

## 말라카이트 그린의 색엷음 현상을 이용한 글리세롤의 정량: 바이오디젤 내 반응물 분석의 적용 가능성

이미화, 이영철, 신현재\*

### Quantification of Glycerol by Malachite Green Fading Phenomenon: Application in Reaction By-Product of Biodiesel

Mi-Hwa Lee, Young-Chul Lee, and Hyun-Jae Shin\*

접수: 2011년 7월 28일 / 게재승인: 2011년 9월 23일  
© 2011 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Nowadays biodiesel (fatty acid methyl ester, FAME) has been becoming an important issue as a desired alternative of energy products because of non-toxic, biodegradable properties, and lower exhaust emissions. During esterification of fatty acids or transesterification of oils and fats with short chain alcohols by the alkali-catalyzed methanolysis, FAME and unrefined glycerol are generated. Quantification of glycerol as a by-product is important because of a determinant of biodiesel quality. However, the glycerol analysis by gas chromatography (GC) method has laborious works with sample preparation, long time and cost of sample analysis. Thus, there is a need to analyze glycerol more simply. Herein we demonstrate that the colorimetric assay for glycerol analysis conducted by UV-vis spectrophotometer at the wavelength 617 nm whose peak is maximum intensity of malachite green, resulting in the red-shift occurred proportionally as a function of glycerol amount. Thus, it is considered the solvent media for malachite green fading for biodiesel production: (1) water, (2) MeOH, and (3) EtOH. The resulting findings show that the peak intensity at 617 nm in glycerol-malachite green mixture had a relationship between glycerol concentration and degree of peak shift as increase in pure glycerol concentration approximately at pH 7.0. However,

when it was measured the unrefined glycerol concentration by diluting and adjusting with water to buffer (pH 7.0), it was not observed the absorption peak at 617 nm because of impurities and OH ions. In case of glycerol from biodiesel production factories, glycerol concentration could be successfully measured.

**Keywords:** Biodiesel, Alkaline fading, Malachite green, Glycerol, Quantification, Colorimetric assay

#### 1. 서론

바이오디젤은 식물성기름이나 동물성지방과 알코올을 반응시켜 합성된 바이오연료로 전이 에스테르화 반응을 통하여 부산물인 glycerol과 fatty acid methyl ester (FAME, 3 molecules of biodiesel)가 생성된다. 바이오디젤이라고 하는 것은 FAME로 규정되어 있다 [1-3].

Fig. 1은 식물성 오일 또는 동물성 지방산과 알코올이 촉매에 의해 바이오디젤이 생성되는 반응이다. 1몰의 triglyceride를 반응시켜서 1몰의 glycerol과 3몰의 methyl esters를 만들기 위해서 이론상 3몰의 알코올이 필요하지만 충분한 양이 있어야 반응이 쉽게 일어날 수 있기 때문에 보통은 알코올과 오일의 비를 6 : 1의 비율로 반응시킨다. 에스테르화 반응의 속도는 보통 염기, 산 촉매 또는 lipase 효소에 의해 달라지지만 염기촉매를 사용하는 방법이 산 촉매와 효소를 사용하는 방법보다 반응속도가 빠르고 저렴하기 때문에 NaOH, KOH 같은 촉매가 사용된다 [4].

조선대학교 생명화학공학과  
Department of Chemical & Biochemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel: +82-62-230-7518, Fax: +82-62-230-7226  
e-mail: shinhj@chosun.ac.kr

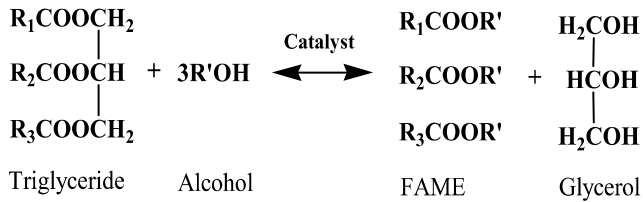


Fig. 1. Transesterification reaction.

