

# 11

## 생성물의 회수와 정제

### 11.1 생성물의 회수와 정제 전략

발효 및 세포배양 생성물은 세 종류로서 세포자체, 세포 외 성분(extracellular product) 과 세포 내 성분(intracellular product)이다. 생성물의 회수와 정제 공정의 난이도는 생성물

분리에 영향을 미치는  
주요인자

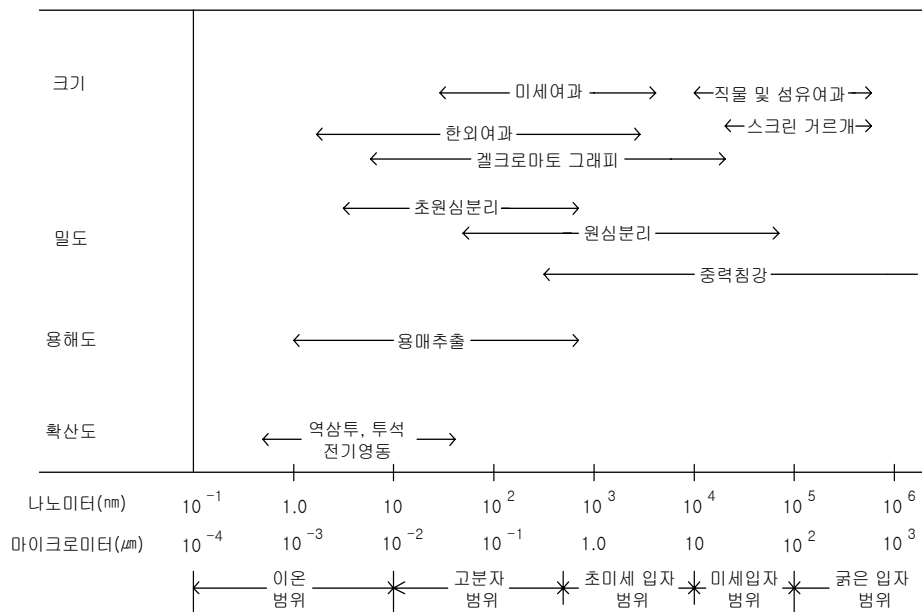


그림 11.1 생성물 입자의 크기별로 추천되는 분리공정

의 성질에 크게 좌우된다. 어떤 성분들은 아주 높은 순도를 요구하기 때문에 여러 단계의 회수와 정제공정이 필요하고 따라서 제조비용에서 차지하는 부분이 크다.

회수, 정제방법은 생성물의 크기와 성질에 따라 다르다. 세포자체가 목표 생성물일 때에는 그 절차가 비교적 용이하다. 여과, 원심분리, 응집 등의 방법을 사용하여 세포를 회수하면 된다. 얻고자 하는 생성물이 세포 외 성분일 때에는 세포 등 불용성 성분을 제거하고 난 후에 배지를 추출, 흡착, 침전, 한외여과, 크로마토그래피 등의 방법으로 가용성 생성물을 분리하고 나서 정제의 마무리 단계로서 결정화와 건조를 이용한다. 목표 생성물이 세포 내 성분일 때에는 여과, 원심분리, 응집 등을 이용하여 세포를 회수한 후 파쇄하여야 한다. 세포를 파쇄하는 방법에는 기계적 방법과 비기계적 방법이 있다. 세포를 파쇄시키면 쏟아져 나온 세포의 내용물을 추출, 흡착, 침전, 한외여과, 크로마토그래피 등을 이용하여 분리정제한다. 생성물 입자의 크기별로 추천되는 분리공정을 그림 11.1에 요약하였다.

세포 내 효소(intracellular enzyme)의 분리 단계는 다음과 같다.

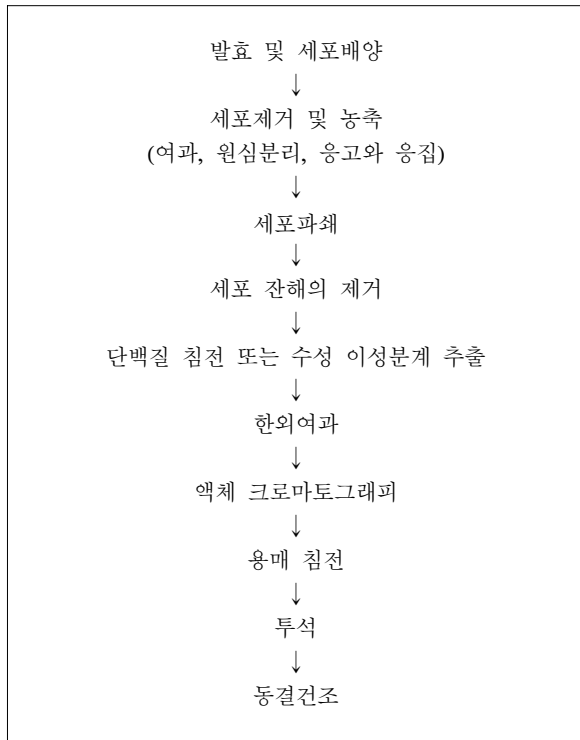


그림 11.2 세포 내 효소의 분리정제 단계

## 11.2 불용성 입자의 분리

생성물 회수의 첫 번째 단계인 불용성 입자 분리(separation of insoluble particles)는 입자의 크기, 밀도, 용해도, 그리고 확산도와 같은 물리화학적 성질의 차이를 이용한다. 세 포의 분리에 사용되는 주요방법으로는 여과, 원심분리, 응고, 응집 등이 있다.

