

바이오디젤 생산을 위한 리파아제 고정 부직포의 효소활성화

김예진* · 이성해** · 홍성규** · 김민* · 박상진**†

*동국대학교 안전환경시스템공학과
780-714 경상북도 경주시 석장동 707

**동국대학교 화공생물공학과
100-715 서울시 중구 필동 3가 26번지
(2009년 10월 30일 접수, 2009년 12월 10일 채택)

Enzyme Activity of Lipase Immobilized Non-Woven Fabric for Biodiesel Production

Ye Jin Kim*, Sung Hae Lee**, Sung Kyu Hong**, Min Kim* and Sang Jin Park**†

*Department of Safety Environmental System Engineering, 707 Seokjang-dong, Gyeongju-si, Gyeongbuk 780-714, Korea

**Department of Chemical and Biochemical Engineering, Dongguk University, 26 Pil-dong, 3-ga, Jung-gu, Seoul 100-715, Korea
(Received 30 October 2009; accepted 10 December 2009)

요 약

본 연구의 목적은 효소법을 이용한 바이오디젤의 생산에서의 효소(lipase) 활성화를 최적화함에 있다. 효과적인 방법으로 효소를 고정하기 위해 방사선 그래프트 중합법을 이용한 부직포에 음이온 교환기인 ethanolamine과 diethylamine을 도입시켜 음이온 교환 부직포(이때 얻어진 부직포는 EtA, DEA-EtA 부직포라 함)를 합성하였다. 기존에 사용하던 다공성 중공사막의 경우 시간이 지남에 따라 막힘 현상에 따라 유속이 현저하게 줄어드는 점을 보완하고자 기공(pore size)이 300 μm 인 부직포를 선택하였다. 이 부직포에 음이온 교환기가 도입된 EtA, DEA-EtA 부직포의 최적효소 흡착 특성과 효소 활성도에 대하여 고찰하였다. 그 결과 효소 흡착량은 EtA, DEA-EtA 부직포가 비슷하였으나(EtA non-woven fabric: 15.69 mg/g, DEA-EtA non-woven fabric: 14.45 mg/g) 기름을 투과시킨 결과 효소 활성화는 DEA-EtA 부직포가 EtA 부직포에 비해 현저히 떨어짐(EtA non-woven fabric: 3.50 mol/h·kg, DEA-EtA non-woven fabric: 0.38 mol/h·kg)을 알 수 있었다. 이 음이온교환기를 이용해 효율적인 바이오디젤 생산을 위한 온도, 효소고정량, 기름과 알코올과의 관계 등의 최적의 조건을 도출하였다.

Abstract – This study is to optimize the enzyme(lipase) activity for biodiesel production. The ion-exchanged non-woven fabrics(EtA, DEA-EtA non-woven fabric) containing ethanolamine, diethylamine groups are used by radiation induced grafted polymerization onto a non-woven fabric for more effective immobilization of lipase. Since the porous hollow fiber membranes are showed the low throughput, the non-woven fabric membranes are used for biodiesel production. The physical characteristics of enzyme immobilized and the enzyme activity to EtA and DEA-EtA non-woven fabrics are studied. The EtA non-woven fabrics are quite similar to DEA-EtA non-woven fabric for the amount of enzyme immobilized(EtA non-woven fabric: 15.69 mg/g, DEA-EtA non-woven fabric: 14.45 mg/g) but DEA-EtA non-woven fabrics have shown the lower permeability than the EtA non-woven fabrics(EtA non-woven fabric: 3.50 mol/h·kg, DEA-EtA non-woven fabric: 0.38 mol/h·kg). Optimum characteristics of the non-woven fabric membranes and the immobilization activity are also investigated for the effective biodiesel production.

Key words: Grafted Polymerization, Lipase, Biodiesel, Immobilization, Non-Woven Fabric, Optimum Characteristics

1. 서 론

바이오디젤이란 동·식물성 기름에 에스테르화 반응을 시킨 결과물로 경유에 비해 독성이 낮고 생분해성이 높은 친환경적인 산물이다. 경유와 물리적, 화학적 성질이 거의 같아 기존 상용 공정의 변화 없이 바로 사용이 가능하며, 이산화탄소 배출량도 적어 차세대

에너지원으로서 많은 연구가 이루어지고 있다[1-3].

바이오디젤의 생산 방법은 크게 직접이용법, 초임계유체법, 전이 에스테르화법으로 나뉜다. 직접이용법은 경유와 동·식물성 기름을 직접 혼합한 것으로 시간이 지날수록 디젤의 점도가 높아져 운행에 방해가 된다. 이는 식물성 기름을 장시간 사용할 경우 불완전 연소에 의한 탄소침전물이 생기기 때문이다[4]. 초임계유체법은 반응속도가 빠르며 지방산, 글리세린 등은 모두 열분해 되어 부생물이 발생하지 않는다[5]. 그러나 대규모 장치를 필요로 하고, 고압·고온 반

