

생물학적 숙신산 생산을 위한 반응추출공정의 적용

† 홍연기 · ¹허윤석 · ¹홍원희
충주대학교 화공생물공학과, ¹한국과학기술원 생명화학공학과
(접수 : 2005. 6. 17., 게재승인 : 2005. 6. 24.)

Application of Reactive Extraction to Biological Production of Succinic Acid

Yeon Ki Hong[†], Yun Suk Huh¹, and Won Hi Hong¹

Department of Chemical and Biological Engineering, Chungju National University, Chungju, Chungbuk 380-702, Korea

¹Department of Chemical and Biomolecular Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology,
373-1, Guseong-dong, Yuseong-gu, Daejeon 305-701, Korea

(Received : 2005. 6. 17., Accepted : 2005. 6. 24.)

Succinic acid is an important material in industries producing biodegradable polymers, food and pharmaceutical products, and green solvents. Furthermore, succinate fermentation is a novel process due to the fixation of CO₂ into succinate during fermentation. However, the impurities in fermentation broth make the separation process of succinic acid be difficult. Reactive extraction has been proposed to be an effective primary separation step of succinic acid from dilute fermentation broth. This article presents the principles of reactive extraction along with the characteristics of tertiary amine extractants. A brief overview on the current research on reactive extraction of succinic acid is presented. Finally, for the succinic acid separation, reactive extraction as a primary step is suggested in the whole downstream process for succinic acid from fermentation broth.

Key Words : Succinic acid, Reactive extraction, Amine, Fermentation, Separation factor

서 론

숙신산 (succinic acid)은 합성수지, 생분해성 고분자 및 다른 화학합성에 대한 중간체와 같은 다양한 응용분야를 가지는 중요한 C₄ 디카르복실산이다. 현재 사용되고 있는 대부분의 숙신산은 n-부탄을 시작물질로 하는 석유화학 공정으로부터 생산되어 왔다. 생물학적으로 봤을 때 숙신산은 식물, 동물, 그리고 미생물에 의해 형성되는 보편적인 대사산물이며 트리카르복실산 사이클 (tricarboxylic acid cycle, TCA)의 중간체 또는 혐기성 미생물의 발효 생성물 중 하나로서 생산된다(1). 숙신산 발효에 대한 관심은 1980년 초반부터 일찍이 있어 왔으나 최근 온실가스 배출 감소에 관한 교토 협약 준수와 생분해성 플라스틱에 대한 관심의 증가로 인해 산업적 중요성이 크게 증가하였다. 숙신산 발효 생성물 및

발효공정 상의 장점은 CO₂ 고정화에 있다. 예를 들어 에탄올 발효를 위해 1 mol의 포도당을 소비할 경우 2 mol의 CO₂가 발생하는데 반해서 succinate 발효는 CO₂를 소비하게 된다(2). 이와 같은 CO₂ 고정 발효는 그 자체가 이미 매우 환경친화적인 공정이 될 수 있으며 온실가스 배출 감소에 관한 교토 협약에 대한 적극적인 대응 수단으로서 그 의미가 크다고 할 수 있다.

그러나, 숙신산을 생산하는 모든 박테리아는 succinate 뿐 아니라 에탄올, 젖산, 포믹 산 등과 같은 다른 부산물을 형성하게 된다. *Anaerobiospirillum succiniciproducens*의 경우 100 mol의 포도당에 대해 120 mol까지의 succinate를 형성하는 것으로 보고된 바가 있다(3). *Anaerobiospirillum succiniciproducens* 및 *Actinobacillus succinogens*는 phosphoenolpyruvate (PEP) carboxykinase 경로를 사용하여 숙신산을 만들게 된다(Fig. 1). 이 대사 경로는 CO₂수준에 의해 조절된다. 이들 박테리아에서 PEP carboxylase (PEP carboxykinase)는 이화적으로 작용하여 CO₂를 고정하고 PEP로부터 oxaloacetate를 합성하게 된다. 낮은 CO₂ 수준의 경우 (10 mol CO₂/100 mol 포도당) *Anaerobiospirillum succiniciproducens*은 주로 젖산을 생성하게 되는 반면 *Actinobacillus succinogens*는 주된 생성물로서 에탄

† Corresponding Author : Department of Chemical and Biological Engineering, Chungju National University, 123, Geomdan-ri, Iryu-myeon, Chungju, Chungbuk 380-702, Korea
Tel : +82-43-841-5231, Fax : +82-43-841-5220
E-mail : hongyk@chungju.ac.kr

을 생성하게 된다. 높은 농도의 CO₂ 하에서는 (100 mol CO₂/100 mol 포도당) 이들 박테리아는 모두 숙신산을 주 생성물로 만들게 된다(2, 4). 최근에는 대사공학적 방법을 통해 숙신산이외의 다른 카르복실산이 발현되는 것을 억제하기 위한 많은 노력들이 경주되고 있으며 *Mannheimia succiniciproducens*는 이에 대한 대표적인 균주라고 할 수 있다(5-7). 그럼에도 불구하고 숙신산 이외의 다른 카르복실산의 발현을 완벽하게 차단하기는 어렵다. 또한 숙신산의 낮은 증기압은 숙신산의 분리를 더욱 어렵게 만드는 요인이 된다. 이같은 요인들로 인해 발효액으로부터 숙신산의 효율적인 분리정제기술 개발은 숙신산 대량 생산공정 전체의 경제성을 위해 필수적이라 할 수 있다. 실제로 발효공정에서 분리정제 공정이 차지하는 비중은 전체 생산비용의 약 50-70%에 이르는 것으로 알려져 있다(8).

