(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2013-0008672
(43) 공개일자 2013년01월23일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12P 7/64 (2006.01) *C10L 1/02* (2006.01)
C12N 11/04 (2006.01) *C12N 9/20* (2006.01)
(21) 출원번호 10-2011-0066090
(22) 출원일자 2011년07월04일
심사청구일자 2011년07월04일

(71) 출원인
호남석유화학 주식회사
서울특별시 동작구 보라매로5길 51 (신대방동)
고려대학교 산학협력단
서울 성북구 안암동5가 1
(72) 발명자
김승욱
서울특별시 노원구 공릉2동 737번지 삼익아파트 104동 905호
김성봉
서울특별시 성북구 안암로 145, 공학관 734호 (안암동5가, 고려대학교)
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
유미특허법인

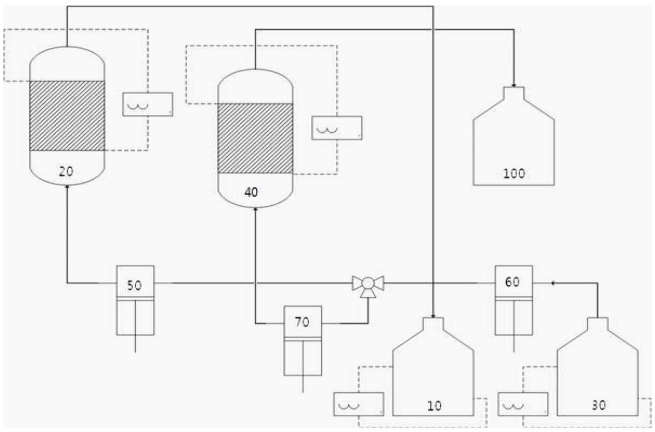
전체 청구항 수 : 총 11 항

(54) 발명의 명칭 **바이오디젤의 제조 방법**

(57) 요 약

본 발명은 바이오디젤 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 고정화된 리파아제를 이용하여 효소공정으로 유지로부터 고효율로 바이오디젤을 제조하는 방법에 관한 것이다.

대 표 도 - 도1



(72) 발명자

이자현

서울특별시 성북구 안암로 145, 공학관 734호 (안암동5가, 고려대학교)

강경보

대전광역시 유성구 배울2로 42, 신동아아파트 514동 1502호 (관평동)

장우인

대전광역시 유성구 가정로 65, 109동 506호 (신성동, 대림두레아파트)

강종원

대전광역시 유성구 가정로 65, 109동 404호 (신성동, 대림두레아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

유지 및 알코올을 기질로 하는 바이오디젤 제조 방법으로서,

제1 저장용기 내의 제1 기질 및 물을 제1 리파아제가 있는 제1 반응기로 보내어 예비 바이오디젤 생성물을 생산하는 단계;

상기 예비 바이오디젤 생성물을 상기 제1 반응기 및 제1 저장용기 사이에서 재순환하는 단계; 및

제2 저장용기 내의 제2 기질 및 물과, 상기 제 1 저장용기 내의 상기 예비 바이오디젤 생성물을 제2 리파아제가 있는 제2 반응기로 보내어 바이오디젤을 생산하는 단계를 포함하는 바이오디젤의 제조방법.

청구항 2

제1항에 있어서, 상기 예비 바이오디젤 생성물을 상기 제1 반응기 및 제1 저장용기 사이에서 재순환하는 단계는 상기 제1 기질의 바이오디젤로의 전환율이 60%에 도달할 때까지 수행하는 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조방법.

청구항 3

제1항에 있어서, 상기 제1 반응기에서 상기 예비 바이오디젤 생성물을 생산하는 단계는,

반응온도가 36 내지 54℃, 유속이 0.8 내지 1.0ml/min 및 상기 제1 리파아제 농도가 상기 제1 기질의 유지 중량 기준으로 2 내지 10 중량%인 조건하에서 수행되는 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서, 상기 제2 반응기에서 상기 바이오디젤을 생산하는 단계는,

반응온도가 36 내지 54℃, 유속이 0.1 내지 0.3ml/min 및 상기 제2 리파아제 농도가 상기 제2 기질의 유지 중량 기준으로 2 내지 10 중량%인 조건하에서 수행되는 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법

청구항 5

제1항에 있어서, 상기 제1 리파아제 및 상기 제2 리파아제는 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제인 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조방법.

청구항 6

제5항에 있어서, 상기 무위치 선택성 리파아제는 스타필로코커스 오리우스 (*Staphylococcus aureus*), 페니실린 사이클로피움 (*Penicillium cyclopium*), 코리네박테라움 아크네스 (*Corynebacterium acnes*), 또는 캔디다 루고사 (*Candida rugosa*) 유래의 리파아제이고,

상기 1,3-위치선택성 리파아제는 리조포스 (*Rhizopus*), 아스퍼질러스 (*Aspergillus*) 또는 무코르 (*Mucor*) 속

유래의 리파아제, 췌장의 리파아제 (pancreatic lipase), 또는 쌀겨 (rice bran)의 리파아제인 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 7

제6항에 있어서, 상기 무위치 선택성 리파아제는 캔디다 루고사 (*Candida rugosa*) 유래의 리파아제이고,

상기 1,3-위치선택성 리파아제는 리조포스 (*Rhizopus*) 유래의 리파아제인 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 8

제5항에 있어서, 상기 동시고정화 리파아제 내의 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치선택성 리파아제 간의 비율은 중량 기준으로 1:3 내지 3:1인 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 9

제1항 내지 제8항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유지는 비식용 식물성 유지 및 폐유로 이루어진 군에서 선택된 것이고

상기 알코올은 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분지쇄 알코올인 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 10

제9항에 있어서, 상기 비식용 식물성 유지는 자트로파(jathropa) 오일이고, 상기 알코올은 메탄올, 에탄올 및 부탄올로 이루어진 군에서 선택된 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조방법.

