

발간등록번호

11-1543000-000376-01

## 고정화 lipase를 이용한 저트랜스지방 생산기술 개발

(Development of an immobilized lipase system for lowering the production of trans fats in industrial processing)

(주)누리바이오텍

농림축산식품부

# 제 출 문

농림축산식품부 장관 귀하

이 보고서를 “고정화 lipase를 이용한 저트랜스지방 생산기술 개발에 관한 연구” 과제(세부과제 “ 고정화 lipase를 이용한 저트랜스지방 생산기술 개발에 관한 연구”)의 보고서로 제출합니다.

2014 년 3월 5일

주관연구기관명 : (주)누리바이오텍  
주관연구책임자 : 최 상 용  
세부연구책임자 : 최 상 용  
연 구 원 : 권 오 범  
연 구 원 : 문 광 수  
연 구 원 : 서 성 원  
연 구 원 : 장 현 미  
위탁연구기관명 : 건국대학교  
위탁연구책임자 : 백 현 동  
연 구 원 : 윤 현 주  
연 구 원 : 한 경 준

# 요 약 문

## I. 제 목

고정화 lipase를 이용한 저트랜스지방 생산기술 개발

## II. 연구개발의 목적 및 필요성

트랜스지방산(trans fatty acid)이란 트랜스형태(trans form)의 이중결합을 가지고 있는 지방산으로서, 좀 더 정확히 말하면 독립형 이중결합(isolated double bond)을 갖고 있는 지방산의 이중결합이 적어도 하나 이상의 트랜스 형을 가지고 있는 지방산을 말한다. 자연계의 지방산은 일반적으로 시스형(cis) 이중결합이며 이중결합이 2개 이상인 경우 비공액형인데 공액형 지방산인 경우 CLA(conjugated linoleic acid)가 되며 이는 트랜스지방에서 제외된다.

일반적인 가공식품에서 발견되는 트랜스지방은 식물성 기름에 수소첨가를 통하여 제조되는 부분경화유(partially hydrogenated oil)로부터 유래된다. 물론 자연계에서도 낙농식품에서 발견되나 극히 낮은 수준이다. 가공식품에서의 트랜스지방산의 함량을 감소시키기 위하여서는 기존의 부분경화유를 원료로 사용하는 가공식품들에 꾸준히 사용되어진 고-트랜스 유지원료(즉 부분경화유)를 대체할 수 있는 유지의 대량생산 방법의 개발이 필요한 실정이다.

근래에 들어 식품용 경화유 제조시 화학법 대신 고정화 lipase를 사용하여 효소공법에 의해 트랜스지방이 적은 제품이 널리 보급되어지고 있다. 국내의 경우 담체제조 기술이 초기단계로 해외 제품과의 수준차이가 있는 것이 현실이다. 국내에서는 주로 NOVO나 DSM사의 고정화된 lipase를 고가로 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

본 연구에서는 30~40nm의 silica 담체를 제조하는 기술을 개발하여 lipase를 고정화시킴으로써 100회 이상 경제적으로 사용할 수 있는 기술을 개발하고자 하였으며 개발시 식용유지산업에 크게 기여할 수 있을 것이라 판단된다.

## III. 연구개발 내용 및 범위

Nano silica 담체 제조에서 1차적인 silica hydrogel의 형성시 적정 pH는 2.0 부근이 적합하였으며 gel 형성시 온도가 낮을수록 gel이 천천히 형성되어 10℃ 이하에서 균일한 세공의 분포를 나타내었다. 1차 형성된 gel의 염을 세척하기 위해서는 60시간 정도 천천히 세척하여 pH 9.0 부근까지 세척하는 것이 좋았으며 이때의 BET표면적은 800~900m<sup>2</sup>/g 이었으며 pore size는 10nm 전후이다.

1차적으로 중합된 silica gel은 건조 후 180℃(압력 8~9kg/cm<sup>2</sup>)에서 0.5~3hr 유지하면서 수열처리(thermal treatment)를 거쳐 30~40nm의 pore size를 가진 silica 담체를 제조할 수 있었다. 소수성 butyl기를 가진 N-(n-butyl)-3-aminopropyl trimethoxy silane 부착시 농도는 5% 정도이고 pH 2.0~3.0에서 부착하는 것이 적당하였다. Lipase의 사용량은 담체무게 대비 1:1로 등전점 부근인 pH 4.5에서 고정시키는 경우 고정화수율은 85.4%로 양호한 결과를 나타내었다.

Lipase 고정화시 반응조건은 20~30°C에서 5~15시간이 적당하였으며 고정화 후 lipase의 활성 보호를 위해 0.5~1% 정도의 polyethylene imine을 사용하는 것이 좋았다. 고정화된 lipase의 tributyrin 분해활성은 NOVO사 lipozyme RMIM이 496u/g이며 NRB-RMIM은 618u/g으로 본 연구를 통해 개발한 lipase가 높은 활성을 나타내었다.

극도경화유(SSS)와 대두유를 1:1로 혼합하여 고정화 lipase를 2% 첨가하여 tributyrin의 전환율을 측정한 결과 20시간 반응 후 96.93% 이상 전환되었으며 20회 반복반응을 시키며 전환율을 측정한 결과 20회 반응 후 NOVO-RMIM은 93.37%, NRB-RMIM은 93.52%가 전환되는 결과를 나타내었다. 이러한 결과로 볼 때 본 연구를 통하여 개발한 NRB-RMIM의 경우 100회 이상 사용할 수 있다고 예상되며 NOVO-RMIM과 비교시 경쟁력이 있다고 판단된다.

#### IV. 연구개발결과

본 연구를 통하여 30~40nm의 pore size를 갖는 silica 담체를 개발하였으며 소수성 butyl silane을 functional기로 결합시켜 고정화시킴으로써 국내에서 수입에 의존하여 사용하고 있는 NOVO사나 DSM사의 고정화 lipase에 비하여 동등이상의 활성과 내구성을 가진 제품을 개발할 수 있었다.

#### V. 연구성과 및 성과활용 계획

최근 연구되고 있는 저트랜스지방 제조공법 중, 산업화의 가능성이 가장 높게 가치화 된 부분은 효소적 에스테르 교환반응에 기초를 두고 있다. 즉 트랜스지방이 없는 유지들을 기질로 사용하고 lipase를 효소로 활용하여 글리세롤에 붙어있는 1번, 3번 지방산의 위치를 서로 교환함으로써 원하는 물성을 지닌 트리아실글리세롤(triacylglycerol)을 제조하는 것이다. 이렇게 제조된 트리아실글리세롤은 트랜스지방이 없거나 기준 이하로 존재하는 무-트랜스유지가 된다.

산업체가 요구하는 무트랜스유지를 제조하기 위해서는 연속식으로 생산되는 대용량의 효소적 에스테르 교환반응의 구축이 필수적 요건이다. 생산된 유지의 트랜스지방 함유 여부 및 적정한 물성을 변화를 통하여 튀김용 쇼트닝, 제과, 제빵 등에 적합한 제품을 개발할 수 있으며 식품용 외에도 유지를 사용하는 계면활성제 개발 분야에도 적용이 가능하다. 또한 개발된 효소고정화 기술을 활용하여 CAL-B(*Candida antarctica* lipase-B)유래의 lipase를 고정화함으로써 bio-diesel 및 제약 산업과 정밀화학산업의 chiral 기능성을 가진 원료 생산에 이용될 수 있다고 판단된다.

# SUMMARY

## I. Title

Development of an immobilized lipase system for lowering the production of trans fats in industrial processing

## II. Background

Trans fats are fatty acids that contain one or more double bonds in the trans configuration. In their natural form, fatty acids usually contain a double bond in the cis configuration. When two or more double bonds are present in a fatty acid, they are usually not conjugated.

Trans fats are produced during the process of partial hydrogenation, in which hydrogen is added to vegetable oils. Trans fats exist naturally in dairy products in extremely low quantities. Food processing methods have been revamped or replaced, in order to reduce the content of trans fatty acids in various processed foods.

In recent years, the use of immobilized lipases as biocatalysts instead of chemical catalysts is gaining importance for the production of hydrogenated oils in the food industry. Until recently, immobilized lipases had to be imported from foreign companies like NOVO or DSM, which rendered the entire process very expensive.

In this study, we have developed the technology for manufacturing immobilized lipases on a silica substrate of 30 to 40 nm, which can significantly contribute to the edible oil processing industry.

## III. Research scope

Primary silica hydrogel was manufactured from a nanosilica substrate at a pH close to 2.0, which allowed the gel to form slowly as the temperature was lowered, resulting in a uniform pore distribution at temperatures below 10 °C. The purification of salts of the primary gel was carried out slowly over 60 h, at pH 9.0, during which the specific surface area of the gel was between 800 and 900 m<sup>2</sup>/g, and the pore size was around 10 nm.

Once the polymerized silica gel was dry, the silica substrate with a pore size of 30 to 40 nm was manufactured using a thermal treatment process at 180 °C and a pressure between 8 and 9 kg/cm<sup>2</sup> for 0.5 to 3 h. The attachment of the hydrophobic butyl groups

with N-(n-butyl)-3-aminopropyltrimethoxysilane at 5% was carried out at a pH between 2.0 and 3.0. The ratio of the lipase to substrate was fixed at 1:1 (w/w); at pH 4.5, which is close to the isoelectric point, the immobilization of the lipase was achieved with a good yield of 85.4%. Polyethyleneimine (0.5 to 1 %) was used for the protection of the immobilized lipase activity at between 20 and 30 °C, for 5 to 15 h.

The tributyrin hydrolytic activity of the immobilized lipase NOVO lipozyme RMIM was 496 U/g, whereas that of the in-house-developed lipase (NRBIM) was 618 U/g. Therefore, the NRBIM lipase showed a higher activity than the commercial one.

The conversion of tributyrin was measured after 20 h by adding 2% immobilized lipase to a 1:1 mixture of extremely hydrogenated oils (SSS) and soybean oil, and the conversion rate was 96.93%. After 20 reaction cycles, the conversion rates for NOVO lipozyme RMIM and NRBIM were 93.37% and 93.52%, respectively. In conclusion, NRBIM had higher activity than the NOVO lipozyme RMIM, and could be re-used at least for 100 times. Therefore, the NRBIM is competitive with the NOVO lipozyme RMIM.

#### IV. Results

In this study, a silica carrier with a pore size between 30 and 40 nm was developed by combining hydrophobic butyl silane, the activity and durability of the in-house-immobilized lipase were equal to or higher than those of the lipases obtained from companies like NOVO or DSM.

#### V. Achievements and Future plans

Recent efforts to develop manufacturing techniques for the lowering of trans fats have been most visible in industrial enzymatic transesterification applications. Triacylglycerols, containing no trans fat, were produced by the esterification of fatty acids, which were treated with the lipase, at the 1 and 3 positions of the glycerol backbone. The triacylglycerols produced in our system had either no trans fat or lesser trans fat than those produced by the standard.

One of the essential requirements for enzymatic transesterification in industry is to have a continuous culture of immobilized lipase during the manufacturing process. The immobilized lipase system can be used in the surfactant as well as food industries to develop processes that require a change in properties, e.g., maintenance of the proper shortening used in frying, confectionery, bakery, etc. In addition, this technology can also be used for immobilizing *Candida antarctica* lipase-B for use in bio-diesel, fine chemical, and pharmaceutical industries for the preparation of chiral functional materials.

# CONTENTS

Part 1. Overview of research and development projects .....	10
Chapter 1. The purpose of the research and development .....	10
Chapter 2. The need and range to develop the immobilized lipase technology .....	12
Part 2. The present states of Technology .....	15
and development at Home and Abroad .....	15
Chapter 1. Technology Development Status .....	15
Chapter 2. Market conditions and the direction of industrialization .....	17
1. Overseas production and market situation .....	17
2. Domestic production and market situation .....	17
3. Direction of technology development and industrialization of the expected effects .....	17
Part 3. Information and results of research performed .....	19
Chapter 1. For details and how to develop .....	19
1. Preparation of Nano silica substrate .....	19
2. Butyl groups on Nano silica substrate by silanization .....	26
3. Lipase (Palatase) Review of the immobilization conditions .....	28
4. Immobilized lipase (Palatase) using a low- trans fat component analysis .....	32
5. 500L Pilot scale up conditions using the enzyme immobilized Review .....	33
6. 50L Pilot scale up using the enzyme reactor conditions review .....	34
7. Tristearin reaction according to the amount of change in the number of recycling .....	35
Chapter 2. The results of research .....	36
1. Preparation of Nano silica substrate .....	36
2. Butyl groups on Nano silica substrate by silanization .....	45
3. Immobilization conditions review of Lipase (Palatase) .....	48
4. Lipase (Palatase) Fixation of optimum conditions .....	54
5. Immobilized lipase (Palatase) using a low- trans fat component analysis .....	55
6. 500L Pilot scale up conditions using the immobilized Review .....	58
7. 500L Pilot scale up conditions using the immobilized Review .....	59
8. 50L Pilot Reactor for production .....	59

scale up conditions that trans fats Review	
9. Reaction Tristearin content changes	60
according to the number of recycling	
Part 4. Achievements of Purpose and Contribution for Relative Field	61
Chapter 1. Research objectives and content	61
1. Research objectives	61
2. Annual Research Development Content	61
Chapter 2. Achievement and Contribution to Research Development Goals	62
1. Annual achievement of research and development	62
2. Contribution of for Relative Field	63
Part 5. Achievements of Research Development and utilization plan	68
Chapter 1. Commercialization and industrialization plans	68
1. Commercialization , industrialization and technology Transfer Plan	68
2. Intellectual Property Rights Security Plan	68
3. execution of technique	69
4. The use of additional research and other research plan	69
Part 6. Global Science and Technology Information Collected in	71
the course of research and development	
Part 7. Status of research facilities and equipment	73
Part 8. References	74



# 목 차

제 1 장. 연구개발과제의 개요	10
제 1 절. 연구개발의 목적	10
제 2 절. 고정화 lipase의 기술개발 필요성 및 범위	12
제 2 장. 국내외 기술 현황	15
제 1 절. 기술개발 현황	15
제 2 절. 시장현황 및 산업화방향	17
1. 국외 제품생산 및 시장현황	17
2. 국내 제품생산 및 시장현황	17
3. 개발기술의 산업화방향 및 기대효과	17
제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과	19
제 1 절. 세부개발 내용 및 방법	19
1. Nano silica 담체의 제조	19
2. Nano silica 담체에 silanization을 통한 작용기 부착	26
3. Lipase(Palataase)의 고정화조건 검토	28
4. 고정화된 lipase(Palataase)를 이용한 저트랜스지방의 성분분석	32
5. 500L Pilot를 이용한 효소고정화 scale up 조건검토	33
6. 50L Pilot를 효소반응장치를 이용한 scale up 조건검토	34
7. 반응시 recycling 횟수에 따른 Tristearin의 함량변화	35
제 2 절. 실험결과	36
1. Nano silica 담체의 제조	36
2. Nano silica 담체에 silanization을 통한 작용기 부착	45
3. Lipase(Palataase)의 고정화조건 검토	48
4. Lipase(Palataase)의 고정화시 최적조건	54
5. 고정화된 lipase(Palataase)를 이용한 저트랜스지방의 성분분석	55
6. 500L Pilot를 이용한 고정화 scale up 조건검토	58
7. 500L Pilot scale에서의 고정화수율	59
8. 50L Pilot용 반응기를 이용한 저트랜스지방 생산 scale up 조건검토	59
9. 반응시 recycling 횟수에 따른 Tristearin 함량변화	60
제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도	61
제 1 절. 연구목표 및 내용	61
1. 연구목표	61
2. 연차별 연구개발 내용	61
제 2 절. 연구개발 목표달성도 및 기여도	62

1. 연차별 연구개발의 목표달성도 .....	62
2. 관련 분야에의 기여도 .....	63
제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획 .....	68
제 1 절. 실용화 및 산업화 계획 .....	68
1. 실용화, 산업화 및 기술확산 계획 .....	68
2. 지식재산권 확보 .....	68
3. 기술실시 .....	69
4. 추가연구 및 타 연구에의 활용계획 .....	69
제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보 .....	71
제 7 장. 연구시설 및 장비현황 .....	73
제 8 장. 참고문헌 .....	74

# 제 1 장. 연구개발과제의 개요

## 제 1 절. 연구개발의 목적

화학적 공법에 비하여 효소적 공법(bioconversion technology)은 생체 내에 존재하는 복잡한 다양한 생체물질의 불활성기(unactivated position)에 정확하게 작용하는 생체기능을 이용하여 원료 화학물질을 고부가가치의 산물로 전환시키는 생물공정이다. 이러한 생물전환기술의 핵심은 균주개발, 생체촉매의 고정화, 생체촉매를 사용한 생물전환기술 등인데 국내에서는 지금까지 고정화된 생체촉매를 외국으로부터 직접 고가에 수입하여 사용하거나, 고정화되지 않은 생체촉매 자체를 일부 분야에서 사용하고 있는 실정이다. 나노/바이오 융합 기술을 이용한 생물전환 연구는 국내외의 많은 연구팀에서 연구하고 있으나, 연구결과를 산업 현장에 적용한 예는 많지 않은 것이 현실이다. 특히 30~60 nano (300~600Å) 전후의 생체촉매를 이용하는 촉매의 탐색 및 생물전환에 관련된 기초연구에 대해서는 다수의 연구팀이 연구하고 있으나 이를 상업적으로 적용하기 위한 응용연구는 초기 단계에 있으며 해외와의 수준격차가 있는 것이 현실이다. 또한 이러한 생체촉매를 사용하기 위해 고정화 하는 고정화소재 및 고정화기술은 국내에서는 상업적으로 미비한 상태이다. 이로 인하여 국내에서는 주로 NOVO사나 DSM사의 고정화된 효소를 고가로 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

식품에 적용하기 쉬운 경화유 제조공정은 식물성유지들(대두유, 옥수수 배아유, 카놀라유, 면실유)을 수소첨가에 의하여 경화시키는 공정을 거치게 되고 이로 인해 트랜스지방이 다량 생성되어 지는 것으로 알려져 있다. 유지공업에서 이러한 트랜스지방을 낮추는 방법으로는 일반적으로 경화공정시 전기촉매법이나 초임계용매법, 분획법 등을 많이 사용하고 있다. 근래에 들어서는 유전자 조작을 통하여 대두, 옥수수 등에서 linoleic acid 대신 안전성이 우수한 oleic acid 함량이 많은 품종을 개발하여 사용하고 있다.

현재 가장 많이 시도하는 방법은 에스테르 교환방법으로 transesterification 기능을 가진 lipase를 사용하여 기존의 중성 지질에 결합되어 있는 지방산의 위치를 교환시켜 transform의 지방산이 생성되지 않게 하는 방법이다. 일반적으로는 경화공정시 sodium methoxide를 사용한 전기촉매법이나 초임계용매법, 분획법 등을 많이 사용하고 있다. 이러한 lipase를 경제적으로 사용하기 위해서는 일회용이 아니라 100회 이상 반복적 사용을 위해 다공성을 가진 담체에 고정화시키는 기술이 필요하며 이미 선진국의 NOVO(덴마크), DSM(네덜란드), Roche(독일), BASF(독일), Lonza(독일), Amano(일본)사 등에서 제품화되어 있다. NOVO사 제품의 경우 RMIM(*Rhizomucor miehei* 유래 고정화된 lipase)의 경우 kg당 100만원 정도이며 CAL-B-IM(*Candida antarctica* 유래 고정화된 lipase)의 경우 kg당 200만원 정도로 수입되어 사용되어지나 본 과제를 통하여 국산화에 성공시 가격을 수입가의 10%의 수준인 10~20만원으로 생산할 수 있다.

본 연구에서는 (주)누리바이오텍이 보유한 효소고정화 기술을 이용하여 30~40nm의 pore size를 갖는 nano silica 담체를 개발하고 개발된 담체의 표면에 N-(n-butyl)-3-aminopropyl trimethoxy silane을 사용하여 silanization을 통해 소수성 butyl기를 부착시켜 *Rhizomucor miehei* 유래의 lipase를 고정화 시키고자 하였다.

## 제 2 절. 고정화 lipase의 기술개발 필요성 및 범위

20세기의 물질적 풍요를 주도하던 화학 산업은 원료 화학물질을 다른 물질로 전환하여 부가 가치를 올리는 작은 개념에서 출발하였으나, 오늘날에는 대규모 산업으로 급속히 성장하고 있다. 이러한 화학 산업의 급속한 발전은 전자, 기계, 소재산업을 포함한 모든 산업발전에 획기적으로 기여하였으나 고온, 고압, 유독성 용매에 의한 산업안전문제 및 폐수에 의한 환경오염문제 등의 새로운 문제점을 야기하고 있다. 그러나 효소적 공법(bioconversion technology)은 생체 내에 존재하는 복잡 다양한 생체물질의 불활성기(unactivated position)에 정확하게 작용하는 생체기능을 이용하여 원료 화학물질을 고부가가치의 산물로 전환시키는 생물공정이다. 이러한 생물전환기술의 핵심은 균주개발, 생체촉매의 고정화, 생체촉매를 사용한 생물전환기술 등인데 국내에서는 지금까지 고정화된 생체촉매를 외국으로부터 직접 고가에 수입하여 사용하거나, 고정화되지 않은 생체촉매 자체를 일부 분야에서 사용하고 있는 실정이다. 나노/바이오 융합 기술을 이용한 생물전환 연구는 국내외의 많은 연구팀에서 연구하고 있으나, 연구결과를 산업 현장에 적용한 예는 많지 않은 것이 현실이다. 특히 30~60 nano (300~600Å) 전후의 생체촉매를 이용하는 촉매의 탐색 및 생물전환에 관련된 기초연구에 대해서는 다수의 연구팀이 연구하고 있으나 이를 상업적으로 적용하기 위한 응용연구는 초기 단계에 있으며 해외와의 수준 격차가 있는 것이 현실이다. 또한 이러한 생체촉매를 사용하기 위해 고정화 하는 고정화소재 및 고정화기술은 국내에서는 상업적으로 미비한 상태이다.

