

*Alcaligenes eutrophus*의 배양액으로부터 균체 분리 효율에 미치는 철(Fe)계 응집제의 효과

류희욱¹ · 조경숙² · 곽종운³ · 장용근*

¹숭실대학교 화학공학과, ²이화여자대학교 환경공학과,
³경기화학공업(주) 수처리연구실, 한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터*

Effect of Fe-based Coagulants on Cell Separation Efficiency from the Culture Broth of *Alcaligenes eutrophus*. Ryu, Hee Wook¹, Kyung-Suk Cho¹, Jong Woon Kwak³, and Yong Keun Chang*. ¹Department of Chemical and Environmental Engineering, Soong Sill University, Seoul 156-743, Korea, ²Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea, ³Department of Water Treatment, 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*—*Alcaligenes eutrophus* was successfully recovered from high cell density broth by pre-treatment with Fe-based coagulants. An inorganic coagulant, Fe₂(SO₄)₃, and a polymerized coagulant, Ferix-3, were used. Good coagulation was observed in broad pH range of 3 to 13, the floc size was increased with increasing pH of culture broth. The optimum pH of fermentation broth for cell recovery was 10 to 13. The optimum coagulant dosages to recover cells with 95% cell recovery were increased with increasing cell concentration. Optimal coagulant dosage was lower when the polymerized coagulant was used rather than the inorganic coagulant. The coexistence of NH₄⁺ was increased coagulant requirement, and the coagulant requirement was 0.066g Fe³⁺/g NH₄⁺.

Key words: *Alcaligenes eutrophus*, cell separation, coagulants, polyhydroxyalkanoates

난분해성 석유화학 폐플라스틱의 매립으로 인한 토양 오염 및 생태계 파괴를 최소화하기 위해 생분해성 플라스틱의 개발에 관한 연구가 활발히 진행되고 있다. 대표적인 생분해성 고분자로는 polyhydroxyalkanoates(PHA), polylactides, aliphatic polyester 및 polysaccharides 등이 있다. 이들 중에서 PHA는 미생물의 세포내에 합성·축적되는 polyester 구조의 화합물로 현재 사용되고 있는 석유화학 플라스틱과 매우 유사한 물성을 가지고 있어 기존 플라스틱의 대체물질로 주목받고 있는 물질이다. 대표적인 PHA로는 polyhydroxybutyrate(PHB)와 poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate, P(3HB-co-3HV))이다.

많은 종류의 세균들은 다량의 탄소원의 존재하에서 생장에 필요한 영양분(질소, 인, 산소 등)이 부족할 경우, 탄소 혹은 에너지 저장물질로 PHA를 축적하는 것으로 알려져 있다. 대표적인 PHA 생산 균주로는 *Alcaligenes eutrophus*[2, 3, 9, 10, 15], *Alcaligenes latus*[7], *Azotobacter vielandii*[16, 17], *Pseudomonas* sp.[20] 및 *Methylobacterium organophilum*[12] 등이 있다. 최근 들어서는

PHA 생산에 관여하는 유전자를 재조합한 *Escherichia coli*와 *Klebsiella aerogenes*를 이용한 PHA 생산에 관한 연구도 진행되고 있다[11, 14, 23]. *Alcaligenes eutrophus*는 glucose와 같은 간단한 탄소원으로부터 건조 세포 무게의 약 80%라는 많은 양의 PHB를 축적할 수 있어 대량 배양 기술 개발 측면에서 가장 활발하게 연구되어지고 있는 균주이다. 이 균주를 이용하여 인을 제한 영양소로 하는 DO-stat 유가식 고농도 세포 배양기술을 개발하여 약 280 g/L(230 g PHA/L)의 균체 생산이 가능하였다[21]. 이러한 대량 생산기술의 개발에도 불구하고, PHA의 생산원료와 분리·정제 비용이 비싸기 때문에 아직은 PHA의 가격은 P(3HB-co-3HV)가 1 kg당 \$16으로 고가이다[13]. PHA가 상용화를 되기 위해서는 값싼 원료를 이용한 대량 생산기술의 개발이 필요하며, 특히 저 비용의 분리·정제 기술의 개발이 필요하다.

PHA를 함유한 세포로부터 PHA를 회수하는 방법은 배양액으로부터 균체 회수와 회수된 균체로부터 PHA의 회수과정으로 구성되어 있다[5, 6, 13, 18]. 배양액으로부터 균체를 회수하는 가장 보편적인 방법은 원심분리법과 여과법이다. 그러나, 미생물 균체의 밀도는 액체(물)의 밀도와 거의 비슷하며 균체의 크기가 작고 균체의 침전 속도가 매우 작아, 기존의 원심분리법이나 여과법을 그

*Corresponding author
Tel. 82-42-869-8812, Fax. 82-42-869-8800
E-mail: ychang@sorak.kaist.ac.kr

