT 10 등의 동물 세포 등이 사용될 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니다.

- [56] 형질전환은 폴리뉴클레오티드를 도입하는 어떤 방법도 포함되며, 당 분야에서 공지된 바와 같이 숙주세포에 따라 적합한 표준 기술을 선택하여 수행할 수 있다. 이런 방법에는 전기충격유전자전달법(electroporation), 원형질 융합, 인산 칼슘( $\text{CaPO}_4$ ) 침전, 염화 칼슘( $\text{CaCl}_2$ ) 침전, 실리콘 카바이드 섬유 이용한 교반, 아그로박테리아-매개 형질전환, PEG(polyethylene glycol), 텍스트란 설페이트, 리포펙타민, 입자 충격법(particle bombardment) 등이 포함되나 이로 제한되지 않는다.
- [57] 본 발명의 다른 실시양태는 상기 PDC 생산용 재조합 균주와 기질을 반응시키는 단계를 포함하는, PDC의 생산방법을 제공한다.
- [58] 본 발명에서 제공하는 PCD 생산방법은 특별히 이에 제한되지 않으나, 구체적인 일 예로서, (1) TphB 효소를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열, TphAabc 효소를 코딩하는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열, LigAB 효소를 코딩하는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열 및 LigC 효소를 코딩하는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열이 도입된 재조합 균주를 수득하는 단계; 및 (2) 상기 수득한 재조합 균주와 테레프탈산(TPA)을 반응시켜서, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생성하는 단계를 포함한다.
- [59] 이때, 상기 TphAabc 효소와 TphB 효소의 순차반응을 통해 테레프탈산(TPA)을 프로토포카테추산(PCA)으로 전환시키는 촉매반응을 수행할 수 있고, 상기 LigAB 효소는 프로토포카테추산(PCA)을 CHMS(4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde)로 전환시키는 촉매반응을 수행할 수 있으며, 상기 LigC 효소는 CHMS를 PDC로 전환시키는 촉매반응을 수행할 수 있다.
- [60] 다른 예로서, 본 발명에서 제공하는 PCD 생산방법은 (1) TphB 효소를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열과 TphAabc 효소를 코딩하는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열이 도입된 제1 재조합 균주, 및 LigAB 효소를 코딩하는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열과 LigC 효소를 코딩하는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열이 도입된 제2 재조합 균주를 각각 수득하는 단계; (2) 상기 수득한 제1 재조합 균주와 제2 재조합 균주를 15:25(균체수)의 비율로 혼합하여 혼합균주를 수득하는 단계; 및 (3) 상기 수득한 혼합균주와 테레프탈산(TPA)을 반응시켜서, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생성하는 단계를 포함한다.
- [61] 또 다른 예로서, 본 발명에서 제공하는 PCD 생산방법은 (1) LigAB 효소를 코딩하는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열과 LigC 효소를 코딩하는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열이 도입된 재조합 균주를 수득하는 단계; 및 (2) 상기 수득한 재조합 균주와 프로토포카테추산(PCA)을 반응시켜서, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생성하는 단계를 포함한다.
- [62] 또한, 상기의 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 3) 제조된 PDC를 고순도로

정제하는 단계의 경우 하기 단계를 포함하는 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법을 제공한다:

- [63] (a) 조절 2-피론-4,6-디카르복실산 소듐염을 산성화하여 2-피론-4,6-디카르복실산을 함유하는 수용액을 제조하는 단계;
- [64] (b) 상기 단계 (a)에서 결과된 수용액을 유기용매로 추출하고 증분리하는 단계;
- [65] (c) 상기 단계 (b)에서 증분리된 수층에 아세톤을 첨가하여 형성되는 백색 침전물을 분리하여 제거하는 단계;
- [66] (d) 상기 단계 (c)에서 백색 침전물이 제거된 용액을 유기용매로 추출하고 증분리하는 단계;
- [67] (e) 상기 단계 (b)에서 증분리된 유기층 및 단계 (d)에서 증분리된 유기층을 결합하여 농축하는 단계; 및
- [68] (f) 상기 단계 (e)에서 결과된 농축물을 에틸 아세테이트와 헥산의 혼합 용매로 컬럼 크로마토그래피하는 단계.
- [69] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 2-피론-4,6-디카르복실산 소듐염은 리튬, 칼륨, 루비듐, 은, 세슘과 같은 1가 금속 양이온; 마그네슘, 칼슘, 철(II), 구리(II), 아연, 바륨, 코발트, 니켈(II), 망간, 크롬(II)과 같은 2가 금속 양이온; 철(III), 알루미늄, 갈륨과 같은 3가 금속 양이온; 및 비소(IV), 납(IV), 티탄(IV), 게르마늄(IV)과 같은 4가 금속 양이온으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 다른 금속 양이온을 포함할 수 있다.
- [70] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (a)에서 산성화는 염산, 황산, 질산 및 인산으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 산, 바람직하게는 염산을 사용하여 수행될 수 있다.
- [71] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (b) 및 (d)에서 사용되는 유기용매는 동일 또는 상이하며, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤, THF 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상일 수 있고, 바람직하게는 에틸아세테이트이다.
- [72] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (f)의 컬럼 크로마토그래피는 에틸아세테이트:헥산=4:1 ~ 1:4의 혼합 용매로 용리될 수 있으며, 바람직하게는 에틸아세테이트:헥산=4:1 ~ 1:4의 혼합 용매에서 시작하여 에틸아세테이트(단일 용매)로 변화시키면서 농도구배 용리될 수 있다.
- [73] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 단계 (f)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피일 수 있다.
- [74]

### 발명의 효과

- [75] 본 발명에 따르면 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)로부터 바이오 매스 촉매를 이용하여 테레프탈산(TPA)을 생성하고, 상기 TPA를 제조함 균주와 반응시켜 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)을 생산할 수 있으며, 상기 PDC의 불순물을

제거하여 고순도의 PDC를 제공할 수 있다.

- [76] 또한, 본 발명에 의한 바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매, 그 제조방법, 및 이를 이용한 PET의 TPA 분해방법을 이용하면, 종래의 중성 조건하에서 PET 가수분해 속도 보다 빠른 시간에 고순도 테레프탈 산(TPA)의 제조가 가능하며, 제조된 테레프탈 산은 다시 폴리에스테르 섬유의 원료 등으로 유용하게 사용할 수 있다.

- [77] 또한, 본 발명에서 제공하는 제조합 균주를 사용하여 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생산하는 경우 일정량의 기질에서 전환량이 100% 이며, 부산물 없이 PDC 만 선택적으로 생산하는 것이 가능하여 부산물에 대한 분리정제가 요구되지 않아 경제적이므로, PDC의 경제적인 생산에 널리 활용될 수 있을 것이다.

- [78] 또한, 본 발명에 따르면, 공업적으로 제조되거나 상업적으로 입수가 가능한 조질(crude) 2-피론-4,6-디카복실산 또는 이의 소듐염에서, NMR 및/또는 TLC 분석법으로 확인되지만 제거 및 정제가 곤란한 불순물을 간단하면서도 저렴한 비용으로 제거할 수 있다.

[79]

### 도면의 간단한 설명

- [80] 도 1은 바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법을 나타낸 것이다.
- [81] 도 2는 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산으로 가수분해하는 방법을 나타낸 것이다.
- [82] 도 3(a) 내지 3(f)는 실시예 1 및 2의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.
- [83] 도 4는 실시예 1에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의 X-선 회절 패턴을 분석한 것이다.
- [84] 도 5(a) 내지 5(f)는 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의 XPS를 측정한 결과를 나타낸 것이다.
- [85] 도 6(a) 및 6(b)는 실시예 1 및 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의 XPS 정량분석을 나타낸 것이다.
- [86] 도 7(a) 및 7(b)는 실시예 1 및 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의  $\text{N}_2$  흡착/탈착 등온선을 나타낸 것이다.
- [87] 도 8은 실시예 1 및 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의  $\text{NH}_3$ -TPD 측정결과를 나타낸 것이다.
- [88] 도 9(a) 및 9(b)는 시간 및 온도에 따른 TPA의 수율을 나타낸 그래프이다.
- [89] 도 10(a) 및 10(b)는 테레프탈 산(TPA)의 NMR을 분석한 것이다.
- [90] 도 11(a) 및 11(b)는 농도 및 시간에 대한 반응속도 상수값을 나타낸 그래프이다.
- [91] 도 12는 본 발명에서 제공하는 실험군 1의 제조합 대장균 균주를 이용하여 프로토키테추산을 기질로 전세포 전환하고, 이로부터 전환된 CHMS를 확인한 결과이다.
- [92] 도 13은 본 발명에서 제공하는 실험군 2의 제조합 대장균 균주를 이용하여

프로토타캐추산을 기질로 전세포 전환하고, 이로부터 전환된 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)을 확인한 결과이다.

[93] 도 14는 본 발명에서 제공하는 실험군 3의 제조합 대장균 균주를 이용하여 테레프탈산을 기질로 전세포 전환하고, 이로부터 전환된 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)을 확인한 결과이다.

[94] 도 15는 본 발명에서 제공하는 실험군 4-1의 제조합 대장균 균주와, 실험군 4-2의 제조합 대장균 균주를 이용하여 테레프탈산을 기질로 전세포 전환하고, 이로부터 전환된 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)을 확인한 결과이다.

[95] 도 16은 본 발명의 단계 (a)에서 사용된 조질 2-피론-4,6-디카복실산 소듐염의 NMR 그래프이다.

[96] 도 17은 본 발명의 단계 (b)에서 결과된 조질 2-피론-4,6-디카복실산의 NMR 그래프 및 TLC 분석 이미지이다.

[97] 도 18은 본 발명의 단계 (c)에서 결과된 백색 침전물의 NMR 그래프 및 TLC 분석 이미지이다.

[98] 도 19, 20 및 21은 본 발명의 비교예 1, 2 및 3에서 수득된 PDC의 NMR 그래프를 각각 보여준다.

[99] 도 22는 본 발명의 단계 (f)에서 컬럼 크로마토그래피하여 얻어진 PDC의 NMR 그래프 및 TLC 분석 이미지이다.

[100]

### 발명의 실시를 위한 최선의 형태

[101] 본 발명은 고순도 2-피론-4,6-디카복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법으로; 1) PET로부터 TPA를 제조하는 단계; 2) TPA를 제조합 균주와 반응시켜 PDC를 생성하는 단계; 및 3) 제조된 PDC를 고순도로 정제하는 단계를 포함한다.

[102] 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법은, 가) 왕겨를 분쇄한 후 산처리하는 단계; 및 나) 상기 가) 단계의 산처리된 왕겨를 열처리하는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[103] 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산으로 가수분해하는 방법은, a) 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매 및 물을 마이크로파 반응기에서 반응시켜 테레프탈 산이 침전된 혼합물을 제조하는 단계; b) 상기 혼합물에 수산화나트륨을 혼합하여 테레프탈 산을 용해시키는 단계; c) 상기 테레프탈 산이 용해된 혼합물을 여과하여 잔여물과 촉매를 제거하는 단계; d) 상기 잔여물과 촉매가 제거된 혼합물에 산성용액을 투입하여 침전물을 형성시키고 수득하는 단계; 및 e) 상기 수득된 침전물을 건조시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 한다.

[104] 또한, PDC 생산용 제조합 균주와 기질을 반응시키는 단계를 포함하는, PDC의 생산방법을 제공한다.

[105] 본 발명에서 제공하는 PCD 생산방법은 (1) TphB 효소를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열, TphAabc 효소를 코딩하는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열, LigAB 효소를 코딩하는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열 및 LigC 효소를 코딩하는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열이 도입된 재조합 균주를 수득하는 단계; 및 (2) 상기 수득한 재조합 균주와 테레프탈산(TPA)을 반응시켜서, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생성하는 단계를 포함한다.

[106] 또한, 본 발명은, (a) 조질 2-피론-4,6-디카르복실산 소듐염을 산성화하여 2-피론-4,6-디카르복실산을 함유하는 수용액을 제조하는 단계; (b) 상기 단계 (a)에서 결과된 수용액을 유기용매로 추출하고 증분리하는 단계; (c) 상기 단계 (b)에서 증분리된 수층에 아세톤을 첨가하여 형성되는 백색 침전물을 분리하여 제거하는 단계; (d) 상기 단계 (c)에서 백색 침전물이 제거된 용액을 유기용매로 추출하고 증분리하는 단계; (e) 상기 단계 (b)에서 증분리된 유기층 및 단계 (d)에서 증분리된 유기층을 결합하여 농축하는 단계; 및 (f) 상기 단계 (e)에서 결과된 농축물을 에틸 아세테이트와 헥산의 혼합 용매로 컬럼 크로마토그래피하는 단계를 포함하는 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법을 제공한다:

[107]

### 발명의 실시를 위한 형태

[108] 이하 첨부된 도면을 참조하면서 본 발명에 따른 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[109] 본 발명의 이점 및 특징, 그리고 그것을 달성하는 방법은 첨부된 도면과 함께 상세하게 후술되어 있는 실시예들을 참조하면 명확해질 것이다.

[110] 그러나 본 발명은 이하에 개시되는 실시예들에 의해 한정되는 것이 아니라 서로 다른 다양한 형태로 구현될 것이며, 단지 본 실시예들은 본 발명의 개시가 완전하도록 하며, 본 발명이 속하는 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자에게 발명의 범주를 완전하게 알려주기 위해 제공되는 것이며, 본 발명은 청구항의 범주에 의해 정의될 뿐이다.

[111] 또한, 본 발명을 설명함에 있어 관련된 공지 기술 등이 본 발명의 요지를 흐리게 할 수 있다고 판단되는 경우 그에 관한 자세한 설명은 생략하기로 한다.

[112] 이하 도면을 참조하여 본 발명의 다른 바람직한 실시예를 상세히 설명하기로 한다.

[113]

[114] 본 발명은 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법으로; 1) PET로부터 TPA를 제조하는 단계; 2) TPA를 재조합 균주와 반응시켜 PDC를 생성하는 단계; 및 3) 제조된 PDC를 고순도로 정제하는 단계를 포함한다.

[115]

[116] **1. PET로부터 TPA 제조**

[117] 본 발명의 설명에 앞서 본 발명에서 설명되는 바이오 매스는 왕겨일 수 있다.

[118] 상기 바이오 매스에서 제조되는  $\text{SiO}_2$  나노입자는  $\text{SiO}_2$  촉매일 수 있다.

[119] 또한, 티올 작용기에 의하여 표면이 개질된  $\text{SiO}_2$  촉매는 Thiol- $\text{SiO}_2$  촉매로 표현한다.

[120] 본 발명의 목적은 왕겨를 이용하여  $\text{SiO}_2$  촉매를 제조하고, 이를 이용하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate)를 마이크로파 반응기에서 반응시켜 고체상 테레프탈 산을 용이하게 분해할 수 있는 방법을 제공하는 데 있다.

[121] 또한, 본 발명은 중성 조건하에서 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate)를 가수분해할 때 테레프탈 산 중의 불순물 함량을 낮추어 고순도의 테레프탈 산을 제조하는 방법을 제공하는 데 그 목적이 있다.

[122] 본 발명의 바이오 매스로부터 추출된  $\text{SiO}_2$  촉매 및 그 제조방법을 제공하며, 상기  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate)를 가수분해하는 방법을 제공한다.

[123] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 매스는 왕겨일 수 있다.

[124] 본 발명의 일 실시예에 따른  $\text{SiO}_2$  촉매는 바이오 매스로부터 추출된 것이며, 상기  $\text{SiO}_2$  촉매는 티올 작용기(-SH)에 의해 표면이 개질된 것일 수 있다.

[125] 상기  $\text{SiO}_2$  촉매의 비표면적은  $151.92 \sim 281.02 \text{ m}^2/\text{g}$ 이고, 기공의 크기는  $0.57 \sim 0.66 \text{ nm}$ 일 수 있다.

[126]

[127] 이하, 도 1을 참조하여 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법에 대하여 설명한다.

[128] 도 1은 바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법을 나타낸 것이다.

[129] 본 발명의 일 실시예에 따른 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법은, 가) 왕겨를 분쇄한 후 산처리하는 단계(S10); 및 나) 상기 (가) 단계(S10)의 산처리된 왕겨를 열처리하는 단계(S20);를 포함하여 제공된다.

[130] 상기 가) 단계(S10)는 왕겨를 분쇄하고 산처리하는 단계이다.

[131] 상기 왕겨를 일정크기로 분쇄하는 이유는 분쇄 후 이루어지는 산처리 공정의 효율성을 높이고, 최종적으로 제조되는  $\text{SiO}_2$ 의 순도를 높이기 위함이다.

[132] 상기 왕겨를 분쇄하는 방법은 제한하지 않으며, 구체적으로 밀링하여 수행될 수 있다.

[133] 상기 밀링은 니형 밀링머신, 베드형 밀링머신, 만능 밀링머신 및 직립형 밀링머신 등 통상적으로 사용하는 밀링머신을 이용하여 수행할 수 있다.

[134] 상기 밀링된 왕겨의 입자 크기는  $50 \sim 500 \mu\text{m}$ 일 수 있다.

[135] 상기 가) 단계(S10)의 산처리는 왕겨 내에 포함된 불순물을 제거하기 위함이며,  $7 \sim 15 \%$ 의 산성용액일 수 있으며, 구체적으로는  $10 \%$  산성용액일 수 있다.