청구항 11

제1항에 있어서, 상기 예비 바이오디젤 생성물은 상기 제1 기질로부터 전환된 바이오디젤 및 미전환된 상기 제1 기질을 포함하는 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조방법.

명 세 서

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 바이오디젤의 제조방법에 관한 것으로, 보다 구체적으로는 고정화된 리파아제를 이용하여 효소공정으로 유지로부터 고효율로 바이오디젤을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0002] 전 세계적으로 자동차의 이용량의 급증으로 석유의 수요가 증가하고 있다. 그러나 석유매장량은 한정되어 있고 1997년 교토에서 발의된 협약 이후 공해물질의 규제와 2002년 요하네스버그의 선언에서 대체에너지 중 바이오에

너지의 사용의무화를 강력하게 권고하는 정책이 포함되어 석유를 대체할 수 있는 새로운 에너지 자원의 개발이 절실히 요구되고 있다. 많은 대체에너지들이 개발되고 있지만 대부분의 경우 그러한 에너지를 이용할 수 없어 실용화에 어려움이 많다. 그러나 바이오디젤은 기존의 석유계 경유와 성질이 매우 유사하고 기존의 경유 자동차에 엔진의 변형 없이도 직접 연료로 쓸 수 있으며, 공해가 거의 발생하지 않아 대체 에너지로 각광을 받고 있다.

[0003] 또한, 동식물성 기름을 원료로 하여 생산되어 고갈될 문제점이 없으며, 폐유로도 생산이 가능하기 때문에 새로운 재생에너지로 평가되고 있다. 바이오디젤은 기존의 석유계 경유보다 매연의 배출량을 20%이상 저감시킬 수 있으며 생분해가 가능하며 독성이 적어 청정 에너지원으로 평가 받고 있다. 또한, 바이오디젤은 경유대체 에너지뿐만 아니라 윤활유의 원료, 윤활유 첨가제 등으로 이용될 수 있으며 다양한 무공해 용제 및 생물농약으로 사용이 가능하다. 또한, 원유로 인해 오염된 해변정화를 위한 생물환경정화(bioremediation)를 위한 촉매제로서 이용이 가능하여 다양한 분야에서 사용이 가능한 청정에너지로 각광받고 있다.

[0004] 선진국에서는 바이오디젤을 국가에너지 전략사업화로 중점 연구하고 있다. 유럽의 경우 ERMA (Eropean Renewable Raw material Association)을 신설하여 투자를 확대하고 있고, 이미 경유자동차에 바이오디젤을 사용하기 시작하였다. 미국에서는 경유에 바이오디젤을 혼합한 방식으로 관공서 경유자동차, 대형트럭, 공공버스의 연료로 사용하고 있으며 2020년까지 20%의 경유를 바이오디젤로 대체하기로 결정, 국가적 차원의 연구투자가 이루어지고 있다.

[0005] 바이오디젤은 지방산 메틸에스테르(fatty acid methyl ester)로 동식물성 기름을 알코올과 트랜스에스테르화(transesterification)시켜 생산된다. 현재 바이오디젤은 국내외에서 산염기 촉매를 이용한 합성방법에 의해 생산되고 있다. 그러나 산염기 촉매를 사용한 공정은 다단계 반응공정이 필요하며 촉매에 의한 엔진부식을 발생시켜 생산공정에서 반드시 중화 세척공정이 수행되어야 한다. 부산물로 얻어지는 글리세롤에도 촉매가 함유되어 제품화를 실시하기 위해서는 분리공정을 거쳐야 한다. 또한 부산물 회수의 어려움과 다량의 폐수발생에 의한 환경문제가 야기되며, 처리비용 또한 발생하게 된다.

[0006] 그러므로 향후 대규모 바이오디젤의 수요를 충족할 수 있는 저에너지 요구성의 친환경적 신공정의 필요성이 대두되고 있다. 이러한 이유로 바이오디젤을 생산하기 위한 생산 공정 중 효소인 리파아제(lipase)를 촉매로 이용하는 효소공정이 각광을 받고 있다. 리파아제는 동, 식물성 기름의 가수분해(Hydrolysis), 그 역반응인 에스테르화(Esterification) 그리고 알코올과 기름을 트랜스에스테르화(Transesterification)하여 에스테르(Ester)를 생성하는 반응 등 다양한 반응을 일으킬 수 있는 효소로서, 바이오디젤을 생산하는 효소 공정에 많이 사용된다.

[0007] 효소를 이용한 공정은 화학공정에 비해 온화한 반응조건에서 반응이 진행되어 화학공정에 비해 에너지가 절약되며, 공정이 단순하여 공정비용이 적게 드는 장점이 있다. 특히, 유지 내 유리지방산(free fatty acid, FFA)의 영향을 받지 않아 비누화 반응을 일으키지 않으므로, 비식용 작물에 적용이 유리하여, 현재 대체에너지 생산증가에 의해 대두되고 있는 식량문제를 해결할 수 있을 것으로 판단된다. 또한 효소공정에는 엔진을 부식시키는 화학촉매가 존재하지 않아 분리정제 공정을 단순화 시킬 수 있으며, 부산물로 얻어지는 글리세롤을 제품화하여 바이오디젤의 생산단가를 낮출 수 있다.

[0008] 그러나 상기 효소 공정에서는 낮은 전환율, 느린 반응속도와 높은 리파아제의 가격이 상업화의 걸림돌이 되고 있다.

[0009] 따라서 바이오디젤 생산에서 효소 공정의 상업화를 위해서는 바이오디젤의 생산에 적합한 높은 활성을 갖는 다양한 리파아제의 개발과 반응속도를 크게 증가시킬 수 있는 새로운 공정의 개발에 대한 연구가 이루어져야 한다.

