creative commons

COMMONS DEED

저작자표시-비영리-변경금지 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:

저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.

비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.

변경금지. 귀하는 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공할 수 없습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 이용허락규약(Legal Code)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

Disclaimer

dCollection

[UCI]I804:24011-200000239170

2010년 2월

석사학위논문

Lipase가 고정화된 나노 생촉매를 활용한 생물 전환공정 개발

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

원 춘 화

Lipase가 고정화된 나노 생촉매를 활용한 생물 전환공정 개발

Development of biotransformation process using lipase coated nanobio-catalysis

2010년 2월 25일

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

원 춘 화

Lipase가 고정화된 나노 생촉매를 활용한 생물 전환공정 개발

지도교수 이 중 헌

이 논문을 공학 석사학위신청 논문으로 제출함

2009년 10월

조 선 대 학 교 대 학 원

화 학 공 학 과

원 춘 화

원춘화의 석사학위논문을 인준함

위원장	조선대학교	교수	차 월 석 (인)
위 원	조선대학교	교수	김 정 규 (인)
위 원	조선대학교	교수	이 중 헌 (인)

2009년 11월

조선대학교 대학원

목 차

Abstract

제1장 서론.....1

1−1 Biodiesel.....1

1−2 Fructose ester 4

1−3 Glycerol carbonate 4

제2장 실험재료 및 방법 7

2−1 실험재료.....7
2−1−1 시약.....7
2−1−2 Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR).....7

2−2 효소고정화 실험방법.....11
2−2−1 Polyaniline coated magnetic nanoparticle (PAMP)제조 ...11
2−2−2 L−proline과 polyaniline을 이용하여 새로운 담체 제조.....12
2−2−3 Nanofiber에 효소고정화.....12
2−2−4 효소의 정량.....13
2−2−5 효소의 활성도 측정 13
2−2−6 고정화 효소의 Characterization.....13
2−2−7 고정화 효소의 안정성 14
2−2−8 고정화 효소의 온도에 따른 활성도 변화.....14

2−3 에스테르화 반응.....18

2-3-1 식물성 기름을 이용한 바이오디젤 생산 18
2-3-2 Fructose를 이용한 Fructose ester 생산.....18
2-3-3 Glycerol를 이용한 Glycerol carbonate 생산.....19
2-3-4 Gas chromatography를 이용한 ester분석.....19

제3장 결과 및 고찰 23

3-1 L-proline을 이용하여 만든 담체에 효소고정화.....23

3-2 Nanofiber 에 효소고정화 26

3-3 고정화 효소의 Characterization.....28
3-3-1 고정화 lipase의 Enzyme Kinectics.....28
3-3-2 고정화 효소의 온도에 따른 활성도 변화.....28
3-3-3 고정화 효소의 재사용 가능성 29

3-4 에스테르화 반응.....33
3-4-1 식물성 기름을 이용한 바이오디젤 생산 33
3-4-2 회분식 반응기에서 자연 효소와 고정화 효소에 의한 biodiesel 생산.....34
3-4-3 회분식 반응기에서 부동한 기름을 이용한 biodiesel 생산...34
3-4-4 회분식 반응기에서 biodiesel 생산에 이용되는 고정화효소의 재사용 가능성.....35
3-4-5 CSTR에서 고정화 효소에 의한 biodiesel의 생산 35

3-5 Fructose ester 생산.....41
3-5-1 회분 식 반응기에서 자유효소에 의한 Fructose ester 생산41
3-5-2 Novozym435를 이용 한 fructose ester 생산.....43
3-5-3 고정화 효소를 이용한 fructose ester의 생산 45

3-5-4 다양한 유기용매를 이용한 Fructose ester 생산 47

3-6 Glycerol carbonate 생산 49
3-6-1 회분 식 반응기에서 자유 효소와 Novozyme435에 의한 Glycerol carbonate 생산.....49
3-6-2 Glycerol carbonate 합성에 있어서의 온도의 영향.....49
3-6-3 회분 식 반응기에서 고정화효소에 의한 Glycerol carbonate 의 생산 52
3-6-4 Molecular sieve를 이용한 Glycerol carbonate의 생산.....52
3-6-5 회분식 반응기에서 PANI에 의한 Glycerol carbonate의 생산.....52
3-6-6 회분식 반응기에서 PAMP에 의한 Glycerol carbonate의 생산.....53

제4장 결론.....58

참고문헌 60

List of Table

Table 1. Effect of plate and residence time on p−nitrophenyl butyrate conversion..... 10
Table 2. GC analysis condition..... 22
Table 3. The catalytic activity of the LP immobilized on magnetically separable polyaniline nanofibers. 30

List of figure

Figure 1. Transesterification reaction of triglyceride. 6
Figure 2. Lipase−catalyzed synthesis of fructose fatty acid esters. 6
Figure 3. Lipase−catalyzed synthesis of glycerol carbonate..... 6
Figure 4. microreactor configuration..... 9
Figure 5. Images of CSTR−plate (a) before lipase coating, (b) after lipase coating. 9
Figure 6. Indicates the accessible oxidation states of polyaniline. 15
Figure 7. Standard curve for determination of protein concentration. 16
Figure 8. Standard curve for determination of p−nitrophenol concentration. 17
Figure 9. Standard curve of Palmitic acid..... 20
Figure 10. Standard curve of Glycerol carbonate..... 21
Figure 11. L−proline with polyaniline SEM image. 24
Figure 12. FT−IR spectra: (a) PANI; (b)L−proline with PANI. . 25
Figure 13. polyaniline magnetic particle SEM image..... 27
Figure 14. Lineweaver−Burk plots of free lipase. 30
Figure 15. Lineweaver−Burk plots of PAMP−lipase..... 30
Figure 16. Effect of temperature on stability of the free and immobilized LPs. 31
Figure 17. Recovery of immobilized lipase after reaction with magnet..... 32
Figure 18. Effect of the free and immobilized enzymes on the production of biodiesel. 36
Figure 19. The produced biodiesel peacks from Soybean oil(a) and

graphstone oil(b) are detected by gas chromatography. . 37
Figure 20. Yield of biodiesel from both soybean oil and graphstone oil. 38
Figure 21. Effect of PAMP−LP recycle on biodiesel production... 39
Figure 22. Synthesis of Biodiesel by PAMP−lipase at CSTR (flow rate 0.01ml/min, RT 4hr)..... 40
Figure 23. Effect of moisture content on the enzymatic fructose ester synthesis..... 42
Figure 24. Fructose ester synthesis with novozym435 in acetone (a) vortex, (b) magnetic stirrer..... 44
Figure 25. Fructose ester synthesis with immobilized enzyme. ... 46
Figure 26. Influence of organic solvents on palmitic acid conversion. 48
Figure 27. Glycerol carbonate synthesis with free enzyme and novozym435..... 50
Figure 28. Glycerol carbonate synthesis with novozym435 in different temperature. 51
Figure 29. Glycerol carbonate synthesis using different immobilized media..... 54
Figure 30. Influence of molecular sieve on the synthesis of glycerol carbonate..... 55
Figure 31. Influence of PANF concentration on the synthesis of glycerol carbonate..... 56
Figure 32. Infuence of PAMP concentration on the synthesis of glycerol carbonate..... 57

ABSTRACT

Development of biotransformation process using lipase coated nanobiocatalysis

Yuan Chun Hua
Advisor: Prof. Lee, Jung-Heon, PhD.
Department of Chemical Engineering,
Graduate School of Chosun
University.

Lipase (EC 3.1.1.3) is versatile enzyme with potential industrial applications. It has been used for the modification of fat and oil and synthesis of flavor esters and food additives. The object of this study was to develop a suitable immobilization lipase from *Chromobacterium viscosum* (CV) for production of biodiesel. Lipase was immobilized on the surface of nanofibers as supporting materials by using cross-linked enzyme aggregation by glutaraldehyde. The immobilized lipase on polyaniline magnetic particle (PAMP) is easily separable by magnet. Also, it was much more stable than free enzyme system and it could be used repeatedly with simple recovery process. Immobilized lipase was shown that the storage stability was higher than that of free lipase. The residual activity of immobilized lipase CV was 95% after 32day and that of free lipase was 40%. The produced biodiesel

composition using soybean oil was similar to that of and grapestone oil. The conversion using free lipase was about 60% and using PAMP-lipase was 80% with continuous stirred tank reactor (CSTR).

Fructose ester and Glycerol carbonate were synthesized using free-lipase and immobilized lipase under batch reaction condition enzyme. The conversions of fructose ester and glycerol carbonate with free were 64% and 30% under batch operation. The conversion of glycerol carbonate with immobilized enzyme shows 13.4% under batch operation.

Keywords: immobilized enzyme, biodiesel, fructose ester, glycerol carbonate, CSTR.

제1장 서론

Lipase는 기름분해 공정의 생촉매 역할 이외에도 Fructose ester 합성, Glycerol carbonate 합성 등에 다양한 활용을 할 수 있는 유용한 촉매이며, 산업적으로 매우 중요한 효소이다. 그러나 아직까지 lipase 등의 효소생산단가는 매우 높은 편이며, 안정성이 약하여 효소재활용과 안정성증가를 위한 경제성문제가 발생된다. 이러한 문제점을 보완하기 위해 효소고정화가 연구되고 있으며 고정화 효소를 이용한 공정들이 개발되고 있다.

1-1 Biodiesel

1992년 리우환경회의와 1997년 교토협약 이후 공해물질에 대한 규제와 이산화탄소 배출량 절감의무 등으로 바이오 연료에 대한 관심이 집중되고 있다. 현재 심각한 공해를 유발시키는 디젤유에 대한 청정 대체연료인 바이오디젤은 식물성 기름이나 동물성 지방과 같은 재생 가능한 생물학적 원료로부터 만들어지는 것을 말한다. 이는 생분해가 가능하고 무독성이며 낮은 배기특성을 가지기 때문에 환경적으로 매우 유용하다고 여겨지고 있다. 최근에 들어서 원유가격의 상승, 화석연료의 고갈, 환경적 문제 등으로 인해 바이오디젤 연료를 만들기 위해 식물성기름이나 동물성 지방을 사용하고자 하는 관심이 다시 높아지고 있으나, 화석연료를 지속적으로 사용함으로써 지역적 대기오염을 심화시키고 이산화탄소에 의한 지구온난화를 가속시키는 문제가 점차로 심각해질 것으로 보인다. 이러한 상황에서 바이오디젤의 사용은 오염물질의 배출을 줄이고 결과적으로 대기 중의 암유발 물질의 수준도 감소시키는 결과를 가져오게 될것이다. 바이오디젤은 기름과 지방을 알코올과 화학적으로 반응시켜 얻어지는 지방산알킬에스터(fatty acid alkyl ester, FAAE)를 말한다. 이와 같이 화학적 변환을 통해 얻어진 에스터는 석유계의 디젤유

와 혼합해서 사용된다. 석유유래 디젤에 비해 비용은 높지만 기존의 페트로디젤과 성질이 매우 유사하며 성능은 비슷하지만, 비교적 점도가 낮고 산소함유량이 높고 유황성분과 방향족탄화수소가 전무하여 인체에 유해한 가스배출을 절감할 수 있으며, 생태계에 유출되어도 자연 분해될 뿐만 아니라 발화점이 높아서 운송과 저장 시 보다 더 안전하고 환경친화적이여서 청정연료라 할 수 있다[1]. 대기 중의 탄산가스는 식물의 탄소동화작용으로 에너지화된 재생에너지이며, '기후변화협약'의 관점에서 촉진 되어야 할 대체에너지로서 유럽연합과 미국 등 선진국에서는 정부주도로 적극적인 바이오디젤의 생산계획과 세금감면혜택으로 사용을 장려하고 정부소유차량의 일정량의 바이오디젤을 사용하도록 의무화하기로 하였다.

기름과 지방은 기본적으로 물에 녹지 않으며 식물이나 동물체내에 존재하는 소수성 물질이며, 한 분자의 glycerol 에 세분자의 지방산이 연결되어있는 형태를 갖기 때문에 triglyceride 라고 불린다. 일부 자연에서 얻어지는 glyceride 들은 불포화지방산 함량이 높아서 실온에서 액체의 형태를 가지고 있다, 이들을 바이오디젤 연료로 직접 사용하는 것은 높은 점도로 인해 어려움을 가지고 있다. 지방의 경우는 포화지방산을 더 많이 포함하고 있어 실온에서 고체로 존재하므로 원래의 형태로는 디젤엔진에 사용할 수 없다[2].

식물성 기름은 90~98%의 triglyceride와 소량의 mono-, 그리고 diglyceride를 포함하고 있다. 식물성기름을 디젤엔진연료로 사용하기 위해서는 이들이 갖는 여러가지 문제점들, 즉 높은 점도, 산화도, 유리지방산 농도 등의 문제를 해결해야 한다. 이러한 문제를 해결하기 위한 여러 가지 공정 중에 hydrolysis와 유사한 transesterification은 alcoholysis라고도 불리는데 ester에 붙어있는 alcohol을 다른 alcohol로 치환하는 공정을 말한다. 이 공정은 triglyceride의 점도를 낮추기 위해 널리 사용되는 방법으로 메탄올이 사용되었을 때는 methanolysis라고 불리며 반응식은 Figure 1. 로 나타낼 수 있다. 일반적인 바이오디

젤 생산공정은 유지에 알코올과 촉매를 첨가한 후 진행되는 전이에스테르화 공정과 생성물의 분리를 위한 침강, 정제 및 증발단계로 구성되며 전이에스테르화 반응 후에는 부산물로서 발생되는 글리세린은 반응 후 침강조에서 비중차이로 분리된다[3].

바이오디젤의 생산방법은 주로 KOH, NaOH, K_2CO_3 등을 화학적 촉매방법을[4, 5] 이용하고 있지만, 고 에너지성의 다단계 반응공정이 요구되고 촉매 및 부산물의 회수가 어려울 뿐 아니라 다량의 폐수발생에 의한 2차 환경오염을 유발하는 등의 부작용이 있어 향후 대규모 바이오디젤의 수요를 충족할 수 있는 친환경 생물학적 신공정이 대두되고 있다. 1996년 Nelson등이 미생물 유래의 다양한 lipase를 이용하여 hexane등의 용매내에서 77.8%의 바이오디젤이 생성됨을 보고하여 최초로 생물학적 방법으로 바이오디젤 생산공정 가능성을 시사하였다[6].

이후 일본은 중심으로 Candida antarctica, Pseudomonas cepacia, Candida lugosa, Rhizopus oryzae 등의 미생물 유래의 다양한 lipase를 사용하여 고순도의 바이오디젤 생산이 가능함을 보고하였다. 그러나 생물촉매인 lipase 효소생산 비용이 바이오디젤 생산비용에 비해 매우 고가이기 때문에 바이오디젤 전환반응공정에서 효소를 재사용하지 않으면 경제성이 없었다. 이를 보완하여 효소의 활용성을 높이기 위한 일환으로 효소의 고정화 및 안정화 기술이 많이 개발되어 왔으나 효소를 고정화하는 경우에는 기질의 접근성 문제로 활성도가 낮게 나타나 고정화된 효소를 적용하기 어려웠다. 최근 나노공학이 발달함에 따라 나노물질을 이용한 생명공학에서의 적용이 활발히 진행되고 있다. 자석으로 분리가능한 나노물질에 효소를 고정화함으로서 효소의 지속적인 재활용과 연속적인 활용이 가능해졌다[7].

1-2 Fructose ester

기능성 당에스테르(sugar fatty acid esters)는 비이온성, 생분해성, 그리고 무독성 계면활성제로서 식품유화제, 화장품유화제, 과일도포제 및 건강지향성 지질 대체 식품으로 사용된다. 이와 같은 당에스테르는 고부가가치의 식품 관련 신소재로서 천연유기지방산(lauric, myristic, palmitic, stearic, oleic acid 등)과 각종 당성분(sugars 또는 sugar alcohols)과의 transesterification 반응을 통해 생성된다. 당에스테르는 공업적으로 당과 지방산을 원료로 하여 화학적합성방법으로 생산되고 있으나, 최근에는 환경친화성이 우수한 효소적인 합성법에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다[8]. 화학적 합성법에 의한 당에스테르의 생산은 과도한 용매 및 화학물질 사용과 에너지 소모가 많다는 문제점을 갖고 있다. 반면에 생체촉매기술의 발전과 함께 경제성이 향상되고 있는 효소적 합성법은 소량의 유해 화학물질을 사용하고 에너지사용이 최소화되는 장점을 갖고 있다. Figure 2. 는 palmitic acid와 fructose를 이용하여 fructose palmitate를 합성하는 반응식이다.

1-3 Glycerol carbonate

현재 바이오디젤은 디젤자동차의 경유에 혼합해서 쓰거나, 100%순수 연료로 사용되고 있는데, 미국 및 유럽연합 등에서는 이미 품질기준이 마련되어 있다. 따라서 바이오디젤 생산 시 부수적으로 생산되는 글리세롤의 경우 생산량 급증에 따른 새로운 용도 마련을 위한 많은 연구가 진행되고 있다[9].

