



(19) 대한민국특허청(KR)  
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2016-0019349

(43) 공개일자 2016년02월19일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)  
C12P 7/06 (2006.01) C12P 7/16 (2006.01)  
C12P 7/64 (2006.01)

(52) CPC특허분류  
C12P 7/06 (2013.01)  
C12P 7/16 (2013.01)

(21) 출원번호 10-2015-0057399

(22) 출원일자 2015년04월23일

심사청구일자 2015년04월23일

(30) 우선권주장  
1020140103903 2014년08월11일 대한민국(KR)

(71) 출원인

고려대학교 산학협력단

서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)

(72) 발명자

김인환

서울특별시 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호(하계동, 우방아파트)

최나경

서울특별시 마포구 도화길 28, 112동 1601호(도화동, 삼성아파트)

노다습

서울특별시 서초구 바우피로 91, 111동 1102호(양재동, 우성아파트)

(74) 대리인

특허법인다나

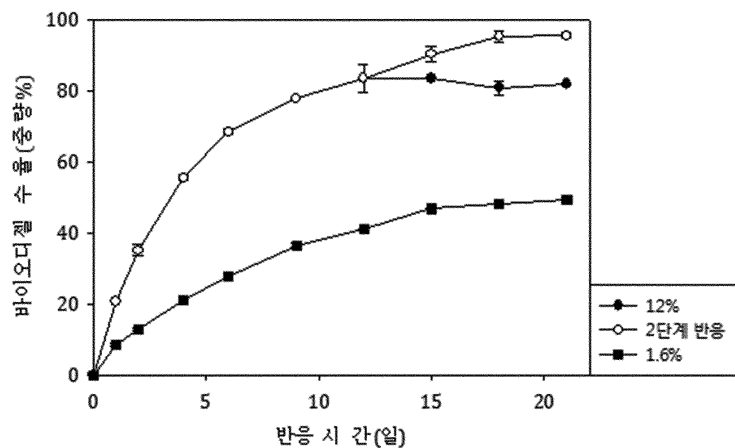
전체 청구항 수 : 총 14 항

(54) 발명의 명칭 미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법

(57) 요약

본 발명은 벼의 정미 과정에서 부산물로서 얻게 되는 미강을 활용한 바이오디젤의 생산 방법을 제공한다. 본 발명은 자체적으로 유지와 리파아제를 함유하고 있는 미강에 알코올을 가하여 바이오디젤을 생산하는 방법, 및 바이오디젤의 생산 수율을 높이기 위한 바이오디젤의 합성에서의 최적의 조건들을 제시한다. 또한, 탈지 미강에 유지 및 알코올을 가하여 바이오디젤을 생산하는 방법을 제시한다. 본 발명은 벼의 정미 과정에서 부산물로서 얻게 되는 미강 또는 미강유를 얻고난 후 버려지는 탈지박, 즉 탈지 미강을 활용하여 매우 간단한 방법으로 바이오디젤의 생산을 가능하게 하므로, 바이오디젤의 생산 방법을 단순화시키고 생산 비용을 절감하여 바이오디젤의 보급화에 이바지할 수 있다.

대표도 - 도7



(52) CPC특허분류  
**C12P 7/649** (2013.01)

---

## 명세서

### 청구범위

#### 청구항 1

미강에 알코올을 분산하고, 반응기 내에서 상기 미강과 알코올의 혼합물을 정치시켜 바이오디젤을 합성하고, 합성된 바이오디젤을 분리하는 것을 포함하는 미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

#### 청구항 2

제1항에 있어서,  
상기 생산 방법은,  
상기 바이오디젤 분리 후 얻은 미강에 유지를 첨가하고 알코올을 분산한 후, 반응기 내에서 이를 정치시켜 바이오디젤을 합성하고, 합성된 바이오디젤을 분리하는 과정을 추가로 포함하며,  
상기 과정은 1회 내지 10회 반복가능한 것인  
미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

#### 청구항 3

제1항에 있어서,  
상기 미강이 탈지 미강인 경우,  
탈지 미강에 유지를 첨가하고 알코올을 분산한 후, 이들 혼합물을 정치시켜 바이오디젤을 합성하고, 합성된 바이오디젤을 분리하는 것을 포함하는  
미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

#### 청구항 4

제2항에 있어서,  
상기 생산 방법은,  
상기 바이오디젤 분리 후 얻은 미강에 유지를 첨가하고 알코올을 분산한 후, 반응기 내에서 이를 정치시켜 바이오디젤을 합성하고, 합성된 바이오디젤을 분리하는 과정을 추가로 포함하며,  
상기 과정은 1회 내지 10회 반복가능한 것인  
미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

#### 청구항 5

제1항에 있어서,  
상기 미강은 0 내지 200의 산가를 갖는 것인  
미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

**청구항 6**

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유지는 식물성 유지, 동물성 유지, 조류유(algae oil), 오일 생성능이 있는 미생물 유래 오일, 유지 증류 지방산 (Oil distillate fatty acid), 폐유 또는 에시드 오일(Acid oil)인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

**청구항 7**

제2항 내지 제4항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 유지는 유지와 미강을 합한 전체 중량의 5 내지 25%의 비율로 첨가되는 것인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

**청구항 8**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 알코올은 메탄올, 에탄올 또는 부탄올인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

**청구항 9**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 알코올은 미강 100 중량부를 기준으로 0.1 내지 10 중량부로 분산되는 것인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

**청구항 10**

제2항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이오디젤의 합성은 유지:알코올의 몰비가 1:1 내지 1:3인 조건에서 수행되는 것인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

**청구항 11**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 바이오디젤의 합성은 20 내지 70℃에서 이루어지는 것인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

**청구항 12**

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 미강은 5 내지 25%의 수분 함량을 갖고 있는 것인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

### 청구항 13

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 생산 방법은 상기 바이오디젤의 합성 후 얻어진 반응물로부터 바이오디젤을 분리하고, 잔사에서 수분 및 알코올을 제거한 후 다시 알코올을 분산하고, 반응기 내에서 이를 정치시켜 바이오디젤을 합성하는 과정을 추가로 포함하는 것인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

### 청구항 14

제1항에 있어서,

상기 바이오디젤의 합성은 용매 중에서 수행되는 것인

미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법.

## 발명의 설명

### 기술 분야

[0001] 본 발명은 벼의 정미 과정에서 부산물로서 얻게 되는 미강을 활용한 바이오디젤의 생산 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, 황산화물과 같은 온실가스 배출량이 적은 장점이 있다.

[0003] 바이오디젤은 식물성 유지나 동물성 지방에 함유된 긴 사슬 지방산과 짧은 사슬 알코올의 모노 알킬 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 및 글리세롤을 회수하기 어려운 단점이 있다. 반면, 효소 촉매를 이용할 경우, 효소가 고가라는 단점이 있으나, 촉매와 반응 생산물을 분리하기 쉽고, 부가적인 처리공정이 필요 없으며, 반응 부산물인 글리세롤의 회수가 용이하다는 장점이 있다. 또한, 효소 반응은 비교적 온화한 조건에서 일어나므로 추가적인 에너지 사용이 적으며, 비누형성을 방지하여 바이오디젤 수율을 증가시킬 수 있다는 장점이 있다.

[0004] 한편, 쌀은 밀, 옥수수과 함께 세계 3대 작물로서, 정미과정에서 제거되는 미강은 현미 중량의 약 10%에 달한다. 미강에는 식물성 스테롤, 토코페롤, 토코트리엔놀, 감마오리자놀, 불검화물 등이 함유되어 있으며, 미강은 이러한 유용성분 또는 미강유의 추출을 위해 활용되고 있다. 또한, 탈지 미강은 동물 사료로 이용될 수 있는 하나 대부분 폐기 처리되고 있는 실정이다. 미강은 리파아제의 가수분해 활성이 높아 정미과정에서 미강유의 가수분해가 쉽게 일어나므로, 다른 식물 유지와 비교하여 미강유의 산가가 높다. 이러한 이유로 가수분해를 유발하는 미강에 함유된 리파아제의 활성을 억제하는 방법이 많이 연구되어 왔다. 그러나 현재까지 미강에 함유된 리파아제를 효율적으로 이용하고자 하는 시도는 전무한 상태이다.

### 발명의 내용

## 해결하려는 과제

[0005] 본 발명은 정미과정에서 생산되는 부산물인 미강을 활용한 바이오디젤의 생산 방법을 제공하고자 한다.

## 과제의 해결 수단

[0006] 효소를 이용하여 바이오디젤을 생산하는 방법에서는 유지, 알코올, 그리고 이들을 반응시키는 리파아제의 사용을 필수로 한다. 그러나, 리파아제는 구입 또는 합성하여 사용하여야 하고, 이를 담체에 고정시켜 사용하고 사용 후 분리 및 회수 하여야 하는 등 복잡한 공정을 야기하므로 바이오디젤의 생산 단가를 높이는 요인이 되고 있다.

[0007] 본 발명자들은 리파아제와 이를 이용한 바이오디젤의 합성에 대한 연구를 수행하던 중 정미과정에서 부산물로 얻게 되는 미강에 함유된 미강 리파아제를 활용하는 방안에 관심을 갖게 되었다. 그런데, 본 발명자들은, 놀랍게도, 미강으로부터 미강 리파아제를 분리하는 과정 없이, 미강에 자체적으로 포함되어 있는 유지와 미강 리파아제를 활용하게 되면 여기에 단순히 알코올만을 추가하여 바이오디젤 합성 반응을 유도함으로써 바이오디젤을 높은 수율로 생산할 수 있음을 밝혔다.

[0008] 이하, 본 발명을 보다 구체적으로 설명한다.

[0009] 본 발명은

[0010] 미강에 알코올을 분산하고, 반응기 내에서 상기 미강을 정치시켜 바이오디젤을 합성하고, 합성된 바이오디젤을 분리하는 것을 포함하는 미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법을 제공한다.