[136] 상기 산성용액은 황산, 염산, 질산, 인산, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서

- 선택된 1 종의 것일 수 있으며, 구체적으로 염산일 수 있다.
- [137] 상기 가) 단계(S10)의 산처리는, 황산, 염산, 질산, 인산, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1 종을 포함하는 산성용액을 사용하여, 40 ~ 150 °C에서 10 분 ~ 3 시간 동안 수행될 수 있으며, 구체적으로 염산을 이용하여 50 ~ 100 °C에서 20 ~ 2 시간 동안 수행될 수 있으며, 더욱 구체적으로는 염산을 이용하여 60 °C에서 30 분 동안 수행될 수 있다.
- [138] 상기 분쇄된 왕겨의 산처리는 1 회 이상 수행될 수 있으며, 구체적으로 1 ~ 10 회 수행하며, 산성용액의 종류 및 농도에 따라 달리하여 수행될 수 있다.
- [139] 상기 가) 단계(S10)의 산처리는 분쇄된 왕겨와 상기 산성용액을 1:5 ~ 15의 고액비(g:ml)로 수행될 수 있으며, 구체적으로는 1:10의 고액비로 수행될 수 있다.
- [140] 상기 가) 단계(S10)의 산처리 후, 상기 산처리된 왕겨를 여과 및 세척하는 단계를 더 포함할 수 있다.
- [141] 상기 여과는 SiO<sub>2</sub> 나노입자를 수득할 수 있는 방법이라면 이를 제한하지 않는다.
- [142] 상기 세척은 증류수, 톨루엔, 아세톤 등으로 1 회 ~ 4 회 수행될 수 있다.
- [143]
- [144] 상기 나) 단계(S20)는, 상기 (가) 단계(S10)의 산처리된 왕겨를 열처리하는 단계이다.
- [145] 상기 나) 단계(S20)의 열처리는 산처리된 왕겨를 600 ~ 700 °C의 온도에서 분당 3.5 °C씩 하강시키면서 2 ~ 3 시간 동안 수행될 수 있다.
- [146] 열처리가 상기와 같은 조건에서 수행될 때 높은 비표면적(151.92 ~ 281.02 m<sup>2</sup>/g) 및 큰 기공(0.57 ~ 0.66 nm)의 SiO<sub>2</sub> 촉매를 수득할 수 있다.
- [147]
- [148] 상기 나) 단계(S10) 후 SiO<sub>2</sub> 촉매의 표면을 개질시키는 단계를 더 포함하며, 상기 SiO<sub>2</sub> 촉매의 표면을 개질시키는 단계는, 상기 SiO<sub>2</sub> 촉매와 머캅토프로필 트리메톡시실란(Mercaptopropyl trimethoxysilane)을 톨루엔(Toluene) 용매에 투입하여 혼합물을 제조하는 단계; 상기 혼합물을 세척하는 단계; 및 상기 세척된 혼합물을 건조시키는 단계;를 포함할 수 있다.
- [149] 상기 혼합물을 세척하는 단계는, 증류수, 톨루엔, 아세톤 등으로 1 회 ~ 4 회 수행될 수 있다.
- [150] 상기 세척된 혼합물을 건조시키는 단계는, 50 ~ 70 °C에서 12 ~ 26 시간 동안 진공건조될 수 있다.
- [151]
- [152] 도 2는 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산으로 가수분해하는 방법을 나타낸 것이다.
- [153] 본 발명의 다른 실시예에 따른 바이오 매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매를 이용한 PET의 TPA 분해방법은, 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate),

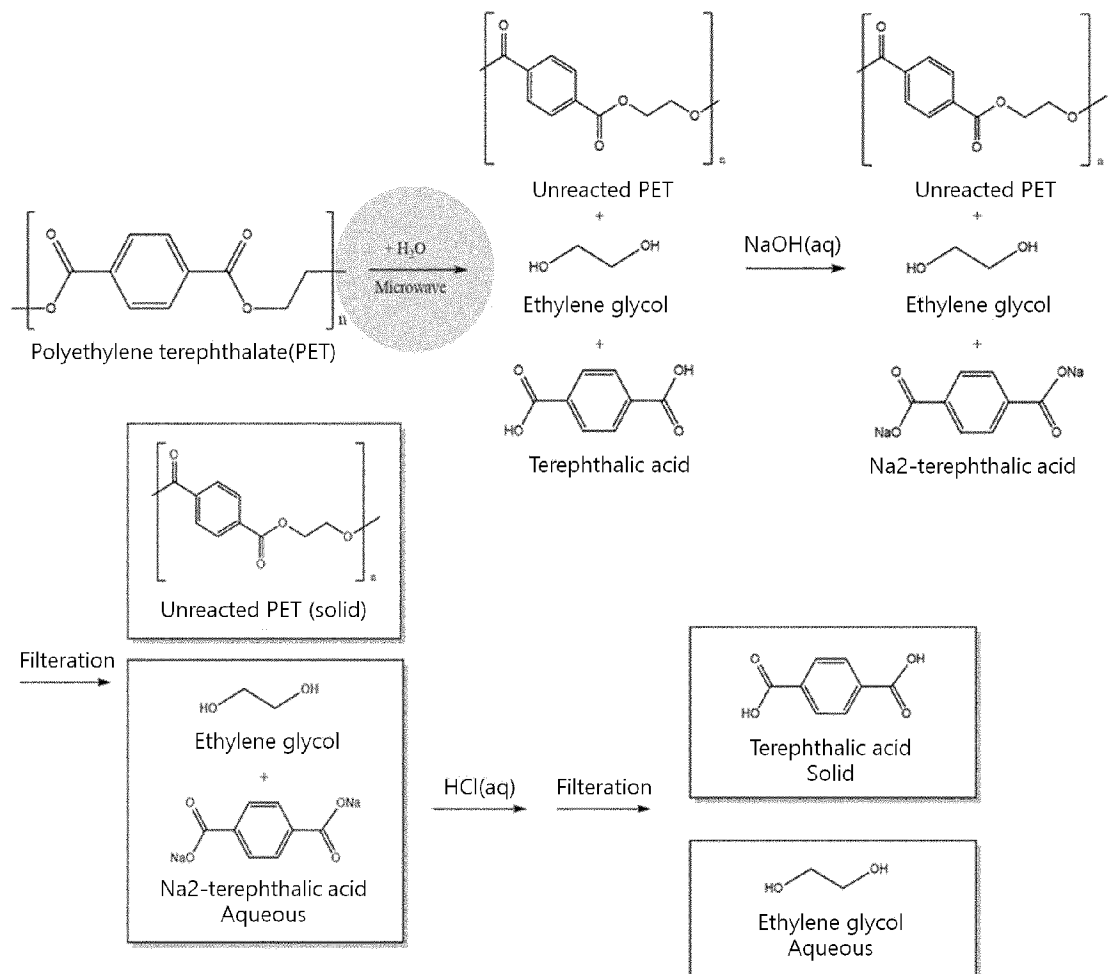
바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매, 및 물을 혼합하고 마이크로파를 조사하여 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산(Terephthalic acid)으로 가수분해하는 것을 특징으로 한다.

[154] 구체적으로 바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산으로 가수분해하는 방법은, a) 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매, 및 물을 마이크로파 반응기에서 반응시켜 테레프탈 산이 침전된 혼합물을 제조하는 단계(S100); b) 상기 혼합물에 수산화나트륨을 혼합하여 테레프탈 산을 용해시키는 단계(S200); c) 상기 테레프탈 산이 용해된 혼합물을 여과하여 잔여물과 촉매를 제거하는 단계(S300); d) 상기 잔여물과 촉매가 제거된 혼합물에 산성용액을 투입하여 침전물을 형성시키고 수득하는 단계(S400); 및 e) 상기 수득된 침전물을 건조시키는 단계(S500);를 포함하여 제공된다.

[155] 하기의 반응식 1은 폴리에틸렌 테레프탈레이트가 테레프탈 산으로 가수분해되는 과정을 나타낸 것이다.

[156] [화학식 1]

[157]



[158] 상기 a) 단계(S100)는 바이오매스에서 유래된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산으로 가수분해시키는 단계이다.



- [159] 상기 가수분해는 마이크로파 반응기에서 수행될 수 있다.
- [160] 상기 마이크로파 반응기(Anton Paar, Monowave 400, 영국)는 온도 및 압력 센서가 장착된 것일 수 있다.
- [161] 상기 마이크로파 반응기에 대한 설명은 본 발명의 범위를 벗어나므로 이에 대한 설명은 생략한다.
- [162] 상기  $\text{SiO}_2$  촉매는 바이오매스에서 유래된  $\text{SiO}_2$  촉매일 수 있으며, 상기 바이오매스는 왕겨일 수 있다.
- [163] 또한, 상기 바이오매스에서 유래된  $\text{SiO}_2$  촉매는 티올 작용기에 의해 표면이 개질된 것일 수 있다.
- [164] 상기  $\text{SiO}_2$  촉매는 앞서 설명하였기에 대한 설명은 생략한다.
- [165] 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 가수분해하기 위해서는 물이 필요한 것은 자명한 것으로 이에 대한 설명은 생략한다.
- [166] 상기 반응식 1을 참조하면, 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트가 가수분해되면 테레프탈 산이 침전된 혼합물이 제조된다.
- [167] 상기 혼합물은 테레프탈 산, 에틸렌 글리콜, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 및 촉매일 수 있다.
- [168] 상기 b) 단계(S200)는 상기 혼합물에 수산화나트륨을 혼합하여 테레프탈 산을 용해시키는 단계이다.
- [169] 상기 b) 단계(S200)에서 테레프탈 산을 용해함으로써, 다음 단계에서 불순물을 제거할 수 있다.
- [170] 여기서 불순물이란 반응하지 않은 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 촉매이다.
- [171]
- [172] 상기 c) 단계(S300)는 상기 테레프탈 산이 용해된 혼합물을 여과하여 잔여물과 촉매를 제거하는 단계이다.
- [173] 상기 잔여물은, 미분해된 폴리에틸렌 테레프탈레이트이다.
- [174] 상기 c) 단계(S300)는 미분해된 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 촉매를 제거할 수 있는 방법이라면 이를 제한하지 않는다.
- [175]
- [176] 상기 d) 단계(S400)는, 상기 잔여물과 촉매가 제거된 혼합물에 산성용액을 투입하여 침전물을 형성시키고 수득하는 단계이다.
- [177] 상기 산성용액은 황산, 염산, 질산, 인산, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1 종일 수 있으며, 바람직하게는 염산일 수 있다.
- [178]
- [179] 상기 e) 단계(S500)는 수득된 침전물을 건조시키는 단계이다.
- [180] 상기 수득된 침전물을 건조시키는 방법은 제한하지 않는다.
- [181]
- [182] 이하, 실시예 및 실험예에 의하여 본 발명을 더욱 상세하게 설명하고자 한다. 단, 하기 실시예 및 실험예는 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐 본 발명의 범위가

이들만으로 한정되는 것은 아니다.

[183]

[184] 실시예 1: 바이오매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매의 제조

[185] 먼저, 분쇄기를 이용하여 왕겨의 입자크기가 150  $\mu\text{m}$ 가 되도록 분쇄하여 준비하였다.

[186] 10 g의 분쇄된 왕겨를 100 ml의 염산(10 % HCl) 수용액에 15 시간 동안 침지시켰다.

[187] 다음으로, 필터를 이용하여 염산 수용액을 제거한 후 증류수로 왕겨를 2 회 세척하였다.

[188] 마지막으로, 세척된 왕겨를 65 °C의 온도에서 분당 3.5 °C씩 하강시키면서 3 시간 동안 열처리(Annealing)하여 바이오매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매를 제조하였다.

[189]

[190] 실시예 2: 표면 개질된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 제조

[191] 먼저, 실시예 1에 따라 제조된 바이오매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매 0.5 g과 머캅토프로필 트리메톡시실란(Mercaptopropyl trimethoxysilane) 0.5 ml를 톨루엔(Toluene) 200 ml에 혼합한 후 24 시간 동안 환류시키고 톨루엔과 아세톤으로 세척하였다.

[192] 마지막으로, 60 °C 진공 오븐에서 24 시간 동안 건조시켜 표면 개질된 SiO<sub>2</sub> (Thiol-SiO<sub>2</sub>) 촉매를 제조하였다.

[193]

[194] 실험예 1: 무촉매 PET의 가수분해

[195] 먼저, 폴리에틸렌 테레탈레이트 0.1 g 및 탈이온수 12 ml를 마이크로파 반응기(Anton Paar, Monowave 400, 영국)에 테레프탈 산이 침전된 혼합물을 제조하였다.

[196] 반응 후 상기 테레프탈 산이 침전된 혼합물에 1 M의 수산화나트륨을 첨가하여 침전된 테레프탈 산(TPA)을 디-2-메틸 테레프탈 산(NaTPA)의 형태로 용해시킨 후 여과하여 반응하지 않은 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 제거하였다.

[197] 다음으로, 과량의 염산을 투입하여 TPA를 침전시키고 여과하여 TPA를 분리하였다.

[198] 마지막으로, 60 °C의 오븐에서 건조 TPA를 수득하였다.

[199]

[200] 실험예 2: 바이오 매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매를 이용한 PET의 가수분해

[201] 먼저, 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매 0.1 g, 폴리에틸렌 테레탈레이트 0.1 g 및 탈이온수 12 ml를 마이크로파 반응기(Anton Paar, Monowave 400, 영국)에 테레프탈 산이 침전된 혼합물을 제조하였다.

[202] 반응 후 상기 테레프탈 산이 침전된 혼합물에 1 M의 수산화나트륨을 첨가하여 침전된 테레프탈 산(TPA)을 디-2-메틸 테레프탈 산(NaTPA)의 형태로 용해시킨 후 여과하여 반응하지 않은 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 SiO<sub>2</sub> 촉매를

제거하였다.

[203] 다음으로, 과량의 염산을 투입하여 TPA를 침전시키고 여과하여 TPA를 분리하였다.

[204] 마지막으로, 60 °C의 오븐에서 건조 TPA를 수득하였다.

[205]

[206] **실험예 3: 표면 개질된 SiO<sub>2</sub> 촉매를 이용한 PET의 가수분해**

[207] 먼저, 실시예 2에 따라 제조된 표면 개질된 SiO<sub>2</sub> 촉매 0.1 g, 폴리에틸렌 테레프탈레이트 0.1 g 및 탈이온수 12 ml를 마이크로파 반응기(Anton Paar, Monowave 400, 영국)에 테레프탈 산이 침전된 혼합물을 제조하였다.

[208] 반응 후 상기 테레프탈 산이 침전된 혼합물에 1 M의 수산화나트륨을 첨가하여 침전된 테레프탈 산(TPA)을 디-2-메틸 테레프탈 산(NaTPA)의 형태로 용해시킨 후 여과하여 반응하지 않은 폴리에틸렌 테레프탈레이트와 표면 개질된 SiO<sub>2</sub> 촉매를 제거하였다.

[209] 다음으로, 과량의 염산을 투입하여 TPA를 침전시키고 여과하여 TPA를 분리하였다.

[210] 마지막으로, 60 °C의 오븐에서 건조 TPA를 수득하였다.

[211]

[212] **시험예 1: SiO<sub>2</sub> 촉매의 특성 분석**

[213] 도 3(a) 내지 3(f)는 실시예 1 및 2의 SEM 이미지를 나타낸 것이다.

[214] 도 3(a) 내지 3(c)를 참조하면, 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 약 50 nm의 사이즈를 갖는 작은 SiO<sub>2</sub> 입자로 구성되고, 미세한 상호 연결 구조를 갖는 막대 모양의 형태인 것을 확인할 수 있다.

[215] 또한, 도 3(d) 내지 3(f)를 참조하면, 실시예 2에 따라 제조되어 표면 개질된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 표면을 개질한 후에도 미세한 형태를 계속 유지하는 것을 확인할 수 있다.

[216] 결과적으로, 이러한 나노구조는 SiO<sub>2</sub> 촉매의 고유한 형태인 것을 확인할 수 있다.

[217]

[218] **시험예 2: SiO<sub>2</sub> 촉매의 X-선 회절 분석**

[219] 도 4는 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 X-선 회절 패턴을 분석한 것이다.

[220] 도 4를 참조하면 2θ 값이 20 °인 부분에서 넓은 돌기 형태로 나타났으며, 이것은 비정질 상태 실리카의 X-선 회절 패턴과 일치한다.

[221]

[222] **시험예 3: SiO<sub>2</sub> 촉매의 X-선 광전자 분광법(XPS)에 의한 분석**

[223] 도 5(a) 내지 5(f)는 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 XPS를 측정된 결과를 나타낸 것이다.

[224] 도 5(a) 내지 5(c)를 참조하면, O 1s 스펙트럼에서 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 532.8 eV에서 단일피크를 나타내었으며, 이것은 Si-O-Si결합 환경에서

산소(O)에 해당한다. 또한, Si 2p 스펙트럼에서 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 103.5 eV에서 단일피크를 나타내었으며, 이것은 Si-O결합 환경에서 실리콘(Si)에 해당한다. 또한, S 2p 스펙트럼에서 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 황에 해당하는 피크는 발견되지 않았다.

- [225] 도 5(d) 내지 5(f)를 참조하면, O 1s 스펙트럼에서 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 532.9 eV에서 단일피크를 나타냈다. 이것은 촉매의 표면을 티올 관능기로 개질한 후에도 Si-O-Si의 결합이 변하지 않은 것을 확인할 수 있는 결과이다.
- [226] 그러나, Si 2p 스펙트럼에서 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 Si-O 결합(103.8 eV)을 나타내는 하나의 피크와 Si-S 결합(102.4 eV)을 나타내는 또 하나의 피크로 데콘볼루션(deconvolution)되는 것을 확인할 수 있으며, 이것은 촉매의 표면이 티올 관능기로 개질되었다는 것을 의미한다.
- [227] 더불어, S 2p 스펙트럼에서 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 S 2p<sub>1/2</sub> 및 2p<sub>3/2</sub>에 해당하는 피크가 각각 164.6 eV 및 163.5 eV에서 확인되었으며, 이는 촉매의 표면이 티올 관능기로 인해 개질되어 나타나는 것으로 확인할 수 있다.
- [228] 도 6(a) 및 6(b)는 실시예 1 및 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 XPS 정량분석을 나타낸 것이다.
- [229] 도 6(a) 및 6(b)를 참조하면, 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 실리콘 원자비는 31.24 %이고, 산소 원자비는 64.01 %로 종래의 SiO<sub>2</sub> 구성과 일치하는 것으로 확인되었으며, 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 실리콘 원자비는 26.26 %이고, 산소 원자비는 50.65 %이며, 황 원자비는 2.78 %인 것을 확인할 수 있다.
- [230] 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 원자비가 실시예 1과 상이한 것은 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 표면이 티올 관능기로 개질되었기 때문이다.
- [231] 상기 XPS 분석결과 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매는 표면 개질 과정이 잘 수행되었으며, 실시예 1에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 표면을 개질하더라도 초기 구조에 영향을 주지 않는 것을 확인할 수 있다.

[232]

[233] **시험예 4 : SiO<sub>2</sub> 촉매의 N<sub>2</sub> 흡착/탈착 분석 및 NH<sub>3</sub>-TPD 분석**

- [234] 도 7(a) 및 7(b)는 실시예 1 및 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 N<sub>2</sub> 흡착/탈착 등온선을 나타낸 것이고, 도 8은 실시예 1 및 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매의 NH<sub>3</sub>-TPD 측정결과를 나타낸 것이다.
- [235] 도 7(a) 및 7(b)를 참조하면, 실시예 1 및 2에 따라 제조된 두 SiO<sub>2</sub> 촉매 모두는 다층 흡착(multilayer adsorption)에 이은 모세관 응축(capillary condensation)을 통한 메조포러스 고체(mesoporous solids)로 인하여 0.4 ~ 1.0 상대압력(P/PO) 범위에서 히스테리시스 루프(Hysteresis loops)를 형성하는 iv 타입의 등온선을 나타내었다.
- [236] Brunauer-Emmett-Teller(BET) 이론(SBET)에 의해 SiO<sub>2</sub> 촉매의 비표면적을 계산하였다.