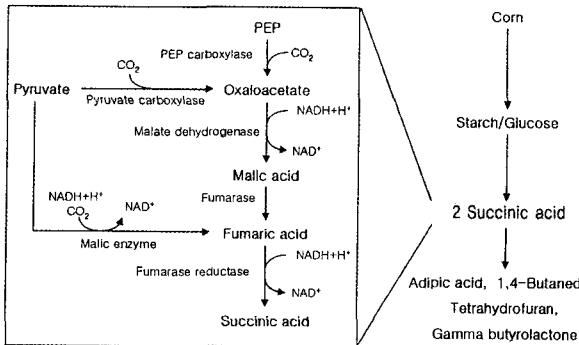


Figure 1. Metabolic pathway leading to the synthesis of succinic acid and usage of succinic acid(2, 4).

일반적으로 숙신산을 포함한 카르복실산의 회수를 위한 전형적인 방법은 황산에 의한 재산화 (reacidification)를 수반한 비용해성 칼슘염과 카르복실산간의 결정화를 이용한 방법이다. 결정은 단순 여과공정을 통해 회수되며 세포와 단백질은 결정의 수세를 거쳐 제거된다. 수세된 결정은 농축 황산 용액을 첨가하여 용해성 카르복실산 용액과 불용성 황화칼슘 용액으로 전환된다. 이 공정의 단점은 많은 양의 고체 슬러리를 포함한다는 것과 상당량의 황화칼슘 폐기물이 발생한다는 데에 있다. 그러므로 황화칼슘 폐기물의 처리를 위해서는 추가적인 용매 추출이나 전기투석과 같은 공정이 요구된다(2, 9).

또 다른 방법으로서 액-액 추출법을 들 수 있다. 액-액 추출법은 수용상과 유기상을 사이에 두고 이들의 물리적인 접촉을 통해 카르복실산을 유기상으로 전달시키는 방법을 말한다. 그러나, 물리적인 용해도 차이에 의한 액-액 추출법의 경우 용매의 낮은 용해도로 인해 처리 용량이 낮으며 추출 후 용매 재생에 많은 에너지가 소모된다는 단점을 가지고 있다. 이 밖에 고분자 수지나 활성탄과 같은 다공성 고체 흡착제를 통한 회수를 실시할 수 있으나 처리 용량에 제한이 있어 대규모 생산에는 적합하지 않은 것으로 알려져 있다. 최근에는 카르복실산 분리정제에 전기투석법이나 나노여과법을 이용한 사례들도 보고되고 있다(10, 11).

본 논문에서는 발효액으로부터 고순도 숙신산을 효과적

으로 정제할 수 있는 반응추출 공정에 대한 원리를 추출제의 특성을 중심으로 고찰해본다. 또한 다성분 카르복실산 계에 대한 선택적인 추출과 아울러 실제 발효액에 대한 반응추출 사례 및 반응추출을 전처리공정으로 한 고순도 숙신산 분리공정을 살펴보고자 한다.

반응추출을 위한 추출제 및 회석제

반응추출은 추출제와 추출하고자 하는 물질과의 반응을 이용한 분리공정이다. 반응추출에서 유기상내에 존재하는 추출제는 추출 대상 물질과 반응하고 이렇게 형성된 반응복합체가 유기상에 용해된다. 숙신산의 반응추출의 경우 숙신산에 포함된 카르복실기와 추출제의 작용기간의 복합체 형성이 가능하다. 다른 분리공정과는 달리 발효액에서의 숙신산의 낮은 농도는 복합체를 형성하고자 하는 추출제의 결합부위에 높은 구동력을 제공하게 된다.

반응추출에 사용되는 추출제

반응추출에 사용되는 추출제는 다음과 같이 크게 3가지로 나눌 수 있다(12).

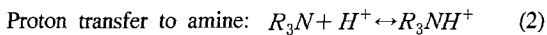
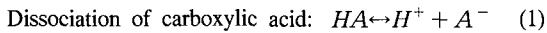
- Carbon-bonded oxygen-donor extractants
- Phosphorus-bonded oxygen-donor extractants
- High molecular weight aliphatic amines and their salts

첫 번째와 두 번째 부류는 산소를 기본으로 한 추출제이며 세 번째 부류는 질소를 기본으로 한 추출제이다. 일반적으로 숙신산을 비롯한 카르복실산의 반응추출에 사용되는 추출제는 대부분 두 번째 및 세 번째 부류에 속하므로 이에 대해서만 논의하도록 하겠다.

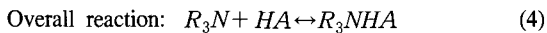
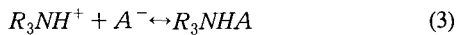
Phosphorus-bonded oxygen-donor 추출제는 carbon-bonded oxygen-donor 추출제보다 강한 루이스 염기인 phosphoryl 그룹을 갖고 있다. 따라서 이들은 carbon-bonded oxygen-donor 추출제에 비해 물에 대한 높은 불용성과 카르복실산에 대한 더 높은 추출능을 가지게 된다. Fahim 등(1992)은 묽은 프로피온 산 용액에 대해 TOPO (Trioctyl phosphine oxide)를 가했을 경우 높은 추출능을 얻을 수 있었다고 보고하였다(13). 이 부류에 속하는 대표적인 추출제는 TBP (tributylphosphate)가 있으며 만일 TBP의 alkoxy group에 알킬 그룹이 치환된 경우 루이스 염기도는 증가하게 된다. 이는 TOPO에 대해서도 똑같은 경향을 가진다. 일반적으로 phosphoryl oxygen의 염기도는 다음의 순서로 증가한다: trialkyl phosphate ((RO)₃P=O), dialkyl phosphonate ((RO)₂RP=O), alkyl dialkyl phosphinate ((RO)R₂P=O), 그리고 trialkyl phosphine oxide (R₃P=O). 그러나 추출대상물질에 대한 이들 추출제의 추출능은 추출제의 염기도 이외에도 추출 대상 물질의 특성, 회석제의 극성, 수용상의 pH와 같은 다른 요인들에 의해서도 영향을 받는다.

