

## 수상이성분계에 의한 1,3-프로판디올 추출특성에 대한 알콜과 카르복실산의 영향

홍연기<sup>†</sup>

한국교통대학교 화공생물공학과  
380-702 충북 충주시 대학로 50  
(2013년 6월 3일 접수, 2013년 6월 29일 수정본 접수, 2013년 7월 5일 채택)

### Effect of Alcohols and Carboxylic Acids on Extraction Characteristics for 1,3-Propanediol by Aqueous Two Phases Systems

Yeon Ki Hong<sup>†</sup>

Department of Chemical and Biological Engineering, Korea National University of Transportation,  
50 Daehak-ro, Chungju-si, Chungbuk 380-702, Korea

(Received 3 June 2013; Received in revised form 29 June 2013; accepted 5 July 2013)

#### 요 약

최근 바이오 플라스틱인 Polytrimethylene terephthalate (PTT)의 원료물질인 1,3-프로판디올의 생물학적 생산이 주목받고 있다. 발효를 통한 1,3-프로판디올의 생산에 있어 부산물로 생성되는 젖산, 숙신산을 포함한 카르복실산들은 1,3-프로판디올의 경제적인 생산을 어렵게 한다. 본 연구에서는 카르복실산 부산물이 포함된 1,3-프로판디올 수용액으로부터 1,3-프로판디올의 효율적 분리정제를 위해 수용성 알콜과 염으로 구성된 수상이성분계를 이용한 추출을 적용하였다. 알콜과 염으로 구성된 수상이성분계 형성은 하부상에 존재하는 염의 염출효과에 의한 것이며 이로 인해 1,3-프로판디올이 상부상으로 이동된다. 추출효율을 알콜의 사슬길이가 짧을수록, 염의 세기가 높을수록 높아졌으며 최대 98%의 회수율을 얻을 수 있었다. 또한 발효 시에 부산물로 형성되는 카르복실산은 1,3-프로판디올과 동반추출되지 않았으며 1,3-프로판디올의 추출효율에도 영향이 없는 것으로 나타났다. 그러므로 본 연구에서 적용된 친수성 알콜과 염으로 구성된 수상이성분계는 카르복실산 부산물로부터 1,3-프로판디올을 선택적으로 분리하는데 효과적인임을 알 수 있다.

**Abstract** – 1,3-Propanediol is a promising chemical which can be produced from fermentation of glycerol because the application of 1,3-propanediol is mainly in the production of bio-polytrimethylene terephthalate (bio-PTT). However, the cost of downstream processes in the biological production of 1,3-propanediol can make a high portion in the total production cost due to the large amount of water and the by-produced carboxylic acids such as succinic, lactic and acetic acids in 1,3-propanediol fermentation broth. In this study, aqueous two-phases systems composed of hydrophilic alcohols and phosphate salts were applied to the recovery of 1,3-propanediol from its artificial aqueous solution. Formation of aqueous biphasic systems in hydrophilic alcohols and phosphate salts was due to the salting-out effect of salts in bottom phase, thereby 1,3-propanediol in bottom phase was moved into top phase. Extraction efficiency for 1,3-propanediol was proportional to the polarity of hydrophilic alcohols and the basicity of salts and the maximum value of extraction efficiency was more than 98%. In the aqueous two-phases systems after extraction, there was no carboxylic acid in top phase. Therefore, it was concluded that the aqueous two-phases systems composed of hydrophilic alcohols and phosphate salts were effective for the selective recovery of 1,3-propanediol without any coextraction of carboxylic acids.

Key words: 1,3-Propanediol, Aqueous Two-phases, Carboxylic Acids, Salting-out

#### 1. 서 론

1,3-프로판디올(1,3-Propanediol)은 비교적 간단한 구조를 가지는데 화학물질로서 그 동안 UV-큐어링 코팅, 용제, 부동액 등에 사용되었을 뿐 아니라 고기능성 폴리에스터인 PTT의 주요한 단량체

로 사용되어 왔다. 최근에 1,3-프로판디올이 주목받게 된 것은 1,3-프로판디올을 생물학적으로 생산할 수 있게 됨에 따라 1,3-프로판디올에서 유래되는 PTT 역시 기존의 PET나 PBT를 대체할 수 있는 바이오 플라스틱으로의 활용이 가능하기 때문이다. 현재 전 세계적으로 1,3-프로판디올의 시장 규모는 약 1억 5천만불 정도이며 2019년까지 약 5억 6천만불까지 성장하여 매년 약 20%에 이르는 성장률을 가지는 것으로 전망하고 있다[1].