전이 에스테르화 반응을 통해서 FAME과 비정제 glycerol이 얻어진다면 분석을 통해서 함량 즉, 농도를 얻을 수 있다. 얻어진 FAME은 한국석유관리원에서 권하는 시험방법 KS M 2412를 참고하여 gas chromatography (GC)로 분석을 하여 함량을 얻을 수 있다. 하지만 GC를 사용하기 때문에 분석방법이 굉장히 복잡할 뿐만 아니라 먼저 바이오디젤을 구성하고 있는 각각의 지방산 메틸에스테르 (FAME Mix Analytical Standard)를 이용하여 머무름 시간을 확인하고 내부 표준물질인 methyl heptadecanoate의 면적과 비교하여 각 성분의 농도를 계산하여야 한다. 내부 표준 시료인 methyl heptadecanoate는 메틸헵타데카노에이트와 헵탄을 사용하여 10 mg/mL로 만들어서 FAME 250 mg과 표준시료 5 mL를 혼합하여 GC로 분석한다.

$$Y_{ester} (\%) = \frac{(\sum A) - A_{EI}}{A_{EI}} \times \frac{C_{EI} V_{EI}}{m} \times 100 \quad (1)$$

식 (1)은 FAME의 함량을 구하는 식으로  $\sum A$ 는 C<sub>14</sub>에서 C<sub>24:1</sub>까지의 피크 전체 면적을 나타내며 A<sub>EI</sub>는 메틸헵타데카노에이트에 해당하는 면적, C<sub>EI</sub>는 사용한 메틸헵타데카노에이트 용액의 농도 (mg/mL), V<sub>EI</sub>는 사용한 메틸헵타데카노에이트 용액의 부피 (mL), m은 시료의 무게 (mg)을 나타낸다 [5-7]. 바이오디젤 내의 glycerol을 정량하는 방법은 FAME 함량 측정방법과 마찬가지로 한국석유관리원에서 권하는 시험 방법 KS M 2412를 참고하여 GC를 이용하여 정량할 수 있다. 또 다른 방법으로는 UV-vis spectrophotometer를 사용하여 분석 할 수 있다. 이 방법은 비경제적이고 data processing이 오래 걸리는 GC 방법 보다 더 경제적이고 신속하다는 장점이 있다. 비색분법의 원리는 바이오디젤 내 유리 glycerol이 sodium periodate와 반응을 하여 formaldehyde를 생성하는데 이때 formaldehyde는 acetyl acetone와 반응하여 3,5-diacetyl-1,4-dihydrolutidine이라는 황색 물질을 형성한다. 이때 생성되는 화합물의 양은 시료 내 glycerol의 양에 비례하므로 이를 410 nm에서 측정하면 바이오디젤 내의 glycerol을 정량할 수 있다 [8]. 그러나 이 방법은 여러 종류의 시약이 필요하며 실험 준비가 까다롭기 때문에 오랜 시간이 걸린다는 단점이 있으며 에스테르화반응 후 얻어지는 부산물인 glycerol의 농도는 측정이 불가능하다는 단점이 있다. 그 외에 thin layer chromatography (TLC)와 near infrared (NIR) spectroscopy를 이용하여 에스테르화 반응 후 얻어지는 glycerol의 함량을 정량하는 방법이 있다 [9,10]. 그러나 상기한 방법들은 GC의 경우 여러 시약과 준비과정이 까다로우며 분석 시에 시간이 오래 걸리는 불편함이 있다. 다시

말해 값비싼 장비와 숙달된 전문가가 필요하다. 이에 반해 박막 방법은 간단하고 값싼 방법이지만 하나 이미지의 결점과 GC에 비해 100배 낮은 농도까지는 식별이 쉽지 않아 GC나 high performance liquid chromatography (HPLC)의 inline 방법이 접목되어야 하는 문제점이 있다. 또한 NIR spectroscopy의 경우 많은 시료를 빠르게 분석할 수 있고 시료의 양이 극히 적어도 분석이 가능하며 시료가 파괴되지 않는다는 장점이 있지만 신뢰도, 정확도, 재현성이 떨어진다는 단점을 가지고 있다.

한편, alcohol, ethylene glycol, H<sub>2</sub>O, glycerol in water의 weight percent를 달리하여 malachite green (MG<sup>+</sup>)을 넣으면 hydroxide ion과 MG<sup>+</sup>의 반응을 하여 fading 현상이 일어나게 되는데 각 시료를 UV-vis spectrophotometer로 측정할 때 glycerol의 weight percent가 증가하면 할수록  $\lambda_{max}$  (nm)가 증가하는 걸 볼 수 있다. 이는 hydroxide ion의 농도가 진할수록  $\lambda_{max}$  (nm)가 증가 한다는 것을 알 수 있다 [11]. 즉, 흡수 파장이 intensity가 증가되면서 shift 한다는 것을 관찰할 수 있었으며 이는 glycerol의 hydroxide ion 또한 농도에 따라서  $\lambda_{max}$  (nm)가 달라진다는 것을 알 수 있다. MG<sup>+</sup>과 hydroxide ion이 반응을 하면서 chromatic malachite green이 carbinol base 형태로 변환된다. Fig. 2에서 보듯이 MG<sup>+</sup>의 색이 변화가 일어날 때 hydroxide ion의 농도에 따라 MG<sup>+</sup>과의 반응 달라지기 때문에 흡광도의 변화를 이용하여 glycerol의 농도를 측정할 수 있다.