발명의 내용

해결하려는 과제

[0010] 상기와 같은 과제를 해결하기 위하여, 본 발명은 높은 활성을 갖는 고정화된 리파아제를 효소로 이용하여 비식용 작물의 유지로부터 고효율로 바이오디젤을 생산하는 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0011] 이에, 본 발명은

[0012] 유지 및 알코올을 기질로 하는 바이오디젤 제조 방법으로서,

[0013] 제1 저장용기 내의 제1 기질 및 물을 제1 리파아제가 있는 제1 반응기로 보내어 예비 바이오디젤 생성물을 생산하는 단계;

[0014] 상기 예비 바이오디젤 생성물을 상기 제1 반응기 및 제1 저장용기 사이에서 재순환하는 단계; 및

[0015] 제2 저장용기 내의 제2 기질 및 물과, 상기 제 1 저장용기 내의 상기 예비 바이오디젤 생성물을 제2 리파아제가 있는 제2 반응기로 보내어 바이오디젤을 생산하는 단계를 포함하는 바이오디젤의 제조방법을 제공한다.

[0016]

[0017] 이하에서, 첨부한 도면을 참조로 하여 본 발명의 바이오디젤 제조방법을 보다 구체적으로 설명한다.

[0018] 도 1을 참조하면, 제1 기질 및 물을 제1 저장용기(10)에서 교반한다.

[0019] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에서는 유지와 알코올을 기질로 사용한다.

[0020] 바이오디젤(biodiesel)은 식용 또는 비식용의 동물성 또는 식물성 유지, 바람직하게는 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), 무해하며(nontoxic), 발암성 공해물질인 황이나 방향족 화합물을 포함하지 않는다는 장점이 있다. 또한, 바이오디젤인 지방산 메틸에스테르는 분자 내에 10% 이상의 산소를 포함할 수 있으므로, 값비싼 산소첨가제를 첨가하지 않아도, 완전 연소를 도와서 분진 또는 일산화탄소의 방출이 감소시킨다는 장점이 있다.

[0021] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에서 기질로 사용되는 유지는 통상적으로 바이오디젤의 생산에 사용될 수 있는 모든 식용 또는 비식용 유지가 될 수 있으며, 바람직하게는 비식용의 식물성 유지 및 폐유를 포함한다.

[0022] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 유지는 자트로파 오일(jathropa oil), 팜유, 대두유, 카놀라유, 옥수수유, 해바라기유 또는 상기 유지의 폐유일 수 있다.

[0023] 본 발명의 바이오디젤 제조 방법에서, 상기 유지와 함께 기질로 사용되는 알코올은 탄소수 2 내지 8개의 직쇄 또는 분지쇄 알코올, 바람직하게는 탄소수 2 내지 4개의 직쇄 또는 분지쇄 알코올일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 메탄올, 에탄올 또는 직쇄 또는 분지쇄 부탄올일 수 있다. 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 알코올은 에탄올, 메탄올, 1-프로판올, 이소-프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 이소-부탄올 또는 테르-부탄올일 수 있다.

[0024] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에서 제1 기질의 유지와 알코올의 사용량은 통상의 바이오디젤 제조 공정에 사용되는 바에 따라 혼합하여 사용할 수 있다. 예를 들어, 유지 몰 수 : 알코올 몰 수를 1 : 1 내지 10, 바람직하게는 1 : 3 내지 7 의 혼합비로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0025] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에서 물은 상기 제1 기질의 유지 중량에 대해 1 내지 20중량%로, 바람직하게는 5 내지 10중량%로 포함될 수 있다.

[0026] 상기 제1 기질 및 물을 제1 저장용기(10)에서 교반한다. 교반 속도는 바람직하게는 200 내지 300 rpm, 보다 바람직하게는 240 내지 260 rpm, 더욱 바람직하게는 245 내지 255 rpm일 수 있으며, 상기 교반 속도는 통계학적 분석 방법에 의하여 최적 조건으로 선정된 범위로 설정할 수 있다.

[0027] 다음에, 상기 제1 기질 및 물을 상기 제1 저장용기(10)로부터 제1 리파아제가 있는 제1 반응기(20)로 보내어 예비 바이오디젤 생성물을 생산한다.

[0028] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에 있어서, 상기 제1 리파아제는 무위치 선택성 리파아제(non-specific lipase) 및 1,3-위치선택성 리파아제(1,3-specific lipase)가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 사용할 수 있다. 동시고정화된 리파아제를 사용하는 것이 각각 고정화된 리파아제를 혼합하여 사용하는 경우보다 반응시간과 바이오디젤 전환율 측면에서 더 우수한 효과를 보일 수 있다.

[0029] 바이오디젤 제조 방법에서 사용되는 효소공정에서 사용되는 리파아제는 위치 선택성에 따라 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제로 분류할 수 있다. 이때, 상기 1,3-위치 선택성 리파아제(1,3-specific lipase)는 트리글리세라이드의 1-,3-위치에서의 지방 아실기(fatty acyl group)에만 반응 특이성을 보이는 리파아제를 의미하고, 상기 무위치 선택성 리파아제 (non-specific lipase)는 모든 트리글리세라이드의 모든 세 가

지의 지방 아실기와 반응하는 리파아제를 의미한다.

[0030] 본 발명의 일 실시예에 있어서, 상기 제1 리파아제는 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시에 고정화된 것일 수 있다.

[0031] 이 때 사용되는 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제의 기원은 특별히 제한되지 않는다. 예를 들어, 상기 리파아제들은 포유동물의 췌장, 우유 등에서 유래한 리파아제, 식물성 리파아제(소맥, 대두, 면화 등의 씨앗 내부에서 유래한 리파아제), 미생물 리파아제(사상균, 세균, 효모 등에서 유래한 리파아제) 등일 수 있다. 보다 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. 또한, 무위치 선택성 리파아제는 스타필로코커스 오리우스(*Staphylococcus aureus*), 페니실린 사이클로피움 (*Penicillium cyclopium*), 코리네박테라움 아크네스(*Corynebacterium acnes*), 캔디다 루고사(*Candida rugosa*) 등에서 유래한 것일 수 있다.

