

활성탄을 이용한 히아루론산 배양액의 유색물질 제거

윤 중 원* · 김 덕 중* · 정 윤 철** · 박 정 극*** · 김 태 진
수원대학교 공과대학 화학공학과, *(주)제철화학 중앙연구소
한국과학기술연구원 환경연구센터, *동국대학교 공과대학 화학공학과

Color Removal of Culture Broth Containing Hyaluronic Acid by Activated Carbon

Jong Woon Yoon,* Deog Jung Kim,* Yun Chul Chung,**
Jung Keug Park,*** and Tai Jin Kim

Department of Chemical Engineering, The University of Suwon
*R&D Center, Korea Steel Chemical Co., Ltd.

**Environmental Research Center, Korea Institute of Science & Technology

***Department of Chemical Engineering, Dongguk University

ABSTRACT

Activated carbons were used to examine their performance for the separation of undesirable colored materials from culture broth containing hyaluronic acid. Six local samples and a NORIT ROX 08 were tested, whereas the latter was mainly studied under batch and continuous modes. The optimal wavelength for the detection of colored materials was 330nm. The optimal choice of NORIT ROX 08 provided 30% colored residuals with 96% hyaluronic acid recovery of original broth in batch experiments. The nonlinear adsorption behavior of protein and colored materials with activated carbon (C) was correlated by a Langmuir equation to give $18C/24+C$ and $500C/892+C$ for protein and colored materials, respectively. It appears that colored materials were composed of 78% protein and 22% glucose residuals on the basis of clearance results. A microscopic study using a scanning electron microscope suggests that regeneration of used activated carbon with 0.1N NaOH and hot water was not satisfactory. The present study proposes that the continuous monitoring of colored materials during purification can be accomplished by installation of a UV monitor commonly used for continuous detection of protein during the process, as resulted from the significant correlation of $\text{color}(A_{330}) = 0.353 \text{ protein(mg/ml)} + 0.1$ ($R=99.7\%$).

서 론

활성탄은 입자나 표면적의 크기를 임의로 조절할 수 있고 비독성의 안정한 성질을 갖고 있어서 폐수 처리, 정수 및 정밀화학 공정에서 보편적으로 사용

되는 물질이나 발효액의 처리 공정에는 별로 사용되지 않고 있다. 그러나 최종 제품이 히아루론산(hyaluronic acid)과 같은 값비싼 생체고분자일 경우에는, 활성탄 사용으로 인한 정제 공정비의 부담을 감수할 수 있다. 일반적으로 히아루론산을 발효

공정으로 생산한 후에는 인체에 해로운 균주의 특성상 열처리 공정을 거치게 된다. 이러한 배양액에는 잔류 포도당을 비롯한 다량의 불순물이 존재하는데 이들을 열처리함으로써 배양액이 갈색을 띄게 된다. Xanthan Gum 이나 Pullulan 등은 식품 첨가물 혹은 접착제 등으로 쓰여서 그다지 색깔의 유무가 문제되지 않을 것이고 또한 저렴한 가격으로 공급되지만, 히아루론산은 무색 청정한 용액 혹은 하얀 가루 상태로 시판되며 주로 고가의 화장품 원료로 널리 쓰이고 있다. 따라서 색깔의 존재로 인하여 생산한 히아루론산 제품의 질이 저하됨을 방지하기 위하여 열처리 후 발생한 색깔을 적절한 방법으로 제거할 필요가 있다. 일반적으로 히아루론산의 정제는 에틸에탄올로 수차례 반복하여 침전시킴으로써 이뤄지지만 이는 고가의 알코올을 사용해야 하고 알코올의 재사용을 위한 증류 공정으로 인하여 상당한 에너지 비용을 요구하는 단점이 있다. 따라서 본 연구에서는 히아루론산 및 유색물질을 공유하고 있는 배양액을 활성탄으로 각각을 쉽게 분리할 수 있는 공정 개발을 위한 기초적 실험조건을 제시하고자 한다.

