(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2020-0102361
(43) 공개일자 2020년08월31일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)
C12N 9/20 (2006.01) *C12N 11/04* (2020.01)
C12N 11/08 (2020.01) *C12P 7/62* (2006.01)
(52) CPC특허분류
C12N 9/20 (2013.01)
C12N 11/04 (2013.01)
(21) 출원번호 10-2020-0018508
(22) 출원일자 2020년02월14일
심사청구일자 2020년02월14일
(30) 우선권주장
1020190020316 2019년02월21일 대한민국(KR)

(71) 출원인
고려대학교 산학협력단
서울특별시 성북구 안암로 145, 고려대학교 (안암동5가)
(72) 발명자
김인환
서울특별시 노원구 공릉로58길 176, 102동 1108호(하계동, 우방아파트)
이아리
경기도 고양시 덕양구 은빛로77번길 29-14(화정동), 1층
(뒷면에 계속)
(74) 대리인
특허법인 다해

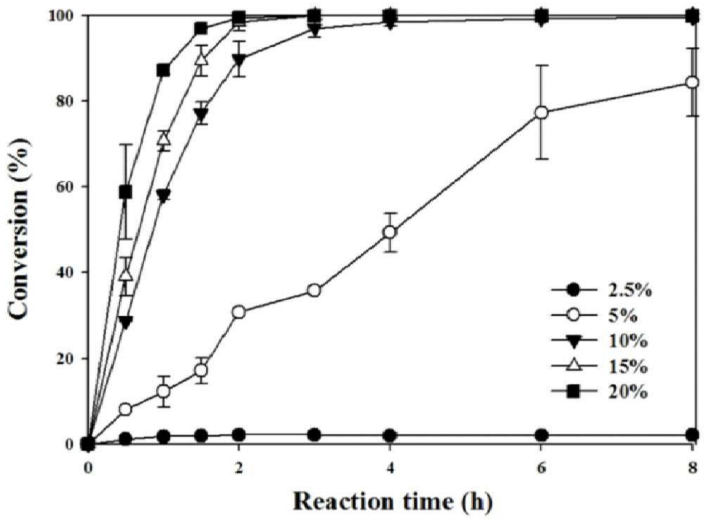
전체 청구항 수 : 총 12 항

(54) 발명의 명칭 **디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 디아이소노닐 아디페이트 제조방법**

(57) 요 약

본 발명은 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제, 이의 제조방법, 및 이를 이용한 디아이소노닐 아디페이트 제조방법에 관한 것으로, 본 발명의 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 효소는 비교적 저렴한 상업용 액상 리파아제인 Eversa transform 2.0 (*Thermomyces lanuginosus*)를 효소로 하고 소수성인 Lewatit VP OC 1600을 담체로 하여 제조된 것으로서 아이소노닐 알콜과 아디픽산 (adipic acid)으로부터 디아이소노닐 아디페이트를 낮은 온도에서 빠른 속도로 완전하게 합성할 수 있는바, 효율적이고 경제적으로 디아이소노닐 아디페이트를 제조할 수 있다는 효과가 있는바 식품 포장재 산업에 유용하게 이용될 것으로 기대된다.

대 표 도 - 도5



(52) CPC특허분류
C12N 11/08 (2013.01)
C12P 7/62 (2013.01)
(72) 발명자
김희진
경기도 의정부시 평화로272번길 39 푸른마을아파트 101동 403호

김태훈
충청북도 영동군 영동읍 기골로 7 서한감고을아파트, 101동 1006호

이 발명을 지원한 국가연구개발사업
과제고유번호 117037022SB010
부처명 농림축산식품부
연구관리전문기관 농림식품기술기획평가원
연구사업명 농생명산업기술개발사업
연구과제명 참깨박으로부터 고 리그난 참기름 및 리그난 농축물 생산
기 여 율 1/1
주관기관 고려대학교산학협력단
연구기간 2018.01.01 ~ 2018.12.31

명 세 서

청구범위

청구항 1

소수성 담체에 고정화된 써모마이세스 라누지노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제를 포함하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성용 조성물.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 담체는 메타크릴레이트(methacrylic aester)와 디비닐벤젠(divinylbenzene)의 중합체(copolymer)이고 다공성인 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성용 조성물.