전 세계적으로 바이오디젤 생산에 따른 글리세롤 부산물 생산 량은 2001년 60000 ton 에서 2005년 400000 ton 으로 급증하여 전체 글리세롤 총생산량의 50% 를 점유하였고 향후에도 급격히 증가할 것으로 예상되고 있다. 통계에 따르면 디젤연료의 5%를 바이오디젤로 혼합하여 사용하는 경우 천만 톤의 바이오디젤이 필요하게 되고 이 때 백만톤

의 글리세린이 부산물로 생산된다고 한다. 미국의 글리세롤 시장은 과거 20세기에 30년 동안 약 140000 ton/년 규모로 매우 안정적인 시장을 형성하였으나 21세기 들어와서는 바이오디젤의 급격한 보급으로 글리세롤 생산이 공급과잉 상태로 전환되었다[9]. 일본에서의 글리세롤 생산량은 2006년 46000 ton 규모로 파악되었고, 일본에서의 정제 글리세롤(98.5%) 가격은 2004 년 180엔/Kg 에서 2007년 초 165~172엔/Kg 으로 2년 10%동안 정도 떨어진 것으로 나타났다. 한국에서의 글리세롤 시장은 금액단위로 파악되었는데, 240 억 원 규모의 시장에서 자체 생산은 86억, 수입은 154억 정도였다. ICIS보고서에 따르면 2007년 5월에서 8월까지 글리세롤 가격이 약 650 $/ton 에서 1020 $/ ton 으로 약 60% 이상 급등하였다[10]. 이는 전 세계적으로 유지가격이 폭등하면서 일시적으로 바이오디젤 생산이 줄어 수요에 공급이 따라가지 못해 글리세롤 가격이 상승된 것으로 보이나 장기적으로는 바이오디젤 생산에 따른 부산물 글리세롤 생산의 증가로 글리세롤 가격은 하락할 것으로 예측된다. 이런 가격변동은 과거에도 있었는데 1997~ 2000 년 동안 유럽의 바이오디젤 생산량 증가로 글리세롤 가격이 약 40% 폭락하였다가 2001년 회복된 바 있어 글리세롤 시장 예측은 세상의 화학물질 중에서 가장 어려운것으로 보고된 바 있다.

글리세롤 카보네이트(Glycerol Carbonate, 4-hydoxy methyl-1,3-di- oxolan-2-one)는 글리세롤을 이용한 상대적으로 새로운 물질로 화학공업에서 광범위하게 사용될 수 있는 잠재력을가진 물질로 가스분리막의 주요성분, 다양 한 종류의 물질들에 대한 용매 그리고 이 물질의 고체표면에 부착되어 산화를 막는 특성으로 바이오윤활제로도 사용될수있다. Figure 3. 은 Glycerol과 DMC를 이용하여 Glycerol Carbonate를 합성하는 반응식이다.

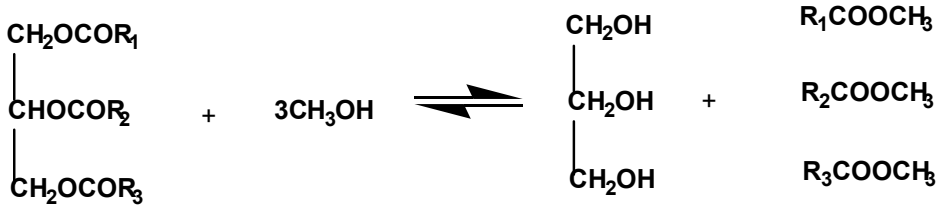


Figure 1. Transesterification reaction of triglyceride.

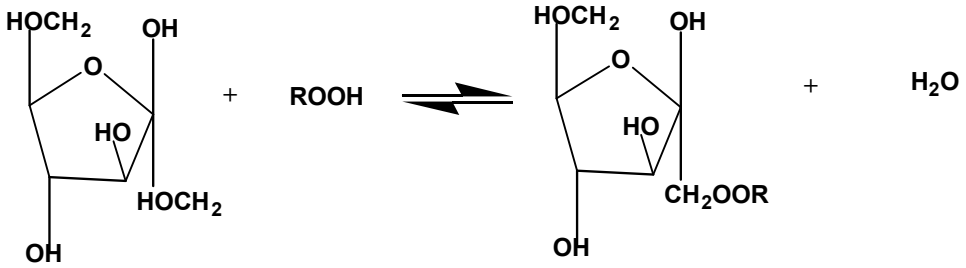


Figure 2. Lipase−catalyzed synthesis of fructose fatty acid esters.

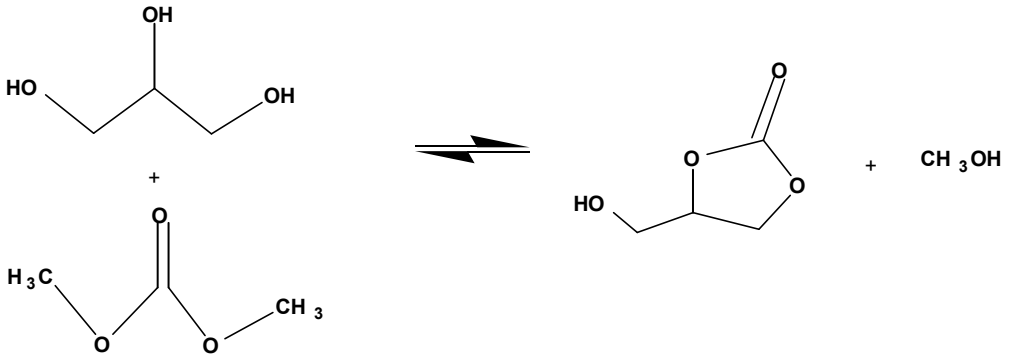


Figure 3. Lipase−catalyzed synthesis of glycerol carbonate.

제2장 실험재료 및 방법

2-1 실험재료

2-1-1 시약

본 연구에서 고정화하기 위해 lipase from *Chromobacterium viscosum*(sigma, USA)를 사용하였고, 담체 제조에 polyaniline, Fe_2O_3(sigma, USA)을 사용하였다. 바이오디젤을 제조하기 위한 원료 유지로는 콩기름 (soybean oil, 백설), 포도씨유(grapestone oil, 청정원)을 사용하였다. 그밖에 Glutaraldehyde solution 25%(sigma, USA), p-nitrophenyl butyrate 98%(sigma, USA), N, N-dimethylformamide (sigma, USA), p-nitrophenol 10 mM standard solution(sigma, USA), sodium phosphate(Duksan), n-hexane HPLC grade(Duksan), protein assay kit(Bio-rad)을 사용하였다. D-(-)Fructose (JUNSEI), Palmitic acid, minimum 99% (Sigma), Lipase B Canida antarctica (Fluka), Acetone HPLC grade (DUKSAN), Molecular sieve 3A beads 4-8mesh(Sigma-Aldrich), Glycerin (DC Chemical Co., Ltd), Dimethy carbonate (Wako), Tetrahydrfuran (Sigma-Aldrich), Molecular sieves, 3Å,beads 4-8mesh (Sigma-Aldrich)를 사용하였다. L-proline((s)-2-Pyrrolidinecarboxylic Acid: Mbcell)와 Acetonitrile(Sigma)도 사용하였다.

2-1-2 Continuous Stirred Tank Reactor (CSTR)

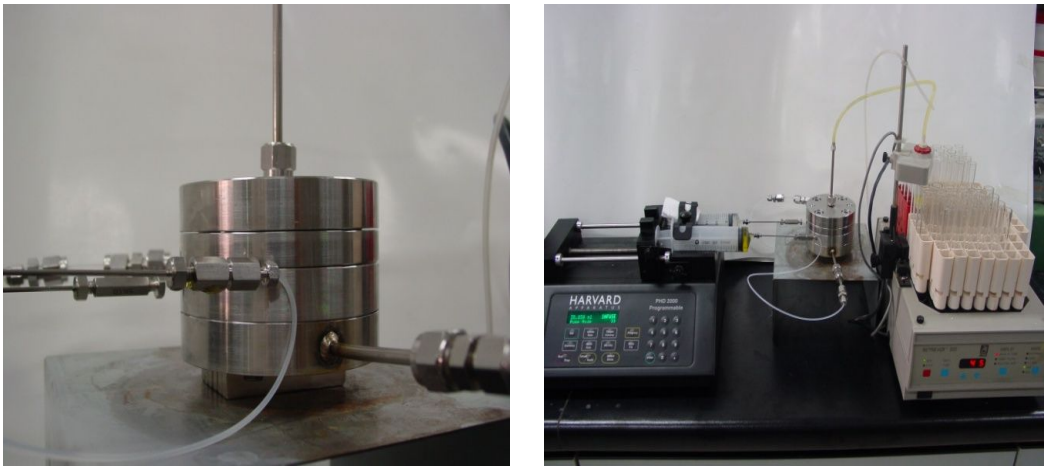
반응기 안에서 마이크로채널을 형성하는 철판으로 이루어진 마이크로 반응기가 만들어 졌다(Figure 4). 채널 반응기는 5개의 부동한 형태로 된 얇은 판을 반복적으로 쌓아서 사용할 수 있도록 구성되었다. 이런 디

스크의 두께는 0.5mm이고 직경은 2cm이다. 이것은 두 개의 채널 강철 시트와 두 개의 혼합 채널 강철 시트 그리고 하나의 철 시트로 구성되어있다. 조립되는 순서는 혼합 구멍, 반응액 배출구 순이다.

이 반응기는 혼합 채널 시트에 작용함에 따라 난류를 구성할 수 있게 되어 있다. 반응 전과 반응 후에는 증류수로 마이크로반응기를 세척하고 완충용액으로 나머지 기질을 제거한다. 반응기의 부피와 체류시간은 유량과 체류시간에 의하여 측정한다. 기질의 유량은 실린지 펌프(Harvard Apparatus PHD2000, Instech Solomon, USA)에 의하여 조절된다.

액-액 혼합공정은 염료-추출 방법에 의하여 결정된다[7]. 용해가능한 염료 Nile red를 표시제로 사용하였을 때 물을 수용 상으로 하고 이소옥탄을 유기상으로 하였다. Nile red는 수기상에서 유기상으로 이동한다. 마이크로반응기에서 혼합채널 시트에 의하여 난류 혼합이 일어나며, 두 상의 혼합공정에서 물질전달의 실제적인 표면적을 제공한다. 유기상에서 얻어지는 Nile red의 농도는 분광 광도계 489 nm에서 측정하였으며 추출된 염료의 농도가 가 검출 되었다. Figure 5. 는 반응기 얇은 판에 효소를 고정화 하기 전과 고정화 후를 보여주는 것이다.

생물학적변환이 연속교반반응기(continuous stirred tank reactor: CSTR)에서 체류시간 영향에 대한 연구를 하였다. 전환율은 유속의 변화에 의하여 측정된다. 얇은 판이 없는 반응기 일 때 유속 2ml/min, resident time 10min에서 4-NPB의 전환율은 50% 밖에 되지 않았지만 얇은 판을 넣은 반응기 일 때 같은 유속과 체류시간에서 기질의 전환율은 90%까지 도달하였다. 에 PAMP를 붙인 얇은 판을 CSTR에 넣어서 유속은 1ml/min, 체류시간은 7min 일 때 전환율은 보여준 것이다. 이 모든 결과를 Table 1. 로 정리하였다.



(a) (b)

Figure 4. microreactor configuration
(a) Microreactor; (b) The full process contains a syringe pump, a microreactor and a fraction collector.

(a) (b)

Figure 5. Images of CSTR−plate (a) before lipase coating, (b) after lipase coating.

Table 1. Effect of plate and residence time on p−nitrophenyl butyrate conversion.

Condition	Flow rate [ml/min]	Residence time [min]	Conversion [%]
With plate	2	8	45
	2	10	50
Without plate	16	1	43
	2	4	75
	8	2	90
	2	10	90
With plate and PAMP	1	7	70

2-2 효소고정화 실험방법

2-2-1 Polyaniline coated magnetic nanoparticle (PAMP)제조

자석으로 분리가능한 polyaniline nanofiber의 제조를 위해서 iron oxide 나노입자를 첨가하여 반응시키는데 polyaniline 중합시 nanofiber가 끼워들어가는 형태 또는 nanoparticle 표면에 polyaniline이 coating되는 형태의 자석에 의해 분리가능 한 나노입자 또는 nanofiber의 제조가 가능하게 하였다. 이렇게 제조한 nanofiber는 증류수로 4번 이상 씻은 다음 효소의 고정화를 위해 냉장고에 보관한다.

가장 일반적으로 알려진 폴리아닐린 합성법은 Figure 6. 에 나타낸 바와 같이 산화상태에 따라, 완전 산화형(pernigraniline), 중간산화형(emeraldine), 완전환원형(leucoemeraldine)으로 부른다. 일반적으로 중간산화형은 $(NH_4)_2S_2O_8$와 같은 산화제를 사용해 수용액의 양성자산 존재 하에서 아닐린을 직접 산화 반응시켜 쉽게 얻을 수 있다. 완전환원형의 경우, 중간산화형을 hydrazine hydrate와 같은 환원제를 이용하여 얻을 수 있고, 완전환원제는 m-chloroperoxybenzoic acid와 같은 산화제를 이용하여 얻을 수 있다. 이번 실험에서는 주로 중간산화제가 형성될 것으로 판단된다.

2-2-2 L-proline과 polyaniline을 이용하여 새로운 담체 제조

3mg의 L-proline을 1.3ml 증류수에 녹인다. 이것을 이미 준비하여 놓은 PANI(polyaniline)과 상온에서 24시간 잘 섞이도록 혼합한다. 즉 L-proline과 PANI를 3: 7의 질량비로 혼합하였다. 이렇게 혼합된 PR(polyaniline&proline)은 냉장보관하였다. 10mg/ml의 lipase를 PR에 고정화하여 그 특성을 측정하여 보았다.

합성된 시료를 KBr 분말과 잘 섞어 혼합물로 만들고 15~20psi의 압력을 가하여 KBr 펠렛(pellet)을 만든 후 Fourier Transform Infrared(Perkin Elmer System 2000 FT-IR)스펙트럼을 4000~370cm^{-1} 의 영역에서 측정하였다.

2-2-3 Nanofiber에 효소고정화

효소를 고정화시키기 위해서 2 ㎎의 nanofiber에 lipase효소를 최적 pH의 buffer 1ml에 넣어 효소와 nanofiber가 잘 섞이도록 상온에서 30분 동안 200 rpm으로 흔들어준다. Glutaraldehyde 용(0.5 %)[11]을 첨가하여 상온에서 저속으로 2시간 반응시킨다. 효소가 고정화된 nanofiber를 20 mM sodium phosphate buffer와 100 mM tris-HCl buffer (pH 7.5)로 고정화되지 않은 효소와 반응되지 않은 glutaraldehyde를 제거한다. 고정화되지 않은 효소가 충분히 제거될 때까지 8~10 번 세척한다. 제조된 고정화 nanofiber의 활성도를 측정한 후 반응에 사용되기 전까지 4℃에 보관한다. Lipase from *Chromobacterium viscosum*은 20 mM sodium phosphate buffer (pH 7.7)을 사용하여 nanofiber 2 ㎎에 효소 0.1 ㎎을 고정화하여 반응에 사용하였다.

2-2-4 효소의 정량

준비한 담체에 고정화되는 효소 양 측정을 위해 고정화 시키기 전후 buffer안의 단백질 양을 측정하여 비교하였다.

효소정량은 10 ㎕ 시료와 200 ㎕의 protein assay kit 그리고 증류수 790 ㎕ 를 혼합하고 595 ㎚에서 흡광도를 측정한 후 Bradford method를 사용하여 정량하였다. Standard curve는 Bovine serum albumin(BSA)로 작성하였다(Figure 7)[4].

2-2-5 효소의 활성도 측정

Lipase의 활성도 측정은 p-nitrophenyl butyrate(p-NPB)를 가수분해 하여 p-nitrophenol(p-NP)과 butyric acid가 생성되는데 이중 p-NP의 농도는 UV/Visible-spectrophotometer (Ultrospec2100pro, Amersham)를 이용하여 400 ㎚에서 흡광도를 측정하였다. 반응은 0.7 mM p-NPB를 기질로 하여 1ml 20 mM sodium phosphate buffer (pH 6.5)에서 free lipase solution 또는 고정화 효소를 넣고 상온에서 흔들어주면서 반응시켜 시간에 따른 kinetic activity를 측정하였고 반응은 1ml cuvette에서 진행하였다. Standard curve는 p-nitrophenol를 농도별로 측정하여 작성하였다(Figure 8)[12-15].

2-2-6 고정화 효소의 Characterization

Free lipase, 고정화 lipase의 기질로서 p-nitrophenyl butyrate를 사용하였고, 농도의 범위는 0.1 ~ 2 mM로 하여 kinetic activity를 측정하였다. pH6.5, 온도는 25℃에서 lipase enzyme assay와 동일한 방법으로 측정하였다.

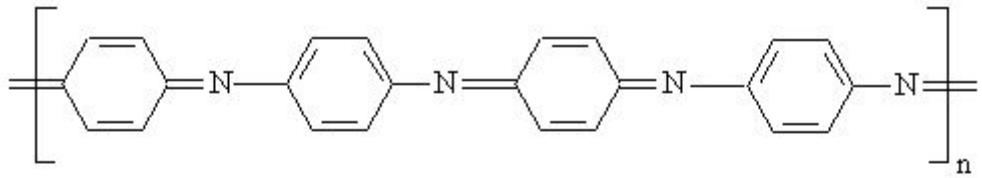
2-2-7 고정화 효소의 안정성

고정화 효소의 보관조건에 따른 안정성을 측정하기 위해 25℃, 200 rpm의 shaking조건에서 lipase가 고정화된 nanofiber를 각 buffer에 두고 보관하면서 시일에 따라 고정화 효소의 활성도가 변하는 것을 측정하였다. 측정방법은 lipase 활성도 측정방법과 동일한 방법으로 실험하였다.