Lipase(triacylglycerol ester hydrolase, EC 3.1.1.3)는 일반적으로 oil이나 fats를 분해하여 free fatty acids, diacylglycerol, monoacylglycerol 및 glycerol을 생산하는 촉매로 사용되어지며(1, 2) 반대로 그림 1과 같이 유기용매 상에서 esterification, transesterification (acidolysis, interesterification, alcoholysis), aminolysis, oximolysis 및 thioesterification에 이용되어 진다.(3)

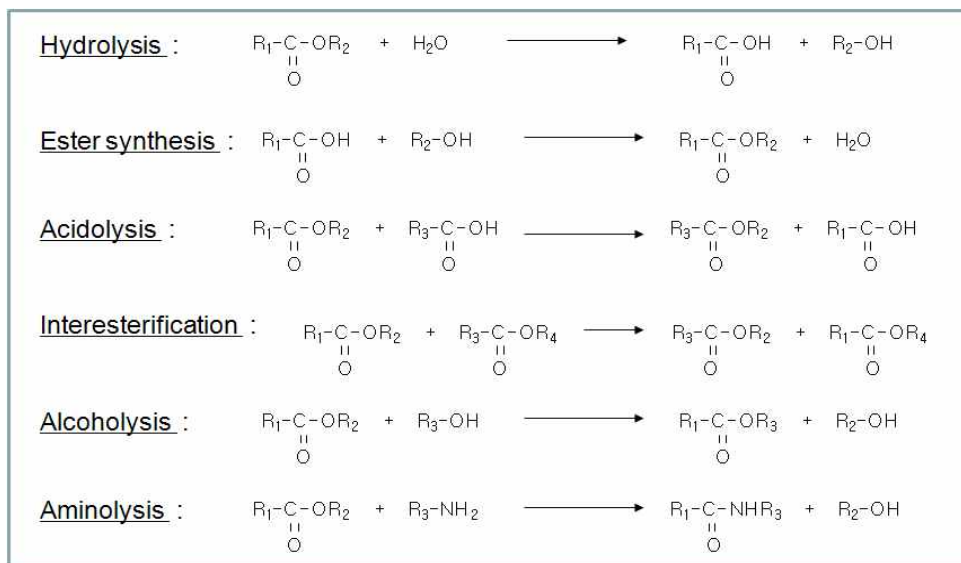


그림 1. Different reactions catalyzed by lipase in aqueous and non-aqueous solutions

화학적 방법의 oil 및 fats의 분해는 주로 가성소다를 사용하여 높은 pH, 높은 온도와 압력이 필요하며 많은 양의 폐수를 발생시키나 microbial lipase를 사용한 생물전환 방법은 표 1에서 보는 바와 같이 낮은 온도, 낮은 pH에서 쉽게 분해를 시킬 수 있는 커다란 장점을 가지고 있다.(4)

표 1. Physical properties of microbial lipase

Source	M.W(KDa)	Substrate	Isoelectric pH	Optimum pH	Optimum temp.(°C)
<i>C. cylindracea</i>	67	Olive oil		5.0~7.0	40~45
<i>P. fluorescens</i>	32	Sesame oil	4.8~5.1	7.0	50~60
<i>Bacillus</i> spp.	22	Olive oil	4.5	5.5~7.2	35~45
<i>G. candidum</i>	62	Olive oil	4.8	6.0	40~50
<i>H. lanuginosa</i>	39	Olive oil	6.6	7.0	40~60
<i>P. nitens</i>	26.5	Olive oil	5.9	6.0	35~50
<i>C. rugosa</i>	65	Olive oil	4.5	7.1	30~35
<i>C. antarctica</i>	55	Olive oil	6.5	7.5	40~60
<i>S. thermophilus</i>	49	Tributyrim	9.0	6.2	50~60
<i>S. faecalis</i>	20.9	Butter oil	3.6	7.5	35~45
<i>Pseudomonas</i> spp.	38	Corn oil	6.2	8.5	50~60

Polyhydric alcohol과 free fatty acid에 의한 esterification반응은 주로 유기용매 상에서 lipase에 의해 mild한 조건으로 이루어지며 화학적 방법에 비해 부반응 물질이 거의 생성되지 않는다. 표 2에서와 같이 microbial lipase에 의한 공업적 이용의 예로서 aliphatic alcohol에 의한 oleic acid ester나 butyric acid, lauric acid나 menthol을 이용한 methyl ester 생산에 이용할 수 있다.(5)

표 2. Examples of industrial applications of lipases

Field of industry	Application	Product
<i>Hydrolysis</i>		
Food (dairy)	Hydrolysis of milk fat	Flavoring agents for dairy products
Chemical (oil processing)	Hydrolysis of oils and fats	Fatty acids, diglycerides, and monoglycerides Reagents for lipid analysis
Chemical (detergent)	Analysis of fatty acid distribution in triglycerides Removal of oil stains, spots and lipids	Detergents for laundry and household uses
Medical	Blood triglyceride assay	Diagnostic kits
<i>Esterification</i>		
Chemical (fine chemical)	Synthesis of esters	Chiral intermediates Esters, emulsifiers
Food (chemical and pharmaceutical)	Transesterification of natural oils	Oils or fats (e.g., cocoa butter equivalent)

최근 서구식으로 변화하는 식습관으로 인해 섭취가 급격히 증가하는 트랜스지방은 그림 2와 같이 이중결합을 가진 불포화 지방산이지만 포화 지방산의 성질을 가지고 있으며 발생원인은 액체기름인 불포화 지방산에 수소를 첨가해 인위적으로 고체 상태로 만드는 과정 중 생성되며 LDL(Low Density Lipoprotein) 콜레스테롤 함량이 높은 반면에 HDL(High Density Lipoprotein) 콜레스테롤 함량을 낮추는 작용을 하며 이로 인해 동맥경화와 같은 심혈관질환의 원인이 되고 있다. 2000년대 후반부터는 건강에 대한 관심이 커지면서, 식용유의 트렌드가 바뀌어 지고 있다. 기존에 사용되었던 쇼트닝, 마아가린 등의 소비가 확연히 줄어든 것을 통해 확인할 수 있다. 식용유의 기능적인 면이 두각 되면서 포도씨유, 올리브유, 유채유, 카놀라유 등의 소비가 증대되고 있는 실정이다. 또한, CJ에서 상품화한 “로프리식용유”, 오뚜기의 “날씬 쿡오일”의 경우 diglyceride 함량이 높아 기존의 식용유에 비해 칼로리가 낮아 체지방의 체내 축적을 막는 기능성을 가지고 있다. 이들의 단가에 의해 치킨, 라면 등의 식품의 가격이 올라가는 결과를 초래하게 되었다.

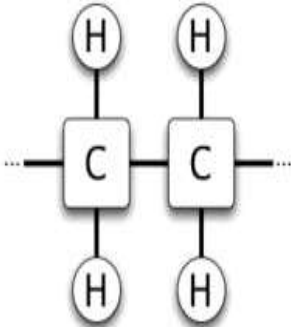
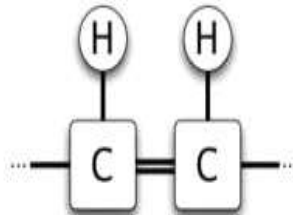
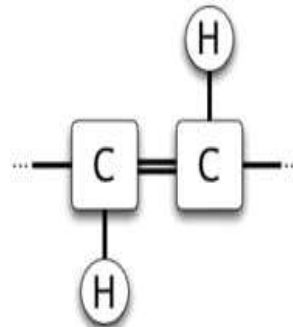
포화 지방산	시스형-불포화 지방산	트랜스형-불포화 지방산
		
(2개의 수소 원자와 결합된) 두 포화 탄소 원자는 단일 결합을 가진다.	(1개의 수소 원자와 결합된) 두 불포화 탄소 원자는 이중 결합을 가진다. 시스형(cis)	(1개의 수소 원자와 결합된) 불포화 탄소 원자는 이중 결합을 가진다. 트랜스형(trans)

그림 2. 지방산의 분자구조 비교

저트랜스지방을 만들기 위한 esterification반응은 화학적인 방법과 효소적인 방법이 있으며 표 3에서 보는바와 같이 장단점을 가지고 있으며 근래에 들어서는 고정화효소를 이용한 효소적 방법으로 급속히 전환되고 있는 실정이다.(6)

표 3. Esterification의 화학적 방법과 효소적 방법의 비교

Esterification 방법	장점	단점
<p style="text-align: center;">화학적 방법 (Sodium methoxide 사용)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 초기 시설투자가 적고 공정이 비교적 간단</li> <li>· 소량 다품종에 적합</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 수분이 0.01%되게 고온의 건조공정이 필요 (energy 소비가 많음)</li> <li>· 촉매제거 및 세척 공정에서 폐수 및 불필요한 부산물 발생</li> <li>· 탈취공정이 필요</li> </ul>
<p style="text-align: center;">효소적 방법 (RM-IM, TL-IM)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 화학적 방법보다 낮은 온도에서 반응</li> <li>· Specificity를 가져 공정이 효율적으로 이루어지며 폐기물이 적음</li> <li>· 제품의 품질과 수율이 높음</li> <li>· 고정화 효소를 사용하므로 촉매의 재사용이 가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>· 고정화 효소를 수입에 의존하므로 고비용 (NOVO, Roche 등)</li> <li>· 연속적으로 효소를 재사용함으로써 세심한 효소의 관리가 중요</li> </ul>

## 제 2 장. 국내외 기술 현황

### 제 1 절. 기술개발 현황

현재 국내에서는 lipase의 생산에 관한 연구는 KAIST, 한국생명공학연구원, 한국화학연구원 등에서 많이 이루어져 *Rhizomucor miehei*, *Candida antarctica* 등의 일부 lipase는 유전자조작을 통하여 양산할 수 있는 시스템을 갖추고 있다. 또한 국내업체인 (주)제노포커스에서는 *Rhizomucor miehei*, *Thermomyces lanuginosus* 등의 lipase관련 효소들을 공업적으로 생산할 수 있는 기술을 보유하고 있다. 그러나 lipase의 반복사용을 위한 효소 고정화의 국내기술은 아직 미진한 단계여서 상용화되지 못하고 있는 실정이다. 이러한 이유로 국내에서는 주로 NOVO사의 NOVOZYME을 고가로 수입하여 사용하고 있는 실정이다.

현재 선진국에서 상용화된 고정화 lipase의 종류는 표 4와 같다. 국외 NOVO사의 Lipozyme RMIM의 경우 Duolite라는 macroporous resin에 lipase를 흡착시켜 사용하고 있으며 Novozyme435(CAL-B)의 경우는 butyl기가 부착된 macroporous한 methacrylate resin을 사용한다.

표 4. The immobilized commercial lipases used and their characteristics

Brand	Lipase species	Carrier	Specificity
Lipozyme TL IM	<i>Thermomyces lanuginosus</i>	silica granules	sn-1,3-specific
Lipozyme RM IM	<i>Rhizomucor miehei</i>	macroporous resin	sn-1,3-specific
Novozym435 (CAL-B)	<i>Candida antarctica</i> lipase B	macroporous polymer based on methyl and butyl methacrylic esters	nonspecific
Lipase PS-C-I	<i>Burkholderia cepacia</i>	ceramic particles	nonspecific
Lipase PS-D-I	<i>Burkholderia cepacia</i>	diatomaceous earth	nonspecific

Lipase의 고정화를 위한 담체로는 표 5와 같이 이온교환수지용 polystyrene polymer, polymethacrylate, silica zeolite, celite, glass bead, Ca-Alginate bead, chitosan 등이 검토되어져 왔다.(7, 8)



표 5. 효소의 고정화를 위한 담체의 종류

Inorganic Materials	Organic Materials
<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Porous silica</li> <li>■ Aluminum silicate</li> <li>■ Boehmite</li> <li>■ Zirconia gel</li> <li>■ Diatomaceous earth</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>■ Polystyrene</li> <li>■ Polymethacrylate</li> <li>■ Duolite</li> <li>■ Polyvinyl alcohol</li> <li>■ Ca-alginate</li> <li>■ Carrageenan</li> <li>■ Chitosan</li> </ul>

국내의 경우 분리정제 및 생체촉매 지지체는 일부 특정 물성을 갖는 기공재료가 가능하나 이를 사업화하는 단계까지는 수행되지 못했다. 또한 생물공정에서 원가의 가장 많은 부분을 차지하는 분리정제 공정에 사용되는 소재는 전량 수입에 의존하고 있다. 생물전환공정의 경우 대부분의 대학 관련 학과에서 연구를 하고 있으나 상업화가 이루어지지 못하는 실정이다.

Meso 기공을 갖는 분리정제 및 생체촉매 지지체의 경우 PMMA 및 PS 등의 폴리머와 일부 지지체를 정치한 상태에서 반응하는 일부 소재가 상업화 되었으나 대량의 생체촉매 반응을 진행하는 데에는 기계적 물성 및 기공제어의 한계 등으로 신규소재의 개발이 필요한 상태이다.

국외에서는 polysiloxane이나 polyacrylamide 등의 개발된 지지체를 이용하여 생체촉매를 고정화하여 자체적으로 이용하여 판매하고 있는 회사로 유럽의 NOVO, DSM, Lonza, Degussa, Roche 등이 있으며 대부분 생체촉매를 배양을 통하여 생산한 후 균체를 수거하여 유기 matrix 에 고정화하여 사용하고 있다. 또한 지지체 및 고도 분리정제용 소재는 미국의 W. R. Grace, Merck, 일본의 Mitsubishi chemical, Fuisysylisia, Italy의 Resindion, 독일의 Degussa, Röhm & Hass 등이 전 세계에 공급하고 있다.(9, 10, 11)

Lipase의 고정화시 사용되는 결합방법으로는 ion결합에 의한 adsorption공법(12), glutaraldehyde를 사용한 covalent cross linking방법(13), sol-gel법에 의한 entrapment방법(14, 15) 등이 있으며 고정화 담체의 functional group으로는 amine group(16, 17), mercapto group, cyano group, phosphoric acid group, exoxid group(18), butyl group(13) 등이 있다.

## 제 2 절. 시장현황 및 산업화방향

### 1. 국외 제품생산 및 시장현황

전 세계적으로 저트랜스지방의 요구도는 선진국은 물론 개발도상국까지 확대되고 있는 추세로 시장전망은 매우 유망하고 안정적이다. 해외의 당과제의 고정화 담체 lipase를 이용한 대상제품 시장은 마가린, 쇼트닝, 가공유지와 같은 산업용 식용유지 시장으로서 대표적인 분야로 튀김용과 가공유지용으로 나뉠 수가 있다. 산업용 식용유지 시장에서 높은 트랜스지방 함유량 때문에 대두경화유는 사용이 대폭 줄어들고 있으며, 팜유로 많은 대체를 하고 있으나 팜유도 포화지방산 함량이 50% 정도로 높고, 실온에서의 굳는 성질로 인하여 사용상의 불편으로 인하여 선호도가 줄고 있다.

따라서, 산화안정성이 좋고 포화지방산이 상대적으로 낮은 저트랜스지방의 수요는 전세계적으로 늘어나는 추세이므로, 산업화의 제품수요는 본 과제의 고정화 담체 lipase의 산업화 기술을 확립하면 우리나라는 물론 해외로 수출이 가능하며, 세계시장에서 경쟁력있는 기술시장분야로 확대되고 있는 추세이다.(19)

### 2. 국내 제품생산 및 시장현황

본 과제의 고정화담체 lipase가 산업적으로 이용하는 분야는 식용유지산업이다. 식용유지산업의 시장규모는 2009년 1조 3,700억원(식품유통연감 2010)이며, 성장률은 4.6%로 식품산업 상 차지하는 비중이 높다. 본 과제와 관련이 높은 법규인 어린이식생활안전관리특별법이 2010년 1월부터 시행이 됨으로서 가공식품인 제과, 제빵업계에서는 포화지방이 적은 식용유지에 대한 요구가 증가하였고, 이에 따라 고올레산, 해바라기유, 카놀라유의 시장이 확대되었으며, 마가린, 쇼트닝과 같은 가공유지에서도 포화지방을 저감화하는 노력이 진행되고 있다. (주)CJ제일제당은 호소 에스테르화 기술을 이용한 트랜스지방이 없는 가공유지인 트랜스케어를 상용화한 이래, 트랜스케어를 적용한 마가린, 튀김유지와 같은 업무용 식용유지 시장에 확대하여 진출하고 있다. 오뚜기, 롯데삼강, 사조해표 등의 유지업체도 트랜스지방을 저감하면서 유지제품의 저트랜스화 요구에 노력을 하고 있다.

이 외의 업체인 삼양웰푸드, 웰가, 동서유지 등의 가공유지회사들도 포화지방 저감화에 시장의 요구가 증대함에 따라, 당 과제의 고정화 담체 lipase의 산업화 요구가 증대하고 있다.(20)

### 3. 개발기술의 산업화 방향 및 기대효과

#### 가. 산업화 방향(제품의 특징, 대상 등)

- lipase는 식품분야 뿐만 아니라 제약, 정밀화학, 에너지 등 다양한 분야에서 사용이 되고 있으며, 그 사용의 분야는 널리 확대되고 있다.
- 고정화 lipase는 현재 식품분야의 저트랜스지방 제조공정에 사용이 되고 있으며, 당사의 고정화 담체생산기술을 이용하여 경쟁력있는 제품(가격, 효과, 사용방법)을 생산한다.

- 본 과제의 고정화 담체 lipase를 우선 식품분야의 식용유지(가공유지, 마가린, 쇼트닝분야)의 생산에 이용을 선 개발하고, 점차 정밀화학, 에너지, 제약 등의 분야로 확대한다.

나. 산업화를 통한 기대효과

(단위 : 백만원)

항 목 \ 산업화 기준	1차년도	2차년도	3차년도	4차년도	5차년도	계
직접 경제효과	2,500	4,500	6,800	7,200	10,000	31,000
경제적 파급효과	4,432	7,978	12,056	12,765	17,730	54,961
부가가치 창출액	1,890	3,402	5,140	5,443	7,560	23,435
합 계	8,822	15,880	23,996	25,408	35,290	109,396

# 제 3 장. 연구개발 수행내용 및 결과

## 제 1 절. 세부개발 내용 및 방법

### 1. Nano silica 담체의 제조

#### 가. Nanoporus silica 제조공정

그림 3은 nano silica 기공을 가진 silica 담체를 만들기 위한 제조공정도 이다.

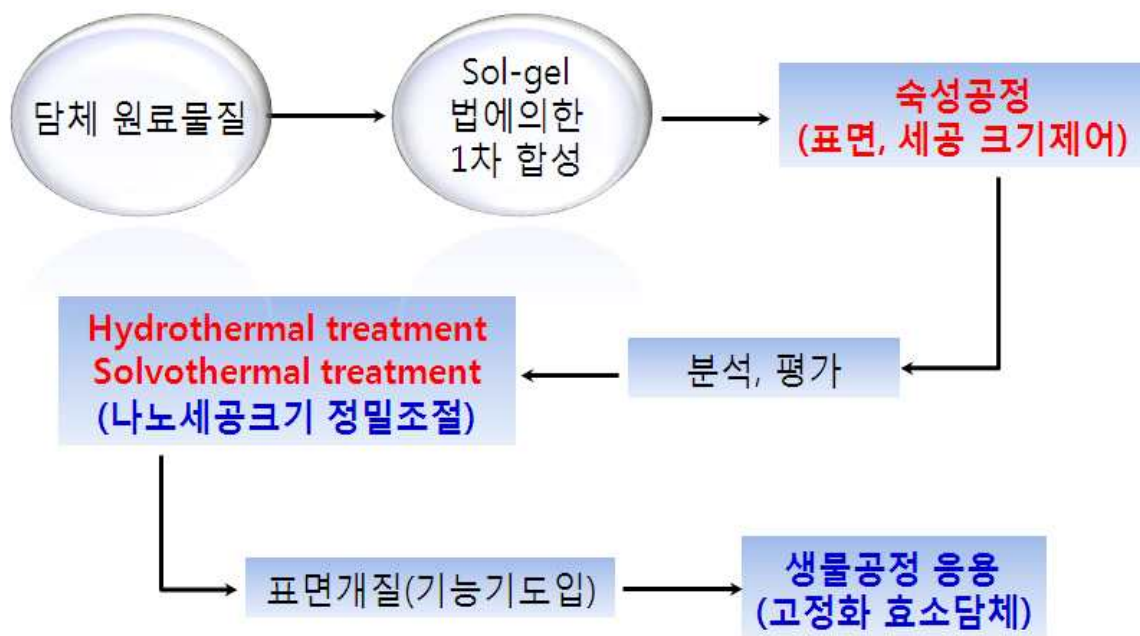


그림 3. 나노기공 실리카 제조공정

#### 나. 원료 물질의 제조

##### (1) 물유리(water soluble sodium silicate)

수용성 silicate의 제조방법은 크게 Furnace route, Hydrothermal process 등이 알려져 있고, Furnance route는 sodium carbonate와 Silica sand를 고온에서 반응시켜 액상으로 만든 후 공냉 혹은 물에 냉각해서 고체 상태로 만드는 공정으로 약 1,400℃의 온도에서 정확한 비율로 측

정된 silica sand와 soda ash를 직접 녹여서 만드는 방법이며, Hydrothermal process는 sand를 caustic soda에 직접 용해하기 위해 고안한 autoclave에서 격렬한 반응을 시켜 제조하고 있다.

Sodium silicate는 실리카나 결정 실리카의 여러 다른 형태에 공통적으로 나타나는 tetrahedra구조인  $\text{SiO}_4$  구조를 가지고 있는데 이것은 silicate tetrahedra는 monomer나 Si-O-Si bridge 형태로 산소를 공유하여 polymer 형태를 갖는다. 그러나 수용성 실리케이트에서의 전체적인 구조는 공유된 양이온인  $\text{Na}_2\text{O}$  와  $\text{SiO}_2$  분자의 불규칙한 배열이다.

$\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$  의 비율이 0.5일 때 ortho silicate, 비율이 1일 때 meta silicate, 비율이 2가 되면 di silicate라고 하며  $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$  의 비율이 낮을수록, 수분함유량이 많을수록 물에 녹는 속도가 일반적으로 빨라진다.

일반적으로 침강성 실리카, 졸, 겔을 제조시  $\text{SiO}_2/\text{Na}_2\text{O}$  몰비가 약 2.2~4.0인 제품을 사용한다. 이는 실리카를 중화할 때 산의 첨가량이 적으며, 많은 양이 생산되므로 제조 가격을 낮출 수 있기 때문이다. 따라서 실리카 나노 기공소재를 제조시 물유리 2종을 이용하고, 시료는 국내의 신우소재 주식회사의 고순도 물유리를 사용하였다.

#### 다. Silica 중합 실험

$\text{H}_2\text{SO}_4(15\%)$  및 규산나트륨( $[\text{SiO}_2]/[\text{Na}_2\text{O}] = 2.5\text{mole}$ , 18%)을 injection pump를 통해 중간 저장 pot으로 옮기고 pump가 부착된 nozzle을 통하여 균일하게 혼합 반응시켰다. 겔화(gelation) 반응이 진행된 슬러리에서 silica hydrogel을 분리함과 동시에 실리카 표면의 실라놀기를 축중합 시키기 위하여 다음과 같이 aging을 실시하였다. 겔화된 슬러리를 배수가 가능한 반응용기에 이송한 후 슬러리에 흘려보내는 수세수의 조건을 pH 4.0 및 40°C(이하 “ALT”라 함), pH 9.0, 온도 70°C의 조건(이하“ BHT”라 함)으로 조정한 후 70시간 까지 물을 흘려보내면서 수세 및 중합을 동시에 실시하였다. 이러한 aging처리 후 hydrogel의 물성제어가 완료되면 150°C에서 24시간 동안 건조시키고 건조된 실리카는 Puffering Mill을 사용하여 10~80 mesh로 입도를 제어하였으며 제어된 입자의 물성 변화를 측정 하였다. 한편 겔화된 슬러리를 배수가 가능한 반응용기에 이송한 후 슬러리에 흘려보내는 수세수의 조건을 초기 물성제어와는 달리 hydrogel내의 이온물질인 나트륨 및 황산이온을 제거하기 위하여 R/O membrane을 거친 pH 6.8~7.2의 수세수를 흘려보내서 hydrogel의 나노기공 속에 존재하는 나트륨 이온과 황산이온을 제거한다. 최종적으로 염이온의 존재여부를 간접적으로 확인하기 위하여 전기 저항을 측정하여 종료한다. 염이온의 제거가 목표치에 도달하면 염기성 조건이 아닌 중성 조건에서 나노세공 제어를 하기 위하여 silanol 축중합장치를 이용하여 중성 및 150°C 이하에서 나노 기공 hydrogel 내부 및 외부에 존재하는 실라놀기의 축중합 및 미세 입자의 용해에 의해 나노세공을 제어 한다.

