



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2015-0051187

(43) 공개일자 2015년05월11일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 7/64 (2006.01)

(21) 출원번호 10-2014-0151230

(22) 출원일자 2014년11월03일

심사청구일자 2014년11월03일

(30) 우선권주장

1020130131924 2013년11월01일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

대한민국(농촌진흥청장)

전라북도 전주시 완산구 농생명로 300 (중동)

(72) 발명자

김인환

서울특별시 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호

최나경

서울특별시 마포구 도화길 28, 112동 1601호

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

한양특허법인

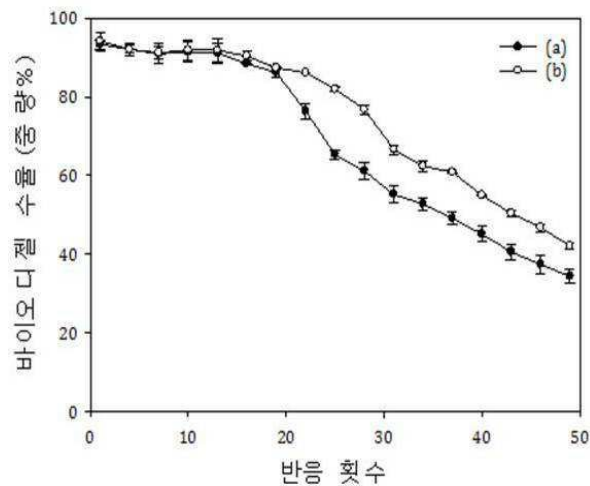
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 비누분 유래 에시드 오일 및 효소를 이용한 바이오디젤의 제조 방법

(57) 요약

본 발명은 바이오디젤의 제조방법에 관한 것으로, 좀 더 구체적으로는 미강유를 제조하는 과정에서 공해물질로 생성되는 비누분(soapstock)으로부터 에시드 오일(acid oil)을 제조하고, 이를 효소 존재하에 에탄올과 에스테르화 반응시켜 바이오디젤을 제조하는 방법에 관한 것이다. 본 발명의 제조 방법에 따르면 높은 수율로 바이오디젤을 얻을 수 있는 장점이 있다.

대표도 - 도18



(72) 발명자

윤성원

서울특별시 동대문구 장안벚꽃로 107, 108동 2004호

백지연

경기도 성남시 분당구 동판교로 155, 706동 901호

이점식

경기도 수원시 장안구 천천로74번길 92, 822동 701호

이준수

충청북도 청주시 상당구 중흥로 71, 111동 901호

곽지은

경기도 화성시 메타폴리스로 22, 303동 1103호

윤미라

경기도 수원시 영통구 동탄원천로1109번길 42, 202동 314호

이정희

경기도 안양시 만안구 박달로479번길 31, 6동 407호

천아름

경기도 안양시 동안구 경수대로797번길 5, 102동 905호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업

과제고유번호 407048033SB120

부처명 농림수산식품기술기획평가원

연구관리전문기관 보건과학대학학사지원부

연구사업명 고부가가치식품기술개발사업

연구과제명 배아함유 현미유로부터 생리활성물질 추출, 농축 및 소재화

기 여 율 1/1

주관기관 충북대학교 산학협력단

연구기간 2013.01.01 ~ 2013.12.31

명세서

청구범위

청구항 1

(1)미강유 유래 비누분(soapstock)으로부터 애시드 오일(acid oil)을 제조하는 단계; 및
(2)상기 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올을 기질로 하며, 상기 기질과 노보자임 435(Novozym 435), 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 및 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 효소를 반응시켜 에스테르화 반응을 시키는 단계를 포함하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 2

청구항 1에 있어서, 상기 애시드 오일은 미강유 유래 비누분, 이소프로판올, 헥산, 황산 및 물을 반응시켜 제조되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 3

청구항 1에 있어서, 상기 (2)단계의 효소로 노보자임 435를 사용하는 경우 에스테르화 반응 조건은 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 몰비는 1:4 내지 1:6이고, 반응온도는 20 내지 60℃이고, 상기 기질 총 중량에 대하여 노보자임 435가 5 내지 15 중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 4

청구항 1에 있어서, 상기 (2)단계의 효소로 리포자임 RM IM을 사용하는 경우 에스테르화 반응 조건은 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 몰비는 1:2 내지 1:6이고, 반응온도는 10 내지 50℃이고, 상기 기질 총 중량에 대하여 리포자임 RM IM이 2.5 내지 15 중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 5

청구항 1에 있어서, 상기 (2)단계의 효소로 리포자임 TL IM을 사용하는 경우 에스테르화 반응 조건은 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 몰비는 1:2 내지 1:6이고, 반응온도는 10 내지 45℃이고, 상기 기질 총 중량에 대하여 리포자임 TL IM이 10 내지 15 중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 6

청구항 1에 있어서, 상기 (2)단계에서 효소로 노보자임 435(Novozym 435) 및 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 사용하여 1차 에스테르화 반응을 시키고, 상기 효소를 여과하여 제거하는 단계 및 효소로 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)을 첨가하여 2차 에스테르화 반응을 시키는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 7

청구항 6에 있어서, 상기 1차 에스테르화 반응은 5 내지 60분 동안 진행되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 8

청구항 1에 있어서, 상기 (2)단계에서 기질 및 효소를 연속식 반응기(packed-bed reactor, PBR)에서 반응시켜 에스테르화 반응을 시키는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 9

청구항 8에 있어서, 상기 (2)단계의 연속식 반응기에서 에스테르화 반응 조건은 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 몰비는 1:3 내지 1:6이고, 반응온도는 10 내지 35℃이고, 상기 기질 총 중량에 대하여 수분이 1 내지 6 중량%로 사용되는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 10

청구항 8에 있어서, 상기 (2)단계에서 생성되는 글리세롤을 제거하는 단계를 추가하는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 11

청구항 8에 있어서, 상기 효소는 리포자임 TL IM 인 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

청구항 12

청구항 1에 있어서, 상기 탄소수 1 내지 4의 알코올은 에탄올인 것을 특징으로 하는 바이오디젤 제조 방법.

발명의 설명

기술 분야

[0001] 본 발명은 비누분 유래 에시드 오일 및 효소를 이용한 바이오디젤의 제조 방법에 관한 것으로, 보다 자세하게는 미강유(rice bran oil)를 제조하는 과정에서 부산물로 생성되는 비누분(soapstock)으로부터 에시드 오일(acid oil)을 제조하고, 상기 에시드 오일을 효소 존재 하에 에스테르화 반응을 시켜 바이오디젤을 제조하는 방법에 관한 것이다.

배경 기술

[0002] 현재 전 세계적으로 석유 보유량이 감소하고, 화석연료를 사용할 때 발생하는 온실가스 배출량 감축이 의무화되면서 대체연료인 바이오디젤 개발의 중요성이 증가하고 있다. 바이오디젤은 무독성이고 생분해성이 있으며 재생 가능한 연료 에너지로, 특히 일산화탄소, 이산화탄소, 황산가스와 같은 온실가스 배출량이 적은 장점이 있다.

[0003] 바이오디젤은 식물성 기름이나 동물성 지방에 함유된 긴 사슬 지방산과 짧은 사슬 알코올의 모노알킬 에스테르이다. 일반적으로 바이오디젤 합성반응은 화학적 촉매나 효소 촉매를 이용하는데, 화학적 촉매 반응은 수산화나트륨, 수산화칼륨 또는 황산 등을 이용하며, 바이오디젤 생산 시 시간 및 초기 비용이 적게 드는 장점이 있어서 상업적으로는 사용되고 있는 방법이다. 그러나, 반응 후 시행되어야 하는 중화 반응 및 염 제거공정에서 발생하는 다량 발생하는 폐수 처리 비용이 많이 소요되며, 글리세롤을 회수하기 어려운 단점이 있다.

[0004] 반면, 바이오디젤 제조 시, 촉매로서 효소를 사용하는 경우 반응시간이 비교적 길고, 효소가 고가인 단점이 있으나, 촉매와 반응 생산물을 분리하기 쉽고, 부가적인 처리공정이 필요 없으며, 반응 부산물인 글리세롤의 회수가 용이한 장점이 있다. 또한, 효소반응은 비교적 온화한 조건에서 일어나므로 추가적인 에너지 사용이 필요 없으며, 비누형성을 방지하여 바이오디젤 수율을 증가시킬 수 있다는 장점이 있다.