[0011] 본 발명에 따른 바이오디젤의 생산 방법은 놀라울 만큼 간단하다. 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명은 미강에 알코올을 분산하고 이를 반응기 내에서 정치시키는 것만으로도 바이오디젤이 생산된다는 사실을 보여준다. 즉, 본 발명은 미강에 자체적으로 포함되어 있는 유지와 미강 리파아제를 활용함으로써 일반적인 효소를 이용한 바이오디젤의 생산 방법에서 필수적으로 요구되는 유지의 공급 및 리파아제의 첨가 단계를 단순화시켰다. 미강 내 리파아제를 분리하지 않고 그대로 활용함으로써 효소적 반응 시스템의 문제점으로 지적되는 효소 고정화 및 분리 단계도 필요하지 않다. 이러한 방법은 기존의 화학적 또는 효소적 반응 시스템과 구별되는 방법으로서, 별도의 복잡한 공정이 필요하지 않으므로, 바이오디젤을 경제적으로 합성할 수 있게 된다.

[0012] 본 발명에 있어서, 알코올을 분산시킨 미강을 반응기 내에 정치시킨다고 함은 그대로 두어도 바이오디젤 합성 반응, 즉 지방산 알킬에스테르의 생성이 진행됨을 의미한다. 본 발명에 따른 바이오디젤 합성 반응은 통상의 바이오디젤의 합성 공정에서 사용되는 별도의 교반 공정을 필수로 요하지 않는다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 반응기는 바이오디젤이 합성될 수 있는 반응의 공간을 제공하는 것이면 족하며, 기질의 투입부와 바이오디젤의 배출부 정도의 기본적 구성만 갖추면 될 뿐, 특별한 장치를 구비하지 않아도 무방하다. 다만, 미강에 알코올을 골고루 분산시키기 위한 분산 장비 또는 교반 장비를 갖추는 것이 바람직할 수 있으나, 알코올의 분산 후 바이오디젤의 합성 반응이 진행되는 동안에는 별도의 교반이 필수적인 것은 아니다.

[0013] 본 발명에 따른 미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법은 합성된 바이오디젤을 분리하는 과정을 포함한다. 본 발명의 방법에 있어서, 바이오디젤의 합성은 지방산 알킬 에스테르의 생성을 의미한다. 미강 내 유지를 반응 기질로서 사용하는 경우 바이오디젤, 즉 지방산 알킬 에스테르는 미강 내에 축적되게 된다. 따라서, 지방산 알킬 에스테르의 합성이 종료된 미강으로부터 이러한 지방산 알킬 에스테르를 예컨대, 통상의 유기 용매를 이용하여 추출함으로써 최종적으로 바이오디젤을 얻을 수 있게 된다. 탈지 미강을 이용하는 경우에는 반응 기질로서 추가의 유지를 첨가하여 사용하므로, 이 경우 바이오디젤은 탈지 미강 및/또는 첨가된 유지를 비롯한 반응물 내에 포함되어 있는 상태가 되며, 이로부터 바이오디젤을 추출 및/또는 정제함으로써 최종적으로 바이오디젤을 얻을 수 있게 된다. 바이오디젤의 분리 후 얻게 되는 미강은 2단계 합성 공정 또는 별도의 바이오디젤 생산 공장에서 재사용할 수 있다. 상기 추출에 사용할 수 있는 유기 용매는 유지의 추출에 사용되는 통상의 유기 용매를 이용할 수 있으며, 예를 들어 헥산, 터셔리 부탄올, 아이소프로필 알코올, 아이소옥탄, 클로로포름, 디에틸에테르, 석유에테르 등을 사용할 수 있다. 추출되는 기름의 조성 및 양은 용매의 극성도에 따라 달라질 수 있는데, 극성도가 큰 용매일수록 극성 지질 성분의 추출이 증가한다. 바이오디젤 추출에 있어서 불필요한 극성 지질 성분의 증가는 바이오디젤 순도를 감소시키는 요인이 될 수 있다. 이를 고려할 때, 바이오디젤의 추출에 가장 바람직한 용매는 예컨대, 헥산일 수 있다.

- [0014] 본 발명에 따른 미강을 이용한 바이오디젤의 생산 방법은, 바이오디젤의 분리 후 얻은 미강을 재활용하여 수행될 수 있다. 미강 내 유지는 바이오디젤의 1차 합성 과정에서 소진되겠지만, 미강 리파아제는 효소 활성이 계속적으로 유지된 상태로 미강 내에 존재한다. 하기 실시예에서 볼 수 있는 바와 같이, 바이오디젤의 합성에 사용된 미강은 약 10회까지 반복사용하더라도 리파아제의 역할을 유효하게 수행할 수 있다.
- [0015] 따라서, 본 발명의 한 구체예에서,
- [0016] 상기 생산 방법은,
- [0017] 상기 바이오디젤 분리 후 얻은 미강에 유지를 첨가하고 알코올을 분산한 후, 반응기 내에서 이를 정치시켜 바이오디젤을 합성하고, 합성된 바이오디젤을 분리하는 과정을 추가로 포함하며, 상기 과정은 1회 내지 10회 반복가능하다.
- [0018] 미강 리파아제의 반복적인 사용가능성을 고려할 때, 본 발명에 따른 바이오디젤의 합성을 위한 미강으로서 미강 유를 얻고 버려지게 되는 탈지 미강을 사용하는 것도 고려해 볼 수 있다.
- [0019] 이에 본 발명자들은 탈지 미강 내 리파아제를 활용하되, 탈지 미강에서 부족하게 된 유지를 추가하는 방법을 착안하였다.
- [0020] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 미강이 탈지 미강인 경우, 본 발명에 따른 생산 방법은
- [0021] 탈지 미강에 유지를 첨가하고 알코올을 분산한 후, 이들 혼합물을 정치시켜 바이오디젤을 합성하고,
- [0022] 합성된 바이오디젤을 분리하는 것을 포함하여 수행된다.
- [0023] 탈지 미강 역시 반복사용하더라도 리파아제로서의 기능을 수행할 수 있다. 따라서, 본 발명에 따른 바이오디젤의 생산 방법의 일 구체예에서는 탈지 미강을 이용한 바이오디젤을 합성, 분리 후 얻은 탈지 미강에 다시 유지를 첨가하고 알코올을 분산한 후, 반응기 내에서 이를 정치시켜 바이오디젤을 합성하고, 합성된 바이오디젤을 분리하는 과정을 추가로 포함하며, 상기 과정은 1회 내지 10회 반복가능하다.
- [0024] 본 발명의 다른 구체예에서, 미강은 0 내지 200, 예컨대 0 내지 100의 산가를 가질 수 있다. 미강은 정미공정에서 시간에 따라 급격히 산가가 증진하게 되므로 저가의 미강을 공급받게 되면 대개 산가가 높은 것일 수 있다. 산가가 높아지면 바이오디젤의 생산 수율이 다소 떨어지긴 하나, 하기 실시예에서 확인할 수 있는 바와 같이, 본 발명에 따른 미강으로부터의 바이오디젤의 생산을 구현하기에는 특별한 문제가 없다. 따라서, 본 발명에서 사용되는 미강의 산가는 특별히 제한되지 않는다.
- [0025] 바이오디젤의 1차 합성을 거쳐 재사용되는 미강 또는 탈지 미강에 추가로 첨가되는 유지의 종류는 특별히 제한되지 않으며, 일반적으로 바이오디젤의 생산을 위해 사용될 수 있는 것으로 알려진 것이면 어떠한 것이든 사용가능하다. 예를 들어, 상기 유지는 식물성 유지, 동물성 유지, 조류유(algae oil), 오일 생성능이 있는 미생물 유래 오일, 유지 증류 지방산 (Oil distillate fatty acid), 폐유 또는 에시드 오일(Acid oil) 등 일 수 있다. 식물성 유지의 예로는 이에 제한되는 것은 아니나, 대두유, 팜유, 코코넛유, 유채유, 카놀라유, 해바라기유, 미강유 등이 포함되며, 동물성 유지의 예로는 이에 제한되는 것은 아니나, 어류, 조류, 포유류 등으로부터 유래한 오일일 수 있다. 유지 공급을 위해 사용될 수 있는 조류로는 해양 미세조류, 착편모조류, 담수산 미세조류 등이 있으며, 구체적인 예로 나노클로롭시스(*Nannochloropsis* sp.), 아이소크라이시스 (*Isochrysis* sp.), 세네데스머스(*Scenedesmus* sp.), 클로렐라(*Chlorella* sp.) 등이 포함된다. 또한, 오일 생성능이 있는 미생물로는 예를 들면, *Aeromonas* 속 미생물, *Achromobacter* 속 미생물, *Acidovorax delafieldii*, *Acidovax facilis*, *Acinetobacter* 속 미생물, *Actinomyces* 속 미생물, *Aeromonas* 속 미생물, *Alcaligenes* 속 미생물, *Alteromonas* 속 미생물, *Althornia* 속 미생물, *Aplanochytrium* 속 미생물, *Aspergillus* 속 미생물, *Amoebobacter* 속 미생물, *Aphanocapa* sp., *Aphanothece* sp. *Aquaspirillum autotrophicum*, *Azorhizobium caulinodans*, *Azospirillum* sp., *Azospirillum* 속 미생물, *Azotobacter* 속 미생물, *Bacillus* 속 미생물, *Beggiatoa* 속 미생물, *Beijerinckia* 속 미생물, *Beneckea* 속 미생물, *Blakeslea* 속 미생물, *Bordetella pertussis*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Caryophamon latum*, *Caulobacter* 속 미생물, *Chlorogloea* 속 미생물, *Chromatium* 속 미생물, *Chromobacterium* 속 미생물, *Clostridium* 속 미생물, *Comamonas* 속 미생물, *Corynebacterium* 속 미생물, *Cryptocodium* 속 미생물, *Cyanobacteria* 속 미생물, *Derxia* 속 미생물, *Desulfonema* 속 미생물, *Desulfosacina variabilis*, *Desulfovibrio sapovorans*, *Ectothiorhodospira* 속 미생물, *Elina* 속 미생물, *Entomophthora* 속 미생물, *Ferrobacillus ferroxidans*, *Flavobacterium* sp., *Haemophilus influenzae*, *Halobacterium* 속 미생물, *Haloferax mediterranei*, *Hydroclathratus clathratus*, *Hydrogenomonas facilis*,

