

효모의 연속 포말 분리

†서근학 · *심현관 · **윤종원

부산수산대학교 공과대학 화학공학과, *부산수산대학교 자연과학대학 화학과
**대구대학교 공과대학 생물공학과

Continuous Foam Separation of Yeast Cells

Kuen Hack Suh[†], Hyun Kwan Shim*, and Jong Won Yun**

Department of Chemical Engineering, National Fisheries University of Pusan 608-737, Korea

*Department of Chemistry, National Fisheries University of Pusan 608-737, Korea

**Department of Biotechnology, Taegu University, 713-714, Korea

ABSTRACT

Cell separation by means of continuous foam separation of *Saccharomyces formosensis* without additive was investigated. The yeast separation ratio was improved at low feed rates, high nitrogen rates, optimum pH and temperature for ethanol production, dilution of cultivation medium and addition of 0.5g/l CaCl₂. Percentage of yeast removal and yeast separation ratio were more than 85 when continuous foam separation was operated in optimum condition.

서 론

배지에서 미생물을 분리 및 농축하여 재사용하는 방법으로 배지와 미생물의 밀도차를 이용하여 분리하는 원심분리법이 널리 사용되어지고 있으나, 원심분리법은 별도의 분리 및 회수장치 설비와 운전압력 증가 등으로 인하여 많은 에너지를 필요로 하여 공업화의 단점으로 대두한다. 미생물을 분리 및 농축하여 재사용하기 위하여 포말 분리법(Foam Separation)이 활발하게 연구(1-4) 되어지고 있다. 포말 분리법은 용액 내에 존재하는 미량 성분(무기물, 유기물 및 단백질)을 제거하기 위한 효과적인 방법으로 주로 계면활성제를 첨가한 다음 하부에 공기를 공급하여 기-액 계면에서 흡착되는 미량 성분을 제거한다(5-7). 계면활성제에 의하여 미생물을 분리

및 회수할 경우 미생물의 활성을 감소시킬 수 있으므로, 미생물을 재사용할 경우 계면활성제를 이용하지 않아야 한다. 포말 분리법(Foam Separation)은 기체가 미생물이 포함된 배지를 통과할 경우 기-액 계면에 소수성 표면을 가진 미생물이 많이 흡착되는 현상을 이용하는 것으로, 계면 활성적인 미생물은 액본체보다 기-액 계면에서 높은 농도를 나타낸다. 포말이 분리관을 나올 경우 액체 동반량은 매우 적어 배출되는 포말액에 존재하는 미생물의 농도는 액본체의 미생물 농도에 비하여 매우 높다(8-9).

본 연구의 목적은 연속식 포말 분리관에 효모 용액을 일정하게 공급하며 계면활성제를 첨가하지 않고 분리 실험을 수행하며 배지 공급량, 기체 공급량, 온도와 pH, 배지의 회석비 및 CaCl₂ 첨가 등의 영향에 따른 분리 특성과 효모용액 중의 효모 분리능 및 운전 안정성 등을 관찰하여 배지에서 효모를 효

† Corresponding Author

과적으로 분리하기 위한 최적 조건을 구하려 한다.

재료 및 방법

포말분리관

연속포말분리관은 내경 3cm, 높이 25cm의 폴리 아크릴관에 같은 재질의 길이 30cm인 관을 U자형 태로 휘어서 접합하여 제작하였는데, 포말분리관내 액본체의 부피는 180ml 이었다. 포말분리관 하부에 glass filter(pore size:G3)를 접합시켜 기포가 효과적으로 발생될 수 있게 한다.

사용배지

균 배양 배지는 Cysewski(9) 등이 사용한 조건과 동일하게 제조하여 사용하였다. 포도당과 영양분은 별도로 1N-H₂SO₄을 이용하여 pH 5.0 되게 조절한 후 121℃에서 20분간 멸균하여 냉각 후 혼합하였다.

