



(19) 대한민국특허청(KR)

(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2020년01월15일

(11) 등록번호 10-2066436

(24) 등록일자 2020년01월09일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/40 (2006.01) *C07C 41/18* (2006.01)
C07C 43/205 (2006.01) *C12P 7/24* (2006.01)
C12P 7/62 (2006.01)

(52) CPC특허분류
C12P 7/40 (2013.01)
C07C 41/18 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2018-0112692

(22) 출원일자 2018년09월20일

심사청구일자 2018년09월20일

(56) 선행기술조사문헌

ACS Sustainable Chem. Eng., 2017, Vol. 5, No. 5, pp. 3913-3919*

Wang, Through Lignin Biodegradation to Lignin-based Plastics, The University of Minnesota (2015. 01.)*

JP2017505754 A

*는 심사관에 의하여 인용된 문헌

(73) 특허권자

울산과학기술원

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(72) 발명자

김용환

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

팜 리 탄 마이

울산광역시 울주군 언양읍 유니스트길 50

(74) 대리인

특허법인 무한

전체 청구항 수 : 총 7 항

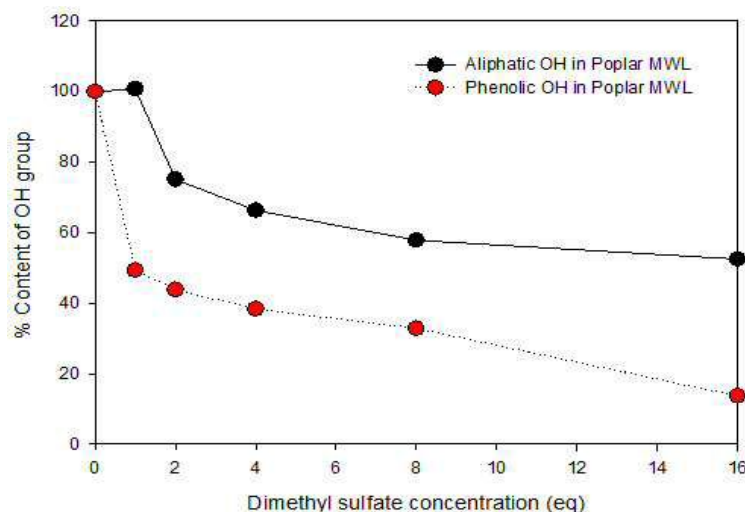
심사관 : 류민정

(54) 발명의 명칭 선택적 메틸화 방법을 이용한 리그닌 분해산물 수득방법

(57) 요약

리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계, 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소를 이용하여 분해하는 단계 및 상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계를 포함하고, 상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 것인, 리그닌 분해산물 수득 방법을 제공한다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C07C 43/2055 (2013.01)

C12P 7/24 (2013.01)

C12P 7/62 (2013.01)

C12Y 111/01014 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1711061308

부처명 과학기술정보통신부

연구관리전문기관 한국연구재단

연구사업명 기후변화대응기술개발

연구과제명 바이오 화학 융복합 기술을 이용한 리그닌의 선택적 해중합을 통한 분해 중간체 생산 원천 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 울산과학기술원

연구기간 2017.12.20 ~ 2018.03.19

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 1415156022

부처명 산업통상자원부

연구관리전문기관 한국산업기술평가관리원

연구사업명 바이오산업핵심기술개발

연구과제명 공정 부산물의 고부가가치 응용제품용 중간 원료화 및 공통 활용 기술 개발

기 여 율 1/2

주관기관 국민대학교산학협력단

연구기간 2017.10.01 ~ 2018.07.31

명세서

청구범위

청구항 1

리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계;

메틸화된 리그닌을 리그닌퍼옥시데이즈(Ligninperoxidase)를 이용하여 분해하는 단계; 및

상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계;

를 포함하고,

상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 것이고,

상기 방향족 화합물은, 3,4-디메톡시벤조산(3,4-dimethoxy benzoic acid), 3,4,5-트리메톡시벤조산(3,4,5-trimethoxy benzoic acid), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxy benzaldehyde), 3,4,5-트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-trimethoxy benzaldehyde), 메틸-3,4,5-트리메톡시벤조에이트(methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)로 구성된 군으로부터 선택되는 것인,

효소를 이용한 리그닌 분해산물 수득 방법.

청구항 2

삭제

청구항 3

제1항에 있어서,

상기 메틸화하는 단계는, 다이메틸설페이트(dimethylsulfate), 다이메틸카보네이트(Dimethylcarbonate) 중 어느 하나에 의한 것인, 효소를 이용한 리그닌 분해산물 수득 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 선택적 메틸화는, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 메틸기 전환율이 50% 미만인, 효소를 이용한 리그닌 분해산물 수득 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 선택적 메틸화는, 상기 분해된 리그닌의 재증합을 저해하는 것인, 효소를 이용한 리그닌 분해산물 수득 방법.

청구항 6

제1항에 있어서,

상기 리그닌은, 활엽수, 침엽수 및 초본류 계열의 목재 중 어느 하나로부터 유래된 것인, 효소를 이용한 리그닌 분해산물 수득 방법.

청구항 7

삭제

청구항 8

제1항에 있어서,

상기 리그닌 분해산물은, 상기 리그닌의 5 내지 20 중량%인, 효소를 이용한 리그닌 분해산물 수득 방법.

청구항 9

제1항의 방법에 의해 수득되는 리그닌 분해산물로,

상기 리그닌 분해산물은, 3,4-디메톡시벤조산(3,4-dimethoxy benzoic acid), 3,4,5-트리메톡시벤조산(3,4,5-trimethoxy benzoic acid), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxy benzaldehyde), 3,4,5-트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-trimethoxy benzaldehyde), 메틸-3,4,5-트리메톡시벤조에이트(methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는, 리그닌 분해산물.

청구항 10

삭제

발명의 설명

기술 분야

- [0001] 리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계, 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소를 이용하여 분해하는 단계 및 상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계를 포함하고, 상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 것인, 리그닌 분해산물 수득 방법이 개시된다.