[0032] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 1,3-위치 선택성 리파아제로서 리조포스 오라이제(*Rhizopus oryzae*) 리파아제를, 상기 무위치 선택성 리파아제로서 캔디다 루고사(*Candida rugosa*) 리파아제를 사용할 수 있다.

[0033] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에 있어서, 상기 1,3-위치특이성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제의 첨가되는 비율은 다양하게 조절가능하나, 1 : 3 내지 3 : 1 중량비로 사용할 수 있으며, 바람직하게는 1 : 2 내지 2 : 1의 중량비로, 보다 바람직하게는 1 : 0.8 내지 1 : 1.2의 중량비로 사용할 수 있다.

[0034] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에서, 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제는 자유로운(free) 형태 또는 고정화된 형태로 사용될 수 있으나, 바람직하게는 실리카겔과 같은 통상의 담체에 고정화된 리파아제일 수 있다. 본 발명에서 리파아제를 고정화시키는 방법은 특별히 제한되지 않으며 예를 들어, 흡착법, 포괄법 등의 물리적인 방법, 공유결합법, 가교연결방법 등의 화학적인 방법을 사용할 수 있다.

[0035] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 아미노기를 가지고 있는 담체에 리파아제 용액과 글루타르알데히드를 반응시켜 리파아제와 담체 사이에 가교반응을 일으켜 효소를 막 위에 고정화시킬 수 있다.

[0036] 효소공정을 이용한 바이오디젤 제조방법에서 리파아제의 사용량 특히, 동시고정화 리파아제의 사용량과 관련하여, 본 발명자의 선행특허인 한국등록 제0883397호(본 명세서에 참조로서 포함됨)의 도 5에 나타낸 바와 같이, 혼합 리파아제를 사용할 때 사용량을 유지 투입량의 5 내지 30 중량%까지 5 중량%의 간격으로 실험하였을 때, 혼합 리파아제의 양이 10 중량% 이상이면 전환율이 50%를 넘고, 20중량% 이상이면 거의 100%에 가까운 전환율을 나타내는 것으로 기재되어 있다.

[0037] 그러나, 상업적으로 입수할 수 있는 상기 리파아제들은 단위 중량당 가격이 높아 대량생산을 위해 많은 양을 사용할 경우 바이오디젤 생산시 제조 단가가 상승하는 원인이 된다. 본 발명의 바이오디젤 제조방법에 따르면, 상기 제1 리파아제의 사용량은 제1 기질의 유지 중량 기준으로 약 2 내지 약 10 중량%, 바람직하게는 약 4 내지 10 중량%, 보다 바람직하게는 약 4 중량% 정도만 사용하여도 20시간 내에 60%이상의 전환율을 얻을 수 있어, 대량 생산공정에 유리하게 적용할 수 있다.

[0038] 상기 제1 저장용기(10)로부터 상기 제1 반응기(20)로 제1 기질 및 물을 보내는 유속은 0.6 내지 1.2 ml/min, 바람직하게는 0.8 내지 1.0 ml/min일 수 있다. 상기 제1 기질 및 물의 상기 제1 반응기(20)로의 이동을 원활하게 하고 유속을 조절하기 위하여 상기 제1 저장용기(10)와 상기 제1 반응기(20)의 사이에 제1 펌프(50)를 더 구비할 수 있다.

[0039] 또한, 상기 제1 반응기(20)에서의 반응은 36 내지 54℃, 바람직하게는 40 내지 50℃, 보다 바람직하게는 44 내지 48℃, 더욱 바람직하게는 45 내지 46℃의 반응 온도에서 수행될 수 있다.

[0040] 상기 유속 및 반응 온도는 통계학적 분석 방법에 의하여 최적 조건으로 선정된 범위로 설정할 수 있다.

[0041] 상기 제1 반응기(20)에서 상기 제1 기질과 제1 리파아제와의 반응으로 생성된 예비 바이오디젤 생성물은 상기 제1 반응기(20)으로부터 상기 제1 저장용기(10)로 재순환한다. 따라서, 상기 제1 반응기(20)에서 제1 기질과 제1 리파아제와의 반응 개시 후 재순환 공정이 수행되는 동안, 상기 제1 저장용기(10)의 상기 예비 바이오디젤 생성물에는 상기 제1 기질로부터 전환된 바이오디젤 생성물과 미전환된 상기 제1 기질이 혼합된 상태로 존재하게 된다.

[0042] 상기와 같이 제1 반응기(20)에서 제1 기질과 제1 리파아제와 효소 반응을 수행한 후 상기 제1 저장용기(10)로

재순환하는 공정은, 반응 개시 후 12 내지 24시간, 바람직하게는 15 내지 20 시간 이내에 제1 기질의 바이오디젤로의 전환율이 50%, 바람직하게는 55%, 보다 바람직하게는 60%이 될 때까지 수행할 수 있다. 이 때 바이오디젤로의 전환율은 아래의 식 1에 따라 계산된다.

[0043] [식 1]

$$\text{바이오디젤로의 전환율(\%)} = \frac{\text{생성된 지방산 메틸에스테르(FAME)의 몰수}}{\text{(기질로 사용된 유지의 몰수 * 3)}} \times 100$$

[0044]

[0045] 한편, 별도의 제2 저장용기(30)에서 제2 기질 및 물을 교반한다.

[0046] 상기 제2 기질은 상기 제1 기질과 마찬가지로 유지 및 알코올을 포함하며 이에 대한 상세한 설명은 상기 제1 기질에서 상술한 바와 같다.

[0047] 상기 제2 기질의 교반 속도는 바람직하게는 200 내지 300 rpm, 보다 바람직하게는 240 내지 260 rpm, 더욱 바람직하게는 245 내지 255 rpm일 수 있으며, 상기 교반 속도는 통계학적 분석 방법에 의하여 최적 조건으로 선정된 범위로 설정할 수 있다.

