

연속공정에서 리파제 촉매 전이에스테르화에 의한 식물유의 바이오디젤화

현영진[†] · 김해성^{*}

[†]제주대학교 공과대학 청정화학공학과

^{*}명지대학교 공과대학 화학공학과

(2005년 1월 14일 접수 ; 2005년 4월 6일 채택)

Bio-diesel of Vegetable Oils by Lipase Catalyzed Trans-esterification into Continuous Process

Young-Jin Hyun[†] · Hae-Sung Kim^{*}

[†]Department of Chemical Engineering and Clean Technology, Cheju National University,
Jeju-Si, 690-756, Korea

^{*}Department of Chemical Engineering, Myongji University, Yongin, 449-728, Korea
(Received January 14, 2005 ; Accepted April 6, 2005)

Abstract : Bio-diesel as fatty acid methyl ester was derived from such oils as soybean, peanut and canola oil by lipase catalyzed continuous trans-esterification. So the activation of lipase(Novozym - 435) was kept to be up to 4:1, the limiting molar ratio of methanol to oil under one-step addition of methanol due to the miscibility of oil and methanol through the static mixer for 4hrs and the elimination of glycerol on the surface of lipase by 7wt% silica gel. Therefore the overall yield of fatty acid methyl ester from soybean oil appeared to be 98% at 50°C of reaction temperature under two-steps addition of methanol with 2x2:1 of methanol to oil molar ratio at an interval of 5.5hrs, 7wt% of lipase, 24 number of mixer elements, 0.2ml/min of flow rate and 7wt% of silica gel.

Keywords : Bio-diesel, lipase catalyzed continuous trans-esterification, static mixer, elimination of glycerol, silica gel.

1. 서론

현재 디젤기관의 주 연료는 경유로 70년대에 시작된 에너지 파동과 중동의 정세 불안으로 인하여 원유가격은 매년 상승하고 있다. 한편 서

방 선진국들이 산업화를 수행하는 과정에서 원유의 무절제한 사용으로 지구온난화가 초래되어, 생태계 교란이 시작되었다. 이런 에너지 위기 및 지구환경의 악화에 대처하는 길은 원유의존도를 낮추고 이를 대체할 수 있는 청정에너지 원료를 개발하여 실용화하는 것 밖에 없다. 이 기술개발은 이미 전 세계의 관심분야로 부각되

[†]주저자 (E-mail : yjhyun@cheju.ac.kr)

있고, 특히 90년대에 들어서 지구 온난화를 경감하기 위해 탄산가스 배출량을 규제하는 기후변화 협약이 체결되면서, 환경친화적으로 재생이 가능한 바이오디젤의 기술경쟁력 확보에 관심이 모아지고 있다[1]. 바이오디젤은 화학촉매나 효소촉매 하에 식물유나 동물유의 지방산 글리세리드(트리 글리세리드)를 단쇄기 알코올에 전이 에스테르화시켜 전환된 지방산 메틸에스테르로 단독연료 또는 경유와의 혼합연료로서 사용되고 있다. 연소성능은 경유와 유사하지만, 산소함량이 높고, 황이나 유해한 방향족 탄화수소가 전혀 함유되지 않아, 대기 질을 보존하는 데 크게 기여하는 연료이다. 그 외에도 생태계에 유출되어 스스로 생분해되고, 발화점이 높아서 운송과 저장에도 안전하다[2]. 유럽과 북미주 선진국의 정부들도 바이오디젤의 생산에 연구지원과 세금감면 등의 혜택을 부여하고 있고, 정부소유의 일정차량은 바이오디젤 사용을 의무화하고 있다[3]. 바이오디젤의 생산 법에는 직접이용법, 마이크로 에멀전법, 열분해법 및 전이 에스테르화법이 있다[4]. 전이 에스테르화법이 대규모 생산 공정에 사용되고 있고, 화학촉매나 리파제 효소 하에 메탄올로 오일을 전이 에스테르화시켜 지방산 메틸에스테르를 얻어, 글리세롤을 원심분리시키면 고순도의 바이오디젤이 생산된다[5]. 전이 에스테르화를 촉진시키는 촉매로는 알칼리·산 및 효소촉매가 있다. 오일의 수분과 유리지방산 함량이 한계치(0.06%, 0.5%)보다 낮으면, 알칼리 촉매가 효과적이다. 이들 함량이 한계치 보다 높거나 폐식용유의 경우, 촉매작용을 하는 베크스드 이온이 불활성화되어 이를 억제하기 위해 산 촉매로 유리지방산을 중화시킨 후 알칼리 촉매로 전이 에스테르화를 수행해야 한다. 산 촉매공정은 오일과 메탄올의 몰 비를 1:3 보다 아주 높게 유지해야만 전화율이 증가하나, 메탄올 과잉주입으로 이의 분리 회수비용이 높다는 한계를 갖고 있다. 화학촉매공정의 전이 에스테르화법은 세척 시 산·알칼리 폐수를 방출시키면 글리세롤 회수비용이 높으며, 상대적으로 에너지사용량이 많고, 오일에 함유된 유리지방산과 수분을 한계치 이하로 낮추어야 하는 등의 문제점을 갖고 있다. 이런 단점을 극복하기 위해, Ma[6] 등은 화학적 전이 에스테르화 공정을 개선하였으며, Hajek[7]는 고체촉매인 부론 카바이드(B_4C)를 사용하여 폐수 방출을 억제함으로써 전화율을 높였다. 그리고

