

Alcaligenes eutrophus 고농도 배양액으로부터 응집제를 이용한 균체 회수

류희욱, 조경숙*, 장용근**, 장호남**

승실대학교 화학공학과, 이화여자대학교 환경공학과*, 한국과학기술원 화학공학과
및 생물공정연구센터**

Cell separation from high cell density broths of *Alcaligenes eutrophus* by using a coagulant

Hee W. Ryu, Kyeong S. Cho*, Young K. Chang**, and Ho N. Chang**

Department of Chemical Engineering, Soong Sil University, Department of
Environmental Engineering, Ewha Womans University*, Department of
Chemical Engineering and BPERC, KAIST**

서론

생물화학산업에 있어서 생산물의 분리 및 회수공정은 생산단가를 좌우하는 중요한 과정이다. 일반적으로 널리 사용되는 회수공정은 원심분리법, 여과법 및 막분리법 등이 사용되고 있다. 천이나 섬유를 이용한 여과법의 경우 미생물 크기가 1 - 3 μm 로 입자크기가 작기 때문에 filter-aid로 pre-coating한 filter를 사용하여야 한다. 여과법과 막분리법을 사용하는 경우에는 막힘현상등으로 단위면적당 flux가 낮기 때문에 회수에 많은 시간이 소요된다. 그리고, 원심분리법을 사용하는 경우에도 많은 동력이 소요되는 단점이 있다. 만약 균체의 입자크기가 수백 μm 이상이면 균체의 회수는 훨씬 용이할 것이다. 수용액상의 분산된 입자를 응집제를 첨가함으로써 floc을 형성시킨후 침전시켜 분리할 수 있어 상수와 폐수처리공정에서 널리 사용되고 있다. 이러한 응집원리는 배양액으로부터 균체 회수공정의 전처리 방법으로 이용될 수 있을 것이다.

*Alcaligenes eutrophus*를 이용한 생분해성 고분자 생산에 관하여 많은 연구가 진행되어 170g-cell/L 까지 고농도 배양이 가능하게 되었다. 배양액으로부터 PHA를 회수는 용매추출법을 사용되고있어 많은 양의 용매가 사용되고 있다. 배양액으로부터 균체의 회수가 용이하다면 균체를 농축시킨후 용매추출을 하면 용매의 사용량을 현저히 줄일수 있을 것이다. 본 연구에서는 응집제를 이용한 균체 회수의 대표적인 한 예로 *A. eutrophus*의 고농도 배양액으로부터 무기고분자 응집제인 polyaluminium hydroxide chloride silicate를 사용한 전처리공정을 거쳐 원심분리나 여과법을 사용하여 균체 회수의 특성과 최적회수 조건을 조사하였다.

실험방법 및 재료

A. *eutrophus* 배양액의 생산

생분해성 고분자인 PHA를 생산하는 *A. eutrophus* (NCIMB 11599)의 배양액을 얻기 위하여 50L 발효기 (한국발효기)에서 유가식 배양을 하였다. 초기 배지의 조성(per liter)은 20g glucose, 4.44g KH_2PO_4 , 4g $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, 1.2g $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 1.7g citric acid, 10 ml trace metal solution이다. Trace metal solution의 조성(per liter of 5N HCl)은 10g $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 2g $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$, 2.25g $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.5g $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 1.0g $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 0.1g $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 0.2g $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 이다. 초기 배지의 부피는 18L이고, 유가식 배양하는 동안 공급배지는 700 g/L glucose이다. 배양하는 동안에 pH는 ammonium water와 5N HCl로 6.8로 조절하였다.

응집제를 이용한 균체 회수

*A. eutrophus*의 분리를 용이하게 할 수 있는 첨가제로 polyaluminium hydroxide chloride silicate(경기화학)를 사용하였다. 응집제는 증류수로 2.5배 희석하여 사용하였다. 응집현상은 삼호과학의 jar-tester를 사용하였다. 이 응집시험기는 6개의 1리터 비커와 교반기 및 콘트롤러로 구성되어 있다. 응집 실험은 400 rpm에서 응집 현상에 따라 1-3분, 완속교반은 100 rpm에서 10분 동안 하였다. 응집제를 사용하여 배양액으로부터 균체의 응집현상에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위하여 pH를 6에서 14까지 변화시키면서 응집현상을 관찰하였고, 첨가된 응집제의 농도와 균체농도가 균체 회수 및 응집 현상에 미치는 영향도 조사하였다. 원심분리기와 다양한 크기의 sieve를 사용하여 응집성능을 조사하였다. 원심분리기를 사용하는 경우 응집 처리된 배양액 10 ml를 눈금이 있는 15 ml 용량의 원심분리관에 채취한 후 원심력을 변화시키면서 원심관에서 세포가 분리 농축된 부피를 측정하고, 상등액을 채취하여 흡광도를 660nm에서 측정하여 초기치의 세포농도와 각 조건에서 원심분리한 후 상등액의 흡광도를 기준으로 균체 회수율을 측정하였다. 여과지(filter)를 사용한 균체 회수를 모사하기 위하여 응집처리된 배양액을 0.05, 0.1, 0.5 mm의 sieve를 사용하여 회수율을 측정하였다. 각 sieve를 통과한 여과액의 흡광도를 측정하여 균체 회수율을 조사하였다.