대로 사용하기에는 많은 어려운 점이 대두된다. 이러한 공정의 전 단계에 응집제를 배양액을 첨가함으로써 coagulation과 flocculation에 의해 균체의 입자 크기를 수백 μm 이상으로 만들어 균체의 입자 크기와 밀도를 증가시키고 유체의 밀도와 점도를 감소시킨다면, 균체 분리 효율을 상당히 증가시킬 수 있을 뿐만 아니라 분리비용도 상당히 감소시킬 수 있을 것이다. 응집제를 생물 분리 공정에 적용하려는 연구가 몇몇 연구진에 의해서 진행되었다[4, 19, 22]. 대표적인 예로 Weeks 등[22]은 응집제를 사용하여 효모균인 *Saccharomyces cerevisiae*의 농축에 관하여 연구하였다. 유가식 배양에 의한 고농도 세포 배양 기술이 발달함에 따라, 생물분리공정에 응집제를 적용하기 위해서는 100~200 g/L의 고농도 세포배양액에서의 응집 현상과 응집처리에 의한 균체의 회수특성에 관한 연구가 필요하다.

기준에 많이 사용되고 있는 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 있다. 본 연구에서는 생분해성 플라스틱을 생산하는 *A. entrophus*의 고농도 세포배양액에서의 Fe계 응집제의 응집 특성을 조사하였고, 원심분리법이나 여과법에 의한 균체효율에 미치는 Fe계 응집제의 영향을 조사하였다. 또한, 균체 응집에 미치는 여러 가지 인자의 영향을 파악하여 최적 응집조건을 도출하고자 하였다.

재료 및 방법

A. *entrophus*의 배양

균체회수 실험에 사용할 배양액은 2.5 L 발효기(한국 발효기)를 이용하여 *A. entrophus* NCIMB 11599 균주를 유가식 배양하여 생산하였다. 종균배양에 사용된 배지는 증류수 1 L에 대해 Glucose 10 g, KH_2PO_4 1.5 g, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 9 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 1 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g 및 미량 금속 용액을 1 mL 첨가하여 조제하였다. 미량 금속 용액은 1 L의 5N HCl용액에 $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 10 g, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 2 g, $\text{ZnSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2.25 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ 0.5 g, $\text{CuSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.0 g, $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$ 0.1 g, $\text{Na}_2\text{B}_4\text{O}_7 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g을 첨가하여 만들었다. 유가식 배양에 사용한 초기 배지는 증류수 1 L당 glucose 20 g, KH_2PO_4 4.4 g, $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 4 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 1.2 g, citric acid 1.7 g 및 미량 금속 용액을 10 mL 첨가하여 만들었다. 배지 조제시 glucose와 $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 는 별도로 멸균하여 배지에 첨가하였다. 30°C에서 1일간 진탕 배양(180 rpm)한 종균 배양액 100 mL를 800 mL의 상기의 배지를 넣은 발효기에 접종하였다. 유가식 배양은 DO-stat법에 의해 800 g/L의 glucose 용액을 주입하면서 배양하

였다[21]. 배양액의 pH는 28% 암모니아수와 5N HCl을 이용하여 6.8-7.0으로 조절하였다.

응집제 및 응집반응

본 연구에서 사용된 철계 응집제는 Junsei사의 $\text{Fe}_2(\text{SO}_4)_3$ 와 K 화학에서 생산한 무기 고분자 응집제인 Ferix-3(FeCl_xOH_y , $x+y=3$)를 사용하였다.

배양액에 응집제를 첨가하는 모든 응집실험은 100 mL의 비이커를 이용하여 수행하였다. 세포배양액 25 mL를 넣은 비이커에 적절한 농도의 응집제를 첨가하고 1분간 급속교반 후 3분간 완속 교반 하였다. 유가식 배양하여 얻은 배양액을 원심분리(8000 rpm, 20 min)하여 균체와 상등액으로 분리한 후, 각 실험조건에 알맞는 균체농도가 되도록 회수한 균체를 상등액으로 희석하였다. 응집에 미치는 pH의 영향을 조사하기 위해 균체농도를 40 g/L로 조절한 세포 배양액의 pH를 10N NaOH와 5N HCl을 사용하여 3-13의 범위로 조절하고, 2 g Fe/L의 응집제를 첨가한 후 응집 실험을 수행하였다. 또한, 세포 배양액의 농도에 따른 응집 효율의 변화는 균체 농도를 23-210 g/L로 설정하고 각각의 균체 농도에서 응집이 잘 일어나는 최적 응집제 농도를 결정하기 위해 응집제를 5-6 g Fe/L 까지 변화시키면서 조사하였다.

응집효율에 미치는 NH_4^+ 의 영향은 다음의 방법으로 조사하였다. 배양액 속에 함유된 NH_4^+ 을 배제시키기 위하여 세포 배양액을 원심분리(8000 rpm, 20 min)하여 3회 세정한 후에 세포농도가 110 g/L 가 되도록 증류수로 재현탁하였다. 이 현탁액에 암모니아수를 사용하여 NH_4^+ 의 농도가 0, 0.2, 0.5, 1.0, 2.0, 6.0, 9.0 g/L가 되도록 첨가하였고, 이 세포액에 응집제의 첨가량을 변화시키면서 상기의 응집 과정에 의해서 응집 실험을 수행하였다.