†To whom correspondence should be addressed.
E-mail: sjpark@dongguk.edu

응으로 인해 단가가 높아져 실용화가 된 예는 없다. 현재까지 가장 보편적으로 사용되고 있는 방법으로 전이에스테르화법은 촉매 존재 하에 triglyceride와 알코올을 혼합하여 기름을 지방산에스테르와 글리세린으로 분해하는 방법으로 이때 분리된 지방산에스테르가 바이오디젤이 된다. 이는 화학 촉매를 사용하는 화학법과 생촉매를 사용하는 효소법으로 나뉜다. 화학법은 촉매 코스트가 싸고 단시간에 높은 전환율을 얻기 때문에 대부분의 공정에서 사용되어지고 있다. 일반적으로 산촉매(HCl, H₂SO₄ 등), 또는 염기촉매(NaOH, KOH 등)를 사용하며 산촉매는 유리지방산이 높은 폐유에 적합하나 공정의 부식, 고온·고압에 따른 에너지 소모가 크다는 단점을 가지고 있다[6]. 염기촉매는 산촉매보다 반응속도가 빨라 많은 상용 공정에서 사용되고 있다. 그러나 글리세린의 재결합에너지가 크고 부생물이 발생하여 품질이 낮아지고 폐기물 처리로 인한 2차적인 환경오염이 유발되는 문제점을 가지고 있다[7]. 효소법은 리파아제를 촉매로 사용하여 에스테르화를 하는 방법으로 화학법에 비해 알코올 사용량이 적고 글리세린의 분리 정제 과정은 생략이 가능하다. 또한 기름에 포함된 지방산이 모두 에스테르화가 가능하며 생성물의 순도도 다소 높은 편이다. 그러나 촉매가 고가이며 반응속도가 느리고 유기용제 속에서 효소의 활성도가 떨어진다는 단점을 가지고 있다[8,15].

이러한 효소법의 단점을 보완하기 위해 다공성 중공사막에 방사선 그래프트 중합법을 이용하여 그래프트 체인을 형성하고 친수기의 음이온 교환기를 도입[9]하여 효소의 활성도를 유지하고자 했다[10]. 그러나 이 음이온 교환막에 기름을 투과시킴에 있어 막힘 현상이 나타나 유속이 저하되는 문제점이 나타났다. 따라서 본 연구에서는 효과적인 효소 고정화를 위한 방법으로 다공성 중공사막보다 기공이 큰 부직포를 사용함으로써 유속 저하의 문제를 극복할 수 있었다. 즉, 방사선 그래프트 중합법을 적용하여 부직포에 전자선을 조사한 후 glycidyl methacrylate(GMA)를 그래프트 중합하여 음이온 교환기(EtA, DEA-EtA)를 도입시켜 음이온 교환 부직포를 합성하였고 여기에 리파아제를 흡착시켜 효소 고정 부직포를 작성하고 기름을 투과시키는 방법으로 효율적인 바이오 디젤생산을 위한 효소의 흡착 특성과 효소 활성화 특성을 검토하였다.

2. 실험

Nam Yang non-woven fabric Co.로부터 PP100 부직포(Polypropylene based 부직포)를 기제로 사용하였다. 음이온 교환 반응에 사용된 시약으로는 diethylamine(DEA:C₂H₅C₂H₅NH)을 사용하였고, 친수화 반응에는 ethanolamine(EtA:NH₂C₂H₄OH)를 그대로 사용하였다[11]. 효소 고정막 제작을 위해 사용된 리파아제는 Amano enzyme Co.의 F-API5(*Rhizopus oryzae*)를 사용하였다. 그 외 다른 시약은 특급이나 그 이상의 등급을 사용하였다.

음이온 교환기가 도입된 부직포의 물성변화를 측정하기 위해 SEM(Philips, Model XL-30S-FEG)과 FT-IR Microscope(Thermo Electron, Model Nicolet 6700)을 이용하였고, 효소정량을 위해 UV(Shimadzu, UV-1201)를 사용하였다. 지방산과 지방산 에스테르 분석은 GC/MSD(HP, Model 5973)로 분석하였다.

부직포에 음이온 교환기로서 DEA-EtA, EtA의 도입경로를 Fig. 1에 나타냈다.

부직포(50 cm²)를 질소 분위기 하에서 200 KGy 선량으로 전자선

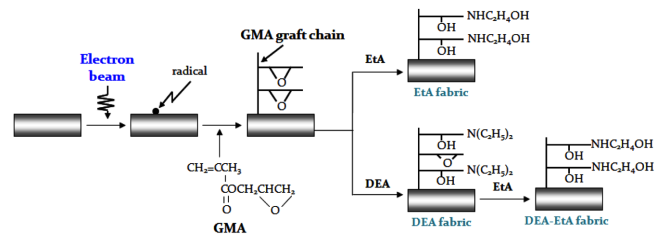


Fig. 1. Preparation scheme of the ion exchange group.

을 조사하여 라디칼을 발생시킨 후, 10 v/v% GMA-methanol 용액에 넣고 일정한 시간 동안 그래프트 중합을 하였다. 그래프트율(degree of grafting, dg)은 다음과 같이 정의하였다. 이때 얻어진 부직포를 GMA 부직포라 한다.

$$dg[\%] = 100(\text{mass of GMA} - \text{mass of polymer}) / \text{mass of polymer} \quad (1)$$

효소의 활성도를 높이기 위해 GMA 부직포에 친수기(-OH)가 붙은 음이온 교환기를 도입하였다. 그 중 비교적 제조방법이나 시간이 간단한 EtA와 DEA-EtA를 이용하여 부직포에 이온교환을 시도하였다. 이 이온교환부직포를 제작하기 위해 DEA 수용액 303 K에서 5 시간 반응시켰다. 그 후 친수화 반응을 위해 EtA 수용액 303 K에서 2시간 반응시켰다. 이때 작성된 부직포를 DEA-EtA 부직포라 하며, 친수화 반응만을 거친 부직포를 EtA 부직포라 한다. 이 기재의 물성은 적외선 흡수 스펙트럼(FT-IR)과 전자현미경사진(SEM)을 400배율로 확대하여 측정하였다.