재료 및 방법

실험재료

히아루론산 발효를 위하여 사용한 균주는 *Streptococcus equi* ATCC 9528이었다. 사용한 배지 조성은 veal infusion broth(1~2.5%), 포도당(2~5%), tryptone(0.5~4%), yeast extract(0.5~1.5%), 인산염(0.2~2.5%), 황산암모늄(0.01~1.8%)이었다. 자세한 발효공정은 한국 특허 90-5774에 상술한 바와 같다. 사용한 활성탄은 7가지 종류였으며, 이중 NORIT ROX 08을 제외한 나머지 6가지는 국산이었다. 이들은 Lignite, 입자형 활성탄(4×8, 8×12, 12×30mesh), 분말형 활성탄(이상은 유진 Chemical 에서 입수한 시료임), carbon black(제철화학 제품) 등이었다. 공정의 편의성 및 처리비를 감안하여 본 연구에서는 주로 NORIT ROX 08을 사용하였으며, 그의 물성치는 Tabel 1에 표시하였다.

활성탄별 Batch 실험방법

활성탄 0.5g에 증류수 5ml을 넣고 vortex mixer로 혼합한 후 100℃에서 10분간 기다렸다가 3000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거하였다. 이같은 전처리를 3회 실시한 활성탄에 0.5g/

Table 1. Physical Properties of NORIT ROX 08

Parameters	Value
Total surface area	900m ² /g
Effective diameter	0.8mm
Total pore volume	1.0ml/g
Bulk density	0.390g/ml
pH range	4~7
Internal porosity	0.7
Shape factor	0.41

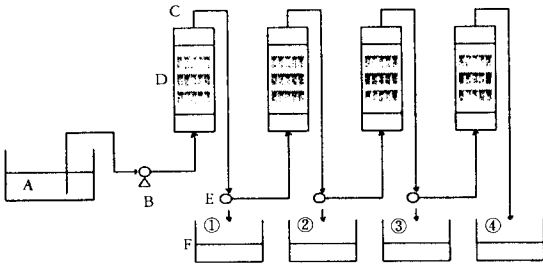
L의 히아루론산을 포함하는 시료 5ml와 증류수 5ml을 각각 첨가하였다. 동일한 혼합 및 원심분리 방법으로 상등액을 재차 원심분리하여 잔여 분진을 제거한 후 잔류한 히아루론산 및 색깔을 정량하였다.

NORIT 활성탄 Batch 실험방법

주어진 활성탄 양에 대하여 흡착 능력이 포화되는 시간을 구하기 위하여, 전처리한 0.5g, 1g의 활성탄을 5배 희석한 배양액 500ml에 넣고 25℃, 200rpm조건으로 혼합하여 시간별로 시료를 채취하였다. 시료에 잔류한 히아루론산, 단백질, 색깔 등을 정량하였다. 아울러 일정한 배양액에 대한 활성탄의 처리능력을 실험하기 위하여 활성탄을 0.05g부터 매 0.05g씩 증가시켜 0.5g까지 흡착 활성탄의 처리능력을 실험하기 위하여 활성탄을 5배 희석한 배양액 50ml을 넣고 동일 조건에서 16시간 동안 교반한 후 잔류 농도들을 정량하였다.

NORIT 활성탄 Column 실험방법

Fig. 1의 연속식 실험장치는 일정시간 동안 배양액을 연속적으로 통과시켰을 때의 농도 분포도를 구하기 위한 것으로 Coleman peristaltic pump(head no. 7014)로 일정 유량을 공급하였다. 전체적인 활성탄 10g씩을 Vison 회사의 길이 30cm 및 내경 1.3cm의 packed-bed column 유리관 4개에 각각 채운 후 수 시간 증류수로 세척하였다. 5~6배 희석한 배양액 1.5liter를 혼합하여 일정 유량으로 column 내로 흘러 보내면서 ①, ②, ③ 및 ④의 위치에서 시간별로 sampling하고 sampling 하지 않는 동안의 sample은 ④의 위치에서 모았다. sample의 색깔, 단백질 및 히아루론산을 정량하여 처리전 배양액과 비교하고 시간에 따른 이들 값의 변화를 관찰하였다. sample이 모두 loading된 후, 활성탄을 0.1N NaOH 및 더운 물을 사용하여 활성탄의 재생 여부를 실험했다.



- A : Diluted Culture Broth Tank
- B : Pump
- C : Packed-Bed Column
- D : Activated Carbon
- E : Flow Valve
- F : Storage Tank

Fig. 1. Schematic Diagram of Packed-Bed Column.