1차 hydrogel의 나노기공물성이 목표치에 도달하면 박스 건조기를 이용하여 150°C에서 24시간 동안 건조한다. 이러한 공정을 통해 제조된 나노기공 실리카는 제로젤로써 추후 생물전환 공정 현장에서 적용시 기계적 물성 중에서 내구성을 유지 할 수가 있다.

합성된 Xerogel은 다시 2차 Hydrothermal treatment를 하기 위하여 Autoclave에서 고온 고압으로 수열 처리를 한다. 1차 Hydrothermal treatment를 통해 제어된 나노기공은 이 과정 통해 나노기공의 크기 및 물포로지가 효소를 고정화 할 수 있는 유효한 세공용적 및 크기로 제어된다.

물성제어가 완료된 나노 기공 재료는 존재하는 수분을 제거하기 위하여 박스 건조기를 이용하여 150°C에서 24시간 건조한다. 개략적인 각 공정별 내용을 살펴보면 다음과 같다.

#### (1) 원료 혼합 공정

출발물질인 규산나트륨을 황산으로 산 분해 하는 반응에 의해 hydrosol이 생성되는 공정으로 실리카의 농도 및 온도에 따라  $\text{Si(OH)}_4$ 의 축중합에 의해 생성되는 1차 입자의 형태가 결정된다.

#### (2) 겔화 공정

생성된 hydrosol은 시간, 온도에 따라 겔화로 진행되며 수소결합과 실록산 결합에 의해 3차원 망목구조의 겔이 형성된다(그림 4).

#### (3) Wet treatment

형성된 Hydrogel 내부에는  $\text{NaSO}_4$  등을 회수하고 각 응용분야에 맞는 세공 크기를 제어할 필요가 있다. 그러므로 연속적인 R/O 수의 흐름과 pH 및 온도 제어에 의해 내부의 염이온의 제거 및 표면적, 세공구조 제어를 본 공정에서 진행한다.

#### (4) Drying 공정

물성이 제어된 Hydrogel은 건조 방법에 따라 Aerogel 혹은 Xerogel을 제조할 수 있는데, 일반적으로 supercritical drying에 의해서는 Aerogel을 제조할 수 있고, 상압에 의한 건조 방법은 Xerogel을 제조할 수 있다. 본 공정에서는 ambient drying에 의한 Xerogel을 제조하였으며 표면 실라놀기의 보호를 위해서 150°C 이하에서 수행하였다.

#### (5) Drying & size reduction

제조된 nanoporous xerogel은 사용용도에 따라 크기 및 입도 분포를 제어하는 것이 중요하며, 이것은 분체 가공 설비의 종류 및 사용방법에 따라 각 용도에 맞는 분체를 제조할 수 있다. 본 연구에서는 ball mill, pin mill, pulverizing mill 과 초음파 classifier 등을 사용하였다.

개략적인 전체 flowchart는 그림 5에 공정별 주요변수를 나타내었다.

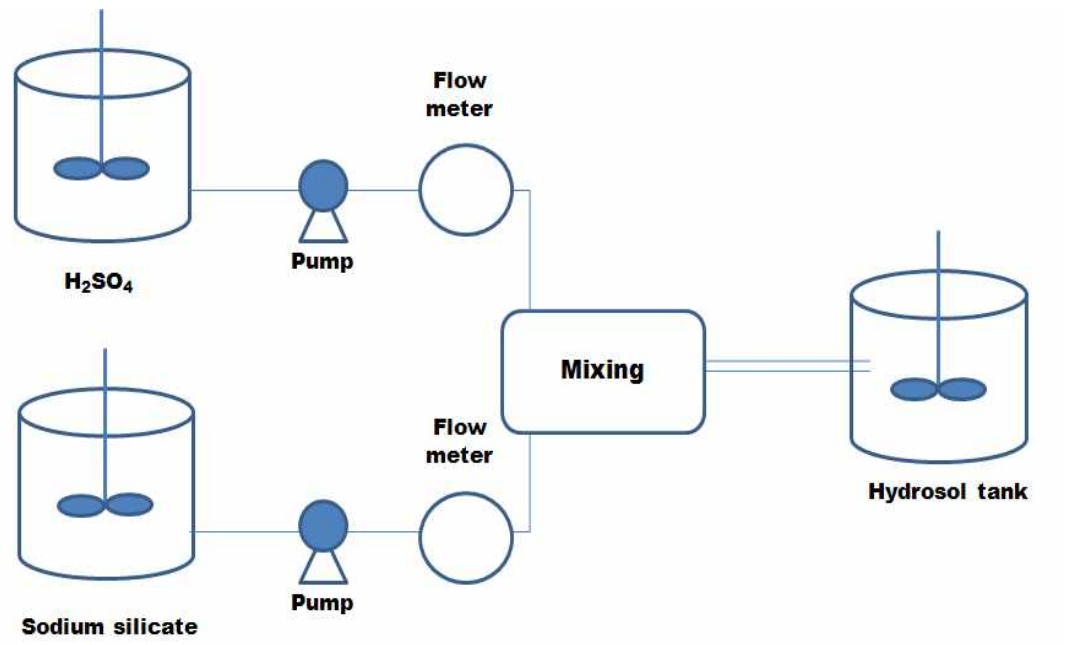


그림 4. Silica hydrogel 반응장치

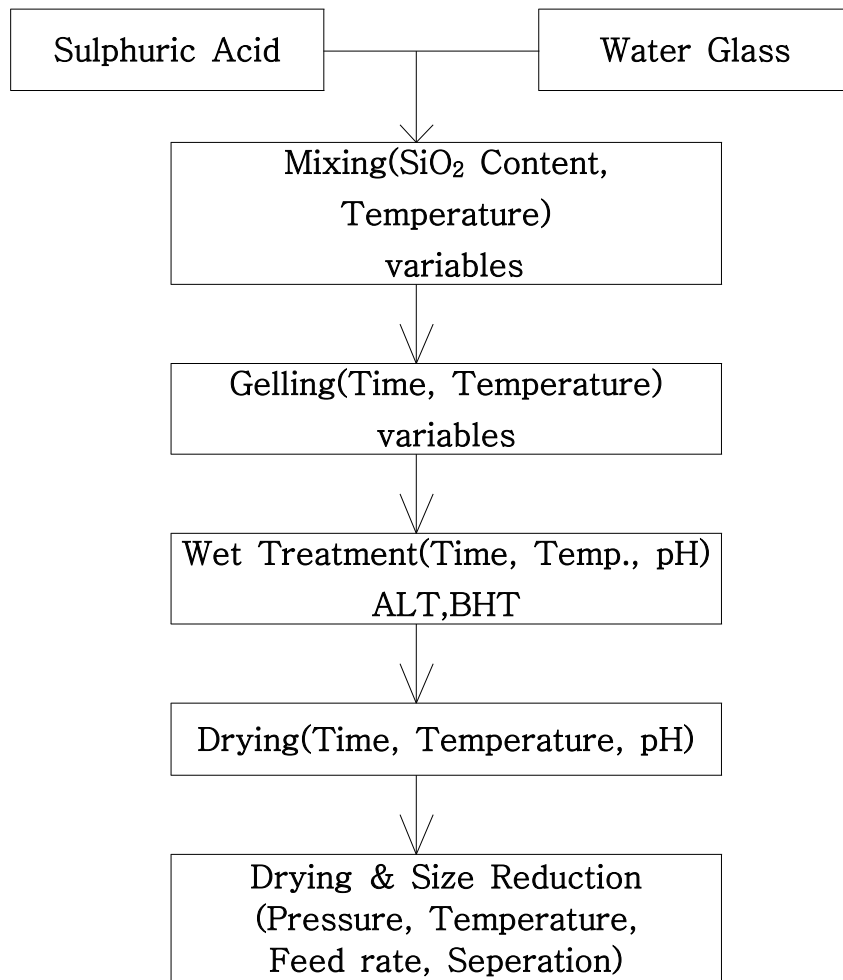


그림 5. Sodium silicate의 peptization에 의한 nano 세공 silica gel 제조공정



## 라. Nanoporous silica 분석 및 물성 측정

### (1) Gelation time 측정

온도 및 pH 변화에 따르는 hydrogel의 gelation 속도에 미치는 영향을 측정하기 위하여 초기 과잉산 즉 pH 1.0에서부터 pH 변화에 따르는 Gelation time과 pH 3.0에서의 온도에 따르는 gelation time을 측정하여 안정하고 균일한 nanoporous hydrogel을 제조하기 위한 최적 조건을 조사하였다.

### (2) Na<sup>+</sup> 및 pH 변화 측정

출발물질로 사용된 규산나트륨 중에 존재하는 Na<sup>+</sup> 이온이 산 분해반응 후 중합 시간에 따르는 Na<sup>+</sup> 이온의 소멸속도와 pH 변화를 측정(Orion사 Model 720A)하여 중합 공정의 parameter로 활용하고자 하였다.

### (3) BET 측정방법

건조 및 열처리된 시료의 nano pore 구조특성을 조사하기 위해 BET 표면적 측정장치 (Model ; Micrometrics ASAP 2020)를 이용하여 0.05~0.15gr 정도 평량한 후 350℃에서 1시간 동안 전 처리를 시행하고 무게를 측정한다. BET 표면적 측정기를 이용하여 최소한 5 point까지 측정하여 BET 표면적 자료로 사용하였다.

### (4) Nanoporous silica의 Pore volume 측정방법

Water titration에 의한 Pore volume의 측정 방법은 시료를 200℃에서 2시간 동안 건조한 후 데시케이터에서 항온을 시킨 후 삼각 플라스크에 10~40gr 의 시료를 평량하고 3차 증류수를 이용하여 적정을 하고 물에 의하여 포화가 되는 점을 찾아 종말점으로 한다. 최종 세공 용적은 다음과 같이 계산한다.

$$\text{Pore volume} = \text{소비된 물의 ml 수} / \text{시료의 무게 g}$$

### (5) Pore Size 측정

Pore size의 측정 방법은 30 point 이상의 질소 흡착법을 이용한 BJH Method에 의해 분석한 평균 세공크기와, 비교적 간단한 방법인 5 point 까지 측정된 BET 표면적 측정값과 Water titration에 의한 pore volume을 측정된 값을 이용하여 Wheeler formula에 의해 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{APD}(\text{\AA}) = 40000 \times \text{PV/BET SA m}^2/\text{gr}$$

## (6) 강열감량

나노 세공 실리카의 세공 내 외부에 존재하는 결합수 및 실라놀기의 밀도 등에 대한 간접적인 정보를 알 수 있는 DIN 55921 실험 방법으로, 시료 3~5gr (M1)을 알루미나 Crucible에 0.1mg 까지 평량하여 1000℃ × 2시간 가열한 후의 무게를 달아 (M2) 무게 감량을 계산하여 휘발성 물질을 확인한다. 시료의 전처리는 수분을 제거한 후 평량해야 한다.

### 마. Silica hydrogel 형성시 pH의 영향

규산나트륨의 농도 18%, 황산의 농도 15%를 출발물질로 사용하여 반응시 flow meter의 속도를 조정하였으며 두 성분의 당량비를 변화시켜 pH변화에 따라 생성되는 hydrogel의 형성시간을 측정하였다.

### 바. Silica hydrogel 형성시 온도의 영향

18% 규산나트륨과 15% 황산의 당량비를 조절하면서 pH를 3.0으로 고정하고 반응온도를 0℃~40℃로 변화시키면서 gel이 형성되는 시간을 측정하였다.

### 사. Silica hydrogel의 중합 후 세척처리 시간에 따른 pH변화

Silica hydrogel 중합시 형성되는 염이온의 농도가 silanol기에 영향을 주므로 세척시간에 따른 염의 제거정도를 pH변화에 의해 측정하였다.

### 아. 수열처리(Hydrothermal treatment)시간에 따른 BET 비표면적 변화

1차적으로 중합 형성된 hydrogel은 BET 표면적이 300~800m<sup>2</sup>/g이며 pore size로는 5~10nm로 형성된다. 1차적으로 형성된 hydrogel을 130℃에서 건조한 후 180℃의 고압반응기(8~10kg/cm<sup>2</sup>)에서 수열처리 반응을 하였다.

## 2. Nano silica담체에 silanization을 통한 작용기 부착

Pore size가 34nm로 제조된 silica 담체를 사용하여 그림 6과 같이 amine silane (3-aminopropyl-triethoxy silane)과 butyl silane(N-(n-Butyl)-3-aminopropyl-trimethoxy silane)의 농도, 반응시 pH, 반응시간에 따른 부착조건을 검토하였다.

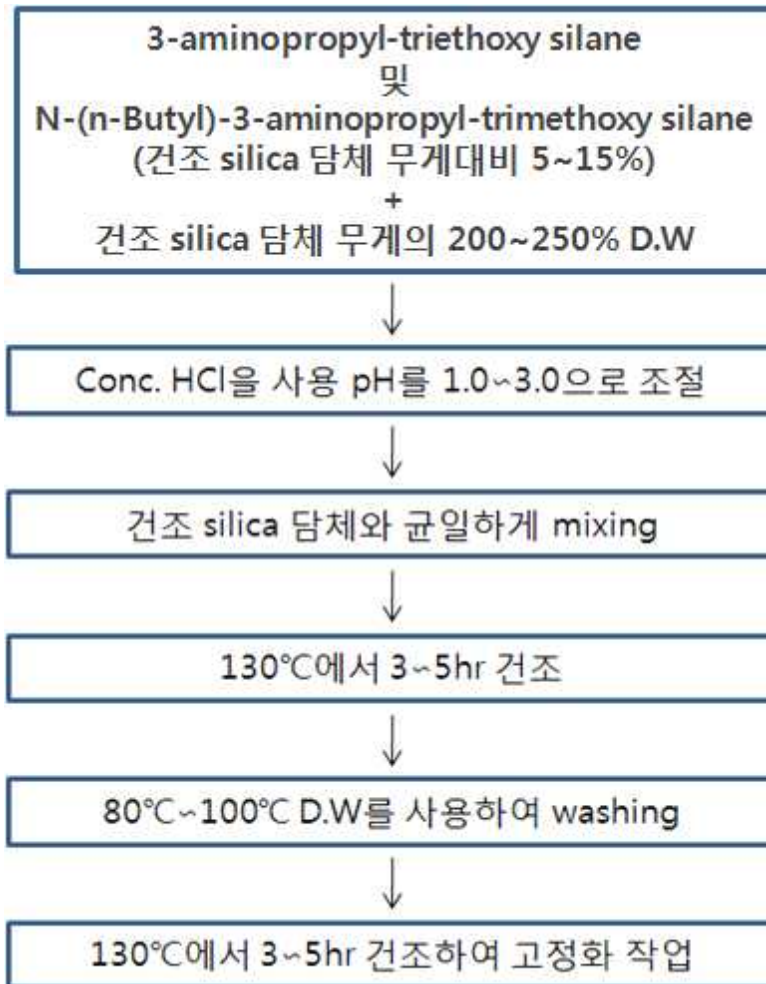


그림 6. Nano silica 담체를 이용한 silanization공정

#### 가. Butyl silane의 농도별 영향

Amine silane과 butyl silane의 농도를 건조된 silica 담체무게 대비 각각 2.5%, 5%, 10%, 15%로 하여 반응pH를 3.0으로 고정시켜 부착시킨 후 lipase(Palatase)를 고정화하고 대두유 emulsion을 이용하여 반응시 유리되는 free acid의 함량을 산가측정법으로 활성도를 측정하였다.

#### 나. Silanization시 pH의 영향

Silica 담체에 amine silane과 butyl silane을 사용하여 silanization시 silane의 농도를 5%로 고정하고 반응pH를 각각 1.0, 2.0, 3.0, 5.0, 7.0, 9.0으로 조정하여 부착시킨 후 lipase(Palatase)를 고정화하고 대두유 emulsion을 이용하여 반응시 유리되는 free acid의 함량을 산가측정법으로 활성도를 측정하였다.

#### 다. Silanization후 건조시 수분함량의 영향

Silica 담체에 amine silane과 butyl silane 5%를 반응pH 3.0에서 부착시키고 증류수로 세척하여 135°C 건조기에서 수분함량이 1%, 2%, 3.5%, 5% 되게 건조시킨 후 lipase(Palatase)를 고정화하고 대두유 emulsion을 이용하여 반응시 유리되는 free acid의 함량을 산가측정법으로 활성도를 측정하였다.

### 3. Lipase(Palatase)의 고정화조건 검토

#### 가. 고정화 반응

Lipase의 active site를 보호하기 위하여 기질로 대두유(soybean oil)을 1% 첨가하여 40°C에서 30min 반응 후 정지하여 대두유층을 제거한 후 citric acid를 사용하여 pH를 등전점 부근인 4.5 부근으로 조정하여 그림 7과 같은 고정화 효소반응기를 사용하여 그림 8과 같이 butyl silane이 부착된 silica 담체에 담체무게 대비 lipase(Palatase)를 1:1로 하여 고정화 하였다.



그림 7. 고정화 효소반응기

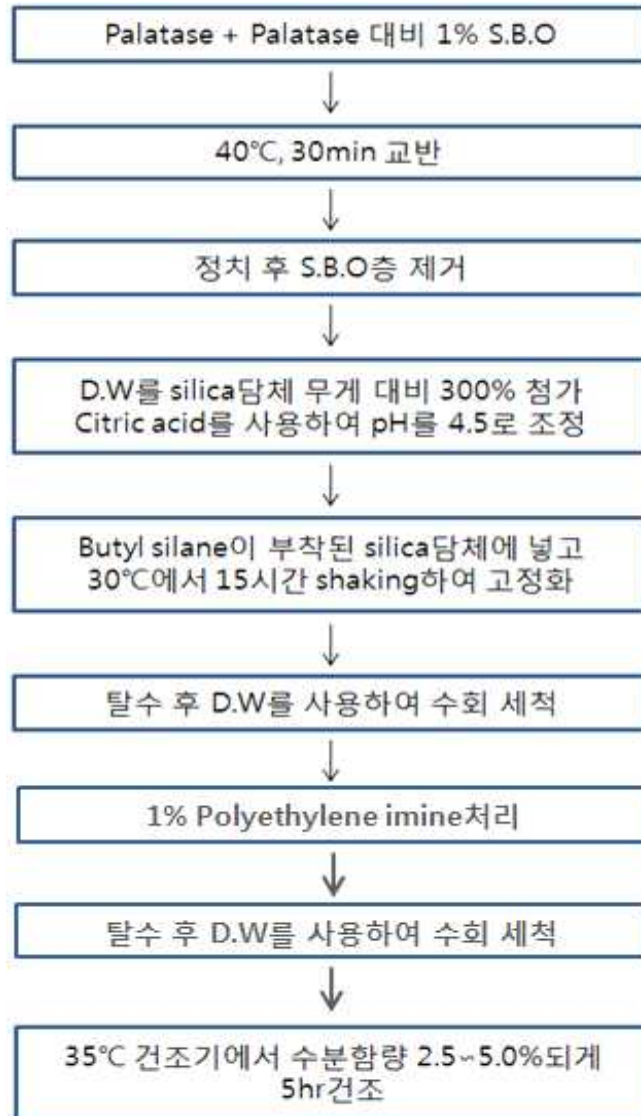


그림 8. Lipase(palatase) 고정화 공정

### (1) 고정화 반응시 nano silica 담체의 pore size에 따른 영향

규산나트륨 수용액과 황산을 사용하여 일차적으로 중합된 silica를 180℃에서 반응시간에 따라 pore size 15nm (BET: 200m<sup>2</sup>/g), 30nm(BET: 100m<sup>2</sup>/g), 60nm(BET: 50m<sup>2</sup>/g)되게 제조한 후 건조하고 건조된 silica resin에 대비 butyl silane (N-N-(butyl)-3-aminopropyl trimethoxy silane) 10%와 증류수 200%를 첨가하여 혼합한 후 130℃ dry oven에서 2시간 이상 건조하여 수분함량이 5% 미만 되게 하였다. 건조된 butyl silane이 흡착된 silica resin을 80℃에서 세척하여 부착되지 않은 butyl silane은 제거하였다. butyl기가 부착된 silica resin에 NOVO사의 RML액상 제품인 Palatase를 넣고 반응 pH 5.0, 반응온도 28℃, 반응시간 15~24hr 으로 고정화 시킨 후 증류수를 사용하여 수회 세척하고 30℃에서 5hr 건조한 후 NOVO사의 Lipozyme RM-IM과 활성도를 비교하였다.

활성도는 대두유 20g에 증류수 15g을 혼합한 후 고정화된 lipase를 0.25g 첨가하고 34℃에서 180분간 220rpm 으로 교반하며 유리되는 지방산을 0.05 N NaOH 용액으로 적정하여 소모되는 양을 비교측정 하였다(산가측정법).

### (2) 고정화 반응시 pH의 영향

Lipase(NOVO사 액상제품인 RML=Palatase)를 butyl silane이 부착되어 건조된 silica 담체에 1:1 비율로 혼합하고 교반이 가능하게 적당량의 증류수를 첨가하여 pH를 각각 4.5, 6.0, 7.0, 8.0 으로 조정하여 고정화 하였다. 고정화된 lipase의 활성도는 산가측정법으로 반응시 유리되는 free acid의 함량으로 측정하였다.

### (3) 고정화 반응시 온도의 영향

Lipase(Palatase)를 butyl silane이 부착되어 건조된 silica 담체에 1:1 비율로 혼합하고 교반이 가능하게 적당량의 증류수를 첨가하여 반응온도를 각각 5℃, 10℃, 20℃, 30℃, 40℃로 조정하여 고정화 하였다. 고정화된 lipase의 활성도는 산가측정법으로 반응시 유리되는 free acid의 함량으로 측정하였다.

### (4) 고정화시 반응시간의 영향

Lipase(Palatase)를 butyl silane이 부착되어 건조된 silica 담체에 1:1 비율로 혼합하고 교반이 가능하게 적당량의 증류수를 첨가하여 반응온도 25℃에서 각각 2시간, 5시간, 10시간, 15시간, 24시간 동안 고정화 하였다. 고정화된 lipase의 활성도는 산가측정법으로 반응시 유리되는 free acid의 함량으로 측정하였다.