Kusdiana[8] 등은 메탄올과 오일의 유전상수(dielectric constant)가 유사한 성질을 이용하여 초임계 반응을 도입, 전이 에스테르화 속도를 향상시켰다. 1990년 중반부터는 화학적 전이 에스테르화 공정에 미생물 효소를 이용하여, 폐수 방출이 없는 환경친화적 공정으로 개조시키는 연구가 시작되었다. 리파제는 그 표면에 소수성 및 친수성 작용부위를 가지고 있고, 이들 중 일부는 활성 작용부위로서 그 수가 일정하다. 반응물이 없으면, 작용부위는 닫힌 구조의 불활성을 나타낸다. 그러나 반응물이 존재하면 작용부위가 열리고, 이것은 활성 작용부위로 확산되고 흡착반응으로 생성물 탈착이 반복되면서, 리파제 촉매반응이 진행된다. 리파제 반응속도는 활성 작용부위로부터 위 과정의 연속성에 의존한다. 반응물에 친수성 물질이 과량 존재하면, 혼합되지 않은 친수성 물질이 먼저 친수성 작용부위로 흡착되는 양이 증가하여 소수성 작용부위의 구조전이가 방해된다. 따라서 소수성 작용부위 일부가 열리지 않고 소수성 물질 일부가 반응에 참여할 수 없게 되어 리파제 기능이 저하되는 불활성화가 나타나기도 한다. 리파제 효소의 우수한 성능이 유지되려면, pH, 온도, 용매의 종류와 양, 그리고 지지체 특성에 적합하도록 미생물을 고정화시켜야 한다. 효소 고정화는 우수한 기술과 상당한 비용이 요구되고 있고 고정화 효소의 생산단가가 높다는 단점을 갖고 있다[9]. 따라서 리파제 촉매공정은 이러한 고비용을 절감시켜야만 알칼리 촉매공정과 경쟁이 가능하고, 무폐수 청정공정이 될 수 있다. 바이오디젤의 생산을 위한 효과적인 리파제는 Novo Nordisk 사가 유전자 재조합 기술로 개량하여 배양시킨 *Candida antarctica*를 아크릴 수지에 고정시킨 Novozym 435가 있다. Novozym 435는 40~50°C에서도 활성이 높아 내열성이 양호하고, 반복해서 사용하여도 활성도와 안정성을 유지하는 장점을 갖고 있으며, 이를 이용한 리파제 촉매 전이 에스테르화 공정은 차세대 유망 기술로 기대된다[10]. 리파제를 이용한 식물유의 전이 에스테르화는 대부분 회분계에서 진행되어 왔고, Watanabe[15] 등은 처음으로 고정층 흐름반응기에서 15~24시간 동안 수행하였다.

본 연구는 오일과 메탄올의 혼합도를 높이기 위하여 정적 반응기를 설치하였고, 반응물과 리파제의 촉매효과를 향상시키기 위하여 연속교반 반응기에서 전이 에스테르화 반응을 진행시켰다.

메탄올을 단계별로 급액 조에 투입하고, 전이에스테르화의 생성물인 글리세롤을 반응기내의 실리카겔에 흡착시켜 리파제의 활성을 유지하였다. 오일과 메탄올의 몰 비, 메탄올 투입단계, 반응물 유량, 리파제 함량, 정적 반응기의 역 회전수, 식물유 종류 및 실리카겔의 함량 변화가 지방산 메틸에스테르의 총괄 수율에 미치는 영향을 고찰하여, 리파제 촉매 전이에스테르화공정을 최적화하는데, 본 연구의 목적이 있다.

2. 실험

2.1. 실험재료

대두유, 피넛유, 카놀라유 및 메탄올(1급시약)은 Aldrich Chemical Co.(St. Louis, Missouri)에서 구입하였다. 표준용액 성분인 올레인산 메틸에스테르, 리놀레인산 메틸에스테르, 리놀레닌산 메틸에스테르, 팔미틴산 메틸에스테르, 스테아린산 메틸에스테르, 내부 표준물질인 트리카플린(tri-caprlyn), 지방산을 지방산 메틸에스테르로 전환시키는 bi-(tri-methylsilyl) tri-fluoroacetamide(BSTFA)도 Sigma Chemical Co.에서 구입하였다. 추출 용매는 노말-헥산과 클로로포름을 사용하였고, 표준용액의 용매는 피리딘을 사용하였다. 이들과 함께, 실리카겔(1000 μ m), 폴리에틸렌-정적 반응기, 미량펌프의 헤드(0.2 ml/min, 0.5 ml/min, 0.8 ml/min)·드라이브와 튜브는 Cole Parmer Co.(Vermon Hills, Illinois)에서 구입하였다. *Candida antarctica*를 고정화시킨 리파제 효소인 Novozym - 435는 Novozym American Co.(Franklin, North Carolina)에서 구입하였다.

2.2. 분석방법

HP-5 칼럼(0.32mm x 25mm, Agilent Technologies Inc, Wilmington, Delaware)와 FID 검출기가 충전된 휴렛팩커드 - 5890 가스 크로마토그래피를 사용하여 표준용액의 각 성분을 분석하였다. 헬륨가스 유량은 13ml/min, 헬륨과 공기 혼합가스 유량은 26ml/min으로 유지하였고, 인젝터와 검출기의 온도는 각각 325 $^{\circ}$ C, 350 $^{\circ}$ C로 고정하였다. 초기온도가 80 $^{\circ}$ C인 오븐온도를 180 $^{\circ}$ C까지는 15.0 $^{\circ}$ C/min, 250 $^{\circ}$ C까지는 5.0 $^{\circ}$ C/min, 325 $^{\circ}$ C까지는 15.0 $^{\circ}$ C/min으로 높혔고, 총 소요시간은 23분이었다. 분석종료 시 오븐의 온

