(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 등록특허공보(B1)

(45) 공고일자 2018년05월16일
(11) 등록번호 10-1858915
(24) 등록일자 2018년05월10일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/20 (2006.01) *C11C 3/00* (2014.01)
C12M 1/40 (2006.01) *C12N 11/08* (2006.01)
C12N 9/00 (2006.01) *C12P 7/64* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/20 (2013.01)
C11C 3/003 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2017-7024588(분할)
(22) 출원일자(국제) 2011년02월02일
심사청구일자 2017년08월31일
(85) 번역문제출일자 2017년08월31일
(65) 공개번호 10-2017-0104002
(43) 공개일자 2017년09월13일
(62) 원출원 특허 10-2012-7023811
원출원일자(국제) 2011년02월02일
심사청구일자 2015년12월30일
(86) 국제출원번호 PCT/IL2011/000121
(87) 국제공개번호 WO 2011/107977
국제공개일자 2011년09월09일
(30) 우선권주장
61/309,122 2010년03월01일 미국(US)
(56) 선행기술조사문헌
JP2008527154 A
(뒷면에 계속)
전체 청구항 수 : 총 21 항

(73) 특허권자
트랜스 바이오디젤 엘티디.
이스라엘, 쉐파람 20200, 레지오날 알앤디 센터 피.오. 박스 437
(72) 발명자
바쉐르, 솝하이
이스라엘 사크닌 20173 피.오. 박스 9327
하즈, 마이사
이스라엘 쉐파람 자보르 스트리트 20200
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
성낙훈

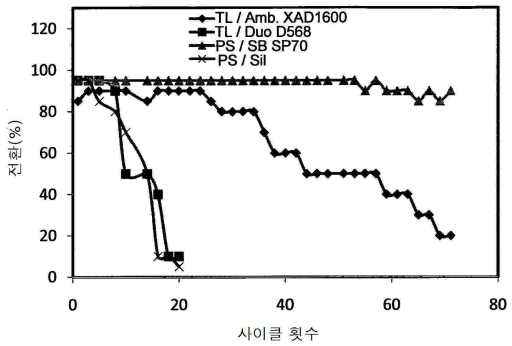
심사관 : 한지혜

(54) 발명의 명칭 **지방산 알킬 에스테르의 효소적 합성을 위한 방법**

(57) 요 약

생물연료, 식품과 세정제 산업에서 이용을 위한 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 효소적 회분식 또는 연속 방법, 그리고 이를 위한 시스템이 개시된다. 상기 방법은 알칼리성 또는 약알칼리성 수성 완충액의 존재에서, 또는 수용액의 존재에서 지방산 공급원 및 알코올 또는 알코올 공여자와 혼합된 소수성 수지 상에 고정된 효소를 이용한다. 지방산 알킬 에스테르에 대한 이러한 생산 방법은 에스테르교환 또는 에스테르화에 의해 동시에 또는 순차적으로 수행된다. 생물촉매 활성은 복합 용도에서 유의미한 활성 상실 없이 유지되고, 또한 생물촉매 상에서 글리세롤과 물 부산물 또는 기타 친수성 화합물의 축적을 회피한다.

대 표 도 - 도1



(52) CPC특허분류
C12M 21/18 (2013.01)
C12N 11/08 (2013.01)
C12N 9/00 (2013.01)
C12P 7/6436 (2013.01)
C12P 7/649 (2013.01)
C12Y 301/01003 (2013.01)
Y02E 50/13 (2013.01)
Y02P 20/52 (2015.11)

(72) 발명자
모셴, 우사마
이스라엘 이브린 30012
쉐하데, 도아
이스라엘 나자레트 16000 스트리트 7000 피.오.박스 5046
힌다위, 아흐매드
이스라엘 쉐파-암 20200 알프와르
마소우드, 에메드
이스라엘 아라라 30026 피오비 52

(56) 선행기술조사문헌
WO2009069116 A2
KR1020060046398 A
JP2008545407 A
JP2006081537 A

명 세 서

청구범위

청구항 1

지방산 공급원을 알킬 알코올로 동시적 또는 순차적으로 효소적 에스테르교환 및 에스테르화시켜 지방산 알킬 에스테르 및 글리세롤 및 물을 각각 형성하는 방법에 있어서, 방법이

(1) 지방산 공급원을 제공하고, 여기에서 반응 용기 내에 유리 지방산 또는 이들의 유도체의 부재 또는 존재 중에서, 상기 지방산 공급원은 모노-, 디- 또는 트리-글리세리드 및 임의의 비율로의 이들의 혼합물을 포함하고;

(2) 상기 지방산 공급원에 7 내지 11의 pH를 갖는 수성 알칼리성 완충액 용액을 지방산 공급원의 2 중량% 내지 5 중량%의 양으로 첨가하여 상기 지방산 공급원과 수성 완충액 용액의 혼합물을 수득하고;

(3) 단계 (2)에서 수득되는 혼합물에 고정된 리파아제 제조물을 첨가하고, 여기에서 제조물은 소수성 다공성 중합체 서포트 상에 고정된 적어도 하나의 리파아제를 포함하고;

(4) 단계 (3)에서 수득되는 혼합물에 알킬 알코올 또는 알코올 공여자를 단계별로 첨가하는 한편으로 혼합하여 상기 지방산 공급원, 고정된 효소, 수성 알칼리성 완충액 용액 및 알킬 알코올을 포함하는 반응 매체를 수득하고, 여기에서 반응 매체의 pH는 5 내지 9이고;

(5) 상기 지방산 공급원과 상기 알코올 간의 반응이 상기 용기 내에서 지방산 공급원의 지방산 알킬 에스테르, 글리세롤 및 물로의 적어도 70% 전환이 수득되기에 적절한 시간 동안 교반 및/또는 진탕 하에서 진행되는 것을 허용하고;

(6) 반응 매체로부터 상기 지방산 알킬 에스테르를 분리하는;

단계를 포함하는 방법.

청구항 2

지방산 공급원을 알킬 알코올로 동시적 또는 순차적으로 효소적 에스테르교환 및 에스테르화시켜 지방산 알킬 에스테르 및 글리세롤 및 물을 각각 형성하는 방법에 있어서, 방법이

(1) 지방산 공급원을 제공하고, 여기에서 반응 용기 내에 유리 지방산 또는 이들의 유도체의 부재 또는 존재 중에서, 상기 지방산 공급원은 모노-, 디- 또는 트리-글리세리드 및 임의의 비율로의 이들의 혼합물을 포함하고;

(2) 상기 지방산 공급원에 물 또는 5 내지 11의 pH를 갖는 수용액을 지방산 공급원의 2 중량% 내지 5 중량%의 양으로 첨가하여 상기 지방산 공급원과 물 또는 수용액의 혼합물을 수득하고;

(3) 단계 (2)에서 수득되는 혼합물에 고정된 리파아제 제조물을 첨가하고, 여기에서 제조물은 소수성 다공성 중합체 서포트 상에 고정된 적어도 하나의 리파아제를 포함하고;

(4) 단계 (3)에서 수득되는 혼합물에 알킬 알코올 또는 알코올 공여자를 단계별로 첨가하는 한편으로 혼합하여 상기 지방산 공급원, 고정된 효소, 물 또는 수용액 및 알킬 알코올을 포함하는 반응 매체를 수득하고, 여기에서 반응 매체 또는 수용액의 pH는 5 내지 9이고;

(5) 상기 지방산 공급원과 상기 알코올 간의 반응이 상기 용기 내에서 지방산 공급원의 지방산 알킬 에스테르, 글리세롤 및 물로의 적어도 70% 전환이 수득되기에 적절한 시간 동안 교반 및/또는 진탕 하에서 진행되는 것을 허용하고;

(6) 반응 매체로부터 상기 지방산 알킬 에스테르를 분리하는;

단계를 포함하는 방법.

청구항 3

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 고정된 리파아제 제조물이 유의미한 활성 상실 없이 동일한 공정의 20 연속 사이클 이상 재사용되는 방법.

청구항 4

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 알코올이 짧은-사슬 C_{1-6} 알킬 알코올이고 상기 알코올 공여자가 모노-알킬 에스테르 또는 디-메틸 카보네이트 등과 같은 디-알킬 카보네이트인 방법.

청구항 5

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 적어도 하나의 리파아제가 리조무코 미에헤이(*Rhizomucor miehei*), 슈도모나스 종(*Pseudomonas sp.*), 리조푸스 니베우스(*Rhizopus niveus*), 무코 자바니크스(*Mucor javanicus*), 리조푸스 오리제(*Rhizopus oryzae*), 아스페르질루스 니제르(*Aspergillus niger*), 페니실리움 카멤베르틸(*Penicillium camembertii*), 알칼리게네스 종(*Alcaligenes sp.*), 아크로모박테르 종(*Acromobacter sp.*), 버크홀데리아 종(*Burkholderia sp.*), 써모미세스 라누기노사(*Thermomyces lanuginosa*), 크로모박테리움 비스코슘(*Chromobacterium viscosum*), 칸디다 안타르티카(*Candida antarctica*) B, 칸디다 루고사(*Candida rugosa*), 칸디다 안타르티카(*Candida antarctica*) A, 파파야 씨앗(papaya seed) 및 췌액소(pancreatin) 중에서 임의의 하나로부터 유래되는 리파아제인 방법.

청구항 6

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 고정된 리파아제가 지방산 알킬 에스테르와 물을 산출하도록 하는 유리 지방산의 에스테르화 및 지방산 알킬 에스테르와 글리세롤을 산출하도록 하는 트리글리세리드 및 부분 글리세리드의 에스테르교환 둘 다를 촉진할 수 있는 방법.

청구항 7

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 리파아제 제조물이 동일한 소수성 서포트 상에 각각 별개로 또는 공동-고정될 수 있는 적어도 2개의 리파아제를 포함하고, 여기에서 상기 리파아제는 동일하거나 상이한 위치-특이성 (region-specificity)을 갖는 방법.

청구항 8

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 서포트가 소수성 지방족 중합체-기반 서포트 및 소수성 방향족 중합체-기반 서포트 또는 이들의 임의의 조합 중의 하나인 방법.

청구항 9

제 8 항에 있어서, 여기에서 상기 소수성 중합체-기반 서포트가 선형 또는 가지형 유기 사슬 또는 이들의 임의의 조합을 포함하는 거대망상(macroreticular) 서포트인 방법.

청구항 10

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 서포트가 소수성일 수 있거나 소수성 유기 물질로 코팅된 다공성 또는 비-다공성 무기 서포트인 방법.

청구항 11

제 1 항에 있어서, 여기에서 지방산 공급원이 먼저 상기 수성 알칼리성 완충액 용액과 혼합되고, 계속해서 혼합물이 상기 고정된 리파아제 제조물로 처리되고, 상기 알코올을 첨가하고 상기 지방산 공급원의 적어도 70%가 지방산 알킬 에스테르로 전환될 때까지 반응이 진행되도록 허용되는 방법.

청구항 12

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 반응 매체를 여과하고, 여과된 반응 매체를 상 분리에 적용시키고, 지방산 알킬 에스테르 및 반응되지 않은 잔류 지방산 공급원을 포함하는 위쪽 상을 수집하는 것에 의하여 상기 지방산 알킬 에스테르가 상기 반응 혼합물로부터 분리되는 방법.

청구항 13

제 12 항에 있어서, 여기에서 임의의 형성된 글리세롤이 분리되고 수집되는 방법.

청구항 14

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 지방산 공급원이 식물유(plant oil), 동물 지방(animal fat), 조류유(algal oil), 어유(fish oil), 폐유(waste oil), 갈색 그리스(brown grease) 및 이들의 임의의 혼합물 중 임의의 하나인 방법.

청구항 15

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 지방산 공급원이 선택적으로 추가로 다른 미량 지방산 유도체의 부재 또는 존재 중에서 인지질, 지방산 에스테르 및 아미드를 포함하고, 여기에서 상기 지방산 공급원이 정제되지 않은, 정제된, 표백된, 탈취된 또는 이들의 임의의 조합인 방법.

청구항 16

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 알코올이 메탄올이고 상기 결과의 지방산 알킬 에스테르는 지방산 메틸 에스테르인 방법.

청구항 17

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 알킬 알코올이 6 내지 10개의 탄소 원자의 중간-사슬 지방 알코올 또는 12 내지 22개의 탄소 원자의 긴-사슬 지방 알코올인 방법.

청구항 18

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 여기에서 상기 고정된 리파아제가 회분(batch) 또는 연속 방식으로 가동되는 연속 교반-탱크 반응기(continuous stirred-tank reactor) 또는 충전탑 반응기(packed-bed column reactor)에서 이용되는 방법.

청구항 19

지방산을 알킬 알코올로 동시적 또는 순차적으로 에스테르교환 및 에스테르화시켜 지방산 알킬 에스테르 및 글리세롤 및 물을 각각 형성하기 위한 시스템으로서, 고정된 리파아제 제조물의 존재하에 지방산과 알킬 알코올 및 알킬 알코올 공여자 중 적어도 하나를 포함하는 반응 매체를 반응시키도록 구성된 반응 용기를 포함하고, 여기에서 고정된 리파아제 제조물이 소수성 다공성 서포트 상에 고정된 적어도 하나의 리파아제를 포함하고 반응 매체가 수성 알칼리성 완충액 용액 및 물 또는 수용액 중의 적어도 하나를 포함하는 시스템.

청구항 20

제 1 항 또는 제 2 항에 있어서, 청구항 제 19 항의 시스템 중에서 수행되는 방법.

청구항 21

제 2 항에 있어서, 여기에서 지방산 공급원이 먼저 상기 물 또는 수용액과 혼합되고, 계속해서 혼합물이 상기 고정된 리파아제 제조물로 처리되고, 상기 알코올을 첨가하고 상기 지방산 공급원의 적어도 70%가 지방산 알킬 에스테르로 전환될 때까지 반응이 진행되도록 허용되는 방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] **본 발명의 기술 분야**

[0002] 생물연료, 식품과 세정제 산업에서 이용을 위한 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 효소적 방법이 개시된다. 이러한 방법에서 지방산 공급원 및 알코올 또는 알코올 공여자는 알칼리성 수성 완충액 또는 물의 존재에서, 소수성 수지 상에 고정된 효소의 존재에서 반응된다. 개시된 방법은 연속 교반-탱크 (continuous stirred-tank) 또는 충전탑 반응기 (packed-bed column reactor)를 이용하여 회분식으로 또는 연속적으로 가동될 수 있다.

배 경 기 술

[0003] **본 발명의 배경 기술**

[0004] 효소의 고정화 (immobilization)는 기본적으로, 전체 효소적 방법에서 효소의 원가 부담 (cost contribution)을 감소시키고; 산물로부터 효소의 회수를 용이하게 하고; 그리고 이러한 방법의 연속 가동 (continuous operation)을 가능하게 하는 것을 목적으로 하는 매우 다양한 기술에 의해 설명되었다.

[0005] 고정화 기술은 일반적으로, 하기와 같이 분류된다:

[0006] 1. 고형 서포트, 예를 들면, 실리카와 불용성 중합체에 효소의 물리적 흡수.

[0007] 2. 이온-교환 수지 상에 흡착.

