



(19) 대한민국특허청(KR)
(12) 공개특허공보(A)

(11) 공개번호 10-2012-0029753
(43) 공개일자 2012년03월27일

(51) 국제특허분류(Int. Cl.)

C12P 7/64 (2006.01) *C12N 9/20* (2006.01)

C10L 1/08 (2006.01) *C12R 1/445* (2006.01)

(21) 출원번호 10-2010-0091783

(22) 출원일자 2010년09월17일

심사청구일자 2010년09월17일

(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

이중호

서울특별시 성북구 안암로 145, 공학관 734호 (안
암동5가, 고려대학교)

(뒷면에 계속)

(74) 대리인

유미특허법인

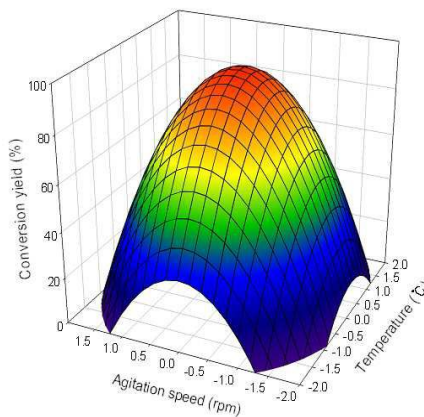
전체 청구항 수 : 총 10 항

(54) 발명의 명칭 동시고정화 리파아제를 이용한 바이오디젤 생산 방법

(57) 요약

1,3-위치선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 사용하여 유지로부터 바이오디젤을 생산하는 조건 및 이를 기반으로 하는 바이오디젤의 생산 방법이 제공된다.

대표도 - 도1a



(72) 발명자

김성봉

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)

현동훈

대전광역시 유성구 가정로 65, 109동 706호 (신성동, 대림두레아파트)

특허청구의 범위

청구항 1

알코올과 유지를 반응기질로 하는 바이오디젤 제조 방법에 있어서,

무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 사용하고,

반응온도가 36 내지 54℃, 교반속도가 160 내지 340 rpm, 반응기질에 첨가된 수분함량이 유지 중량 기준으로 1 내지 20 중량%, 동시고정화 리파아제 농도가 유지 중량 기준으로 10 내지 50 중량%인 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 2

제1항에 있어서,

상기 무위치 선택성 리파아제는 스태필로코커스 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,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 3

제2항에 있어서,

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

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

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 4

제1항에 있어서,

상기 동시고정화 리파아제 내의 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치선택성 리파아제 간의 비율은 중량 기준으로 1:3 내지 3:1인,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 5

제1항에 있어서,

상기 유지는 식물성 유지 및 폐유로 이루어진 군에서 선택된 것이고

상기 알코올은 탄소수 1 내지 4의 직쇄 또는 분지쇄 알코올인,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 6

제1항 내지 제5항 중 어느 한 항에 있어서,

반응온도가 44 내지 48℃, 교반속도가 240 내지 260 rpm, 반응기질 내 수분함량이 유지 중량 기준으로 7 내지 15 %, 및 동시고정화 리파아제 농도가 유지 중량 기준으로 20 내지 50 중량%인 조건하에서 수행되는 것을 특징

으로 하는,

바이오디젤의 제조 방법.

청구항 7

무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 포함하는, 바이오디젤 제조용 리파아제 조성물.

청구항 8

제7항에 있어서,

상기 무위치 선택성 리파아제는 스태필로코커스 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,

바이오디젤 제조용 리파아제 조성물.

청구항 9

제8항에 있어서,

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

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

바이오디젤 제조용 리파아제 조성물.

청구항 10

제7항 내지 제9항 중 어느 한 항에 있어서,

상기 동시고정화 리파아제 내의 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치선택성 리파아제 간의 비율은 중량 기준으로 1:3 내지 3:1인,

바이오디젤 제조용 리파아제 조성물.

명세서

기술분야

[0001] 본 발명은 기존의 고정화된 1,3-위치선택성 및 무위치 선택성 리파아제 보다 높은 활성을 나타내기 위해 두 가지 리파아제를 하나의 담체에 동시고정화 하여 효소간 간격을 극소화시켜 바이오디젤의 생산을 위해 활성이 극대화된 동시고정화 리파아제를 이용하여 식용 또는 비식용 유지로부터 바이오디젤을 생산하기 위해 반응조건인 반응온도, 교반속도, 수분함량에 관한 공정변수를 최적화하는 기술에 관한 것으로, 보다 구체적으로, 식용 또는 비식용 유지를 기질로 하여 상기 반응조건 하에서 상기 동시고정화 리파아제를 반응시키는 단계를 포함하는 바이오디젤 생산 방법에 관한 것이다.

배경기술

[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 바이오에너지의 사용의무화를 강력하게 권고하는 정책이 포함되어 석유를 대체할 수 있는 새로운 에너지 자원의 개발이 절실히 요구되고 있다. 많은 대체에너지들이 개발되고 있지만 대부분의 경우 그러한 에너지를 이용 할 수 없어 실용화에 어려움이 많다. 그러나 바이오디젤은 기존의 석유계 경유와 성질이 매우 유사하고 기존의 경유자동차에 엔진의 변형 없이도 직접 연료로 쓸 수 있으며, 공해가 거의 발생하지 않아 대체에너지로 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 청정에너지원으로 평가받고 있다. 또한, 바이오디젤은 경유대체 에너지 뿐만 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. 효소공정에는 엔진을 부식시키는 화학촉매가 존재하지 않아 분리정제 공정을 단순화시킬 수 있으며, 부산물로 얻어지는 글리세롤을 제품화하여 바이오디젤의 생산단가를 낮출 수 있다.
- [0007] 효소를 이용한 생물공정은 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.
- [0008] 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 효소적 공정에 많이 사용된다. 뿐만 아니라 이부프로펜계열인 (R, S)-나프록센과 (R, S)-케토프로펜 과 같은 광학이성질체의 분리, 생산에도 이용되는 등 그 산업적 가치는 날로 증가하고 있다.
- [0009] 이러한 리파아제가 실제 산업에 쓰이기 위해서는 고정화 리파아제의 제조가 필수적이다. 레비와 푸시에 의한 미국특허 제 4,141,857 호는 알데히드기와 효소의 아미노기 사이의 공유결합을 형성시켜 효소와 담체를 접촉시키는 고정화 기술이 개시되어 있다. 이러한 기술에 따라, 본 발명자들은 리파아제의 고정화시에 담체의 포어 크기 제어나 다른 첨가제를 사용하지 않으면서도 간단한 방법으로 리파아제를 담체에 고정화시키기 전에 전처리 과정을 거침으로서 높은 효소의 활성을 유지할 수 있도록 할 수 있는 방법을 개발하였을 뿐만 아니라 (등록특허 10-0817775), 효소의 활성과 안정성을 극대화시킬 수 있는 버퍼 혼합시스템을 개발하여 고활성 고안정성의 고정화 효소를 개발하였다 (Jong Ho Lee et al., *Bioresour. Technol.* 101, pp s66-s70, January 2010).
- [0010] 그러나, 바이오디젤을 보다 높은 수율로 생산하기 위하여, 상기 고정화된 효소 시스템을 이용하여 수행되는 바이오디젤 생산 공정 조건의 최적화가 요구된다.

