(19)대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(51) 。Int. Cl.
C10L 1/02 (2006.01)

(45) 공고일자 2007년01월24일
(11) 등록번호 10-0673837
(24) 등록일자 2007년01월18일

(21) 출원번호 10-2005-0113515
(22) 출원일자 2005년11월25일
심사청구일자 2005년11월25일

(65) 공개번호
(43) 공개일자

(73) 특허권자 고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가1 고려대학교 내

(72) 발명자 김승욱
서울시 노원구 공릉동 737, 삼익아파트 104동 905호

이동환
경기도 고양시 덕양구 행신동 샘터마을 208동 802호

최무선
서울시 성북구 장위3동 77-61

(74) 대리인 손민

(56) 선행기술조사문헌
JP2000270886 A
US6982155 B1
KR1020040084515 A
WO0012743 A1
* 심사관에 의하여 인용된 문헌

심사관 : 김성수

전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제를이용하여 바이오디젤을 제조하는 방법

(57) 요약

본 발명은 유지와 알코올을 기재로 하고 1,3-위치 선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제를 동시 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오디젤을 생산하는 방법에 관한 것으로, 성질이 다른 두 종류의 리파아제를 사용하는 본 발명의 방법으로 바이오디젤의 생산 효율을 극대화시킬 수 있다.

대표도

도 3

특허청구의 범위

청구항 1.

유지와 알코올을 기재로 하고 1,3-위치 선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제를 동시 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오디젤을 생산하는 방법.

청구항 2.

제1항에 있어서, 1,3-위치 선택성 리파아제가 리조포스 오라이제(*Rhizopus oryzae*)유래 리파제인 방법.

청구항 3.

제1항에 있어서, 무위치 선택성 리파아제가 켄디다 루고사(*Candida rugosa*) 유래 리파제인 방법.

청구항 4.

제1항에 있어서, 상기 방법이 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제를 중량비를 기준하여 1 : 5 내지 5 : 1 비율로 사용하는 방법.

청구항 5.

제1항에 있어서, 리파제가 고정화된 리파제인 방법.

청구항 6.

제1항에 있어서. 유지가 천연유지, 가공유지 및 폐유지 중에서 선택되는 방법.

청구항 7.

제1항에 있어서, 알코올이 메탄올, 에탄올, 프로판올 및 부탄올 중에서 선택되는 방법.

청구항 8.

제1항에 있어서, 상기 방법이 40 ℃ 내지 50 ℃에서 반응되는 방법.

명세서

발명의 상세한 설명

발명의 목적

발명이 속하는 기술 및 그 분야의 종래기술

본 발명은 1,3-위치 선택성 리파아제(1,3-specific lipase) 및 무위치 선택성 리파아제(non-specific lipase)를 동시 사용하여 바이오디젤을 제조하는 방법에 관한 것이다.

전 세계적으로 자동차의 이용량이 급증하면서 석유의 수요가 증가하고 있다. 하지만 석유의 매장량은 한정되어 있어, 석유를 대체할 수 있는 새로운 에너지 자원의 개발이 절실히 요구되고 있다. 많은 대체에너지들이 개발되고 있지만 대부분의 경우 그러한 에너지를 이용할 수 있는 새로운 엔진을 필요로 하여 그 실용화에는 어려움이 있다. 하지만 바이오디젤은 기존의 경유자동차에 엔진의 변형없이도 직접 연료로 쓸 수 있어 대체에너지로 각광 받고 있다. 또한 동, 식물성 유지를 원료로 하여 생산되기 때문에 자원고갈의 문제점이 없고, 폐자원인 폐유를 원료로도 생산이 가능하기 때문에 신재생에너지로 평가되고 있다. 바이오디젤은 기존의 경유를 연료로 사용하였을 경우보다 일산화탄소, 탄화수소, 황산화물, 미세분진, 매연의 배출량을 20% 이상 저감시킬 수 있다. 또한 바이오디젤 자체가 생분해가 가능하며 독성이 적어 청정 에너지원으로도 평가받고 있다. 바이오디젤의 중요성은 대체에너지뿐만 아니라 청정연료인 점에서 더욱더 각광받고 있다. 선진국에서는 국가 에너지 전략 사업화로 바이오디젤을 중점 연구하고 있다. 유럽의 경우 ERMA (European Renewable Raw materials Association)을 신설하여 투자를 확대하고 있는 실정이며, 300여 도시에서 버스 및 트럭 등의 경유자동차에 바이오디젤을 이미 사용하기 시작하였다. 미국에서는 경유에 바이오디젤을 혼합한 방식으로 관공서 차량, 대형트럭, 공공버스에 연료로 사용하고 있으며, 2020년 까지 20%의 경유를 바이오디젤로 대체하기로 결정하여 국가적 차원에서의 연구투자가 이루어지고 있다. 국내에서는 (주)신한에너지, (주)신양현미유 등의 중소기업에서 바이오디젤을 생산하고 있으나, 생산단가가 높아 세재 지원 등의 정부 보조가 없으면 상업화가 어려운 현실에 있어 지속적인 연구투자가 필요한 시점에 있다. 또한 서울시의 대기오염의 원인 중 41.6%를 경유 자동차의 배출가스가 차지하는데, 특히 미세분진의 농도는 서울시가 76㎍/㎥로 OECD 국가 중 1위로 매우 심각한 상황이다. 바이오디젤의 보급으로 경유를 바이오디젤로 대체 한다면 이러한 환경문제를 크게 개선시킬 수 있을 것이다.