[0005] 현재 바이오디젤 생산 연구는 주로 정제유를 사용하고 있으며, 정제유 비용은 바이오디젤 생산 원가의 약 70%를 차지하고 있는데, 바이오 디젤의 원료로 사용하기에 정제유의 가격이 너무 고가이며, 심지어 화석연료에 비하여도 경제성이 떨어지는 문제점이 있다. 또한, 대부분의 정제유는 농작물로부터 생산되므로 해당 농작물의 작황에 따라 가격의 등락이 심한 편이다.

[0006] 따라서, 바이오디젤의 제조 방법에 있어서 효소를 사용하되, 그 반응 효율을 높이고, 생산 원가를 낮추어 경제성을 갖출 수 있도록 하는 제조 방법에 대한 기대가 높은 실정이다.

선행기술문헌

특허문헌

[0007] (특허문헌 0001) 대한민국 공개특허 제10-2010-0029458호
(특허문헌 0002) 대한민국 공개특허 제10-2013-0008672호
(특허문헌 0003) 대한민국 공개특허 제10-2013-0099537호

비특허문헌

- [0008] (비특허문헌 0001) Lara Pizarro, A.V., Park, E.Y. 2003. Lipase-catalyzed production of biodiesel fuel from vegetable oils contained in waste activated bleaching earth. Process Biochemistry, 38(7), 1077-1082.
- (비특허문헌 0002) Ma, F., Hanna, M.A. 1999. Biodiesel production: a review. Bioresource Technology, 70(1), 1-15.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0009] 본 발명은 미강유 유래 비누분(soapstock)으로부터 애시드 오일(acid oil)을 제조하고, 상기 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올을 기질로 하며, 상기 기질에 효소를 첨가하여 에스테르화 반응을 진행시켜 바이오디젤을 제조하는 방법을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0010] 또한, 본 발명은 상기 바이오디젤 제조 방법으로부터 바이오디젤을 최적으로 얻을 수 있는 수득 조건을 제공하는 것을 목적으로 한다.
- [0011] 또한, 본 발명은 상기 바이오디젤 제조 방법에 사용되는 효소를 재사용하여 바이오디젤 제조 방법의 경제성 및 효율성을 증대시키는 것을 목적으로 한다.

과제의 해결 수단

- [0012] 상기 목적을 달성하기 위하여,
- [0013] 본 발명은 (1)미강유 유래 비누분(soapstock)으로부터 애시드 오일(acid oil)을 제조하는 단계; 및
- [0014] (2)상기 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올을 기질로 하며, 상기 기질과 노보자임 435(Novozym 435), 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 및 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 효소를 반응시켜 에스테르화 반응을 시키는 단계를 포함하는 바이오디젤 제조 방법을 제공한다.

발명의 효과

- [0015] 본 발명의 바이오디젤 제조 방법은 최적 조건에서 높은 수율로 바이오디젤을 수득할 수 있다.
- [0016] 또한, 본 발명의 바이오디젤 제조 방법은 효소를 재사용할 수 있어, 그에 따른 효율성 및 경제성을 증대시킬 수 있다.

도면의 간단한 설명

- [0017] 도 1은 효소 종류에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.
- 도 2는 노보자임 435(Novozym 435) 단독 사용시, 기질 간의 물 비율에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.
- 도 3은 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 단독 사용시, 기질 간의 물 비율에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.
- 도 4는 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 단독 사용시, 기질 간의 물 비율에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.
- 도 5는 노보자임 435(Novozym 435) 단독 사용시, 반응 온도에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.
- 도 6은 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 단독 사용시, 반응 온도에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.
- 도 7은 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 단독 사용시, 반응 온도에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프

이다.

도 8은 노보자임 435(Novozym 435) 단독 사용시, 효소 사용량에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.

도 9는 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 단독 사용시, 효소 사용량에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.

도 10은 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 단독 사용시, 효소 사용량에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.

도 11은 노보자임 435(Novozym 435)로 1차 에스테르화한 후, 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)으로 2차 에스테르화한 후의 바이오디젤 수득율을 나타낸 그래프이다. 이때 2단계 반응 중 1차 에스테르 반응시간을 달리하여 그 결과를 도시하였다. 5분 (●), 15분 (○), 30분 (▼), 60분 (△). ■와 □은 각각 Novozym 435, Lipozyme TL IM의 단일효소반응을 나타낸다.

도 12는 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM)으로 1차 에스테르화한 후, 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)으로 2차 에스테르화한 후의 바이오디젤 수득율을 나타낸 그래프이다. 이때 2단계 반응 중 1차 에스테르 반응시간을 달리하여 그 결과를 도시하였다. 5분 (●), 15분 (○), 30분 (▼), 60분 (△). ■와 □은 각각 Lipozyme RM IM, Lipozyme TL IM의 단일효소반응을 나타낸다.

도 13은 글리세롤을 제거하지 않는 연속식 반응기를 나타낸 모식도이다.

도 14는 글리세롤을 제거하는 연속식 반응기를 나타낸 모식도이다.

도 15는 연속식 반응기에서 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 사용시, 기질의 수분 함량에 따른 바이오디젤의 수득율을 나타낸 그래프이다.

도 16은 연속식 반응기에서 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 사용시, 반응 온도에 따른 바이오디젤 수득율을 나타낸 그래프이다.

도 17은 연속식 반응기에서 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 사용시, 기질 간의 물 비율에 따른 바이오디젤 수득율을 나타낸 그래프이다.

도 18은 연속식 반응기에서 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 사용시, 효소의 사용 횟수에 따른 바이오디젤 수득율을 나타낸 그래프로 b 는 반응 중에 생성되는 글리세롤을 제거해 준 경우이고 a는 제거가 없는 경우이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

이하, 본 발명을 보다 자세히 설명한다.

본 발명은 바이오디젤의 제조방법에 관한 것으로,

(1)미강유 유래 비누분(soapstock)으로부터 애시드 오일(acid oil)을 제조하는 단계; 및

(2)상기 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올을 기질로 하며, 상기 기질과 노보자임 435(Novozym 435), 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 및 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상의 효소를 반응시켜 에스테르화 반응을 시키는 단계를 포함하여 바이오디젤을 제조할 수 있다.

본 발명의 바이오디젤의 제조방법은 미강유 유래 비누분(soapstock)으로부터 만들어진 애시드 오일(acid oil)을 기질로 사용하므로, 환경오염을 방지할 뿐만 아니라 제조 단가를 낮추는 효과가 있다. 상기 미강유 유래 비누분(soapstock)이라 함은, 미강유 정제 과정에서 발생하는 찌꺼기 부산물이다.

본 발명에 따른 미강유 유래 비누분(soapstock)으로부터 수득되는 애시드 오일(acid oil)은 유리지방산 (39-79%), 아실글리세롤 (18-30%), 색소 및 다른 친수성 물질로 구성되어 있어 바이오디젤 제조에 적합한 원료이다.

상기 (1)단계에서 애시드 오일은 미강유 유래 비누분과 함께 이소프로판올, 헥산, 황산 및 물을 첨가한 후 교반하여 제조할 수 있다.

