



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2022-0101428  
(43) 공개일자 2022년07월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
*C12P 7/64* (2022.01) *C10M 129/70* (2006.01)  
(52) CPC특허분류  
*C12P 7/6436* (2022.01)  
*C10M 129/70* (2013.01)  
(21) 출원번호 10-2021-0003437  
(22) 출원일자 2021년01월11일  
심사청구일자 2021년01월11일

(71) 출원인  
고려대학교 산학협력단  
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암  
동5가)  
(72) 발명자  
김인환  
서울특별시 송파구 올림픽로 135, 213동 1204호  
(잠실동, 리센즈)  
김지원  
인천광역시 계양구 용종로 26, 412동 1801호 (계  
산동, 은행마을아주아파트)  
(74) 대리인  
특허법인 남앤남

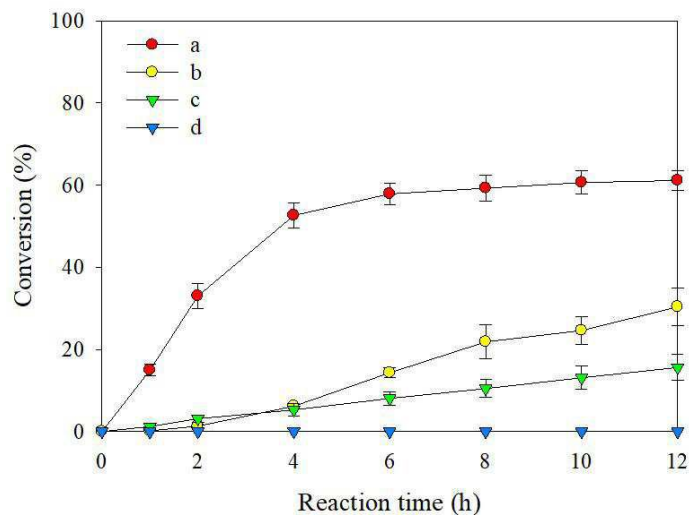
전체 청구항 수 : 총 8 항

(54) 발명의 명칭 효소반응을 이용한 바이오윤활유 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 제조 방법

### (57) 요약

본 발명은 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester, NPG diester)의 제조방법에 관한 것으로, 자세하게는 고정화 리파아제를 이용하여 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산로부터 네오펜틸글라이콜 다이에스터를 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조 방법은 소수성 담체에 써모마이세스 라누지노시스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래 리파아제를 물리적으로 흡착시킨 고정화 효소를 촉매로 이용하고, 최적의 효소량, 온도 및 진공도 조건을 통하여 단시간(8h) 내에 네오펜틸글라이콜 다이에스터 최대 전환율이 97%에 도달하는 효과를 갖는다.

대표도 - 도1



(52) CPC특허분류

C10M 2207/2835 (2013.01)

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

|             |                                       |
|-------------|---------------------------------------|
| 과제고유번호      | 1465031407                            |
| 과제번호        | HP20C0064030020                       |
| 부처명         | 보건복지부                                 |
| 과제관리(전문)기관명 | 한국보건산업진흥원                             |
| 연구사업명       | 피부과학응용소재선도기술개발(R&D)                   |
| 연구과제명       | 국내산 천연 오일을 원료로 에틸헥실 바이오컨버전 오일 생산 기술개발 |
| 기 여 율       | 1/1                                   |
| 과제수행기관명     | 고려대학교산학협력단                            |
| 연구기간        | 2020.04.01 ~ 2020.12.31               |

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

- a) 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 혼합한 기질을 준비하는 단계; 및  
b) 기질에 고정화 효소를 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,

상기 고정화 효소는 소수성 담체에 써모마이세스 라누지노시스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래 리파아제를 물리적으로 흡착시킨 것을 특징으로 하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,

상기 식물성 지방산은 팜 오일에서 유래한 지방산인 것을 특징으로 하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

#### 청구항 4

제1항에 있어서,

상기 고정화 효소는 기질의 무게 기준으로 5 내지 7.5 중량%로 혼합하는 것을 특징으로 하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 50℃ 내지 60℃의 온도조건에서 반응시키는 것을 특징으로 하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

#### 청구항 6

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 1.3 내지 26.7 kPa의 압력의 진공 조건에서 반응시키는 것을 특징으로 하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

#### 청구항 7

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 기질인 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 1:2의 몰비율로 반응시키는 것을 특징으로 하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

#### 청구항 8

제1항에 있어서,

상기 b) 단계는 2시간 동안 상압에서 반응시킨 후 26.7 kPa의 압력의 진공 조건에서 6 ~ 8 시간 동안 반응시키는 것을 특징으로 하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법.

## 발명의 설명

## 기술분야

[0001] 본 발명은 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester, NPG diester)의 제조방법에 관한 것으로, 자세하게는 고정화 리파아제를 이용하여 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산로부터 네오펜틸글라이콜 다이에스터를 제조하는 방법에 관한 것이다.

## 배경기술

[0002] 최근 윤활유 산업에서 생분해성이 있으며 환경친화적인 바이오윤활유의 개발에 대한 관심이 증가하고 있다. 바이오윤활유의 일반적인 형태 중 하나인 폴리올 에스터는 트리메틸올프로판과 네오펜틸글라이콜(Neopentyl glycol, NPG)과 같은 폴리올에 중쇄, 장쇄 지방산이 에스터화되어 만들어진다. 이는 점도 계수가 높고 저온에서의 물리적 특성이 윤활작용을 하기에 적합하다. 네오펜틸글라이콜은 베타 탄소에 수소 원자가 없는데, 베타 수소는 열화에 중요한 지점이므로 이것이 천연 기름의 글리세롤 부분을 대체하면 기름의 열화 안정성이 상승한다. 폴리올 에스터 중 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester, NPG diester)는 유동점이 가장 낮아 산업현장에서 활용도가 높다. 가장 많이 활용되는 곳은 제트엔진이며 절삭유 배합 및 압축기 등에도 사용된다.

[0003] 효소를 이용해 네오펜틸글라이콜 다이에스터를 합성하는 몇몇 연구가 있어 왔다. 대부분의 연구들에서 칸디다 루고사(*Candida rugosa*) 유래 Lipomod 34MDP, 리조무코 미에헤이(*Rhizomucor miehei*) 유래 Lipozyme RM IM, 칸디다 안타르크티카(*Candida Antarctica*) 유래 Novozym 435 등의 효소를 이용해 합성하는 방법이 개시된바 있으며, 이때 상기 효소를 이용하는 경우 24시간 이내에 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 전환율이 61% 내지 78%에 이르는 것으로 나타났다.