청구항 3

소수성 담체에 액상의 써모마이세스 라누지노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제를 흡착시키는 단계를 포함하는, 디아이소노닐 아디페이트(diisononyl adipate) 합성용 고정화 리파아제 제조방법.

청구항 4

제3항에 있어서,

상기 담체는 메타크릴레이트(methacrylic aester)와 디비닐벤젠(divinylbenzene)의 중합체(copolymer)이고 다공성인 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제 제조방법.

청구항 5

제3항에 있어서,

상기 흡착단계는 10 내지 50 ℃에서 1 내지 30 시간 동안 상기 리파아제와 담체를 100 내지 300 rpm의 속도로 교반하여 수행되는 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제 제조방법.

청구항 6

제3항 내지 제5항 중 하나의 항의 방법으로 제조된 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제.

청구항 7

(1) 아이소노닐 알콜(isononyl alcohol)과 아디픽산 (adipic acid)을 혼합한 기질 준비단계;

(2) 상기 기질에 소수성 담체에 고정화된 써모마이세스 라누지노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제를 혼합하는 혼합단계; 및

(3) 상기 아이소노닐 알콜 및 아디픽산과 상기 담체에 고정화된 리파아제를 반응시키는 반응단계를 포함하는, 디아이소노닐 아디페이트(diisononyl adipate) 합성방법.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 (1) 단계의 기질에 혼합된 아이소노닐 알콜과 아디픽산의 몰 비율은 1: 2.5~3.5인 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성방법.

청구항 9

제7항에 있어서,

상기 (2) 혼합단계의 고정화 리파아제의 수분활성도는 0.33 내지 0.75 (Aw)인 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성방법.

청구항 10

제7항에 있어서,

상기 (2) 혼합단계에서 기질과 리파아제의 혼합비율은 1:0.08~0.2 중량비인 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성방법.

청구항 11

제7항에 있어서,

상기 (3) 반응단계는 진공도 8.3 내지 18.3 kPa 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성방법.

청구항 12

제7항에 있어서,

상기 (3) 반응단계의 반응온도는 30 내지 70 ℃인 것을 특징으로 하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성방법.

발명의 설명

기 술 분 야

[0001] 본 발명은 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제 등에 관한 것이다.

배 경 기 술

[0003] 아디페이트 에스터(adipate ester)는 자동차 엔진 오일의 구성성분, 코팅제, 및 윤활유 제조의 첨가제로 사용될 뿐만 아니라 가소제로 널리 적용된다. 가소제 산업에서 아디페이트 에스터는 낮은 온도에서 유연성을 향상시키기 위하여 프탈레이트(phthalate)와 혼합하여 사용된다. 한편, 가소제로서 사용되는 아디페이트 에스터의 종류로는 디아이소부틸 아디페이트, 디아이소에틸헥실 아디페이트, 디아이소데실 아디페이트, 디아이소노닐 아디페이트 등이 있으며, 그 중에서 디아이소노닐 아디페이트는 식품에 접촉이 허용되는 물질로서 상업적인 식품 포장에 널리 사용되고 있다.

[0004] 현재, 디아이소노닐 아디페이트(diisononyl adipate: DINA)는 화학 촉매를 사용해서 만들어지고 있지만, 화학적 촉매를 사용하는 방법은 반응 온도 상승, 고가의 시설비, 유해 촉매, 폐기물 발생 등 상당한 한계를 가지고 있

다. 그러나, 효소적 방법을 이용한 디아이소노닐 아디페이트 합성은 보다 낮은 반응 온도 조건, 낮은 에너지 요구량, 분리의 용이성, 효소 재사용과 같은 장점을 가지고 있다.

[0005] 다양한 아디페이트 에스터 합성을 위해 캔디다 안타크티카(*Candida antarctica*) 유래 리파아제인 Novozym 435를 이용한 효소적 에스테르 반응을 이용한 시도가 있었다. 그러나 Novozym 435 리파아제는 현재 이용가능한 리파아제 중 가장 비싼 효소 중 하나이다. 이와는 반대로 써모마이세스 라누지노서스 (*Thermomyces lanuginosus*) 유래 리파아제인 Eversa transform 2.0 효소는 최근 바이오디젤 생산을 위해 개발되었으며 훨씬 더 저렴한 리파아제로 인정받고 있다. 본 연구에서는 액상형태의 Eversa transform 2.0 리파아제를 촉매로써 사용하였을때 디아이소노닐 아디페이트가 합성되지 않음을 확인하였다. 따라서, 액상형태의 Eversa transform 2.0 리파아제를 Lewatit VP OC 1600 담체에 고정화하여 사용함으로써 아이소노닐 알콜과 아디픽산으로부터 효과적으로 디아이소노닐 아디페이트를 합성하였다.

