

# 유기용매와 이온성액체를 이용한 바이오 부탄올 추출발효 용매 선정 평가

조민옥 · 이선미 · 상병인 · 엄영순\*

한국과학기술연구원 환경기술연구단

## Evaluation of Extractants for Bio-butanol Extraction Fermentation Using Organic Solvents and Ionic Liquids

Min Ok Cho, Sun-Mi Lee, Byoung-In Sang, and Youngsoon Um\*

Korea Institute of Science and Technology, Center for Environmental Technology Research, Seoul 136-791, Korea

**Abstract** Oleyl alcohol, butyl butyrate, and two different ionic liquids were evaluated for the extraction of butanol from culture broth without toxic effect to cells. The tested solvents showed more than 50% extraction efficiency, and oleyl alcohol was chosen as the best extractant for butanol among the used extractants with a partition coefficient of 2.89. When oleyl alcohol was used as an extractant, more than 80% of butanol was extracted in the wide range of butanol concentrations (1-20 g/L) and pH values (pH 4-5.5). In extractive fermentation using oleyl alcohol only, there was 11% more butanol production and glucose consumption when compared to that without extractive fermentation, implicating a reduced inhibitory effect of butanol due to butanol removal to the oleyl alcohol phase. In addition, oleyl alcohol did not inhibit cell growth, while a mixture of oleyl alcohol and butyl butyrate with the volume ratio of 9 : 1~7 : 3 inhibited either butanol production or cell growth significantly due to the toxicity of butyl butyrate to cells. In conclusion, oleyl alcohol can be used as an efficient and non-toxic solvent for extractive fermentation for butanol production.

**Keywords:** butanol, oleyl alcohol, ionic liquid, extractive fermentation, *in-situ* removal

### 서 론

현재 세계 에너지 수요량의 80% 가량을 석유, 석탄, 천연가스 등 화석연료에 의존하고 있다. 이들은 매장량이 한정되어 있을 뿐만 아니라, 연소 시 발생하는 각종 오염물질과 그로 인한 지구 온난화 문제 등 여러 가지 환경적인 문제를 야기 시킨다. 뿐만 아니라 원유 생산국의 지역적 편차에 따른 유가 상승 등의 국가적 긴장이 발생하기도 한다. 따라서 이러한 문제점들을 해결하기 위해 화석연료보다 더 청정하고 안전하며 재생 가능한 대체 에너지원의 개발이 필요하다 [1].

다양한 산-재생 에너지원 중 바이오 에너지는 여타의 재생 에너지와는 다른 장점이 있다. 바이오 에너지는 무형의 에너지 (열, 전기 등)를 생산하는 다른 재생 에너지 (풍력, 태양열)와는 달리 기체, 액체의 형태 (메탄, 수소, 알코올, 바이오 디젤)로 생산되기 때문에 에너지 저장성 및 이동성이 매우 높다는 장점이 있다. 바이오 에너지는 또한 그 원료로서 식물이나 농업 및 환경 폐기물을 이용하기 때문에 지구 온난화의 주범이 되는 온실가스인 이산화탄소 (CO<sub>2</sub>)를 증가시키지 않는다. 또한 바이오 에너지는 중금속 및 다른 유해물질을 포함하고 있지 않으며, 각종 유기성 폐기물을 이용함으로써 폐기물을 줄이는 효과가 있고, 액체 바이오연료인 경우 기존의 자동차 액체 연료와 함께 혼합하여 사용할 수 있는 장점이 있다 [2,3].

부탄올은 에탄올과 마찬가지로 자동차 연료인 휘발유와 혼합하여 사용할 수 있다. 부탄올의 연료로서의 물리적,

### \*Corresponding author

Tel: +82-2-958-5819, Fax: +82-2-958-6858

e-mail: yum@kist.re.kr

화학적 특성은 현재 자동차 연료로 사용되고 있는 에탄올에 비하여 우수한데, 특히 에탄올에 비해 증기압이 낮아 증기 막힘 (vapor lock)이 적고, 물에 대한 용해도가 낮으며 발열량이 현재 사용하는 가솔린과 거의 비슷하다는 장점을 갖고 있다 [4]. 부탄올을 연료로 사용하면 석유 수입 대체 효과가 있을 뿐 아니라, 부탄올은 휘발유의 탄화수소 화합물보다 더 산화된 연료 (oxygenated fuel)이기 때문에 대기 오염에 악영향을 미치지 않는다. 또한 디젤과 등유의 대체물로 부탄올의 필요성이 제기되고 있고, 부탄올의 휘발유 대체제로서의 우수성에 관한 사실이 보고되고 있다 [5].

미생물을 이용한 부탄올의 생산은 유기산 생성 단계와 용매 생성 단계로 나누어지는 대사경로에 의해 이루어진다. 미생물의 생육단계에 따라서 유기산이 생성되는 단계에서는 부티레이트 (butyrate), 아세테이트 (acetate), CO<sub>2</sub>, H<sub>2</sub> 등이 주로 생성되고, 아세토인 (acetoin), 에탄올 (ethanol), 락테이트 (lactate)가 배양 조건에 따라 소량 생산된다. 이러한 대사산물의 구성은 대수 증식기를 지나면서 용매 생성 단계로 변화하여 분비된 유기산들이 흡수되어 부탄올과 아세톤으로 전환된다. 생산된 부탄올의 지속적인 축적은 세포 성장을 저해하는 것으로 알려져 있으며, 부탄올이 14 g/L일 때 세포성장은 완전히 저해되고, 8 g/L일 때 세포성장이 50%가 저해된다고 보고된 바 있다 [6]. 이렇듯, 부탄올이 생산 균주에 미치는 독성이 에탄올의 그것에 비하여 높기 때문에 경제성 있는 상업적 생산 공정 개발에 어려움이 따르게 된다.