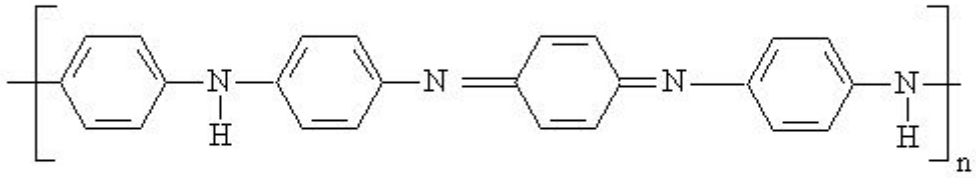
2-2-8 고정화 효소의 온도에 따른 활성도 변화

효소활용의 감소 요인의 하나로 열에 의한 활성도 저하를 꼽을 수 있는데, 반응열 및 반응온도는 공정에서 무시할 수 없는 부분이라 할 수 있다.

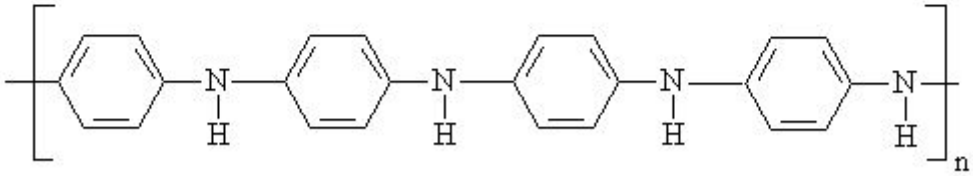
고정화 효소의 온도 영향을 알아보기 위하여 Thermofinemixer (SH2000-DX)를 사용하여 25~75 ℃로 온도를 변화시키면서 반응온도에 따른 활성도를 측정하였다. 또한 시일이 지남에 따라 보관온도에 의한 효소의 활성도 변화를 측정하기 위해 고정화 효소를 buffer에 넣은 상태로 25℃, 50℃, 75 ℃에 두고 시간에 따라 활성도를 측정하였다. 보관 시 Multi-room incubator (HB-101-4, 한백과학)을 사용하였다. 측정방법은 활성도 측정방법과 동일한 방법으로 실험하였다.



pernigraniline



emeraldine



leucoemeraldine

Figure 6. Indicates the accessible oxidation states of polyaniline.

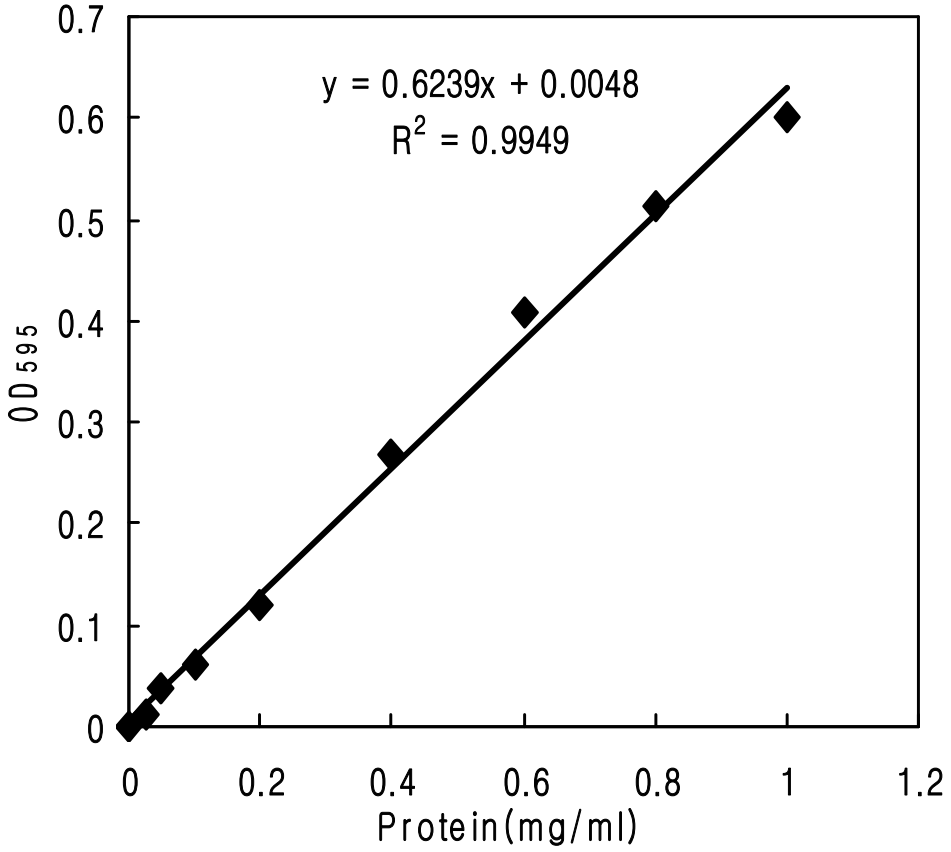


Figure 7. Standard curve for determination of protein concentration.

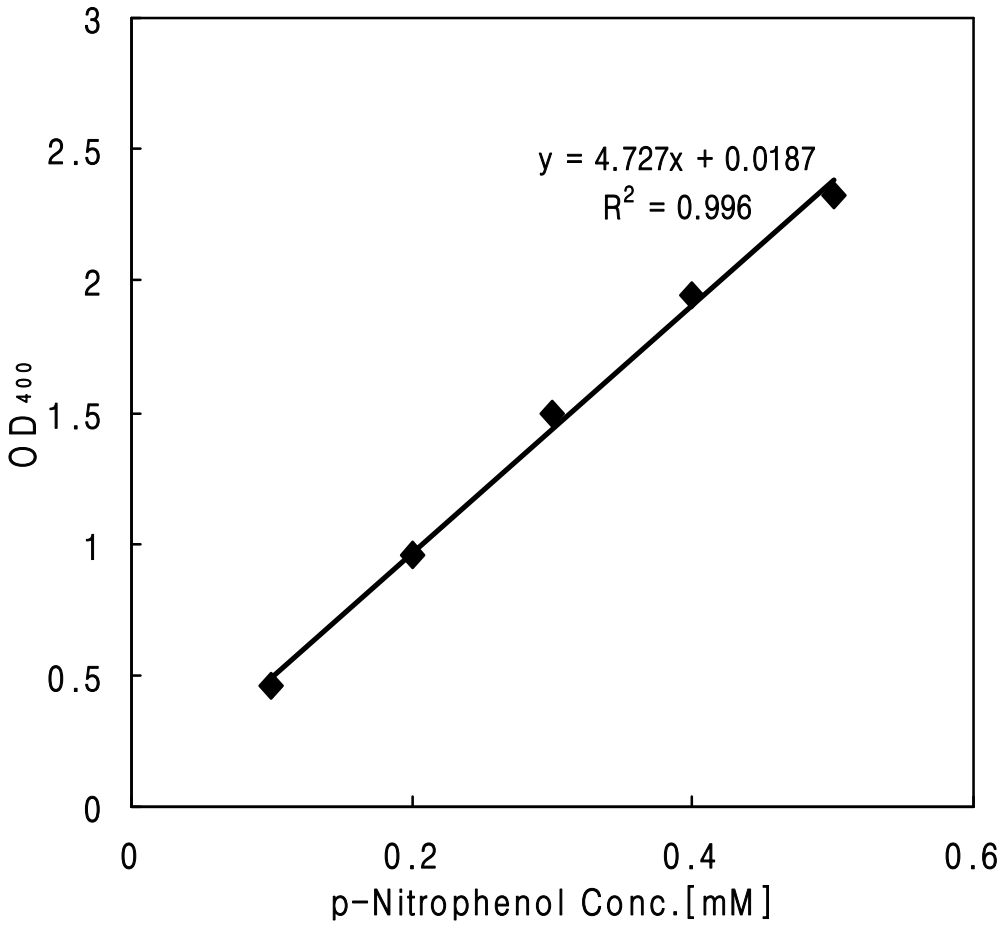


Figure 8. Standard curve for determination of p−nitrophenol concentration.

2-3 에스테르화 반응

2-3-1 식물성 기름을 이용한 바이오디젤 생산

식물성 기름의 전이에스테르화 반응을 free lipase와 PAMP에 고정화시킨 lipase를 이용하여 실험을 진행하였다. Shaking incubator(HB-201S, 한백)를 이용하여 200 rpm의 37℃ 항온 조건에서 포도씨유 또는 콩기름 0.5 g과 methanol을 1:4(mol:mol)로 넣고 소량의 물 첨가(5%)한 후 진탕 반응을 시작하였다. 2, 4, 6, 9, 12, 24 시간에 따라 50 ㎕ 시료를 채취하여 n-hexane에 20배 희석하여 GC로 측정하였다. 반응 후 고정화효소를 다시 회수하여 같은 조건에서 재사용하여 반응을 하였다[13, 16, 17]

2-3-2 Fructose를 이용한 Fructose ester 생산

40ml vial에 acetone 20ml, palmitic acid 85mg(0.3mmol) 를 혼합하고 palmitic acid가 전부 희석될 때까지 흔들어 준다. 여기에 과당 60mg(0.3mmol), molecular sieve 3Å 2g, Novozym 435 20mg 을 넣고 강하게 흔들면서 6 ℃에서 반응을 진행한다. Stanadrad cureve 는 Palmitic acid 로 검량하였다(Figure 9).

2-3-3 Glycerol를 이용한 Glycerol carbonate 생산

100ml의 삼각 플라스크에 THF 12ml, 글리세린 0.55g(6.0mmol), DMC 0.54g(6.0mmol)이 잘 섞이도록 혼합한다. Novozym435 300mg, 자유효소 1mg, 고정화 효소 4mg 을 부동한 반응 용액에 넣고 55℃, 200rpm에서 36시간 반응을 진행 하였다. 일정한 시간별로 샘플을 취하여 GC(Gas chromatography)로 생성물의 함량을 측정하였다. Glycerol carbonate 농도별로 Standard curve를 만들었다(Figure 10).

2-3-4 Gas chromatography를 이용한 ester분석

에스테르화 반응의 반응물 및 반응생성물은 Gas-Chromatography (GC2010AF, Shimadu)를 이용하여 분석하였다. Column은 DB-5MS (Agilent technologies, 0.25um X 60m X 0.25mmID)를 사용하였으며, 이동가스 (carrier gas)는 질소와 보조 가스로 혼합기체를 사용하였다. 분석은 Split mode에서 1㎕ injection 하여 전자포획 검출기 (Flame Ionization Detector)로 분석하였다. Biodiesel 에서 methyl ester의 측정은 injection 온도 280℃, oven 온도 250 ℃, detector 온도 290℃ 그리고 column 유속 0.49 ㎖/min으로 하여 분석하였다. Fructose ester 측정은 injection 온도 280℃, oven 온도 250℃, detector 온도 290℃ 그리고 column 유속 1ml/min 로 하여 분석하였다. Glycerol carbonate 측정은 injection 온도 250℃, oven 온도 50~200℃, detector 온도 280℃ 그리고 column 유속 0.82ml/min 로 하여 분석하였다(Table 2).

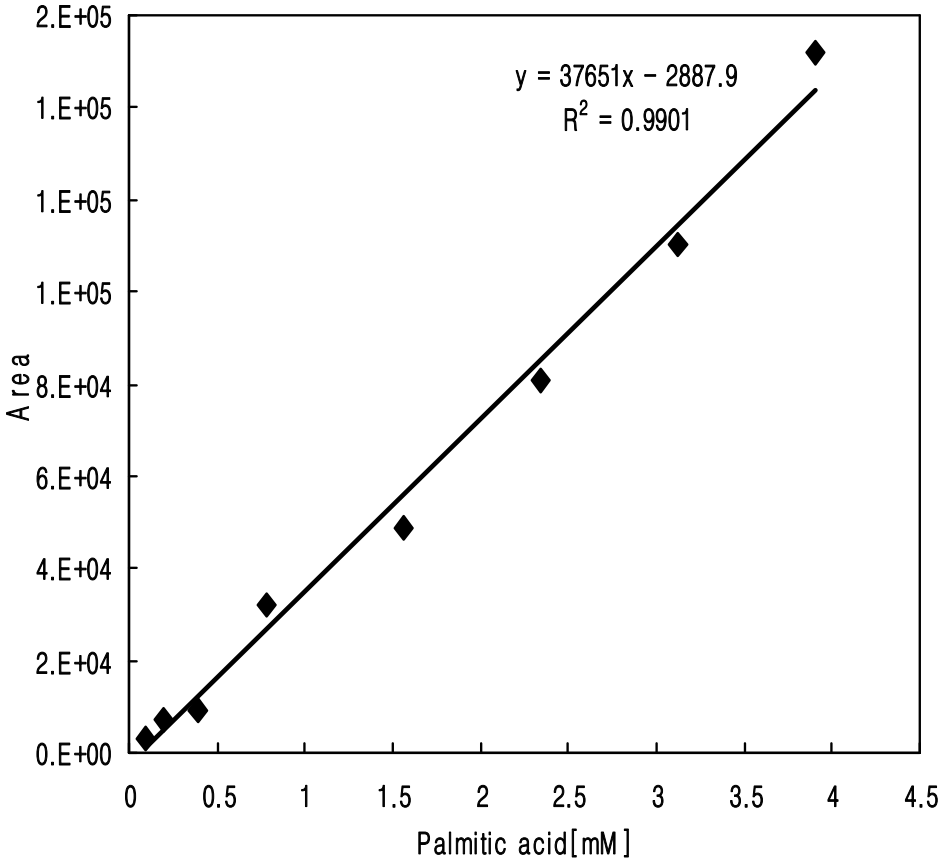


Figure 9. Standard curve of Palmitic acid.

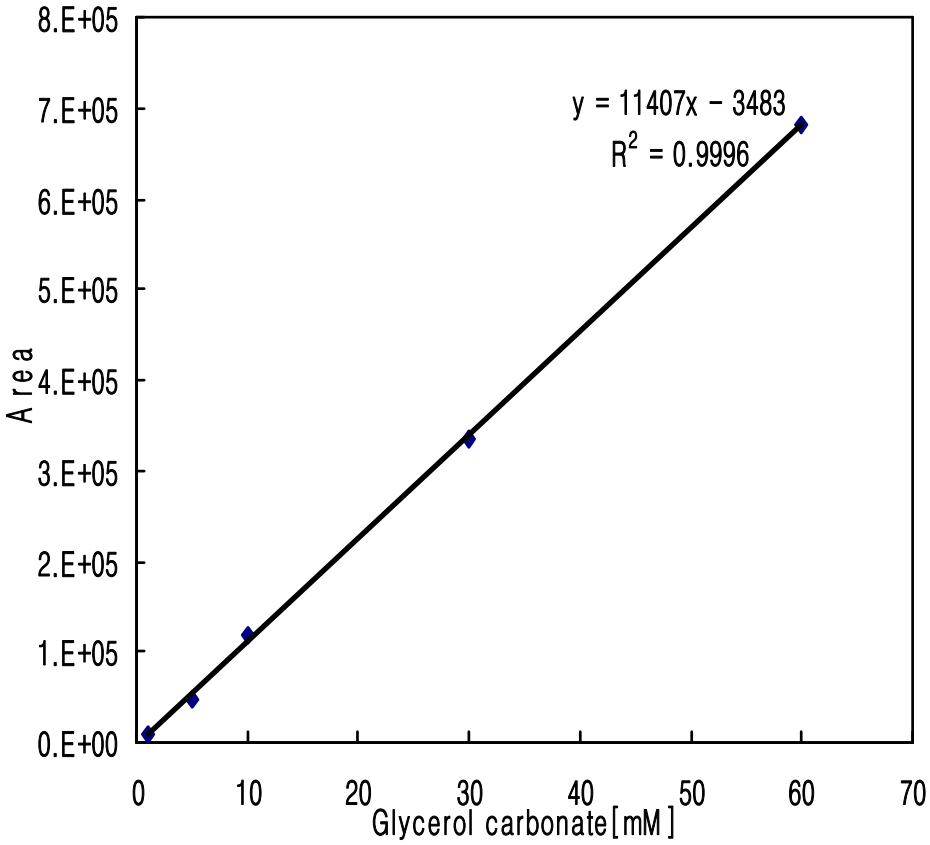


Figure 10. Standard curve of Glycerol carbonate.

Table 2. GC analysis condition.