분석방법

배양액 내의 잔류 포도당량을 DNS법으로 정량하였다. 즉, 증류수 1416ml에 3.5-dinitrosalicylic acid 10.6g 및 NaOH 19.8g을 넣고 녹인 용액에, Na-K tartarate 306g, 50℃에 녹인 페놀 7.6ml, sodium pyrosulfite 8.5g을 혼합하였다. 이같은 DNS시약 3ml에 시료 1ml을 마개 있는 실험관에 넣고 혼합하여 물중탕기에서 5분간 혼합하였다. 이같은 DNS시약 3ml에 시료 1ml을 마개 있는 실험관에 넣고 혼합하여 물중탕기에서 5분간 가열하였다. 끓인 후의 원액을 5배 희석하여 만든 최종 부피 20ml 용액을 실온으로 식힌 후에 550ml에서 흡광도를 구하였다. 단백질의 양은 Lowry-Folin방법을 이용하였으며, column 실험에서는 연속측정을 위하여 254nm에 고정된 흡광계를 이용하였다. 유색 물질의 양은 실험적으로 scanning하여 구한 330nm에서 측정하였다. 한편, 히아루론산의 정량은 체철화학 중앙연구소에서 생산한 입자 상태의 히아루론산을 표준 물로하여 Carbazole 방법으로 구하였다. 배지중의 히아루론산이 다른 성분에 의한 방해없이 정확한 정량이 가능하도록 기존의 Carbazole 방법을 수정하여 본 연구에서 독자적으로 개발한 전처리후 정량법을 사용하였다. 즉, 5ml 진한 황산을 마개 있는 실험관에 넣고 -20℃까지 냉각시켰다. 1ml 시료와 표준 용액을 각각 주의 깊게 떨어뜨려 혼합한 후 중탕기에서 15분간 가열한 후 실온으로 냉각시켜 530nm에서 흡광도를 측정하였다. 이같은 방법은 일반적인

Carazole 방법인데 여기에 다음과 같은 전처리 단계를 추가하였다. 즉, 시료 2ml에 3M NaCl 20μl를 첨가후 혼합한 다음 5% cetyl pyridium chloride 160μl를 넣고 혼합하여 1시간 방치시켰다. 6000rpm에서 10분간 원심분리하여 상등액을 제거한 침전물에 2M CaCl₂ 1ml를 넣고 완전히 용해시켰다. 차가운 순수 에탄올 3ml를 넣고 혼합하여 30분간 방치한 후 6000rpm에서 5분간 원심분리하여 상등액을 제거한 침전물에 포화 벤조산 용액 2ml를 녹였다. 1ml를 취하여 전술한 Carbazole 방법에 따라 히아루론산을 정량하였다.

결과 및 고찰

활성탄 종류별 Batch 실험

사용한 여러 가지의 활성탄에 대한 히아루론산의 회수율과 잔류색깔은 Tabel 2와 같으며 한편 잔류 색깔의 측정을 위한 최적 흡광도의 파장은 Fig. 2에 나타난 바와 같이 330nm이었다.

Table 2. Percentage of Hyaluronic Acid Recovery and Residual Color.

Sample	Percentage	
	Hyaluronic Acid Recovery	Residual Color
Lignite	100	47
Pellet Carbon		
.4 × 8mesh	100	59
.4 × 12mesh	100	84
.12 × 30mesh	100	82
Powder Carbon	19	13
Carbon Black	87	60
NORITROX08	96	30

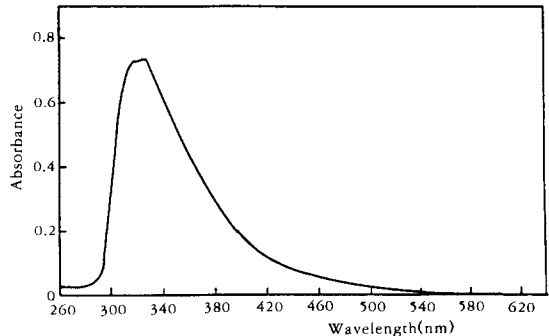


Fig. 2. Scanning of culture broth for optimal absorbance.