선행기술문헌

비특허문헌

[0007] (비특허문헌 0001) SAGE-Hindawi Access to Research, Biotechnology Research International, Volume 2011, Article ID 162987, 7 pages

발명의 내용

해결하려는 과제

[0008] 본 발명자들은, 상업용 리파아제인 Eversa transform 2.0 (*Thermomyces lanuginosus*)를 효소로 하고 소수성인 Lewatit VP OC 1600을 담체로 하여 자체 생산된 고정화 효소가 디아이소노닐 알콜과 아디픽산 (adipic acid)으로부터 디아이소노닐 아디페이트를 효과적으로 합성할 수 있음을 확인하고 본 발명을 완성하였다.

[0009] 이에, 본 발명의 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제 및 이의 제조방법을 제공하는 것이다.

[0010] 또한, 본 발명의 다른 목적은 상기 고정화 리파아제를 이용하여 디아이소노닐 아디페이트를 제조하는 방법을 제공하는 것이다.

[0011] 그러나 본 발명이 이루고자 하는 기술적 과제는 이상에서 언급한 과제에 제한되지 않으며, 언급되지 않은 또 다른 과제들은 아래의 기재로부터 당해 기술분야의 통상의 기술자에게 명확하게 이해될 수 있을 것이다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 담체에 고정화된 써모마이세스 라누지노서스(*Thermomyces lanuginosus*) 유래의 리파아제를 포함하는 디아이소노닐 아디페이트 합성용 조성물을 제공한다.

[0014] 또한, 본 발명은 담체에 액상의 써모마이세스 라누지노서스 리파아제(*Thermomyces lanuginosus* lipase: TLL)를 흡착시키는 단계를 포함하는, 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제 제조방법을 제공한다.

[0015] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 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.

[0016] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 흡착단계는 10 내지 50 ℃바람직하게는 20 내지 40 ℃더욱 바람직하게는 30℃의 진탕기에서 수행될 수 있다.

[0017] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 흡착단계는 1 내지 30 시간, 바람직하게는 12 내지 22 시간, 더욱 바람직하게는 17 시간 동안 수행될 수 있다.

[0018] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 흡착단계는 교반속도 100 내지 300 rpm, 바람직하게는 250 rpm 에서 수행

될 수 있다.

[0019] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 제조방법은 흡착단계 이후 인산완충용액으로 세척하는 세척단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0020] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 제조방법은 상기 세척단계 이후에 건조단계를 추가로 포함할 수 있다.

[0021] 또한, 본 발명은 상기 제조방법에 의해 제조된 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 리파아제를 제공한다.

[0022] 또한, 본 발명은 (1) 아이소노닐 알콜(isononyl alcohol)과 아디픽산 (adipic acid)을 혼합한 기질 준비단계; (2) 상기 기질에 상기 제조방법에 의해 제조된 고정화 리파아제를 혼합하는 혼합단계: 및 (3) 상기 아이소노닐 알콜 및 아디픽산과 상기 고정화 리파아제를 반응시키는 반응단계를 포함하는, 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate) 합성방법을 제공한다.

[0023] 본 발명의 일 구현예로서, 상기 (1) 단계의 기질에 혼합된 아이소노닐 알콜과 아디픽산의 몰 비율은 1: 2.5~3.5일 수 있고, 바람직하게는 1:3일 수 있다.

[0024] 본 발명의 다른 구현예로서, 상기 (3) 반응단계의 반응온도는 30 내지 70 ℃일 수 있고, 바람직하게는 45 내지 65 ℃ 일 수 있으며, 더욱 바람직하게는 50 내지 60 ℃일 수 있다.

[0025] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 (2) 혼합단계의 고정화 리파아제의 수분활성도는 0.33 내지 0.75일 수 있고, 바람직하게는 0.75일 수 있다.