[0048] 상기 제2 기질은 제1 기질이 60%이상의 전환율로 전환된 상기 예비 바이오디젤 생성물과 함께 제2 리파아제가 있는 제2 반응기(40)로 보내어 상기 제2 반응기(40)에서 바이오디젤을 최종적으로 생산한다. 이 때, 상기 제2 기질 및 물은 상기 제2 저장용기(30)로부터 상기 예비 바이오디젤 생성물이 있는 상기 제1 저장용기(10)로 보내진 다음, 상기 예비 바이오디젤 생성물과 혼합되어 상기 제2 반응기(40)로 보내질 수 있다.

[0049] 이 때, 상기 제2 저장용기(30)로부터 상기 제1 저장용기(10)로의 이동을 원활하게 하고 유속을 조절하기 위하여 상기 제2 저장용기(30)와 상기 제1 저장용기(10)의 사이에 제2 펌프(60)를 더 구비할 수 있다. 또한, 상기 제1 저장용기(10)로부터 상기 제2 반응기(40)로의 이동을 원활하게 하고 유속을 조절하기 위하여 상기 제1 저장용기(10)와 상기 제2 반응기(40)의 사이에 제3 펌프(70)를 더 구비할 수 있다.

[0050] 본 발명의 일 실시예에 따르면, 상기 제2 기질 및 물을 제2 저장용기(30)에서 교반하는 단계 및 상기 제2 반응기(40)에서 바이오디젤을 생산하는 단계는, 제1 반응기(20)에서의 상기 제1 기질의 전환율이 일정 수준까지 도달한 후, 바람직하게는 60%까지 도달한 후 순차적으로 수행될 수 있다.

[0051] 본 발명의 다른 실시예에 따르면, 상기 제2 기질 및 물을 제2 저장용기(30)에서 교반하는 단계 및 상기 제2 반응기(40)에서 바이오디젤을 생산하는 단계는, 제1 반응기(20)에서의 예비 바이오디젤 생성물을 생산하는 단계와 동시에 이루어질 수 있다.

[0052] 상기 제2 리파아제는 상기 제1 리파아제와 마찬가지로, 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 사용할 수 있으며 이에 대한 상세한 설명은 상기 제1 리파아제에서 상술한 바와 같다.

[0053] 본 발명의 바이오디젤 제조방법에 따르면, 상기 제2 리파아제의 사용량은 제2 기질의 유지 중량 기준으로 약 2 내지 약 10 중량%, 바람직하게는 약 4 내지 10 중량%, 보다 바람직하게는 약 4 중량% 정도만 사용하여도 80% 이상의 높은 전환율을 얻을 수 있어, 대량 생산공정에 유리하게 적용할 수 있다.

[0054] 상기 제2 반응기(40)에서 상기 제2 리파아제에 의해 전환되는 대상은 제2 기질 외에 상기 제1 반응기(20)에서의 반응 공정에서 미전환된 제1 기질이 더해지게 된다.

[0055] 상기 제2 저장용기(30)로부터 상기 제1 저장용기(10)로 제2 기질을 보내는 유속 및 상기 제1 저장용기(10)로부터 제2 반응기(40)으로 상기 제2 기질을 보내는 유속은 0.1 내지 0.5 ml/min, 바람직하게는 0.1 내지 0.3 ml/min일 수 있다.

[0056] 또한, 상기 제2 반응기(40)에서의 반응은 36 내지 54℃, 바람직하게는 40 내지 50℃, 보다 바람직하게는 44 내지 48℃, 더욱 바람직하게는 45 내지 46℃의 반응 온도에서 수행될 수 있다.

[0057] 상기 유속 및 반응 온도는 통계학적 분석 방법에 의하여 최적 조건으로 선정된 범위로 설정할 수 있다.

[0058] 상기 제2 반응기(40)로부터 최종적으로 생성된 바이오디젤은 생성물 저장용기(100)로 보낸다.

[0059] 상기와 같은 본 발명의 바이오디젤 제조방법에 따르면, 높은 활성을 갖는 고정화된 리파아제를 효소로 이용하여 예비 바이오디젤 생산 단계를 포함하여 2단계로 효소 공정을 거침으로써 적은 양의 리파아제를 사용하여도 고효율로 높은 전환율의 바이오디젤을 생산할 수 있다.

발명의 효과

[0060] 본 발명은 동시고정화 리파아제를 이용하여 2단계로 효소 공정을 수행함으로써 적은 양의 리파아제를 사용하여도 높은 전환율을 달성할 수 있어 바이오디젤의 대량생산 공정에 유용하게 적용할 수 있다.

도면의 간단한 설명

[0061] 도 1은 본 발명의 바이오디젤 제조방법에 사용된 장치를 개략적으로 보여주는 도면이다.

도 2는 본 발명의 실시예 1에서 시간에 따른 제1 기질의 바이오디젤로의 전환율을 나타내는 그래프이다.

도 3은 본 발명의 실시예 1에서 시간에 따른 최종 바이오디젤로의 전환율을 나타내는 그래프이다.

도 4는 본 발명의 실시예 2에서 시간에 따른 제1 기질의 바이오디젤로의 전환율을 나타내는 그래프이다.

도 5는 본 발명의 실시예 2에서 시간에 따른 최종 바이오디젤로의 전환율을 나타내는 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0062] 이하 본 발명을 다음의 실시예에 의하여 보다 구체적으로 설명하고자 한다. 그러나 이들은 본 발명을 예시하기 위한 것일 뿐이며, 본 발명의 범위가 이들 실시예에 의하여 제한되는 것은 아니다.

[0063] **참조예 1**

[0064] **리파아제의 준비**

[0065] 무위치 선택성 리파아제인 캔디다 루고사 (*Candida rugosa*) 리파아제, 1,3-위치특이성 리파아제인 리조포스 오라이제 (*Rhizopus oryzae*) 리파아제는 미국의 시그마 (Sigma Co., USA)사에서 구입하였다.

