

피페리딘계 이온성 액체와 포스페이트 염으로 구성된 수상이성분계를 이용한 숙신산의 추출

이우윤 · 홍연기[†]

한국교통대학교 화공생물공학과
27469 충북 충주시 대학로 50

(2015년 4월 21일 접수, 2015년 5월 18일 수정본 접수, 2015년 5월 19일 채택)

Liquid Extraction of Succinic Acid by Aqueous Two-Phase Systems Composed of Piperidinium Ionic Liquids and Phosphate Salt

Woo Yun Lee and Yeon Ki Hong[†]

Department of Chemical and Biological Engineering, Korea National University of Transportation, 50, Daehak-ro,
Chungju, Chungbuk, 27469, Korea

(Received 21 April 2015; Received in revised form 18 May 2015; accepted 19 May 2015)

요 약

본 연구에서는 숙신산 추출을 위한 효과적인 분리공정으로서 피페리딘계 이온성 액체/ K_2HPO_4 에 의한 수상이성분계를 적용하여 수상이성분계 형성 특성 및 추출특성을 고찰하였다. 실험 결과 K_2HPO_4 수용액에 적정량의 피페리딘계 이온성 액체를 첨가함에 따라 안정한 수상이성분계가 형성됨을 확인할 수 있었으며 이성분계 형성능력은 이온성 액체 내 양이온의 알킬 사슬길이에 따라 증가하였다. K_2HPO_4 수용액을 기준으로 피페리딘계 이온성 액체의 수상이성분계 형성 능력은 이미다졸계나 피롤리딘계에 비해 우수하였다. 피페리딘계 이온성 액체를 이용한 수상이성분계 추출에 있어 숙신산 추출 효율은 75~95%의 범위를 가지며 이 값들은 이미다졸계나 피롤리딘계와 큰 차이가 없었다. 그러므로 피페리딘계 이온성 액체를 이용한 수상이성분계를 숙신산 추출에 적용할 경우 이미다졸계 및 피롤리딘계에 비해 적은 양의 이온성 액체를 사용하여 높은 추출효율을 얻을 수 있음을 확인할 수 있었다.

Abstract – As an effective method for extraction of succinic acid, aqueous two-phase systems based on piperidinium ionic liquids were used in this study. Effects of the alkyl chain length of cation in piperidinium ionic liquids on phase diagram and extraction efficiencies were investigated. Experimental results show that aqueous two phase systems can be formed by adding appropriate amount of piperidinium ionic liquids to aqueous K_2HPO_4 solutions. It can be found that the ability of piperidinium ionic liquids for phase separation followed the order [OMPip][Br]>[HMPip][Br]>[BMPip][Br]>[EMPip][Br]. The biphasic-forming ability of piperidinium ionic liquids was higher than that of imidazolium and pyrrolidinium ionic liquids in the presence of K_2HPO_4 . 75~95% of the succinic acid could be extracted into the ionic liquid-rich phase in a single-step extraction. There was little difference in the extraction efficiency of succinic acid by piperidinium ionic liquids comparing to other ionic liquids such as imidazolium and pyrrolidinium ionic liquids. This aqueous two phase system by piperidinium ionic liquid is suggested to have effective application for the separation of succinic acid.

Key words: Ionic Liquids, Piperidinium, Aqueous Two-Phases, Binodal Curve, Succinic Acid

1. 서 론

1990년대 이래로 생물공정에 의한 숙신산 생산에 많은 관심이 집중되어 왔다. 기존의 석유화학 유래 숙신산에 비해 생물학적으로 생산된 숙신산이 가지는 장점은 숙신산의 발효과정에서 이산화탄소를

고정시켜 대기오염 저감에 기여할 수 있다는 것이다. 숙신산 생산에 필요한 에너지 측면에서도 생물학적 경로를 통한 숙신산의 생산공정이 현재의 석유화학 경로에 의한 숙신산 생산공정에 요구되는 에너지의 60~70%에 불과하다는 점도 장점이 되고 있다[1]. 현재 숙신산 생산에 효율적인 균주로서는 *Mannheimia succiniciproducens*, 재조합 대장균, *Actinobacillus succinogens*, *Corynebacterium glutamicum* 등이 있는 것으로 알려져 있다[2].

그러나 생물학적인 공정을 통한 숙신산 생산이 경제성을 갖기 위해서는 발효공정과 더불어 저비용 고효율 분리 및 정제 공정 개발이 필요하다. 일반적으로 숙신산 생산 비용 중 다운스트림 공정이

[†]To whom correspondence should be addressed.