- [237] 실시예 1 및 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의 비표면적은  $281.02 \text{ m}^2/\text{g}$  및  $151.92 \text{ m}^2/\text{g}$ 으로 계산되었다.
- [238] 또한, Hgoorvath-Kawazoe (HK) 방법에 의해  $\text{SiO}_2$  촉매의 기공 크기를 계산하였다.
- [239] 실시예 1 및 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의 기공 크기는 각각  $0.57 \text{ nm}$ 와  $0.66 \text{ nm}$ 으로 계산되었다.
- [240] 두 결과를 통해  $\text{SiO}_2$  촉매는 티올 개질 과정 동안 표면적 및 기공 크기가 거의 변하지 않는 것을 확인할 수 있다.
- [241] 도 8을 참조하면, 실시예 1에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매는  $161.6^\circ\text{C}$ 의 저온 영역(LT)에서  $\text{NH}_3$  흡착 피크가 확인되었으며, 계산된 산성부위 농도는  $0.00838 \text{ mmol/g}$  이다.
- [242] 또한, 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매 역시  $161.6^\circ\text{C}$ 의 저온 영역(LT)에서  $\text{NH}_3$  흡착 피크가 확인되었으며, 계산된 산성부위 농도는  $0.00838 \text{ mmol/g}$  이다.
- [243] 그러나, 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매는 표면의 티올 관능기가 산성부위로 작용하여  $369.4^\circ\text{C}$ 의 고온 영역(HT)에서 또 다른  $\text{NH}_3$  흡착 피크가 확인되었으며, 계산된 산성부위 농도는  $0.39319 \text{ mmol/g}$  이다.

[244]

[245] **시험예 5 : 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)의 가수분해에 따른 테레프탈 산(TPA)의 수율계산**

- [246] 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 실시예 1 및 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용하여 가수분해된 테레프탈 산의 수율을 계산하였다.
- [247] 도 9(a) 및 9(b)는 시간 및 온도에 따른 TPA의 수율을 나타낸 그래프이다.
- [248] TPA의 수율은 하기의 수학식 1에 의해 계산되었다.
- [249] [수학식 1]

[250]

$$\begin{aligned} \text{TPA Yield}(\%) &= \frac{\text{Experimentally produced TPA amount(g)}}{\text{Theoretically produced TPA amount(g)}} \times 100 (\%) \\ &= \frac{\text{Produced TPA amount(g)}}{\frac{\text{Degraded PET amount(g)}}{192.2(\text{g/mol})} \times 163.13 \text{ g/mol}} \times 100(\%) \end{aligned}$$

- [251] 도 9(a)는  $230^\circ\text{C}$ 의 온도에서 반응시간에 따른 테레프탈 산의 가수분해 수율을 비교한 것이다.
- [252] 도 9(a)를 참조하면, 촉매를 사용하지 않은 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해는 초기 5 분 동안 반응하지 않았으며, 50 분 동안 반응하여 수율이  $91.74 \%$ 에 도달하였다.
- [253] 그러나 실시예 1에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해는 초기 5 분의 반응시간 동안 가수분해가 진행되었으며, 40 분 동안 반응하여 수율이  $92.4 \%$ 에 도달하였다. 더불어 실시예

2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해 반응은 30 분 동안 반응하여 수율이 93.43 %에 도달하였다.

[254] 결과적으로, 촉매를 사용하지 않은 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해 반응 보다 실시예 1에 따른  $\text{SiO}_2$  촉매를 사용하였을 때 가수분해 시간을 10 분 단축시켰으며, 실시예 2에 따른  $\text{SiO}_2$  촉매를 사용하였을 때는 10 분을 더 단축시키는 것을 확인할 수 있었다.

[255] 이것은 실시예 1에 따른  $\text{SiO}_2$  촉매 보다 실시예 2에 따른  $\text{SiO}_2$  촉매의 산도가 높기 때문이며, 반응이 시작될 때 가수분해 속도가 서서히 증가되는 것은 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 불규칙 사슬 분리에 의한 것이다.

[256] 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 불규칙 사슬 분리를 거친 후 가수 분해 속도는 급격히 증가하였으며, 테레프탈 산 가수분해 수율은 97.06 %에 도달하였다.

[257] 도 9(b)를 참조하면, 170 °C 이하에서 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해는 시작되지 않았으며, 온도를 상승시켰을 때 온도가 증가함에 따라 테레프탈 산의 수율이 증가하는 것을 확인할 수 있다. 더불어, 230 °C의 반응온도에서 수율이 93.43 %에 도달하였다.

[258] 결과적으로 촉매를 사용하지 않은 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해는 170 °C이하의 온도에서는 진행되지 않았으나, 실시예 1 및 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용할 경우 170 °C이하의 조건에서도 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해가 진행될 수 있다는 것을 확인할 수 있다.

[259]

[260] **시험예 6 : 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 가수분해에 따른 테레프탈 산(TPA)의 NMR 분석**

[261] 도 10(a) 및 10(b)는 테레프탈 산(TPA)의 NMR을 분석한 것이다.

[262] 도 10(a)를 참조하면, 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용하여 제조된 테레프탈 산은 하이드록시 양성자와 방향족 단일 양성자에 대한 두 개의 피크를 나타냈으며, 화학적 시프트 값은 각각 13.31 ppm과 8.03 ppm으로 나타났다.

[263] 도 10(b)를 참조하면, 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용하여 제조된 테레프탈 산은  $^{13}\text{C}$  NMR 스펙트럼에서 3개의 피크가 나타났으며, 각각 방향족 탄소 4 급 방향족 탄소 및 카보닐 탄소이며, 화학적 시프트 값은 각각 129.7 ppm, 134.8 ppm 및 166.4 ppm으로 나타났다.

[264] 상기한 결과는 종래의 테레프탈 산 데이터와 일치하는 것으로 확인된다.

[265]

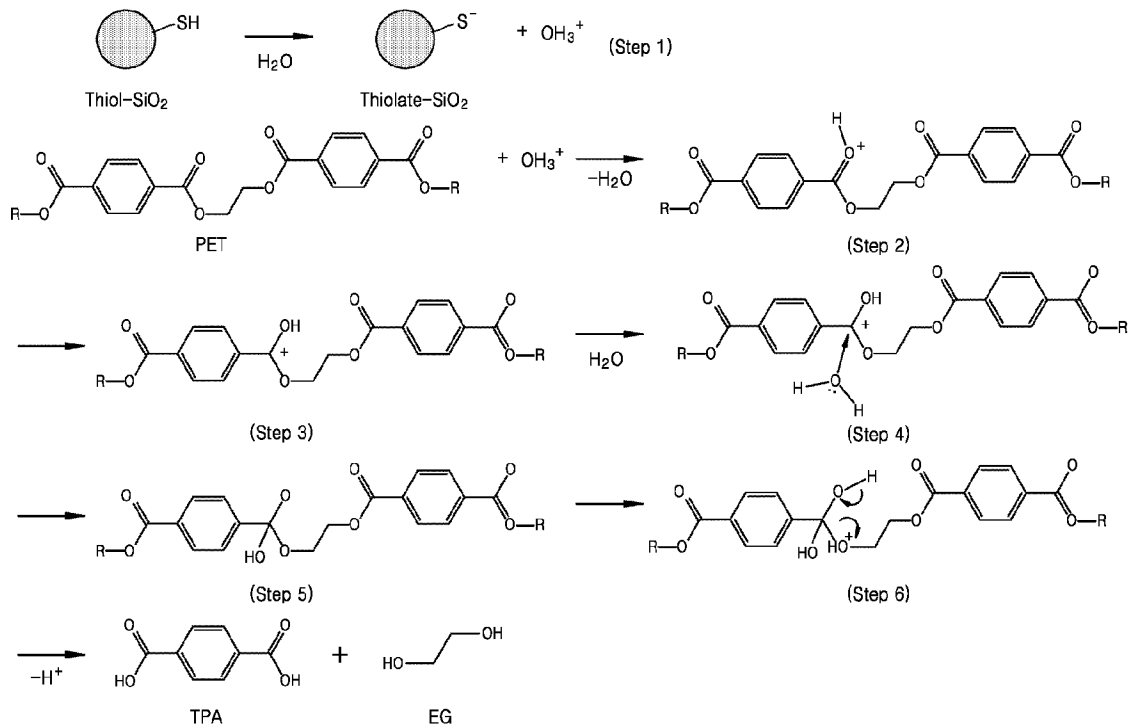
[266] **시험예 7 : 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET) 가수분해의 동력학 분석**

[267] 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 테레프탈 산 가수분해는 하기의 수학식 2를 따른다.

[268] [수학식 2]

[269] 
$$v = k[A]^2$$

- [270] 여기서,  $v$ 는 반응속도,  $k$ 는 반응속도 상수,  $[A]$ 는 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 농도를 나타낸다.
- [271] 통합속도 법칙에 따라 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해 반응의 반응속도 상수( $k$ ) 값은 하기의 수학식 3에 따라 결정된다.
- [272] [수학식 3]
- [273]  $1/[A]_t - 1/[A]_0 = kt$
- [274] 여기서,  $[A]_t$ 는 특정반응 시간의 폴리에틸렌 테레프탈레이트 농도를 나타내는 것이고,  $[A]_0$ 는 초기의 폴리에틸렌 테레프탈레이트 농도를 나타낸 것이며,  $t$ 는 특정 반응 시간을 나타내는 것이다.
- [275] 도 11(a) 및 11(b)는 농도 및 시간에 대한 반응속도 상수값을 나타낸 그래프이다.
- [276] 도 11(a)를 참조하면, 촉매가 없을 때(무 촉매), 실시예 1 및 2에 따른 촉매를 사용하였을 때 반응속도 상수( $k$ )값은 각각 0.56055, 0.76866 및 1.33406으로 나타났다.
- [277] 실시예 1에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 가수분해는 무 촉매 가수분해 보다 1.37 배 향상된 가수분해 특성을 나타냈으며, 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 가수분해는 2.37 배 향상된 가수분해 특성을 나타내었다.
- [278] 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 가수분해 특성이 향상된 이유는 활성화 에너지가 낮아졌기 때문이며, 이는 반응 온도 제어 실험에 기초한 하기의 수학식 4(Arrhenius 방정식)에 따라 계산되었다.
- [279] [수학식 4]
- [280]  $k = Ae^{-E_a/RT}$
- [281] 여기서,  $k$ 는 속도 상수이며,  $A$ 는 사전 지수 인자,  $E_a$ 는 활성화 에너지,  $R$ 은 기체상수, 및  $T$ 는 절대온도를 나타낸다.
- [282] 상기 수학식 4는 하기의 수학식 5로 변화될 수 있다.
- [283] [수학식 5]
- [284]  $\ln(k) = \ln(A) - E_a/R(1/T)$
- [285] 도 11(b)를 참조하면, 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매에 의한 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해의 활성화 에너지는 23.19 kJ/mol로 계산되었으며, 이 값은 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해 활성화 에너지(56.8 kJ/mol) 값 보다 절반 이상 감소된 것이다.
- [286]
- [287] **시험예 8 : 실시예 2에 따라 제조된  $\text{SiO}_2$  촉매의 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해 메커니즘 분석**
- [288] 하기의 반응식 2는 폴리에틸렌 테레프탈레이트가 테레프탈 산으로 가수분해되는 과정을 나타낸 것이다.
- [289] [화학식 2]
- [290]



- [291] 먼저, 실시예 2에 따른 SiO<sub>2</sub> 촉매 표면의 티올 관능기는 수성 조건에서 쉽게 탈프로톤화되어 티올레이트와 하이드로늄(OH<sub>3</sub><sup>+</sup>) 이온으로 형성된다.
- [292] 다음으로, 생성된 하이드로늄 이온은 폴리에틸렌 테레프탈레이트의 친핵성 중심에 양성자를 제공한다.
- [293] 폴리에틸렌 테레프탈레이트에서 에스테르 그룹의 산소 원자는 양전하를 띄지만, 양전하는 중심 탄소 원자에서 더 비편재화된다.
- [294] 다음으로, 물 분자는 양전하를 띤 중심 탄소 원자를 공격하게 되며, 에틸기의 산소 원자는 다른 양전하 산소 원자에서 수소 원자를 제공받아, 양전하를 띄고, 탄소와 산소의 결합을 파괴하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트 가수분해 반응에서 테레프탈 산과 에틸렌 글리콜을 생성한다.
- [295] 실시예 2에 따라 제조된 SiO<sub>2</sub> 촉매가 없다면, 높은 활성화에너지로 인하여 폴리에틸렌 테레프탈레이트에서 에스테르 결합의 불완전한 분해를 유도하여 테레프탈 산의 순도가 떨어질 수 있으며, 본 발명은 이러한 문제점을 해소하여 고순도의 테레프탈 산을 제조할 수 있다.
- [296] 따라서, 본 발명에 의한 바이오 매스 유래 SiO<sub>2</sub> 촉매, 그 제조방법, 및 이를 이용한 PET의 TPA 분해방법을 이용하면, 종래의 PET 중성 가수분해 조건 보다 빠른 시간에 고순도 TPA의 제조가 가능하며, 제조된 테레프탈 산은 다시 폴리에스테르 섬유의 원료 등으로 유용하게 사용할 수 있다.

[297]

[298] **2. TPA를 재조합 균주와 반응시켜 PDC를 생성**[299] **실시예 3: 재조합 대장균 균주 발현벡터 및 균주 구축**[300] 본 발명에서는 재조합 균주로부터 PDC를 생산하기 위해 대장균(*Escherichia*



*coli* XL1-Blue) 균주를 이용하여  
 1,2-디하이드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카르복실레이트  
 디하이드로게네이스 (1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylate  
 dehydrogenase; TphB) 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 1),  
 테레프탈레이트 1,2-디옥시게네이스 (terephthalate 1,2-dioxygenase; TphAabc)  
 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 2), 프로토크테추에이트  
 4,5-디옥시게네이스 (Protocatechuate 4,5-dioxygenase; LigAB) 효소를 코딩하는  
 뉴클레오티드 서열(서열번호 3),  
 4-카복시-2-하이드록시뮤코네이트-6-세미알데하이드 디하이드로게네이스  
 (4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase; LigC) 효소를  
 코딩하는 뉴클레오티드 서열(서열번호 4)이 도입된 제조합 대장균 균주 발현  
 벡터를 구축하였다.

[301] 이 때 TphB 효소와 TphAabc 효소를 코딩하는 각 뉴클레오티드 서열은  
*Comamonas sp.* E6 균주로부터 유래된 것을 사용하고, LigAB와 LigC 효소를  
 코딩하는 각 뉴클레오티드 서열은 *Sphingomonas paucimobilis* 균주로부터 유래된  
 것을 사용하였다.

[302] [표1]

| 프라이머 서열 |                                      | 목적 유전자         |
|---------|--------------------------------------|----------------|
| 1       | 5'-ggatcc atgacaatagtcaccgtagattg-3' | <i>tphB</i>    |
| 2       | 5'-actagttt agaccgggttgggctccg-3'    |                |
| 3       | 유전자 합성 의뢰                            | <i>tphAabc</i> |
| 4       |                                      |                |
| 5       | 유전자 합성 의뢰                            | <i>ligAB</i>   |
| 6       |                                      |                |
| 7       | 유전자 합성 의뢰                            | <i>ligC</i>    |
| 8       |                                      |                |

[303]

[304] 발현 벡터를 구축하기 위한 구체적인 방법으로서, pKE112 플라스미드를 *KpnI*  
 및 *SbfI*의 제한효소로 절단하고, *KpnI* 및 *SbfI*의 제한효소로 절단된 *ligAB*  
 유전자를 삽입하여 실험군 1의 pKE112ligAB 플라스미드를 구축 하였다. 상기  
 구축 된 pKE112ligAB 플라스미드를 *HindIII*의 제한효소로 절단하고, *SbfI* 및 *Hind*  
*III*의 제한효소로 절단한 *ligC* 유전자를 삽입하여 실험군 2의 pKE112ligABC를  
 구축하였다. 실험군 3의 경우, pKE112 플라스미드를 *EcoRI* 및 *KpnI*의 제한효소로  
 절단하고, *EcoRI* 및 *KpnI*의 제한효소로 절단한 *tphB* 유전자를 삽입하였다.

[305] 이후 실험군 1 및 2와 동일한 방법으로 *ligABC* 유전자를 삽입하여

pKE112tphBligABC 플라스미드를 구축하였다. 실험군 3의 경우, pKM212 플라스미드를 *KpnI* 및 *HindIII*의 제한효소로 절단하고 *KpnI* 및 *HindIII*의 제한효소로 절단한 *tphAabc* 유전자를 삽입하여 pKM212tphAabc를 구축하였다. 실험군 4-1의 경우, 실험군 3과 같이 pKE112 플라스미드에 *tphB* 유전자를 삽입한 후, pKE112tphB를 구축하였다. pKM212tphAabc의 경우 실험군 3의 두 번째 플라스미드와 같은 방법으로 구축하였다. 실험군 4-2의 경우 실험군 2와 같은 플라스미드이다.

[306] 이후 상기 발현벡터를 대장균 균주에 형질전환하여 하기 표 2의 실험군 1 내지 4의 균주를 확보하였다. 실험군 3의 경우, 두 플라스미드를 한 대장균 균주에 형질전환하여 균주를 확보하였다. 실험군 4의 경우, 실험군 4-1의 2개 플라스미드를 한 대장균에 형질전환하여 균주를 확보하고, 4-2의 플라스미드를 한 대장균에 형질전환하여 균주를 확보 한 후 이를 15:25 비율로 전세포 전환을 실행하였다.

[307]

[308] [표2]

| 조건    |   | 플라스미드            |                                                                                                                                                           |
|-------|---|------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 실험군 1 |   | pKE112ligAB      | pKE112; P <sub>tac</sub> promoter, <i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain ligAB gene, Amp <sup>R</sup>                                                   |
| 실험군 2 |   | pKE112ligABC     | pKE112; P <sub>tac</sub> promoter, <i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain ligABC gene, Amp <sup>R</sup>                                                  |
| 실험군 3 |   | pKE112tphBligABC | pKE112; P <sub>tac</sub> promoter, <i>Comamonas</i> sp. strain E6 <i>tphB</i> gene, <i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain ligABC gene, Amp <sup>R</sup> |
|       |   | pKM212tphAabc    | pKM212; P <sub>tac</sub> promoter, <i>Comamonas</i> sp. strain E6 <i>tphAabc</i> genes, Km <sup>R</sup>                                                   |
| 실험군 4 | 1 | pKE112tphB       | pKE112; P <sub>tac</sub> promoter, <i>Comamonas</i> sp. strain E6 <i>tphB</i> genes, Amp <sup>R</sup>                                                     |
|       |   | pKM212tphAabc    | pKM212; P <sub>tac</sub> promoter, <i>Comamonas</i> sp. strain E6 <i>tphAabc</i> genes, Km <sup>R</sup>                                                   |
|       | 2 | pKE112ligABC     | pKE112; P <sub>tac</sub> promoter, <i>Sphingomonas paucimobilis</i> strain ligABC gene, Amp <sup>R</sup>                                                  |

[309]

[310] 실시예 4: 재조합 대장균 균주를 사용한 프로토카테츄산으로부터 CHMS 제조

[311] 상기 실험군 1의 재조합 대장균 균주를 2 ml의 LB 배지(5 g/L 효모추출물(yeast extract), 10 g/L 염화나트륨(NaCl), 10 g/L 카제인의 채장 효소 분해물(bacto-tryptone))가 포함된 14 ml의 둥근 튜브(round bottom tube)에 접종하고, 37 °C 및 200 rpm 의 조건에서 8시간 배양하였다.