*Hydrogenophaga* 속 미생물, *Hyphomicrobium* 속 미생물, *Ilyobacter delafieldii*, *Japonochytrium* 속 미생물, *Labrys monachus*, *Lamprocystis reseopersicina*, *Lampropedia hyalina*, *Legionella* sp., *Leptothrix discophorus*, *Methylobacterium* 속 미생물, *Methylosinus* 속 미생물, *Micrococcus* 속 미생물, *Mortierella* 속 미생물, *Mycobacterium* 속 미생물, *Nitrobacter* 속 미생물, *Nocardia* 속 미생물, *Paracoccus dentrificans*, *Oscillatoria limosa*, *Penicillium cyclopium*, *Photobacterium* 속 미생물, *Physarum ploycephalum*, *Phycomyces* 속 미생물, *Pseudomonas* 속 미생물, *Pythium* 속 미생물, *Ralstonia* 속 미생물, *Rhizobium* 속 미생물, *Rhodobacillus* 속 미생물, *Rhodobacter* 속 미생물, *Rhodococcus* 속 미생물, *Rhodocyclus* 속 미생물, *Rhodomicrobium vannielii*, *Rhodopseudomonas* 속 미생물, *Rhodospirillum* 속 미생물, *Schizochytrium* 속 미생물, *Sphingomonas paucimobilis*, *Spirillum* 속 미생물, *Spirulina* 속 미생물, *Staphylococcus* 속 미생물, *Stella* 속 미생물, *Streptomyces* 속 미생물, *Syntrophomonas wolfei*, *Thermophilic cyanobacteria*, *Thermus thermophilus*, *Thiobacillus A2*, *Thiobacillus* 속 미생물, *Thiocapsa* 속 미생물, *Thraustochytrium* 속 미생물, *Thiocystis violacea*, *Vibrio parahaemolyticus*, *Xanthobacter autotrophicus*, *Xanthomonas maltophilia*, *Zoogloea* 속 미생물 및 오일 생성능을 가지는 효소를 코딩하는 유전자로 형질전환된 미생물 등을 들 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다. 증류 지방산은 모든 기름에서 나올 수 있으므로 유지 증류 지방산 (oil disillate fatty acid)은 유지의 정제 과정에서 발생하는 부산물로서 모든 유래의 유지로부터 발생할 수 있으며, 예를 들어 팜유 지방산을 들 수 있다. 한편, 애시드 오일(Acid oil) 란, 유지 정제 과정 중 탈산 과정에서 발생하는 비누분(Soapstock) 이라는 부산물로부터 산처리하여(Acidification) 추출한 유지를 말한다. 이러한 애시드 오일의 예로는 미강유의 정제 과정에서 얻을 수 있는 미강 유래의 애시드오일이 있다.

[0026] 이에 제한되는 것은 아니나, 바이오디젤의 수율을 고려할 때 상기 유지는 유지와 미강을 합한 전체 중량의 5 내지 25%의 비율로 추가되는 것이 바람직하다.

[0027] 본 발명의 바이오디젤 생산 방법에 있어서, 바이오디젤의 합성은 사용되는 미강의 상태(탈지 여부, 산가 등), 알코올의 종류, 반응온도, 유지: 알코올의 몰비, 등과 같은 다양한 조건에 따라 그 수율이 변경될 수 있다. 특정 조건하에서 바이오디젤의 합성이 수행될 경우 바이오디젤의 생산 수율이 향상되나, 생산 수율은 경제성을 얻기 위해 사용자가 임의의 컷오프 값을 선택할 수 있는 것이므로, 아래에서 설명하는 특정 조건이 본 발명의 특징을 제한하는 것으로 해석되어서는 안 된다. 어떠한 조건을 선택하더라도 본 발명의 바이오디젤 생산 방법은 위에서 설명한 간단한 과정으로 바이오디젤을 생산할 수 있게 된다.

[0028] 본 발명에 있어서, 바이오디젤의 생산을 위해 미강에 분산시키는 알코올은 바이오디젤의 생산에 사용될 수 있는 것이라면 어떠한 것이든 사용가능하다. 바람직하게는 미강에 분산시키는 알코올로서 짧은 사슬 알코올, 즉 C1-6의 저급 알코올, 특히, C1-4 알코올, 예컨대, 메탄올, 에탄올, 이소프로필, 부탄올 등을 사용할 수 있다. 예를 들어, 메탄올을 알코올로서 사용하는 경우, 메탄올이 트리글리세리드로부터 글리세롤을 분리시켜 유리 지방산으로 분해하고 미강 내 리파아제가 이러한 유리 지방산의 에스테르화를 일으켜 바이오디젤로서 지방산 메틸 에스테르가 생성된다. 마찬가지로, 에탄올을 알코올로서 사용하는 경우, 바이오디젤로서 지방산 에틸 에스테르가 생성된다.

[0029] 본 발명의 한 구체예에서, 미강에 분산시키는 알코올은 메탄올일 수 있다. 일반적으로 바이오디젤의 합성에 사용되는 알코올은 사슬의 길이가 긴 것이 유리한 것으로 여겨지나, 하기 실시예에서는 유지와의 반응을 위해 가장 적합한 알코올이 메탄올임을 보여준다.

[0030] 바이오디젤의 합성 시 필요한 알코올의 양은 리파아제나 유지의 양과 상관관계가 있다. 따라서, 본 발명에 있어서, 미강에 분산시키는 알코올의 양은 미강 내 존재하는 리파아제의 양을 고려하여, 미강 내 유지의 양 또는 재활용 미강이나 탈지 미강에 추가되는 유지의 양에 따라 적절히 조절될 필요가 있다.

[0031] 일반 미강을 사용하는 경우에는 미강 내 리파아제와 유지의 양이 고정적이므로 미강 대 알코올의 양만을 적절히 조절하면 된다. 반대로, 재활용 미강이나 탈지 미강을 사용하는 경우에는 미강 내 리파아제의 양은 고정적이나 유지의 양이 달라질 수 있으므로, 첨가하는 유지의 양과 알코올의 양을 적절히 조절할 필요가 있다. 예를 들어, 미강에 첨가하는 유지의 양을 늘리면 합성되는 바이오디젤의 절대량은 늘어날 수 있으나, 합성에 소요되는 시간은 늘어날 수 있으므로, 비용과 시간을 고려한 적절한 양과 비율의 선택이 필요하다.

[0032] 또한, 본 발명에서 알코올은 미강의 가수분해를 억제하는 한편 바이오디젤의 합성에 있어서 에스테르 반응에 관여한다. 미강 리파아제의 활성을 억제하지 않는 적절한 알코올의 양을 고려하면, 이에 제한되는 것은 아니나, 알코올은 미강 100 중량부를 기준으로 0.1 내지 100 중량부로 분산되는 것이 바람직할 수 있다.

- [0033] 하기 실시예에서는, 미강과 여기에 첨가되는 유지의 중량의 합을 기준으로 10%, 15%, 20%, 25%의 유지를 추가할 경우, 유지:알코올의 물비에 따라 바이오디젤의 합성 수율이 어떻게 변화하는지를 분석한 결과를 보여준다.
- [0034] 유지 첨가량이 미강 및 유지의 전체 중량의 10% 내지 25%인 범위 내에서 유지:알코올의 물비를 1:1 내지 1:3 내에서 조절하면 최적의 수율을 얻을 수 있는 유지의 첨가량과 유지:알코올의 물비를 결정할 수 있다.
- [0035] 본 발명의 또 다른 구체예에서, 바이오디젤의 합성은 유지:알코올의 물비가 1:1 내지 1:3인 조건에서 수행될 수 있다. 유지와 알코올의 물비는 기질간의 충분한 반응과 높은 반응 수율을 얻기 위해 상기 범위인 것이 바람직한 것으로 나타났다. 별도의 표시가 없더라도, 본 명세서에 따른 유지:알코올의 물비는 유지 중 지방산을 기준으로 나타낸 것이다. 즉, 본 명세서에 있어서 유지:알코올의 물비는 지방산:알코올의 물비를 의미한다. 바람직한 구체예에서, 유지:알코올의 물비는 1:1.5 내지 1:2.5일 수 있다.
- [0036] 본 발명의 다른 구체예에서, 바이오디젤의 합성은 20 내지 70℃, 예를 들어, 20 내지 50℃, 30 내지 60℃ 등에서 이루어질 수 있다. 하기 실시예에서는 바이오디젤의 생산 수율을 높일 수 있는 온도 범위는 20 내지 70℃이며, 이 중에서도 약 40℃에 최적의 수율을 나타냄을 보여준다. 위 온도 범위 내라면 항온 또는 변온 조건 모두 무방할 것이다. 실제 산업화되는 경우의 편의성을 고려할 때 상기 온도는 20 내지 50℃가 바람직할 것이다.
- [0037] 본 발명의 다른 구체예에서, 바이오디젤의 합성에 사용되는 미강은 5 내지 25%의 수분 함량을 갖고 있을 수 있다. 바람직하게는 미강은 10 내지 15%의 수분 함량을 갖고 있을 수 있다. 미강 내 수분은 산가(Acid value)와 관련되며 수분이 높을수록 산가가 높아진다. 본 발명의 방법에서는 산가가 높은 미강을 사용하더라도 바이오디젤을 생산할 수 있으나, 생산 수율을 높이기 위해서는 상기 범위 내의 수분 함량을 갖고 있어 적절 산가를 나타내는 미강을 사용하는 것이 바람직할 수 있다.
- [0038] 본 발명에 따른 미강으로부터의 바이오디젤의 생산 방법은 2단계 합성 공정을 통해 수율을 최대화시킬 수 있다. 바이오디젤의 수율을 향상시키기 위하여, 반응물에 추가의 기질을 공급하고 반응 수율을 최대한으로 이끌어 내는 것을 특징으로 한다. 예를 들어, 본 발명의 바이오디젤 생산 방법은 바이오디젤의 합성 후 얻어진 반응물로부터 바이오디젤을 추출하고, 잔사에서 수분 및 알코올을 제거한 후 다시 알코올을 분산하고, 반응기 내에서 이를 정치시켜 바이오디젤을 합성하는 것을 추가로 포함할 수 있다. 이러한 과정은 미강으로부터의 바이오디젤의 생산 수율을 최대 96중량%까지도 이끌어 낼 수 있다.
- [0039] 본 발명에 따른 미강으로부터의 바이오디젤의 생산 방법에 있어서 바이오디젤의 합성은 또한 용매 중에서 수행될 수 있다. 이러한 용매계 합성 방법에서 사용하는 용매는 반응에는 참여하지 않으며, 매질(medium)으로 사용되는 것으로서 통상의 용매계 합성 방법에서 사용하는 용매를 사용할 수 있으며, 이에 제한되는 것은 아니나, 예를 들어 헥산, 터셔리 부탄올, 아이소프로필 알코올, 아이소옥탄, 클로로포름, 디에틸에테르, 석유에테르 등을 이용할 수 있다. 본 발명에 따른 바이오디젤의 합성을 용매 중에서 수행할 경우 용매계에서 바이오디젤을 합성함과 동시에 합성된 바이오디젤을 추출할 수 있게 되므로 생산 공정을 보다 단순화시킬 수 있다는 점에서 바람직할 수 있다.
- [0040] 본 발명의 한 구체예에서, 상기 바이오디젤의 합성 과정은 약 7일 내지 약 21일 동안 수행될 수 있다. 합성에 소요되는 시간 또한 수율과 관계되는 것으로서 사용자가 임의로 조절할 수 있다. 약 9일 내지 약 15일의 범위 내에서는 높은 생산 수율을 얻을 수 있으므로 보다 바람직할 수 있다.