<sup>†</sup>To whom correspondence should be addressed.  
E-mail: hongyk@ut.ac.kr

발효공정을 통해 얻게 되는 발효액 내의 1,3-프로판디올의 농도는 50 g/L에서 130 g/L의 범위의 낮은 농도여서 이를 농축하기 위한 분리공정에 많은 에너지가 요구되며 발효액에 부산물로 존재하는 숙신산, 젖산, 아세트산과 같은 카르복실산 염을 제거하기 위해서는 추가적인 분리공정이 필요하다는 문제점이 있다. 또한 1,3-프로판디올은 강한 친수성을 가질 뿐 아니라 끓는점이 상압에서 214 °C여서 증류에 의한 분리도 쉽지 않다[2,3].

일반적인 발효 생성물의 분리와 마찬가지로 1,3-프로판디올의 분리를 위해서는 미생물 세포의 분리를 위한 막여과나 고속 원심분리 공정, 불순물의 제거 및 1,3-프로판디올의 일차 분리를 위한 전기투석, 증발, 추출, 크로마토그래피 공정, 그리고 최종적으로 제품의 순도를 높이기 위한 일련의 증류공정 및 감압증류가 필요하다. 그러므로 1,3-프로판디올의 분리공정이 효율적으로 이루어지기 위해서는 발효 부산물로부터 1,3-프로판디올을 효과적으로 농축시키고 동시에 수분 제거에 따른 에너지 저감이 필요하다[5]. 이를 위해서 제시된 공정에는 탈염을 위한 전기투석 및 증발공정, 크로마토그래피 공정, 반응추출공정 등이 있다. 전기투석 공정을 통한 1,3-프로판디올의 회수율은 96.8%인 것으로 보고된 바 있으나[6] 조업 중 막의 오염에 따른 분리효율 저하뿐 아니라 고가의 이온교환막에 대한 교체 유지비용과 같은 비용상의 문제점이 있으므로 막의 오염 방지와 기계적 물성 향상에 대한 추가적인 연구가 필요한 상황이다. 물의 제거를 통한 1,3-프로판디올의 농축을 목적으로 증발공정을 사용하기도 하나 증발 이전에 카르복실산 염 및 단백질과 같은 불순물 제거가 선행되지 않으면 증발공정의 효율 저하가 발생한다고 알려져 있다. 추출법은 타 공정에 비해 저 농도로 존재하는 대상물질의 분리에 효율적인 공정으로 알려져 있으나 1,3-프로판디올의 강한 친수성 뿐 아니라 발효액 내에 포함된 다른 불순물들로 인해 추출 효율이 저하된다[7]. 유기추출용매로의 1,3-프로판디올 분배를 촉진시키기 위해 유기상에서의 반응을 이용하는 반응추출에 대한 연구결과도 보고된 바 있다. Malinowski(2000)는 이온교환수지를 촉매로 하여 1,3-프로판디올을 아세트알데하이드와 반응시켜 2-methyl-1,3-dioxane (2MD)로 전환시켜 톨루엔으로 추출하였다. 그러나 반응 시 1,3-프로판디올 외에 에탄올 및 글리세린과 같은 발효액 내의 불순물로 인해 촉매활성과 반응선택도의 저하가 나타나서 이에 대한 개선이 필요한 것으로 알려져 있다[8].