### (5) Lipase(Palatase)의 고정화 후 Polyethylene imine 처리에 의한 영향

고정화 반응이 종료된 후 filtering에 의해 상등액을 제거하고 polyethylene imine을 각각 0.25%, 0.5%, 1%, 2% 처리하여 lipase의 활성도에 미치는 영향을 검토하였다.

(6) 고정화된 lipase(Palatase)의 활성도 측정

(가) 산가측정(활성도 측정법)

① 시약

- 50mM NaOH용액
- Ethanol용액 : ethanol과 증류수를 9:1로 혼합
- 0.5% phenolphthalein 지시약
- 100ml flask에 대두유(soybean oil) 20g과 증류수 14g을 넣어 혼합

② 측정방법

대두유 20g과 증류수 14g이 혼합된 100ml flask에 고정화된 lipase(Palatase)를 0.2g~0.5g 첨가하고 34℃에서 250rpm 으로 30~60분간 교반한다. ethanol용액(ethanol:증류수 = 9:1) 50ml에 0.5% phenolphthalein 1~2방울을 넣고(빨간색) magnetic bar로 교반하면서 1g의 측정용 sample을 넣고 50mM NaOH용액으로 빨간색이 없어질 때까지 적정하여 측정하였다.

③ 계산식

산가(Acid value) = 유리되는 지방산량

$$\begin{aligned}
 & NaOH\ M.W \times NaOH\ mol\ 농도 \times NaOH\ 소비량(cc) \\
 & \quad sample\ 1ml\ 당\ BO\ 량\ \left(\frac{20}{34} = 0.588\right) \\
 & = \frac{40 \times 0.05 \times NaOH\ 소비량(cc)}{0.588} \quad \approx 3.40 \times NaOH\ 소비량(cc)
 \end{aligned}$$

(나) Tributyrin 분해능측정

① 시약

- Gum arabic emulsifier : NaCl 1.79g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 0.041g, Gum arabic 0.6g, Glycerol 54g을 녹인 후 증류수를 첨가하여 100ml로 맞춤
- Tributyrin emulsion(Tributyrin 5%) : Tributyrin 15g, Gum arabic emulsifier 50g을 혼합한 후 증류수를 첨가하여 300ml로 맞춤

② 측정방법

Tributyrin emulsion용액 30ml(0.16M tributyrin)을 100ml beaker에 넣고 30℃에서 200rpm 으로 교반하며 고정화된 lipase를 0.1g~0.5g 첨가하여 pH를 7.0으로 유지시키는데 소모되는 0.05N NaOH양을 측정하였다.

③ 계산식

$$\text{Tributyrin 분해능(활성도)} = \frac{\text{분당 소모된 } NaOH\ 소비량(cc) \times NaOH\ mole\ 농도(0.05N) \times 1000}{\text{고정화된 } lipase\ sample(g)}$$



4. 고정화된 lipase(Palatase)를 이용한 저트랜스지방의 성분분석

가. Tristearin(SSS)의 HPLC상의 분석조건

여러 가지 칼럼을 이용하여 분석조건을 확립하였다(표 6). 그 결과 Eclipse XDB C18 칼럼과 칼럼 온도 65°C에서 tristearin을 검출할 수 있었다.

표 6. Tristearin 분석을 위한 HPLC 분석 조건

Model	Agilent 1100series
Column	Eclipse XDB C18, PN 993967-902
Detector	UV detector (215 nm)
Mobile phase	A = Acetonitrile : methyl-tert,butyleter (9:1) B = LC용 water
Gradient	0~20 min : A 87%, B 13% 20~50 min : A 100%
Flow rate	1.2 ml/min
Column oven temp.	65°C
Sample	20 mg/ml in isopropanol : hexane (5:4)

나. HPLC분석에 따른 Tristearin(SSS)의 감소비율 비교

극도경화유와 대두유를 45:55 비율로 혼합한 후 고정화 lipase를 2%씩 각각 넣고 70°C에서 200rpm 으로 30분, 1시간, 2시간으로 샘플링하여 tristearin의 감소정도를 tristearin 전환율로 나타내었다.

$$\text{Tristearin 전환율} = \frac{\text{반응전 Tristearin} - \text{반응후 Tristearin}}{\text{반응전 Tristearin}} \times 100$$

## 5. 500L Pilot를 이용한 효소고정화 scale up 조건검토

35nm의 pore size를 가진 20kg silica 담체에 butyl silane를 1.0kg(5%) 처리하여 부착하였다. 130℃에서 2시간 butyl silane을 fixation 시킨 후 세척하여 다시 130℃에서 5시간 건조하여 수분함량이 3%미만 되게 처리하였다.

Palatase 20L에 대두유 0.2kg을 넣고 45℃에서 30분간 교반한 후 정치시켜 separating funnel을 사용하여 대두유 성분을 제거하였다. 대두유 성분이 제거된 Palatase를 그림 9의 500L 반응기에 넣고 증류수 80L를 가하고 pH를 4.5로 조절하였다. butyl silane이 부착된 silica담체 20kg을 반응기에 추가 투입하여 30℃에서 15시간 고정화 하였다. 고정화가 완료된 silica 담체에 polyethylene imine(PEI)을 0.2L(1%) 처리한 후 증류수로 3회 이상 세척하였다.

34℃ dry oven에서 수분함량이 3%이하 되게 20~24시간 건조하여 전환반응에 사용하였다.



그림 9. 500L 반응기

## 6. 50L Pilot 효소반응장치를 이용한 scale up 조건검토

50L 효소반응장치 그림 10에 극도경화유 10kg을 넣고 온도를 70℃로 올려 완전히 용해시킨 후 고정화된 lipase(Palatase) 200g을 첨가하여 교반하면서 상부투입구를 통해 대두유 10kg을 천천히 투입하면서 온도를 70℃로 유지하였다.

2시간, 5시간, 10시간, 20시간, 30시간 별로 각각 sample을 채취하여 Tristearin(SSS)가 감소되는 정도를 HPLC를 사용하여 분석하였다.



그림 10. 50L 효소반응장치

## 7. 반응시 recycling 횟수(반응횟수)에 따른 Tristearin의 함량변화

고정화 lipase의 내구성 및 활성도 유지를 확인하기 위해 극도경화유과 대두유의 혼합비율을 1:1로 하여 50L 반응기에서 70℃로 20회 반응시키며 Tristearin의 함량변화를 조사하였다.

## 제 2 절. 실험결과

### 1. Nano silica 담체의 제조

#### 가. Silica hydrogel 형성시 규산나트륨의 산 분해 pH의 영향

규산나트륨의 농도 18%, 황산의 농도 15% 의 출발 물질을 사용하여 반응 시 두 성분의 당량을 변화시켰고 이에 따른 pH 변화에 따라 생성된 hydrosol의 gel화 시간을 그림 11에 나타내었다. 실온(25°C)에서 pH가 과잉산에서 반응을 시작하여 pH 1과 3에서는 5시간 정도에 gel화가 완료되었다. pH 2에서 6시간으로 가장 gel화 시간이 길게 나타났으며, pH 4에서는 2시간으로 급격히 짧아졌고 pH가 6에 가까워짐에 따라 겔화시간이 급격히 빨라져서 더 이상 gel화 시간을 측정 할 수 없었다. 이러한 현상은 산 분해 반응 시 생성되는  $\text{Si(OH)}_4$  monomer가 축중합에 의해 silanol 및 siloxane 구조를 갖는 3차원 망목구조로 진행되는 반응에서  $\text{Si(OH)}_4$  monomer는 IEP(등전점)에서, 즉 zero 전하가 되는 지점인 pH 2에서 가장 gel화 시간이 길게 나타난 것이며 pH 2를 기준으로 pH가 낮은 구간에서는 positive 전하를 띄기 때문에 겔화 시간이 약간 빨라지는 것으로 판단되었다. 이는 산 조건에서 겔화 시간은 존재하는  $\text{H}^+$  이온의 농도에 비례한다는 기존의 학설과도 일치한다. 반대로 pH가 2보다 증가할 경우 중합속도는  $\text{OH}^-$  이온농도에 비례한다는 R.K Iler의 중합속도 모델로 설명 할 수 있다. 그러나 pH가 6이상 10.5 사이에서는 negative 전하를 띄게 되며 이 경우 서로 반발하는 경향이 있으나 0.2~0.3mole 이상의 염의 존재 하에서는 전하반발이 감소하고 응집 겔이 이루어지는 것으로 추정된다. 그림 12에는 pH 변화에 따르는 상대적인 겔화 시간을 염이 존재 할 때와 그렇지 않을 경우를 나타내었으며, 그림 13에는 각 pH 영역별 sol의 안정성에 대한 그래프를 각 pH의 전하별로 나타내었다. 이러한 연구 결과에 의하면 규산나트륨의 산 분해 반응시 안정한 1차 입자 및 균일한 나노 세공을 제어하기 위해서는 최적의 pH 조건이 있으며 본 실험의 경우 pH가 3 이하로 제어되어야 할 것으로 나타났다.

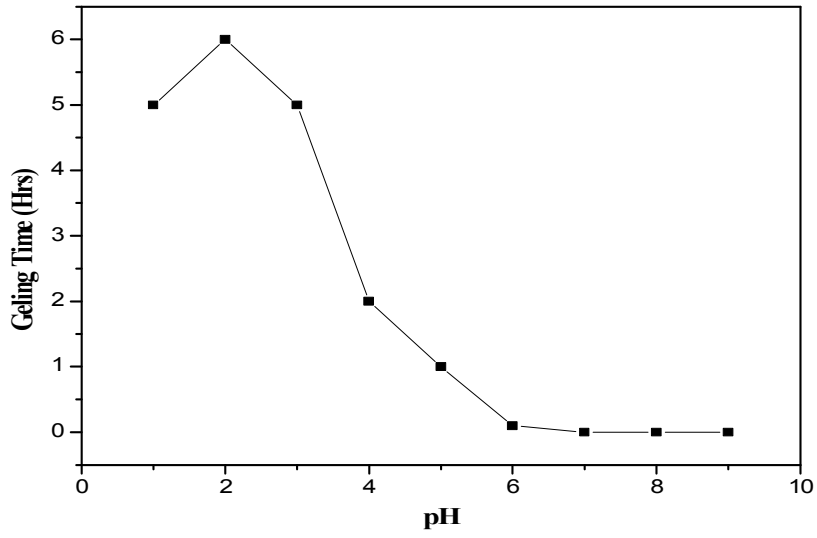


그림 11. pH에 따른 gelation time 변화

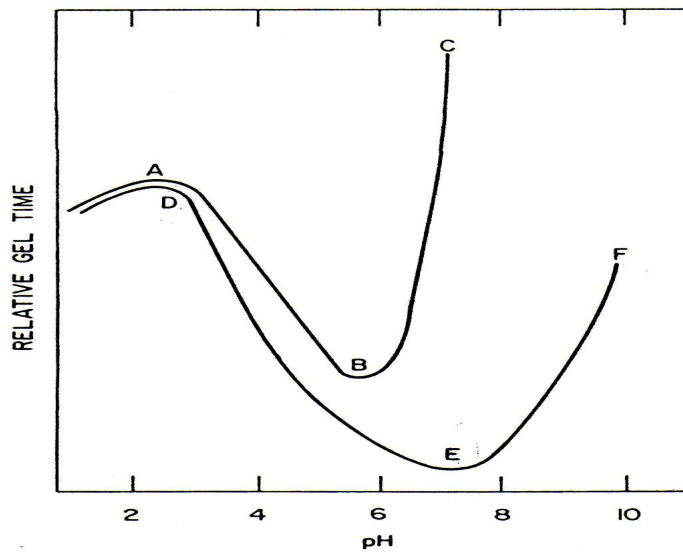


그림 12. Silica sol의 gelling시 pH 영향

(Curves A-C-sols in the absence of sodium salts ; D-F in the presence of sodium salts)

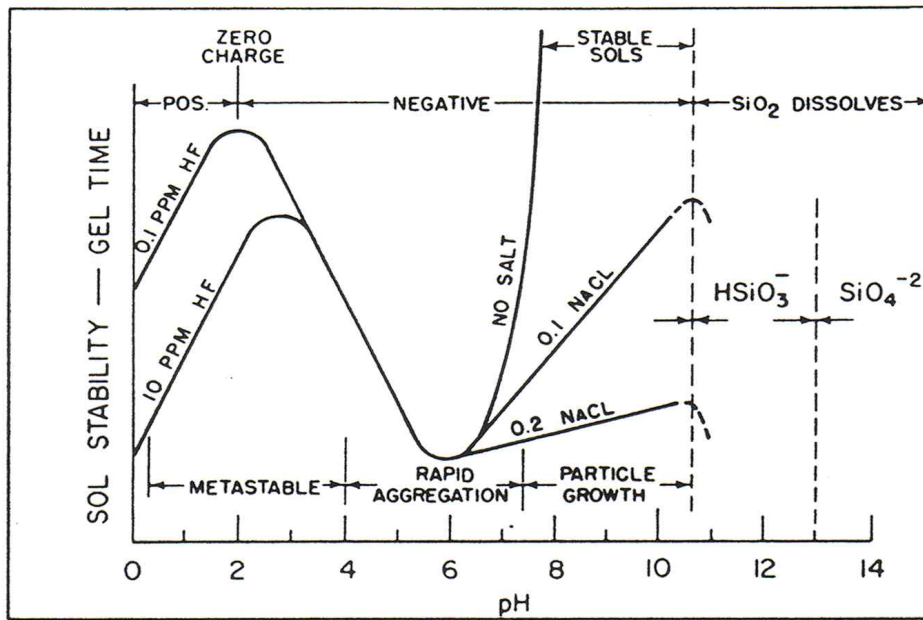


그림 13. Colloidal silica-water 상태에서의 pH 영향

#### 나. 액상 규산나트륨의 산 분해 반응 시 온도의 영향

규산나트륨의 산 분해 반응에 의한 나노 세공 실리카를 형성하는 반응에서 생성된  $\text{Si}(\text{OH})_4$ 가 생성 후 졸-겔 반응이 진행되어 3차원 망목구조로 되는 속도는 그림 14에서와 같이 pH가 과잉산에서 반응을 시작하여 pH 1과 3에서는 5시간 정도에 gel화가 완료되었고, pH 2에서 6시간으로 가장 gel화 시간이 길게 나타났으며, pH 4에서는 2시간으로 급격히 짧아졌고 pH가 6에 가까워짐에 따라 겔화시간이 급격히 빨라져서 pH가 gel화 시간에 영향을 미치는 것과 같이, 특정의 온도범위에서 Gel Time이 빨라지거나 지연되는 현상을 볼 수 있었다. 규산나트륨과 황산 반응시 두 물질의 혼합비를 제어하여 반응 후 생성되는 hydrosol의 pH를 3에 고정시켰으며, 출발물질의 온도는  $-5^\circ\text{C}$ 에서 최고  $80^\circ\text{C}$  까지 변화시키면서 겔화 시간을 측정 하였다. 그 결과 Gel화시간이 온도에 따라 다르게 나타났으며 반응물의 온도가 낮아질수록 실리카 졸로부터 겔이 되는 시간이 늦어지는 경향을 나타내고 온도가 높아질수록 겔화 시간이 짧아지는 경향을 나타내고 있다. 온도가  $-5^\circ\text{C}$ 에서는 30시간,  $0^\circ\text{C}$ 에서는 25시간,  $10^\circ\text{C}$ 에서는 12시간,  $30^\circ\text{C}$ 에서는 4시간 등으로 거의 온도 상승과 같이 비례적으로 상승하다가  $40^\circ\text{C}$  이상에서는 급격하게 gel화가 진행 되었다. 이러한 결과는 앞에서 조사한 sol-gel공정에서 pH 뿐만 아니라 규산나트륨의 산 분해 반응 시 gel화시간은 온도에도 크게 의존하는 것으로 나타났다. 이것은 silicic acid 생성 후 졸-겔 반응이 진행되는 과정에서 pH의 영향에 의한 것과 같이 온도의 증가에 의해 중합속도가 빨라지는 것으로 판단할 수가 있다. 그러므로 균일한 1차 입자를

형성시키기 위해서는 pH를 고정화 하였을 경우 온도를 가능한 낮게 제어하는 것이 균일한 세공을 갖는 시료를 제조 할 수가 있으며, 반대로 급격한 gel화가 이루어지는 60°C 이상에서는 1차 입자의 성장 응집과정이 국부적으로 일어날 가능성이 있으며 이와 같은 반응에 의한 겔의 경우 세공 분포의 불균일성이 나타날 가능성이 큰 것으로 판단된다.

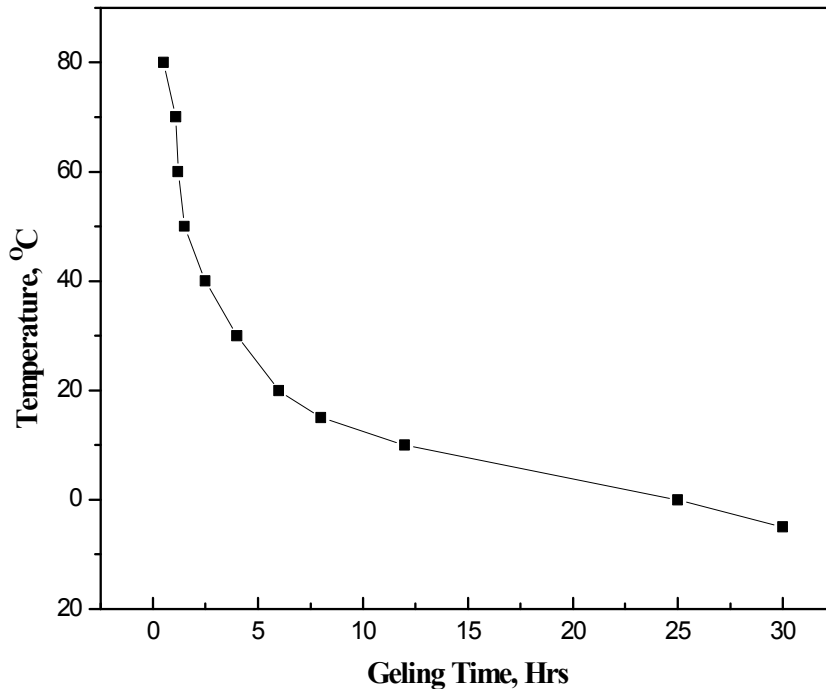
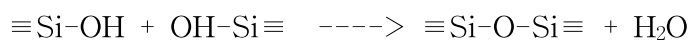


그림 14. Sodium silicate와 Hexafluorosilicic acid 상태에서의 온도에 따른 gelling time 변화

다. Hydrogel의 중합 시 pH 변화

Si(OH)<sub>4</sub> monomer로부터 gel화에 의해 생성된 hydrogel은 표면 및 내부의 nano 세공체에 -Si-OH group를 가지고 있으며 이 기능기를 적절한 온도, pH가 조정되는 R/O수(reverse osmosis 방식으로 된 membrane을 통과한 물)를 흘려주면 아래의 반응 mechanism 같이 축중합이 일어나며 이러한 중합과정을 통해 nanoporous silica의 순도를 높이고 BET surface, pore size, pore volume 등 각종 물성을 제어할 수가 있다. 이러한 수세 공정에서의 중합 mechanism을 살펴보면 그림 15에서 보이는 것과 같이 pH의 변화는 초기 과잉산의 배출에 의한 산분위기로 지속되다가 ALT의 경우 pH의 설정치인 pH 4로 근접하면서 60시간 이후에는 pH의 변화가 없었다.





이와 같은 반응 메커니즘을 갖는 hydrogel의 나노 세공 물성을 제어하기 위해 온도, pH, flow rate가 제어 될 수 있는 5L 용기에서 표면 및 내부에 존재하는 silanol 기의 축중합 수행 시 pH 변화를 측정된 결과 그림 15와 같이 나타났으며 이러한 데이터를 이용하여 최종적으로 Na<sup>+</sup>이온의 배출량을 추정하였으며 ICP에 의해 미량 성분 분석을 하였다. 1차입자의 성장 응집에 의해 생성된 hydrogel은 온도 및 pH 제어에 의해 표면 및 내부에 존재하는 -SiOH의 축중합에 의해 물성을 제어할 수 있으며 이때 내부에 존재하는 염이온의 농도는 silanol 기의 축중합에 영향을 줄 수 있으므로 수세수로 배출되는 수용액의 pH 및 Na<sup>+</sup> 이온 농도를 확인함으로써 간접적인 수세 정도를 확인 할 수 있었다. 이 결과에 의하면 초기에 과잉 산 분위기에서 반응을 수행하였기 때문에 수세수의 pH가 거의 1에 가까운 강산으로 나타났으며 30시간까지는 수세 시간에 따라 pH의 변화 속도가 빨랐으나 60시간 이후에는 BHT 및 ALT 양쪽 모두 pH 변동이 없었다. ALT의 경우 수세수에 유입되는 pH 자체가 산분위기이기 때문에 60시간 이후에는 거의 변화가 없었으며, BHT 조건에서도 60시간 이후에는 거의 유입되는 수세수에 근접한 pH 9.0 으로 유지 되었다. 그러므로 중합 공정에서의 수세수의 배출은 본 연구와 같은 졸-겔 반응의 경우 60시간 이후에는 수세수의 배출이 없이 온도만을 제어해도 축중합이 일어날 수 있다고 판단 할 수 있다.