발명의 내용

해결하려는 과제

- [0011] 이러한 요구에 따라, 본 발명자들은 극대화된 활성의 효소를 이용하여 물질전달의 저해 현상이 높은 비식용 또

는 식용 유지의 바이오디젤 생산공정에 적용하고 통계학적 분석방법을 이용하여 공정 변수를 최적화하여 대부분의 비식용 또는 식용 유지를 이용한 바이오디젤 생산공정에 적용할 수 있는 고효율 생산공정을 개발함으로써 본 발명을 완성하였다.

[0012] 따라서, 본 발명은 1,3-위치선택성 리파아제 및 무위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 사용하여 식용 또는 비식용 유지로부터 바이오디젤을 생산하는 조건 및 이를 기반으로 하는 바이오디젤의 생산 방법을 제공한다.

과제의 해결 수단

[0013] 상기 목적을 달성하기 위하여, 본 발명은 동시 고정화된 리파아제를 이용하고 식용 또는 비식용 유지로부터 통계학적 분석방법을 이용하여 최적화를 수행하여 고효율의 바이오디젤의 생산공정을 개발하는 것을 특징으로 하며, 특히 폐유로부터 바이오디젤을 생산할 수 있어, 전반적인 식용 또는 비식용 유지를 적용할 수 있는 고효율 바이오디젤 생산공정을 개발하는 것을 특징으로 한다.

[0014] 즉, 본 발명의 주된 목적은 동시고정화된 리파아제를 이용하여 비식용 작물 유지(예컨대, jathropa oil)을 이용한 바이오디젤 생산을 수행하고 공정변수를 최적화하고 이를 더 가혹한 조건인 폐유에 적용시킴으로써 고효율 바이오디젤 생산공정을 제공하는 것이다.

[0015] 이를 위하여, 본 발명의 일례는 하기 단계들을 포함하는 고효율 리파아제를 제조하고 바이오디젤을 생산하는 과정에서 효소의 활성을 유지시킬 수 있는 최적의 반응 조건을 확립하는 방법을 제공한다.

[0016] a) 통계학적 실험설계 (statistical experimental designs)를 이용하여 식용 또는 비식용 작물 유지(예컨대, jathropa oil 등)로부터 바이오디젤을 생산하기 위한 최적 조건을 확립하는 단계; 및

[0017] b) 상기 최적화된 생산공정을 폐유에 적용하여 고효율 바이오디젤 생산공정을 확립하는 단계.

[0018] 이와 같이, 동시고정화 리파아제를 이용하여 jathropa 유지로부터 바이오디젤을 생산하기 위한 생산공정을 통계학적 분석 방법을 이용하여 공정 조건을 최적화하여 효소의 활성과 반응성이 극대화시킬 수 있다. 이와 같이 얻어진 최적화 조건은 다른 식용 또는 비식용 유지에도 적용 가능한 바이오디젤 생산공정의 개발에 기초를 제공한다.

[0019] 이에, 본 발명에서의 다른 일례는 상기와 같이 얻어진 최적화 조건하에서 동시고정화 리파아제를 이용하여 유지로부터 바이오디젤을 생산하는 것을 특징으로 하는 바이오디젤 생산 방법을 제공한다.

[0020] 보다 구체적으로, 상기 바이오디젤 생산 방법은,

[0021] 알코올과 유지를 반응기질로 하는 바이오디젤 제조 방법에 있어서, 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 사용하고,

[0022] 반응온도가 36 내지 54℃, 바람직하게는 40 내지 50℃, 보다 바람직하게는 44 내지 48℃, 더욱 바람직하게는 45 내지 46℃이고, 교반속도가 160 내지 340 rpm, 바람직하게는 200 내지 300 rpm, 보다 바람직하게는 240 내지 260 rpm, 더욱 바람직하게는 245 내지 255 rpm이며, 반응기질 내 수분함량이 유지 중량 기준으로 1 내지 20 중량%, 바람직하게는 7 내지 15 중량%, 보다 바람직하게는 9 내지 12 중량%, 더욱 바람직하게는 10 내지 11 중량%이고, 유지에 대한 동시고정화 리파아제 농도가 10 중량% 이상 (예컨대, 10 중량% 내지 50 중량% 또는 10 중량% 내지 30 중량%), 바람직하게는 15 중량% 이상 (예컨대, 15 내지 50 중량% 또는 15 내지 30 중량%), 보다 바람직하게는 20 중량% 이상 (예컨대, 20 내지 50 중량% 또는 20 내지 30 중량%)인 조건 하에서 수행되는 것을 특징으로 하는 것일 수 있다. 상기 반응기질 내의 수분함량은 반응기질로서 알코올과 유지가 물과 함께 반응에 참여하게 되는데, 이때 함유된 물의 함량을 의미한다.

[0023] 바이오디젤 (biodiesel)은 동식물성 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) 반응 시 제조되는 지방산 메틸에스테르 (FAME)가 바이오디젤이다. 바이오디젤은 생분해가능하고 (biodegradable), 무해하며 (nontoxic), 발암성 공해물질인 황 (sulfur)이나 방향족 (aromatic)을 포함하지 않는다는 장점이 있다. 또한, 바이오디젤인 지방산 메틸에스테르는 분자내에 10% 이상의 산소를 포함할 수 있으므로, 값비싼 산소첨가제를 첨가하지 않아도, 완전

연소를 도와서 분진 또는 일산화탄소의 방출이 감소시킨다는 장점이 있다.

[0024] 본 발명은 효소공정에 두 가지 종류의 리파아제, 즉 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 것을 사용하는 것을 특징으로 하는 것으로, 바이오디젤 제조시 생산시간을 최소화하며 생산 효율을 최대화하기 위하여 그 공정 조건을 최적화한 것을 특징으로 한다.

[0025] 상기한 바와 같이, 본 발명에 따른 효소공정은 반응온도 36 내지 54℃, 바람직하게는 40 내지 50℃, 보다 바람직하게는 44 내지 48℃, 더욱 바람직하게는 45 내지 46℃, 교반속도가 160 내지 340 rpm, 바람직하게는 200 내지 300 rpm, 보다 바람직하게는 240 내지 260 rpm, 더욱 바람직하게는 245 내지 255 rpm이며, 반응물 내 수분함량이 1 내지 20 중량%, 바람직하게는 7 내지 15 중량%, 보다 바람직하게는 9 내지 12 중량%, 더욱 바람직하게는 10 내지 11 중량%인 조건 하에서 수행되는 것이 좋다. 상기 수치범위는 실시예 1에 예시된 바와 같은 통계학적 분석 방법에 의하여 최적 조건으로 선정된 범위이다 (실시예 1 및 도 1a 내지 도 3b 참조).

[0026] 본 발명에 따라서 상기와 같은 조건 하에서 효소 공정을 수행하여 바이오디젤을 생산하는 경우, 반응 4 시간 만에 바이오디젤 전환율이 99.52 %로 거의 100%에 가까운 전환율을 얻을 수 있다 (도 4 참조). 기존에 고정화된 일반적 리파아제를 단독 이용하여 바이오디젤 제조시 90%의 전환율에 도달하기 까지는 걸리는 시간은 50시간 이상이며, 고정화된 리조포스 오라이제 리파아제의 경우에는 60시간 이상 걸리며, 각각 고정화된 1,3-위치특이성 리파아제(1,3-specific lipase)와 무위치 선택성 (non-specific lipase)를 혼합하여 함께 이용한 효소 공정에서도 90%이상의 전환율에 도달하기 까지 걸리는 시간은 18시간 이상이 걸리는 것으로 보고(한국특허등록 제 0673837호 참조, 본 명세서에 참조로서 포함됨)된 것을 고려할 때, 본 발명에 따른 바이오디젤 생산 방법은 기존의 방법과 비교하여 현저하게 짧은 시간동안 높은 전환율을 보이는 매우 효과적이고 효율적인 방법이다.