Table 2에 나타난 바와 같이, 활성탄의 사용으로 인한 히아루론산의 손실은 분말 활성탄의 경우를 제외하고는 전반적으로 무시할 수 있었다. 색깔의 제거 능력은 분말 활성탄이 가장 우수하였다. 이같은 실험결과와 분말 활성탄이 다른 시료에 비하여 일정 무게가 차지하는 흡착 표면적이 상대적으로 큰 때문으로 추정된다. 또한 시료에는 히아루론산의 분자량이 수십만에서 수백만에 이르러 단일 분자의 길이가 대략 수 μm 에 해당하므로 히아루론산이 활성탄의 pore에 스며들어 흡착되기엔 너무나 큰 고분자인 때문으로 해석된다. 그러나 분말 활성탄의 경우에 히아루론산의 회수율이 19%에 불과한 까닭은 수용성인 히아루론산의 특성을 감안할 때 흡착에 의한 손실이기 보다는 분말과 분말 격자 사이에 히아루론산을 함유한 용액이 entrapped되기 때문으로 여겨진다. 따라서 사용한 활성탄 그 자체를 배양액으로부터 쉽게 분리할 수 있으면서 히아루론산의 손실을 최소로 하고 배양액의 색깔을 효율적으로 제거하려면 NORIT ROX 08이 최적임을 알 수 있었다.

NORIT 활성탄 Batch 실험

활성탄 1g에 히아루론산, 단백질, 색깔을 함유한 열처리 후의 배양액을 24시간 동안 batch 조건으로 실험한 결과는 Fig. 3과 같다. 단백질 및 색깔은 7시간이 지나면 이미 포화됨을 알 수 있다. 따라서 히아루론산을 함유한 배양액은 활성탄 1g을 기준으로 볼 때 batch 조건에서 7시간 이내로 사용하여 단백질이나 색깔 물질을 제거함이 타당하다. 활성탄 양의 증가에 따른 히아루론산의 회수율, 단백질 및 색깔의 제거율에 대한 변화도는 Fig. 4와 같다. 히아루론산은 전반적으로 손실되지 않고 거의 회수되었다. 또한, 단백질과 색깔은 활성탄의 사용량의 증가할수록 제거율이 비선형적으로 비례하여 증가하였다. 따라서 활성탄과의 상관관계를 다음과 같은 Langmuir의 흡착식(1)을 이용하여 Lineweaver-Burk 방법으로 단백질 및 색깔에 대하여 도시하면 각각 Fig. 5 및 6과 같으며 이같은 결과를 이용하여 구한 각 변수들을 요약하면 Table 3과 같다.

$$Q = \frac{Q_{\max}C}{K_m + C} \tag{1}$$

이때 Q = 사용한 활성탄 1g중에 흡착된 기질의 양 (mg)

Q_{\max} = 활성탄 1g당 최대로 흡착될 수 있는 기질의 양(mg)

C = 흡착이 평형상태에 도달했을 때 용액내의 기질의 양(mg)
 K_m = affinity 상수(mg)

Clearance란 최대로 어떤 물질을 주어진 조건에서 제거할 수 있는 능력을 말하는데, 색깔의 수치가 단백질의 값(1.4)보다 다소 크다(1.8). 따라서 색깔의 물질은 22%(0.4/1.8)의 열처리로 카라멜화된 잔

Table 3. Adsorption Parameters of Protein and Color for 1 gram of Activated Carbon Used.

Parameter	Protein	Color
Q_{\max} (mg)	18	500
K_m (mg)	24	892
Correlation Coefficient(%)	97	99
*Clearance	1.4	1.8

*Clearance = K_m/Q_{\max}

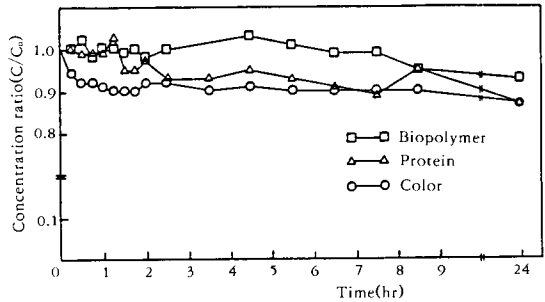


Fig. 3. Concentration ratio as a function of time.

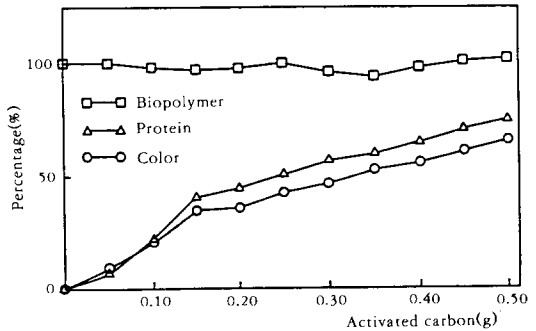


Fig. 4. Removal (protein, color) and recovery (biopolymer) vs. amount of activated carbon used.