E-mail: hongyk@ut.ac.kr

*이 논문은 서울대학교 김화용 교수님의 정년을 기념하여 투고되었습니다. This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

차지하는 비중은 약 50~60%에 달하는 것으로 알려져 있다[3].

생물학적인 숙신산 생산에 있어 숙신산 분리정제 공정은 크게 3 단계로 구성된다. 첫 번째 단계는 미세여과나 원심분리에 의한 균주의 제거이다. 두 번째 단계에서는 발효액으로부터 숙신산을 1차적으로 분리하고 불순물을 제거하게 된다. 숙신산의 1차적인 분리를 위해 다양한 공정이 사용될 수 있는데 해당 공정으로서는 침전 공정, 환외여과나 나노여과 및 전기투석을 이용한 막분리 공정, 반응 추출공정, 이온교환에 의한 흡착공정 등이 사용될 수 있다. 그러나 정제 수율, 순도, 에너지 소비량 측면에서 봤을 때 이들 공정 대부분은 충분히 효과적이지 않은 것으로 알려져 있다[4]. 그러나 산업적 응용 면에서 액-액 추출 공정은 분리효율과 수율, 적절한 선택도, 기술적 단순함과 낮은 비용 등으로 인해 숙신산의 분리공정으로서 여전히 유효한 공정으로 알려져 있다[5]. 숙신산을 포함한 생물분자들의 추출에 있어 사용되는 용매는 수용상과 상호 용해도가 없어야 한다. 이 같은 조건을 만족하는 용매의 상당수는 휘발성 유기 용매로서 용매의 손실 및 용매에 의한 독성이 문제가 된다[6].

액-액 추출의 단점을 극복하고 산업적 적용에 있어서의 장점을 활용하기 위해 사용될 수 있는 추출계로서 수상이성분계를 제시할 수 있다. 수상이성분계는 두 종류의 고분자 물질, 혹은 고분자-염을 특정 조성으로 혼합할 경우 형성되는 계를 말한다. 수상이성분계를 이용한 추출공정은 추출 대상 물질에 따라 차이가 있지만, 분리 효율과 물질 전달 속도가 빠른 것으로 알려져 있다. 최근에는 고분자-고분자 혹은 고분자-염 이외에도 이온성 액체를 수상이성분계에도 포함함으로써 이온성 액체가 갖는 낮은 증기압, 열적 안정성, 균주에 대한 생물 적합성과 같은 장점을 활용하고자 하는 연구가 진행되고 있다[7-8]. Gutowski 등은 이미다졸계 이온성 액체에 K_3PO_4 와 같은 무기염을 조합하여 수상이성분계가 형성됨을 확인하였다[9]. cosmotropic한 염을 친수성 이온성 액체의 수용액에 첨가할 경우 이온성 액체가 rich한 상과 염이 rich한 상으로 구성된 혼합되지 않는 수상이성분계가 형성된다. 이후 Pei 등은 이미다졸계 이온성 액체와 인산염으로 구성된 수상이성분계를 이용하여 단백질의 추출하였으며 이 때 추출능은 75~100%에 이르는 것으로 보고하였다. 추출능은 이미다졸계 이온성 액체의 양이온 사슬 길이와 조업온도에 비례한다고 했으며 열역학적인 해석을 통해 정전기적 인력과 염출효과(salting-out effect)가 단백질의 이동에 중요한 영향을 미치지만 주된 구동력은 소수성 인력임을 밝혔다[10]. Claudio 등은 위와 동일한 수상이성분계를 이용하여 바닐린(vanillin)을 추출하였다. 바닐린 추출에 대한 분배 계수 역시 이미다졸계 이온성 액체의 양이온 사슬 길이에 영향을 받으며 사슬 길이 증가에 따른 극성 감소와 이온성 액체가 주로 포함된 상부층에서의 표면 장력 감소로 인해 [HmIm][Cl](1-hexyl-3-methylimidazolium chloride)에 의해 만들어진 수상이성분계가 가장 높은 분배 계수를 나타낸 것으로 보고하였다[11]. 유기산 추출의 경우 이미다졸계 이온성 액체와 인산염으로 구성된 수상이성분계를 적용한 결과 숙신산 및 아크릴산을 효과적으로 분리할 수 있음이 보고된 바 있다[12,13].