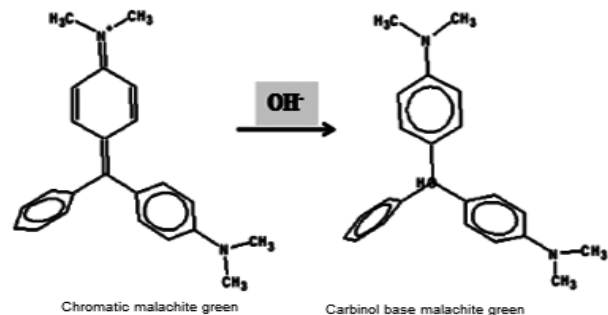


Fig. 2. Two forms of malachite green.

본 연구에서는 MG<sup>+</sup>을 이용하여 glycerol in water를 정량할 수 있다는 연구결과에 따라 전이 에스테르화 반응 후 얻어지는 바이오디젤 내의 glycerol를 측정 할때 MG<sup>+</sup>을 이용하여 UV-vis spectrophotometer로 농도를 측정하는 것이 고가의 장비 GC를 이용하여 농도를 측정하는 방법의 대안이 될 수 있는지 확인해보았고 전처리 과정을 거친 glycerol의 농도, 공장 수준에서 얻어지는 impurity가 거의 없는 glycerol의 농도를 성공적으로 측정하였다.

## 2. 실험재료 및 방법

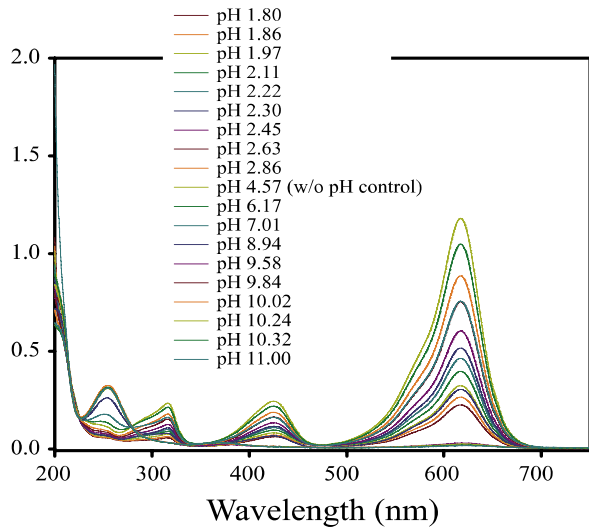
### 2.1. 재료 및 실험 장치

본 실험에서 사용되는 유지 시료는 CJ에서 생산되고 있는 백설유로 전이 에스테르화 반응을 하였으며 반응에 사용된

알코올은 메탄올 (순도 99.5%)은 대정화금의 제품, 에탄올 (순도99.8%)은 CARLO ERBA CHEMICAL 제품을 사용하였다. 반응의 촉매로 사용된 것은 KOH (KOH content  $\geq$  85%,  $K_2CO_3$  content  $\leq$  2.0%)는 Sigma aldrich의 제품을 사용하였다.  $Mg^{+}$ 와 glycerol의 관계를 파악하기 위해  $Mg^{+}$ 는 Kanio Chemical의 제품을 사용하였고 glycerol (순도 minimum 99%)은 Sigma aldrich의 제품을 사용하였다. 실험 장치로는 500 mL 분액 깔대기, 3구 플라스크 500 mL, 온도 조절이 가능한 교반기, UV-vis spectrophotometer가 사용되었다.

