한 국 버 섯 학 회 지 Journal of Mushrooms Research Article

양송이 배지에서 유래한 Lipase 생산균을 이용한 바이오디젤 생산

김현희 · 김찬겸 · 한창훈 · 이찬중[1] · 공원식[1] · 윤민호*

충남대학교 농업생명과학대학 생물환경화학과
[1]농촌진흥청 국립원예특작과학원 버섯과

Biodiesel production using lipase producing bacteria isolated from button mushroom bed

Heon-Hee Kim, Chan-Kyum Kim, Chang-Hoon Han, Chan-Jung Lee[1], Won-Sik Kong[1] and Min-Ho Yoon*

Department of Bio-Environmental Chemistry, College of Agriculture and Life Sciences, Chungnam National University, Daejeon 305-764, Korea
[1]Mushroom Research Division, National Institute of Horticultural & Herbal Science, RDA, Eumseong 369-873, Korea.

ABSTRACT: A lipase producing bacterium was isolated from button mushroom bed, which showing high clear zone on agar media containing Tributyrin as the substrate. The strain was identified as *Burkholderia cepacia* by analysis of 16S rDNA gene sequence. Crude lipase (CL) was partially purified from 70% ammonium sulfate precipitation using the culture filtrate of *B. cepacia*. Immobilized lipases were prepared by cross-linking method with CL from *B. cepacia* and Novozyme lipase (NL) onto silanized Silica-gel as support. Residual activitiy of the immobilized CL (ICL) and immobilized NL (INL) was maintained upto 61% and 72%, respectively. Biodiesel (Fatty acid methyl ester, FAME) was recovered by transesterification and methanolysis of Canola oil using NaOH, CL and ICL as the catalysts to compare the composition of fatty acids and the yield of FAME. Total FAME content was NaOH 781 mg L^{-1}, CL 681 mg L^{-1} and ICL 596 mg L^{-1}, in which the highest levels of FAME was observed to 50% oleic acid (C18:1) and 22% stearic acid (C18:0). In addition, the unsaturated FAME (C18:1, C18:2) decreased, while saturated FAME (C16:0, C18:0) increased according to increasing the reaction times with both CL and ICL, supporting CL possess both transesterification and interesterification activity. When reusability of ICL and INL was estimated by using the continuous reaction of 4 cycles, the activity of ICL and INL was respectively maintained 66% and 79% until the fourth reaction.

KEYWORDS: Biodiesel, *Burkholderia cepacia*, Immobilized lipase, Crosslinking method, Button mushroom bed

J. Mushrooms 2015 March, 13(1):56-62
http://dx.doi.org/10.14480/JM.2015.13.1.56
Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
© The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author
E-mail : mhyoon@cnu.ac.kr
Tel : +82-42-821-6733, Fax : +82-42-823-9241

Received March 3, 2015
Revised March 30, 2015
Accepted AMarch 30, 2015

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

서 론

바이오 디젤은 식물성 기름과 동물성 기름을 원료로 만드는 바이오 연료로서 바이오 에탄올과 함께 석유에너지를 대체할 친환경 에너지로 부각되고 있다(Akoh *et al*., 2007). 석유계 디젤유와 물리적, 화학적 특성이 유사하고, 생분해성이 높아 환경친화적이며(Knothe and Steidley, 2005), 기름을 원료로 사용하기에 자원고갈의 문제점이 없고(Noureddini *et al*., 2005) 폐유로도 생산이 가능하기 때문에 새로운 재생에너지로 평가되고 있다(Shimada et al., 2002). 또한 온실가스(CO, CO_2, SO_x)의 배출량이 기존의 연료보다 20% 이상 절감 시킬 수 있기 때문에 대체에너지를 넘어 청정에너지로도 평가받고 있다(Charpe

and Rathod, 2010; Draft Technical Report, 2002).

바이오디젤은 각종 식물성 오일 또는 동물성 지방의 중성지방(triglyceride)이 화학촉매와 효소촉매 하에 알코올과 반응하여 에스테르교환반응(transesterification), 또는 지방산과 알코올이 에스테르화 반응(esterfication)에 의해 fatty acid methylester(FAME)으로 전환되어 얻어진다(Mehr *et al*., 2006). 중성지방을 글리세롤과 지방산으로 분해하는 화학적촉매반응은 일반적으로 HCl, H_2SO_4와 같은 산 촉매와 NaOH, KOH등의 염기촉매를 사용하며, 반응기간이 짧고, 전환율이 높은 장점이 있으나, 산염기 촉매 모두 높은 온도와 압력이 요구되므로 에너지 소모가 크고 특수 설비에 따른 많은 시설비가 많이 요구되며, 또한 분해산물인 글리세롤의 제거가 힘들고 폐수로 인한 2차적인 환경오염을 발생시킨다(Bajaj *et al*., 2010; Parawira, 2009).

