

섬유성 바이오매스를 이용한 Acetic Acid 생산

우 창 호 · 박 준 호 · *윤 현 희
경원대학교 화학공학과
(접수 : 2000. 8. 9., 게재승인 : 2000. 10. 9.)

Production of Acetic Acid from Cellulosic Biomass

Chang Ho Woo, Chun Ho Park, and Hyon Hee Yoon*
Department of Chemical Engineering, Kyungwon University, Seongnam, Kyonggi 461-701, Korea
(Received : 2000. 8. 9., Accepted : 2000. 10. 9.)

Production of acetic acid from cellulosic biomass by Simultaneous Saccharification and Extractive Fermentation (SSEF) was investigated. The homoacetate organism used in this study was a strain of *Clostridium thermoaceticum*, ATCC # 49707. A batch operation of Simultaneous Saccharification and Fermentation (SSF) using α -cellulose at pH 5.5 and 55°C yielded 40% conversion of cellulose to acetic acid, while a fed-batch SSF operation produced a maximum acetic acid concentration of 25 g/L, with 50% overall yield. In-situ extractive fermentation to reduce the end-product inhibition on both bacteria and enzyme was carried out. In a batch SSEF using 200 g/L IRA-400 resin, acetic acid concentration reached to 23.9 g/L and acetic acid yield and productivity were observed to be 48% and 0.20 g/L-hr, respectively.

Key Words : SSF, SSEF, *Clostridium thermoaceticum*, acetic acid, cellulosic biomass

서 론

Acetic acid는 아세트산비닐의 제조를 비롯하여 식품, 의약품, 및 각종 유기화합물의 주부원료로 광범위하게 사용되고 있다(1,2). 특히 최근에는 부식성이 강하고 토양오염을 유발하는 염화물 제설제 (CaCl_2 , NaCl)를 대체할 수 있는 저부식·저공해 제설제로서 calcium magnesium acetate (CMA)의 사용이 확대됨에 따라 CMA의 주원료인 acetic acid의 수요가 급증하고 있다(3). CMA 성분의 제설제는 염소이온(Cl^-)을 함유하고 있지 않기 때문에 부식성이 없으며 토양을 오염시키지 않고 산성토양을 중화하는 역할 및 토양미생물을 늘리는 작용을 한다(4). 또한 CMA는 산성비의 원인인 황 배출을 감소시키는 동시에 석탄 연소의 효율을 증가시켜준다(5). 이와 같은 CMA의 용도에 따라 acetate의 대량생산에 관한 관심이 높아지고 있다. CMA는 acetic acid와 석회석 (dolomitic lime)을 반응시켜 제조된다. CMA는 질량의 약 80%가 acetate로 구성되며, 원료비용의 85-90%가 acetic acid 비용이다(4). 따라서 CMA의 생산가격을 줄이기 위해서는 저가의 acetic acid 생산이 가장 중요한 과제이다.

현재 공업용 acetic acid는 대부분 천연가스로부터 화학적

으로 합성되고 있다(1). 화학합성공정의 문제점은 천연가스 등의 석유자원을 원료로 사용하고 다량의 환경오염물질을 배출하는 것이다. 이에 반하여, 미생물 발효에 의한 acetic acid 생산공정의 장점은 매년 재생산되는 생물자원을 원료로 사용하고 오염물질의 배출이 작다는 것이다. 특히 최근에 관심이 모아지고 있는 homoacetate 균주를 이용한 발효공정은 육탄당 (glucose, fructose) 및 오탄당 (xylose)을 포함한 다양한 기질을 높은 수율 (이론수율 100%)로 acetic acid로 전환할 수 있다(6,7). 미생물 발효공정에 의한 acetic acid 생산비용의 주요 항목은 정제비용과 원료비용이다(8). Homoacetate 균주인 *Clostridia*는 생성물에 의한 저해에 민감하여 생산성이 낮고 생성물의 농도가 낮기 때문에 정제에 많은 비용이 요구된다. 또한 acetic acid 생산의 주원료는 전분 (whey, com, sweet sorghum, sugarcane 등) 유래의 glucose이며 이것들은 식품으로 사용될 수 있기 때문에 가격이 비싸고 결과적으로 acetic acid의 생산원가를 높이는 원인이 되고 있다.

본 연구에서는 대체원료로 섬유성바이오매스를 사용하여 acetic acid를 생산하는 공정을 조사하였다. 섬유성바이오매스로부터 acetic acid를 생산하는 공정은 cellulase 효소를 이용한 당화 (enzymatic saccharification)와 acidogenic bacteria를 이용한 혐기성 발효공정으로 구성된다. 동시당화발효 (Simultaneous Saccharification and Fermentation, SSF)는 이와 같은 효소당화와 발효공정을 동시에 한 개의 반응기 안에서 수행하는 것으로 SSF공정의 장점은 cellulase 효소에 대한 glucose의 저해작용을 최소화하여 효소당화 속도가 증대되고 따라서 고가의 효소사용량을 줄일 수 있다는 것과 공정이 단순화된다는 것

*Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Kyungwon University, Seongnam, Kyonggi 461-701, Korea
Tel : +82-31-750-5356, Fax : +82-31-750-5363
E-mail : hhyoon@mail.kyungwon.ac.kr

이다(9). 현재 SSF공정은 에탄올생산에 주로 응용되고 있으며, 최근에 lactic acid 생산에 적용한 연구결과가 발표되고 있는데(10,11) 아직까지 acetic acid 생산에 적용한 예는 보고된 바 없다. 따라서, 본 연구에서 섬유성바이오매스의 효소당화실험과 혐기성발효실험을 수행하여 각 공정의 조업특성과 최적조건을 조사하였으며, 이를 근거로 SSF의 최적조건을 선정하고 SSF 실험을 수행하여 수율, 생산성, 최종 농도, 공정 특성 등을 조사하였다. 또한 생성물인 초산의 저해작용을 검토하고, SSF 반응도중에 초산을 분리 제거하는 동시당화추출 발효 (Simultaneous Saccharification and Extractive Fermentation, SSEF)의 성능을 조사하였다.

재료 및 방법

균주

초산생산 균주는 동결 건조된 *Clostridium thermoaceticum* (최근에 *Moorella thermoacetica*로 개명되었음), ATCC 49707 을 American Type Culture Collection으로부터 분양 받아 Reinforced Clostridial Medium에 적응 배양시킨 후 acetate에 대한 내성을 높이기 위해서 3% sodium acetate가 첨가된 배지로 3일마다 계대배양 하였다.

배지

발효배지 조성은 ① 5 g/L Yeast extract, ② Phosphate solution [9 g/L KHCO₃, 1.4 g/L K₂HPO₄, 1.1 g/L KH₂PO₄], ③ Salt solution [1g/L (NH₄)₂SO₄, 0.25 g/L MgSO₄ · 7H₂O, 0.04 g/L Fe(NH₄)₂(SO₄)₂ · 6H₂O, 0.03 g/L CoSO₄ · 7.5H₂O, 0.0033 g/L Na₂WO₄ · 2H₂O, 0.0024 g/L Na₂MoO₄ · 2H₂O, 0.00024 g/L NiCl₂ · 6H₂O, 0.00029 g/L ZnSO₄ · 7H₂O, 0.00017 g/L Na₂SeO₃, 0.1% Resazurin indicator 1ml/L], ④ 0.25 g/L Cysteine · HCl · H₂O, ⑤ 기질[glucose 또는 α -cellulose]이다. 배양액은 멸균도중 카라멜화 등의 부반응을 억제하기 위해서 위의 5가지로 각각 분리해서 121°C에서 20분간 멸균했다. 냉각시 CO₂ 가스를 불어넣어 주어 산소가 유입하는 것을 방지하였으며, 0.05% resazurin 용액을 첨가하여 산소가 제거된 것을 확인한 후 5 N HCl이나 5 N NaOH로 원하는 pH를 조절했다.

초산 발효

종균배양은 10 ml의 배지를 포함하는 15 ml 시험관에 *C. thermoaceticum*을 접종하여 55°C, 120 rpm에서 36시간동안 배양하였다. 전배양은 250 ml의 삼각플라스크에서 90 ml의 배지에 10 ml의 종배양액을 접종하여 55°C, 120 rpm에서 48시간 동안 배양하였다. 본 발효는 1.5L New Brunswick, Bioflo III에서 전배양액 10%를 접종하고 CO₂ 가스를 주입시키면서 수행되었으며, 이때 pH 조절 용액은 5 N NaOH를 사용하였다.

효소당화

당화효소는 *Trichoderma reesei* 변이균주에 의해 생산된 상업용 효소인 Celluclast 1.5L (Novo Co., Denmark)과 증성효소인 Novozym 342(Novo Co., Denmark)를 사용하였다.

Celluclast 효소 사용시 *Aspergillus niger* 균주에 의해 생산된 Novozym-188 (β -glucosidase)을 4:1의 비율로 혼합하여 사용하였다. Celluclast 효소의 활성도는 95 IFPU/ml 이었다. 당화 실험은 250ml Erlenmeyer flask에서 100ml의 0.05M citrate buffer 용액에 5 g α -cellulose와 정해진 양의 효소를 첨가하여 수행하였다. α -cellulose (Sigma)의 glucan 함량은 79.7% 이었다.

동시당화발효(SSF)

SSF 배지의 조성은 초산발효배지와 같고 단지 glucose 대신에 α -cellulose를 기질로 사용한다. 배지 900 ml에 100 ml의 전배양액 (초산발효실험과 동일)과 당화효소 (45 IFPU/g cellulose)를 첨가하여 SSF 실험을 수행하였다. 이때 사용한 반응기는 1.5L New Brunswick, Bioflo III 이며, 200 rpm으로 72~120시간 배양하였다. pH 조절은 5 N NH₄OH용액을 사용하였다. 유가식 SSF실험에서는 회분식 SSF를 통해 기질 투입시기를 결정하여 기질을 1% (w/v)씩 투입하였다.