최근 수상이성분계를 이용하여 적은 에너지로 2,3-부탄디올 및 1,3-프로판디올과 같은 디올 물질들을 효과적으로 농축시킨 사례들이 보고되었다. 두 종류의 수용성 고분자나 고분자와 염 등이 수용상에서 특정 농도 이상으로 용해되면 상분리가 이루어지는데 이때 분리하고자 하는 물질의 분배 차이를 이용한 추출법이 수상이성분계 추출이다. Lim 등과 Jiang 등은 에탄올과 설페이트 염을 이용하여 2,3-부탄디올, 아세트인, 잔류 글리세린이 포함된 모사 수용액에 대해서 최대 93.7%의 1,3-프로판디올 회수율을 얻은 바 있으며 2,3-부탄디올에 대해서도 최대 98.13%의 회수율을 얻었다[3,9]. 기존의 고분자/고분자 또는 고분자/염으로 구성된 수상이성분계에 비해 고분자 대신 알콜을 도입한 경우 비교적 고가의 고분자 물질을 대체할 수 있다는 점과 고분자 물질에 비해 알콜의 회수가 용이하다는 점에서 장점을 가지고 있다. 또한 알콜/염으로 구성된 수상이성분계는 1,3-프로판디올의 분리뿐 아니라 1,3-프로판디올의 농축을 위한 증발공정에 요구되는 에너지를 줄일 수 있다는 장점도 있다.

본 논문에서는 발효 부산물인 카르복실산이 포함된 1,3-프로판디올 모사수용액에 대해서 1,3-프로판디올을 선택적으로 분리하기 위한 알콜/염으로 구성된 수상계의 수상이성분계 형성 특성을 살펴보고 알콜 및 염의 종류 그리고 염과 용매의 비율에 따른 1,3-프로판디올의 추출 특성을 고찰하고자 한다.

## 2. 실험

### 2-1. 시료 및 시약

1,3-프로판디올 모사 수용액을 제조하기 위해 1,3-프로판디올 (Sigma-Aldrich, 99.9%), 숙신산(Sigma-Aldrich, 99.9%), 젖산(Sigma-Aldrich, 99.9%)과 2차 증류수를 사용하였다. 해당 성분들의 농도는 발효 미생물이나 조업조건에 따라 달라질 수 있으나 *K. pneumoniae*에 의해 생성된 발효액 조성에 기초하여 1,3-프로판디올의 경우 50-100 g/L로 하였으며 숙신산은 14 g/L 내외, 젖산은 2.5 g/L 내외로 하였다[10,11]. 알콜과 염으로 구성된 수상이성분계를 만들기 위해 친수성 알콜로서는 메탄올(Sigma-Aldrich, 99.9%), 에탄올(Sigma-Aldrich, 99.9%) 그리고 이소프로판올(Sigma-Aldrich, 99.9%)를 사용하였으며 염으로서 K<sub>3</sub>PO<sub>4</sub>(Sigma-Aldrich, 99.9%)와 K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>(Sigma-Aldrich, 99.9%)를 사용하였다.

### 2-2. 수상이성분계 추출 및 분석

수상이성분계에 의한 추출에 앞서 알콜/염에 대한 상태도(phase diagram)를 얻기 위해 탁도 적정법(turbidity titration method)을 사용하였다. 먼저 바이얼에 2차 증류수에 일정비율의 염을 용해시킨 후 알콜을 바이얼에 투입하면서 상 분리여부를 확인한다. 염/알콜 수용액이 탁도를 띄기 시작하는 점을 탁점(turbid point)이라고 하며 이 때 첨가된 알콜의 총량은 무게를 측정하여 얻을 수 있다. 탁점에서의 알콜과 염의 농도는 아래의 식을 이용하여 계산할 수 있다.

$$w_1 = \frac{m_1}{m_1 + m_2 + m_3} \quad (1)$$

$$w_2 = \frac{m_2}{m_1 + m_2 + m_3} \quad (2)$$

여기서  $w_1$ 과  $w_2$ 는 각각 알콜과 염의 질량 분율이며  $m_1$ ,  $m_2$ ,  $m_3$ 는 첨가된 알콜, 염, 그리고 물의 질량을 나타낸다.

수상이성분계를 이용한 모사 수용액에서의 1,3-프로판디올의 추출과정은 다음과 같다. 우선 10 mL의 모사수용액에 10 mL의 알콜을 투입한 후 염을 첨가한다. 이 경우는 1,3-프로판디올 분배에 대한 염의 영향을 보기 위함이다. 알콜의 투입량에 대한 영향을 살펴보기 위해서는 투입 순서를 변경하게 된다. 이와 같이 준비된 수상 혼합물을 약 5분간 강력히 교반한 후 상분리를 위해 10시간 이상 방치해 둔다.