[0027] 따라서, 본 발명에 따른 바이오디젤의 생산 방법은 리파아제에 의한 효소 반응 개시 후 3 내지 5시간, 바람직하게는 3.5 내지 4.5 시간 이내에 바이오디젤로의 전환율이 80% 이상, 바람직하게는 90% 이상, 보다 바람직하게는 99% 이상, 더욱 바람직하게는 99.5% 이상인 것을 특징으로 한다. 이 때 바이오디젤로의 전환율은 아래의 식 1에 따라 계산된 것일 수 있다:

[0028] [식 1]

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

[0029]

[0030] 바이오디젤 생산 방법에서 사용되는 효소공정에서 사용되는 리파아제는 위치 선택성에 따라 1,3-위치 선택성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제로 분류할 수 있다. 본 발명에서 정의한 바에 따르면, '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, '무위치 선택성 리파아제 (non-specific lipase)'는 모든 트리글리세라이드의 모든 세 가지의 지방 아실기와 반응하는 리파아제를 의미한다.

[0031] 본 발명의 바람직한 일례에 있어서, 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시에 고정화된 것을 특징으로 한다. 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 스태필로코커스 오리우스 (Staphylococcus aureus), 페니실린 사이클로피움 (Penicillium cyclopium), 코리네박테리움 아크네스 (Corynebacterium acnes), 캔디다 루고사 (Candida rugosa) 등에서 유래한 것일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서는 1,3-위치 선택성 리파아제로서 리조포스 오라이제 (Rhizopus oryzae) 리파아제를, 무위치 선택성 리파아제로서 캔디다 루고사 (Candida rugosa) 리파아제를 사용하였다.

[0032] 본 발명에 있어서, 상기 1,3-위치특이성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제의 첨가되는 비율은 다양하게 조절 가능하나, 1:3 내지 3:1 중량비로 사용되는 것이 좋으며, 바람직하게는 1:2 내지 2:1, 보다 바람직하게는 1:0.8 내지 1.2 (약 1:1)의 중량비로 사용되는 것이 좋다. 본 발명자의 선행특허등록 제0883397호(본 명세서에 참조로서 포함됨)의 효소의 혼합비율에 따른 바이오디젤의 생산성을 비교한 그래프(도 6)에서 알 수 있는 바와 같이, 캔디다 루고사 리파아제와 리조포스 오라이제 리파아제의 혼합비율을 1:1, 2:1, 3:1, 1:2, 1:3으로 변화

시키면서 바이오디젤의 생산성을 비교한 결과, 생산성에는 많은 차이를 보이지 않았지만 그 중에 캔디다 루고사와 리조포스 오라이제의 비율이 1:1일 때 바이오디젤로의 전환율이 가장 높음을 확인하였다.

[0033] 본 발명에서 사용된 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제는 자유로운 (free) 형태 또는 고정화된 형태로 사용될 수 있으나, 바람직하게는 통상의 담체 (예컨대 실리카겔 등)에 고정화된 리파아제인 것을 특징으로 한다. 본 발명에서 리파아제를 고정화시키는 방법은 특별히 제한되지 않으며 다양한 응용이 가능하다. 예를 들어, 흡착법, 포괄법 등의 물리적인 방법, 공유결합법, 가교연결방법 등의 화학적인 방법을 사용할 수 있다. 본 발명의 실시예에서는 아미노기를 가지고 있는 담체에 리파아제 용액과 글루타르알데히드를 반응시켜 리파아제와 담체 사이에 가교반응을 일으켜 효소를 막 위에 고정화시켰다.

[0034] 본 발명의 바람직한 예에서, 상기 리파아제는 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체, 바람직하게는 아미노기를 갖는 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제일 수 있다. 하기하는 실시예 2와 비교예에서 확인되는 바와 같이, 무위치 선택성 리파아제 및 1,3-위치 선택성 리파아제가 동시고정화된 리파아제를 사용하는 경우 반응 4시간만에 바이오디젤 전환율이 99.52 %로 거의 100%에 가까운 수치를 보인 반면 (도 4 참조), 각각 따로 고정화된 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치 선택성 리파아제를 1:1의 중량비로 사용하는 경우에는 반응 4시간에는 약 20% 정도의 바이오디젤 전환율이 약 20%에 불과하고, 18시간 후에 93.1%, 25시간 후에 95%에 도달하는 것으로 나타나서, 동시고정화된 리파아제를 사용하는 것이 각각 고정화된 리파아제를 혼합하여 사용하는 경우보다 반응시간과 바이오디젤 전환율 측면에서 매우 우수한 효과를 보이는 것을 확인하였다.

[0035] 본 발명에서 리파아제(바람직하게는 동시고정화 리파아제)의 사용량과 관련하여, 본 발명자의 선행특허등록 제 0883397호(본 명세서에 참조로서 포함됨)의 도 5에 나타난 바와 같이, 혼합 효소(캔디다 루고사 리파아제 + 리조포스 오라이제 리파아제)의 양을 유지의 투입량의 5 내지 30 중량%까지 5 중량%의 간격으로 실험하였을 때, 혼합효소의 양이 10 중량% 이상이면 전환율이 50%를 넘고, 20중량% 이상이면 거의 100%에 가까운 전환율을 나타내는 것으로 확인되었다. 또한, 혼합효소의 양이 20 중량% 이상인 경우에는 혼합효소 사용량이 증가함에 따라 전환율이 크게 증가하지 않았다.

[0036] 따라서, 본 발명에 있어서 리파아제(바람직하게는 동시고정화 리파아제)의 사용량은 기질인 유지 중량 기준으로 10 중량% 이상 (예컨대, 10 중량% 내지 50 중량% 또는 10 중량% 내지 30 중량%), 바람직하게는 15 중량% 이상 (예컨대, 15 내지 50 중량% 또는 15 내지 30 중량%), 보다 바람직하게는 20 중량% 이상 (예컨대, 20 내지 50 중량% 또는 20 내지 30 중량%)인 것이 좋다. 이 중에서도, 효소 사용량과 얻어지는 효과를 고려할 때, 가장 효과적이고 적절한 효소의 사용량은 유지 질량 대비 약 20 중량%일 때인 것으로 확인하였다.

[0037] 본 발명의 바이오디젤 생산 방법에서 기질로 사용되는 유지는 통상적으로 바이오디젤의 생산에 사용될 수 있는 모든 식용 또는 비식용 유지, 바람직하게는 식물성 (식용 또는 비식용 작물) 유지 및 폐유를 포함한다. 예컨대, 상기 유지는 자트로파(jathropa), 팜유, 대두유, 카놀라유, 옥수수유, 해바라기유 등으로 이루어진 군에서 선택된 유지; 및 상기 유지의 폐유로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0038] 본 발명의 바이오디젤 생산 방법에서, 상기 유지와 함께 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. 예컨대, 상기 알코올은 에탄올, 메탄올, 1-프로판올, 이소-프로판올, 1-부탄올, 2-부탄올, 이소-부탄올 및 테르-부탄올 등으로 이루어진 군에서 선택된 1종 이상일 수 있다.

[0039] 본 발명에서의 유지와 알코올의 사용량은 통상의 바이오디젤 제조 공정에 따르며, 예컨대, 몰 기준으로 1:1 내지 10, 또는 1: 3 내지 7 (유지 몰수:알코올 몰수)의 혼합비로 사용할 수 있으나, 이에 제한되는 것은 아니다.