- [0025] 보다 구체적으로, 상기 애시드 오일은 미강유 유래 비누분과 핵산을 임펠러믹서로 교반한 후, 황산 및 증류수를 넣은 후 반응물을 분별 깔때기에 옮기고 핵산을 추가한 다음 증류수로 3~4회 세척하여 상층의 pH가 5 이상이 되도록 한 후, 상기 핵산층을 무수 황산나트륨을 통과 시키면서 둥근 플라스크에 수집하고 진공회전 증발농축장치를 이용하여 핵산을 증발시켜 제조할 수 있다.
- [0026] 그러나 상기 애시드 오일 제조 방법은 이에 한정되는 것은 아니며, 상기 미강유 유래 비누분으로부터 애시드 오일을 제조하는 방법은 통상의 기술자라면 누구나 적용할 수 있는 기술을 활용할 수 있다.
- [0027] 상기 (2)단계는 바이오디젤이 수득되는 단계로, 상기 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올을 기질로 사용하여, 상기 기질에 효소를 첨가하여 에스테르화 반응을 진행시켜 바이오디젤을 수득할 수 있다.
- [0028] 상기 효소는 노보자임 435(Novozym 435), 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 및 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 사용할 수 있다.
- [0029] 바이오디젤을 최적으로 수득하기 위한 다양한 효소를 활성 스크리닝한 결과, 상기 3종의 효소는 다른 균주 유래의 효소(Lipase AYS-Candida rugosa 유래, Lipase PS-Pseudomonas fluorescence 유래)에 비하여 기본 조건에서 현저하게 높은 바이오디젤 수득을 보여, 본 발명에서는 상기 3종의 효소를 바이오디젤을 제조하기 위해 사용하는 효소로 선택하였다.
- [0030] 본 발명의 상기 (2)단계 에스테르화 반응은 회분식이거나 연속식일 수 있다.
- [0031] 효소를 이용하여 기질을 에스테르화하는 반응에 있어서, 사용되는 효소의 종류, 기질간의 물 비율, 반응온도 및 사용되는 효소량이 매우 중요한 인자로 작용한다.
- [0032] 상기 3종의 효소를 각각 단독으로 사용할 경우, 에스테르화 반응을 통하여 바이오디젤을 최적으로 수득하기 위한 반응 조건은 하기와 같다.
- [0033] 상기 노보자임 435(Novozym 435)를 단독으로 사용할 경우, 에스테르화 반응 조건은, 기질로 사용되는 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 물비는 1:4 내지 1:6이며, 바람직하게는 1:5이다. 상기 기질 간의 물 비율이 1:4 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 1:6을 초과하면 1:5인 경우와 뚜렷한 차이가 없어 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.
- [0034] 또한, 반응 온도는 20 내지 60℃인 것이 바람직하다. 반응 온도가 20℃미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 60℃를 초과하면 노보자임 435 효소가 변질될 우려가 있다.
- [0035] 또한, 상기 노보자임 435 효소는 상기 기질의 총 중량에 대하여 5 내지 15 중량%로 사용되는 것이 바람직하다. 상기 함량이 5 중량% 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 15 중량%를 초과하면 15 중량% 이하일 때와 뚜렷한 차이점을 보이지 못하므로 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.
- [0036] 상기 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM)을 단독으로 사용할 경우, 에스테르화 반응 조건은, 기질로 사용되는 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 물비는 1:2 내지 1:6이며, 바람직하게는 1:5이다. 상기 기질 간의 물 비율이 1:2 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 1:6을 초과하면 1:6인 경우와 뚜렷한 차이가 없어 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.
- [0037] 또한, 반응 온도는 10 내지 50℃인 것이 바람직하다. 반응 온도가 10℃미만 또는 50℃를 초과하면 바이오디젤의 수득율이 감소한다.
- [0038] 또한, 상기 리포자임 RM IM 효소는 상기 기질의 총 중량에 대하여 2.5 내지 15 중량%로 사용되는 것이 바람직하다. 상기 함량이 2.5 중량% 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 15 중량%를 초과하면 15 중량% 이하일 때와 뚜렷한 차이점을 보이지 못하므로 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.
- [0039] 상기 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)을 단독으로 사용할 경우, 에스테르화 반응 조건은, 기질로 사용되는 애시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 물비는 1:2 내지 1:6이며, 바람직하게는 1:5이다. 상기 기질 간의 물

비율이 1:2 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 1:6을 초과하면 1:6인 경우와 뚜렷한 차이가 없어 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.

[0040] 또한, 반응 온도는 10 내지 45℃인 것이 바람직하다. 반응 온도가 10℃ 미만 또는 45℃를 초과하면 바이오디젤의 수득율이 감소한다.

[0041] 또한, 상기 리포자임 TL IM 효소는 상기 기질의 총 중량에 대하여 10 내지 15 중량%로 사용되는 것이 바람직하다. 상기 함량이 10 중량% 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 15 중량%를 초과하면 15 중량% 이하일 때와 뚜렷한 차이점을 보이지 못하므로 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.

[0042] 상기 3종의 효소를 단독으로 사용할 경우의 기질 간의 물비, 반응 온도 및 효소의 사용량의 수치 범위가 본 발명의 권리 범위를 한정하는 것은 아니며, 본 발명의 균등 범위 내에 포함된다.

[0043] 본 발명에서 상기 (2)단계의 에스테르화 반응은 서로 상이한 효소를 사용하여 1차 에스테르화 반응 후 2차 에스테르화 반응을 진행하는 방식으로 진행할 수 있다.

[0044] 노보자임 435와 리포자임 RM IM 효소는 효소활성 및 잔존 활성도가 높아 효소를 이용한 촉매반응에 널리 사용될 수 있다. 그러나 두 효소 모두 고가이므로 상기 두 효소를 이용하여 바이오디젤을 상업적으로 생산할 경우, 원가상승의 요인이 될 수 있다. 따라서, 본 발명에서는 상기 두 효소에 비하여 최소 10배, 최대 20배 가량 가격이 낮은 리포자임 TL IM을 대체 효소로 사용하여 생산 비용을 절감하고, 실제 산업에서 적용 가능할 수 있도록 하고자 하였다.

[0045] 그에 따라, 본 발명에서는 상기 (2)단계에서 효소로 노보자임 435(Novozym 435) 및 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM)으로 이루어진 군으로부터 선택되는 1종 이상을 사용하여 1차 에스테르화 반응을 시키고, 상기 효소를 여과하여 제거하는 단계 및 효소로 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)을 첨가하여 2차 에스테르화 반응을 시키는 단계를 추가하는 바이오 디젤 제조 방법을 제공할 수 있다.

[0046] 즉, 서로 다른 두 가지 효소를 단계적으로 반응하여 반응 속도를 조절하고자 하였다.

[0047] 구체적으로, 효소 활성이 높은 노보자임 435 또는 리포자임 RM IM으로 비교적 짧은 시간(5, 15, 30, 60분) 동안 1차 에스테르화 반응을 진행한 후, 나머지 24시간까지 리포자임 TL IM을 이용하여 2차 에스테르화 반응을 진행시킨다.

[0048] 상기 1차 에스테르화 반응은 5 내지 60분 동안 반응하며, 바람직하게는 15분 동안 반응한다. 상기 1차 에스테르화 반응 시간이 5분 미만이면 반응 시간이 너무 짧아 초기 반응 속도가 저하될 우려가 있고, 60분을 초과하면 60분 이하인 경우와 큰 차이가 없고 고가의 효소를 장시간 사용하게 되어 경제성이 저하되는 문제점이 있다.

[0049] 상기 1차 에스테르화 반응에서 효소로 노보자임 435를 단독으로 사용할 경우, 기질로 사용되는 에시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 물비율은 1:4 내지 1:6이며, 반응 온도는 20 내지 60℃이고, 상기 기질 총 중량에 대하여 노보자임 435가 5 내지 15 중량%로 사용된다.

[0050] 상기 1차 에스테르화 반응에서 효소로 리포자임 RM IM을 단독으로 사용할 경우, 기질로 사용되는 에시드 오일 및 탄소수 1 내지 4의 알코올의 물비율은 1:2 내지 1:6이며, 반응 온도는 10 내지 50℃이고, 상기 기질 총 중량에 대하여 리포자임 RM IM이 2.5 내지 15 중량%로 사용된다.

[0051] 상기 1차 에스테르화 반응 후, 효소를 여과하여 제거하며, 리포자임 TL IM을 첨가하여 2차 에스테르화 반응을 진행시켜 바이오디젤을 제조한다. 이때 리포자임 TL IM의 사용조건은 단독 사용 때와 동일 또는 유사하다.

[0052] 상기 방법은 리포자임 TL IM을 단독으로 사용한 반응보다 초기 반응 속도가 빠르고, 최대 수율이 높은 장점이 있다. 상기 방법은 보다 짧은 시간 내에, 고가의 효소를 단독으로 사용한 반응과 유사한 최대 수율의 바이오디젤을 얻을 수 있다. 또한 고가의 효소를 짧은 시간 동안 사용하기 때문에 효소의 재사용 횟수를 증가시킬 수 있는 장점이 있다.