아민계 추출제를 이용한 추출에서는 수용상에서 추출물의 농도보다 유기상에서의 아민의 농도가 추출에 많은 영향을 준다. 이러한 아민을 이용한 추출은 아민의 염기성을 이용한 것으로 추출대상물질과 반응하여 염을 형성한다는

사실에 근거해서 행해진다. 위에서 언급한 산소를 기본으로 한 추출과 아민과 같이 질소를 기본으로 한 추출의 기본적인 차이는 수용상에서 유기상으로 전달되는 동안 추출대상물질의 양성자 거동이다. 카르복실산 추출의 경우, 산소를 기본으로 한 용매에서는 수용상에서의 카르복실산의 강도와 유기상에서의 수소결합의 세기가 추출의 척도이다. 그러나 아민을 함유한 유기상으로의 추출은 추출대상물질이 더 이상 산으로 취급되어지지 않고 단지 암모늄염으로 취급된다. 그래서 추출의 척도가 알킬 암모늄의 양이온과 추출대상물질과의 라디칼과의 결합정도가 된다. 이러한 아민은 그 추출능이 매우 뛰어나서 카르복실산에 대한 큰 분배계수를 가지며, 때로는 아민의 양론적으로 가능한 값을 초과한다(14). 아민계 추출제를 이용한 반응추출에서의 반응은 알킬암모늄 양이온과 추출 대상물질의 라디칼 간의 이온쌍 형성을 기본으로 하므로 pH에 따른 산의 해리여부에 영향을 크게 받는다.



Recombination of the ammonium salts:



아민에는 1차 아민부터 3차 아민까지 있지만 추출능은 3차 아민이 가장 크며 방향족 아민은 추출능이 aliphatic 아민 보다 훨씬 좋지 않다. 1차 아민의 경우는 물에 대한 높은 용해성을 가지고 있으므로 수용상에 존재하는 카르복실산의 반응추출에는 적용하기 어렵다. 그리고 2차 아민의 일부는 증류공정에 의한 용매회수시 비가역적으로 아마이드가 형성된다는 단점을 가지고 있다. 3차 아민은 물에 대한 불용성, 높은 추출 효율 그리고 용매 회수의 용이성으로 인해 카르복실산의 반응추출에 널리 사용되고 있다. Jagirdar와 Sharma(1980)는 다양한 카르복실산을 수용상으로부터 유기상으로 분리하기 위해서 tri-n-octylamine (TOA)과 물에 섞이지 않는 유기용매를 유기상으로한 추출을 행하였다(15). Bizek 등(1992)은 trialkylamine이 용해된 1-octanol/n-heptane계를 이용하여 구연산에 대한 반응추출을 실시하였으며 Heyberger 등(1998)은 3차 아민계 추출제를 이용하여 구연산에 대한 반응추출 특성을 고찰하였다(16, 17). 3차 아민은 그 사슬 길이에 따라 다양한 종류가 존재하며 추출능은 사슬길이가 늘어남에 따른 염기도의 증가에 의해 증가하게 된다. 그러나 이같은 사실은 Fig. 2에서 보듯이 극성이 있는 활성 희석제 (active diluent)에서는 성립하나 극성이 없는 비활성 희석제 (inactive diluent)에서는 반대의 경향이 나타나는 것으로 보고되었다(18).

보통은 아민-추출물 복합체의 용해도 향상과 제 3상 형성 (third phase formation)의 억제를 동시에 수행하기 위해 활성 희석제와 비활성 희석제를 혼합하여 사용하게 된다. 이와 같은 혼합 희석제에 대해서는 비교적 짧은 사슬 길이를 갖는 3차 아민과 사슬 길이가 긴 3차 아민을 혼합하여 추출제를 구성할 경우 특정 아민을 단독으로 사용했을

경우에 비해 그 추출능이 현저하게 증가하는 것으로 나타났다(19, 20).

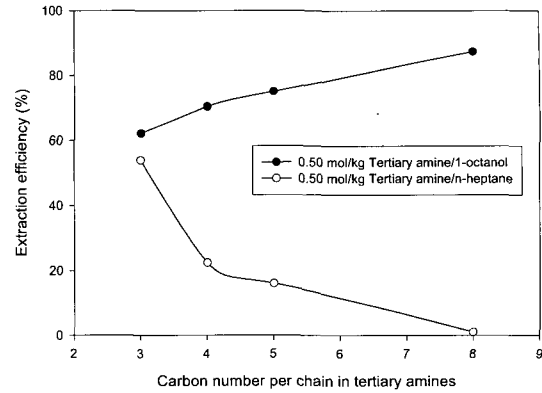


Figure 2. Effect of chain length of tertiary amines on extraction efficiency in succinic acid extraction(18).