[0040] 본 발명에 있어서, 유지와 알코올을 기제로 하고 동시고정화 리파아제를 이용하여 최적화된 조건 하에서 바이오디젤을 생산하는 방법으로 생산된 바이오디젤(메틸에스테르)은 대체연료, 윤활유의 원료, 윤활유 첨가제뿐만 아니라 무공해 용제, 페인트 및 농약 등에 사용가능하다. 또한 바이오디젤은 섬유, 세제, 화장품 산업에서 다량 사용하는 독성 계면활성제를 대체하는 환경 친화성 에톡시드 메틸에스테르, 황산염화 메틸에스테르, 알콜아민계 메틸에스테르의 중간체로서도 유용하다.

[0041] 상기한 바와 같이, 본 발명에서 사용된 따른 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제는 기존에 사용되던 각각 고정화된 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치 선택성 리파아제의 혼합물과 비교하여 반응시간 및 바이오디젤 전환율에 있어서 현저하게 우수한 효과를 보인다

로, 상기 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제는 바이오디젤 제조용 리파아제로서 매우 유용하다.

[0042] 따라서, 본 발명의 다른 예는 무위치 선택성 리파아제와 1,3-위치 선택성 리파아제가 하나의 담체에 동시고정화된 동시고정화 리파아제를 포함하는, 바이오디젤 제조용 리파아제 조성물을 제공한다.

[0043] 상기 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, 상기 무위치 선택성 리파아제는 스태필로코커스 오리우스 (*Staphylococcus aureus*), 페니실린 사이클로피움 (*Penicillium cyclopium*), 코리네박테리움 아크네스 (*Corynebacterium acnes*), 캔디다 루고사 (*Candida rugosa*) 등에서 유래한 것일 수 있다. 본 발명의 바람직한 구체예에서는 1,3-위치 선택성 리파아제로서 리조포스 오리아제 (*Rhizopus oryzae*) 리파아제를, 무위치 선택성 리파아제로서 캔디다 루고사 (*Candida rugosa*) 리파아제를 사용하였다.

[0044] 본 발명에 있어서, 상기 1,3-위치특이성 리파아제와 무위치 선택성 리파아제의 첨가되는 비율은 다양하게 조절 가능하나, 1:3 내지 3:1 중량비로 사용되는 것이 좋으며, 바람직하게는 1:2 내지 2:1, 보다 바람직하게는 1:0.8 내지 1.2 (약 1:1)의 중량비로 사용되는 것이 좋다.

[0045] 본 발명에서 리파아제 고정화 시키는 방법은 특별히 제한되지 않으며 다양한 응용이 가능하다. 예를 들어, 흡착법, 포괄법 등의 물리적인 방법, 공유결합법, 가교연결방법 등의 화학적인 방법을 사용할 수 있다.

[0046] 상기 담체는 특별한 제한이 없으며, 리파아제가 고정될 수 있는 표면을 갖고 리파아제 고정에 통상적으로 사용되는 모든 종류를 사용할 수 있고, 예컨대, 실리카겔, 고분자 비드, 등으로 이루어진 군에서 선택된 것일 수 있으며, 바람직하게는 표면에 아미노기 등의 작용기를 갖는 것일 수 있다.

발명의 효과

[0047] 본 발명은 동시고정화 리파아제를 이용하여 jathropa 유지에서부터 바이오디젤 생산공정을 통계학적 분석방법을 이용하여 최적화 하고 이러한 공정을 가혹조건인 폐유공정에 적용함으로써 비식용 유지로부터 바이오디젤 생산공정을 개발함으로써 현재 대두되고 있는 식량문제를 해결할 수 있으며 대체에너지문제 또한 해결할 수 있으며로 현재 에너지 산업상 매우 유용한 발명인 것이다.

도면의 간단한 설명

[0048] 도 1a 및 1b는 반응온도와 교반속도의 반응표면 중앙혼합설계 실험에 의해 최적화된 3차원 반응표면(1a)과 등고선(1b)을 도시한 그래프이다.

도 2a 및 2b는 반응온도와 수분함량의 반응표면 중앙혼합설계 실험에 의해 최적화된 3차원 반응표면(1a)과 등고선(1b)을 도시한 그래프이다.

도 3a 및 1b는 교반속도와 수분함량의 반응표면 중앙혼합설계 실험에 의해 최적화된 3차원 반응표면(1a)과 등고선(1b)을 도시한 그래프이다.

도 4는 실시예 2에서 동시고정화된 리파아제를 사용한 경우의 시간의 경과에 따른 폐유에서 바이오디젤로의 전환율을 도시한 그래프이다.

도 5는 비교예에서 각각 고정화된 리파아제가 1:1로 혼합된 것을 사용하는 경우의 시간의 경과에 따른 폐유에서 바이오디젤로의 전환율을 도시한 그래프이다.

발명을 실시하기 위한 구체적인 내용

[0049] 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.

[0050] **참조 예 1. 리파아제의 준비**

[0051] 무위치 선택성 리파아제인 캔디다 루고사 (*Candida rugosa*) 리파아제는 미국의 시그마 (Sigma Co., USA)사에서 구입하였으며, 1,3-위치특이성 리파아제인 리조포스 오라이제 (*Rhizopus oryzae*) 리파아제는 독일의 플루카 (Fluka Co., Germany)에서 구입하였다.

[0052] **참조 예 2. 리파아제 고정화를 위한 담체의 제조**

[0053] 리파아제 고정화를 위한 담체로서 활성화된 실리카겔(silica gel)을 다음의 방법으로 제조하여 사용하였다.

[0054] 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.

[0055] **참조 예 3. 리파아제의 전처리 공정**

[0056] 130U/mg의 캔디다 루고사(*Candida rugosa*) 리파아제와 41.6U/mg의 리조포스 오라이제(*Rhizopus oryzae*) 리파아제를 용해시킨 각각의 수용액 10mL와 대두유 (Soybean oil) 10mL (리파아제 용액:대두유=1:1(v/v))를 37℃, 200rpm에서 30분 동안 반응시켜 대두유의 가수분해 반응을 유도함으로써, 효소의 활성을 유지할 수 있도록 리파아제를 전처리하였다.

[0057] **참조예 4. 리파아제의 고정화**

[0058] 참조예 2와3에서와 같이 두 종류의 리파아제 용액을 준비하고 전처리 한 후, 각각 다음의 가교연결방법 (cross-linking method)을 이용하여 실리카겔에 고정화 시켰다.

[0059] 고정화 담체인 실리카겔을 35%(v/v)의 H₂O₂로 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, 두 종류 리파아제를 하나의 실리카겔 입자에 동시고정화하였다.

[0060] **실시예 1. 통계학적 분석방법 (Statistical analysis method)을 통한 유지로부터 바이오디젤의 최적 생산 조건 확립**

[0061] 본 발명에서는 최적의 바이오디젤 생산공정을 개발하기 위하여 가수분해를 빠른 속도로 진행시킬 수 있는 무위치 선택성 리파아제인 캔디다 루고사 리파아제 (*Candida rugosa* lipase)와 에스테르화 반응을 빠르게 진행시킬 수 있는 1,3-위치 선택성 리파아제인 리조포스 오라이제 리파아제 (*Rhizopus oryzae* lipase)를 도입하여 동시고정화를 수행하고, 이를 jathropa 유지로부터 바이오디젤을 생산하는 공정에 적용시켰다.