추출 후 수용상의 상부와 하부에서의 1,3-프로판디올의 농도 및 카르복실산의 농도는 액체 크로마토그래프(Agilent 1200, RI 검출기)에 Aminex HPX-87H 칼럼(300 mm×7.8 mm, Bio-Rad, 이온교환 polystyrene/divinylbenzene 구형수지 충전물)을 장착하고 0.01 N H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 이동상으로 하여 측정하거나 Supelcogel C-610H 칼럼(300 mm×7.8 mm, Supelco, 이온교환 polystyrene/divinylbenzene 구형수지 충전물)을 장착하고 0.1 vol.-%의 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 수용액을 이동상으로 하여 측정하였다.

### 3. 결과 및 고찰

다양한 친수성 알콜과  $K_3PO_4$  또는  $K_2HPO_4$ 로 구성된 수상 이성분계에 대한 상태도를 Fig. 1에 나타내었다. 상태도 곡선은 수상 이성분계를 형성할 수 있는 상의 농도에 대한 정보를 제공할 수 있다. Fig. 1에서 보듯이 알콜과 염의 적정한 비율에서 수상 이성분이 형성되는 것을 알 수 있었으며 수용성 알콜의 상분리능은 이소프로판올, 에탄올, 메탄올의 순서로 낮아짐을 알 수 있었다. 이는 일반적으로 알콜의 극성이 강할수록 물분자와의 친화력이 강하기 때문에 같은 알콜 농도에 대해서 알콜의 극성이 높을수록 수상 이성분계 형성이 저해되는 것으로 설명할 수 있다. 또한 같은 알콜에 대해서 염의 무게 분율이 높아질수록 알콜의 상분리능이 커짐을 알 수 있었다. 이는 염의 음이온과 물분자간의 강한 상호작용에 따른 수상 이성분계 형성으로 해석할 수 있다. 또한 상태도에서도 알 수 있듯이 1,3-프로판디올 외에 존재하는 카르복실산은 수상 이성분계 형성에 영향을 없으며 단지 수상 이성분계 형성을 위한 알콜 및 염의 무게 분율에 있어서 약간의 변화를 가져올 뿐이다. 수상 이성분계 형성에 대한 염의 영향을 살펴보면 음이온의 하전 정도가 클수록 적은 양의

염으로 수상 이성분계를 형성함을 알 수 있었다. 포스페이트 음이온( $PO_4^{3-}$ )은 수소화포스페이트 음이온( $HPO_4^{2-}$ )보다 높은 하전정도를 나타내므로 물과 더 강한 수소결합을 형성할 수 있고 음이온 주위의 물분자의 쌍극자의 정렬이 더 잘 되게 하므로 수상 이성분계의 형성을 촉진하게 된다[12].

수상 이성분계 추출에 의한 1,3-프로판디올의 추출 효율은 초기 수용상에 포함된 1,3-프로판디올의 양에 대해서 추출 후 상부상으로 추출된 1,3-프로판디올 양의 비로 나타낼 수 있으며 아래와 같이 계산할 수 있다.

$$Y(\%) = \frac{C_t V_t}{C_t V_t + C_b V_b} \times 100 \quad (3)$$

여기에서  $C_t$ 와  $C_b$ 는 각각 상층부와 하층부에서의 1,3-프로판디올의 농도,  $V_t$ 와  $V_b$ 는 상층부와 하층부의 부피이다.