도를 80 $^{\circ}$ C로 유지하였다. 표준용액 각 성분의 농도에 따른 면적 값으로부터 각 성분의 검량선을 작성하였다. 채취 조 G의 밸브를 열어, 10ml 시료를 채취하고 리파제와 실리카겔을 여과시켰다. 여과시킨 시료를 회전증발기로 감압 증류시킨 후 미 반응 메탄올을 제거하였다. 메탄올이 제거된 시료를 클로로포름과 노르말 헥산의 혼합용매(혼합비 1:2)로 추출한 후, 원심분리 시키면, 글리세롤이 하층으로 분리된다. 상층 액 1ml를 취하여 60 $^{\circ}$ C에서 감압 증류시켜 클로로포름을 분리시켰다. 이 액 50 μ l를 취하여 150 μ l 내부 표준물질(8.0mg 트리카플린/ml 피리딘)에 혼합시켜 200 μ l BSTFA와 70 $^{\circ}$ C에서 20분간 반응시켜 생성물에 함유된 미량의 유리 지방산을 지방산 메틸에스테르로 전환시켰다. 위 시료를 실온에서 냉각시켜 최종체적이 1200 μ l가 되도록 노르말 헥산으로 희석시켰다. 희석 액 1 μ l를 HP-5칼럼에 주입하여 나타나는 각 성분의 체류시간, 체류면적과 검량선 으로부터 각 성분의 양을 계산하였다.

2.3. 실험방법

식물유의 리파제 촉매 전이에스테르화에 미치는 오일과 메탄올의 몰 비, 정적 반응기의 역 회전수, 메탄올 투입 방식, 반응물 유량, 리파제 함량 및 실리카겔 함량의 조업변수가 지방산 메틸에스테르 수율에 미치는 영향을 규명하기 위한 실험을 수행하였다. 급액 조 B(200ml)에서 오일과 메탄올을 교반시킨 후 미량펌프 C에 의해 정적 반응기 D(30ml)를 통과한 반응물은 Fig. 1과 같이 50 $^{\circ}$ C의 항온 실(A)에서 리파제와 실리카겔이 충전된 연속교반 반응기(CSTR) E(130ml)로 유입시켜 리파제 촉매 전이에스테르화 반응을 진행시켰다. 침강 조 F에 유입된 생성물 중 미 반응 지방산 글리세리드(TG), 디·모노 글리세리드(D·MG)는 밸브 H로 유량을 조절하면서 급액조로 환류 시켰다. 리파제 불활성화를 억제하기 위해 단계별로 메탄올을 급액조로 주입하여 메탄올 양을 조절하였다. 그러나 교반으로 인해 리파제 지지체가 깨어지지 않도록 하고, 리파제와 실리카겔의 일류를 방지하기 위해 교반속도를 1,000rpm이하로 유지하였다.

오일과 메탄올의 몰 비와 메탄올 투입단계를 변화시키면서 전이에스테르화시켜 지방산 메틸에스테르의 총괄 수율로부터 리파제의 불활성화

가 시작되는 물 비를 결정하는 실험을 하였다. 리파제 활성이 유지되는 오일과 메탄올의 물 비와 메탄올을 투입조건 하에 다음과 같은 실험 범위의 범위 내에서 식물유의 연속식 전이 에스테르화 실험을 하였다. 유량은 0.2ml/min(체류시간:11시간), 0.5ml/min(체류시간:4.3시간), 0.8ml/min(체류시간:2.7시간)으로, 리파제 함량은 4wt%, 7wt%, 10wt% 으로, 정적 반응기의 역회전수는 12, 24, 36 으로, 실리카겔 함량을 4wt%, 7wt%, 10wt%로 변화시켜 실험하였다.

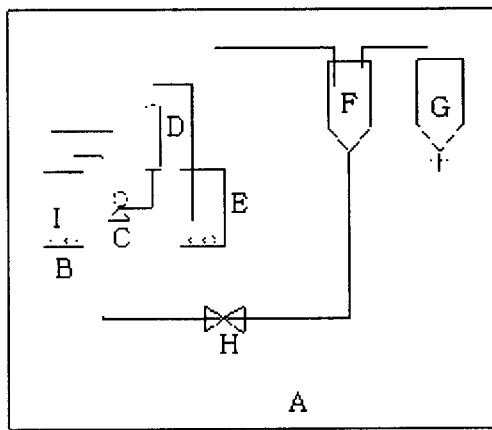


Fig.1. Schematic diagram of continuous stirred tank reactor. (A; incubating room, B; feed vessel, C; pump, D; static mixer, E; CSTR, F; settling vessel, G; sampling vessel, H; valve, I; magnetic stirrer).

3. 결과 및 고찰

3.1. 물 비와 메탄올 주입 단계가 수율에 미치는 영향

식물유의 전이 에스테르화는 가역반응으로 오일과 메탄올의 물 비에 의존한다. 전이에스테르화 속도를 높이려면, 메탄올의 몰수를 양론 물비(1:3)보다 높게 유지해야 하나, 한계 물비 이상으로 크게 하면, 촉매나 효소의 불활성화로 수율이 감소하여 바이오디젤의 질이 떨어질 뿐만 아니라 메탄올의 재순환 비용이 올라간다. Nimcevic[11] 등은 1wt% 알칼리 촉매를 사용