[0004] 그러나 종래 기술을 통한 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 합성은 반응시간이 길며 전환율이 다소 낮은바, 효소 반응을 이용한 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 효과적인 합성을 위하여 반응시간 단축 및 수득률 증가가 요구되는 실정이다.

[0005] 본 발명자는 무 용매 시스템에서 고정화 효소 촉매 에스터화 반응을 통해 네오펜틸글라이콜(Neopentyl glycol, NPG)과 식물성 지방산으로부터 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester, NPG diester) 합성을 수행하였다. 그 결과, 본 발명의 고정화된 효소를 이용하는 경우 종래 네오펜틸글라이콜 다이에스터 합성에 사용된 상업용 리파아제와 비교하여 두드러지게 우수한 네오펜틸글라이콜 다이에스터를 생성율을 보이는 것을 확인하였다. 또한, 효소량, 온도 및 진공도와 같은 다양한 반응 조건을 조사하여 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 최대 수율을 달성하였다. 뿐만 아니라, 경제성을 고려한 새로운 효소 반응 전략으로 진공도의 조합 방법을 제안하고자 한다.

## 선행기술문헌

### 특허문헌

[0006] (특허문헌 0001) 한국공개특허 제10-2015-0046397호

## 발명의 내용

### 해결하려는 과제

[0007] 따라서 본 발명의 목적은 고정화 효소 존재 하에서, 최적의 효소량, 온도 및 진공도 조건을 이용하여 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 기질로 하여 반응시켜 수율이 향상된 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

### 과제의 해결 수단

[0008] 상기와 같은 본 발명의 목적을 달성하기 위해서, 본 발명은 a) 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 혼합한 기질을 준비하는 단계; 및 b) 기질에 고정화 효소를 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 합성방법을 제공한다.

- [0009] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 고정화 효소는 소수성 담체에 써모마이세스 라누지노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래 리파아제를 물리적으로 흡착시킨 것일 수 있다.
- [0010] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 식물성 지방산은 팜 오일에서 유래한 지방산일 수 있다.
- [0011] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 고정화 효소는 기질의 무게 기준으로 5 내지 7.5 중량%로 혼합할 수 있다.
- [0012] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 b) 단계는 50℃ 내지 60℃의 온도조건에서 반응시키는 단계일 수 있다.
- [0013] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 b) 단계는 1.3 내지 26.7 kPa의 압력의 진공 조건에서 반응시키는 단계일 수 있다.
- [0014] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 b) 단계는 기질인 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 1:2의 몰비율로 반응시키는 단계일 수 있다.
- [0015] 본 발명의 일실시예에 있어서, 상기 b) 단계는 2시간 동안 상압에서 반응시킨 후 26.7 kPa의 압력의 진공 조건에서 6 ~ 8 시간 동안 반응시키는 단계일 수 있다.

### 발명의 효과

- [0016] 본 발명의 제조 방법은 소수성 담체에 써모마이세스 라누지노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래 리파아제를 물리적으로 흡착시킨 고정화 효소를 촉매로 이용하고, 최적의 효소량, 온도 및 진공도 조건을 통하여 단시간(8h) 내에 네오펜틸글라이콜 다이에스터 최대 전환율이 97%에 도달하는 효과를 갖는다.

### 도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 효소의 종류에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 나타낸 것이다. 사용된 효소는 다음과 같다: a, 본 발명의 고정화 리파아제; b, *Rhizomucor miehei* 유래 Lipozyme RM IM; c, *Candida antarctica* 유래 Novozym 435; d, *Thermomyces lanuginosus* 유래 Lipozyme TL IM. 이 반응은 50℃의 온도, 1:2의 몰 비율 (네오펜틸글라이콜:식물성 지방산), 5 %의 효소량 (총 반응 기질 대비) 그리고 250rpm의 교반 속도로 무 진공 하에서 이루어졌다. 모든 반응은 3 반복으로 수행되었다.
- 도 2는 효소량에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 나타낸 것이다. 이 반응은 50℃의 온도, 1:2의 몰 비율 (네오펜틸글라이콜:식물성 지방산), 그리고 250rpm의 교반 속도로 무 진공 하에서 이루어졌다. 모든 반응은 3 반복으로 수행되었다.
- 도 3은 온도 조건에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 나타낸 것이다. 이 반응은 5 %의 효소량 (총 반응 기질 대비), 1:2의 몰 비율 (네오펜틸글라이콜:식물성 지방산), 그리고 250rpm의 교반 속도로 무 진공 하에서 이루어졌다. 모든 반응은 3 반복으로 수행되었다.
- 도 4는 진공 조건에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 나타낸 것이다. 이 반응은 50℃의 온도, 1:2의 몰 비율 (네오펜틸글라이콜:식물성 지방산), 5 %의 효소량 (총 반응 기질 대비) 그리고 250rpm의 교반 속도로 이루어졌다. 모든 반응은 3 반복으로 수행되었다.
- 도 5는 진공-무 진공 조합에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 나타낸 것이다. 이 반응은 50℃의 온도, 1:2의 몰 비율 (네오펜틸글라이콜:식물성 지방산), 5 %의 효소량 (총 반응 기질 대비) 그리고 250rpm의 교반 속도로 이루어졌다. 모든 반응은 3 반복으로 수행되었다.

### 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

- [0018] 이하, 본 발명을 상세하게 설명한다.
- [0020] 본 발명은 a) 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 혼합한 기질을 준비하는 단계; 및 b) 기질에 고정화 효소를 혼합하여 반응시키는 단계를 포함하는, 네오펜틸글라이콜 다이에스터(Neopentyl glycol diester) 제조 방법을 제공한다.
- [0021] 본 발명의 상기 a) 단계는 기질을 준비하는 단계로서, 자세하게는 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 혼합한 기질을 준비하는 단계이다.