[312] 다음으로, 10 ml LB 배지(5 g/L 효모추출물(yeast extract), 10 g/L 염화나트륨(NaCl), 10 g/L 카제인의 채장 효소 분해물(bacto-tryptone))가 포함된 원뿔형 관(conical tube)에 상기 8 시간 배양한 배양액을 넣고 37 °C 및 200 rpm의 조건에서 오버나이트(overnight)로 배양 하였다.

[313] 오버나이트(overnight)로 배양한 배양액은 다시 500 ml LB 배지(5 g/L 효모추출물(yeast extract), 10 g/L 염화나트륨(NaCl), 10 g/L 카제인의 채장 효소 분해물(bacto-tryptone))가 포함된 2 리터 진탕 삼각 플라스크(baffled Erlenmeyer flask) 로 옮겨져 37 °C 및 200 rpm의 조건에서 세포성장이 흡광도(OD600) 에서 0.4 가 될 때까지 배양 하였다. 이 때, 흡광도 (OD600) 에서 0.4까지 배양 하는 것은 세포의 IPTG 유도(IPTG induction)을 위함이다.

[314] 상기 IPTG 유도(IPTG induction)는 알로락토스(allolactose)와 분자적으로 유사하여 유전자가 락 오페론(lac operon)의 통제하에 있을 때 전사를 개시한다. 알로락토스(allolactose)의 유사체인 IPTG는 알로락토스(allolactose)와는 다르게 베타 갈락토시다아제( $\beta$ -galactosidase)에 의해 가수분해 되지 않아 실험환경 내내 같은 농도로 유지된다. 이러한 이유로 IPTG 유도(IPTG induction)은 단백질 발현을 유도하는데 쓰인다.

[315] 상기 IPTG 유도(IPTG induction)을 위하여 세포성장이 흡광도(OD600) 에서 0.4 가 될 때까지 배양한 후 얼음에 넣어 세포의 성장을 멈추고 IPTG의 최종 농도가 0.1mM 이 되도록 더해준 뒤 16 °C 및 180 rpm 조건에서 세포 생장이 멈출 때까지 약 24시간 동안 배양 하였다.

[316] 다음으로 24시간 동안 배양한 배양액은 전세포 전환을 위한 세포 회수를 위해 4 °C 및 8000 rpm 조건에서 20분 간 원심분리 하였다. 원심분리 이후 회수된 세포는 pH 8.0의 50mM 농도 Tris-HCl로 세척하여 20 ml 부피에서의 세포 농도를 흡광도 (OD600) 에서 30으로 맞추었다. 이는 다시 4 °C 및 4400 rpm 조건에서 원심분리 하여 1 g/L 농도의 프로토카테츄산이 포함된 pH 8.0의 50 mM Tris-HCl로 250 ml 진탕 삼각 플라스크(baffled Erlenmeyer flask)에서 20 ml의 부피로 30 °C 및 250 rpm 조건에서 반응 하였다.

[317] 상기 250 ml 진탕 삼각 플라스크(baffled Erlenmeyer flask)에서 반응한 실험군 1의 반응액을 이용하여 기질로 사용된 프로토카테츄산 및 재조합 대장균으로부터 전환된 CHMS를 측정하기 위해 표 3의 조건으로 HPLC 분석을 수행하였으며 이의 결과를 도 12에 나타내었다.

[318] 도 12에서 보듯이, 상기 재조합 대장균 균주를 이용하여 프로토카테츄산을

기질로 전세포 전환을 진행했을 경우  $1.20(\pm 0.01)$  g/L 의 프로토키테추산을 3시간째에 모두 소모 했으며  $156.03(\pm 9.63)$ 의 HPLC 면적 값의 CHMS를 전환했다.

[319]

[320] 실시예 5: 재조합 대장균 균주를 사용한 프로토키테추산으로부터 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)의 제조

[321]

[322] 상기 실험군 2의 재조합 대장균 균주를 상기 실시예 4와 같은 방법으로 전세포 전환 반응을 진행 하였으며 기질로 사용된 프로토키테추산 및 재조합 대장균으로부터 전환된 CHMS와 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 측정하기 위해 하기 표 3의 조건으로 HPLC 분석을 수행하였으며 이의 결과를 도 13에 나타내었다.

[323] 도 13에서 보듯이, 상기 재조합 대장균 균주를 이용하여 프로토키테추산을 기질로 전세포 전환을 진행했을 경우  $1.17(\pm 0.01)$  g/L 의 프로토키테추산을 6시간째에 모두 소모 했으며  $1313.80(\pm 22.79)$ 의 HPLC 면적 값의 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)을 전환했다.

[324]

[325] 실시예 6: 재조합 대장균 균주를 사용한 테레프탈산으로부터 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)의 제조

[326]

[327] 상기 실험군 3의 재조합 대장균 균주를 상기 실시예 4와 같은 방법으로 전세포 전환 반응을 진행 하였으나 pH 8.0 의 50 mM Tris-HCl 완충액 대신 TG 완충액(pH 7.0의 50 mM Tris-HCl, 20 g/L 글리세롤)을 사용하였으며, 기질 또한 1 g/L 프로토키테추산 대신 0.5 g/L 의 테레프탈산을 사용하였다. 기질로 사용된 테레프탈산, 중간산물인 프로토키테추산 및 CHMS, 재조합 대장균 균주로부터 전환된 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 측정하기 위해 하기 표 3의 조건으로 HPLC 분석을 수행하였으며 이의 결과를 도 14에 나타내었다.

[328] 도 14에서 보듯이, 상기 재조합 대장균 균주를 이용하여 테레프탈산을 기질로 전세포 전환을 진행했을 경우  $0.50(\pm 0.01)$  g/L 의 테레프탈산을 5시간째에 모두 소모 했으며  $1129.9(\pm 17.4)$ 의 HPLC 면적 값의 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 전환 하였으나  $11.8(\pm 2.3)$ 의 HPLC 면적 값의 CHMS를 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)으로 전환하지 못하여 전세포 전환액에 남았다.

[329]

[330] 실시예 7: 두 가지 재조합 대장균 균주를 사용한 테레프탈산으로부터 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)의 제조

[331]

[332] 상기 실험군 4-1의 재조합 대장균 균주와 실험군 4-2의 재조합 대장균 균주를 상기 실시예 4와 같은 방법으로 전세포 전환 반응을 진행 하였으나 실험군 4-1 의

제조합 대장균 균주와 상기 실험군 4-2의 제조합 대장균 균주의 비율을 15:25로 진행하였다. 기질로 사용된 테레프탈산, 중간산물인 프로토키테추산 및 CHMS, 제조합 대장균 균주로부터 전환된 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 측정하기 위해 표 3의 조건으로 HPLC 분석을 수행하였으며 이의 결과를 도 15에 나타내었다.

[333]

[334] [표3]

|               | HPLC 수행조건                              |                                                                                                    |
|---------------|----------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------|
|               | ODC 및 CHMS 측정 조건                       | TPA 및 PCA 측정 조건                                                                                    |
| 컬럼            | Aminex HPX-87H column                  | Optimapak C18 column                                                                               |
| 유량(Flow rate) | 0.8 ml/min                             | 1.0 ml/min                                                                                         |
| 용매(solvent)   | 5 mM of H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> | A; 0.1 % trifluoroacetate in 100 % acetonitrile B; 0.1 % trifluoroacetate in waterA : 10 %B : 90 % |
| 온도            | 50 °C                                  | 30 °C                                                                                              |

[335]

[336] 도15에서 보듯이, 상기 실험군 4-1의 제조합 대장균 균주와 실험군 4-2의 제조합 대장균 균주를 15:25의 비율로 이용하여 테레프탈산을 기질로 전세포 전환을 진행했을 경우 0.52(±0.00) g/L의 테레프탈산을 6시간에 모두 소모 했으며 1585.73(±16.63)의 HPLC 면적 값의 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 전환하였다. 도 14의 결과와는 다르게 중간산물인 CHMS 가 전세포 전환액에 남지 않았으며 이는 중간산물인 CHMS까지 모두 전환했음을 알 수 있다.

[337]

### [338] 3. 제조된 PDC의 고순도 정제

[339] 2-피론-4,6-디카복실산(이후, PDC로 약칭)은 화학적으로 안정하면서 여러 가지 관능기를 갖고 있어 다용도 기능성 물질로 많은 기대를 받고 있다. PDC의 피론 고리는 유사-방향족 고리로서, 공여체-수용체 유형 크로모포어에서 수용체 특성 및 PDC 가수분해효소에 의해 유도된 생분해성과 같은 유용한 기능을 가지고 있으며, 피론 고리에 부착된 2 개의 카복실산 관능기는 큰 분자 시스템이 만들어질 때 화학적으로 변형되어 연결기로서 작용할 수 있다. 대표적으로는, PDC는 2관능성 단량체로서 다른 2관능성 또는 3관능성 단량체와 중축합함으로써 선형 또는 망상화된 중합체를 제공하기 위해 활용하는 것이 연구되고 있다.

[340] PDC는 석유화학 기술을 사용하여 합성할 수 없고 현재로는 식물 성분으로부터만 추출 가능한데, 예를 들어, 미생물 발효 공정으로 대규모로

생산하는 것이 가능하다.

- [341] 미생물 발효 공정으로 PDC를 제조할 때, PDC를 함유하는 발효 혼합물에 NaCl을 첨가하여 PDC 소듐염을 석출시키고, 이를 원심분리로 회수하고, 다시 산성화하여 유기용매로 추출함으로써, 순수한 PDC를 정제하는 방법이 제안되었다.
- [342] 화합물로서의 PDC는 물, 아세톤, 메탄올, THF 및 아세토니트릴과 같은 극성 용매에 매우 용해성이지만, 벤젠, 헥산 및 헵탄과 같은 비극성 용매에는 거의 용해되지 않는다. PDC 소듐염과 같은 PDC 금속염도 대부분 물이나 극성용매에서의 용해도가 매우 낮는데, 이를 이용하여 PDC 정제 방법이 개발되었다.
- [343] 본 발명에 있어서, 이러한 조질 PDC 또는 조질 PDC 소듐염을 제조하거나 입수하는 방법은 특별히 한정되지 않는다. 일반적으로는, 조질 PDC 또는 조질 PDC 소듐염은 상업적으로 입수한 것이거나 선행기술에 기재된 미생물 발효 공정으로 제조된 것일 수 있다.
- [344] 그러나 상업적으로 입수가 가능하거나 선행기술에 기재된 미생물 발효 공정으로 제조된 조질 PDC 또는 조질 PDC 소듐염은, NMR 등의 분광학적 검사에서는 불순물이 미량인 것으로 분석되지만, TLC(박막크로마토그래피) 분석법에서는 PDC의 스팟과 뚜렷이 구분되는 별개의 스팟들이 관찰된다. 이러한 스팟은 불순물인 것으로 판단되며, 그 양 또한 적지 않은 것으로 보여진다.
- [345] 본 발명은 상업적으로 입수가 가능하거나 선행기술에 기재된 미생물 발효 공정으로 제조된 조질 PDC 또는 조질 PDC 소듐염에서 이러한 불순물을 간단하면서도 저렴한 비용으로 제거할 수 있는 경제적인 PDC 정제 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [346]
- [347] 본 발명은 하기 단계를 포함하는 2-피론-4,6-디카르복실산(PDC)의 정제 방법을 제공한다:
- [348] (a) 조질 PDC 소듐염을 산성화하여 조질 PDC-함유 수용액을 제조하는 단계;
- [349] (b) 상기 단계 (a)에서 결과된 조질 PDC-함유 수용액을 유기용매로 추출하여 수층과 유기층으로 증분리하는 단계;
- [350] (c) 상기 단계 (b)에서 결과된 수층에 아세톤을 첨가하여 형성되는 백색 침전물을 분리하여 제거하는 단계;
- [351] (d) 상기 단계 (c)에서 백색 침전물이 제거된 용액을 유기용매로 추출하고 수층과 유기층으로 증분리하는 단계;
- [352] (e) 상기 단계 (b)에서 결과된 유기층 및 단계 (d)에서 결과된 유기층을 농축하는 단계; 및
- [353] (f) 상기 단계 (e)에서 결과된 농축물을 에틸 아세테이트와 헥산의 혼합 용매로 컬럼 크로마토그래피하는 단계.
- [354]

- [355] 본 발명에 있어서, 단계 (a)는 조절 PDC-함유 수용액을 준비하는 단계로서, 예를 들면, 염산, 질산, 황산, 인산 등으로 구성된 군에서 선택되는 1종 이상의 산을 사용하여 조절 PDC 소듐염을 산성화함으로써 PDC를 함유하는 수용액을 제조하는 단계이다.
- [356] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 산성화는, PDC 소듐염을 물에 도입하고 격렬히 교반하여 수분산물 또는 수혼합물로 만들고, 여기에 진한 염산을 첨가하거나, PDC 소듐염에 진한 염산을 직접 첨가함으로써 수행될 수 있다.
- [357] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 산성화는, PDC 소듐염을 물에 도입하고 격렬히 교반하여 수분산물 또는 수혼합물로 만들고, 여기에 진한 염산을 첨가하거나, PDC 소듐염에 진한 염산을 직접 첨가함으로써 수행될 수 있다.
- [358] 첨부된 도면에 있어서, 도 16 및 도 17은 조절 PDC 소듐염 및 조절 PDC의 NMR 그래프를 각각 보여주는데, 피론 고리상의 2개의 수소원자의 피크( $\delta$  7.0 ~ 7.4 부근)가 도 16에서는 보이지 않지만, 도 17에서는 뚜렷하게 나타난다. 도 17에서, 불순물의 존재를 시사하는 피크는 뚜렷하게 보이지 않으나,  $\delta$  8 ~ 9 및  $\delta$  3 ~ 4에서 나타나는 피크들이 불순물로 추정될 수 있다.
- [359] 도 16 및 도 17의 NMR 그래프 상에는 불순물의 존재가 명확하지 않으나, 도 17의 상단에 표시된 TLC 이미지에서는 점선 내에 PDC 스팟(P로 표시) 뿐만 아니라 이와는 다른 위치에 스팟들이 뚜렷하게 보이며, 이들 스팟들로부터 상당량의 불순물이 존재할 수도 있음이 유추된다.
- [360] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 조절 PDC 소듐염은 다른 금속 양이온의 염으로 대체되거나 이들을 일부 포함할 수 있다. 다른 금속 양이온의 예로는 1가, 2가, 3가 또는 4가의 다른 금속 양이온, 구체적으로는 리튬, 칼륨, 루비듐, 은, 세슘 등과 같은 1가 금속 양이온; 마그네슘, 칼슘, 철(II), 구리(II), 아연, 바륨, 코발트, 니켈(II), 망간, 크롬(II) 등과 같은 2가 금속 양이온; 철(III), 알루미늄, 갈륨 등과 같은 3가 금속 양이온; 및 비소(IV), 납(IV), 티탄(IV), 게르마늄(IV) 등과 같은 4가 금속 양이온을 언급할 수 있다.
- [361] 상기 조절 PDC 소듐염의 산성화는 염산, 황산, 질산, 인산 등과 같은 무기산, 아세트산 등과 같은 유기산을 사용하여 수행될 수 있으며, 바람직하게는 염산, 더욱 바람직하게는 진한 염산을 사용하여 수행될 수 있다. 이렇게 산성화되어 PDC를 함유하는 용액은 pH 6 이하, 바람직하게는 pH 5 이하, 더욱 바람직하게는 pH 3 ~ 5를 가질 수 있다.
- [362] 본 발명에 있어서, 단계 (b)는 상기 단계 (a)에서 결과된 조절 PDC-함유 수용액을 유기용매로 추출하고 수층과 유기층으로 층분리하는 단계로서, 추출은 조절 PDC-함유 수용액에 유기용매를 첨가하고, 교반하거나, 진탕하거나 또는 흔들기(shaking)함으로써 수행될 수 있다.
- [363] 추출에 사용되는 유기용매는 특별히 한정되지 않으나, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤, THF 등이 언급될 수 있으며, 바람직하게는 에틸아세테이트, THF, 또는 이들의 혼합물이 언급될 수 있다.

- [364] 유기용매의 양은 특별히 한정되지 않으나, 일반적으로는 수층의 50~150 부피%, 바람직하게는 70~130 부피%, 더욱 바람직하게는 90~110 부피%에서 선택될 수 있다.
- [365] 층분리된 유기층에 함유된 PDC에는 미량의 불순물이 함유되어 있는 것이 NMR 및 TLC 분석으로 확인되었다 (도 17 참조).
- [366] 본 발명에 있어서, 단계 (c)는 상기 단계 (b)에서 층분리된 수층에 아세톤을 첨가하여 형성되는 백색 침전물을 분리하여 제거하는 단계로서, 백색 침전물이 분리된 수층 또는 용액이 수득된다. 분리된 백색 침전물은, NMR 및 TLC 분석 결과, PDC를 함유하지 않아 불순물인 것으로 확인되었다.
- [367] 백색 침전물의 분리는 특별히 한정되지 않고, 통상적인 고액 분리 방법을 이용할 수 있으며, 예를 들면 여과, 원심분리, 경사분리 등에 의해 수행될 수 있다.
- [368] 이와 관련하여, PDC는 물 및 아세톤에 모두 높은 용해도를 나타내는 반면, 불순물인 백색 침전물은 물에서의 용해도는 높지만 아세톤에서의 용해도는 낮기 때문에, 수층에 아세톤을 첨가하면 PDC는 석출되지 않고 아세톤에 불용성인 불순물은 석출되는 것으로 보여진다.
- [369] 본 발명의 하나의 변법에 따르면, 메탄올, 에탄올, 프로판올, 아세토니트릴, 디메틸포름아미드(DMF), 디메틸설폭사이드(DMSO) 및 N-메틸피롤리돈(NMP)과 같은 다른 수혼화성 유기용매를 아세톤 대신에 사용하거나 일부 대체시킬 수 있다.
- [370] 아세톤 또는 다른 수혼화성 용매의 사용량은 특별히 한정되지 않으나, 수층의 30~200 부피%, 바람직하게는 50~150 부피%, 더욱 바람직하게는 60~120 부피%, 구체적으로는 90~110 부피%에서 선택될 수 있다. 아세톤 또는 다른 수혼화성 용매의 사용량이 상기 범위 이하이면 백색 침전물의 형성이 제대로 되지 않을 우려가 있고, 상기 범위 이상이면 후속 추출 단계를 위해 사용된 수혼화성 용매를 일부 또는 전부 제거하는 공정이 추가로 필요해질 수 있다.
- [371] 도 18은 여과로 분리된 백색 침전물의 NMR 그래프 및 TLC 분석 이미지(우상단)를 보여주는 도면이다. 도 18에 나타난 백색 침전물의 NMR 그래프를 PDC 소듐염의 NMR 그래프(도 16) 및 PDC의 NMR 그래프(도 17)와 비교하면, 상기 백색 침전물은 PDC와는 상이한 물질인 것이 확인된다. 또한, 상기 백색 침전물의 TLC 분석 이미지를 PDC의 TLC 분석 이미지(도 17의 좌상단 이미지)와 비교하면, 상기 백색 침전물의 스팟은 PDC 스팟의 위치와는 상이하며, PDC 불순물의 스팟 중의 하나와 동일한 위치에서 나타나므로, 상기 백색 침전물은 PDC가 아닌 불순물인 것이 확인된다.
- [372]
- [373] 본 발명에 있어서, 단계 (d)는 상기 단계 (c)에서 백색 침전물이 분리된 용액을 유기용매로 추출하여 수층과 유기층으로 층분리하는 단계로서, 추출은 상기 용액에 유기용매를 첨가하고, 교반하거나, 진탕하거나 또는



흔들기(shaking)함으로써 수행될 수 있다.