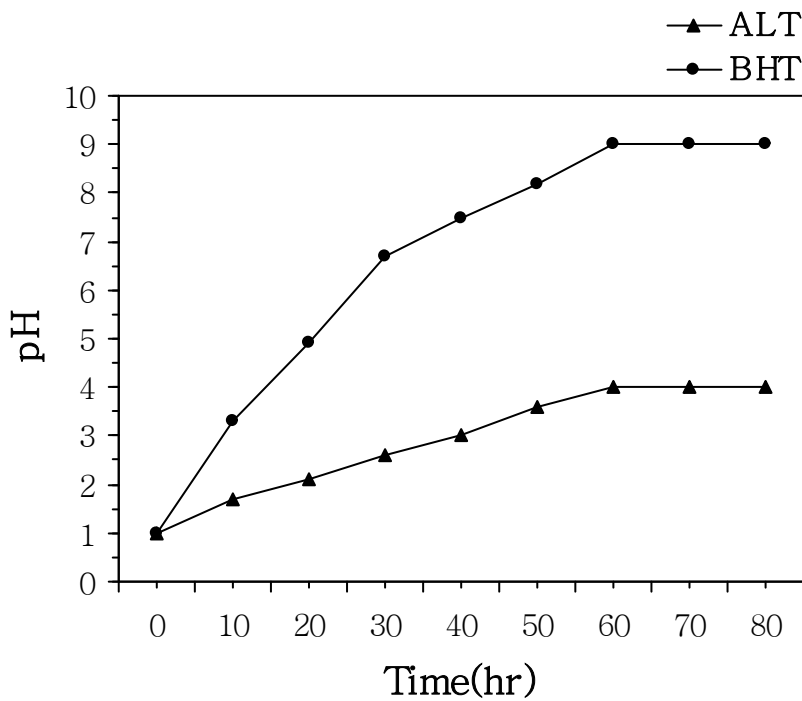


그림 15. 세척처리시간에 따른 pH 변화

라. 분석 및 물리적 특성

(1) BET 비표면적 분석

그림 16의 그래프의 중합 조건에 따른 표면적의 변화를 보면 ALT의 경우 최초의 BET 비표면적이 885m<sup>2</sup>/gr 에서 중합 시간이 지남에 따라 낮아지는 경향이 있으며 초기에는 급격히 낮아지다가 60시간 이후에는 서서히 낮아지는 경향으로 나타났다. 이러한 경향은 초기의 나노 세공 표면 및 내부에 존재하는 실라놀기(-Si-OH)가 상대적으로 많아서 중합이 빠르게 일어나다가 일정 시간 이후부터는 상대적으로 나노 세공 내외부에 존재하는 실라놀기의 감소로 중합 속도가 늦어지면서 표면적이 감소되는 경향이 나타나고 있다. 또한 BHT의 경우 초기에는 급격히 표면적의 감소로 이어지다가 60시간 이후에는 표면적의 감소율이 상당히 낮아지는 것을 볼 수 있다. 이것은 실라놀기의 중합 속도가 pH 및 온도에 크게 의존하는 것으로 나타났으며, ALT의 경우 BET 표면적을 최고 885m<sup>2</sup>/gr 에서 560m<sup>2</sup>/gr 까지 제어할 수 있었으며, BHT의 경우 885m<sup>2</sup>/gr 에서 110m<sup>2</sup>/gr 까지 제어할 수 있었다. 이러한 표면적의 제어는 향후 촉매, 정밀 화학 등의 첨가제로서 사용될 경우 중요한 물성 중의 하나이다.

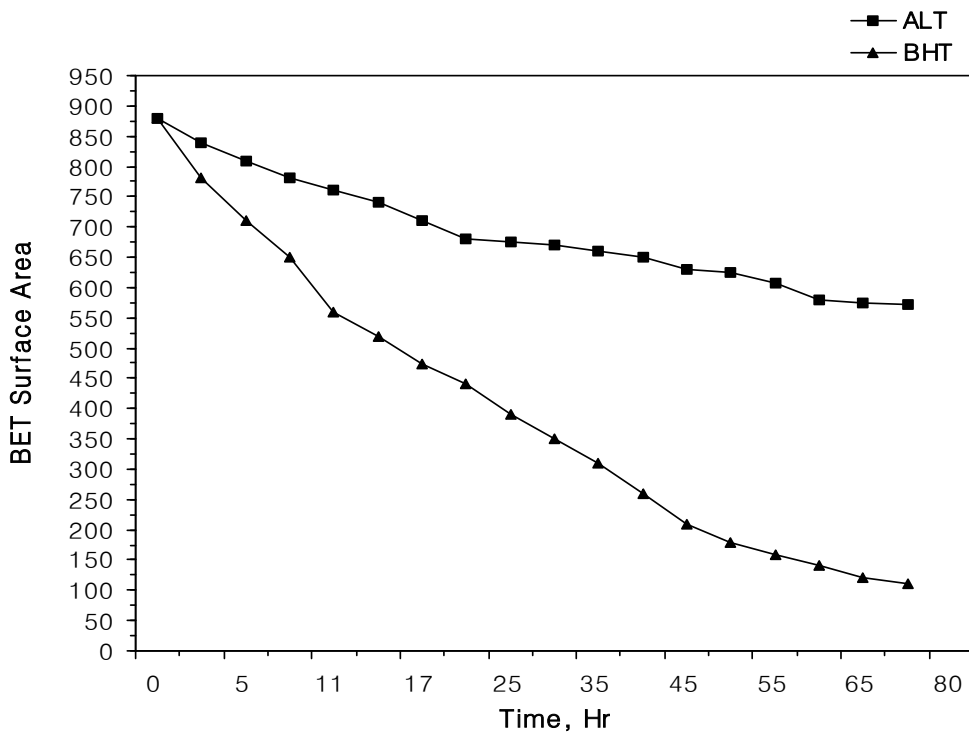


그림 16. Aging time에 따른 BET surface area 변화  
(ALT : ■ , BHT : \* )

## (2) Pore Volume

나노 세공 실리카의 용도에 따라 요구되는 물성은 다양하며 다공성 재료에 있어서는 BET 표면적 다음으로 중요한 물성은 세공 용적이다. 이는 생체 촉매 혹은 촉매 물질의 담지 능력과 관련이 있다. 중합 시간별 세공 용적의 변화는 다음과 같이 나타났다. 그림 17에서 Water titration에 의한 세공 용적의 측정결과는 BHT의 경우 세공 용적이 0시간에서 70시간까지 중합 시간의 증가와 함께 0.23~1.35ml/gr 까지 증가하였으며, BET 비표면적 값이 중합 시간의 증가와 함께 감소하는 것과 대조적으로 중합 시간의 경과와 함께 세공 용적이 증가하는 것으로 나타났다. 이러한 결과는 나노 세공 hydrogel의 내외부에 존재하는  $-SiOH$ 기의 축중합에 의해 탈수 축합이 일어나는 것과 또 한편으로는 100ppm 정도의 용해도를 지니는  $-SiOH$ 가 용해되므로 아주 작은 기공성 입자의 용해 침몰 현상으로 세공 용적이 증가하는 것으로 추정된다.

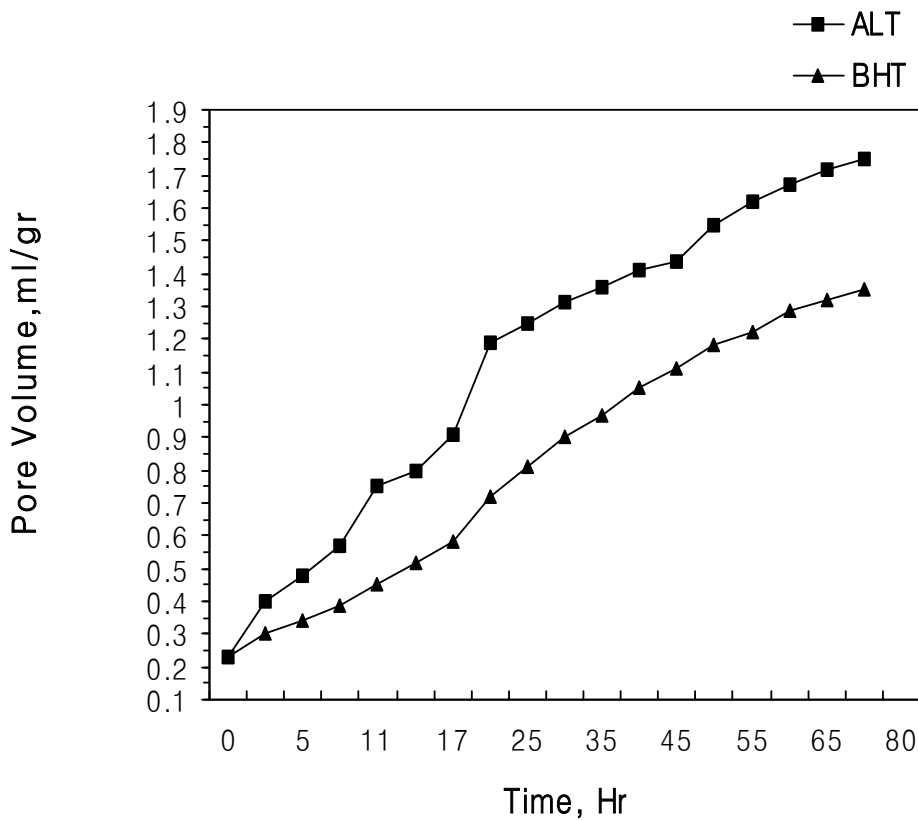


그림 17. 축중합 시간에 따른 pore volume의 변화

### (3) 강열 감량

강열감량을 측정한 자료는 나노 세공 실리카 기공 내외부에 존재하는 기능기 즉 유리수, 결합수, 실라놀기의 다소, 유무를 간접적으로 측정할 수 있는 방법이다. 측정 결과 그림 18의 그래프와 같이 ALT의 경우에는 중합시간이 0~70시간 까지 길어짐에 따라 12.7% 에서 7.6% 로 감소하였으며, BHT의 경우에는 12.7% 에서 4.4% 로 감소하였다. 이러한 결과는 ALT 및 BHT 모두 중합 초기에는 나노세공 내부 및 외부에 -SiOH가 다수 존재하였으며 중합이 진행되면서 BHT의 경우가 급격히 감소하는 원인은 -SiOH기의 급격한 축중합으로 남아있는 -SiOH group이 ALT 보다 작아 졌기 때문으로 추정된다. 또한 이러한 결과는 중합과정에서 실라놀기와 실라놀기의 축중합에 의해 실록산 결합이 형성됨으로서 더이상 무게 감소가 일어날 수 가 없음을 의미하며 ALT가 BHT 보다 무게 감소가 큰 것은 표면 및 내부에 실라놀기가 많음을 나타내는 것이다.

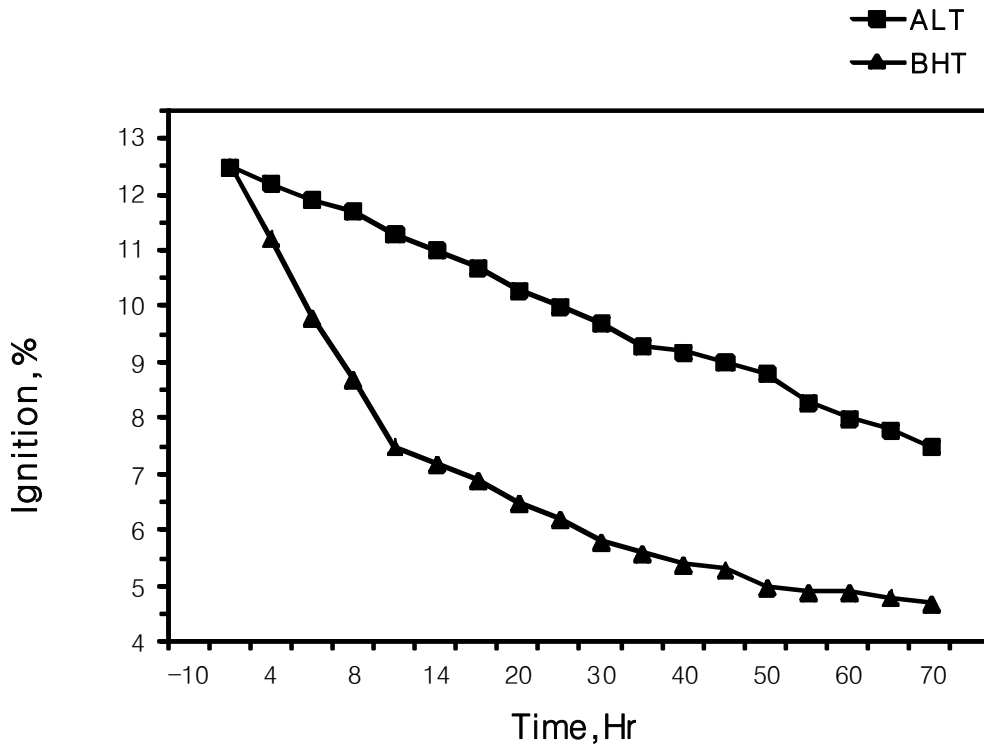


그림 18. 축중합 시간에 따른 강열감량 변화

#### (4) TGA 분석 결과

그림 19는 ALT시료와 BHT시료의 열중량 분석(TGA : Thermal gravimetric analysis, TAS-100, Rigaku, JAPAN) 결과이다. 100~150℃ 근처에서 표면에 결합되어 있는 수소결합형 수분(H<sub>2</sub>O)이 떨어지면서 큰 무게 감량을 보이며, 600℃ 이후에서는 지속적으로 중량 감소가 일어나는 것은 silanol group이 응축(condensation)되면서 siloxane bond(Si-O-Si)를 형성한 것이다. ( $\equiv\text{Si-OH} + \text{HO-Si} \rightarrow \equiv\text{Si-O-Si}\equiv + \text{H}_2\text{O}$ )

ALT의 경우는 수소결합형 수분이 BHT에 비교하여 상당히 많음을 알 수 있는데 이러한 결과는 앞에서 고찰한 흡습율 변화에서 낮은 상대습도에서도 높은 흡습율을 나타내는 결과와 관련성이 있으며, 즉, -Si-OH group의 수가 많을수록 흡습성이 강함을 나타내며 이러한 현상을 이용하여 기존의 건조제가 사용되고 있는 것이다. 또한 이러한 기능기는 효소담체에서는 active site로 역할을 하기 때문에 기능기를 제어하는 것은 중요한 연구과제이다.

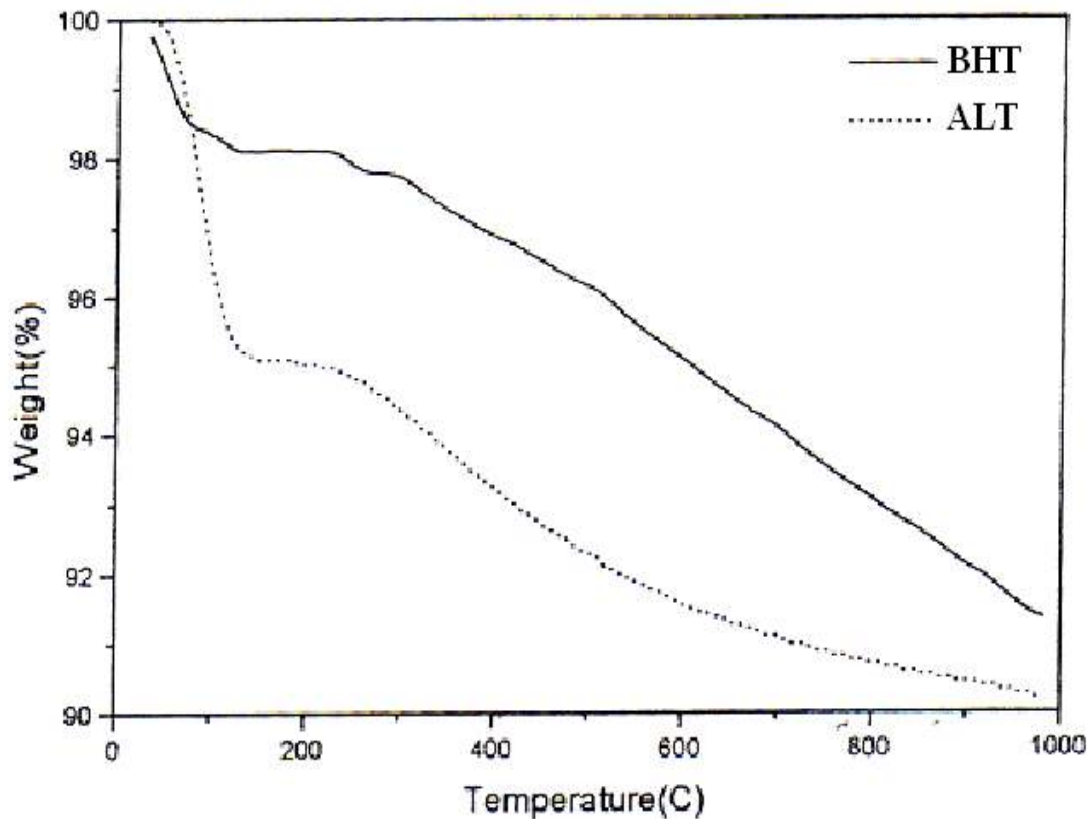


그림 19. BHT 및 ALT silica xerogel의 열중량 분석

2. Nano silica 담체에 silanization을 통한 작용기 부착

가. Silane의 농도별 영향

표 7에서 보는 바와 같이 amine silane에 비하여 소수성기를 가진 butyl silane이 높은 활성도를 나타내었으며 butyl silane의 농도는 건조 silica 무게대비 5%이상 사용시 NOVO RM-IM STD대비 양호한 결과를 나타내었으며 silane농도에 따라서는 커다란 차이를 나타내지 않았다. 이러한 결과로 볼 때 silica담체의 silanol기(Si-OH) 대비 활성기인 butyl silane은 5% 정도 이상이면 충분하다고 판단된다.

표 7. Silane 농도별 활성화도

Silane 농도 (%)	산가		
	Amine silane	Butyl silane	NOVO RM-IM STD
2.5	8.45 ± 2.25	11.85 ± 2.01	16.17
5	14.78 ± 1.75	17.23 ± 1.56	
10	15.25 ± 0.50	17.95 ± 0.35	
15	15.18 ± 0.98	17.84 ± 1.02	

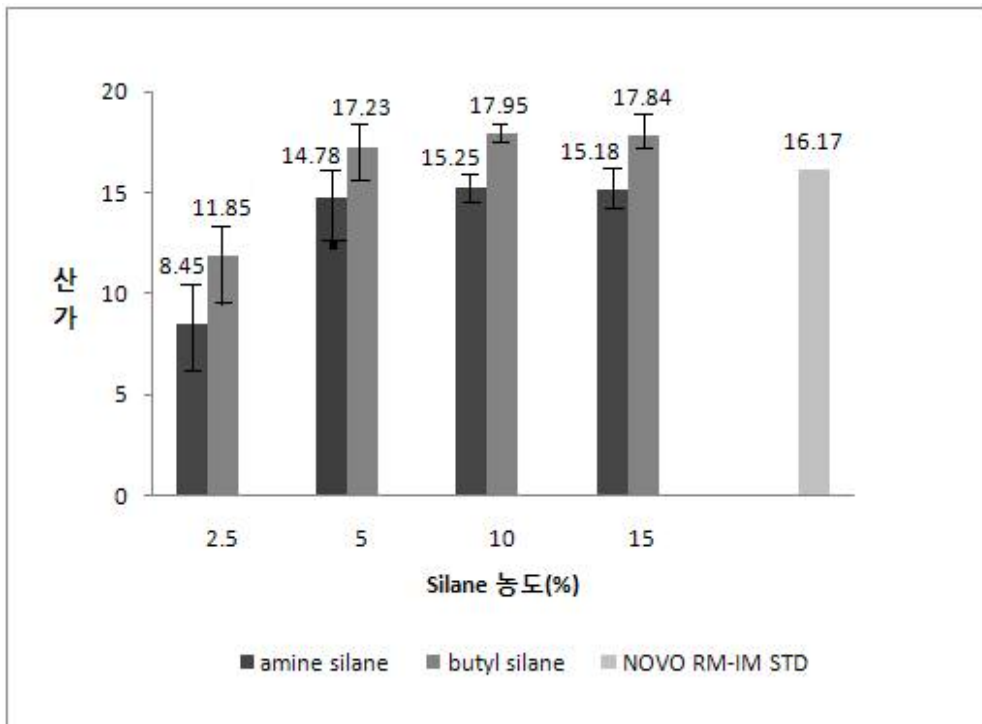


그림 20. Silane 농도별 활성화도

나. Silanization시 pH의 영향

표 8에서 보는 바와 같이 전반적으로 butyl silane을 사용한 경우가 amine silane을 사용한 경우보다 우수하였으며 silanization 반응시 pH가 높은 상태에서는 silane이 제대로 용해되지 못하고 탁한 상태를 나타내었으며 pH 1.0~3.0 사이에서 반응시 활성도가 가장 양호하였다. 이러한 결과로 볼 때 pH가 5.0 이상 되면 수용액상태에서는 silane 자체가 중합되어 활성기로서의 작용이 제대로 이루어지지 않는다고 판단된다.

표 8. Silanization시 pH별 활성도

Silanization pH	산가		
	Amine silane	Butyl silane	NOVO RM-IM STD
1.0	13.65 ± 1.05	18.26 ± 1.43	16.17
2.0	14.43 ± 0.90	18.46 ± 0.75	
3.0	15.12 ± 0.50	18.40 ± 0.55	
5.0	12.24 ± 0.78	13.09 ± 1.02	
7.0	8.12 ± 1.68	9.96 ± 1.55	
9.0	5.95 ± 2.30	6.92 ± 1.78	

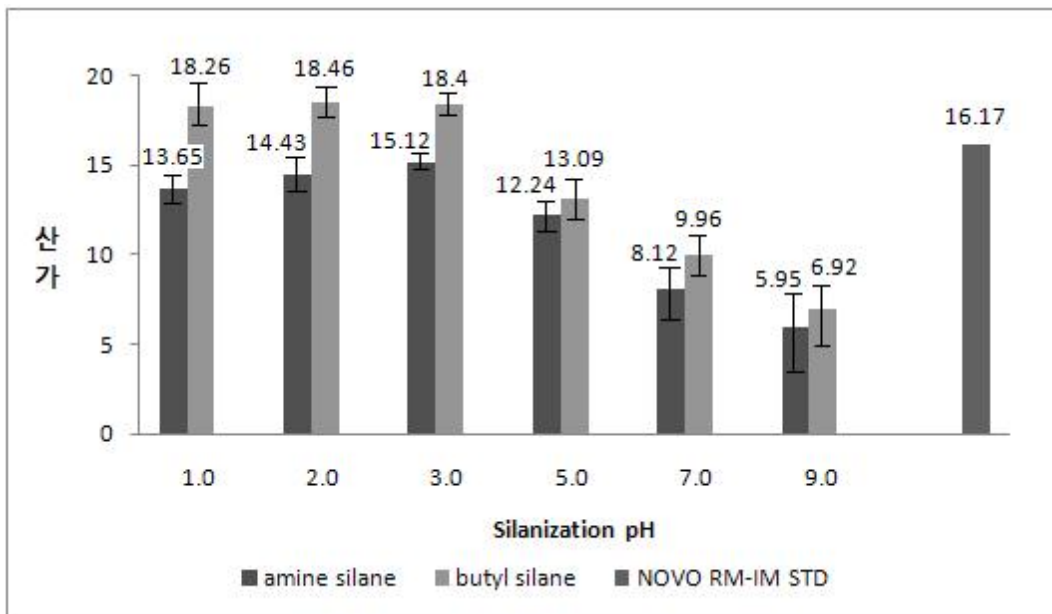


그림 21. Silanization시 pH별 활성도

다. Silanization 후 건조시 수분함량의 영향

Silanization 후 건조시 수분함량이 중요하였으며 135℃에서 2시간이상 건조하여 수분함량 2~5% 미만이 되도록 건조시켰을 때 고정화작업에는 커다란 영향이 없었다(표 9).