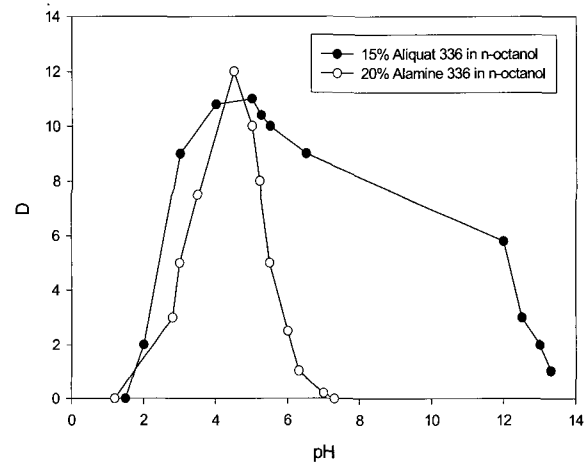
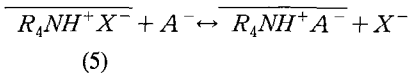


Figure 3. Effect of pH on the distribution coefficient in tertiary amine and quaternary amine salt(22).

최근 4차 암모늄 염을 반응 추출에 적용한 사례들이 꾸준히 보고되고 있다. 4차 암모늄 염은 3차 아민과는 달리 이온교환 반응을 기본으로 하여 추출이 이루어지며 반응식은 다음과 같다.



4차 암모늄 염의 경우 3차 아민에 비해 낮은 추출능을 가지는 것으로 알려져 있지만 이온교환 반응에 의해 추출이 진행되므로 3차 아민과는 달리 추출하고자 하는 물질의 해리 여부에 크게 영향을 받지 않는다(21). Fig. 3에서는 3차 아민의 일종인 Alamine 336과 4차 암모늄 염인 Aliquat 336의 추출능을 pH에 따라 비교한 결과를 나타내었다(22). 그림에서 보듯이 4차 암모늄 염이 3차 아민에 비해 더 넓은 pH영역에 걸쳐 높은 추출능을 보임을 알 수 있다. 이와 같은 특성을 이용한 3차 아민과 4차 암모늄 염

수 있음이 밝혀졌다(23). 최근에는 4차 암모늄 염에서의 음이온을 다른 음이온으로 치환한 새로운 추출제들이 연구되기도 하였다(24).

반응추출에 사용되는 회석제

반응추출에 사용되는 아민계 추출제들은 높은 추출능을 가짐에도 불구하고 그것들의 높은 점성과 마모성 그리고 반응시의 발열 문제 등으로 인해 회석제에 회석하여 사용해야 한다. 회석제의 물성은 아민-추출물 복합체의 반응비, 아민의 로딩값 (loading value) 뿐 아니라 제 3상의 형성 정도에도 영향을 주기 때문에 적절한 회석제의 사용은 반응추출에 있어 중요하다. 회석제는 크게 활성 회석제와 비활성 회석제로 구분할 수 있다.

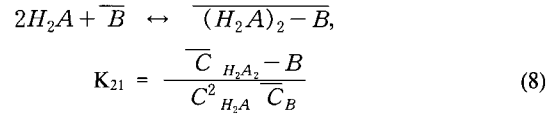
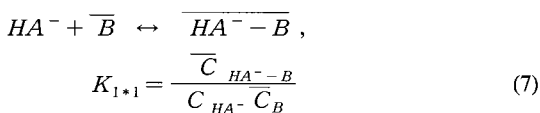
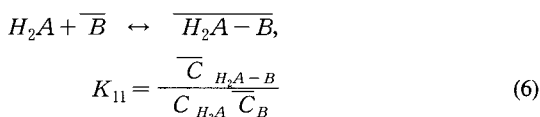
활성 회석제는 아민-추출물 복합체를 용해시킬 수 있는 작용기를 가진 회석제를 말한다. 여기에는 염화탄화수소, 케톤, 알콜, 그리고 할로젠화 방향족 화합물 등이 있다. 반면, 비활성 회석제는 아민-추출물 복합체에 대한 낮은 용해도를 가진다. 이들은 활성 회석제와는 달리 작용기가 없고 비극성을 가지며 제 3상의 형성이 현저히 떨어진다는 장점을 가진다. 또한 활성-비활성 회석제를 혼합한 회석제가 사용될 경우 회석제의 조성 조절에 따른 추출물 회수와 용매 재생도 가능한데 이를 회석제-스윙-재생 (dileut-swing -regeneration, DSR)이라 한다.

숙신산 분리정제를 위한 반응추출의 적용

모사 숙신산 수용액으로부터의 반응추출

발효액 내의 다양한 불순물 영향을 배제한 상태에서의 숙신산 추출평형을 조사하기 위하여 모사 숙신산 수용액으로부터의 숙신산 반응추출을 실시하였다. 모사 숙신산 수용액에서의 숙신산 농도는 50 g/L였으며 이는 *Anaerobiospirillum succiniciproducens*에 의해 생산되는 발효액의 조성에 기초한 것이다. *Anaerobiospirillum succiniciproducens*는 숙신산 이외에도 상당량의 아세트산을 만들어낸다(25).

3차 아민을 기초로 한 숙신산의 반응추출에서의 추출평형은 수용상에 대한 3차 아민의 용해도는 무시할 수 있고 3차 아민은 오직 비헤리 형태의 숙신산과 반응할 수 있다는 점과 숙신산은 2가 카르복실산으로서 분자간 수소결합 (intermolecular hydrogen bonding)에 의해 이합체 (dimer)를 형성할 수 있다는 가정을 바탕으로 한 모델을 통해 모사될 수 있다(26, 27). 이와 같은 가정을 바탕으로 숙신산과 3차 아민간의 반응은 다음과 같이 표현할 수 있다. 여기에서 B는 아민이며 overbar는 유기상을 의미한다.