하여 유체유의 전이 에스테르화는 수행한 최적 물 비를 1:6으로 제시하였다. Freedman[12] 등은 60°C에서 0.5wt% 소듐 메톡시드 촉매를 사용하여 대두유, 해바라기 유, 면실유에 대한 전이에스테르화를 수행하여 최적 물 비 1:6에서 96~98% 범위의 전화율을 얻었다. Nouredini[13] 등은 70°C에서 0.6wt% 소듐 히드록시드 촉매를 사용하여, 최적 물 비 1:6으로 대두유를 연속 공정에서 전이 에스테르화 시킨 결과, 99%의 전화율을 얻었다. 알칼리 촉매를 사용한 식물유의 전이 에스테르화의 한계 물 비는 1:6으로 제시하고 있다. 한계 물 비 이상의 메탄올이 주입될 경우 오일과 메탄올은 교반 시 쉽게 혼합되지 않고 경막 저항을 형성하여 알칼리 촉매로 생성되는 메톡시드 이온이 오일표면으로 물질이동이 어려워진다. 따라서 트리글리세리드의 카르보닐기 활성화물이 잘 형성되지 않아 전이 에스테르화 속도가 떨어진다. 반응물의 혼합도를 높이기 위해 정적 반응기로 미리 혼합시킨 균일상의 반응물을 반응기로 주입하여 전이 에스테르화 속도를 향상시켰다. 리파제 촉매 전이 에스테르화는 화학촉매 공정보다 메탄올의 주입 양에 더 민감하여 양론 물비 1:3보다 약간 높은 물비를 유지해야 하나, 과잉 메탄올을 주입하면 미 반응 메탄올 액적은 오일보다 가벼워서 먼저 리파제 표면의 친수성 작용부위에 쌓인다. 이로 인하여, 소수성 작용부위의 동공과 트리글리세리드의 상호작용이 약해져 소수성 작용부위의 동공 일부는 닫힌 구조를 보인다. 동공이 닫힌 작용부위에서 오일이 더 이상 흡착되지 않아 리파제가 불활성화된다. Shimada[14]는 30°C, 2일간, 4wt% *Candida antarctica* lipase를 사용하여 1:1 물비의 3단계의 메탄올 주입 시 98.4%의 전화율을 얻었다. 이것은 양론 물비 1:3의 메탄올을 몇 단계로 나누어 투입해야만 리파제 불활성화가 억제됨을 알 수 있다. 특히 반응 초기 1:1.5 물비 이하의 메탄올을 투입하면 오일과 메탄올의 혼합도가 증가하고, 리파제 활성도 유지된다. Watanabe[15] 등은 30°C의 회분식 반응기에서 4wt% *Candida antarctica* lipase를 사용하여 36시간 동안 2:3 물비의 메탄올을 2단계로 투입하여 식물유를 전이 에스테르화시킨 결과 96.1%의 전화율을 얻었다. Samukawa[16] 등은 리파제를 메틸 올레일레이트에 미리 배양시켜 30°C, 3.5시간 동안 1:0.33 물비의 메탄올을

24분 간격으로 투입하여 대두유를 전이 에스테르화시킨 결과, 97%의 전화율을 얻었다. Kim[17]은 3급 부탄올이 1:1 체적비로 혼합된 메탄올을 1단계로 1vol% 메틸글루코시드 올레인산 폴리에스테르 유화제가 섞인 대두유에 첨가하고, 대두유와 메탄올의 몰비 1:4 및 40℃에서 3시간 동안 전이 에스테르화시킨 결과 58%의 지방산 메틸에스테르의 총괄 수율을 얻었고, 리파제를 불활성화시키는 한계 몰비를 1:1.5에서 1:4로 증가시켰다. Fig. 2는 50℃에서 대두유를 전이 에스테르화시켜 몰비와 메탄올 투입단계가 총괄 수율에 미치는 영향을 도시하였다. 반응온도 50℃에서 7wt% 리파제를 첨가 시, 대두유에 대한 메탄올의 몰비 1:1.5(2단계), 1:3(1단계), 1:1.5x2(2단계), 1:4(1단계)와 1:(1.5+4.5)(2단계)로 메탄올을 투입하여 4시간 동안 전이 에스테르화시켜 지방산 메틸에스테르의 총괄 수율을 각각 A(14%), B(33%), C(36%), D(65%)와 E(41%)를 얻었다. 정적 반응기를 설치하지 않고 전이 에스테르화시킨 총괄 수율 A(2시간 간격의 2단계 메탄올 투입) 14%와 정적 반응기를 설치한 전이 에스테르화의 총괄 수율 C(2시간 간격의 2단계 메탄올 투입) 36%를 비교하면, C는 정적 반응기 설치로 A보다 2.2배의 총괄 수율 증가를 보였다. 정적 반응기를 설

치한 B와 C를 비교하면, 2단계 메탄올 투입 시 총괄 수율 C는 1단계 투입 시 B보다 3%가 높았다. A, B와 C의 결과로부터 몰비가 1:3이 되어도 정적 반응기 설치로 리파제 활성이 유지됨을 확인하였다. 정적 반응기를 설치하고, 1:4 몰비의 1단계 메탄올을 투입하고, 7wt% 실리카겔을 첨가 시, 정적 반응기의 혼합효과 향상과 실리카겔에 의한 글리세롤 제거로 총괄 수율 D는 Kim의 연구결과인 58%보다 높은 65%를 나타냈다. 실리카겔을 첨가하지 않고, 정적 반응기만을 설치하고 1:(1.5+4.5)의 몰비로 메탄올을 2단계로 투입할 때 총괄 수율 E는 41%를 보였다. D와 E의 결과로부터 실리카겔 첨가에 의한 글리세롤 제거가 리파제 불활성을 억제하는 변수로 확인되었고, 리파제 활성이 유지되는 몰비는 1:4.5 미만이어야 한다고 사료된다. A, B, C, D와 E의 결과로부터 리파제 활성이 유지되는 한계 몰비가 Kim의 결과와 동일한 1:4로 나타났고, 총괄 수율 D는 Kim의 결과보다 7% 증가하였다. 정적 반응기를 설치하고 실리카겔을 첨가 시 1:4 몰비의 다단계 메탄올을 투입하면, 총괄 수율은 98%로 증가할 것으로 사료되었다. 따라서 정적 반응기 설치와 실리카겔 투입은 유화제와 3급 부탄올 첨가를 대체하는 청정 전이에스테르 공정의 주요 조업인자로 판단되었다.