부탄올의 생산성을 제고하기 위한 방법으로는 부탄올 생산과 *in-situ* 부탄올 제거 공정을 연계하여 배양액내의 부탄올 농도를 낮게 유지시킴으로써 부탄올에 의한 독성을 줄이는 공정이 사용될 수 있다. 바이오 부탄올을 미생물 배양액으로부터 분리하는 종래 기술로서는 혐기 발효 공정 중에서 생성되는 가스를 이용하여 상대적으로 소수성인 바이오 부탄올을 탈기하는 gas stripping 공정 [7], 부탄올을 선택적으로 추출하는 유기용매를 이용하는 액-액 추출공정 [8], 막을 이용하여 추출하는 perstraction 공정 [9], 부탄올을 선택적으로 통과시키는 막을 이용하여 부탄올을 제거 농축하는 투과증발 (pervaporation) [9], 그 외에 distillation, adsorption [10] 등의 방법이 이용되어지고 있다. 이러한 방법 중에서 액-액 추출공정은 다른 기술에 비해 에너지 소비가 작고, 분리 막 사용시 발생하는 막힘 현상에 대한 염려가 없다는 장점이 있다 [11]. 용매를 사용한 추출방법은 배양액으로부터 바이오 부탄올을 추출해 내는 간단한 방법으로서 적합한 용매를 선정하는 것이 중요하다. 부탄올 추출의 경우, 부탄올을 생산하는 미생물에게 저해 작용을 일으키지 않고, 분배계수가 높아 배양액내의 부탄올을 효과적으로 추출해 낼 수 있어야 하며, 또한 배양액과 상분리가 쉽게 일어나고 휘발성이 낮은 친환경 용매를 선정하는 것이 좋다 [12]. 친환경 용매로 최근 연구가 활발히 이루어지고 있는 이온성 액체는 유기 양이온과 유기 (또는 무기) 음이온으로 이루어진 화합물로서 일반

이온성 염 (상온에서 고체상) 과는 다르게 양이온과 음이온의 크기가 상대적으로 커서 packing이 잘 되지 않아 낮은 격자에너지 (lattice energy)를 갖게 된다. 그 결과 낮은 녹는점을 가지게 되어 상온에서도 액체상태로 있는 이온성액체가 다수 존재한다. 이온성 액체의 녹는점, 밀도, 점도, 친수성 및 소수성 등의 특성은 이온성 액체의 양이온과 음이온을 적절히 선택하면 얼마든지 조절이 가능하므로 designer solvent로도 일컬어지고 있다 [13]. 특히 증기압이 낮아서 대기오염을 유발시키는 휘발성 유기화합물 (VOCs)를 대신할 수 있는 청정 대체용매 (green media)로 이용하기 위한 연구가 활발히 이루어지고 있다.

본 연구에서는 유기용매와 친환경 용매인 이온성 액체를 이용하여 부탄올 추출에 적합한 용매를 선정하고자 하였다. 유기용매로는 Roffler 등 [14]이 실험한 다양한 용매 중에서 미생물 생장에 저해작용을 끼치지 않는다고 보고된 oleyl alcohol과, 부탄올과 유사한 화학구조를 가진 부틸부티레이트를 선정하였다. 이온성 액체로는 물과 혼합되지 않는 이미다졸리움 기반 양이온을 가진 소수성 이온성 액체 2종류를 이용하여 부탄올 추출 평가를 수행하였다. 또한, 부탄올 추출 효율과 더불어 부탄올 생산 미생물의 성장 저해 정도를 검토하여 추출발효 (extractive fermentation) 공정 적용시 부탄올 *in-situ* 분리에 적합한 용매를 선정하고자 하였다.

## 재료 및 방법

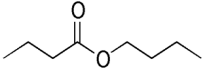
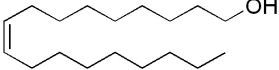
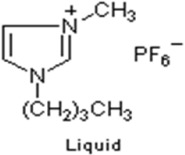
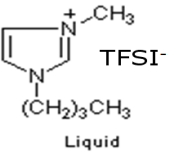
### 추출용매

배양액 내의 바이오 부탄올을 추출하기 위한 유기용매로서 부틸부티레이트 (Aldrich, 98%)와 oleyl alcohol (Aldrich, 85%)을 이용하였고, 이온성 액체로서는 1-부틸-3-메틸 이미다졸리움 비스 (트리플루오로메틸설포닐) 이미드 (1-butyl-3-methyl imidazolium bis (trifluoromethylsulfonyl) imide, [BMIM][TFSI])와 1-부틸-3-메틸 이미다졸리움 헥사플루오로포스페이트 (1-butyl-3-methyl imidazolium hexafluorophosphate [BMIM][PF6])을 이용하여 부탄올 추출 효율을 비교하였다. 사용한 용매의 화학구조와 특성은 Table 1에 나타내었다.