효소 흡착을 위해서는 10 mM의 Tris-HCl buffer(pH 8.5)에 리파아제 0.2 g/L를 일정시간 침전시킨다. 그 후, 가교제로서 0.01% glutaraldehyde 수용액을 상온에서 일정시간, 0.5 M의 NaCl 수용액에서 일정시간 침전시킨다. 이때 작성된 부직포를 효소 고정 부직포라 한다. 효소의 고정량은 다음 식 (2)로 정의하였다.

$$q[\text{mg/g}] = \int_0^{V_e} (C_0 - C) dV / W \quad (2)$$

여기서 V_e 는 C 가 C_0 에 도달하였을 때의 투과체적이고, W 는 건조

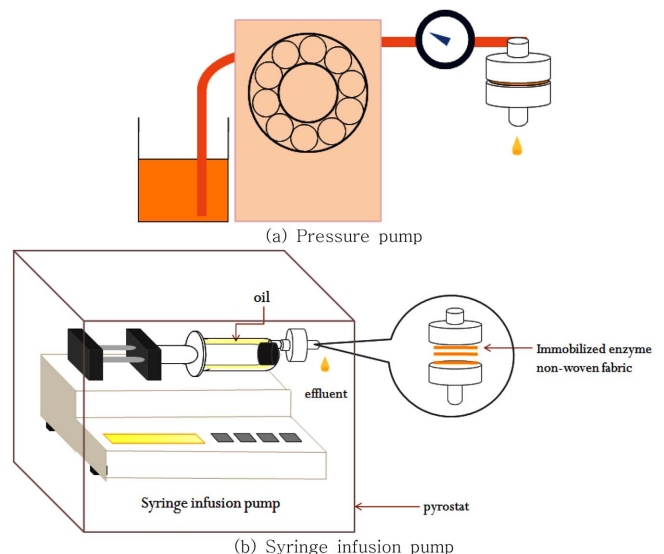


Fig. 2. Experimental apparatus.

된 부직포의 중량이다.

이 기재의 투과 특성을 알아보기 위해 Fig. 2(a)에 나타난 장치를 사용하여 일정한 압력으로 기름을 투과시켰으며, 정해진 체적을 투과하는데 걸린 시간을 측정하여 투과유속을 식 (3)과 같이 계산하였다.

$$\text{pure oil flux [ml/h]} = \text{permeation rate} / (\pi \times D_0 \times L) \quad (3)$$

여기서 투과 용량은 ml/s, D_0 는 부직포의 직경으로 mm, L은 부직포의 높이로 cm이다.

이렇게 작성되어진 효소 고정 부직포에 지방산인 oleic acid를 Fig. 2(b)에 나타난 장치를 이용해 투과시킨다. 이렇게 투과된 기름을 GC/MSD를 이용해 지방산 에스테르를 분석한다. 이렇게 분석된 지방산 에스테르의 농도를 통해 효소의 반응 속도를 나타내는 효소의 활성화는 식 (4)로 정의하였다[12].

$$\text{immobilized enzyme activity [mol/(h·kg)]} = (C_p \times F) / \text{amount of immobilized enzyme} \quad (4)$$

여기서 C_p 는 지방산 에스테르의 농도(mol/m^3), F는 유속(m/h), amount of immobilized enzyme(kg)을 나타낸다.

3. 결과 및 고찰

PP부직포에 전자선을 조사하여 라디칼을 생성시킨 후 그래프트 중합에 의해 그래프트 체인을 성장시킨다. 이 그래프트 체인에 관능기(이온교환기)를 화학적으로 부여한 후 부직포의 물성변화를 Fig. 3과 4에 SEM 사진과 적외선 흡수 스펙트럼(FT-IR)을 통해 나타내었다. 그래프트율 70%일 경우 EtA, DEA-EtA 부직포의 최종 이온교환기 용량은 각각 1.04, 0.05 mol/kg으로 좋은 반응성을 나타냈다. Fig. 3에 나타난 SEM 사진은 건조된 상태에서 기재의 단면을 400 배율로 확대하여 나타냈다. 사진의 밝은 곳은 기재의 matrix 부분이고 어두운 부분은 부직포의 기공 부분을 나타낸다. 이온교환기가 도입됨에 따라 각 기재의 matrix 부분이 팽윤되었지만 pore size는 거의 변화가 없었다. 또한 부직포의 표면뿐 아니라 내부에도 방사선 그래프트 중합법에 의한 그래프트 체인이 생성되었다는 것을 알 수 있었다[13]. Fig. 4에 나타난 적외선 흡수 스펙트럼의 측정결과

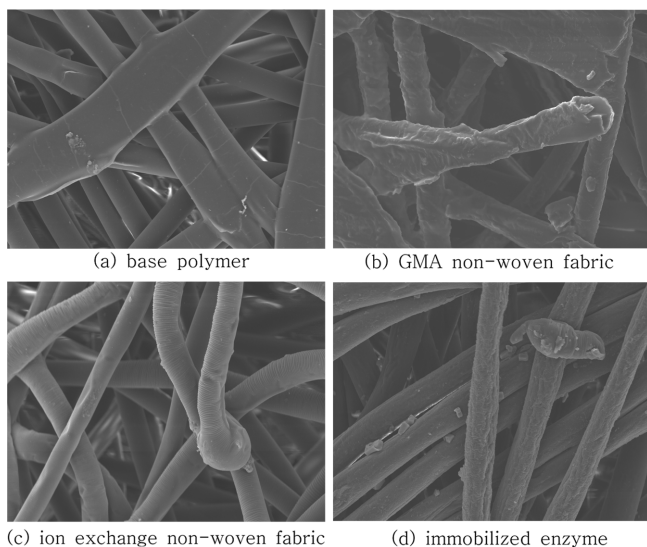


Fig. 3. SEM images of anion exchange non-woven fabric.