표 9. Silanization시 수분함량별 활성화도

수분함량(%)	산가		
	Amine silane	Butyl silane	NOVO RM-IM STD
1.0	14.09 ± 0.85	18.75 ± 0.53	16.17
2.0	15.01 ± 1.20	18.50 ± 0.85	
3.0	14.75 ± 1.50	18.50 ± 0.77	
5.0	13.94 ± 0.78	18.10 ± 1.25	
7.5	13.12 ± 1.54	15.03 ± 1.18	

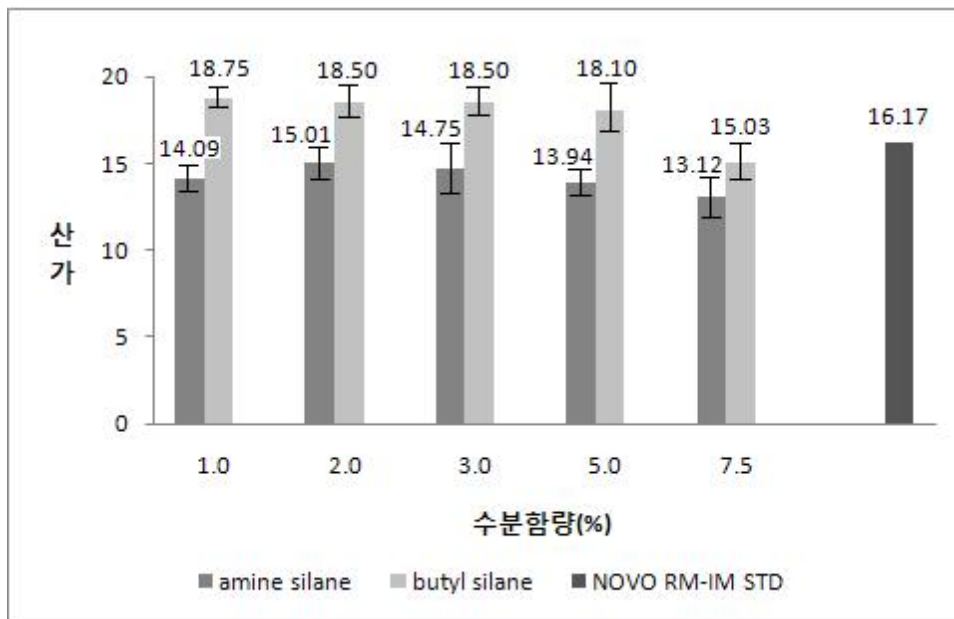


그림 22. 수분함량별 활성화도



### 3. Lipase(Palataase)의 고정화 조건검토

#### 가. 고정화 반응시 nano silica 담체의 pore size에 따른 영향

고정화 반응은 silanization 조건검토를 통해 amine silane에 비해 활성도가 우수한 butyl silane이 부착된 담체를 사용하였으며 표 10에서 보는바와 같이 pore size 15nm에서는 활성도가 거의 없었으며 30nm에서는 NOVO RM-IM제품에 비해 산생성 활성도가 양호하였으며 60nm에서는 30nm에 비해 오히려 감소하는 결과를 나타내었다. 이러한 결과를 볼 때 pore size가 작은 15nm에서는 활성기는 많이 존재하나 효소가 부착될 수 있는 공간이 부족하여 활성도가 떨어지는 것으로 판단되며 pore size가 큰 60nm의 경우는 오히려 효소가 결합할 수 있는 활성기의 수가 부족한 결과라고 판단된다. 이러한 실험결과로 볼 때 silica 담체의 pore size는 30~40nm 정도가 가장 적당하다고 판단된다.

표 10. Nano silica 담체 pore size별 활성도

Pore size (nm)	산가	NOVO RM-IM STD
15.4	4.08 ± 0.78	16.17
34.3	19.10 ± 0.23	
60.8	17.23 ± 1.01	

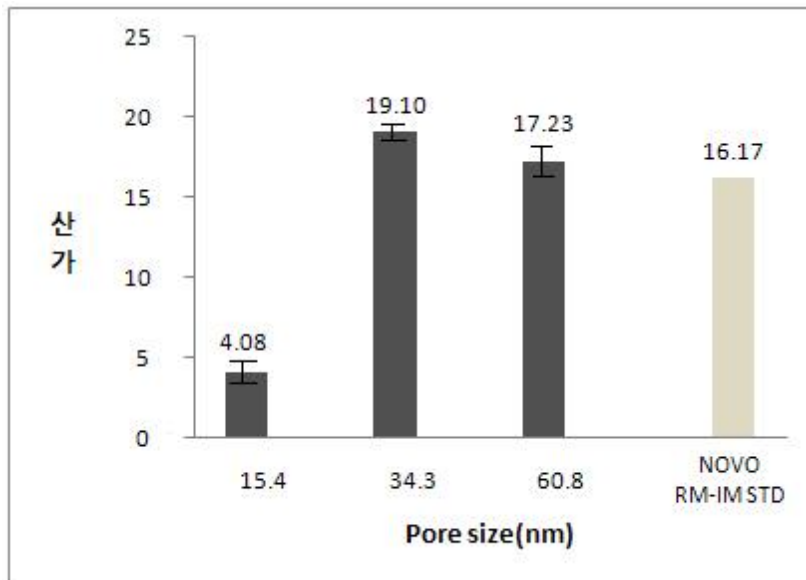


그림 23. pore size별 활성도

나. 고정화 반응시 pH의 영향

NOVO사 액상제품인 RML(=Palatase)를 건조된 silica resin과 1:1 비율로 혼합하고 교반이 가능하게 적당량의 증류수를 첨가하여 pH를 등전점 부근인 4.5, 6.0, 7.0, 8.0으로 하여 고정화 시킨 결과 표 11에서 보는 바와 같이 lipase의 등전점인 pH 4.5부근에서 고정화하는 경우가 가장 양호하였다.

표 11. 고정화시 반응 pH별 활성화도

고정화시 pH	산가	NOVO RM-IM STD
4.5	19.94 ± 0.38	16.17
6.0	16.37 ± 0.53	
7.0	15.60 ± 0.99	
8.0	11.92 ± 0.75	

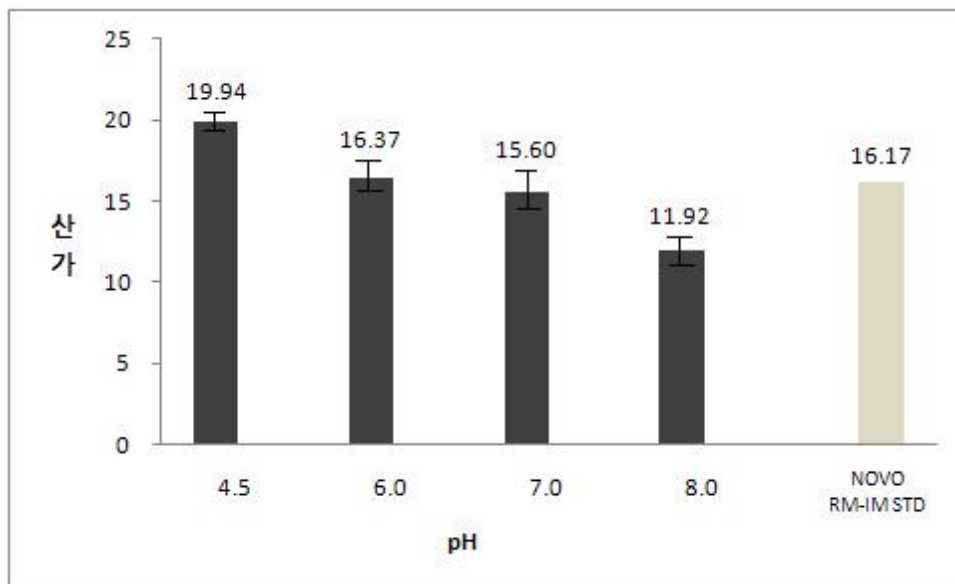


그림 24. 고정화시 반응 pH별 활성화도

다. 고정화 반응시 온도의 영향

고정화시 반응온도는 10~30℃ 사이에서는 15시간 이상 반응시 커다란 차이를 나타내지 않았으며 바람직한 반응온도는 20~30℃가 적당하다고 판단된다(표 12).

표 12. 고정화 반응시 온도에 따른 활성도

고정화시 반응온도(℃)	산가	NOVO RM-IM STD
5	18.95 ± 1.51	16.17
10	18.82 ± 1.62	
20	18.43 ± 0.69	
30	18.78 ± 0.75	
40	17.45 ± 1.24	

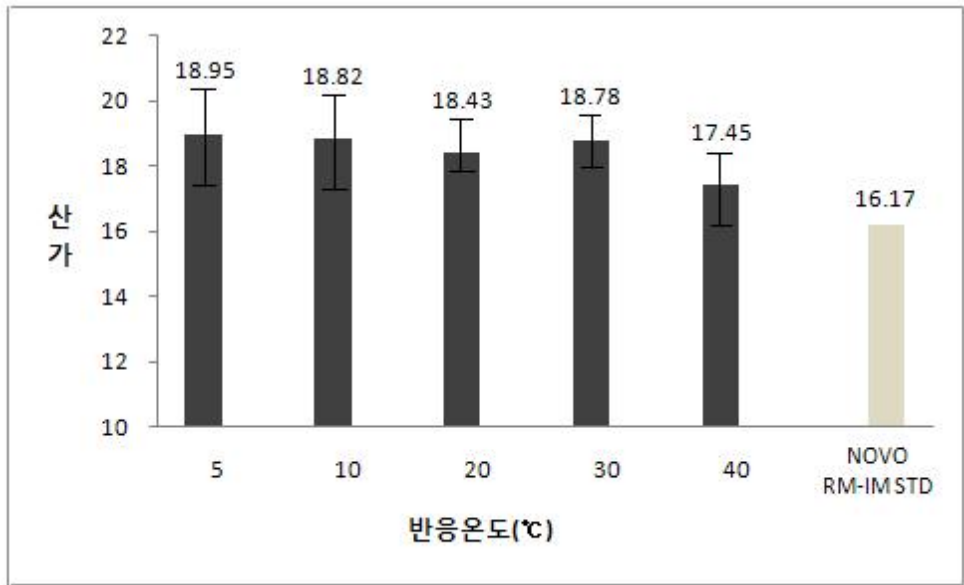


그림 25. 고정화 반응시 온도에 따른 활성도

라. 고정화시 반응시간의 영향

20~30℃에서 고정화시 반응시간은 5시간 이상이면 커다란 차이를 나타내지 않았으며 바람직한 반응시간은 5~15시간이 적당하다고 판단된다(표 13).

표 13. 고정화시 반응시간별 활성도

고정화시 반응시간(hr)	산가	NOVO RM-IM STD
2	18.13 ± 1.22	16.17
5	19.27 ± 0.85	
10	18.95 ± 0.42	
15	19.34 ± 0.76	
24	19.21 ± 1.01	

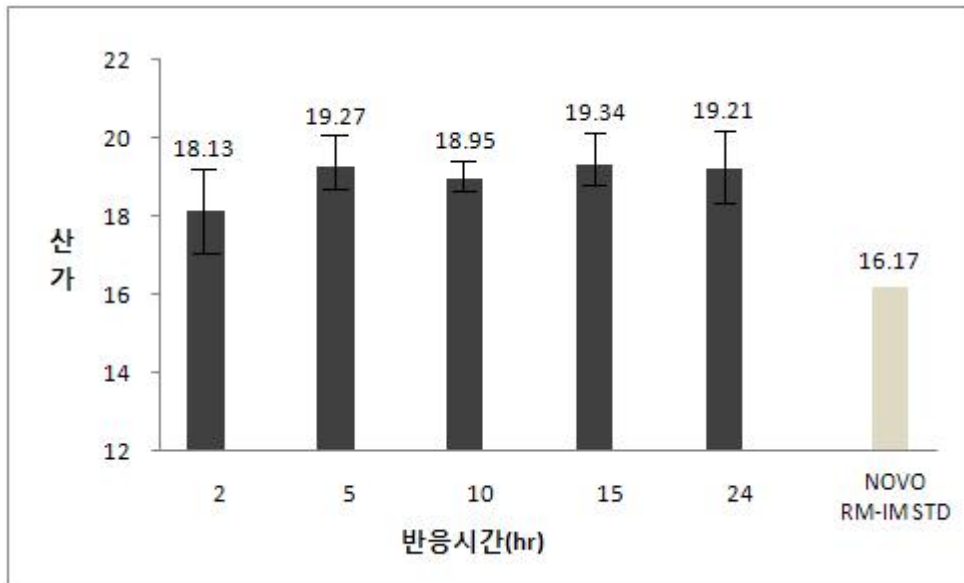


그림 26. 고정화시 반응시간별 활성도

마. 고정화 후 polyethylene imine 처리에 의한 영향

고정화 후 lipase의 활성보호를 위해 polyethylene imine을 처리한 결과 처리 농도는 0.5%~1.0%가 적당하였다(표 14).

표 14. 고정화 후 polyethylene imine 처리 농도별 활성도 변화

Polyethylene imine 농도(%)	산가	NOVO RM-IM STD
0.25	18.92 ± 1.00	16.17
0.5	18.65 ± 0.65	
1.0	19.34 ± 0.80	
2.0	12.43 ± 0.76	

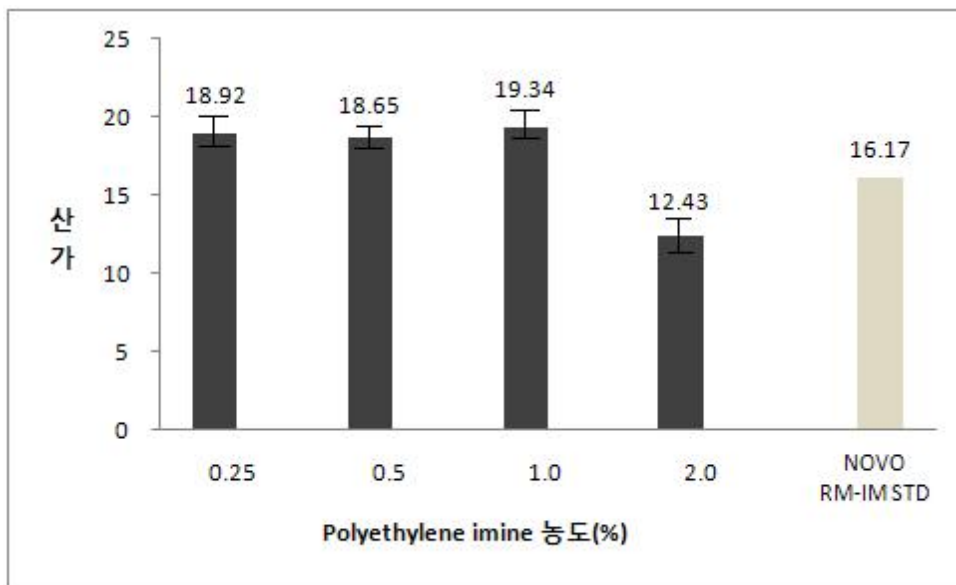


그림 27. 고정화 후 polyethylene imine 처리 농도별 활성도 변화

바. 고정화 lipase의 제품사진

34nm의 silica담체를 사용하여 고정화 전후의 제품은 그림 28과 같다.



● 30~40nm 실리카 담체  
(고정화 전)

● Butyl기 부착 후  
고정화 Lipase

● Amine기 부착 후  
고정화 Lipase

그림 28. 고정화 전후 제품사진

#### 4. Lipase(Palatase) 고정화시 최적조건

Silica 담체 pore size는 30~40nm, silanization시 silane의 농도는 5% 전후, silanization시 pH는 pH 2.0 전후, silanization 후 건조시 수분함량은 3% 미만으로, Palatase를 이용한 고정화 반응시 반응 pH는 pH 4.5 전후, 고정화시 반응온도는 20~30℃, 고정화시 반응시간은 5~15시간, polyethylene imine농도는 1% coating이 적당하였다.

위와 같은 최적조건으로 고정화 반응기를 사용하여 고정화한 후 산가측정법 및 tributyrin을 사용하여 유리되는 butyric acid를 0.05 N NaOH로 적정하는 NOVO 측정법에 따라 활성도를 측정하였다.

표 15에서 보는 바와 같이 tributyrin분해 활성이 618로 NOVO RM-IM 496에 비하여 양호하였으며 대두유 emulsion을 이용한 산가 측정법과 상관성을 나타내었다.

이때 고정화 후 여액의 tributyrin 분해활성도는 34정도로 약 18%  $\left[ \frac{34 \times 4(\text{회석배수}) = 136}{618 + 136 = 754} \right]$ 가 고정화 되지 않고 남아 82% 정도의 고정화 수율을 나타내었으며 이러한 결과는 산가측정에 의한 고정화 수율과 일치되는 것으로 나타났다.

표 15. Tributyrin 분해 활성

	누리바이오텍 제품	NOVO RM-IM STD
산가	19.94	16.17
Tributyrin 분해능(u/g)	618	496

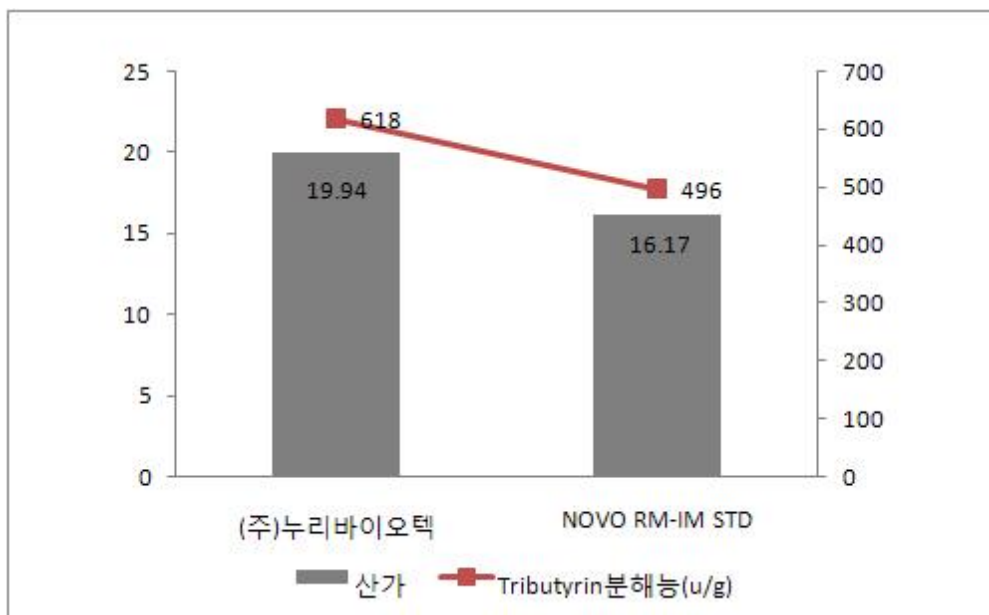


그림 29. Tributyrin 분해 활성

5. 고정화된 lipase(Palataase)를 이용한 저트랜스지방의 성분분석

가. Tristearin(SSS)의 HPLC상에서의 확인

Tristearin의 retention time을 알아보기 위해 극도경화유와 대두유 혼합물 (45:55)을 분석한 결과 그림 30와 같이 극도경화유의 peak면적이 반으로 줄어든 32.7분에 tristearin으로 확인하였다.

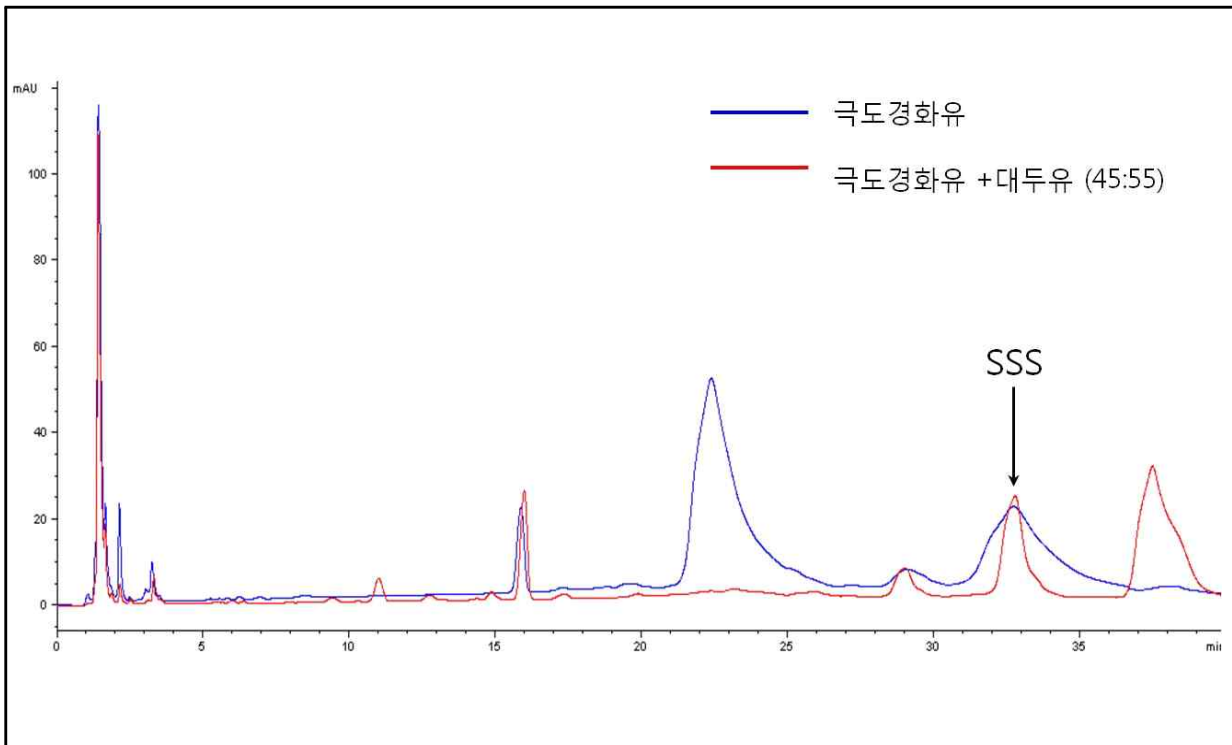


그림 30. HPLC 결과



나. 반응시간에 따른 Tristearin(SSS)의 감소경향

극도경화유와 대두유를 45:55로 혼합하여 고정화 lipase를 1% 첨가하여 70°C에서 200 rpm으로 0.5~24h 반응시킨 결과 그림 31에서와 같이 tristearin이 감소하는 것을 알 수 있었다.