- [0022] 상기 식물성 지방산은 팜유, 콩기름, 코코넛유, 옥수수기름, 카놀라유 또는 해바라기유와 같은 식물성 유래 지방산을 사용할 수 있으며, 예를 들어, 올레산(oleic acid), 리놀레산(linoleic acid), 팔미트산(palmitic acid), 스테아린산(stearic acid), 피놀렌산(pinolenic acid), 미리스트산(myristic acid), 프릴산(caprylic acid) 및 카프르산(capric acid)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 포함하는 지방산일 수 있다.
- [0023] 본 발명의 상기 b) 단계는 기질을 촉매 하에서 반응시키는 단계로서, 자세하게는 고정화 효소 하에서 기질인 네오펜틸글라이콜과 식물성 지방산을 화학 양론적 비율로 반응시키는 단계이다.
- [0024] 본 발명에서 ‘고정화 효소’란 소수성 담체에 리파아제를 물리적으로 흡착시킨 효소를 의미하는 것으로, 리파아제와 담체가 결합된 형태를 의미한다.
- [0025] 본 발명에서 사용하는 리파아제는 써모마이세스 라누지노시스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래인 것으로서, 예를 들면, 상품명으로 Eversa® transform 2.0, Lipozyme TL 100L, Lipozyme TL IM 등을 예시할 수 있으며, 바람직하게는 Eversa® transform 2.0을 사용할 수 있다.
- [0026] 써모마이세스 라누지노시스(*Thermomyces lanuginosus*)는 자낭균문이라도 불리우는 진핵생물로서 한계 생존 가능 온도가 60℃이고, 적정 생존 가능 온도가 50℃인 호열성 세균이다.
- [0027] 본 발명에서 리파아제를 고정화할 수 있는 담체는 소수성 담체일 수 있고, 다공성 담체일 수 있으며, 구체적으로 메타크릴레이트(methacrylic aester)와 디비닐벤젠(divinylbenzene)의 중합체(copolymer)일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에서는 소수성의 다공성 담체로서 Lewatit® VP OC 1600를 이용하였다.
- [0028] 본 발명의 하기 실시예에서, 효소의 종류에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 측정한 결과, 본 발명의 고정화 효소(Lewatit® VP OC 1600 담체에 써모마이세스 라누지노시스 유래 Eversa® transform 2.0 리파아제를 물리적으로 흡착시킨 것)의 경우 다른 상업용 리파아제에 비하여 동일한 반응조건에서 현저하게 높은 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 전환율을 보였다(도 1 참조).
- [0029] 본 발명의 상기 고정화 효소는 기질의 무게 기준으로 5 내지 7.5 중량%로 혼합할 수 있으며, 바람직하게는 5중량%를 사용할 수 있다.
- [0030] 본 발명의 하기 실시예에서, 효소양에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 측정한 결과, 효소량이 1%에서 5%로 증가했을 때 전환율이 크게 증가하는 것으로 나타난 반면, 5%에서 7.5%사이의 전환율에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 처음 4시간 동안 7.5%의 반응속도는 5%보다 약간 높았지만 결국 두 조건에서 모두 6시간 후 60%의 전환율을 달성했다. 따라서, 비용 효율성과 제품 수율을 고려하는 경우 최적의 효소량은 5%로 결정되었다(도 2 참조).
- [0031] 반응 온도는 반응속도 및 효소의 잔존 활성에도 영향을 미치므로 효소 반응에서 중요한 요소이다.
- [0032] 본 발명의 상기 b) 단계에서 반응 온도는 40~60℃일 수 있으며, 바람직하게는 50~60℃이며, 더욱 바람직하게는 50℃일 수 있다.
- [0033] 본 발명의 하기 실시예에서, 온도에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 측정한 결과, 30℃에서 가장 낮은 네오펜틸글라이콜 다이에스터의 전환율을 나타내었다. 한편, 초기 반응속도에는 50~60℃사이엔 큰 차이가 없었으며 6시간 이후 평형에 도달하였고 전환율은 60%였다. 50℃에서 얻은 최대 전환율은 6 시간에 60%, 10 시간에 63%였다. 따라서 에너지 비용과 효소 안정성을 고려할 때 50℃를 최적 온도로 선택하였다(도 3 참조).
- [0034] 본 발명의 상기 b) 단계는 1.3 내지 26.7 kPa 압력의 진공 조건에서 진행될 수 있으며, 바람직하게는 26.7kPa 압력에서 진행할 수 있다.
- [0035] 일반적으로 효소를 이용한 에스테르화 반응에서 수분은 반응에 매우 큰 영향을 주는 요인으로 알려져 있다. 네오펜틸글라이콜과 지방산이 반응하여 네오펜틸글라이콜 다이에스터가 합성될 때 물이 생성되는데, 과량의 물이 생성되면 에스테르 반응의 역반응인 가수분해 반응을 촉진하여 에스테르 반응에 바람직하지 못한 영향을 준다. 따라서 본 발명에서는 반응 중 생성되는 수분을 진공을 이용하여 효과적으로 제거하였다. 그러나 너무 높은 진공은 효소 활성에 필수적인 수분까지 제거하게 되어 오히려 효소 활성을 감소시킨다. 따라서 적절한 진공은 부적절한 가수분해 반응을 막을 뿐만 아니라 효소 내 최적의 효소 활성을 유지할 수 있는 수분을 조절하는데 필수적이다.
- [0036] 본 발명의 하기 실시예에서, 진공에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율을 측정한 결과, 무

진공(상압) 조건에서 10시간 후에 63%의 최대 전환율을 얻었지만 진공을 적용하자 97%의 최대 전환율을 얻었다. 진공도에 따른 소폭의 차이가 있었지만, 진공은 약 34%의 최대 전환율 향상을 이끌어냈으며, 이는 지금까지 수행한 이전 연구 중에서 효소 반응을 이용해 12시간 이내에 네오펜틸글라이콜 다이에스터를 100% 가까이 합성한 최초의 결과이다. 전체 결과 중 26.7 - 1.3 kPa의 전환율에는 큰 차이가 없었고, 40.0kPa는 나머지 결과와 다르게 3% 정도의 최종 전환율 차이가 있었다. 따라서 진공 적용을 위한 제품 수율과 에너지 효율성을 고려하여 최적의 진공도 조건으로 26.7kPa를 선정하였다(도 4 참조).

[0037] 또한, 본 발명의 상기 b) 단계는 2시간 동안 상압에서 반응시킨 후 26.7 kPa의 압력의 진공 조건에서 6 ~ 8 시간 동안 반응시킬 수 있다.

[0038] 진공을 적용하는 경우 100% 가까이의 전환율을 이끌어낼 수 있지만, 진공은 산업에서 추가적인 에너지 비용을 가져오기 때문에, 이를 고려하여 본 발명에서는 진공-무 진공 조합이라는 새로운 전략을 도입하였다.