숙신산이 비록 2가 산이긴 하지만 결합비가 (1, 2)인 숙신산-3차 아민 복합체의 형성은 어려운 것으로 알려져 있다(28).

각 반응물에 대한 물질수지를 바탕으로 로딩값 Z는 다음과 같이 얻을 수 있다.

$$Z = \frac{K_{11} C_{H_2A} + K_{1*1} C_{HA^-} + 2K_{21} C_{H_2A}^2}{1 + K_{11} C_{H_2A} + K_{1*1} C_{HA^-} + K_{21} C_{H_2A}^2} \quad (9)$$

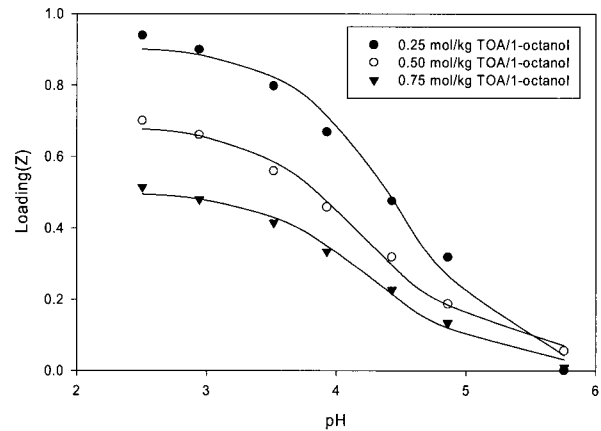


Figure 4. Effect of pH on the loading values for succinic acid in succinic acid extraction(30).

Fig. 4에서는 TOA (tri-n-octylamine)와 1-octanol이 혼합된 유기상을 이용하여 모사 숙신산 수용액에 대한 추출평형을 나타내었다. 모든 아민 농도에 대해서 로딩값은 pH값이 증가함에 따라 감소하는 경향을 보였다. pH값의 감소는 비헤리산의 농도가 증가하는 것을 의미한다. 그림에서 보듯이 추출평형 곡선은 숙신산의 pK_{A1} 값 근처에서 크게 변하는 것을 알 수 있으며 이를 통해 TOA가 반응하는 숙신산의 형태는 대부분 비헤리 형태를 가진다는 것을 확인할 수 있다(29, 30).

결국 TOA가 비헤리산만을 추출한다는 것은 pH에 따른 추출거동이 각각의 카르복실산마다 달라짐을 말하며 이는 이성분 카르복실산 혼합물로부터 특정 카르복실산을 선택적으로 제거하기 위한 효과적인 수단을 제공하게 된다(30). 기존에는 이성분계 이상의 카르복실산 수용액에 대한 반응추출을 단순히 회석제나 추출제의 종류를 바꾸어 실시하였으나 선택도가 비교적 낮은 것으로 보고되었다(31, 32). *Anaerobiospirillum succiniciproducens*이 생산하는 발효액 조성에 기초하여 숙신산과 아세트산이 혼합된 모사 수용액에 대한 추출특성을 Fig. 5에 나타내었다. 아세트산에 대한 선택도는 pH가 증가할수록 높아지며 TOA의 농도와는 반비례함을 알 수 있다. 낮은 pH의 경우 TOA의 반응 부위에 숙신산이 주로 결합되어 있으나 pH값 5 근처에서

는 숙신산보다는 아세트산과 결합할 수 있는 TOA가 많아 지게 되므로 상대적으로 숙신산의 추출이 잘 이루어지게 된다. 이를 바탕으로 0.25 mol/kg TOA/1-octanol 유기상을 이용하여 3단계의 회분식 추출을 수행할 경우 숙신산은 거의 대부분 수용상에 남아 있고 아세트산의 약 70% 이상을 제거할 수 있다는 것이 보고되었다(30). 이는 전기투석법을 이용하여 숙신산과 아세트산으로 구성된 모사 수용액으로부터 숙신산을 선택적으로 분리한 결과와 비교했을 때보다 더 우수한 결과를 얻었음을 알 수 있다(33).

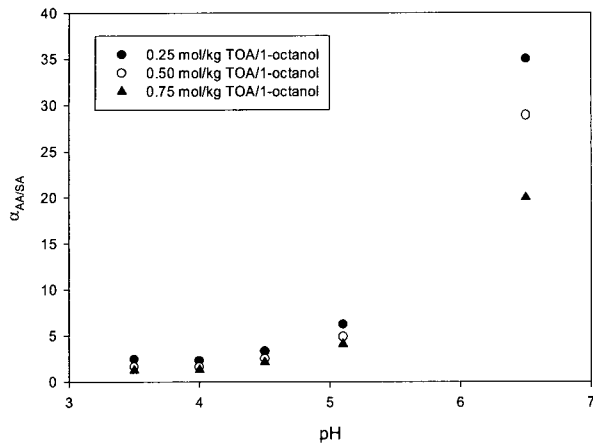


Figure 5. Effect of pH on the separation factors for acetic acid in succinic and acetic acid aqueous solution(30).

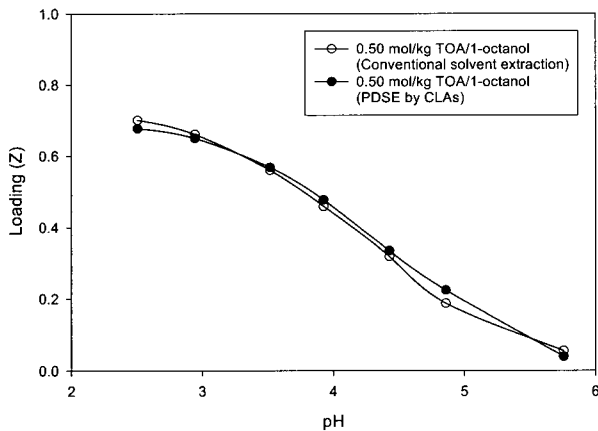


Figure 6. Comparison of the loading values in PDSE by CLAs and conventional mixer-settler type extractor(35).