동시당화추출발효(SSEF)

SSF 반응도중 초산을 분리제거하기 위하여 이온교환수지 (Amberlite IRA-400)를 사용하였다. 수지의 전처리방법은 다음과 같다. 먼저 멸균된 증류수로 수지를 수회 세척 후 2.5 N NaOH 용액으로 수지가 포화될 때까지 세척을 하였다. 다시 세척액의 pH가 7이하로 될 때까지 증류수로 세척하였다. 최종적으로 멸균을 위해 메탄올로 세척한 후 테시케이터에서 2일간 건조시켰다. 수지흡착실험은 40°C에서 48시간 동안 행하였다. 탈착은 흡착된 수지와 용액을 분리하고 증류수로 수지표면에 묻은 acetic acid를 제거한 후 2.5 N HCl 용액에서 평형에 도달될 때까지 담가두었다. 이온교환수지를 이용한 SSEF실험은 발효조에 200 g/L의 수지를 첨가한 후 SSF와 같은 방법으로 행하였다.

분석

유기산 (acetate) 및 당성분(glucose, cellobiose, xylose)은 HPLC와 효소법 (영동제약 포도당 측정용 시약)으로 분석했다. HPLC (Waters 2690) isocratic mode에서 BioRad HPX-87H column을 사용하였으며 이동상은 0.005M H₂SO₄이었고 column 온도는 65°C 이었고 유속은 0.6 ml/min 이었다.

결과 및 고찰

Acetic acid 발효

본 실험에 사용한 *C. thermoaceticum*의 초산생산특성을 조사한 결과, Figure 1에 나타난 바와 같이 균주의 성장시 초산이 생성되는 growth-associated 형태인 것을 알 수 있었다. 발효실험도중 종종 균주의 사멸기동안 공급되는 영양분이 불충분할 경우 acetic acid 대신 부산물로 lactic acid가 생성되는 것도 관찰되었다.

초산발효와 효소당화 반응을 동시에 효과적으로 수행하기 위해서는 초산발효균주와 당화효소의 최적 활성조건이 유사하여야 한다. 따라서 본 실험에서는 먼저 초산발효에서 pH와 온도의 영향을 조사하였다. Figure 2는 pH 7.0에서 온도에 따

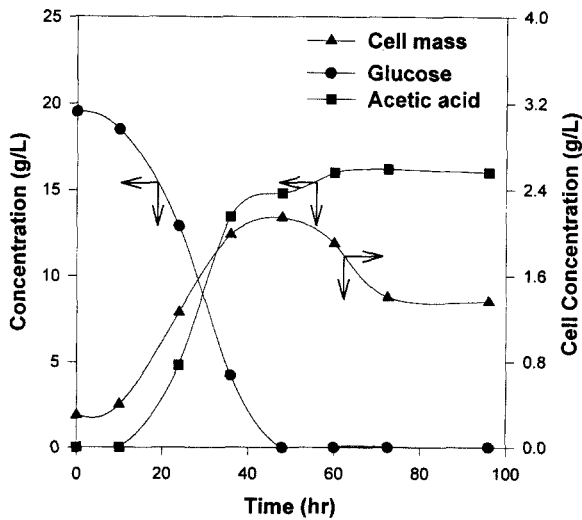


Figure 1. Typical acetic acid fermentation by *C. thermoaceticum*. Operating conditions : pH 6.5, 55°C, 20 g/L glucose.

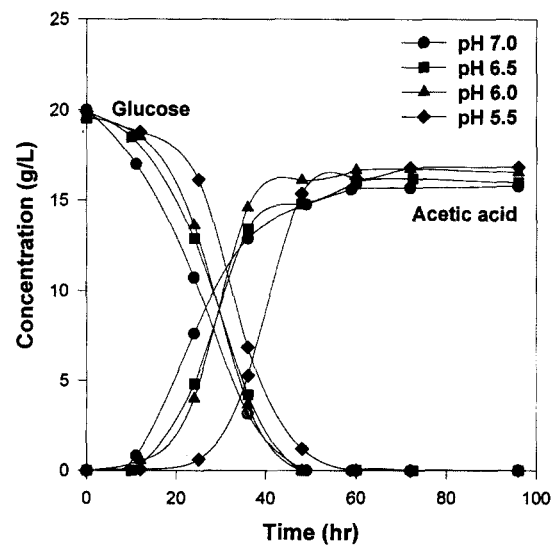


Figure 3. Effect of pH on the acetic acid fermentation at 55°C. (Substrate: 20 g/L glucose)