결과 및 토론

응집효과에 미치는 pH의 영향

균체농도를 82 g/L로 하고 충분히 응집이 일어날 수 있도록 응집제를 1.2 vol% 첨가하고 응집효과에 미치는 배양액의 pH의 영향을 조사하였다(Fig. 1). 균체 회수율은 45 x g에서 3분간 원심분리한 후 얻어진 상등액의 OD값을 측정하여 계산하였다. pH 6이하에서는 응집현상이 거의 관찰되지 않았으나, pH 7에서부터 세포들이 응집되기 시작하였으며 pH가 높을수록 응집효율이 높았다. 그러나,

pH 13 이상에서는 응집효율이 감소하였고, 최적 pH는 11에서 12사이 이었다.

응집제 첨가량에 따른 균체 회수율

균체 농도 82 g/L, pH 11의 조건하에서 0 - 1.6 vol% 범위에서 응집제 첨가량에 따른 균체 회수율을 조사하였다(Fig. 2). 45 x g에서 원심분리한 경우 1.0 % 이상 응집제를 첨가할 때 거의 완전하게 균체회수가 가능하였고, 1100 x g에서도 1.0% 이상 첨가해야 균체회수가 가능하였다. 균체회수에 필요한 응집제의 첨가량은 82 g/L의 농도까지는 균체농도에 비례하였다. 균체농도가 20.5, 41, 82 g/L에서 90%이상 균체회수가 가능한 첨가량은 각각 0.4, 0.6, 1.0% 이었다. 164 g/L의 고농도에서는 45 x g에서는 회수가 불가능하였고, 1600 x g에서 0.4% 이상 응집제 첨가시 90% 이상의 회수가 가능하였다.

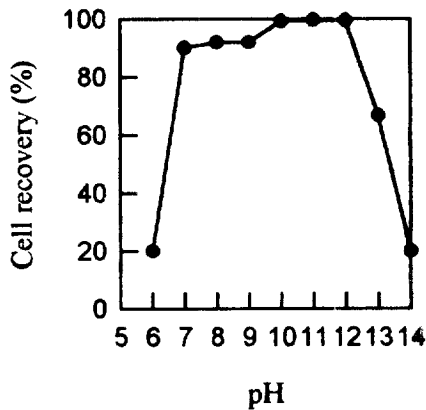


Fig. 1. Effect of pH on cell recovery by centrifuge (82 g-cell/L).

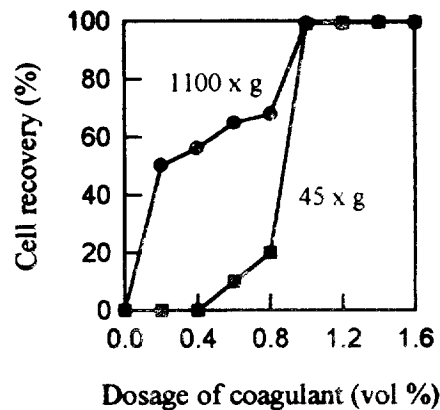


Fig. 2. Effect of coagulant dosage on cell recovery by centrifuge (82 g-cell/L).

