

Alcaligenes eutrophus 고농도 배양액으로부터 알루미늄(Al)계 응집제를 이용한 세포분리

¹조 경 숙 · ²류 희 옥 · ²정 현 우 · ³곽 종 운 · †장 용 근

¹이화여자대학교 환경공학과, ²숭실대학교 환경·화학공학과, ³경기화학공업(주) 수처리연구소,
한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터
(접수 : 1997. 12. 30., 게재승인 : 1998. 3. 23.)

Cell separation from high density culture broths of *Alcaligenes eutrophus* by using Al-based coagulants

¹Kyung-Suk Cho, ²Hee Wook Ryu, ²Hyon Wu Chung, ³Jong Woon Kwak, and †Yong Keun Chang

¹Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea,

²Department of Chemical and Environmental Engineering, Soong Sil University, Seoul 156-743, Korea

³Water Treatment Dept. Kyunggi Chemicals Ltd., Buchon 422-080, Korea

Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,

Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

(Received : 1997. 12. 30., Accepted : 1998. 3. 23.)

Cell recovery from high cell density broths of *Alcaligenes eutrophus* by pretreatment with aluminum-based coagulants such as aluminum sulfate, polyaluminum hydroxide chloride silicate (PACS), and polyaluminum hydroxide chloride (Hi-PAX) was carried out. Cells coagulated with coagulants could be successfully recovered above 95-99% by centrifugation or filtration. The optimum initial pH of fermentation broths for cell recovery was in the range of 10 to 12. Optimum coagulants dosage for cell recovery increased with increasing of cell concentrations (21-160 g/L). The optimum coagulant dosages to recover cells with more than 95% cell recovery by centrifugation for the cell concentrations ranged 21-160 g/L were as follows: aluminum sulfate, 416-1708 mg Al/L; PACS, 211-826 mg Al/L; Hi-PAX, 320-960 mg Al/L. At optimum conditions for the coagulation of cells, centrifugal forces for 95% of cell recovery were dependent on the cell concentration. The centrifugal forces at 82 g/L and 160 g/L of cell concentration were only 45 × g and 1600 × g, respectively.

Key Words : coagulation, cell recovery, centrifugation, filtration, *Alcaligenes eutrophus*.

서 론

최근 생물산업이 발달함에 따라 미생물에 의해 생산할 수 있는 고부가 가치의 물질을 대량으로 생산하여 상용화하기 위한 연구가 활발하게 진행되고 있다. 생화학물질, 항생제, 효소, 약 및 생분해성 플라스틱의 생산효율을 향상시키고 생산단가를 낮추기 위해 고농도 세포 배양 기술 및 재조합 DNA 기술 등이 개발되고 있다. 특히, 난분해성 석유화학 폐플라스틱에 대량 발생에 따른 환경오염 문제의 해결책의 하나로 미생물에 의해 생

산되는 생분해성 플라스틱의 생산기술은 눈부시게 발전하고 있다(1-4). 생분해성 플라스틱을 생산하는 대표적인 균주인 *Alcaligenes eutrophus*의 경우, 고농도세포 배양기술 개발로 배양액 1L당 최고 280 g 정도의 균체 생산이 가능하게 되었다(5). 그러나, 미생물에 의해 생산된 생물질을 배양액으로부터 저비용, 고효율로 회수·정제 할 수 있는 분리공정이 제대로 개발되지 않는다면, 이러한 생산기술들을 상용화 하기는 어려울 것이다.

배양액으로부터 생물질을 회수·정제하는 공정은 액상으로부터의 균체분리, 세포파괴와 debris 분리(세포질내 생산물인 경우에만 해당), 농축, 전처리와 일차분리, 고순도 정제 및 최종산물의 가공 등 일련의 공정들로 구성되어 있다. 이러한 회수·정제 단계에 있어서 특정 생물질을 회수한 후 그 물질의 유용성과 안정성이 유지될 수 있어야 하므로 생물질의 물리·화학적 성질은 회수·정제 공정 방법을 결정하는데 중요한 요소로 작용한다. 현재 널리 사용되고 있는 배양액으로부터 균체 회수방법은 원심력을 이용한 원심분리 방법과 입자의 입경에 기초한 여과방

† Corresponding author : Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea

Tel : 82-42-869-8812, Fax : 82-42-869-8800

e-mail : ychang@sorak.kaist.ac.kr

법이 가장 보편적으로 사용되고 있다(6-9).

원심분리 방법은 고농도의 균체와 고형성분을 함유하는 배양액 처리에 가장 유용한 기술로 사용되고 있다(8). 원심분리 방법은 일회 처리 가능 용량이 크고, scale-up이 용이하며 세척과 멸균이 용이하다는 장점을 가지고 있으며, 연속 배출(discharge)이 가능한 연속분리기를 이용하면 연속배양기에 직접 연결시켜 사용할 수 있어 그 활용범위가 넓다(8). 그러나, 초기 시설 투자비가 많이 들고 동력비가 많이 소요되는 고에너지 기술인 단점이 있다(8). 미생물 배양액을 여과방법에 의해 균체를 회수하는 경우에는 일반적으로 미생물 균체가 10 μm 이하이므로 filter-aid로 precoating한 filter를 사용해야 하고 막힘 현상에 의해 단위 면적당 flux가 낮기 때문에 회수에 많은 시간이 소요되는 단점이 있다(6).