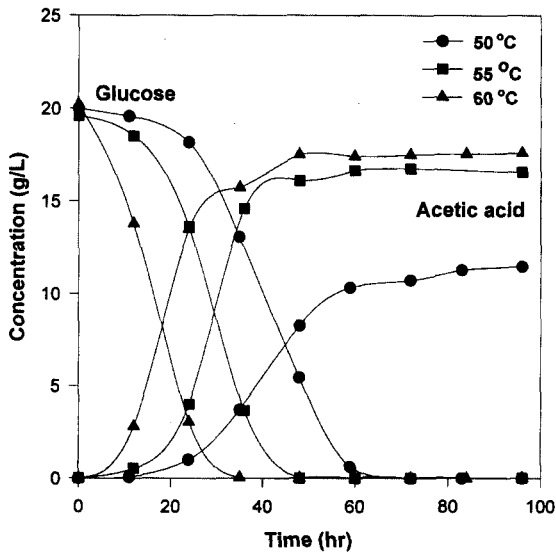


Figure 2. Effect of temperature on the acetic acid fermentation at pH 7.0. (Substrate: 20 g/L glucose)

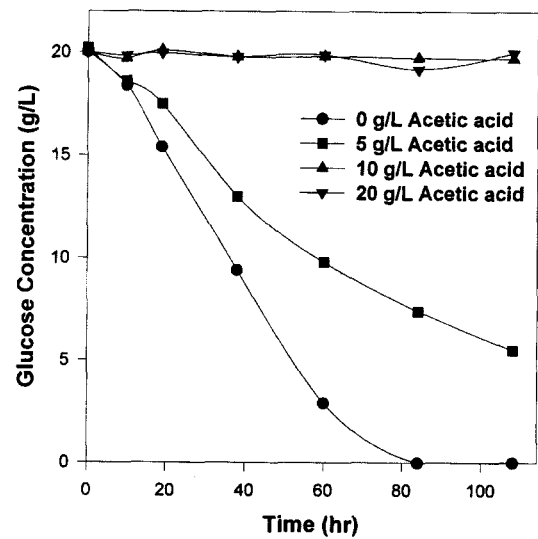


Figure 4. Effect of product inhibition on acetic acid fermentation at pH 6.0 and 55°C.

른 초산발효성능을 나타낸 것이다. 발효온도 60°C, 55°C, 50°C에서 초산수율이 각각 87, 81, 58% 이었다. 발효온도가 높을수록 지연시간이 짧고 발효속도가 빠르며 수율 또한 높게 나타났다. Figure 3은 pH의 영향을 나타낸 것으로, pH 7.0에서 pH 6.0으로 낮아지면 약간의 초산수율 증가를 보였으나 동시에 지연시간이 pH감소와 함께 증가함을 나타내고 있다. 대체적으로 pH 7.0~5.5 사이에서 균주의 활성이 pH에 따라 크게 변하지 않았다. 그러나 pH가 낮은 경우 종종 acetic acid 대신 lactic acid 등의 부산물이 생성되는 것을 관찰하였다. 따라서 pH 5.5의 실험결과에서 발효말기에 acetic acid 수율이 높게 나타난 것은 초기에 생성된 부산물이 acetic acid로 전환되었기 때문인 것으로 판단된다.

초산균주에 미치는 초산의 저해작용을 조사하기 위하여 초기에 초산을 첨가하고 발효실험을 수행하였다. Figure 4는

acetic acid를 각각 0, 5, 10, 20 g/L 첨가하고 발효실험을 수행하여 반응시간에 따른 발효용액내의 glucose 소모속도를 나타낸 것이다. 이 실험에서 pH는 CaCO₃를 첨가하여 조절되도록 하였다. Figure 4에 나타난 바와 같이 acetic acid를 첨가하지 않은 경우에는 80시간만에 glucose가 전부 소모되었다. 그러나 10 g/L이상의 acetic acid가 발효초기부터 첨가된 경우에는 glucose 소모가 거의 없는 것을 관찰할 수 있다. 이러한 실험 결과 초산의 저해작용이 심각한 것을 알 수 있다. 일반적으로 해리되지 않은 유기산이 해리된 유기산염에 비하여 저해작용 크기 때문에(8), 앞에서 관찰한 바와 같이 pH가 낮을수록 초산의 저해가 증가되었다.

효소당화

초산발효실험에서 적절한 발효온도는 60-55°C, pH는 7.0-

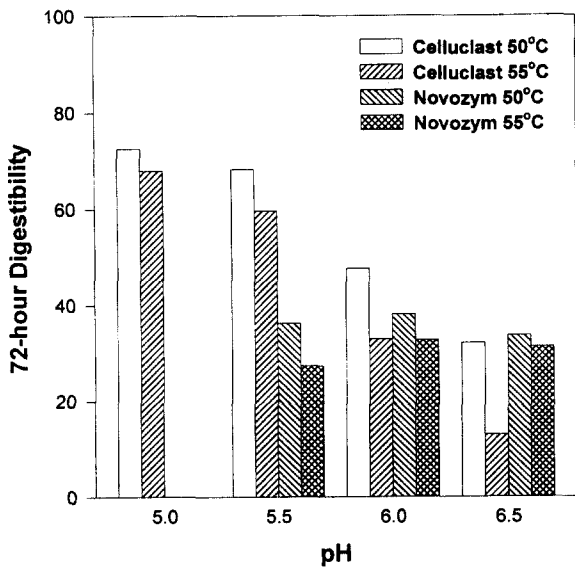


Figure 5. Effects of pH and temperature on the enzymatic digestibility of α -cellulose. (enzyme loading : 50 IFPU/g cellulose, substrate : 5wt% α -cellulose)