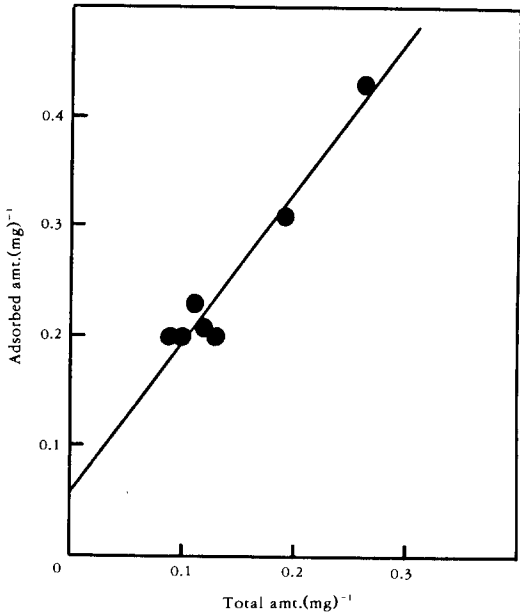


Fig. 5. Lineweaver-Burk plot for protein.

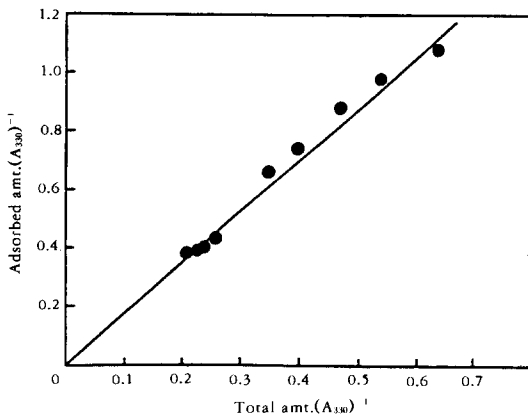


Fig. 6. Lineweaver-Burk plot for colored materials.

류 포도당 등과 78% (1.4/1.8)의 단백질로 구성되었음을 알 수 있다. Fig. 4에 나타난 사용한 활성탄에 대한 단백질 및 색깔의 상관관계를, 사용한 활성탄의 양이 일정한 조건에서 상관 지으면 Fig. 7과 같으며 그 상호 관계식은

$$\text{Color}(A_{330}) = 0.353 \text{ Protein}(\text{mg/ml}) + 0.1 \quad (2)$$

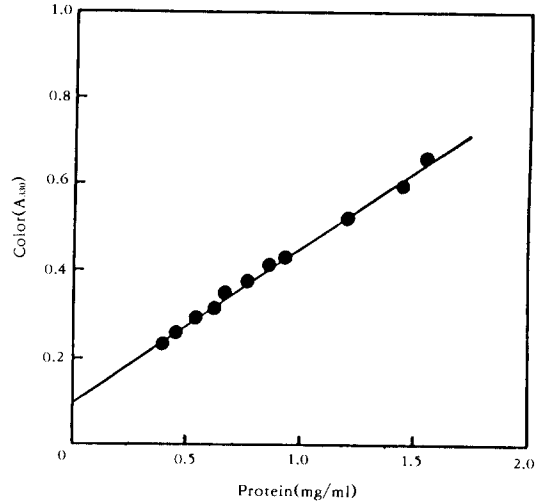


Fig. 7. Correlation between colored material and protein.

이때 상관 계수는 99.7%이다. 따라서 Fig. 7의 결과를 살펴볼 때, 히아루론산을 함유한 배양액의 정제 공정에서 색깔의 농도를 연속적으로 측정하려면 단백질의 농도 측정에 보편적으로 쓰이는 A_{254} 나 A_{280} 조건에 있는 UV monitor를 연속 공정에서 설치함으로써 가능함을 알 수 있다.

Column실험

Fig. 1의 ④번 Tank 직전에 A_{254} 의 UV monitor를 설치하여 단백질 및 색깔의 농도를 시간 변화에 따라 관찰한 결과는 Fig. 8과 같다. 이는 Fig. 4와 같은 batch 실험결과와 잘 일치하였다. 한편 유속을 65ml/min 및 7ml/min로 각각 변화시키면서 실험 방법에서 서술한 요령에 따라 Fig. 1의 ①, ②, ③, ④위치의 Column을 통과할 때의 색깔 제거율을 실험한 결과는 Fig. 9과 같다. 각 유속에서 히아루론산 회수율 및 색깔 제거율은 Table 4에 요약한 바와 같다. 따라서 Column을 이용하여 색깔을 연속적으로 제거하면 가능한 낮은 유속을 유지함이 바람직하였다.