미생물의 밀도는 물의 밀도와 거의 비슷하며, 균체의 크기는 작고 일정한 모양을 지니지 않는 경우가 많아서 균체부유액은 non-Newtonian 유체 특성을 갖으며, 균체 부유액의 침전속도가 매우 느리다(7). 따라서, 배양액으로부터 균체를 효율적으로 회수하기 위해서 균체의 입경 크기와 밀도를 증가시키고 유체의 밀도와 점도를 감소시키는 전처리 방법이 이용될 수 있다. 이러한 효과는 coagulation과 flocculation 전처리에 의해 이루어질 수 있는데, coagulation은 콜로이드입자의 부유상태가 불안정화되어 뭉침을 형성하는 현상이고, flocculation은 입자 자체 혹은 응집된 입자간의 충돌이 촉진되어 입자 크기가 커지게 되는 현상을 말한다(7).

콜로이드 부유액에서 입자간의 반발력은 대전된 입자의 표면에 기인하며, 인력은 van der Waals force에 기인한다(7). 입자의 표면전하는 입자 주위의 전기 경도력층을 만들어 서로 접근하지 않게 하므로 이 층의 두께에 전해질을 넣어 반발력을 감소시킴으로써 인력이 지배적인 힘이 되면 응집이 일어나게 된다. 일반적으로 미생물 균체는 음의 표면전하를 가지고 있으므로 양이온 응집제가 효과적이고, 다가의 양이온일수록 응집효율이 증가한다(10). 일단, 부유물의 응집이 시작되면 서로 충돌하여 침전이 가능한 크기로 자라 floc을 형성하게 되는데, flocculation rate는 입자의 농도가 높을수록, 유체의 점성도가 낮을수록 증가하는 경향이 있다. 부유물을 응집시켜 제거 처리하는 기술은 상수나 폐수처리 분야 및 슬러지 탈수공정 등 환경공학분야(11-17)에서 뿐만 아니라, 빵제조에 사용하는 효모 배양이나 single-cell protein 생산 공정에 도입되고 있다(18).

기존의 무기응집제는 크게 알루미늄(Al)계 응집제와 철(Fe)계 응집제로 구분할 수 있다. Fe계 응집제는 Al계 응집제에 비하여 단분자일 경우 상대적으로 분자량이 크기 때문에 응집효율이 좋은 장점이 있으나 처리 후 착색현상이 일어나는 문제점이 있다. 따라서, Fe계 응집제보다는 Al계 응집제의 적용범위가 훨씬 넓어 많이 사용되고 있다(13-15). 본 연구에서는 생분해성 플라스틱을 생산하는 *A. eutrophus*의 고농도 세포 배양액으로부터 균체를 효율적으로 회수하기 위해, 원심분리나 여과 방법의 전처리 방법으로 Al계 응집제에 의한 균체 응집 방법을 적용하였다. Al계 응집제 종류에 따른 응집효율을 서로 비교 검토하였으며, 균체 응집에 미치는 여러 가지 인자의 영향을 파악하여 최적 응집조건을 도출하고자 하였다. 또한, 원심분리 회수공정에 있어서 응집제를 사용한 전처리에 의한 에너지 저감 효과도 조사하였다.

재료 및 방법

*A. eutrophus*의 배양

Alcaligenes eutrophus (NCIMB 11599) 균주를 60L 발효기에서 유가식 배양을 하였다. 집종액을 배양하기 위한 배지 조성은 다음과 같았다: Glucose, 10g/L; KH_2PO_4 , 1.5 g/L; $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$, 9g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.2g/L; 미량 금속 용액, 1 mL. 미량 금속 용액은 5N HCl용액 1L에 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.25g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5g, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.1g, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2g을 녹여 조제하였다. 유가식 배양에 사용한 초기 배지의 조성은 glucose, 20g/L; KH_2PO_4 , 4.44 g/L; $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 4g/L; $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.2g/L; citric acid, 1.7g/L; 미량 금속 용액, 10 mL/L 이었다. 초기 배지의 부피는 18L로 하였고, 800 g/L의 glucose 용액을 주입하면서 연속 배양하였다. 배양액의 pH는 28% 암모니아수와 5N HCl를 이용하여 6.8로 조절하였다. 최종적으로 얻어진 배양액의 균체농도는 164 g/L이었다. 응집 실험에 필요한 균체 농도는 위의 배양액을 희석하거나 농축하여 조절하였다.

사용한 응집제

본 연구에서는 황산반토($\text{Al}_2(\text{SO}_4)_3$, Al_2O_3 : 8%)와 고분자화된 폴리염화수산화규산알루미늄(polyaluminium hydroxide chloride silicate ($\text{Al}_x\text{Si}_y(\text{OH})_z\text{Cl}_a$, Al_2O_3 17%; PACS) 및 폴리염화수산화알루미늄(polyaluminium hydroxide chloride($\text{Al}_x(\text{OH})_y\text{Cl}_z \cdot x\text{H}_2\text{O}$, Al_2O_3 17%; Hi-PAX)의 3종류 응집제를 사용하였다. 고분자화된 PACS와 Hi-PAX(silicate를 함유하지 않음)의 염기도는 45-50%범위이고, 밀도는 1.39이다. 위의 세가지 응집제 용액의 pH는 3.5 - 5이다.

응집제에 의한 균체 회수

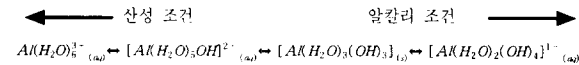
배양액에 응집제를 첨가하여 균체를 회수하는 실험은 100 mL의 비이커를 이용하여 수행하였다. 세포배양액 25mL를 넣은 비이커에 일정량의 응집제를 첨가하고 1분간 급속교반(500 rpm) 후 3분간 완속교반(100 rpm)하였다. 응집에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 균체농도를 41g/L로 조절한 세포배양액의 pH를 10N NaOH와 5N HCl을 사용하여 6-13의 범위로 조절하였다. 세포배양액의 균체농도는 20.5, 41, 82 및 164 g/L로 설정하고 각각의 균체농도에서 응집이 잘 일어나는 최적 응집제 농도를 결정하였다.