[374] 추출에 사용되는 유기용매는 특별히 한정되지 않으며, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤, THF 등을 예시할 수 있으며, 바람직하게는 에틸아세테이트, THF 또는 이들의 혼합물을 언급할 수 있다.

[375] 유기용매의 양은 특별히 한정되지 않으나, 일반적으로는 수층의 50~150 부피%, 바람직하게는 70~130 부피%, 더욱 바람직하게는 90~110 부피%에서 선택될 수 있으며, 1회 이상, 바람직하게는 2~3회 추출할 수 있다.

[376]

[377] 본 발명의 단계 (e)는 상기 단계 (b)에서 결과된 유기층 및 단계 (d)에서 결과된 유기층들을 농축하여 2-피론-4,6-디카르복실산을 함유하는 농축물을 수득하는 단계이다.

[378] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 유기층은 황산마그네슘, 황산나트륨 등으로 미리 건조시킨 다음, 감압 또는 상압 하에 농축될 수 있다.

[379] 상기 농축물에 함유된 PDC는, NMR 및 TLC 분석 결과, 미량의 불순물이 여전히 존재함이 확인된다.

[380]

[381] 본 발명의 단계 (f)는 상기 단계 (e)에서 결과된 농축물을 에틸아세테이트와 헥산의 혼합 용매, 바람직하게는 에틸아세테이트:헥산 = 4:1~1:4의 혼합 용매로 컬럼 크로마토그래피하는 단계로서, 2-피론-4,6-디카르복실산을 고순도로 수득하는 단계이다.

[382] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 실리카겔 컬럼 크로마토그래피를 이용한다.

[383] 도 19, 20 및 21은 상기 고형물을 에틸아세테이트:메탄올=1:1의 혼합 용매, 에틸아세테이트:메탄올=2:1의 혼합 용매, 및 에틸아세테이트 100% 단일 용매를 각각 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 분리하여 수득된 PDC의 NMR 그래프 및/또는 TLC 분석 이미지를 각각 보여준다. 각각의 NMR 이미지는 PDC 이외에 불순물이 미량이지만 무시하지 못할 양으로 존재하는 것을 시사한다.

[384] 도 22는 상기 고형물을 에틸아세테이트:헥산=1:1의 혼합 용매를 사용하여 컬럼 크로마토그래피로 분리하고, 수득된 2-피론-4,6-디카르복실산 생성물의 NMR 그래프를 보여주는데, 불순물에 해당하는 피크가 거의 보이지 않는다.

[385] 본 발명의 바람직한 일 실시예에 따르면, 상기 컬럼 크로마토그래피는 등용매용리(isocratic elution) 또는 농도구배용리(gradient elution)에 의해 수행될 수 있다. 농도구배용리의 예로서, 4:1 내지 1:4의 비율에서 선택되는 에틸아세테이트와 헥산의 혼합 용매에서 시작하여, 점차로 에틸아세테이트의 비율을 증가시켜, 최종적으로 에틸 아세테이트 100%의 단일 용매를 사용하여 용리하는 방식을 언급할 수 있다. 본 발명은, 점차로 에틸아세테이트의 비율을 저하시켜, 최종적으로 헥산의 100% 단일 용매를 사용하는 농도구배용리도 배제하지 않는다.

[386] 본 발명의 하나의 이점에 따르면, 재결정, 용매석출, 염석 등과 같은 종래의

정제 방법으로 확인 및/또는 제거가 곤란한 불순물을 대부분 제거하여 고순도의 2-피론-4,6-디카르복실산(PDC)을 제공할 수 있다.

[387] 본 발명의 또다른 이점에 따르면, 고기능성 중합체를 제조할 수 있는 고순도의 2-피론-4,6-디카르복실산(PDC)을 공업적인 규모로 경제적이면서 간단한 방법으로 제공할 수 있다.

[388] 본 발명의 또다른 이점에 따르면, 2-피론-4,6-디카르복실산(PDC)에 함유되어 있으며 NMR과 같은 분광학적 방법 및/또는 TLC와 같은 크로마토그래피적 방법으로 구분이 어려운 불순물을 확인 및 제거하는 방법을 제공할 수 있다.

[389]

[390] **제조예 1**

[391] PDC를 함유하는 미생물 배양액 (1.5 L)을 원심분리(4000 rpm, 1 hour, 4 °C)하여 세포를 제거한다. 상등액에 15 g의 NaCl을 첨가하고 4 °C에서 12시간 동안 정치하여 PDC 소듐염을 석출시키고, 여과로 회수하여, 조질 PDC 소듐염을 제조하였다.

[392] 조질 PDC 소듐염(22 g)을 물에 분산시키고, 진한 염산을 첨가하여 산성화시키고, pH 3~4로 조정하고, 감압 하에 농축하여, 조질 PDC를 제조하였다.

[393] 도 16은 조질 PDC 소듐염의 NMR 그래프이고, 도 17은 조질 PDC 소듐염을 진한 염산으로 산성화시켜 수득한 PDC의 NMR 그래프 및 TLC 분석 이미지(전개용매 클로로포름:에틸아세테이트:포름아미드 = 10:8:1)를 보여준다.

[394] PDC의 피론 고리의 2개의 수소원자는, 소듐염인 상태(COONa 상태)에서는 NMR 그래프에 나타나지 않지만(도 16), 산성화된 상태(COOH 상태)에서는  $\delta$  7.0 ~ 7.3 부근에서 나타나는 것(도 17)이 관찰된다. 하지만 도 17의 TLC 분석 이미지는 PDC 스팟(붉은 점선으로 된 사각형 내에 P로 표시된 스팟) 뿐만 아니라 별개의 다른 스팟들이 뚜렷하게 표시되고 있어, PDC 이외에 상당량의 불순물이 포함되어 있음을 보여준다.

[395]

[396] **실시예 8**

[397] 제조예 1에서 얻어진 조질의 PDC 소듐염 22 g을 증류수 100 ml에 용해시키고, 1M 염산을 천천히 첨가하여 pH 3 ~ 4로 조정한 다음, 에틸아세테이트 100 ml로 1회 추출하였다(1차 추출).

[398] 수층과 유기층을 분리하고, 수층에 아세톤 30 ml를 첨가하여 백색 고형물을 석출시키고, 형성된 백색 고형물을 여과로 제거하고, 남아있는 아세톤을 감압하여 제거한 다음, 여액을 다시 에틸아세테이트 100 ml로 2회 추출하였다(2차 추출).

[399] 상기 1차 추출 및 2차 추출에서 얻어진 유기층(에틸아세테이트층)을 모두 결합하고, 무수 황산마그네슘으로 건조시키고, 여과로 무수 황산마그네슘을 제거하고, 결과된 여액을 감압 하에 농축하였다.

[400] 상기 결과된 농축물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 에틸

아세트레이트:헥산=1:1의 혼합 용매로 용리하고, 감압 하에 농축하여 고순도 PDC를 수득하였으며, 반응물에 대비된 수율은 80 % 이상이었다. 컬럼 크로마토그래피에서 용리되는 분획에서 PDC-함유 여부는 TLC (에틸 아세트레이트:헥산=1:1)로 확인하였다.

[401]

[402] **실시예 9**

[403] 유기층을 농축하여 얻어진 농축물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 에틸 아세트레이트:헥산=1:1의 혼합 용매에서 에틸 아세트레이트 단일 용매로 서서히 비율을 변화시키면서 농도구배 용리하는 것을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 수행하였다.

[404] 결과된 2-피론-4,6-디카르복실산에는 불순물이 대부분 제거된 것을 NMR 그래프(도 22)에서 확인할 수 있었다.

[405]

[406] **비교예 1**

[407] 유기층을 농축하여 얻어진 농축물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 에틸 아세트레이트:메탄올=1:1의 혼합 용매로 용리하는 것을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 수행하였다.

[408] 결과된 2-피론-4,6-디카르복실산에는 미량의 불순물이 여전히 존재하는 것을 NMR 그래프(도 19)에서 확인할 수 있었다.

[409]

[410] **비교예 2**

[411] 유기층을 농축하여 얻어진 농축물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 에틸 아세트레이트:메탄올=2:1의 혼합 용매로 용리하는 것을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 수행하였다.

[412] 결과된 2-피론-4,6-디카르복실산에는 미량의 불순물이 여전히 존재하는 것을 NMR 그래프(도 20)에서 확인할 수 있었다.

[413]

[414] **비교예 3**

[415] 유기층을 농축하여 얻어진 농축물을 실리카겔 컬럼 크로마토그래피에서 에틸 아세트레이트(단일 용매)로 용리하는 것을 제외하고는 실시예 8에서와 동일하게 수행하였다.

[416] 결과된 2-피론-4,6-디카르복실산에는 미량의 불순물이 여전히 존재하는 것을 NMR 그래프(도 21)에서 확인할 수 있었다.

[417]

[418] 지금까지 본 발명의 일 실시예에 따른 고순도 2-피론-4,6-디카르복실산 제조방법 및 그를 위한 중간체 제조방법에 관한 구체적인 실시예에 관하여 설명하였으나, 본 발명의 범위에서 벗어나지 않는 한도 내에서는 여러 가지 실시 변형이 가능함은 자명하다.

[419] 그러므로 본 발명의 범위는 설명된 실시예에 국한되어 정해져서는 안 되며, 후술하는 특허청구범위뿐만 아니라 이 특허청구범위와 균등한 것들에 의해 정해져야 한다.

[420] 즉, 전술된 실시예는 모든 면에서 예시적인 것이며, 한정적인 것이 아닌 것으로 이해되어야 하며, 본 발명의 범위는 상세한 설명보다는 후술될 특허청구범위에 의하여 나타내어지며, 그 특허청구범위의 의미 및 범위 그리고 그 등가 개념으로부터 도출되는 모든 변경 또는 변형된 형태가 본 발명의 범위에 포함되는 것으로 해석되어야 한다.

## 청구범위

- [청구항 1] 1) 폴리에틸렌 테레프탈레이트(PET)로부터 테레프탈산(TPA)을 제조하는 단계;  
2) 테레프탈산(TPA)을 재조합 균주와 반응시켜  
2-피론-4,6-디카복실산(PDC)을 생성하는 단계; 및  
3) 제조된 PDC를 고순도로 정제하는 단계를 포함하는 고순도  
2-피론-4,6-디카복실산 및 이를 위한 중간체 제조방법.
- [청구항 2] 바이오 매스로부터 추출된 것을 특징으로 하는,  $\text{SiO}_2$  촉매.
- [청구항 3] 제 2항에 있어서,  
상기 바이오 매스는 왕겨인 것을 특징으로 하는,  $\text{SiO}_2$  촉매.
- [청구항 4] 제 2항에 있어서,  
상기  $\text{SiO}_2$  촉매는,  
티올 작용기(-SH)에 의해 표면이 개질된 것을 특징으로 하는,  $\text{SiO}_2$  촉매.
- [청구항 5] 제 2항에 있어서,  
상기  $\text{SiO}_2$  촉매의 비표면적은  $151.92 \sim 281.02 \text{ m}^2/\text{g}$ 이고, 기공의 크기는  $0.57 \sim 0.66 \text{ nm}$ 인 것을 특징으로 하는,  $\text{SiO}_2$  촉매.
- [청구항 6] 가) 왕겨를 분쇄한 후 산처리하는 단계; 및  
나) 상기 가) 단계의 산처리된 왕겨를 열처리하는 단계;를 포함하는 것을  
특징으로 하는, 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법.
- [청구항 7] 제 6항에 있어서,  
상기 가) 단계의 상기 산처리는,  
황산, 염산, 질산, 인산, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1  
종을 포함하는 산성용액을 사용하여,  
 $40 \sim 150^\circ\text{C}$ 에서 10 분 ~ 3 시간 동안 수행되는 것을 특징으로 하는,  
바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법.
- [청구항 8] 제 6항에 있어서,  
상기 가) 단계의 산처리 후,  
상기 산처리된 왕겨를 여과 및 세척하는 단계를 더 포함하는 것을  
특징으로 하는,  
바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법.
- [청구항 9] 제 6항에 있어서,  
상기 (나) 단계의 열처리는  
 $600 \sim 700^\circ\text{C}$ 의 온도에서 분당  $3.5^\circ\text{C}$ 씩 하강시키면서 2 ~ 3 시간 동안  
수행되는 것을 특징으로 하는,  
바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법.
- [청구항 10] 제 6항에 있어서,  
상기 (나) 단계 후  $\text{SiO}_2$  촉매의 표면을 개질시키는 단계를 더 포함하며,

상기  $\text{SiO}_2$  촉매의 표면을 개질시키는 단계는,  
 상기  $\text{SiO}_2$  촉매와 머캡토프로필 트리메톡시실란(Mercaptopropyl trimethoxysilane)을 톨루엔(Toluene) 용매에 투입하여 혼합물을 제조하는 단계;  
 상기 혼합물을 세척하는 단계; 및  
 상기 세척된 혼합물을 건조시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는, 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매의 제조방법.

[청구항 11] 폴리에틸렌 테레프탈레이트(Polyethylene terephthalate), 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매, 및 물을 혼합하고 마이크로파를 조사하여 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산(Terephthalic acid)으로 가수분해하는 것을 특징으로 하는,

바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 PET의 TPA 분해방법.

[청구항 12] 제 11항에 있어서,  
 상기 폴리에틸렌 테레프탈레이트를 테레프탈 산으로 가수분해하는 방법은,  
 (a) 폴리에틸렌 테레프탈레이트, 바이오매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매, 및 물을 마이크로파 반응기에서 반응시켜 테레프탈 산이 침전된 혼합물을 제조하는 단계;  
 (b) 상기 혼합물에 수산화나트륨을 혼합하여 테레프탈 산을 용해시키는 단계;  
 (c) 상기 테레프탈 산이 용해된 혼합물을 여과하여 잔여물과 촉매를 제거하는 단계;  
 (d) 상기 잔여물과 촉매가 제거된 혼합물에 산성용액을 투입하여 침전물을 형성시키고 수득하는 단계; 및  
 (e) 상기 수득된 침전물을 건조시키는 단계;를 포함하는 것을 특징으로 하는,

바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 PET의 TPA 분해방법.

[청구항 13] 제 12항에 있어서,  
 상기 산성용액은,  
 황산, 염산, 질산, 인산, 및 이들의 혼합물로 이루어진 군에서 선택된 1 종인 것을 특징으로 하는,

바이오 매스 유래  $\text{SiO}_2$  촉매를 이용한 PET의 TPA 분해방법.

[청구항 14] 1,2-디하이드록시-3,5-사이클로헥사디엔-1,4-디카복실레이트 디하이드로게네이스 (1,2-dihydroxy-3,5-cyclohexadiene-1,4-dicarboxylate dehydrogenase; TphB) 효소; 테레프탈레이트 1,2-디옥시게네이스 (terephthalate 1,2-dioxygenase; TphAabc) 효소; 프로토크아테추에이트 4,5-디옥시게네이스 (Protocatechuate 4,5-dioxygenase; LigAB) 효소; 4-카복시-2-하이드록시뮤코네이트-6-세미알데하이드

디하이드로게네이즈 (4-carboxy-2-hydroxymuconate-6-semialdehyde dehydrogenase; LigC) 효소 및 이들의 조합으로 구성된 균으로부터 선택되는 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열이 도입된, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC) 생산용 재조합 균주.

- [청구항 15] 제14항에 있어서,  
상기 TphB 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 1로 표시되는 것을 특징으로 하는, PDC 생산용 재조합 균주.
- [청구항 16] 제14항에 있어서,  
상기 TphAabc 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 2로 표시되는 것을 특징으로 하는, PDC 생산용 재조합 균주.
- [청구항 17] 제14항에 있어서,  
상기 LigAB 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 3으로 표시되는 것을 특징으로 하는, PDC 생산용 재조합 균주.
- [청구항 18] 제14항에 있어서,  
상기 LigC 효소를 코딩하는 뉴클레오티드 서열은 서열번호 4로 표시되는 것을 특징으로 하는, PDC 생산용 재조합 균주.
- [청구항 19] (a) TphB 효소를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열, TphAabc 효소를 코딩하는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열, LigAB 효소를 코딩하는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열 및 LigC 효소를 코딩하는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열이 도입된 재조합 균주를 획득하는 단계; 및  
(b) 상기 획득한 재조합 균주와 테레프탈산(TPA)을 반응시켜서, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생성하는 단계를 포함하는, PDC의 생산방법.
- [청구항 20] 제19항에 있어서,  
상기 TphB 효소와 TphAabc 효소는 테레프탈산(TPA)을 프로토키테추산(PCA)으로 전환시키는 촉매반응을 수행하는 것인, PDC의 생산방법.
- [청구항 21] 제19항에 있어서,  
상기 LigAB 효소는 프로토키테추산(PCA)을 CHMS로 전환시키는 촉매반응을 수행하는 것인, PDC의 생산방법.
- [청구항 22] 제19항에 있어서,  
상기 LigC 효소는 CHMS를 PDC로 전환시키는 촉매반응을 수행하는 것인, PDC의 생산방법.
- [청구항 23] (a) TphB 효소를 코딩하는 서열번호 1의 뉴클레오티드 서열과 TphAabc 효소를 코딩하는 서열번호 2의 뉴클레오티드 서열이 도입된 제1 재조합 균주, 및 LigAB 효소를 코딩하는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열과 LigC 효소를 코딩하는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열이 도입된 제2 재조합

균주를 각각 수득하는 단계;

(b) 상기 수득한 제1 재조합 균주와 제2 재조합 균주를 15:25(균체수)의 비율로 혼합하여 혼합균주를 수득하는 단계; 및

(c) 상기 수득한 혼합균주와 테레프탈산(TPA)을 반응시켜서, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생성하는 단계를 포함하는, PDC의 생산방법.