[0008] 3. 고형 서포트 물질, 예를 들면, 에폭시화 (epoxidation)된 무기 또는 중합성 서포트에 효소의 공유 결합.

[0009] 4. 성장하는 중합체 내에 효소의 포획.

[0010] 5. 막 반응기 또는 반-침투성 겔 내에 효소의 가둠.

[0011] 6. 가교-연결 효소 결정 (CLECS) 또는 집합체 (CLEAS).

[0013] 앞서 언급된 모든 효소 고정화 절차는 하기 단계로 구성된다:

[0014] 1. pH, 온도, 완충액 염의 유형 및 이온 강도에 대하여 적절한 완충액 시스템에서 효소를 용해시키는 단계.

[0015] 2. 고형 서포트를 효소 용액 내로 첨가하고, 그리고 효소 분자가 고형 서포트 상에 고정될 때까지 일정 시간 동안 혼합하는 단계.

[0016] 3. 고정된 효소를 내포하는 고형 서포트를 여과하는 단계.

[0017] 4. 느슨하게 결합된 효소 분자를 제거하기 위하여 적절한 완충액으로 서포트를 세척하고, 이후 고형 서포트를 건조시키는 단계.

[0019] 계면 효소 (interfacial enzyme), 주로 리파아제 (lipase)는 전술한 기술에 따라서 고정된다. 이들은 낮은 합성 활성 및/또는 짧은 가동 반감기 시간을 갖는 고정된 효소 제조물을 제공하였다. 고정된 리파아제 및 기타 계면 효소의 합성 활성과 안정성을 증가시키는 시도에서, 상이한 활성화 방법이 적용되었다. 이들 방법에는 하기가 포함된다:

[0021] 1. 소수성 잔기, 예를 들면, 지방산 또는 폴리에틸렌 글리콜로 효소의 표면 기능기 (surface functional group)에 결합.

[0022] 2. 계면활성제, 예를 들면, 폴리올 지방산 에스테르로 효소의 표면을 코팅.

[0023] 3. 친수성 용매, 예를 들면, 에탄올 또는 이소-프로판올로 전처리된 소수성 서포트, 전형적으로 폴리프로필렌으로 효소와 접촉.

[0025] 앞서 언급된 방법 중에서 어느 것도 산업적 양으로 효소적 역전환 (enzymatic reverse conversion)을 달성하기 위한 고정된 계면 효소의 안정화와 비용-효과 (cost-effectiveness)에 대하여 만족스러운 결과를 산출하지 못하였다. 또한, 대부분의 효소는 전술한 절차에 따라 고정될 때, 그들의 합성 활성 중에서 상당 부분을 상실하거나, 또는 고정화 절차에 의해 강제되는 일정한 제약으로 인하여, 또는 반응 매체 내에 일정한 효소 저해물질의 존재 때문에 그들의 완전한 활성 능력 (activity performance)을 발휘하지 못하는 것으로 보고되었다.

[0026] 리파아제와 포스포리파아제의 다른 주요한 단점은 친수성 기질, 특히 짧은-사슬 알코올과 짧은-사슬 지방산 (C4 미만)에 대한 그들의 낮은 내성 (tolerance)이다. 많은 연구에서, 짧은-사슬 알코올과 짧은-사슬 지방산, 예를 들면, 메탄올과 아세트산은 각각, 이들 효소의 4차 구조로부터 필수적인 물 분자를 이탈시키는데 주도적인 역할을 하고, 그들의 변성 (denaturation) 및 결과적으로, 그들의 촉매 활성의 상실을 유발하는 것으로 밝혀졌다. 이러한 단점은 오일 트리글리세리드와 메탄올을 기질로서 이용한, 상업적인 양의 지방산 메틸 에스테르 "바이오디젤 (biodiesel)"의 생산을 위한 리파아제의 적용을 방해하였다.

[0027] 유리 알코올로 지방산 공급원의 에스테르교환/에스테르화를 위한 고정된 리파아제를 이용하는 추가의 단점은 생물촉매 (biocatalyst) 상에 형성된 글리세롤과 물 부산물의 축적, 그리고 결과로써, 고정된 효소의 활성 부위에 기질의 자유로운 접근의 불가능이다. 이런 생물촉매는 일반적으로, 생물촉매의 동일한 회분이 이용될 때 소수의 사이클 이후 그들의 촉매 능력을 상실한다.

[0028] 본 발명자들은 많은 생산 사이클 동안 우수한 안정성, 지속적인 활성을 보이는 특별한 고정된 효소 제조물을 개발하였다. 이런 효소 제조물의 실례는 특히, WO/2008/084470, WO/2008/139455 및 WO2009/069116에서 기술된다.

[0030] 촉매 반응이 수행되는 조건은 고정된 효소 제조물의 안정성과 효율에 부정적인 영향을 줄지도 모른다. 이들 반응 조건 하에 안정성과 활성을 보전하는 효소 제조물을 확보하는 것이 중요하다.

[0031] 본 발명의 이들 목적 및 다른 목적은 설명이 진전됨에 따라 명백해질 것이다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0032] **본 발명의 요약**

[0033] 한 구체예에서, 본 발명은 지방산 알킬 에스테르를 형성하는, 알코올로 지방산 공급원의 에스테르교환 (transesterification)/에스테르화 (esterification)를 위한 방법에 관계하고, 상기 방법은 고정된 리파아제 제조물의 존재에서 지방산 공급원 및 알코올 또는 알코올 공여자를 반응시키는 단계를 포함하고, 여기서 고정된 리파아제 제조물은 소수성 다공성 서포트 상에 고정된 적어도 하나의 리파아제를 포함하고, 그리고 반응 매체는 수성 알칼리성 완충액 용액을 내포한다.

[0034] 상기 수성 알칼리성 완충액 용액은 약한 수성 알칼리성 완충액 용액일 수 있다. 상기 수성 알칼리성 완충액 용액은 반응 혼합물 내에서 지방산 공급원의 5% wt.까지의 양으로 내포될 수 있다. 수성 완충액 용액은 7 내지 대략 11, 예를 들면, 7-8.5, 7-9, 7-9.5, 7-10 및 7-11 중에서 임의의 한 가지의 pH를 가질 수 있다. 완충액 용액을 구성하는 보충된 약알칼리성 시약의 pKa는 지방산 공급원을 구성하는 산의 pKa보다 높거나 이와 동등하다.

[0035] 다른 구체예에서, 본 발명은 지방산 알킬 에스테르를 형성하는, 알코올로 지방산 공급원의 에스테르교환 (transesterification)/에스테르화 (esterification)를 위한 방법에 관계하고, 상기 방법은 고정된 리파아제 제조물의 존재에서 지방산 공급원 및 알코올을 반응시키는 단계를 포함하고, 여기서 고정된 리파아제 제조물은 소수성 다공성 서포트 상에 고정된 적어도 하나의 리파아제를 포함하고, 그리고 반응 매체는 물을 내포한다. 물은 3 내지 11의 pH를 갖는 수용액의 형태로 존재한다. 반응 매체는 지방산 공급원의 5% wt.까지 물 또는 수용액을 내포할 수 있다.

[0036] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 알코올은 짧은-사슬 알코올, 예를 들면, C_1-C_6 알킬 알코올, 더욱 구체적으로 C_1-C_4 알킬 알코올, 특히 메탄올 또는 에탄올일 수 있다. 상기 알코올이 메탄올인 경우에, 상기 결과의 지방산 에스테르는 지방산 메틸 에스테르 (FAME - 바이오디젤)이다. 알코올은 또한, 중간-사슬 지방 알코올 (C_6-C_{10}) 또는 긴-사슬 지방 알코올 (C_{12}-C_{22})일 수도 있다. 알코올 공여자는 모노-알킬 에스테르 또는 디-알킬 카보네이트, 예를 들면, 디-메틸 카보네이트 또는 디에틸 카보네이트일 수 있다.

[0037] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 상기 고정된 리파아제는 유리 지방산의 에스테르화를 촉진시켜 지방산 알킬 에스테르와 물을 부산물로서 산출할 수 있고, 그리고 트리글리세리드와 부분 글리세리드의 에스테르교환을 촉진시켜 지방산 알킬 에스테르와 글리세롤을 부산물로서 산출할 수 있다.

[0038] 알칼리성 완충액 또는 알칼리성 용액의 용도에 관련된 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 반응 매체 내에서 상기 알칼리성 완충액 또는 용액의 양은 지방산 공급원의 0.001 내지 5% wt이다.

[0039] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 상기 적어도 하나의 리파아제는 리조무코 미에헤이 (*Rhizomucor miehei*), 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*), 리조푸스 니베우스 (*Rhizopus niveus*), 무코 자바니크스 (*Mucor javanicus*), 리조푸스 오리제 (*Rhizopus oryzae*), 아스페르질루스 니제르 (*Aspergillus niger*), 페니실리움 카멤베르틸 (*Penicillium camembertii*), 알칼리게네스 종 (*Alcaligenes sp.*), 아크로모박테르 종 (*Acromobacter sp.*), 버크홀데리아 종 (*Burkholderia sp.*), 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*), 크로모박테리움 비스코슘 (*Chromobacterium viscosum*), 칸디다 안타르티카 (*Candida antarctica*) B, 칸디다 루고사

(*Candida rugosa*), 칸디다 안타르티카 (*Candida antarctica*) A, 파파야 씨앗 (papaya seed) 및 췌액소 (pancreatin) 중에서 임의의 한 가지로부터 유래되는 리파아제일 수 있다. 리파아제 제조물은 적어도 2개의 리파아제를 포함할 수 있고, 이들은 소수성 서포트 상에서 각각 별개로 고정되거나, 또는 동일한 소수성 서포트 상에 공동-고정될 수 있다. 상기 리파아제는 동일한 또는 상이한 위치-특이성 (regio-specificity)을 가질 수 있다. 상기 리파아제는 유리 지방산의 에스테르화를 동시에 또는 연속적으로 촉진시켜 지방산 알킬 에스테르와 물을 부산물로서 산출할 수 있고, 그리고 트리글리세리드와 부분 글리세리드의 에스테르교환을 동시에 또는 연속적으로 촉진시켜 지방산 알킬 에스테르와 글리세롤을 부산물로서 산출할 수 있다.

[0040] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 상기 서포트는 소수성 지방족 중합체-기초된 서포트 및 소수성 방향족 중합체-기초된 서포트 중에서 임의의 한 가지일 수 있다. 상기 소수성 중합체 서포트는 선형 또는 가지형 유기 사슬로 구성될 수 있다. 상기 서포트는 거대망상 (macroreticular) 유기 중합체 또는 공중합체 사슬을 포함할 수 있다. 상기 서포트는 다공성 또는 비-다공성 무기 서포트일 수 있고, 이것은 소수성일 수 있거나, 또는 소수성 유기 물질로 코팅된다. 상기 유기 물질은 선형, 가지형, 또는 기능화된 소수성 유기 사슬일 수 있다.

[0041] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 알칼리성 완충액 용액이 이용되는 경우에, 상기 수성 알칼리성 완충액 용액은 무기 알칼리성 염 또는 유기 염기의 용액일 수 있다. 상기 알칼리성 완충액 용액은 알칼리성 금속 히드록시드, 카보네이트, 비카보네이트, 포스페이트, 설페이트, 아세테이트와 시트레이트, 일차, 이차와 삼차 아민, 그리고 이들의 임의의 혼합물 중에서 임의의 한 가지의 용액일 수 있다. 특정 구체예에서, 상기 알칼리성 완충액 용액은 나트륨 또는 칼륨 비카보네이트와 카보네이트에서 선택되는 약염기 (weak base)의 용액일 수 있다. 본 발명의 방법의 일부 특정 구체예에서, 상기 알칼리성 완충액 용액은 예비혼합 단계에서 상기 지방산 공급원에 첨가되거나, 또는 반응 매체에 직접적으로 첨가될 수 있다.

[0042] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 알칼리성 완충액 용액이 이용되는 경우에, 에스테르교환/에스테르화 반응 매체 내에서 상기 알칼리성 완충액 용액의 함량은 오일 공급원료 (oil feedstock)의 0.001-5% wt., 예를 들면, 1-2% wt. 범위 내에 있을 수 있다.

[0043] 본 발명의 일부 구체예에서, 지방산 공급원은 먼저, 알칼리성 완충액 용액과 또는 물 또는 물 용액과 혼합되고, 혼합물은 이후, 상기 고정된 리파아제 제조물로 처리되고, 그 이후에 상기 알코올이 첨가되고, 그리고 상기 지방산 공급원이 지방산 에스테르로 전환될 때까지 적절한 조건 하에 반응이 진행될 수 있다.

[0044] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 상기 지방산 공급원은 식물유 (plant oil), 동물 지방 (animal fat), 조류유 (algal oil), 어유 (fish oil), 폐유 (waste oil) 및 이들의 임의의 혼합물 중에서 임의의 한 가지일 수 있다. 상기 지방산 공급원은 다른 미량 지방산 유도체, 예를 들면, 인지질과 스테롤 에스테르의 부재 또는 존재에서 유리 지방산, 모노-, 디- 또는 트리-글리세리드, 임의의 비율에서 이들의 혼합물을 포함할 수 있다. 지방산 공급원은 정제되지 않은, 정제된, 표백된, 탈취된 또는 이들의 임의의 조합일 수 있다.

[0045] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 반응은 10℃ 내지 100℃, 구체적으로 25 내지 30℃의 온도에서 수행될 수 있다.

[0046] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 상기 지방산 공급원은 반응전 준비 용기 내에서 상기 알코올 또는 알코올 공여자 및 상기 물 또는 완충액 용액과 예비혼합되어 에멀젼이 형성될 수 있고, 이것은 이후, 상기 고정된 리파아제 제조물과 함께 에스테르교환/에스테르화 반응 용기 내로 공급될 수 있다.

[0047] 본 발명의 모든 구체예와 측면에서, 상기 고정된 리파아제는 회분 (batch) 또는 연속 (continuous) 방식으로 가동되는 충전탑 반응기 (packed bed column reactor)에서 이용될 수 있다.

[0048] 본 발명의 다른 측면에 따라서, 지방산 알킬 에스테르를 형성하는, 알코올로 지방산의 에스테르교환/에스테르화를 위한 시스템이 제시되고, 상기 시스템은 고정된 리파아제 제조물의 존재에서 지방산을 포함하는 반응 매체 및 알코올과 알코올 공여자 중에서 적어도 하나를 반응시키도록 설정된 반응 용기 (reaction vessel)를 포함하고, 여기서 고정된 리파아제 제조물은 소수성 다공성 서포트 상에 고정된 적어도 하나의 리파아제를 포함하고, 그리고 반응 매체는 수성 알칼리성 완충액 용액과 물 중에서 적어도 하나를 내포한다.

[0049] 상기 시스템은 임의의 바람직한 조합 (combination) 또는 변경 (permutation)에서, 하기 특징 중에서 하나 또는 그 이상을 포함할 수 있다:

[0050] A. 반응 용기는 적어도 상기 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 상기 시스템의 가동 동안, 고정된 리파아제 제조물을 포함할 수 있다.