기존의 반응추출은 대부분 혼합-침강조를 이용하여 수행되어 왔으나 교반에 따른 에너지 소비와 상분리의 어려움을 극복하기 위해서 CLA (colloidal liquid aphrons)를 이용한 선분산 용매추출법 (PDSE, predispersed solvent extraction)을 이용한 사례도 보고되었다(34-36). CLA란 수용성 계면활성제 필름으로 둘러싸여 있는 콜로이드 형 구형 액적이 연속상에 분산되어 있는 형태를 말한다(37). 가운데 구형 액적은 소량의 지용성 계면활성제를 포함하고 있으며 CLA의 크기는 수 마이크로에서 50 마이크로에 이

를 수 있다. CLA 표면을 둘러싸고 있는 계면활성제 층은 추출제를 포함한 에이프론을 추가적인 기계적 교반 없이 연속상에 분산시킬 수 있게 하며 이에 따른 물질전달 속도 상승을 가져올 수 있다. Fig. 7에서는 CLA를 이용한 숙신산의 선분산 용매추출법을 기존의 혼합-침강조를 이용한 추출법과 비교했을 때 기계적 교반이 없음에도 불구하고 추출능의 차이가 거의 나타나지 않음을 나타내고 있다(34). 최근에는 CLAs를 이용한 컬럼에서의 연속추출 결과도 보고되고 있다. 또한, CLA는 이같은 장점 이외에도 미생물에 대한 용매 독성을 줄일 수 있어서 추출적 발효공정(*in situ extractive fermentation*)으로의 적용도 가능하다(37). 그러나 추출이 완료된 CLA로부터 숙신산을 얻기 위한 회수효율이 비교적 낮은 단점이 있으므로 이를 극복하기 위한 연구가 진행 중에 있다.

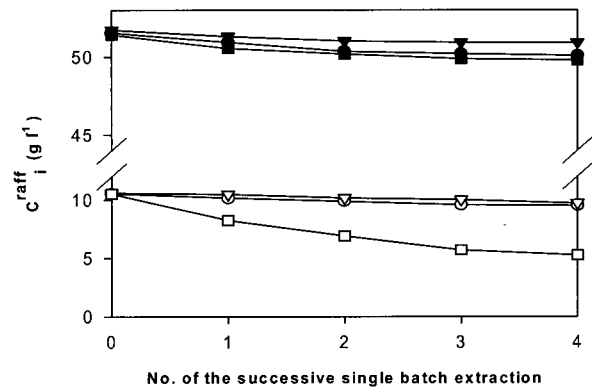


Figure 7. Multiple extraction for the removal of acetic acid from the final fermentation broth by *Mannheimia succiniciproducens* using 0.25 mol/kg TOA/1-octanol(39).

숙신산 발효액으로부터의 반응추출 및 최종분리정제

최근 숙신산 생산을 위해 숙신산 생산 대사 회로 분석 및 최적 발효조건이 확립된 *Mannheimia succiniciproducens* 균주가 개발되었다(38). 전술한 바와 같이 발효법에 의한 숙신산 생산 공정은 사용원료가 값싼 재생자원을 이용한다는 점에서 경제적이다. 더욱이 숙신산 발효공정은 이산화탄소를 소비하는 청정기술이기 때문에 환경친화적인 공정으로 그 가치가 높다고 할 수 있다. 그러나 *Mannheimia succiniciproducens*를 비롯한 숙신산 생산 균주가 만들어내는 발효액 내에는 숙신산 이외의 불순 카르복실산인 아세트산, 피루브산, 말레익산, 푸마릭산 등이 발현된다. 이 경우 불순 카르복실산 제거 및 숙신산의 정제를 위한 전처리 공정으로 3차 아민계 추출제를 이용한 반응추출공정을 사용할 수 있다. 즉, 3차 아민은 그 추출대상을 비헤리산으로 한정하기 때문에 적절한 pH 범위에서는 특정 유기산만을 선택적으로 추출할 수 있게 된다. *Mannheimia succiniciproducens*에 의해 발현된 발효액을 pH값 5.0에서 3회 연속 추출한 결과 Fig. 7에서 보듯이 숙신산과 아세트산의 질량비가 4.9에서 9.4로 높아졌음을 확인할 수 있었다(39).

위와 같은 결과를 바탕으로 전처리 공정으로서 반응추출을 적용한 숙신산의 고도정제공정을 Fig. 8과 같이 확립

하였다(40). 반응추출에 의한 전처리를 거치게 되면 단 1회의 추출을 통하더라도 숙신산의 농도는 일정하게 유지하면서 피루브산, 아세트산, 말레익산의 50% 이상을 제거함으로써 이후 공정의 조업을 원활하게 할 수 있었다. 또한 결정화공정의 pH를 최적화함으로써 불순 카르복실산은 95% 이상, 글루코오스는 99.8% 이상 제거하는 정제효과를 얻을 수 있었으며 최종적으로 99% 이상의 순도를 가지는 숙신산을 얻을 수 있었다(40).