균체 회수 실험

응집 처리한 균체 배양액으로부터 균체를 회수하는 방법으로 원심분리법, 여과법 및 중력침강법을 이용하였다. 원심분리법에 의해 균체를 회수하기 위해서 15 mL의 원심관에 응집 처리한 배양액 10 mL를 담아 45, 1100 혹은 1600×g에서 10분간 원심분리하였다. 원심분리하여 얻은 상등액의 OD를 650 nm에서 측정하였다. 여과법을 사용하는 경우에는 응집 처리한 세포 배양액을 체의 크기가 0.5, 0.1 및 0.05 mm인 3개의 체를 사용하여 연속적으로 여과시켰다. 각각의 체를 통과한 여과액의 흡광도를 650 nm에서 측정하였다. 또한, 중력침강법을 이용하여 균체를 회수하는 경우에는 응집 처리한 배양액 10 mL을 15 mL의 원심관에 넣고 1시간 동안 상온에서 정지시킨 후, 상등액의 OD를 상기의 방법으로 측정하였다. 응집제에 의한 흡광도의 영향을 배제시키기 위하여 균체가 없는 배양액에 응집제를 첨가하여 측정된 흡광도를

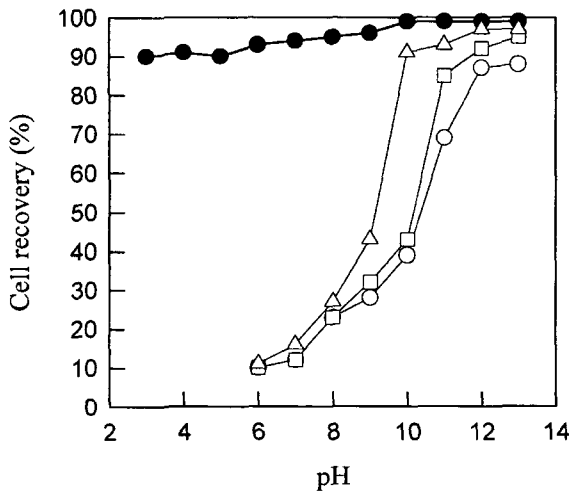


Fig. 1. Effect of pH on cell recovery using Fe₂(SO₄)₃ at 41 g cell/L.
 Symbols: ●, centrifugation at 45×g; sieve size (mm): △, 0.05; □, 0.10; ○, 0.5.

바탕값으로 사용하여 상기의 실험을 수행하여 얻은 흡광도 값의 보정에 사용하였다. 균체의 회수율은 응집제로 처리하지 않은 세포 배양액의 흡광도 값을 기준으로 하여 응집 처리하여 세포를 분리한 후의 상등액이나 여과액의 흡광도 차이로부터 계산하였다.

결과 및 고찰

응집 효율에 대한 배양액의 초기 pH의 영향

무기 응집제인 Fe₂(SO₄)₃을 pH 3-13으로 조절된 배양액(균체농도, 41 g/L)에 첨가하여 균체 회수율을 조사한 결과를 Fig. 1에 도시하였다. 첨가한 Fe₂(SO₄)₃ 응집제의 농도는 2 g Fe/L 이었다. 원심분리법에 의해 균체를 회수하는 경우, 45×g의 매우 낮은 원심력에서도 pH에 상관없이 90% 이상의 높은 균체 회수율을 얻을 수 있었다. 특히, pH 10 이상의 범위에서는 배양액의 균체를 98%까지 회수할 수 있었다. 여과법에 의해 균체를 회수할 경우 배양액의 pH가 증가할수록 균체 회수율이 증가하였는데, 이는 배양액의 pH가 높을수록 형성된 균체 flocc의 크기가 증가하였기 때문으로 사료되었다. 체의 크기가 작아질수록 균체 회수율도 증가하였고, 세 종류의 체에서 모두 최고 균체 회수율은 pH 13에서 관찰되었다. 특히,

