

## Hollow Fiber 막에 의한 *Pichia stipitis* 의 Cross Flow여과

김 홍·정 인 식

경희대학교 자연과학대학 유전공학과

### Cross Flow Filtration of *Pichia stipitis* by a Hollow Fiber Membrane

H. Kim and I.S. Chung

Department of Genetics Kyung Hee University, Suwon, Korea

#### ABSTRACT

The feasibility of separating *Pichia stipitis* from a fermentation broth using a hollow fiber membrane was evaluated. The permeate flux was affected by such parameters as cell concentration, pH, content of antifoam agents, suction pressure, and recirculation rate. A minor effect of temperature on the flux loss was also observed. A microcomputer-aided backflush was proven effective in alleviating membrane fouling and allowing long term separation of *P. stipitis* from a fermentation broth.

#### 서 론

Membrane을 이용한 여과 기술은 미생물 세포, 식물 세포, 동물 세포, 효소, 단일클론항체 그리고 recombinant DNA 산물 등의 생물공정제품의 분리 및 회수공정에 사용될 수 있다(1-4).

그리고 이러한 여과기술은 생물 반응기와 결부시켜 생산성 향상을 위한 cell-recycle 생물 반응기 시스템에도 이용이 가능하다. 여러가지 재질의 membrane을 사용한 cell-recycle 생물반응기 시스템에 대한 연구는 미생물의 종류도 다양하게 사용되었으나 (5-9) 이들 대부분의 연구자들은 membrane 여과공정에서 fouling으로 인한 permeate flux의 감소현상이 현저하다고 보고하고 있다. 이러한 flux의 감소는 미생물과 용액중의 기타물질등이 membrane 표면에 축적 또는 상호작용등에 의해서 초래될 수 있다고 사료되고 있으나 (10, 11) 아직도 membrane의 표면과 proe구조에서 일어나는 현상들은 확실하지 않다. 본 연구에서는 membrane 여과공정(cross-flow 여과방식)에서 permeate flux의 감소현상을 규명하기 위하여 cell의 농도, 배양액의 pH, 여과압력, 온도, anti-

foam agent의 농도, 그리고 recirculation rate등의 변수가 flux에 미치는 영향을 조사하였다. 아울러 이러한 flux의 감소 문제를 해결하기 위한 방안으로써 규칙적인 back-flushing 방법에 의한 clean-up 시스템의 이용을 검토하였다.

#### 재료 및 실험방법

##### 균주 및 세포배양

본 실험에 사용한 균주는 *Pichia stipitis* CBS 5776 이며 1 liter 당 20g xylose와 6.7 g yeast nitrogen base (Difco) 를 함유한 배지에서 발효조를 사용하여 배양되었으며 배양된 균주는 원심분리 후 inoculum으로 사용되었다.

##### Membrane Module

이 실험에서 사용한 membrane filter는 미국 Amicon (order number 1853) 회사의 H1MPOL-43 (m.w. cut-off: 0.1  $\mu$ m)이다. 이 filter의 cartridge의 직경은 2.3cm이며 길이는 20.3cm이고 fiber의 수는 55개 이며 polysulfone으로 만들어 진 것이다. Inlet에서 조업이 가능한 최대 압력은 25 psi 이고 membrane이 안정할 수 있는 pH의 범위

는 1.5-13.0이다. 그리고 연속조업 온도는 50°C까지인 것으로 알려져 있다.

### 여과실험방법

Membrane 여과는 실험하기 위한 장치는 그림 1. 과 같다. 이 그림에서 알 수 있듯이 fermenter와 hollow fiber membrane은 silicon tubing으로 연결되어 있으며 용액은 peristaltic pump에 의해 순환되고 pump의 vacuum pressure에 의해 membrane 밖으로 나온 여과액은 다시 fermenter로 되돌려 진다. 그리고 fermenter로 되돌아 가는 loop에서 T 자관을 연결하여 graduated cylinder로 단위 시간에 얻어지는 여과부피를 측정하고 여과 flux는 다음과 같은 식으로 계산되었다.

$$\text{Flux} = \frac{V}{A \cdot T}$$

여기서 V는 측정시 graduated cylinder에 얻어진 여과 부피이며

A는 membrane의 면적

t는 여과부피를 측정할 시간이다.