[0051] B. 특징 A에 부가적으로 또는 대안으로, 반응 용기는 적어도 상기 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 상기 시스템의 가동 동안, 지방산 및 알코올과 알코올 공여자 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0052] C. 특징 A 또는 B에 부가적으로 또는 대안으로, 상기 반응 매체는 혼합물을 포함하고, 상기 시스템은 상기 반응 용기와 선택적으로 유체 소통 (fluid communication)하는 반응전 용기를 더욱 포함하고, 상기 반응전 용기는 적어도 지방산 및 알코올과 알코올 공여자 중에서 적어도 하나를 예비혼합하여 상기 혼합물을 형성하고, 그리고 적어도 상기 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 상기 시스템의 가동 동안 상기 혼합물을 상기 반응 용기에 선택적으로 전달하도록 설정된다. 이러한 시스템은 상기 반응전 용기와 선택적으로 유체 소통하고 적어도 상기 시스템의 상기 가동 동안 지방산을 상기 반응전 용기로 선택적으로 전달하도록 설정된 지방산 공급원, 그리고 상기 반응전 용기와 선택적으로 유체 소통하고 적어도 상기 시스템의 상기 가동 동안 알코올과 알코올 공여자 중에서 적어도 하나를 상기 반응전 용기에 선택적으로 전달하도록 설정된 알코올 공급원을 임의적으로 더욱 포함할 수 있다. 상기 시스템은 상기 반응전 용기와 선택적으로 유체 소통하고 적어도 상기 시스템의 상기 가동 동안 상기 혼합물에 포함되는 수성 알칼리성 완충액 용액과 물 중에서 적어도 하나를 상기 반응전 용기에 선택적으로 전달하도록 설정된 완충액 공급원을 임의적으로 더욱 포함할 수 있다.

[0053] D. 특징 A 내지 C에 부가적으로 또는 대안으로, 상기 시스템은 적어도 상기 시스템의 상기 가동 동안 각각 연속적인 방식으로 또는 별개의 회분에서 하나 또는 그 이상의 지방산 및/또는 알코올과 알코올 공여자 중에서 적어도 하나 및/또는 수성 알칼리성 완충액 용액과 물 중에서 적어도 하나를 상기 반응전 용기에 선택적으로 전달하도록 설정될 수 있다.

[0054] E. 특징 A 내지 D에 부가적으로 또는 대안으로, 반응전 용기는 적어도 상기 시스템의 상기 가동 동안 연속적인 방식으로 및/또는 별개의 회분에서 상기 혼합물을 상기 반응 용기에 선택적으로 전달하도록 설정될 수 있다.

[0055] F. 특징 A 내지 E에 부가적으로 또는 대안으로, 상기 시스템은 적어도 하나의 지방산; 알코올과 알코올 공여자 중에서 적어도 하나; 그리고 수성 알칼리성 완충액 용액과 물 중에서 적어도 하나를 상기 반응 용기에 선택적으로 및 직접적으로 전달하도록 설정될 수 있다.

[0056] G. 특징 A 내지 F에 부가적으로 또는 대안으로, 반응 용기는 상기 반응 용기 내에서 반응 매체를 선택된 온도 범위 내에 유지하도록 설정된 열 조절 시스템 (thermal regulation system)을 포함할 수 있다.

[0057] H. 특징 A 내지 G에 부가적으로 또는 대안으로, 상기 시스템은 적어도 상기 시스템의 가동 동안 고정된 리파아제 제조물을 상기 반응 용기 내에 보전하도록 설정된 보전 배열 (retaining arrangement)을 임의적으로 더욱 포함할 수 있다.

[0058] I. 특징 A 내지 H에 부가적으로 또는 대안으로, 상기 시스템은 상기 반응 용기와 선택적으로 유체 소통하는 산물 분리 용기 (product separation vessel)를 더욱 포함하고, 상기 시스템은 반응 산물을 포함하는 반응 혼합물을 상기 반응 용기로부터 상기 산물 분리 용기로 선택적으로 전달하도록 설정되고, 그리고 여기서 상기 산물 분리 용기는 거기에 전달된 반응 혼합물로부터 지방산 알킬 에스테르의 산출물을 선택적으로 분리하도록 설정된다. 가령, 산물 분리 용기는 원심분리기와 중력 분리 시스템 중에서 한 가지일 수 있다.

[0059] J. 특징 A 내지 I에 부가적으로 또는 대안으로, 반응 용기는 적어도 상기 시스템의 상기 가동 동안 연속적인 방식으로 및/또는 별개의 회분에서 상기 반응 혼합물을 상기 산물 분리 용기에 선택적으로 전달하도록 설정된다.

[0060] K. 특징 I 내지 J에 부가적으로 또는 대안으로, 상기 시스템은 상기 산물 분리 용기로부터 지방산 알킬 에스테르의 상기 산출물을 선택적으로 전달하도록 설정된다. 가령, 상기 시스템은 연속적인 방식으로 및/또는 별개의 회분에서 상기 산물 분리 용기로부터 지방산 알킬 에스테르의 상기 산출물을 선택적으로 전달하도록 설정된다.

[0061] L. 특징 A 내지 K에 부가적으로 또는 대안으로, 상기 시스템은 상기 산물 분리 용기에 전달된 반응 혼합물로부터 지방산 알킬 에스테르의 상기 산출물을 증가시키도록 설정된다. 이러한 특징을 갖는 시스템의 한 설정 (configuration)에서, 상기 시스템은 상기 산물 분리 용기에 차후에 전달된 반응 혼합물로부터 지방산 알킬 에스테르의 상기 산출물을 더욱 증가시키기 위하여 지방산 알킬 에스테르의 상기 산출물을 상기 반응 용기에 선택적으로 경로 변경 (rerouting)하도록 설정된다. 이러한 특징을 갖는 시스템의 다른 설정에서, 상기 시스템은 지방산 알킬 에스테르의 상기 산출물을 보조 반응기 모듈로 선택적으로 경로 변경하도록 설정되고, 여기서 상기 보조 반응기 모듈은 보조 반응기 용기와 보조 산물 분리 용기를 포함하고, 여기서 지방산 알킬 에스테르의 상기 더욱 증가된 산출물은 상기 보조 산물 분리 용기를 거쳐 선택적으로 차후에 전달된다.

과제의 해결 수단

[0062] **본 발명의 상세한 설명**

[0063] 효소적으로 촉매된 산업적 방법, 특히 고정된 리파아제(들)의 존재에서 알코올로 지방산 공급원의 에스테르교환/에스테르화를 위한 방법의 향상을 위하여, 본 발명자들은 고정된 리파아제(들)의 안정성이 여러 차례의 생산 사이클 동안 보존되는 특정한 조건을 개발하였다.

[0064] 본 발명의 한 구체예에서, 본 발명은 용매-없는 알칼리성 미소수성 시스템에서 지방산의 알킬 에스테르, 구체적으로 지방산의 짧은-사슬 알킬 에스테르, 예를 들면, 지방산 메틸과 에틸 에스테르 (바이오디젤)의 제조 방법에 관계한다. 특정 구체예에서, 알칼리성 미소수성 시스템은 약알칼리성 미소수성 시스템이다. 상기 방법은 지방산 공급원을 제공하는 단계, 그리고 상기 알칼리성 또는 약알칼리성 조건 하에 고정된 리파아제 제조물의 존재에서 이를 유리 알코올 또는 알코올 공여자와 반응시키는 단계를 포함한다. 이론에 한정됨 없이, 알칼리성 완충액 용액으로 지방산 공급원의 전처리는 효소에 대한 저해 효과를 가질지도 모르는 산을 중화시킬 것이다. 100% 전환까지 반응을 완결하는데 요구되는 알코올의 양은 단계별로 또는 한 회분으로 첨가될 수 있다. 더 나아가, 알코올은 짧은-사슬 알코올, 예를 들면, 메탄올 또는 에탄올일 수 있다. 다른 알코올 공여자는 가수분해효소(hydrolase)의 존재에서 지방산 공급원과의 반응에서, 그리고 상기 지방산 공급원이 지방산 알킬 에스테르, 구체적으로, 지방산 메틸 에스테르 (FAME) 또는 지방산 에틸 에스테르로 전환될 때까지 이러한 반응이 적절한 조건 하에 진행될 수 있도록 하는데 이용될 수 있고, 여기서 상기 가수분해효소 제조물은 적절한 거대망상 다공성 소수성 중합체-기초된 서포트 상에 별개로 또는 공동으로 고정된 하나 또는 그 이상의 리파아제를 포함한다.

[0065] 추가의 구체예에서, 지방산 공급원과 알코올 또는 알코올 공여자 사이에 에스테르교환/에스테르화 반응은 반응 혼합물에 물의 첨가로, 수성 미소환경에서 수행된다. 특정 구체예에서, 물은 지방산 공급원의 0.0001 내지 5% wt.로 첨가될 수 있다. 본 명세서에서 물은 순수한 또는 증류된 물을 의미하고, 또한 맹물, 바닷물 또는 임의의 다른 천연 물 자원 또는 저장소로부터 물, 탈염된 물, 화학적으로 또는 효소적으로 정제된 또는 처리된 물, 그리고 임의의 기타 수성 용액이 포함되지만 이들에 국한되지 않은 "수용액"을 의미한다. 반응 시스템 또는 수용액의 pH는 변할 수 있고, 그리고 예로써, 대략 3-11, 예를 들면, 4-10, 5-10, 5-9, 6-10, 6-9, 또는 7-9일 수 있다.

[0066] 본 발명의 방법은 반응 혼합물로부터 형성된 글리세롤 및 임의의 과잉의 물을 연속적으로 제거하면서 수행될 수 있다. 상기 지방산 공급원에 포함되는 지방산 아실 기 또는 유리 지방산의 지방산 알킬, 구체적으로 메틸 에스테르로의 전환은 반응 동안 다양한 시점에서 모니터링될 수 있다. 반응 매체는 반응 동안 임의의 원하는 시점에서 적절한 수단에 의해 제거되어 반응이 중단될 수 있고, 그리고 형성된 지방산 메틸 에스테르 및 임의적으로, 형성된 글리세롤은 반응 매체로부터 분리된다. 구체적으로, 반응은 상기 지방산 공급원에 포함되는 지방산 아실 기 또는 유리 지방산의 지방산 메틸 에스테르로의 전환이 적어도 70%, 예를 들면, 적어도 85%, 또는 적어도 90%에 도달할 때 중단될 수 있다.

[0067] 반응 시스템은 공동-계류 중인 WO2009/069116에서 기술된 것과 유사할 수 있다. 가령, 생산 시스템은 반응기 내에서 생물촉매를 보전하지만 반응 매체가 반응기 외부로 스며들 수 있도록 하는 바닥 소결 유리 또는 스테인리스강 필터가 구비된 교반 탱크 반응기를 이용할 수 있다. 이런 반응기 형태 (configuration)는 고정된 효소로부터 자가-탈착되는 부산물, 구체적으로 글리세롤과 물이 반응기의 바닥으로 가라앉고, 그리고 필터를 통하여 스며들 수 있도록 한다. 결과적으로, 탈착된 형성된 글리세롤 및 과잉의 물이 반응 매체로부터 연속적으로 제거되고, 반응이 합성 쪽으로 변동되어 98%를 초과하는 전환이 도달된다. 이러한 반응기에 이용되는 생물촉매는 본 명세서에서 기술된 바와 같이, 그들의 위치 특이성 (positional specificity)과 원천 (origin)을 고려하여, 단일 또는 복합-유형의 리파아제로 구성될 수 있다. 대안으로, 바닥 필터가 구비된 2개의 연속 교반 탱크 반응기가 이용될 수도 있다. 2개의 반응기 사이에 침전 탱크 (settling tank) 또는 원심분리기 (centrifuge)가 이용될 수 있다. 첫 번째 반응기는 단일 또는 복합-유형의 리파아제로 구성되는 고정된 생물촉매를 내포할 수 있다. 양쪽 반응기 사이에 침전 탱크 또는 원심분리기의 역할은 형성된 글리세롤 및 과잉의 물을 반응 매체로부터 제거하여, 적당한 반응 시간에서 두 번째 반응기 내에 원료 물질 (raw material)의 그들의 상응하는 지방산 알킬 에스테르로의 전환을 98% 초과까지 증가시키는 것이다. 일부 특정한 반응 시스템과 방법이 하기에 기술된다.

[0068] 용어 "반응 혼합물", "반응 시스템" 및 "반응 매체"는 본 명세서에서 동의어로서 이용될 수 있다.

[0069] 본 발명의 방법의 구체예에서처럼 알칼리성 완충액 용액 또는 물의 존재에서 소수성 수지 상에 고정된 리파아제의 이용은 상기 효소의 높은 안정성 및 생물촉매 상에 친수성 물질, 예를 들면, 물 및 형성된 글리세롤 부산물

의 축적의 회피를 담보한다. 본 발명의 방법의 특정 구체예에서, 0.001-5%, 예를 들면, 0.01-5%, 0.05-5%, 0.1-5%, 0.5-5%, 예를 들면, 0.001%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 0.75%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% 또는 5% 알칼리성 또는 약알칼리성 완충액 용액이 이용된다. 물이 이용되는 본 발명의 방법의 특정 구체예에서, 물은 0.0001-5% 물의 수준, 예를 들면, 0.001-5%, 0.01-5%, 0.05-5%, 0.1-5%, 0.5-5%, 예를 들면, 0.0001%, 0.001%, 0.01%, 0.05%, 0.1%, 0.5%, 0.75%, 1%, 1.5%, 2%, 2.5%, 3%, 3.5%, 4%, 4.5% 또는 5%에서 이용된다. 언급된 바와 같이, 알칼리성 용액이 이용될 때, 이것은 전형적으로 부반응으로 인하여 지방산 공급원 또는 산출물 내에 존재하는 산을 중화시킬 수 있다. 이들 부산물의 연속적인 능동 제거는 상기 방법의 효율을 더욱 증가시킬 수 있다. 분리된 글리세롤은 산업적으로 이용될 수 있다.

[0070] 본 발명의 방법에 이용되는 지방산 공급원은 대두유 (soybean oil), 카놀라유 (canola oil), 조류유 (algae oil), 유채유 (rapeseed oil), 올리브유 (olive oil), 피마자유 (castor oil), 야자유 (palm oil), 해바라기유 (sunflower oil), 낙화생유 (peanut oil), 면실유 (cotton seed oil), 자트로파유 (Jatropha oil), 원유 옥수수유 (crude corn oil), 어유 (fish oil), 동물-유래된 지방, 폐식용유 (waste cooking oil), 갈색 그리스 (brown grease), 불가식 식물 공급원으로부터 유래된 오일 트리글리세리드, 이들 오일로부터 유래된 부분 글리세리드와 유리 지방산, 또는 임의의 원하는 비율에서 이들 중에서 적어도 2가지의 혼합물 중에서 적어도 하나를 포함할 수 있다.

[0071] 본 발명의 모든 방법에서, 반응에 의해 형성된 지방산 짧은-사슬 알킬 에스테르는 구체적으로 지방산 메틸, 에틸, *이*소-프로필 또는 부틸 에스테르 (바이오디젤)이다. 다른 중간-사슬 지방 알코올 (C_6-C_{10})과 긴-사슬 지방 알코올 (C_{12}-C_{22}) 역시 본 발명의 생산 방법에 이용될 수 있을지도 모른다. 이들 더욱 긴 알코올은 구체적으로, 예로써 미용 산물을 위한 왁스의 생산에 적합할 수 있다.