[0039] 본 발명의 하기 실시예에서, 26.7 kPa의 진공을 기준으로, 무 진공 상태로 반응을 시작하고 일정 시간 이후 26.7kPa의 진공 상태에서 반응을 수행하는 방식의 진공-무 진공 조합으로 반응이 수행하였다. 그 결과 전체 10 시간 동안 26.7kPa의 진공을 적용한 결과와 초기 1, 2시간은 무 진공 상태에서 반응하고 이후 각각 9, 8시간 동안 26.7kPa의 진공을 적용한 실험이 최종 전환율의 차이가 거의 없다는 결과를 도출하였다. 따라서, 에너지 효율성을 고려하면, 2시간 동안 진공 없이 반응을 진행하고, 이후 나머지 8시간 동안 26.7kPa의 진공 상태에서 반응을 수행하는 방식이 최적 조건으로 선정되었다(도 5 참조).

[0040] 이러한 시도는 실제 바이오 윤활유 산업에서 적은 에너지 비용으로 효율적인 네오펜틸글라이콜 다이에스터 합성을 할 수 있는 합리적 방법이 될 수 있다.

[0041] 본 발명의 상기 b) 단계에서 반응시간은 2시간 내지 12시간, 바람직하게는 4시간 내지 10시간이며, 더욱 바람직하게는 8시간 내지 10시간일 수 있다.

[0042] 본 발명의 제조방법에서는 고정화 효소(Lewatit® VP OC 1600 담체에 써모마이세스 라누지노시스 유래 Eversa® transform 2.0 리파아제를 물리적으로 흡착시킨 것)를 촉매로 이용하고, 효소량 5중량%, 50℃ 온도 조건 및 진공도 조건(2h 무 진공 & 이후 26.7kPa 진공 상태)을 통하여 단시간(8h) 내에 네오펜틸글라이콜 다이에스터 최대 전환율이 97%에 도달할 수 있다.

[0044] 이하, 실시예를 통하여 본 발명을 보다 상세히 설명하고자 한다. 이들 실시예는 본 발명을 보다 구체적으로 설명하기 위한 것으로, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 한정되는 것은 아니다.

## [0046] <실시예>

### [0048] 1. 재료 및 방법

#### [0050] 재료

[0051] 이 실험에서 사용된 기질인 NPG는 Ohsung Chemical Ind. Co., Ltd. (Incheon, Republic of Korea)에서, 식물성 지방산은 팜 오일에서 유래한 지방산으로 ILSHINWELLS (Cheongju, Republic of Korea)에서 기증받았다. 식물성 지방산의 지방산 조성은 올레산(C18:1n-9, 80%), 리놀레산(C18:2n-6, 11%), 팔미트산(C16:0, 6%), 스테아르산(C18:0, 2%), 미리스트산(C14:0, 1%)이다. Thermomyces lanuginosus 유래 Lipozyme TL IM, Rhizomucor miehei 유래 Lipozyme RM IM 및 Candida antarctica 유래 Novozym 435는 Novozymes Korea (Seoul, Republic of Korea)에서 구입하였다. 고정화에 사용된 효소는 Thermomyces lanuginosus 유래 Eversa 리파아제 (제품명: Eversa® transform 2.0)로, Novozymes Korea (Seoul, Republic of Korea)에서 기증받았다. 고정화에서 담체로 사용된 Lewatit VP OC 1600은 Lanxess Energizing Chemistry (Obernburg, Germany)에서 구입하였다. 그 밖에 사용된 추출 용매 및 모든 시약은 일급 시약을 사용하였다.

[0053] 효소 고정화

[0054] 소수성 담체인 Lewatit VP OC 1600은 담체 내 기공에 액체 효소가 물리적으로 접근하기 용이하도록 에탄올에 3 시간 동안 담가두었다가 pH 완충액으로 치환했다. 효소 용액은 120mL의 액체 Eversa 리파아제와 30mL의 인산 나트륨 완충액 (50mM, pH 7.0)를 혼합하여 제조했다. 제조한 효소 용액 (150mL)과 15g의 담체를 플라스크에 첨가 하였다. 효소 용액과 담체의 혼합물을 250rpm의 교반 속도와 30℃의 온도에서 17시간동안 오비탈 셰이커에서 교 반하였다. 고정화된 리파아제는 사용하기 전에 4℃에서 보관되었다.

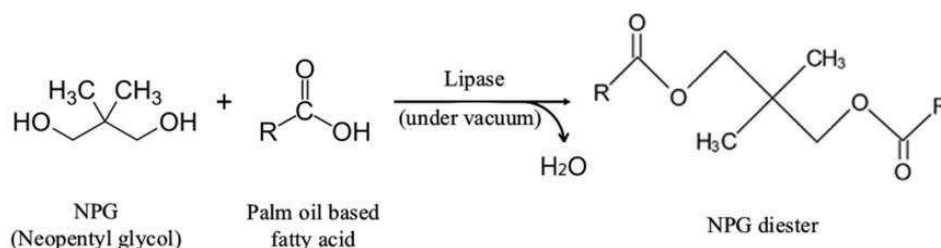
[0056] 반응 전 효소 수분 활성화도 조절

[0057] 본 실험에서 사용된 모든 효소는 밀폐 용기에서 수분 활성화도의 평형화를 이룬 후에 사용되었다. 수분 활성화도(A<sub>w</sub>)가 0.53인 포화 질산마그네슘 용액이 첨가된 밀폐 용기를 준비했다. 수분 활성화도 평형화 과정은 최소 48시간 동안 실온에서 수행되었다.

[0059] 네오펜틸글라이콜 다이에스터(NPG diester) 합성

[0060] NPG diester 합성을 위한 NPG와 식물성 지방산의 에스터화 반응은 온도 조절을 위해 water jacket이 장착된 유리 반응기(내경 3.5, 높이 8cm)를 이용하여 실시되었다. 에스터화 반응식은 하기에 나타내었다. 총 3g의 기질을 일정량의 효소와 함께 반응기에 넣고 250rpm의 속도 교반했다. NPG 및 식물성 지방산을 화학 양론적 비율 (1:2)로 반응을 실시했다. 반응 온도는 반응기와 연결된 water circulator (RW-0525G, JEIO TECH, Seoul, South Korea)에 의하여 조절되었다. 워터 펌프 (Model A-1000S, Tokyo Rikakikai Co. Ltd, Tokyo, Japan)와 로터리 펌프 (Model MVP-24, Woosung Vacuum Co., Ltd, Korea)로 에스터화 과정에서 발생하는 물을 진공으로 제거했다. 진공은 마이크로 미터링 밸브 (Swagelok, Solon, OH, USA)에 의해 제어되고 디지털 진공 게이지 (Teledyne, Thousand Oaks, CA, USA)로 모니터링되었다. 50 μl의 분취량을 1, 2, 4, 6, 8 및 10 시간 간격으로 용기로부터 샘플링하고 350 μl의 클로로포름에 용해시켰다. 이어서 샘플을 0.45 mm 나일론 마이크로 필터 (Pall Corporation, Port Washington, NY, USA)를 통해 각각 여과 하였다. 모든 실험은 세 번 반복하여 수행되었다.