### 발명의 효과

- [0041] 본 발명은 자체적으로 유지와 효소를 함유하고 있는 미강에 알코올을 가하여 바이오디젤을 생산하는 방법, 및 바이오디젤의 생산 수율을 높이기 위한 바이오디젤의 합성에서의 최적의 조건들을 제시한다. 본 발명은 버의 정미 과정에서 부산물로서 얻게 되는 미강 또는 미강유를 얻고 난 후 버려지는 탈지박, 즉 탈지 미강을 활용하여 매우 간단한 방법으로 바이오디젤의 생산을 가능하게 하므로, 바이오디젤의 생산 방법을 단순화시키고 생산 비용을 절감하여 바이오디젤의 보급화에 이바지할 수 있다.

### 도면의 간단한 설명

- [0042] 도 1은 열처리 시간에 따라 미강의 가수분해가 저해되는 양상을 보여주는 그래프이다.

- 도 2는 열 처리 시간에 따른 미강을 이용한 바이오디젤의 합성 수율을 보여주는 그래프이다.
- 도 3은 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 있어서 알코올의 종류에 따른 바이오디젤의 합성 수율을 나타낸 것이다.
- 도 4는 미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 반응 온도가 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 보여준다.
- 도 5는 미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 기질 간의 물 비율이 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 6은 미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 미강 내 수분 함량이 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 나타낸다.
- 도 7은 수분 조절을 이용한 2단계 합성이 미강을 이용한 바이오디젤의 합성 수율을 향상시킬 수 있음을 보여주는 그래프이다.
- 도 8은 고산가 미강을 이용하더라도 본 발명에 따른 미강을 이용한 바이오디젤의 합성이 이루어짐을 보여주는 그래프이다.
- 도 9는 탈지에 사용되는 용매의 종류가 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다.
- 도 10은 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성 중 첨가되는 유지의 종류에 따른 바이오디젤의 합성 수율을 나타낸다.
- 도 11은 탈지 미강에 첨가하는 대두유의 함량과 그에 따른 메탄올의 물 비율이 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 나타낸다.
- 도 12는 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성 중 15 % 유지 함량에서 기질 간의 물 비율이 바이오디젤 수율에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 13은 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성 중 반응 온도가 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 14는 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성 중 미강 내 수분함량이 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 나타낸 것이다.
- 도 15는 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성 최적 조건에서 반응 횟수에 따른 바이오디젤 수율을 나타낸 그래프로 처리군은 반응 중에 생성되는 글리세롤을 제거해 준 경우이고, 대조군은 글리세롤 제거가 없는 경우이다.
- 도 16은 용매계에서 미강을 촉매로 한 바이오디젤 합성 수율을 보여주는 그래프이다.

## 발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

### 재료

본 연구에서 사용된 미강은 국내산 벼 (품종명: 보람찬, 자포니카 벼)를 정미하는 과정에서 얻은 미강을 원료로 하였다. 미강은 30 mesh 크기의 체를 이용하여 왕겨, 배아, 쌀레기 및 기타 불순물을 제거하여 사용하였으며, 이 때 미강의 평균 수분 함량과 유지 함량은 각각 12%와 15%이었다. 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 사용된 유지로는 식물성 유지 (대두유, 카놀라유), 동물성 유지 (라드), 팜유, 팜유 지방산(탈취 증류물), 폐 식용유 (M 햄버거사 감자튀김 폐유), 애시드 오일 (Acid oil) 등이었다. 준비된 미강 및 탈지 미강은 -85 °C 초저온 냉동고에 보관하여 사용하였다. 내부표준물질로 사용한 트리카프린 (tricaprin)은 시그마 알드리치 (서울, 한국) 회사에서 구입하였다. 이외의 언급되지 않은 다른 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다.

### 추출 및 분석 방법

미강 내 유지 성분을 헥산을 이용하여 추출하는 과정은 다음과 같다. 250mL 비커에 4 g의 기질과 헥산 60 mL를 넣고 1시간 동안 300rpm의 속도로 교반하였다. 그리고 헥산층을 여과를 통하여 분리하였다. 이상의 과정은 4회 반복하여 추출이 실시되었다. 유지 성분이 함유된 헥산층은 250 mL 등근 플라스크에 옮긴 후 60 °C에서 회전 진공 증발기를 통해 제거하고, 고 진공을 통해 잔존하는 헥산을 완전히 제거하였다.

[0047] 추출된 유지 성분 40mg 정도를 5mL 정용 부피 플라스크에 정확히 칭량한 후 0.5 mg 트리카프린의 내부 표준물질과 함께 가스크로마토그래피 (Model 3800; Varian, Palo Alto, CA, USA)로 정량 분석을 실시하였다. 컬럼은 DB-1ht column (15 m × 0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA, USA)을 사용하였고, 검출기는 불꽃 이온화 검출기를 사용하였다. 컬럼의 온도는 120 °C에서 3분간 유지하고 25 °C/min 의 속도로 370 °C까지 올라간 후 370 °C에서 5분간 유지되도록 프로그래밍 되었다. 운반 가스로는 헬륨을 사용하여 1.5 mL/min으로 흘려주었다. 주입부와 검출기는 모두 370 °C에서 유지되었다.

[0048] 추출된 유지 성분의 산가 (Acid value)는 AOCS Cd 3d-63 방법에 의해 측정되었다.

[0049] 합성된 바이오디젤의 수율은 추출된 유지 중의 지방산 알킬 에스터의 퍼센트(중량 기준)를 나타낸다.

#### [0050] 실시예 1: 미강을 이용한 바이오디젤 합성

[0051] 정미 직후의 신선한 미강 (초기 산가=0)을 이용하여 매개변수로 반응 온도, 몰 비율, 미강 내 수분함량을 선정하고, 반응시간에 따른 바이오디젤의 수율을 조사하여 각 매개변수의 최적 반응 조건을 조사하였다.

[0052] 본 실시예에서 사용된 미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 과정은 다음과 같다. 먼저, 1L 폴리프로필렌 병에 100 g의 미강과, 미강 내 함유한 유지(지방산)를 기준으로 한 특정 몰 비율의 알코올을 첨가하였다. 그 후 이를 5분간 격렬하게 흔들어 알코올을 미강에 고루 분산시켰다. 알코올이 고루 분산된 미강 4 g을 15mL 폴리프로필렌 병에 옮겨 알코올이 날아가지 않도록 밀봉하여 특정 온도의 항온에서 반응을 실시하여 바이오디젤을 합성하였다.

#### [0053] 실험예 1: 미강 내 자가 효소에 의한 바이오디젤의 합성 확인

[0054] 실시예 1에 따른 미강을 이용한 바이오디젤의 합성이 미강 내 자가 효소 즉 미강 리파아제에 의한 반응인지 여부를 확인하기 위해 미생물 살균에 사용되는 멸균기 (Autoclave)를 이용한 열처리를 통하여 가수분해 반응과 바이오디젤 수율을 조사하였다. 효소의 활성 저해 정도를 확인하기 위해 미강은 내열 유리병 (Media bottle)에 담아 밀봉하여 열처리 시간을 달리하여 멸균기 (Autoclave) (121 °C)에서 0분, 15분, 30분, 60분간 열처리 되었다. 그리고 열처리 시간에 따른 미강 효소 (미강 리파아제)의 가수분해 활성 저해 효과를 확인하기 위해 서로 다른 시간 동안 열처리를 거친 미강 4g을 15mL 폴리프로필렌 병에 담아 밀봉하여 항온기에서 반응을 실시하였다. 또한, 열처리 시간에 따른 미강 리파아제의 에스테르 반응 활성, 즉 바이오디젤 합성 반응 저해 효과를 확인하기 위해 서로 다른 시간 동안 열처리를 수행한 미강에 일정량의 메탄올을 가하여 바이오디젤 합성 반응 즉 에스테르 반응을 실시하였고, 그 반응 과정은 다음과 같다. 먼저, 폴리프로필렌 병에 미강과 미강 내 함유한 유지(지방산)의 양을 기준으로 2몰의 메탄올을 넣었다. 그 후 뚜껑을 닫아 봉한 후 5분간 격렬하게 혼합하여 메탄올이 미강에 고루 분산되도록 하였다. 메탄올이 고루 분산된 기질 4g을 15mL 폴리프로필렌 병에 옮겨 메탄올이 날아가지 않도록 뚜껑을 닫아 밀봉하였다. 이상의 과정을 거쳐 만들어진 시료는 일정 온도로 유지되는 항온기에서 반응을 실시하여 바이오디젤을 합성하였다. 이 때의 반응 온도는 40 °C이었으며, 미강 내 수분함량은 12% 이었다.