[0062] 보다 구체적으로, 반응기질로는 jathropa 유지 (한국석유품질관리원, 1 내지 4 mmol)과 메탄올 (1 내지 5 mmol)을 사용하였다. 증류수를 jathropa 유지 중량의 10 내지 20중량%로 반응기질에 투입하였으며, 아래의 표 1의 조건 하에서 4시간동안 반응시켰다. 또한, 효소로서 사용되는 상기에서 준비된 캔디다루고사와 리조포스 오라이제 리파아제의 비율이 1:1인 동시고정화 리파아제의 사용량은 jathropa 유지 중량의 20 중량%에 해당하는 0.5g으로 하였다.

- [0063] 통계학적 분석방법을 통해 설계한 반응조건은 실험설계 (표 1)에 따라 설계하였으며 효소의 농도는 유지 중량대 비 20중량%로 하고, 효소로는 상기에서 준비된 캔디다루고사와 리조포스 오라이제 리파아제의 비율이 1:1인 동 시고정화 효소를 사용하였다. 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.
- [0064] 분석은 다음과 같은 조건에서 수행하였다. 인젝터 (Injector)는 260℃ 이고, 오븐 (oven)은 150℃부터 180℃까 지는 15℃/min으로 승온, 240℃까지는 5℃/min으로 승온하여 240℃에서는 1분동안 retention하였다. 검출기 (Detector)로는 FID를 260℃ 조건에서 사용하였다. 인젝션 볼륨 (Injection volume)은 1μL로 하였고, 스플릿 비율 (split ratio)은 20:1로 하였다. 운반가스 (carrier gas)로 헬륨 (He)을 사용하였으며 유속은 1 ml/min 로 하였고, 공기 (air)는 280 ml/min, 수소 (H₂)는 40 ml/min으로 주입하였다. Make up flow는 헬륨을 사용하 였으며, 유속은 30 ml/min으로 하였다. 유지 (oil)을 메탄올 (methanol)과 트랜스에스테르화 (transesterification) 하였을 때 주 생성물은 메틸 팔미테이트 (Methyl palmitate), 메틸 스테아레이트 (methyl stearate), 메틸 올레이트 (methyl oleate), 메틸 리놀리 에이트 (methyl linoleate), 및 메틸 리놀레 네이트 (methyl linolenate)이므로, 그 생산물을 GC로 분석하여 위의 5가지 지방산 메틸에스테르(FAME)의 몰수 를 계산하였다. 바이오디젤의 전환율은 다음의 [식 1-1]로 계산하였다.
- [0065] [식 1-1]
- [0066]
$$\text{전환율} = (\text{moles of FAMES}) / (\text{moles of oil} \times 3) \times 100$$
- [0067] 통계학적 실험설계 (statistical experimental design)를 이용하여 최적의 바이오디젤 생산공정을 확립하기 위 하여, 실험설계는 18개 세트로 구성된 분류변수 설계를 실시하였고, 바이오디젤의 전환율에 영향을 주는 가장 중요한 요소를 결정하는데 사용하였다. 각 변수는 식 2에 따라 할당되었다.
- [0068] [식 2]
- [0069]
$$x_i = (X_i - X_0) / \Delta X \quad i = 1, 2, 3, \dots, j$$
- [0070] 여기서, x_i 는 독립변수의 코드화된 값 (coded value), X_i 는 독립변수의 실제값 (real value), X_0 은 중앙값 (center point)에서 독립변수의 실제값 (real value)이며, ΔX 는 단계별 변화값 (step change value)을 나타낸 다. 본 발명에서 조사되는 변수들의 범위와 수치는 표1에 나타내었다. 실험데이터의 실험적 적합성은 분산분 석 (analysis of variance)을 통하여 산출된 다항식 회귀 (polynomial regression)에 따랐다.
- [0071] 2차 다항식 (empirical second-order polynomial model)을 저감화하기 위해, 5개의 코드화 수준을 가진 중앙 혼합설계 (central composite design)을 실시하였으며 통계학적 실험설계의 거동은 다음과 같은 2차 다항식[식 3]으로 설명될 수 있다.
- [0072] [식 3]
- [0073]
$$y = \beta_0 + \sum \beta_i X_i + \sum \beta_{ii} x_i^2 + \sum \beta_{ij} X_i X_j$$
- [0074] 단, y 는 반응변수이고, β 는 회귀계수 (regression coefficients), x 는 독립변수의 코드화 수준 (coded leve l)이다. 얻어진 실험값의 통계학적 분석을 위해 SAS 9.1.3 package를 사용하였다. 2차 다항식의 통계적 유의 성은 F-value에 따라 결정하였으며, 상기 식에 따라 설명된 편차는 복합결정계수 (multiple coefficient of determination), R^2 에 따라 제공되었다 ('Optimization of cell conditions for enzymatic fuel cell using statistical analysis' Journal of Industrial and Engineering Chemistry 14 (2008) 338-343 참조).

표 1

중앙 혼합설계 (central composite design)를 위한 각 변수의 범위

	Symbol	Coded value				
		-1.682	-1	0	+1	+1.682
Temperature (℃)	36.6 ℃	7.2ml	40 ℃	45 ℃	50 ℃	53.4 ℃
Agitation speed (rpm)	X ₂	166 rpm	200 rpm	250 rpm	300 rpm	334 rpm
Water content (%)	X ₃	1.6 %	5 %	10 %	15 %	18.4 %

[0075]

표 2

중앙 혼합 설계 (central composite design)의 실험 설계 및 그 결과

Run	Temperature (℃)	Agitation speed (rpm)	Water content (%)	Conversion yield (%)
1	-1	-1	-1	33.08
2	-1	-1	1	49.13
3	-1	1	-1	32.71
4	-1	1	1	33.39
5	1	-1	-1	40.08
6	1	-1	1	63.89
7	1	1	-1	46.94
8	1	1	1	49.32
9	-1.682	0	0	55.73
10	1.682	0	0	75.15
11	0	-1.682	0	35.36
12	0	1.682	0	56.01
13	0	0	-1.682	62.15
14	0	0	1.682	65.87
15	0	0	0	91.38
16	0	0	0	94.10
17	0	0	0	94.48
18	0	0	0	86.42

[0076]

표 3

온도, 교반속도, 수분함량에서 바이오디젤 전환율 모델에 대한
통계학적 분석결과

Source	Sum of squares	Degrees of freedom	Mean square	F-value	P > F
Model	6726.659	9	697.41	5.66	0.0162
Error	861.96	7	123.123		
Corrected total	7138.52	16			

Coefficient of variation (CV) = 19.273 %, Coefficient of determination (R^2) = 0.879

[0077]

[0078]

온도(X_1), 교반속도 (X_2)와 수분함량 (X_3)의 독립변수들의 최적 조건을 결정하기 위해 반응표면분석방법 (response surface methodology, 'Optimization of cell conditions for enzymatic fuel cell using statistical analysis' Journal of Industrial and Engineering Chemistry 14 (2008) 338-343 참조)을 도입하였다. 나머지 변수인 효소농도는 20 %에 배치하였다. 실험은 중앙값에 6개의 스타포인트 (four star points, $\alpha = \pm 1.682$)와 중앙값의 4회반복 (four replicates)을 포함하는 실험을 실시하였다.

[0079]

표3에 나타난 바와 같이, F-value와 P-value는 각각 5.66과 0.0162였다. 2차방정식의 통계적인 유의성을 점검하였고, 모델의 결정계수 (R^2)는 0.879로 반응의 변이성의 87.9 %는 모델에 의해 설명될 수 있음을 나타내었다. 변동계수 (coefficient of variation, CV)는 19.273로 비교적 높은 수치를 나타내어 바이오디젤 생산에 변수들의 독립적인 영향이 높음을 나타내었다. 반응 방정식은 바이오디젤 생산 실험의 반응면에 적합한 모델을 제공하였으며, 다음과 같다.