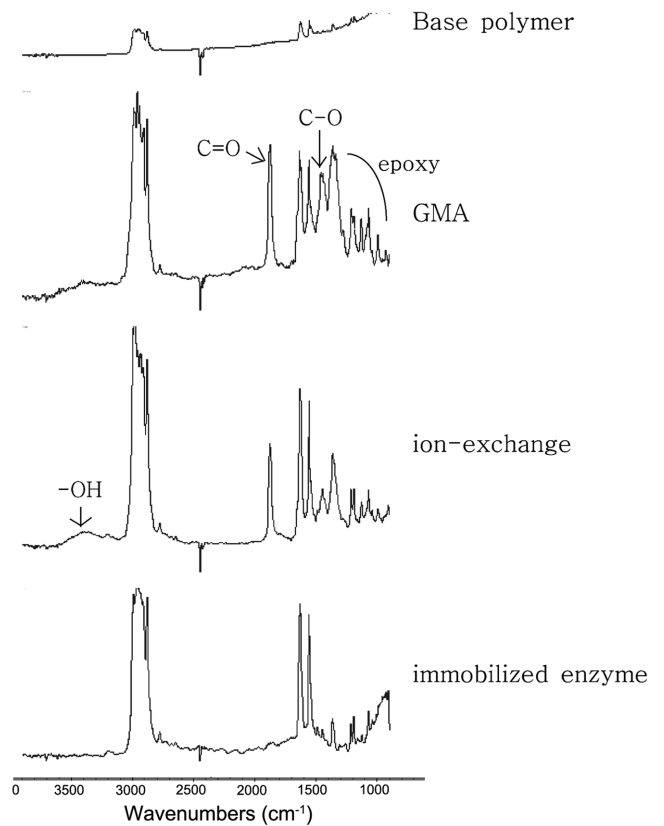


Fig. 4. FT-IR spectra of anion exchange non-woven fabric.

GMA를 방사선 그래프트 중합합으로서 peak 760, 840, 910, 1,270 cm^{-1} 의 에폭시기, 1,730 cm^{-1} 의 C=O와 1,130~1,160 cm^{-1} 의 C-O의 특성 피크가 나타났으며, peak 3,387~3,416 cm^{-1} 사이의 특성 피크의 조합으로 -OH 그룹의 존재도 확인할 수 있었다. 음이온교환기가 도입되면서 에폭시기의 흡수피크가 모두 사라지는 것으로 보아 이온교환기가 도입됨을 알 수 있다[14].

Fig. 5는 효소 고정 부직포의 제작 과정을 나타낸 것으로 먼저 효소 흡착을 위해 EtA, DEA-EtA 부직포에 효소 수용액(Tris-HCl)을 침전시켰다. EtA, DEA-EtA 부직포의 그래프트율 변화와 침전시간에 따른 효소 흡착량을 측정한 결과는 Fig. 6(a)에 나타냈다. 침전시간이 18시간이 되기까지는 대체적으로 흡착량이 증가되는 것을 볼 수 있으나 그 이후에는 흡착량이 줄어드는 것으로 보아 침전시간은 18시간이 적합하다는 것을 알 수 있었다. 이것은 그래프트 체인의 밀도에 따라 다른 양상이 나타남을 알 수 있는데 일정 시간이 지난 후에는 효소가 더 이상 흡착하지 못하고 떨어져 나감을 알 수 있다.

Fig. 6(b)는 가교[16]를 위해 부직포를 침전시킨 시간에 따른 효소 고정량을 나타낸 것이다. 가교를 실시할 때 효소의 소모가 많고 안정성이 떨어져 반응 시간이 중요하게 작용된다. 24시간 전후로는 효소 고정량이 적은 것으로 보아 24시간 가교시키는 것이 적합하다고 할 수 있다. 실험을 통해 얻은 효소 고정 부직포를 효과적인 방법으로 제작한 결과 EtA, DEA-EtA 부직포의 최종 효소 고정량은 각각 15.59, 14.45 mg/g로 나타났다.

제작된 EtA 막(membrane-공중사 막)과 EtA 부직포(non-woven fabric)의 유속 비교 결과를 Fig. 7에 나타냈고 DEV는 식 (5)와 같이 나타낼 수 있다.

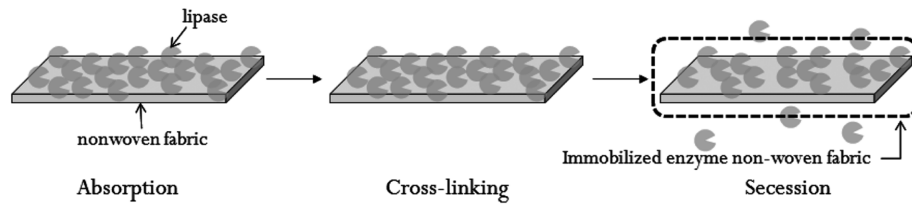


Fig. 5. Preparation scheme of immobilized enzyme non-woven fabric.