### 추출 실험

부탄올을 추출하는데 가장 적합한 용매를 선정하기 위해 액-액 접촉을 통한 분배계수를 구하였다. 부탄올 원액 (Sigma, 99%)을 20 g/L로 희석하고, 50 mL의 분별 깔때기에 부탄올 수용액과 유기용매 부피 비율이 각각 1:1, 1:2, 1:3이 되도록 준비하였다. 준비된 시료를 분별 깔때기 (separation funnel)에 넣고 3,000 rpm으로 한 시간 동안 교반하고 1시간 동안 상분리가 되도록 한 후, 하부에 위치

**Table 1.** Characteristics of the tested extractants

	Butyl butyrate	Oleyl alcohol	[BMIM][PF <sub>6</sub> ]	[BMIM][TFSI]
Chemical structure				
Molecular formula	C <sub>18</sub> H <sub>16</sub> O <sub>2</sub>	C <sub>18</sub> H <sub>36</sub> O	C <sub>8</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>2</sub> P	C <sub>10</sub> H <sub>15</sub> F <sub>6</sub> N <sub>3</sub> O <sub>4</sub> S <sub>2</sub>
Molar mass (g/mol)	144.21	268.48	284.18	419.36
Density (g/cm <sup>3</sup> )	0.87	0.85	1.37	1.44
Distribution coefficient	1.95	2.89	0.99	1.58

한 수용액 상에서 샘플을 취하여 GC-FID를 이용하여 부탄올 농도를 분석 하였다. 분배계수 (Partition coefficient)는 다음과 같이 정의되며, 분배계수는 수용액 상과 유기용매 상의 부피 비율이 1 : 1일 때 측정된 값으로 계산하였다.

$$m_i = \frac{\text{유기 용매상에서의 용질의 농도 } (C_{io})}{\text{수용액 상에서의 용질의 농도 } (C_{iw})}$$

부탄올 농도에 따른 부탄올 추출 효율의 변화를 알아보기 위해서 증류수에 부탄올의 농도를 1 g/L에서 15 g/L로 다양하게 희석하여 실험하였다. 또한 pH에 따른 부탄올과 부틸산의 추출 영향을 알아보았다. 바이오 부탄올의 발효 과정은 유기산 생성 단계와 부탄올 생성단계로 나누어지는 2단 배양으로서, 미생물의 성장 단계에 따라 유기산 생성 단계에서 글루코스를 소모시켜 부틸산을 생산한 후 생산된 부틸산을 이용하여 부탄올을 생산하게 된다 [15,16]. 또한, 발효가 일어나는 동안 배양액의 pH는 6.5에서 4.5 까지 변화하게 되는데, pH에 따라서 선택적으로 부탄올만 추출하고 부틸산은 추출하지 않는 용매 선정이 필요하다. pH에 따른 실험에서는 부탄올과 부틸산을 증류수에 10 g/L가 되도록 희석하고, pH를 4.0-5.5로 다양하게 변화시키며 실험하여 추출 효율을 구하였다.

### 균주 및 배지 조성

본 실험에 사용된 균주 *Clostridium beijerinckii* NCIMB 8052는 생물자원센터 (KCTC : Korean Collection for Type Cultures)에서 분양받았다. 부탄올 발효에 사용된 배지는 modified CAB 배지 (M-CAB)를 사용하였고, 접종물 배양에 사용한 배지는 RCM (Reinforced clostridia medium) 배지를 사용하였다. M-CAB 배지 사용시 글루코스를 기질로서 사용하였고 보조기질로 sodium butyrate 2 g/L를 첨가하여 부탄올 생산을 촉진시켰다 [15]. 균주의 부탄올 생산 배지인 M-CAB 조성은 증류수 1 L에 글루코스 30 g, yeast extract 4 g, tryptone 1 g, K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1.5 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g, asparagine 0.5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.1 g, MnSO<sub>4</sub> · H<sub>2</sub>O 0.1 g,

FeSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 0.015 g, NaCl 0.1 g을 넣어서 배지를 만들었다. RCM의 배지 조성은 증류수 1 L에 글루코스 5 g, yeast extract 3 g, beef extract 10 g, tryptone 5 g, peptone 5 g, soluble starch 1 g, cysteine hydrochloride 0.5 g, NaCl 5 g, sodium acetate 3 g 이었다.

### 회분식 추출발효 및 독성 테스트

부탄올 생산 발효에 사용한 M-CAB배지는 멸균필터를 통과한 아르곤 가스를 붙여 넣은 후 250 mL 혈청병 (serum bottle)에 배지 50 mL를 넣고, 혐기성 조건을 유지하기 위하여 부틸 고무마개와 알루미늄 캡으로 밀봉하여 121 °C, 15 psig에서 20분간 autoclave하여 멸균하였다. 회분식 추출발효를 위해서는 추출용매를 다른 용기에 담아 멸균하여 준비하고, 혐기상태에서 배지 50 mL가 있는 혈청병에 주입하여 배지와 용매의 부피비율이 1 : 1이 되도록 하였다. RCM에서 overnight 배양한 배양액을 5% 접종시킨 후 37 °C에서 140 rpm으로 배양하고, 일정 시간 간격으로 일회용 멸균 주사기를 사용하여 혈청병 하부에 위치한 배양액과 상부에 위치한 용매 층에서 각각 샘플을 취하였다. O.D. (optical density)를 측정해 미생물의 성장 정도를 확인하여 추출용매가 미생물 성장에 저해작용을 미치는지 확인하고, 배양액과 용매 층에 있는 부탄올 농도를 분석하여 총 부탄올 생산을 계산하였다.