#### [0055] (1) 열처리 시간에 따른 효소의 가수분해 및 에스테르 반응 활성 변화

[0056] 미강을 멸균기 (Autoclave)에서 15분, 30분, 60분 동안 고압 열처리한 결과, 미강 내 효소의 가수분해 및 에스테르 반응의 활성이 모두 저해되었다.

#### [0057] (2) 열처리 시간에 따른 미강의 가수분해 저해

[0058] 도 1은 열처리 시간에 따라 미강의 가수분해가 저해되는 양상을 보여주는 그래프이다. 가수분해 반응의 경우, 고압 열처리처리를 하지 않은 미강을 15일 동안 40 °C 에서 저장한 후 핵산으로 추출된 유지 (대조군)의 산가가 110인 반면에 15분, 30분, 60분 고압 열처리한 미강의 경우, 동일 조건에서 저장한 후 핵산을 통하여 추출된 유지의 산가는 각각 28, 30, 9 이었다.

[0059]

### (3) 열처리 시간에 따른 미강의 바이오디젤 수율

[0060]

도 2는 열 처리 시간에 따른 미강을 이용한 바이오디젤의 합성 수율을 보여주는 그래프이다. 바이오디젤 합성에 관여하는 에스테르 반응의 경우, 멸균기 (Autoclave)를 통해 열처리를 하지 않은 원료 미강을 이용 반응을 실시한 결과, 12 일째 83 중량%의 바이오디젤 수율을 얻었다. 반면, 15분, 30분, 60분 동안 열처리한 경우, 34, 35, 12 중량% 의 수율을 얻었다. 따라서, 15분 또는 30분 동안 열처리를 한 경우, 미강 내 바이오디젤 합성에 관여하는 효소의 활성이 비슷한 수준으로 저해되었고, 60분 동안 열처리를 한 경우, 미강 내 효소의 활성의 더 많이 저해된 것을 알 수 있었다.

[0061]

본 실험에 1의 결과로부터 미강을 이용하여 합성되는 바이오디젤은 미강이 갖고 있는 자체 효소인 미강 리파아제에 의해 합성된다는 것을 증명할 수 있었다.

[0062]

### 실시에 1-(1) 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 대한 알코올의 종류에 따른 효과

[0063]

알코올 종류가 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 메탄올, 에탄올, 부탄올 (1-butanol)을 사용하여 바이오디젤을 합성하였다. 반응 조건은 미강 내 유지(지방산):알코올의 물 비율 1:2 , 반응 온도 40 ℃ 이었다.

[0064]

도 3은 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 있어서 알코올의 종류에 따른 바이오디젤의 합성 수율을 나타낸 것이다. 도 3에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응 12 일째 기준으로, 메탄올의 바이오디젤 수율은 83 중량%로 세 가지 알코올 중 바이오디젤 수율이 가장 높았고, 에탄올과 부탄올을 이용한 바이오디젤 수율은 모두 69 중량% 이었다.

[0065]

따라서 메탄올이 본 실험에 가장 적합한 알코올이라는 결론을 얻을 수 있었다.

[0066]

### 실시에 1-(2) 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 반응 온도가 미치는 영향

[0067]

미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 반응 온도가 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서 수행된 온도의 범위는 20 ℃ ~ 70 ℃ 이었으며, 이 때 미강 내 유지(지방산)와 메탄올의 물 비율은 1:2, 미강 내 수분함량 12% 이었다.

[0068]

도 4는 미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 반응 온도가 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 보여준다. 도 4에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응 9일 동안 바이오디젤 수율은 20 ℃ 에서 50 ℃ 의 온도 증가에 비례하였고, 60 ℃ 와 70 ℃ 에서는 수율이 다시 떨어졌다. 하지만, 50 ℃ 의 경우, 반응 9일 이후에 바이오디젤 수율은 더 이상 증가하지 않은 반면, 40 ℃ 의 경우, 반응 12일까지 계속 증가하여 **83 중량%의 최대 수율**을 얻었다.

[0069]

60 ℃ 와 70 ℃ 의 경우, 반응 6일까지 바이오디젤 수율이 증가하였지만, 6일 이후 바이오디젤 수율은 더 이상 증가하지 않았다. 20 ℃ 와 30 ℃ 의 경우, 반응 12일까지 바이오디젤 수율이 증가하였지만, 12일 이후 바이오디젤 수율은 더 이상 증가하지 않았다. 따라서 40 ℃ 가 최적 반응 온도로 나타났다.

[0070]

### 실시에 1-(3) 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 미강 내 유지와 메탄올의 물 비율이 미치는 영향

[0071]

미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 기질 간의 물 비율이 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서 수행한 미강 내 유지(지방산)와 메탄올의 물 비율의 범위는 1:1 ~ 1:3 (미강 내 유지:메탄올) 이었다. 이 때 반응온도는 40 ℃ , 미강 내 수분함량은 12% 이었다.

[0072]

도 5는 미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 기질 간의 물 비율이 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 나타낸 것이다. 1:3 를 제외한 조건에서 물 비율이 증가함에 따라 바이오디젤 수율이 증가하였다. 하지만, 1:1의 경우, 반응 2일 이후, 반응속도가 확연히 느려졌다. 1:2과 1:2.5의 경우, 전 반응 기간 동안 가장 높은 바이오디젤 수율을 보였으며, 두 물 비율 간에 큰 차이를 보이지 않았다. 1:3의 경우, 반응 2일 동안은 반응속도가 가장 느렸지만, 반응 12일까지 바이오디젤 수율이 계속 증가하다 반응 15 일째 다시 감소하였다. 따라서 메탄올이 효소 변성에 미치는 영향과 비용을 고려하여 최적 물 비율은 1:2으로 선정하였다. 1:2에서 **최대 수율은 반응 12**

일제 83 중량% 이었다.

**실시에 1-(4) 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 미강 내 수분 함량이 미치는 영향**

미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 미강 내 수분 함량이 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 조사하였다. 본 실험에서 수행한 수분함량의 범위는 1.6%~24% 이었다. 1.6%의 수분함량은 미강을 동결건조 하였을 때 남아있는 최소 수분함량이었다. 이 때의 반응 조건은 온도 40 ℃, 미강 내 유지(지방산)와 메탄올의 몰 비율 1:2 이었다.

도 6은 미강을 이용한 바이오디젤 합성 반응 중 미강 내 수분 함량이 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 나타낸다. 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 미강 내 수분함량이 1.6%에서 12%까지는 수분함량이 증가함에 따라 바이오디젤 수율이 증가하였다. 그러나, 미강 내 수분함량이 18% 또는 24%로 증가함에 따라 바이오디젤 수율은 점차적으로 감소하였다. **최대 수율은 수분 12%에서 반응 12 일제 83 중량%**을 얻었다. 따라서 최적 미강 내 수분함량은 12%로 선정하였다.

**실시에 1-(5) 수분 조절을 이용한 2단계 반응**

앞에서 얻은 최적 조건에서 최대 바이오디젤 수율은 83 중량%이었다. 이 때 유지의 조성에는 바이오디젤 이외에 8.5 중량%의 지방산과 1~2 중량%의 아실글리세롤 (모노글리세라이드+다이글리세라이드+트리글리세라이드)이 잔존하였다. 수분함량에 따른 산가 결과를 보았을 때, 수분이 증가함에 따라 산가가 증가하였다. 따라서 남아있는 지방산을 제거하고자 12일 동안 최적 조건 (온도 40 ℃, 지방산과 메탄올의 몰 비율 1:2, 미강 내 수분 12%)에서 메탄올과 반응시킨 후, 건조를 통해 수분을 제거한 후 메탄올을 재첨가하여 40 ℃에서 재반응을 실시하였다. 그 결과, 도 7에서 볼 수 있는 바와 같이, 재반응 6일 만에 지방산이 모두 바이오디젤로 전환되어, **최대 수율 96 중량% (불검화물질 4 중량%를 제외하면 바이오디젤로의 전환율 100%)**의 바이오디젤을 얻을 수 있었다.

**실시에 1-(6) 고산가 미강으로부터 바이오디젤 합성**

미강 리파아제는 가수분해 역가가 매우 높다. Siti Zullaikah (2005) 에 따르면 미강 내 유리지방산은 도정 후 한 시간 내부에 빠르게 증가하기 시작하여 하루에 약 5%씩 증가한다고 보고되고 있다. 특히 미강 내 유리지방산 함량은 온도가 높을수록, 저장 기간이 길어질수록 증가한다. 따라서 유리 지방산 함량이 높은 미강을 이용하여 바이오디젤 합성 정도를 조사하였다.

본 실험에서 사용된 미강 내 유지의 초기 산가가 100 (유리지방산 50%)이었다. 미강 내 유지(지방산)와 메탄올의 몰 비율 1:2, 반응 온도 40 ℃, 수분 12%에서 반응한 결과, 도 6에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응 12 일제, 78 중량%의 수율을 얻었다.

**비교실험예 1: 미강으로부터 분리된 리파아제 추출물을 이용한 바이오디젤의 합성**

본 발명에 따른 미강을 이용한 바이오디젤의 합성 방법은 미강 내 자체 효소인 미강 리파아제에 의한 것이므로, 이러한 미강 리파아제를 분리하여 바이오디젤을 합성할 수 있는지 확인해 보고자 하였다. 이에 미강으로부터 리파아제를 분리한 리파아제 추출물을 이용하여 바이오디젤의 합성을 시도하였다.