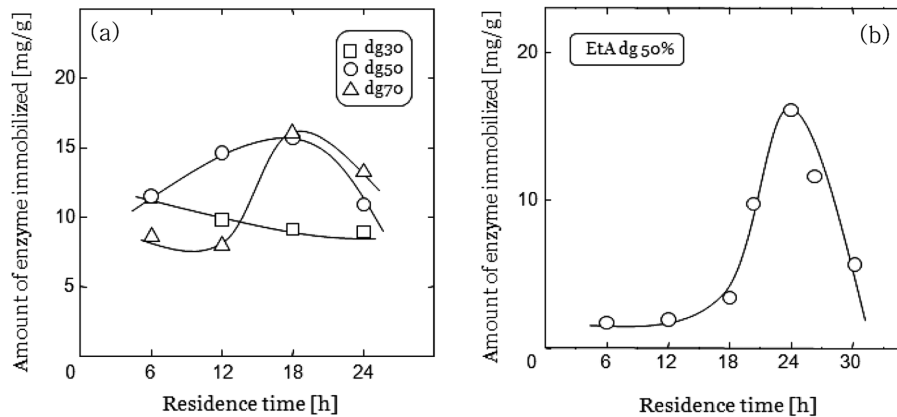


Fig. 6. Amount of enzyme immobilized as residence time(a) and Amount of enzyme immobilized cross-linker residence time(b).

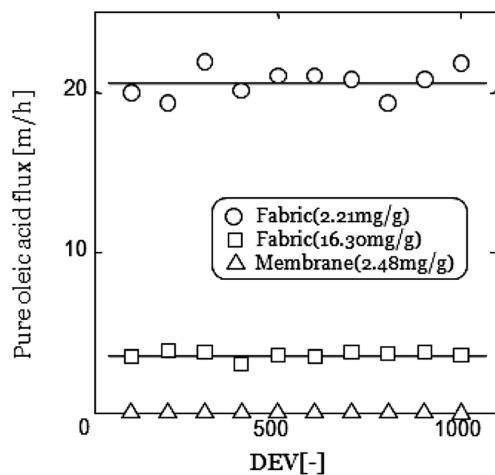


Fig. 7. Pure oil flux of dimensionless effluent volume(DEV).

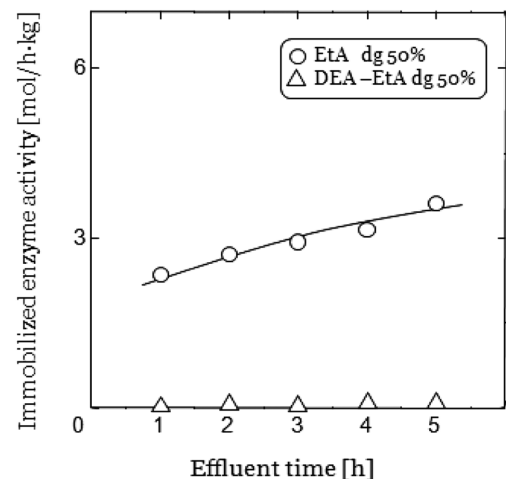


Fig. 8. Immobilized enzyme activity of comparative EtA, DEA-EtA non-woven non-woven fabric.

$$\text{DEV}[-] = \text{effluent volume} / \text{non-woven fabric volume} \quad (5)$$

비슷한 양의 효소 고정량을 가지는 EtA 막과 EtA 부직포의 유속 측정 결과를 식 (3)과 (5)를 통해 계산하였으며, 각각 평균 0.06 m/h, 20.38 m/h로 EtA 부직포가 EtA 막보다 약 350배 빠른 것을 알 수 있었다. 또한 16.30 mg/g의 효소 고정량을 가진 EtA 부직포가 2.21 mg/g의 효소 고정량을 가진 EtA 부직포보다 유속이 현저하게 떨어짐을 보였고 효율적인 바이오 디젤 생산을 위해서는 최적의 효소 고정량을 가진 부직포가 필요함을 알 수 있었다.

효소 활성화 특성을 조사하기 위해 제작된 부직포에 올리브유의 주성분인 Oleic acid와 Methanol을 1:1로 혼합하여 5 mL/h로 투과법에 의해 에스테르화를 수행하였다. Fig. 8은 음이온 교환기의 종류에 따른 효소 활성화를 나타낸 것이다. 효소 활성화는 식 (3)에 의해 계산하였다. DEA-EtA 효소 고정 부직포의 경우 0.38 mol/(h·kg)

로 EtA 효소 고정 부직포가 3.81 mol/(h·kg)인 것과 비교하여 볼 때 효소의 활성도가 거의 이루어지지 않았다.

에스테르화에 의한 바이오디젤 생산의 치환반응에 사용되는 알코올의 종류를 달리한 실험의 결과를 Fig. 9에 나타냈다. EtA 효소 고정 부직포를 사용하였으며, 기름과 알코올의 혼합비율은 몰비 1:1로 동일하게 하였다. 효소 활성화는 식 (4)를 이용하였으며 40 °C 조건에서 5 ml/h로 일정한 유속으로 30시간 반응하였을 때 알코올의 종류를 methanol을 사용한 경우 0.1 mol의 에스테르화가 나타났고, ethanol을 사용한 경우 0.38 mol의 에스테르화가 나타났다. 효소 활성화는 3.39 mol/(h·kg), 같은 조건으로 알코올의 종류만 8.73 mol/(h·kg)으로 약 2.5배 높은 효소 활성화를 나타냈다. 이것은 methanol이 단백질인 효소에 독성을 띄어 효소의 활성도가 떨어졌다고 할 수 있다. 또한 일정한 속도로 투과시켰을 때 투과 10시간 이후로 고

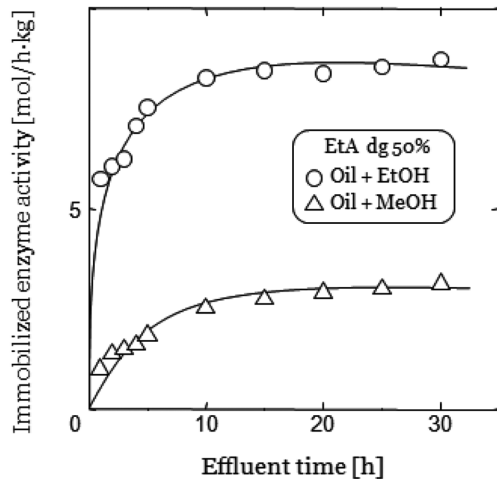


Fig. 9. Immobilized enzyme activity of comparative combine methanol and ethanol.