[0062] [반응식 1]



[0063]

[0065] 생성물 분석

[0066] NPG diester의 전환율에 대한 가스 크로마토그래피 분석은 Varian 가스 크로마토그래피 장비 (Model 3800; Varian Inc., Palo Alto, CA, USA)에서 컬럼 (DB-1ht 컬럼, 15m x 0.25mm id; J & W Scientific, Folsom, CA, USA) 및 불꽃 이온화 검출기 (FID)를 통해 수행되었다. 컬럼 온도 설정은 다음과 같았다. 80℃에서 2 분 동안 시작한 다음 3 분 동안 유지하면서 20℃/ min의 속도로 350 ℃로 가열했다. 헬륨은 1.5 mL / min의 유속에서 운 반 가스로 사용되었으며 분할 비율은 1:50 이다. 주입기 및 검출기 온도는 각각 340 및 350 ℃로 설정되었다. NPG diester 로의 전환은 다음 방정식을 사용하여 가스 크로마토그래피의 결과로부터 계산되었다.

[0067] NPG diester 전환율(%) =  $c/(a+b+c) \times 100$

[0068] a: 반응물에서 식물성 지방산 무게

[0069] b: NPG monoester 무게

[0070] c: NPG diester 무게

[0072] 2. 결과

[0074] 효소 스크리닝

[0075] NPG diester 합성에서 있어서 본 발명의 고정화한 리파아제와 세 가지 상업용 리파아제(Lipozyme RM, Novozym 435, Lipozyme TL IM)의 활성이 비교 평가하였으며, 그 결과는 도 1에 자세히 나타내었다. 본 발명의 고정화 리파아제는 담체인 Lewatit VP OC 1600에 액체 리파아제 효소인 Eversa® transform 2.0을 물리적으로 결합하여 만들어졌다. 본 실험에서 효소량, 온도, NPG와 식물성 지방산의 물 비율은 각각 5%(전체 기질 기준), 50℃, 및 1:2로 일정하게 유지되었다. 본 연구에서 제조된 고정화된 리파아제 (a)의 활성이 가장 높았으며, 그 다음으로 Lipozyme RM IM (b), Novozym435 (c) 및 Lipozyme TL IM (d) 순서대로 활성도의 차이가 있었다. Lipozyme TL IM (d)는 소량의 NPG monoester만 합성했으며, 12시간 이후 반응에서도 NPG diester를 합성하지 못했다. Lipozyme RM IM (b)과 Novozym435 (c)를 사용할 때 전환율은 각각 12시간에 30%와 15%였다. 반면에 본 실험에서 고정화한 리파아제는 8시간만에 60%의 평형 전환율에 도달했다. 특히, 고정화 리파아제는 NPG diester 합성을 위해 대표적인 효소로 널리 보고된 Novozym 435에 비해 전체 반응에서 훨씬 빠른 속도와 높은 전환율을 보였다. 따라서 본 실험에서 제조한 고정화 리파아제를 선택하여 공정 파라미터 효과를 조사하였다.

표 1

[0077] 효소의 종류에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율

| 반응<br>시간<br>(h) | (a)<br>고정화 리파아제 |      | (b)<br>Lipozyme RM IM |      | (c)<br>Novozym 435 |      | (d)<br>Lipozyme TL IM |      |
|-----------------|-----------------|------|-----------------------|------|--------------------|------|-----------------------|------|
|                 | 평균              | 표준편차 | 평균                    | 표준편차 | 평균                 | 표준편차 | 평균                    | 표준편차 |
| 0               | 0.0             | 0.0  | 0.0                   | 0.0  | 0.0                | 0.0  | 0.0                   | 0.0  |
| 1               | 14.9            | 1.4  | 0.2                   | 0.3  | 1.2                | 0.9  | 0.0                   | 0.0  |
| 2               | 33.0            | 3.1  | 1.3                   | 0.4  | 3.1                | 0.9  | 0.0                   | 0.0  |
| 4               | 52.6            | 3.0  | 6.2                   | 0.6  | 5.3                | 1.6  | 0.0                   | 0.0  |
| 6               | 57.9            | 2.5  | 14.3                  | 1.2  | 8.0                | 1.7  | 0.0                   | 0.0  |
| 8               | 59.3            | 3.2  | 21.8                  | 4.1  | 10.5               | 2.2  | 0.0                   | 0.0  |
| 10              | 60.6            | 2.9  | 24.6                  | 3.5  | 13.1               | 2.9  | 0.0                   | 0.0  |
| 12              | 61.2            | 2.5  | 30.4                  | 4.5  | 15.6               | 3.1  | 0.0                   | 0.0  |

[0079] 효소량에 따른 영향

[0080] 효소량은 단일 반응에서 사용되는 효소의 양이며 기질의 중량 대비 %로 정의된다. 효소량은 경제성 때문에 매우 중요한 요소이므로 가능한 한 적게 사용해야 한다. 도 2는 에스터화 반응에 대한 효소량 변화의 영향을 보여준다. 무진공 회분식 반응에서 50℃ 온도로 NPG와 식물성 지방산 물 비율을 1:2로 교반 속도를 250rpm으로 유지하여 평가하였다. 효소량 평가 범위는 1 - 7.5%였다. 효소량이 1%에서 5%로 증가했을 때 전환율이 크게 증가하였다. 그러나 5%에서 7.5%사이의 전환율에는 큰 차이가 없는 것으로 나타났다. 자세하게는, 처음 4시간 동안 7.5%의 반응속도는 5% 보다 약간 높았지만 결국 두 조건에서 모두 6시간 후 60%의 전환율을 달성하는 것으로 나타났다. 결과적으로, 비용 효율성과 제품 수율을 고려하여 NPG diester의 합성에 필요한 리파아제의 최소량은 5%로 결정되었다.