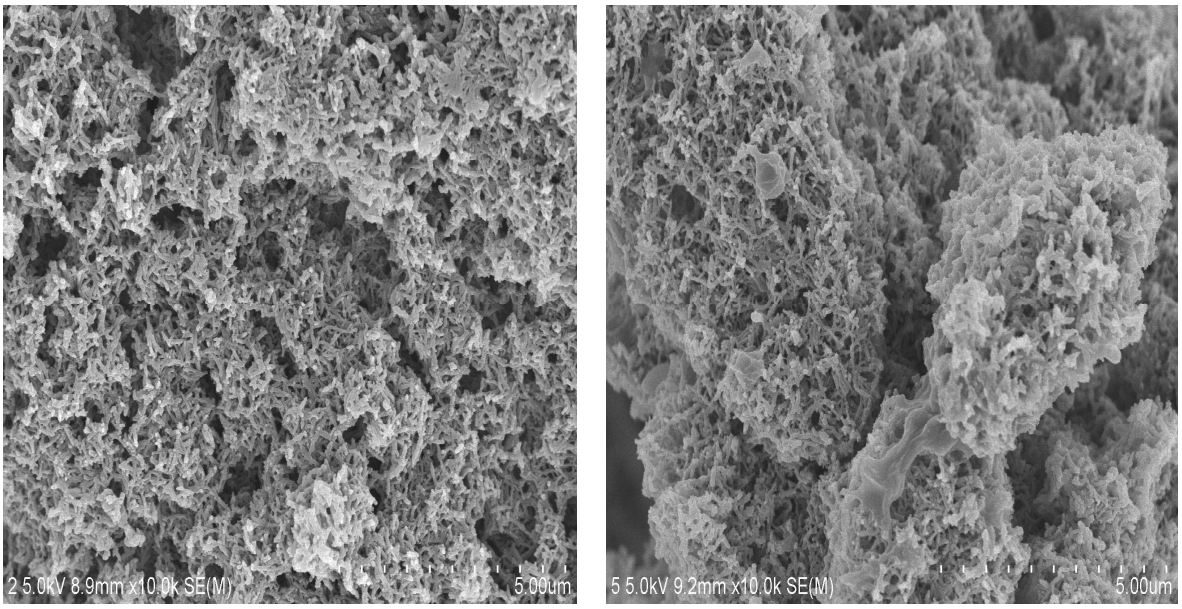
GC condition		Biodiesel	Fructose ester	Glycerol carbonate
Injector	Injection mode	split	Split	Split
	Temperature	280℃	280℃	250℃
	Carrier gas	N_2/Air	N2/Air	N2/Air
	Total flow	27.9ml/min	54.0ml/min	45ml/min
	Column flow	0.49ml/min	1.00ml/min	0.82ml/min
	split ratio	50	50	50
Column oven	Temperature	250℃	250℃	50~200℃
Detector(FID)	Temperature	290℃	290℃	280℃
	Run time	55min	12min	40min
	Makeup gas	N_2/Air	N2/Air	N2/Air
	H2 flow	40ml/min	40.0ml/min	40.0ml/min
	Air flow	400ml/min	400ml/min	400ml/min

제3장 결과 및 고찰

3-1 L-proline을 이용하여 만든 담체에 효소고정화

제조된 PAMP와 lipase고정화 후 증류수로 10회 세척한 PR-LP을 감압건조 시켜 고정화 전과 후를 SEM image 분석하여 보았다. 그 결과 고정화 후 담체 표면에 lipase enzyme가 결집된 모양으로 덮여있는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 11). 이렇게 고정화된 효소는 protein assay를 통하여 70%의 효소가 담체 표면에 고정화된다는 것을 알수 있었다. 그 활성도는 32일 간 지나도 유지된다는 것을 4-NPB 기질을 이용하여 확인하였다.

Figure 12(a) 에서 3100~3400cm^{-1} 부근에서 나타나는 중첩된 피크는 -C=N과 -C-NH-의 신축진동에 의한 것으로 보여지며, 2000~1650cm^{-1} 영역의 피크로 보아 벤젠 치환체임을 알 수 있다. 또한 1597, 1507cm^{-1}에서의 피크는 각각 퀴논 형 고리와 벤젠 형 고리의 C=C 신축진동에 의한 것이며, 벤젠 형 고리에 의한 피크가 더 강하게 나타났다. 이로 보아 합성된 폴리아닐린은 모두 emeraldine산화상태임을 확인할 수 있었다. Figure 12(b)에서는 Figure 12(a)와 비슷한 피크가 나타 났지만 1581.1~1485.5cm^{-1}에서 -CO-NH-R의 펩타이드 결합이 형성된 것으로 보아 L-proline과 polyaniline이 결합된 것으로 확정된다.



(a) (b)

Figure 11. L−proline with polyaniline SEM image.

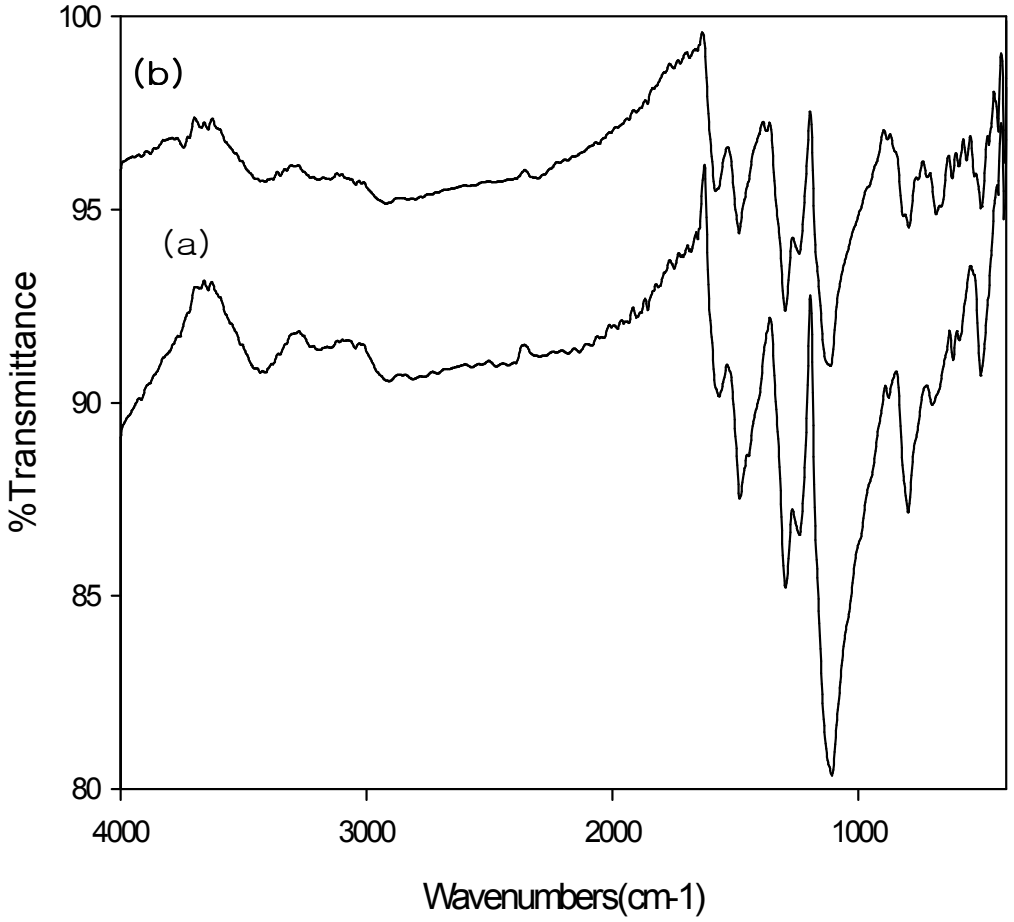
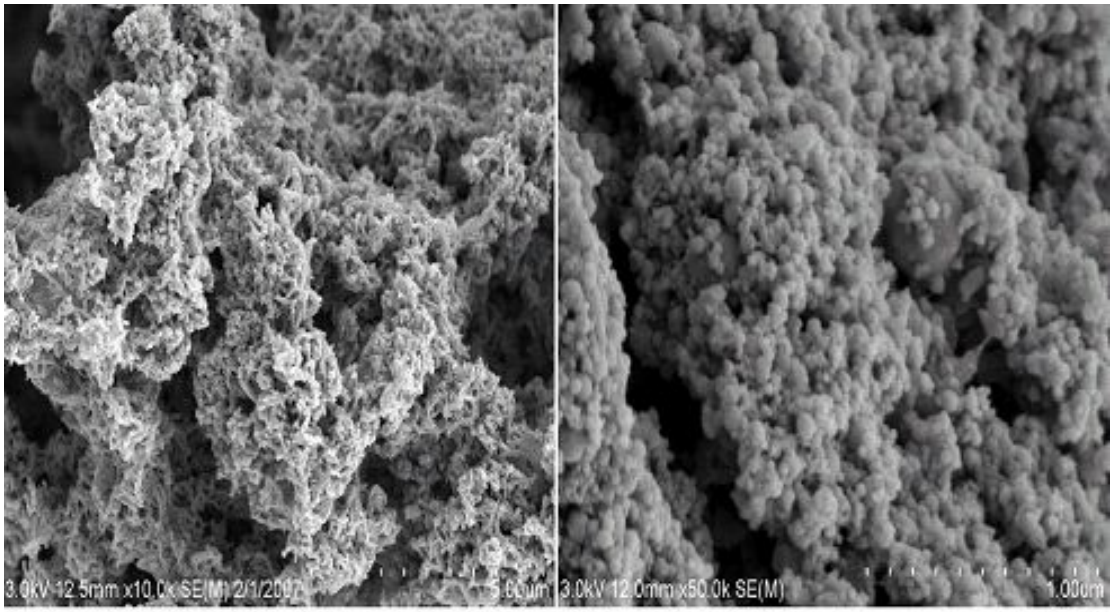


Figure 12. FT-IR spectra: (a) PANI; (b)L-proline with PANI.

3-2 Nanofiber 에 효소고정화

제조된 PAMP와 lipase고정화 후 증류수로 2회 이상 세척한 PAMP-CR 을 감압건조 시켜 SEM image 분석을 한 결과 고정화 후 nanofiber 표면에 lipase enzyme이 결집된 모양으로 덮여있는 것을 확인 할 수 있었다 (Figure 13).

2 mg의 PANI, PAMP에 각각 lipase-CR를 고정화를 시키고 회수 후 2 ml의 buffer를 취하여 Bradford method에 의하여 남아있는 단백질 농도를 분석하였다. 효소 10mg/ml 담체에 붙였을 때 PANF는 36%, PAMP는 11%의 고정화 효율을 나타내었다. Lipase-CV의 경우 효소의 unit이 높아 0.1mg/ml로 소량을 고정화 시켰을 때 100% 고정화 되었을 것으로 추정된다. PAMP는 철 함유로 인해 표면의 활성기 및 pore의 감소로 인하여 효소 고정화 효율이 낮은 것으로 사료 된다.



(a) (b)

Figure 13. polyaniline magnetic particle SEM image.

3-3 고정화 효소의 Characterization

3-3-1 고정화 lipase의 Enzyme Kinectics

Michaelis-Menten 상수 Km과 Vmax는 효소의 기질의 상호작용의 특성을 나타내며, 초기 효소 농도에 비례하여 증가되는 값으로 효소의 속도를 나타내는 중요한 매개변수들이다. Free lipase-CV의 경우 0.1mg/ml반응 시 Vmax는 0.703(mM/min), Km은 0.975(mM), k_{cat}는 703(mM/min mg)이고, 고정화된 PAMP 0.1mg/ml의 반응 시 Vmax는 0.428(mmol/min), Km은 1.23(mM), k_{cat}는 428(mM/min mg) 으로 이것은 자연효소의 60% 정도가 되는 반응속도이며 해리상수는 자연효소보다 26% 더 빠르다. 이 결과를 Table. 3 에 정리하였으며 이것은 효소의 담체의 공유결합으로 기질확산저항, 기질 분배의 문제점, 단백질의 구조적인 변화, 단백질의 유동성 감소 등으로 활성도의 감소로 인해 일어난 것으로 생각된다(Figure 14,15)[18-21].

3-3-2 고정화 효소의 온도에 따른 활성도 변화

고정화 효소를 사용하여 반응 온도에 따른 활성도를 측정하였다. 반응 온도를 25~75℃로 증가시켰을 때 활성도도 증가하는 경향을 보인다. 고정화 효소는 온도가 25~75℃ 증가에 따라 활성도가 2배 증가되는데 비해 자유효소는 활성도가 3배 증가함을 보였다. 그러나 효소의 열적 안정성은 온도가 높은 경우 효소의 비활성화에 의하여 빠른 속도로 감소하게 되므로 25℃, 50℃와 75℃에 보관해 두면서 시일이 지남에 따라 활성도 측정했을 때 온도가 높을 수록 효소의 활성도는 급격히 떨어짐을 볼 수 있었다. 이러한 안정성 유지는 효소의 나노물질에 결합 한 경우 낮은 온도에서는 안정된 결합을 하다가 높은 온도에서는 결합상태가 쉽게 유리되어 전체적인 안정성이 떨어지는 것으로 추정된다. Free

는 25℃에서 32일 경과 후 40%, 50℃에서 8일 경과 후 2%, 75℃에서 1일 경과 후 1%로 활성이 거의 없어졌지만 고정화 효소의 경우 25℃에서 32일 경과 후 거의 95%, 50℃에서 32일 경과 후 8%, 75℃에서 1일 경과 후 3.5% 의 활성도가 유지되는 것으로 보아 열 안정성이 free효소 보다 고정화 효소가 더 높다는 것을 알 수 있다(Figure 16).

3-3-3 고정화 효소의 재사용 가능성

PAMP는 자석으로 쉽게 분리가 가능하므로 고정화한 효소를 반복 사용한 후 활성도를 측정하여 고정화 효소의 재사용 가능성을 비교해보았다. 이러한 일련의 실험은 효소의 재활용을 통하여 경제적인 효과를 얻기 위한 과정으로 고정화 효소를 사용하고 이를 자석으로 회수 하여 다시 사용하는 반복된 과정을 통하여 본 결과 한번 회수할 때마다 회수되는 효소의 양이 95% 이상으로 8번 반복해서 사용한 경우 회수되는 효소의 양이 초기 효소활성도의 62% 의 회수율을 보여주었다. Figure 17.은 효소의 회수과정을 사진으로 보여준 것이다. 특히, 본 연구에서 개발한 고정화 담체는 자석에 빠른 속도로 붙기 때문에 분리가 용이하면서 반응 액으로부터 깨끗하게 분리되는 모습을 보여주고 있다.

Table 3. The catalytic activity of the LP immobilized on magnetically separable polyaniline nanofibers.

	V_{max} (mM/min)	K_m (mM)	k_{cat} (mM/min mg)
Free LP	0.703	0.975	703
Magnetically separable immobilized LP	0.428	1.23	428

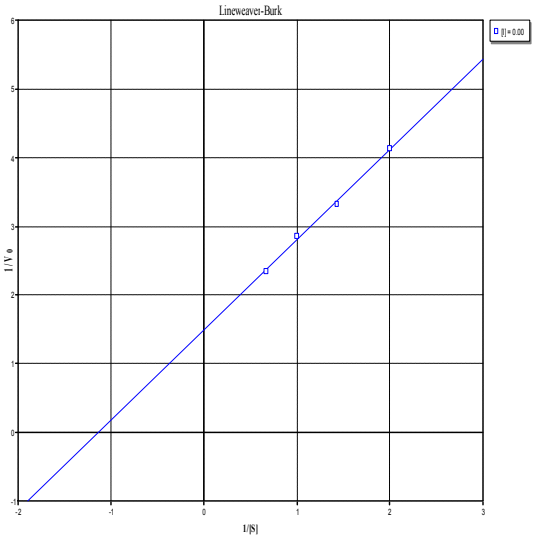


Figure 14. Lineweaver-Burk plots of free lipase.

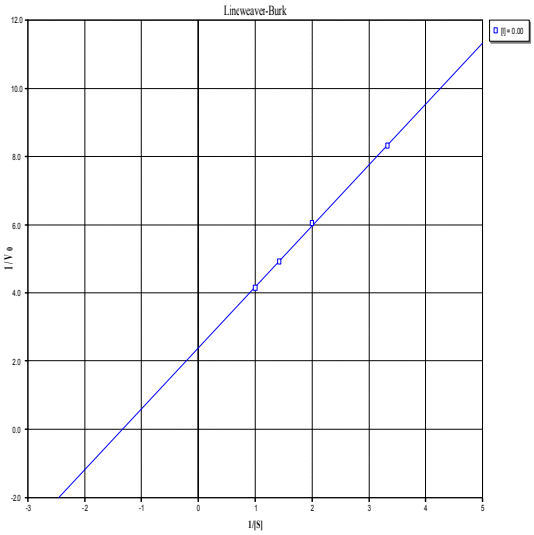


Figure 15. Lineweaver-Burk plots of PAMP-lipase.