[0026] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 반응단계는 진공도 6.6 내지 103.3 kPa 하에서 수행될 수 있고, 바람직하게는 8.3 ~18.3 kPa, 더욱 바람직하게는 13. 3 kPa 하에서 수행될 수 있다.

[0027] 본 발명의 또 다른 구현예로서, 상기 혼합단계에서 기질과 고정화 리파아제의 혼합비율은 1:0.08~0.2일 수 있고, 바람직하게는 1:0.1 중량비 일 수 있다.

발명의 효과

[0029] 본 발명의 디아이소노닐 아디페이트 합성용 고정화 효소는 비교적 저렴한 상업용 액상 리파아제인 Eversa transform 2.0 (*Thermomyces lanuginosus*)를 효소로 하고 소수성인 Lewatit VP OC 1600을 담체로 하여 제조된 것으로서 아이소노닐 알콜과 아디픽산으로부터 디아이소노닐 아디페이트를 낮은 온도에서 빠른 속도로 완전하게 합성할 수 있는바, 식품 포장재 산업에 있어 효율적이고 경제적으로 디아이소노닐 아디페이트를 제조할 수 있다는 효과가 있다.

도면의 간단한 설명

[0031] 도 1은 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate) 합성에 대한 온도효과를 확인한 도면이다.

도 2는 디아이소노닐 아디페이트 합성에 대한 기질 몰비율 효과를 확인한 도면이다.

도 3은 디아이소노닐 아디페이트 합성에 대한 수분활성도 효과를 확인한 도면이다.

도 4는 디아이소노닐 아디페이트 합성에 대한 진공도 효과를 확인한 도면이다.

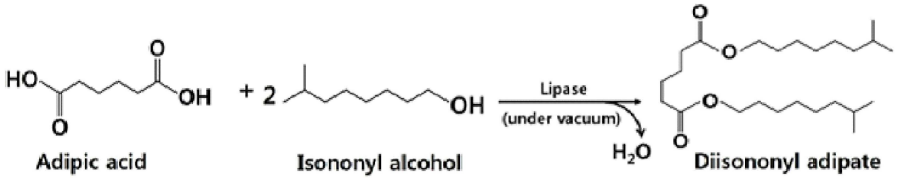
도 5는 디아이소노닐 아디페이트 합성에 대한 효소량 효과를 확인한 도면이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0032] 본 발명자들은 상업용 리파아제인 Eversa transform 2.0 (*Thermomyces lanuginosus*)를 효소로 하고 소수성인 Lewatit VP OC 1600을 담체로 하여 제조된 고정화 효소를 이용하여 아이소노닐 알콜과 아디픽산 (adipic acid)으로부터 식품용 플라스틱용기 제조에 널리 사용되는 가소제인 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate)를 효율적·¡¤경제적으로 합성할 수 있음을 확인하여 본 발명을 완성하였다.

[0033] 하기의 반응식 1은 아이소노닐 알콜(Isononyl alcohol)과 아디픽산 (adipic acid)으로부터 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate) 합성과정을 나타낸 것이다.

[0034] [반응식 1]

[0035] 

[0037] 본 발명자들은 사용된 고정화 리파아제는 액체형태의 상업용 리파아제인 Eversa transform 2.0 (*Thermomyces lanuginosus*)를 효소로하고 Lewatit VP OC 1600을 담체로 하여 자체 생산된 고정화 효소를 사용하였다. 반응변수로는 온도, 기질의 몰비율 (아이소노닐 알콜(isononyl alcohol) : 아디픽산 (adipic acid)), 효소의 수분활성도, 진공도 및 효소량에 대한 효과를 조사하였다.

[0038] 구체적으로, 본 발명자들은 상이한 온도조건에서 상기 고정화 리파아제를 이용하여 아이소노닐 알콜과 아디픽산의 반응을 유도하고 디아이소노닐 아디페이트로의 전환율을 확인한 결과 50℃ 및 60℃에서 약 88%의 전환율을 확인하였으며, 상기 온도에서 가장 빠른 평형상태에 도달할 수 있음을 확인하였다(결과 1 참조).

[0039] 또한, 본 발명자들은 아이소노닐 알콜과 아디픽산의 몰비율이 1:3에서 반응속도와 전환율의 최대값에 도달하는 시간이 가장 빠른 것을 확인하고(결과 2 참조), 수분활성도 0.33~0.75 Aw에서 가장 빠른 반응속도 및 전환율 증가를 확인하였다(결과 3 참조).