그에 비해 효소 촉매 방법은 산업적으로 광범위하게 사용되는 효소인 리파아제를 사용하는 공정으로 이는 높은 기질선택성, 위치 선택성, 입체 선택성을 지니고 있다(Dizge *et al*., 2009; Jaeger and Eggert, 2002, Tripathia *et al*. 2014). 또한 기존의 화학적 촉매 방법에 비해 낮은 온도에서 진행되어 공정에서 요구되는 에너지의 양이 적으며, 부산물과 생성물 사이의 분리가 쉬어 회수가 용이하고, 적은 유기용매 사용량으로 인해 환경문제에서 화학적 촉매 방법보다 높은 장점이 있다. 그러나 효소의 단가가 비싸고 반응 공정 시 발생할 수 있는 효소의 낮은 안전성이 단점으로 부각될 수 있다(Yoo *et al*, 2011). 이러한 단점들을 보완하는 기술이 바로 효소 고정화 기술이다. 고정화 기술을 이용하면 효소의 재회수를 가능케 하여 공정에 다시 사용시킬 수 있어 단가를 크게 낮출 수 있다. 또한 효소의 활성과 안정성을 증가시켜 기존의 효소적 촉매 반응의 단점들을 상쇄시킬 수 있다(Kharrat *et al*, 2011; Li *et al*, 2009).

현재 사용 중인 효소의 고정화 기술로는 흡착법(adsorption)과 Cross-linking method(Park *et al*., 2004), covalent attachment, encapsulation 방법 등이 있다. 이중 Adsorption (Ye *et al*, 2007)은 Van der Waals 또는 소수성 결합 또는 분산력 등을 이용하여 효소를 고체상태의 담체에 고정시키는 방법으로, 비용이 싸고 효소의 활성이 높게 유지되는 장점이 있다. 그러나 담체와의 결합력이 약하기 때문에 장시간 사용할 수 는 없다. 그러나 Cross-linking method는 효소와 담체가 공유결합을 이루면서 효소의 활성은 많이 유실되는 반면 결합력이 강해 장시간 사용할 수 있다는 장점을 가진다(Yoon *et al*, 2011; Kim *et al*., 2005).

본 연구에서는 양송이 배지로부터 lipase 생산균 *Burkholderia cepacia*를 분리하고, 분리균으로부터 회수된 lipase 조효소를 Cross-linking method를 이용하여 lipase 고정화 효소를 제조 한 후, 식물성 기름인 Canola oil로부터 고정화 효소에 의한 생성된 바이오디젤(FAME) 물질의 종류 및 수율을 비교 분석하였다.

재료 및 방법

실험재료

바이오디젤(FAME) 반응에 사용된 기질인 카놀라유(canola oil, 99.999%)는 ㈜사조해표 제품을, palmitic ethyl ester(16:0)와 stearic ethyl ester (18:0) 등의 FAME 표준물질은 Sigma-Aldrich Chemical Co. (St. Louis, MO, USA)에서 구입하여 사용하였다. 고정화 (immobilization)에 사용한 lipase(glycerol ester hydrolase, E.C. 3.1.1.3)는 Novozymes(Denmark)사에서 구입하였고, 고정화에 사용한 support는 Silica-gel(Merck, Germany)을 사용하였으며, 기기분석에 사용된 모든 시약은 분석용 특급시약을 사용하였다.

Lipase 생산균의 분리 및 동정

충청남도 부여군 석성면 양송이 재배농가로부터 양송이 배지를 수집하였다. Lipase 생산균을 분리하기 위하여 양송이 배지 10 g을 90 ml 멸균수에 넣어 60분동안 진탕한 후, Luria Broth(LB) agar 배지에 도말하여 bacterial colony들을 분리하였다. 분리균으로 부터 lipase 생산균의 선발은 Tributyrin을 함유하는 phenol red plate assay 법(Singh *et al*, 2006)을 사용하였다. 분리균의 동정은 순수 배양된 분리균의 단일 colony를 주형으로 *E. coli* 16S rDNA 부분의 conserved sequence를 기초로 한 27F(5'-AGAGTTTGATCCTGGCTCAG-3') primer와 1492R(5'-AAGGAGGTGATCCAGCCGC-3') primer를 이용하여 16S rRNA 염기서열을 분석하였다. 분석한 16S rRNA의 부분서열의 상동성은 DDBJ/ EMBL/ GeneBank database의 Blast program을 이용하여 분석하였다.

Lipase 조효소 제조

Lipase 생산균으로부터 lipase 조효소를 회수하기 위하여 탄소원으로 1% (v/v) tributyrin이 함유된 Minimal Salt Media (0.2 g $MgSO_4$, 0.05 g $Fe(CH_3COO)_3NH_4$, 0.085 g $NaNO_3$, 7.8 g $Na_2HPO_4 \cdot 2H_2O$, 6.8 g KH_2PO g per liter, pH 7.5)를 이용하여 35℃, 72h 배양하였다. 배양액을 8000 g에서 20 min 원심분리하여 회수 한 배양여액을 70% ammonium sulphate로 포화 시켜 원심분리하여 효소침전물 회수하였다. 효소침전물을 멸균수를 이용하여 12 h 투석한 후, 투석액을 동결건조 시켜 농축한 조효소액을 FAME 생성을 위한 에스테르전환반응(transesterification)과 고정화효소를 제조하기 위한 lipase로 사용하였다.