[0066] **참조예 2**

[0067] **리파아제 고정화를 위한 담체의 제조**

[0068] 리파아제 고정화를 위한 담체로서 활성화된 실리카겔(silica gel)을 다음의 방법으로 제조하여 사용하였다.

[0069] 먼저, 건조된 실리카겔 1g을 10%(v/v) 3-아미노프로필트리에톡시실란(aminopropyl-triethoxysilane; 3-APTES)의 아세톤 용액 20mL와 혼합한 다음, 일정하게 교반하면서(100rpm~150rpm), 50℃에서 2 시간 동안 반응시켰다. 상기와 같이 반응된 실리카겔을 물로 세척한 후, 2 시간 동안 60℃에서 건조시켰다. 건조된 실리카겔을 소듐 포스페이트 버퍼 (Sodium phosphate buffer)에 다양한 pH (6.0 내지 8.0)와 이온강도 (0.1M 내지 0.5M)에서 20mL로 현탁하였다. 25%(w/v) 글루타르알데하이드 용액 2mL를 상기 실리카겔 현탁액에 첨가한 다음 실리카겔이 활성화되도록 20℃에서 2 시간 동안 반응시켰다. 활성화된 실리카겔을 물로 세척한 후 60℃에서 2 시간 동안 건조시켰다.

[0070] **참조예 3**

[0071] **리파아제의 전처리 공정**

[0072] 130U/mg의 캔디다 루고사(*Candida rugosa*) 리파아제와 41.6U/mg의 리조포스 오라이제(*Rhizopus oryzae*) 리파아제를 용해시킨 각각의 수용액 10㎖와 대두유 (Soybean oil) 10㎖ (리파아제 용액:대두유=1:1(v/v))를 37℃, 200rpm에서 30분 동안 반응시켜 대두유의 가수분해 반응을 유도함으로써, 효소의 활성을 유지할 수 있도록 리파아제를 전처리하였다.

[0073] **참조예 4**

[0074] **리파아제의 고정화**

[0075] 참조예 2와3에서와 같이 두 종류의 리파아제 용액을 준비하고 전처리 한 후, 각각 다음의 가교연결방법 (cross-linking method)을 이용하여 실리카겔에 고정화 시켰다.

[0076] 고정화 담체인 실리카겔을 35%(v/v)의 H_2O_2로 전처리하여 실리카겔 표면의 불순물을 제거하였다. 전처리된 실리카겔을 15%(w/v)의 3-APTES의 아세톤 용액을 이용하여 50℃, 150rpm에서 120분간 실란화(silanization)하여, 실리카겔 표면에 아미노기(amino group)를 도입하였다. 상기 실란화된 실리카겔을 가교제인 글루타르알데하이드(glutaraldehyde)를 64℃의 0.1M 포스페이트 버퍼(pH 8.0)에서 20분간 전처리하여, 아미노기가 도입된 실리카겔과 2%(v/v)의 MOPs-HCl과 NaOH와 소듐 포스페이트 버퍼의 혼합시스템의 (pH 6.5)에서 20℃, 150rpm의 조건으로 24시간 동안 상기 전처리된 두 종류 리파아제(참조예 3)를 반응시켜, 1:1의 비율로 하나의 실리카겔 입자에 동시고정화하였다.

[0077] **실시예 1**

[0078] **자트로파 오일로부터 바이오디젤의 제조**

[0079] 상기 참조예 1 내지 4에 의해 캔디다 루고사 리파아제(*Candida rugosa* lipase) 및 리조포스 오라이제 리파아제(*Rhizopus oryzae* lipase)가 동시고정화된 실리카겔을 두 종류의 리파아제의 총중량이 각각 10g이 되도록 제1 반응기 및 제2 반응기에 각각 도입하였다.

[0080] 제1기질로는 자트로파 오일(jathropa oil) 250g(한국에너지기술연구원) 및 메틸알코 올30g 을 사용하고, 증류수 10g을 500ml용량의 제1 반응기에 투여하여 250 내지350rpm으로 교반하였다. 교반된 제1 기질을 0.8 내지1.0 ml/min의 유속으로 제1 반응기로 보내어 45℃에서 효소 반응을 일어나도록 한 후 제1반응기의 생성물을 다시 제1반응기로 순환하였다.

[0081] 상기 순환 공정은 제1 기질의 전환율이 60%가 될 때까지 수행되었다.

[0082] 제2기질로는 자트로파 오일(jathropa oil) 250g (한국에너지기술연구원) 및 메틸알코올 30g 을 사용하고, 증류수 10g을 500ml용량의 제2 반응기에 투여하여 250 내지 350rpm 으로 교반하였다. 교반된 제2 기질 및 물을 제1 저장용기로 보낸 후 제1저장용기로부터 다시 제2 기질을 0.1 내지 0.3ml/min의 유속으로 제2 반응기로 보내어 제2반응기에서 45℃에서 효소 반응을 수행함으로써 최종적으로 바이오디젤을 생성하였다.

[0083] **실시예 2**

[0084] **폐유로부터 바이오디젤의 제조**

[0085] 제1 기질 및 제2 기질의 자트로파 오일 대신 폐유를 사용한 것 외에는 실시예 1과 동일하게 실시하였다.

[0086] 폐유는 대두유의 폐유로 하였다.

[0087] **실험예**

[0088] **바이오디젤로의 전환율 측정**

[0089] 생성된 바이오디젤은 GC (gas chromatography)를 사용하여 바이오디젤의 양을 분석하였다. GC는 영린 ACME 6100모델을 이용하였고, column은 HP-INNOWAX (19091N-133, 30m X 0.25 μm)를 사용하였다.