[0040] 또한, 본 발명자들은 디아이소노닐 아디페이트 생성시 발생하는 물분자를 제거하여 전환율을 높임과 동시에 고정화 리파아제에 결합된 물은 유지하여 효소 활성을 유지할 수 있는 진공의 강도를 확인한 결과, 6.6 kPa 에서 높은 전환율을 확인하였으나 반응 속도가 매우 낮고, 101.3 kPa에서는 전환율이 비교적 낮았는바, 효소의 활성을 저해하지 않으면서 높은 디아이소노닐 아디페이트 전환율을 나타내는 13.3kPa을 최적의 진공도로 선정하였다(결과 4 참조).

[0041] 특히 본 기술에서는 진공도가 매우 중요한 변수였다. 최적반응조건으로 온도는 50℃, 몰비율은 1:3 (아이소노닐 알콜:아디픽산), 수분활성도는 0.75, 진공도는 13.3 kPa, 효소량은 기질 대비 10 wt%로 나타났다. 이상의 최적 조건에서 6시간 만에 100%의 전환율을 나타내었다.

[0042] 상기로부터 본 발명자들은 *Thermomyces lanuginosus* 유래의 리파아제

[0043] 이하, 본 발명의 이해를 돕기 위하여 바람직한 실험 재료 및 방법과 그 결과를 제시한다. 그러나 하기의 실험 재료 및 방법과 그 결과는 본 발명을 보다 쉽게 이해하기 위하여 제공되는 것일 뿐, 하기 실험 재료 및 방법과 그 결과에 의해 본 발명의 내용이 한정되는 것은 아니다.

[0045] **[재료 및 방법]**

[0046] **1. 재료**

[0047] 실험에 사용된 액체효소는 노보사에서 생산된 액체 형태의 리파아제로서 상품명은 Eversa Transform 2.0이고 *Thermomyces lanuginosus* 유래 효소이다. 고정화에 사용된 담체는 소수성 아크릴 소재로서 상품명 Lewatit VP OC 1600 (Lanxess Energizing Chemistry)를 사용하였다. 아디픽산은 씨그마사로부터 디아이소노닐 알코올은 ㈜애경으로부터 구입 하였다. 이외 실험에 사용된 모든 시약은 특급 이상의 것을 사용하였다.

[0049] **2. 고정화 효소 제조방법**

[0050] 담체로 사용된 Lewatit VP OC 1600 15g을 99% 에탄올에 3시간 동안 적신 후 여기에 액체효소인 Eversa Transform 2.0을 120 mL 그리고 50 mM 인산완충용액 (pH 7.0) 30 mL를 삼각플라스크에 넣은 후 30 ° 진탕기에서 17시간 동안 흡착 과정을 실시 하였다. 이때 교반속도는 250 rpm이었다. 흡착 과정이 끝난 후 고정화 효소는 동일 완충용액으로 충분히 수세 과정을 거친 후 40 ° 에서 12시간 동안 건조 과정을 실시한 후 반응에 사용하였다..

[0052] **3. 디아이소노닐 아디페이트 제조방법**

[0053] 상기 제조된 고정화된 리파아제를 이용하여 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate)를 합성하는 과정은 다음과 같다. 일정 몰비율의 기질 5g을 이중자켓 유리 반응기에 넣고 원하는 온도를 맞춘 후 일정량의 효소와 측정 진공도 하에서 반응이 실시 되었다. 이때 마그네틱 스터러의 교반속도는 250 rpm 이었다. 진공은 반응 중 생성되는 수분 제거를 위하여 적용되었다.

[0055] **4. 디아이소노닐 아디페이트 전환율 분석방법**

[0056] 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate) 전환율은 가스크로마토그라피를 이용하여 실시하였다. 분석전 시료는 N-O-Bis(trimethylsilyl) acetamide를 통하여 sylation 유도체화를 거친 후 분석하였다. 가스크로마토그라피 분석조건은 다음과 같다. 칼람은 DB-1ht column (15 m×0.25 mm i.d.; J&W Scientific, Folsom, CA, USA), 주입구와 검출기의 온도는 각각 320℃ 와 330℃ 이었다. 칼람온도는 80 ℃에서 2분간 정치 후 분당 20℃ 속도로 370℃까지 상승 하였다. 최종 전환율은 다음과 같은 식으로부터 산출되었다.