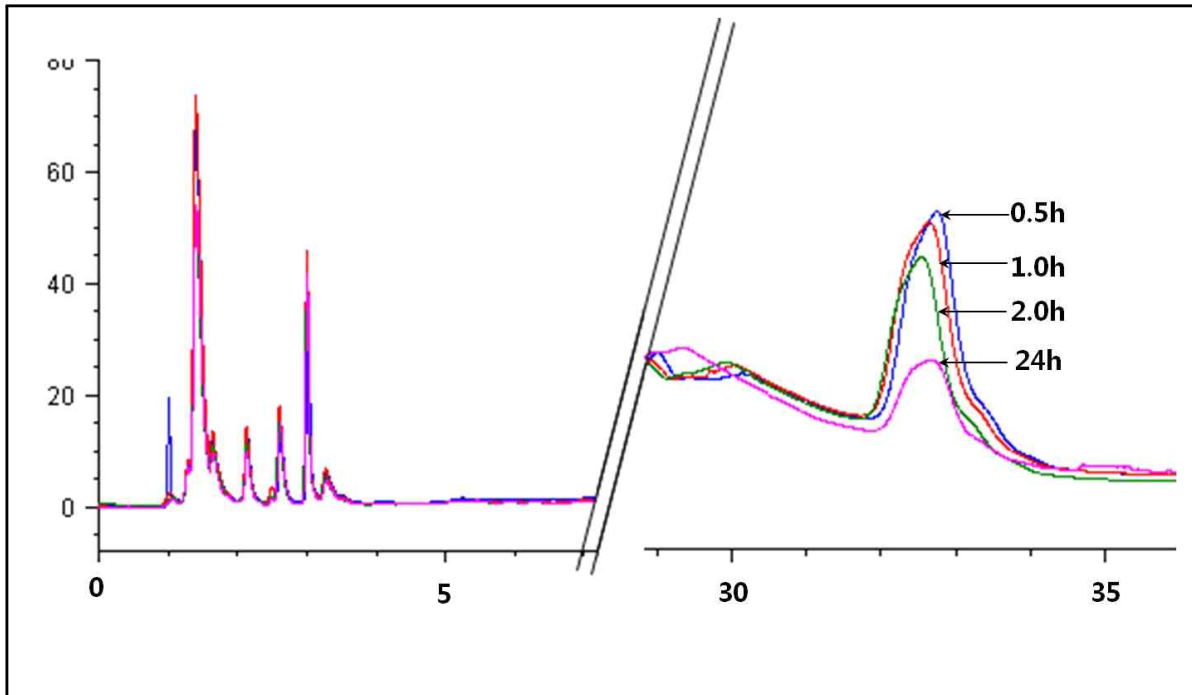


그림 31. 반응 시간에 따른 Tristearin의 변화  
(- 0.5 h, - 1 h, - 2 h, - 24 h)

다. HPLC 분석에 따른 Tristearin(SSS)의 감소비율 비교

그림 32에서 보는 바와 같이 tristearin 전환율이 반응시간이 30분일 때 NOVO RM-IM(STD)는 21.26%, 누리바이오텍 제품이 35.19%로 13.93% 높았으며 반응시간 1시간일 때는 NOVO RM-IM 42.93%, 누리바이오텍 제품 48.79%, 반응시간 2시간일 때는 NOVO RM-IM 62.61%, 누리바이오텍 제품 70.38%로 각각 5.86%와 7.77%가 누리바이오텍에서 고정화 시킨 제품이 높았다.

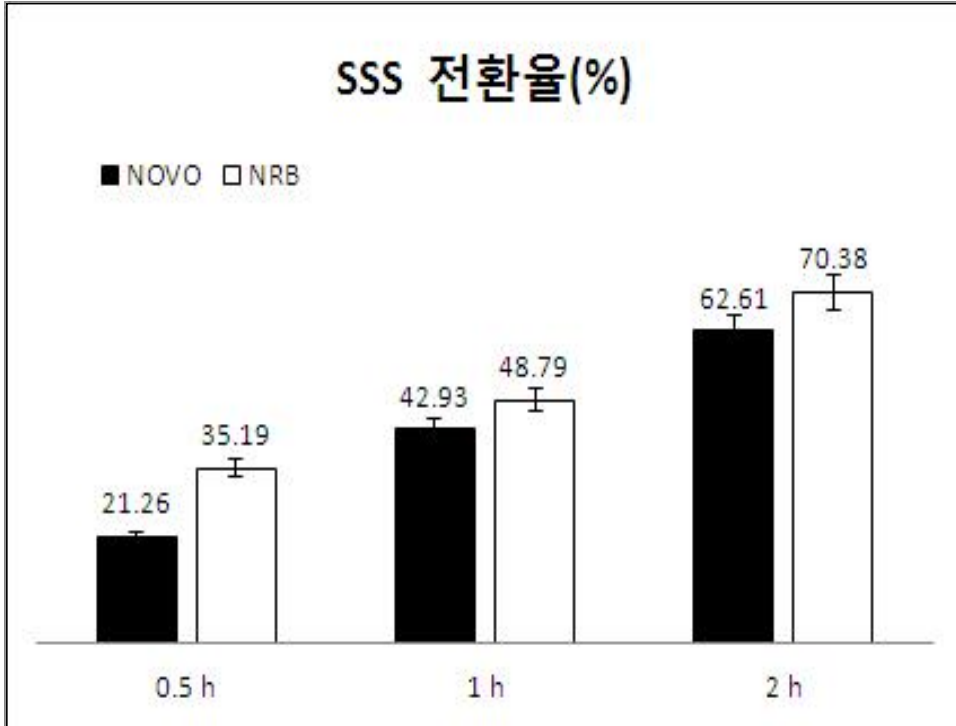


그림 32. HPLC분석에 따른 Tristearin의 감소비율 비교

- \* NOVO = NOVO사에서 시판하고 있는 고정화된 palatase
- NRB = 누리바이오텍에서 고정화한 palatase

6. 500L Pilot를 이용한 고정화 scale up조건 검토

고정화시 반응시간에 따른 활성도를 검토한 결과 표 16에서 보는 바와 같이 반응시간은 10~15시간이 가장 적당하였다.

표 16. 500L pilot를 사용 고정화시 반응시간별 활성도 변화

반응시간(hr)	2	5	10	15	24
산가	16.36	17.54	19.07	19.15	19.02
Tributylin 분해능에 의한 활성도(u/g)	509	586	603	620	611

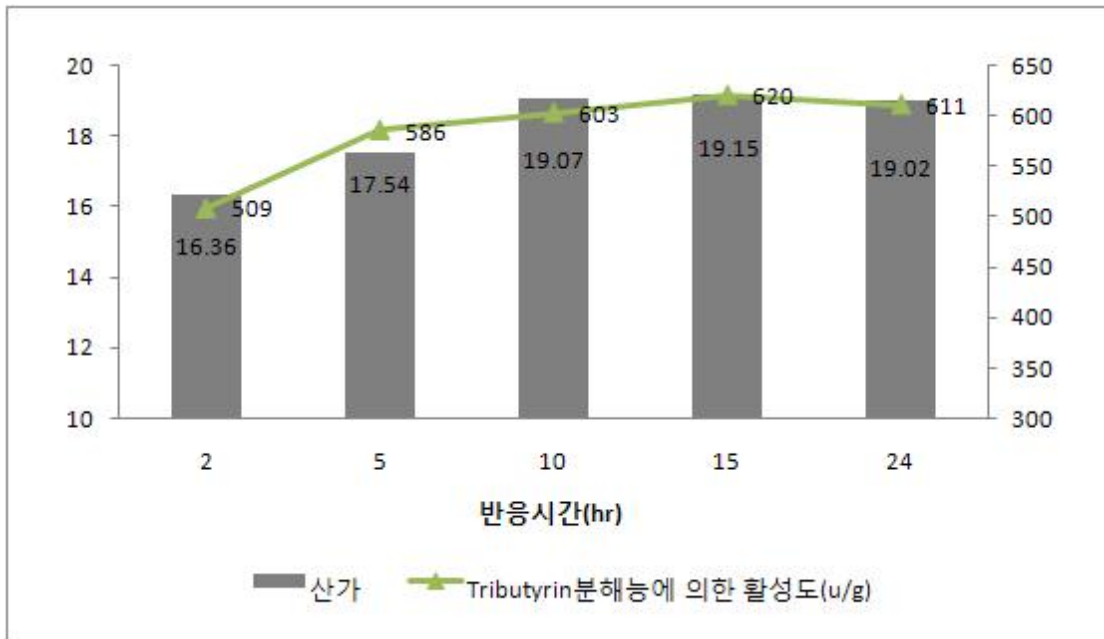


그림 33. 500L pilot를 사용 고정화시 반응시간별 활성도 변화

7. 500L Pilot scale에서의 고정화 수율

고정화 전 투입된 lipase(Palatasase)의 농도는 630u/ml로 총 12,600,000 unit (630u/ml×20L)이며 고정화 후 최종적인 여액의 volume은 95L 이었으며 tributyrin을 사용하여 활성도를 측정 한 결과 19.3 u/ml로 총 1,833,500 unit (19.3u/ml×95L) 이었다. 고정화된 lipase량은 12,400,000 unit이었다. 고정화 수율은  $\approx 85.4\%$  (630u/g×20kg - 19.3u/ml×95L) 정도로서 양호한 결과를 나타내었다.

8. 50L Pilot용 반응기를 이용한 저트랜스지방 생산 scale up조건 검토

극도경화유 10kg을 50L Pilot용 반응기에 넣고 온도를 70℃로 올려 완전히 용해시킨 후 고정화된 lipase 200g을 첨가하여 교반하면서 대두유 10kg을 천천히 투입하여 온도를 70℃로 유지하였다. 투입이 완료된 후 2시간, 5시간, 10시간, 20시간, 30시간 별로 각각 sample을 채취하여 Tristearin(SSS)이 감소되는 정도를 HPLC를 통하여 분석한 결과 표 17과 그림 34에서 보는 바와 같이 20시간에 Tristearin이 96.93% 전환되고 30시간에는 98.34% 전환되어 반응시간은 20~30시간이 적당하였다.

표 17. HPLC 분석을 통한 효소와 유지의 시간별 반응물의 SSS 전환율 결과

시간	SSS 전환율 (%)
2h	38.68 ± 2.05
5h	54.12 ± 2.48
10h	73.88 ± 0.69
20h	96.93 ± 1.03
30h	98.34 ± 0.38

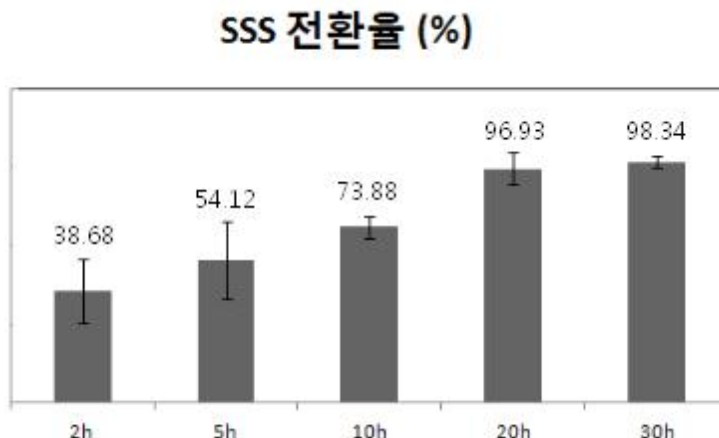


그림 34. HPLC 분석을 통한 효소와 유지의 시간별 반응물의 SSS 전환율 결과

## 9. 반응시 recycling 횟수에 따른 Tristearin 함량변화

고정화된 lipase의 내구성 및 활성도 유지상태를 확인하기 위해 그림 7의 효소반응기를 사용하여 극도경화유와 대두유의 혼합비율을 1:1로 하여 고정화 효소를 혼합유 대비 2% 넣고 70℃에서 20시간씩 20회 반응시키며 Tristearin의 함량변화를 관찰한 결과 1회 반응시 NOVO사의 Lipozyme RMIM은 98.21%, (주)누리바이오텍에서 개발한 NRB-RMIM은 97.25%를 나타내었으며 10회 반응시 NOVO Lipozyme RMIM 94.25%, NRB-RMIM 95.38%, 20회 반응시 NOVO Lipozyme RMIM 93.37%, NRB-RMIM 93.52%를 각각 나타내어 본 과제를 통하여 (주)누리바이오텍에서 개발된 NRB-RMIM은 NOVO사의 Lipozyme RMIM과 동등수준의 활성을 유지하였다.(그림 35).

고정화효소의 내구성 및 반응성을 검토하기 위해 (주)누리바이오텍에서 선행연구되었던 CPC-deacetylase(본 연구와 유사한 silica resin 고정화효소)의 연구결과와 비교해보았다. CPC deacetylase는 100회 반응시 활성도가 76% 유지되었으며, 200회이상 반응이 되었던 고정화 효소로서 20회 반응후 각각의 활성변화를 보면 CPC deacetylase는 56kU에서 53kU로 94.6% 활성이 유지된 반면 본 과제에 의해 개발된 NRB-RMIM의 활성은 97.25%에서 93.52%로 96.2% 활성이 유지되었다. 이 결과는 NRB-RMIM을 충분히 100회 이상 반복사용이 가능함을 보여준다. 아울러 NRB-RMIM을 이용한 내구성 및 반응성에 관한 실험은 100회 이상을 목표로 계속 진행 중이다.

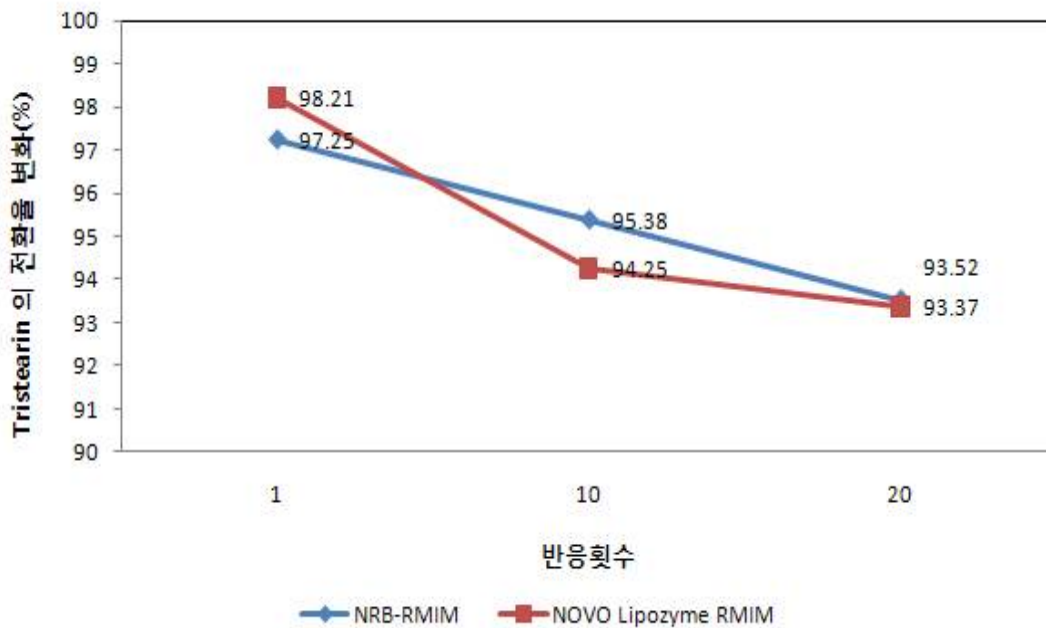


그림 35. 개발된 고정화효소(NRB-RMIM)와 기존제품(NOVO Lipozyme RMIM)과 반응성비교

## 제 4 장. 목표달성도 및 관련분야에의 기여도

### 제 1 절. 연구목표 및 내용

#### 1. 연구목표

본 과제에서는 국내기업이 공급하는 가격 경쟁력있는 lipase를 공급받아, 본사에서 보유한 효소의 고정화 기술을 이용하여 OH기를 갖는 30~40nm의 nano silica 담체에 silanization을 통하여 lipase가 효율적으로 결합할 수 있는 소수성기를 가진 N-(n-butyl)-3-aminopropyl trimethoxy silane을 결합시킨 resin을 개발하여 lipase를 고정화하고자 한다. 또한 개발된 고정화 lipase를 사용하여 생물전환공법에 의해 식품에 적용하여 효율성을 확인하여 식품산업에 적용되고 있는 저트랜스지방을 함유한 유지 생산공정을 개발하고자 하였다.

#### 2. 연차별 연구개발 내용

##### 가. 1차년도

본사가 보유한 효소 고정화기술을 이용하여 30~40nm의 pore size를 갖는 nano silica 담체를 개발하고 개발된 담체의 표면에 N-(n-butyl)-3-aminopropyl trimethoxy silane을 사용하여 silanization을 통해 소수성 butyl기를 부착시키는 기술을 개발하고 개발된 소수성기를 가진 고정화용 담체를 이용 활성도 50IUN으로 농축된 lipase를 사용하여 담체 1g당 150IUN되게 고정화를 한다. 실험실 단계에서 연구 개발된 고정화용 담체를 이용하여 식품에 적용시켜서 기존의 식품과 본 과제를 통해서 얻어진 식품의 차이를 확인하였다.

##### 나. 2차년도

고정화된 lipase를 사용하여 저트랜스지방을 생산하기 위해 반응장치, 반응온도, 반응속도, 반응시간, recycling횟수 등을 최적화한다. 대량 생산된 lipase를 통해, 기존의 방식에 의한 식품과 본 과제를 통해 얻은 식품의 차이를 확인하고, 효율성 및 경제성을 검토하였다.

## 제 2 절. 연구개발 목표달성도 및 기여도

### 1. 연차별 연구개발의 목표달성도

구분 (연도)	연구개발 목표	세부연구내용	연구범위	달성도(%)
1차 년도 (2012)	Lipase(Palataase) 고정화용 nano silica 담체 제조시 pore size 30~40nm 조절	1차적으로 중합된 silica를 수열처리과정에서 압력 및 온도를 조정하여 30~40nm의 pore size를 갖게 조절	1차중합 silica pore size : 5~10nm BET표면적 : 300~800m <sup>2</sup> /g 수열처리 후 pore size : 30~40nm BET표면적 : 80~120m <sup>2</sup> /g	100
	Nano silica담체의 silanization에 의한 butyl기 부착조건 확립	부착시 반응pH, 반응온도, 반응시간, butyl silane의 농도에 따른 부착조건 검토	각 조건별로 lipase를 고정화하여 oil과 반응시 분해되어 생성되는 산생성능을 NaOH로 중화하여 측정	100
	Lipase(Palataase) 고정화조건 확립	고정화 반응시 pH, 온도, 반응시간에 따른 고정화율 검토(NOVO사의 Lipozyme RM-IM을 표준으로 하여 활성도 비교)	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Tributyrin을 사용하여 lipase의 반응에 의해 유리되는 butyric acid를 0.05N NaOH로 적정하여 활성도 측정</li> <li>• 고정화수율이 80%이상 되게 반응조건 검토</li> </ul>	100
	고정화lipase를 적용시킨 저트랜스지방의 성분분석 (위탁과제)	TLC를 사용하여 합성된 저트랜스지방의 지방산 조성분석	NOVO사의 Lipozyme RM-IM을 표준으로 하여 활성을 비교	100
2차 년도 (2013)	Lipase고정화시 scale up 조건 확립	고정화시 pH, 온도, 시간, 건조조건 등을 검토하여 고정화 수율이 80%이상 될 수 있도록 개발, NOVO사 제품과 동등 이상의 활성도(150 IUN)를 갖는 제품개발	우선적으로 NOVO사 액상 제품인 Palatase(RML)을 이용하여 scale up조건을 확립하고 이차적으로 국내 업체인 제노포커스에서 생산되는 RML, TLL 등에 적용시킬 수 있는 기술개발	100
	연속적으로 반응시킬 수 있는 반응장치 제작 및 전환반응 scale up조건 확립	반응시 반응온도, 반응속도, 반응시간, recycling횟수(안정성) 등을 검토하여 최적화	Column을 이용하여 반응시 압력이 걸리지 않도록 resin의 particle size 및 내구성 등을 I사 및 C사 등사용업체와 협력하여 개발	95
	사용기질에 따른 반응조건 및 분석조건 확립 (주관 및 위탁기관)	분석시 사용기질에 따라 column, 용매, 이동상 등의 가동조건 검토를 통해 최적의 분석방법 확립	Tristearin의 감소비율을 통해 효소의 활성을 확인하고 Triglyceride의 조성을 분석	100
	Lipase를 적용한 식용유지 성분분석 (위탁기관)	극도경화유와 식물성 유지의 혼합비율에 따른 물성 변화 및 지방산 조성 분석	HPLC와 GC를 사용하여 트랜스지방 함량 분석	95

## 2. 관련 분야에의 기여도

### 가. 기술적 파급효과

20세기의 물질적 풍요를 주도하던 화학 산업은 원료 화학물질을 다른 물질로 전환하여 부가가치를 올리는 작은 개념에서 출발하였으나, 오늘날에는 대규모 산업으로 급속히 성장하고 있다. 이러한 화학 산업의 급속한 발전은 전자, 기계, 소재산업을 포함한 모든 산업발전에 획기적으로 기여하였으나 고온, 고압, 유독성 용매에 의한 산업안전문제 및 폐수에 의한 환경오염문제 등의 새로운 문제점을 야기하고 있기 때문에 화학합성 공업술(bioconversion technology)은 생체 내에 존재하는 복잡 다양한 생체물질의 불활성기(unactivated position)에 정확하게 작용하는 생체기능을 이용하여 원료 화학물질을 고부가가치의 산물로 전환시키는 생물공정이다. 이러한 생물전환기술의 핵심은 균주개발, 생체촉매의 고정화, 생체촉매를 사용한 생물전환기술 등인데 국내에서는 지금까지 고정화된 생체촉매를 외국으로부터 직접 고가에 수입하여 사용하거나, 고정화되지 않은 생체촉매 자체를 일부 분야에서 사용하고 있는 실정이다. 나노/바이오 융합 기술을 이용한 생물전환 연구는 국내외의 많은 연구팀에서 연구하고 있으나, 연구결과를 산업 현장에 적용한 예는 많지 않은 것이 현실이다. 특히 30~60nm 전후의 생체촉매를 이용하는 촉매의 탐색 및 생물전환에 관련된 기초연구에 대해서는 다수의 연구팀이 연구하고 있으나 이를 상업적으로 적용하기 위한 응용연구는 초기 단계에 있으며 해외와의 수준격차가 있는 것이 현실이다. 또한 이러한 생체촉매를 사용하기 위해 고정화 하는 고정화소재 및 고정화기술 또한 자체 소비용 외에는 상업적으로 생체 촉매를 사업화한 예가 국내에는 없는 실정이다. 국내에서는 현재 저트랜스지방 제조를 위해 대부분 화학적 처리방법을 사용하고 있으며 일부 생물전환공법을 사용시 NOVO사와 DSM사에서 methacrylic resin이나 silica resin에 고정화시킨 lipase를 사용하고 있는 실정이다.

본 과제에서는 (주)누리바이오텍이 보유한 효소의 고정화 기술을 이용하여 그림 36, 37과 같이 1차적으로 중합된 silica gel을 사용하여 압력과 온도조절에 의한 수열처리(hydrothermal treatment)를 거쳐 pore size가 30~40nm인 nano silica resin을 개발하고 OH기를 갖는 30~40nm의 nano silica 담체에 silanization을 통하여 lipase가 효율적으로 결합할 수 있는 소수성기를 가진 N-(n-butyl)-3-aminopropyl trimethoxy silane을 결합시킨 resin을 개발하여 lipase를 고정화하고자 하였으며(그림 38) 개발된 고정화 lipase를 사용하여 그림 39와 같은 장치를 이용하여 생물전환공법에 의해 식품산업에 널리 이용되는 마가린, 쇼트닝 및 기능성 가공유지 등의 저트랜스지방을 함유한 유지 생산공정을 개발하였다.