본 연구에서는 수용액에서 K_2HPO_4 에 대해 피페리딘계 이온성 액체의 수상이성분계 형성에 의한 평형 데이터를 측정하였고 이를 이미다졸계에서의 평형 데이터[12]와 피롤리딘계 이온성 액체와 비교하였다. 또한, 수용액에 용해된 숙신산의 추출에 있어 이온성 액체에서의 양이온 사슬 길이에 따른 추출능의 변화를 고찰하고 이들을 비교하였다.

2. 실험

2-1. 시료 및 시약

숙신산 모사 수용액을 제조하기 위해 숙신산(Sigma-Aldrich, 99%)을 2차 증류수에 용해시켰다. 수상이성분계 형성에 따른 상평형도를 결정하기 위해 K_2HPO_4 (Sigma-Aldrich, 99.9%) 수용액과 피롤리딘계 및 피페리딘계 이온성 액체를 조합하였다. 본 연구에서 사용된 피페리딘계 이온성 액체로서 N-ethyl-N-methylpiperidinium bromide([EMPip][Br]), N-butyl-N-methylpiperidinium bromide([BMPip][Br]), N-hexyl-N-methylpiperidinium bromide([HMPip][Br]), 그리고 N-octyl-N-methylpiperidinium bromide([OMPip][Br])를 사용하였다. 또한 피페리딘계 이온성 액체와의 수상이성분계 형성능과 숙신산 추출 효율 비교를 위해 이미다졸계 중에서 1-ethyl-3-methylimidazolium bromide([EMIm][Br])과 1-butyl-3-methylimidazolium bromide([BMIm][Br]), 피롤리딘계 이온성 액체 중에서는 N-ethyl-N-methylpyrrolidinium bromide([EMPyr][Br])과 N-butyl-N-methylpyrrolidinium bromide([BMPyr][Br])를 사용하였으며 (주)씨트리에서 구입하였다. Fig. 1에서는 본 연구에서 사용된 이온성 액체 중 [EMIm][Br], [EMPip][Br], [EMPyr][Br]의 구조를 보여주고 있다.

2-2. 수상이성분계 추출 및 분석

이온성 액체/염으로 구성된 수상이성분계의 상태도를 얻기 위해 탁도 적정법(turbidity titration method)을 사용하였다. 먼저 바이알에 일정비율의 염을 용해시킨 수용상을 준비한 후 여기에 이온성 액체를 투입하면서 상 분리여부를 확인하였다. 실험 온도는 항온조를 이용하여 25 °C를 유지하였으며 압력은 대기압에서 진행하였다. 이온성 액체/염 수용액의 상 분리가 일어나는 지점을 탁점(tubid point)이라 하며 이 때 첨가된 이온성 액체의 총량은 질량을 측정하여 얻을 수 있다. 탁점에서 이온성 액체와 염의 농도는 아래의 식을 이용하여 계산하였다[14].

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

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

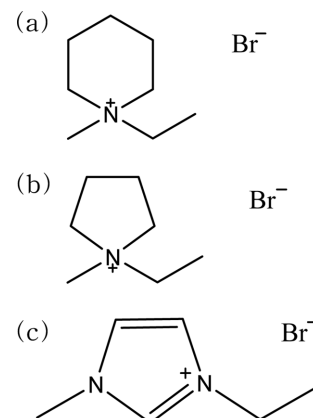


Fig. 1. Chemical structures of ionic liquids used in this study: (a) N-ethyl-N-methylpiperidinium bromide([EMPip][Br]), (b) N-ethyl-N-methylpyrrolidinium bromide([EMPyr][Br]), (c) 1-ethyl-3-methylimidazolium bromide([EMIm][Br]).

여기에서 w_1 과 w_2 는 각각 이온성 액체와 염의 질량 분율이며 m_1 , m_2 , m_3 는 첨가된 이온성 액체, 염, 그리고 물의 질량을 나타낸다.

수상이성분계를 이용한 수용액에서의 숙신산의 추출과정은 다음과 같다. 우선 염이 포함된 10 ml의 모사수용액을 준비한 후 여기에 이온성 액체를 첨가한다. 이와 같이 준비된 수상혼합물을 약 30분간 강력히 교반한 후 상분리를 위해 10시간 이상 방치해 둔다.