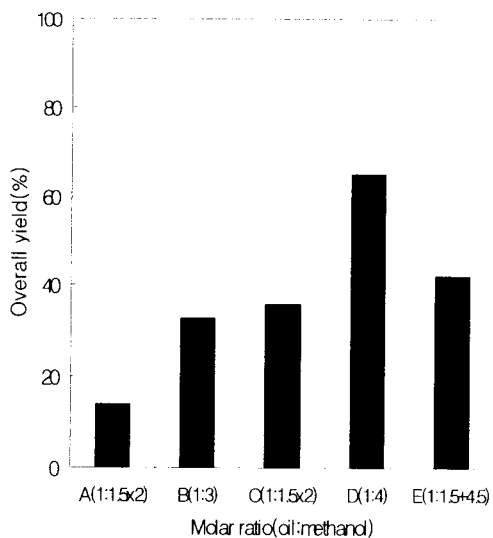


Fig. 2. Effects of molar ratio on overall yield of lipase catalyzed transesterification. (soybean oil, 50℃).

3.2. 리파제 함량 변화가 총괄 수율에 미치는 영향

*Candida antarctica*를 고정화 시킨 리파제인 Novozym - 435는 세린, 아스파르틱산과 히스티딘이 중첩된 단백질에 결합되어 촉매작용을 하는 세 작용부위를 갖는 3차원 구조이다. 평상시 작용부위는 닫힌 구조를 보인다. 오일 및 메탄올이 잘 섞인 혼합물이 리파제와 접촉하면, 상대적으로 가벼운 메탄올이 먼저 리파제 표면으로 확산되어 친수성 작용부위가 열리고, 이 부위에 결합된 히스티딘은 수소결합을 형성한다. 메탄올이 오일로 확산되면 리파제 표면이 오일로 둘러싸여, 친수성 트리 글리세리드의 아실 연쇄기를 끌어당기면서 이를 수용할 구조조건이 일어난다. 오일은 그 부위에 결합된 세린과 수소결합을 하여 효소-기질 복합체가 형성된다. 세린으로부터 전자를 당겨서 생성된 산소음이온의 전자가 카르보닐기로 전달되면, 트리 글리세리드 결합이 깨져 아실 효소 복합체가 만

들어지고, 히스티딘의 양이온은 중간활성물인 디·모노 글리세리드로 이동하여 고립전자쌍을 갖는 히스티딘으로 바뀐다. 히스티딘의 고립전자쌍을 갖는 질소가 메탄올 분자의 수소를 제거하여 생성된 메톡시드 이온은 아실 효소 복합체의 카르보닐기와 반응한다. 세린의 산소는 히스티딘 위의 수소를 되찾아 수소결합을 하고, 산소 음이온의 전자가 카르보닐기로 전달되면서, 효소-지방산 메틸에스테르 복합체가 형성된다. 리파제 표면의 아스파르틱산은 히스티딘으로부터 양전하를 잡아당겨, 지방산 메틸에스테르가 더 이상 활성 작용부위에 화학적으로 결합되지 않고 효소-지방산 메틸에스테르 복합체로부터 탈착된다. 디 - 모노 글리세리드도 동일하게 지방산 메틸에스테르로 전환되어, 탈착되고, 동시에 글리세롤이 만들어지면서 전이에스테르화가 진행된다[18]. 일련의 반응과정의 연속성이 전이에스테르화를 결정한다. 본 연구에서는 유량이 0.2ml/min, 반응온도가 50℃, 실리카겔 함량이 7wt%과 정적 반응기의 역 회전수가 24일 때, 1:2x2의 물 비로 메탄올을 2단계로 주입하고, 리파제 함량 변화가 총괄 수율에 미치는 영향을 Fig. 3에 도시하였다.

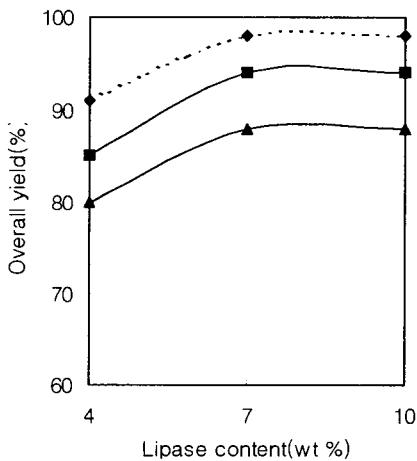


Fig. 3. Effects of lipase content on overall yield. (···◆···: soybean oil, 50℃, 0.2 ml/min, 7% silica gel, 24 number of elements, -■-: peanut oil, 50℃, 0.2 ml/min, 7% silica gel, 24 number of elements, -▲-: canola oil, 50℃, 7% silica gel, 24 number of elements).

대두유의 경우, 4wt%에서 7wt%까지는 리파제 함량이 높을수록, 친수성 작용부위 및 구조 전이에 의한 소수성 작용부위가 용이하게 열려서 단계별 리파제 반응속도가 높고, 비가역 전이 에스테르화가 빨리 평형에 도달하게 된다. 따라서 지방산 메틸에스테르의 총괄 수율이 85%에서 98%로 급격히 증가하였다. 그 이상에서는 활성 작용부위의 수가 일정하여 총괄 수율이 거의 일정하였다. Watanabe 등은 30℃에서 4wt% 리파제를 사용하여, 유량이 0.1ml/min인 고정층 흐름 반응기에서 24시간 동안 1:1x3의 물 비로 3단계로 메탄올을 주입하면서 대두유를 전이에스테르화 시켜 93%의 전환율을 얻었다. 본 연구의 결과와 비교하면, 역 회전수가 24인 정적 반응기를 설치하고, 1:2x2(2단계주입) 물 비에서 온도를 20℃ 높여, 리파제 함량을 3wt% 높이고, 실리카겔 함량을 7wt%로 유지하면, 조업시간이 24시간에서 11시간으로 단축되면서 총괄 수율이 93%에서 98%로 증가하였다. 따라서 0.2ml/min 유량, 7wt% 실리카겔, 50℃ 반응온도, 1:2x2 물 비의 메탄올을 2단계로 주입 시 최적 리파제 함량은 7wt%로 판단되었다.