사용한 활성탄을 재사용하기 위하여 0.1N NaOH 및 끓는 물로 처리하였을 때 단백질의 탈착 정도를 실험한 결과는 Fig. 10과 같다. Fig. 11, 12, 13에는 사용전, 후 및 재생한 활성탄의 흡착 정도를 Scanning Electron Microscope (ISI WB-6) 로 관찰한 결과이다. Fig. 11에 나타난 활성탄의 많은 기공들이 Fig. 12와 같이 사용 후에는 상당히 좁혀져 있으며

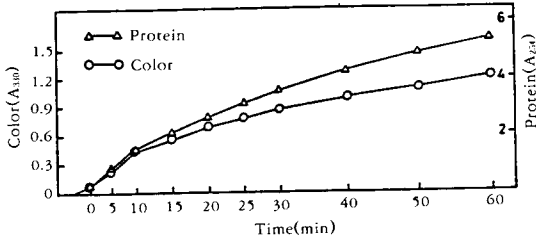


Fig. 8. Color and protein as a function of time.

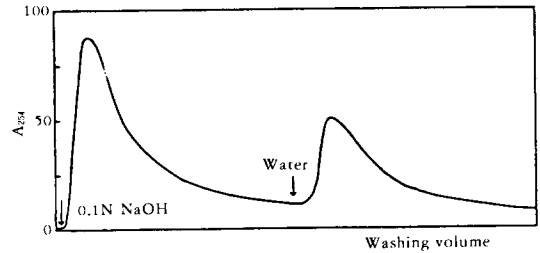


Fig. 10. Regeneration of Activated Carbon by 0.1N NaOH and Water.

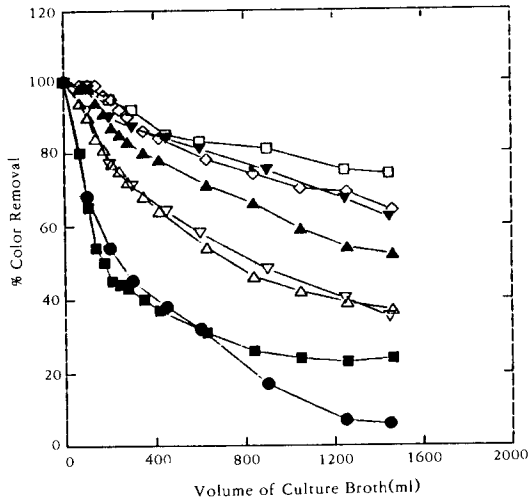


Fig. 9. Percentage of Color Removal for Activated Carbon Used at Different Flow Rates.

Flow Rate : 7ml/min Flow Rate : 5ml/min
 ◇ 40g A.C. □ 40g A.C.
 ▲ 30g A.C. ▼ 30g A.C.
 △ 20g A.C. ▽ 20g A.C.
 ■ 10g A.C. ● 10g A.C.

Table 4. Percentage of Hyaluronic Acid Recovery and Color Residual at Different Flow Rates.

Flow Rate (ml/min)	Percentage	
	Hyaluronic Acid Recovery*	Color Removal**
5	98.2	81.1
7	95.6	72.5

$$* \text{Hyaluronic Acid Recovery}(\%) = \frac{(A_{530})_{out}}{(A_{530})_{in}} \times 100$$

$$** \text{Color Removal} = \frac{(A_{330})_{in} - (A_{330})_{out}}{(A_{330})_{in}} \times 100$$

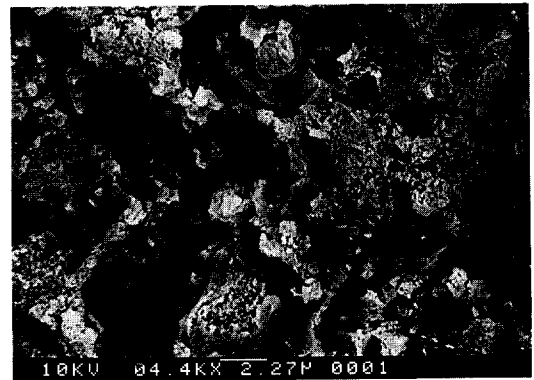


Fig. 11. Fresh Activated Carbon.