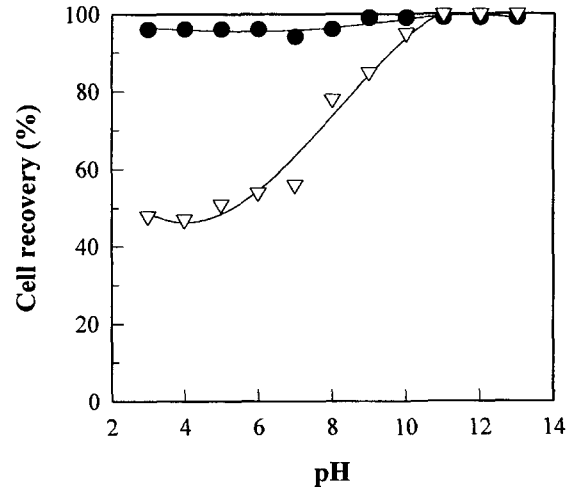


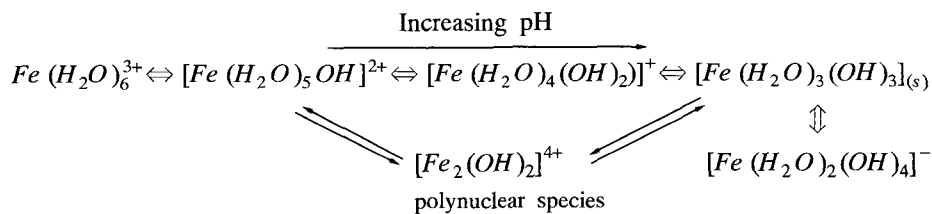
Fig. 2. Effect of pH on cell recovery using Ferix-3 at 41 g cell/L.
 Symbols: ●, centrifugation at 45×g; ▽, sedimentation.

pH 13에서 0.5 mm의 가장 큰 체를 이용하여도 균체를 약 80% 회수 가능한 결과는 이 조건하에서 형성된 균체 flocc의 크기는 약 80%가 0.5 mm이상임을 의미하였다. 0.05 mm의 작은 체를 이용할 경우에는 pH 10에서 13의 넓은 범위에서 균체를 90% 이상 회수할 수 있었다.

Fig. 2는 무기고분자 응집제인 Ferix-3를 배양액에 첨가했을 때, 응집 효율에 미치는 배양액의 pH의 영향을 나타낸 것이다. 원심분리(45×g)에 의해 pH 3부터 13까지 광범위한 영역에서 95% 이상의 균체 회수율을 얻을 수 있었다. 특히, pH 9 이상에서는 거의 100%에 가깝게 균체를 회수할 수 있었다. 또한, Ferix-3 응집제에 의해 형성된 균체 flocc는 밀도가 커서 중력침전에 의해서도 pH 3-6의 산성 영역에서도 50% 정도의 균체 회수율을 얻을 수 있었고, 균체회수율은 배양액의 pH가 높을수록 증가하였다. 배양액의 pH가 11 이상인 조건하에서는 중력침전법에 의해서 100%에 가까운 균체 회수율을 얻을 수 있었다.

상수나 폐수처리에서 일반적으로 널리 사용되고 있는 응집제인 Fe³⁺의 염은 물 속에 첨가하였을 때 Fe(H₂O)₆³⁺ 이온으로 해리되고, 아래 반응에 의해 pH가 증가함에 따라 가수분해 반응이 일어난다[1].

철계 응집제에 의한 콜로이드의 응집 반응은 첨가된 응집제들이 콜로이드의 표면 음전하를 중화시켜 콜로이



드를 불안정화 시키고, 금속염의 가수분해 산물의 용해도가 낮을 때 침전되는 sweep floc에 의해서 진행된다 [1]. 따라서, 응집반응은 Fe^{3+} 의 용해도와 밀접한 관련이 있다. Fe^{3+} 는 pH 8 근처에서 최소 용해도를 갖고, pH 2 이하에서는 가수분해되지 않은 Fe^{3+} 가 지배적으로 존재한다 [1, 4]. 따라서, 철계 응집제는 pH 2 이하의 pH 영역을 제외한 매우 넓은 pH 영역에서 응집반응이 진행되는 것으로 알려져 있다. Fig. 1과 2로부터 알 수 있는 바와 같이 두 종류의 철 응집제 모두 원심분리를 할 경우 넓은 영역에서 90% 이상의 높은 세포 회수율을 얻을 수 있다. 그런데, 세포 회수를 위한 배양액의 최적 pH는 10-13로 매우 높았다. Fig. 1과 2의 실험에서 pH가 3-9인 배양액에 응집제를 첨가하여 균체를 응집시킨 후 배양액의 pH는 2-4.5로 저하된 반면, pH가 10-13인 배양액의 경우는 응집반응 후 pH가 5-8로 저하되었다. 즉, 배양액의 pH가 높을수록 응집 반응 후의 pH가 Fe^{3+} 수산화물(응집 침전물)의 용해도가 낮은 중성 부근으로 낮아지기 때문에 상대적으로 큰 floc이 생성됨을 알 수 있었다. 이러한 사실은 Fig. 1과 2의 여과와 침강에 의한 균체 회수 결과에서도 확인할 수 있었다.

최적 응집제 첨가량

균체 농도가 105 g/L인 균체 배양액에 무기 고분자 응집제인 Ferix-3을 다양한 농도로 첨가하여 얻은 균체 회수율 Fig. 3(a)에 도시하였다. Ferix-3을 0.8 g Fe/L만 첨가하여도 배양액의 균체를 원심분리법에 의해 대부분의 균체를 회수할 수 있었다. 여과법을 이용해 균체를 회수하는 경우에도 Ferix-3을 1 g Fe/L이상 첨가하면 0.5 mm의 가장 큰 체에 의해서도 85%이상의 균체 회수율을 얻을 수 있었고, 0.05 mm 체를 사용하는 경우 90% 이상