3.3. 유량과 식물유 종류가 수율에 미치는 영향

리파제 전이 에스테르화 반응조건은 온도, 유량과 식물유의 종류 등이 총괄 수율에 미치는 영향을 고찰하였는 바, 유량과 온도는 에너지 비용을 결정하는 주요 조업인자이었다. 반응온도가 높으면 리파제 활성 및 반응물의 상호 용해도가 증가하고, 유량이 크면 반응물과 리파제의 혼합도가 높아진다. 그리고 불포화 지방산 함량이 높은 식물유일 수록 비가역 전이 에스테르화가 빨리 평형에 도달하여 조업시간이 단축되기 때문에 식물유 종류도 조업변수이다. 조업시간을 단축하기 위해 반응온도는 리파제의 최적온도인 50℃로 고정시켰다. 불포화 지방산 함량이 전이 에스테르화 속도에 미치는 효과를 비교하기 위해 리놀레인산의 함량이 54%, 32%, 22%인 대두유, 피넛유, 카놀라유를 반응물인 오일로 선정하였다. 유량은 0.2ml/min (체류시간:11시간), 0.5ml/min (체류시간:4.3시간), 0.8ml/min (체류시간:2.7시간)으로 변화시켰다. Fig. 4는 반응온도 50℃, 리파제 함량 7wt%, 실리카겔 함량 7wt%, 1:2x2 물 비의 메탄올을 2 단계로 투입할 때 유량변화와 식물유 종류가 총

팔 수율에 미치는 영향을 도시하였다.

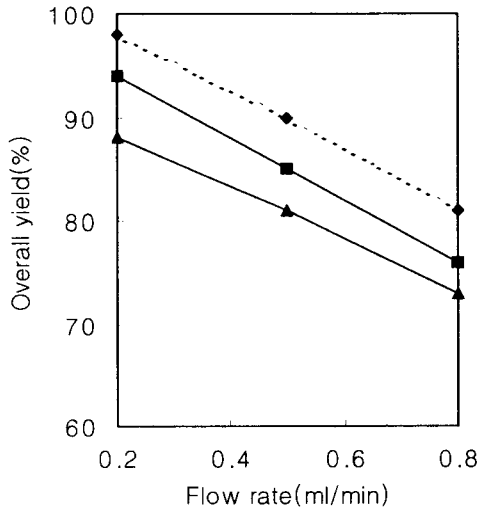


Fig.4. Effects of flow rate and oil kinds on overall yield. (· · ·◆· · ·:soybean oil, 50°C, 7% lipase, 7% silica gel, 24 number of elements, -■-:peanut oil, 50°C, 7% lipase, 7% silica gel, 24 number of elements, -▲-:canola oil, 50°C, 7% lipase, 7% silica gel, 24 number of elements).

대두유의 경우, 유량이 0.2ml/min일 때 오일과 메탄올이 각각 소수성 및 친수성 활성 작용부위에서 세린과 히스티딘에 흡착하여 수소결합을 하고 단계별 리파제 반응에 소요되는 시간이 충분할 뿐 만 아니라 트리 글리세리드에 결합된 아실 연쇄기의 이중결합 수가 2개인 리놀레인산의 함량이 54%를 나타내어 리놀레인산이 활성 작용부위에서 쉽게 리놀레산 메틸에스테르로 전이되어 98%의 총괄 수율을 얻었다. 유량이 0.8ml/min일 때 리파제의 활성 작용부위에서 반응물의 단계별 반응시간이 충분치 못하여 83%의 총괄 수율을 얻었다. 한편, 리놀레인산 함량이 각각 32%, 22%인 피넛유와 카놀라유의 경우 활성 작용부위에서 리놀레인산이 리놀레인산 메틸에스테르로 전환되는 속도가 상대적으로 낮아 이들의 총괄 수율은 각각 78~94%, 74~88%를 나타내었다. 유량증가는 반응물과 리파제의 혼합도를 높이기보다는 오히려 반응물의

체류시간을 감소시켜 총괄 수율이 떨어졌다. 따라서 리파제 촉매 전이에스테르화는 유량증가에 의한 반응물과 리파제의 접촉 효과 보다는 유량 감소로 미생물반응에 필요한 체류시간에 더 영향을 받았다. 불포화 지방산 함량이 낮은 피넛유나 카놀라유의 전이 에스테르화는 2단계 공정에서 수행될 때 고 순도의 바이오디젤이 생산될 것으로 판단되었다.