[0072] 리파아제는 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*), 리조무코 미에헤이 (*Rhizomucor miehei*), 무코르 미에헤이 (*Mucor miehei*), 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*), 리조푸스 종 (*Rhizopus sp.*), 무코 자바니크스 (*Mucor javanicus*), 페니실리움 로크포르티 (*Penicillium roqueforti*), 아스페르질루스 니제르 (*Aspergillus niger*), 크로모박테리움 비스코숨 (*Chromobacterium viscosum*), 아크로모박테르 종 (*Acromobacter sp.*), 버크홀데리아 종 (*Burkholderia sp.*), 칸디다 안타르티카 (*Candida antarctica*) A, 칸디다 안타르티카 (*Candida antarctica*) *B*, 칸디다 루고사 (*Candida rugosa*), 알칼리게네스 종 (*Alcaligenes sp.*), 페니실리움 카멤베르틸 (*Penicillium camembertii*), 파파야 씨앗 (papaya seed) 및 췌액소 (pancreatin) 중에서 임의의 한 가지로부터 유래되는 리파아제일 수 있지만 이들에 국한되지 않는다.

[0073] 리파아제는 적절한 서포트, 구체적으로 소수성 지방족 중합체-기초된 서포트 또는 소수성 방향족 중합성 서포트 상에 공동으로 고정될 수 있다. 상기 리파아제 각각은 적절한 서포트 상에 고정될 수 있고, 여기서 상기 리파아제가 고정되는 서포트는 동일하거나 상이할 수 있다. 이용되는 리파아제는 그들의 기질에 대하여 위치-특이적이거나, 또는 무작위일 수 있다. 하나 이상의 리파아제가 이용될 때, 리파아제는 동일한 또는 상이한 소수성 서포트 상에 고정될 수 있다. 동일한 서포트 상에 공동-고정된 리파아제는 그들의 기질에 대하여 동일한 또는 상이한 기질 선택성 또는 위치-특이성을 나타낼 수 있다.

[0074] 리파아제는 위치-특이적 (또는 부위-특이적)일 수 있고, 각각은 단독으로 또는 동일한 또는 상이한 부위 특이성의 리파아제와 공동으로 이용될 수 있다. 위치 sn-1, sn-2- 또는 sn-3을 지칭할 때, 이들은 다양한 글리세리드의 글리세롤 골격 상에서 위치이다. 따라서 본 발명의 방법에 이용되는 리파아제는 sn-2 위치로 향하여 무작위 리파아제의 선택성보다 높은 선택성, 다시 말하면, 알코올 또는 알코올 공여자 및 sn-2 위치의 지방 아실 기 사이에 반응의 촉매에서 그들의 편애를 나타낼 수 있는 반면, 무작위 리파아제는 글리세롤 골격 상에 3개 위치 모두에서 지방 아실 기에 대한 동일한 에스테르교환 활성을 나타낸다. 일부 리파아제는 특히, 기질, 산물 등에 의해 결정된 특정 조건 하에, sn-2 위치 상에서 위치 활성 (positional activity)을 독특하게 나타낸다. 본 발명의 방법에 이용되는 다른 리파아제는 sn-1,3 위치 특이적이다. 이들은 단독으로, 또는 무작위 리파아제, 구체적으로 부분 글리세리드에 친화성을 갖는 리파아제, 그리고 임의적으로, sn-2 위치에 높은 친화성을 갖는 세 번째 리파아제와 함께 이용될 수 있다.

[0075] 서포트는 구체적으로, 다공성 거대망상 소수성 서포트이고, 이것은 유기 또는 무기일 수 있다. 서포트의 실례는 예로써, 소수성화된 실리카- 및/또는 알루미나-기초된 서포트가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 다공성 무기 서포트, 그리고 예로써, 중합성 또는 중합체-기초된 서포트가 포함되지만 이들에 국한되지 않는 소수성 유기 서포트이다. 서포트는 임의적으로, 에폭시 및/또는 알데히드 기에서 선택되는 활성 기능기 (active functional

group), 또는 이온 기 (ionic group)를 내포할 수 있다.

[0076] 본 발명의 방법에 이용되는 불용성 서포트는 구체적으로, 다공성 망상 소수성 지방족 또는 방향족 중합체-기초된 서포트, 예를 들면, 디비닐벤젠 또는 디비닐벤젠과 폴리스티렌의 혼합물로부터 제조된 다공성 미소망상 수지로 구성되는 Amberlite® XAD 1600과 Sepabeads® SP70, 미소망상 지방족 아크릴 중합체로 구성되는 Amberlite® XAD 7HP, 그리고 다공성 지방족 중합체, 예를 들면, 다공성 폴리프로필렌 (Accurel®)이다.

[0077] 서포트는 디비닐벤젠, 또는 디비닐벤젠과 스티렌의 혼합물로 구성되는 망상 소수성 중합체, 그리고 지방족 아크릴 중합체 또는 폴리알켄, 예를 들면, 폴리프로필렌으로 구성되는 망상 소수성 지방족 중합체일 수 있다. 특정한 서포트는 25-1000 Å, 그리고 더욱 구체적으로 80-200 Å 범위에서 구멍 크기의 다공성 매트릭스이다. 서포트는 또한, 분말성 또는 과립성 다공성 소수성 실리카 또는 기타 무기 산화물일 수 있다. 서포트는 또한, 분말성 또는 과립성 다공성 소수성화된 실리카 또는 기타 무기 산화물일 수 있다. 특정 구체예에서, 서포트 수지의 표면적 (surface area)은 100m^2/g보다 크다.

[0078] 지방산 공급원과 알코올 사이에 리파아제 촉매된 에스테르교환/에스테르화 반응으로 보충되는 알칼리성 또는 약알칼리성 수성 용액의 양은 일반적으로, 반응 매체의 5%wt. 미만이다. 이러한 알칼리성 용액은 예로써, 무기 알칼리성 염기 또는 염으로부터 또는 유기 염기로부터 제조된다. 무기 염기와 염은 예로써, 알칼리성 금속 히드록시드, 카보네이트, 비카보네이트, 포스페이트, 설페이트, 아세테이트와 시트레이트이다. 유기 염기는 예로써, 일차, 이차 또는 삼차 아민일 수 있다. 이들 알칼리성 작용제의 혼합물 역시 예기된다. 본 발명에 따른 방법에서, 고정된 효소의 미소환경의 pH는 알칼리성 또는 약알칼리성 값에 유지된다. 도 4와 5에서 도시된 바와 같이, 반응 시스템에 증류된 물의 첨가가 소수성 서포트 (수지) 상에 고정된 리파아제의 성능을 향상시키긴 하지만, 이용된 염기의 유형에 따라 상이한 pH 값을 갖는 다양한 알칼리성 완충액의 첨가는 예로써, 도 2와 3에서 도시된 바와 같이 소수성 서포트 (수지) 상에 고정된 리파아제의 더욱 안정화를 유발하였다. 카보네이트와 비카보네이트 완충액은 소수성 서포트 상에 고정된 리파아제의 안정성을 증가시키는데 효과적인 약염기의 실례이다. 다른 적절한 염기가 본 명세서에서 기술된다. 일반적으로, 완충액 용액을 구성하는 보충된 알칼리성 또는 약알칼리성 시약의 pKa는 지방산 공급원을 구성하는 산의 pKa와 동등하거나 이보다 크다. 본 발명에서 이용된 약알칼리성 용액은 일반적으로, 7 내지 대략 11, 예를 들면, 7-8.5, 7-9, 7-9.5, 7-10 또는 7-11의 pH를 갖는 용액이다. 일반적으로, 이용된 알칼리성 또는 약알칼리성 수성 용액의 양은 반응에 이용된 오일의 양에 기초하여 중량 퍼센트 (weight percent, wt.%)로 표시된다.

[0079] 예로써, 0.01-5% wt., 0.05-5% wt., 0.05-4% wt., 1-5% wt., 또는 1-4% wt.의 양으로, 알칼리성 또는 약알칼리성 용액의 존재에서 다공성 소수성 중합체-기초된 서포트 (수지) 상에 고정된 리파아제의 이용은 지방산 공급원과 알코올 사이에 에스테르교환/에스테르화 반응에서 생물촉매의 활성을 안정화시킨다. 이것은 하기 실시예에서 증명된다.

[0080] 지방산 공급원은 트리글리세리드, 부분 글리세리드, 유리 지방산, 인지질, 지방산의 에스테르와 아미드, 또는 적어도 2가지의 상기 공급원으로 구성되는 혼합물 중에서 적어도 하나이다.

[0081] 지방산 알킬 에스테르의 생산은 에스테르교환 또는 에스테르화에 의해 동시에 또는 순차적으로 수행된다. 이런 반응 시스템 하에, 생물촉매 활성은 복합 용도에서 유의미한 활성 상실 없이 유지되고, 또한 생물촉매 상에서 글리세롤과 물 부산물 또는 기타 친수성 화합물의 축적을 회피한다.

[0082] 본 발명에서는 많은 생산 사이클 동안 높은 활성과 안정성을 보전하는 특정한 고정된 계면 효소를 이용하는 방법을 제시한다. 구체적으로, 리파아제와 포스포리파아제 제조물이 에스테르교환/에스테르화 반응에 이용된다. 이들 반응은 식료품, 화장품 및 생물연료 ("바이오디젤")의 생산에 이용될 수 있다. 특히 흥미롭게는, 이들 효소는 "바이오디젤"로서 이용을 위한 지방산 짧은-사슬 알킬 에스테르의 합성에 이용될 수 있다.

[0083] 본 발명에서는 짧은-사슬 지방산, 예를 들면, 아세트산뿐만 아니라 짧은-사슬 알코올, 예를 들면, 메탄올, 에탄올과 글리세롤에 대하여 높은 내성의 안정한 고정된 계면 효소를 이용하였다. 이들 효소 제조물의 이용은 또한, 고정된 생물촉매 상에 친수성 물질, 특히 글리세롤과 물의 축적을 예방한다.

[0084] 본 발명의 한 구체예에서, 적당한 반응 시간, 전형적으로 5시간 미만 동안 완전한 전환에 가깝게 원하는 산물, 다시 말하면, 지방산 알킬 에스테르를 획득하기 위하여, 알칼리성 또는 약알칼리성 수성 용액의 존재에서 소수성 서포트 (수지) 상에 고정된 한 가지 또는 그 이상의 유형의 리파아제를 이용하여 알코올로 지방산 공급원의 동시적 또는 순차적 에스테르교환/에스테르화 반응을 위한 방법이 제시된다. 약알칼리성 용액, 예를 들면, 나트

륨 비카보네이트의 0.001M, 0.1M, 0.5M 또는 1M 용액은 반응에 이용된 오일의 양의 대략 5% wt. 또는 대략 4% wt. 미만의 양으로 반응 시스템 내에 존재할 수 있다.

[0085] 하기 실시예에서 증명된 바와 같이, 리파아제의 가동 수명 (operational lifetime) 역시 에스테르교환/에스테르화 반응 매체에서 예로써, 0.001-5% wt. 범위에서 알칼리성 또는 약알칼리성 완충액 용액의 이용과 함께 리파아제 고정화를 위한 소수성 수지 서포트를 이용함으로써 연장될 수 있다. 하기 실시예에서 더욱 증명된 바와 같이, 반응 혼합물의 물 함량은 pH 값에 상관없이 증가될 수 있다. 따라서 다른 구체예에서, 생물촉매의 안정성은 예로써, 지방산 공급원의 0.0001-5% wt.에서, 또는 앞서 정의된 임의의 특정 하위-범위에서 물을 첨가함으로써 반응 시스템의 물 함량을 증가시키면 증가한다. 이들 결과는 지방산 공급원의 0.0001-5% wt. 범위에서 알칼리성 용액 (도 2와 3) 또는 지방산 공급원의 0.001-4%에서 물 (도 4와 5)의 첨가가 많은 반응 사이클 동안 효소 활성과 안정성을 유지시킨다는 것을 증명한다.

[0086] 본 발명의 방법에 이용되는 알코올 또는 알코올 공여자는 짧은-사슬 알킬 알코올, 구체적으로 C_1-C_6 알킬 알코올, 더욱 구체적으로 C_1-C_4 알킬 알코올, 그리고 특히 메탄올 또는 에탄올일 수 있고, 또는 알코올 공여자는 모노-알킬 에스테르 또는 디알킬 카보네이트, 예를 들면, 디메틸 카보네이트일 수 있다. 알코올 공여자, 예를 들면, 디알킬 카보네이트는 또한, 반응 시스템의 알칼리성 (alkalinity) 또는 약한 알칼리성에 대한 공급원으로서 기능할 수 있다.

[0087] 본 발명의 다른 측면에 따라, 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 시스템이 제시된다. 도 **11**을 참고하면, 참고번호 **100**으로 전반적으로 지정된 이런 시스템의 첫 번째 구체예는 반응기 용기 **120**, 반응전 준비 용기 **140**, 그리고 산물 분리 용기 **160**을 포함한다.

[0088] 반응전 준비 용기 **140**은 공급원료 물질과 완충액 (및/또는 물)을 수용하고, 이들로부터 적절한 에멀젼을 형성하고, 그리고 제조된 에멀젼 **PE** (또한, 유화된 공급원료로 지칭됨)를 반응기 용기 **120**에 공급하도록 설정된다. 특히, 이런 피드백 물질 (feedback material)은 각각, 용기 유입구 **172**, **174**, **176**, 그리고 적절한 밸브 (도시되지 않음)를 거쳐 상기 반응전 준비 용기 **140**과 유체 소통하는 각각, 적절한 공급 라인 **152**, **154**, **156**을 거쳐 제공된 지방산 공급원 **182**로부터 지방산 **FA** (가령, 폐식용유), 그리고 알코올 공급원 **184**로부터 알코올 **AL** (가령, 메탄올), 그리고 완충액/물 공급원 **186**으로부터 완충액 (및/또는 물) **BU**를 포함할 수 있다.

[0089] 반응전 준비 용기 **140**은 내부 부피 (internal volume) **V1**을 한정하고, 여기서 용기 유입구 **172**, **174**, **176**을 거쳐 그 내부에 제공된 공급원료 물질과 완충액/물을 포함하는 반응 혼합물은 동력 공급원 (도시되지 않음)에 의해 구동된 적절한 교반 시스템 **142**에 의해 서로 혼합되어 에멀젼 **PE**를 형성한다. 반응전 준비 용기 **140**은 외부 재킷 **149**를 포함하고, 이를 통하여 적절한 작동 유체 (work fluid)는 원하는 정상 상태 온도에서 부피 **V1**이 유지되도록 순환될 수 있다. 가령, 작동 유체는 오일 또는 물이고, 상이한 용기 (도시되지 않음)에서 가열되거나 냉각되고, 그리고 적절한 유입구와 출구 포트 (도시되지 않음)를 거쳐 재킷 **149**를 통해 펌핑 (pumping)될 수 있다. 이러한 구체예의 대안적 변형에서, 반응전 준비 용기 **140**은 재킷 **149** 대신에 또는 재킷 **149**에 추가하여, 가열 및/또는 냉각 요소, 예를 들면, 전기 동력 가열 및/또는 냉각 요소의 시스템을 포함할 수 있다.