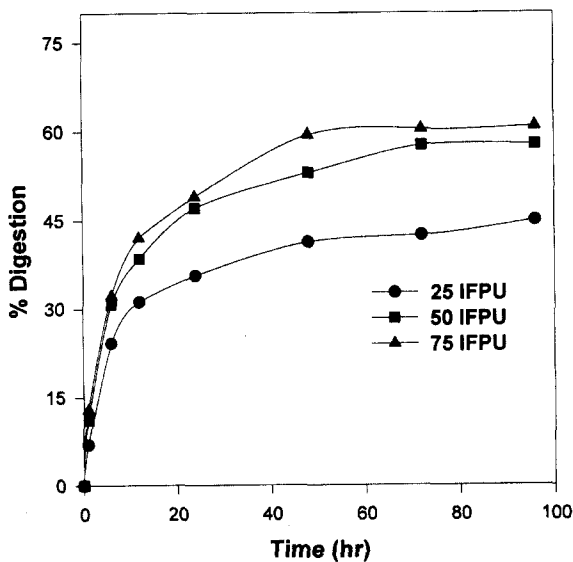


Figure 6. Time course of saccharification at varying enzyme loadings at pH 5.5 and 55°C. (substrate : 5wt% α -cellulose)

5.5로 조사되었다. 따라서 이와 같은 온도 및 pH 범위에서 활성을 갖는 섬유소 가수분해효소를 탐색하였다. Figure 5는 Celluclast 1.5L과 Novozym 342를 사용하여 α -cellulose의 가수분해실험을 수행한 결과로서, 반응온도 및 pH에 따른 당화도를 나타낸 것이다. 본 실험의 범위에서 (온도 50-55°C, pH 5.0-6.5), Celluclast 효소는 낮은 온도 (50°C)와 낮은 pH(5.0)에서 높은 활성을 나타내었다. 반면에 Novozym 342 효소는 pH의 영향이 미미하였다. 그러나 전반적으로 Celluclast 효소의 활성이 Novozym 342 효소에 비하여 우수한 것으로 나타났다. Celluclast 효소의 최적 pH와 온도는 각각 pH 4.8~5.0, 50°C 이었으며 이러한 조건에서 α -cellulose의 당화도는 73% 이었다. 그러나 초산발효와 근접한 조건을 고려하면 pH 5.5

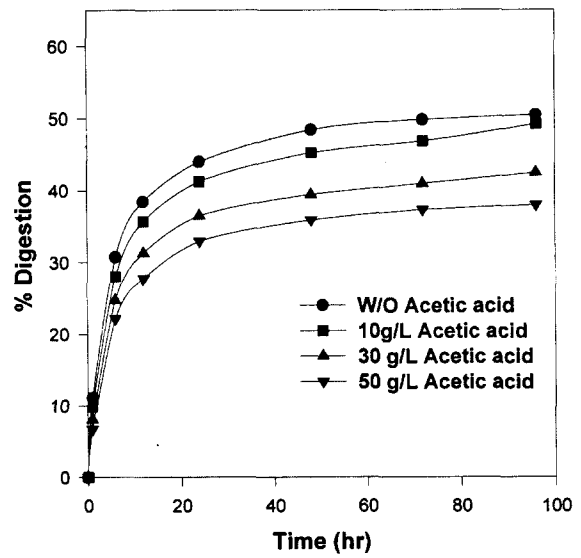


Figure 7. Effect of acetic acid inhibition on enzyme hydrolysis at pH 5.5 and 55°C.

와 55°C (초산발효의 경계조건)에서 SSF를 조업시키는 것이 타당할 것으로 판단할 수 있다. Figure 6은 pH 5.5와 55°C에서 효소의 투입량에 따른 당화도를 관찰한 것으로, α -cellulose의 최대 당화도는 60%이었다. Figure 6에 나타난 바와 같이 단순한 효소당화에서 최적의 효소사용량은 약 50 IFPU/g cellulose로서 상당히 많은 양의 효소가 요구되었다. 따라서 섬유소 가수분해효소를 초산생산공정에 효과적으로 응용하기 위해서는 보다 높은 온도 (-60°C)와 중성의 pH에서 최적조건을 갖는 효소가 요구된다. 그러나 단순한 효소당화 반응에서는 glucose의 축적에 따른 저해작용 때문에 비교적 많은 양의 효소가 요구되나, SSF에서는 효소가수분해에 의하여 생성된 glucose가 균주에 의하여 소모됨으로 glucose 축적이 감소되며 따라서 inhibition이 감소되어 효소사용량을 감소시킬 수 있을 것이다.

Figure 7은 효소당화에서 acetic acid에 의한 효소의 저해작용을 조사한 실험결과이다. 기질은 5wt% α -cellulose를 사용하였고 초기 acetic acid를 0, 10, 30, 50 g/L 씩 첨가하였을 때의 반응시간에 따른 glucose 생성속도를 나타낸 것이다. 이때 acetic acid의 농도가 증가할수록 6시간 이후부터 효소의 활성이 상당히 저하되는 것으로 나타났다.