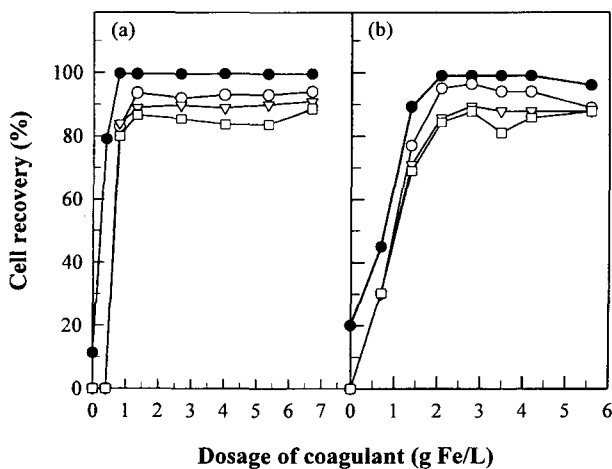


Fig. 3. Effect of dosage of coagulants on cell recovery. (a) Ferix-3, (b) $Fe_2(SO_4)_3$.
 Symbols: ●, centrifugation at $45\times g$; sieve size (mm): ○, 0.05; ▽, 0.10; □, 0.5.

의 균체 회수율을 얻을 수 있었다.

균체 농도가 82 g/L인 배양액에 $Fe_2(SO_4)_3$ 응집제를 다양한 농도로 첨가하여 원심분리법과 여과법에 의한 균체 회수율을 조사하였다(Fig. 3(b)). 두 회수방법 모두 $Fe_2(SO_4)_3$ 응집제의 농도 2 g Fe/L까지는 균체 회수율이 증가하였다. 2-4 g Fe/L의 범위에서는 원심분리법에 의해 거의 100%에 가까운 균체회수율 얻을 수 있었다. 여과법을 사용한 경우, 응집제의 농도가 2 g Fe/L을 초과하는 범위에서 체의 크기가 0.1, 0.5 mm일 때 85-90% 이상의 균체 회수율을 얻을 수 있었고, 0.05 mm 체의 경우 약 95%의 균체 회수율을 얻을 수 있었다.

이상의 결과로부터 무기 응집제인 $Fe_2(SO_4)_3$ 보다 무기 고분자 응집제인 Ferix-3이 적은 농도에서 응집 효율이 우수하다는 것을 알 수 있었다. 무기고분자화된 응집제들은 기존의 단분자 응집제 보다 분자량이 증가된 것으로 응집 및 침전능력이 우수하다. 고분자화되면 일반적으로 평균 charge가 증가함으로 동일한 몰수의 단분자보다 응집효과가 향상된다 [1, 8, 19].

Fig. 4에 배양액의 균체 농도별로 원심분리법에 의해 99%, 여과법에 의해 95% 이상의 균체회수율을 얻을 수 있는 최소 응집제 용량을 도시하였다. 균체 농도가 증가할수록 소요되는 응집제 용량도 증가하였다. 각 균체 농도별로 요구되어지는 응집제의 용량은 $Fe_2(SO_4)_3$ 보다 Ferix-3 응집제의 경우가 적었고 또한 두 종류의 응집제의 요구량의 차이는 균체 농도가 증가할수록 증가하는 경향을 보였다. $Fe_2(SO_4)_3$ 는 여과법과 원심분리법에서 최소 응집제 용량이 유사한 반면, Ferix-3은 여과법을 사용하는 경우 원심분리법보다 많은 양의 응집제가 요구되었다. 이러한 현상은 원심분리법은 floc만 형성되면 낮은 원심력에서도 대부분의 균체들이 회수되는 반면, 여과법은

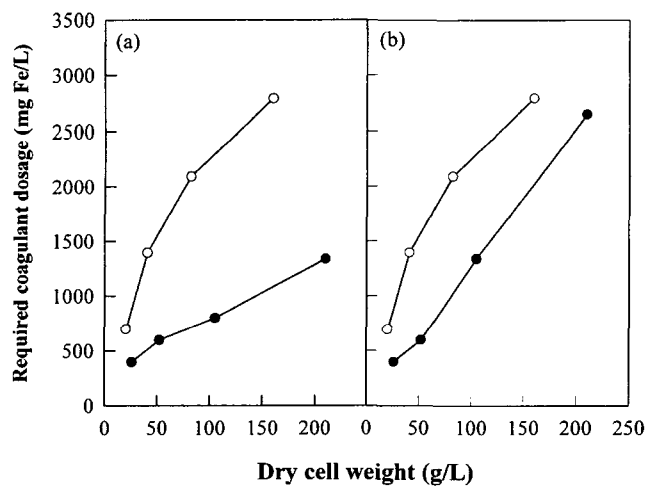


Fig. 4. Optimum dosage for 99% cell recovery by centrifugation and 95% cell recovery by filtration. (a) centrifugation at $45\times g$, (b) filtration with 0.05 mm sieve.
 Symbols: ○, $Fe_2(SO_4)_3$; ●, Ferix-3.