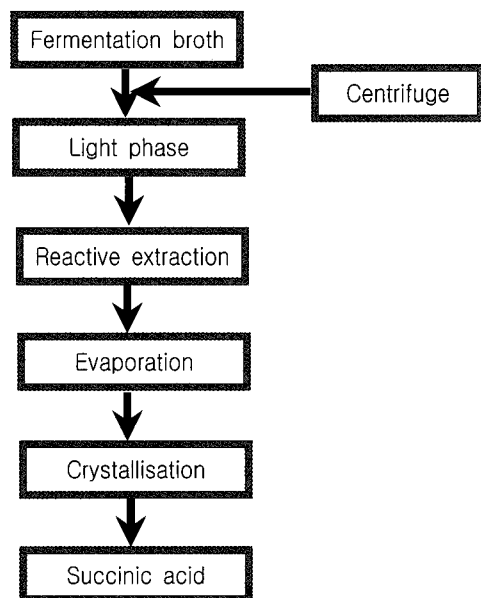


Figure 8. Schematic diagram of recovery process for succinic acid from fermentation broth by *Mannheimia succiniciproducens*(40).

요약

이상을 통해 숙신산 분리정제를 위한 반응추출의 원리와 연구개발 및 적용 사례를 살펴보았다. 반응추출은 에너지가 적게 드는 고효율 생물분리공정이라는 장점을 확인할 수 있었으며 향후 카르복실산 이외에 항생제를 비롯한 다양한 생물분자들의 분리정제에 적용할 수 있는 높은 응용 가능성을 갖고 있다. 그러나 특정 카르복실산의 회수를 목적으로 할 경우 추출제의 pH제한성은 극복되어야 할 문제점으로 작용할 수도 있다. 이와 병행하여 추출된 특정 카르복실산의 효과적인 회수 및 용매 재활용을 위한 재생공정의 개발도 요구된다. 기존에는 온도-스윙-재생법(temperature-swing-regeneration, TSR)이나 희석제-스윙-재생법(diluent-swing-regeneration, DSR)을 주로 사용하였으나 회수율이 낮은 단점이 있다. 반응추출 공정의 경제성 향상을 위해서는 이를 개량하거나 대체할 수 있는 공정의 개발이 요구된다. 아울러 발효공정의 수율향상과 생성물의 동시분리를 위해반응추출을 발효공정에 in-situ로 적용하기 위해서는 추출제 및 희석제의 생물적합성 향상을 위한 연구도 필요하다.

감사

본 연구는 한국과학재단지정 초정밀생물분리기술연구센터의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Lynd, L. R., C. E. Wyman, and T. U. Gerngross (1999), Biocommodity engineering, *Biotechnol. Prog.* **15**, 777-793.
2. Zeikus, J. G., M. K. Jain, and P. Elankovan (1999), Biotechnology of succinic acid production and markets for derived industrial product, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **51**, 545-552.
3. Nghiem, N. P., B. H. Davison, B. E. Suttle, and G. R. Richardson (1997), Production of succinic acid by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **63-65**, 565-576.
4. Lee, S. Y., S. H. Hong, S. H. Lee, and S. J. Park (2004), Fermentative production of chemicals that can be used for polymer synthesis, *Macromol. Biosci.* **4**, 157-164.
5. Millard, C. S., Y.-P. Chao, J. C. Liao, and M. I. Donnelly (1996), Enhanced production of succinic acid by overexpression of phosphoenolpyruvate carboxylase in *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.* **62**, 1808-1810.
6. Lee, P. C., S. Y. Lee, S. H. Hong, and H. N. Chang (2003), Batch and continuous cultures of *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E for the production of succinic acid from whey and corn steep liquor, *Biopro. Biosyst. Eng.* **26**, 63-67.
7. Kim, D. Y., S. C. Yim, P. C. Lee, W. G. Lee, S. Y. Lee, and H. N. Chang (2004), Batch and continuous fermentation of succinic acid from wood hydrolysate by *Mannheimia succiniciproducens* MBEL55E, *Enzyme Microbiol. Technol.* **35**, 648-653.
8. Baniel, A. M. and A. M. Eyal (1995), Citric acid extraction, US patent 5,426,220.
9. Hong, Y. K., W. H. Hong, and D. H. Han (2001), Application of reactive extraction of recovery of carboxylic acids, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**, 386-394.
10. Glassener, D. A., P. Elankovan, D. R. Beacom, and K. A. Berglund (1995), Purification process for succinic acid produced by fermentation, *Appl. Biochem. Biotechnol.* **51/52**, 73-82.
11. Kang, S. H., Y. K. Chang, and H. N. Chang (2004), Recovery of ammonium lactate and removal of hardness from fermentation broth by nanofiltration, *Biotechnol. Prog.* **20**, 764-770.
12. Kertes, A. S. and C. J. King (1986), Extraction chemistry of fermentation product carboxylic acids, *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 269-282.
13. Fahim, M. A., A. Qader, and M. A. Hughes (1992), Extraction equilibria of acetic and propionic acids from dilute aqueous solution by several solvents, *Sep. Sci. Technol.* **27**, 1809-1821.
14. Han, D. H. and W. H. Hong (1996), Reactive extraction of lactic acid with trioctylamine(TOA)/methylene chloride(MC)/n-hexane, *Sep. Sci. Technol.* **31**, 1123-1135.
15. Jagirdar, G. C. and M. M. Sharmar (1980), Recovery and separation of mixtures of organic acids from dilute aqueous solutions, *J. Sep. Proc. Technol.* **1**, 40-43.
16. Bizek, V., J. Horacek, M. Kousova, A. Heyberger, and J. Prochazka (1992), Mathematical model of extraction of citric acid with amine, *Chem. Eng. Sci.* **47**, 1433-1440.
17. Heyberger, A., J. Prochazka, and E. Volaufova (1998), Extraction of citric acid with tertiary amine-Third-phase formation, *Chem. Eng. Sci.* **53**, 515-521.
18. Hong, Y. K. and W. H. Hong (2000), Equilibrium studies on reactive extraction of succinic acid from aqueous solutions with tertiary amines, *Biopro. Biosyst. Eng.* **22**, 477-481.

