

Lipase를 이용한 피마자유의 methanolysis

양중석, 진규중, 허병기*, 양지원

한국과학기술원 화학공학과, 인하대학교 공과대학 화공·고분자·생물공학부*

전화 (042) 869-3964, FAX (042) 869-3910

Abstract

The characteristics of enzymatic methanolysis of castor oil were investigated as a clean technology. Among 16 lipases tested in this study, Novozym 435 showed the highest activity in methanolysis. Solvents had different effects on the methanolysis of castor oil according to weight percent (wt%) of Novozym 435. Heptane showed best activity with 1 wt% of Novozym 435, while isopropyl ether gave the best yield of ricinoleic acid methyl ester with 0.5 wt% of that. Ricinoleic acid methyl ester was obtained in 86% of yield through the methanolysis of castor oil catalyzed by Novozym 435 (1.0 wt%) during 24hr.

서론

피마자유는 의약적으로 하제로 이용되는 잘 알려진 식물성 오일이다. 산업적인 면에서는 코팅제, urethane 유도체, 계면 활성제, 분산제, 화장품, 윤활제 등을 만드는 원료물질로 이용되고 있다¹⁾.

Triglyceride 형태의 식물성 오일을 메탄올을 이용하여 지방산 ester를 만드는 방법(methanolysis)에는 산 촉매를 이용하는 방법, 알칼리 촉매를 이용하는 방법, 그리고 효소를 이용하는 방법이 있다²⁾. 이 중 산이나 알칼리 촉매를 이용하는 경우에는 반응이 빠르다는 장점이 있으나 생성 물질을 분리하기 힘들고 에너지 소모가 많으며 이러한 이유로 큰 설비 투자가 요구된다. 또한 생성물의 품질이 낮고, 발생되는 폐수로 인해 환경문제가 발생한다. 반면 효소를 이용한 방법은 에너지 비용이 절감되고 생성물 분리가 쉬워 초기 투자비용이 상대적으로 적으며 고품질의 생성물을 얻을 수 있으나, 효소의 가격이 비싸다는 단점이 있다.

이러한 사실을 배경으로 상용화된 lipase를 이용하여 triglyceride 형태인 피마자유를 methanolysis하여 ricinoleic acid methyl ester를 대량 생산하기 위한 공정을 개발하기 위하여 본 연구를 수행하였다.

재료 및 방법

본 실험에서 사용한 피마자유 (지방산의 조성 : 89.5% ricinoleic acid, 3.0% oleic acid, 4.2% linoleic acid, 3.3% other acid)는 Sigma사의 제품을 이용하였다. Lipase는 Amano(Japan)사의 Lipase F-AP15, Lipase M[■]"Amano"[■]10, Lipase AY[■]"Amano"[■]30, Sigma(USA)사의 Lipase PP(*Porcine Pancrease*), Lipase CR(*Candida rugosa*), Lipase CC(*Candida cylindracea*), Novo Nordisk(Denmark)사의 Novozym 435, Lipozyme RM IM, Meito

Sangyo(Japan)사의 Lipase QL, Lipase PL, Lipase AL, Lipase OF, Lipase MY를 사용하였다. 유기용매의 영향을 알아보기 위해 1,4-dioxane, DMF, methanol, acetone, THF, cyclohexanone, diisopropyl ester(DIPE), chloroform, toluene, cyclohexane, hexane, heptane 등의 유기용매를 Merck, Junsei, Sigma 등 다양한 회사로부터 구입하였다.

실험 방법은 3.0g의 피마자유와 실험에 따라 일정한 양의 methanol, lipase, 유기용매를 20mL vial에 넣고 shaking incubator에서 50°C, 300rpm으로 하루동안 교반하였다.

반응의 생성물질은 HPLC(Waters symmetry C₁₈ column, RI detector, Waters 510 pump, Waters Automated Gradient Controller, Waters 717 plus Autosampler, Hewlett Packard 3396II Integrator)를 이용하여 정량하였다. 이동상은 acetonitrile:ethanol(3:2 v/v)을 0.5mL/min로 흘려주었다.