추출 후 숙신산 농도는 액체 크로마토그래피(Waters 2487, UV 검출기)에 Supelcogel C-610H 칼럼(300 mm×7.8 mm, Supelco)을 고정상으로, 0.1 wt%의 H_3PO_4 수용액을 이동상으로 하여 측정하였다.

3. 결과 및 고찰

상평형도는 수상이성분계 추출 공정의 설계와 향후 숙신산 분배를 예측하기 위한 모델을 수립하기 위해 필요하다. 실험적으로 얻어진 바이노달 곡선(binodal curve)은 아래의 식을 이용하여 최소 자승법에 의한 회귀분석에 의해 맞추어 졌다[15].

$$[IL] = A \exp[(B \times [Salt]^{0.5}) - (C \times [Salt]^3)] \quad (3)$$

위 식에서 $[IL]$ 과 $[Salt]$ 은 각각 이온성 액체와 염의 퍼센트 분율이며 A , B , C 는 실험데이터의 회귀분석에 의해 얻어진 상숫값들이다.

Fig. 2에서는 피페리딘계 이온성 액체와 K_2HPO_4 에 의해 형성된 바이노달 곡선을 나타내고 있다. 바이노달 곡선에서 보듯이 피페리딘계 이온성 액체의 수상이성분계 형성능력은 양이온의 알킬사슬 길이에 따라 증가한다. 이는 알킬 사슬길이 증가에 따른 chaotropicity와 소수성 증가와 관련이 있다. 그러나 이온성 액체에 의한 수상이성분계 형성에 있어 이온성 액체에서의 양이온 알킬 사슬길이의 증가와 수상이성분계 형성능력이 정확하게 일치하지는 않는 경우도 보고되어 왔다. 이미다졸계 및 모폴린계 이온성 액체의 경우 양이온 알킬 사슬 길이가 C6에서 수상이성분계 형성능력이 최대로 나타나며 그 이상이 될 경우는 오히려 감소하는 것으로 알려져 있다[11,13]. 이에 대한 이유로서 이온성 액체 내 양이온에서 알킬 사슬이 증가하면 이온성 액체의 자가 응집(self-aggregate)이 발생하여 수상이성분계 형성 능력이 떨어지는 현상을 들 수 있다. 이온성 액체의 양이온 내 알킬 사슬에 이중결합, 벤질기 또는 하이드록시기가 도입될 경우에도 이

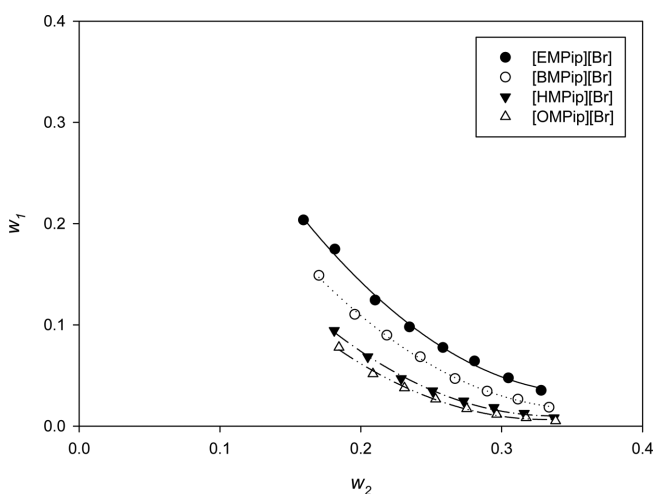


Fig. 2. Phase diagram of piperidinium ionic liquids/ K_2HPO_4 , aqueous two-phase systems.

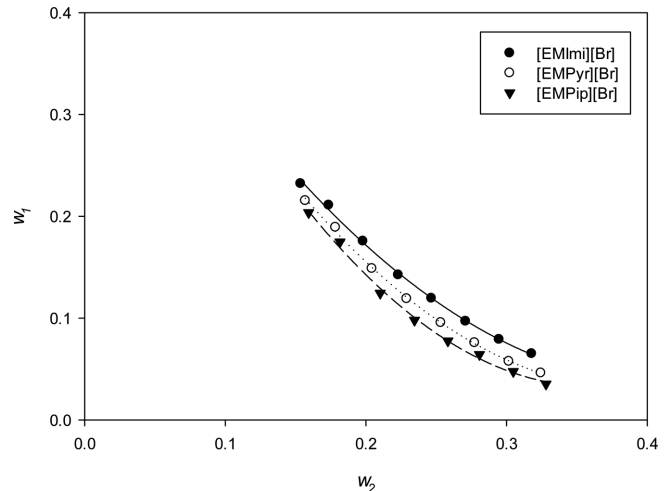


Fig. 3. Effect of cation on phase diagram of ionic liquids/ K_2HPO_4 aqueous two-phase systems.