우선, 보람찬 품종의 미강을 헥산으로 추출하여 탈지 미강을 얻었다. 탈지 미강에 탈지 미강 무게의 8배에 해당하는 인산칼륨 완충액 (50 밀리몰농도 mM, pH 7.0)을 30 분간 교반한다. 원심분리를 하여 상층액을 따로 모아두고, 하층에 다시 새 인산칼륨 완충액을 넣고 30 분간 교반한다. 위 과정을 4번 반복한다. 상층액, 곧 조 리파아제 추출물 (crude lipase extract)과 폐식용유를 1:10 중량비로 넣고, 메탄올을 폐식용유의 2배의 해당하는 몰 (mol) 만큼 넣어 50 ℃ 에서 3시간 반응하였다. 그 결과, 본 비교실험예 1에서는 바이오디젤이 전혀 합성되지 않았으며, 곧, 그 수율은 0 중량% 이었다.

**실시에 2: 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성**

[0085] 미강유를 얻기 위해 착유 공정을 거친 탈지 미강을 사용하더라도 본 발명의 방법에 따른 바이오디젤의 합성이 가능한지 확인하고자 본 실험을 진행하였다.

[0086] 먼저, 실험에 사용될 탈지 미강을 제조하기 위하여 미강 100 g에 용매 500 mL를 가한 후 20분간 교반하면서 탈지 과정을 실시하였고 이상의 추출 과정을 4회 반복하여 지방 함량이 1% 이하인 탈지 미강을 제조하였다. 추출이 끝난 탈지 미강에 함유된 용매는 실온의 흡후드에서 12시간 이상 용매를 제거하였다.

[0087] 이상의 과정을 거쳐 제조한 탈지 미강을 측매로 하여 여러 유지로부터 바이오디젤을 합성하였고, 그 과정은 다음과 같다. 1L 폴리프로필렌 병에 100 g의 탈지 미강에 10-25% 함량의 유지를 헥산과 함께 첨가한 후 회전진공 증발기를 이용하여 헥산을 제거하여 유지를 탈지 미강에 고루 분산시켰다. 그 후 실온의 흡후드에서 잔존 헥산을 증발시켜 제거하였다. 유지가 첨가된 미강에 최적 수분 및 메탄올 함량을 맞추기 위해 일정량의 수분과 메탄올을 첨가하여 고루 분산시켰다. 이 과정을 통하여 만들어진 시료들은 일정온도로 유지되는 항온기에서 반응을 실시하여 바이오디젤을 합성하였다.

#### [0088] 실시예 2-(1) 탈지 용매 종류에 따른 탈지 미강의 바이오디젤 수율 비교

[0089] 탈지에 사용되는 용매의 종류가 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 확인하기 위하여 용매로 헥산, 클로로포름, 디에틸에테르, 아세톤을 이용하여 같은 방법으로 탈지 미강을 얻고, 미강 내 효소를 이용한 대두유의 바이오디젤의 합성 정도를 비교하였다. 반응과정은 다양한 용매로 탈지된 탈지미강에 일정량의 유지, 메탄올 및 수분을 첨가하여 반응을 실시 하였다. 즉 반응 조건으로는 유지 (대두유) 첨가량 15 중량%, 미강 내 수분함량 12%, 물 비율 1:2 (첨가된 대두유(지방산):메탄올), 온도 40 ℃ 이었다.

[0090] 도 9는 탈지에 사용되는 용매의 종류가 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 보여주는 그래프이다. 도 9에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응 9 일째 기준으로, 바이오디젤의 수율은 헥산 (88.71 중량%), 클로로포름 (83.42 중량%), 에틸에스테르 (78.60 중량%), 아세톤 (77.89 중량%) 순으로 나타났다. 따라서 헥산을 이용하여 만들어진 탈지 미강이 바이오디젤 합성에 가장 높은 수율을 보여주었다.

#### [0091] 실시예 2-(2) 유지 종류에 따른 바이오디젤 합성

[0092] 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성 중 첨가되는 유지의 종류에 따른 바이오디젤의 합성 수율에 미치는 영향을 확인하기 위하여, 식물성 유지 (대두유, 카놀라유), 동물성 유지 (라드), 팜유, 팜유 증류물, 폐 식용유, 에시드 오일(Acid oil)을 이용하여 바이오디젤의 수율을 비교하였다. 반응 조건으로는 유지 첨가량 15 중량%, 유지 (지방산 기준)와 메탄올의 물 비율 1:2, 반응 온도 40 ℃, 수분함량 12% 이었다. 이때 사용된 탈지 미강은 헥산으로 탈지된 탈지미강을 사용하였다.

[0093] 도 10은 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성 중 첨가되는 유지의 종류에 따른 바이오디젤의 합성 수율을 나타낸다. 도 10에서 볼 수 있는 바와 같이, 반응 12 일째, 순서대로 각각 90.43 중량% (대두유), 90.65 중량% (카놀라유), 91.36 중량% (라드), 91.92 중량% (팜유), 87.15 중량% (팜유 증류물: 지방산함량 98%), 87.29 중량% (폐식용유; 튀김유), 80.02 중량% (에시드 오일)의 수율을 얻었다.

#### [0094] 실시예 2-(3) 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 대해 유지 첨가량이 미치는 영향

[0095] 탈지 미강을 이용한 바이오디젤 합성에 첨가 유지와 메탄올의 물 비율이 바이오디젤 합성 수율에 미치는 영향을 분석하여 최적 조건을 도출하고자 실험을 진행하였다. 이 때 탈지 미강에 첨가한 유지는 대표적인 식물성 유지인 대두유를 사용하였다. 탈지 미강에 대두유를 첨가하여, 유지 첨가량이 10, 15, 20, 25%(퍼센트는 유지 첨가량 / (탈지 미강 무게 + 유지 첨가량)으로 계산) 인 대두유 함유 미강을 제조하였다. 여기에 유지를 기준으로 1몰, 2몰, 3몰의 메탄올을 각각 첨가한 후 최적 온도 및 미강 내 수분함량 (40 ℃, 12%)에서 저장기간에 따른 바이오디젤의 수율을 측정하였다.

[0096] 도 11은 탈지 미강에 첨가하는 대두유의 함량과 그에 따른 메탄올의 물 비율이 바이오디젤 합성에 미치는 영향을 나타낸다. 유지 첨가량 10%의 경우, 1:3의 물 비율이 최적이었으며, 반응 9 일째 89 중량%의 수율을 얻었다. 유지 첨가량 15%의 경우, 1:2의 물 비율이 최적이었으며, 반응 12 일째 90 중량%의 수율을 얻었다. 유지 첨가량 20%의 경우, 1:1의 물 비율이 최적이었으며, 반응 27 일째 94 중량%의 수율을 얻었다. 유지 첨가량 25%의 경우,

반응 27 일째 83 중량%의 수율을 얻었다.

- [0097] 실시예 2-(4) 탈지미강을 이용한 바이오디젤 합성에 대해 미강 내 유지와 메탄올의 몰 비율이 미치는 영향
- [0098] 유지 첨가량 15%에 있어서 바이오디젤 합성에 미치는 기질간의 몰 비율의 영향을 반응 시간에 따라 도 12에 나타내었다. 수행한 몰 비율의 범위는 1:1 ~ 1:3 (미강 내 유지:메탄올) 이었다. 이 때 반응온도는 40 ℃, 미강 내 수분함량은 12% 이었다. 몰 비율에 따른 바이오디젤의 수율은 다음과 같았다. 바이오디젤 수율은 몰 비율 1:1 에서 1:2 의 몰 비율 증가에 비례하였고, 1:2.5에서 1:3은 떨어졌다. 하지만, 1:1의 경우, 반응 2일 이후, 반응 속도가 확연히 느려졌다. 반응 6일 동안은 1:1.5과 1:2의 경우, 가장 높은 바이오디젤 수율을 보였지만, 반응 9 일 이후 1:2는 바이오디젤 수율이 계속 증가하는 반면, 1:1.5는 더 이상 증가하지 않았다.
- [0099] 따라서 최대 수율 및 메탄올이 효소 변성에 미치는 영향과 비용을 고려하여 최적 몰 비율은 1:2으로 선정하였다. 1:2에서 최대 수율은 반응 15 일째 93 중량% 이었다.
- [0100] 실시예 2-(5) 탈지미강을 이용한 바이오디젤 합성에 대해 반응 온도가 미치는 영향
- [0101] 미강 내 자가 효소에 의한 바이오디젤 합성 반응 중 반응 온도가 바이오디젤의 수율에 미치는 영향을 도 13에 나타냈다. 본 실험에서 수행된 온도의 범위는 30 ℃ ~ 60 ℃ 이었으며, 이 때 미강 내 유지와 메탄올의 몰 비율은 1:2, 미강 내 수분함량 12% 이었다.
- [0102] 반응 온도에 따른 바이오디젤의 수율은 다음과 같았다. 바이오디젤 수율은 30 ℃에서 40 ℃의 온도 증가에 비례 하였고, 50 ℃ 이상의 온도에서는 온도 증가에 따라 수율이 다시 감소하였다. 50 ℃ 이상의 온도의 경우, 반응 9일 이후에 바이오디젤 수율은 더 이상 증가하지 않은 반면, 40 ℃ 이하의 온도의 경우, 반응 15일까지 계속 증가하였다. 40 ℃에서 반응속도가 가장 빠르고 바이오디젤 수율 최대치 (반응 15 일째 93 중량%)를 얻었으며, 반응 12 일째 92 중량%의 수율을 얻었다.
- [0103] 따라서 40 ℃ 가 최적 반응 온도로 나타났다.
- [0104] 실시예 2-(6) 탈지미강을 이용한 바이오디젤 합성에 대해 미강 내 수분함량이 미치는 영향
- [0105] 바이오디젤 합성에 미치는 미강 내 수분함량의 영향을 반응 시간에 따라 도 14에 나타내었다. 수행한 수분함량의 범위는 0.96%~24% 이었다. 0.96%의 수분함량은 미강을 동결건조하였을 때 남아있는 최소 수분함량이었다. 이 때의 반응 조건은 온도 40 ℃, 몰 비율 1:2 이었다.
- [0106] 미강 내 수분함량에 따른 바이오디젤 수율은 다음과 같았다. 0.96%에서 12%까지는 수분함량이 증가함에 따라 바이오디젤 수율이 증가하였다. 그러나, 미강 내 수분함량이 18% 또는 24%로 증가함에 따라 바이오디젤 수율은 점차적으로 감소하였다. 초기 반응 속도는 수분 12%에서 최대이었으며, 반응 15 일째 수분 6%와 12%에서의 바이오디젤 수율은 큰 차이를 보이지 않았다. 또한, 초기 미강 내 수분 함량이 12% 이었으며, 비용 및 시간을 고려하였을 때, 수분 12%를 미강내 최적 수분함량으로 선정하였다. 반응 15 일째 최대 수분함량 93 중량%를 얻었으며, 반응 12 일째 92 중량%의 수율을 얻었다.
- [0107] 실시예 2-(7) 탈지미강을 이용한 바이오디젤 합성 최적 조건에서 탈지 미강 리파아제 활성도 측정
- [0108] 상기 실시예 2-(4) 내지 2-(7)에서 측정한 최적 조건(기름 함량 15%, 반응 온도 40℃, 유지와 메탄올의 몰비율 1:2, 수분 함량 12%, 반응시간 12일)에서 바이오디젤 수율로부터 효소의 활성도를 측정하였다. 또한, 글리세롤이 효소의 활성 억제에 미치는 영향을 알아보기 위하여 매 반응 후 아세톤으로 반응 중에 생성된 글리세롤을 제거하는 반응과 글리세롤을 제거하지 않은 반응으로 나누어 반응 횟수에 따른 바이오디젤의 수율을 비교하였다. 글리세롤을 제거하기 위한 용매로는 아세톤이 사용되었으며, 반응 1회분마다 실시예 2와 동일한 방법으로 탈지 후, 미강 무게의 5배의 부피로 20분간 교반 과정을 총 3회 실시하였다. 그 후, 다시 미강 무게의 5배의 부피로 헥산을 사용하여 20분간 교반 과정을 총 2회 실시하였다. 이후의 과정은 상기 실시예 2와 동일하게 수행하였다.
- [0109] 글리세롤을 제거하지 않은 결과(도 15 대조군 곡선), 반응이 반복됨에 따라 반응 2회 이후 바이오디젤 수율이