응집 처리한 세포배양액 10mL을 15mL 원심관에 담아 45, 1100 혹은 1600 $\times g$ 에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리 후 얻어진 상등액의 흡광도를 650nm에서 측정하였다. 또한, 응집 처리한 세포배양액을 pore 크기가 0.5, 0.1 및 0.05mm인 3개의 체에 연속적으로 여과시켰다. 각각의 체를 통과한 여과액의 흡광도를 650nm에서 측정하였다. 응집제에 의한 흡광도의 영향을 배제시키기 위하여 균체가 없는 배양액에 응집제를 첨가하여 측정된 흡광도를 상기의 실험을 수행하여 얻은 흡광도 값의 보정에 사용하였다. 균체의 회수율은 응집제로 처리하지 않은 세포배양액의 흡광도값을 기준으로 하여 응집처리하여 세포를 원심분리하여 얻은 상등액이나 여과액의 흡광도 차이로부터 계산하였다.

결과 및 고찰

균체 회수율에 미치는 배양액의 초기 pH의 영향

Al에 의한 콜로이드 입자의 응집은 흡착과 전하의 중화와 sweep floc에 의한 침전의 두 기작에 의해서 진행된다(19, 20). 철이나 알루미늄 염과 같은 금속염을 이들의 용해도보다 낮은 농도로 물에 첨가할 경우 금속염이 가수분해된다. 금속염의 가수분해 산물은 양전하를 띠며 음전하를 가진 콜로이드 입자에 흡착되어 콜로이드 표면의 전하를 중화시켜 콜로이드 입자를 응집시킨다. 한편, 금속염을 용해도 이상으로 과잉으로 첨가한 경우, 금속염 수산화물이 생성되어 침전물을 형성하게 되는데 이 침전물과 콜로이드입자가 함께 침전되는 sweep floc이 진행되게 된다. 금속염의 가수분해 산물이나 침전물의 전하는 pH에 의해서 조절되며 응집은 금속염의 등전점(electric point)에서 일어나게 된다(19, 20). 따라서, 응집제의 종류에 따라 응집이 효과적으로 일어나는 최적 pH가 존재하게 된다. Al(OH)₃은 산성 조건하에서 양전하를 띠고, 알칼리 조건에서 음전하를 띠는 양쪽 성질(amphiprotism)을 가지고 있다.



Al(OH)₃의 용해도는 특정 pH에서 최소가 되고 이 값을 벗어나면 증가하게 된다. 그러므로, 용해도가 가장 낮은 pH에서 가장 효과적인 응집 현상이 일어나기 때문에 최적 pH 조건을 확립해야만 한다(19, 20).

Al₂(SO₄)₃, PACS 및 Hi-PAX의 3종류의 응집제를 각각 pH 6-13 사이의 세포배양액(균체농도; 41 g/L)에 첨가하여 균체 회수율에 미치는 pH의 영향을 조사하였다. Figure 1은 응집처리한 세포를 45×g에서 원심분리하여 회수한 결과이다. 각각의 pH 범위에서 응집제를 첨가하지 않고 세포배양액만 45×g의 낮은 원심력에서 원심분리하면 균체를 배양액으로부터 회수하는 것은 거의 불가능하였다. 그러나, 응집제를 첨가하면 낮은 원심력에 의해서도 배양액으로부터 균체를 회수하는 것이 가능하였다. 배양액의 pH가 6인 경우, Al₂(SO₄)₃, PACS 및 Hi-PAX 응집제를 첨가했을 때 각각의 균체 회수율은 95, 90 및 82%로, Al₂(SO₄)₃ 응집제를 사용했을 때 가장 높은 균체 회수율을 얻을 수 있었다. 배양액의 pH가 7에서 11의 범위에서는 응집제의 종류에 관계없이 3가지 응집제에 의한 균체회수율은 95% 이상이었다. Hi-PAX 응집제의 경우, pH 6에서 11까지의 범위에서는 pH가 증가할수록 응집효율도 증가하는 경향을 보였으며, pH 10과 11에서는 100%에 가까운 균체회수율을 보였다. Al₂(SO₄)₃ 응집제는 pH 6부터 pH 12까지의 범위에서 95%이상의 균체회수율을 얻을 수 있었으며, 응집효율이 pH에 의해 크게 영향을 받지 않았다. 한편, PACS는 pH 6에서 13까지의 범위에서는 pH가 증가할수록 응집효율이 증가하여 균체회수율이 증가하였으며, pH 11-13의 범위에서는 배양액의 균체를 거의 100% 회수 가능하였다.

pH가 6-14인 배양액(균체농도; 41 g/L)에 3종류의 응집제를 첨가하여 균체를 응집시킨 후, pore 크기가 0.5, 0.1 및 0.05mm 인 체를 이용하여 응집 처리한 배양액을 여과했을 때 얻은 균체 회수율의 결과를 Figure 2에 도시하였다. Al₂(SO₄)₃ 응집제를

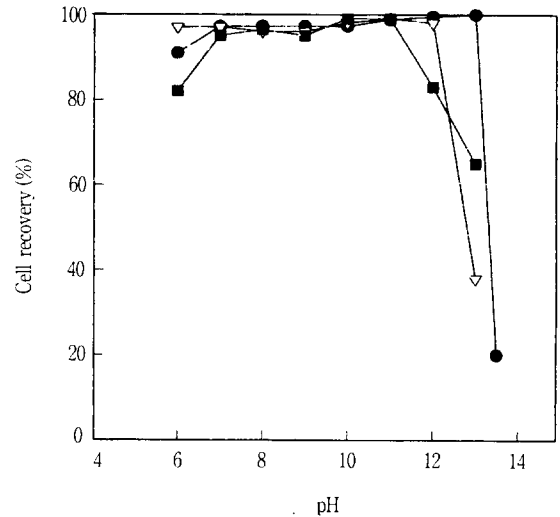


Figure 1. Effects of initial pH on cell recovery from the fermentation broths pretreated with three different Al-based coagulants by centrifugation (45×g). Symbols: ●, PACS; ▽, Al₂(SO₄)₃; ■, Hi-Pax.