바이오디젤은 지방산메틸에스테르(fatty acid methyl ester)로 동, 식물성 유지를 메탄올과 트랜스에스테르화(transesterification)시켜 얻어진다. 국내외에서 바이오디젤은 화학촉매를 이용한 합성방법에 의해 생산되고 있다. 이러한 화학적 합성 공정에서는 산, 염기 촉매가 이용되는데 이러한 촉매는 엔진을 부식시키기 때문에 생산공정에서 반드시 중화 세척되어야 한다. 또한 부산물로 얻어지는 글리세롤에도 이러한 촉매가 함유되어 제품화하기 위해서는 분리공정을 거쳐야 한다. 화학공정에는 전반적으로 분리를 위한 유기 용매가 다량 사용되고 이로 인한 환경문제가 야기되며, 처리비용 또한 발생하게 된다. 또한 높은 온도에서 반응이 진행되므로 에너지를 많이 소모하며, 촉매의 재사용이 어려워 생산단가가 높아지게 된다. 결국 화학공정에 의해 생산된 바이오디젤은 석유디젤 보다 생산단가가 높아 상업화가 어려운 실정에 있다. 특히 원료로 순수한 동, 식물성 유지를 주로 사용하는데, 이로 인하여 생산단가의 많게는 80%를 원료의 가격이 차지하고 있는 실정이다. 최근 원료의 가격을 줄이기 위해서 폐유를 원료로 사용하는 공정이 연구되고 있다. 폐유에는 지방산(fatty acid)과 수분이 함유되어 있는데 화학공정에서 폐유가 원료로 사용되기 위해서는 이들 성분이 반드시 제거되어야만 한다. 특히 폐유내 잔존하는 지방산은 화학촉매와 반응하여 염을 형성하여 촉매의 기능을 상실시키게 된다. 그러므로 폐유를 전처리하는 공정이 추가되어 여전히 원료의 가격은 생산단가의 큰 비중을 차지하게 된다.

이러한 이유로 바이오디젤을 생산하기 위한 새로운 생산공정의 연구가 이루어져 왔으며, 그 중 효소인 리파아제(lipase)를 촉매로 이용하는 효소공정의 개발이 각광을 받고 있다. 리파아제는 동, 식물성 유지와 메탄올을 합성하여 바이오디젤을 합성할 수 있는 효소이다. 리파아제는 엔진을 부식시키지 않아 생산공정 중 분리정제 공정을 단순화시킬 수 있다. 또한 낮은 온도 조건에서 반응이 진행되어 공정에서 에너지 소모를 크게 줄일 수 있다. 공정에서 유기 용매를 사용하지 않기 때문에 그로 인한 환경문제도 발생되지 않으며, 부산물로 얻어지는 글리세롤의 정제가 쉬어 이를 제품화하여 바이오디젤의 생산단가를 낮출 수 있다. 폐유를 원료로 이용할 경우 잔존하는 수분은 전혀 문제가 되지 않으며, 잔존하는 지방산(fatty acid)의 경우 리파아제의 활성을 저하시키지 않을 뿐만 아니라, 오히려 리파아제에 의해서 바이오디젤로 전환된다. 즉 폐유를 이용함에 있어서 고형물을 제거하는 의외의 특별한 전처리 공정이 요구되지 않아 폐유를 이용하는데 있어서도 효소공정은 화학공정에 비해 훨씬 유리하다. 즉 효소공정을 이용하여 바이오디젤을 생산한다면 생산단가를 줄여 바이오디젤의 상업화를 가능하게 할 뿐만 아니라, 환경오염문제도 야기하지 않아 친환경적인 공정을 개발할 수 있다.

바이오디젤 생산을 위한 효소공정이 이러한 장점을 가지고 있지만 아직 상업화에는 어려움이 있다. 이용되는 고정화 리파아제의 안정성이 낮아 장기간의 반응에 어려움이 있고, 화학적 생산공정에 비해 반응시간이 길기 때문이다.