[청구항 24] (a) LigAB 효소를 코딩하는 서열번호 3의 뉴클레오티드 서열과 LigC 효소를 코딩하는 서열번호 4의 뉴클레오티드 서열이 도입된 재조합 균주를 수득하는 단계; 및

(b) 상기 수득한 재조합 균주와 프로토키테추산(PCA)을 반응시켜서, 2-피론-4,6-디카복실산(PDC)를 생성하는 단계를 포함하는, PDC의 생산방법.

[청구항 25] (a) 조절 2-피론-4,6-디카복실산 소듐염(PDC 소듐염)을 산성화하여 조절 PDC-함유 수용액을 제조하는 단계;

(b) 상기 단계 (a)에서 결과된 조절 PDC-함유 수용액을 유기용매로 추출하여 수층과 유기층으로 층분리하는 단계;

(c) 상기 단계 (b)에서 결과된 수층에 아세톤을 첨가하여 형성되는 백색 침전물을 분리하여 제거하는 단계;

(d) 상기 단계 (c)에서 백색 침전물이 제거된 용액을 유기용매로 추출하고 수층과 유기층으로 층분리하는 단계;

(e) 상기 단계 (b)에서 결과된 유기층 및 단계 (d)에서 결과된 유기층을 농축하는 단계; 및

(f) 상기 단계 (e)에서 결과된 농축물을 에틸 아세테이트와 헥산의 혼합 용매로 컬럼 크로마토그래피하는 단계;

를 포함하는, 2-피론-4,6-디카복실산의 정제 방법.

[청구항 26] 제25항에 있어서,

상기 2-피론-4,6-디카복실산 소듐염은 리튬, 칼륨, 루비듐, 은, 세슘과 같은 1가 금속 양이온; 마그네슘, 칼슘, 철(II), 구리(II), 아연, 바륨, 코발트, 니켈(II), 망간, 크롬(II)과 같은 2가 금속 양이온; 철(III), 알루미늄, 갈륨과 같은 3가 금속 양이온; 및 비소(IV), 납(IV), 티탄(IV), 게르마늄(IV)과 같은 4가 금속 양이온으로 구성된 군에서 선택된 1종 이상의 다른 금속 양이온을 포함하는 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카복실산의 정제 방법.

[청구항 27] 제26항에 있어서,

상기 단계 (a)에서 산성화는 염산, 황산, 질산 및 인산으로 구성된 군에서 선택된 하나 이상의 산을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카복실산의 정제 방법.

[청구항 28] 제26항에 있어서,



상기 단계 (a)에서 산성화는 염산을 사용하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법.

[청구항 29] 제26항에 있어서,  
상기 단계 (b) 및 (d)에서 사용되는 유기용매는 동일 또는 상이하며, 에틸아세테이트, 메틸에틸케톤, THF 및 이들의 혼합물로 구성된 군에서 선택되는 하나 또는 둘 이상인 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법.

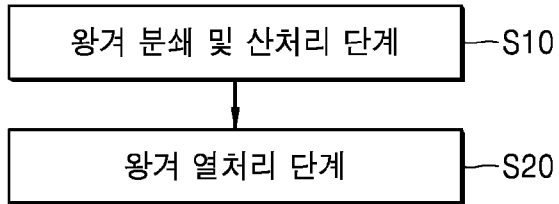
[청구항 30] 제26항에 있어서,  
상기 단계 (b) 및 (d)에서 사용될 수 있는 유기용매는 에틸아세테이트인 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법.

[청구항 31] 제26항에 있어서,  
상기 단계 (f)의 컬럼 크로마토그래피는 에틸아세테이트:헥산=4:1~1:4의 혼합 용매로 용리되는 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법.

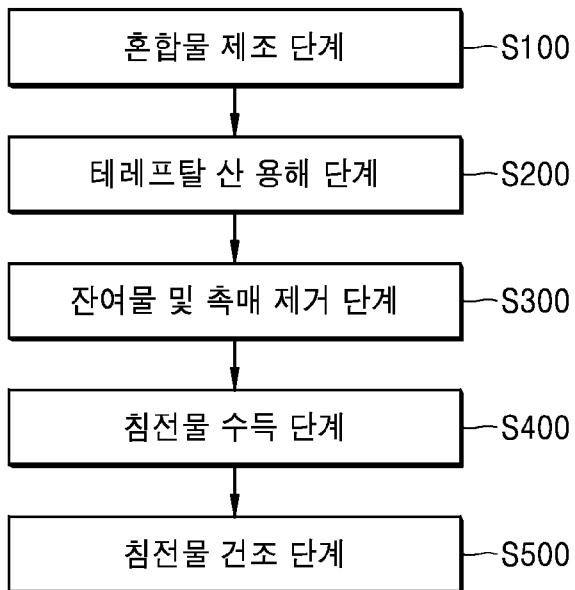
[청구항 32] 제26항에 있어서,  
상기 단계 (f)의 컬럼 크로마토그래피는 에틸아세테이트:헥산=4:1~1:4의 혼합 용매에서 시작하여 에틸아세테이트(단일 용매)로 변화시키면서 농도구배 용리되는 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법.

[청구항 33] 제26항에 있어서,  
상기 단계 (f)의 컬럼 크로마토그래피는 실리카겔 컬럼 크로마토그래피인 것을 특징으로 하는, 2-피론-4,6-디카르복실산의 정제 방법.

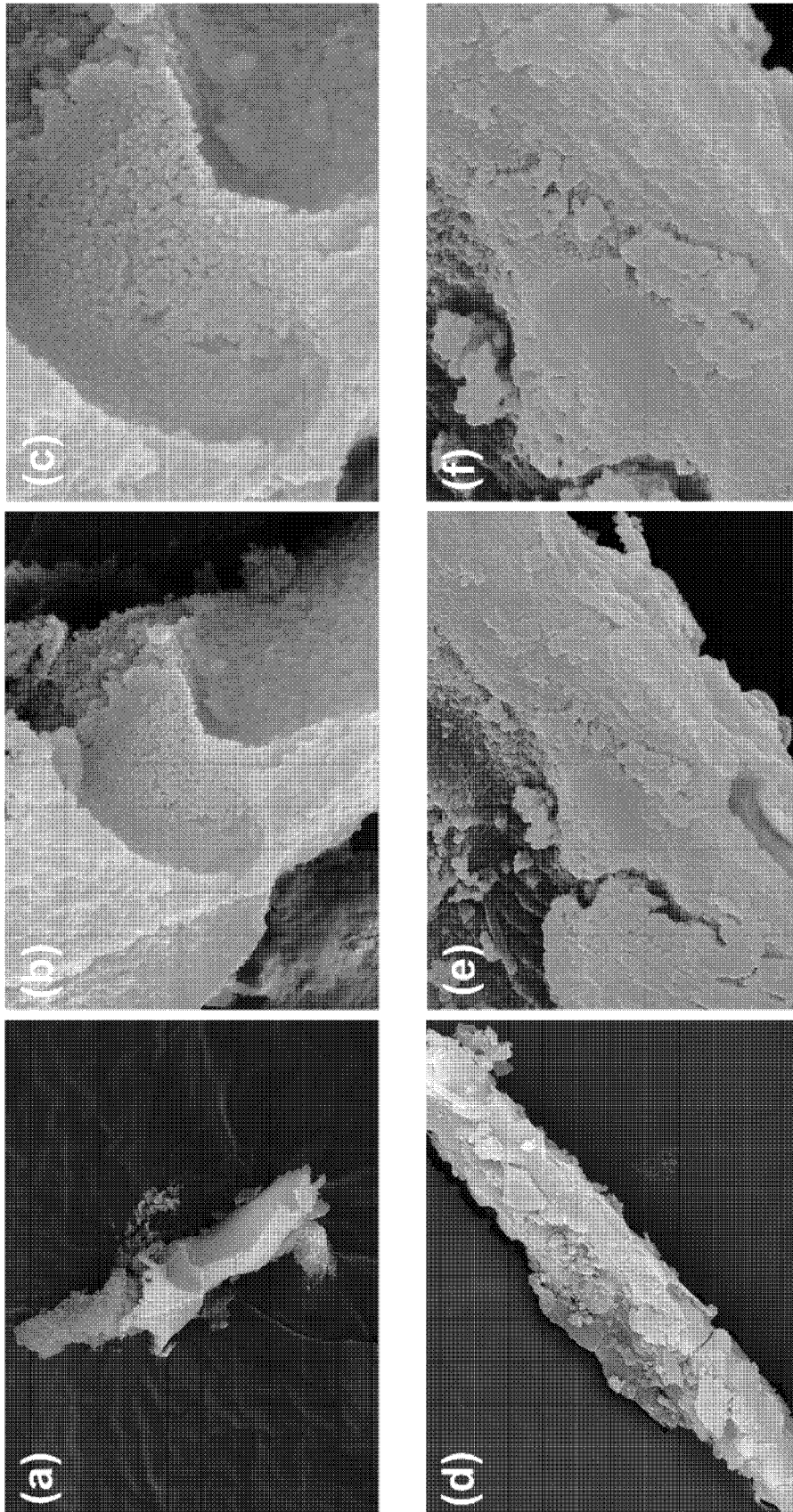
[도1]

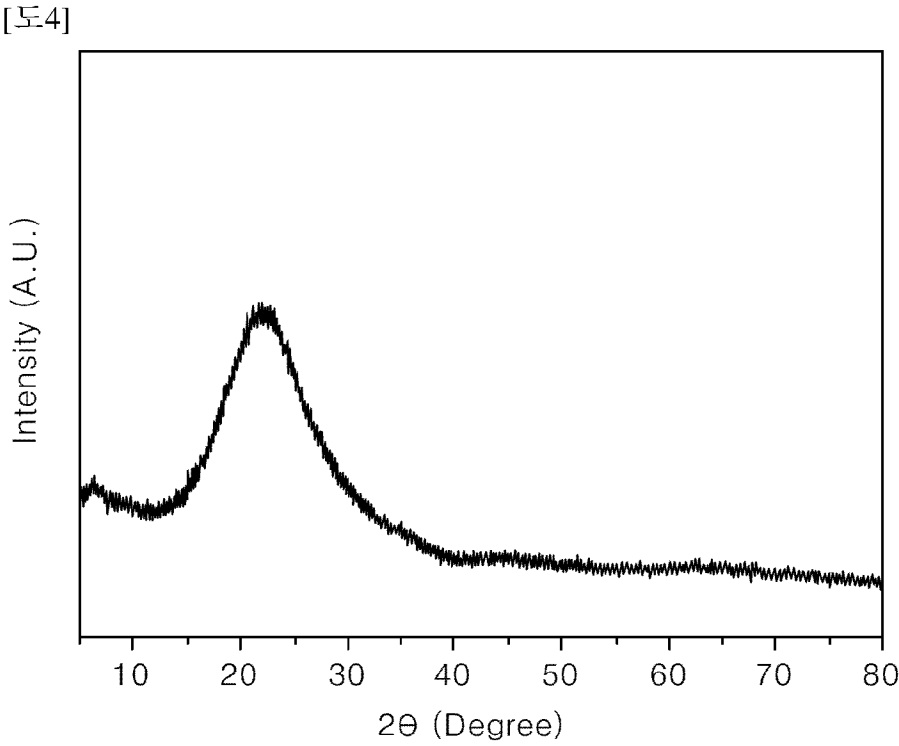


[도2]

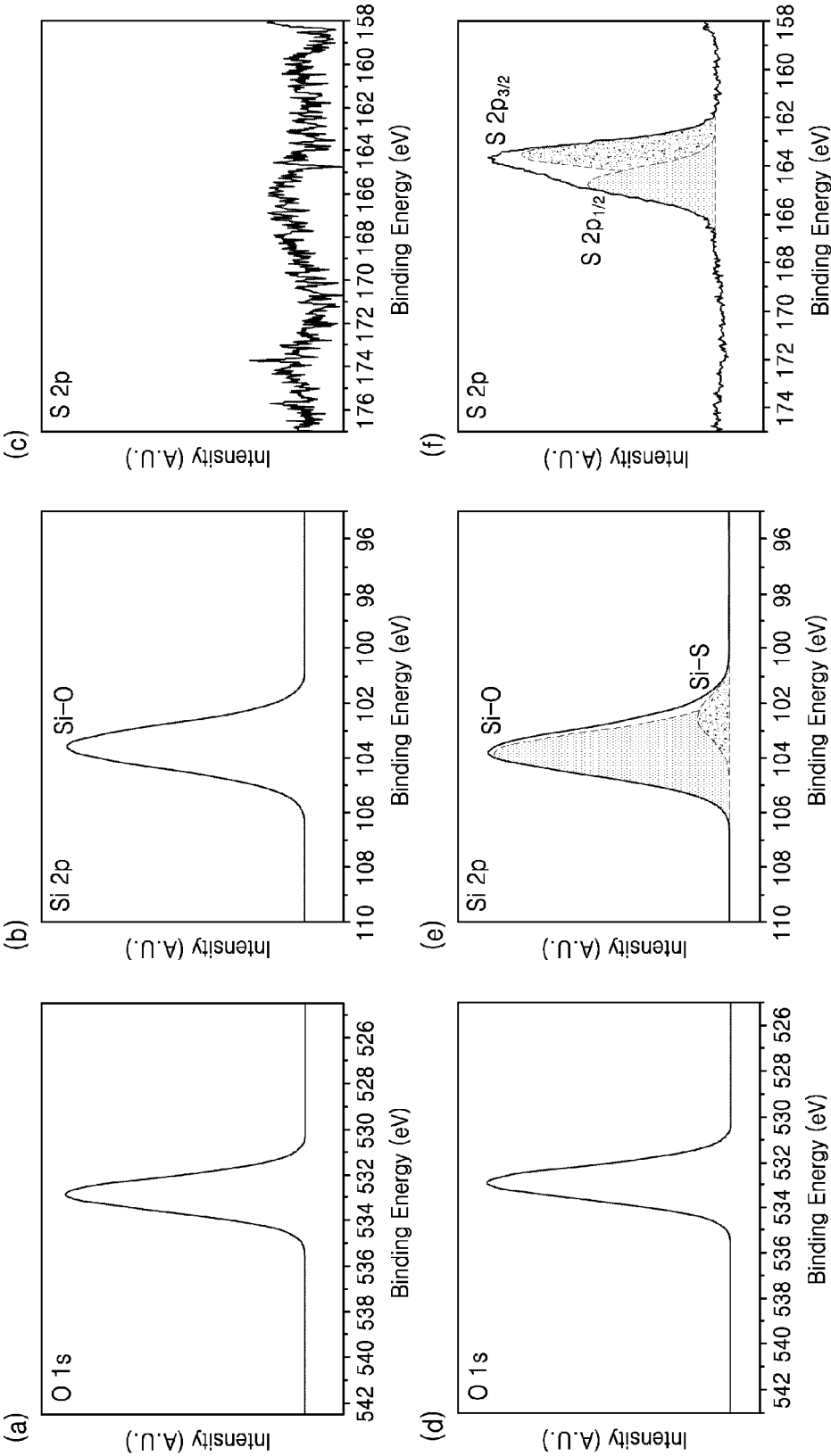


[도3]

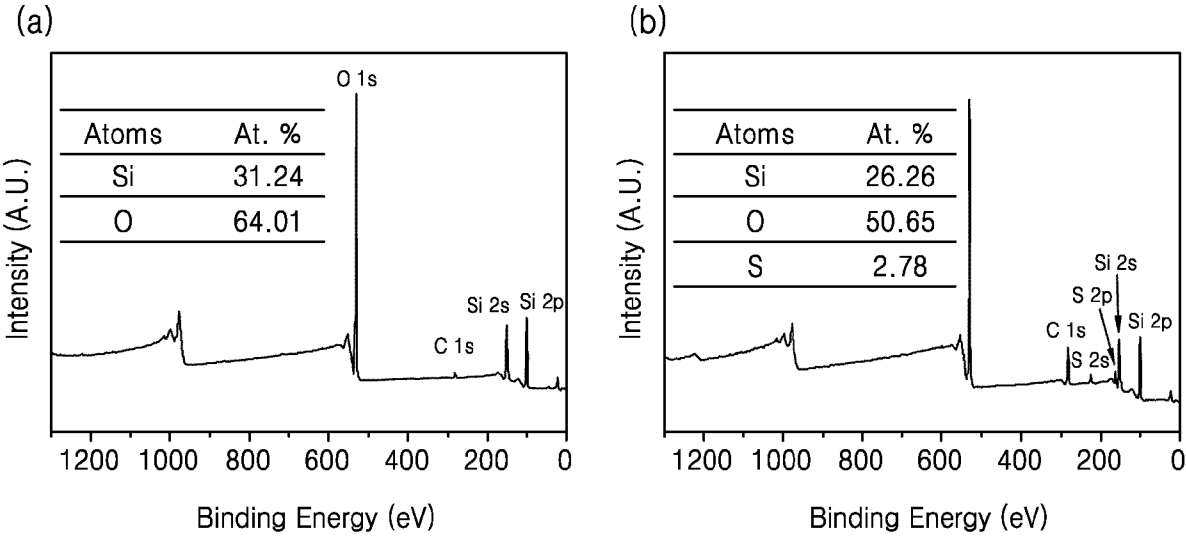




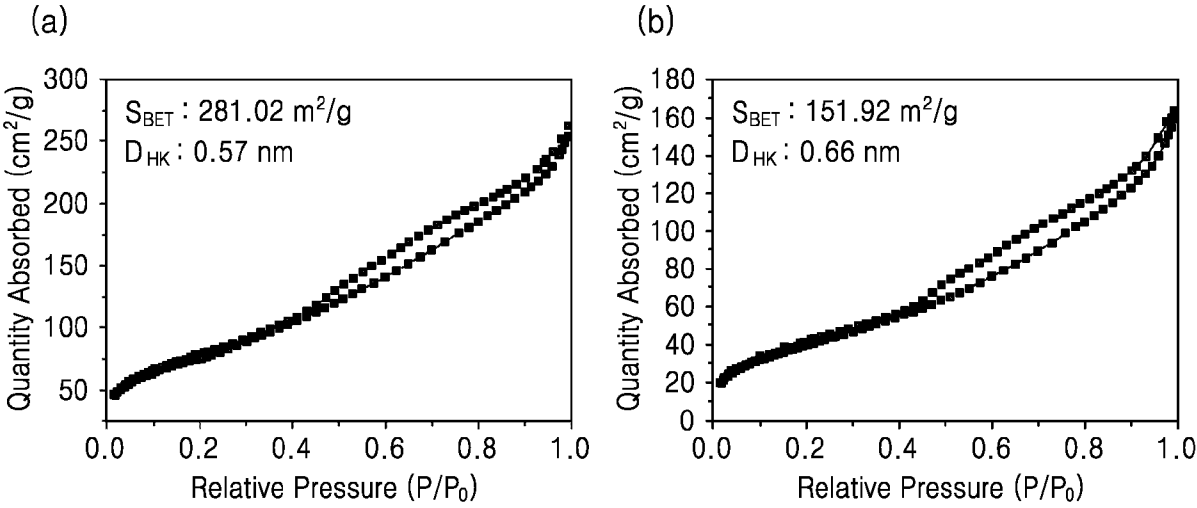
[도5]