### 분석방법

분석에 사용한 샘플은 2 mL을 취해 spectrophotometer (UV-1700, SHIMAZU)를 이용하여 optical density (O.D.)를 측정해 미생물의 성장 정도를 확인하였다. 취한 샘플을 원심분리기를 이용하여 12,000 rpm, 10 °C에서 5분 동안 원심분리 하고 cell pellet을 제거한 후 상등액만을 취하여 분석하였다. 기질 (글루코스)의 소모를 알아보기 위하여 reflect quant strip (glucose test strip, Merck co., Ltd)을 이용하여 분석하였다.

알코올과 유기산의 농도 분석은 GC-FID (Gas

Chromatography Flame Ionization Detector : Agilent technology 6890N Network GC system)를 이용하였다. 사용한 column은 HP-INNOWax column (30 m x 250  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technologies)을 사용하였다. Oven 온도는 50°C에서 170°C까지, 10°C/min으로 설정하여 증가시켰다. Injector와 detector의 온도는 250°C로 설정하였으며 He을 carrier 가스로 이용하였다 [15].

추출 용매 내 부탄올의 농도는 GC-FID (YOUNGLIN 6000 series)를 이용하여 분석하였다. 사용한 column은 HP-5 column (30 m x 320  $\mu\text{m}$  x 0.25  $\mu\text{m}$ , Agilent Technology)을 사용하였다. Oven 온도는 45°C에서 315°C까지 10°C/min으로 설정하여 증가시켰다.

## 결과 및 고찰

### 추출 용매 선정

고농도 바이오 부탄올 생산을 위한 추출발효 공정에서 추출 효율이 뛰어나면서 미생물에게 해를 주지 않는 용매를 선정하는 것은 매우 중요하다. 본 연구에서는 oleyl alcohol, 부틸부티레이트, 이온성 액체 [BMIM][TFSI]과 [BMIM][PF6]의 부탄올 추출효율을 평가하여 부탄올 추출에 적합한 용매를 선정하고, 선정된 용매가 미생물 생장에 해를 주는지의 여부를 조사하였다.

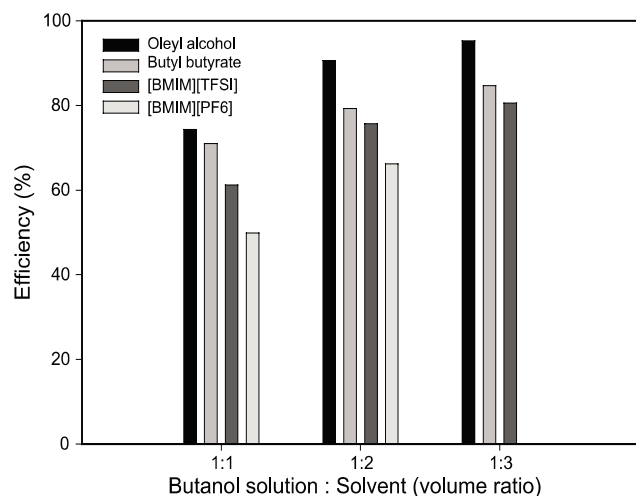


Fig. 1. Extraction of butanol with solvents.

각 용매별 부탄올에 대한 분배 계수를 알아보기 위해 분별 깔때기를 이용하여 부탄올용액:용매 부피비를 1:1로 하여 추출 실험을 수행하였다. 그 결과, Table 1에서와 같이 oleyl alcohol이 2.89로 가장 높은 분배계수를 나타내었고, 이온성액체 [BMIM][PF6]는 상대적으로 낮은 0.99를 나타내었다. 추출 용매들을 다양한 부피비에서 추출 실험을 수행한 결과 Fig. 1에서와 같이 사용되어진 4가지 추출용

매들이 모두 50% 이상의 부탄올 추출효율을 보였으며, 추출 용매의 부피 비율이 증가 할수록 추출효율이 높아지는 것을 확인 할 수 있었다. 부탄올용액과 추출용매의 부피비가 1:1인 경우, oleyl alcohol을 사용한 경우는 추출 효율이 74.3%로서 [BMIM][PF6]를 사용하여 추출한 경우보다 1.5배 증가한 추출효율을 보였다. 또한, 추출실험에 사용된 용매의 분배계수가 높을수록 추출 효율이 높아진다는 것을 확인할 수 있었다 [17].

본 실험 결과, 유기용매인 oleyl alcohol과 부틸부티레이트가 이온성액체보다 효과적으로 부탄올을 추출할 수 있음을 알 수 있었다. 이온성 액체는 녹는점이 낮고 증기압이 낮아 휘발성이 낮고 비가연성이므로 친환경 용매로서 장점이 있으나, 가격이 상대적으로 높고 부탄올 추출 효율이 낮기 때문에 부탄올 추출용매로서 적합하지 않다고 판단된다. 그에 비하여 oleyl alcohol이나 부틸부티레이트의 경우 범용 용매로 사용되어지고 있고 부탄올 추출효율이 우수하므로, 이 후 연구에서는 oleyl alcohol과 부틸부티레이트를 이용하여 실험을 수행하였다.