배경 기술

- [0002] 자연계에서는 매년 수십억톤의 리그닌이 생합성되고 있으며, 펄프제지 및 바이오연료 생산공정에서도 수 천만 톤의 리그닌이 부산물로 발생하고 있다.
- [0003] 리그닌은 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 함께 지구상에 축적되는 유기물 중 가장 많은 양을 차지하고 잘 분해되지 않는 목재 유기물의 주성분으로, 식물의 2차 세포벽에 존재하는 중요한 구성요소이며, 식물의 나이와 목질 조직이 증가함에 따라 그 함량이 증가하는 특성이 있다. 또, 리그닌은 생물권에서 방향족 탄소의 대부분을 차지하는데, 이러한 방향족 물질은 살아있는 유관 속 식물에서 다당류 필라멘트와 섬유의 아교제 역할을 함으로써 조직의 견고함과 강도를 유지하는 역할을 하며, 식물의 물 수송과 미생물 분해에 대한 저항성을 부여하는 작용도 한다는 점에서 중요한 물질이라고 할 수 있다 (Monties and Fukushima, 2001). 식물의 생존에 리그닌이 중요한 역할을 하는 동시에 리그닌의 분해가 탄소원 순환에 있어 중요하다(Crawford, 1981). 아울러, 리그닌은 방향족화합물과 같은 고분자로 이루어져 있어, 분해효소로 분해하면 다량의 방향족화합물을 얻을 수 있다.
- [0004] 또, 리그닌 분해함으로써 생성되는 분해산물은 생물펄핑(biopulping), 생물표백(biobleaching)과 같은 제지 및 펄프 산업에 이용될 수 있고, 리그노셀룰로오스는 사료, 연료 및 기타 유용성화합물로 전환될 수 있으며, 폐수의 오염색 제거나 독성 화합물 처리에 이용될 수도 있다.
- [0005] 리그닌은 탄소-탄소(C-C), 에테르(C-O-C)결합 등과 같은 최소한 12가지의 다른 결합으로 이루어진 매우 복잡한 화합물로서, 분해를 위해 세포 외적인 산화기작에 의한 해중합이 필요하기 때문에 일반적인 효소로는 분해되기 어려우나, 일부 사상성 진균류 특히 백색부후균은 리그닌의 분해능이 높은 것으로 보고되었다.
- [0006] 백색부후균에 의한 리그닌과 오염물질 분해시 생성되는 리그닌 분해효소로 공지된 것으로는 리그닌퍼옥시데이즈(lignin peroxidase, Lip), 망간퍼옥시데이즈(MnP), 락케이즈(laccase) 등이 있으며(Tuor U, Winterhalter K, Fiechter A. 1995. Enzymes of white-rot fungi involved in lignin degradation and ecological determinants for wood decay. Journal of Biotechnology 41(1):1-17), 이들 효소는 균류의 종류에 따라 다르게 나타나고, 분비된 효소에 따라서 기능의 차이가 있다.
- [0007] 리그닌퍼옥시데이즈는 대체로 340여개의 아미노산으로 구성되어 있으며, 약 40kDa의 분자량을 갖는 헴 단백질(heme protein)로, 과산화수소(H₂O₂)의 존재 하에서 리그닌 분자의 비페놀부위(non-phenol residues)로부터 하나의 전자를 방출시켜 양이온 라디칼(radical)을 만들고, 이러한 라디칼은 산화 반응을 통하여 궁극적으로 리그닌을 산화시키고 해중합시킨다. 반면에, 망간퍼옥시데이즈와 락케이즈는 단지 리그닌의 페놀 부위를 산화시키

는 기능만 수행한다.

[0008] 망간퍼옥시데이즈는 리그닌퍼옥시데이즈와 마찬가지로 리그닌을 분해하는 공통된 퍼옥시데이즈로, 헴단백질을 포함하는 당단백질로 38,000~62,500 Da 정도의 분자량을 갖는 분해효소이다.

[0009] 이들은 대부분 곰팡이로부터 분비되며 자연계에서 리그닌을 분해한다. 그러나 위와 같은 리그닌 분해효소를 이용하여 리그닌을 분해하는 경우, 분해된 산물이 재증합되어 분해효율이 매우 적다는 단점이 있으며, 바이오연료 제조 등을 위한 대규모 공정에서는 낮은 안정성, 낮은 활성을 나타내며 보결 그룹(prosthetic group)을 필요로 하기 때문에 그 응용이 어려운 것으로 알려져 있다. 특히, 상기 3종의 분해효소 중 가장 높은 활성을 나타내는 리그닌퍼옥시데이즈는 분해활성을 위해서 과산화수소를 필수적으로 요하는 것으로 알려져 있는데, 리그닌퍼옥시데이즈의 헴(Heme) 작용기가 과산화수소에 의해 쉽게 공격을 받아 파괴되어, 빠르게 불활성화되는 낮은 안정성이 상업적 이용의 걸림돌로 작용하고 있었다.

[0010] 따라서, 리그닌 분해효소로 리그닌을 분해하여 방향족화합물을 획득하기 위해서는 리그닌을 분해하여 수득되는 방향족화합물의 재증합을 막고, 동시에 리그닌 분해효소의 지속적인 활성상태를 유지하기 위한 방안이 필요한 바이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0011] (특허문헌 0001) 한국등록특허 제1423689호, “근임계수 상에서 고체 염기촉매를 사용하여 리그닌의 β -0-4 결합을 가수분해하여 방향족 화합물을 생성하는 방법” (공개일: 2014.02.07)

(특허문헌 0002) 한국등록특허 제1627538호, “리그닌 분해용 촉매, 알코올류 및 유기산류의 제조 방법, 리그닌 분해 생성물의 제조 방법, 방향족 탄화수소 분해용 촉매, 수소 이온의 유리 방법, 그리고 포르피린” (공개일: 2011.05.25)

발명의 내용

해결하려는 과제

[0012] 본 발명의 목적은 리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계, 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소를 이용하여 분해하는 단계 및 상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계를 포함하고, 상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 것인, 리그닌 분해산물 수득 방법을 제공하는 것이다.