이런 배경하에, 본 발명자는 1,3-위치 선택성 리파아제(1,3-specific lipase)와 무위치 선택성 리파아제(non-specific lipase)를 동시 사용하여 바이오디젤을 생산할 경우, 단축된 반응시간에 높은 수율로 바이오디젤을 생산할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성시켰다.

발명이 이루고자 하는 기술적 과제

본 발명의 하나의 목적은 유지와 알코올을 기재로 하고 1,3-위치 선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제를 동시 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오디젤을 생산하는 방법에 관한 것이다.

발명의 구성

하나의 양태로서, 본 발명은 유지와 알코올을 기재로 하고 1,3-위치 선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제를 동시 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 바이오디젤을 생산하는 방법에 관한 것이다.

본 발명에서 용어, "바이오디젤(bio-diesel)"은 동, 식물성 유지를 원료로 하여 만든 연료를 의미한다. 3가의 지방산(fatty acid)에 글리세롤(glycerol)이 결합한 트리글리세라이드와 알코올로부터 글리세롤과 지방산 메틸에스테르를 만들어 내는 트랜스에스테르화(transesterification) 반응시 제조되는 지방산 메틸에스테르(FAME)가 바이오디젤이다. 바이오디젤은 생분해가능하고(biodegradable), 무해하면(nontoxic), 발암성 공해물질인 황(sulfur)이나 방향족(aromatic)을 포함하지 않는다는 장점이 있다. 또한, 바이오디젤인 지방산 메틸에스테르는 분자내에 10% 이상의 산소를 포함할 수 있으므로 값비싼 산소첨가제를 첨가하지 않아도, 완전 연소를 도와서 분진 또는 일산화탄소의 방출이 감소시킨다는 장점이 있다. 본 발명은 리파아제-촉매 공정을 통하여 바이오디젤을 제조에 관한 것으로, 바이오디젤 제조시 효율을 최대화하기 위하여 1,3-위치 선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제를 동시 사용하는 것을 특징으로 한다.

바이오디젤 제조시 리파아제를 이용하는 효소 촉매 공정(enzymatic catalyzed process)은 설포닉산(sulphuric acid) 등을 이용하는 산 촉매공정이나 NaOH, KOH 등을 이용하는 알칼리 촉매 공정(alkali-catalyzed processs)보다 환경 친화적이며 공정이 간단하다는 장점이 가지나, 긴 반응 시간을 필요로 한다는 문제점을 가진다. 본 발명자는 성질이 다른 두 종류의 리파아제를 사용할 경우, 단독의 리파아제를 사용할 때 보다 반응 시간을 단축시키고 높은 수율로 바이오디젤을 생산할 수 있음을 확인할 수 있었다.

리파아제는 위치 특이성에 따라 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제로 분류할 수 있다. 본 발명에서 용어, "1,3-위치 선택성 리파아제 (1,3-specific lipase)"란 트리글리세라이드의 1-, 3- 위치에서의 지방 아실기(fatty acyl groups)에만 반응 특이성을 보이는 리파제를 의미한다. 본 발명에서 용어, "무위치 선택성 리파아제(non-specific lipase)"란 모든 트리글리세라이드의 모든 세 가지의 지방 아실기와 반응하는 리파아제를 의미한다.

고정화된 일반적 리파아제를 단독 이용하여 바이오디젤 제조시 90%의 전환율에 도달하기 까지는 걸리는 시간은 50시간 이상이며, 고정화된 리조포스 오라이제 리파아제의 경우에는 60시간 이상 걸리는 것으로 알려졌다(M. Kaieda et al., "Biodiesel fuel production from plant oil catalyzed by *Rhizopus oryzae* lipase in a water-containing system without an organic solvent", *J. Bioscience and Bioengineering*, **88**, 6, 627-631, 1999).

1,3 위치 선택성 리파아제를 무위치 선택성 리파아제와 동시 처리시 트리글리세라이드의 가수분해 속도가 증가되어, 결론적으로 바이오디젤 생성의 전체 반응 속도가 증가하게 된다.