그림 36. Preparation of nano porous silica

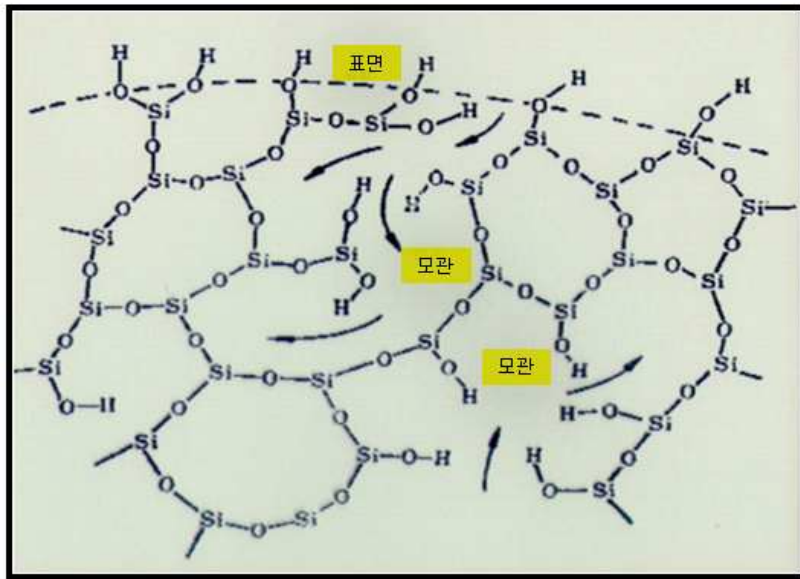
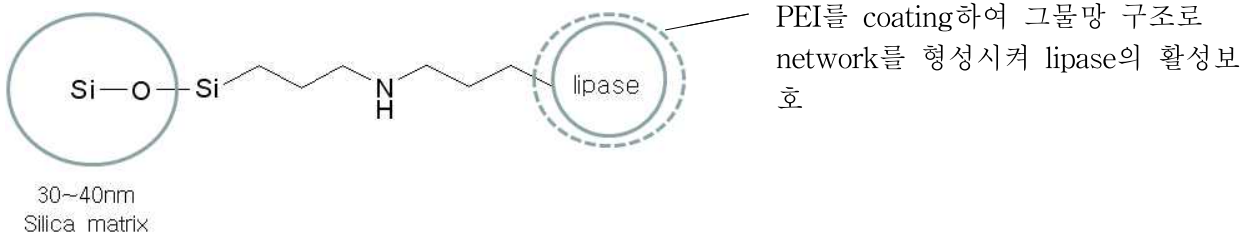


그림 37. 나노 세공 표면 및 내부의 Silanol 구조



소수성 butyl기를 가진 N-(n-butyl)-3-aminopropyl trimethoxy silane을 active group으로 부착시킨 후 lipase를 흡착시켜 고정화

그림 38. Structure of immobilized lipase

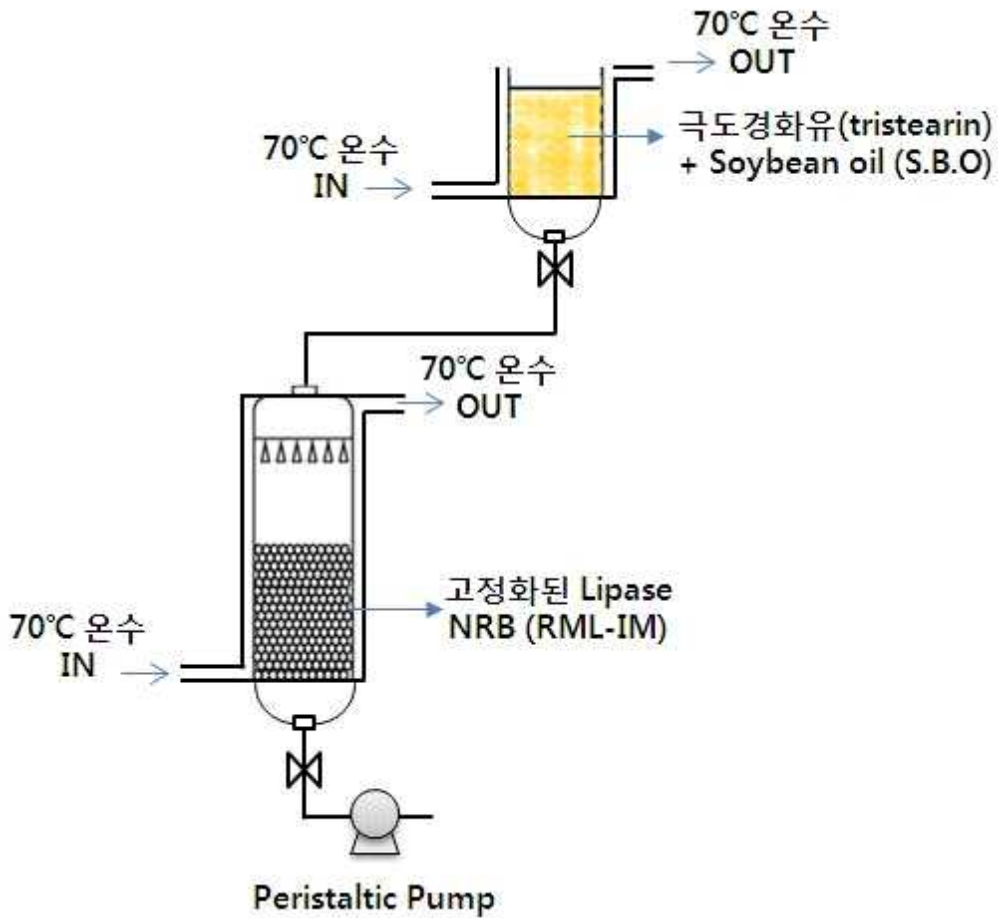


그림 39. 저트랜스지방 제조를 위한 반응실험 장치

나. 경제적 파급효과

식품에 적용하기 쉬운 경화유 제조공정은 식물성유지들(대두유, 옥수수 배아유, 카놀라유, 면실유)을 수소첨가에 의하여 경화시키는 공정을 거치게 되고 이로 인해 트랜스지방이 다량 생성되어 지는 것으로 알려져 있다. 유지공업에서 이러한 트랜스지방을 낮추는 방법으로는 일반적으로 경화공정시 전기촉매법이나 초임계용매법, 분획법 등을 많이 사용하고 있다. 효소를 사용한 생물전환공법은 energy 소비가 절감되며 제품의 품질과 생산성면에서 화학적공법에 비하여 장점을 가지고 있다. 또한 수입에 의존하는 고정화 효소를 국내에서 자체적으로 개발하여 사용시 커다란 원가절감의 효과가 있을 것으로 예상된다(표 18, 그림 40). 근래에 들어서는 유전자 조작을 통하여 대두, 옥수수 등에서 linoleic acid 대신 안전성이 우수한 oleic acid 함량이 많은 품종을 개발하여 사용하고 있다.

표 18. Esterification의 화학적 방법과 효소적 방법의 비교

Esterification 방법	장 점	단 점
<p style="text-align: center;"><b>화학적 방법</b> (Sodium methoxide사용)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 초기 시설투자가 적고 공정이 비교적 간단</li> <li>• 소량 다품종에 적합</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 수분이 0.01%되게 고온의 건조공정이 필요 (energy소비가 많음)</li> <li>• 촉매제거 및 세척 공정에서 폐수 및 불필요한 부산물 발생·탈취 공정 필요</li> </ul>
<p style="text-align: center;"><b>효소적 방법</b> (RM-IM, TL-IM)</p>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 화학적방법보다 낮은 온도에서 반응</li> <li>• Specificity를 가져 공정이 효율적으로 이루어지며 폐기물이 적음</li> <li>• 제품의 품질과 수율이 높음</li> <li>• 고정화 효소를 사용함으로 촉매의 재사용이 가능</li> </ul>	<ul style="list-style-type: none"> <li>• 고정화 효소를 수입에 의존하므로 고비용 (NOVO, Roche 등)</li> <li>• 연속적으로 효소를 재사용함으로 세심한 효소의 관리가 중요</li> </ul>

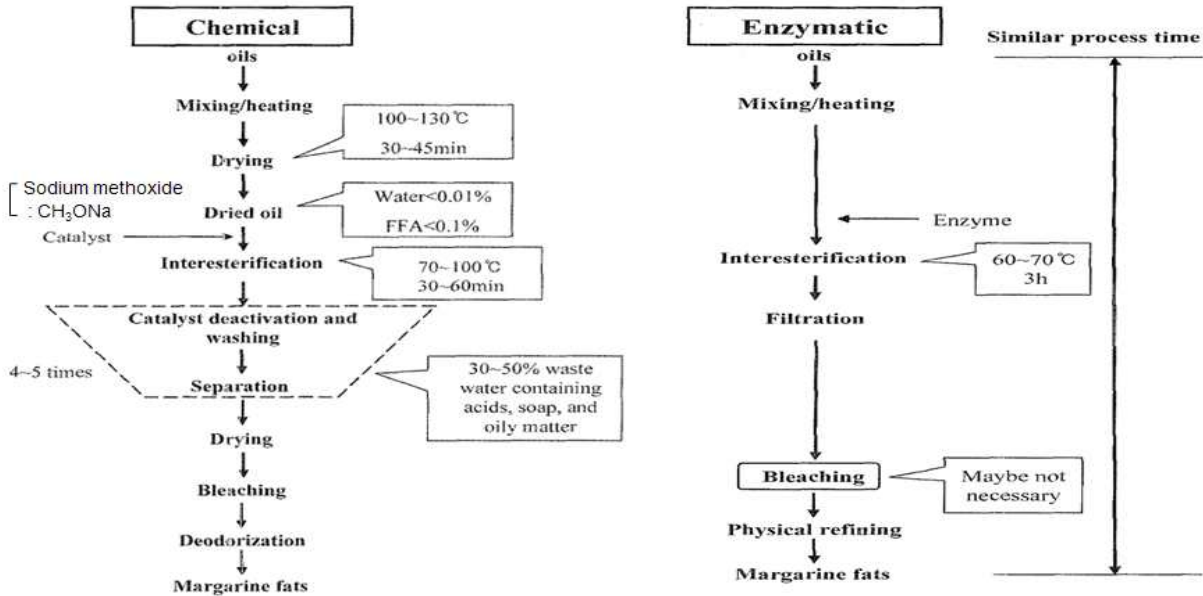


그림 40. Production of margarine using chemical and enzymatic interesterification.

현재 가장 많이 시도하는 방법은 에스테르교환방법으로 transesterification 기능을 가진 lipase를 사용하여 기존의 중성 지질에 결합되어 있는 지방산의 위치를 교환시켜 transform의 지방산이 생성되지 않게 하는 방법이다.

이러한 lipase를 경제적으로 사용하기 위해서는 일회용이 아니라 100회 이상 반복적 사용을 위해 다공성을 가진 담체에 고정화시키는 기술이 필요하며 이미 선진국의 NOVO(덴마크), DSM(네덜란드), Roche(독일), BASF(독일), Lonza(독일), Amano(일본)사 등에서 제품화되어 있다. NOVO사 제품의 경우 RMIM(*Rhizomucor miehei* 유래 고정화된 Lipase)의 경우 kg당 100만원 정도이며 CAL-B-IM(*Candida antarctica* 유래 고정화된 Lipase)의 경우 kg당 200만원 정도로 수입되어 사용되어지나 본 과제를 통하여 국산화에 성공시 가격을 수입가의 10%의 수준인 10~20만원으로 생산할 수 있다.

## 제 5 장. 연구개발 성과 및 성과활용 계획

### 제 1 절. 실용화 및 산업화 계획

#### 1. 실용화, 산업화 및 기술확산 계획

본 연구를 통하여 30~40nm의 pore size를 갖는 silica 담체를 개발하였으며 소수성 butyl silane을 functional기로 결합시켜 고정화시킴으로써 국내 유지회사에서 수입에 의존하여 사용하고 있는 NOVO사나 DSM사의 고정화 lipase에 비해 동등 이상의 활성과 내구성을 가진 제품을 개발할 수 있었다.

아직까지 국내에서는 C사 및 L사에서 일부 고가의 제품에만 수입산 제품을 사용하고 있으며 나머지 O사, I사, S사 등은 아직도 화학적 방법으로 저트랜스지방을 생산하고 있으며 고정화 lipase를 사용하는 공법은 검토중에 있는 실정이다.

(주)누리바이오텍에서는 본 연구를 통하여 얻어진 개발기술을 식품분야의 저트랜스지방 제조에 경제적으로 사용할 수 있도록 적극적으로 마케팅 전략을 수립하여 추진할 예정이며 nano silica 담체를 이용한 효소고정화 기술을 활용하여 CAL-B(*Candida antarctica* lipase-B) 유래의 lipase 고정화기술을 개발하여 제약, 정밀화학 및 bio-diesel 산업으로의 영역 확대를 목표로 하며 가격 및 품질의 경쟁력을 확보하여 동남아 및 중국 등의 해외시장에의 수출을 검토하고 있다.

#### 2. 지식재산권 확보

- 특허 1 (출원 10-2012-0098579)  
: 소수성부틸기를 가진 나노 실리카 담체의 제조 및 이를 이용한 리파아제의 고정화방법
- 특허 2 (출원 10-2013-0078367)  
: 소수성부틸기를 가진 나노 실리카 담체를 이용한 리조뮤코아 미헤이 균주 유래 리파아제의 고정화방법
- 논문 : (식품과학회지 게재)  
: 저 트랜스 지방 생산을 위한 소수성 부틸기가 부착된 나노 실리카 고정화 lipase의 개발

### 3. 기술실시

(단위: 천원)

구분	주요 연구결과	총연구비	정부출연금	기술실시 관련도(%)
1차년도	· Pore size 30~40nm의 nano silica 담체 제조	167,000	125,000	20
	· 소수성 Butyl functional group 부착조건 확립			15
	· Lipase(Palatase)의 고정화조건 확립 (특허출원:10-2012-0098579)			15
2차년도	· 500L Pilot scale에서의 lipase(Palatase) 고정화조건 확립	167,000	125,000	15
	· 50L Pilot scale에서의 고정화 lipase (Palatase)를 이용한 반응조건 확립			15
	· HPLC 분석조건을 확립하여 tristearin의 전환율 측정 (특허출원:10-2013-0078367)			20
합 계		334,000	250,000	100

### 4. 추가연구 및 타연구에의 활용계획

효소를 고정화 하는 방법은 그림 32와 같이 공유흡착법, 공유결합법, ion결합법, 함몰법이 있으며 본 연구에서 사용한 lipase의 고정화 방법은 이중 소수성기를 이용한 ion결합법에 해당되며 일반적으로 공유결합법(covalent cross-link)이나 함몰법(entrapment)이 효소의 종류 및 특성에 따라 많이 이용되고 있다.

본 연구를 통해 30~40nm의 silica resin 제조 및 수입 Lipase(Palatase)를 이용한 고정화 연구는 진행이 완료된 상태로 국산 Lipase를 이용한 고정화 Lipase를 상품화 하기 위해서는 국내 효소생산 기업과의 1~2년간의 연구를 진행해야하며 기술이전을 통해 저렴하고 우수한품질의 국내상품을 생산할 계획이다. 아울러 *Thermomyces lanuginosus*나 *Candida antarctica*-B 유래의 lipase나 lipase 이외의 다른 작용을 하는 효소의 고정화에 본 연구를 통하여 얻어진 기술을 활용하고자 한다.


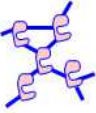
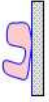

방법	강점	약점
공유 흡착 	pH, 배지의 이온강도 및 기질 농도에 무관함	활성부위의 구조가 변할 수 있음. 고 비용
공유 결합 	효소가 강하게 결합되어 소실 위험이 적다	분리중 효소 활성의 소실 가능. 고분자물질에 부적합함. 담체의 재생 불가.
흡착 	간단하고 효소의 변화 없음. 담체의 재생 가능. 비용이 저렴함.	효소가, 미생물 또는 단백질 분해효소의 공격에 약함. 이온강도의 변화에 의해 탈리 가능
함몰 	효소의 화학적 변화가 없음.	확산효과가 분리에 영향을 줄 수 있음. 준비가 어렵고 간혹 효소 활성이 소실. Pore size 분포에 따라 지속적인 효소 loss 가능. 고분자물질에 부적절. 효소가, 미생물 또는 단백질 분해효소의 공격에 무관함.

그림 41. 효소고정화 방법

## 제 6 장. 연구개발과정에서 수집한 해외과학기술 정보

◎ Lipase(Palataase) 고정화시 ion 결합에 의한 흡착공법(adsorption)을 사용하는 경우 alumina, silica, ceramic, metal oxides, porous glass, sepharose, zeolite, polystyrene 등의 담체를 이용할 수 있으며 이때 lipase의 pH는 등전점 부근인 pH 4.0~4.5가 적당하였다. 또한 담체의 pore size는 100nm 정도가 적당하였으며 담체표면의 functional group은 hydrophilic 보다는 hydrophobic 상태가 양호하였다.

(Zorica. D, BIBLID 1450~7188(2004) 35, 151~164 review)

◎ Lipase(Palataase=NOVO lipozyme)을 hydrophobic functional group을 가진 high density polyethylene(HDPE)을 사용하여 glutaraldehyde를 사용하여 covalent cross linking법으로 citrate-phosphate buffer(pH 5.0) 상태에서 고정화하였다.

(T. Bagheri Lotfabad, Iranian J. of chemical engineering vol 1. No.2 2004)

◎ *Candida antarctica* B 유래의 lipase를 sol-gel법에 의한 entrapment 방법을 사용하여 고정화

lipase에 1M NaF, isopropyl alcohol, tertiary silane을 사용하여 gelation을 시킨 후 celite를 섞어 고정화

(Anca ursoiu, Molecules 2012, 17. 13045-13061)

◎ *Humicola lanuginosa* 유래의 lipase를 synthetic magnesium silicatd powder에 섞은 후 교반하면서 gelatin이나 polyvinylpyrrolidone을 첨가하여 entrapment 방법으로 고정화

(Sven pedersen, NOVO Nordisk Denmark, US patent 5776741)

◎ Pore size 400Å(40nm)의 sepabead를 사용

ionic 방법과 glutaraldehyde를 이용한 covalent 방법을 이용 *Mucor miehei*, *Candida rugosa* 유래의 lipase를 고정화 시킨후 polyethylene imine을 처리하여 lipase의 활성기를 보호

(J. M. Gu: San, Italy, J. of Molecular catalysis B : enzymatic 11(2001)817-824)

◎ Pore size 400Å(40nm), particle size 30~45mesh의 silica 담체를 이용 *Rhizomucor miehei*, *Candida antartica* 유래의 lipase를 adsorption 방법으로 고정화

(Wo patent/1988/002775)

◎ Mesoporous silica 담체를 이용 functional group으로 mercapto group, cyano group, phosphoric acid group, epoxide group을 부착하여 lipase의 고정화 조건 검토

(Chia-Hung Lee, USA, Nano today 2009. 4, 165-179)

◎ *Thermomyces lanuginosa* 유래의 lipase를 이용하여 interesterification에 의해 palm stearin(SSS)과 coconut oil을 75:25로 혼합하여 margarine 제조조건을 검토



(Hong Zhang, Sweden, JAOCS, vol 78 No 1 (2001) 57-64)

© *Thermomyces lanuginosus*, *Rhizomucor miehei*, *Candida antartica* B 유래의 NOVO사 고정화 lipase인 Lipozyme TLIM, Lipozyme RMIM, NOVOZYME 435를 이용하여 반응시간, 반응온도, lipase 사용량 등의 조건을 검토

(Roila Awang, Malaysia, J. of OLEO Science vol. 54, No 5 305-309, 2005)

## 제 7 장. 연구시설 및 장비현황

구 분	기자재 및 시설명	규 격	구입 연도	용 도 (구입사유)
기보유 기자재	Jar Fermentor	14 ℓ	2002	미생물배양실험
	Fermentor	50 ℓ	2005	배양조건실험
	Air-lift Fermentor	500 ℓ	2004	scale-up 배양
	Mechanical oven	-	2002	미생물고정화
	PIM MILL	-	2006	
	Clean bench	제진률99.97%	2002	균주 무균작업
	Incubator	RT~100	2003	균주 분리배양
	Auto-clave	120 ℓ	2003	배지의 멸균화
	Table-top centrifuge	0~8000rpm	2004	균체수거·분리
	Spectro-photometer	UV-visible	2005	성분·농도분석
	DO control system	DO control/ sensor unit	2008	산소농도 측정 및 제어
	HPLC	UV detector	2009	효소전환의 정성·정량분석
신규 확보한 기자재	Lab.용 효소반응장치	50L	2012	효소전환
	효소고정화 system	Mx300	2013	효소 고정화
	효소전환 반응장치	2way	2013	효소전환

## 제 8 장. 참고문헌

1. Anna, M, F, L.Tian(1997) Enzyme Microb. Technol 20;198-206
2. Jose,A , C.O Arcos, C, G. Hill(1998) Biotechnol. Bioeng. 68;563-570
3. Pierre villeneuve, Jean. M, Muderhwa(2000)  
J. of Molecular catalysis B vol 9 ; 113-148
4. Petrauskaite V. De greyt w.(1998) Am, oil Chem soc. 75(4);489-493
5. M.J.Jun, S.H.Kim(2006) J, Ind. Eng. Chem.12;115
6. CasimirC, Akoh and David B(2008) Food lipids chapter 10;268-287
7. U.S patent 5342768
8. U.S patent 5776741
9. J.M.Guisan, P.sabuqu;110 (2001) J. of Molecular catalysis B vol 11;817-824
10. Hong Zhang, Xuebing xu(2001) JAOCS vol 78 no 1
11. Chia-Hung Lee, Tien-sung Lin(2009) nano Today vol 4;165-179
12. Zorica. D, BIBLID 1450~7188(2004) 35, 151~164 review7
13. T. Bagheri Lotfabad, Iranian J. of chemical engineering vol 1. No.2 2004
14. Anca ursoiu, Molecules 2012, 17. 13045-13061
15. Sven pedersen, NOVO Nordisk Denmark, US patent 5776741
16. J. M. Gu: San, Italy, J. of Molecular catalysis B : enzymatic 11(2001)817-824
17. Wo patent/1988/002775
18. Chia-Hung Lee, USA, Nano today 2009. 4, 165-179

19. Hong Zhang, Sweden, JAOCS, vol 78 No 1 (2001) 57-64

20. Roila Awang, Malaysia, J. of OLEO Science vol. 54, No 5 305-309, 2005

## 주 의

1. 이 보고서는 농림축산식품부에서 시행한 “고부가가치식품기술개발사업”의 연구보고서입니다.
2. 이 보고서 내용을 발표할 때에는 반드시 농림축산식품부에서 시행한 “고부가가치식품기술개발사업”의 연구결과임을 밝혀야 합니다.
3. 국가과학기술 기밀유지에 필요한 내용은 대외적으로 발표 또는 공개하여서는 아니 됩니다.