Lipase 고정화

효소 고정화 방법은 분리균으로 부터 얻어진 조효소액과 Novozymes lipase를 효소로 이용하여 Yu 등(2006)이

보고한 cross-linking법을 일부 변형하여 사용하였다. Lipase와 결합할 담체로는 Silica-gel(Merck, Germany)을 사용하였으며, 담체의 불순물들을 제거하기 위하여 Kim 등(2005)의 방법에 따라 Silica-gel을 35%(w/v) 과산화수소 용액에 20°C, 150 rpm에서 2시간 동안 반응시켜 전처리하였다. Silica-gel 표면에 amino silane group을 형성시키는 silanization 반응은 전처리한 담체를 silanization agent인 10% (w/v) (3-Aminopropyl)triethoxysilane(3-APTES, Sigma-Aldrich, USA)와 50°C, 150 rpm에서 2시간 동안 반응시켜 증류수로 세척한 후 Dry Oven에 2시간 동안 건조시켰다. Glutaraldehyde는 Silica-gel과 lipase를 연결 시켜주는 Cross-linking agent로, 이는 공유결합을 통해 lipase 내의 amino group과 Schiff base를 형성하여 최종적으로 lipase를 담체에 결합시키는 역할을 한다. 고정화를 위해서 2% (v/v) Glutaraldehyde(Sigma-Aldrich, USA)와 silanization 과정을 거친 Silica-gel을 0.1 M Phosphate Buffer(pH7)에 혼합하여 20°C, 150 rpm으로 2시간 동안 반응시켜 증류수로 세척, 여과하여 얻어진 lipase 고정화 효소를 냉장보관 하면서 바이오 디젤 효소촉매 반응에 사용 하였다.

Lipase Activity 측정 및 Lowry method

Lipase activity 측정은 Winkler & Stuckmann method (1979)를 이용하였다. 이는 기질인 p-nitrophenylpalmitate (pNPP)로 부터 효소작용에 의해 분해, 생성되는 p-nitrophenol을 정량하는 방법이다. 즉 30 mg의 pNPP(Sigma-Aldrich, USA)를 10 ml isopropanol(Sigma-Aldrich, USA)에 녹인 기질 A와 0.8 mg Triton X-100(Samchun, Korea)과 0.1 mg Gum arabicum(SigmaAldrich, USA)을 100 ml 0.1M TrisHCl buffer(pH8)에 녹인 기질 B를 1:9 비율로 혼합하여 기질을 제조하였다. 기질용액에 1% (w/v) lipase 효소액 0.1 ml를 첨가하여 40°C, 20 min 반응 시키고 1M Na_2CO_3을 넣어 반응을 중지시킨 후, 분광광도계를 이용하여 405 nm에서 흡광도(O.D)를 측정하였다. 효소활성도 1 unit는 분당 생성된 1 μmol p-nitrophenol로 정의하였다. 단백질 정량은 Lowry 등(1951)의 방법을 사용하여 고정화전의 free lipase 와 고정화 후 여액의 단백질 함량을 측정하였고, 표준물질로 bovine serum albumin (Sigma-Aldrich, USA)을 사용하였다.

Biodiesel 제조 및 분석

바이오디젤(FAME)을 제조하기 위해 Canola oil을 사용하여 화학적 촉매법, 효소적 촉매법 그리고 고정화 효소 촉매 방법을 이용하여 트랜스에스터화 반응에 바이오디젤을 각각 제조하였다. 고정화 효소의 경우 4회 반복 사용해서 FAME을 제조한 후, 각 횟수별 회수율을 비교하였다. Canola oil의 중성지방으로 부터 전환된 FAME의 분석은 6890 series GC system(Agilent Technologies, CA, USA)를 사용하였고, 분석 칼럼은 DB-5 column(30 m ×0.320 mm I.d., particle size 0.25 μm, Agilent Technologies, USA), 이동가스(carrier gas)는 질소를 사용하여 불꽃이온화 검출기 (Flame Ionization Detector)로 분석하였다. 분석조건은 injection 온도는 250°C, Detector 온도는 250°C로 설정하였고 오븐 온도는 140°C에서 1분간 유지하고 5°C/min의 속도로 최종 250°C에 도달해서 10분간 유지시켜 분석하였으며, 이 때 FAME 표준물질을 Heptane을 이용하여 200 ppm까지 희석하여 사용하였다.

화학적 촉매, 효소적 및 고정화효소 촉매법

화학적 촉매 방법은 알칼리 촉매인 NaOH 사용법을 선택하였다(Shin, 2004). Oil 시료를 40°C까지 예열 시킨 후, 0.35 g NaOH와 30 ml Methanol 혼합물을 첨가하고 40°C, 15 min간 반응시킨 후, 분획여두(Separate funnel)을 사용하여 층 분리하였다. 지방층인 상층부를 회수하여 실온에서 2000 rpm, 30 min동안 원심분리 하여, 바이오디젤 침전물을 최종적으로 회수하였다..