수상 이성분계에 의한 1,3-프로판디올 추출에 있어 부산물로 존재하는 카르복실산의 농도 및 친수성 알콜과 염의 비율이 추출 효율에 미치는 영향을 Fig. 2에서 보여주고 있다. 보통 수상 이성분계에서 분리 대상물질의 분배는 부피 배제 효과(volume exclusion effect)와 염

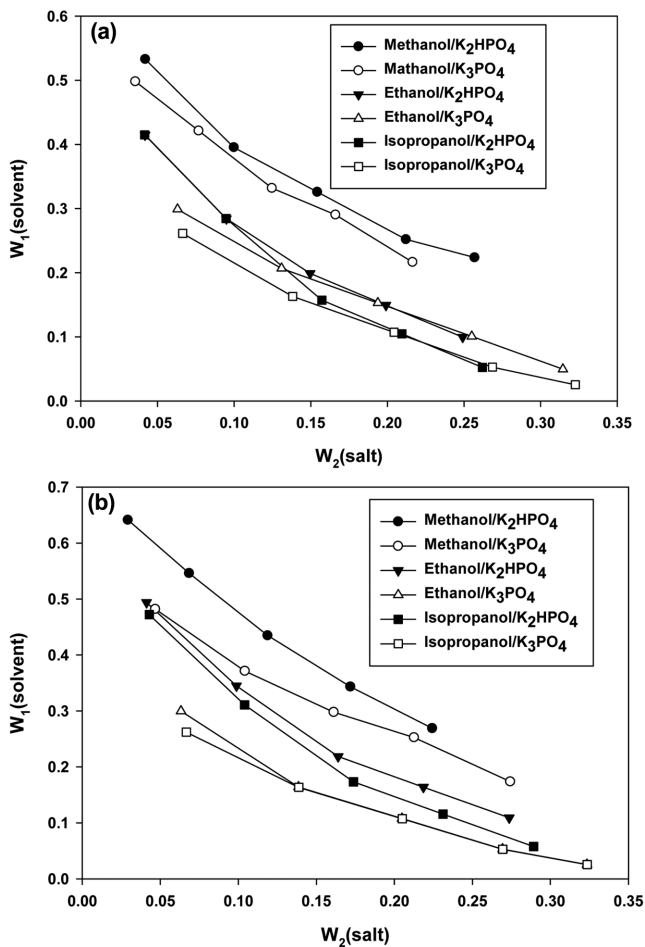


Fig. 1. Phase diagram for hydrophilic alcohols/phosphate salts aqueous systems in the presence of carboxylic acids. (a) in the presence of succinic acid and (b) in the presence of lactic acid (concentration of 1,3-propanediol=102 g/L, concentration of succinic acid=14 g/L, and concentration of lactic acid =2.5 g/L).

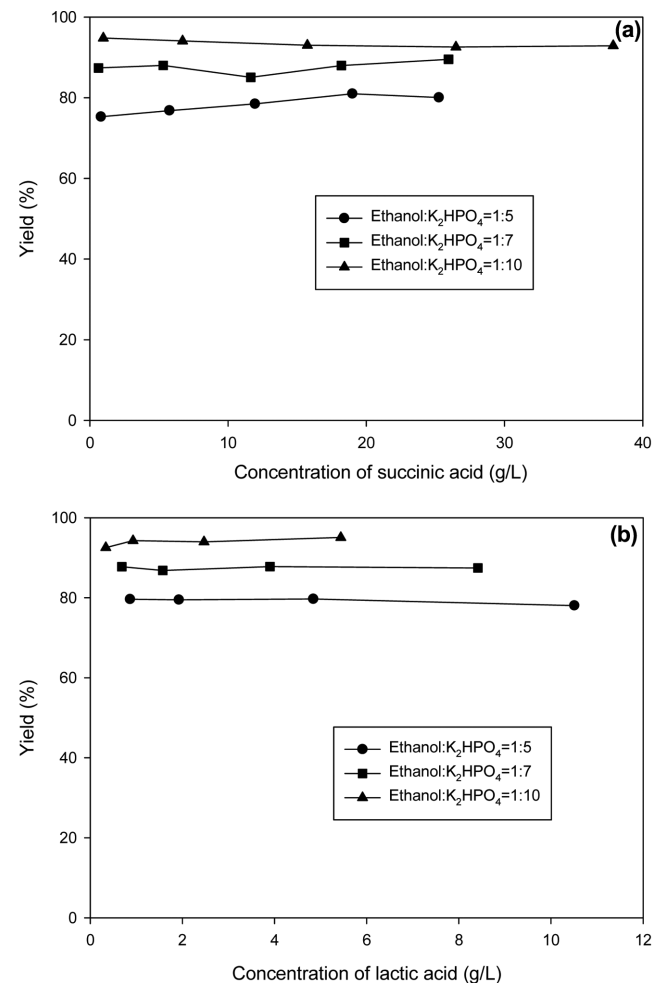


Fig. 2. Effect of the concentration of carboxylic acids on extraction efficiency for 1,3-propanediol by ethanol/ $K_2HPO_4$  aqueous two phase system. (a) in the presence of succinic acid and (b) in the presence of lactic acid (concentration of 1,3-propanediol=102 g/L).