[0057] Disononyl adipate 전환율 (%) = c/(a+b+c)

[0058] [a: adipic acid 무게, b: monoisononyl adipate 무게, c: diisononyl adipate 무게]

[0060] **[결과 및 고찰]**

[0061] **1. 온도**

[0062] 온도에 대한 실험으로서 반응에 사용된 온도는 30, 40, 50, 60, 70 ℃이었고 이때 몰비율 (adipic acid : isononyl alcohol)은 1:3, 효소량은 기질대비 무게로 10%, 진공은 무진공, 즉 대기압에서 실시되었다. 온도가 증가함에 따라 50℃까지 반응속도 및 전환율 모두 급속히 증가 하였으며 50℃와 60℃모두 3시간만에 평형에 도달했으며 이때 전환율은 약 88% 이었다. 반응 온도가 70℃로 높아졌을때는 전환율이 크게 감소하는 경향을 보여 주었다. 따라서 경제성을 고려하여 50℃를 최적반응온도로 결정하였다. (도 1 참조)

[0064] **2. 몰 비율**

[0065] 기질의 몰 비율에 대한 실험으로서 조사된 몰비율 (adipic acid : isononyl alcohol)은 1:2, 1:2.5, 1:3, 1:3.5, 1:4 이었고 이때 반응온도는 50℃ 효소량은 기질대비 무게로 10%, 진공은 무진공 즉 대기압에서 실시 되었다. 1분자의 adipic acid가 당량적으로 2분자의 isononyl alcohol과 반응하였을 때 가장 경제적이지만 조사된 범위에서 가장 낮은 전환율을 나타내었다. 한편 반응속도 및 전환율에 있어서 몰비율이 1:3까지 증가함에 따라 꾸준히 증가 하였으며, 1:3에서 가장 빠른 반응속도와 최대값에 도달하는 시간이 3시간으로 가장 빠른 것으로 나타났다. 따라서 몰비율에 대한 경제성과 반응시간을 고려하여 1:3을 최적 몰비율로 선정하였다. (도 2 참조)

[0067] **3. 수분활성도 (Aw)**

[0068] 효소의 초기 수분함량에 대한 효과를 조사하기 위하여 수분활성도가 다른 수분활성도 챔버인 다양한 염 용액 용기에 효소를 48시간 정치시킨 후 반응에 사용하였다. 이때 사용된 수분활성도는 0.00, 0.11, 0.33, 0.53, 0.75, 0.97 이었다. 이외 반응조건으로서 반응온도는 50℃, 기질의 몰비율은 1:3 (adipic acid : isononyl alcohol), 효소량은 기질대비 무게로 10% 이었다 수분활성도 0.00 에서 가장 느린 반응속도를 나타낸 반면 수분활성도가 0.33까지 증가함에 따라 반응속도 및 전환율이 증가되는 경향을 보여 주었다. 반면 0.33에서 0.75까지 수분활성도가 증가함에 따라 큰 차이를 보여 주지 않았다. 따라서 최적 수분활성도는 0.33 - 0.75 범위로 설정 하였고 이후 변수 실험에서는 수분활성도를 0.75로 고정하여 사용 하였다. (도 3 참조)

[0070] **4. 진공도**

[0071] 본 반응에서는 생성물인 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate) 분자가 생성될 때 두 분자의 물이 생성된다. 그러나 이때 생성되는 물이 축적될 경우 리파아제효소에 의한 가수분해가 일어나 전환율이 떨어지게 된다. 본 실험에서는 생성된 물을 제거하기 위하여 진공을 적용하였다. 반면 생성된 물 이외에 효소에 결합된 물까지 제거되면 오히려 활성도가 떨어질 수 있기 때문에 적당한 진공이 필요하다. 따라서 최적의 진공도 실험이 실시 되었다. 조사된 진공도는 6.6, 13.3, 26.6, 40.0, 103.3 kPa (대기압) 이었다. 이때 반응온도는 50℃, 기질의 몰비율은 1:3 ((adipic acid : isononyl alcohol), 효소량은 기질대비 무게로 10% 이었다. 진공을 통하여 생성된 물을 제거함에 따라 대기압 상태에서 전환율이 88%에서 진공이 적용되었을 때 모든 진공조건에서 100% 전환율을 얻을 수 있었다. 그러나 가장 높은 진공도인 6.6 kPa에서 8시간 이후에 100% 전환율을 얻을 수는 있었지만 가장 낮은 반응속도를 나타내었다. 이와 같은 결과는 효소가 필요로하는 최저의 수분까지 제거되었기 때문인 것으로 사료된다. 반면 13.3 kPa에서는 반응속도 및 최대값에 도달하는 평형시간 역시 가장 빠른 것으로 나타나 13.3 kPa가 최적 진공도로 선정되었다(도 4 참조).