첨가했을 경우, pH 9까지는 pH가 증가하여도 여과법에 의한 균체회수율은 크게 증가하지 않았으나, pH 9를 초과하면 균체 회수율이 급격하게 증가하였다가 pH 11 이후에는 다시 감소하였다. 배양액의 pH가 11과 12에서는 0.05 mm의 여과체를 이용할 경우 95%이상의 균체회수율을 얻을 수 있었다. 특히, 배양액의 pH가 11인 조건에서는 0.5mm 체를 이용하여도 80% 이상 균체를 회수할 수 있었다. 이러한 결과는 pH 11의 조건하에서 응집된 floc의 80%가 적어도 0.5mm 보다 크고, 95%가 0.05mm 보다 크다는 것을 의미한다. 배양액의 pH가 12를 초과하면 원심 분리법을 이용한 결과와 동일하게 여과에 의한 균체회수율이 40%까지 저하하였다.

PACS 응집제의 경우, 배양액의 pH가 9이하의 조건에서는 0.5와 0.1mm 체를 이용해서는 균체를 전혀 회수할 수 없었다. 그러나, 0.05mm의 가장 작은 체를 이용하여 균체를 회수하면 균체회수율이 40-70% 이었고 회수율은 pH에 비례하는 경향이 있었다. 0.05mm인 체를 사용하고 배양액의 pH가 9이하인 조건하에서 Al₂(SO₄)₃와 Hi-PAX를 첨가했을 때의 결과와 비교해보면, PACS를 첨가했을 때 가장 높은 균체 회수율을 얻을 수 있었다. 이 결과는 PACS응집제를 첨가했을 때 형성된 균체 floc의 대부분이 0.05-0.1mm 크기였음을 나타낸다. pH 10-13의 범위에서는 균체회수율이 체의 크기에 상관없이 거의 비슷하였다. 이 결과는 이러한 pH 범위 하에서 PACS를 첨가하여 형성된 균체 floc의 크기가 0.05mm이상인 균체 floc의 비율이 비슷함을 시사한다. 특히, pH 12에서는 0.5mm 체에 여과시켜도 균체회수율이 95%이상으로 상당히 높은 회수율을 얻을 수 있었다. 이 결과로부터, 위의 조건하에서 형성된 균체 floc의 95%는 크기가 0.5mm 이상임을 알 수 있었다.

Hi-PAX 응집제를 첨가할 경우, Al₂(SO₄)₃ 응집제를 첨가한 경우와 유사하게 pH 8 이하의 낮은 pH 범위에서는 여과법에 의한 회수율을 25% 이하로 낮았다. 그러나, 배양액의 pH가 8

이상이 되면 pH 11까지 균체회수율이 급격하게 증가하였는데, pH 11에서 거의 100%에 가까운 균체 회수율을 얻을 수 있었다. PACS 응집제와 유사하게, pH 11의 조건에서 형성된 균체 flocc의 크기는 대부분 0.5mm 이상으로 상당히 큰 균체 flocc이 형성됨을 알 수 있었다.

Figure 1과 Figure 2에 나타난 응집제 첨가 후에 얻은 균체 회수율에 미치는 pH의 영향을 조사한 결과를 종합해보면, 가장 효율적인 응집이 일어나는 최적 pH값은 $Al_2(SO_4)_3$ 와 Hi-PAX 응집제의 경우에는 11 이었고, PACS 응집제의 경우에는 12임을 알 수 있었다.

Si가 첨가된 PACS의 경우 Si가 첨가되지 않은 Hi-PAX보다 넓은 pH 범위에서 응집이 잘 일어나는 현상을 보여주고 있는데 (Figure 1), 이것은 Si의 흡착성질 때문으로 보인다. 정수처리나 폐수처리의 경우 Si가 첨가된 응집제가 응집성능이 우수한 경향을 보이는데, 본 실험에서는 pH 6-10.5 범위에서는 PACS와 Hi-PAX가 거의 유사한 경향을 보여주는 반면, PACS의 경우는 pH가 13.5 될 때까지도 응집효과가 계속 유지되는 경향을 보여 주고 있다. 이는 PACS에 함유된 Si에 의해 흡착부위 (adsorption site)가 증가되었기 때문으로 사료된다(12).

일반적으로 수처리와 폐수처리에서 사용되는 Al 계통의 응집제들은 첨가량이 5 - 50 ppm 정도로 매우 낮고 원수의 pH가 5.5 - 7.5 범위에서 이용되고 있다(13-17, 21). 이러한 경우에는 응집을 위해 첨가해야 할 응집제의 양이 수십 ppm 이하로 응집