결과 및 고찰

Lipase screening

피마자유의 methanolysis 반응에서 최대의 활성을 나타내는 lipase를 찾기 위하여 16개의 lipase를 가지고 30°C와 50°C에서 각각 실험을 진행하였다. Figure 1에서 보여지는 바와 같이 온도에 따른 lipase의 활성에는 차이가 있지만 피마자유의 methanolysis 반응에서 어느 정도 활성을 보이는 lipase는 Novo Nordisk사의 Novozym 435와 Lipozyme RM IM, Meito Sangyo 사의 Lipase -QL, -PL, -AL 들이다. 이 중에서 가장 높은 활성을 보인 것은 30°C에서 Lipase QL (powder type) 과 50°C에서 Novozym 435 (immobilized type) 이다. 그러나 lipase QL의 경우는 고정화한 경우에 활성이 매우 떨어짐을 보여주고 있으며 이것은 산업적인 응용측면에서 단점이 된다. 예를 들어 고정화된 효소는 반응 후 쉽게 회수가 가능하고 계속하여 재사용을 할 수 있기 때문에 고정화가 되어 있지 않은 효소보다 훨씬 경제적이다. 이러한 이유로 이후 실험에서는 고정화되어 있으며 활성이 높은 Novozym 435를 사용하였다. Novozym 435의 경우는 적정 온도가 40-60°C인데³⁾ 이후 실험에서는 methanol의 끓는점을 고려하여 50°C에서 실험을 진행하였다. 50°C에서 Novozym 435의 경우에는 monoglycerids(MG), diglycerides(DG), 피마자유(CO) 모두 매우 적은 양만이 남아 있어 반응이 거의 진행되었음을 알 수 있다.

Effect of solvent

피마자유의 methanolysis에서 참여하는 methanol이 효소의 활성을 방해하는 역할을 하기 때문에 이러한 영향을 줄이기 위해서 유기용매를 첨가하여 효소의 활성을 비교하여 보았다. Figure 2에서처럼 유기용매가 존재하는 않는 상태(free)에서도 좋은 활성을 보여 주었다. 그러나 피마자유에 대한 0.5 wt% Novozym 435를 첨가하였을 때는 DIPE의 경우에 가장 좋은 활성을 보였고, 1.0 wt%의 경우에는 heptane의 경우가 가장 좋은 활성을 보였다. 유기용매를 사용하지 않은 경우에도 높은 활성을 유지하였으나, Novozym 435의 양에 따라 DIPE, heptane, cyclohexanone, cyclohexane 등의 유기용매에서 각각 다른 활성을 확인하였다.

Effect of methanol and time profile

일반적으로 methanolysis의 경우 methanol이 기질과 용매의 역할을 하지만, 효소를 저해하기 때문에 최적의 값을 찾는 것이 중요하며, 화학양론적으로 보면 3g의 피마자유를 methanolysis 하기 위해서는 0.407mL의 메탄올이 필요하다. 일반적인 식물성 오일의 methanolysis에서 oil:methanol의 몰 비가 1:6 일 때 최대값을 가지는 것으로 보고되고 있다⁴⁾. 본 실험에서는 Novozym 435의 양을 변화시키면서 메탄올의 최적값을 찾아보면 Figure 3에서 보는 바와 같이 Novozym 435의 양이 많아짐에 따라 최적의 methanol 양이 조금씩 많아짐을 알 수 있다. 3g의 피마자유에 1 wt%의 Novozym 435를 사용하였을 경우 최적의 methanol양은 약 1mL이다. 이것을 몰 비로 나타내면 oil : methanol 의 비가 약 1:7.37 일 때이다.

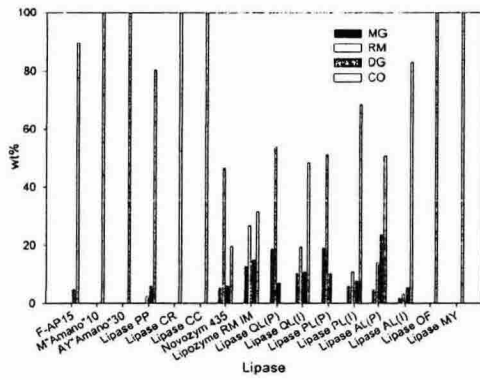
Figure 4는 시간에 따라 생성물의 변화를 나타낸 것이다. 초기에 피마자유(CO)의 양이 급격하게 줄어들고 ricinoleic acid methyl ester(RM)의 양이 시간에 따라 증가함을 확인하였다. Diglycerides(DG)와 monoglycerides(MG)의 경우는 초기에 늘어나다 점점 줄어들음을 알 수 있는데 monoglycerides의 경우는 triglycerids나 diglycerides보다 Novozym 435에 의한 transesterification의 속도가 매우 느림을 확인할 수 있다. 피마자유에 대해 1 wt%의 Novozym 435를 사용할 경우 24hr 반응으로 생성물 내에서 80 wt% 정도의 ricinoleic acid methyl ester를 얻을 수 있었다.