### 부탄올 농도와 pH에 따른 추출 효율 비교

부탄올농도에 따른 부탄올 추출효율 영향을 알아보기 위해 부탄올 농도를 1 g/L-15 g/L로 변화시키면서 부틸부티레이트와 oleyl alcohol을 이용하여 추출 실험을 수행하였다. Fig. 2에서 보는 바와 같이 부탄올 농도에 따른 부틸부티레이트의 추출 효율은 약 70%에서 75% 정도로 변화의 폭이 크지 않는 것을 확인할 수 있었다. Oleyl alcohol을 이용한 추출에서는 부탄올 농도에 상관없이 일반적으로 80% 이상의 높은 추출효율을 나타내었으며, 부탄올 농도가 낮을수록 추출효율이 높아지는 경향을 보였다. Oleyl alcohol을 사용했을 경우, 부탄올의 농도가 1 g/L일 경우의 추출효율이 15 g/L일 때보다 약 17% 가량 높은 것으로 확인되었다.

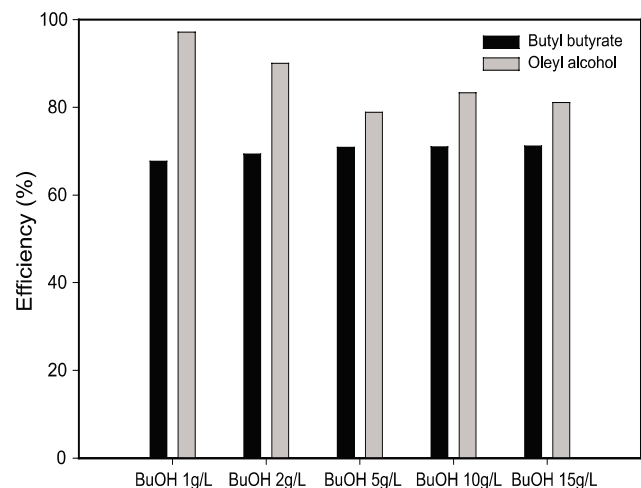


Fig. 2. Efficiency of extraction with various butanol concentration.

pH에 따른 부탄올의 추출 효율과 선택성에 대한 영향을 알아보기 위해 부탄올과 부틸산을 증류수에 각각 10 g/L로 희석시킨 후 pH를 4-5.5로 변화시키면서 부틸부티레이트와 oleyl alcohol을 이용하여 추출 실험을 수행하였다. 부탄올 발효 과정 중에 부틸산을 포함한 유기산 생산이 이루어지면서 pH가 초기 pH 6.5에서 4.5까지 내려가게 되므로 추출발효에서 부탄올 추출효율이 pH에 따른 영향을 받지 않아야 한다. 또한, 추출 용매가 바이오부탄올의 전구체인 부틸산을 추출한다면 부탄올 생산에 효율성이 떨어지게 되므로, 부탄올은 추출하되 부틸산은 추출하지 않는 용매를 선정하여야 한다. 부틸부티레이트나 oleyl alcohol 모두 Fig. 3에서 보는 바와 같이 배양액의 pH 변화에 따른 부탄올 추출 효율이 각각 약 70%와 80%로 일정하게 유지되는 것을 확인할 수 있었다. 그러나 부틸산의 경우 pH가 낮아지면 추출효율이 높아지는 등 pH에 따라 추출효율이 크게 변화되는 것을 확인할 수 있었다. 바이오부탄올 생산공정에서 부탄올 생산 미생물은 pH 5 이상에서 부탄올을 생산하게 된다. 본 연구에서 선정된 부틸부티레이트와 oleyl alcohol은 pH 5.0에서 부틸산 추출효율이 30% 이하로 매우 낮으면서 부탄올 추출효율이 70-80%를 유지하므로 부탄올 추출 용매로서 적합함을 알 수 있다.

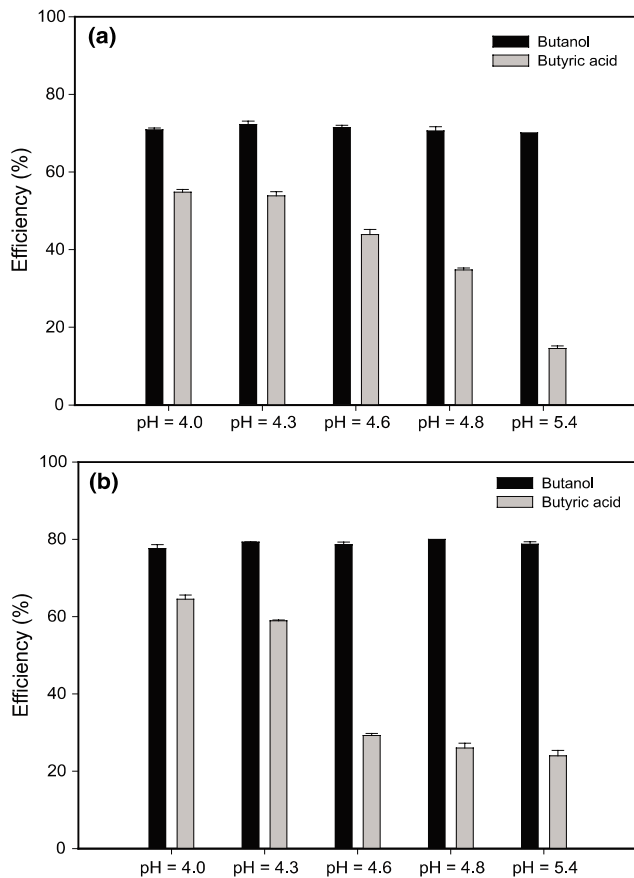


Fig. 3. Efficiency of extraction at various pH: (a) Butyl butyrate, (b) Oleyl alcohol.