[0053] 또한, 본 발명은 상기 (2)단계에서, 상기 기질 및 효소를 연속식 반응기(packed-bed reactor, PBR)에서 반응시켜 바이오디젤을 제조하는 방법을 제공할 수 있다.

[0054] 기질 및 효소를 연속식 반응기에서 에스테르화 반응을 진행할 때의 조건으로, 기질로 사용되는 에시드 오일 및

탄소수 1 내지 4의 알코올의 몰비는 1:3 내지 1:6이며, 바람직하게는 1:5이다. 상기 기질 간의 물 비율이 1:3 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 1:6을 초과하면 1:6인 경우와 뚜렷한 차이가 없어 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.

[0055] 또한, 반응 온도가 0 내지 35℃인 것이 바람직하다. 반응 온도가 35℃를 초과하면 바이오디젤의 수득율이 감소한다.

[0056] 또한, 상기 에스테르화 반응은 수분이 추가된 환경에서 진행될 수 있는데 이때 수분의 함량은 상기 기질의 총 중량에 대하여 1 내지 6 중량%로 사용되는 것이 바람직하다. 상기 함량이 1 중량% 미만이면 바이오디젤의 수득율이 감소하고, 6 중량%를 초과하면 6 중량% 이하일 때와 뚜렷한 차이점을 보이지 못하므로 경제성이 낮아지는 문제점이 있다.

[0057] 상기 방법은 연속식 반응기를 사용하므로, 반응 주기마다 탄소수 1 내지 4의 알코올을 주입하여 글리세롤을 제거함으로써 상기 리포자임 TL IM 효소의 활성을 유지하고, 사용 기간을 연장시킬 수 있다.

[0058] 따라서, 상기 (2)단계에서 글리세롤을 제거하는 단계를 추가함으로써, 효소의 사용기한을 연장할 수 있다.

[0059] 또한, 상기 바이오디젤 제조 방법에서 사용되는 탄소수 1 내지 4의 알코올은 직쇄인 것이 바람직하며, 보다 바람직하게는 에탄올을 사용한다. 상기 알코올의 탄소수가 4를 초과하면 제조된 바이오디젤이 저온에서 겔 상태가 될 수 있다.

[0060] 이하, 본 발명을 구체적으로 설명하기 위하여 실시예를 들어 상세하게 설명하기로 한다. 다만, 하기 실시예는 본 발명을 예시하는 것일 뿐, 본 발명의 권리범위야 하기 실시예에 의해 한정되는 것은 아니다.

[0061] 제조예 1. 미강유 유래 비누분을 이용한 에시드 오일의 제조

[0062] 비커에서 비누분 100g과 이소프로판올 300mL, 헥산 300mL을 임펠러믹서로 교반한 후, 황산 10mL 및 증류수 10mL를 넣은 후 반응물을 분액 깔때기로 옮기고, 헥산 700mL를 추가한 다음 증류수 200mL로 3~4회 세척하여 상층의 pH가 5이상 되도록 한 후, 상기 헥산층을 무수 황산나트륨을 통과 시키면서 둥근 플라스크에 수집하고 회전 진공 증발기로 헥산을 증발시켜 에시드 오일을 제조하였다.

[0063] 실시예 1. 바이오디젤 제조에 최적화된 효소의 스크리닝

[0064] 고정화 리파아제의 종류에 따른 바이오디젤 함성량을 테스트 하기 위하여 기질로서 에시드 오일(1.80g, 6.52 mmol)과 99% 에탄올 수용액(1.20g, 26.09mmol)의 혼합물 3g을 25mL 스쿠르 캡 삼각 플라스크에 넣고, 리파아제 AYS(Lipase AYS), 리파아제 PS(Lipase PS), 노보자임 435(Novozym 435), 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 및 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 0.3 g(10 중량%)을 각각 첨가하여 반응 온도 30℃에서 300rpm의 속도로 교반하였다. 반응을 시작하여 정해진 시간마다 샘플을 채취하여 가스크로마토그래피로 분석하고 에탄올을 질소로 증발시켜 산가를 측정하였다.

[0065] 시료 분석

[0066] 반응 후 합성된 바이오디젤(지방산 에스테르)과 남아있는 지방산, 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 트리글리세라이드는 일정 간격으로 채취된 샘플에서 20 μL을 1mL 클로로포름에 녹여 가스크로마토그래피 (Model 3800; Varian, Palo Alto, CA, USA)로 분석되었다. 검출기로는 Flame ionization detector (FID)를 사용하였고, 컬럼은 fused silica capillary column (DB-1ht, 15 m X 0.25 mm i.d. X 0.15 μm film thickness, J&W Scientific, Folsom, CA, USA)를 사용하였다. 샘플 1 μL가 split mode (split ratio 50:1)로 autosampler를 통해 주입되었고, 컬럼의 온도는 120℃에서 3분간 유지된 후 20℃/min의 속도로 370℃까지 올라간 후 370℃에서 5분간 유지되도록 프로그래밍 되었다. 운반 가스로는 헬륨을 사용하여 1.5mL/min으로 흘려주었다. 주입부와 검출기는 모두 370℃에서 유지되었다.

- [0067] 산가 측정은 AOCS Cde 3d-63 방법에 의해 수행되었다.
- [0068] 상기 방법으로 측정한 결과, 리파아제 AYS(Lipase AYS) 및 리파아제 PS(Lipase PS) 효소는 바이오디젤의 수율이 약 20% 이하로 나타난 반면, 노보자임 435(Novozym 435), 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 및 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM) 효소는 바이오디젤의 수율이 80% 이상으로 나타났다(도 1).
- [0069] 따라서, 노보자임 435(Novozym 435), 리포자임 RM IM(Lipozyme RM IM) 및 리포자임 TL IM(Lipozyme TL IM)의 3가지 효소가 바이오디젤을 제조할 수 있는 적합한 효소로 판단되어 상기 3가지 효소를 사용하여 바이오디젤을 제조하고, 수율을 측정하였다.
- [0070] **실시예 2. 바이오디젤 제조시 기질간 몰비율의 최적화**
- [0071] 기질간 몰비율에 따른 바이오디젤 합성량을 테스트하기 위하여 기질로서 제조예 1에서 제조한 애시드 오일과 99% 에탄올 수용액의 혼합물 3g을 몰비율 범위 1:2에서 1:6까지로 하여, 25mL 스쿠르 캡 삼각 플라스크에 넣고, 노보자임 435, 리포자임 RM IM, 리포자임 TL IM 0.15g(5 중량%)과 함께 반응온도 30℃에서 300rpm의 속도로 교반하였다. 반응을 시작하여 정해진 시간마다 샘플을 채취하여 가스크로마토그래피로 분석하고 에탄올을 질소로 날려 산가를 측정하였다.
- [0072] 반응 후 합성된 바이오디젤 (지방산 에스테르)과 남아있는 지방산, 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 트리글리세라이드 및 산가 측정은 상기 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.
- [0073] 상기 노보자임 435 효소는 애시드 오일 및 에탄올의 몰비가 1:4 내지 1:6에서 바이오 디젤 수득 최적 조건을 보였으며(도 2), 상기 리포자임 RM IM 및 리포자임 TL IM 효소는 애시드 오일 및 에탄올의 몰비가 1:2 내지 1:6에서 바이오디젤 수득 최적 조건을 보였다(도 3 및 도 4).
- [0074] **실시예 3. 바이오디젤 제조시 온도의 최적화**
- [0075] 온도에 따른 바이오디젤 합성량을 테스트하기 위하여 기질로서 제조예 1에서 제조한 애시드 오일(1.64g, 5.94 mmols)과 99% 에탄올 수용액(1.36g, 29.57 mmols)의 혼합물 3g을 25mL 스쿠르 캡 삼각 플라스크에 넣고, 노보자임 435, 리포자임 RM IM, 리포자임 TL IM 0.15g(5 중량%)과 함께 300rpm의 속도로 교반하였다. 반응 온도는 10에서 60℃범위로 10℃ 간격으로 실시하였다. 반응을 시작하여 정해진 시간마다 샘플을 채취하여 가스크로마토그래피로 분석하고 에탄올을 질소로 날려 산가를 측정하였다.
- [0076] 반응 후 합성된 바이오디젤(지방산 에스테르)과 남아있는 지방산, 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 트리글리세라이드 및 산가측정은 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.
- [0077] 상기 노보자임 435 효소는 20 내지 60℃의 온도에서 바이오 디젤 수득 최적 조건을 보였으며(도 5), 상기 리포자임 RM IM 효소는 10 내지 50℃의 온도에서 바이오 디젤 수득 최적 조건을 보였으며(도 6), 리포자임 TL IM 효소는 10 내지 45℃의 온도에서 바이오 디젤 수득 최적 조건을 보였다(도 7).
- [0078] **실시예 4. 바이오디젤 제조시 효소량의 최적화**
- [0079] 효소량에 따른 바이오디젤 합성량을 테스트 하기 위하여 기질로서 제조예 1에서 제조한 애시드 오일(1.64g, 5.94 mmols)과 99% 에탄올 수용액 (1.36g, 29.57 mmols)의 혼합물 3g을 25mL 스쿠르 캡 삼각 플라스크에 넣고, 노보자임 435, 리포자임 RM IM, 리포자임 TL IM 0.15g(5 중량%)과 함께 300rpm의 속도로 교반하였다. 반응 온도는 노보자임 435의 경우, 40℃에서, 리포자임 RM IM과 리포자임 TL IM은 30℃에서 실시하였다. 효소량의 범위는 0.075g(2.5 중량%), 0.15g(5중량%), 0.3g(10 중량%), 0.45g(15 중량%) 이었다. 반응을 시작하여 정해진 시간마다 샘플을 채취하여 가스크로마토그래피로 분석하고 에탄올을 질소로 날려 산가를 측정하였다.
- [0080] 반응 후 합성된 바이오디젤(지방산 에스테르)과 남아있는 지방산, 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 트리글리세라이드 및 산가측정은 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.
- [0081] 상기 노보자임 435 효소는 5 내지 15 중량%에서 바이오 디젤 수득 최적 조건을 보였으며(도 8), 상기 리포자임

