

Lipase를 이용한 Calcium Stearate 생산

권진수, 정철연*, 김현수*, 박건규*, 김은기, 허병기
인하대학교 공과대학 생물공학과 생물 환경소재 연구실, 무궁화(주)*
전화 (032) 872-2978, FAX (032) 875-0827

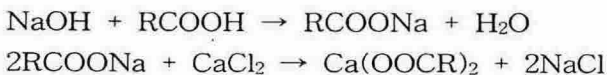
Abstract

Enzyme production of calcium stearate was attempted by lipase. Lipase having the highed hydrolyzing activity at 60°C, a melting point of substrate (hydrogenated beef tallow),was selected. 60% of hydrogenated beef tallow was converted into calcium stearate in 48hr. This result showed the possible replacement of conventional waste-producing process into enzymetic reaction.

Introduction

Calcium stearate는 고분자 첨가제(윤활제, 이형제, 안정제, 촉매 불활성제, 방착제), 제지 코팅제, 시멘트 첨가제 등의 각종 산업분야에 많이 응용되고 있는 물질이다.⁽¹⁾ 전통적으로 calcium stearate를 제조하는 방법은 double decomposition process 와 fusion process 등이 있다. double decomposition process는 포화 또는 불포화 지방산 과 NaOH를 수용액 중에서 반응시켜 지방산염을 만든 후 수용성 금속을 첨가시켜 반응시키는 방법이다. 그러나 double decomposition process는 제조 공정이 복잡하고, 설비비가 많이 들며, 특히 반응중에 생성되는 NaCl이 반응물에 잔류시 사용용도에 따라 치명적인 영향을 준다.⁽²⁾⁽⁴⁾ fusion process는 수용액중이나 유기용매 중에서 지방산과 금속산화물 또는 수산화물을 직접 반응시키는 방법으로 double decomposition process 보다 설비가 간단하고, NaCl이 발생하지 않으나, calcium stearate 의 melting point 이상의 온도(147-149°C)에서 반응을 수행해야, 좋은 품질의 calcium stearate를 생산할 수 있다.⁽¹⁾ 본 연구에서는 비누를 생산하는데, 널리 이용되는 값싼 beef tallow를 수첨해서 lipase의 기질로 사용했으며, Ca(OH)₂ 와 H₂O를 첨가한 후에 수첨된 beef tallow의 melting point인 60°C에서 교반을 통해서 calcium stearte를 생산했다.또한 효소를 이용한 공정은 상온 상압에서 반응을 진행 시킬수 있으므로 전통적인 공정 보다, 에너지 효율면 에서도 월등하다고 할 수 있다.

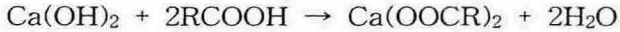
THE DOUBLE DECOMPOSITION PROCESS



THE FUSION PROCESS



or



THE ENZYME PROCESS

Substrate (hydrogenated beef tallow) \rightarrow RCOOH + Ca(OH)₂ \rightarrow Ca(OOCR)₂

Material and Method

p-Nitrophenylstearate(*p*-NPS)를 이용한 lipase 의 열안전성 Test

50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2) 에 lipase를 첨가하고, 2-propanol에 용해된 *p*-NPS를 더하여진 Lipase 양 의 50배로 첨가하여 준다. *p*-NPS 와 50 mM sodium phosphate buffer (pH 7.2)가 들어 있는 시험관을 각각의 온도별로 준비하고, 각각의 온도에서 10min간 preincubation 한 후에 lipase 1ml을 첨가한다. 3min간 반응시킨 후에 enzyme을 inactivation 시키기 위해서, ethanol/acetone(50:50) 용액을 2ml첨가한다. 반응액 1ml을 410nm에서 quartz cell을 이용해서 흡광도를 측정한다. Enzyme 대신 distilled water 1ml을 첨가한 blank test를 반드시 시행한다.

Calcium stearate 합성을 분석

반응물을 85°C에서 2시간 건조시킨 후에, 분쇄기를 이용해서 분쇄한후 3g을 정밀히 달아, 분별 깔대기에 담는다. 분쇄된 반응물 3g을 85°C 물로 washing 한 후, 다시 85°C에서 2시간 동안 건조시킨다. 건조된 반응물 3g을 유기용매를 이용해서 미반응의 불순물을 제거한 후에, 여과를 통해서 생성된 calcium stearate를 회수한다.