의 염출 효과(salting-out effect)로 설명할 수 있다[13]. 가령 PEG와 같은 고분자-염 시스템의 경우 고분자의 농도, 고분자의 사슬 길이 나 분자량이 증가할수록 분리 대상물질이 차지할 수 있는 공간을 줄어듦에 따라 해당 물질이 다른 상으로 이동하게 되는데 이를 부피 배제 효과라고 한다. 반대로 염이 풍부한 상의 경우는 염의 농도가 증가할수록 분리 대상물질의 용해도는 저하됨에 따라 해당 물질이 다른 상으로 이동하게 된다. 본 연구에서 사용된 수용상 알콜과 염으로 구성된 수상이성분계에서는 하부상의 염에 의한 염출 효과에 의해 1,3-프로판디올의 용해도가 낮아지게 되고 이들이 상부의 수용상 알콜에 높은 용해도를 가지게 되므로 결국 하부상의 1,3-프로판디올이 알콜로 구성된 상부상으로 이동하게 되는 것이다. 또한, Fig. 2에서 보듯이 수상이성분계에서의 1,3-프로판디올의 추출효율은 모사 수용액 내 카르복실산의 농도와 상관없이 일정함을 알 수 있었으며 상층부에 대한 분석결과 카르복실산은 전혀 추출되지 않은 결과를 얻을 수 있었다. 그러므로 본 연구에서 제시한 친수성 알콜/염으로 구성된 수상이성분계가 발효 부산물인 카르복실산에 대해 1,3-프로판디올을 선택적으로 추출할 수 있다고 할 수 있다. 수상이성분계에서 알콜에 대한 염의 비율이 증가할수록 추출 효율은 증가하였으며 에탄올과 염의 비율이 1:5인 경우 약 75% 이상, 1:10인 경우는 90% 이상의 높은 값을 얻을 수 있었다. 이 같은 결과는 염의 농도 증가에 따른 염출 효과가 커짐에 따라 하부상에서의 1,3-프로판디올의 용해도가 저하되는 것으로 설명할 수 있다. 추출이 종료된 후 하층부에는 숙신산 결정이 일부 형성되는 것을 관찰할 수 있었는데 이는 염을 회수할 때에 숙신산을 동시에 회수할 수 있는 가능성을 제시한다고 할 수 있다. 그러나 염의 비율이 너무 높을 경우에는 공정비용 상승은 물론 염의 회수에 따른 어려움이 발생할 수 있다.

Fig. 3는 숙신산의 존재 하에서 알콜의 사슬길이 및 염의 세기에 따른 추출능의 변화를 보여주고 있다. 알콜의 사슬 길이가 증가할수록 추출능이 감소되지만 본 연구에 사용된 모든 알콜에 대해서 80%가 넘는 추출능을 보였다. 또한 모든 알콜/염 계에 대해서 상층부로의 카르복실산 분배는 이루어지지 않았는데 이는 친수성 알콜에 대한 카르복실산의 낮은 용해도 때문이다. Fig. 1에서의 결과와