1,3-위치선택성 리파아제인 리조포스 오라이제 리파아제를 이용하여 바이오디젤을 생산하는 트랜스에스테르화 반응이 두 단계로 이루어진다(M. Kaieda et al., *J. Bioscience and Bioengineering*, **88**, 6, pp627-631 ,1999) 트리글리세라이드를 가수분해시켜 지방산을 생성한 후 생성된 지방산을 다시 에스테르화(esterification) 시킨다. 리조포스 오라이제 리파아제를 이용하여 바이오디젤을 생산할 경우 트리글리세라이드의 1,3번 위치의 지방산만 바이오디젤로 전환되므로 이론적인 최대 전환율은 약 67%이다. 그러나 많은 연구자들에 의해, 리조포스 오라이제 리파아제를 이용하여 90% 정도의 전환율로 바이오디젤을 생산됨이 보고하였다. 일본의 Fukuda 연구팀이 밝힌, 1,3-위치선택성 리파아제인 리조포스 오라이제 리파아제에 의해 생성된 2,3-디글리세라이드(2,3-diglyceride)가 다시 1,3-디글리세라이드(1,3-deglyceride)로 전환된다는 아실기 이동(acyl migration) 이론에 의하면 (M. Oda et al., *Biochemical Engineering J.*, **23**, pp45-51 2005) 1,3-디글리세라이드는 1,3-위치선택성 리파아제에 의해서 전환이 가능하므로 리조포스 오라이제 리파아제를 이용해서도 90%의 전환율로 바이오디젤의 생산이 가능하다. 하지만 2,3-디글리세라이드가 1,3-디글리세라이드로 전환되는 아실기 이동을 거쳐야 하므로 반응 시간은 오래 걸릴 수밖에 없다. 본 발명에서는 무위치 선택성 리파아제인, 켄디다 루고사 리파아제를 이용하여 1,2-디글리세라이드를 가수분해시킴으로써 1,2-디글리세라이드의 1,3-디글리세라이드로의 아실 이동에 시간이 걸리지 않도록 하여 전체 반응의 속도를 증가시켰다.

실제, 본 발명의 1,3 위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제를 혼합 처리하는 방법으로 바이오디젤을 제조시, 반응시작 후 18시간 만에 90% 이상의 전환율에 도달하고 21시간에 99%의 전환율에 도달하는 것을 확인할 수 있었다. 이는 기존의 리파제 이용한 바이오디젤 생산 효율을 2.7배 이상 향상시키는 것이다.

또한, 본 발명의 방법은 약 99%의 높은 바이오디젤 전환률을 보인다.

따라서, 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제를 동시 사용하는 본 발명의 방법을 이용할 경우, 높은 전환률과 단축된 반응 시간으로 바이오디젤의 생산 효율을 극대화할 수 있다.

본 발명의 바이오디젤에 사용되는 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제의 기원은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 리파제는 췌장, 우유 등에서 유래한 리파제, 식물성 리파아제(소맥, 대두, 면화 등의 씨앗 내부에서 유래한 리파아제), 미생물 리파아제(사상균, 세균, 효모)일 수 있다. 구체적으로, 1,3-위치 선택성 리파아제는 리조포스(*Rhizopus*), 아스퍼질러스(*Aspergillus*) 또는 무코르(*Mucor*) 속에서 유래하거나, 췌장의 리파아제(pancreatic lipase) 또는 쌀겨(rice bran)의 리파아제일 수 있다. 구체적으로, 무위치 선택성 리파아제는 스타필로코스 에우레우스(*Staphylococcus aureus*), 페니실린 사이클로피움(*Penicillium cyclopium*), 코리네박테리움 아키네스(*Corynebacterium acnes*), 프로피오니박테리움 아키네스(*Propionibacterium acnes*), 켄디다 루고사(*Candida rugosa*), 게오트리치엄 켄디디움(*Geotrichum candidum)* 등에서 유래할 수 있다.

본 발명의 구체적인 실시에서는, 1,3-위치 선택성 리파아제는 리조포스 오라이제(*Rhizopus oryzae*) 리파아제를, 무위치 선택성 리파아제는 켄디다 루고사(*Candida rugosa*) 리파아제를 사용하였다.

본 발명에서 제공하는 1,3-위치 선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제는 자유로운(free) 형태 또는 고정화된 형태로 사용될 수 있으나, 고정화된 리파아제가 바람직하다. 리파아제 고정화시키는 방법은 특별히 제한되지 않으며 다양한 응용이 가능하다. 예들 들어, 흡착법, 포괄법 등의 물리적인 밥법, 공유결합법, 가교연결방법 등의 화학적인 방법을 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시에서는 아미노기를 가지고 있는 담체에 리파아제 용액과 글루타르알데히드를 반응시켜 리파아제와 담체 사이에 가교반응을 일으켜 효소를 막 위에 고정화시켰다.

1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제의 첨가되는 비율은 다양하게 조절가능하다. 바람직하게는, 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제를 중량비 기준으로 1 : 5 내지 5 : 1 비율로 사용할 수 있다. 본 발명의 구체적인 실시에서는, 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제를 3:1, 1:1, 1:3으로 사용하였을 때, 거의 비슷한 활성을 가지는 것을 확인할 수 있었다.