3.4. 정적 반응기의 역 회전수가 총괄 수율에 미치는 영향

비극성 트리 글리세리드로 이루어진 식물유는 극성을 갖는 메탄올에 매우 낮은 용해도를 보인다. 따라서 소수성 식물유는 친수성 메탄올과 교반시켜도 쉽게 혼합되지 않고 메탄올이 큰 액적으로 오일에 분산되는 불균일 상의 W/O계가 형성된다. 특히 식물유의 포화지방산 함량이 높으면 소수성은 더 강하여 메탄올과의 상호 용해도는 현저히 떨어져 전이 에스테르화 속도가 감소한다. 메탄올이 오일에 충분히 분산되지 못할 경우, 상대적으로 비중이 낮은 메탄올이 먼저 친수성 작용부위로 확산되어 액적으로 쌓이면 그 양이 증가함으로써 소수성 작용부위의 구조 전이가 방해되어, 단된다. 따라서 오일과 세린의 수소결합이 저지되어 리파제 촉매의 전이 에스테르화 속도가 감소하게 된다. 오일과 메탄올의 불균일 반응계의 혼합도를 향상시키기 위해서는 상용 용매를 사용해야 한다. 그러나 용매공정은 용매회수와 재순환 비용이 매우 높기 때문에 상용화에 적절치 못하다. 이런 문제점을 해소하기 위해 본 연구에서는 유화제와 상용용매 대신에 메탄올을 단계별로 투입하여 반응물의 혼합도를 높이는 정적 반응기를 설치하여 리파제 촉매 전이 에스테르 법을 도입하였다. Fig. 5는 반응 온도 50°C, 유량 0.2ml/min, 리파제 함량 7wt%, 실리카겔 함량 7wt%, 물 비 1:2x2의 2단계로 메탄올을 주입 시 정적 반응기의 역 회전수가 총괄 수율에 미치는 영향을 도시하였다. 대두유의 경우, 역 회전수가 12에서 24로 증가하면, 반응물의 혼합도가 증가되고 메탄올과 유지분자는 리파제의 활성 작용부위로 거의 동시에 확산되며 단계별 리파제 반응이 연속적으로 진행되며 리파제 활성이 유지되었고, 총괄 수율은 90%에서 98%로 증가하였다. 피넛유와 카놀라유의 경우도 역 회전수가 24일 때 각각 94%, 88%의 총괄 수율을 보였다. 역 회전수가 24이상에서는

리파제 촉매의 전이 에스테르화가 평형에 도달하여 총괄 수율의 변화가 거의 없었다. 따라서 본 연구범위에서는 최적 역 회전수를 24로 나타냈다.

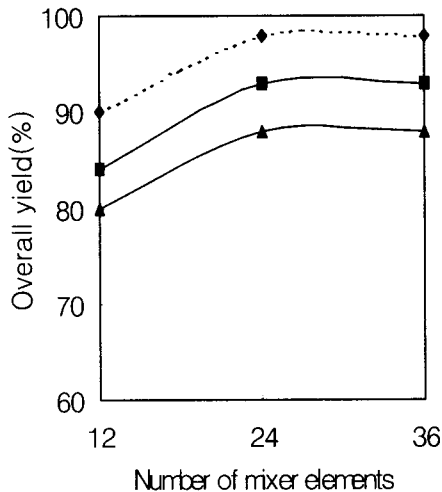


Fig. 5. Effects of mixer elements number on overall yield. (· · ·◆· · ·:soybean oil, 50°C, 7% lipase, 7% silica gel, -■-:peanut oil, 50°C, 7% lipase, 7% silica gel, -▲-: canola oil, 50°C, 7% lipase, 7% silica gel).

3.5. 실리카겔 함량이 총괄 수율에 미치는 영향

리파제 불활성화는 정적 반응기 설치와 메탄올 주입 양에 따른 반응물의 혼합도 뿐만 아니라 미 반응 트리 글리세리드(TG)와 메탄올, 중간생성물인 디·모노 글리세리드(D·MG) 그리고 최종 생성물인 글리세롤의 양에도 좌우된다. 글리세롤은 비중과 점도가 지방산 메틸에스테르나 트리 글리세리드 보다 커서 이것들은 상호 혼합도가 매우 낮다. 글리세롤은 극성 구조를 갖는 친수성 물질이어서 리파제 표면의 친수성 활성 작용부위로 흡착되어, 리파제 표면에 축적되면, 메탄올의 친수성 작용부위에 확산이 저지될 뿐만 아니라 구조전이에 의한 소수성 작용부위가 쉽게 열리지 않아서 리파제 기능이 현저히 감소된다. 리파제 기능저하로 형성된 디·모노 글리세리드(D·MG)는 지방산 메틸에스테르, 미 반응 메탄올과 글리세롤을 유화시키

는 계면활성제로 작용하여 지방산 메틸에스테르의 질을 저하시키고, 글리세롤 회수비용도 증가한다. 따라서 조업시간을 단축하여 양질의 바이오디젤을 얻기 위해서는 리파제 표면의 글리세롤에 의한 리파제 불활성화를 해결해야 한다. Selmi 등[19]은 해바라기유의 리파제 촉매 전이 에스테르화 공정에서 글리세롤을 실리카겔에 흡착시켜 리파제 불활성화를 억제하는 연구를 수행하였다. 극성을 띤 실리카겔은 글리세롤 수거체(glycerol collector)로 글리세롤에 대한 높은 흡착 능을 나타내었다. 실리카겔로 글리세롤이 제거되면 리파제 표면의 활성 작용부위가 보호되고 가역 전이 에스테르 반응의 평형을 우측으로 이동시키면 총괄 수율이 커진다. 따라서 본 연구에서도 실리카겔을 연속 반응기에 주입하여 그 함량이 총괄 수율에 미치는 영향을 고찰하였다. Fig. 6은 반응온도 50°C, 물 비 1:2x2의 2단계 메탄올을 주입, 리파제 함량 7wt%일 때 실리카겔 함량이 지방산 메틸에스테르의 총괄 수율에 미치는 영향을 도시하였다.

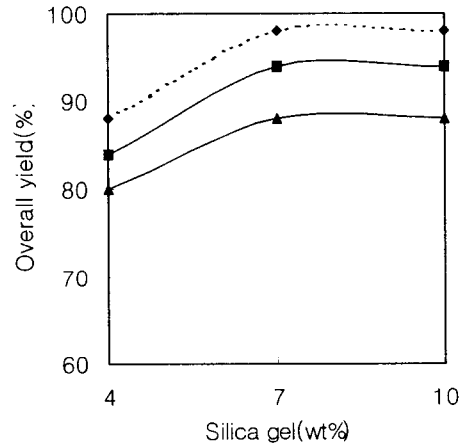


Fig. 6. Effects of silica gel content on overall yield. (· · ·◆· · ·:soybean oil, 50°C, 7% lipase, 24 number of element, -■-:peanut oil, 50°C, 7% lipase, 24 number of elements, -▲-:canola oil, 50°C, 7% lipase, 24 number of elements).