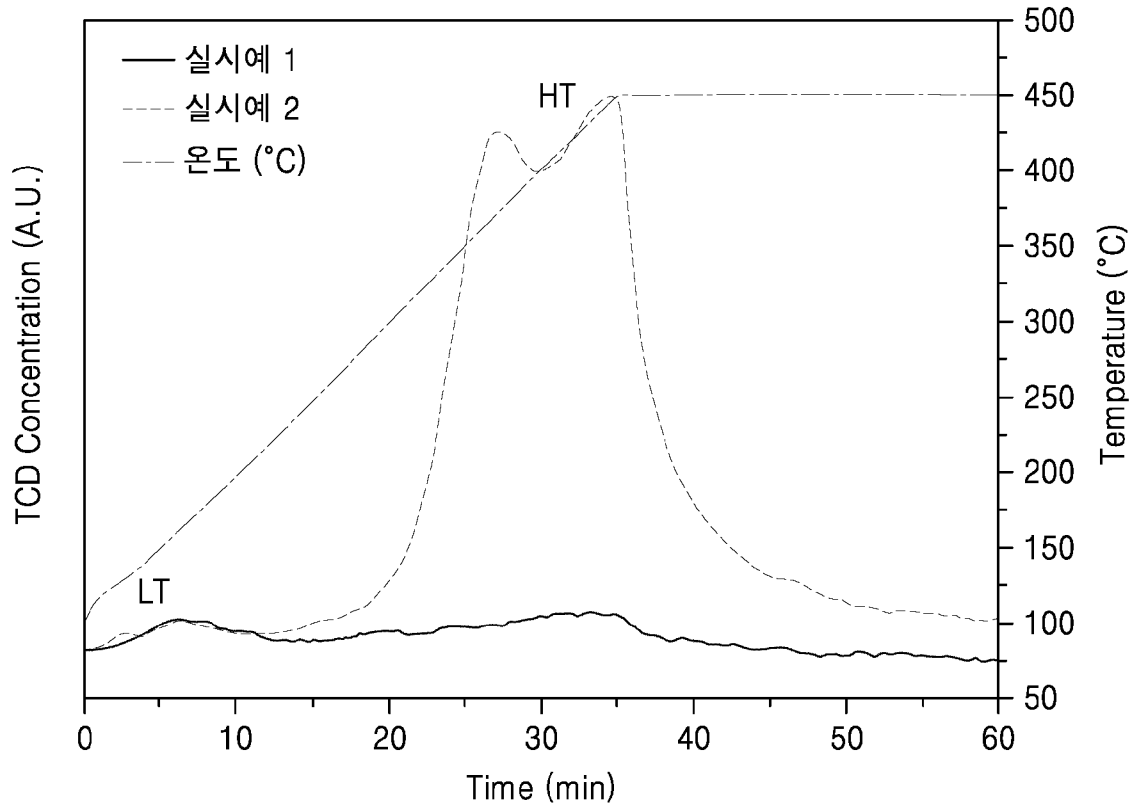
[도6]



[도7]

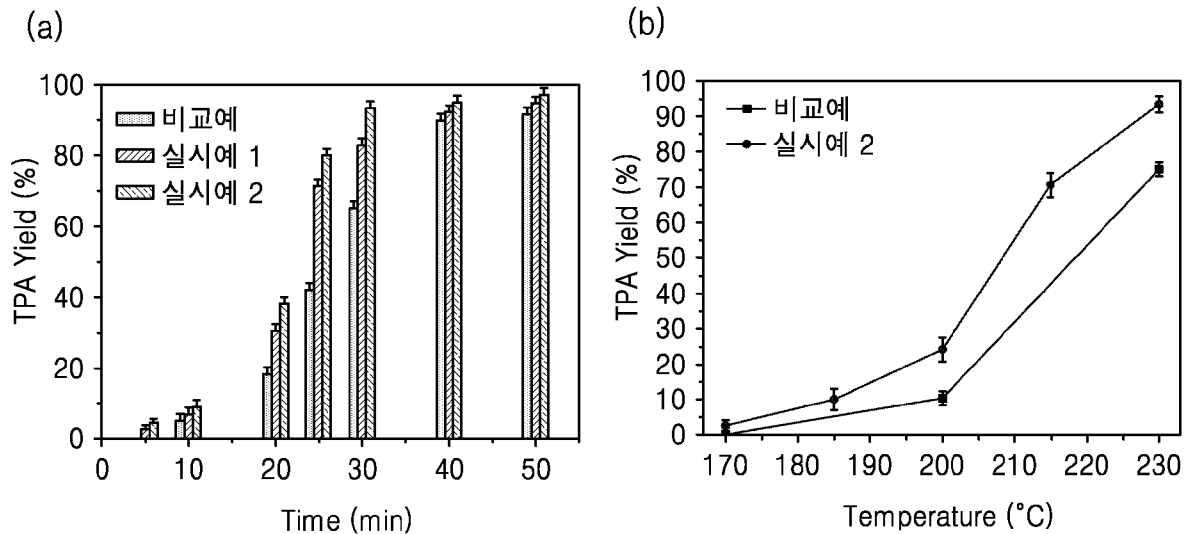


[도8]

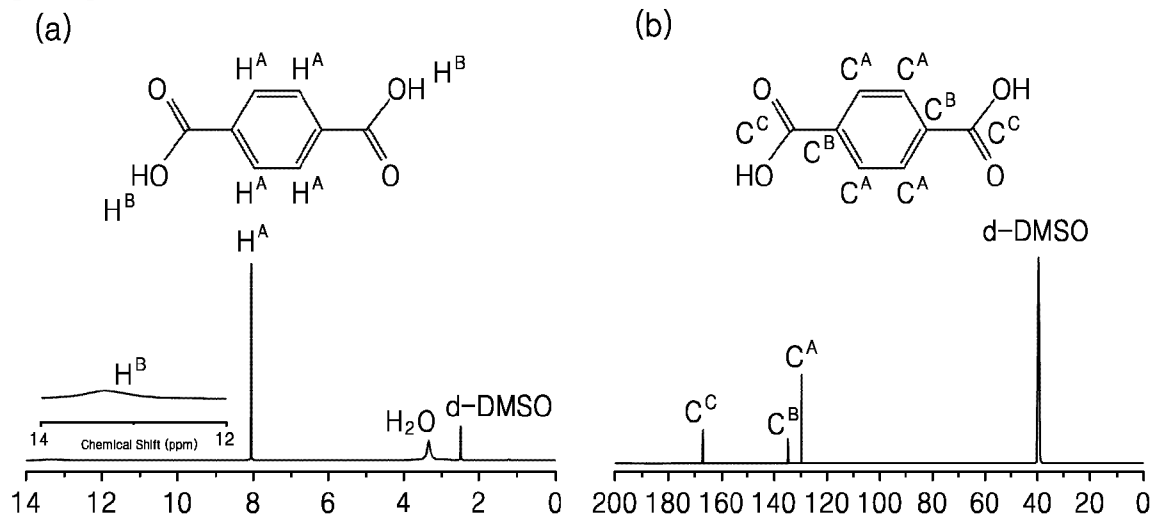


|                       | 실시예1    | 실시예2    |
|-----------------------|---------|---------|
| LT peak (°C)          | 161.6   | 161.6   |
| Acidic sites (mmol/g) | 0.00838 | 0.00838 |
| HT peak (°C)          | —       | 369.4   |
| Acidic sites (mmol/g) | —       | 0.39319 |

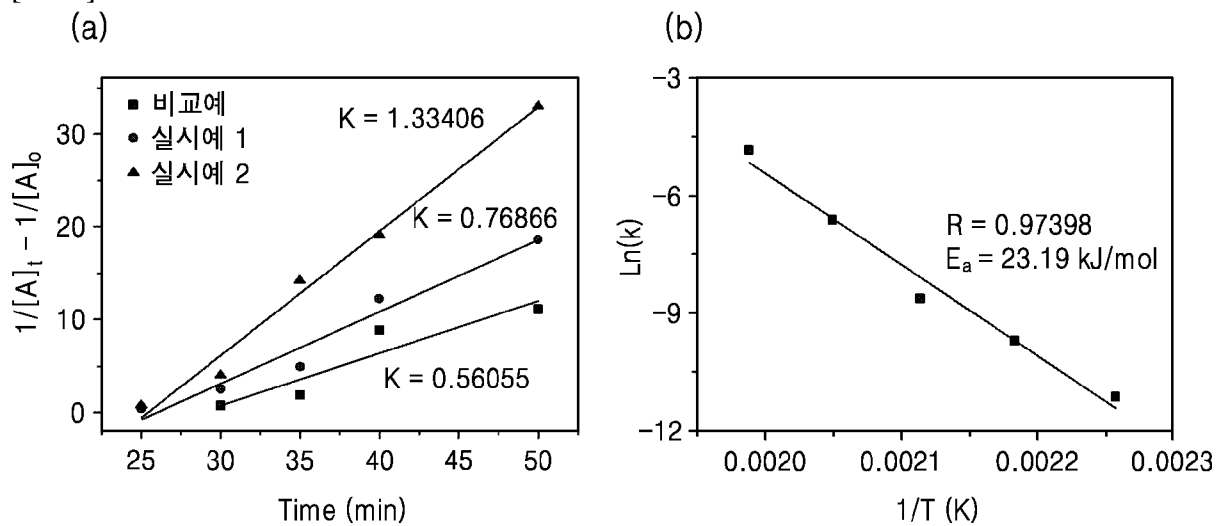
[도9]



[도 10]

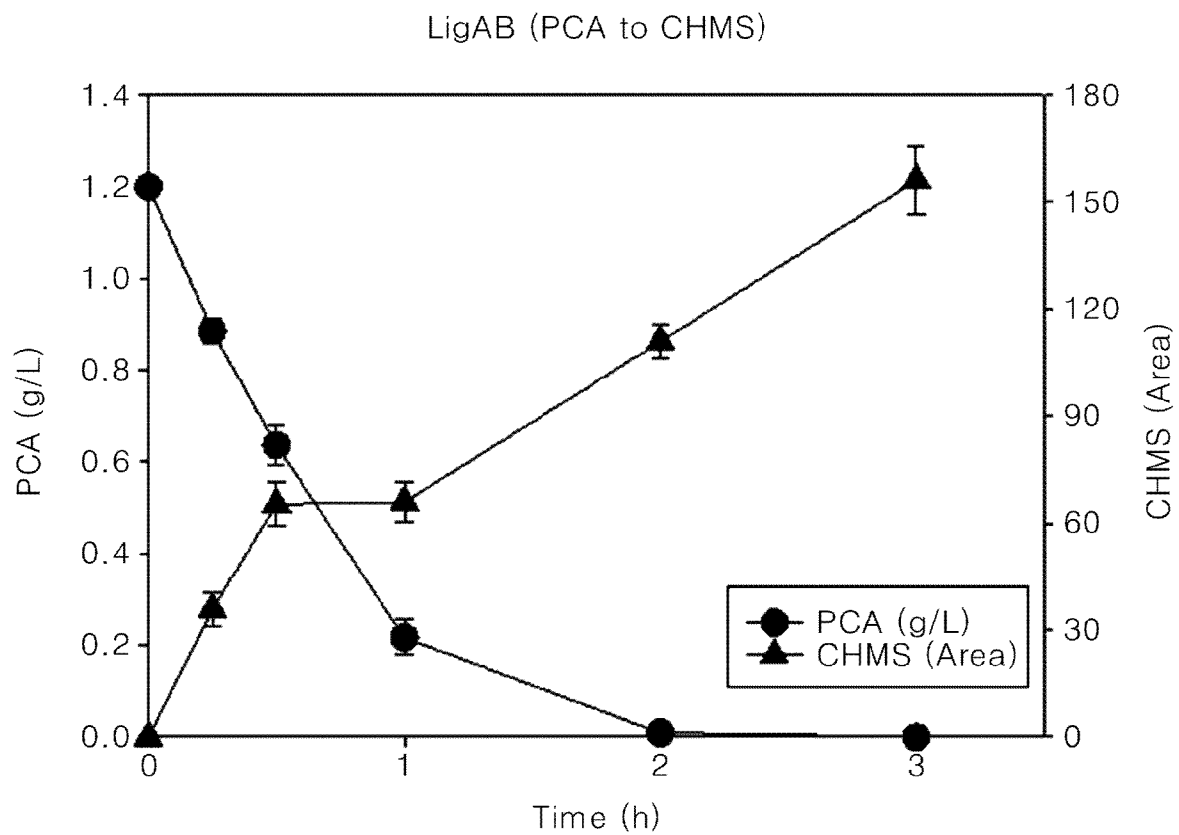


[도 11]

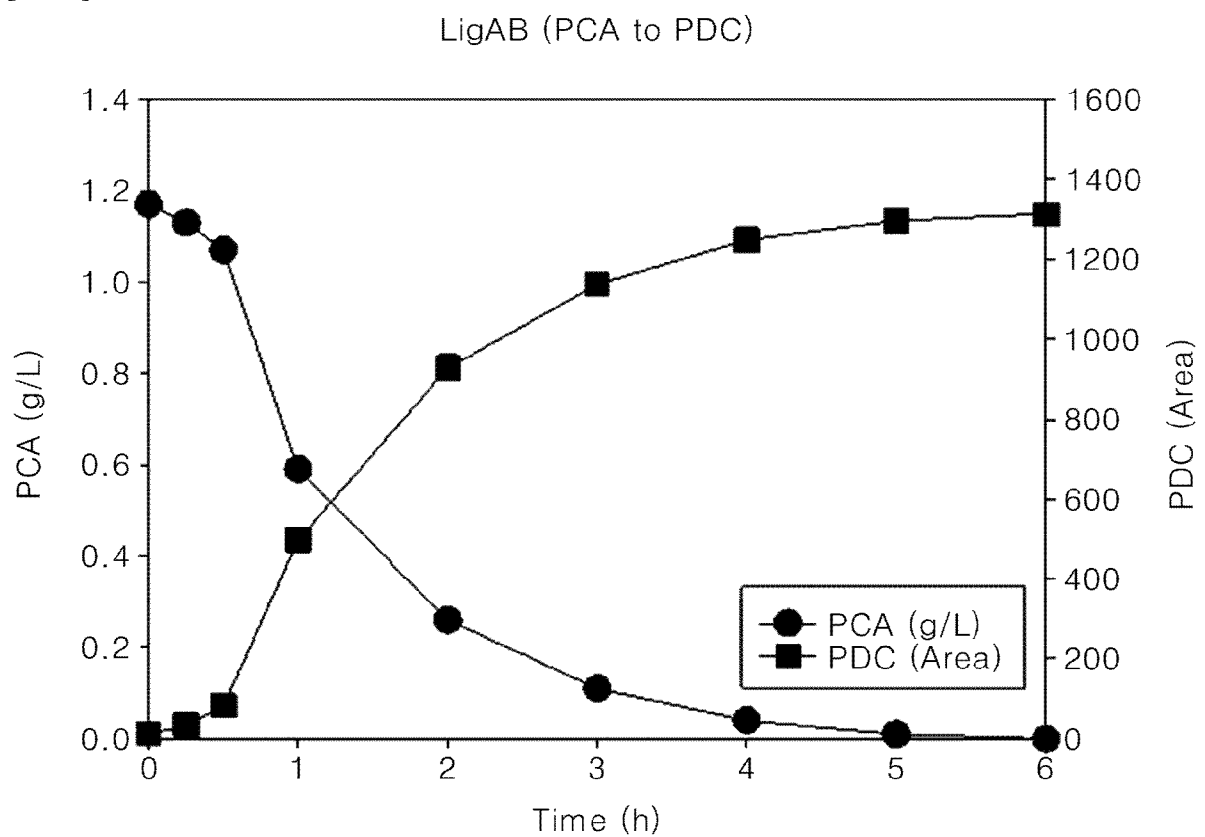




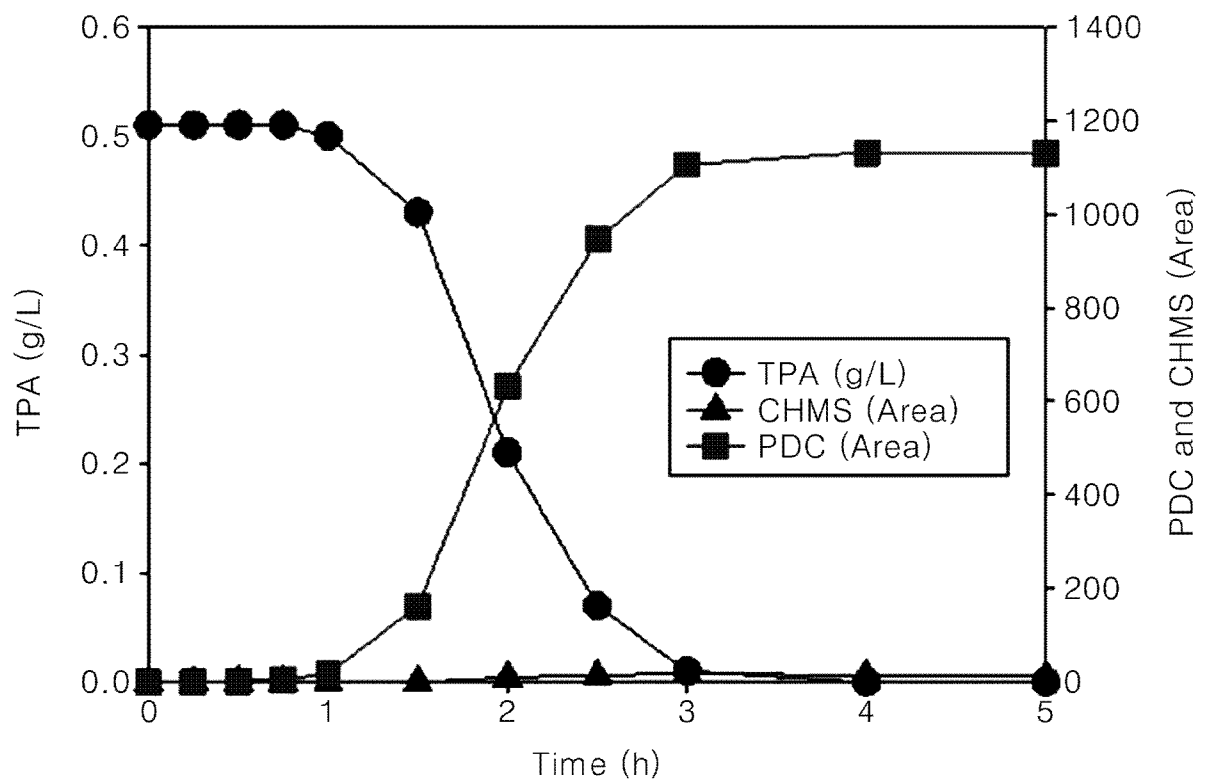
[도12]