바이오디젤에 사용될 수 있는 유지는 식물성 유지 또는 동물성 유지이며, 보다 바람직하게는 식물성 유지이다. 천연유지, 가공유지 및 폐유지 중에서 선택될 수 있고, 구체적으로 대두유, 채종유, 팜유 등을 예시할 수 있다.

알코올은 바람직하게는 탄소수 2개 내지 8개이고, 보다 바람직하게는 탄소수 2개 내지 4개인 알코올이다. 구체적으로, 에탄올, 메탄올, 1-프로판올, 이소-프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 이소-부탄올 또는 테르-부탄올 등을 예시할 수 있다.

두 종류의 리파제를 이용하여 바이오디젤을 제조하는 본 발명에서 유지의 수분함유 정도, 알코올 첨가 방식, 효소 농도, 및 반응온도 등의 조건은 다양하게 조절될 수 있다. 예들 들어, 온도는 40 ℃ 내지 50 ℃에서 반응시킬 수 있다.

유지와 알코올을 기재로 하고 1,3-위치 선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제를 동시 첨가하는 단계를 포함하는 것을 특징으로 하는 본 발명의 바이오디젤을 생산하는 방법으로 생산된 바이오디젤(메틸에스테르)은 대체연료, 윤활유의 원료, 윤활유 첨가제 뿐만 아니라 무공해 용제, 페인트 및 농약 등에 사용가능하다. 또한 바이오디젤은 섬유, 세제, 화장품 산업에서 다량 사용하는 독성 계면활성제를 대체하는 환경 친화성 에톡시드 메틸에스테로, 황산염화 메틸에스테로, 알콜아민계 메틸에스테로의 중간체로 사용할 수 있다.

이하, 본 발명을 실시예에 의해 상세히 설명한다. 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 내용이 하기 실시예에 한정되는 것은 아니다.

참조예 1. 리파아제의 준비

1-1. 무위치선택성 리파아제의 경우

무위치선택성 리파아제인 켄디다 루고사(*Candida rugosa*) 리파아제(Lipase OF^{TM})는 일본의 메이토사 (Meito Co., Japan)으로부터 구입하였다.

1-2. 1,3-위치 선택성 리파아제의 경우

리조포스 오라이제(*Rhizopus oryzae*) KCCM 11970는 50ml의 PDB배지에서 28℃, 200rpm 조건에서 2일 동안 종균배양한 후, 배양한 종균을 50ml의 증류수에 4% 올리브 오일, 8% 박토펩톤(bactopeptone), 0.1% KH_2PO_4, 0.1% $NaNO_3$, 0.05% $MgSO_4 \cdot 7H_2O$를 첨가하여 pH를 6.0으로 조정한 합성배지를 생산배지로 하여 10% v/v의 비로 중균 접종하여 28℃, 250rpm의 조건에서 5일간 배양하여 1,3-위치 선택성 리파아제인 리조포스 오라이제 리파아제를 생산하였다.

리조포스 오라이제 배양액 50ml를 4℃에서 10,000rpm으로 15분 원심분리하여 세포를 제거하였다. 리파아제가 포함되어 있는 상등액에 4℃에서 6시간 동안 60%(g/v)의 암모늄설페이트(ammonium sulfate)을 가하여 리파아제를 침전시켰다. 이를 4℃에서 10,000rpm으로 15분 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 침전된 리파아제를 다시 0.05 M 인산염 완충액(phosphate buffer, pH 7.0) 10ml에 녹여 리파아제 수용액을 제조하였다. 한외여과(Ultrafiltration)를 이용하여 이용액에 염을 포함한 단백질 이외의 물질을 제거하여 리파아제가 부분정제된 용액을 수득하였다.

참고예 2. 리파아제의 고정화

참고예 1-1, 1-2에서 준비된 두 종류의 리파아제 용액을 30분간 콩기름(soybean oil)과 1:1 (v/v)로 반응시키는 전처리과정을 수행한 후 각각 다음의 가교연결방법(cross-linking method)을 이용하여 실리카 겔(silica gel)에 고정화 시켰다.

고정화 담체인 실리카겔을 35% (v/v)의 H_2O_2로 전처리하여 실리카겔 표면의 불순물을 제거하였다. 전처리된 담체를 아세톤을 용매로 15% (w/v)의 3-APTES를 이용하여 50℃, 150rpm에서 120분간 실라니화(silanization)하여 담체 표면에 아미노기(amino gropu)을 도입하였다. 가교제인 글루탈알데하이드(glutaraldehyde)를 64℃의 0.1M phosphate buffer (pH 8.0)에서 20분간 전처리하여, 아미노기가 도입된 실리카겔과 2% (v/v)의 농도로 0.1M 인산염 완충용액 (pH 7.0)에서 20℃, 150 rpm의 조건으로 2시간 동안 반응시켰다. 이후에 실리카겔을 증류수로 세척한 후 건조시켜 0.1M 인산염 완충용액 (pH 7.0)에 넣고 준비한 리파아제를 20℃에서 150분간 반응시켜 고정화 하였다.