사용균주

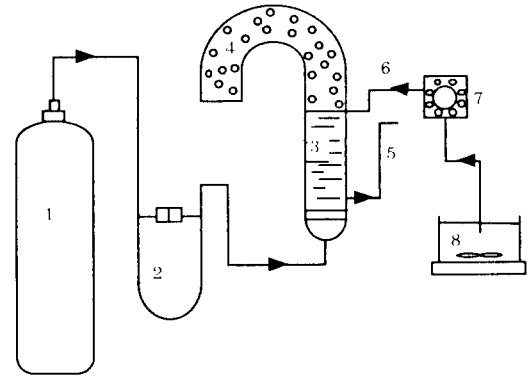
본 연구에 사용한 균주는 에탄올 발효시 생성물과 함께 유출되는 효모를 효과적으로 분리하기 위한 분리 특성을 연구하기 위하여 에탄올 발효능이 우수한 *Saccharomyces formosensis*을 일산실업(부산 문현동 소재)으로부터 사면배지 형태로 분양 받아 이용하였다. 10%(w/v) 포도당 배지 150ml를 취한 500ml의 삼각 플라스크에 접종하여 진탕배양기(150 strokes/min.)에 넣고 32℃에서 40시간 배양하여 실험에 이용하였다.

분석방법

효모농도는 분광광도계를 이용하여 시료를 적절한 배율로 희석하여 660nm에서 O.D.값과 건조된 효모량 간의 보정선을 이용하여 농도를 구하였다(10).

실험방법

연속식 포말 분리 실험을 위한 장치는 Fig. 1과 같이 배치하였다. 질소 실린더의 질소 기체는 manometer를 사용하여 기체량을 조절하여 연속식 포말 분리관에 공급하고, 배지는 균의 응집을 방지하기 위해 교반을 하면서 peristaltic pump를 이용하여 일정량을 연속식 포말 분리관 하부에서 높이 25cm위에서 공급하였다. 기체가 효모 용액을 통과할 때 발생된 포말은 포말배출구에서 제거하였다. 포말 시료는 10분 간격으로 모았으며 동시에 액체 시료는 액본체 배출구에서 1ml 채취하여 효모 농도



- | | |
|----------------------|-----------------|
| 1. Nitrogen gas bomb | 2. Manometer |
| 3. Foam Separator | 4. Foam outlet |
| 5. Bulk outlet | 6. Medium inlet |
| 7. Peristaltic pump | 8. Medium |

Fig. 1. Schematic Diagram of Experimental Apparatus.

를 분석하였다.

결과 및 고찰

연속식 포말 분리관에서 효모분리의 실험을 수행하여 배지 공급량, 질소 기체 공급량, 효모 농도, pH, 온도, 배지의 희석비 및 첨가물 CaCl₂ 변화에 따른 분리의 특성을 관찰하였다. 포말 형성 특성의 재현성을 증대시키기 위하여 효모 용액의 pH와 온도 영향 실험을 제외하고 pH는 5.0, 용액 온도는 32℃로 일정하게 유지하였다. 운전시작 30~40분 경과 후 정상상태에 도달하여 기포층 및 액본체의 효모 농도가 거의 일정하게 유지되었다. 배지 공급량이 1000ml/hr일때 시간 변화에 따른 기포층 및 액본체의 효모 농도를 Fig. 2에 나타내었다. 연속분리시 기포층 및 액본체의 효모 농도는 30~40분 경과시 거의 일정하게 유지되어 정상상태에 도달하였다고 가정하였다.

배지 공급량의 영향

연속식 포말 분리관에 공급하는 배지 공급량 변화에 따른 효모 분리 특성 영향을 연구하기 위하여 공급되는 배지 공급량을 150ml/hr, 200ml/hr, 300ml/hr, 400ml/hr, 800ml/hr, 및 1000ml/hr로 되게 하여 10분 간격으로 포말과 액본체의 효모 농도를 구하여 정상상태의 값을 평균내어 배지 공급량 변화에

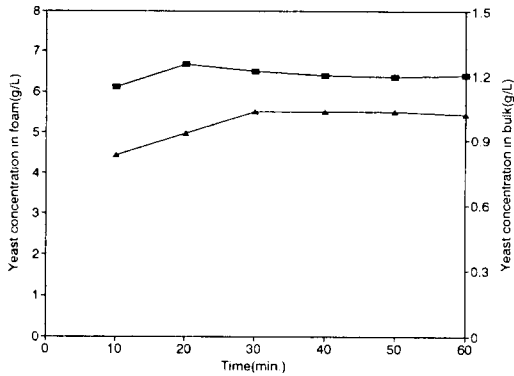


Fig. 2. Effect of Time on Yeast Concentration in Foam Liquid(—■—) and Residue(—▲—).