[0013] 그러나, 본 발명이 해결하고자 하는 과제는 이상에서 언급한 과제로 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 해당 기술분야의 통상의 지식을 가진 자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0014] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계; 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소를 이용하여 분해하는 단계; 및 상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계;를 포함하고, 상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 것인, 리그닌 분해산물 수득 방법이 제공된다.

[0015] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해효소는, 리그닌퍼옥시데이즈(Ligninperoxidase)일 수 있다.

[0016] 일 측에 따르면, 상기 메틸화하는 단계는, 다이메틸설페이트(dimethylsulfate), 다이메틸카보네이트(Dimethylcarbonate) 중 어느 하나에 의한 것일 수 있다.

[0017] 일 측에 따르면, 상기 선택적 메틸화는, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 메틸기 전환율이 50% 미만일 수 있다.

[0018] 일 측에 따르면, 상기 선택적 메틸화는, 상기 분해된 리그닌의 재증합을 저해하는 것일 수 있다.

[0019] 일 측에 따르면, 상기 리그닌은, 활엽수, 침엽수 및 초본류 계열의 목재 중 어느 하나로부터 유래된 것일 수 있다.

다.

[0020] 일 측에 따르면, 상기 방향족 화합물은, 3,4-디메톡시벤조산(3,4-dimethoxy benzoic acid), 3,4,5-트리메톡시벤조산(3,4,5-trimethoxy benzoic acid), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxy benzaldehyde), 3,4,5-트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-trimethoxy benzaldehyde), 메틸-3,4,5-트리메톡시벤조에이트(methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.

[0021] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해산물은, 상기 리그닌의 5 내지 20 중량%일 수 있다.

[0022] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계; 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소를 이용하여 분해하는 단계; 및 상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계;를 포함하고, 상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 방법에 의해 수득되는 리그닌 분해산물이 제공된다.

[0023] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해산물은 3,4-디메톡시벤조산(3,4-dimethoxy benzoic acid), 3,4,5-트리메톡시벤조산(3,4,5-trimethoxy benzoic acid), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxy benzaldehyde), 3,4,5-트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-trimethoxy benzaldehyde), 메틸-3,4,5-트리메톡시벤조에이트(methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0024] 본 발명의 방법을 이용하면, 리그닌의 페닐계-수산화기를 선택적으로 메틸화함으로써, 분해된 화합물이 재중합되는 현상을 완화할 수 있어, 선택적 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소로 분해하면, 고수율로 방향족 화합물을 수득할 수 있어, 경제적이고 친환경적이다.

[0025] 그러나 본 발명의 효과는 상기한 효과로 한정되는 것은 아니며, 본 발명의 상세한 설명 또는 청구범위에 기재된 발명의 구성으로부터 추론 가능한 모든 효과를 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

도면의 간단한 설명

[0026] 도 1은 따른 활엽수(포플라) 유래 리그닌 수산화기의 메틸기 전환율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 2는 침엽수(소나무) 유래 리그닌 수산화기의 함량을 표로 나타낸 것이다.

도 3은 침엽수(소나무) 유래 리그닌 수산화기의 메틸기 전환율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 4는 초본류(갈대) 유래 리그닌 수산화기의 함량을 표로 나타낸 것이다.

도 5는 초본류(갈대) 유래 리그닌 수산화기의 메틸기 전환율을 그래프로 나타낸 것이다.

도 6은 일 실시예에 따른 리그닌 이량체의 전환율 및 분해효율을 도시한 것이다.

도 7은 다른 일 실시예에 따른 리그닌 이량체의 전환율 및 분해효율을 나타낸 것이다.

도 8은 고속 액체 크로마토 그래피(HPLC)를 통해 리그닌 분해산물을 확인한 실험결과를 그래프로 나타낸 것이다.

도 9는 고속 액체 크로마토 그래피(HPLC)로 확인된 5종의 방향족 화합물을 나타낸 것이다.

도 10은 선택적 메틸화된 리그닌의 구조 및 이를 분해하여 수득되는 리그닌 분해산물의 구조를 나타낸 것이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0027] 이하에서, 첨부된 도면을 참조하여 실시예들을 상세하게 설명한다. 그러나, 실시예들에는 다양한 변경이 가해질 수 있어서 특허출원의 권리 범위가 이러한 실시예들에 의해 제한되거나 한정되는 것은 아니다. 실시예들에 대한 모든 변경, 균등물 내지 대체물이 권리 범위에 포함되는 것으로 이해되어야 한다.

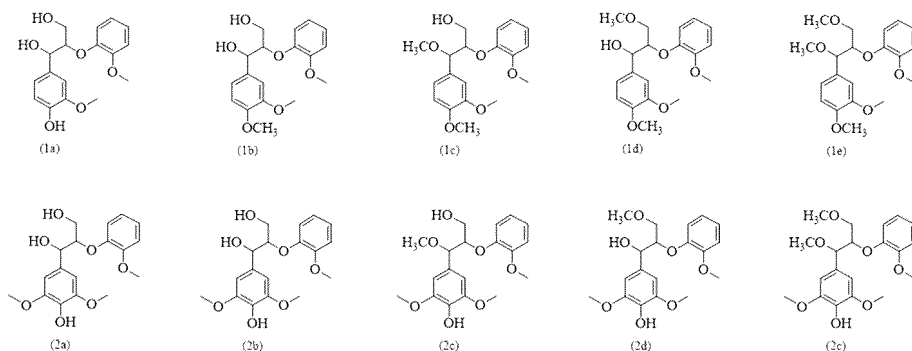
[0028] 실시예에서 사용한 용어는 단지 설명을 목적으로 사용된 것으로, 한정하려는 의도로 해석되어서는 안된다. 단수의 표현은 문맥상 명백하게 다르게 뜻하지 않는 한, 복수의 표현을 포함한다. 본 명세서에서, "포함하다" 또는 "가지다" 등의 용어는 명세서 상에 기재된 특징, 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것이 존재함을 지정하려는 것이지, 하나 또는 그 이상의 다른 특징들이나 숫자, 단계, 동작, 구성요소, 부품 또는 이들을 조합한 것들의 존재 또는 부가 가능성을 미리 배제하지 않는 것으로 이해되어야 한다.