[0073] **5. 효소량**

[0074] 효소는 경제성 검토에 중요한 요소이다. 효소량 실험에서 반응온도는 50℃, 기질의 몰비율은 1:3 (adipic acid : isononyl alcohol), 진공도는 13.3 kPa 이었다. 조사된 효소량은 기질대비 무게로 2.5, 5, 10, 15, 20% 이었다. 2.5% 효소량에서는 전 반응시간에서 4% 이하의 합성율을 나타내었다. 반면 효소량이 10% 까지 증가함에 따라 급속히 전환율이 증가 하였다. 그리나 효소량이 10% 이상 증가함에 따라 반응속도는 다소 증가 하였지만 최대 전환율에 도달하는 평형 시간은 큰 차이를 나타내지 않았다. 따라서 최적 효소량으로는 기질대비 10%가 최적인 것으로 나타났다. (도 5 참조)

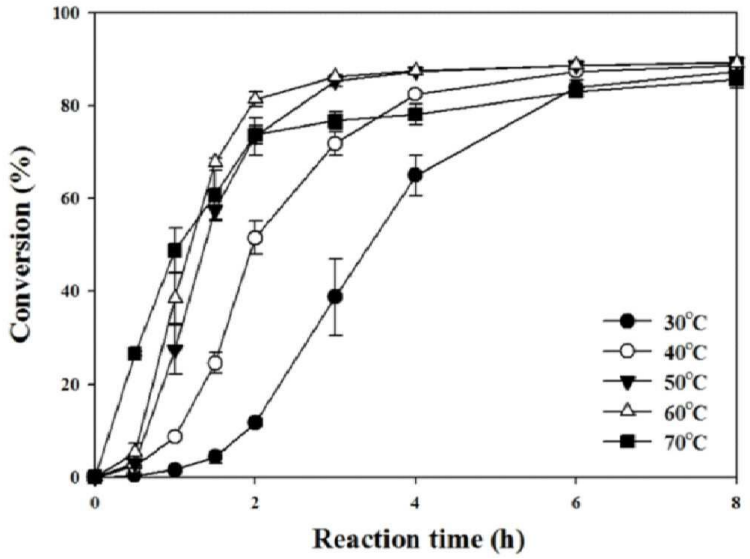
[0076] **6. 결론**

[0077] 디아이소노닐 아디페이트 (diisononyl adipate)가 본 발명에서 상업용 액체효소를 이용하여 제조된 고정화된 효소를 이용 100%의 전환율을 나타내는 성공적 결과를 얻었다. 최적조건하에서 6시간 이내에 100% 전환율을 달성하였고 효소를 이용한 방법으로는 최초의 결과로서 친환경 공정으로 산업화가 높은 결과이다.

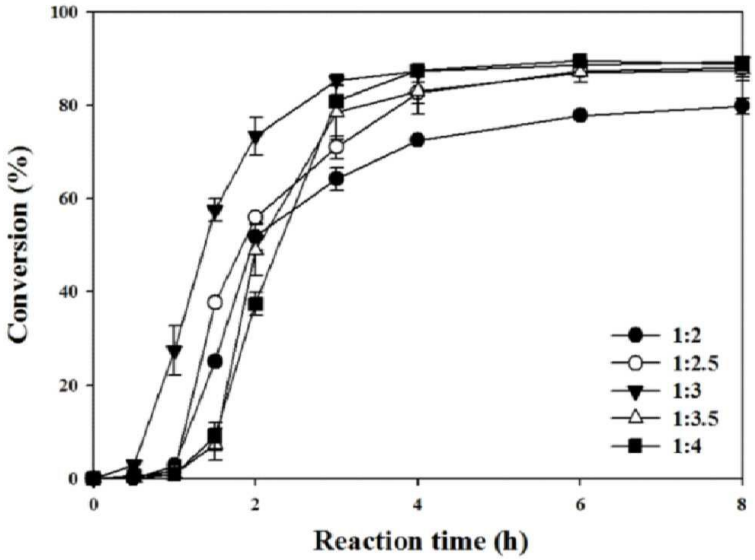
[0079] 이상으로 본 발명 내용의 특정한 부분을 상세히 기술하였는바, 당업계의 통상의 지식을 가진 자에게 있어서, 이러한 구체적 기술은 단지 바람직한 실시 양태일 뿐이며, 이에 의해 본 발명의 범위가 제한되는 것이 아닌 점은 명백할 것이다. 따라서 본 발명의 실질적인 범위는 첨부된 청구항들과 그것들의 등가물에 의하여 정의된다고 할 것이다.