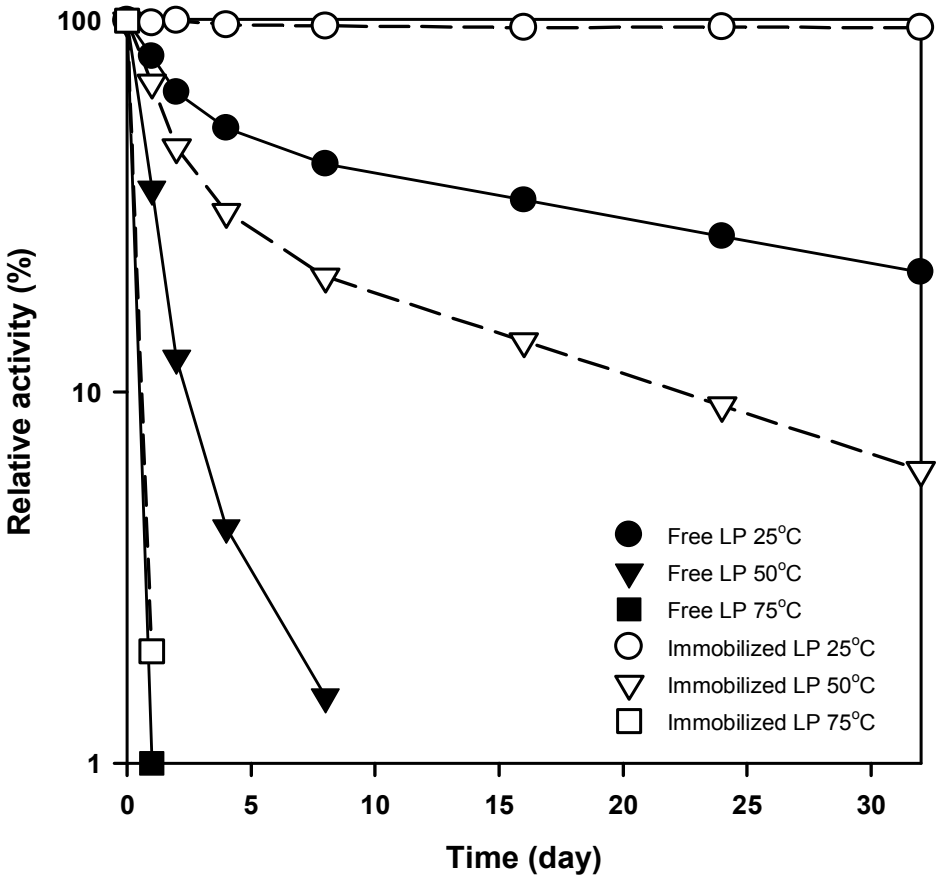


Figure 16. Effect of temperature on stability of the free and immobilized LPs.

Figure 17. Recovery of immobilized lipase after reaction with magnet.

3-4 에스테르화 반응

3-4-1 식물성 기름을 이용한 바이오디젤 생산

Transesterification 의 일반적인 반응은 앞에서도 언급했지만 그 외에도 세가지 연속적이며 가역적인 반응이 일어나는데, 첫번째 반응은 triglyceride가 diglyceride로 변환되며 fatty acid methyl ester를 만들어내고 이어서 diglyceride는 monoglyceride로, monoglyceride는 glycerol로 변환되면서 최종적으로 세 분자의 fatty acid methyl ester를 만들어내게 된다.[22] 이와 같이 methyl ester로 변환하게 되면 분자량이 triglyceride의 1/3로 감소하게 되며 점도를 떨어뜨리고 휘발성은 약간 증가시키게 된다. 바이오디젤의 점도는 디젤유와 비슷한 값을 갖는다. 또한 이 ester들은 전체 분자량의 10%정도에 해당하는 산소를 포함하고 있어 엔진 내에서 화석연료보다 높은 폭발력을 나타내게 된다.

본 실험에서는 lipase from Chromobacterium viscosum 을 촉매로 사용하여 포도씨유와 콩기름을 원료로 해서 methyl ester로 변환시키는 실험을 수행하였다. 알코올로 메탄올을 사용하여 유지와 메탄올을 1:4의 몰비로 반응시켰다. 이는 문헌의 보고에 의하면 lipase촉매공정에서 지방산 메틸에스테르의 수율을 높이고 반응시간을 단축시키기 위해서는 유지에 대한 메탄올 몰비를 1:3이상으로 높게 유지해야 하는데 메탄올 몰비를 증가시키면 lipase가 메탄올에 의해 불활성화 되는 문제점과 1 :1 이하로 낮게 유지하였을 경우 lipase의 불활성화는 억제하였으나 전환율이 매우 낮은 문제점이 있기 때문이다.[1]

3-4-2 회분식 반응기에서 자연 효소와 고정화 효소에 의한 biodiesel 생산

자연효소 혹은 고정화 효소를 이용하여 콩기름으로부터 바이오 디젤을 합성하는 실험을 진행하였다. 자연효소를 이용한 바이오 디젤의 생성 속도는 고정화 효소보다 높았다. Figure 18.를 보면 자연효소를 사용하였을 때 바이오디젤의 수율은 64%, 고정화 효소를 사용하였을 때의 바이오 디젤의 수율은 56%이다. 현재 보고되고 있는 Chemical transesterification 방법을 이용한 수율은 85~95%[23]로서 이것은 biocatalysts 방법보다 높으며 Vegetable oil를 이용한 methanolysis의 수율은 75-92%이다. 이번 연구의 초점은 효소반응의 속도에 있으므로 효소반응을 24시간으로 마무리 하였으며 반응시간을 연장하였을 경우 수율이 계속하여 상승할 것으로 사료된다.

3-4-3 회분식 반응기에서 부동한 기름을 이용한 biodiesel 생산

Figure 19.(a), (b)는 soybean oil과 grapessed oil 를 transesterification 한 후 gas chromatography 로 측정 한 결과그래프이다. 여기에서 peak 6.3min 는 hexane이고 10~14.5min 때 peak은 methly ester이다. 그외의 peak은 에스테르화 반응에서 생성되는 부산물 peak으로서 반응과정에서 함께 증가하였다. 10.9min, 14.1min, 14.4min, 14.7min 때가 각각 palmitic, steric, oleic, linoleic acid의 methly ester들이다. Figure 20.는 두 가지 oil의 반응과정에서의 전환율을 보여 주었는데 포도씨유의 전환율의 콩기름의 전환율보다 약각 크게 나타나는 것을 확인 할 수 있었다.

3-4-4 회분식 반응기에서 biodiesel 생산에 이용되는 고정화효소의 재사용 가능성

바이오 디젤을 합성 한 후의 고정화 효소 PAMP-LP는 자석으로 회수하여 buffer로 두번 세척한 후 재사용하여 그 활성을 측정하여 보는 실험을 진행하였다. 회수된 PAMP-LP는 콩기름과 메탄올의 혼합용액에 추가되었다. 기름 상으로부터 샘플을 취하여 바이오디젤의 수율을 측정하였다. 반복회수는 바이오 디젤의 합성수율에 의해 결정하였다. Figure 21. 에서 보여주는 PAMP-LP는 처음 PAMP-LP의 88%정도 되었다. 고정화 효소를 7번 회수한 후의 바이오디젤의 수율은 58%였으므로 자연효소를 사용하여 일차적인 반응만 진행할 수 있을 때보다 훨신 경제적이라는 것을 알 수 있다.

3-4-5 CSTR에서 고정화 효소에 의한 biodiesel의 생산

Figure 22. 는 CSTR에서 고정화 효소 PAMP-lipase를 사용하여 Flow rate 0.01ml/min, 반응부피 4ml, resident time 4시간으로 하였을 때 합성된 biodiesel 의 농도를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 반응시간이 28시간 이후에 반응이 정상상태로 가는 것을 보여 주었으며 conversion이 80%에 도달하여고 이는 회분식 반응기에서 반응할 때 보다 높은 conversion 으로 나타났다.

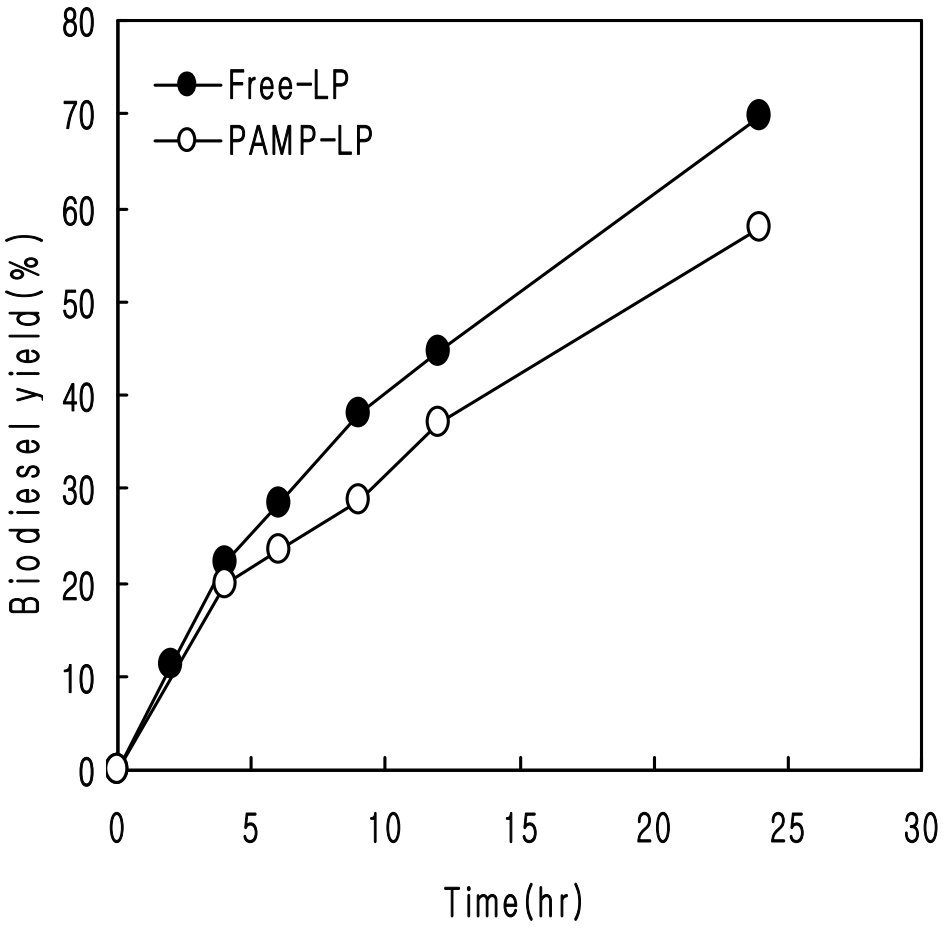
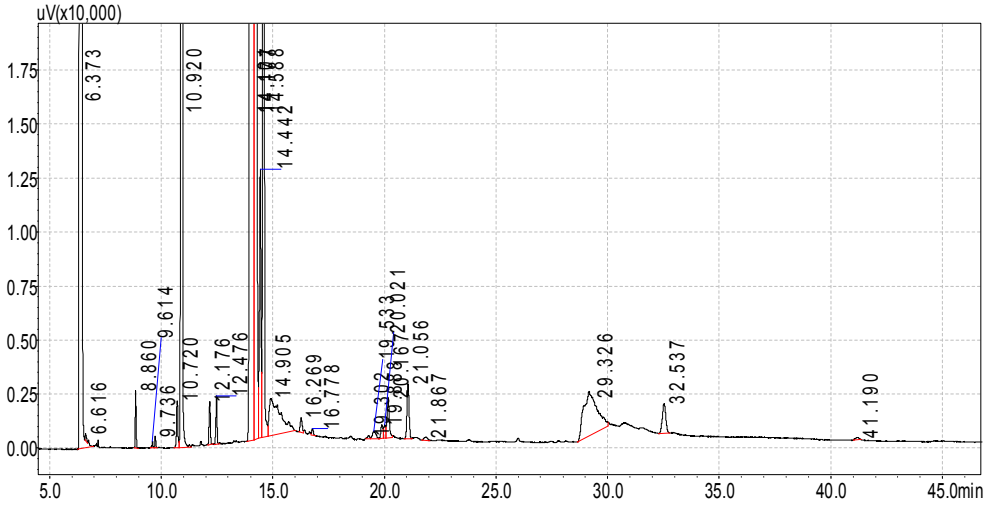
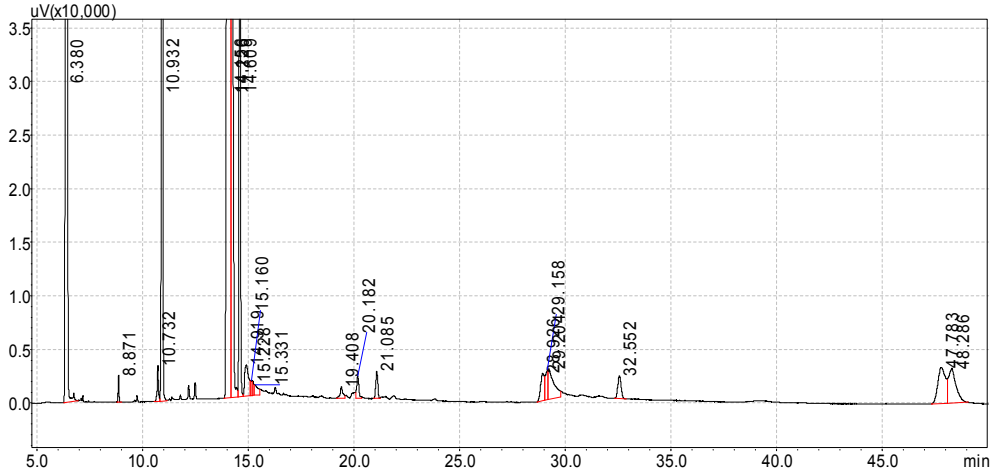


Figure 18. Effect of the free and immobilized enzymes on the production of biodiesel.



(a)



(b)

Figure 19. The produced biodiesel peacks from Soybean oil(a) and graphstone oil(b) are detected by gas chromatography.

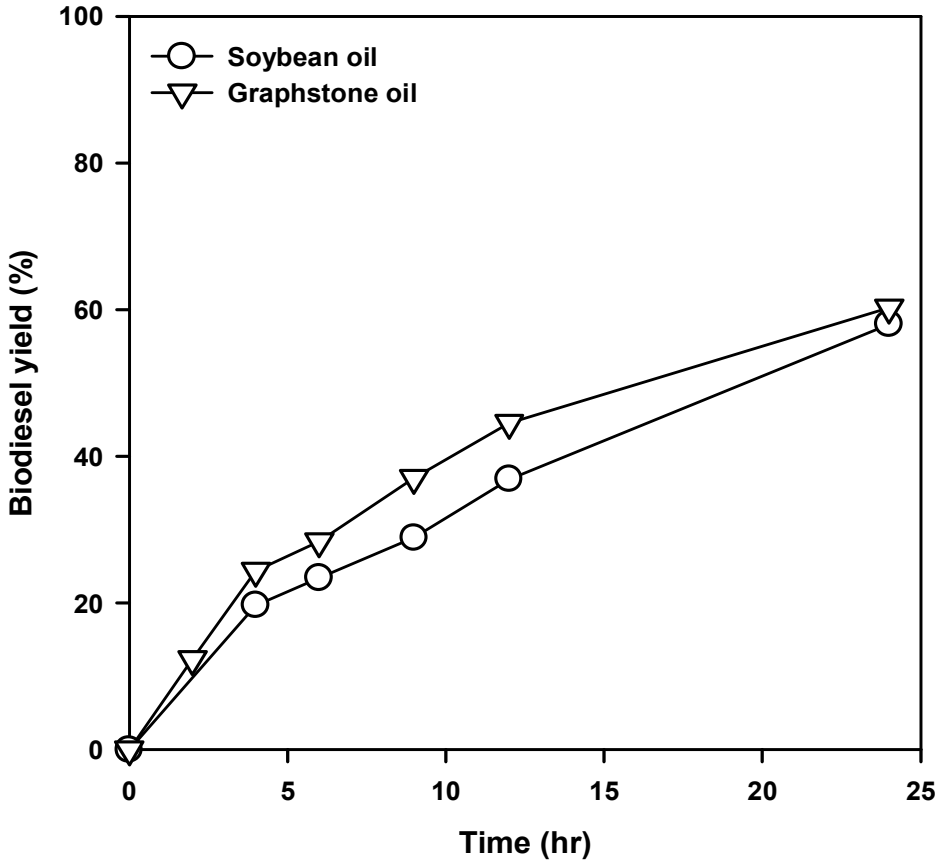


Figure 20. Yield of biodiesel from both soybean oil and graphstone oil.

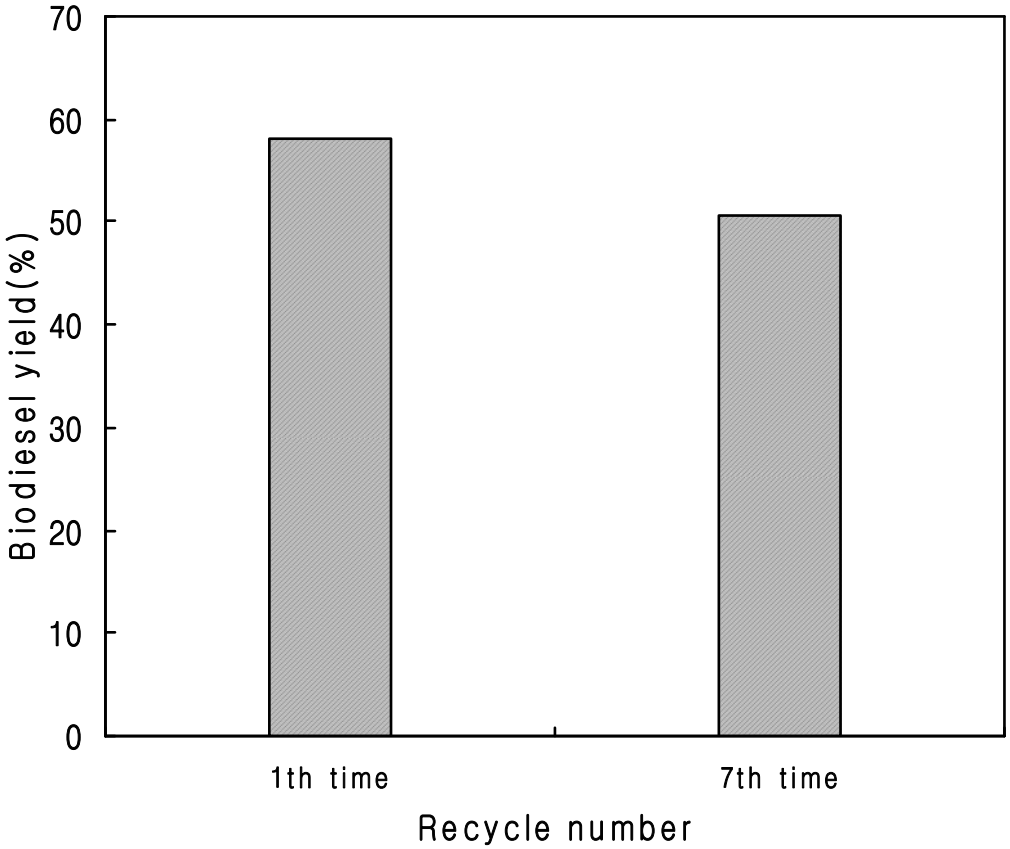


Figure 21. Effect of PAMP−LP recycle on biodiesel production.