여과 실험은 fermenter(5 liter Marubishi)를 사용해서 1 liter당 20g xylose, 0.12g  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ 와 0.18g  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ 를 포함한 배지에서 aeration을 하지 않은 상태에서 100rpm이 교반속도로 행하여 졌으며 명시되지 않은 경우에서의 여과 실험조건은 다음과 같다. 온도는 30°C, recirculation rate은 80ml/min, suction 압력은 7.1cm Hg vacuum, 그리고 초기 yeast의 농도는 6g dry cells/liter이다.

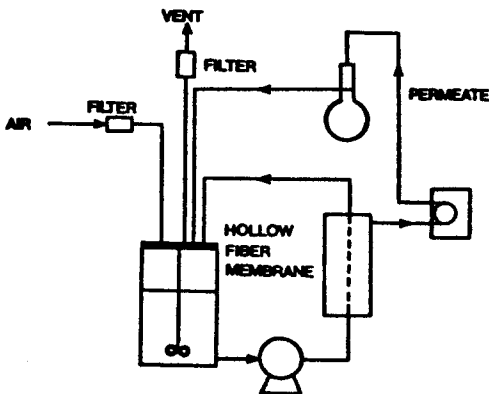


Fig. 1. Schematic diagram of the experimental set-up

### Clean-up 시스템

Microcomputer로 membrane을 backflush하는 기작을 시간적으로 제어할 수 있는 clean-up 시스템을 구성하기 위해 여과 mode와 backflushing mode를 switch/diversion 시키는데 필요한 interface를 제작하고 Basic program을 개발 (12)하여 그림 2. 와 같이 시스템을 구성하였다.

이 시스템은 그림 1. 의 장치에 여과액을 사용해서 backflush하는 mode를 첨가한 것으로 cell broth는 hollow fiber (HF)의 tube쪽을 통해서 순환되며 broth의 일부는 pump의 vacuum pressure에 의해 여과된다.

cell이 없는 broth는 여과액 holder를 통해 fermenter로 recycle되며 이때 여과액 holder에 있는 여과액이 membrane을 backflush할 때 사용된다. 그리고 HF의 shell 쪽의 상단부가 여과 mode의 pump와 연결되며 하단부는 backflushing mode의 pump와 연결되고 microcomputer의 Basic program에 의해 시간적으로 조절되어 여과 mode의 pump가 작동시에는 backflushing mode의 pump가 멈추는 switch/diversion 기능을 할 수 있도록 interface를 통해 HF membrane과 pump들이 연결되어 있다.