제 첨가에 의한 원수의 pH의 변화가 작기 때문에 pH 조절 없이 중성 조건에서 응집제의 사용이 가능하다. 이러한 이유 때문에 수처리 분야에서는 응집제의 pH변화에 따른 응집효율은 일정한 pH하에서 연구되고 있다. 그러나, 본 연구에서는 20-200 g/L의 고농도 균체 입자들을 응집시키기 위해서는 많은 양의 응집제를 첨가하여야 하기 때문에 응집제들의 가수분해에 따른 배양액의 pH 감소 현상이 심하게 나타났다 (Figure 3). 초기 pH가 10-12에서는 응집 후 pH가 약 5-7 정도로 감소하였고, 초기 pH가 12-13 이상인 경우에는 반응후 pH가 5.5 이상이었다. 이는 응집제 용액 자체의 pH가 3.5 - 5로 낮고, 응집제를 배양액에 첨가하면 가수분해반응에 의해서 1몰의 Al이 3몰의 수소를 방출하기 때문에 배양액의 pH가 급감하는 것으로 사료되었다(19). 응집 처리 후에 배양액의 pH가 5-7 사이에서 비교적 큰 flocc이 생성되고, pH 5미만인 경우 미세 flocc이 생성되는 것이 관찰되었다. 이러한 현상은 Figure 2로부터 간접적으로 알 수 있고, pH 6.5에서 알루미늄염의 용해도가 가장 낮은점과 잘 일치한다(11).

Figure 1과 2에서 배양액의 초기 pH가 응집제에 따라서 12 또는 13이상으로 증가시 응집효율이 급격하게 감소하는 경향을 보였다. 이러한 현상은 Figure 3에서 보는바와 같이 응집제 첨가된 후에도 pH가 7 이상으로 높게 유지되어 응집제들의 등전점 이상으로 유지되기 때문이다. 등전점 이상에서는 첨가한 응집제들이 음전하($Al(OH)_4^-$)가 지배적이다(19). 따라서, 동일한 음전하를 가진 응집제와 콜로이드(세포) 입자 사이의 전기적인 반발력이 작용하여 응집효율이 감소한 것으로 사료된다.

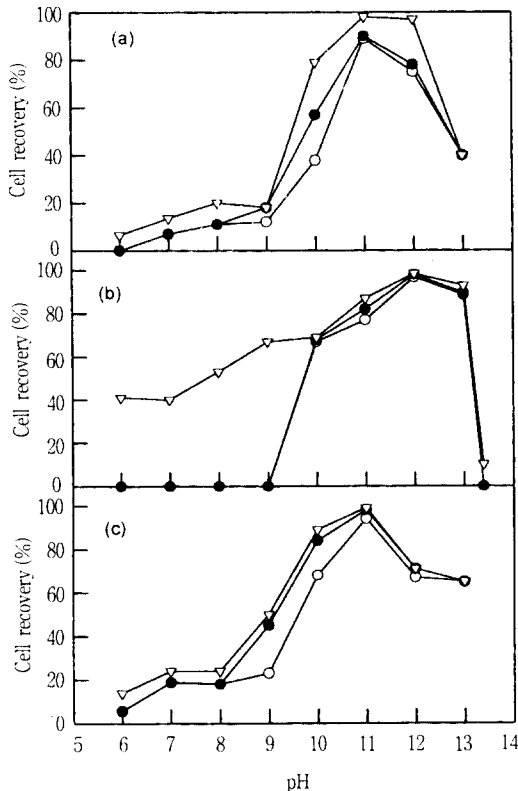


Figure 2. Effects of initial pH on cell recovery from the fermentation broths pretreated with three different Al-based coagulants by filtration. (a) $Al_2(SO_4)_3$, (b) PACS, (c) Hi-PAX. Symbols: ∇ , 0.05 mm; \bullet , 0.10 mm; \circ , 0.50 mm.

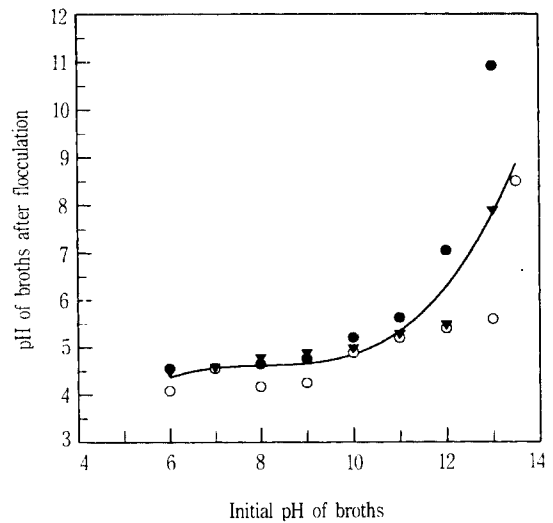


Figure 3. Initial pH vs final pH after coagulation treatment. Symbols: \circ , PACS; ∇ , $Al_2(SO_4)_3$; \bullet , Hi-PAX.

균체 회수율에 미치는 응집제 첨가량의 영향

균체 회수율에 미치는 응집제 첨가량의 영향을 세농도가 81 g/L인 배양액을 이용하여 조사하였다(Figure 4). 이때 배양액의 초기 pH는 상기의 실험에서 얻은 최적 pH인 11 ($Al_2(SO_4)_3$ 와 Hi-PAX) 또는 12 (PACS)로 조절하였다. 응집제의 종류에 상관없이 첨가한 응집제의 양이 증가할수록 원심분리 혹은 여과법에 의해 회수 가능한 균체량이 증가하였다.

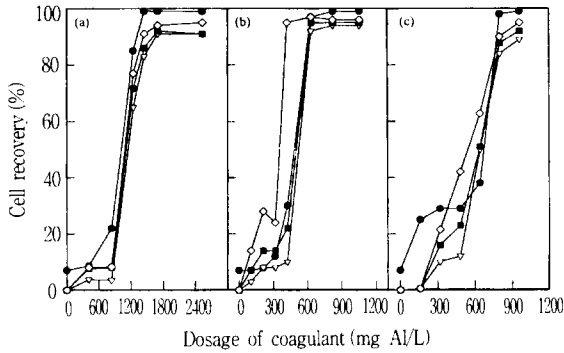


Figure 4. Effect of coagulant dosage on cell recovery. (a) $Al_2(SO_4)_3$, (b) PACS, (c) Hi-PAX. Symbols: centrifugation: ●, 45×g; filtration: ◇, 0.05 mm; ■, 0.1 mm; ▽, 0.5 mm.