실시예 1. 리조포스 오라이제 리파아제를 이용하여 콩기름으로부터 바이오디젤을 생산.

1,3-위치 선택성 리파아제인 고정화 리조포스 오라이제 리파아제의 활성을 40, 60, 90 U/g으로 다양하게 하여 실리카겔에 고정화한 고정화 리조포스 오라이제 리파아제를 이용하여 콩기름으로부터 바이오디젤을 생산하였다. 반응기질로는 식물성 기름인 콩기름(soybean oil) 2mmol과 메탄올을 사용하였고 이때 메탄올은 3시간에 한번씩 1mmol씩 기질에 공급였다. 증류수를 콩기름 무게의 10%(0.18g)로 반응기질에 투입하였으며 45℃ 조건에서 200rpm의 교반속도로 30시간 동안 반응하였다. 고정화 리조포스 오라이제 리파아제의 양은 콩기름1의 30% (w/w)에 해당하는 0.53g으로 하였다. 도 1에서 보듯이 반응에 이용한 리파아제의 활성이 높을수록 전환속도는 빨라지지만 일정한 전환율 이상으로는 전환율이 더 이상 증가하지 않았다.

생성된 바이오디젤은 FAME(fatty acid methyl ester)로 구성되어 있다. 이것을 분석하기 위해 GC(gas chromatography)를 사용하였다. GC는 영린 M600D 모델을 이용하였고, column은 HP-INNOWAX(19091N-133, 30m 0.25㎛ 0.25㎛)를 사용하였다. 분석은 다음과 같은 조건에서 수행하였다. 인젝터(Injector)는 260℃ 이고, 오븐(oven) 은 150℃부터 180℃까지는 15℃/min 으로 승온, 240℃ 까지는 5℃/min 으로 승온하여 240℃에서는 일분 동안 retention 하였다. 디텍터(Detector)로는 FID를 260℃ 조건에서 사용하였다. 인젝션 불륨(Injection volume)은 1㎕ 로 하였고, 스플릿 비율(split ratio)은 20:1 로 하였다. 운반 가스(Carrier gas)는 헬륨(He)을 사용하였으며, 유속은 1㎖/min, 공기(air)는 320㎖/min 그리고 수소(H_2)는 40㎖/min 으로 주입하였다. Make up flow는 헬륨을 사용하였으며, 유속은 30㎖/min으로 하였다.

메틸 팔미테이트(Methyl palmitate), 메틸 스테아레이트(methyl stearate), 메틸 올레이트(methyl oleate), 메틸 리놀리에이트(methyl linoleate), 메틸 리놀레네이트(methyl linolenate)가 오일(oil)을 메탄올(methanol)과 트랜스에스테르화(transesterification) 하였을 때 주 생성물이므로 생산물을 GC로 분석하여 위의 5가지 FAME의 몰수를 계산하였다. 바이오디젤의 전환율은 다음의 식으로 계산하였다.

수학식 1

$$\text{전환율} = (\text{moles of FAMEs}) / (\text{moles of oil} \times 3) \times 100$$

실시예 2. 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제의 혼합물을 이용하여 콩기름으로부터 바이오디젤을 생산

본 발명에서는 리조포스 오라이제 리파아제를 이용한 트랜스에스테르화 반응에서 첫 단계인 가수분해 반응을 빠른 속도로 진행시키기 위해서 위치선택성이 없는 리파아제인 켄디다 루고사 리파아제(*Candida rugosa* lipase)를 도입하였다. 몇몇의 연구에서는 켄디다 루고사 리파아제는 가수분해 반응은 일으키지만 트랜스에스테르화는 전혀 일으키지 못한다고 보고하였다(H. Noureddini et al., *Bioresource Technology*, 96, pp769-777, 2005, M. Iso et al., *J. of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 16, pp53-58, 2001). 본 발명에서는 켄디다 루고사 리파아제를 고정화시켜 80 U/g의 활성을 갖는 고정화 켄디다 루고사 리파아제를 제조하였다. 이를 같은 방법으로 제조한 90 U/g의 활성을 갖는 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 일정비율로 혼합하여 바이오디젤 생산반응에 이용하였다. 고정화 켄디다 루고사 리파아제의 영향을 알아보기 위해서 전체 고정화 리파아제의 양은 0.53g으로 고정시키고, 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제의 비를 1:3, 1:1, 3:1 (w:w)로 다양하게 하여 바이오디젤 생산에 미치는 영향을 조사하였다. 반응기질로는 2mmol의 콩기름(soybean oil)과 메탄올을 사용하였고 이때 메탄올은 3시간에 한번씩 1mmol씩 기질에 공급였다. 증류수를 콩기름 무게의 10%(0.18g)로 반응기질에 투입하였으며 45℃조건에서 200rpm의 교반속도로 30시간동안 반응하였다. 각각의 결과를 도 2, 3, 4에 도시하였다.