성분계 형성 능력이 떨어지는 것으로 알려져 있다[16].

Fig. 3에서는 피페리딘계, 피롤리딘계, 이미다졸계 이온성 액체와 염에 의해 형성된 상평형 곡선을 나타내고 있다. 사용된 이온성 액체 모두가 K_2HPO_4 에 대해 수상이성분계를 형성함을 알 수 있다. 곡선이 x 축에 가까워질수록 이성분계 영역이 커지고 따라서 이온성 액체의 상분리능이 증가한다고 할 수 있다. 본 연구에서 사용된 이온성 액체 중 상분리능은 피페리딘계가 가장 우수하였으며 $[EMPip][Br] > [EMPy][Br] > [EMIm][Br]$ 의 순서로 감소하였다. 동일한 염에 대한 이온성 액체의 상분리능에 영향을 주는 인자로서는 이온성 액체의 chaotropicity와 소수성이다. 이온성 액체의 양이온의 화학적 구조를 고려할 때 이 같은 순서는 사용된 이온성 액체 내 양이온으로 인한 chaotropicity의 감소와 동일하다.

수상이성분계에서 상부상과 하부상간의 숙신산 분배계수는 아래와 같이 계산된다.

$$D = \frac{C_{SA}^t}{C_{SA}^b} \quad (4)$$

여기에서 C_{SA}^t 와 C_{SA}^b 는 각각 상부상과 하부상에서 숙신산의 농도이다. 본 연구의 경우 이온성 액체가 주로 포함된 상부상으로서의 숙신산이 분배된다. 상부피비(phase volume ratio) R 은 상부상의 부피와 하부상의 부피 비로 나타낼 수 있다.

$$R = \frac{V^t}{V^b} \quad (5)$$

$$E(\%) = \frac{C_{SA}^t V^t}{C_{SA}^t V^t + C_{SA}^b V^b} \times 100 = \frac{DR}{1+DR} \times 100 \quad (6)$$

이온성 액체와 K_2HPO_4 로 구성된 수상이성분계를 이용하여 수용액에 용해된 숙신산을 추출했을 때 이온성 액체 내 양이온 알킬 사슬 길이 및 수용액에서의 숙신산 농도에 따른 분배계수를 Fig. 4에 나타내었다. 피페리딘계 이온성 액체의 경우 이온성 액체 양이온 내 알킬 사슬길이가 증가함에 따라 분배계수가 증가하였다. 이온성 액체 양이온 내 알킬 사슬이 C6 이상인 긴 사슬을 가질 경우 초기 숙신산 농도 증가에 따라 추출 효율이 감소하였으나 짧은 알킬 사슬

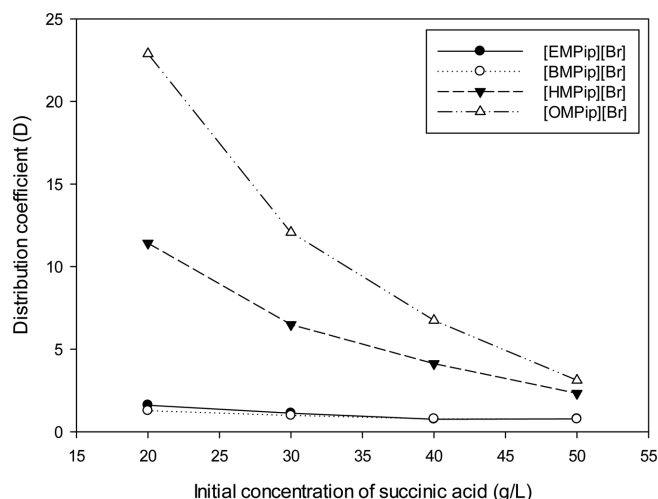


Fig. 4. Effect of initial concentrations of succinic acid on distribution coefficient.