$Al_2(SO_4)_3$ 응집제의 경우, 응집제의 농도가 1000 mg Al/L 이하의 범위에서는 응집제 첨가량이 증가함에 따라 균체회수율이 서서히 증가하였으나, 1000 mg Al/L 이상의 응집제를 첨가해 주면 균체 회수율이 급격하게 증가하였다. 응집제를 1458 mg Al/L 이상 첨가했을 때 각 회수방법에 의한 균체회수율은 원심분리법 (45×g) 사용 시 99%, 0.5mm 체 사용할 때 83%, 0.1 mm 체 사용할 때 86% 및 0.05mm 체 사용할 때 91%의 높은 회수율을 얻을 수 있었다.

$Al_2(SO_4)_3$ 응집제와 비교해서 PACS와 Hi-PAX와 같은 무기 고분자 응집제는 비교적 적은 용량을 첨가하여도 높은 균체 회수율을 얻을 수 있었다. PACS의 경우, 원심분리법과 여과법 (0.05mm 체)을 이용하여 95% 이상의 균체회수율을 얻을 수 있는 최소 용량은 635 mg Al/L이었다. 한편, Hi-PAX는 800 mg Al/L 농도에서 원심분리법에 의해 균체를 98%, 여과법 (0.05mm 체)에 의해서는 90% 회수 가능하였다. Hi-PAX의 농도를 1058 mg Al/L로 높이면 여과법에 의해서도 균체를 95% 회수 할 수 있었다.

균체농도와 원심력간의 관계

응집처리한 균체를 원심분리법에 의해 회수할 때 여러 원심력에서의 응집제 첨가량의 변화에 따른 균체의 회수율을 균체농도가 82 g/L와 164 g/L일 때 각각 조사하였다(Figure 5). PACS와 Hi-PAX응집제를 첨가하기 전에 배양액의 pH를 각각 12와 11로 조절하였다. 균체 농도가 82 g/L인 경우, 응집제 첨가량에 따른 균체회수율은 응집제 첨가량이 증가함에 따라 증가하였고, 원심력을 45×g에서 1100×g로 증가시키에 따라 균체 회수율이 상승하였다(Figure 5-a). PACS와 Hi-PAX를 각각 635 mg Al/L와 826 mg Al/L이상 첨가하면 45×g의 낮은 원심력 조건 하에서도 95% 이상의 균체회수효율을 얻을 수 있었다.

균체농도가 160 g/L인 고농도 세포 배양액에서 일정한 원심력 하에서 응집제 첨가량 변화에 따른 균체의 회수율을 조사하였다(Figure 5-b). PACS를 826 mg Al/L 첨가시 응집이 일어났다. 고농도 세포 배양액에서도 응집제 첨가량이 증가하거나 원심력이 증가함에 따라 균체회수율이 향상되었다. 그러나, 원심력이 상대적으로 낮은 45×g와 1100×g에서는 응집이 일어나는 826 mg Al/L 이상에서도 각각 47%와 62%의 낮은 회수율을 얻었고, 95% 이상 균체를 회수하기 위해서는 1600×g 이상의

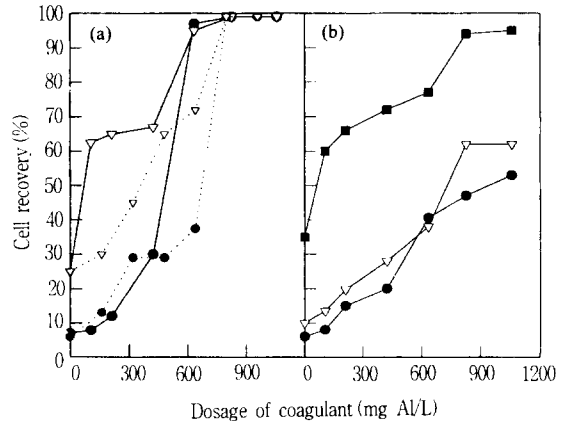


Figure 5. Cell recovery from high density cell broths by centrifugation. (a) 82 g DCW/L, (b) 164 g DCW/L. Coagulants: solid lines, PACS; dotted lines, Hi-PAX. Centrifugal force (×g): ●, 45; ▽, 1100, ■, 1600.

원심력을 필요로 하였다.

이상의 결과로부터 응집이 충분히 진행될 수 있도록 응집제를 첨가하면 원심분리에 의해 낮은 원심력에서도 높은 균체의 회수율을 얻을 수 있고, 균체농도가 164 g/L와 같이 고농도인 경우 상대적으로 높은 원심력을 필요로 함을 알 수 있었다. 한편, 원심분리법에 의해 균체를 회수하는 공정의 전단계에 배양액에 응집제를 첨가할 경우와 첨가하지 않을 경우 균체회수에 필요한 최소한의 원심력을 비교 검토해 보았다. 그 결과, 응집제를 배양액에 첨가하여 균체를 회수하는 경우에 소요되는 원심력은 응집제를 사용하지 않은 경우에 소요되는 원심력의 3-11%에 불과하였다. 즉, 응집제를 사용함으로써 배양액으로부터 균체를 회수하는데 소요되는 경비를 상당히 많이 저감시킬 수 있음을 알 수 있었다.