[0090] 반응기 용기 **120**은 반응전 준비 용기 **140**로부터 제조된 에멀젼 **PE**를 수용하고, 적절한 생물촉매 **BC**의 존재에서 그 내부에 공급원료 물질을 반응시켜 반응 산물 **RP**를 생산하고, 그리고 반응 혼합물로부터 반응 산물 **RP**를 산물 분리 용기 **160**에 공급하도록 설정된다. 배출구 라인 **148**은 적절한 밸브 (도시되지 않음)를 거쳐 반응전 준비 용기 **140**과 반응기 용기 **120** 사이에 선택적 유체 소통을 제공하고, 그리고 반응전 준비 용기 **140**에 의해 제조된 에멀젼 **PE**가 원하는 대로 반응기 용기 **120**에 공급될 수 있도록 한다.

[0091] 반응 용기 **120**은 내부 부피 **V2**를 한정하고, 여기서 용기 유입구 **122**를 거쳐 그 내부에 제공된, 반응 혼합물 내에 제조된 에멀젼 **PE**는 반응되고, 그리고 반응 혼합물은 동력 공급원 (도시되지 않음)에 의해 구동된 적절한 교반 시스템 **124**에 의해 교반되어 반응 산물 **RP**가 형성될 수 있다. 생물촉매 **BC**는 적절한 효소를 포함할 수 있고, 그리고 무능화되거나 충분히 효과적이지 못할 때까지 반응기 용기 **120** 내에 존속하는 고정된 효소 비드 (enzyme bead)의 형태로 제공되고, 그 후에, 이들은 제거되고 새로운 생물촉매 **BC**로 대체될 수 있다. 가령, 생물촉매 **BC**는 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)로부터 유래된 리파아제를 포함할 수 있다.

[0092] 반응기 용기 **120**은 외부 재킷 **129**의 형태로 열 조절 시스템 (thermal regulation system)을 포함하고, 이를 통하여 적절한 작동 유체는 원하는 정상 상태 온도에서 부피 **V2**가 유지되도록 순환될 수 있다. 가령, 작동 유체는 오일 또는 물이고, 상이한 용기 (도시되지 않음)에서 가열되거나 냉각되고, 그리고 적절한 유입구와 출구 포트

123을 거쳐 재킷 129를 통해 펌핑 (pumping)될 수 있다. 이러한 구체예의 대안적 변형에서, 열 조절 시스템은 재킷 129 대신에 또는 재킷 129에 추가하여, 가열 및/또는 냉각 요소, 예를 들면, 전기 동력 가열 및/또는 냉각 요소의 시스템을 포함한다.

[0093] 반응기 용기 120의 아래쪽 부분은 배출구 127을 포함하고, 그리고 필터 125의 형태에서 적절한 보전 배열은 반응기 용기 120으로부터 이전에 앞서 반응 혼합물, 특히 반응 산물 RP를 여과하고, 그리고 생물촉매 BC가 반응 산물 RP와 함께 이전되는 것을 예방하도록 설정된 배출구 127의 상류에 제공된다.

[0094] 산물 분리 용기 160은 과잉의 물과 글리세롤 G를 포함하는 산물에 의한, 반응 산물 RP로부터 원하는 산물 P (지방산 알킬 에스테르)을 분리하도록 설정된다. 배출구 라인 147은 적절한 밸브 (도시되지 않음)를 거쳐 산물 분리 용기 160과 반응기 용기 120 사이에 선택적 유체 소통을 제공하고, 그리고 반응 산물 RP가 원하는 대로 반응기 용기 120으로부터 산물 분리 용기 160에 공급될 수 있도록 한다. 이러한 구체예에서, 산물 분리 용기 160은 전술한 분리를 수행하기 위한 원심분리기 또는 중력 분리 시스템을 포함하고, 그리고 산물 P를 출력하기 위한 첫 번째 배출구 162, 그리고 과잉의 물과 글리세롤 G를 수집하기 위한 두 번째 배출구 164를 포함한다. 산물 P는 탭 163을 거쳐 수집될 수 있다.

[0095] 본 발명의 시스템은 따라서, 연속 생산 방식으로 가동될 수 있고, 여기서 제조된 에멀젼 PE는 반응기 용기 120 내로 공급되고, 그리고 원하는 산물 P는 탭 163을 거쳐 연속적인 방식으로 수집된다. 에멀젼 PE는 반응 산물 RP가 배출구 127로부터 이전되는 속도와 동일한 속도에서 그 내부에 반응물의 부피를 보충하기 위하여 연속적인 방식으로 제조되고 반응기 용기 120으로 전달될 수 있다. 대안으로, 에멀젼 PE는 배출구 127을 거쳐 반응 산물 RP의 연속 이전 이후에 반응기 용기 120에서 반응물의 수준이 특정의 최소 수준으로 하락할 때마다 별개의 간격에서 반응 혼합물 내에 반응물의 부피를 보충하기 위하여 회분으로 제조되고 반응기 용기 120으로 전달될 수 있다. 당연히, 원하는 산물 P가 연속적으로보다는 회분으로 제공되도록 시스템 100을 가동시키는 것도 가능하다.

[0096] 대안으로, 시스템 100은 증강된 수율 방식으로 가동될 수 있는데, 여기서 산물 P는 탭 163을 거쳐 즉시 수집되는 대신에, 라인 165, 용기 유입구 121 및 밸브 166을 포함하는 임의적 경로 변경 시스템을 거쳐 반응기 용기 120으로 경로 변경되고, 여기서 밸브 166은 탭 163으로부터 산물 P를 우회시키기 위하여 선택적으로 가동될 수 있다. 반응기 용기 120으로 경로 변경될 때, 산물 P는 공급원 184로부터, 상이한 알코올 공급원 (도시되지 않음)으로부터, 또는 반응전 준비 용기 140을 거쳐 공급원 184로부터 독립된 라인 (도시되지 않음)을 거쳐 제공된 알코올 AL과 그 내부에서 더욱 반응되어 더욱 높은 수율의 산물 P가 산출될 수 있고, 상기 산물은 산물 분리 용기 160을 이용하여 부산물로부터 다시 한 번 분리될 수 있다. 알코올이 준비 용기 140을 거쳐 제공될 때, 후자는 먼저, 제조된 에멀젼 PE가 비워지고, 그리고 적절한 밸브가 각각의 공급원 182와 186에 의해 제공되는 지방산 FA 및 임의적으로, 완충액/물을 예방한다. 적절한 펌프 또는 중력 공급 (gravity feed) 및 제어가능 밸브는 각각의 라인 152, 154, 156, 148, 147, 165를 통하여 각각의 물질을 선택적으로 운반하기 위하여 제공될 수 있고, 그리고 적절한 컨트롤러 (도시되지 않음)는 시스템의 가동을 모니터링하고 제어한다.

[0097] 첫 번째 구체예의 적어도 일부 대안적 변형에서, 반응전 준비 용기 140은 반응기 용기 120과 일체가 될 수 있다. 가령, 각각의 내부 부피 V1과 V2는 라인 148에 상응하는 열린 배치 (opening arrangement)를 갖는 벽에 의해 구분될 수 있다. 대안으로, 각각의 내부 부피 V1과 V2는 인접할 수 있지만, 내부 부피 V1은 에멀젼 PE가 생물촉매 BC에 도달하기 이전에 형성되도록 충분한 시간을 제공할 만큼 생물촉매 BC로부터 충분히 이격된다.

[0098] 첫 번째 구체예의 대안적 변형에서, 지방산 FA, 알코올 AL, 그리고 완충액/물 BU 중에서 하나, 둘 또는 모두는 반응기 용기 120에 직접적으로 제공되고 반응전 준비 용기 140을 우회할 수도 있다. 가령, 지방산 공급원 182, 알코올 공급원 184, 그리고 완충액/물 공급원 186 중에서 하나 또는 그 이상이 적절한 공급 라인 (도시되지 않음)을 거쳐 직접적으로 반응기 용기 120과 선택적으로 유체 소통하고 반응전 준비 용기 140을 우회할 수 있다.

[0099] 첫 번째 구체예, 또는 이의 대안적 변형에 따른 시스템 100의 모든 성분은 예로써, 각 성분이 온도, 압력, pH 등을 비롯한 각각의 조건에서 각각의 기능을 수행할 수 있도록 하기 위하여, 당분야에 공지된 바와 같이 적절한 형태를 갖고 적절한 물질로부터 만들어지는 것으로 간주된다.

[0100] 도 12를 참고하면, 참고 번호 200으로 지정된 본 발명의 시스템의 두 번째 구체예는 필요 부분에서 약간 수정에 의한 일부 차이를 제외하고, 도 11에서처럼 모든 유사-넘버링 성분을 비롯하여, 첫 번째 구체예 및 이의 대안적 변형의 모든 요소와 특성을 포함한다. 가령, 시스템 200 역시 첫 번째 구체예에서 필요 부분만 약간 수정하여 동일한 반응기 용기 120, 반응전 준비 용기 140, 산물 분리 용기 160, 지방산 공급원 182, 알코올 공급원 184, 완충액/물 공급원 186, 공급 라인 152, 154, 156, 용기 유입구 172, 174, 176, 교반 시스템 142, 외부 재킷

149, 배출구 라인 148, 용기 유입구 122, 교반 시스템 124, 생물촉매 BC, 외부 재킷 129, 유입구와 출구 포트 123, 배출구 127, 필터 125, 배출구 라인 147, 첫 번째 배출구 162, 두 번째 배출구 164를 포함한다.

[0101] 하지만, 두 번째 구체예에서, 첫 번째 구체예의 라인 165, 탭 163 및 밸브 166은 제외되고, 그리고 그 대신에, 보조 반응기 모듈 300이 산물 분리 용기 160의 첫 번째 배출구 162에 가동가능하게 연결된다.

[0102] 보조 반응기 모듈 300은 보조 반응기 용기 220 및 보조 산물 분리 용기 260을 포함하고, 이들은 본 구체예에서, 필요 부분만 약간 수정하여 각각 반응기 용기 120 및 산물 분리 용기 160과 실질적으로 유사하다. 가동 동안, 산물 분리 용기 160으로부터 원하는 산물 P는 라인 266, 밸브 267 및 용기 유입구 221을 거쳐 보조 반응기 용기 220로 보내진다. 보조 반응기 용기 220으로 보내질 때, 산물 P는 공급원 184로부터 또는 상이한 알코올 공급원 (도시되지 않음)으로부터 독립된 라인 (도시되지 않음)을 거쳐 제공된 알코올 AL과 그 내부에서 더욱 반응되어 더욱 반응된 산물 FRP가 생산될 수 있다. 라인 249는 더욱 반응된 산물 FRP가 보조 산물 분리 용기 260으로 운반될 수 있도록 하고, 이것은 이후, 가동되어 부산물로부터 더욱 높은 수율의 산물 P'를 분리한다.

[0103] 시스템 200은 필요 부분만 약간 수정하여 시스템 100에서와 유사한 방식으로 가동될 수 있다.

[0104] 개시되고 설명된 본 발명은 본 명세서에서 개시된 특정 실례, 방법 단계, 그리고 물질에 한정되지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 이런 방법 단계와 물질이 다소간 변할 수 있기 때문이다. 또한, 본 명세서에서 이용된 전문 용어는 특정 구체예를 설명하는 목적으로만 이용되고 한정을 의도하지 않는 것으로 이해되는데, 그 이유는 본 발명의 범위가 첨부된 특허청구범위 및 이의 등가물에 의해서만 한정될 것이기 때문이다.

[0105] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위에서, 단수 형태는 문맥에서 달리 명시되지 않으면, 복수의 지시 대상(referent)을 포함하는 것으로 이해되어야 한다.

[0106] 본 명세서 및 첨부된 특허청구범위 전역에서, 단어 "포함한다", 그리고 변형, 예를 들면, "포함한다"와 "포함하는"은 문맥에서 달리 명시되지 않으면, 규정된 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 포함하지만, 임의의 다른 정수 또는 단계, 또는 정수 또는 단계의 집단을 배제하지 않는다는 것을 암시하는 것으로 이해될 것이다.

[0107] 하기 실시예는 본 발명의 측면을 수행할 때 본 발명자들에 의해 이용되는 기술을 대표한다. 이들 기술이 본 발명의 실시를 위한 바람직한 구체예의 전형이긴 하지만, 당업자는 본 발명의 개시에 비추어, 본 발명의 의도된 범위를 벗어나지 않는 다양한 개변이 만들어질 수 있음을 인지할 것이다.

도면의 간단한 설명

[0108] **도면의 간단한 설명**

본 발명을 이해하고 본 발명이 실제로 어떻게 수행되는 지를 살펴보기 위하여, 하기 첨부된 도면을 참고로 하여 단지 무제한적 실례로써 구체예가 기술될 것이다:

도 1: 소수성 수지로서 Amberlite XAD 1600 (Amb. XAD 1600) 및 친수성 수지로서 Duolite D568 (Duo D568) 상에 고정된 리파아제 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) (TL), 그리고 소수성 수지로서 Sepabeads SP70 (SB SP70) 및 친수성 수지로서 다공성 실리카 (Sil.) 상에 고정된 리파아제 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*, PS)의 에스테르교환 활성.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클

도 2: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 0.1M의 상이한 수준의 나트륨 비카보네이트 용액에서 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세롤로의 전환. 생물촉매는 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)로부터 유래된 리파아제이었다.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클

도 3: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 0.1M의 상이한 수준의 나트륨 비카보네이트 용액에서 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세롤로의 전환. 생물촉매는 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제이었다.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클

도 4: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 물 없이 및 물의 상이한 수준에서 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세롤로의 전환. 생물촉매는 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)로부터 유래된 리파아제이었다.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클; DW - 증류된 물

도 5: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 물의 상이한 수준에서 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세롤로의 전환. 생물촉매는 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)로부터 유래된 리파아제이었다.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클; DW - 증류된 물

도 6: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 0.1M의 상이한 수준의 나트륨 비카보네이트 용액에서 4시간의 에스테르화/에스테르교환후 FFA와 대두유의 혼합물의 바이오디젤, 그리고 글리세롤과 물 부산물로의 전환. 생물촉매는 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제이었다.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클; DW - 증류된 물

도 7: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 0.1M의 2% 나트륨 비카보네이트 용액의 존재에서 4시간의 반응후 대두유 가수분해물의 바이오디젤과 물로의 에스테르화. 생물촉매는 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제이었다.

약어: Ac. Val. - 산가 (acid value); Cyc. - 사이클

도 8: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 0.1M의 1% wt. 나트륨 비카보네이트 용액의 존재에서 6시간의 반응후 에탄올로 어유의 에스테르교환. 생물촉매는 Amberlite XAD 1600 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) (TL Lip.)와 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) (PS Lip.)로부터 유래된 리파아제이었다.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클

도 9: 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 0.1M의 2% wt. 나트륨 비카보네이트 용액의 존재에서 6시간의 반응후 에탄올로 우지 (Tallow fat)의 에스테르교환. 생물촉매는 Amberlite XAD 1600 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginose*), 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제 (PS Lip.; TL Lip.)이었다.