19. Hong, Y. K., W. H. Hong and T. H. Hong (1999), Separation characteristics of lactic acid by using mixed tertiary amine extractants, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 566-571.
20. Hong, Y. K. and W. H. Hong (2000), Extraction of succinic acid with 1-octanol/n-heptane solutions of mixed tertiary amine, *Biopro. Biosyst. Eng.* **23**, 535-538.
21. Hong, Y. K. and W. H. Hong (2004), Reactive extraction of succinic acid by amine extractants and comparison of extraction characteristics of maleic acid, *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* **19**, 33-37.
22. Li, Z., W. Qin, and Y. Dai (2002), Extraction behavior of amino sulfonic acid by tertiary and quaternary amines, *Ind. Eng. Chem. Res.* **41**, 5812-5818.
23. Kyuchoukov, G., M. Marinova, J. Molinier, J. Albet, and G. Malmay (2001), Extraction of lactic acid by means of a mixed extractants, *Ind. Eng. Chem. Res.* **40**, 5635-5639.
24. Kyuchoukov, G., M. Marinova, J. Molinier, J. Albet, and G. Malmay (2004), New method for the extraction of lactic acid by means of a modified extractant (Aliquat 336), *Ind. Eng. Chem. Res.* **43**, 1179-1184.
25. Lee, P. C., W. G. Lee, S. Kwon, S. Y. Lee, and H. N. Chang (1999), Succinic acid production by *Anaerobiospirillum succiniciproducens*: Effect of the H_2/CO_2 supply and glucose concentration, *Enzyme Microb. Technol.* **24**, 549-554.
26. Hong, Y. K., W. H. Hong, and Y. K. Chang (2001), Effect of pH on the extraction characteristics of succinic acid and formic acid with tri-n-octylamine dissolved in 1-octanol, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **6**, 347-351.
27. Yang, S.-T., S. A. White, and S.-T. Hsu (1991), Extraction of carboxylic acids with tertiary amine and quaternary amines: Effect of pH, *Ind. Eng. Chem. Res.* **30**, 1335-1342.
28. Hong, Y. K. and W. H. Hong (2004), Influence of chain length of tertiary amines on extractability and chemical interactions in reactive extraction of succinic acid, *Korean J. Chem Eng.* **21**, 488-493.
29. Tung, L. A. and C. J. King (1994), Sorption and extraction of lactic and succinic acid at $pH > pK_{A1}$: I. Factors governing equilibria, *Ind. Eng. Chem. Res.* **33**, 3217-3223.
30. Hong, Y. K. and W. H. Hong (2005), Removal of acetic acid from aqueous solutions containing succinic acid and acetic acid by tri-n-octylamine, *Sep. Purif. Technol.*, **42**, 151-157.
31. Kirsch, T. and G. Maurer (1997), Distribution of binary mixtures of citric, acetic, and oxalic acids between water and organic solutions of tri-n-octylamine. Part I. Organic solvent toluene, *Fluid Phase Equilib.* **131**, 213-231.
32. Siebold, M., P. v. Frieling, R. Joppien, D. Rindfleisch, K. Schugerl, and H. Roper (1995), Comparison of the production of lactic acid by three different Lactobacilli and its recovery by extraction and electro dialysis, *Proc. Biochem.* **30**, 81-95.
33. Kim, S.-H. and B. C. Lee (2005), Separation of succinic acid from organic acid mixture using electro dialysis, *Korean Chem. Eng. Res.* **43**, 260-271.
34. Kim, B. S., Y. K. Hong, and W. H. Hong (2002), Effect of pH on the extraction characteristics of succinic acid and its stability of colloidal liquid aphrons, *Korean J. Chem. Eng.* **19**, 669-672.
35. Kim, B. S., Y. K. Hong, and W. H. Hong (2004), Effect of salts on the extraction characteristics of succinic acid by predispersed solvent extraction, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 207-211.
36. Kim, B. S., Y. K. Hong, and W. H. Hong (2004), Predispersed solvent extraction of succinic acid aqueous solution by colloidal liquid aphrons in column, *Biotechnol. Bioprocess Eng.* **9**, 454-458.
37. Hong, Y. K., D. W. Lee, P. C. Lee, W. H. Hong, and H. N. Chang (2001), Extraction of lactic acid with colloidal liquid aphrons and comparison of their toxicities with solvents without surfactant on the viability of *Lactobacillus rhamnosus*, *Biotechnol. Lett.* **23**, 983-988.
38. Hong, S. H., J. S. Kim, S. Y. Lee, Y. H. In, S. S. Choi, J.-K. Rih, C. H. Kim, H. Jeong, C. G. Hur, and J. J. Kim (2004), The genome sequence of the capnophilic rumen bacterium *Mannheimia succiniciproducens*, *Nat. biotechnol.* **22**, 1275-1281.
39. Huh, Y. S., Y. K. Hong, W. H. Hong, and H. N. Chang (2004), Selective extraction of acetic acid from fermentation broth produced by *Mannheimia succiniciproducens*, *Biotechnol. Lett.* **26**, 1581-1584.
40. Hong, W. H., S. Y. Lee, Y. K. Hong, Y. S. Huh, W. H. Lee, and H. H. Song, Purification method for succinic acid, Korean Patent Appl. 10-2005-0004652.