[0080]

[식 4]

[0081]

$$Y = 94.14 + 6.193X_1 + 6.19X_2 + 0.80X_3 - 12.67X_{11} - 19.66X_{22} - 13.18X_{33} + 1.05X_{12} + 1.18X_{13} - 4.60X_{23}$$

[0082]

단, X_1 은 코드화된 온도의 값, X_2 는 코드화된 교반속도, X_3 은 코드화된 수분함량의 값을 나타낸다.

[0083]

도 1a 내지 도 3b는 계산된 반응표면의 3차원 도면과 등고선을 도시화한 것이다. 바이오디젤의 생산을 위해 얻어진 반응온도, 교반속도, 수분함량의 최적값은 0.15, 0.006, 0.087이었다. 상기 결과들에 따라 45.75℃, 250 rpm, 10.44 중량%이 바이오디젤 생산을 위한 최적값으로 최적화되었다. 통계학적 모델에 의하여 예측되는 바이오디젤의 최대 전환율은 93.32 %였다. 결론적으로 45.75℃ 반응온도, 250 rpm 교반속도, 10.44 중량% 수분함량, 및 20% 동시고정화 리파아제가 바이오디젤 최대 전환율을 얻기 위한 최적조건임을 확인하였다. 상기 수분함량은 반응 시 유지와 알코올과 물을 같이 넣고 반응을 시키는데 이때 들어가는 수분의 함량을 의미한다.

[0084]

실시에 2. 통계학적 분석방법 (Statistical analysis method)에 따른 바이오디젤 생산의 최적조건의 증명 및 폐유로의 적용

[0085]

상기 통계학적 분석방법에 따라 설정된 바이오디젤의 최적 생산조건을 증명하기 위해 상기 최적 조건인 45.75℃ 반응온도, 250 rpm 교반속도, 10.44 % 수분함량, 20 % 동시고정화 리파아제 농도에서 대조실험을 실시하여 전환율을 비교하였다. 상기 대조실험은 jathropa 유지를 사용하여 시험하였다. 그 결과, jathropa 유지에서의 실제 전환율은 96.63 %로 오차범위 1.95 %이내로 통계학적 분석방법이 신뢰할 수 있음을 나타내었다.

[0086]

이에 확립된 반응조건을 폐유에 적용하여 최적화된 바이오디젤의 생산공정의 적용성을 검토하였다. 검토를 위

하여, 폐유를 이용하여 상기 조건 하에서 반응시켜 전환율을 측정하였다. 폐유는 닭튀김에 사용된 대두유를 필터링한 것으로 하였다. 시간 경과에 따른 전환율을 도 4에 나타내었다. 도 4에서 알 수 있는 바와 같이, 시간이 지남에 따라 바이오디젤의 전환율은 증가하였으며 이에 4시간에 바이오디젤 전환율이 99.52 %로 거의 100%에 가까운 전환율을 보였다.

[0087] 이러한 결과는, 상기와 같이 통계학적 분석방법에 따라 확립된 공정변수들의 값이 다른 작물 (예컨대, 비식용 작물) 및 여러 유지에도 적용 가능함을 나타내는 것이라고 할 수 있다.

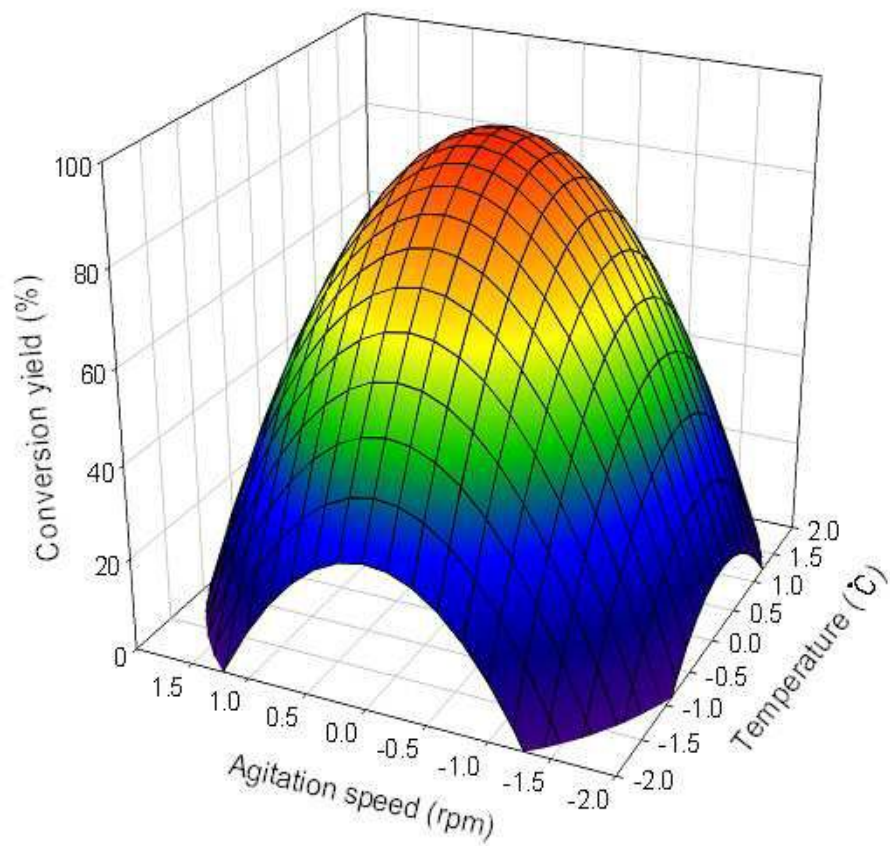
[0088] **비교예 1. 고정화 리조포스 오라이제 리파아제와 고정화 캔디다 루고사 리파아제의 혼합물을 이용한 폐유로부터 바이오디젤의 생산**

[0089] 참조예 3에서 준비된 두 종류의 리파아제 용액을 가교연결방법(cross-linking method)을 이용하여 참조예 2에서 준비된 실리카 겔(silica gel)에 고정화 시켰다. 고정화 담체인 실리카겔을 35% (v/v)의 H₂O₂로 전처리하여 실리카겔 표면의 불순물을 제거하였다. 전처리된 담체를 아세톤을 용매로 15% (w/v)의 3-APTES를 이용하여 50℃, 150rpm에서 120분간 실란화(silanization)하여 담체 표면에 아미노기(amino group)을 도입하였다. 가교제인 글루탈알데하이드(glutaraldehyde)를 64℃의 0.1M phosphate buffer (pH 8.0)에서 20분간 전처리하여, 아미노기가 도입된 실리카겔과 2%(v/v)의 농도로 0.1M 인산염 완충용액 (pH 7.0)에서 20℃, 150 rpm의 조건으로 2시간 동안 반응시켰다. 이후에 실리카겔을 증류수로 세척한 후 건조시켜 0.1M 인산염 완충용액 (pH 7.0)에 넣고 준비한 리파아제를 20℃에서 150분간 반응시켜, 리포오스 오라이제 리파아제와 캔디다 루고사 리파아제를 각각 담체에 고정화 하였다.