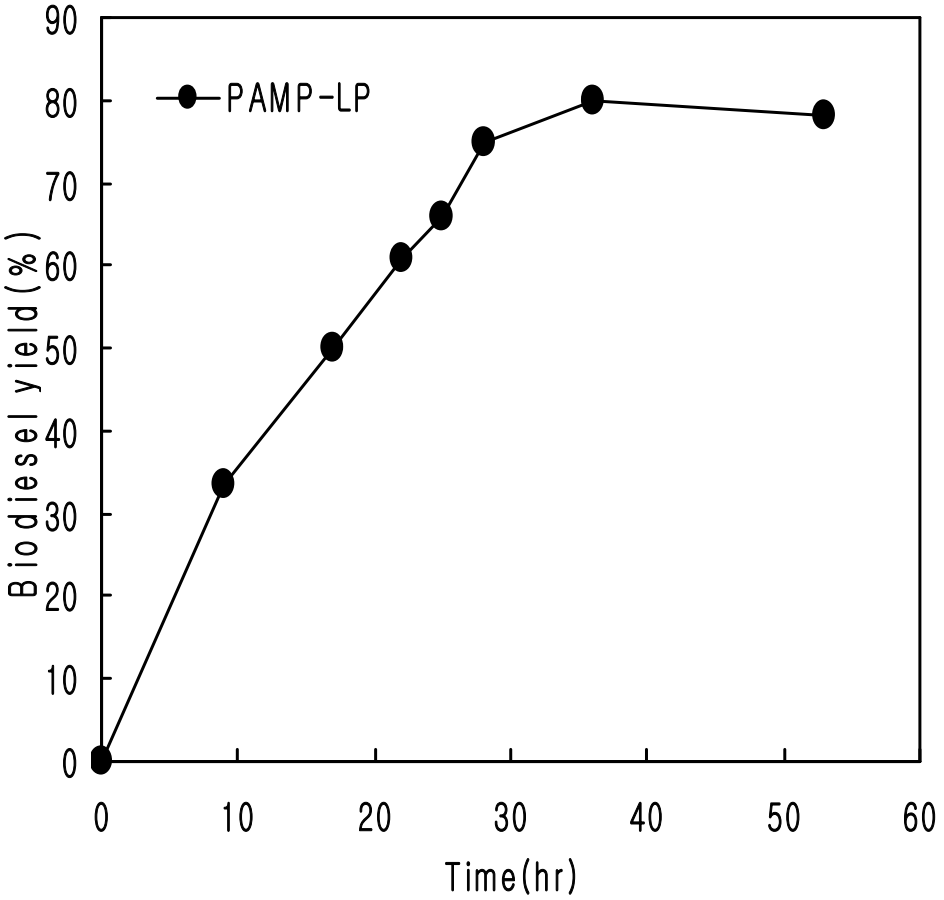


Figure 22. Synthesis of Biodiesel by PAMP−lipase at CSTR (flow rate 0.01ml/min, RT 4hr).

3-5 Fructose ester 생산

3-5-1 회분 식 반응기에서 자유효소에 의한 Fructose ester 생산

수분이 전환 율에 대한 영향을 알기 위하여 물이 있을 때와 없을 때의fructose ester합성 실험을 비교하여 보았다. Palmitic acid 20mmol, TAA 24ml, fructose 20mmol, Molecular sieve 3Å 4g를 혼합한 후 한 반응용기에는 5mg의 자유효소를 넣고 다는 한 반응용기에는 5mg의 자유효소를 1ml(4%)의 3차 증류수에 용해한 후 혼합하여 반응을 진행하였다. 그 결과를 Figure 23. 에 나타내었다. 결과로부터 물이 없을 때의 ester의 전환 율은 20%, 물이 있을 때의 전환 율은 5%로서 이것은 물이 없을 때의 전환 율의 1/4배 정도밖에 안된 다는 것을 알 수 있다. 그러므로 이번 반응에서는 물을 넣지 않고 반응을 진행하는 것이 유용하다. 실제로 에스테르화 반응에서는 가역반응의 정 반응을 추진하기 위하여 기질을 과량으로 넣거나 생성물을 제거하는 방법을 사용하고 있다. 이번 반응에서는 Molecular sieve를 이용하여 반응에서 생성되는 물을 제거하였다. 효소의 활성을 촉진하기 위하여 반응초기에 사용하는 물은 fructose의 응고를 형성하여 molecular sieve의 주위에 Fructose 덩어리를 형성하여 molecular sieve의 작용을 저해한다.

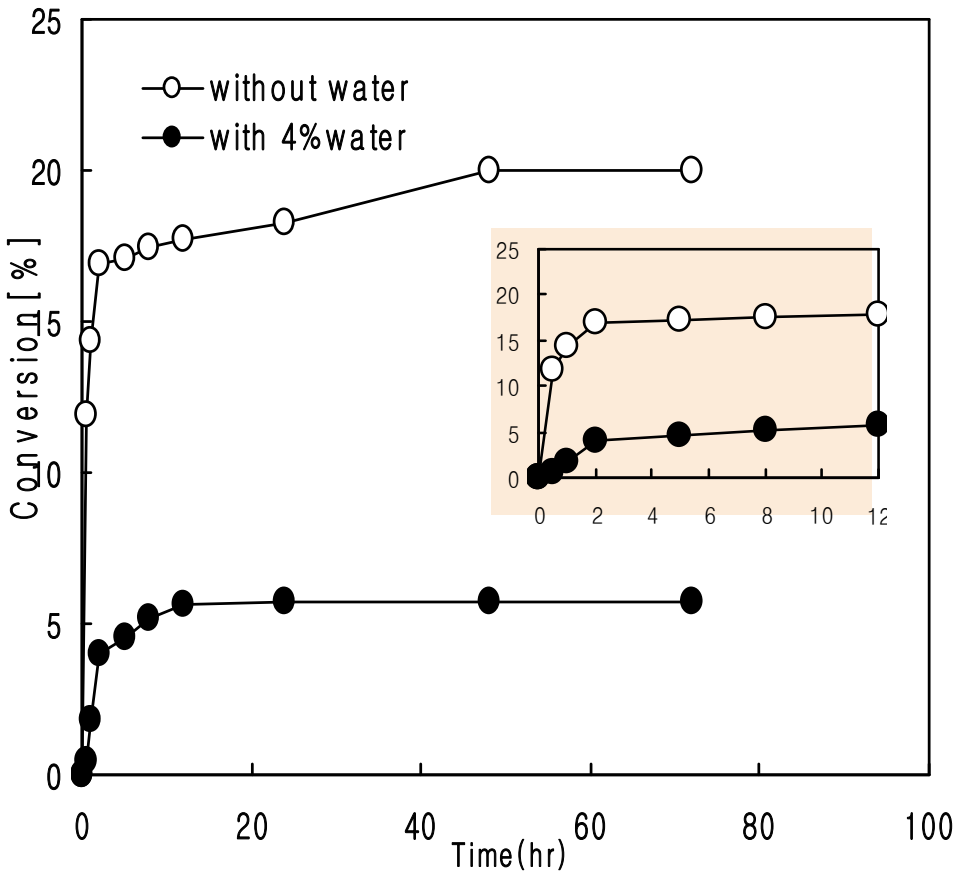
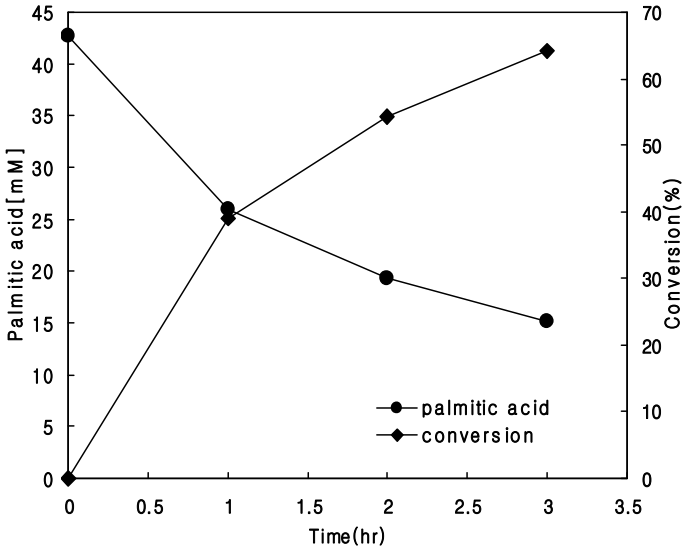


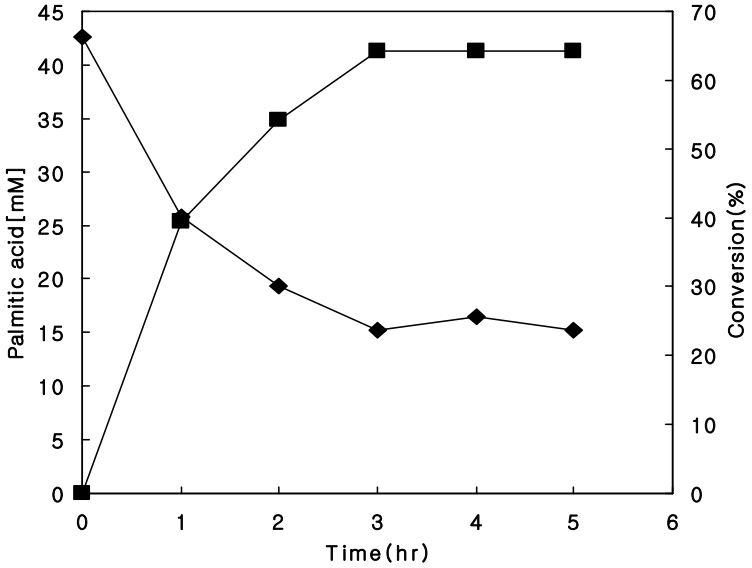
Figure 23. Effect of moisture content on the enzymatic fructose ester synthesis.

3-5-2 Novozym435를 이용 한 fructose ester 생산

Figure 24.은 혼합방법에 의한 ester 합성결과를 비교한 것이다. Figure 24.(a)는 Vortex를 이용하고, Figure 24.(b)는 magnetic stirrer를 이용하여 60℃에서 에스테르화 반응을 진행한 결과이다. 그림으로부터 3시간 정도 지났을 때의 전환 율이 모두 64%에 도달 하였는데 이것은 Sabeder, Sasa가 2005년에 발표한 연구결과와 비슷하며 72시간 반응을 진행할 경우 80%의 전환 율을 획득하였다는 연구결과가 보고되어 있다[24]. 이번 연구에서는철이 코팅되어 있는 담체 PAMP를 사용하기 위하여 magnetic stirrer는 사용하지 않는다. 이 결과를 앞으로의 연구에서 담체 PANF와 PAMP를 이용한 ester 합성결과와 비교하려고 한다.



(a)



(b)

Figure 24. Fructose ester synthesis with novozym435 in acetone (a) vortex, (b) magnetic stirrer.

3-5-3 고정화 효소를 이용한 fructose ester의 생산

Figure 25.는 담체 PANF와 PAMP에 자유효소를 고정화 하여 fructose ester를 합성한 결과이다. 담체 PAMP 2mg에 자유 효소를 1mg 고저화 한 후 이렇게 고정화 한 후의 담체 5개를 모아서 합성반응에 사용하였다. 즉 5mg 의 자유 효소를 10mg의 담체에 고정화하여 사용하였다. PANF도 같은 방법으로 진행하였다. 그림으로부터 72시간 반응을 진행하였을 때 CAL-B/NF, CAL-B/MP가 모두 20%정도의 전환율을 나타냈다. 이는 자유효소가 72시간 반응을 진행하였을 때 80%에 달아는 전환 율보다 4배 낮다. 이는 글루타알데하이드에 의해 효소를 고정화 할 경우 효소들이 글루타알데하이드에 의해 가교결합이 되면 불용성 집합체를 형성하거나, 흡착된 효소끼리 서로 연결되기도 한다. 그러므로 CAL-B/NF, CAL-B/MP에 의한 생성물의 농도가 자연효소에 비해 낮은 이유는 가교 연결로 인한 효소의 활성부위 변화와 확산저항에 의한 것으로 판단된다. 하지만 자연 효소는 공정이 끝난 후 회수가 어렵지만 고정화 효소는 자석에 의해 회수가 용이하므로 고정화 효소를 재회수하여 사용한다면 이는 자연 효소를 사용한 공정보다 더 경제적이라고 생각된다.

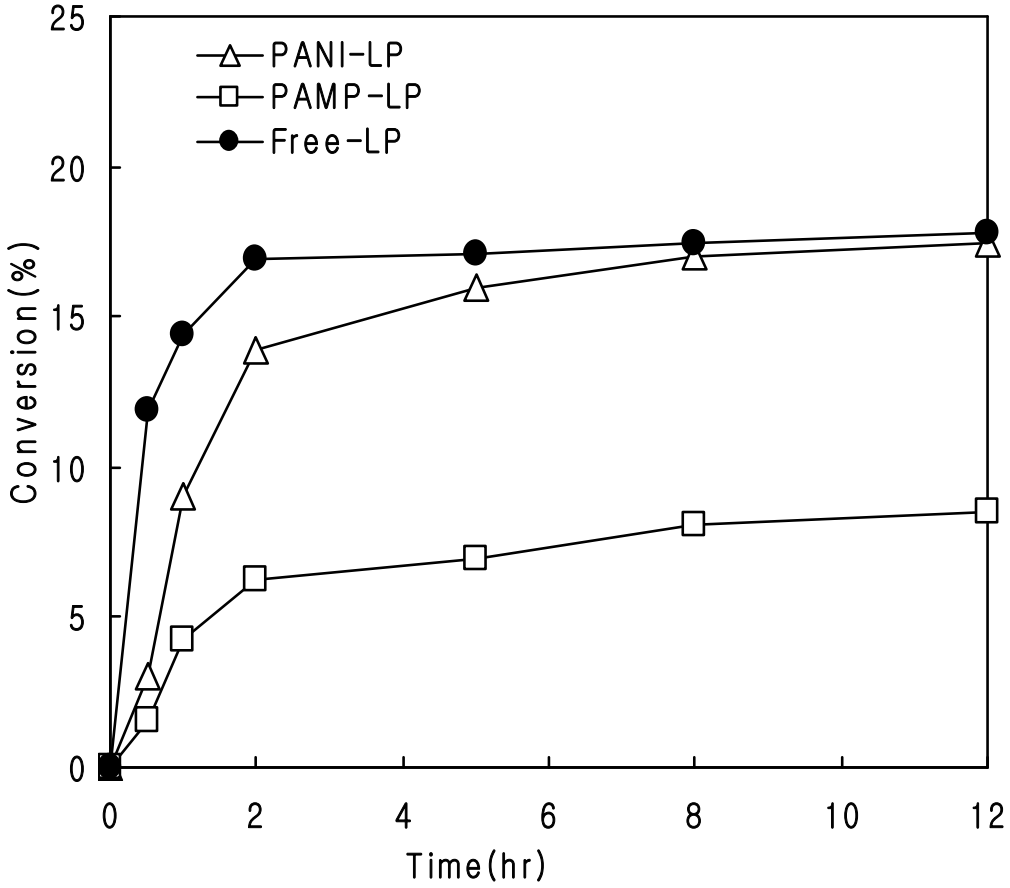


Figure 25. Fructose ester synthesis with immobilized enzyme.

3-5-4 다양한 유기용매를 이용한 Fructose ester 생산

Figure 26. 용매 종류에 따른 전환율을 나타낸 결과이다. 유기용매 2-methyl-2-butanol로 72시간 까지 반응을 진행하였을 때 20%정도의 전환 율이 생겼다. 이것은 유기용매 acetone을 사용하였을 때의 전환 율 60% 보다 3배 낮다. 그러므로 ester의 수율 을 올리기 위하여 유기용매로 acetone를 사용하는 것이 유용하다는 것을 알 수 있다. 그렇지만 acetone을 사용하였을 때 샘플을 모으는 과정에서 결정화가 발생하는 불편함이 발생한다.