- [0029] 다르게 정의되지 않는 한, 기술적이거나 과학적인 용어를 포함해서 여기서 사용되는 모든 용어들은 실시예가 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자에 의해 일반적으로 이해되는 것과 동일한 의미를 가지고 있다. 일반적으로 사용되는 사전에 정의되어 있는 것과 같은 용어들은 관련 기술의 문맥 상 가지는 의미와 일치하는 의미를 가지는 것으로 해석되어야 하며, 본 출원에서 명백하게 정의하지 않는 한, 이상적이거나 과도하게 형식적인 의미로 해석되지 않는다.
- [0030] 또한, 첨부 도면을 참조하여 설명함에 있어, 도면 부호에 관계없이 동일한 구성 요소는 동일한 참조부호를 부여하고 이에 대한 중복되는 설명은 생략하기로 한다. 실시예를 설명함에 있어서 관련된 공지 기술에 대한 구체적인 설명이 실시예의 요지를 불필요하게 흐릴 수 있다고 판단되는 경우 그 상세한 설명을 생략한다.
- [0031] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계; 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소를 이용하여 분해하는 단계; 및 상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계;를 포함하고, 상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 것인, 리그닌 분해산물 수득 방법이 제공된다.
- [0032] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해효소는, 리그닌퍼옥시데이즈(Ligninperoxidase)일 수 있다.
- [0033] 일 측에 따르면, 상기 메틸화하는 단계는, 다이메틸설페이트(dimethylsulfate), 다이메틸카보네이트(Dimethylcarbonate) 중 어느 하나에 의한 것일 수 있다.
- [0034] 일 측에 따르면, 상기 선택적 메틸화는, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 메틸기 전환율이 50% 미만일 수 있다.
- [0035] 일 측에 따르면, 상기 선택적 메틸화는, 상기 분해된 리그닌의 재증합을 저해하는 것일 수 있다.
- [0036] 일 측에 따르면, 상기 리그닌은, 활엽수, 침엽수 및 초본류 계열의 목재 중 어느 하나로부터 유래된 것일 수 있다.
- [0037] 일 측에 따르면, 상기 방향족 화합물은, 3,4-디메톡시벤조산(3,4-dimethoxy benzoic acid), 3,4,5-트리메톡시벤조산(3,4,5-trimethoxy benzoic acid), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxy benzaldehyde), 3,4,5-트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-trimethoxy benzaldehyde), 메틸-3,4,5-트리메톡시벤조에이트(methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)로 구성된 군으로부터 선택되는 것일 수 있다.
- [0038] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해산물은, 상기 리그닌의 5 내지 20 중량%일 수 있다.
- [0039] 본 발명의 다른 일 실시예에 따르면, 리그닌의 수산화기를 선택적 메틸화하는 단계; 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소를 이용하여 분해하는 단계; 및 상기 분해하는 단계로부터 방향족 화합물을 포함하는 분해산물을 수득하는 단계;를 포함하고, 상기 선택적 메틸화는 리그닌의 수산화기 중 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 포함하는 작용기를 선택적으로 메틸화하는 방법에 의해 수득되는 리그닌 분해산물이 제공된다.
- [0040] 일 측에 따르면, 상기 리그닌 분해산물은 3,4-디메톡시벤조산(3,4-dimethoxy benzoic acid), 3,4,5-트리메톡시벤조산(3,4,5-trimethoxy benzoic acid), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxy benzaldehyde), 3,4,5-트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-trimethoxy benzaldehyde), 메틸-3,4,5-트리메톡시벤조에이트(methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)로 구성된 군으로부터 선택되는 어느 하나 이상을 포함하는 것일 수 있다.
- [0041] 본 발명을 이용하여 리그닌 분해산물을 수득하는 방법으로, 먼저 리그닌 수산화기를 선택적으로 메틸화하는 단계를 수행한다.
- [0042] 리그닌은 페놀계 수산화기(Phenolic-OH) 및 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)를 가지고 있으며, 상기 리그닌을 분해하면 분해산물의 수산화기에 의해 재증합되어 분해효소의 활성을 저해하게 된다. 후술하는 실시예를 통해 검증한 바에 따르면, 분해효소에 의해 생성되는 분해산물인 방향족 화합물에 포함된 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)에 의해 방향족화합물 간의 재증합이 일어나 분해효율이 떨어짐이 확인되었다. 반면, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)는 메틸화가 되면 오히려 리그닌의 분해효율이 떨어짐을 확인할 수 있었다.
- [0043] 따라서, 리그닌 분해산물인 방향족 화합물의 재증합을 억제하여 분해효율을 높이기 위해서는, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)는 상대적으로 높은 확률로 메틸화 시키고, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)는 낮은 확률로 메틸화를 시킬 수 있는 리그닌의 선택적 메틸화가 필요하다.
- [0044] 메틸화에 사용되는 메틸화제는 공지된 것이면 사용 가능하고, 특별히 제한을 두는 것은 아니다.