RM IM 효소는 2.5 내지 15 중량%에서 바이오 디젤 수득 최적 조건을 보였으며(도 9), 리포자임 TL IM 효소는 10 내지 15 중량%에서 바이오 디젤 수득 최적 조건을 보였다(도 10).

실시예 5. 두 가지 효소를 이용한 2단계 에스테르화 반응을 통한 바이오디젤 합성

두 단계 에스테르화를 통한 바이오디젤 합성량을 테스트하기 위하여 기질로서 제조예 1에서 제조한 애시드 오일 (1.64g, 5.94 mmols)과 99% 에탄올 수용액 (1.36g, 29.57 mmols)의 혼합물 3g을 25mL 스쿠르 캡 삼각 플라스크에 넣고, 1단계에서는 노보자임 435 또는 리포자임 RM IM을, 2단계에서는 1단계에서 사용한 효소를 0.45 μ L 나일론 마이크로 필터를 통해 여과하여 제거한 후, 리포자임 TL IM을 넣고, 300rpm의 속도로 교반하였다. 각 효소 종류에 따른 반응온도와 효소량은 노보자임 435의 경우 40℃에서 0.3g(10 중량%), 리포자임 RM IM의 경우 30℃에서 0.15g (5 중량%), 리포자임 TL IM의 경우 30℃에서 0.3 g (10 중량%) 이었다. 반응을 시작하여 정해진 시간마다 샘플을 채취하여 가스크로마토그래피로 분석하고 에탄올을 질소로 날려 산가를 측정하였다.

반응 후 합성된 바이오디젤(지방산 에스테르)과 남아있는 지방산, 모노글리세라이드, 다이글리세라이드, 트리글리세라이드 및 산가측정은 실시예 1과 동일한 방법으로 측정하였다.

상기 측정 결과에서, 노보자임 435, 리포자임 RM IM 및 리포자임 TL IM을 각각 단독으로 사용하여 한번의 에스테르화 반응을 진행하여 바이오디젤을 제조하였을 때보다, 두 번의 에스테르화 반응을 진행하여 바이오디젤을 제조하였을 때 더 짧은 시간에 더욱 높은 수득율을 보였다(도 11 및 도 12).

실시예 6. 연속식 반응기를 이용한 바이오디젤 제조

리포아제를 촉매로 사용한 애시드 오일과 에탄올의 에스테르 반응을 작은 규모의 연속식 반응기 (Packed-bed reactor, PBR) 에서 수행하였다 (도 13). 반응물을 전자식 실린지 펌프(Model 200; KD Scientific, New Hope, Pa., U.S.A.) 에 의해 특정한 속도로 주입하였다. 반응을 시작하기 전에 체류 시간 3분의 속도 (350 μ L/분)로 기질을 5 회분 통과시켜 주었으며, 반응 시작 후 각각의 생성물은 3 회분씩만큼 통과한 후 얻었다.

시료분석

10, 20, 30 분, 1, 2, 4, 8시간 동안의 반응을 각각 수행한 후 에스테르 반응결과를 분석하였다. 반응 후 생성물 10 μ L을 클로로포름 1 mL에 녹여 가스크로마토그래피 (Model 3800; Varian, Palo Alto, CA, USA)로 분석하였다. 컬럼은 DB-1ht column (15 m $\times$ 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 사용하였고, 검출기는 불꽃 이온화 검출기를 사용하였다. 컬럼의 온도는 120℃에서 3분간 유지하고 20℃/min 의 속도로 370℃까지 올라간 후 370℃에서 3분간 유지되도록 프로그래밍 되었다. 운반 가스로는 헬륨을 사용하여 1.5 mL/min으로 흘려주었다. 주입부와 검출기는 모두 370℃에서 유지되었다.

산가 측정은 AOCS Cd 3d-63 방법에 의해 수행되었다.

기질의 수분함량은 Karl-Fisher moisture analyzer (Model 870 KF Titrino plus; Metrohm AG; Herisau, Switzerland) 에 의해 측정되었다.

실시예 7. 연속식 반응기를 사용한 바이오디젤 제조시 수분 함량의 최적화

실시예 6의 방법에 따른 연속식 에스테르화 반응을 수행하였다. 수분 함량에 따른 바이오디젤 합성량을 테스트하기 위하여 기질로서 제조예 1에서 제조한 애시드 오일과 99% 에탄올 수용액을 1:5의 물비로 혼합한 혼합물을 리포자임 TL IM 0.5g이 담지된 연속식 반응기에 주입하여 30℃에서 반응하였다. 또한, 수분은 기질 중량 대비 1 내지 6중량%로 하여 각각 측정하였다.

상기 반응에서 수분 함량이 증가함에 따라 반응 속도 및 바이오디젤의 최대 수율이 증가하였다. 그러나 수분 함량 4 중량% 이상에서는 반응 속도와 최대 수율에서 큰 차이를 보이지 않았다. 따라서, 최적 수분 함량은 4 중량%이며, 이때의 바이오디젤 수율은 90% 이었다(도 15).

실시예 8. 연속식 반응기를 사용한 바이오디젤 제조시 반응 온도의 최적화

실시예 6의 방법에 따른 연속식 에스테르화 반응을 수행하였다. 반응 온도에 따른 바이오디젤 합성량을 테스트하기 위하여 기질로서 제조예 1에서 제조한 애시드 오일과 99% 에탄올 수용액을 1:5의 물비로 혼합한 혼합물을 리포자임 TL IM 0.5g 이 담지된 연속식 반응기에 주입하여 각각 0 내지 30℃에서 반응하였다. 이때 수분은 기질 대비 4 중량%이다.

반응 온도 10 내지 30℃에서 반응 속도와 바이오디젤 수율은 거의 비슷하였다. 또한, 반응 온도 0℃의 경우도 초기 반응속도만 약간 느릴 뿐 최대 바이오디젤 수율은 큰 차이를 보이지 않았다.