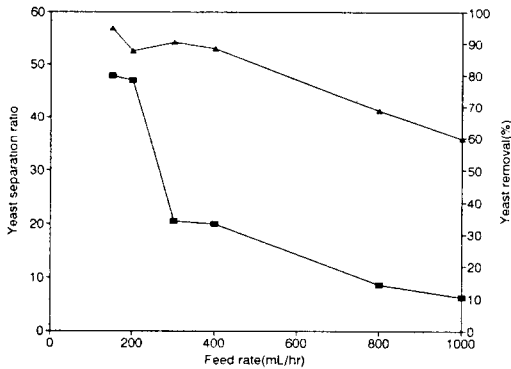


Fig. 3. Effect of Feed Rate on Yeast Separation Ratio(—■—) and Percentage of Yeast Removal(—▲—).

다른 효모 분리비 및 효모 제거율을 Fig. 3에 도시하였다. 한편, 도시한 효모 분리비와 효모 제거율(%)은 다음과 같이 계산하였다.

$$\text{효모 분리비} = \frac{\text{포말 효모 농도}}{\text{액본체 효모 농도}}$$

$$\text{효모 제거율}(\%) = \left[1 - \frac{\text{액본체 효모 농도}}{\text{공급액 효모 농도}} \right] \times 100$$

배지 공급량이 증가할수록 효모 분리비는 감소하는 경향을 나타낸다. 배지 공급량이 150~200ml/hr 일 때는 효모 분리비가 45~50으로 높은 값을 나타낸다. 효모 제거율은 배지 공급량이 150~400ml/hr 사이에서는 85% 이상 제거되어 매우 효과적인 효모 분리법이었다. 따라서 이후 실험에서는 배지 공급량을 200ml/hr로 일정하게 유지하여 분리 실험을

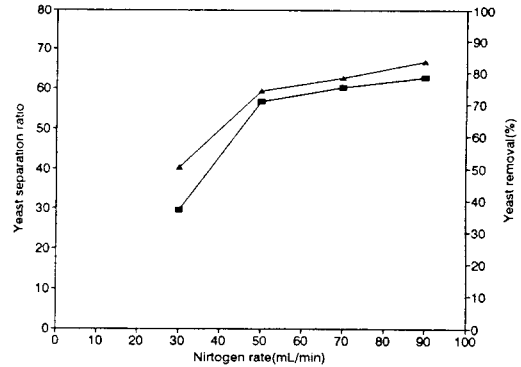


Fig. 4. Effect of N₂ Gas Rate on Yeast Separation Ratio(—■—) and Percentage of Yeast Removal(—▲—).

수행하였다.

질소 공급량 영향

연속식 포말 분리관에 공급하는 질소 공급량 변화에 따른 효모 분리 특성 영향을 연구하기 위하여 배지 공급량을 200ml/hr로 일정하게 유지하고 질소 공급량을 30ml/min, 50ml/min, 70ml/min 및 90ml/min로 변화시키는데 다른 효모 분리비 및 효모 제거율을 Fig. 4에 도시하였다. 공급되는 질소량이 증대할수록 증가된 기-액계면 면적에 의하여 흡착되는 효모량이 증대하여 효모 분리비 및 효모 제거율은 증가하였다. 질소 공급량이 30ml/min에서 50ml/min으로 증가될때 효모 분리비 및 효모 제거율은 급격히 증가하지만 질소 공급량이 50ml/min 이상의 범위에서 효모 분리비 및 효모 제거율이 크게 증가하지 않았다. 따라서 이후 실험에서는 질소 공급량을 50ml/min으로 일정하게 유지하여 분리 실험을 수행하였다.