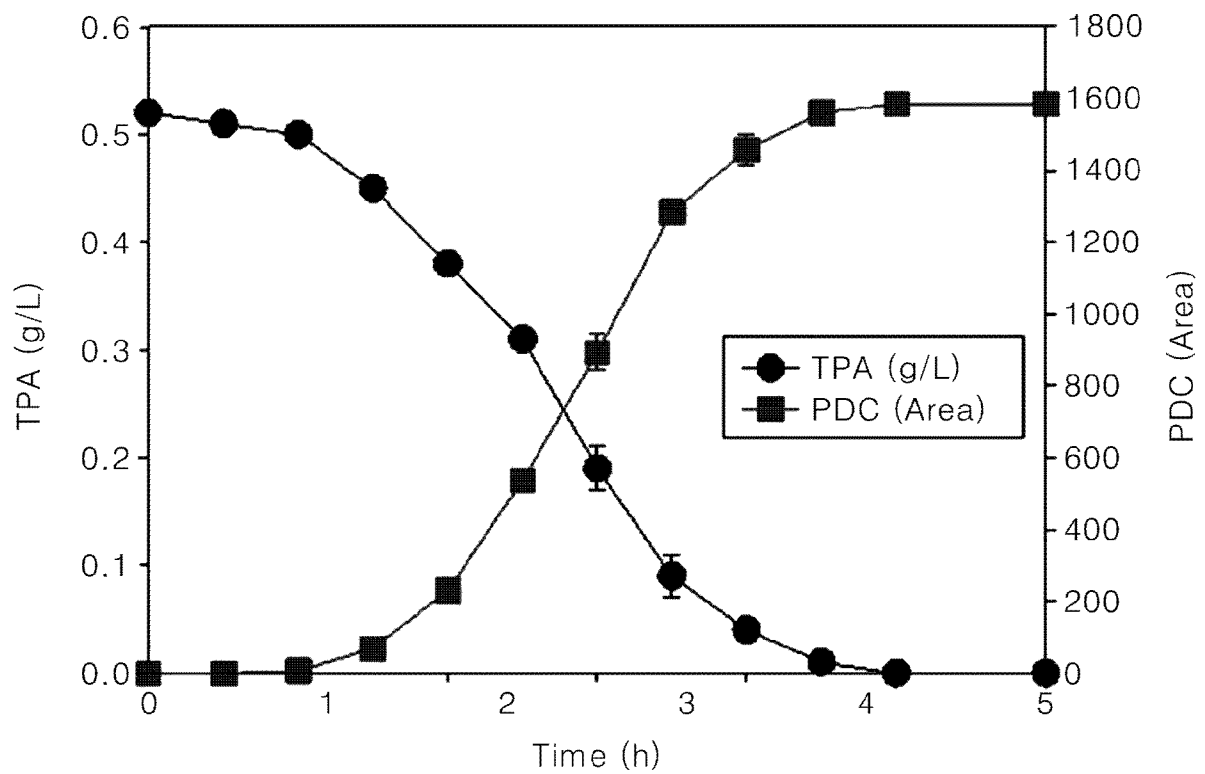
[도13]



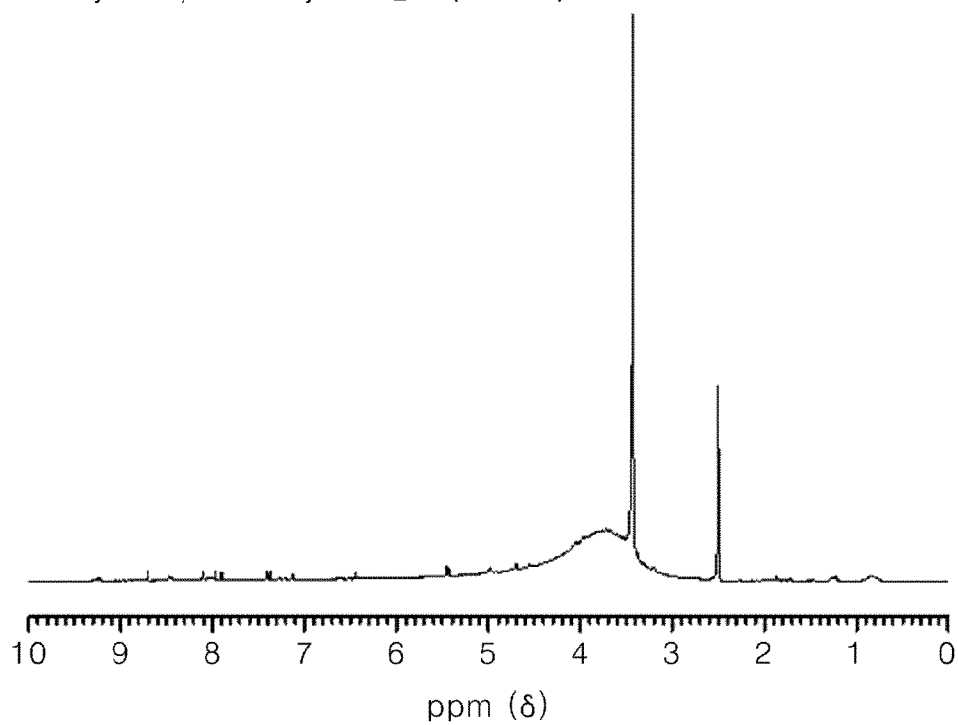
[도14]



[도15]

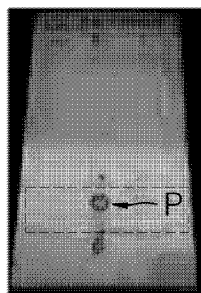


[도 16]

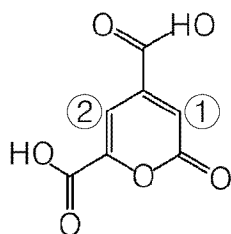
2-Pyrone-4,6-dicarboxylic Acid<sub>Na</sub><sup>+</sup> (PDC-Na<sup>+</sup>)

[도 17]

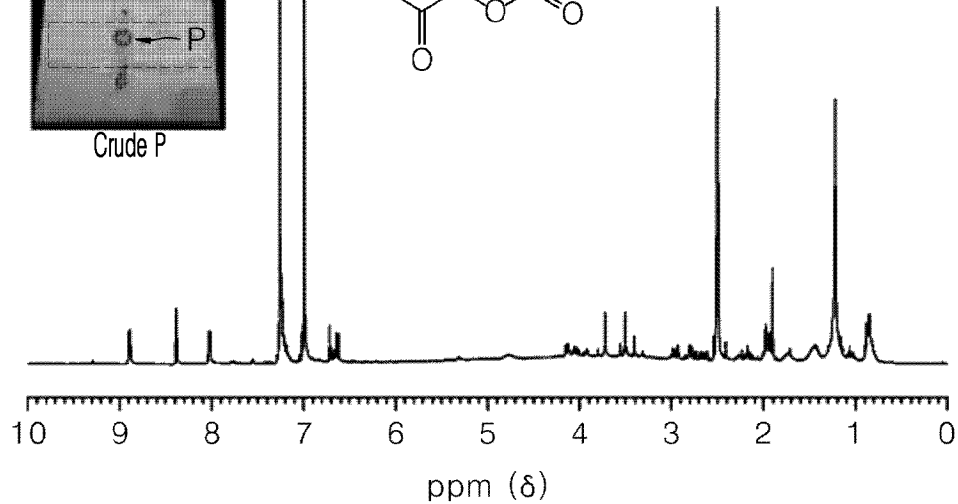
190702\_PDC\_crude\_(HCl-ext-1)\_DMSO(1)

TLC Eluent  
(CHCl<sub>3</sub>:EA:CH<sub>2</sub>O=10:8:1)

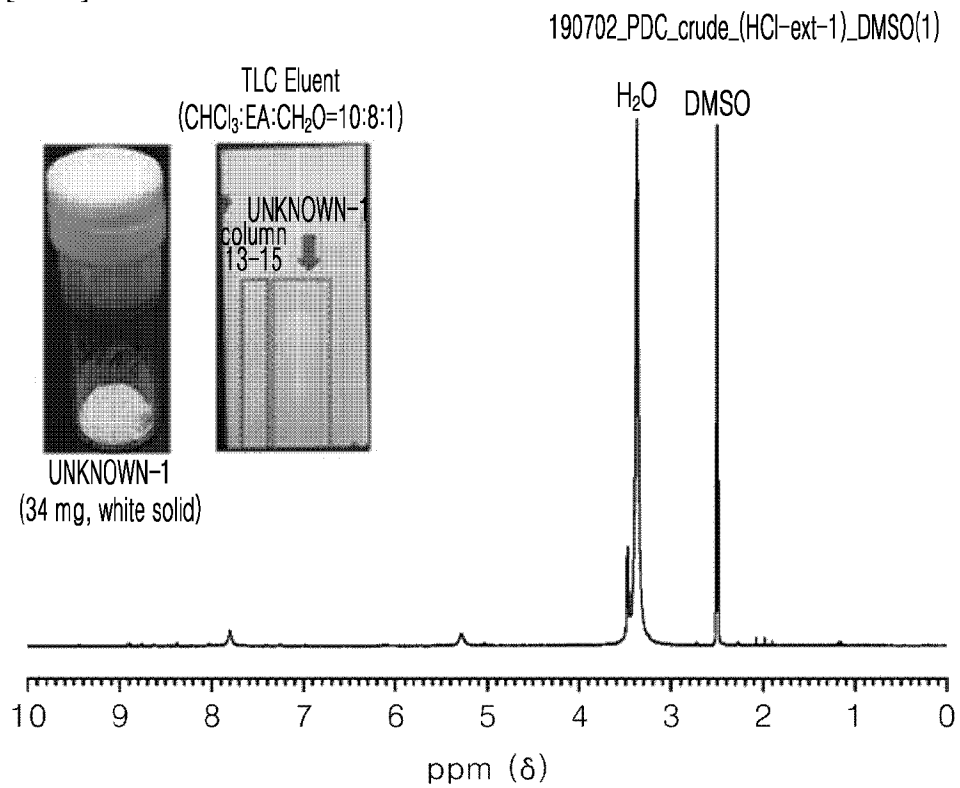
Crude P



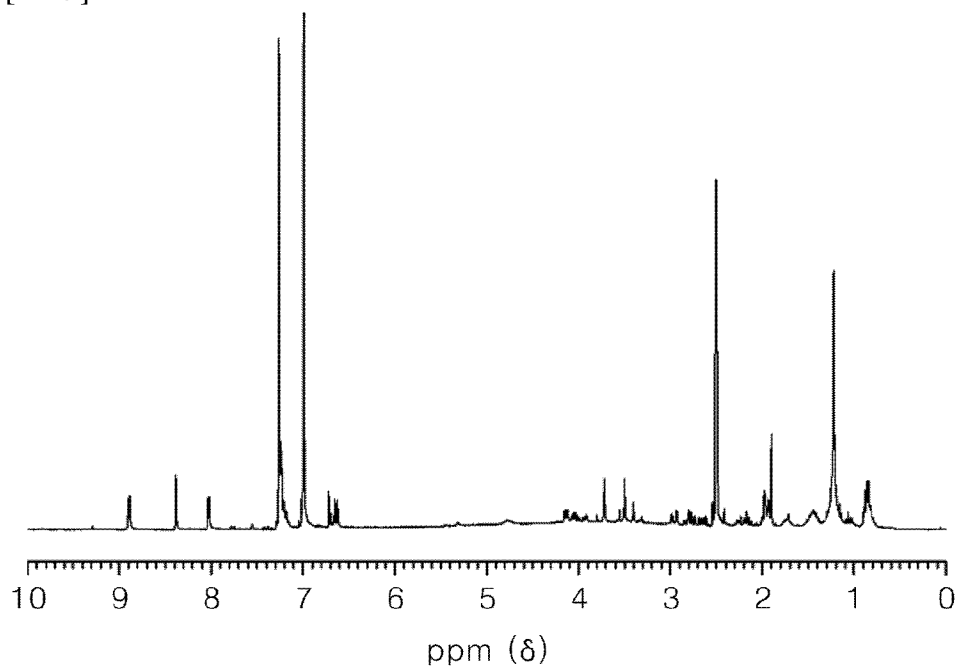
DMSO



[도 18]

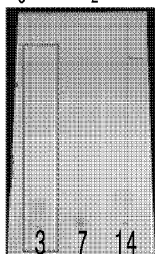


[도 19]

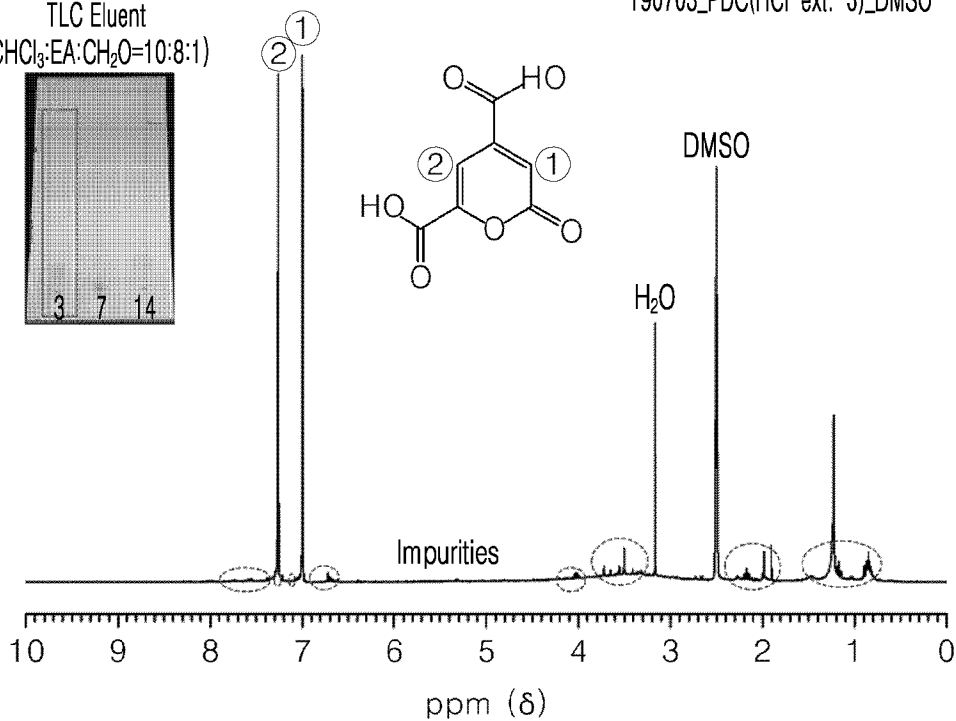


[도20]

Column(2)-PDC product(EA : MeOH = 2 : 1)

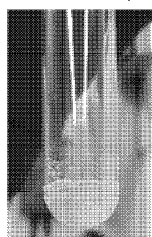
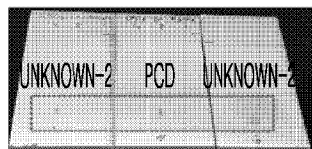
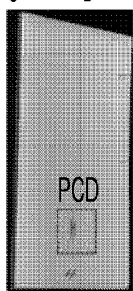
TLC Eluent  
(CHCl<sub>3</sub>:EA:CH<sub>2</sub>O=10:8:1)

190703\_PDC(HCl-ext.-3)\_DMSO

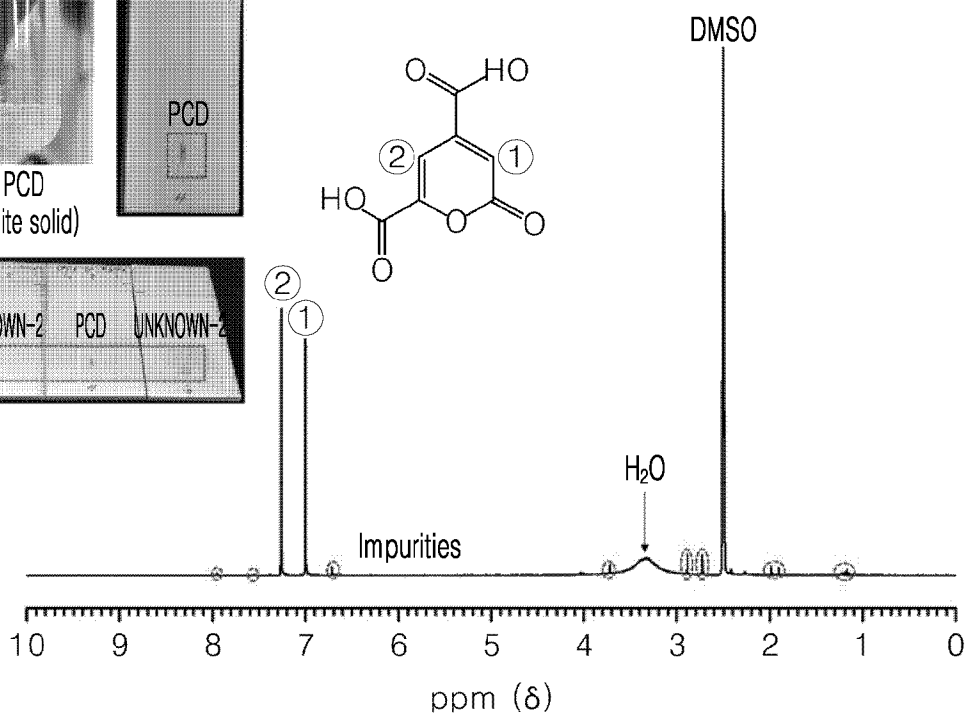


[도21]

Column(2-1)-PDC product(EA 100%)

TLC Eluent  
(CHCl<sub>3</sub>:EA:CH<sub>2</sub>O=10:8:1)PCD  
(white solid)

190704\_PDC(HCl-ext.col(2).-4)\_DMSO



[도22]

Column(3)-PDC product(EA : Hex = 1 : 1)