꾸준히 감소하다가 반응 8회 이후 급격히 감소하였다. 반면, 글리세롤을 제거한 결과 (도 15 처리군 곡선), 반응 3회까지 일정한 바이오디젤 수율을 보이고 이후 9회까지 서서히 감소하다가 그 이후 급격히 감소하였다.

[0110] 따라서, 탈지 미강 리파아제로부터 반응 시 생성되는 글리세롤을 제거하는 것이 효소의 활성을 유지하고 사용기간을 연장시키는데 효과가 있음을 확인할 수 있었다.

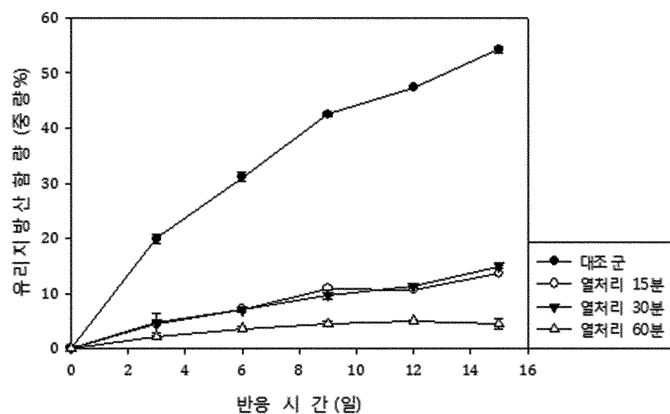
[0111] **실시예 3: 용매계에서 미강을 촉매로 한 바이오디젤 합성**

[0112] 미강 또는 탈지 미강 3 g을 50mL 삼각플라스크에 담고, 시료 미강 내 함유된 유지에 대한 메탄올의 물 비율이 1:2이 되도록 메탄올을 첨가하고, 헥산 10mL을 첨가한 후 밀봉하여 진탕항온수조 (orbital water bath shaker)에서 300 rpm으로 교반하면서 40 °C에서 반응을 실시하여 바이오디젤을 합성하였다.

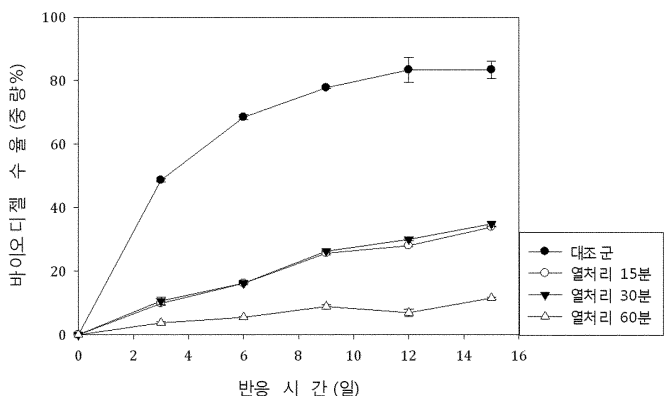
[0113] 헥산을 반응 매질로 한 용매계 반응 시스템에서 미강을 촉매제로 하고 미강 내 유지와 메탄올을 원료로 하여 반응시켰을 때, 반응 12 일째 57 중량% 수율을 얻었으며, 이 때의 산가는 0이었다. 탈지 미강을 촉매제로 하고 식물성 유지 (대두유)와 메탄올을 원료로 하여 반응시켰을 때, 반응 12 일째 52 중량%의 수율을 얻었다 (도 16).