표 2

[0082]

효소량에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율

| 반응<br>시간<br>(h) | 1%   |      | 2.5% |      | 5%   |      | 7.5% |      |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                 | 평균   | 표준편차 | 평균   | 표준편차 | 평균   | 표준편차 | 평균   | 표준편차 |
| 0               | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 1               | 1.5  | 0.7  | 5.0  | 1.2  | 14.9 | 1.4  | 19.3 | 1.1  |
| 2               | 5.0  | 1.4  | 13.8 | 2.0  | 33.0 | 3.1  | 41.0 | 3.1  |
| 4               | 12.2 | 2.3  | 34.8 | 7.2  | 52.6 | 3.0  | 56.0 | 0.9  |
| 6               | 18.7 | 3.9  | 47.0 | 6.2  | 57.9 | 2.5  | 57.5 | 1.8  |
| 8               | 26.0 | 2.9  | 54.1 | 2.7  | 59.3 | 3.2  | 57.9 | 1.0  |
| 10              | 32.3 | 3.2  | 56.0 | 2.9  | 60.6 | 2.9  | 58.3 | 1.3  |

[0084]

#### 반응온도의 효과

[0085]

온도는 효소 활성, 잔류 활성, 에너지 절약 때문에 중요한 요소 중 하나이다. 온도의 증가는 분자의 구조적 유연성과 이동성을 증가시켜 반응을 촉진한다. 반면에 너무 높은 온도는 효소의 변성을 유도하고 사용된 효소의 잔류 활성에 영향을 미칠 수 있으며 특히 반응의 후반부에 영향을 미친다. 본 실험에서 사용된 식물성 지방산은 올레산이 약 80% 포함되어 있어 상온에서 액체상태이고, 백색 결정성 고체인 NPG의 용점은 129.1℃이다. 본 실험에서 이 액체 지방산은 NPG의 용매로 작용해 30℃ 이상의 온도와 NPG와 식물성 지방산 몰 비율 1:2에서 10분 이내에 완전히 혼합된다.

[0086]

도 3은 반응 온도를 달리하여 NPG와 식물성 지방산을 에스터화 반응했을 때 생성된 NPG diester의 전환율을 나타낸 것이다. NPG와 식물성 지방산 몰 비율 1:2, 고정화 리파아제 5%(w/w)를 사용해 30, 40, 50, 60℃에서 NPG diester의 합성을 비교했다. 온도가 증가함에 따라 반응속도가 명확히 증가하며, 30℃에서 가장 낮은 NPG diester의 전환율을 나타낸다. 초기 반응속도에는 50-60℃사이에 큰 차이가 없었으며 6시간 이후 평형에 도달하였고 전환율은 60%였다. 한편, 30℃와 40℃에서의 평형 도달 시간은 각각 8시간과 12시간이었다. 50℃에서 얻은 최대 전환율은 6 시간에 60 %, 10 시간에 63 %였다. 따라서 에너지 비용과 효소 안정성을 고려할 때 50℃를 최적 온도로 선택했다.

### 표 3

[0088]

온도 조건에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율

| 반응<br>시간<br>(h) | 30℃  |      | 40℃  |      | 50℃  |      | 60℃  |      |
|-----------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
|                 | 평균   | 표준편차 | 평균   | 표준편차 | 평균   | 표준편차 | 평균   | 표준편차 |
| 0               | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  | 0.0  |
| 1               | 1.1  | 0.7  | 7.1  | 1.1  | 14.9 | 1.4  | 22.8 | 2.5  |
| 2               | 5.1  | 1.4  | 18.6 | 2.4  | 33.0 | 3.1  | 42.0 | 1.3  |
| 4               | 20.2 | 2.5  | 38.5 | 5.2  | 52.6 | 3.0  | 54.7 | 1.2  |
| 6               | 34.6 | 3.7  | 53.4 | 1.5  | 57.9 | 2.5  | 56.8 | 3.7  |
| 8               | 48.7 | 3.9  | 57.9 | 3.4  | 59.3 | 3.2  | 58.7 | 2.0  |
| 10              | 55.9 | 1.6  | 61.2 | 2.3  | 60.6 | 2.9  | 60.9 | 2.0  |

[0090]

#### 진공에 따른 효과

[0091]

NPG diester 합성 반응 중 물이 형성되며, 수분 함량은 반응의 평형점과 생성물의 이동에 영향을 미친다. 에스터화 반응에서 수분을 제거하기 탈습제인 molecular sieve, 진공, 염수화물 등 다양한 방법을 사용한다. 도 4는 50℃의 온도, 5%의 효소량 (기질 총 질량 기준), 1:2의 몰 비율 (NPG와 식물성 지방산)의 조건에서 NPG diester의 합성에 대한 진공의 영향을 나타낸 것이다. 40.0 - 1.3 kPa 범위에서 진공도에 따른 효과가 비교되었

다. 무 진공 조건에서 10시간 후에 63%의 최대 전환율을 얻었지만 진공을 적용하자 97%의 최대 전환율을 얻었다. 진공도에 따른 소폭의 차이가 있었지만, 진공은 약 34%의 최대 전환율 향상을 이끌어냈으며, 이는 지금까지 수행한 이전 연구 중에서 효소 반응을 이용해 12시간 이내에 NPG diester를 100% 가까이 합성한 최초의 결과이다. 전체 결과 중 26.7 - 1.3 kPa의 전환율에는 큰 차이가 없었고 40.0kPa는 나머지 결과와 다르게 3% 정도의 최종 전환율 차이가 있었다. 따라서 진공 적용을 위한 제품 수율과 에너지 효율성을 고려하여 최적의 진공도 조건으로 26.7kPa를 선정하였다. 진공 시스템에 의해 NPG diester 최대 전환율이 크게 증가하였고 이전 연구에 비해 반응 시간이 단축되는 것을 확인하였다.