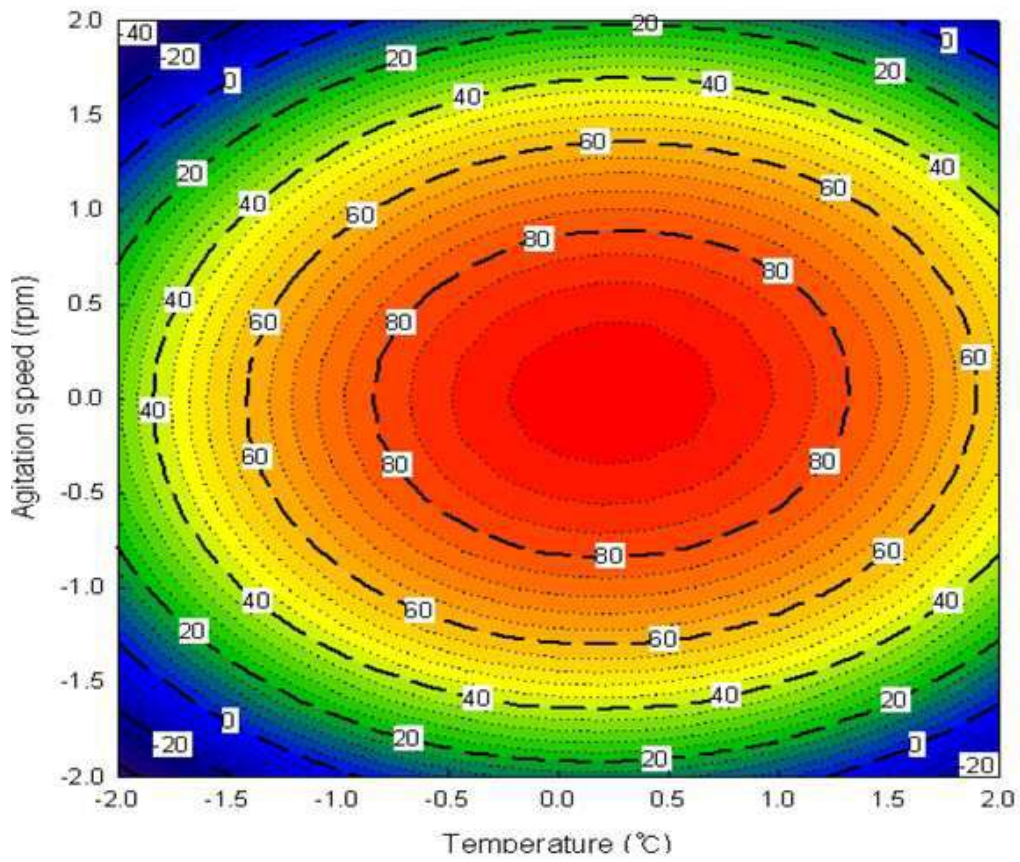
[0090] 고정화 리조포스 오라이제와 고정화 캔디다 루고사 리파아제를 1:1 (w:w)으로 섞은 고정화 리파아제 혼합물을 이용하여 폐유로부터 바이오디젤을 생산하는 반응을 실시하였다. 폐유는 닭튀김에 사용된 대두유를 필터링한 것으로 을 사용하였고, 반응조건은 상기 실시예 2와 동일하게 하였다. 그 결과를 도 5에 도시하였다. 반응시작 후 18시간에 93.1%의 전환율에 도달하였고, 21시간 이후에는 95%의 전환율에 도달하였다.