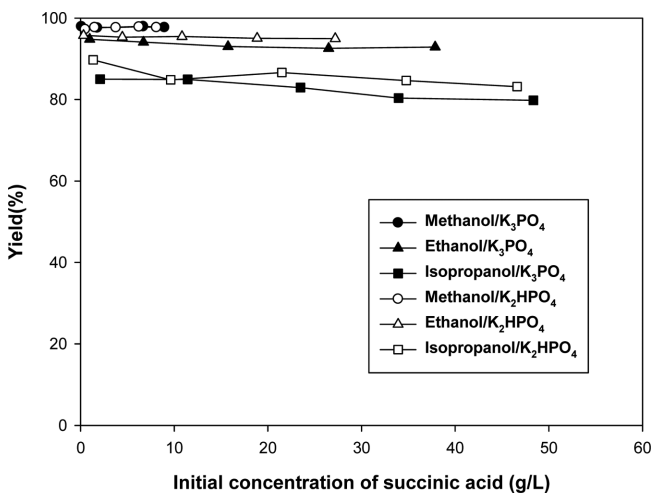


Fig. 3. Effect of the initial concentration of succinic acid on extraction efficiency for 1,3-propanediol by various alcohols and salts (ratio of alcohol to salt=1:10, and concentration of 1,3-PDO=102 g/L).

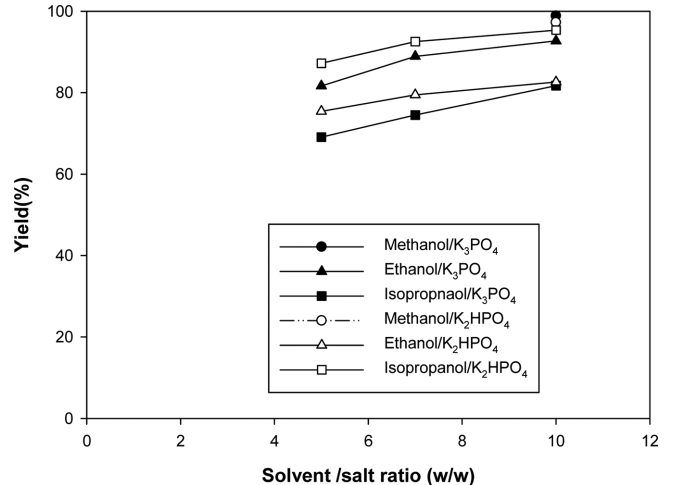


Fig. 4. Efficiency for 1,3-propanediol in hydrophilic alcohols/phosphate salts aqueous systems in the presence of succinic and lactic acids (concentration of 1,3-propanediol=102 g/L, concentration of succinic acid=14 g/L, and concentration of lactic acid=2.5 g/L).

마찬가지로 추출능에 있어서도 포스페이트 음이온의 세기가 강할수록 높은 추출능을 보였으며 그 차이는 알콜의 사슬길이가 길어질수록 크게 나타났다.

Fig. 4에서는 1,3-프로판디올 발효액 내에 부산물로 존재하는 숙신산, 젖산이 모두 포함된 1,3-프로판디올 수용액에 대하여 알콜과 염의 비율에 따른 추출효율을 나타내었다. 앞의 실험과 마찬가지로 상부상로의 카르복실산 분배는 없었으며 염 대비 용매의 비율이 증가할수록, 알콜의 극성과 염의 음이온 세기가 증가할수록 추출능이 증가하였다.

발효액으로부터 1,3-프로판디올의 정제에 대해 보고된 일반적인 분리공정은 발효액 내의 수분 증발에 따른 과도한 에너지 소모, 부산물로 존재하는 카르복실산 분리를 위한 전기투석 공정 등의 도입으로 공정의 복잡성은 물론 공정비용이 증가하는 문제점이 있어왔다. 그러나 본 연구에서 적용된 친수성 알콜/염의 수상이성분계는 부산물인 카르복실산에 대해 1,3-프로판디올을 선택적으로 분리할 수 있음을 알 수 있었다. 발효액 내의 균주제거 및 잔류 배지성분 등이 여과 또는 원심분리를 통해서 분리될 수 있다고 봤을 때 본 연구의 결과를 실제 발효액에도 적용시킬 수 있을 것이며 이에 대한 연구가 필요할 것으로 사료된다. 단, 하부상 형성과 염출 효과에 의한 1,3-프로판디올의 상부상로의 분배를 촉진하기 위한 염의 과다한 사용은 추후 염의 회수에 문제를 유발할 수 있으므로 염의 사용을 줄이기 위한 연구도 병행되어야 할 것이다.