- [0045] 그러나, 일반적인 메틸 브로마이드(methyl bromide)나 메틸 아이오다이드(methyl iodide)와 같은 물질은 메틸기를 비선택적으로 공여하는 성격이 있다는 점에서 본 발명의 적용에는 적합하지 않다.
- [0046] 상기 선택적 메틸화의 원리는 약염기성 촉매이면서 동시에 메틸 작용기의 공여체로 작용하는 물질을 이용하여 선택적으로 메틸화가 가능하다. 따라서, 본 발명의 선택적 메틸화에는 상기 다이메틸설페이트(dimethylsulfate) 또는 다이메틸카보네이트(Dimethylcarbonate)와 같은 메틸화제를 사용함이 보다 바람직하다.
- [0047] 또, 상기 선택적 메틸화는 분해된 리그닌의 재중합을 저해하는 효과를 구현하기 위한 실험조건에서 반응이 진행됨이 바람직하다. 아울러, 상기 선택적 메틸화를 통해 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)는 높은 확률로 메틸화 시키되, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)는 낮은 확률로 메틸화가 되도록 함이 바람직하다.
- [0048] 일 실시예에 따르면, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)의 메틸기 전환율은 50% 이상, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 메틸기 전환율은 50% 미만임이 바람직하다.
- [0049] 더 구체적으로는 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)의 메틸기 전환율은 60% 이상, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 메틸기 전환율은 50% 미만임이 바람직하다.
- [0050] 보다 더 구체적으로는 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)의 메틸기 전환율은 70% 이상, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 메틸기 전환율은 40% 미만임이 바람직하다.
- [0051] 가장 바람직하게는, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)의 메틸기 전환율은 80% 이상, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 메틸기 전환율은 30% 미만인 선택적 메틸화된 리그닌을 이용하여 다량의 리그닌 분해산물을 획득할 수 있다.
- [0052] 상기 다이메틸설페이트(dimethylsulfate), 다이메틸카보네이트(Dimethylcarbonate)는 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)에 메틸기를 공여하는 능력은 상대적으로 적고 쉽게 양성자를 해리시키는 특성이 있다. 동시에, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)에는 좀 더 빠르게 메틸기를 공여하는 특성을 가지고 있다. 이러한 특성으로 인해, 상기 다이메틸설페이트(dimethylsulfate), 다이메틸카보네이트(Dimethylcarbonate)와 같은 메틸화제를 이용하면, 리그닌의 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)에 높은 확률로 선택적인 메틸화가 가능하다. 이 경우, 메틸화 정도를 조절하는 것은 메틸화제의 함량을 조절함으로써 가능하다. 보다 구체적인 메틸화 조절은 실시예를 통해 후술하도록 한다.
- [0053] 리그닌에 선택적으로 메틸화가 되면, 리그닌 분해효소를 이용하여 이를 분해한다. 이 때, 사용되는 리그닌 분해효소는 통상적으로 이용되는 리그닌퍼옥시데이즈(Lignin peroxidase), 망간퍼옥시데이즈(Mangan peroxidase) 및 락케이즈(laccase) 등이 이용될 수 있으며, 특별히 제한되는 것은 아니나, 리그닌퍼옥시데이즈임이 바람직하다.
- [0054] 진술한 방법으로 선택적 메틸화된 리그닌을 리그닌 분해효소로 분해하면 리그닌 분해산물을 수득할 수 있다.
- [0055] 본 발명의 선택적 메틸화된 리그닌을 분해하여 획득되는 리그닌 분해산물은 선택적 메틸화되지 않은 리그닌을 이용한 분해산물과는 상이한 것이다.
- [0056] 구체적으로는, 본 발명의 방법에 의해 수득되는 리그닌 분해산물은 방향족 화합물을 포함한다. 또, 상기 리그닌 분해산물은 바닐린, 시린알데히드(syringaldehyde), p-hydroxybenzaldehyde, 바닐산, 시린지산 등과 같은 방향족 단량체가 포함된 공지된 화합물일 수 있다.
- [0057] 더 구체적으로는, 상기 방향족 화합물은 3,4-디메톡시벤조산(3,4-dimethoxy benzoic acid), 3,4,5-트리메톡시벤조산(3,4,5-trimethoxy benzoic acid), 3,4-디메톡시벤즈알데히드(3,4-dimethoxy benzaldehyde), 3,4,5-트리메톡시벤즈알데히드(3,4,5-trimethoxy benzaldehyde), 메틸-3,4,5-트리메톡시벤조에이트(methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate)로 구성된 군으로부터 선택되는 적어도 하나임이 바람직하다.
- [0058] 도 10은 상술한 내용으로 선택적 메틸화된 리그닌의 구조 및 이를 분해하여 수득되는 리그닌 분해산물의 구조를 나타낸 것이다.
- [0059] 도 10을 참고하면, 합성한 리그닌 이량체를 메틸화 유무에 따라 메틸화되지 않은 리그닌을 이용한 도 10의 (a)와 메틸화된 리그닌을 이용한 (b)로 각각 나누어 분해효소로 분해한 결과, (a)와 같이 선택적 메틸화가 되지 않은 리그닌은 분해산물이 획득되지 않은 반면, (b)와 같이 선택적 메틸화된 리그닌은 분해산물로 리그닌 단량체가 획득됨을 확인하였다.