동시당화발효(SSF)

Glucose를 기질로 한 초산발효실험과 효소당화실험에서 관찰한 반응온도 및 pH 조건을 고려하여 결정한 55°C와 pH 5.5에서 SSF실험을 수행하였다. Figure 8에 나타난 바와같이, SSF의 초기에는 glucose 축적이 상당량 있는데 이는 초기 SSF에서 균주의 성장지연으로 인하여 glucose의 소모가 느리게 진행되었기 때문이다. 이후에는 glucose 생산속도가 전체 공정의 속도결정단계가 되었다. SSF 반응 48시간 이후부터는 glucose의 농도가 거의 영으로 효소당화가 율속단계이었지만, 전체적으로 glucose의 농도가 낮은 상태에서 진행되는 SSF의 특징이 나타나지 않았다. 사실 이 결과는 SSF 결과라기보다는 효소당화와 발효를 분리시킨 결과와 유사하다고 볼 수

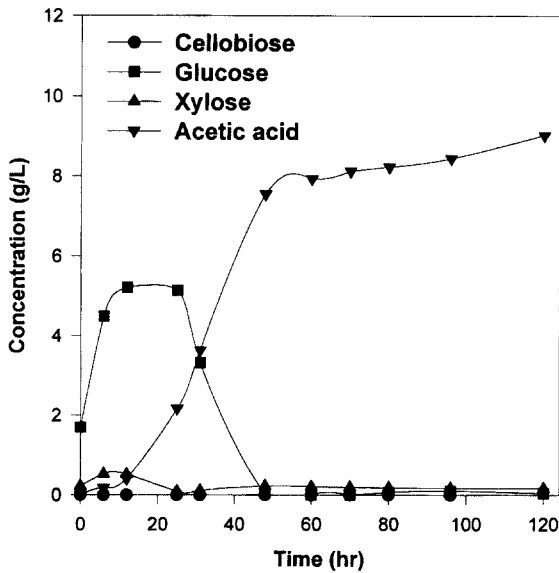


Figure 8. Batch SSF with 2wt% α -cellulose at pH 5.5, 55°C. (Enzyme loading : 50 IFPU/g cellulose)

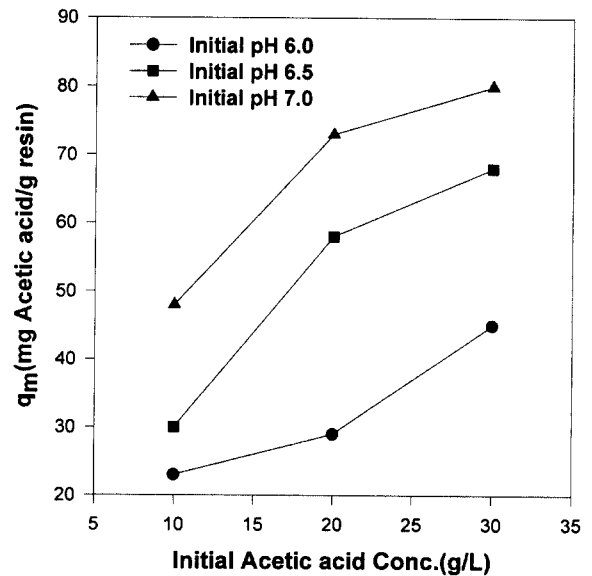


Figure 10. Adsorption isotherm for acetic acid using IRA-400 resin at 40°C.

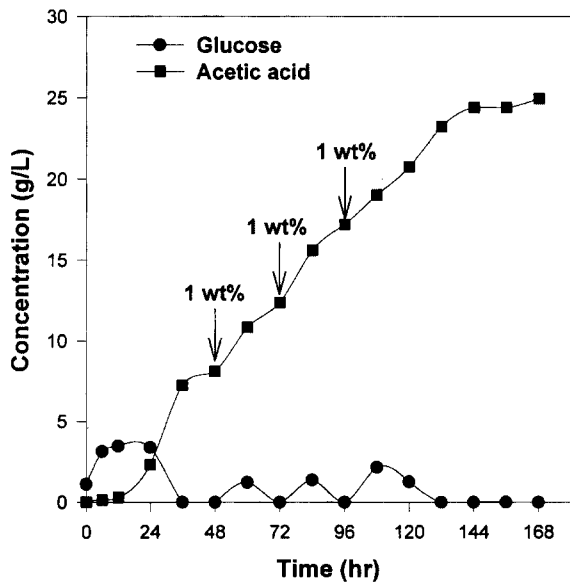


Figure 9. Fed-batch SSF with α -cellulose at 55°C and pH 5.5. 50 IFPU/g-cellulose maintained with each biomass addition.

있다. 따라서 본 SSF의 조업조건에서 미생물의 활동이 제약을 받는 것으로 판단된다.