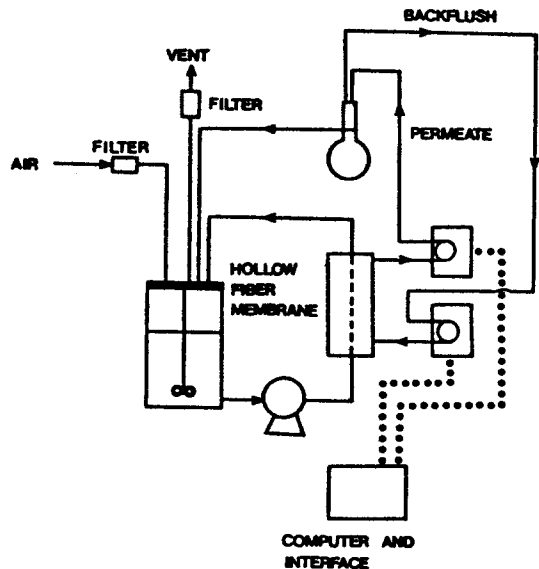


Fig. 2. Schematic diagram of the clean-up system

### 결과 및 고찰

*Pichia stipitis*의 농도가 초기 flux에 미치는 영향은 그림 3에서 볼수 있는데 cell의 농도가 높을 수록 flux는 적

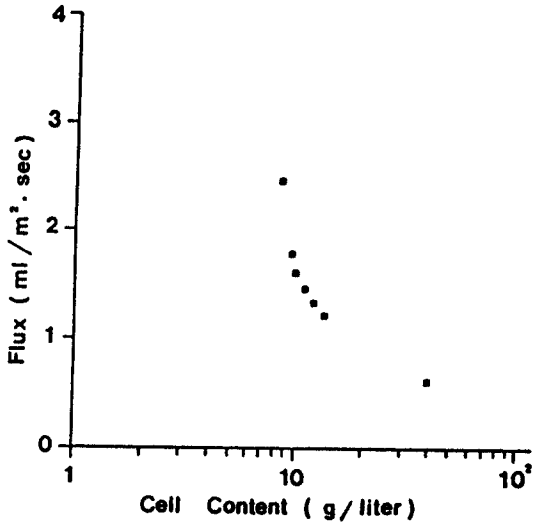


Fig. 3. The effect of cell content on the initial flux

은 값을 나타낸다. 이러한 현상은 cell의 농도가 증가할수록 여과액의 물질전달은 제한되고 gel layer가 견고하게 형성되어 flux가 감소하는 것으로 생각된다. 아울러 flux와 cell 농도의 logarithm과의 linear 관계가 없음은 classical film theory를 따르지 않는 것 처럼 보이며 이러한 사실은 broth의 구성물질 중 cell 이외의 여러가지 다른 성분의 interference에 의한 것으로 추측된다.

배양액의 pH도 membrane의 flux에 영향을 미치고 있는지를 조사하기 위해 여과실험을 시작하기 전에 배양액의 초기 pH를 조정 한 뒤 여과실험을 실시한 결과 pH가 6에서 4로 낮아질수록 flux가 감소함을 보여주었다(그

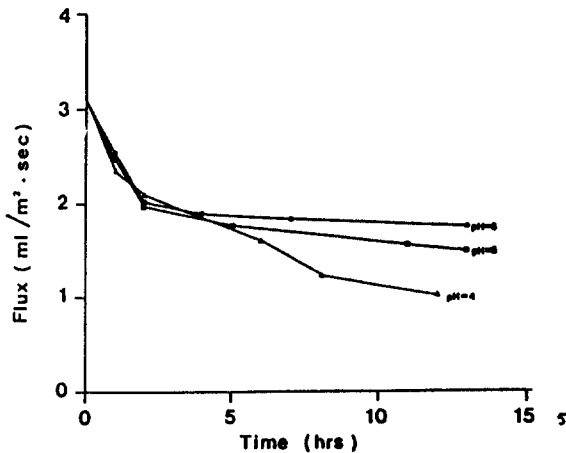


Fig. 4. The effect of pH on the flux

림 4). 일반적으로 등전점에서 용해도는 낮아지고 agglomeration은 증가하는 현상이 있는데 pH가 낮을수록 proton과 *P. stipitis* cell의 표면의 negative charge와 상호작용이 증가되면서 agglomeration현상이 많아져서 flux가 감소되는 것으로 생각된다.

Membrane에 걸리는 압력의 부하에 따라 여과 속도에 어떠한 영향이 미치는가에 대해서 조사하기 위하여 여과 압력을 변화시키면서 membrane의 초기 flux를 측정하였다. 그림 5는 membrane에 걸리는 여과압력의 변화가 초기 flux에 미치는 영향을 보여주는데 여기서 여과 flux는 suction 압력이 18cm Hg vacuum에 도달할때 까지는 증가하나 그 이상으로 압력을 증가시켜도 flux가 증가되지 않음을 확인할 수 있었다.