### 바이오부탄올 추출발효와 독성 테스트

실제로 미생물을 배양하는 과정에서 바이오부탄올의 추출 효율을 조사하고 추출용매가 미생물에게 미치는 독성 영향을 살펴보기 위하여 혈청병 (serum bottle)을 사용하여 추출 발효를 수행하였다. 본 연구실에서 실험한 결과, 부틸부티레이트의 경우 부탄올 추출효율이 약 70% 정도로 뛰어나고 가격이 저렴한 장점이 있는 반면, 부틸부티레이트를 사용하여 추출 발효 실험을 수행하였을 경우 2-3일 후에도 OD 증가가 없는 것을 확인하였고, 이것은 부틸부티레이트가 미생물에게 독성 영향을 미쳤기 때문으로 사료된다. Oleyl alcohol은 부틸부티레이트에 비해 가격 경쟁력은 낮지만, 미생물에 독성을 주지 않는 것으로 관찰되어졌고 (점중 24시간 후 OD=9.6) 부탄올 추출효율도 80%이상이므로 가장 적합한 유기용매로 판단된다. 본 실험에서는 oleyl alcohol과 더불어 oleyl alcohol에 부틸부티레이트의 부피를 10-30%로 변화시키며 혼합한 용매를 사용하는 경우, 보다 경제적이면서 미생물 독성이 없고, 효율이 좋은 추출용매로 사용 가능하지 알아보았다. 혈청병을 이용하여 가장 최적의 부탄올 추출조건을 확인하기 위해 회분식 (batch)타입의 추출 발효를 수행하였다.

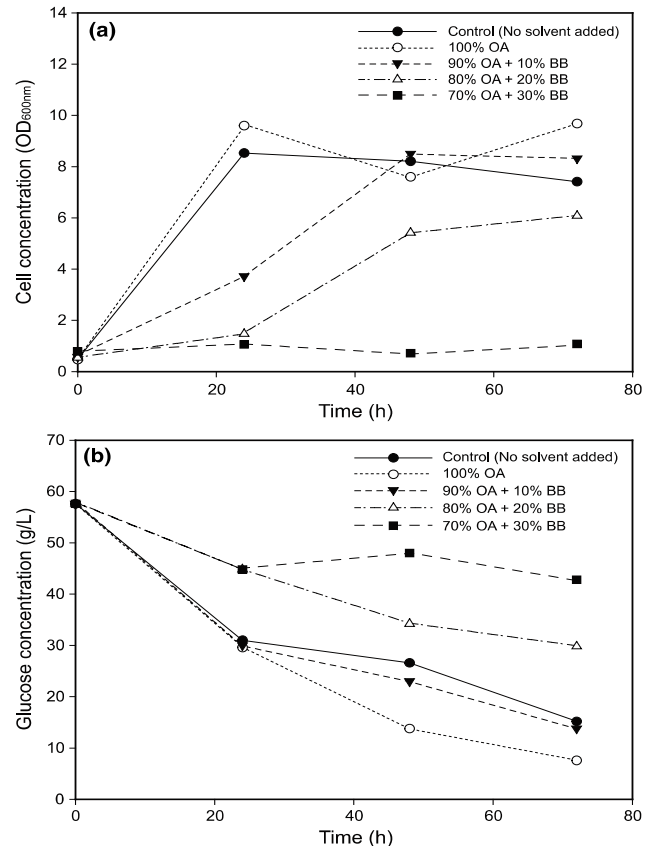
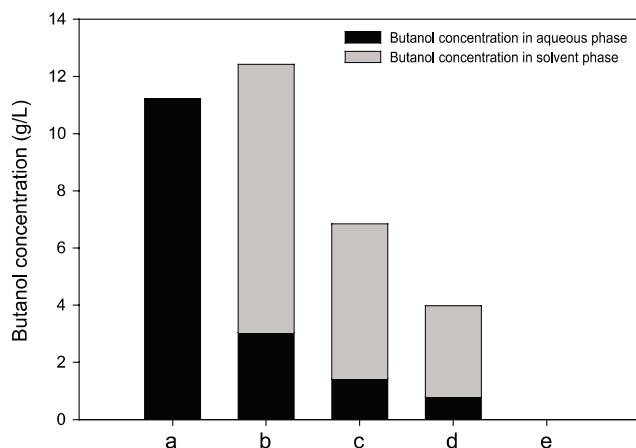


Fig. 4. (a) Cell growth and (b) Glucose concentration during the extractive fermentation with oleyl alcohol (OA) and butyl butyrate (BB).