효소적 촉매 방법은 oil과 methanol의 초기반응 몰 비를 1:1로 하고 12~18 hr 식 단계적으로 총 36~54 hr 동안 methanolysis하는 방법을 선택하였다(Du *et al.*, 2004). 40°C까지 가열한 oil 시료 24 ml와 methanol을 24 ml 혼합 한 후, 0.72 g의 lipase와 2 ml의 증류수를 첨가하여 40°C, 150 rpm에서 12~18 hr 동안 반응시킨다. 반응 후에 같은 방법으로 oil 과 methanol의 몰비가 1:3의 비율까지 추가 반응시킨 후 상등액을 추출하였다. 회수한 상등액을 2000 rpm, 30 min동안 원심분리하여 침전물인 바이오디젤을 회수하였다. 고정화 효소촉매법의 경우 제조한 고정화 효소를 촉매로 이용하여 효소적 촉매 방법과 동일하게 oil 과 methanol의 몰비를 1:3의 비율까지 단계적으로 첨가하여 methanolysis 반응을 수행하였고, 사용한 고정화 효소를 동일방법으로 4회 반복 사용해서 FAME을 제조한 후, 각 횟수별 lipase 효소의 잔존 활성과 FAME 회수율을 비교하였다.

Free lipase를 이용한 interesterification 반응

유지의 triacylglycerol(TAG) 구성 지방산을 재배열 시키는 Free lipase의 interesterification 반응 활성여부를 확인하기 위하여 기질인 Carnola oil, palmitic ethyl ester (16:0)와 stearic ethyl ester (18:0)를 1:1:1의 몰 비율로 혼합한 후, 분리균으로 부터 얻어진 조효소액과 Novozymes lipase를 총 기질무게의 10% 수준으로 첨가하여 항온수조에서 46°C, 200 rpm 조건에서 interesterification 반응을 수행하였다. 반응물의 TAG 조성을 알아보기 위하여 2, 8, 12, 18, 24시간별로 반응물을 취하여 HPLC (Waters, USA)를 이용하여 포화지방산과 불포화지방산 함량을 분석하였다. 분석에 사용된 컬럼은 Nova-pak C18 column (4 μm, 150×3.9 mm I.D., Waters, Milford, Ireland), 이동상은 유

속 1 mL min^{-1}의 속도로 용매 A (acetonitrile)와 용매 B (isopropanol:hexane=2:1, v/v)의 부피비 8:2의 비율로 시작하여 서서히 변화시키는 기울기 용리로 흘려주었고, ACQUITY UPLC evaporative light scattering detector (Waters, USA)를 이용하여 검출하였다. TAG의 조성은 retention time (RT)와 partition number (PN) 사이의 관계식을 통하여 분석하였으며 계산식 중 CN은 TG의 전체 탄소수를 의미하며 ND는 총 이중결합의 수를 뜻한다 (Park *et al*, 2014).

Partition number (PN) =
Total number of carbons (CN) − 2
× total number of double bonds (ND)

통계처리

통계처리는 SAS (statistical analysis system, version 9.2)를 이용하여 Duncan's multiple range test를 진행하였으며 각 그룹간의 유의적인 차이를 $p<0.05$ 수준에서 검증하였다.

결과 및 고찰

Lipase 생산균의 분리 및 lipase 조효소 제조

충남 부여군 석성면 양송이 재배농가의 양송이 배지로부터 기질인 Tributyrin과 phenol red가 함유된 고체배지상에 투명환을 형성하는 lipase 생산균을 분리하였다. 16S rDNA 의 유전자의 염기서열분석 결과 분리균은 그램음성균 *Burkholderia cepacia* ATCC15416^T 와 99.6% 상동성을 보였다(Fig. 1). 분리균으로 부터 lipase 조효소를 제조하기 위하여 Tributyrin 이 함유된 Minimal salt 배지에서 3일간 배양한 배양여액을 70% 황산암모늄 으로 포화시켜 회수한 침전물을 조효소액으로 사용하였다. 조효소의 단백질함량과 효소활성을 측정한 결과, lipase 활성은 22.3 unit mL^{-1} , 단백질 함량은 22.6 mg protein 이었고, 시판효소 Novozyme lipase 활성은 52.4 unit mL^{-1} , 단백질 함량은 14.3 mg protein 으로 계산되었다.

Lipase 고정화

Cross-linking method를 이용하여 제조한 고정화 효소의 고정화 전 free lipase의 단백질 함량과 lipase activity 및 고정화 후 담체(silica-gel)에 흡착된 단백질 함량과 g silica-gel 당 흡착된 단백질 함량을 조효소와 Novozyme lipase를 비교하였다(Table 1). 고정화에 사용한 free lipase의 단백질 함량과 lipase activity는 분리균의 조효소가 3.15 mg과 11.9 unit, Novozyme 효소가 1.76 mg과 10.03 unit 이었다. Silica-gel에 고정화된 단백질 함량은 조효소는 67%(2.11 mg/g silica gel), Novozyme 78% (1.37 mg/g silica gel)로 Mustranta 등(1993)이 보고한 고정화 support로 Amberite resin, silica gel 및 polyethylene 등을 이용하였을 경우보다 g당 지지체에 고정화된 단백질 함량(mg)이 높았다. 또한 비록 고정화에 사용된 조효소의 단백질함량이 높았으나 조효소보다 정제효소인 Novozyme 이 상대적으로 높은 고정화율을 보였는데, 이결과는 조효소의 단백질 순도가 정제효소인 Novozyme 보다 낮기 때문인 것으로 사료된다. 고정화 후 지지체의 lipase 잔존활성은 7.98-9.37 unit로 공급된 free lipase activity의 65-72%에 해당하는 수율을 보였으나, Silica-gel에 고정화된 단백질함량에 대한 상대활성은 97% 이상의 높은 활성을