고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제의 비와 상관없이 모두 반응시작 후 21시간 만에 99%이상의 전환율을 얻을 수 있었다. 주목할 만한 것은 도 2에서 보듯이 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제의 비가 1:3 (w:w)인 경우에도 거의 비슷한 시간에 전환율이 99%에 도달한다는 것이다. 켄디다 루고사 리파아제는 트랜스에스테르화 반응을 거의 일으키지 못한다고 할 때 고정화 리조포스 오라이제 리파아제의 양이 바이오디젤의 전환율에 거의 영향을 안 미친다는 것을 의미한다. 이는 트랜스에스테르화 반응이 가수분해 반응과 에스테르화 반응의 두 단계라고 할 때 가수분해 반응이 속도결정단계여서 일단 가수분해 반응만 일어나면 에스테르화 반응은 빠르게 진행된다는 것이다. 켄디다 루고사 리파아제를 이용하여 1,2-디글리세라이드를 가수분해 시킴으로써 1,2-디글리세라이드의 1, 3-디글리세라이드로서의 아실 이동에 시간이 걸리지 않도록 하여 전체 반응속도가 증가되는 것을 확인할 수 있었다. 반응시작 후 18시간 만에 90%이상의 전환율에 도달하고, 21시간에 99%의 전환율에 도달하였다.

실시예 3. 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제의 혼합물을 이용하여 폐유로부터 바이오디젤을 생산

고정화 리조포스 오라이제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제를 1:1 (w:w)으로 섞은 고정화 리파아제를 이용하여 폐유로부터 바이오디젤을 생산하는 반응을 실시하였다. 폐유는 서울시 소재의 'S 통닭'에서 배출되는 폐유를 사용하였고, 반응조건은 콩기름을 기질로 이용하였을 때와 동일하게 하였다. 그 결과를 도 5에 도시하였다.

반응시작 후 18시간에 93.1%의 전환율에 도달하였고, 21시간 이후에는 95%의 전환율에 도달하였다. 본 연구진이 개발한 신규한 바이오디젤의 생산공정은 폐유를 이용하여 바이오디젤을 생산하는 데 있어서도 효과적임을 알 수 있었다.

발명의 효과

상기에서 기술한 바와 같이, 본 발명의 방법으로 바이오디젤을 생산함으로써 높은 전환률로 반응시간을 단축시켜 반응 효율을 극대화할 수 있다.

도면의 간단한 설명

도 1은 고정화 리조포스 오라이제 리파아제를 이용하여 콩기름으로부터 바이오디젤을 생산할 때 시간에 따른 전환율을 나타내는 도이며,

도 2는 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제를 1:3 (w:w)으로 혼합한 것을 이용하여 콩기름으로부터 바이오디젤을 생산할 때 시간에 따른 전환율을 나타내는 도이며,

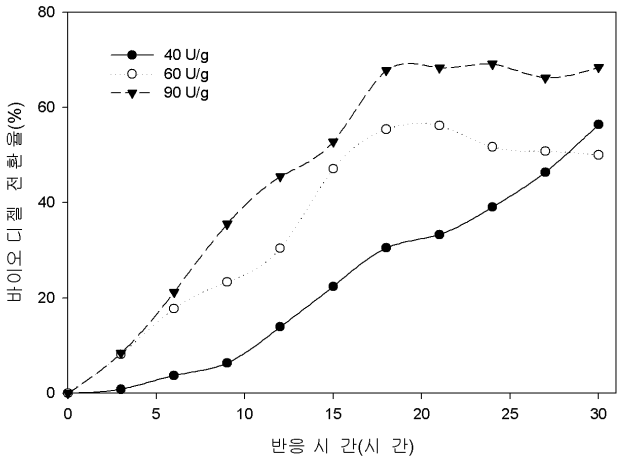
도 3은 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제를 1:1 (w:w)로 혼합한 것을 이용하여 콩기름으로부터 바이오디젤을 생산할 때 시간에 따른 전환율을 나타내는 도이며,