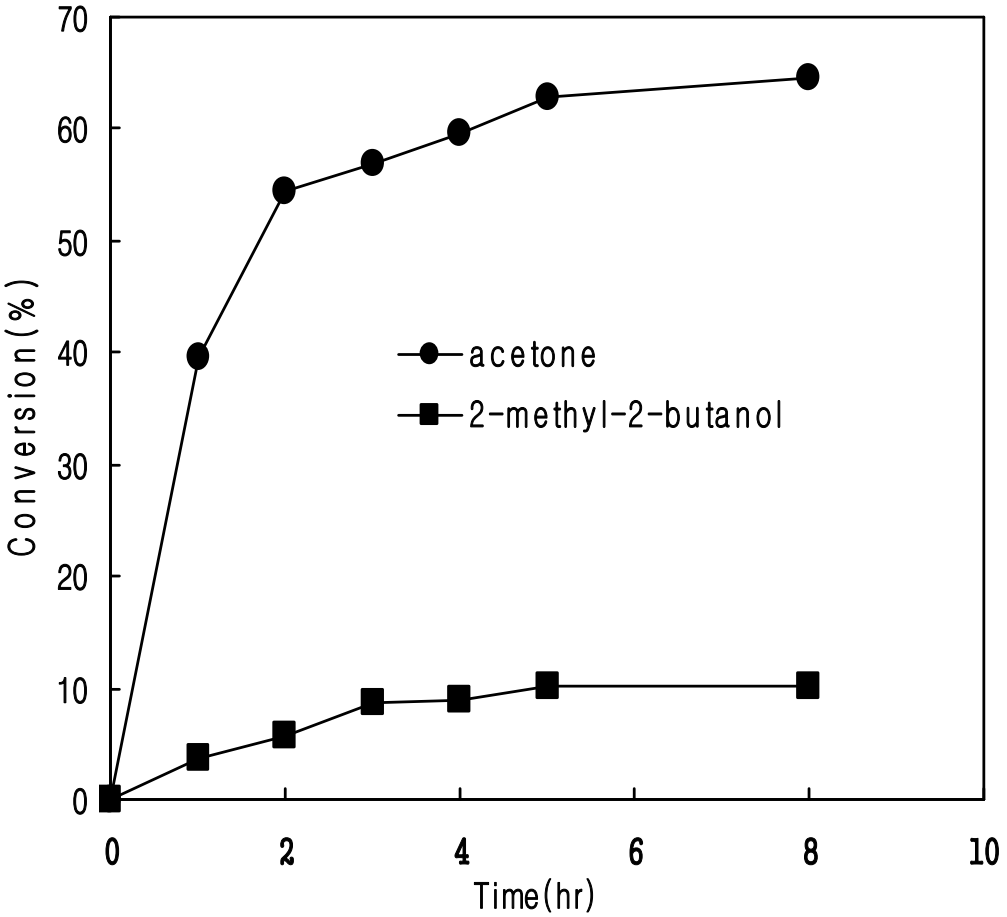


Figure 26. Influence of organic solvents on palmitic acid conversion.

3-6 Glycerol carbonate 생산

3-6-1 회분 식 반응기에서 자유 효소와 Novozyme435에 의한 Glycerol carbonate 생산

Figure 27. 는 Novozym435와 자유효소를 이용한 Glycerol carbonate 합성 결과이다. Glycerol 500mM, DMC 500mM, THF 12ml, molecular sieve 2g로 하고 부동한 반응용기를 이용하여 자유효소 1mg, Novozym435 300mg로 반응을 진행하였을 때 36시간 후 자유효소로는 134mM, Novozym435로는 286mM의 Glycerol carbonate를 획득할 수 있었다. 즉 전환 율이 60%이다. 이것은 논문[25]에서의 냉각기와 감압증류를 하여 얻은 연구결과 전화 율 60%~100%사이에서 나타나는 것과 구별이 되는데 그 이유는 샘플을 취하는 중에 수증기가 반응용기 속으로 주입되어 생성물의 형성에 영향을 주었다고 생각한다. 100%결과를 얻으려면 반응시간에 따라 취득한 샘플을 감압 증류한 후 GC분석기로 정량분석을 하여야 한다고 판단된다.

3-6-2 Glycerol carbonate 합성에 있어서의 온도의 영향

Figure 28. 은 55℃ 와 60℃에서 Glycerol carbonate합성결과이다. 그림으로부터 60℃일 때 Glycerol carbonate의 생성량이 55℃일 때보다 20%증가하였다.

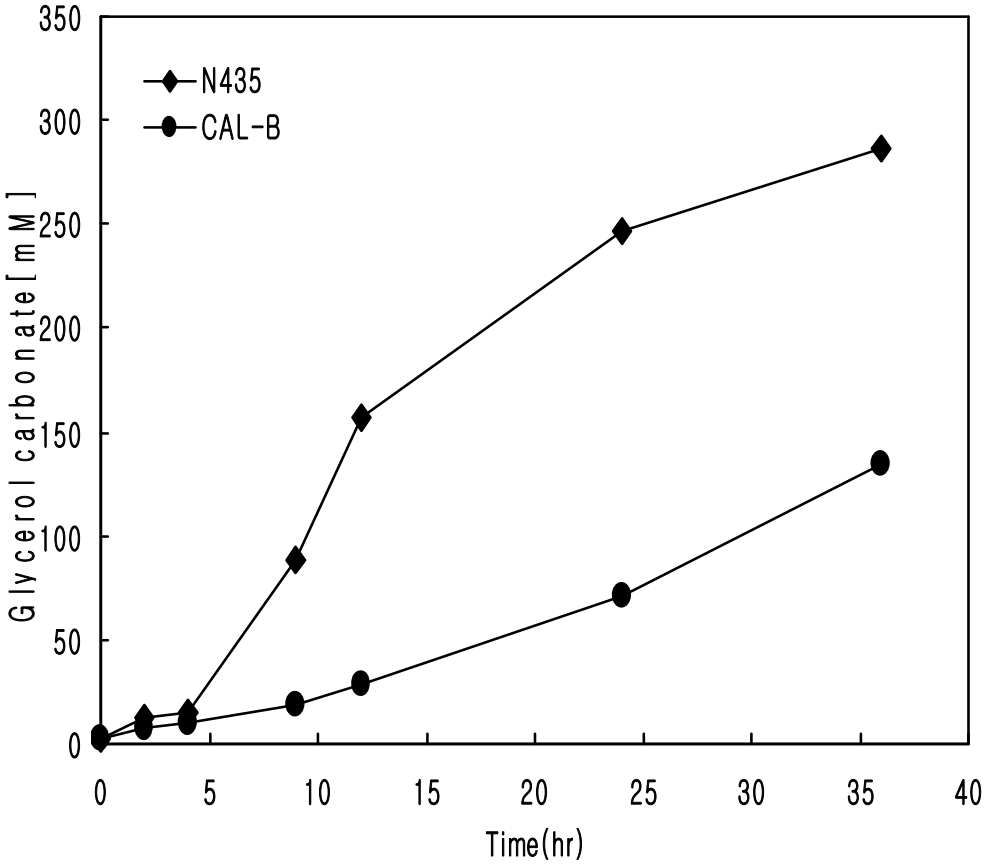


Figure 27. Glycerol carbonate synthesis with free enzyme and novozym435.

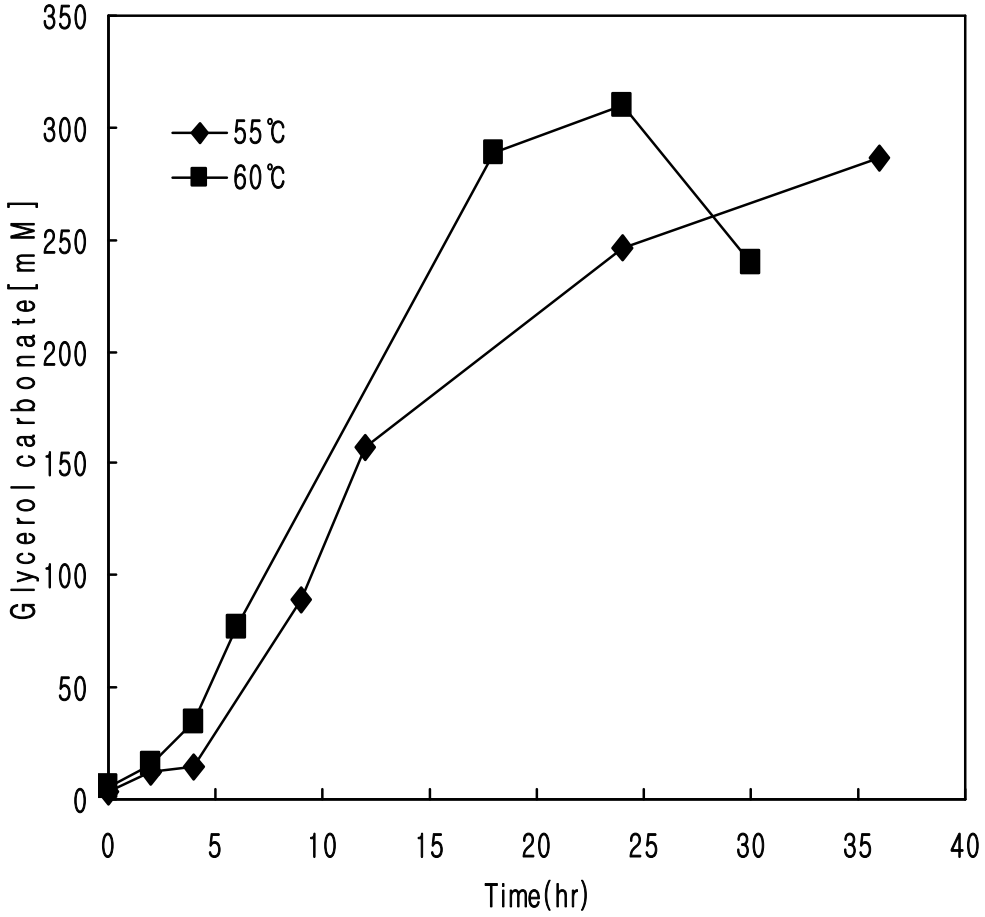


Figure 28. Glycerol carbonate synthesis with novozym435 in different temperature.

3-6-3 회분 식 반응기에서 고정화효소에 의한 Glycerol carbonate의 생산

Figure 29.는 회분식 반응기에서 고정화효소를 이용한 Glycerol carbonate 합성을 보여준 것이다. 실험 결과로부터 초기반응속도가 Free-LP 일 때 27%(Glycerol carbonate:135mM)로서 제일 먼저 포화상태에 도달하였고 그 다음으로 PAMP-LP 13.4%(Glycerol carbonate:67mM) 였고 PANI-LP가 8%(Glycerol carbonate:40mM)로서 제일 마지막에 나타났습니다. 이는 PAMP가 Glycero carbonate 합성과정에 PANI보다 기질의 영향을 더 적게 받는다는 것을 알 수 있다.

3-6-4 Molecular sieve를 이용한 Glycerol carbonate의 생산

Figure 30. 은 Molecular sieve가 합성에 대한 영향을 알기 위하여 Molecular sieve가 있을 때와 없을 Glycerol carbonate의 생산 량을 비교 한 것이다. Molecular sieve 가 없을 때의 생산 량은 21mM, Molecular sieve가 없을 때는 134.5mM 형성되었다. Molecular sieve는 합성과정에서 생성되는 메탄올을 흡수하여 반응이 정반응 쪽으로 진행되도록 하는 작용을 하는데 메탄올을 제거하였을 때 제거하지 않았을 때의 12배 이상의 생산 량을 나타냈다.

3-6-5 회분식 반응기에서 PANI에 의한 Glycerol carbonate의 생산

Figure 31. 은 담체 PANF를 이용한 Glycerol carbonate의 합성결과를 비교한 것이다. PANF 담체를 8mg 사용하였을 때 40mM의 생산량을 보여 주었다. PANF 담체를 40mg 사용하였을 때 58.7mM의 생산량을 보였다. 고정화 담체의 양이 5배 증가함에도 불구하고 생산량은 46.8% 증가하였다. 이는 아마도 합성과정에서 기질의 저해작용을 받는 것으로 예측된다.

3-6-6 회분식 반응기에서 PAMP에 의한 Glycerol carbonate의 생산

Figure 32. 은 담체 PAMP를 이용한 Glycerol carbonate의 합성결과를 비교한 것이다. PAMP 담체를 8mg 사용하였을 때 67mM의 생산량을 보여 주었다. PAMP 담체를 40mg 사용하였을 때 20mM의 생산량을 보였다. 고정화 담체의 양이 5배 증가함에도 불구하고 생산량은 70% 감소하였다. 이는 합성과정에서 기질의 저해작용과 코팅된 산화철의 영향으로 효소의 활성을 영향을 준 것으로 예측된다.

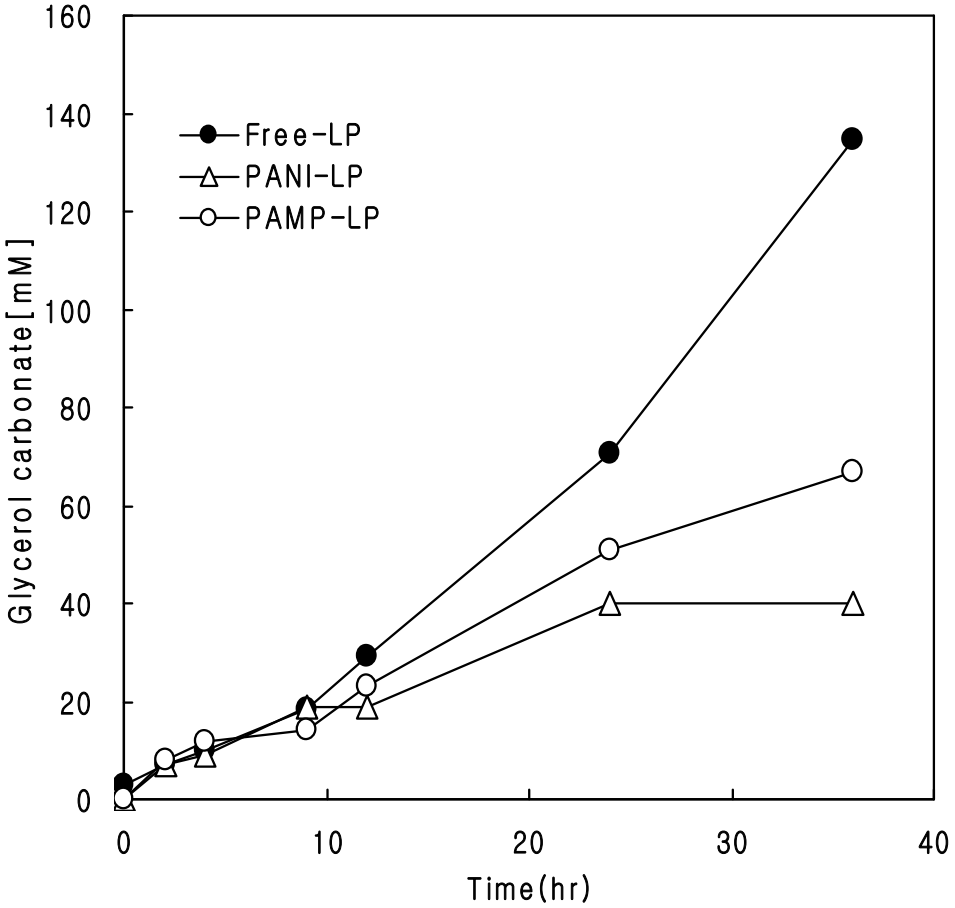


Figure 29. Glycerol carbonate synthesis using different immobilized media.

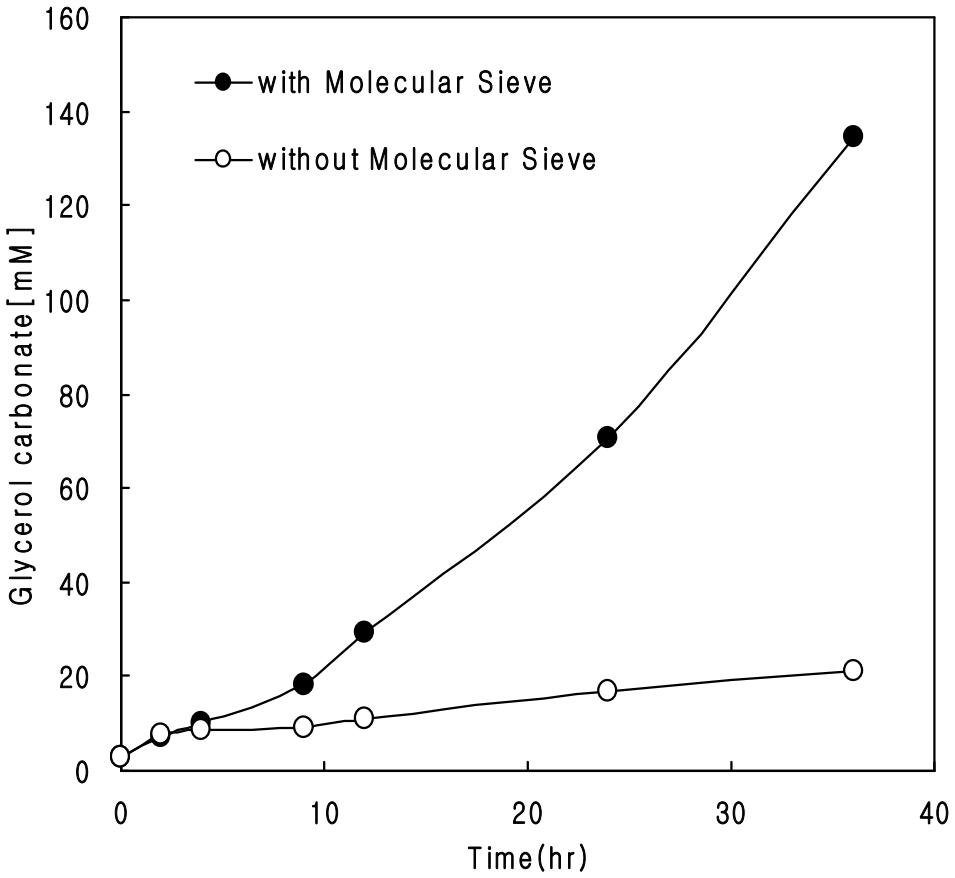


Figure 30. Influence of molecular sieve on the synthesis of glycerol carbonate.