Table 1. Parameters A , B , C of equation (3) for the piperidinium ionic liquids+ K_2HPO_4 aqueous two-phase systems at $T=298.15$ K

	$A \pm \sigma$	$B \pm \sigma$	$10^5 (C \pm \sigma)$	R^2
[EMPip][Br]	171.68 ± 3.46	-0.55 ± 0.14	3.32 ± 0.71	0.9996
[BMPip][Br]	386.23 ± 4.64	-0.81 ± 0.34	2.11 ± 1.64	0.9980
[HMPip][Br]	11.74 ± 11.32	0.044 ± 0.94	9.04 ± 4.38	0.9934
[OMPip][Br]	0.00595 ± 52.97	1.88 ± 1.97	20.09 ± 8.95	0.9858

에 대해서는 뚜렷한 상관관계는 없었다. 이온성 액체 양이온 알킬기의 사슬 길이가 길어질수록 계에서의 표면장력은 감소하고 이온성 액체에서의 자유부피가 증가하여 숙신산이 용해될 수 있는 cavity 형성에 따른 에너지는 감소한다. 한편 알킬 사슬 길이 증가에 따라 쿨롱 인력이나 극성 인력은 감소하며 이온성 액체간의 분산력을 증가시키게 된다. 이미다졸계나 모폴린의 경우 이러한 상반된 효과로 인해 이온성 액체 양이온 내 알킬사슬 길이가 C6까지 증가할 경우 추출대상 물질에 대한 분배계수가 증가하나 그 이상이 되면 감소하는 것으로 알려져 있다[11,13]. 그러나 본 연구에서 사용된 피페리딘계의 경우 이온성 액체 양이온의 알킬 사슬길이가 길어짐에 분배계수가 증가하였으므로 소수성 상호작용과 이온성 액체 내의 자유부피 증가가 분리를 위한 주요 구동력인 것으로 해석할 수 있다.

Table 2에는 이온성 액체의 양이온 종류에 따른 추출효율을 나타내었다. 사용된 이온성 액체 간에 큰 차이는 없으며 수용액 상에서 숙신산의 초기 농도에 따라 상이하지만 약 65~95%의 추출효율을 얻을 수 있었다.

Table 2. Extraction efficiency for succinic acid with various ionic liquids + K_2HPO_4 aqueous two-phase systems at $T=298.15$ K

ILs	C_{SA}^i (g/L)	20	30	40	50
[EMIm][Br]		91.60	97.56	92.94	
[BMIm][Br]		78.08	78.89	68.57	79.04
[EMPyr][Br]		96.56	86.62	74.10	80.64
[BMPyr][Br]		69.72	76.37	70.71	74.61
[EMPip][Br]		85.77	81.43	86.89	96.29
[BMPip][Br]		75.34	79.86	85.63	95.05

4. 결 론

본 연구에서는 양이온을 구성하는 다양한 길이의 알킬 사슬을 가진 피페리딘계 이온성 액체를 이용하여 K_2HPO_4 수용액에 대한 수상이성분계 형성에 따른 평형 데이터를 얻었으며 이를 이미다졸계 및 피롤리딘계 이온성 액체와 비교하였다. 인산염으로 구성된 수상이성분계와 더불어 친수성 알코올과 인산염으로 이루어진 수상이성분계와의 이성분계 형성 특성을 비교하였다. 그 결과 K_2HPO_4 수용액에 적정량의 피페리딘계 이온성 액체를 첨가함에 따라 안정한 수상이성분계가 형성됨을 확인할 수 있었으며 이성분계 형성능력은 양이온 알킬사슬길이에 비례하였다. K_2HPO_4 수용액을 기준으로 했을 때 피페리딘계 이온성 액체의 수상이성분계 형성 능력은 이미다졸계나 피롤리딘계에 비해 우수함을 알 수 있었다. 피페리딘계 이온성 액체를 이용한 수상이성분계 추출에 있어 숙신산 추출 효율은 75~95%의 범위를 가지며 이 값들은 이미다졸계나 피롤리딘계와 큰 차이가 없었다. 수상이성분계 형성을 위해 기존에 사용되던 PEG를 포함한 고분자-염에 비해 본 연구에서 사용된 이온성 액체-염의 경우 점도가 낮고 에멸전 형성이 거의 없다는 장점이 있어 이온성 액체의 경제성이 확보될 경우 향후 숙신산을 포함한 생물분자의 분리에 있어 응용 가능성이 크다고 할 수 있다.

감 사

이 논문은 2014년도 정부(교육부)의 재원으로 한국연구재단의 기초연구사업의 지원을 받아 수행된 것입니다(2013R1A1A2058483).