산가수분해(Acidolysis)나 에스테르 교환반응(interesterification)에서 리포자임 TL IM이 높은 온도에 저항성을 보이는 것과 달리, 에탄올이 존재하는 조건에서 온도가 증가함에 따라 효소의 활성이 급격히 감소함을 확인할 수 있었다. 에너지 경제성과 효소 변성 영향을 고려하여 상온인 20℃를 최적 온도로 선정하였다(도 16).

실시예 9. 연속식 반응기를 사용한 바이오디젤 제조시 기질간의 물 비율의 최적화

실시예 6의 방법에 따른 연속식 에스테르화 반응을 수행하였다. 기질간 물비율에 따른 바이오디젤 합성량을 테스트하기 위하여 기질로서 제조예 1에서 제조한 애시드 오일과 99% 에탄올 수용액의 혼합물 3g을 물비율 범위 1:3에서 1:6까지로 변화시키면서, 리포자임 TL IM 0.5g이 담지된 연속식 반응기에 주입하였다. 이때 수분은 기질 대비 4중량%이고, 온도는 20℃였다.

물 비율 1:4 내지 1:6의 경우, 반응 속도와 바이오디젤 수율에 있어서 큰 차이를 보이지 않았다. 하지만, 물 비율 1:3의 경우, 반응시간 30분 이후 더 이상 바이오디젤 수율이 증가하지 않았고, 낮은 수준의 바이오디젤 수율로 평형에 도달한 것을 확인할 수 있었다. 따라서, 반응의 최적 물 비율은 1:4로 선정하였으며, 이 때의 최대 수율은 93%이었다(도 17).

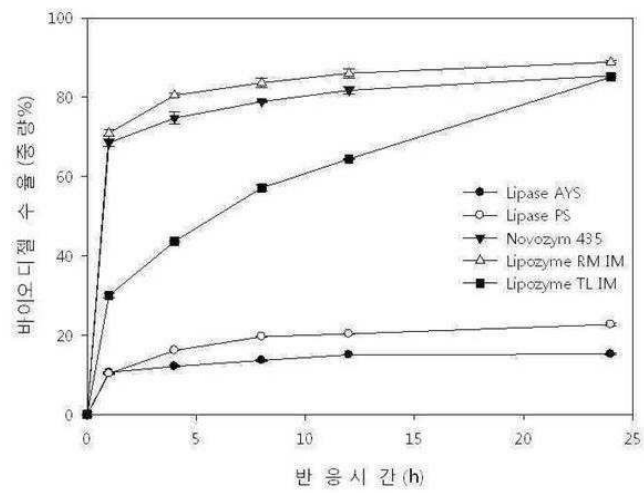
실시예 10. 연속식 반응기를 사용한 바이오디젤 제조 최적 조건에서 효소의 활성도 측정

상기 실시예 7 내지 9에서 측정한 최적 조건(수분 함량 4 중량%, 반응 온도 20℃, 애시드 오일과 에탄올의 물비율 1:4, 체류시간 4시간)에서 바이오디젤 수율로부터 효소의 활성도를 측정하였다. 글리세롤이 효소의 활성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 반응하는 내내 글리세롤을 제거하지 않는 반응기(도 13)와 일정 간격마다 반응 중에 생성된 글리세롤을 제거하는 반응기(도 14)로 나누어 반응 횟수에 따른 바이오디젤의 수율을 비교하였다. 글리세롤을 제거하기 위한 용매로는 에탄올이 사용되었으며, 반응 12회분 마다 10mL 의 에탄올을 통과시켜 주었다.

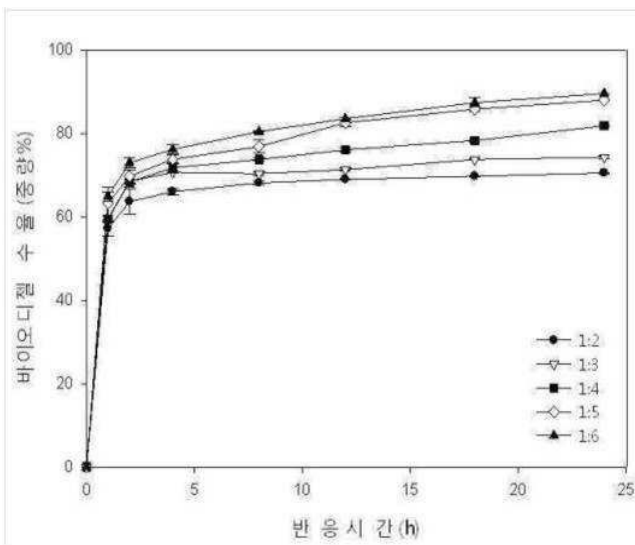
에탄올을 주입하지 않은 결과(도 18 a곡선), 반응이 반복됨에 따라 바이오디젤 수율이 꾸준히 감소하였다. 특히 19회분 까지는 80% 이상의 수율을 보였으나 그 이후 급격히 감소하여 49 회분에는 34 %의 수율이었다. 에탄올을 주입하는 결과 (도 18 b곡선), 반응이 반복됨에 따라 바이오디젤 수율이 서서히 감소하였다. 따라서, 친수성 레진을 갖고 있는 리포자임 TL IM으로부터 반응 시 생성되는 글리세롤을 제거하는 것이 효소의 활성을 유지하고 사용기간을 연장시키는데 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