- [0061] 보다 구체적인 설명은 이하의 실시예를 통해 후술하도록 한다.
- [0063] 실시예 1.
- [0064] 활엽수(포플라)유래 리그닌(이량체)를 0.5 M의 수산화나트륨(NaOH)과 다양한 농도의 다이메틸설페이트(dimethylsulfate)를 이용하여 메틸화 반응을 수행하였다.
- [0065] 이 때, 메틸화제로 사용된 다이메틸설페이트(dimethylsulfate)의 농도를 다양하게 하는 이유는, 리그닌의 메틸화 정도를 조절하기 위함이었다. 메틸화제를 첨가하기 전, 합성한 리그닌 이량체에 존재하는 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)를 정량하였다. 이 후, 다이메틸설페이트(dimethylsulfate)는 정량한 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)의 1.6배, 3.3배, 5배 및 16배 몰 당량으로 첨가하여 메틸화 반응을 진행하였다. 상기 메틸화 반응은 45 °C에서 3시간 동안 수행되었다. 반응이 종료되고, 메틸화된 혼합물(화합물)을 에틸 아세테이트(Ethyl acetate)로 추출한 후, 에틸 아세테이트 층은 질소 가스 퍼징하여 증발시켰다. 이 후, 남아있는 시료를 31P-NMR 및 GC/MS 분석을 이용하여 수산화기의 함량 및 메틸화 반응 효율을 정량하였다.
- [0066] 분석 결과, 도 1에 도시한 바와 같이, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)는 약 90%가 메틸화되어 전환되는 것에 반해, 알리파틱 수산화기(Aliphatic-OH)의 경우 약 40%만 전환되고 나머지 수산화기는 메틸화가 진행되지 않았음을 확인하였다. 또, 이와 동일한 실험을 침엽수(소나무) 리그닌 및 초본류(갈대) 유래 리그닌으로 진행한 경우에도 유사한 결과가 나타났다.
- [0067] 도 2는 전술한 방법과 동일한 방법으로 소나무 유래 리그닌에 선택적 메틸화를 진행한 결과를 나타낸 것이다. 도 2를 보면, 도시된 표의 왼쪽에 리그닌 타입(Lignin type)은 메틸화된 소나무 유래 리그닌(Pine MWL)에 여러 배수의 다이메틸설페이트(dimethylsulfate)를 투입하여 메틸화 반응을 수행한 것을 나타낸 것이다. 도시된 바와 같이, 높은 확률로 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)가 메틸화 된 것을 확인할 수 있다.
- [0068] 도 3은 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)와 알리파틱 수산화기(Aliphatic-OH)의 메틸화 비율을 그래프로 나타낸 것이다. 도시된 바와 같이, 다이메틸설페이트(dimethylsulfate)의 투입량이 증가함에 따라, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)의 수산화기의 함량은 감소하고 있는 반면, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 수산화기 함량은 큰 변화가 없었다. 따라서, 다이메틸설페이트(dimethylsulfate)의 투입량을 조절함으로써 선택적인 메틸화가 가능함을 확인하였다.
- [0069] 위와 동일한 방법으로 초본류(갈대) 유래 리그닌을 메틸화 반응한 결과 역시 앞서 실험한 도 2 및 도 3의 결과와 유사하게 나타났다. (도 4 및 도 5)
- [0070] 즉, 본 발명의 방법을 이용하면, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)에는 상대적으로 높은 확률로 선택적 메틸화를 시킬 수 있고, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 경우에는 약 60% 정도, 구체적으로는 최소 50% 이상 메틸화가 되지 않은 상태를 유지할 수 있음을 알 수 있었다.
- [0072] 실시예 2.
- [0073] 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)와 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)가 메틸화 되는 경우, 리그닌 분해효소(Lignin peroxidase)의 리그닌 분해 활성에 미치는 영향을 살펴기 위하여 총 10개의 리그닌 결합 양식(beta-O-4)결합을 가지는 이량체를 합성하였다. 각기 다른 결합양식을 가지는 이량체 10종의 구조는 하기의 화학식 1과 같다.

화학식 1



[0075]

[0076] 위와 같은 구조로 합성된 10개의 리그닌 이량체와 각 이량체의 페놀계 수산화기(Phenolic-OH) 및 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)의 개수는 하기 표1과 같다.

표 1

[0077]

리그닌 이량체	페놀계 수산화기(Phenolic-OH)의 수	알리파틱 수산화기(aliphatic-OH) 의 수
1a	1	2
1b	0	2
1c	0	1
1d	0	1
1e	0	0
2a	1	2
2b	0	2
2c	0	1
2d	0	1
2e	0	0

[0078] 실시예 3.

[0079] 실시예 2에서 제작된 리그닌 이량체를 리그닌 분해효소(lignin peroxidase)를 이용하여 분해한 결과, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)가 없는 1b, 1c, 1d 경우, 분해산물로 방향족화합물을 얻을 수 있었다. 반면, 메틸화 반응이 진행되지 않아 1a와 같이 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)가 존재하는 경우에는, 분해산물인 방향족화합물을 얻을 수 없었다. 그러나, 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)가 모두 메틸화된 1e의 경우에는, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)가 없음에도 불구하고, 분해산물인 방향족화합물을 얻을 수 없었다. 실험 결과, 페놀계 수산화기(Phenolic-OH)는 분해산물의 재증합 및 분해효소의 활성을 저해하는 역할을 하지만, 이와 반대로 알리파틱 수산화기(aliphatic-OH)는 분해효소의 화합물 재증합을 인지하거나, 이러한 재증합 결합 분해를 유도하는 역할을 할 것으로 예측할 수 있었다. 이러한 경향은, 다른 종류의 리그닌 이량체에도 동일하게 적용될 수 있으므로 실제 리그닌의 분해에도 적용될 수 있음을 확인할 수 있었다. (도 6 및 도 7)

[0081] 실시예 4.

[0082] 방향족계 단량체 화합물을 얻기 위해, 앞서 실시예1에서 메틸화 반응을 진행한 결과, 획득된 활엽수(포플라) 유래 리그닌을 리그닌 분해효소로 해중합하였다.