**2.2. Malachite green ( $Mg^{+}$ )과 glycerol**

Malachite green ( $Mg^{+}$ )이란 트리페닐메탄계의 염료로써 아닐린그린 또는 빅토리아그린 B (또는 WB)라고도 하며, 화학식은  $C_{23}H_{25}ClN_2$ 이다. 청록색의 광택이 나는 결정으로 물 또는 알코올에 녹는다.  $Mg^{+}$ 은 pH가 7.01 이하일 경우 chromatic malachite green의 형태로 존재한다. 하지만 pH 7.01 이상일 경우 carbinol base의 형태로 변하는 걸 알 수 있었다.  $Mg^{+}$ 이 pH에 따라 어떠한 영향을 받는지 알아보기 위해 각각의 pH에 따른  $Mg^{+}$ 의 농도를 5 ppm으로 만들어 617 nm에서 흡광도를 측정하였다. 그 결과 Fig. 3에서 pH 7.01 이상부터 chromatic malachite green이 carbinol base형태로 빠르게 전환되면서 흡수 파장이 617 nm가 아닌 255 nm에서 흡수 파장이 나타나는 것을 알 수 있었다.



**Fig. 3.** Survey scan of UV-vis spectra according to pH at MG concentration (5 mg/L).

glycerol이란 글리세린이라고도 부르며 무색, 무취의 액체이며 점성이 매우 높다. 유지 성분으로써 공업적으로 유지를 분해하여 얻어지며 3개의 수산기를 가진 3가 알코올이다. 화학식은  $C_3H_8O_3$ 이며 물과 알코올에는 임의의 비율로 섞인다.

**2.3. 알칼리 촉매에 의한 전이 에스테르화 반응 방법**

전이 에스테르화 반응을 하기 위해서 유지 : 알코올의 몰비를 1 : 3, 1 : 6, 1 : 9로 변화시키면서 실험을 하였다. 각각

몰비에 대한 촉매 KOH의 첨가량은 유지를 기준으로 하여 0.5, 1.0, 1.5 wt%로 증가시키면서 실험을 하였으며 실험온도는 60°C, 300 rpm의 조건에서 실험을 하였다. 또한 각각 실험 sample은 30분, 1시간 동안 반응시켜서 얻었다.

**2.4. KS 시험방법에 의해 FAME 함량 분석 방법 [2,6,7]**

실험을 통해 얻어진 FAME sample은 분석을 위해 methyl heptadecanoate용액 즉 내부 표준액 10 mg/mL을 제조하여 분석에 사용하였으며 분석의 원리는 KS M 2413 : 2004에 기초한 내부 표준법으로 정량을 하였다. 사용된 GC는 다음과 같다. 모델 6890N, Agilent Technologies, USA이며 컬럼은 DB-WAX 30 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.25  $\mu$ m, Agilent Technologies, USA. GC의 검출기는 불꽃이온화 검출기, 운반 가스는 헬륨, 주입기의 온도는 250°C, 오븐의 온도는 200°C의 조건에서 분석을 하였다.

**2.5. KS 시험방법에 의해 총 glycerol 정량 방법**

실험을 통해 얻어진 총 글리세린은 pyridine과 N-methyl-N-trimethylsilyltrifluoroacetamide (MSTFA) 존재 하에 바이오디젤을 silyated 유도체로 변환하여 분석하는 원리이며 GC (7890A, Agilent Technologies, USA)의 컬럼은 DB-5HT (15 m  $\times$  0.32 mm  $\times$  0.1  $\mu$ m, Agilent Technologies, USA)를 사용하였다. 분석의 방법은 KS M 2412 : 2004에 기초하였으며, GC의 검출기는 불꽃 이온화 검출기, 검출기의 온도는 380°C, 운반 가스는 수소 또는 헬륨을 사용하여 분석하였다.

**2.6. 비정제 glycerol 농도 측정 방법**

비정제 glycerol의 농도를 측정하기 전에  $1.38 \times 10^{-4}$  M의  $Mg^{+}$  solution을 만들었다. solvent H<sub>2</sub>O, MeOH, EtOH를 사용하여 glycerol의 wt%를 0부터 100 wt%까지 만든 후 sample (2.9 mL)과  $Mg^{+}$  solution (0.1 mL)를 vortexing하여 UV-vis spectrophotometer 617 nm에서 측정을 하였으며  $\lambda_{max}$  (nm)를 구하여 glycerol weight percent에 대한 standard curve를 작성하였다. 실제로 전이 에스테르화 반응 후 얻어진 비정제 glycerol의 시료 total volume은 2.9 mL에  $Mg^{+}$  solution (0.1 mL) 첨가한 후 vortexing을 하여 시료와  $Mg^{+}$  solution이 잘 섞이게 한 다음 위와 같은 방법으로 UV-vis spectrophotometer로  $\lambda_{max}$  (nm)를 구하였다.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1 콩 유지를 이용한 바이오디젤의 생산과 반응분석**