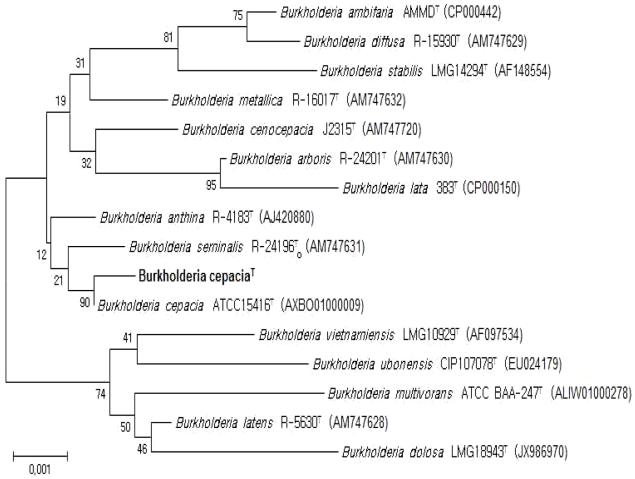

Fig. 1. Phylogenetic tree based on 16S rDNA gene sequences of lipase producing bacteria, showing the position of strain *Burkholderia cepacis* ATCC15416^T with respect to related species. The scale bar indicates 0.005 substitutions per nucleotide position and accession numbers are given in parenthesis.

Table 1. Comparison of protein content and lipase activity on free and immobilized lipases

	Free lipase		Immobilized lipase		
	Protein contents[a] (mg)	Acivity (unit)	Bounding protein[b] (%)	mg protein/g silica gel	Activity/g silica gel
Crude enzyme	3.15±0.12	11.92±0.14	67.32±0.83	2.11±0.07	7.28±0.13(61)
Novozyme	1.76±0.11	10.03±0.15	78.57±0.75	1.37±0.04	8.73±0.16(72)

[a]Protein content supplemented to 1 g Silica-gel
[b]Total protein content bound to 1 g Silica-gel
All values are mean SD(n=3)

Table 2. FAME contents obtained from Canola oil by transesterification with the different kinds of catalysis

FAMEs	Catalysis(mg/L)		
	NaOH	Lipase[a]	Im-Lipase[b]
C16:0	116.64±0.12	66.27±0.13	60.56±0.14
C18:0	83.51±0.14	154.35±0.14	135.68±0.15
C18:1	413.35±0.16	328.25±0.15	303.27±0.12
C18:2	123.55±0.15	99.31±0.12	74.42±0.11
C18:3	44.79±0.13	33.57±0.13	24.53±0.13
Total SFAME	200.15	220.62	196.24
Total UFAME	581.69	461.13	402.22

[a]Free crude lipase obtained from *Burkholderia cepacia*.
[b]Immobilized crude lipase.
SFAME: saturated fatty acid methyl ester, UFAME: unsaturated fatty acid methyl ester

Table 3. FAME composition(%) obtained from Canola oil by transesterification of crude lipase catalysis at the different time reactions

FAMEs (area %)	Free lipase[a]				Im-Lipase[b]			
	2 h	8 h	12 h	18 h	2 h	8 h	12 h	18 h
C16:0	5.9	8.3	9.6	9.7	6.4	8.9	10.4	10.8
C18:0	4.3	17.9	22.7	23.1	7.2	18.7	22.9	23.9
C18:1	61.9	52.8	49.2	48.8	60.5	54.7	50.3	49.7
C18:2	19.7	15.2	13.8	13.6	18.2	15.5	12.3	11.7
C18:3	8.2	5.8	4.7	4.8	7.7	5.2	4.1	3.9
ΣSFA	10.2	26.2	32.3	32.8	13.6	27.6	33.3	34.7
ΣUFA	89.8	73.8	67.7	67.2	86.4	72.4	66.7	65.3

[a]Producing in different kinds of Catalysis.
[b]Immobilized lipase. ΣSFA: total saturated fatty acid methyl ester, ΣUFA: total unsaturated fatty acid methyl este

보임으로서 고정화 후에도 lipase activity가 안정하게 유지되는 것으로 나타났다.