References

- Sauer, M., Porro, D., Mattanovich, D. and Branduardi, P., "Microbial Production of Organic Acids: Expanding the Markets," *Trends Biotechnol.*, **26**, 100-108(2008).
- Okino, S., Noburyu, R., Suda, M., Jojima, T., Inui, M. and Yukawa, H., "An Efficient Succinic Acid Production Process in a Metabolically Engineered *Corynebacterium Glutamicum* Strain," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **81**, 459-264(2008).
- Kurzrock, T. and Weuster-Botz, D., "Recovery of Succinic Acid from Fermentation Broth," *Biotechnol. Lett.*, **32**, 331-339(2010).
- Cheng, K. K., Zhao, X. B., Zeng, J., Wu, R. C., Xu, Y. Z., Liu, D. H. and Zhang, J. A., "Downstream Processing of Biotechnological Produced Succinic Acid," *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **139**, 841-850(2012).
- Gu, B. H., Zheng, P., Yan, Q. and Liu, W., "Aqueous Two-Phase System: An Alternative Process for Recovery of Succinic Acid from Fermentation Broth," *Sep. Purif. Technol.*, **138**, 47-54(2014).
- Martinez-Aragon, M., Burghoff, S., Goetheer, E. L. V. and de Haan, A. B., "Guidelines for Solvent Selection for Carrier Mediated Extraction," *Sep. Purif. Technol.*, **65**, 65-72(2009).
- Desai, R. K., Streefland, M., Wijffels, R. H. and Eppink, M. H. M., "Extraction and Stability of Selected Proteins in Ionic Liquid Based Aqueous Two Phase Systems," *Green Chem.*, **16**, 2670-2679 (2014).
- Zafarani-Moattar, M. T. and Hamzehzadeh, S., "Partitioning of Amino Acids in the Aqueous Biphasic System Containing the Water-Miscible Ionic Liquid 1-Butyl-3-Methylimidazolium Bromide

- and the Water-Structuring Salt Potassium Citrate,” *Biotechnol. Prog.*, **27**, 986-997(2011).
9. Gotowski, K. E., Broker, G. A., Willauer, H. D., Huddleston, J. G., Swatoski, R. P., Holbrey, J. D. and Rogers, R. D., “Controlling the Aqueous Miscibility of Ionic Liquids: Aqueous Biphasic Systems of Water-Miscible Ionic Liquids and Water-Structuring Salts for Recycle, Metathesis, and Separations,” *J. Am. Chem. Soc.*, **125**, 6632-6633(2003).
 10. Pei, Y., Wang, J., Wu, K., Xuan, X. and Lu, X., “Ionic Liquid-Based Aqueous Two-Phase Extraction of Selected Proteins,” *Sep. Purif. Technol.*, **64**, 288-295(2009).
 11. Claudio, A. F. M., Freire, M. G., Freire, C. S. R., Silvestre, A. J. D. and Coutinho, J. A. P., “Extraction of Vanillin Using Ionic-Liquid-Based Aqueous Two-Phase Systems,” *Sep. Purif. Technol.*, **75**, 39-47(2010).
 12. Lee, Y. H., Kang, J. W., Hong, Y. K. and Kim, K.-S., “Extraction Equilibria of Succinic Acid by Using Aqueous Two Phases System Containing Imidazolium Ionic Liquids and Salts,” *Clean Technol.*, **20**, 349-353(2014).
 13. Lee, Y. H., Lee, W. Y., Kim, K.-S. and Hong, Y. K., “Extraction Equilibrium of Acrylic Acid by Aqueous Two-Phase Systems Using Hydrophilic Ionic Liquids,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **52**, 627-631(2014).
 14. Hong, Y. K., “Effect of Alcohols and Carboxylic Acids on Extraction Characteristics for 1,3-Propanediol by Aqueous Two Phases Systems,” *Korean Chem. Eng. Res.*, **51**, 575-579(2013).
 15. Merchuk, J. C., Andrews, B. A. and Asenjo, J. A., “Aqueous Two-Phase Systems for Protein Separation: Studies on Phase Inversion,” *J. Chromatogr. B.*, **711**, 285-293(1998).
 16. Neves, C. M. S. S., Ventura, S. P. M., Freire, M. G., Marrocho, I. M. and Coutinho, J. A. P., “Evaluation of Cation Influence on the Formation and Extraction Capability of Ionic-Liquid-Based Aqueous Biphasic Systems,” *J. Phys. Chem. B.*, **113**, 5194-5199(2009).