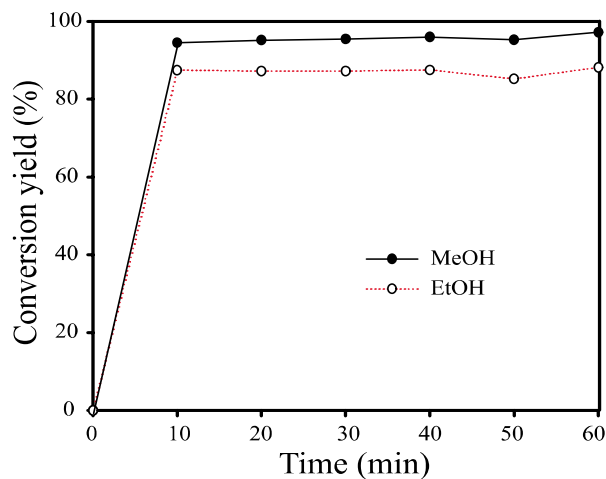
알칼리 촉매에 의한 전이 에스테르화 반응을 통해 얻어진 FAME를 KS 시험 방법에 따라서 함량을 측정한 결과 알코올과 유지의 몰비, 촉매의 wt%, 반응 시간에 따라서 함량이 달라지는 것을 알 수 있었다. Fig. 4는 알코올의 종류와 반응 시간에 따라 알코올과 유지의 몰비는 6 : 1, 촉매는 KOH 1.0 wt%, 60°C의 조건에서 전환수율을 얻은 것으로 반응은 10분이 지나면 거의 완결되는 것으로 확인 할 수 있었다. 대두유를 메탄올 (MeOH)과 반응 시켜 KOH 1.5 wt%를

넣어 반응 시켰을 때 97.23%로 최적의 수율이 얻어졌으며 에탄올 (EtOH)과 대두유를 반응시켜 KOH 1.5 wt%를 넣어 얻은 FAME의 수율은 87.64%로 얻어졌다. 실험 결과 MeOH이 EtOH보다 더 좋은 FAME의 수율을 얻을 수 있었다.

MeOH/oil이 증가할수록 FAME의 함량이 높아지며 그에 반에 monoglyceride, diglyceride, triglyceride는 함량이 낮아지는 관계가 보고된 바 있다 [12]. MeOH과 oil의 비를 6 : 1, 60°C의 조건에서 각각 촉매의 wt%와 반응 시간을 달리하여 FAME 함량과 총 glycerol의 함량 분석을 한 결과 FAME yield가 89.48%일 때 monoglyceride는 0.10, diglyceride는 0.07, triglyceride는 0.23, 유리 glycerol은 0.12%로 total glycerol함량이 0.52%가 얻어졌으며 FAME yield가 97.15%일 때 각각 0.04, 0.00, 0.00, 0.03%로 total glycerol함량은 0.08%가 얻어졌다. 실험 결과 FAME의 농도가 높을수록 총 글리세린의 함량이 낮다는 것을 알 수 있었다 (Table 1).

**Table 1.** Contents of Fatty acid methyl ester (FAME) and total glycerol according to soybean oil : catalyst ratio and reaction time, MeOH : oil = 6 : 1, 60°C, 300 rpm

KOH concentration (wt%)	Reaction time (min)	FAME concentration (%)	Total glycerine concentration (%)
0.5	30	89.48	0.52
	60	91.62	0.37
1	30	95.05	0.16
	60	96.47	0.12
1.5	30	94.87	0.15
	60	97.15	0.08



**Fig. 4.** Conversion yield of biodiesel.

### 3.2. 비정제 glycerol 농도 측정

Glycerol과  $Mg^{2+}$ 의 관계를 알아보기 위하여 solvent  $H_2O$ , MeOH, EtOH에 glycerol의 wt%를 0-100 wt% 까지 만들어  $1.38 \times 10^{-4}$  M  $Mg^{2+}$  solution 0.1 mL을 첨가하여 UV-vis spectrophotometer를 측정된 결과 617 nm에 대한  $Mg^{2+}$ 의 흡광도를 얻을 수 있었는데 Fig. 5의 (a)는 solvent  $H_2O$ , (b)는 solvent MeOH, (c)는 solvent EtOH로써 glycerol의 wt%가 증가하면 할수록  $Mg^{2+}$ 이 hydroxide ion과 반응하

면서 glycerol 즉, hydroxide ion의 농도가 높으면 높을수록 파장이 red-shift 되면서 흡수 intensity가 상승하는 것을 확인하였다.