Oleyl alcohol과 혼합용매를 사용한 추출발효 시 미생물 성장과 탄소원인 글루코스 소모량은 Fig. 4에 나타내었다. Oleyl alcohol만을 이용했을 경우는 추출용매 없이 배양을 한 대조군 (control)에 비해 유사하거나 높은 O.D.값을 나타냈지만, 부틸부티레이트를 10% 이상 혼합한 경우 미생물 생장이 저해되어 lag phase가 길어지거나 최종 O.D.가 낮은 것을 알 수 있었다. 또한, 부틸부티레이트의 부피비율이 증가할수록 미생물 성장 저해정도가 심화되었는데, 특히 부틸부티레이트 30% 혼합 용매를 사용했을 경우에는 미생물 생장이 전혀 이루어지지 않았다. 배양 시간에 따른 글루코스 소모량을 살펴보면, 대조군에 비해 oleyl alcohol을 이용하여 추출발효를 한 경우 글루코스 8-10 g/L를 더 소모한 것으로 나타났다 (Fig. 4(b)). 이는 부탄올 추출에 따른 부탄올의 독성 영향 감소로 미생물 성장 저해 영향이 감소되어 탄소원인 글루코스를 더 소모할 수 있었던 것으로 사료된다. 참고문헌에 따르면, 부탄올이 14 g/L일 때 미생물 생장은 완전히 저해되고, 8 g/L일 때 미생물 생장이 50%가 저해된다는 보고가 있다 [6]. 부틸부티레이트 10% 혼합 용매를 사용한 경우, 배양 24시간 후 O.D.값은 3.72로서 대조군의 O.D. 값인 8.53에 비해 매우 낮으나 글루코스 소모량은 유사한 경향을 나타내었다. 그 외, 부틸부티레이트 20% 이상 혼합된 용매는 낮은 미생물 성장을 보인 O.D. 결과와 마찬가지로 낮은 글루코스 소모 경향을 나타내었다.



**Fig. 5.** Butanol concentration in batch extractive fermentation at 72 h; (a) control (no solvent added), (b) oleyl alcohol, (c) 90% of oleyl alcohol + 10% of butyl butyrate, (d) 80% of oleyl alcohol + 20% of butyl butyrate, (e) 70% of oleyl alcohol + 30% of butyl butyrate.

Fig. 5에서는 배양액 상에 남아 있는 부탄올의 농도, 유기용매 상으로 추출된 부탄올의 농도, 그리고 배양액과 유기용매에 있는 부탄올 농도를 합한 총 부탄올 생산량을 나타내었다. Fig. 5의 결과를 살펴보면 oleyl alcohol을 이용하여 부탄올 추출 발효를 한 경우 배양액 내의 부탄올을 연속적으로 추출하여 배양액 내의 부탄올을 낮게 유지시킴으로

써 추출 발효 하지 않은 대조군보다 더 많은 부탄올을 생산해 내는 것을 확인할 수 있었다 (11.2 g/L vs. 12.4 g/L). 즉, oleyl alcohol을 이용하여 추출 발효했을 경우, 추출된 부탄올로 인해 부탄올 독성이 감소하여 미생물의 성장 및 부탄올 생산이 대조군에 비해 더 활발히 진행된 것을 알 수 있으며, 이는 대조군에 비해 글루코스 소모량이 더 많았던 Fig. 5(a) 결과와도 상통하는 결과이다. 또한, oleyl alcohol로 추출된 부탄올이 9.4 g/L이고, 배양액내 남아있는 부탄올의 농도가 3 g/L에 불과한 것으로 나타났는데, 이로써 oleyl alcohol이 실제 배양액으로부터 부탄올을 추출하는데 우수한 용매로 사용가능함을 알 수 있다. 부틸부티레이트 10% 혼합용매를 사용한 경우, 최종 OD와 글루코스 소모량은 대조군과 유사한 것으로 관찰되어졌지만 (Fig. 4), 총 부탄올 농도는 대조군의 60% 정도만 생산된 것으로 나타났다. 이러한 결과로 미루어볼 때, 부틸부티레이트 10% 혼합용매는 미생물 성장에는 큰 영향을 주지 않지만, 특히 적으로 부탄올 생산에는 심각한 저해 영향을 주는 것으로 사료된다. 부틸부티레이트의 부피비율이 20%인 경우는 미생물 성장과 부탄올 생산량이 모두 대조군에 비해 현격히 감소한 것을 알 수 있었고, 부틸부티레이트의 부피비율이 30%인 경우는 미생물 생장이 전혀 이루어지지 않은 것과 마찬가지로 부탄올도 생산되지 않았다. 본 실험에서 얻은 결과로 볼 때, oleyl alcohol은 미생물 성장과 부탄올 생산에 저해 영향을 미치지 않으면서 고농도의 부탄올을 생산하기 위한 추출발효 공정에서 적합한 용매로 사료된다.

본 연구를 통해 유기용매와 이온성 액체 중에서 배양액 내의 부탄올을 효과적으로 추출할 수 있는 용매로서 oleyl alcohol과 부틸부티레이트를 선정하였고, 특히 선정된 유기용매 중 oleyl alcohol은 미생물에게 독성영향을 끼치지 않고 안정적으로 고농도의 부탄올을 생산할 수 있음을 확인하였다.