른 효소 활성화가 나타남을 알 수 있었다.

기름과 알코올의 혼합비율에 따른 에스테르화 농도를 Fig. 10에 나타냈다. 이것은 40 °C로 일정하게 유지된 항온조에서 실험하였으며 EtA 부직포에 효소 고정량을 거의 동일하게(평균 12.33 mg/g, 표

준편차 0.76)하여 기름과 알코올의 혼합 용액에 침전시킨 후 시간 변화에 따른 전이에스테르를 측정한 결과로 침전시키는 방법을 사용하였다. 그 결과 1:1의 몰비를 가질 때 단시간에 높은 에스테르화(129 mM)가 나타남을 알 수 있었다. 또한 투과법을 이용한 에스테르화 역시 1:1의 비율이 빠른 시간에 높은 에스테르화(125 mM)을 보였으며, 전체적으로 에스테르화 반응 시간이 단축된 것을 알 수 있었다.

효소의 활성화에 적합한 조건을 찾기 위해 그래프트율에 변화를 주었다. 그 결과를 Fig. 11(a)에 나타냈으며, 그래프트율이 50%일 때 효소 활성도가 5.07 mol/h·kg으로 높은 것을 알 수 있었다. 또한 Fig. 11(b)는 온도 변화에 따른 효소 활성화에 대한 결과이다. 40 °C에서 5.07 mol/(h·kg)로 높은 활성도가 나타나는데 이는 효소가 온도에 민감한 반응을 보이기 때문에 온도의 변화에 따라 활성화의 차이가 큰 것으로 생각된다.

Fig. 12는 온도를 40 °C로 일정하게 유지시킨 항온조에서 실험한 것으로 투과 속도에 따른 에스테르화 농도를 나타낸 것이다. 투과 속도는 각각 1, 5, 10 mL/h로 일정하게 유지하였으며 동일한 조건의 효소 고정 부직포와 기름을 사용하였다. 그 결과 각각 28, 27, 26.7 mM로 거의 비슷하게 나타난 것으로 보아 투과 유속은 효소 활성화에 크게 영향을 미치지 못하는 것으로 알 수 있었다.

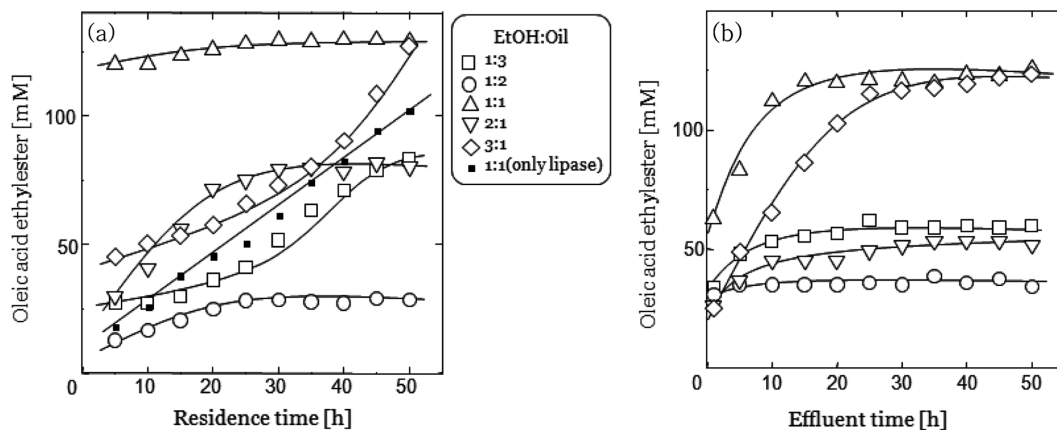


Fig. 10. Oleic acid ethyl ester of residence time to impregnation (a) and permeation (b).

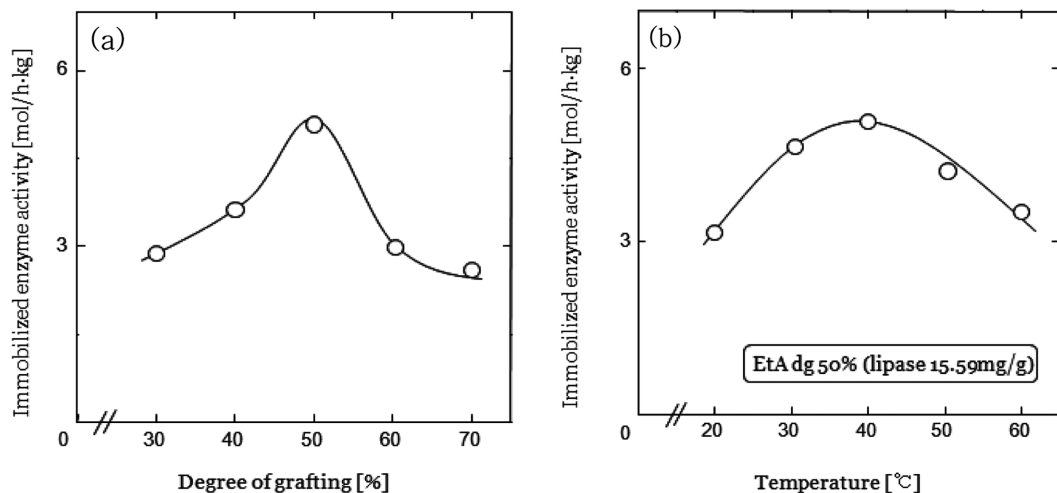


Fig. 11. Immobilized enzyme activity as degree of grafting for EtA non-woven non-woven fabric permeate lipase-buffer about 18 hours (a) and temperature (b).