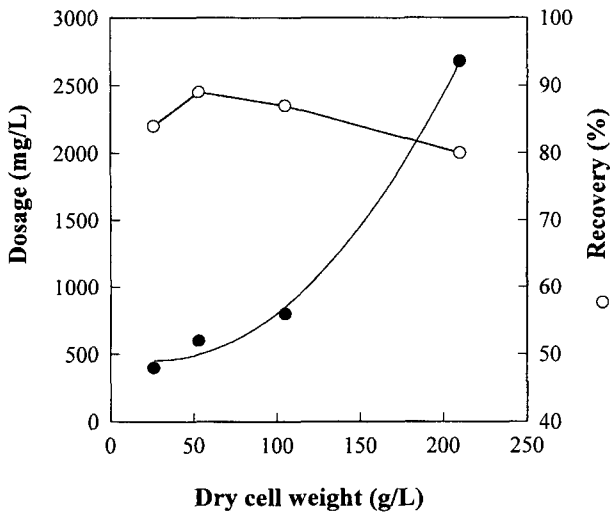


Fig. 5. Cell recovery obtained by the addition of Ferix-3 and sedimentation.

Symbols: ○, recovery (%); ●, dosage.

세포의 분리 효율이 생성된 flocc의 크기와 밀접한 관련이 있기 때문에 어느 정도 이상의 크기로 flocc이 증가할 수 있도록 응집제의 첨가가 필요하다는 것을 의미한다.

전술한 바와 같이 Ferix-3 응집제를 첨가할 경우, 중력 침전법에 의해서도 균체를 회수하여도 약 80% 이상의 높은 회수율을 얻을 수 있었다. Fig. 5는 각 균체농도별로 중력침전법에 의해 80% 이상의 회수율을 얻을 수 있는 Ferix-3 응집제의 최소량을 도시하였다. 균체농도가 26, 53, 105 및 210 g/L일 때 응집에 필요한 응집제의 최소요구량은 400, 600, 800 및 2680 mg Fe/L로 균체농도가 증가할수록 응집제 용량도 증가하였다. 또한, 105 g/L 이하의 균체농도에서는 균체농도에 비례해서 필요한 응집제량이 서서히 증가하였으나, 그 이상의 균체농도에서는 응집제 용량이 급격하게 증가하였다. 결과적으로 세포 농도가 증가할수록 침강법에 의한 균체의 회수율은 감소하는 경향이 있었다.

NH₄⁺ 농도가 응집에 미치는 영향

A. *eutrophus* 균주를 DO-stat법에 의해 glucose를 주입하면서 유가식 배양을 수행하면 배양액의 pH가 저하된다. 배양액의 pH를 6.8-7.0으로 조절하기 위해서 암모니아수를 첨가하므로 배양액 중의 NH₄⁺ 농도는 점점 증가하게 된다. 그러므로, Ferix-3 응집제에 의한 균체의 응집효율에 미치는 배지성분중의 NH₄⁺ 농도의 영향을 조사하는 것이 필요하다. 균체농도가 110 g/L인 배양액 중의 NH₄⁺ 농도를 0-9 g/L로 조절하여 원심분리 방법에 의해 균체를 회수하였을 때 98% 이상의 균체 회수율이 얻어지는 Ferix-3 응집제의 최소요구량을 Fig. 6에 도시하였다. 그 결과, 배양액 중의 NH₄⁺ 농도가 증가할수록 요구되

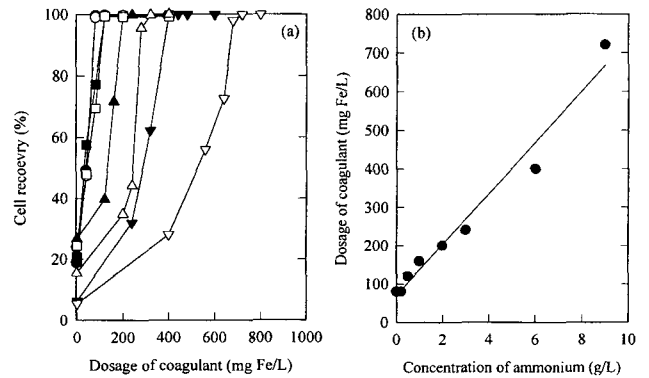


Fig. 6. Effect of ammonium concentration on cell recovery by centrifugation. (a) cell recovery, (b) dosage required for 95% cell recovery.

Ammonium concentration (g NH₄⁺/L): ●, 0.0; ○, 0.2; ■, 0.5; □, 1.0; ▲, 2.0; △, 3.0; ▼, 6.0; ▽, 9.0.

어지는 응집제의 양이 비례하여 증가함을 알 수 있었다. Fig. 6(b)의 기울기는 약 0.066 g Fe³⁺/g NH₄⁺ (0.0214 mmol Fe/mmol NH₄⁺)이다.