온도가 flux에 미치는 영향을 조사하기 위하여 25°C, 30°C 그리고 35°C의 온도에서 여과 실험을 하고 flux의 변화를 관찰하였다. 그림6에서 알 수 있듯이 flux가 온도의 영향을 크게 받지 않고 있다.

Antifoam agent는 물에 불용성인 hydrophobic한 물질이며 발효공업에서 통기배양시 foam의 문제를 줄이기 위해 많이 사용한다. 본 실험에서는 antifoam agent로 antifoam B emulsion (10% silicon defoamer, Sigma No. A-5757)을 사용하였다. Antifoam agent의 농도를 0% (W/V)에서 1.0% (W/V)까지 변화시키면서 flux를 조사해 본 결과 모든 경우에 있어서 배양액에서의 flux는 antifoam agent의 존재하에 감소하는 것을 보여주었다(그림 7). Antifoam agent는 hydrophobic하며 adsorption에 의해 membrane 표면에 축적되므로 flux에 영향을 미치는 것으로 판단된다.

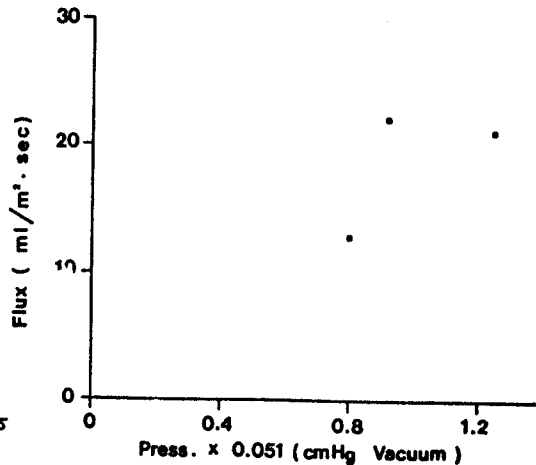


Fig. 5. The effect of suction pressure on the initial flux

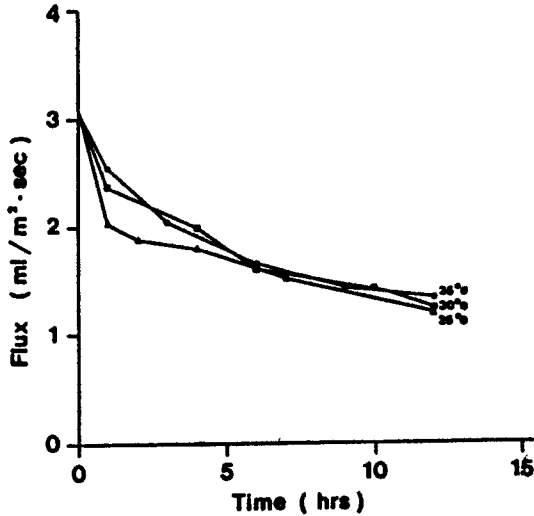


Fig. 6. The effect of temperature on the flux

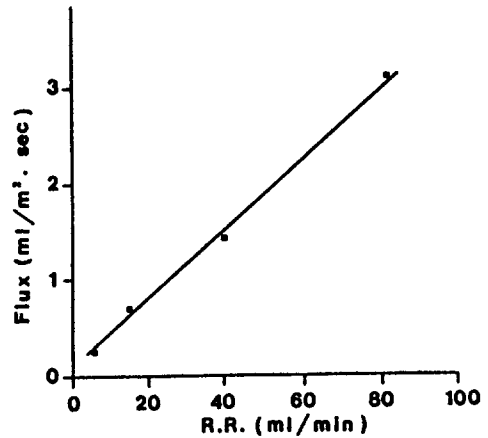


Fig. 8. The effect of recirculation rate on the initial flux

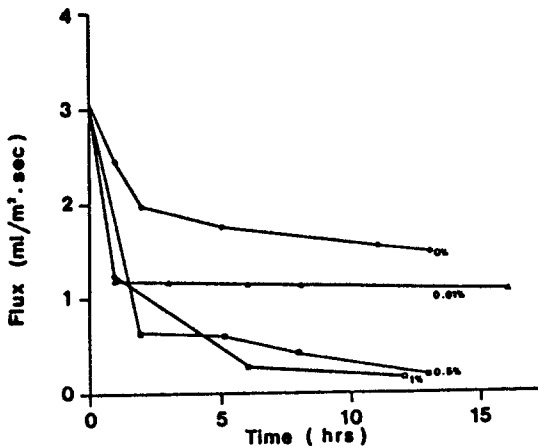


Fig. 7. The effect of antifoam agent on the flux

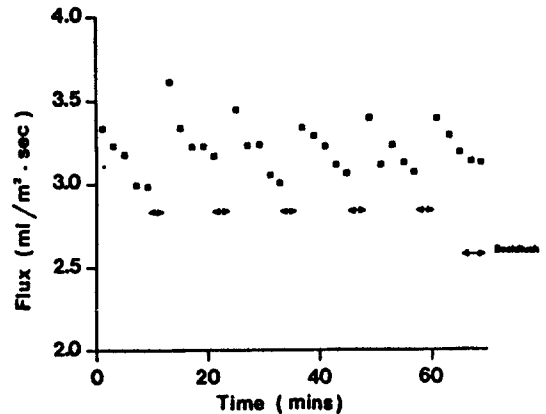


Fig. 9. The effect of backflush on the flux