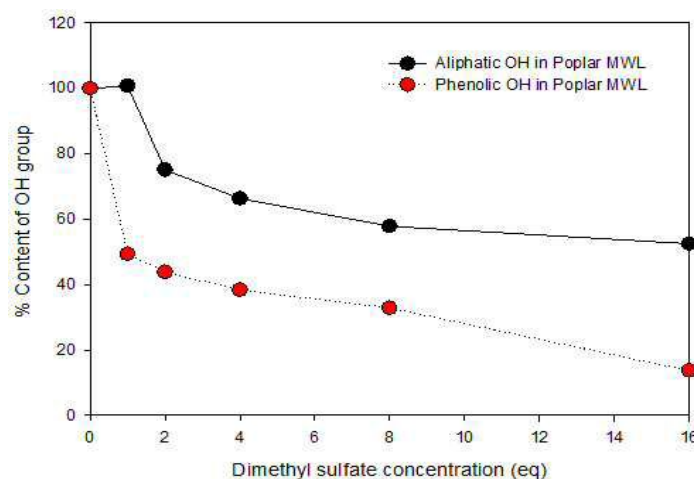
[0083] 상기 해중합은, BR 완충액 0.1M, pH 3.0에서 수행되었다. 메틸화된 리그닌 및 리그닌 분해효소는 각각 0.4 mg / ml 및 1 μM의 작업 농도로 제조되었다. 반응은 50 μM / 15 분의 공급 속도로 H₂O₂를 첨가함으로써 시작되었다. 샘플링 시점에서, 샘플링된 시료 반응용액 200 μl에 10 M의 NaOH 1 μl를 첨가함으로써 반응을 중단시켜 필요한 시료를 준비하였다. 준비된 시료는 PTFE 친수성 0.2μm 멤브레인 필터를 통해 여과하여 고형물을 제거하였

다.

- [0084] 해중합 결과를 확인하기 위해, 여과된 시료를 주입하여 고속 액체 크로마토 그래피(HPLC)를 진행하였다.
- [0085] HPLC 반응은 Agilent 1200 HPLC 시스템을 사용하여 상기 시료를 역상 Eclipse XDB-C18 컬럼 (4.6 x 150 mm, 5 μ m, Agilent)에 주입하여 수행하였다. 수행 결과 획득된 시료의 자외선 흡수 스펙트럼을 기반으로 하여 표준 라이브러리와 비교하였으며, 각각의 화합물의 선형 외부 표준 곡선 ($R^2 > 0.95$)에 기초하여, 반응을 정량화하였다.
- [0086] 시간이 지남에 따라 총 5개의 방향족 단량체 화합물에 해당하는 HPLC 피크가 관찰되었으며, 이러한 피크의 면적이 시간 경과에 따라 비례적으로 증가하는 것이 관찰되었다. (도 8)
- [0087] 시료에 포함된 물질을 구배분리하기 위해, 0.1 % 수성 트리플루오로 아세트산과 메탄올-아세트니트릴을 용매로 하여, 컬럼온도 30 $^{\circ}$ C 하에서, 유속 1.5 ml/분으로 총 15 분간 원심분리한 결과, 시료에 포함된 화합물을 분리하였다.
- [0088] 시료에 포함된 화합물은 5종의 방향족계 단량체로 확인되었다. 상기 방향족계 단량체는 각각 3,4-dimethoxy benzoic acid, 3,4,5-trimethoxy benzoic acid, 3,4-dimethoxy benzaldehyde, 3,4,5-trimethoxy benzaldehyde, methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate 였다. 이러한 방향족계 단량체 화합물의 총합을 고려할 때, 총 리그닌 중량의 약 10.7%가 단량체 방향족계 화합물로 분해되어 생산된 것임을 알 수 있었다.(도 9)
- [0089] 도 8 및 도 9에 도시된 그래프에서 Met-MWL(methyl-Milled Wood Lignin)은 본 발명의 일 실시예에 따라 선택적 메틸화된 리그닌을 의미한다.
- [0090] 이상과 같이 실시예들이 비록 한정된 도면에 의해 설명되었으나, 해당 기술분야에서 통상의 지식을 가진 자라면 상기를 기초로 다양한 기술적 수정 및 변형을 적용할 수 있다. 예를 들어, 설명된 기술들이 설명된 방법과 다른 순서로 수행되거나, 및/또는 설명된 구성요소들이 설명된 방법과 다른 형태로 결합 또는 조합되거나, 다른 구성요소 또는 균등물에 의하여 대치되거나 치환되더라도 적절한 결과가 달성될 수 있다.
- [0091] 그러므로, 다른 구현들, 다른 실시예들 및 특허청구범위와 균등한 것들도 후술하는 청구범위의 범위에 속한다.

도면

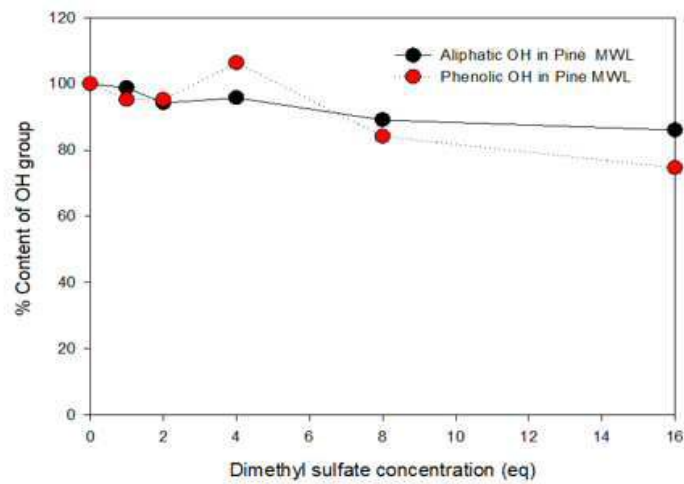
도면1



도면2

Lignin type	Content of OH group (mmol/g)				
	Aliphatic OH	Phenolic S unit	Phenolic G unit	Phenolic H unit	Total phenolic OH
Pine MWL	2.18	-	0.46	0.09	0.55
Pine MWL + 1x eq. DMS	1.56	-	0.36	0.11	0.47
Pine MWL + 2x eq. DMS	1.58	-	0.34	0.07	0.41
Pine MWL + 4x eq. DMS	0.90	-	0.17	0.04	0.21
Pine MWL + 8x eq. DMS	1.58	-	0.25	0.07	0.32
Pine MWL + 16x eq. DMS	1.25	-	0.13	-	0.13