도면

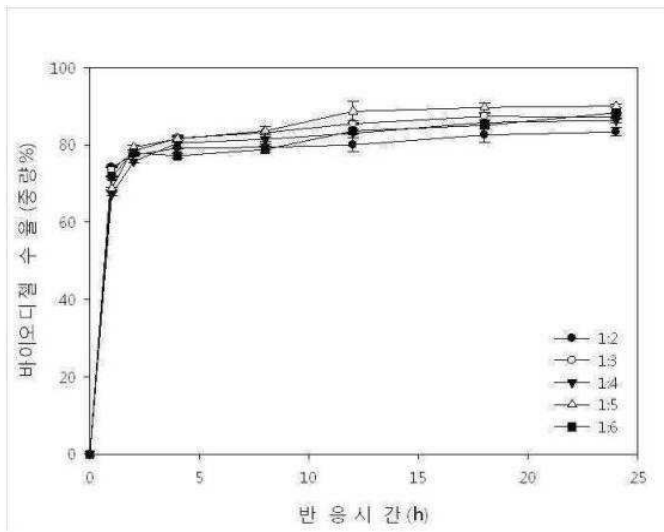
도면1



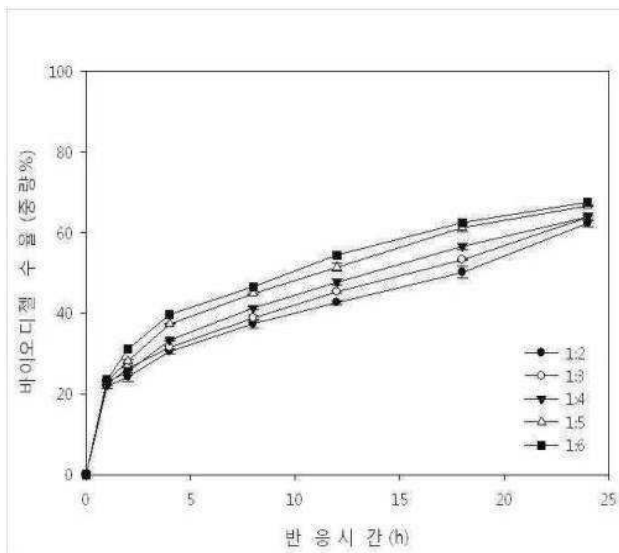
도면2



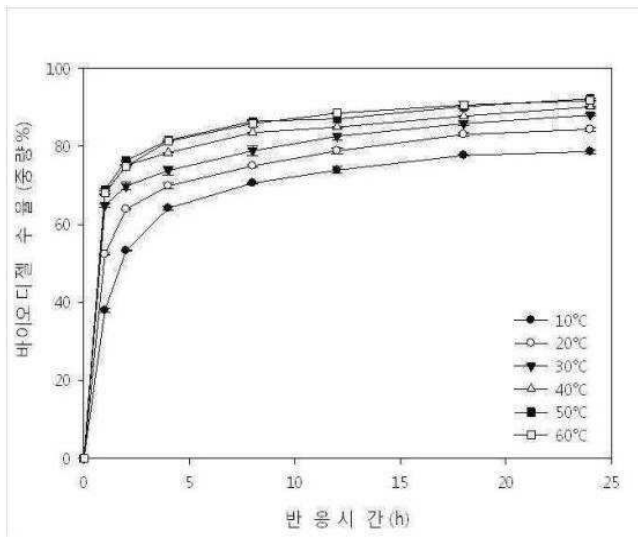
도면3



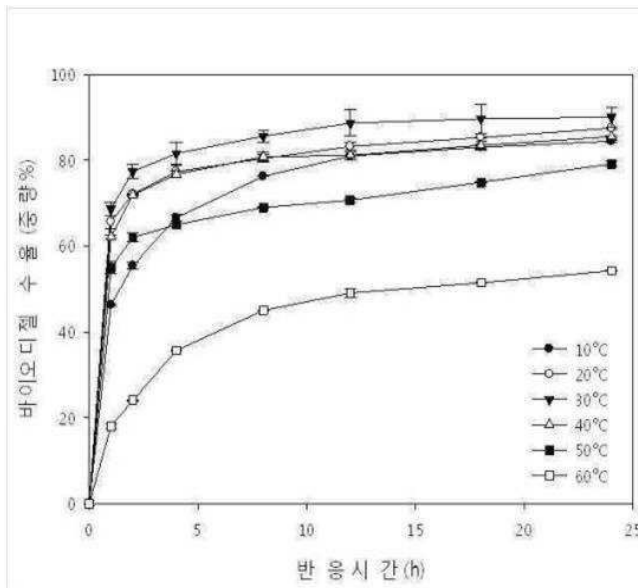
도면4



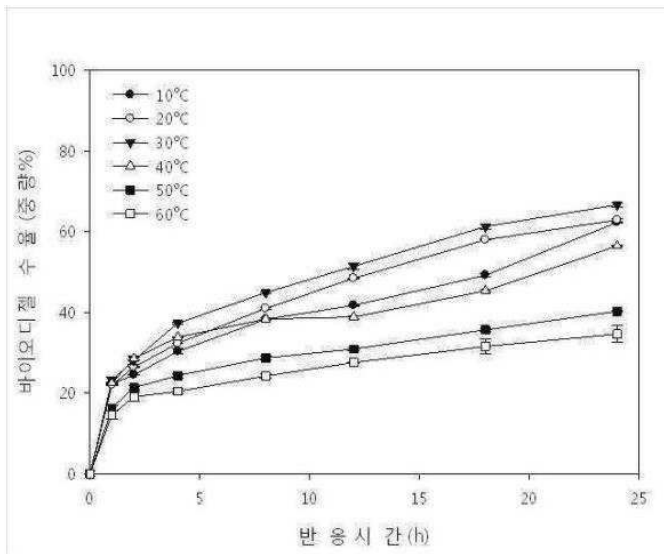
도면5



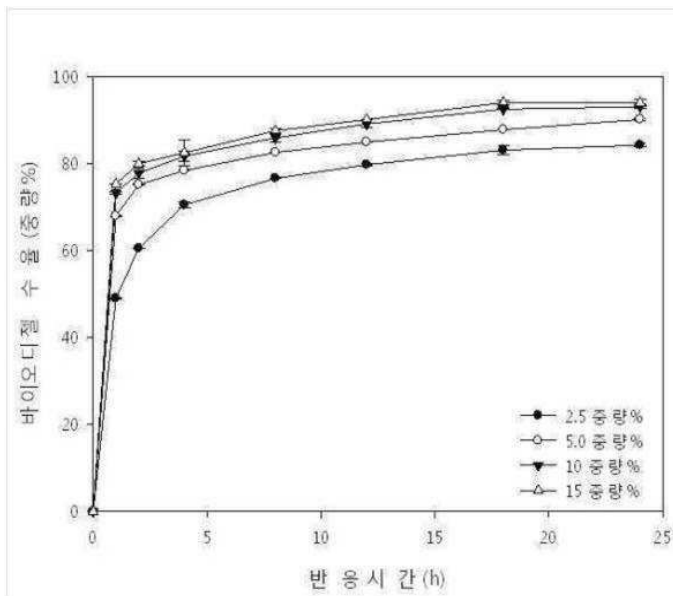
도면6



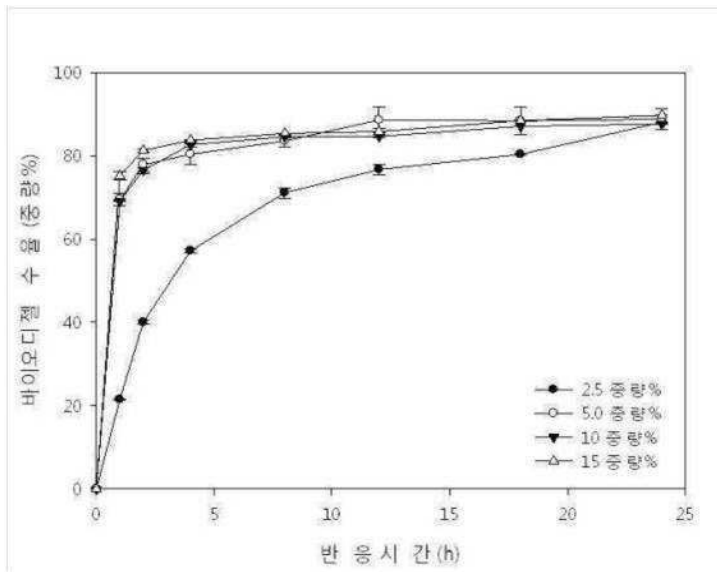
도면7



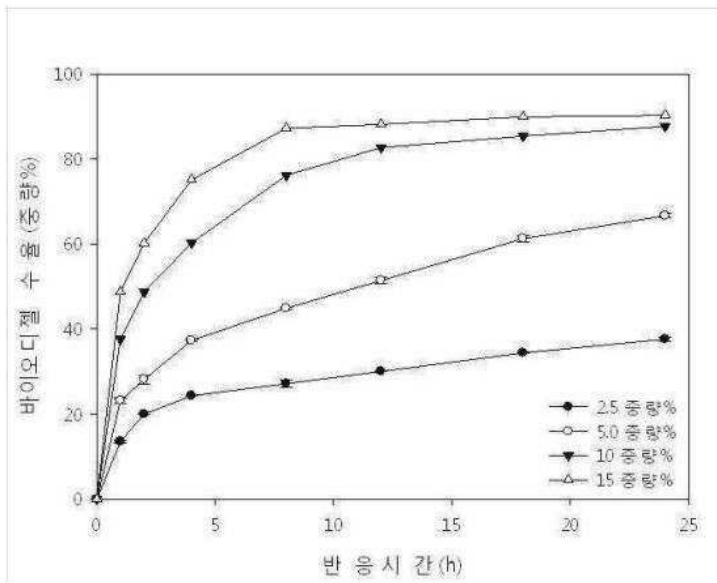