최적 응집제 첨가량

균체농도가 20.5, 41, 82 및 164 g/L에서 95% 이상의 균체회수율을 얻을 수 있는 최소 응집제 첨가량(최적 응집제 첨가량)을 조사하여 그 결과를 Figure 6에 도시하였다. 원심분리법을 이용하여 균체를 회수하는 경우(Figure 6-a), 82 g/L 이하의 균체농도에서는 원심력을 45×g로, 균체농도가 164 g/L 인 경우에는 원심력을 1600×g로 설정하였다. 여과법을 이용하여 균체를 회수하는 실험에서는 0.05 mm 체를 사용하였다(Figure 6-b). 모든 응집제에서 균체농도가 증가할수록 필요로 하는 응집제의 첨가량이 증가하였다. 각 균체농도에서 최적 응집제 최소첨가량은 PACS와 Hi-PAX와 같은 무기고분자 응집제보다는 $Al_2(SO_4)_3$ 가 상대적으로 높았다. 원심분리에 의한 균체 회수시 $Al_2(SO_4)_3$ 는 균체 농도에 따라 416-1708 mg Al/L의 첨가가 필요로 하였다. 무기고분자 응집제의 최적 응집제 첨가량은 PACS의 경우는 211-826 mg Al/L, Hi-PAX의 경우는 320-960으로, PACS가 Hi-PAX보다 다소 적은 양으로도 효율적으로 균체를 응집시킬 수 있었다.

여과법에 의해 95% 이상 균체를 회수하기 위해 필요로 하는 최적 응집제 첨가량은 원심분리법에서 필요로 하는 응집제의 첨가량 보다 많이 필요로 하였다 (Figure 6-b). 최적 응집제 첨가

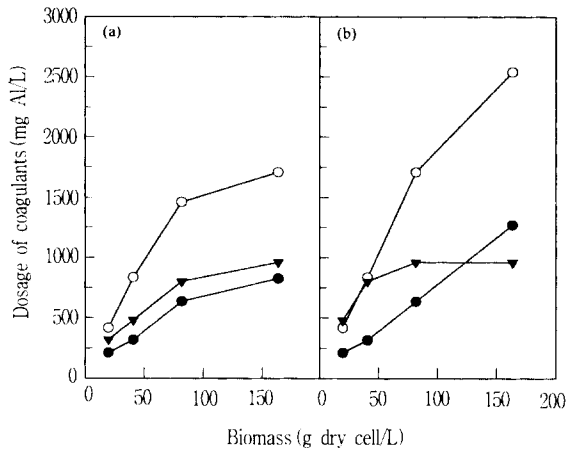


Figure 6. Optimal dosage for 95% cell recovery. (a) centrifugation (1600xg), (b) filtration (pore size: 0.05 mm). Symbols: ●, PACS; ○, Al₂(SO₄)₃; ▼, Hi-PAX.

량은 균체 농도에 따라 Al₂(SO₄)₃는 416-2541 mg Al/L 이었고, PACS와 Hi-PAX의 최적 응집제 용량은 각각 211-1269 mg Al/L와 480-960 mg Al/L이었다.

콜로이드의 응집 또는 표면전하의 중화는 콜로이드의 농도와 첨가된 응집제인 Al의 농도에 의존하는 것으로 알려져 있다 (19). 일정한 pH에서 응집제의 첨가량이 부족할 경우 응집이 일어나지 않으며, 충분한 양의 응집제를 첨가해야만 sweep-floc 응집이 일어난다. 콜로이드 농도와 응집과의 관계는 콜로이드 농도가 임계농도 이하로 아주 낮은 경우에는 콜로이드 입자와 가수분해된 응집제간의 접촉 기회가 적기 때문에 오히려 많은 양의 응집제를 첨가해야만 응집이 일어난다(19). 그리고 콜로이드 입자의 농도가 어느 정도 이상 증가하면 상대적으로 적은 양의 응집제를 첨가하여도 응집이 진행된다. 그러나, 입자의 농도가 더 증가할수록 응집제의 첨가량은 증가하게 된다. 폐수처리와는 달리 본 연구에서 최적 응집제의 첨가량이 수백 내지 수천 ppm인 것은 균체농도가 증가함에 따라 중화시켜야 할 세포 표면이 증가하였기 때문으로 사료된다.

감속염의 응집력(coagulation power)은 이온의 원자가가 1에서 2, 3으로 증가할 때 1:10:1000 의 비로 증가한다(19). 따라서, Si가 4가이기 때문에 3가인 Al 보다 응집력이 크기 때문에 Si가 소량 첨가되어 있는 PACS와 Hi-PAX간의 최적 응집제의 첨가량이 다소간 차이가 있는 것으로 사료되었다. 응집제를 사용하여 배양액으로부터 균체를 회수할 경우, 그 균체로부터 PHB를 추출했을 때 잔류 Al이 영향을 최소화 하기 위해서는 가능한 한 적은 양의 응집제를 사용하여야 한다. 이러한 측면에서 Al₂(SO₄)₃과 같은 무기응집제보다는 PACS 혹은 Hi-PAX와 같은 무기고분자응집제를 사용하는 것이 바람직할 것으로 사료된다.