Fig. 5의 pure glycerol in  $H_2O$ 의 calibration curve 그려 본 결과  $R^2$ 의 값이 0.991로써  $Mg^{2+}$ 와 glycerol이 높은 선형성을 보이는 것을 알 수 있었다. 그 결과를 통해 Table 2에서도 확인할 수 있듯이 glycerol의 wt%가 증가하면 할수록  $\lambda_{max}$  (nm)가 증가하는 걸 알 수 있었으며 실제 알고 있는  $W_{GI}\%$ 과 실험을 통하여 얻어진 calibration curve을 통해  $W_{GI}\%$ 를 비교한 결과를 나타내었다.

**Table 2.** Measurement of glycerol concentration in a series of samples by the MAGUS test

Prepared	$W_{GI}\%$ in sample		$\lambda_{max}$ (nm)
	Calculated		
4.30	3.46		617.99
12.71	11.63		618.91
20.82	19.72		619.82
24.77	27.81		620.73
36.22	35.90		621.66
43.54	43.99		622.56
57.49	52.07		623.47
61.20	68.23		625.29
76.81	76.31		626.20
94.46	92.46		628.02
100	100.54		628.93

비정제 glycerol의 hydroxide ion과 미 반응한 알코올의 hydroxide ion이  $Mg^{2+}$ 과 반응 하여 chromatic malachite green이 carbinol base로 급격하게 변하게 되는데 UV-vis spectrophotometer로 흡광도를 측정된 결과 617 nm에서의 peak가 사라지고 255 nm에서 peak가 나타나면서 pure glycerol과 전이 에스테르화 반응 후 얻어지는 glycerol의 흡수 파장 영역이 다르다는 것을 확인하였다. 비정제 glycerol의 흡수 파장이 에스테르화 반응 후 생성되는 impurity의 영향이나 미 반응한 알코올의 hydroxide ion, 촉매로 인한 pH의 영향으로 흡수 파장이 다른 것으로 추정되어 distilled water (DW)로 dilution을 하였으며 pH를 7이하로 낮추기 위해 pH buffer로 dilution을 하였지만 바이오디젤 내의 glycerol의 농도를 측정할 수 없었다.

현재 나와 있는 연구를 참고하여 보면  $Mg^{2+}$ 은 hydrolyzable salts에 대해 연관성이 있다고 보고된 바 있는데 실제 실험을 통하여 알 수 있듯이 hydrolyzable salts는  $Mg^{2+}$ 의 흡수파장에 영향을 주어 617 nm의 peak가 생성되지 않게 하였다 [13].

부산물인 glycerol의 농도를 UV-vis spectrophotometer로 측정하여 바이오디젤 내 glycerol의 농도를 정량하려고 하였으나 이는 0.08-0.52%대의 총 글리세롤 농도를 UV-vis spectrophotometer로 측정할 수 없어 적용이 불가능하였으며 그 대신 부산물의 glycerol의 농도는 정제를 통하여 측정할 수 있었다. 그 결과 공장에서 얻어진 glycerol은 알고 있는 농도의 98.5%, 99%의 glycerol을 DW를 이용해 dilution시켜  $Mg^{2+}$ 과 반응 시킨 후 UV-vis spectrophotometer로 측정 한 결과 각각 103.42, 103.42%의 결과값을 얻어 오차