[0090] 분석은 다음과 같은 조건에서 수행하였다. 인젝터(Injector)는 250℃ 이고, 오븐(oven)은 140℃에서는 1분동안 retention하고 240℃까지는 5℃/min으로 승온하여 10분동안 retention하였다. 검출기(Detector)로는 FID를 250℃ 조건에서 사용하였다. 인젝션 볼륨(Injection volume)은 1μL로 하였고, 스플릿 비율(split ratio)은 50:1로 하였다. 운반가스(carrier gas)로 헬륨(He)을 사용하였으며 유속은 1 ㎖/min로 하였고, 공기(air)는 280 ㎖/min, 수소(H_2)는 40 ㎖/min으로 주입하였다. Make up flow는 헬륨을 사용하였으며, 유속은 30 ㎖/min으

로 하였다. 메틸헵타데카노이트(m-Heptadecanoate)를 헵탄(Heptane)에 녹여 표준물질로 사용하였다.

[0091] 바이오디젤의 전환율은 EN14103-BD100 FAME 측정표준법으로 계산하였다.

[0092] 실시예 1의 상기 제1반응기에서의 시간에 따른 제1기질의 바이오디젤의 전환율을 도 2에 나타내었다. 또한, 실시예 1의 상기 제2 반응기에서의 시간에 따른 최종적인 바이오디젤의 전환율을 도 4에 나타내었다.

[0093] 실시예 2의 상기 제1반응기에서의 시간에 따른 제1 기질의 바이오디젤의 전환율을 도 3에 나타내었다. 또한, 실시예 2의 상기 제2 반응기에서의 시간에 따른 최종적인 바이오디젤의 전환율을 도 5에 나타내었다.

[0094] 도 2 및 도3을 참조하면, 자트로파 오일 또는 폐유를 이용한 본 발명의 바이오디젤의 제조방법에 있어서, 제1기질은 10 내지 15시간 내에 약 50%의 전환율을 보이며, 20 내지 24시간 이후에는 약 70%이상의 높은 전환율로 바이오디젤을 생산할 수 있었다.

[0095] 또한, 도 4 및 도 5를 참조하면, 최종적으로 약 90%이상의 높은 전환율로 바이오디젤을 생산할 수 있었다.

[0096] 상기와 같이, 본 발명의 바이오디젤 제조방법에 의하면, 기질에 대해 적은 양의 리파아제를 사용하면서도 높은 전환율로 바이오디젤을 생산할 수 있다. 따라서 경제적으로 유리하며 많은 양의 유지를 단시간 내에 전환해야 하는 대량생산에 유용한 공정으로써 바이오디젤의 산업적 적용에 크게 기여할 수 있을 것이다.