균주의 성장지연을 최소화시켜 SSF의 효과를 관찰하기 위하여, 유가식 SSF 실험을 수행하였다. SSF 반응 초기에 2%(w/v) α -cellulose와 50 IFPU/g cellulose의 Celluclast 1.5L 효소를 첨가하였으며, 조업부피는 1 L이었고 반응조건은 55°C, pH 5.5, 교반속도 120 rpm 이었다. 유가식 SSF의 기질 투입은 회분식 SSF의 결과를 고려하여 48시간 지난 후에 24시간마다 1%(w/v)의 기질을 간헐적으로 투입하는 방법을 사용하였다. 이때 효소의 역가는 50 IFPU/g-cellulose를 유지하였으며 mineral과 yeast extract 는 1X배로 보충하였다. Figure 9에 나타난 바와 같이, glucose 농도가 회분식 SSF에 비하여

낮게 유지되었다. 반응 144시간 후 24.4 g/L의 acetic acid를 얻을 수 있었으며, acetic acid 수율은 50%로 증가하였다.

이 실험을 통하여 초산균주가 발효배지에 적응이 된 후에는 25 g/L이상의 acetic acid 농도에서도 활성을 유지한다는 것을 알 수 있었다. 그러나, 유가식 SSF 반응에서 초산생성 속도가 반응시간에 따라 감소하는 것으로 나타났다. 즉, Figure 9에서 나타난 바와 같이 초산농도의 기울기가 시간에 따라 감소하였다. 이것은 앞에서 관찰한 바와 같이 최종생산물인 acetic acid이 초산균주뿐만 아니라 효소에도 저해작용을 하기 때문이다. 따라서 SSF를 효과적으로 수행하기 위해서는 SSF 도중 생성된 초산을 분리제거하는 공정이 필요한 것으로 판단된다.

동시당화추출발효(SSEF)

SSF공정의 생산성을 향상시키기 위해서는 생성된 acetic acid를 제거하는 공정이 필요한 것으로 판단되며 이를 위해서 Amberlite IRA-400 이온교환수지를 이용한 acetic acid 분리제거를 도입하였다. 이온교환수지를 사용할 경우 생성물의 회수가 용이하고, 수지를 다시 재 사용할 수 있다는 장점이 있어서 본 실험에 적용하였다. Figure 10은 Amberlite IRA-400 이온교환수지의 흡착성능을 나타낸 것이다. Acetic acid 흡착능이 83 mg/g dry resin으로 나타났으며 pH가 높을수록 흡착능이 더 높아지는 경향을 나타내었다. 이온교환수지를 SSF 공정에 사용하기 위해서는 멸균공정이 필요한데 IRA-400 수지의 경우는 멸균온도인 121°C에서도 수지의 변형을 가져오지 않는 장점을 갖고 있다. SSF도중 생성된 acetic acid를 분리제거하기 위하여 SSF용액에 멸균된 이온교환수지를 첨가한 추출형 SSF(SSEF)실험을 수행한 결과를 Figure 11에 나타내었다. 120시간에서의 발효액 중의 acetic acid 농도가 12.1 g/L 이었고, IRA-400 수지에 흡착된 acetic acid의 농도는 11.8 g/L 이었다. IRA-400 수지에 흡착된 acetic acid의 농도는 SSEF 반응 후 수지를 2.5N HCl 용액으로 탈착시켜 측정하였다. 따

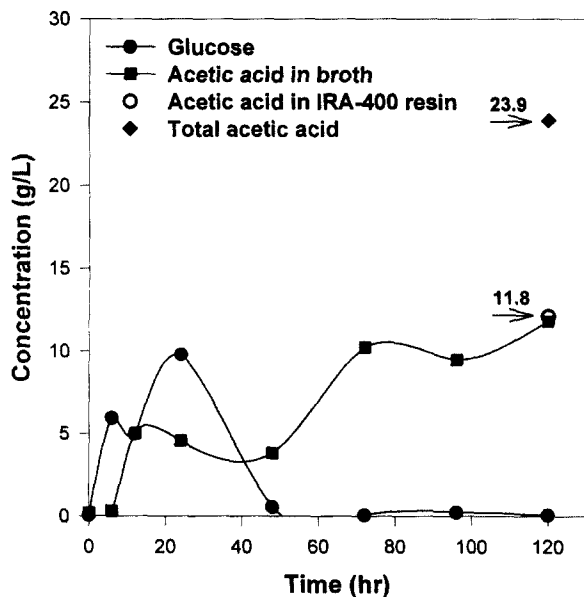


Figure 11. SSEF using Amberlite IRA-400 resin at 55°C, pH 5.5 (5wt% α -cellulose, 50 IFPU/g cellulose)

라서 전체 acetic acid의 농도는 23.9 g/L로 48%의 수율을 보였으며 초산생산성은 단순 유가식 SSF공정의 0.15 g/L-hr 보다도 빠른 0.20 g/L-hr이었다. 이온교환수지를 첨가함으로써 acetic acid가 제거되고 이로 인하여 생성물저해가 감소되었기 때문이다. 이와 같은 실험결과로부터 SSF를 이용한 acetic acid 생산공정에서 이온교환수지를 사용하여 추출발효를 결합한다면 acetic acid의 생산성을 향상시킬 수 있으며 또한 발효액의 pH조절과 생성물의 회수를 용이하게 할 수 있다.