표 4

[0093]

진공 조건에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율

| 반응<br>시간<br>(h) | 1.3kPa |      | 6.7kPa |      | 13.3kPa |      | 26.7kPa |      | 40.0kPa |      | 101.3kPa<br>(no vacuum) |      |
|-----------------|--------|------|--------|------|---------|------|---------|------|---------|------|-------------------------|------|
|                 | 평균     | 표준편차 | 평균     | 표준편차 | 평균      | 표준편차 | 평균      | 표준편차 | 평균      | 표준편차 | 평균                      | 표준편차 |
| 0               | 0.0    | 0.0  | 0.0    | 0.0  | 0.0     | 0.0  | 0.0     | 0.0  | 0.0     | 0.0  | 0.0                     | 0.0  |
| 1               | 15.8   | 1.9  | 13.3   | 2.4  | 13.7    | 2.7  | 17.1    | 1.6  | 16.3    | 1.8  | 14.9                    | 1.4  |
| 2               | 40.1   | 4.6  | 33.8   | 5.9  | 35.4    | 3.5  | 41.1    | 3.8  | 40.0    | 3.1  | 33.0                    | 3.1  |
| 4               | 81.4   | 4.6  | 76.2   | 4.0  | 78.2    | 1.3  | 79.3    | 5.6  | 70.5    | 1.4  | 52.6                    | 3.0  |
| 6               | 93.4   | 1.3  | 92.3   | 1.1  | 91.9    | 0.9  | 92.0    | 1.8  | 87.1    | 0.5  | 57.9                    | 2.5  |
| 8               | 96.1   | 0.5  | 96.3   | 0.4  | 95.6    | 0.3  | 95.5    | 0.5  | 92.9    | 0.4  | 59.3                    | 3.2  |
| 10              | 96.8   | 0.5  | 97.2   | 0.4  | 96.6    | 0.3  | 95.9    | 1.0  | 95.0    | 0.1  | 60.6                    | 2.9  |

[0095]

진공을 적용하여 100% 가까이의 전환율을 이끌어냈지만, 진공은 산업에서 추가적인 에너지 비용을 가져오기 때문에 이를 고려하여 진공-무 진공 조합이라는 새로운 전략을 도입했다. 이에 따른 효과는 도 5에서 나타내었다. 26.7 kPa의 진공을 기준으로, 무 진공 상태로 반응을 시작하고 일정 시간 이후 26.7kPa의 진공 상태에서 반응을 수행하는 방식의 진공-무 진공 조합으로 반응이 수행되었다. 1, 2, 3, 4, 6 시간 동안 무 진공 상태로 반응하면, 이후 각각 9, 8, 7, 6, 4 시간 동안은 26.7kPa의 진공 상태에서 반응하는 방식으로 다섯 가지 조합의 실험이 수행되었다. 이 실험의 결과로 전체 10시간 동안 26.7kPa의 진공을 적용한 결과와 초기 1, 2시간은 무 진공 상태에서 반응하고 이후 각각 9, 8시간 동안 26.7kPa의 진공을 적용한 실험이 최종 전환율의 차이가 거의 없다는 결과를 도출했다.

표 5

[0097]

진공-무 진공 조합에 따른 반응시간별 네오펜틸글라이콜 다이에스터 전환율

| 반응<br>시간<br>(h) | 26.7kPa |      | 1h after<br>26.7kPa |      | 2h after<br>26.7kPa |      | 3h after<br>26.7kPa |      | 4h after<br>26.7kPa |      | 6h after<br>26.7kPa |      | 101.3kPa<br>(no vacuum) |      |
|-----------------|---------|------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|---------------------|------|-------------------------|------|
|                 | 평균      | 표준편차 | 평균                  | 표준편차 | 평균                  | 표준편차 | 평균                  | 표준편차 | 평균                  | 표준편차 | 평균                  | 표준편차 | 평균                      | 표준편차 |
| 0               | 0.0     | 0.0  | 0.0                 | 0.0  | 0.0                 | 0.0  | 0.0                 | 0.0  | 0.0                 | 0.0  | 0.0                 | 0.0  | 0.0                     | 0.0  |
| 1               | 17.1    | 1.6  | 16.2                | 2.5  | 14.3                | 3.0  | 15.0                | 1.2  | 14.8                | 1.1  | 16.0                | 0.6  | 14.9                    | 1.4  |
| 2               | 41.1    | 3.8  | 36.1                | 0.4  | 32.3                | 4.8  | 32.8                | 2.2  | 31.5                | 2.0  | 33.8                | 1.1  | 33.0                    | 3.1  |
| 4               | 79.3    | 5.6  | 75.8                | 1.9  | 47.4                | 4.3  | 47.1                | 2.2  | 46.4                | 1.3  | 48.0                | 0.5  | 52.6                    | 3.0  |
| 6               | 92.0    | 1.8  | 90.7                | 0.8  | 65.2                | 3.9  | 55.6                | 1.2  | 53.6                | 0.3  | 55.5                | 0.5  | 57.9                    | 2.5  |
| 8               | 95.5    | 0.5  | 95.1                | 0.5  | 87.2                | 1.9  | 79.9                | 2.1  | 70.6                | 2.8  | 60.2                | 0.3  | 59.3                    | 3.2  |
| 10              | 95.9    | 1.0  | 96.4                | 0.4  | 93.4                | 0.9  | 90.7                | 0.9  | 87.2                | 2.9  | 70.3                | 2.9  | 60.6                    | 2.9  |

[0099]

결과적으로, 에너지 효율성을 고려하면, 2시간 동안 진공 없이 반응을 진행하고, 이후 나머지 8시간 동안

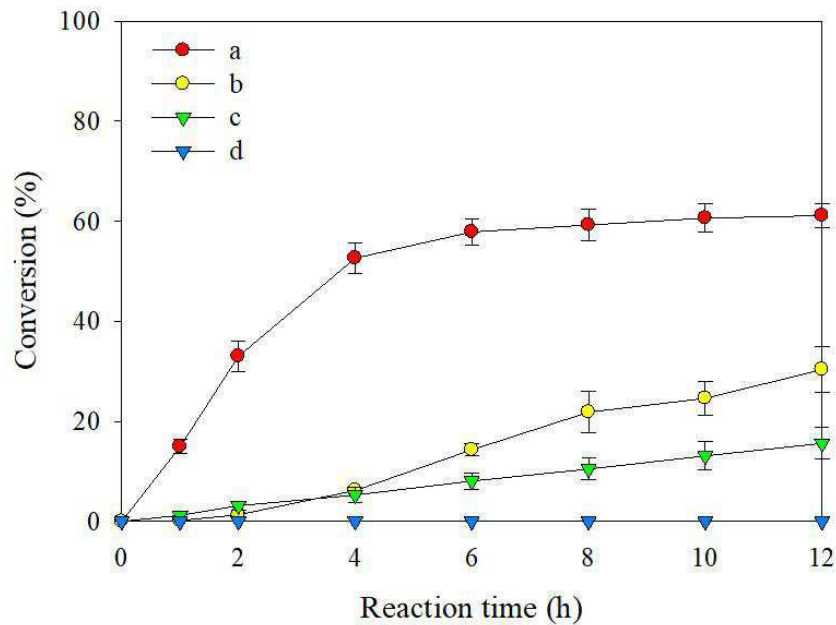
26.7kPa 의 진공 상태에서 반응을 수행하는 방식이 최적 조건으로 선정되었다. 이러한 시도는 실제 바이오 윤활유 산업에서 적은 에너지 비용으로 효율적인 NPG diester 합성을 할 수 있는 합리적 방법이 될 수 있다.