실리카겔의 함량이 높으면 실리카겔에 의해 글리세롤이 현저히 흡착되어 리파제 표면의 활

성 작용부위가 보호될 뿐 만 아니라 가역 전이 에스테르 반응이 비가역 반응으로 전환되면서 총괄 수율이 증가하였다. 대두유의 경우 실리카겔 함량이 7wt%일 때 글리세롤 함량이 평형에 도달하면서 98%의 총괄 수율을 보였고, 그 이상의 함량에서는 총괄 수율이 일정하였다. 피넛유와 카놀라유의 경우도 마찬가지로 실리카겔 함량이 7wt%일 때 각각 94%, 88%의 총괄 수율을 보였다. 본 실험범위에서 최적 실리카겔 함량은 7wt%를 나타냈다.

4. 결론

연속공정 리파제(Novozym - 435) 촉매 전이 에스테르화로 바이오디젤을 생산하는 조업조건들이 지방산 메틸에스테르의 총괄 수율에 미치는 영향을 고찰하여 최적 반응조건들을 얻었다.

1. 본 실험에서 대두유에 대한 메탄올의 한계 몰 비는 1:4로 나타났다.
2. 최대 반응조건으로 오일에 메탄올 주입은 2단계의 1:2x2, 리파제 함량은 7wt%, 정적 반응기의 역 회전수는 24, 유량은 0.2ml/min, 그리고 실리카겔 함량은 7wt%로 나타났다.
3. 불포화 지방산 함량이 가장 높은 대두유로서 지방산 메틸에스테르의 총괄수율은 98%로 나타났다.
4. 정적 반응기 설계, 메탄올의 단계별 주입 과정과 실리카겔 주입과정은 이 리파제 불활성화를 억제해 주는 데 영향이 있음을 알 수 있다.

감사의 글

본 연구는 제주대학교 발전기금의 지원으로 이루어졌으며, 이에 감사를 포함합니다.

참고문헌

1. H. Fukuda, A. Konde, and H. Noda, Bio-diesel Fuel Production by Immobilization of Oils, *J. of Bioscience & Biotechnology*, **92**, 405 (2001).
2. A. Strivastava and R. Prasad, *Triglyceride - based Diesel Fuels*, **4**, 111 (2000).
3. W. Korbitz, Bio-diesel Production in Europe and North America, an Encouraging Prospect, *Renewal Energy*, **16**, 1078 (1999).
4. F. Ma and M. A. Hanna, Bio-diesel Production : A Review, *Bioresource Technology*, **70**, 1 (1999).
5. X. Lang, A. K. Dalai, N. N. Bakhshi, M. J. Reaney, and P. B. Hertz, Preparation and Characterization of Bio-diesel from Various Bio-oils, *Bioresouce Technology*, **80**, 53 (2001).
6. F. Ma, D. Clements, and M. A. Hanna, The Effect of Mixing on Transesterification of Beef Tallow, *Bioresouce Technology*, **69**, 289 (1999).
7. M. Hajek, Microwave Catalysis in Organic Synthesis Andre Loupyed. Weinheim, pp.345 - 378, (2002).
8. D. Kusdiana and S. Saka, Kinetics of Transesterification in Rapeseed Oil to Bio-diesel as Treated in Supercritical Methanol, *Fuel*, **80**, 693 (2001).
9. Yu. L. Khmel'nitsky and A. V. evashov, Engineering Bio-catalytic System in Organic Media with Low Water Content, *Enzyme Microb. Technol.*, **10**, 713 (1988).
10. T. Samukawa, M. Kaido, and H. Fukuda, Pretreatment of Immobilized Candida antarctica Lipase for Bio-diesel Fuel Production from Plant Oil, *J. Biosci. Bioeng.*, **90(2)**, 180 (2000).
11. D. Nimcevic, R. Putingam, and J. R. Gape, Preparation of Rapeseed Oil Ester Lower Aliphatic Alcohol, *JAOCS*, **77**, 275 (2000).
12. B. Freedman, E. H. Pryde, and T. L. Mounts, Variables Affecting the Yield of Fatty Ester from Transesterified Vegetable Oil, *JAOCS*, **61**, 1638 (1984).
13. H. Nouredini, D. Harkey, and V. Medikondure, A Continuous Process for Conversion of Vegetable Oils into Methyl Ester of Fatty acid, *JAOCS*, **75(12)**, 1775 (1998).
14. Y. Shimada, Y. Watanabe, and

- T. Samakawa, Conversion of Vegetable Oil to Bio-diesel Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase, *JAOCS*, **76**, 789 (1999).
15. Y. Watanabe, Y. Shimada, and A. Sugihara, Continuous Production of Bio-diesel Fuel from Vegetable Oil Using Immobilized *Candida antarctica* Lipase, *JAOCS*, **77**, 355 (2000).
16. T. Samukawa, M. Kaieda, and H. Fukuda, Pretreatment of Immobilized *Candida Antarctica* Lipase for Bio-diesel Fuel Production from Plant Oil, *Journal of Bio-resources and Bioengineering*, **90** (2), 180 (2000).
17. H. S. Kim, Enzymatic - catalyzed Transesterification of Soybean Oil into Biodiesel, *Journal of Korean Oil Chemist's Soc.*, **20**(3), 251 (2003).
18. Scott E. Harmeier, Enzymatic Glycerolysis of Soybean oil, *M. S. Thesis*, pp. 11 (1998).
19. B. Selmi and D. Thomas, Immobilized Lipase - Catalyzed Ethanolysis of Sunflower Oil in a Solvent - Free Medium, *JAOCS*, **75** (6), 691 (1998).