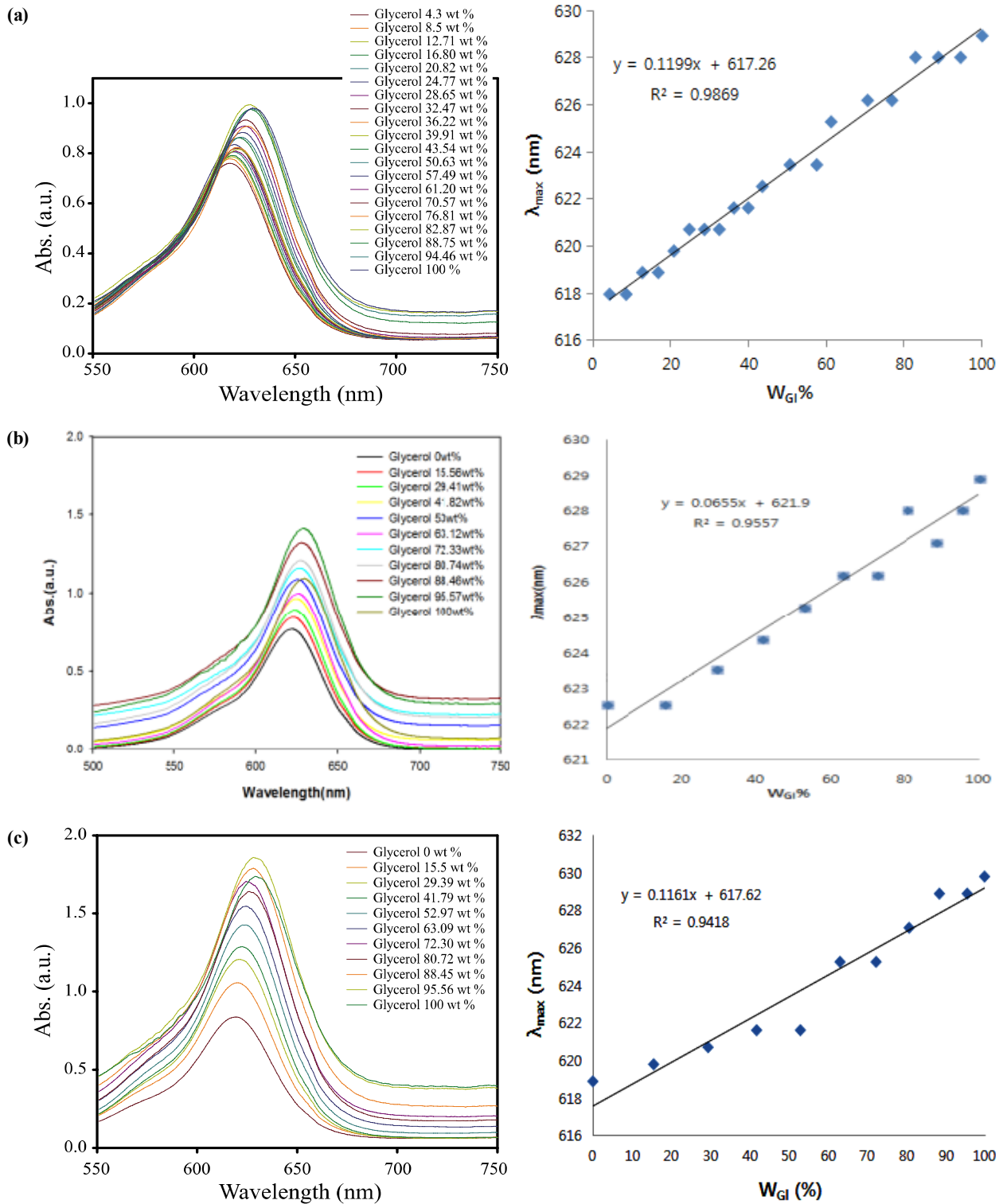


Fig. 5. Survey scan and plot of  $\lambda_{max}$  values of  $MG^+$  vs weight percentage of glycerol in  $H_2O$  (a),  $EtOH$  (b), and  $MeOH$  (c) at neutral pH.

평균 4.67를 나타내었다. 이는 간단한 농도 측정은 가능하다는 것을 보여주었다. 그 결과 전이 에스테르화 반응 후 얻어지는 비정제 glycerol을 간단한 전처리 과정을 통해 흡광도를 측정하여 glycerol의 농도를 측정할 수 있었으며 미지 농도의 glycerol도 UV-vis spectrophotometer를 이용해 농도

를 측정할 수 있었다.

다시 말하여, 전이 에스테르화 반응을 통해 얻어지는 바이오디젤 내의 glycerol이나 부산물로 얻어지는 glycerol은 반응에 사용되는 알코올과 촉매가 녹아 있으며 이는  $MG^+$ 의 peak에 상당한 영향을 주는 것으로 나타났다. 이와 같

이  $MG^+$ 의 흡수 파장의 변화의 원리를 이용하여 UV-vis spectrophotometer로 농도를 측정하는 방법은 극히 미량의 impurity의 영향이나 hydroxide ion의 영향, pH의 영향, 부산물 glycerol이 가지고 있는 황갈색의 색 등에 의해  $MG^+$ 의 peak가 변한다는 한계점을 가지고 있다. 이 한계점을 극복하기 위해서는 전이 에스테르화 반응 후 얻어진 바이오디젤이나 glycerol에 녹아있는 촉매를 산을 통해 중화시킨 후 알코올로 침전시켜 여과한 후 농도를 측정하는 방법이 있으며 buffer를 이용하여 pH를 고정시키는 방법 등을 시도하여 glycerol의 농도를 측정하는 방법이 있다 [14].