Calcium stearte 합성을 계산

$$\text{합성율}(\%) = \frac{\text{회수된 Calcium stearate 의 양 (g)}}{\text{반응물의 양 (g)}} \times 100$$

Result and Discussion

p-Nitrophenylstearate(*p*-NPS)를 이용한 lipase 의 열안전성 Test

Lipase가 *p*-nitrophenylstearate(*p*-NPS)의 ester bond를 가수분해하면 방출되어지는 nitrophenol이 optical density를 증가시키며, 이것을 통해서 substrate가 가수분해되었다는 것을 알 수 있다. 본 실험은 enzyme 의 정확한 activity를 구하는 것보다는 각각의 lipase가 열에 대하여, 어떠한 가수분해 양상을 보이고 있는지를 규명하는데, 연구의 초점이 맞추어 졌다. Lipase CXT 1000 와 Lipase SDL 451은 37°C 부근에서 높은 가수분해율을 보이고 있으며, 온도가 증가함에 따라 가수분해율이 감소한다. Lipase 100T는 온도에 대해서 거의 일정한 가수 분해율을 보이고 있다.(Fig 2)

시간에 따른 Calcium Stearate 합성을 분석

4.5 시간에서 5.39%, 8 시간에서 10.74%, 20 시간에서 43.69%, 48시간에서 64.99%

의 합성율을 보인다. (Fig 3)

H₂O의 비율에 따른 Calcium Stearate 합성율 분석

H₂O를 기질의 비율로 0.079%, 0.3224%, 0.48%, 0.64%, 0.97%, 1.29%로 변 하 시켰을 때 각각 2.15%, 53.15%, 55.9%, 77.63%, 74.53%, 49.68% 의 합성율을 나타냈다. (Fig 4) . 이러한 결과를 바탕으로 calcium stearate 의 합성율을 높이기 위한 lipase screening 과 최적화 작업이 진행중에 있다.

Reference

- (1) Russell H. Rogers, Jr., and William R. Blew, Jr. Manufacture of metal soaps. US Patent 2890232, 1959
- (2) John Blachford. Manufacture of metal soaps. US Patent 4316825, 1982
- (3) L. M. PEREZ ALBA., and S. DE SOUZA CAVALCANTI (1997). Calcium Soaps of olive fatty acid in the Diets of Manchega Dairy Ewees: Effects on Digestibility and Production. J.Dairy Sci 80: 3316-3324
- (4) Fridrich J. Zucker. Process for the continuous production of water insoluble metal soaps. US Patent 4376079, 1983

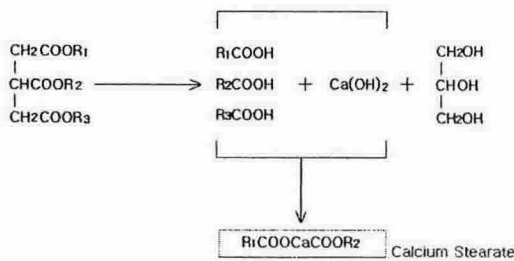


Fig 1 Calcium stearate reaction mode

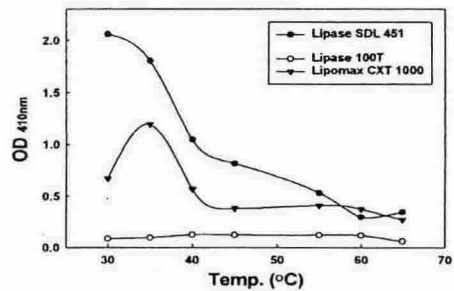


Fig 2 Influence of temperature about the hydrolysis of lipase

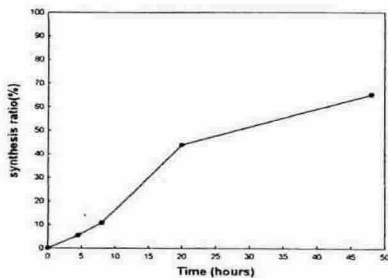


Fig 3 The synthesis ratio of calcium stearate depended on time

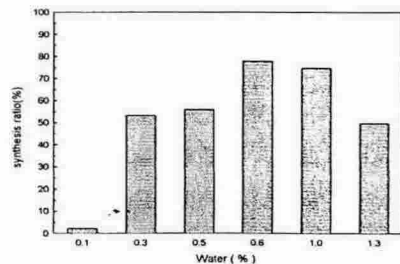


Fig 4 Effect of water ratio on calcium stearate product