원심분리에 의한 균체 회수에 미치는 응집제 첨가 효과

250 ml 원심관에 200ml의 응집 처리한 배양액을 넣고 95% 이상의 균체회수를 위해 필요한 원심력을 세포농도의 변화에 따라 조사하였다(Fig. 3). 각 세포농도 별로 응집제 첨가량은 충분한 응집이 일어날 수 있는 정도를 첨가하였다. 응집제를 첨가하지 않는 경우 세포 농도의 증가에 따라 82 g/L까지는 거의 선형적으로 증가하고 그 이상에서 완만하게 증가하였다. 반면에 응집제를 첨가한 경우에는 164 g/L의 고농도에서도 약 620 x g의 낮은 원심력에서도 균체 회수가 가능하였다. 원심분리기의 동력은 원심력에 비례한다. 82 g/L 이하의 세포농도에서는 응집제를 첨가한 경우 균체 회수에 필요한 에너지를 약 1/25 - 1/30 배 정도의 절감할 수 있고, 164 g/L의 세포농도에서도 응집제 첨가에 의해 약 1/9배 정도 절감할 수 있음을 알 수 있었다.

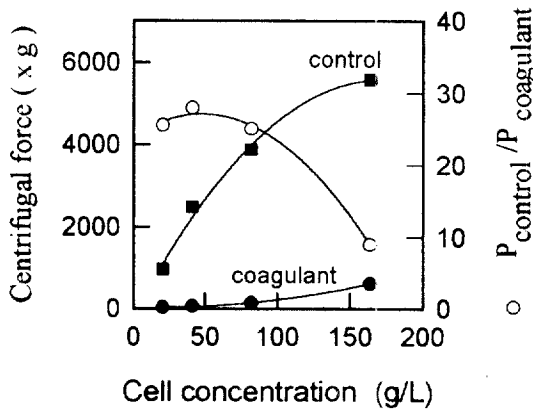


Fig. 3. Centrifugal forces and energy demand ratio for cell recovery.

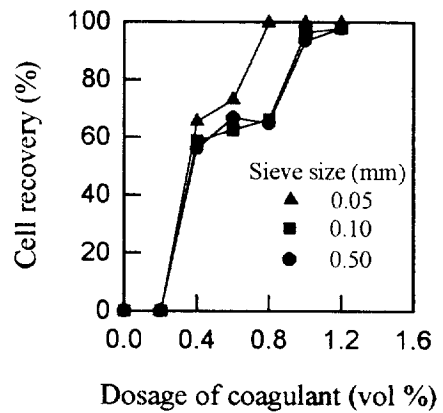


Fig. 4. Effect of concentration of coagulant on cell recovery by filtration (164 g-cell/L).

여과에 의한 균체의 회수

응집제 첨가후 균체를 회수하기 위해 세 종류의 sieve를 사용하여 균체 회수율을 조사하였다. Fig. 4는 균체농도가 164 g/L에서 응집제 첨가량에 따른 균체 회수율을 비교한 결과이다. 응집제를 0.4% 첨가한 경우 약 60%의 회수가 가능하였고, 회수된 균체 floc은 0.5mm sieve에서 회수되었다. 0.8% 첨가한 경우 0.5mm seive를 사용하면 약 60%의 균체를 회수할 수 있었고, 0.05mm sieve를 사용하면 거의 모든 균체의 회수가 가능하였다. 응집제를 1.0%이상 첨가하면 0.5mm seive를 사용하여도 90%이상 균체를 회수할 수 있었다. 즉, 1.0%이상 응집제를 첨가한 경우 대부분의 floc size는 0.5mm 이상임을 알 수 있다.

여과법을 사용하여 용이하게 균체를 회수하기 위해서는 충분한 크기의 floc이 형성될 수 있는 양의 응집제를 첨가하는 것이 바람직하다. 여러 균체농도의 배양액으로부터 0.5mm sieve를 사용하여 90%이상 균체회수가 가능한 floc을 형성하는데 필요한 응집제 첨가량을 Fig. 5에 도시하였다. 균체농도의 증가에 따라 응집제 사용량은 82g/L의 농도까지는 거의 선형적으로 1.0% 까지 증가하였고, 그 이상에는 1.0% 응집제를 첨가하면 90% 이상의 회수가 가능하였다.

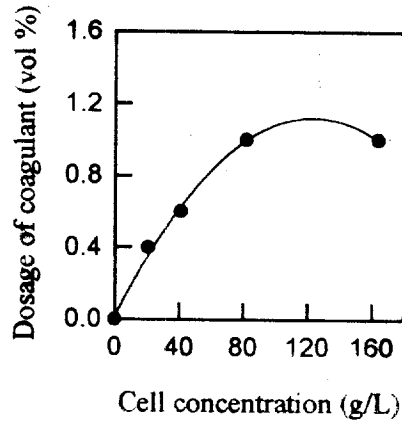


Fig. 5. Relationship of coagulant dosage and cell concentration for cell recovery.