도면

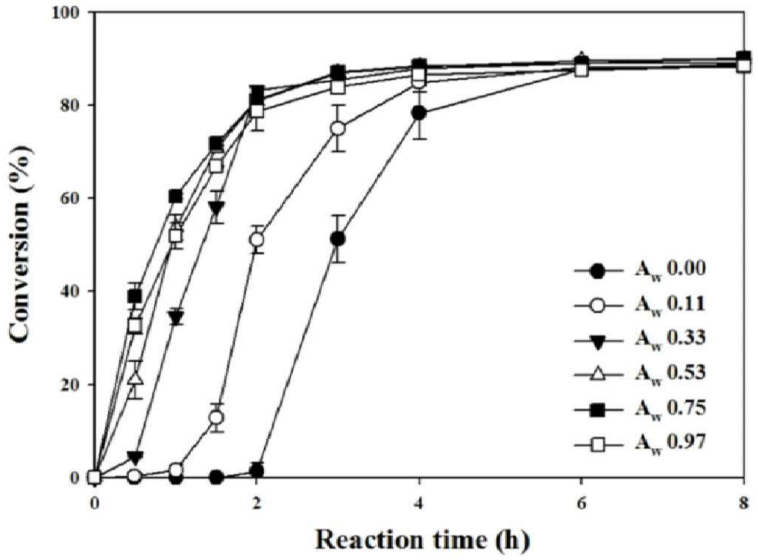
도면1


Conversion (%)
Reaction time (h)
30°C
40°C
50°C
60°C
70°C

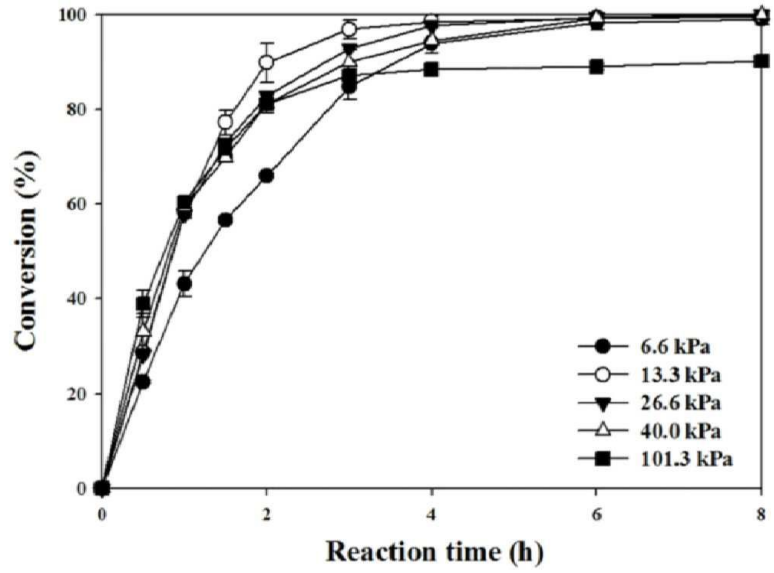
도면2


Conversion (%)
Reaction time (h)
1:2
1:2.5
1:3
1:3.5
1:4

도면3


Conversion (%)
Reaction time (h)
A_w 0.00
A_w 0.11
A_w 0.33
A_w 0.53
A_w 0.75
A_w 0.97

도면4


Conversion (%)
Reaction time (h)
6.6 kPa
13.3 kPa
26.6 kPa
40.0 kPa
101.3 kPa

도면5