Recirculation rate가 membrane fouling에 미치는 영향을 조사했는데 세가지의 다른 recirculation rate에서 초기 flux를 비교해 본 결과 같은 조건에서 recirculation rate를 높일수록 flux가 증가함을 알 수 있었다(그림 8). Recirculation rate를 증가시키면 flow velocity가 높아지는데 이 경우에 dynamic boundary layer (gel layer)가 얇아져서 flux는 같은 조건에서 높아진다고 본다. 이처럼 recirculation rate은 concentration polarization이나 membrane fouling을 경감시키는데 관제가 있다.

기술한 바와 같이 주로 membrane의 fouling 문제로

flux가 감소되므로 membrane을 backflush함으로써 permeability를 회복할 수 있을 것으로 판단되어(13, 14) 규칙적인 backflush로 membrane의 fouling문제를 해결하고자 하였다. 그래서 여과 mode로 10분 동안 조업하다가 membrane을 통과한 여과액을 사용해서 2분 동안 backflush하는 것을 반복하여 5주기 (cycle)에 걸쳐 실시해 보았다. 이때 여과압력은 8.03 cm Hg Vacuum, 그리고 backflushing 부피는 15ml 이었다. 그림 9에서 알 수 있듯이 membrane은 10분 마다 2분 씩 backflush되어 전체적으로 5번 backflush가 된 것을 알 수 있다. 그런데 여

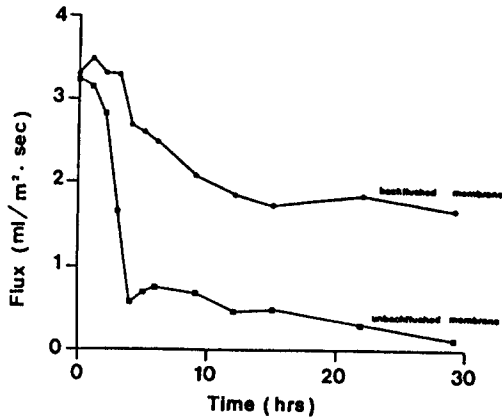


Fig 10. Time dependence of the flux with or without backflush

기서 membrane을 처음으로 backflush하였을 때 flux가 2.96ml/m<sup>2</sup>sec에서 3.61ml/m<sup>2</sup>sec로 증가했다가 backflush이 후에 flux가 서서히 감소하며 2번째의 backflush로 flux가 다시 회복되는 것을 보여주고 있다. 5주기(cycle)를 통해서 flux가 전체적으로 약간씩 감소되는 경향을 보여주는 하지만 짧은 구간에서의 backflush의 효과를 이 실험을 통해서 알 수 있다.