## 도면

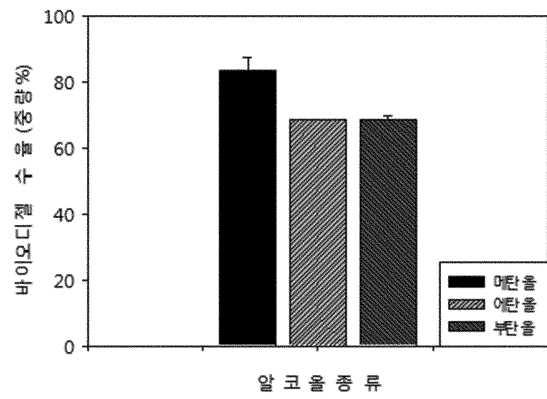
### 도면1



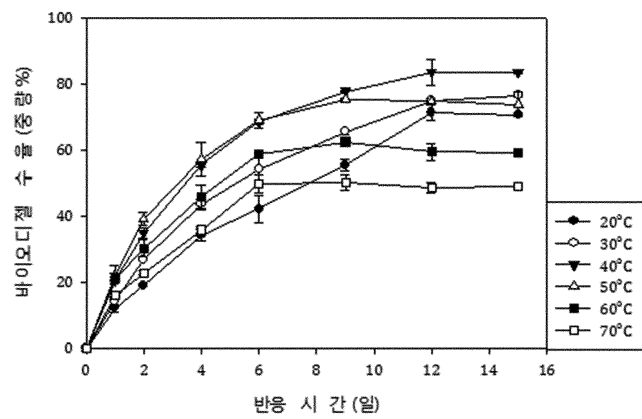
### 도면2



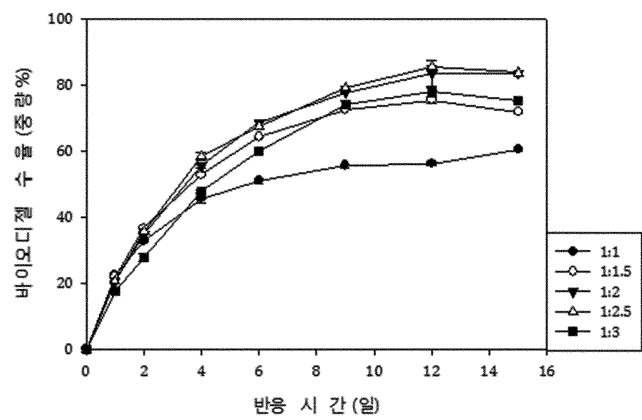
도면3



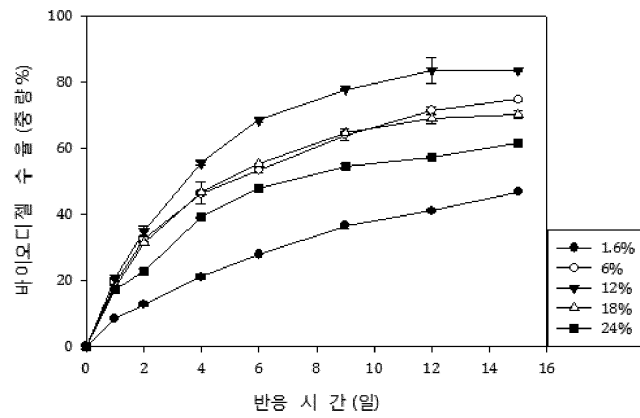
도면4



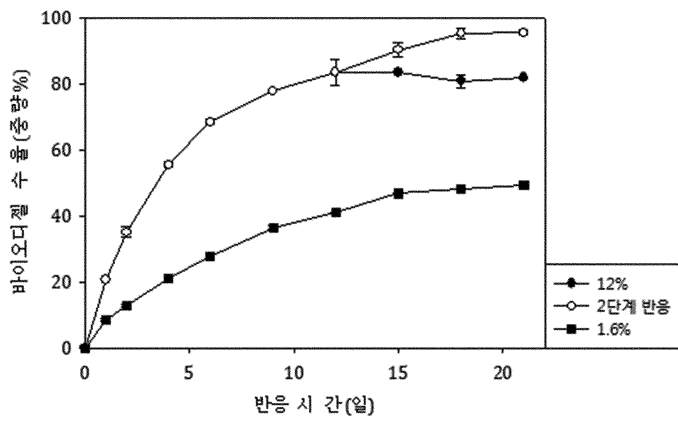
도면5



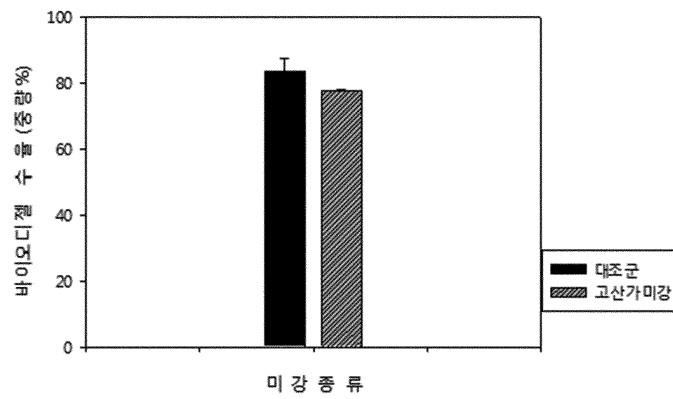
도면6



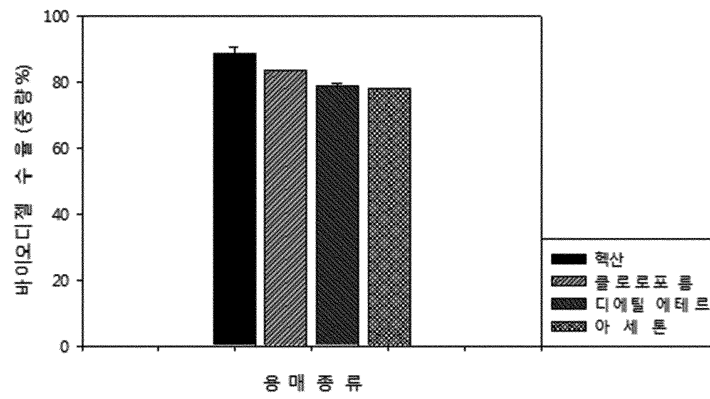
도면7



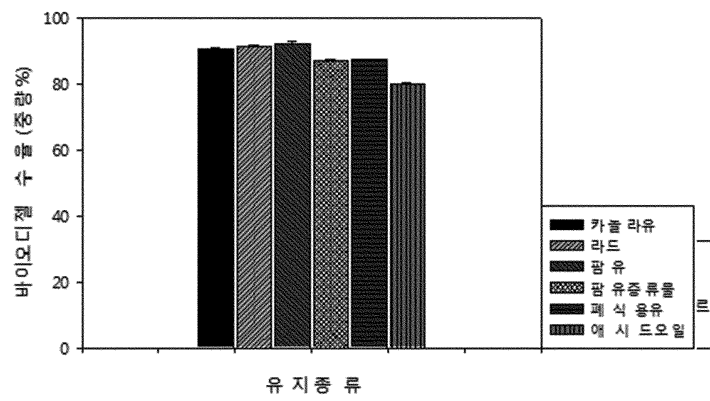
도면8



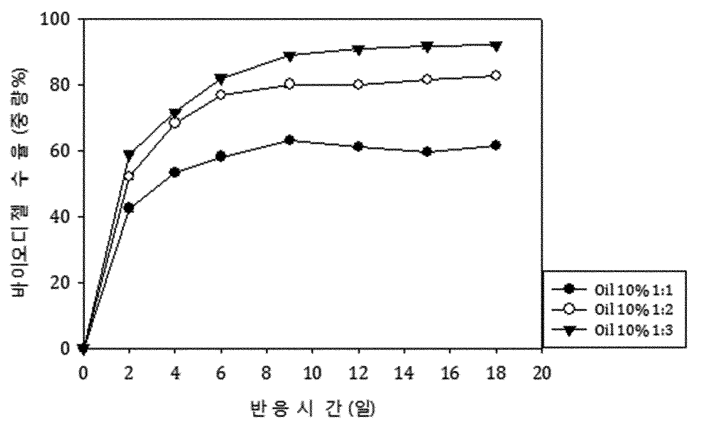
도면9



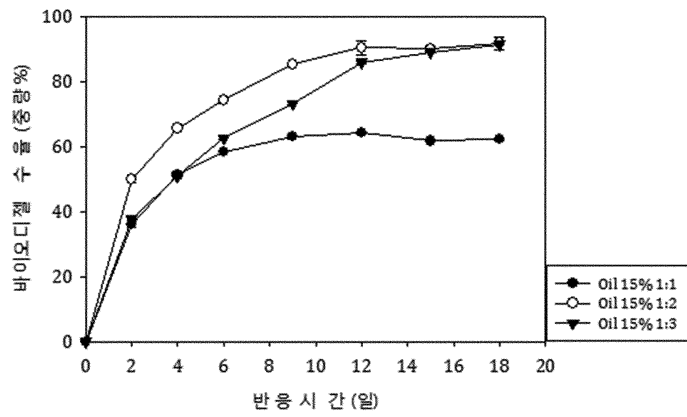
도면10



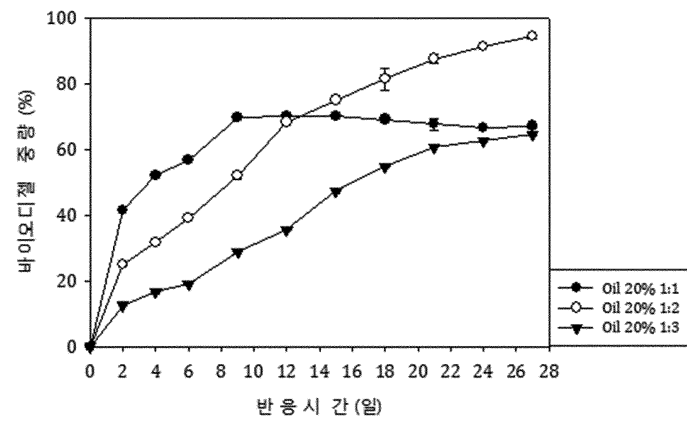
도면11a



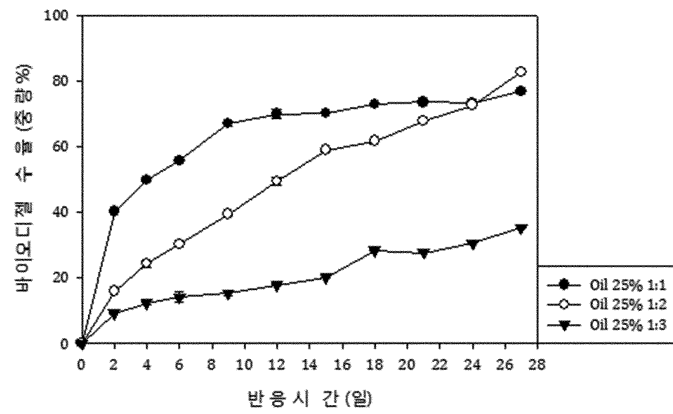
도면11b



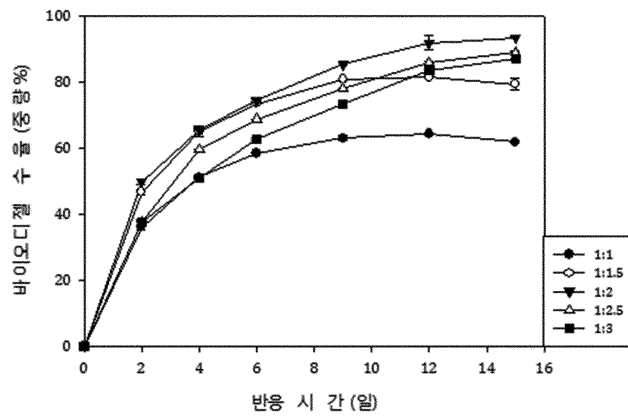
도면11c



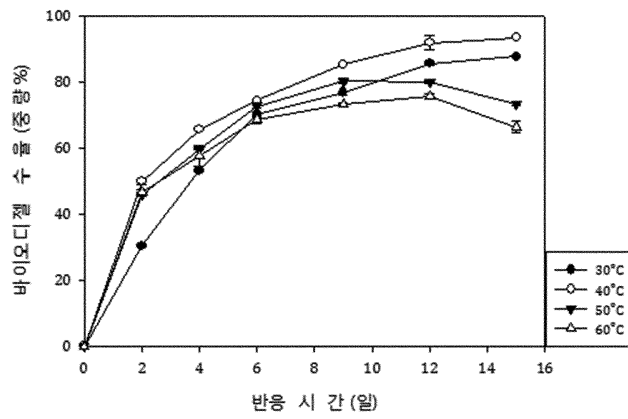
도면11d



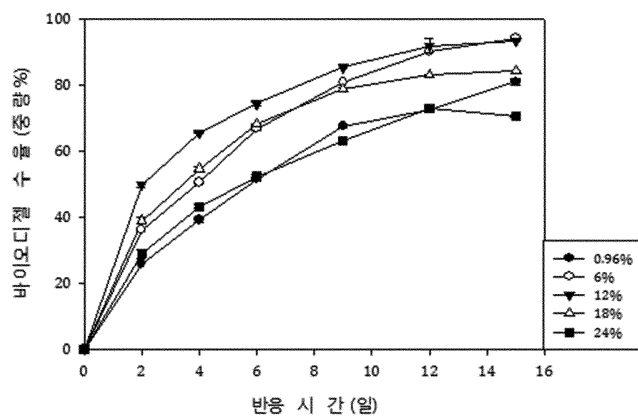
도면12



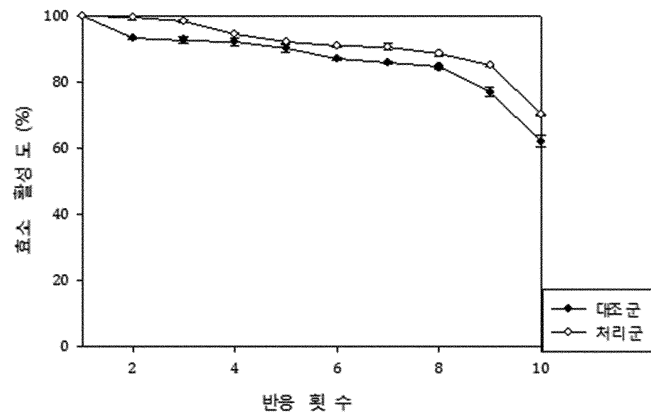
도면13



도면14



도면15



도면16