## 요 약

본 연구에선 바이오부탄올 생산을 위한 추출발효에 적용하고자 부탄올 추출에 효율적이고 미생물에 독성을 주지 않는 적합한 추출용매를 선정하고자 하였다. 추출 용매를 선정하기 위하여 부틸 부티레이트, oleyl alcohol, 친환경 용매인 소수성 이온성 액체 2 종류를 이용하여 분배계수를 구한 결과, 부틸 부티레이트와 oleyl alcohol이 높은 부탄올 분배계수를 나타내었고 부탄올 농도 1-20 g/L와 pH 4-5.5 범위에서 80% 이상의 우수하고 안정적인 추출 효율을 나타내었다. 미생물에 독성이 없는 oleyl alcohol을 사용한 회분식 추출발효에서는 추출을 하지 않은 회분식 배양보다 11% 향상된 부탄올 생산을 보였다 (11.2 g/L vs. 12.4 g/L). 이는 배양액 내의 부탄올이 추출되어 배양액 내의 부탄올 농도가 낮게 유지됨으로써 부탄올 독성 영향이 감소되었고, 이로 인해 향상된 부탄올 생산이 이루어진 것으로 판단된다. Oleyl alcohol : 부틸부티레이트 부피비

를 9 : 1로 혼합한 용매를 사용했을 경우는 미생물 성장에 는 저해 영향이 미미했으나 부탄올 생산은 추출발효를 하 지 않은 회분식 배양에 비해 60%에 그쳤다. 부틸부티레이 트를 20% 이상 미생물 성장에 심각한 저해를 주는 것으 로 관찰되어졌다. 본 연구를 통해, 실험에 사용된 4가지 추출 용매 중에서 oleyl alcohol이 미생물에게 독성영향을 끼치지 않으면서 부탄올 추출을 효율적으로 할 수 있음을 알 수 있었고, oleyl alcohol을 바이오 부탄올 연속 추출발 효에 적용한다면 향상된 부탄올 생산성을 얻을 수 있을 것 으로 기대된다.

접수 : 2009년 7월 23일, 게재승인 : 2009년 9월 23일

## REFERENCES

- Kim, B.-C., J.-Y. Park, Y.-S. Um, B.-I. Sang, and Y.-C. Chung (2008) Bio-alcohol production from organic waste. *Daehan Hwangyeong Gonghag Hoeji* 30: 878-890.
- Ragauskas, A. J., C. K. Williams, B. H. Davison, G. Britovsek, J. Cairney, C. A. Eckert, W. J. Frederick, Jr., J. P. Hallett, D. J. Leak, C. L. Liotta, J. R. Mielenz, R. Murphy, R. Templer, and T. Tschaplinski (2006) The path forward for biofuels and biomaterials. *Science* 311: 484-489.
- Schubert, C. (2006) Can biofuels finally take center stage?. *Nat. Biotechnol.* 24: 777-784.
- Dürre, P. (2007) Biobutanol: an attractive biofuel. *Biotechnol. J.* 2: 1525-1534.
- Schwarz, W. H. and J. R. Gapes (2006) Butanol-rediscovering a renewable fuel. *BioWorld Europe* 01-2006: 16-19.
- Ounine, K., H. Petitdemange, G. Raval, and R. Gay (1985) Regulation and butanol inhibition of D-xylose and D-glucose uptake in *Clostridium acetobutylicum*. *Appl. Environ. Microbiol.* 49: 874-878.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi, and H. P. Blaschek (2003) Production of acetone, butanol and ethanol by *Clostridium beijerinckii* BA101 and *in-situ* recovery by gas stripping. *World J. Microbiol. Biotechnol.* 19: 595-603.
- Qureshi, N. and I. S. Maddox (1995) Continuous production of acetone-butanol-ethanol using immobilized cells of *Clostridium acetobutylicum* and integration with product removal by liquid-liquid extraction. *J. Ferment. Bioeng.* 80: 185-189.
- Qureshi, N., I. S. Maddox, and A. Friedl (1992) Application of continuous substrate feeding to the ABE fermentation: relief of production inhibition using extraction, perstraction, stripping, and pervaporation. *Biotechnol. Progr.* 8: 382-390.
- Nielsen, D. R. and K. J. Prather (2009) *In-situ* product recovery of n-butanol using polymeric resins. *Biotechnol. Bioeng.* 102: 811-821.
- Sang, B.-I. and Y.-H. Kim (2008) Next generation biofuel. *News & Information for Chemical Engineers* 26: 704-709.
- Ezeji, T. C., N. Qureshi, and H. P. Blaschek (2004) Butanol fermentation research: upstream and downstream manipulations. *The Chemical Record* 4: 305-314.
- Lee, S.-M., W.-J. Chang, and Y.-M. Koo (2005) Application of ionic liquids in biotechnology. *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* 20: 183-191.
- Roffler, S. R., H. W. Blanch, and C. R. Wilke (1987) *In-situ* recovery of butanol during fermentation Part 1: Batch extractive fermentation. *Bioprocess. Eng.* 2: 1-12.
- Lee, S.-Mi., M. O. Cho, C. H. Park, Y.-C. Chung, J. H. Kim, B.-I. Sang, and Y. Um (2008) Continuous butanol production using suspended and immobilized *clostridium beijerinckii* NCIMB 8052 with supplementary butyrate. *Energy Fuels* 22: 3459-3464.
- Dürre, P. (2008) Fermentative butanol production. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1125: 353-362.
- Bocquet, S., V. F. Gascons, N. C. Muvdi, J. Sanchez, V. Athes, and I. Souchon (2006) Membrane-based solvent extraction of aroma compounds: Choice of configurations of hollow fiber modules based on experiments and simulation. *J. Membr. Sci.* 281: 358-368.