다음은 1개의 fermenter에 2개의 HF membrane 시스템을 parallel로 연결하여 fermenter의 배양액이 2개의 HF 시스템의 tube 쪽의 하단부로 동시에 들어가 상단부를 통해 fermenter로 recycle되는 testing 시스템을 구성하였다. 여기서 한 membrane 시스템은 backflush하지않고 계속하여 여과 mode로 작동되었으며 다른 membrane 시스템은 10분이 여과하다가 2분간 membrane을 backflush하는 방법으로 운전되었다. 이렇게 backflush의 효과를 29시간 동안 조사해 본 결과는 그림 10과 같다. Backflush를 하지 않은 membrane의 경우에 flux가 29시간 뒤에 0.14ml/m<sup>2</sup>sec인 반면에 backflush가 된 membrane의 경우 1.67ml/m<sup>2</sup>sec로서 clean-up 조작이 첨가되었을 때 membrane 생물반응기에서 fouling의 문제를 경감시켜서 연장된 조업을 가능케 하여 줌을 보여준다.

## 요 약

발효액에서 hollow fiber membrane에 의한 *Pichia stipitis*의 분리 공정의 가능성을 검토해 보았다. Permeate flux는 cell의 농도, pH, antifoam agent의 농도, 여과 압력, 그리고 recirculation rate에 의해 영향을 받았으며 온도는 flux의 감소와 별로 관계가 없는것으로 나타났다.

아울러 microcomputer에 조절되어 membrane을 backflush 하는 것이 membrane의 fouling 문제를 경감시켜서 발효액에서 *P. stipitis*를 분리하는 공정의 연장된 조업을 가능케 함을 확인 하였다.

## 감 사

본 연구는 한국과학재단의 목적기초연구비로 수행되었으며 이에 깊은 감사를 표하는 바입니다.

## 참 고 문 헌

1. K. Shutte, K.M. Kroner, W. Hummel and M.-R. Kula (1983), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **413**, 270
2. R.S. Tutunjian (1983), *Ann. N.Y. Acad. Sci.*, **413**, 238
3. E. Flaschel, C. Wandrey and M.-R. Kula (1983), *Adv. Biochem. Eng. and Biotechnol.*, **26**, 73
4. P. Leuthard, A.R. Schuerch (1980), *Experientia*, **36**, 1447
5. M. Cheryan and M.A. Mehaia (1986), *Membrane Separations in Biotechnology*, ed by W.C. McGregor, New York
6. I.S. Chung, Y.Y. Lee and M.J. Beck (1987), *Biotech. Bioeng. Symp.*, **17**, 391
7. T.B. Vick Roy, D.K. Mandel, D.K. Dea, H.W. Blanch and C.R. Wilke, (1983), *Biotechnol. Lett.*, **5**, 665
8. K.J. Lee, M. Lefebvre, D.e. Tribe and P.L. Rogers (1980), *Biotechnol. Lett.*, **2**, 487
9. H. Hoffmann, W. Kuhlmann, H.-D. Meyer and K. Schugerl (1985), *J. of Membrane Science*, **22**, 235
10. G. Belfort and F.W. Altena (1983), *Desalination*, **47**, 105
11. M.S. Le and J.A. Howell (1985), *Comprehensive Biotechnology*, Vol 2., ed. by M. Moo-Young, Pergamon Press, New York
12. 김 홍, 박영민, 정인식 (1988), 한국 농화학회 추계 학술 발표회
13. K.H. Kroner, H. Schutte, H. Hustedt, M.R. Kula (1984), *Process Biochem.*, **19**, 67
14. I.S. Chung (1986), Ph.D. Thesis, Auburn University

(Received March 6, 1989)