암모니아는 금속과 배위결합하여 착물을 형성하는 배위자(ligand)이다. 따라서, 철응집제와 암모니아가 배위결합을 하여 응집 침전물인 Fe(OH)₃의 용해도를 증가시키기 때문에 암모니아의 농도가 증가할 수록 응집제의 첨가량이 증가하는 것으로 사료된다[1]. Fe³⁺의 배위수(착물에서 중심금속원자나 이온을 둘러싸고 있는 비금속 원자의 수, coordination number)는 6이다. 따라서, 1 mol의 Fe³⁺가 최대 6 mol의 암모니아와 결합하여 배위 화합물(착화합물)을 생성한다고 할 때, 1 g(55.6 mmol)의 암모니아와 배위 결합을 위해 필요로 하는 Fe³⁺의 양은 0.517 g(9.27 mmol)이다. 그러나, 실제 반응에서 암모니아 농도 증가에 따라 세포의 응집을 일으키기 위해 추가로 공급된 응집제의 양은 0.066 g Fe³⁺/g NH₄⁺ (0.0214 mmol Fe³⁺/mmol NH₄⁺)로 이론치의 약 12.8% (NH₄⁺ 농도가 0 일 때 첨가된 80 mg Fe³⁺에 의한 배위 결합은 무시)이다. 이러한 결과는 Fe³⁺의 암모니아와의 배위 결합반응과 세포표면의 음전하와의 중화반응간에 경쟁관계에 있음을 의미한다. 또한, Fe³⁺ 뿐만 아니라 생성된 배위 화합물들과 암모니아도 세포표면의 음전하를 중화시키기 때문에 이론치보다 적은 양의 응집제가 필요한 것으로 사료된다. 결과적으로 배지 중에 응집제와 배위 화합물을 형성할 수 있는 배위자들(Cl⁻, OH⁻, NH₃, CO₃²⁻, SO₄²⁻)이 존재할 경우 응집 효율을 감소시키기 때문에 응집제 사용량이 증가된다. 따라서, 응집반응이 일어날 수 있는 최적 조건으로 배지의 pH를 조절할 때 NH₄OH 보다는 NaOH의 사용이 바람직한 것으로 사료된다.

세포의 응집이 일어나기 위해 필요한 응집제 투여량은 배지를 사용한 경우(Fig. 4)와 원심 분리하여 세정 과정

을 거쳐 증류수에 현탁시킨 경우와 차이가 많다(Fig. 6). 본 연구에서 사용된 배양액 중의 암모니아의 농도는 2 g/L 이었다. 세포 농도가 110 g/L 일 때 원심분리를 이용한 세포회수에 필요로 하는 응집제 첨가량을 Fig. 4와 6의 그림으로부터 비교해 보면, 증류수에 현탁한 세포액의 경우 암모니아 농도가 2 g/L 일 때 200 mg Fe/L의 응집제 투여가 필요하였다(Fig. 6). 반면에, 암모니아 농도가 2 g/L인 세포배양액에 Ferix-3 응집제를 첨가한 경우 약 750 mg Fe/L의 응집제 투여가 필요하였다(Fig. 4). 이와 같이 세포 배양액에 응집제 투여시 응집제 첨가량이 증가하는 배지의 성분과 밀접한 관련이 있는 것으로 사료된다. Weeks 등[22]은 citrate, yeast extract 등과 같은 배지 성분들이 응집제나 세포의 표면으로 흡착되어 응집과정을 강하게 방해하는 것으로 추정하였다.

요 약

*Alcaligenes eutrophus*의 세포배양액(23-210 g dry weight/L)으로부터 균체 회수 효율에 미치는 철계 응집제 첨가 효과에 대해 연구하였다. 응집제로는 무기 응집제인 $Fe_2(SO_4)_3$ 과 무기 고분자 응집제인 Ferix-3를 사용하였다. 철계 응집제는 3-13의 넓은 pH 범위에서 응집효과를 나타내었으며, 배양액의 pH가 증가할수록 floc의 크기는 증가하였다. 균체 회수를 위한 배양액의 최적 pH는 10-13이었다. 최적 응집제의 첨가량은 세포농도가 증가함에 따라 증가하였는데, 무기응집제인 $Fe_2(SO_4)_3$ 보다는 무기고분자응집제인 Ferix-3이 적은 농도에서 응집효율이 우수함을 알 수 있었다. 210 g/L의 세포농도 배양액에 Ferix-3을 1300 mg Fe/L를 첨가하면 45×g의 낮은 원심력에 의해 95% 이상의 균체를 회수 가능하였다. 응집제의 요구량은 배양액 중의 NH_4^+ 농도에 비례하여 증가하였고, 배양액 중의 NH_4^+ 농도가 1 g 증가하면 응집제가 0.066 g Fe^{3+} 정도 더 요구되었다.