효모 농도의 영향

연속식 포말 분리관에 충전한 효모 용액 농도를 1.18g/l, 2.52g/l, 3.98g/l로 변화시켰을 때의 효모 분리 특성을 Fig. 5에 도시하였다. 효모 농도가 증가할수록 효모 분리비는 감소하는 경향을 나타내는 반면에 효모 제거율은 거의 90% 이상의 제거율을 나타내었다. 효모농도가 증가할수록 효모 제거율도 증가하지만 효모 분리비의 급격한 감소에 비하면 효모 제거율의 변화는 거의 일정하다고 볼 수 있다. 따라서 효모 농도가 1.18g/l 일 때 최적의 조건이라

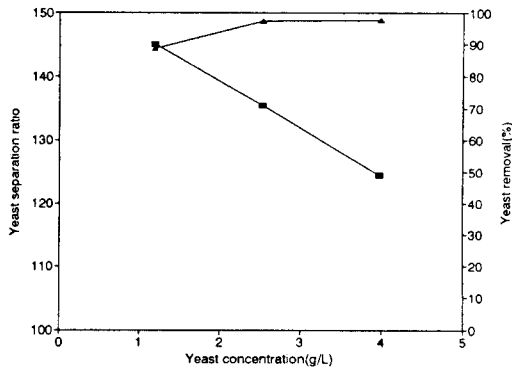


Fig. 5. Effect of Yeast Concentration on Yeast Separation Ratio(—■—) and Percentage of Yeast Removal(—▲—).

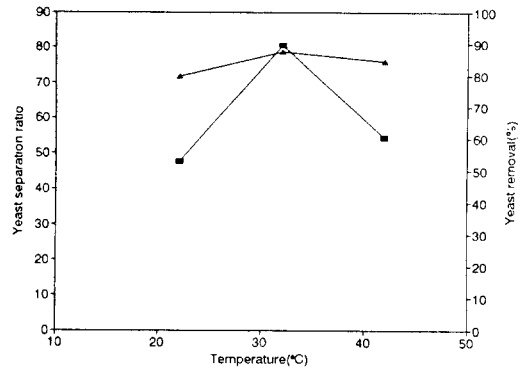


Fig. 7. Effect of Temperature on Yeast Separation Ratio(—■—) and Percentage of Yeast Removal(—▲—).

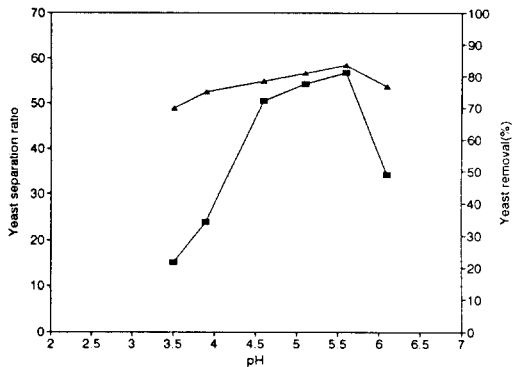


Fig. 6. Effect of pH on Yeast Separation Ratio (—■—) and Percentage of Yeast Removal (—▲—).

할 수 있다. 이때의 효모 분리비는 145이고 효모 제거율은 88.5%이었다. 위와 같은 경향을 나타내는 것은 포말의 기-액 계면에 최대로 흡착된 효모 표면에 또 다른 효모가 흡착되는 것을 방해하기 때문에 포말의 표면적의 최대 면적 만큼 흡착되어 효모 농도가 증가할수록 효모 분리비는 감소하고 효모 제거율은 거의 일정하게 유지되는 경향을 나타낸다고 사료된다.

pH 및 온도의 영향

연속식 포말 분리관에 충전하는 효모 용액의 pH 변화에 따른 효모 분리 특성을 연구하기 위하여 1N-NaOH와 1N-HCl 용액으로 효모 용액의 pH를 3.5, 3.9, 4.6, 5.1, 5.6 및 6.1로 되게 하여 포말 분리