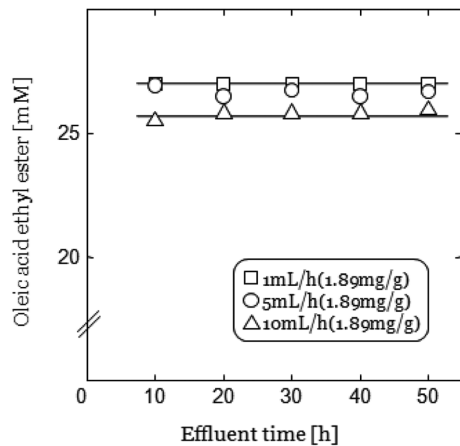


Fig. 12. Oleic acid ethyl ester concentration of different velocity.

효소 고정 부직포를 여러 장 사용했을 경우 변화하는 에스테르화 농도를 침전시키는 방법과 투과시키는 방법으로 측정한 결과는 Fig. 13에 나타났다. 총 50시간 측정한 결과 투과법이 최종적인 에스테르화 농도에 도달하는 시간이 빠른 것을 알 수 있었다. 또한 여러 장을 사용하였을 경우 초기에 높은 에스테르화를 나타냈지만 시간이 지나더라도 에스테르화는 더 이상 나타나지 않았다.

Fig. 14는 base polymer를 polyethylene으로 사용하여 동일한 방

법으로 음이온 교환기를 도입하고 효소 고정 부직포를 제작하여 기름을 투과법에 의해 에스테르화를 시킨 후 기존에 사용하였던 polypropylene과 비교한 결과이다. 먼저 효소 고정량은 base polymer 23.65 mg/g, DEA-EtA 부직포 64.66 mg/g, EtA 부직포 46.09 mg/g으로 나타났으며, 효소 활성화는 각각 0.82, 0.005, 1.04 mol/h·kg으로 나타났다. polyethylene과 polypropylene의 EtA 효소 고정 부직포를 이용한 효소 활성화를 비교하였다. 그 결과 각각 1.04, 8.73 mol/h·kg으로 base polymer를 polypropylene으로 사용하는 것이 약 8배 높은 것을 알 수 있었다.

4. 결 론

본 연구에서는 효소를 이용한 바이오디젤의 효과적인 생산을 위해 방사선 그래프트 중합법을 적용한 GMA 부직포에 이온 교환기를 도입시킨 재료를 합성하였다. 그리고 합성된 재료의 효율을 높이기 위한 효소 활성화에 대해 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

(1) GMA 부직포에 이온 교환기를 도입하고 효소를 고정시켜 특성 조사를 한 결과, DEA-EtA 부직포가 높은 효소 고정량에 비해 효소 활성화에 있어 기능이 현저히 떨어지는 것을 알 수 있었다.

(2) 작성된 EtA 부직포는 그래프트율 50%, 온도 40 °C일 때 가장 높은 효소 활성이 나타났다. 또한 효소 고정 부직포를 사용하는 장

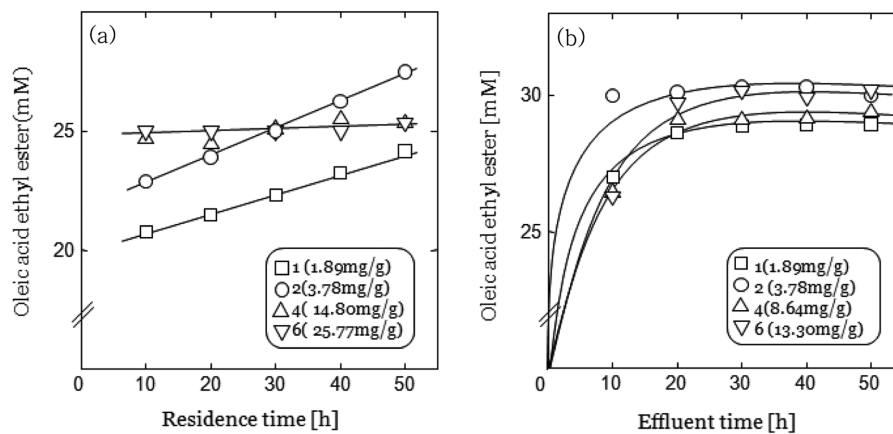


Fig. 13. Oleic acid ethyl ester concentration as the number of sheets batch (a) and permeate method (b).