감사의 글

본 연구는 1996년도 선도기술과제(G-7) 연구비에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. Benefield, L. D., J. F. Judkins, and B. L. Weand. 1982. *Process Chemistry for Water and Wastewater Treatment*. Prentice-Hall, Inc., Englewood Cliffs, New Jersey.
2. Doi, Y., A. Tamaki, M. Kunioka, and K. Soga. 1988. Production of copolyesters of 3-hydroxybutyrate and pentanoic acids. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **28**: 330-334.
3. Doi, Y., K. M. Tamaki, and K. Soga. 1987. Biosynthesis

- of terpolyesters of 3-hydroxybutyrate, 3-hydroxyvalerate, and 5-hydroxyvalerate in *Alcaligenes eutrophus* from 5-chloropentanoic and pentanoic acids. *Makromolekulare Chem. Rapid Commun.* **8**: 631-635.
4. Gregory, J. 1985. Precipitation and coagulation in waste treatment, pp. 785-799. In M. Moo-Young (ed.), *Comprehensive Biotechnology: The Principles, Applications, and Regulations of Biotechnology in Industrial, Agriculture and Medicine*, vol. 4, Toronto, Pergamon Press.
5. Hahn, S. K., Y. K. Chang, B. S. Kim, K. M. Lee, and H. N. Chang. 1993. The recovery of poly(3-hydroxybutyrate) by using dispersions of sodium hypochlorite solution and chloroform. *Biotechnol. Techniques* **7**: 209-212.
6. Hahn, S. K., Y. K. Chang, and S. Y. Lee. 1995. Recovery and characterization of poly(3-hydroxybutyric acid) synthesized in *Alcaligenes eutrophus* and recombinant *Escherichia coli*. *Appl. Environ. Microbiol.* **61**: 34-39.
7. Hangii, U. J. 1990. Pilot scale production of PHB with *Alcaligenes latus*, pp. 65-70. In E. A. Dawes (ed.), *Novel Biodegradable Microbial Polymers*, Kluwer Academic, Dordrecht, the Netherlands.
8. Jiang, J. Q., N. J. D. Graham, and C. Harward. 1994. Preliminary evaluation of polyferric sulfate as a coagulant for surface water treatment, pp. 71-93. In R. Klute and H.H. Hahn (eds.), *Chemical Water and Wastewater Treatment III*, Springer-Verlag, New York.
9. 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.
10. Kim, B. S., S. C. Lee, S. Y. Lee, H. N. Chang, Y. K. Chang, and S. I. Woo. 1994. Production of 3-hydroxybutyric-co-3-hydroxyvaleric acid by fed-batch culture of *Alcaligenes eutrophus* with substrate control using on-line glucose analyzer. *Enzyme Microbiol. Technol.* **16**: 556-561.
11. Kim, B. S., S. Y. Lee, and H. N. Chang. 1992. Production of poly-β-hydroxybutyrate by fed-batch culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biotechnol. Lett.* **14**: 814-816.
12. Kim, S. W., P. Kim, H. S. Lee, and J. H. Kim. 1996. High production of poly-β-hydroxybutyrate (PHB) from *Methylobacterium organophilum* under potassium limitation. *Biotechnol. Lett.* **18**: 25-30.
13. Lee, S. Y. 1996. Bacterial polyhydroxalkanoates. *Biotechnol. Bioeng.* **49**: 1-14.
14. Lee, S. Y., H. N. Chang, and Y. K. Chang, 1994. Construction of plasmids, estimation of plasmid stability, and use of stable plasmids for the production of poly-3-hydroxybutyric acid by recombinant *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **32**: 203-211.
15. Park, C. H. and V. K. Damodaran. 1994. Biosynthesis of poly-3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate from ethanol and pentanol by *Alcaligenes eutrophus*. *Biotech-*

- nol. Prog.* **10**: 615–620.
16. Page, W. J. 1989. Production of poly- β -hydroxybutyrate by *Azotobacter vinelandii* strain UWD during growth on molasses and other complex carbon sources. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* **31**: 329–333.
 17. Page, W. J. 1992. Production of polyhydroxyalkanoates by *Azotobacter vinelandii* UWD in beet molasses culture. *FEMS Microbiol. Rev.* **103**: 149–158.
 18. Page, W. J. and A. Cornish. 1993. Growth of *Azotobacter vinelandii* UWD in fish peptone medium and simplified extraction of poly- β -hydroxybutyrate. *Appl. Environ. Microbiol.* **59**: 4236–4244.
 19. Pinheiro, H. and J. M. S. Cabral. 1992. Sedimentation, pp 97–131. In J. F. Kennedy and J. M. S. Cabral (eds), *Recovery Processes for Biological Materials*, Wiley, New York.
 20. Preusting, H., R. van Houten, A. Hoefs, E. K. van Langenberghe, O. Favre-Bulle, and B. Witholt. 1993. High cell density cultivation of *Pseudomonas oleovorans*: Growth and production of poly(3-hydroxybutyrate) in two-liquid phase batch and fed-batch systems. *Biotechnol. Bioeng.* **41**: 550–556.
 21. Ryu, H. W., S. 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.
 22. 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**: 687–699.
 23. Zhang, H. V. Obias, K. Gonyer, and D. Dennis. 1994. Production of polyhydroxyalkanoates in sucrose-utilizing recombinant *Escherichia coli* and *Klebsiella* strains. *Appl. Environ. Microbiol.* **60**: 1198–1205.

(Received January 20, 1998)