약어: Conv. - 전환; Cyc. - 사이클

도 10: 소수성 다공성 수지 상에 고정된 칸디다 안타르티카 (*Candida antarctica*)로, 소수성 다공성 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 또는 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)를 이용하여 7 mg KOH/1g의 FFA 값을 내포하는 4시간후 획득된 에스테르교환/에스테르화 반응 매체의 처리.

약어: Ac. Val. - 산가; Cyc. - 사이클

도 11: 본 발명의 한 측면에 따른 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 시스템의 첫 번째 구체예를 개략적으로 도시한다.

도 12: 본 발명의 한 측면에 따른 지방산 알킬 에스테르의 생산을 위한 시스템의 두 번째 구체예를 개략적으로 도시한다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0109] **실시예**

[0110] ***전반적***

[0111] 모든 실험은 심원 유리 필터 (centered glass filter)가 바닥에 위치하는 30㎖ 부피의 유리 튜브에서, 또는 150-250 ㎛ 다공성의 소결 유리 필터가 바닥에 위치하는 500 ㎖ 부피의 기계적으로 교반된 반응기에서 수행되었다. 전형적인 반응 매체는 글리세롤 골격 상에 유리 또는 결합되는 지에 상관없이, 지방산에 대하여 1:1 몰 기초 (molar basis)에서 지방산 공급원, 알코올, 통상적으로, 메탄올 또는 에탄올을 내포하였다 (유리 지방산과

모노글리세리드의 경우에 1:1, 디글리세리드의 경우에 1:2, 그리고 트리글리세리드의 경우에 1:3, 알코올 우세). 지방산 공급원은 상이한 양의 알칼리성 완충액, 특정 구체예에서 나트륨 비카보네이트와 예비혼합되었다. 반응은 소수성 수지 상에 고정된 리파아제 (10-15%wt.)의 첨가에 의해 시작되고, 그리고 반응 매체는 30℃에서 기계적으로 진탕되거나, 또는 교반되었다. 알코올 양은 상이하게 지시되지 않으면, 각각 1시간의 시차를 두고 3 단계에서 동등하게 첨가되었다. 반응 전환은 상이한 시간 간격에서 반응 매체로부터 샘플을 채취하고 지방산 성분을 분석함으로써 추적되었다. 바이오디젤로의 전환은 지방산 알킬 에스테르의 100* 피크 면적 (peak area)/모든 피크 면적의 합계로서 계산되었다.

[0113] 리파아제 고정화: 리파아제는 표준 절차에 따라 고정되었고, 여기서 일정한 미생물로부터 유래된 리파아제는 일정한 pH 값, 예를 들면, 7.5에서 0.1M의 완충액 용액에서 용해되었다. 유기 또는 무기 중합체 수지가 리파아제 용액 내로 도입되었다. 혼합물은 실온에서 8시간 동안 진탕되었다. 차가운 아세톤이 수지 상에서 단백질 효소 침전을 증가시키기 위하여 혼합물 내로 임의적으로 첨가되었다. 생성된 혼합물은 여과되고, 그리고 효소 비드는 물 함량을 5% 이하로 감소시키기 위하여 건조되었다.

[0114] 소수성 특성의 수지를 획득하기 위하여 폴리스티렌/디비닐벤젠, 파라핀 또는 이들의 임의의 조합에 기초된 소수성 중합체 수지를 비롯한 상이한 수지가 이용되었다. 이용된 전형적인 소수성 수지에는 Amberlite® XAD 1600 (Rohm & Haas, USA) 및 Sepabeads® SP70 (Resindion, Italy)가 포함되었다. 이용된 전형적인 친수성 수지에는 Duolite® D568 (Rohm & Haas) 및 다공성 실리카 겔이 포함되었다. 리파아제가 수지 상에 별개로 고정되거나, 또는 상이한 리파아제가 동일한 수지 상에 공동-고정된다.

[0116] **실시예 1**

[0117] 소수성 수지로서 Amberlite® XAD 1600 및 친수성 수지로서 Duolite® D568 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)로부터 유래된 리파아제, 그리고 소수성 수지로서 Sepabeads® SP70 및 친수성 수지로서 다공성 실리카 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제의 에스테르교환 활성.

[0118] *반응 조건*: 0.1M의 1% wt. 나트륨 비카보네이트 용액을 내포하는 정제되고 표백된 대두유 (20g). 메탄올 (2.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. 10% wt. 리파아제 제조물을 내포하는 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 1에 도시된다.

[0119] 도 1에 제공된 결과는 1% wt.의 나트륨 비카보네이트 용액의 존재에서 상이한 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) 리파아제 및 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제 둘 모두 동일한 회분의 효소를 이용한 첫 5회 사이클 동안 높은 에스테르교환 활성을 나타낸다는 것을 증명한다. 5번째 회분후, 동일한 회분의 효소가 이용될 때, 시스템으로부터 반응 매체의 여과는 친수성 수지, 다시 말하면, Duolite® D568 및 다공성 실리카 상에 고정된 양쪽 리파아제의 비드 주변에 겔-유사 침전물 (gel-like deposit)의 형성으로 인하여 힘들어지는 것으로 관찰되었다. 친수성 수지 상에 고정된 양쪽 리파아제의 에스테르교환 활성은 추가의 연속 회분에서 급격하게 감소하였고, 그리고 이들은 10번째 사이클후 비활성화되었다. 대조적으로, 소수성 수지, Sepabeads® SP70 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제는 70회 사이클후 최초 활성의 80% 이상을 보전하였고, 반면 소수성 수지, Amberlite® XAD1600 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) 리파아제는 70회 이상의 사이클후 최초 활성의 20% 이상을 보전하였다.

[0121] **실시예 2**

[0122] A. 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세롤로의 전환.

[0123] *반응 조건*: 0.1M의 상이한 농도의 나트륨 비카보네이트 용액을 내포하는 정제되고 표백된 대두유 (20g). 메탄올 (2.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)로부터 유래된 리파아제가 이용되었다 (10%wt.). 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 2에 도시된다.

[0124] B. 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세

롤로의 전환.

[0125] *반응 조건*: 0.1M의 상이한 농도의 나트륨 비카보네이트 용액을 내포하는 정제되고 표백된 대두유 (20g). 메탄올 (2.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제가 이용되었다 (10%wt.). 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 3에 도시된다.

[0126] 도 2와 3은 반응 매체 내에서 나트륨 카보네이트의 양이 소수성 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) 리파아제 및 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제의 가동 수명에서 중요한 역할을 한다는 것을 보여준다. 도 2와 3에서, 알칼리성 용액의 부재에서 양쪽 고정된 리파아제가 소수의 사이클후 그들의 활성을 급격하게 상실하는 반면, 반응 시스템 내에 염기로서 나트륨 비카보네이트 용액의 존재에서 동일한 고정된 리파아제가 복수 이용 동안 그들의 에스테르교환 활성을 유지한다는 것을 확인할 수 있다. 양쪽 고정된 효소에 대한 결과는 반응 매체 내에서 나트륨 비카보네이트 용액의 양을 0 - 4% wt 범위에서 증가시키면 고정된 효소의 동일한 회분의 복수 이용에서 효소 활성의 상실이 감소한다는 것을 증명한다.

[0128] **실시예 3**

[0129] A. 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세롤로의 전환.

[0130] *반응 조건*: 상이한 농도의 증류된 물을 내포하는 정제되고 표백된 대두유 (20g). 메탄올 (2.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)로부터 유래된 리파아제가 이용되었다 (10%wt.). 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 4에 도시된다.

[0131] B. 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 6시간의 반응후 대두유의 바이오디젤과 글리세롤로의 전환.

[0132] *반응 조건*: 상이한 농도의 증류된 물을 내포하는 정제되고 표백된 대두유 (20g). 메탄올 (2.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제가 이용되었다 (10%wt.). 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 5에 도시된다.

[0133] 도 4와 5는 복수 실험에서 소수성 수지 상에 고정된 동일한 회분의 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) 리파아제와 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제를 이용한 에스테르교환 활성이 또한, 반응 시스템 내에 물 함량에 의해 영향을 받는다는 것을 보여준다. 0(zero)에서 4% wt로 물 함량을 증가시키면 연속 사이클에서 이용될 때 생물촉매의 더욱 높은 잔여 에스테르교환 활성이 유지된다는 것을 확인할 수 있다. 도 2 내지 5에 제공된 결과는 에스테르교환 반응에서 약염기, 예를 들면, 나트륨 비카보네이트 용액을 이용하는 것이 연속 사이클에 이용될 때 소수성 수지 상에 고정된 리파아제의 활성을 유지하는데 유리하다는 것을 명백하게 증명한다.

[0135] **실시예 4**

[0136] 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 4시간의 에스테르화/에스테르교환후 유리 지방산 (FFA)과 대두유의 혼합물의 바이오디젤, 그리고 글리세롤과 물 부산물로의 전환.

[0137] *반응 조건*: 0.1M의 상이한 양의 나트륨 비카보네이트 용액을 내포하는 최초 FFA 값 72 mg KOH/1g의 유리 지방산 콩 가수분해물 (50%wt.)과 대두유 (50%wt.)의 혼합물. 메탄올 (4.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제가 이용되었다 (20%wt.). 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 6에 도시된다.

[0138] 도 6은 상이한 양의 염기 용액이 동등한 비율의 대두유 가수분해물과 대두유 트리글리세리드로 구성되는 반응 혼합물 내에 존재하는 FFA의 동시 에스테르화 반응에 대한 중요한 효과를 나타낸다는 것을 보여준다. 에스테르화/에스테르교환 반응 시스템 내로 어떤 알칼리성 용액도 첨가되지 않을 때 소수성 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제는 에스테르화 활성을 상실하는 반면, 0.1 M의 1과 2% wt. 나트륨 비카보네이트 용액이 반응 시스템 내로 별개로 첨가될 때 동일한 생물촉매는 연속 사이클 동안 활성을 유지한다는 것을 확인할 수 있다. 도 6에 제공된 결과는 소수성 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제의 이

용이 0.1M의 1%와 2%wt. 나트륨 비카보네이트 용액의 존재에서, FFA 함량을 72 mg KOH/1g의 최초 값에서 각각 평균적으로 8과 6 mg KOH/1g으로 감소시키고, 그리고 22회 차후 사이클 동안 이러한 활성을 유지시킨다는 것을 증명한다.

[0140] **실시예 5**

[0141] 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 4시간의 반응후 대두유 가수분해물의 바이오디젤과 물로의 에스테르화.

[0142] *반응 조건*: 0.1M의 1% wt. 나트륨 비카보네이트 용액을 내포하는 150 mg KOH/1g의 FFA 값의 유리 지방산 콩 가수분해물 (20g). 메탄올 (2㎖)이 한 회분으로 반응 매체에 첨가되었다. 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제가 이용되었다 (10%wt.). 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 7에 도시된다.

[0143] 도 7은 소수성 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제가 또한, 유리 지방산의 에스테르화를 촉진시켜 지방산 메틸 에스테르와 물 부산물을 형성할 수 있다는 것을 보여준다. 이들 결과는 이러한 리파아제 제조물이 활성의 유의미한 상실의 관찰 없이, 동일한 회분의 생물촉매를 이용한 25회 이상의 사이클 동안 0.1M의 1% 나트륨 비카보네이트 용액을 내포하는 매체에서 에스테르화/에스테르교환 활성을 유지한다는 것을 증명한다.

[0145] **실시예 6**

[0146] 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 6시간의 반응후 에탄올로 어유의 에스테르교환.

[0147] *반응 조건*: 0.1M의 1% 나트륨 비카보네이트 용액을 포함하는 정제된 어유 (20g). 에탄올 (2.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. Amberlite® XAD 1600 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)와 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제가 별개로 이용되었다 (10%wt.). 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 8에 도시된다.

[0148] 도 8은 소수성 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces* lanuginosa)와 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 양쪽 리파아제가 또한, 에탄올로 어유 트리글리세리드의 에스테르교환을 촉진시켜 지방산 에틸 에스테르와 글리세롤 부산물을 형성할 수 있다는 것을 보여준다. 이들 결과는 또한, 양쪽 생물촉매 제조물이 동일한 회분의 생물촉매를 이용한 20회 이상의 사이클 동안 유의미한 활성 상실 없이, 1% 나트륨 비카보네이트 용액의 존재에서 그들의 에스테르교환 활성을 유지한다는 것을 증명한다.

[0150] **실시예 7**

[0151] 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매를 이용하여 6시간의 반응후 에탄올로 우지의 에스테르교환.

[0152] *반응 조건*: 우지의 지방산 에틸 에스테르 (4g)를 내포하는 우지 (16g) 및 1M의 1% 칼륨 카보네이트 용액. 에탄올 (2.5㎖)이 각각 1시간의 시차를 두고 3 동등 회분으로 단계별로 첨가되었다. Amberlite® XAD 1600 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)와 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 리파아제 (10%wt.)가 별개로 또는 동등한 비율에서 공동으로 이용되었다. 상기 반응 매체는 37℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 9에 도시된다.

[0153] 도 9는 소수성 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces* lanuginosa)와 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*)으로부터 유래된 양쪽 리파아제가 또한, 에탄올로 우지 트리글리세리드의 에스테르교환을 별개로 또는 공동으로 촉진시켜 지방산 에틸 에스테르와 글리세롤 부산물을 형성할 수 있다는 것을 보여준다. 반응 매체의 공급원료는 반응 매체의 융점 (melting point)을 낮추기 위하여 우지 (80%) 및 우지로부터 유래된 지방산 에틸 에스테르로 구성되었다. 도 9에 제공된 결과는 동일한 회분의 생물촉매가 100회 연속 사이클 동안 이용될 때, 모든 생물촉매가 약알칼리성 용액, 예를 들면, 1M의 칼륨 카보네이트의 존재에서 그들의 최초 활성의 80% 이상을 보전한다는 것을 증명한다.

[0155] **실시예 8**

[0156] 복수 회분 실험에서 동일한 회분의 생물촉매 (10%wt.)를 이용하여, 소수성 다공성 수지와 메탄올 (각각, FFA와 메탄올 사이에 몰 기초에서 1:10의 비율) 상에 고정된 칸디다 안타르티카 (*Candida antarctica*) B 리파아제로, 소수성 다공성 수지 상에 고정된 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제 또는 써모미세스 라누기노사

(*Thermomyces lanuginosa*) 리파아제를 이용하여 7 mg KOH/1g의 FFA 값을 내포하는 4시간후 획득된 에스테르교환/에스테르화 반응 매체의 처리. 상기 반응 매체는 30℃에서 300rpm으로 진탕되었다. 결과는 도 10에 도시된다.

[0157] 도 10은 전형적으로 3-7 mg KOH/1g의 FFA 값을 내포하는 앞서 기술된 바와 같은 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) 리파아제 또는 슈도모나스 종 (*Pseudomonas sp.*) 리파아제로 처리후 획득된 에스테르교환 반응 매체가 친수성 또는 소수성 서포트 상에 고정된 칸디다 안타르티카 (*Candida antarctica*) B 리파아제로 처리될 수 있고, FFA 값을 2 mg KOH/1g 이하까지 감소시킨다는 것을 보여준다. 고정된 리파아제는 100회 이상의 사이클 동안 활성을 유지할 수 있다.