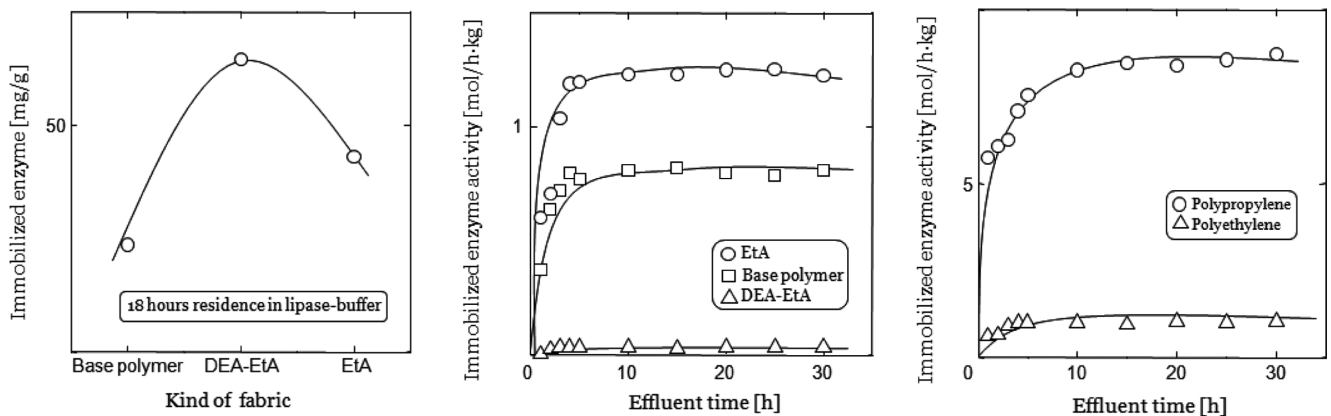


Fig. 14. Differ in kind from base polymer as transesterification.

수에 따라 다른 효소 활성이 나타났다. 이것은 효소의 고정량이 많다고 하여 효소의 활성화와 반드시 연관되는 것은 아니라는 것을 알 수 있었다.

(3) 에스테르화를 위한 치환반응에 사용되는 알코올은 methanol보다 ethanol이 결과적으로 더 높은 효소 활성화를 가져오며 비교적 짧은 시간에 높은 에스테르화가 되는 것을 알 수 있었다.

(4) base polymer는 polyethylene보다 polypropylene이 적은 양의 효소 고정량을 나타냈지만 높은 효소 활성화를 보이므로 보다 효과적인 기재인 것을 알 수 있었다.

참고문헌

1. Kyung, H. R. and Young, T. O., "The Durability and Exhaust Emission Characteristics of an IDI Diesel Engine Using Biodiesel Fuel," *Transactions of KSAE*, **14**(4), 115-122(2006).
2. Marchetti, J. M., Miguel, V. U. and Errazu, A. F., "Possible Methods for Biodiesel Production," *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **11**, 1300-1311(2007).
3. Funda, Y., Kazan, D. and Akin, A. N., "Biodiesel Production from Waste Oils by Using Lipase Immobilized on Hydrotalcite and Zeolites," *Chem. Eng. J.*, **134**, Issues 1-3, 262-267(2007).
4. Srivastava, A. and Prasad, R., "Triglycerides-based Diesel Fuels," *Renew. Sust. Energ. Rev.*, **4**, 111-133(2000).
5. Madras, G., Kolluru, C. and Kumar, R., "Synthesis of Biodiesel in Supercritical Fluids," *Fuel*, **83**, 2029-2033(2004).
6. Freedman, B., Pryde, E. H. and Mounts, T. L., "Variables Affecting the Yields of Fatty Esters from Transesterified Vegetable Oils," *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **61**, 1638-1643(1984).
7. Haas, M., "The Interplay Between Feedstock Quality and Esterification Technology in Biodiesel Production," *Lipid Technology*, **16**, 7-11(2004).
8. Brady, C., Metcalfe, L., Slaboszewski, D. and Frank, D., "Lipase Immobilized on a Hydrophobic, Microporous Support for the Hydrolysis of Fats," *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **65**, 917-921(1988).
9. Kawakita, H., Sugita, K., Saito, K., Tamada, M., Sugo, T. and Kawamoto, H., "Production of Cycloisomaltooligosaccharides from Dextran Using Enzyme Immobilized in Multilayers Onto Porous Membranes," *Biotechnol. Progress*, **18**, 465-469(2002).
10. Goto, M., Kamiya, N., Miyata, M. and Nakashio, F., "Enzyme Esterification by Surfactant-coated Lipase In Organic Media," *Biotechnol. Prog.*, **10**, 263-268(1994).
11. Kim, B. S., Kim, M., Heo, K. B., Hong, J. H., Na, W. J. and Kim, J. H., "Preparation of Anion-exchange Membrane for Selective Separation of Urea and Ion," *J. Ind. Eng. Chem.*, **17**, 303-309(2006).
12. Goto, M., Kawakita, H., Uezu, K., Tsuneda, S., Saito, K., Goto, M., Tamada, M. and Sugo, T., "Esterification of Lauric Acid Using Lipase Immobilized in the Micropores of a Hollow-fiber Membrane," *J. Am. Oil. Chem. Soc.*, **83**, 209-213 (2006).
13. Kim, H.-S. and Kim, M., "Synthesis and Characterization of Chelating Hollow Fiber Membrane Prepared by Radiation Graft Polymerization," *Proc. Membr. Soc. Conference*, 67-70(1999).
14. Kim, M., "Amino Acid Addition to Epoxy-group-containing Polymer Chain Grafted onto a Porous Membrane," *J. Membr. Sci.*, **56**, 289-302(1991).
15. Yeo, J. M., Park, C. H., Lee, D. H., Kim, S. W., "Lipase Immobilization Using Cross-linking for Esterification of Oil to Biodiesel," *Theor. Appl. Chem. Eng.*, **10**(2), 1538-1541 (2004).
16. Eriksson, K.-E. L., "Enzyme Applications in Fiber Processing," American Shemical Society(1998).