요 약

알루미늄계의 응집제를 이용한 전처리에 의해 *Alcaligenes eutrophus*의 고농도 세포배양액(21-160g dry weight/L)으로부터 균체회수를 연구하였다. 응집제는 aluminum sulfate, 무기

고분자 응집제인 polyaluminum hydroxide chloride silicate (PACS)와 polyaluminum hydroxide chloride (Hi-PAX)를 사용하였다. 응집처리에 의해 원심분리와 여과법을 사용하여 95-99%의 세포를 회수율을 얻을 수 있었다. 일반적인 폐수나 상수 처리에서의 응집제 사용을 위한 최적 조건들과 고농도 세포 배양액에서의 세포회수를 위한 조업조건과는 많은 차이점이 관찰되었다. 세포 회수를 위한 배양액의 최적 초기 pH는 10-12로 매우 높았다. 세포농도 증가(21-160g/L)에 따라 원심분리에 의해 95% 이상 균체를 회수할 수 있는 최소 응집제 첨가량(최적 응집제 첨가량)은 증가하였다. 최적 응집제 첨가량은 세포농도에 따라 aluminum sulfate는 416-1708 mg Al/L이었고, 두 고분자 응집제 PACS와 Hi-PAX는 각각 211-826 mg Al/L과 320-960 mg Al/L이었다. 응집처리한 균체를 원심분리에 의해 회수 할 경우 95% 이상 균체의 회수를 위해 필요한 원심력은 사용된 응집제의 종류와 무관하였고, 세포농도에 의존하였다. 82 g/L 이하와 160 g/L의 균체 농도에서 45xg와 1600xg의 낮은 원심력에서도 균체의 95% 이상 회수가 가능하였고, 여과법의 경우 0.05 mm체를 사용하여 95% 이상의 세포회수가 가능하였다.

감 사

본 연구는 1997년도 선도기술과제(G-7) 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

- Doi, Y. (1990), Microbial polyesters, VCH, New York.
- Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) by Fed-batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Glucose Concentration Control, *Biotechnol. Bioeng.*, **43**, 892-898.
- Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo (1994), Production of Poly(3-Hydroxybutyric-co-3-Hydroxyvaleric Acid) by Fed-batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Substrate Control Using On-line Glucose Analyzer, *Enzyme Microbial Technol.*, **16**, 556-561.
- Hahn, S. K., Y. K. Chang, and S. Y. Lee (1995), Recovery and Characterization of Poly(3-Hydroxybutyric Acid) Synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and Recobinant *Escherichia coli*, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 34-39.
- Ryu, H. W., E. K. Hahn, Y. K. Chang, and H. N. Chang (1997), Production of Poly(3-Hydroxybutyrate) by High Cell Density Fed-Batch Culture of *Alcaligenes eutrophus* with Phosphate Limitation, *Biotechnol. Bioeng.*, **55**, 28-32.
- Pinheiro, H. and J. M. S. Cabral (1992), Filtration, In: *Recovery Processes for Biological Materials*. (J. F. Kennedy and J. M. S. Cabral, eds) pp. 67-95, Wiley, New York.
- Pinheiro, H. and J. M. S. Cabral (1992), Sedimentation, In: *Recovery Processes for Biological Materials*. (J. F.

- Kennedy and J. M. S. Cabral, eds) pp. 97-131, Wiley, New York.
8. Pinheiro, H. and J. M. S. Cabral (1992), Centrifugation, In: *Recovery Processes for Biological Materials*. (J. F. Kennedy and J. M. S. Cabral, eds) pp. 133-175, Wiley, New York.
 9. Mateus, M., J. A. L., Santos, and J. M. S. Cabral (1992), Membrane Separation Processes, In: *Recovery Processes for Biological Materials*. (J. F. Kennedy and J. M. S. Cabral, eds) pp. 177-222, Wiley, New York.
 10. McGarry, M. G. (1970), Algal Flocculation with Aluminum Sulfate and Polyelectrolytes, *J. Water Poll. Control Fed.*, **42**, 191-121.
 11. Snoeyink, V. L. and D. Jenkins (1980), *Water Chemistry*, pp. 243-315, Wiley, New York.
 12. Stumm, W. and J. J. Morgan (1996), *Aquatic Chemistry*, 3rd ed, pp. 367-979, John Wiley & Sons Inc, New York.
 13. Johnson, P. N. and A. Amirtharajah (1983), Ferric Chloride and Alum as Single and Dual Coagulants, *J. AWWA*, **175**, 232-239.
 14. Gregory, J. (1985), Precipitation and Coagulation in Waste Treatment, In: *Comprehensive Biotechnology (4). The Principles, Applications, and Regulations of Biotechnology in Industrial, Agriculture and Medicine*, (M. Moo-Young, eds) pp. 785-799, Pergamon Press, Toronto.
 15. Gillberg, L. (1994), Influence of the Basicity of Polyaluminum Chlorides when Cleaning Municipal Wastewater, In: *Chemical Water and Wastewater treatment III*. (R. Klute and H.H. Hahn, eds) pp. 39-56, Springer-Verlag, New York.
 16. Jiang, J. Q., N. J. D. Graham, and C. Harward (1994), Preliminary Evaluation of Polyferric Sulphate As a Coagulant for Surface Water Treatment, In: *Chemical Water and Wastewater treatIII*. (R. Klute and H.H. Hahn, eds) pp. 71-93, Springer-Verlag, New York.
 17. Ratnaweera, H., H. Blom, and G. Aasgaard (1994), Coagulant Dosing Control Using a Model for Wastewater Coagulant, In: *Chemical Water and Wastewater treatment III*. (R. Klute and H.H. Hahn, eds) pp. 105-115, Springer-Verlag, New York.
 18. Weeks, H. G., P. A. Munro, and P. L. Spedding (1983), New Concepts for Rapid Yeast Settling. I. Flocculation with an Inert Powder, *Biotechnol. Bioeng.*, **25**, 687-697.
 19. Benefield, L. D., J. F. Judkins, and B. L. Weand (1982), *Process Chemistry for Water and Wastewater Treatment*, pp. 115-238, Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
 20. Packham, R. F. (1965), Some Studies of the Coagulation of Dispersed Clays with Hydrolyzing Salts, *J. Coll. Sci.*, **20**, 81-92.
 21. Stumm, W. and C. R. O'Melia (1968), Stoichiometry of Coagulation, *J. Am. Water Works Assoc.*, **60**, 514-539.