실험을 수행하였다. 효모 용액의 pH 변화에 따른 효모 분리비와 효모 제거율을 Fig. 6에 도시하였다. 효모 용액의 pH가 증가할수록 효모 분리비는 증가하다가 pH 6.1 될때 감소하는 경향을 나타낸다. 효모 용액의 pH가 3.9에서 4.6으로 증가할때 효모 분리비가 급격히 증가하였다. 반면에 효모 용액의 pH가 4.6~5.6 범위에서는 pH가 증가하여도 효모 분리비는 크게 증가하지 않는다. 효모 용액의 pH가 증가할수록 효모 제거율도 증가하지만 효모 분리비에 비해 큰 폭으로 증가하는 구간이 없고 완만히 증가한다. 효모 용액의 pH가 5.6일때 효모 분리비 및 효모 제거율이 가장 높았으며 이때의 효모 분리비는 56.9, 효모 제거율은 88.6%이었다. 효모 용액의 pH 4.6~pH 5.6일때 효모 분리비가 최대(78.4~83.6)로서 매우 높은 값을 나타내었으며, 상기 pH범위는 효모 *Saccharomyces formosensis*의 최적 발효조건 pH인 5.0 부근이었다.

연속식 포말 분리관에 효모 용액을 충전하여 효모 용액의 온도 변화에 따른 효모 분리 특성 영향을 연구하기 위하여 효모 용액의 온도를 22℃, 32℃, 42℃로 변화시키는데 따른 효모 분리비와 효모 제거율을 Fig. 7에 도시하였다. 온도가 22℃에서 32℃로 상승할때 효모 분리비가 급격히 증가하다가 42℃로 더 상승하면 효모 분리비는 급격히 감소한다. 반면에 효모 제거율도 효모 분리비와 같은 경향을 나타내지만 증가폭 및 감소폭이 효모 분리비에 비해서 미비하여 효모 제거율은 거의 일정하다고 볼 수 있다. 온도가 상승할수록 포말의 표면적이 증가하여 효모가 흡착할 수 있는 면적이 증가한다. 그러므로

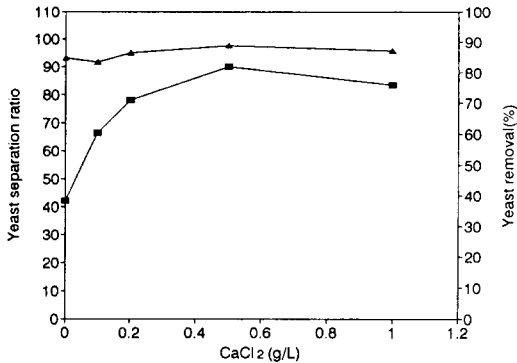


Fig. 8. Effect of CaCl_2 on Yeast Separation Ratio (—■—) and Percentage of Yeast Removal (—▲—).

온도가 상승할수록 효모 분리비 및 효모 제거율이 증가할 것으로 예상되나 본 실험에서 32°C에서 42°C로 상승될 때 효모분리비가 급격히 감소하여 효모의 흡착 특성은 기-액계면 면적만으로 설명하기는 곤란하였다. 본 실험에서 최적 온도는 32°C라 사료되며 이때의 효모 분리비는 80.5, 효모제거율은 87.3%이다. 효모의 포말 분리를 위한 최적 온도 및 pH는 효모의 최적 발효 및 성장을 위한 온도 및 pH와 밀접한 관계가 있는 것으로 사료된다.

첨가물 CaCl_2 영향

효모의 응집성을 증대하는 첨가물로 CaCl_2 가 가장 많이 알려져 있다. 따라서 효모의 응집성이 연속식 포말 분리에 미치는 영향을 연구하기 위하여 효모 용액에 CaCl_2 를 첨가하여 농도가 0g/l, 0.1g/l, 0.2g/l, 0.5g/l 및 1.0g/l 되게 하여 포말 분리 실험을 수행하였으며 그 결과를 Fig. 8에 도시하였다. 효모 용액 중의 CaCl_2 농도가 0.5g/l로 증가할수록 효모 분리비는 증가하다가 효모 용액 중의 CaCl_2 농도가 1g/l 일때 감소하는 경향을 나타낸다. 효모 용액 중의 CaCl_2 농도가 증가해도 효모 제거율은 80~90%사이로 거의 일정하게 유지되었다. 효모 용액 중의 CaCl_2 농도가 0.5g/l 일 때 최대의 효모 분리비와 효모 제거율을 나타내며 이때의 효모 분리비는 90.0, 효모 제거율은 88.8%이었다.