기존의 바이오디젤 연구를 참고하면 반응 후 대부분 얻어지는 sample은 분석시에 GC를 이용하여 수율을 얻어내고 있는데  $MG^+$ 과 같은 값싼 시료 즉, 염료를 통해 분석에 적용한다면 더할 나위 없이 간단한 프로토콜의 분석방법이 될 것으로 사료된다.

#### 4. 결론

본 연구에서는 에스테르화 반응 후 얻어지는 비정제 glycerol의 손쉬운 정량 방법을 통해 glycerol의 농도를 정량할 수 있는 방법에 대해 연구하였다. 기존의 바이오디젤 연구를 참고하면 반응 후 대부분 얻어지는 sample은 분석 시에 GC를 이용하여 수율을 분석하고 있는데  $MG^+$ 와 같은 값싼 염료를 통해 분석에 적용할 수 있을 것이다. 연구 결과 glycerol과 malachite green이 상당한 선형성을 보였으며 전이 에스테르화 반응 후 얻어지는 부산물 glycerol를 전처리 과정을 거쳐 농도를 알 수 있었다. 더 나아가 공장에서 얻어지는 glycerol의 농도 또한 측정할 수 있었다.

#### 감사

본 연구는 2010년도 지식경제부의 재원으로 한국에너지기술 평가원 (KETEP)의 지원을 받아 수행한 연구과제입니다 (No. 20103020090020).

#### References

1. Tan, T., J. Lu, K. Nie, L. Deng, and F. Wang (2010) Biodiesel production with immobilized lipase: A review. *Biotechnol. Adv.* 28: 628-634.
2. Koh, M. Y. and T. I. M. Chazi (2011) A review of biodiesel production from *Jatropha curcas* L. oil. *Renew. Sust. Energ. Rev.* 10: 2240-2251.
3. Jang, Y. S., K. S. Kim, Y. H. Lee, H. J. Cho, and S. J. Suh (2010) Review of property and utilization of oil crop for biodiesel. *Korean J. Plant Biotech.* 37: 25-46.
4. Jo, B. H. and H. J. Cha (2010) Biodiesel production using microalgal marine biomass. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 25: 109-115.
5. Lim, Y. K., H. J. Jeon, S. Kim, E. S. Yim, H. O. Song, S. C. Shin, and D. K. Kim (2009) Determination of fuel properties for blended biodiesel from various vegetable oils. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 47: 237-242.
6. Chung, K. H. and B. G. Park (2010) Biodiesel production from vegetable oils by transesterification using ultrasonic irradiation. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 21: 385-390.
7. Yang, H. S., G. T. Jeong, S. H. Park, J. H. Park, J. H. Park, and D. H. Park (2007) Reaction Condition for Biodiesel Production from Animal Fats. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 22: 228-233.
8. Bondioli, P. and L. D. Bella (2005) An Alternative spectrophotometric method for the determination of free glycerol in biodiesel. *Eur. J. Lipid. Sci. Tech.* 107: 153-157.
9. Bansal, K., J. McCrady, A. Hansen, and K. Bhalerao (2008) Thin layer chromatography and image analysis to detect glycerol in biodiesel. *Fuel* 87: 3369-3372.
10. Dorado, M. P., S. Pinzi, A. de Haro, R. Font, and J. Garcia-Olmo (2011) Visible and NIR spectroscopy to assess biodiesel quality: Determination of alcohol and glycerol traces. *Fuel* 90: 2321-2325.
11. Samiey, B. and A. R. Toosi (2010) Kinetics of malachite green fading in alcohol-water binary mixtures. *Int. J. Chem. Kinet* 42: 508-518.
12. Freedman, B., E. H. Pryde, and T. L. Mounts (1984) Variables affecting the yields of fatty esters from transesterified vegetable oils. *JAOCs* 61: 1638-1643.
13. Baumann, E. W. (1995) Colorimetric determination of low pH with malachite green. *Talanta* 42: 457-462.
14. Yang, Y. M., K. J. Kim, and Y. Lee (2008) Glycerol separation from biodiesel byproduct. *J. Korean Ind. Eng. Chem.* 19: 690-692.