요약

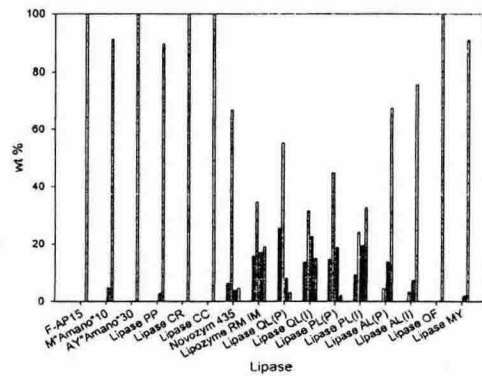
피마자유와 메탄올의 transesterification 반응(methanolysis)에서 Novozym 435가 가장 좋은 활성을 나타냈다. Novozym 435의 경우 유기용매를 사용하지 않을 경우에도 좋은 활성을 유지하였고 사용되는 효소량에 따라 최적의 유기용매가 다르다는 것을 확인하였다. 0.5 wt% Novozym 435를 사용한 경우 DIPE를 사용하였을 때 가장 높은 활성을 나타내었으나, 1.0 wt%의 경우에는 heptane을 이용하였을 때 가장 높은 활성을 보였다. Novozym 435를 이용한 피마자유의 methanolysis에서 methanol에 의한 저해 반응이 나타나고 oil 과 methanol의 몰 비가 약 1:7.37 일 경우 최대의 ricinoleic acid methyl ester를 얻을 수 있었다. 1.0wt%의 Novozym 435를 이용한 methanolysis를 통하여 하루동안 피마자유로부터 ricinoleic acid methyl ester를 86.1%의 수율로 얻을 수 있었다.

참고문헌

1. Kirk-Othmer, "Encyclopedia of chemical technology, 3rd ed."(1979), John Wiley & Sons, Vol(5), 1-15.
2. K. Eder, "Gas chromatographic analysis of fatty acid methyl esters"(1995), Journal of Chromatography B, Vol(671), 113-131.
3. "Novozym 435 product sheet", Novo Nordisk.
4. Anjana Srivastava, Ram Prasad, "Triglycerides-based diesel fuels"(2000), Renewable and Sustainable Energy Reviews, Vol(4), 111 133.

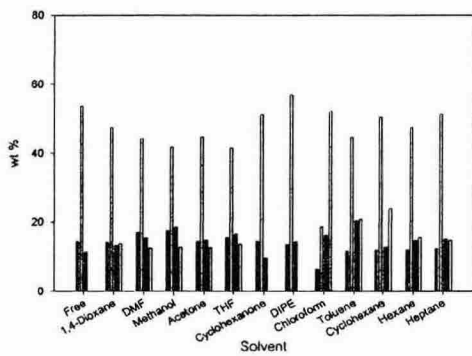


(A)

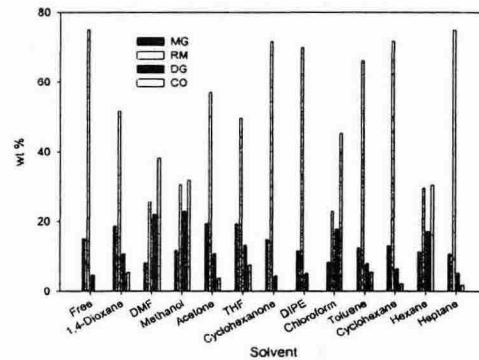


(B)

Figure 1. Screening of lipases for the methanolysis of castor oil (30mg lipase, 3g castor oil and 0.5mL methanol, 300rpm shaking incubator, 24hr (I : immobilized type, P : powder type)) (A) at 30°C (B) at 50°C



(A)



(B)

Figure 2. Solvent effect on the methanolysis of castor oil by (A) 15mg (0.5 wt%) and (B) 30mg (1.0 wt%) Novozym 435 (3g castor oil and 1.0mL methanol in 1.0mL solvent at 50°C, 300rpm shaking incubator, 24hr).

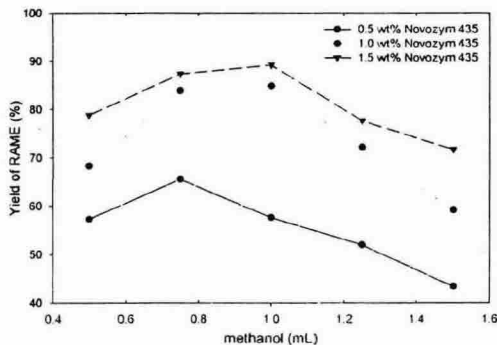


Figure 3. Effect of methanol (30mg lipase, 3g castor oil and 1.0mL methanol at 50°C, 300rpm shaking incubator, 24hr reaction).

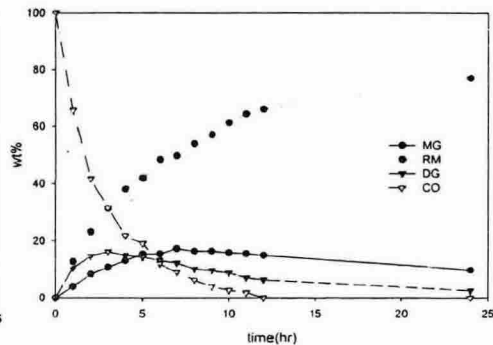


Figure 4. Time profile (2.5g Novozym 435, 250g castor oil and 83.3mL methanol at 50°C, 300rpm mechanical mixing).