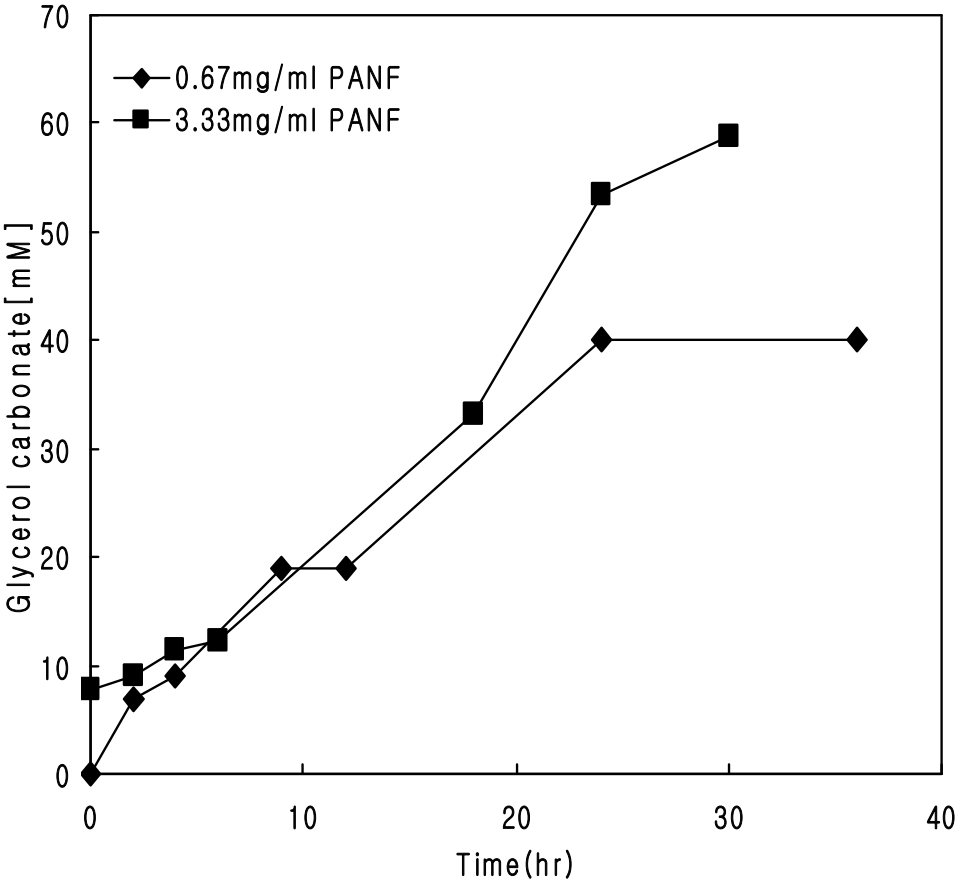


Figure 31. Influence of PANF concentration on the synthesis of glycerol carbonate.

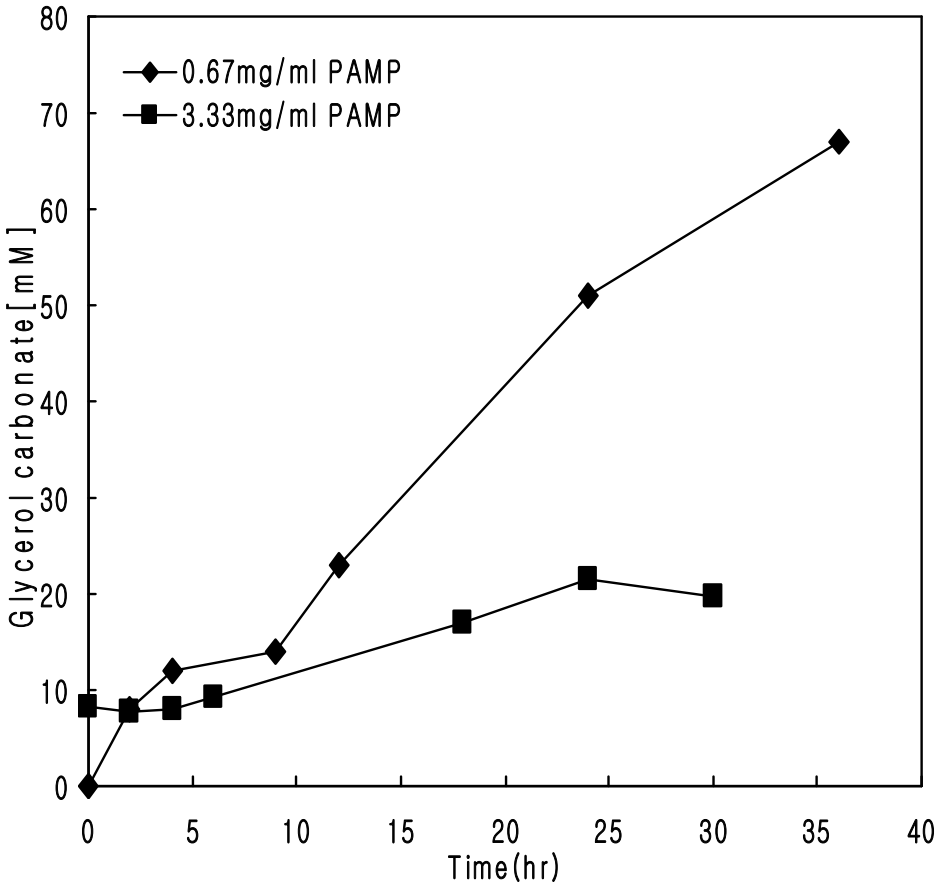


Figure 32. Infuence of PAMP concentration on the synthesis of glycerol carbonate.

제4장 결론

본 연구에서는 생촉매인 enzyme을 개발한 nanofiber에 고정화하여 그 특성을 알아보는 실험을 진행하였다. 고정화 시킬 효소로서 바이오디젤 생산에서 촉매로 다양하게 사용되는 lipase (EC 3.1. 1. 3)를 선택하였다. 자석으로 쉽게 분리 가능한 nanofiber에 glutaraldehyde 를 이용하여 효소를 고정화 시키고 다양한 조건에서 고정화 효소의 활성도 및 안정성을 측정하였고, 식물성 기름을 원료로 한 바이오디젤 생산을 시도하였다. 그리고 이 공정을 CSTR로 돌려서 수율을 측정하여 보았다.

Polyaniline 과 L-proline 합성하여 본 결과 효소를 고정화 하였을 때 32일 되어도 활성도가 안정한 새로운 담체를 형성 할 수 있었다. 이렇게 합성 된 담체를 FT-IR로 그 구조를 확인하여 본 결과 Polyaniline과 L-proline 이 서로 펩타이드 결합을 형성하고 있다는 것을 알 수 있었다.

담체의 특성은 lipase from *Chromobacterium viscosum*(CV)를 사용하여 측정하였다. 고정화 lipase CV의 경우 48일 후 PAMP는 86%의 활성이 남아있음을 확인 할 수 있었고 25℃, 50℃, 75℃ 에 보관 시 free에 비해 높은 활성도를 더 오래 유지함을 알 수 있었다. 이처럼 안정성이 우수한 고정화 효소를 반복 재사용하고 활성을 살펴보면 회수되는 효소양이 95% 이상, 9번의 반복 사용시 초기활성도의 62% 이상이 유지됨을 확인하였다.

식물성기름의 주성분인 triglyceride 를 methyl ester 로 변환시키는 실험에서 24시간 후 free-lipase는 65%, 고정화 효소는 55%의 변환율을 보였다. CSTR에서 PAMP-lipase로 biodiesel를 합성하였을 경우에 80%의 생산량을 보였다.

Fructose와 palmitic acid로 fructose ester를 합성하는 연구에서 free-lipase로 ester를 합성하였을 경우 64%의 전환율을 보였다.

Glycerol과 DMC로 Glycerl carbonate를 합성하는 실험에서 55℃, 36시간 후 Novozym435로 는 60%, free-lipase로 는 30%, 고정화 효소 PANF-lipase로 는 8%, PAMP-lipase로 는 13.4%의 전환 율을 보였다. 위에서와 같은 효소 고정화를 통해 생산단가가 고가이지만 회수가 불가능했던 생촉매인 효소를 재사용 할 수 있게 되었고 반복사용 했을 시 활성도도 높게 유지 되었으며 열안정성이 약한 free 보다 안정성 및 보관성도 높게 유지되었으며 트랜스에스테르화 반응에서도 좋은 활성을 보여주었다.

참고문헌

1. Kim, H.-s., *Enzyme-catalyzed transesterification of soybean oil into biodiesel.* J. of Korean Oil Chemists' Soc, 2003. **20**(3): p. p. 251-258.
2. S. H. Ha, M.N.L., S. H. Lee, S. M. Hwang and Y.-M. Koo, Enzyme and Microbial Technology, 2007. **41**: p. 480-483.
3. M.A., M.F.H., *Biodiesel production: a review.* Bioresource Technology, 1999. **1999**.
4. Bradford, M.M., *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of proteins utilizing the principle of protein-dye binding.* Anal. Biochem, 1976. **76**: p. 248-254.
5. Gerpen, M.C.a.J.H.V., *Biodiesel Production via Acid Catalysis.* Transactions of the ASAE, 1999. **42**(5): p. p. 1203-1210.
6. Y. Shimada, Y.W., T. Samukawa, A. Sugihara, H. Noda, H. Fukuda, *Conversion of Vegetable Oil to Biodiesel Using Immobilized Candida Antarctica Lipase.* JAOCS, 1999. **76**(7): p. p. 789-793.
7. Schultz, N., T.J. Hobley, and C. Syldatk, *Spectrophotometric assay for online measurement of the activity of lipase immobilised on micro-magnetic particles.* Biotechnol Lett, 2007. **29**(3): p. p. 365-71.
8. Sarney, D.B.a.V., E. V.(*Application of enzymes to the synthesis of surfactants.* Trands in Biotecchnology, 1995. **13**: p. 164-174.
9. H. Noureddini, W.R.D., and B. A. Hunt,, *Production of ethers of glycerol from clued glycerol the by-product of biodiesel pro-duction,.* Chemical and Biomolecular Engineering Research and Publications Papers in Biomaterials, 1998.
10. K. S. Tyson, *Biodiesel R&D Potential,.* National Renewable Energy
    Lab. Montana Biodiesel Workshop, 2003.
11. Yujun, W., Jian, Xu Guangsheng, Luo . Youyuan, Dai, *Immobilization of lipase by ultrafiltration and cross-linking onto the polysulfone membrane surface.* Bioresource Technology, 2007.
12. Francisco J. Ploua, M.F., Oscar M. Nuerob,a, Maria V. Calvoa, Miguel Alcaldea, Fuensanta Reyesb and Antonio Ballesterosa,*, *Analysis of Tween 80 as an esterase lipase substrate for lipolytic activity assay.* Biotechnology

Techniques 1998. **12**(3): p. 183-186.
13. Hanen Ghamguia, M.K.-C.a.b., Youssef Gargouri, *1-Butyl oleate synthesis by immobilized lipase from Rhizopus oryzae a comparative study between n-hexane and solvent-free system.* Enzyme and Microbial Technology, 2004. **35**: p. 355-363.
14. Manjari Mukherjee, V.V.K., *Enhancement of Lipoprotein Lipase Activity by Tissue Factor Pathway Inhibitor.* Thromb Haemost, 1999. **82**: p. 1648-51.
15. R. Margesin, G.F., M. Hämmerle, U. Stegner3 & F. Schinner, *A colorimetric method for the determination of lipase activity in soil.* Biotechnology Letters, 2002. **24**: p. 27-33.
16. Shah, S.a.M.N.G., *Lipase catalyzed preparation of biodiesel from Jatropha oil in a solvent free system.* Process Biochemistry, 2007. **42**(3): p. 409-414.
17. Shweta Shah, S.S., and M. N. Gupta *Biodiesel Preparation by Lipase-Catalyzed Transesterification of Jatropha Oil.* Energy & Fuels, 2004. **18**: p. 154-159.
18. DAvis, S.a.R.F.B., *Covalent immobilization of laccase on activated carbon for pgenolic effluent treatment.* Microbiol. Bietechnol, 1992. **37**: p. 474-479.
19. Gottschalk, N.a.R., Jaenicke, *Authenticity and reconstitution of immobilized enzyme characterization and denaturation: renaturation of glucomylase.* Biotechnol. Biochem., 1991. **14**: p. 324-335.
20. Wilson, S.A., K. peek, R. M. Daniel, *Immobilization if proteinase from the extremely thermophilic organism Thermus RT41A.* Biotechnol. Bioeng, 1994. **43**: p. 235-239.
21. Clark, D.S., *Can immobilization be exploited to modify enzyme activity?* Trends Biotechnol, 1994. **12**: p. p.439-443.
22. Zhu, H.N.a.D., *Kinetics of transesterification of soybean oil.* J. Am. Oil Chem. Soc, 1997. **74**: p. 1457-1464.
23. H.-J.Kim, B.-S.K., M.-J.Kim, Y.M.Park, D.-K.Kim, J.-S. Lee and K.-Y. Lee, Catalysis Today, 2004: p. 93-95,315-320.
24. Sabeder, S., M. Habulin, and Z. Knez, *Lipase-catalyzed synthesis of fatty acid fructose esters.* Journal of Food Engineering, 2006. **77**(4): p. 880-886.
25. Kim, S.C., et al., *Lipase-catalyzed synthesis of glycerol carbonate from renewable glycerol and dimethyl carbonate through transesterification.* Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic, 2007. **49**(1-4): p. 75-78.

감사의 글

대학원 석사과정을 마무리 하기까지 많은 도움과 아낌없는 성원을 주신 분들께 이 자리를 빌어 깊은 감사를 드립니다. 특히 석사과정 2년 동안, 너무나도 부족한 저를 언제나 믿어주시고 기회를 주신 이중헌 교수님께 머리 숙여 마음깊이 감사의 인사를 드리고 싶습니다. 자신을 믿지 못해 헤매고 있을 때 제게 올바른 길로 갈 수 있는 지혜와 자세를 가르쳐 주신 이중헌 교수님께 더 좋은 결과를 보여 드리지 못아여 너무나 송구스럽습니다. 또한 바쁘신 가운데도 본 논문을 심사하여 주시고 아낌없는 조언을 주신 차월석, 김정규 교수님께 진심으로 감사 드립니다. 그리고 석사과정에서 따뜻한 격려와 지도를 아끼지 않으신 조선대학교 화학공학과 여러 교수님의 은혜에도 깊은 감사를 드립니다.

대학원 진학에서부터 졸업하기 까지 가까이에서 힘과 용기를 북돋아 주시고 연구에서뿐만 아니라 생활에서도 세심한 배려와 진심 어린 충고를 아끼지 않았던 카리스마 넘치는 김려와 언니에게 깊은 감사의 마음을 전합니다. 실험실에서 같이 생활하고 본 논문을 준비하는데 많은 도움을 준 현우오빠, 지순, 현이, 영덕에게도 고마운 마음을 전합니다. 실험실 생활을 하면서 정이 든 우리 학부생들 하얀이, 동희, 혜영, 민성, 새로미에게도 감사의 마음을 함께 전합니다. 그리고 앞으로 저의 실험을 이어가게 될 고은이게도 고마운 마음을 전하고 싶습니다.

석사과정 중 가까이에서 나의 이야기를 열심히 들어주던 친구 리화와 추현이, 그리고 멀리에서 항상 나를 지켜봐주면서 응원하여 주는 은화, 서화, 해연이에게도 고마운 마음 전하고 싶습니다. 마지막으로 끝없는 사랑과 격려로 저에게 힘이 되어주신 어머님께 진심으로 감사드립니다.

2009년 12월

원 춘 화

저작물 이용 허락서

학 과	화학공학과	학 번	20087731	과 정	석사
성 명	한글: 원 춘 화 한문: 元 春 花 영문 : Chun-Hua Yuan				
주 소	광주광역시 동구 서석동 375번지				
연락처	E-MAIL : xuni1121@naver.com				
논문제목	한글: Lipase가 고정화된 나노 생촉매를 활용한 생물전환공정 개발 영어: Development of biotransformation process using lipase coated nanobio-catalysis				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건아래 -조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집·형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 또는 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물의 이용허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음
7. 소속대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의 (●) 반대 ( )

2008년 2 월 일

저작자: 원 춘 화 (서명 또는 인)

조선대학교 총장 귀하