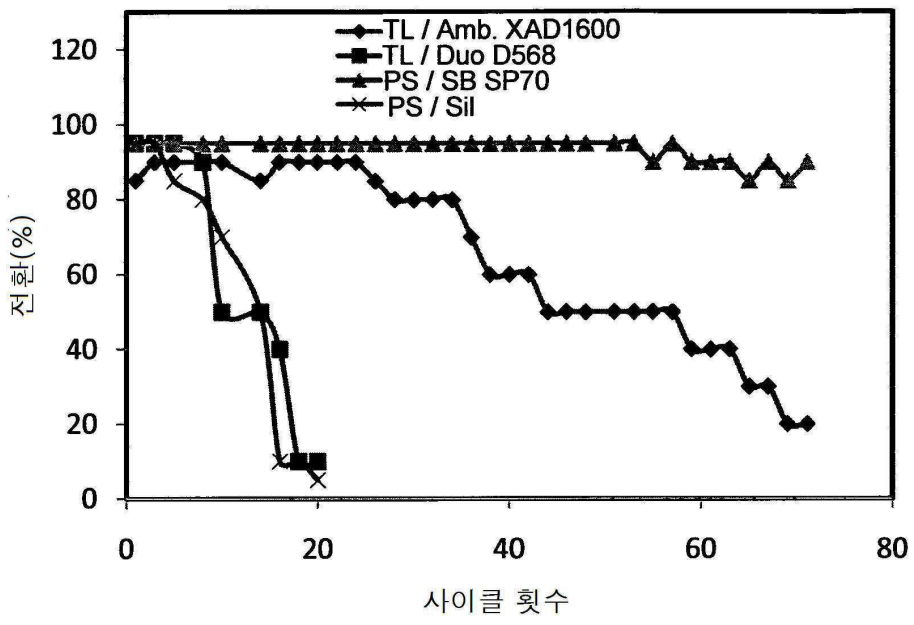
[0159] **실시예 9**

[0160] 도 11에 도시된 시스템의 첫 번째 구체예를 이용하여 바이오디젤, 물과 글리세롤을 형성하기 위한, 메탄올로 10% FFA 포함 폐식용유의 에스테르교환/에스테르화.

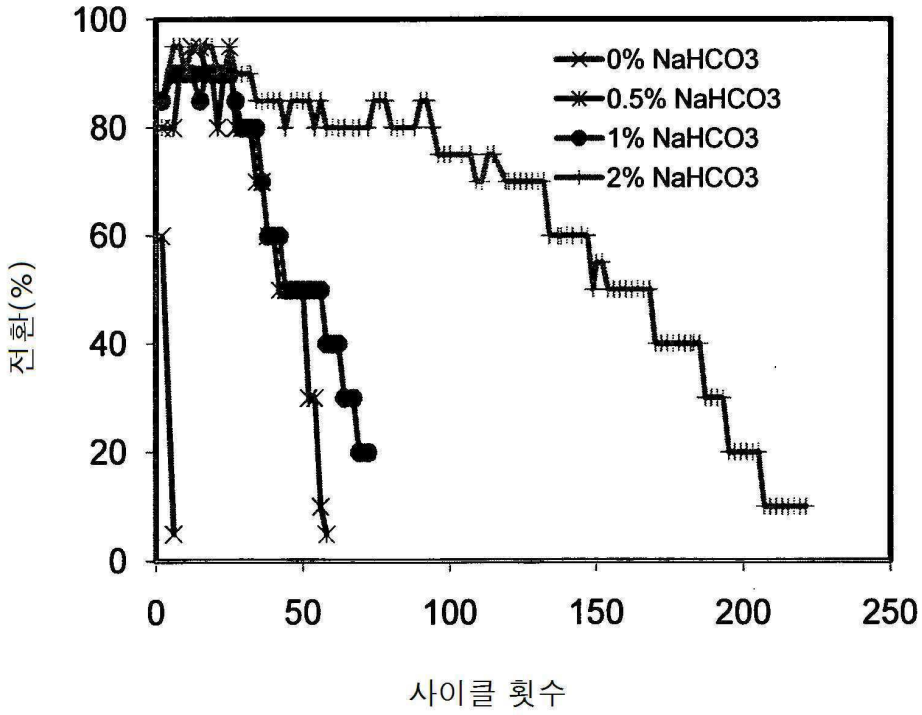
[0161] *반응 조건*: 0.1M의 2% 나트륨 비카보네이트 용액을 내포하는 폐식용유 (1100g) 및 메탄올 (140g)은 먼저, 반응전 준비 용기 **140**에서 예비혼합되어 에멀젼이 형성되고, 이것은 이후, 대략 2 리터의 내부 부피 **V2**를 갖는 반응기 용기 **120**에 도입되었다. 반응 혼합물은 반응기 용기 **120** 내에서 30℃에서 6시간 동안, 소수성과 다공성 폴리스티렌-디비닐벤젠-기초된 수지 (30% wt의 오일) 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*)로부터 유래된 리파아제와 혼합되었다. 반응 혼합물은 필터 **125**를 통하여 여과되고 산물 분리 용기 **160**에 공급되었다. 글리세롤 및 과잉의 물은 산물 분리 용기 **160** 내에서 반응 혼합물로부터 제거되었다. 지방산 메틸 에스테르 및 반응되지 않은 글리세리드를 내포하는 위쪽 상 (phase)은 경로 변경 라인 **165**를 거쳐 반응기 용기 **120**로 재-도입되고, 그리고 반응기 용기 **120** 내에 반응 매체에 메탄올 (110g)의 첨가후 반응기 용기 **120**에서 교반이 재개되었다. 2시간후 메틸 에스테르로의 전환은 98%이었다. 폐식용유 (83% wt), 메탄올 (15%) 및 0.1M의 나트륨 비카보네이트 용액 (2%)을 내포하는 유화된 반응 매체 (제조된 에멀젼)는 대략 30㎖/min의 유속 (flow rate)에서 반응기 용기 **120** 내로 연속적으로 공급되었다. 지방산 메틸 에스테르로의 전환은 거대다공성 소수성 수지 상에 고정된 써모미세스 라누기노사 (*Thermomyces lanuginosa*) 리파아제로부터 유래된 동일한 회분의 생물촉매를 이용할 때, 유의미한 활성 상실 없이 3개월 이상 동안 유지되었다.

도면

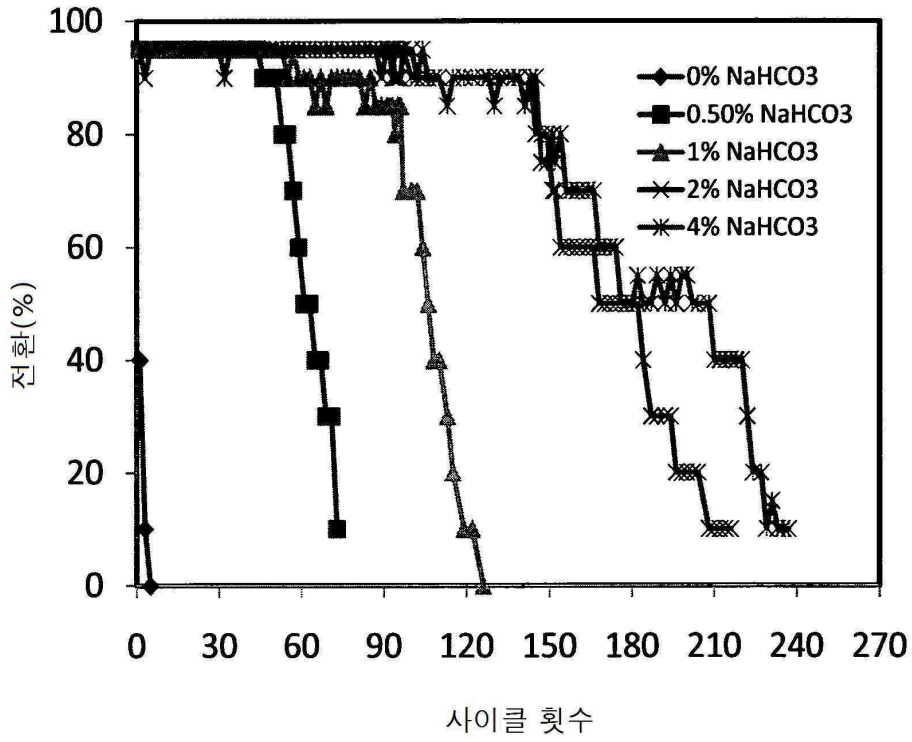
도면1



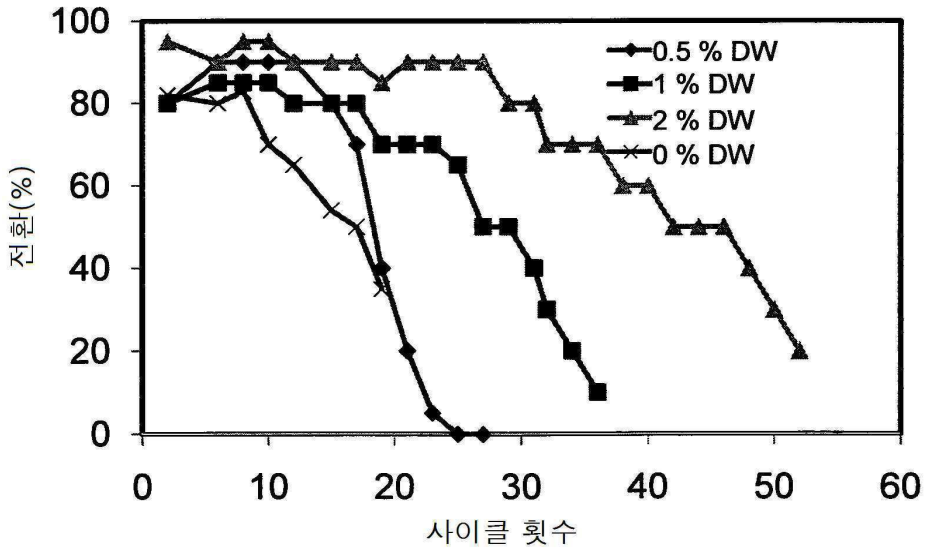
도면2


100
80
60
40
20
0
전환(%)
0
50
100
150
200
250
사이클 횟수
0% NaHCO3
0.5% NaHCO3
1% NaHCO3
2% NaHCO3

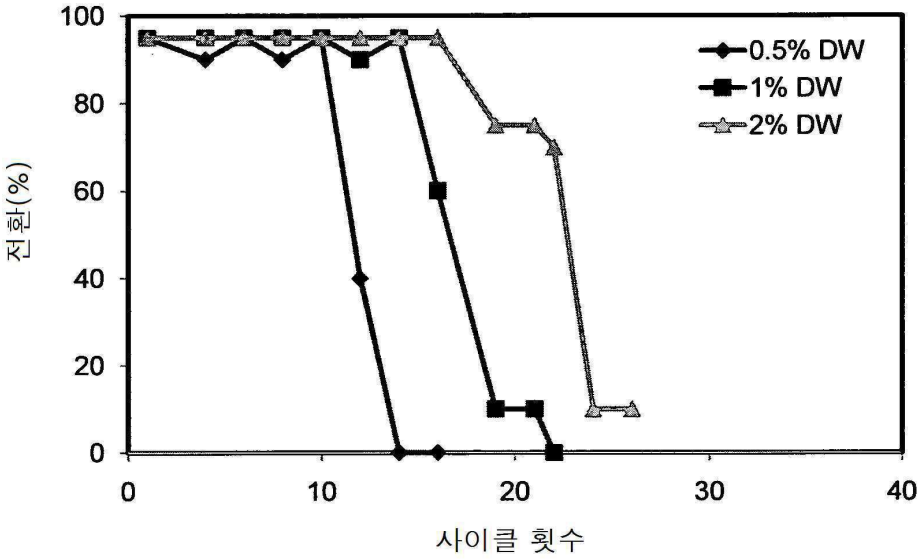
도면3


100
80
60
40
20
0
전환(%)
0
30
60
90
120
150
180
210
240
270
사이클 횟수
0% NaHCO3
0.50% NaHCO3
1% NaHCO3
2% NaHCO3
4% NaHCO3