도면8



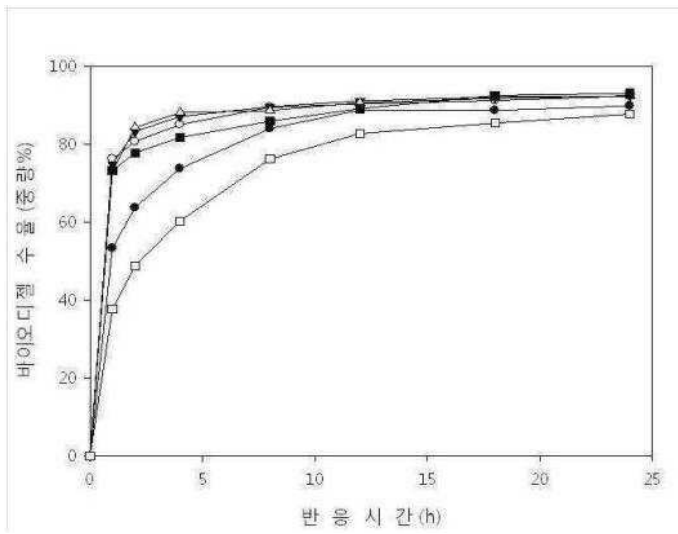
도면9



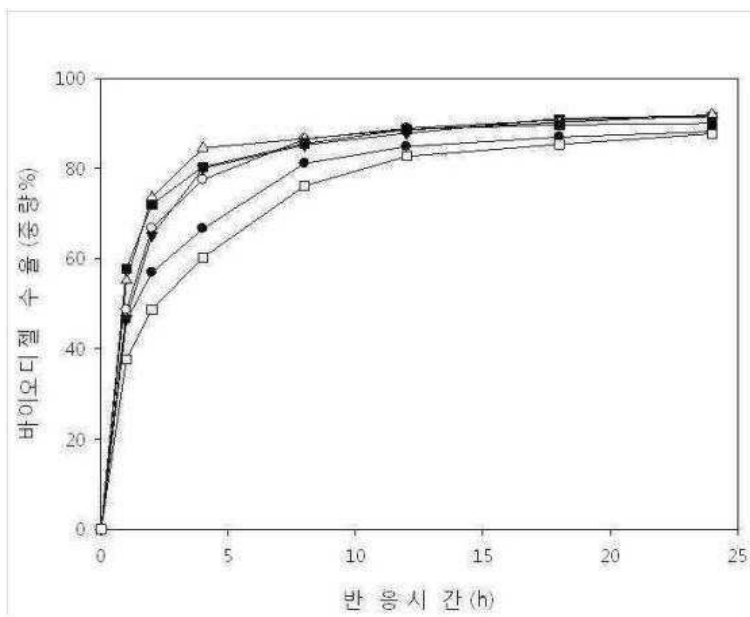
도면10



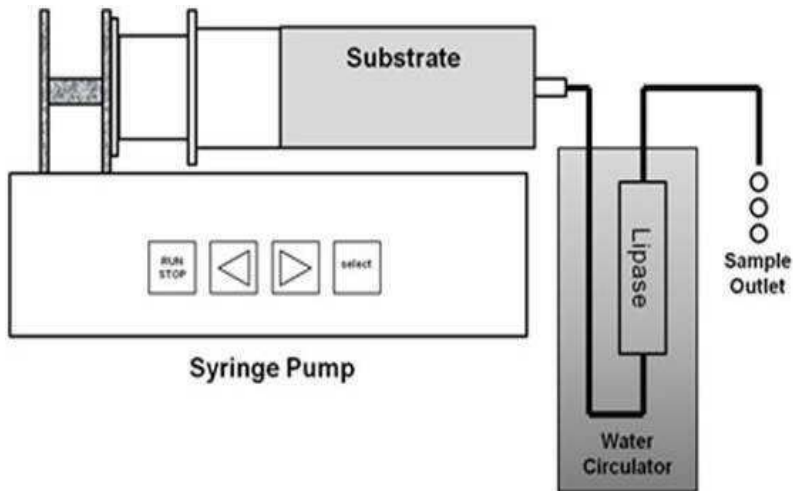
도면11



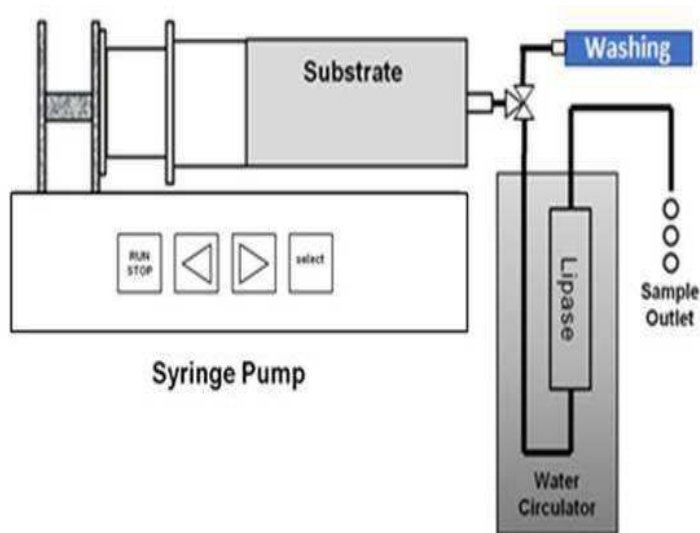
도면12



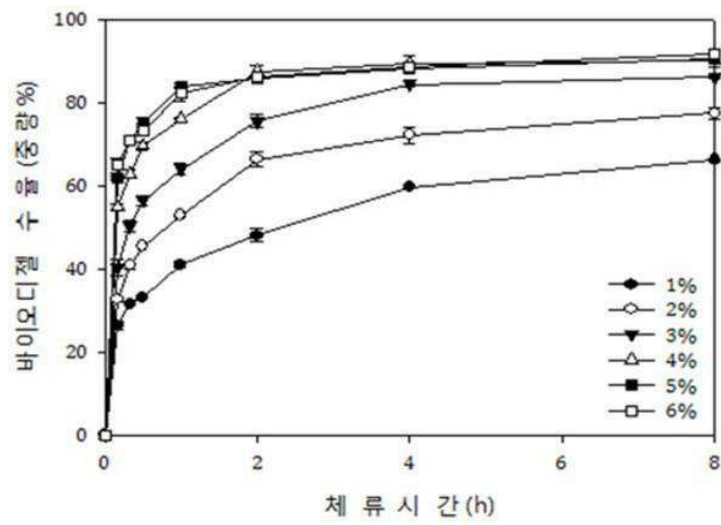
도면13



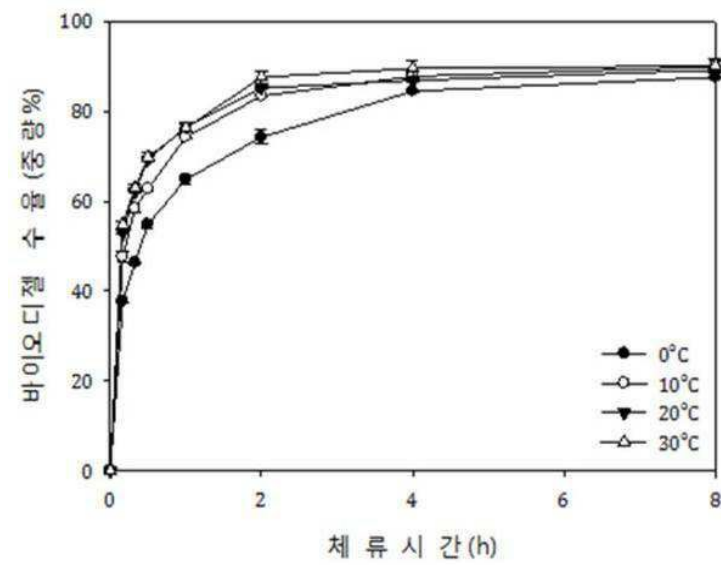
도면14



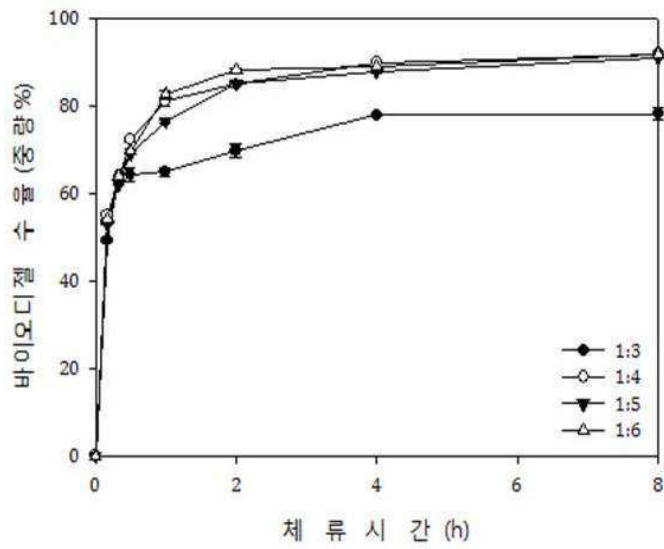
도면15



도면16



도면17



도면18