도 4는 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제를 3:1 (w:w)로 혼합한 것을 이용하여 콩기름으로부터 바이오디젤을 생산할 때 시간에 따른 전환율을 나타내는 도이며,

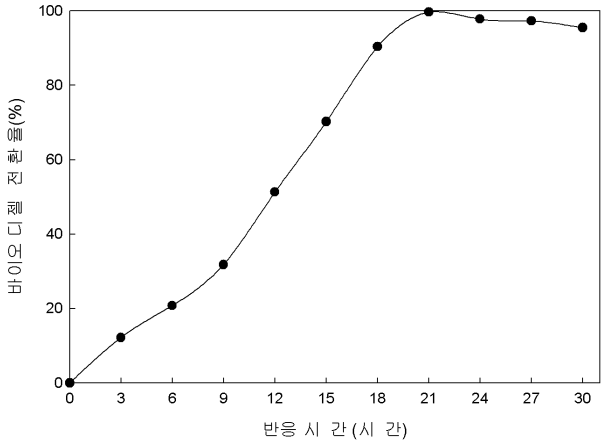
도 5는 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 켄디다 루고사 리파아제를 1:1 (w:w)으로 혼합한 것을 이용하여 폐유로부터 바이오디젤을 생산할 때 시간에 따른 전환율을 나타내는 도이다.

도면

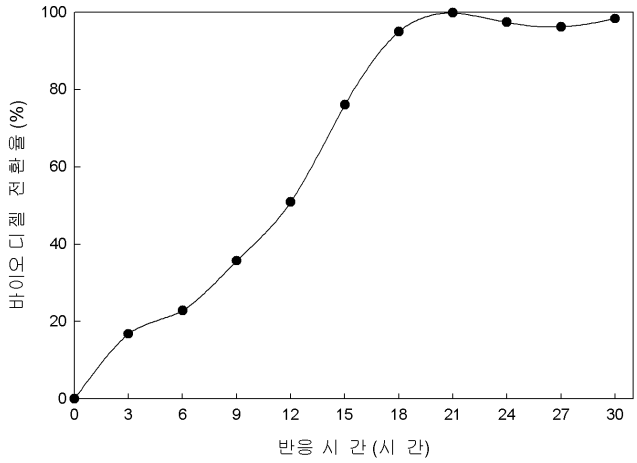
도면1



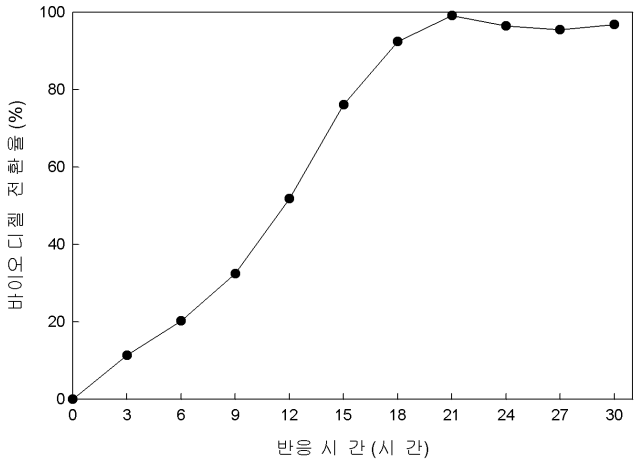
도면2



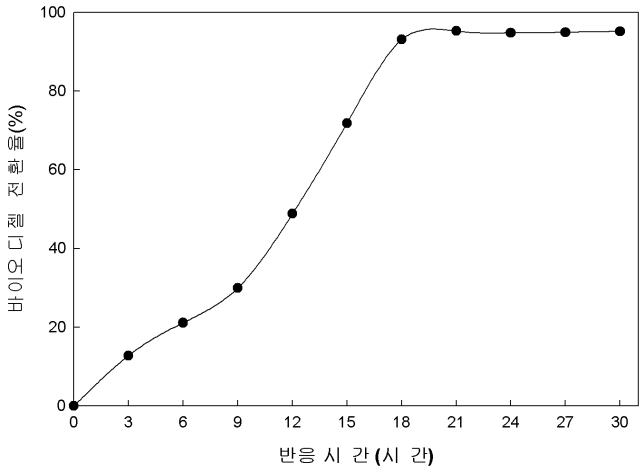
도면3


바이오디젤 전환율 (%)
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
반응 시 간 (시 간)

도면4


바이오디젤 전환율 (%)
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
반응 시 간 (시 간)

도면5


바이오디젤 전환율(%)
100
80
60
40
20
0
0
3
6
9
12
15
18
21
24
27
30
반응 시 간 (시 간)