요약

섬유성바이오매스로부터 초산을 생산하기 위한 동시당화 및 추출발효공정의 성능과 조업특성을 조사하였다. 본 연구에 사용된 homoacetate 미생물은 *Clostridium thermoaceticum* (ATCC 49707)이었다. 온도 55°C와 pH 5.5에서 α -cellulose를 사용한 회분식 SSF 실험결과 초산수율이 40%이었으며, 유가식 SSF 실험결과 초산수율이 50%로서 최대 25 g/L의 초산을 생산하였다. 최종산물의 저해를 최소화하고 정제비용을 줄이기 위하여 SSF반응 도중에 초산을 분리 제거하는 공정이 필요하며, 이를 위하여 유기산 분리에 효과적으로 사용되고 있는 이온교환수지를 이용한 동시당화추출발효(Simultaneous Saccharification and Extractive Fermentation, SSEF) 공정을 도입하였다. 200 g/L의 IRA-400 이온교환수지를 사용한 SSEF공정은 48%의 초산수율을 보였다. 이것은 유가식 SSF공정의 초산생산속도 0.15 g/L-hr 보다도 빠른 0.20 g/L-hr로서 본 연구에서 시도된 이온교환수지를 이용한 SSEF공정을 유가식으로 수행한다면 정제비용을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 생산성도 더욱 향상시킬 수 있을 것이다.

감사

본 연구는 '98 건설기술연구원 건설교통기술연구개발사업의 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

- Agreda, V. H. and Zoeller, J. R. (1993), Acetic Acid and Its derivatives, Marcel Dekker, Inc., N. Y.
- Shah, M. M., Cheryan, M. (1995), Acetate Production by *Clostridium thermoaceticum* in corn steep liquor media, *J. Ind. Micro.*, (15), 424-428.
- Marynowski, C. W., et al. (1983), Process Development for Production of Calcium Magnesium Acetate FHWA-RD-82-145.
- Bryan, W. L. (1992), Research to reduce the cost of Calcium Magnesium Acetate, Chemical Deicers and the Environment, 463-478.
- Chollar, B. H. (1984), Federal Highway Administration Research on Calcium Magnesium Acetate-An Alternative Deicer, Public Roads, 47(4), FHWA.
- Parekh, S. R., Cheryan, M. (1990), Acetate Production from Glucose by *Clostridium thermoaceticum*., *Process Biochem.*, (25), 117-121.
- Witjitra, K. (1994), Master's Thesis, University of Illinois.
- Han, I. S., Cheryan, M. (1996), Downstream Processing of Acetate Fermentation Broths by Nanofiltration, *App. Biochem. & Biotechnol.*, (57/58), 19-28.
- Takagi, M., Abe, S., Suzuki, S., Yata, N., and Emert, G. H. (1977), *Proceedings of Bioconversion Symp.*, IIT Delhi, India.
- Abe, S., Takagi, M. (1995), Simultaneous Saccharification and Fermentation of Cellulose to Lactic Acid, *Biotechnol. Bioeng.*, (37), 93-96.
- Borden, K. J. (1999), Master's Thesis, Auburn University.
- Cheryan, M., Parekh, S., Shah, M., and Witjitra, K. (1997), "Production of Acetic acid by *Clostridium thermoaceticum*", *Advances in App. Microbiology*, (43), 1-31.
- Parekh, S. R., Cheryan, M. (1991), Production of Acetate by Mutant Strain of *Clostridium thermoaceticum*, *App. Micro. Biotech.*, (36), 384-387.
- Parekh, S., Cheryan, M. (1990), Fed-Batch Fermentation of Glucose to Acetate by an Improved Strain of *Clostridium thermoaceticum*, *Biotech. Letters*, (12), 861-864.
- Golob, J. Grilc, W. Zadnik, B. (1981), Extraction of Acetic acid from Dilute Aqueous Solutions with Trioctylphosphine Oxide, *Ind. Eng. Chem. Process Des. Dev.*, (20), 433-435.
- Moritz J. W., Duff, S. J. B. (1996), Simultaneous Saccharification and Extractive Fermentation of Cellulosic Substrates, *Biotechnol. & Bioeng.*, (49), 504-511.
- Reisinger, H., King, C. J. (1995), Extraction and Sorption of Acetic acid at pH above pKa To Form Calcium Magnesium Acetate, *Ind. Eng. Chem. Res.*, (34), 845-852.
- Srivastava, A., Roychoudhury, P. K., and Sahai, V. (1992), Extractive Lactic acid Fermentation Using Ion-Exchange Resin, *Biotechnol. & Bioeng.*, (39), 607-613.
- Yang, S. T., Whate, S., and Hsu, S. T. (1991), Extraction of Carboxylic Acids with Tertiary and Quaternary Amines: Effect of pH, *Ind. Eng. Chem. Res.*, (30), 1335-1342.