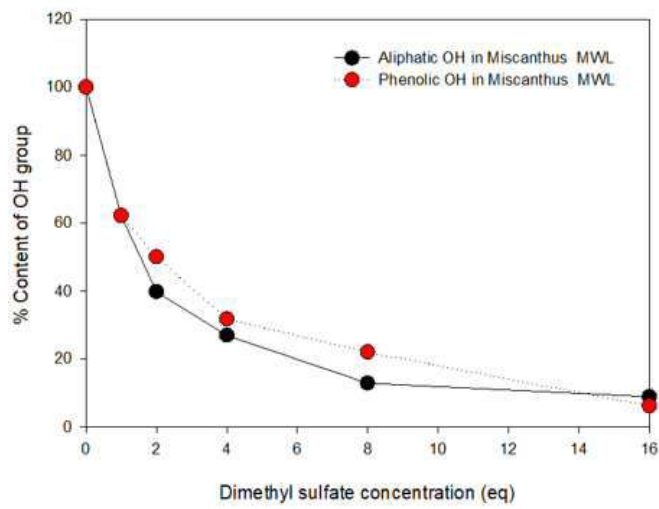
도면3



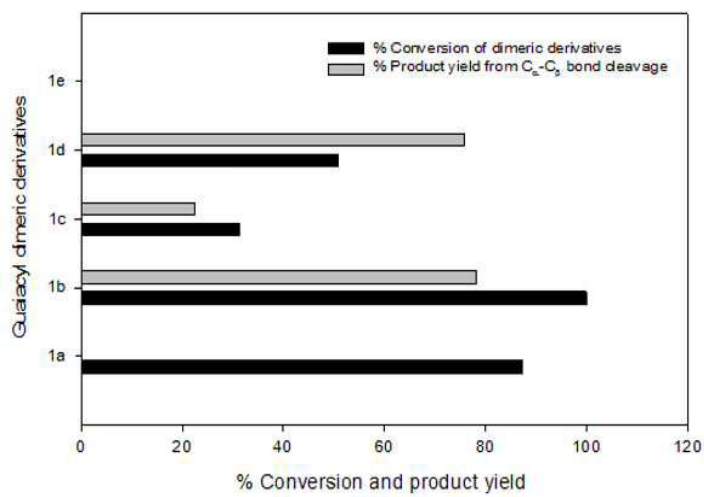
도면4

Lignin type	Content of OH group (mmol/g)				
	Aliphatic OH	Phenolic S unit	Phenolic G unit	Phenolic H unit	Total phenolic OH
Miscanthus MWL	1.92	0.21	0.24	0.62	1.07
Miscanthus MWL + 1x eq. DMS	1.48	0.15	0.25	0.14	0.53
Miscanthus MWL + 2x eq. DMS	1.86	0.20	0.24	0.17	0.61
Miscanthus MWL + 4x eq. DMS	1.40	0.13	0.24	0.13	0.50
Miscanthus MWL + 8x eq. DMS	1.80	0.12	0.29	0.16	0.57
Miscanthus MWL + 16x eq. DMS	1.39	0.06	0.16	0.10	0.31

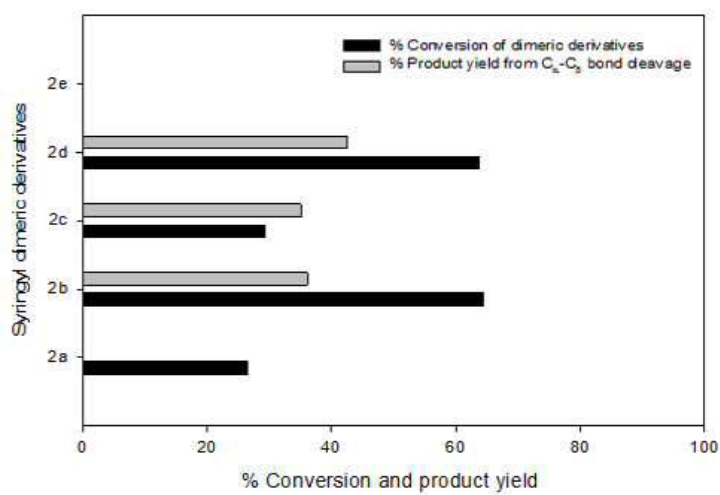
도면5



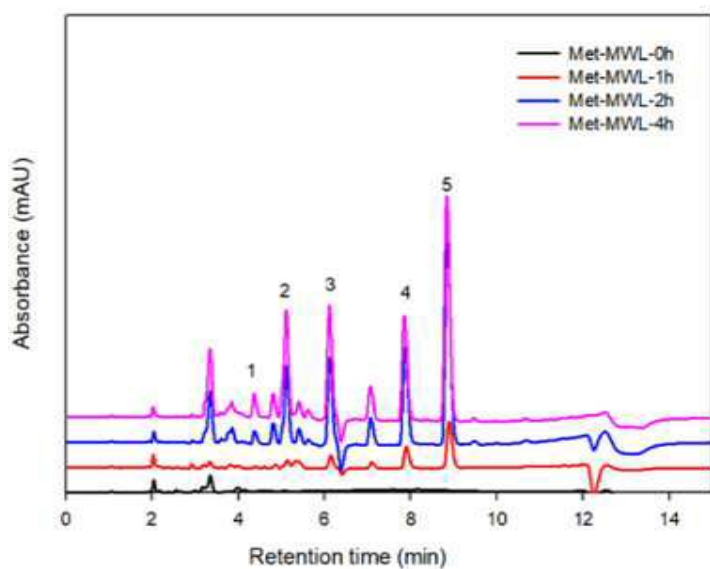
도면6



도면7



도면8



도면9

Number#	Phenolic product	MET-MWL from poplar
1	3,4-dimethoxy benzoic acid	0
2	3,4,5-trimethoxy benzoic acid	12.7
3	3,4-dimethoxy benzaldehyde	48.8
4	3,4,5-trimethoxy benzaldehyde	61.2
5	Methyl-3,4,5-trimethoxy benzoate	79.1
Total concentration		214.1
% Conversion		10.7

* Substrate concentration is 0.4 mg/ml. Average Mw value of each lignin monomer is 200 when S/G ratio is assumed as 1.8

도면10