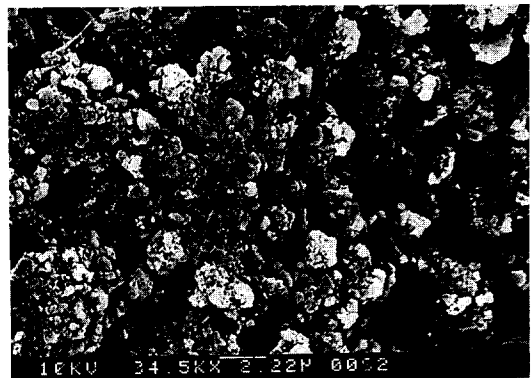


Fig. 12. Used Activated Carbon.

Fig. 10과 같은 재생 방법으로는 충분한 재생이 이뤄지지 않음을 Fig. 12와 13을 비교할 때 큰 차이점이 없음을 통하여 알 수 있다.

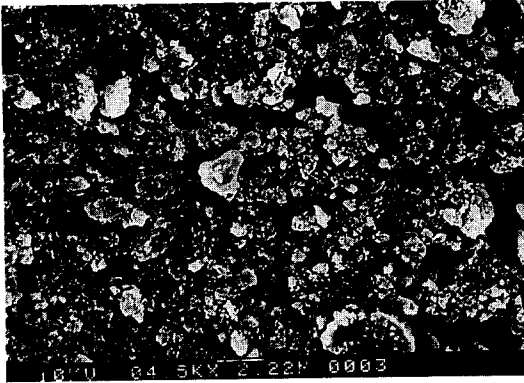


Fig. 13. Regenerated Activated Carbon.

요 약

본 연구에서는 활성탄을 사용하여 히아루론산을 함유한 배지 중에 포함된 유색물질을 연속적으로 제거할 수 있는 방법을 관찰하였다. 6종류의 국산 활성탄과 수입한 NORIT 회사의 ROX 08 시료를 사용하여 실험한 결과, 히아루론산의 손실을 최소로 하고(4%), 유색물질을 가능한 많이 제거하는(70%) 면에서 NORIT ROX 08이 우수하였다. 이같은 활성탄 1g에 대한 단백질 및 유색물질의 Langmuir 흡착식은 각각 $18C/24+C$ 및 $500C/892+C$ 이었다. Clearance 수치를 비교할 때, 유색물질은 78%의 단백질과 잔류 포도당 등의 기타 물질 22%로 구성되었다. 한편, 유색물질과 단백질은 99.7%의 높은 상관계수를 갖는 유색 농도(A_{330}) = 0.353 단백질(mg/ml)/+0.1의 관계식을 나타내므로, 유색물질을 연속적으로 측정하기 위하여서는 일반적인 단백질 측정용 UV monitor를 연속 공정에 설치함으로써 가능하다.

감 사

본 연구의 수행을 위하여 실험 시설의 일부를 제공한 (주)제철화학 중앙연구소와 한국과학기술연구원의 연구비 일부 지원(91-H-117)에 각각 감사드린다.

참고문헌

1. P. Gotz, M. Reuss(1987), 4th European Congress on Biotechnology, 223, Amsterdam, Netherlands.
2. G. McKay(1988), *Chemical Engineering Journal*, **39**, 87-96.
3. NORIT(1988), Technical Bulletin 00-07-78-41, Activated Carbon, Amersfoort, Netherlands.
4. NORIT(1988), Data Sheet 8-20-2684, Activated Carbon, Amersfoort, Netherlands.
5. 한국화학공학회(1990), 화학공업과 기술, **8**(5), 559.
6. 성준용(1989), 활성탄 혼합법, personal communication.
7. 김태진(1990), 생물화공, 한국화학공학회, **4**(1), 56-63.
8. 김태진, 현상원, 강엽(1990), 한국특허, 90-5774.
9. 김태진(1992), 수원대학교 논문집, 10, 인쇄중.
10. S. Yamamoto, M. Nomura, Y. Sano(1987), *AIChE Journal*, **33**(1), 1426-1434.
11. 김동윤, 박말식(1987), 화학공학, **25**(2), 183-192.