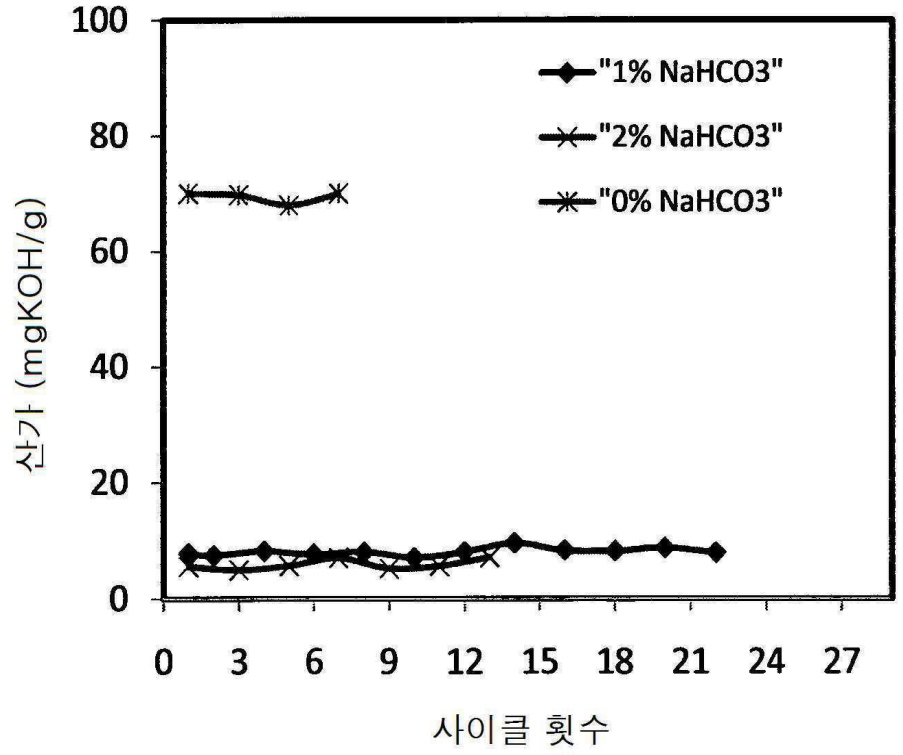
도면4


100
80
60
40
20
0
전환(%)
0
10
20
30
40
50
60
사이클 횟수
0.5 % DW
1 % DW
2 % DW
0 % DW

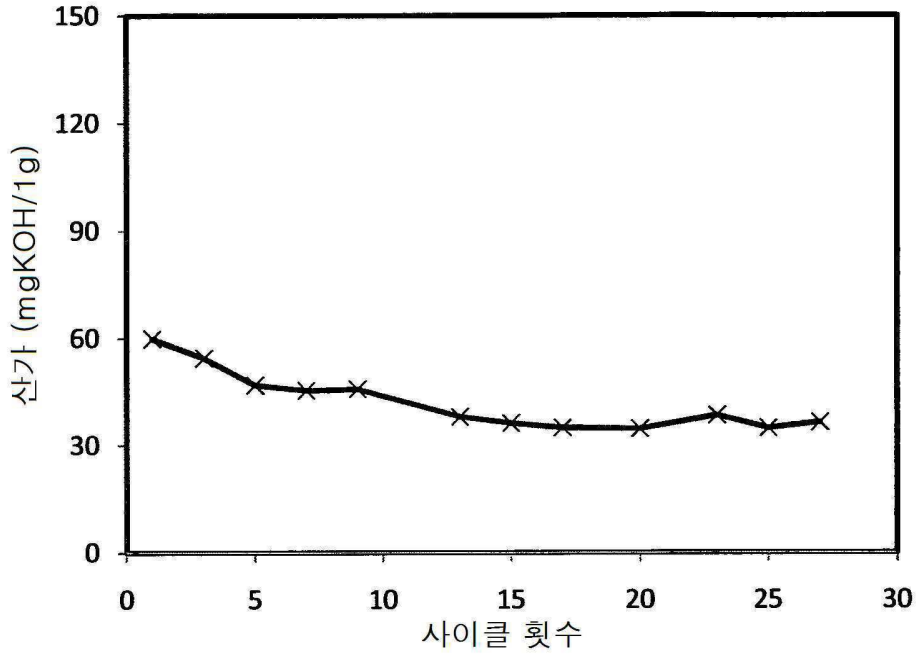
도면5


100
80
60
40
20
0
전환(%)
0
10
20
30
40
사이클 횟수
0.5% DW
1% DW
2% DW

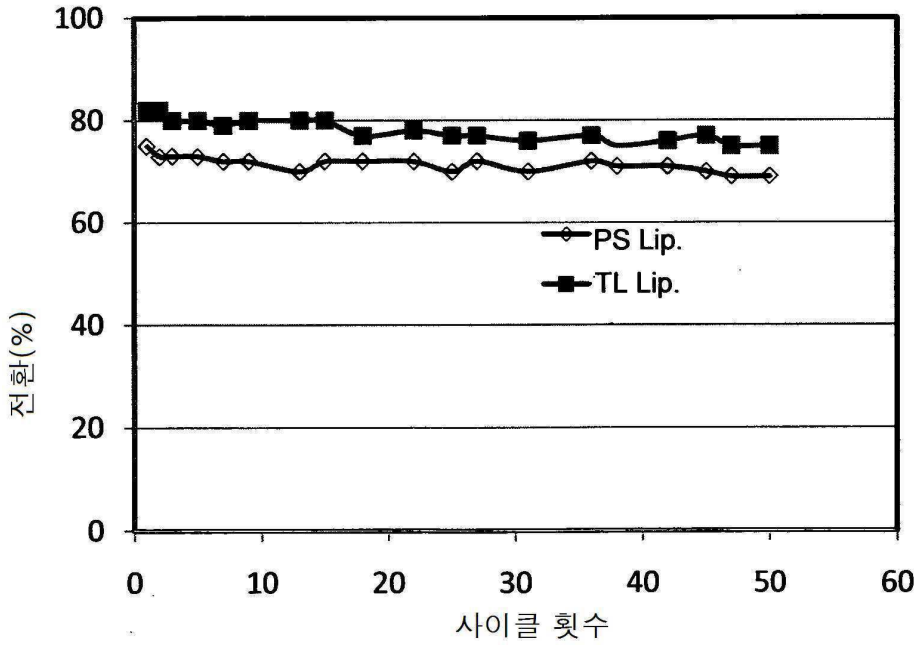
도면6


100
80
60
40
20
0
산가 (mgKOH/g)
"1% NaHCO3"
"2% NaHCO3"
"0% NaHCO3"
0 3 6 9 12 15 18 21 24 27
사이클 횟수

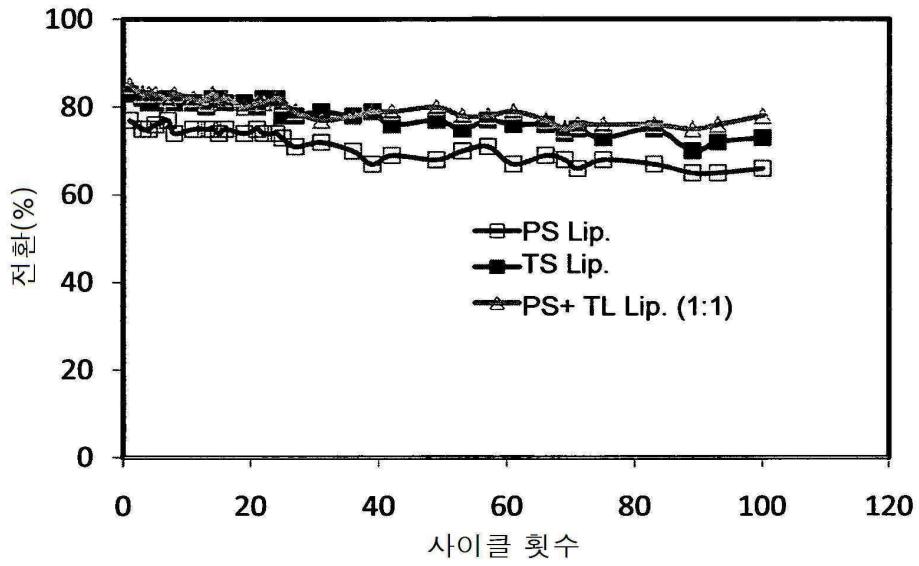
도면7


150
120
90
60
30
0
산가 (mgKOH/1g)
0 5 10 15 20 25 30
사이클 횟수

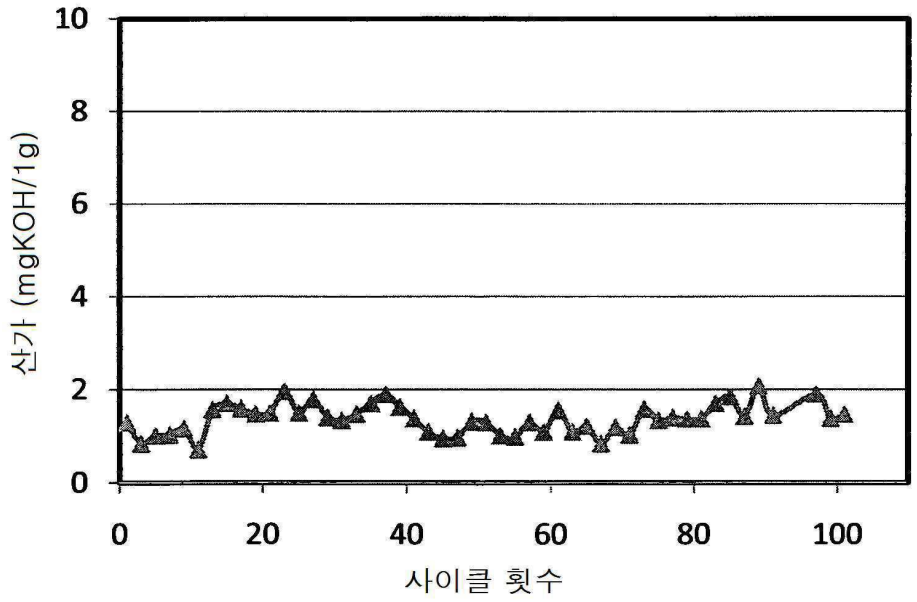
도면8


100
80
60
40
20
0
전환(%)
PS Lip.
TL Lip.
0
10
20
30
40
50
60
사이클 횟수

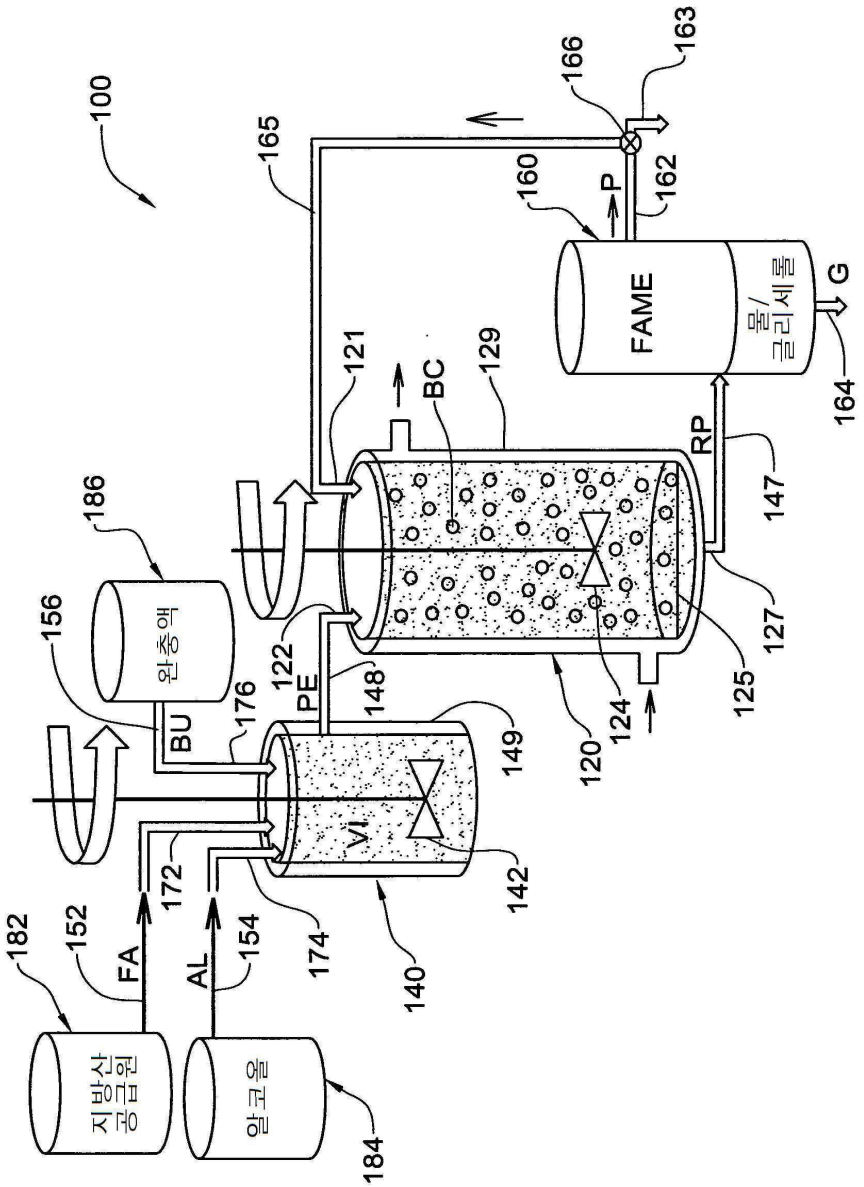
도면9


100
80
60
40
20
0
전환(%)
PS Lip.
TS Lip.
PS+ TL Lip. (1:1)
0
20
40
60
80
100
120
사이클 횟수

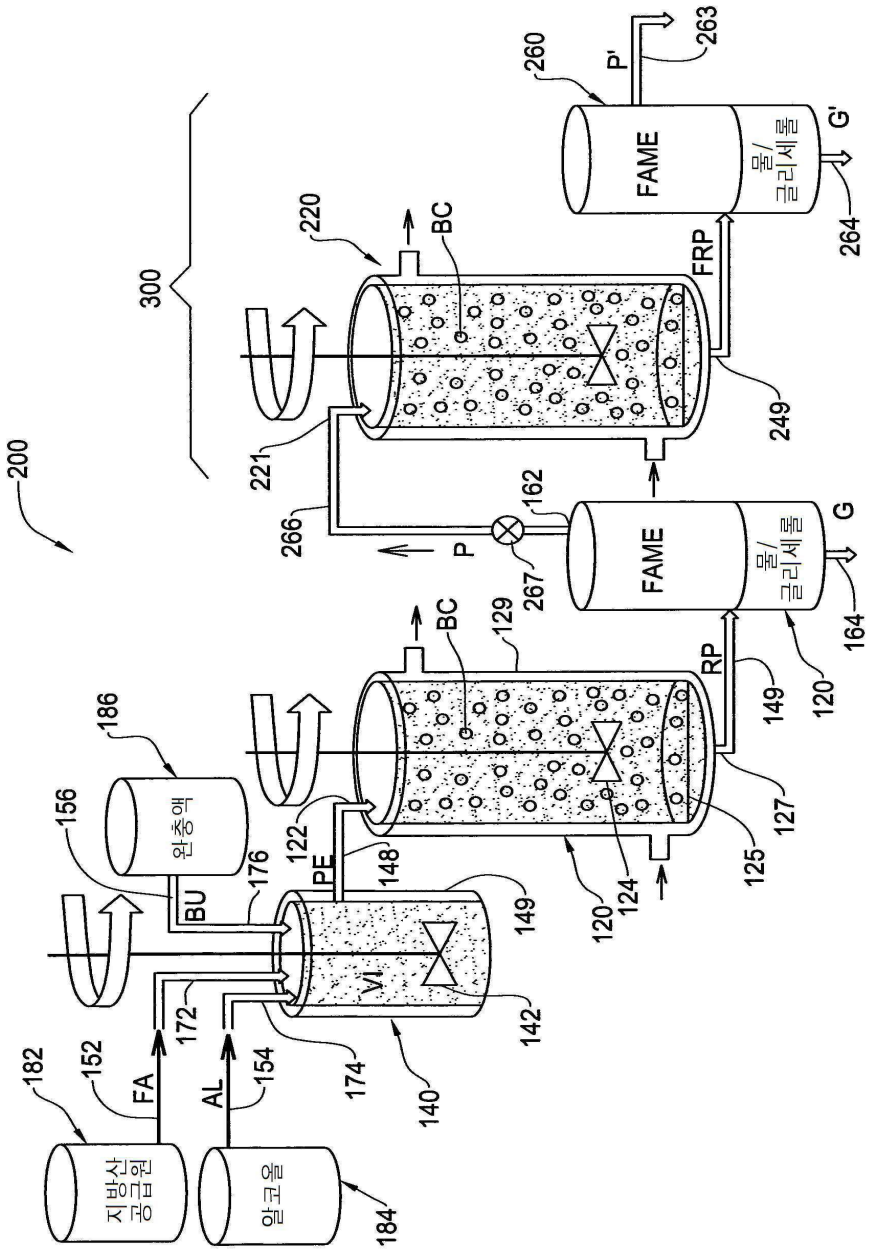
도면10



도면11


100
165
166
163
160
P
162
FAME
물/
글리세롤
G
164
121
BC
129
RP
147
186
완충액
156
BU
176
122
PE
148
149
120
124
125
127
VI
142
172
174
140
182
152
FA
AL
154
지방산
공급원
알코올
184

도면12


200
300
220
BC
221
266
P
267
162
FAME
물/
글리세롤
G
164
120
149
RP
129
BC
122
PE
148
149
124
120
125
127
FRP
249
260
P'
263
FAME
물/
글리세롤
G'
264
186
완충액
156
BU
176
VI
142
140
174
172
154
AL
152
FA
182
지방산
공급원
알코올
184