부호의 설명

[0097] 10: 제1 저장용기

20: 제1 반응기

30: 제2 저장용기

40: 제2 반응기

50: 제1 펌프

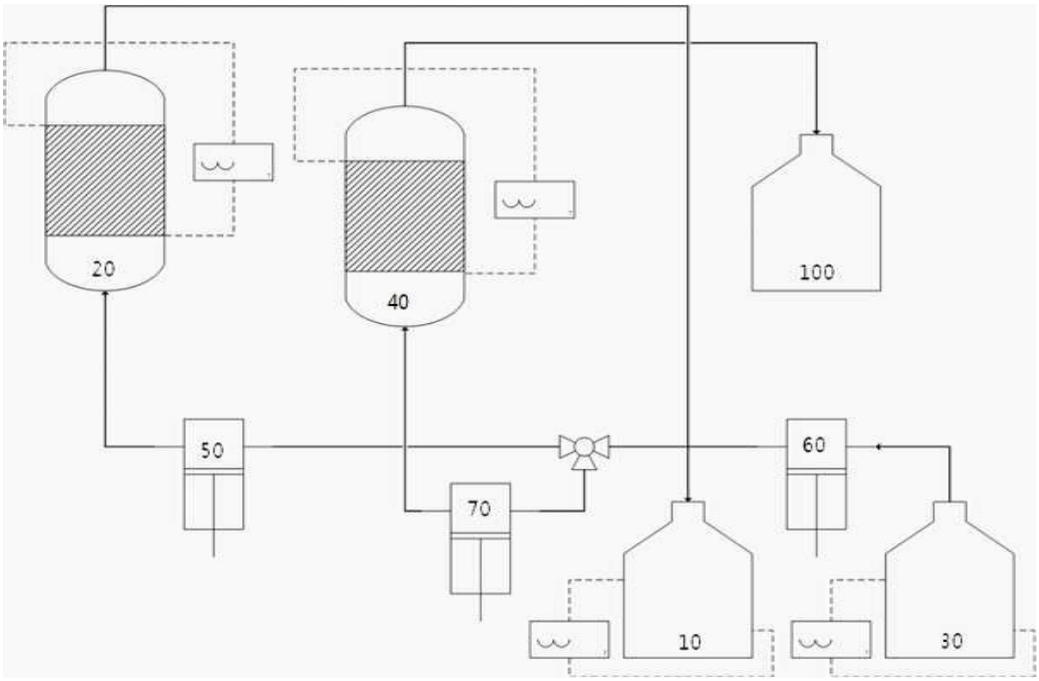
60: 제2 펌프

70: 제3 펌프

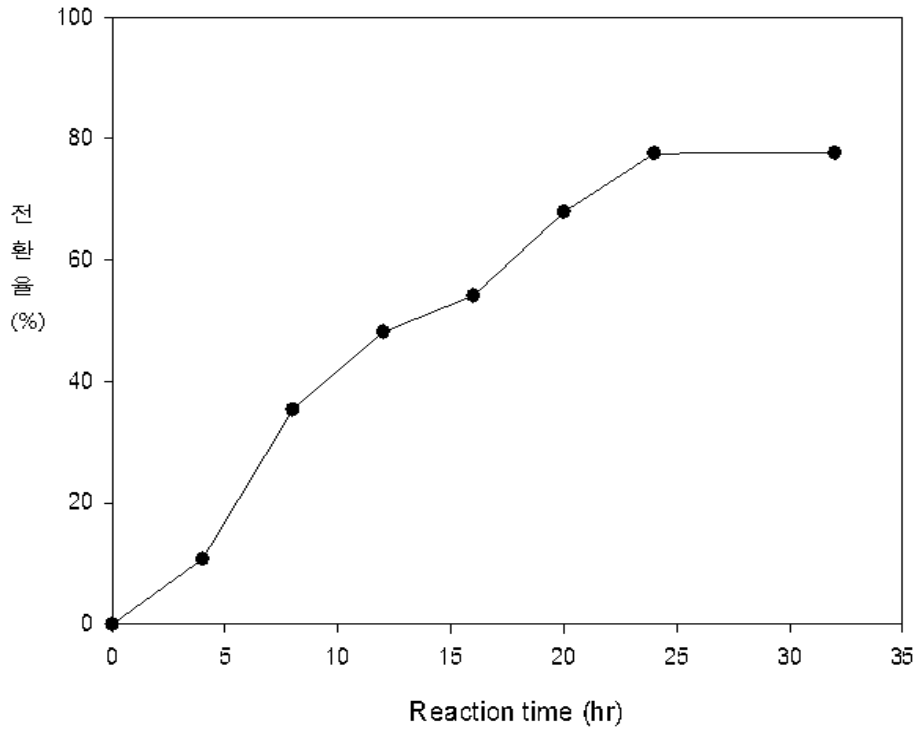
100: 생성물 저장용기

도면

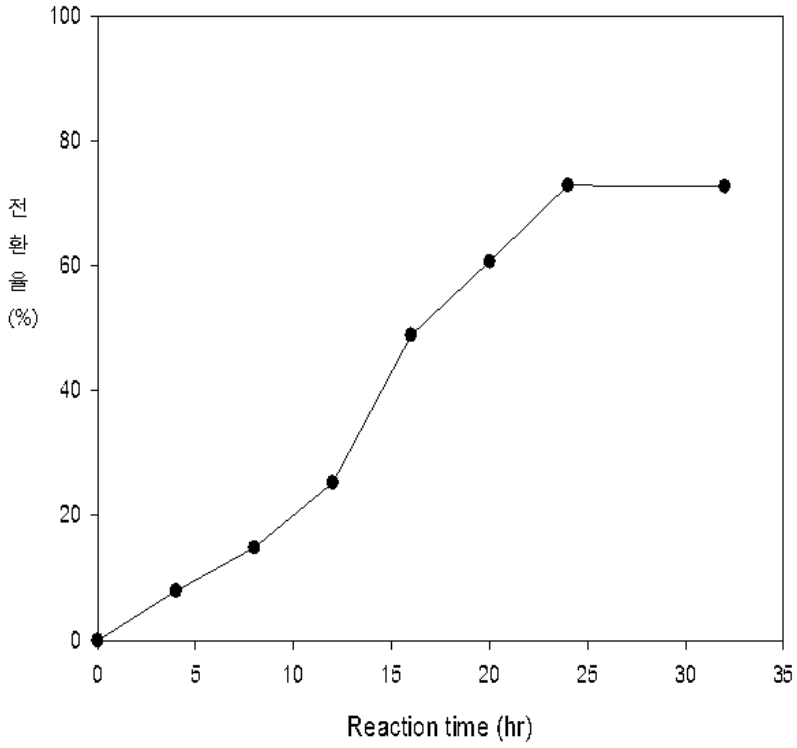
도면1


20
40
100
50
60
70
10
30

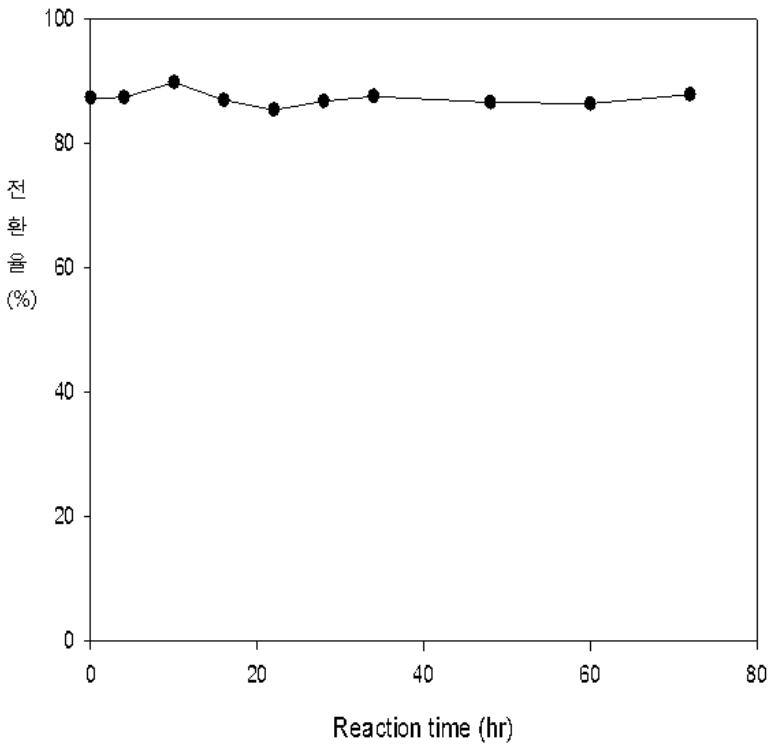
도면2


100
80
60
40
20
0
전
환
율
(%)
0
5
10
15
20
25
30
35
Reaction time (hr)

도면3


100
80
60
40
20
0
전환율 (%)
0
5
10
15
20
25
30
35
Reaction time (hr)

도면4


100
80
60
40
20
0
전환율 (%)
0
20
40
60
80
Reaction time (hr)

도면5