촉매에 따른 바이오디젤 전환

촉매의 종류에 따라 중성지방(triacylglyceride)이 알코올(methanol)과 반응하여 transesterification에 의해 FAME로 전환되는 수율을 조사하였다. 화학적 촉매로는 NaOH, 효소적 촉매로는 free crude lipase(CL), 그리고 Immobilized crude lipase(IL) 효소를 이용하여 기질인 Canola oil로 부터 12시간 Methanolysis 반응에 의해 전환된 바이오디젤의 종류와 전환율을 비교한 결과, 생성된 총 FAME 함량은 NaOH 781 mg L^{-1}, free lipase 681 mg L^{-1}, 고정화 lipase 598 mg L^{-1}순으로 높았으나, 총 saturated FAME 함량은 효소 촉매 방법이 알칼리 촉매법보다 상대적으로 다소 높게 나타났다(Table 2). 지방산 조성별 FAME 함량은 unsaturated FAME인 oleic acid(C18:1)가 약 50%로 가장 높았으며, saturated FAME인 stearic acid (C18:0)가 22% 정도의 높은 수준이었다. 특히 C18:0의 생성율은 10% 수준의 알칼리처리법 보다 효소적 방법이 27% 정도 높게 나타났으며, palmitic acid (C16:0)는 알칼리법이 9% 수준으로 효소법보다 오히려 5% 높았다. 본 연구에 기질로 사용된 카놀라유의 주요 지방산 함량은 불포화지방산은 oleic acid (C18:1)가 57.7%로 가장 높은 조성을 나타냈으며, linoleic acid (C18:2) 21.5%, linolenic acid (C18:3) 10.3%의 순이었고, 포화지방산인 palmitic acid (C16:0)와 stearic acid (C18:0)는 각각 5.8와 2.4%이었다. 따라서 Canola oil의 C16:0의 함량이 C18:0 보다 2배 정도 높은데도 불구하고, 효소촉매법에 의해 생성된 FAME량은 C16:0 보다 C18:0이 4배 이상 높게 나타난 결과는 Park 등(2014)의 보고처럼 촉매반응과정에서 lipase 효소에 의해 불포화지방산이 포화지방산으로 전환되는 interesterification 반응이 동시에 일어난 결과로 여겨진다. 결과적으로 고정화 효소의 경우 알칼리법 보다 24%, free lipase 보다 13% 낮은 FAME 생성 수율을 보임으로서, Cross-linking method에 의해 제조된 고정화 효소가 바이오디젤 생산을 위한 촉매로서 가능할 것으로 사료된다.

효소촉매 반응시간에 따른 바이오디젤 전환

효소촉매 반응시간에 따른 FAME의 조성 및 함량을 조사하기 위하여 분리균에서 정제한 free crude lipase(FCL)과 Immobilized crude lipase(ICL)을 이용하여 Canola oil의 포화지방산(C16:0, C18:0)과 불포화지방산(C18:1, C18:2, C18:3)으로부터 전환된 FAME의 수율(area %)을 조사하였다. 반응시간이 증가함에 따라 FCL과 ICL 모두 불포화지방산 FAME의 조성비가 감소하고 포화지방산 FAME의 조성비는 증가하여 반응 12 h 후 총 불포화지방산은 약 20% 감소하였고, 반면에 총 포화지방산 함량은 비슷한 수준으로 증가하였다 (Table 3). 이중 가장 많은 함량을 차지하고 있는 C18:1은 반응초기에 비해서 12% 감소하였고, C18:O은 4-5배 증가하는 경향을 보임으로서, 상기 반응처럼, FCL 과 ICL 효소에 의해 transesterification 과 interesterification 반응이 동시에 일어날 수 있음을 확인 할 수 있었다.

Lipase를 이용한 interesterification 반응물의 지방산 및 TAG 조성

대부분의 lipase는 가수분해반응 활성과 에스테르반응 활성을 동시에 가지고 있어 기질인 TAG를 구성하는 지방산, 특히 불포화지방산을 interesterification반응에 의해 포화지방산으로 재배열시키는 것으로 알려져 있다(Lee *et al,* 2005). Free crude lipase(FCL)와 free Novozyme lipase (FNL)에 의한 TAG를 조성하는 지방산들의 interesterification 반응 여부를 확인하기 위하여 Canola oil를 이용한 lipase 효소의 interesterification 반응 시간별 TAG를 구성하는 지

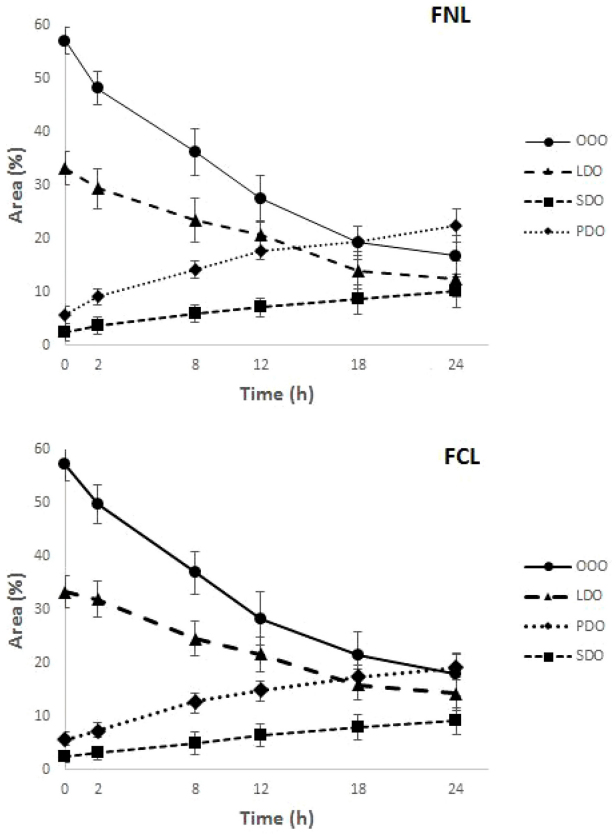

Fig. 2. Change of triacylglycerol (TAG) species obtained from interesterification reaction with free lipases (TAG species: OOO=oleic acid, LDO=linoleic acid, PDO=palmitic acid, SDO=stearic acid).
FNL: free novozyme lipase, FCL: free crude lipase