도면

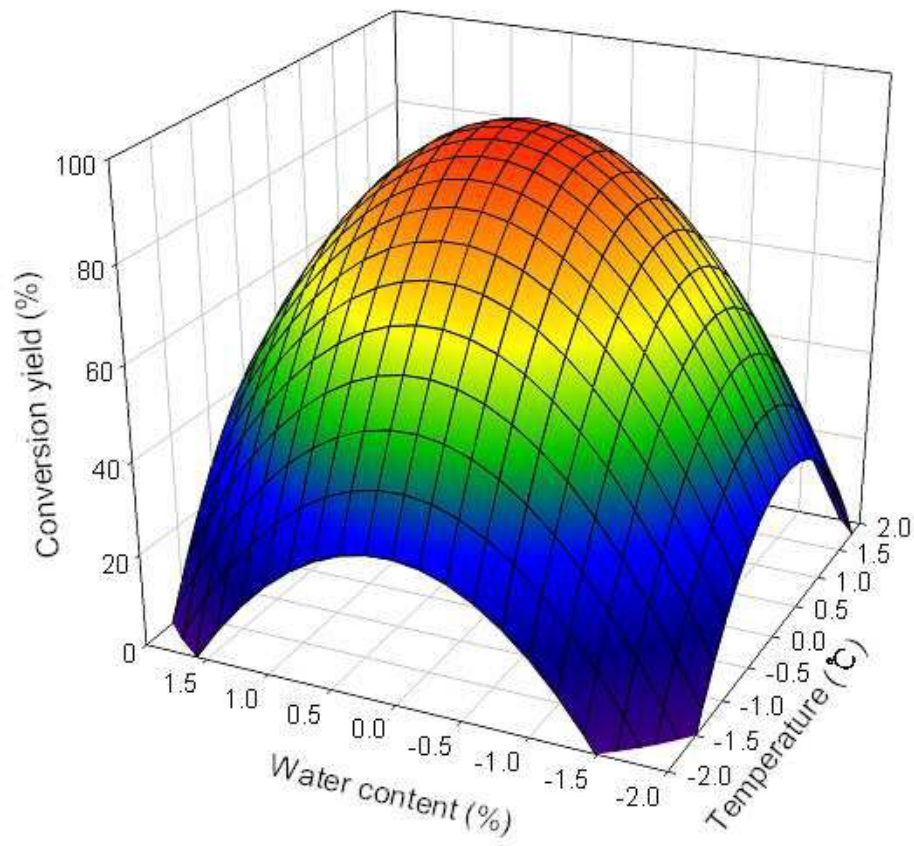
도면1a



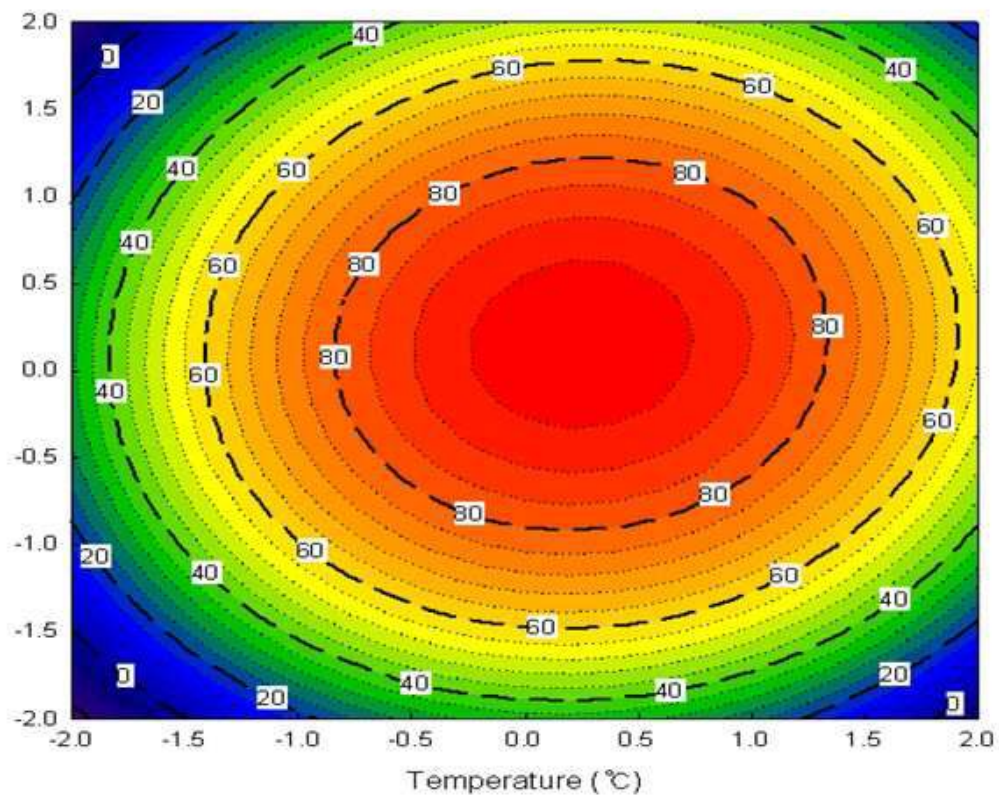
도면1b



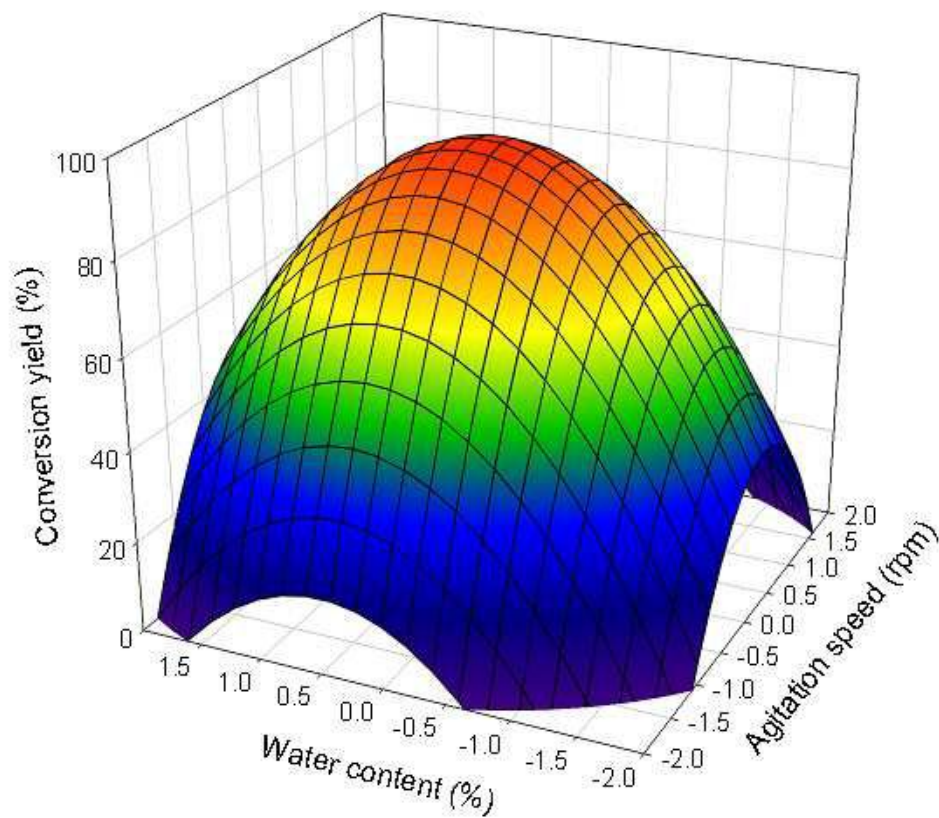
도면2a



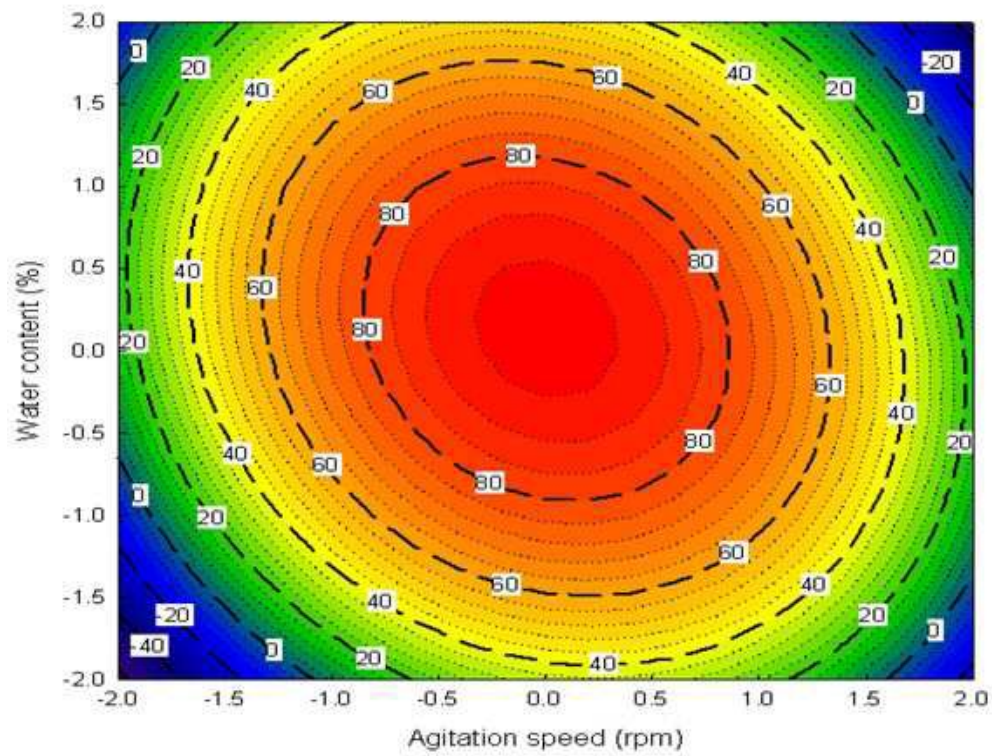
도면2b



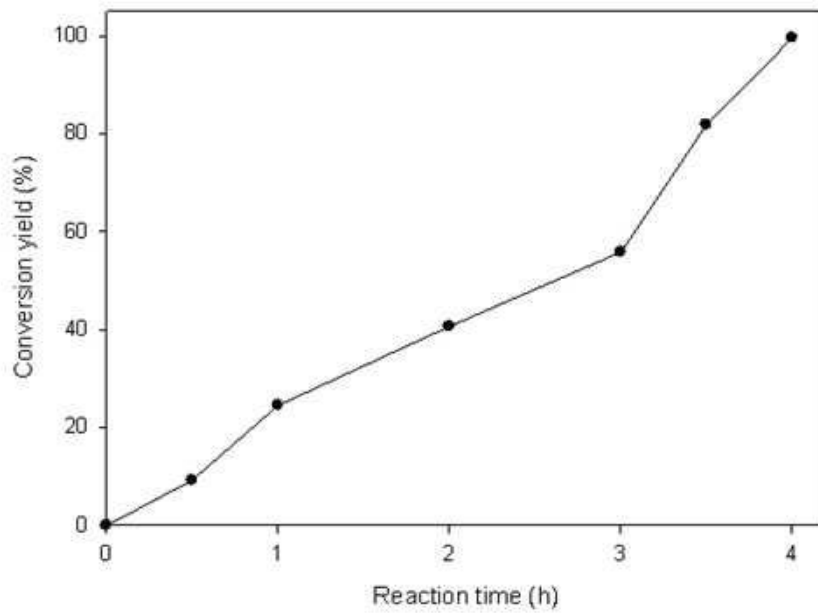
도면3a



도면3b



도면4



도면5