#### 4. 결 론

다양한 친수성 알콜과 포스페이트 염으로 구성된 수상이성분계를 이용하여 카르복실산이 존재하는 1,3-프로판디올 모사 수용액으로부터 1,3-프로판디올을 분리하였다. 알콜의 극성과 염의 음이온 세기가 클수록 수상이성분계 형성이 잘 이루어지는 것으로 확인되었다. 본 연구에서의 수상이성분계 형성은 하부상에 존재하는 염의 염출효과를 통해 이루어졌다. 추출결과 상부상로의 카르복실산 분

배 없이 1,3-프로판디올을 고효율로 분리할 수 있었으며 추출능은 친수성 알콜의 극성과 염의 음이온의 세기에 비례하였다. 알콜과 염의 비율, 알콜의 극성 및 염의 종류에 따라 추출능이 달라질 수는 있으나 메탄올 또는 에탄올과 염으로 구성된 수상이성분계는 1,3-프로판디올에 대하여 90%가 넘는 추출효율을 나타내었다.

## 감 사

이 논문은 2013년도 한국교통대학교 교내학술연구비의 지원을 받아 수행한 연구입니다.

## References

1. <http://www.marketsandmarkets.com/Market-Reports/1-3-propanediol-pdo-market-760.html>.
2. Kaur, G., Srivastava, A. K. and Chand, S., "Advanced in Biotechnological Production of 1,3-Propanediol," *Biochem. Eng. J.*, **64**, 106-118(2012).
3. Lim, Z., Jiang, B., Zhang, D. and Xiu, Z., "Aqueous Two-Phase Extraction of 1,3-Propanediol from Glycerol-Based Fermentation," *Sep. Purif. Technol.*, **66**, 472-478(2009).
4. Hao, J., Xu, F. and Liu, D., "Downstream Processing of Fermentation Broth," *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **81**, 102-108(2006).
5. Hong, Y. K., "Separation Processes of Biologically Produced 1,3-Propanediol," *Korean Chem. Eng. Res.(HWAHAK KONGHAK)*, **50**, 759-765(2012).
6. Wu, R. C., Xu, Y. Z., Song, Y. Q., Luo, J. A. and Liu, D., "A Novel Strategy for Salts Recovery from 1,3-Propanediol Fermentation Broth by Bipolar Membrane Electrodialysis," *Sep. Purif. Technol.*, **83**, 9-14(2011).
7. Xiu, Z.-L. and Zeng, A.-P., "Present State and Perspective of Downstream Processing of Biologically Produced 1,3-Propanediol and 2,3-Butanediol," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **78**, 917-926(2008).
8. Malinowski, J. J., "Reactive Extraction for Downstream Separation of 1,3-Propanediol," *Biotechnol. Prog.*, **16**, 76-79(2000).
9. Jiang, B., Li, Z.-G., Dai, J.-Y., Zhang, D.-J. and Xiu, Z.-L., "Aqueous Two-Phase Extraction of 2,3-Butanediol from Fermentation Broths Using Ethanol/Phosphate System," *Process Biochem.*, **44**, 112-117(2009).
10. Wu, R. C., Ren, H. J., Xu, Y. and Liu, D., "The Final Recover of Salt from 1,3-Propanediol Fermentation Broth," *Sep. Purif. Technol.*, **73**, 122-125(2010).
11. Chen, Z., Liu, H. and Liu, D., "Regulation of 3-Hydroxypropionaldehyde Accumulation in *Klebsiella Pneumoniae* by Overexpression of *dhaT* and *dhaD* Genes," *Enzyme Microb. Technol.*, **45**, 305-309(2009).
12. Mourao, T., Claudio, A. F. M., Boal-Palheiros, I., Freire, M. G., and Coutinho, J. A. P., "Evaluation of the Impact of Phosphate Salts on the Formation of Ionic-liquid Based Aqueous Biphasic Systems," *J. Chem. Thermodyn.*, **54**, 398-405(2012).
13. Navapara, R. D., Avhad, D. N. and Rathod, V. K., "Application of Response Surface Methodology for Optimization of Bromelain Extraction in Aqueous Two-Phase System," *Sep. Sci. Technol.*, **46**, 1838-1847(2011).