방산 조성의 변화를 HPLC를 이용하여 분석하였다(Fig. 2). 카놀라유의 TAG 조성은 triolein(OOO)이 57.23 area%, 1-linolenoly-2,3-dioleolyglycerol(LDO)이 33.46 area%, 1-palmitiyl-2,3-dioleolyglycerol (PDO), 5.72 area%, 그리고 1-stearoyl-2,3-dioleolyglycerol (SDO) 2.53 area% 정도 이었다. 효소와의 반응 시간이 길어질수록 Carnola oil의 주요 TAG 조성인 OOO와 LDO의 함량이 감소하여, 반응 24시간 후 OOO는 16.72 area%, LDO는 12.68 area% 수준으로 크게 감소 하였다. 반면, 포화 지방산인 palmitic acid와 stearic acid를 함유한 TAG 조성물들의 함량은 증가하는 경향을 보여 PDO의 함량은 22.95 area%, SDO도 10.64 area%로 증가하였으며, 두 효소의 interesterification 반응 수율은 FNL 효소가 FCL 효소보다 다소 높게 나타났다. 이상의 결과를 통해 FCL과 FNL 효소는 TAG를 지방산으로 가수분해하여 FAME으로 전환시키는 transesterification 활성과 TAG의 지방산 조성, 특히 불포화지방산을 포화지방산으로 변환시키는 Interesterification 반응 활성을 동시에 가지고 있다는 것을 뒷받침 하고 있다.

Table 4. Comparison of FAME content and residual activity(%) according to reaction number of transesterification using immobilized lipases

Reaction number	Residual activity(%)		Total FAME(mg/L)[a]	
	IM-CL[b]	IM-NL[c]	IM-CL[b]	IM-NL[c]
1st	100	100	60.95±0.13	68.52±0.14
2nd	89.3	94.5	52.37±0.13	64.15±0.13
3rd	78.5	87.7	56.72±0.14	59.18±0.15
4th	66.4	79.2	39.22±0.15	53.41±0.14

All values are mean SD(n=2)
[a]total FAME contents of C16:0, C18:0, C18:1, C18:2, C18:3
[b]immobilized crude lipases, [c]immobilized novozyme lipases

Immobilized lipase의 재사용성(reusability)

고정화 lipase 효소의 반복 사용 시 효소 잔여활성과 FAME 생성 수율을 비교하기 위하여 immobilized crude lipase(ICL) 과 immobilized novozyme lipase(INL)를 4회 반복 12시간 transesterification 반응시킨 후, 잔여활성과 총 FAME 함량을 조사하였다(Table 4). ICL 과 INL의 잔여활성은 반복회수가 증가함에 따라 서서히 감소하여 4회 반복 후, 각각 1 회차의 수율에 비해 34% 와 21%까지 감소함으로서 90%이상의 활성과 수율을 보인 기왕의 결과와는 차이가 있었으며, 잔여활성은 효소의 순도가 높을수록 활성이 높게 유지되었다.

적 요

양송이 수확후 배지로부터 lipase 생산균을 분리하여 16S rDNA 유전자 분석을 통해 동정한 결과, *Burkholderia cepacia* ATCC와 99.8% 상동성을 나타냈다. 분리균 *B. cepacia* 배양여액 중에 함유된 효소단백질을 70% 황산암모늄으로 침전시켜 crude lipase를 회수하였다. 고정화 효소를 제조하기 위하여 crude lipase(CL)과 Novozyme lipase(NL)을 cross-linking 법에 의해 Silane화된 Silica-gel에 고정화 시킨 결과, immobilized CL(ICL)은 61%, immobilized NL(INL)은 72%의 잔존활성을 유지하였다. 중성지방 Canola oil을 알칼리(NaOH) 촉매와 효소(CL 및 ICL) 촉매를 이용하여 지방산(fatty acid)으로 분해한 후, methanolysis에 의한 에스터전이반응(trans-esterification)을 통해 지방산으로부터 전환된 바이오디젤(fatty acid methyl ester, FAME)의 종류와 수율을 비교 하였다. 생성된 총 FAME 함량은 NaOH 781 mg L^{-1}, free lipase 681 mg L^{-1}, 고정화 lipase 598 mg L^{-1}순으로 높았으며, 지방산 조성별 FAME 함량은 linoleic acid(C18:1)가 약 50%로 가장 높았으며, stearic acid(C18:0)가 22%정도의 높은 수준이었다. 또한 반응시간이 증가함에 따라 CL 과 ICL 모두 불포화지방산 FAME의 조성비는 감소하고, 상대적으로 포화지방산 FAME의 조성비는 증가하는 경향을 보여

lipase 효소가 transesterification 활성과 interesterification 활성을 동시에 가지는 것으로 여겨진다. 고정화효소의 잔여활성은 반복회수가 증가함에 따라 서서히 감소하여 4히 반복 후, 초기 활성도에 비해 ICL은 34% 와 INL은 21% 까지 감소하였다.