배지 용액의 희석비에 따른 영향

연속식 포말 분리관에 공급하는 효모 용액을 별도로 pH와 CaCl_2 농도는 조정하지 않고 단지 배양한 원액과 증류수로 2 및 3배로 희석하여 분리실험을

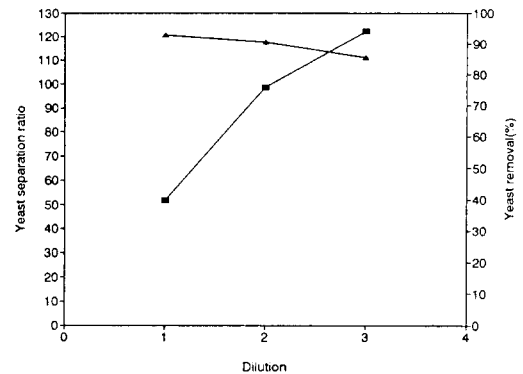


Fig. 9. Effect of Dilution on Yeast Separation Ratio (—■—) and Percentage of Yeast Removal (—▲—).

수행하여 효모 분리비와 효모 제거율을 Fig. 9에 도시하였다. 희석비와 효모 농도와의 관계는 원액 공급액일때 효모 농도는 5.720g/l, 2배 희석시 효모 농도는 3.011g/l, 3배 희석시 효모 농도는 2.073g/l였다. 희석비가 증가할수록 효모분리비는 급격히 증가하였다. 반면에 희석비가 증가하여도 효모 제거율은 80~90%로 일정하게 유지되었다. 희석비가 3배일 때를 효모 분리비 및 효모 제거율이 최대였다. 이때의 효모 분리비는 122.2, 효모 제거율은 92.8%를 나타내었다.

요 약

연속식 포말 분리관에 효모 용액을 일정하게 공급하여 분리 실험을 수행하며 배지 공급량, 질소 공급량, 온도와 pH, 배지의 희석비 및 CaCl_2 첨가 등의 영향에 따른 연속 포말 분리관의 분리 및 특성 등을 연구하였다. 배지 공급량이 200ml/hr인 경우 액본체 효모의 90~95%가 제거되어 매우 효과적인 분리법이었다. 질소 공급량이 50ml/min일때 효모 제거율은 90~95%의 높은 수치를 나타내었다. 효모 용액 중의 효모 농도가 1.18g/l 일 때 액본체 효모가 90% 가까이 제거되었고 효모 분리비도 145로 매우 효과적인 분리의 특성을 나타내었다. 효모 용액의 pH가 4.6~5.6일때 최대의 효모 분리비 78.4~83.6로 나타났고, 효모 용액의 온도가 32°C일때 효모 분리비는 80.5, 효모 제거율은 87.3의 값을 나타내었고, 효모 용액 중의 CaCl_2 의 농도가 0.5g/l 일 때 효모 분리비는 90.04, 효모 제거율은 83.3%

로 높은 수치를 나타내었다. 배지의 회석비가 3배일 때 효모 분리비가 122.2로 높은 수치를 나타내었고 액본체 내의 효모도 92.8%가 제거되는 효과적인 분리 특성을 나타내어 포말분리법은 용액 중 효모를 분리하기 위한 매우 효과적인 방법이었다.

참고문헌

1. S. Parthasarathy and R. Kumar(1988), *Biotechnol. Bioeng.*, **32**, 174.
2. H. Viehweg and K. Schügerl(1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 96.
3. K. H. Bahr and K. Schügerl(1992), *Chem. Eng. Sci.*, **47**, 11.
4. K. H. Suh and K. D. Nam(1993), *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.*, **8**, 282.
5. L. Brown, G. Narshiman and P. C. Wankat (1990), *Biotechnol. Bioeng.*, **36**, 947.
6. R. Lemlich(1972), "Adsorptive Bubble Separation Techniques", Academic Press New York.
7. A. N. Clarke and D. J. Wilson(1972), "Foam Flotation", Marcel Dekker, INC, New York.
8. U. Ustanl and K. Esser(1983), *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, **17**, 199.
9. F. W. Wheaton(1977), "Aquacultural Engineering", John Wiley and Sons, Inc.
10. G. R. Cysewski and C. R. Wilke(1977), *Biotechnol. Bioeng.*, **19**, 1125.
11. S. Furusaki and M. Seiki(1983), *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 2921.