[0101]

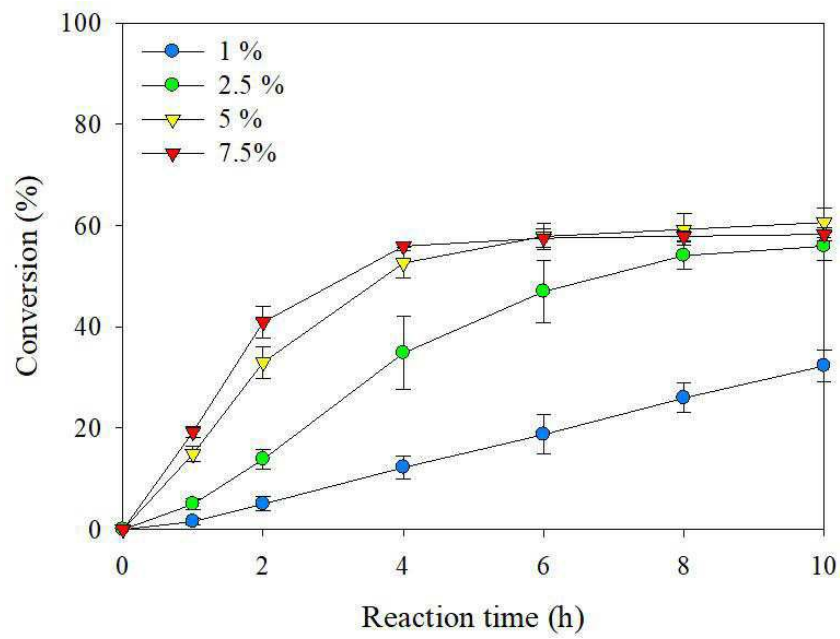
이제까지 본 발명에 대하여 그 바람직한 실시예들을 중심으로 살펴보았다. 본 발명이 속하는 기술 분야에서 통상의 지식을 가진 자는 본 발명이 본 발명의 본질적인 특성에서 벗어나지 않는 범위에서 변형된 형태로 구현될 수 있음을 이해할 수 있을 것이다. 그러므로 개시된 실시예들은 한정적인 관점이 아니라 설명적인 관점에서 고려되어야 한다. 본 발명의 범위는 전술한 설명이 아니라 특허청구범위에 나타나 있으며, 그와 동등한 범위 내에 있는 모든 차이점은 본 발명에 포함된 것으로 해석되어야 할 것이다.

## 도면

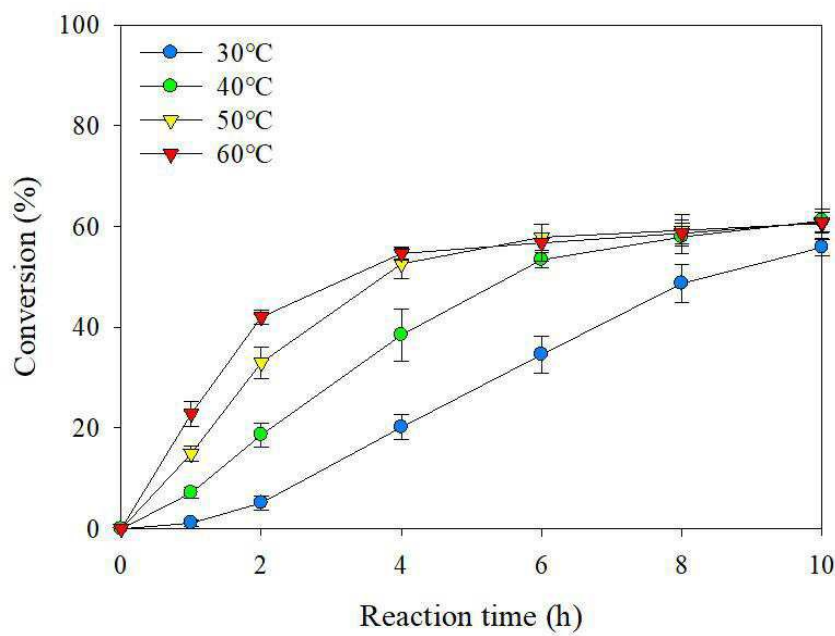
### 도면1



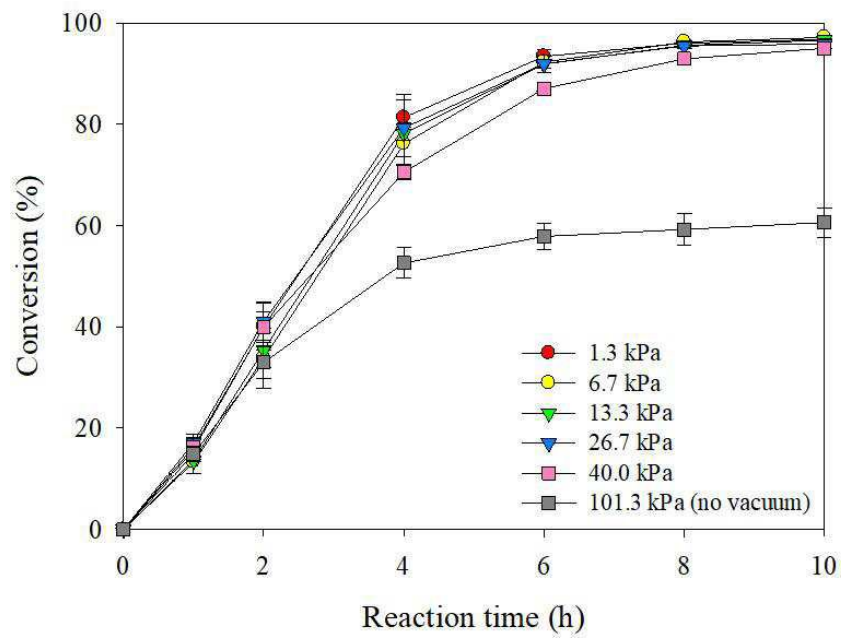
도면2



도면3



도면4



도면5