감사의 글

본 연구는 농촌진흥청 공동연구과제(PJ009961012014)의 지원에 의하여 수행된 결과입니다.

References

Akoh CC, Chang SW, Lee GC, Shaw JF. 2007. Enzymatic approach to biodiesel production. *J Argic Food Chem.* 55: 8995-9005.

Bajaj A, Lohan P, Jha PN, Mehrotra R. 2010. Biodiesel production through lipase catalyzed transesterification: an overview. *J Mol Catal B Enzym.* 62: 9-14.

Charpe TW, Rathod VK. 2010. Biodiesel production using waste frying oil. *Waste Manag.* 31: 8590.

Dizge N, Keskinler AB, Tanriseven A. 2009. Biodiesel production from canola oil by using lipase immobilized onto hydrophobic microporous styrenedivinylbenzene copolymer. *Biochem Eng J.* 44: 220-225.

Jaeger KE, Eggert T. 2002. Lipases for biotechnology. *Curr Opin Biotechnol.* 13: 390-397.

Kharrat N, Ali YB, Marzouk S, Gargouri TY, Karra Chaabouni M. 2011. Immobilization of *Rhizopus oryzae* lipase on silica aerogels by adsorption: Comparison with the free enzyme. *Process Biochem.* 46: 1083-1089.

Kim SW, Lee DH, Yeo JM, Lee JH, Choi MS, Jeon SW. 2005. Biodiesel production from waste oil using Immobilization of lipase. [in Korean]

Knothe G, Steidley KR. 2005. Kinematic viscosity of biodiesel fuel components and related compounds. Influence of compound structure and comparison to petrodiesel fuel components. *Fuel.* 84(9): 1059-1065.

Lee KT, Foglia TA, Lee JH. 2005. Low-calorie fat substitutes: synthesis and analysis. Vol. 16, pp. 1-19. In: Handbook of Industrial Biocatalysis. Hou CT (ed). CRC Press, Boca Raton, FL, USA.

Li NW, Zong MH, Wu H. 2009. Highly efficient transformation of waste oil to biodiesel by immobilized llipase from *Penicillium expansum*. *Process Biochem.* 44: 685-688.

Lowry OH, Rosenbrough NJ, Farr AL, Randall RJ. 1951. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem.* 193: 265-275.

Meher LC, Vidya Sagar D, Naik SN. 2006. Technical aspects of biodiesel production by transesterificationa review. *Renewable and sustainable energy reviews.* 10(3): 248-268.

Mustranta A, Forssell P, Poutanen K. 1993. Applications of immobilized lipases to transesterification and esterification reactions in non-aqueous system. *Enzyme Microb Tech.* 15: 133-139.

Parawira W. 2009. Biotechnological production of biodiesel fuel using biocatalyzed transesterification: A review. *Crit Rev Biotechnol.* 29: 82-93.

Park CH, Yeo JM, Lee DH, Kim SW. 2004. Lipase immobilization using cross linking method for esterification of oil to biodiesel. Theories and Applications of Chem. Eng. 10(2): 1542-1545.

Park SR and Lee KT. 2014. Immobilization of lipases on Amberlite and their interesterification reaction characteristics. *Korean J Food Sci Technol.*. 46: 315-22.

Shimada Y, Watanabe Y, Sugihara A, Tominaga Y. 2002. Enzymatic alcoholysis for biodiesel fuel production and application of the reaction to oil processing. *J Mol Catal B Enzym.* 17: 133-142.

Singh R, Gupta N, Goswami VK, Gupta R. 2006. A simple activity staining protocol for lipases and esterases. *Appl Microbiol Biotechnol.* 70: 679-682.

Tripathia, R., J. Singha, R. K. Bhartia, I. S. Thakur. 2014. Isolation, purification and characterization of lipase from *Microbacterium* sp. and its application in biodiesel production. *Energy Procedia.* 54 : 518-529.

Winkler UK, Stuckmann MJ. 1979. Glycogen, hyaluronate and some other polysaccharides greatly enhance the formation of exolipase by *Serratua marcescens*. *Bacteriol.* 138(3): 663-670.

Ye P, Jiang J, Xu ZK. 2007. Adsorption and activity of lipase from *Candida rugosa* on the chitosan-modified poly (acrylonitrile-comaleic acid) membrane surface. *Colloid Surface B.* 60: 62-67.

Yoo HY, Simkhada JR, Cho SS, Park DH, Kim SW, Seong CN, Yoo JC. 2011. A novel alkaine lipase from *Ralstonia* with potential application in biodiesel production. *Bioresour Technol.* 102: 6104-6111.

Yoon SA, Han JY, Kim HK. 2011. Production of biodiesel using immobilized lipase from *Proteus vulgaris*. *Korean J Microbiol Biotechnol.* 39(3): 238-244.

Yu HW, Chen H, Wang X, Yang YY, Ching CB. 2006. Cross-linked enzyme aggregates (CLEAs) with controlled particles: Application to *Candida rugosa* lipase. *J Mol Catal B Enzym.* 43: 124-127.