### 11.2.1 여과

여과(filtration)는 압력차(pressure difference)가 구동력이 되어 입자의 크기를 기준으로 하는 분리공정이다. 즉, 발효액을 여과매체를 통해 흘려보내서 세공보다 큰 입자는 막을 통과하지 못하고 액체와 작은 입자들은 통과함으로써 액체로부터 고체입자가 분리되는 공정이다. 시간이 지나면서 막위에는 막을 통과하지 못한 큰 입자가 퇴적되어 케이크(cake)를 형성한다. 여과속도는 케이크와 여과매체의 저항값에 의해 결정된다. 즉,

$$\frac{1}{A} \frac{dV_f}{dt} = \frac{\Delta p}{\mu(L/k)} \quad (11.1)$$

여기서  $A$ 는 여과면의 면적,  $V_f$ 는 얻어진 여과액 부피,  $t$ 는 시간,  $\Delta p$ 는 여과기에서의 압력손실,  $\mu$ 는 여과액 점도,  $L$ 은 여재의 두께,  $k$ 는 투과율이다. 여기서,  $L/k$ 은 여과매체에 의한 저항( $R_m$ )과 케이크에 의한 저항( $R_c$ )의 합을 나타낸다. 그런데  $R_m$ 은  $R_c$ 에 비해 매우 작고,  $R_c$ 는 여액의 부피에 비례한다. 즉,

$$\frac{L}{k} \simeq R_c = \frac{\alpha \rho_c V_f}{A} \quad (11.2)$$

여기서,  $\alpha$ 는 케이크의 비저항(specific resistance)이고  $\rho_c$ 는 여액의 단위부피당 케이크의 질량이다. 식 (11.2)를 식 (11.1)에 대입해 적분하면 다음과 같은 식을 얻는다.

$$t = \frac{\mu \alpha \rho_c}{2\Delta p} \left( \frac{V_f}{A} \right)^2 \quad (11.3)$$

식 (11.3)에 따르면 용액의 점도( $\mu$ )가 높아지면 일정량의 용액을 여과하는 시간은 길어진다. 케이크의 압축률이 증가할수록 여과저항계수는 증가하게 되고, 그 결과 운전의 어려움이 나타난다. 대부분의 발효액은 비뉴턴 유체(non-Newtonian)의 성질을 가지며 압축성이 높은 케이크를 형성하기 때문에 열처리, 용액첨가 등의 전처리를 통해 발효액의 여과성을 개선시킨다. 예를 들어 페니실린 발효 생성물 중 균사는 열처리로 응고시켜서 여과성을 증진시킨다.

여과공정 운전에 영향을 주는 요인으로는 여과액의 성질(특히 점도와 밀도), 고형물의 성상(크기, 모양, 입도분포, 충전상태), 고체와 액체의 비, 운전 규모, 운전의 방법 등이 있다. 세포분리는 또한 미세여과나 한외여과에 의해서 이루어질 수 있다. 이 방법에 대해서는 11.4.4 절에 자세히 소개한다. 세포의 회수에 주로 사용되는 여과기는 가압여과기(filter press)와 회전 진공여과기(rotary drum filter)가 있다.

### 11.2.2 원심분리

여과로는 처리 속도가 느리거나 위생적인 연속공정을 수행해야 하는 경우에는 원심분리(centrifugation)를 이용한다. 원심분리는 원심력에 의해 0.1에서 100 $\mu\text{m}$  사이의 크기를 갖는 입자를 분리하는 데 사용된다.

원심분리기에는 관형과 원판형의 두 가지가 있다. 관형 원심분리기는 원통형 회전요소만으로 구성되어 있다. 발효액은 원심분리기의 하부로 공급되며 분리된 용액은 원심분리기의 상부로 유출되고, 고형물질은 원심분리기의 내부 벽면에 축적된다. 축적된 고형물질은 수작업으로(manually) 분리한다. 원판형 원심분리기는 생물 분리공정에서 가장 많이 쓰이는 형태의 원심분리기이며, 연속조업이 가능하다는 장점이 있다. 길이는 짧고 폭이 넓은 형태로서 축을 중심으로 회전하다 부유입자들은 원판 표면에 붙게 되며 분리효율이 증가하게 된다.

입자와 입자 간의 상호작용을 무시할 수 있는 묽은 세포 현탁액에서의 원심분리를 생각하자. 원심력에 의해 액체에서 고체입자를 침강시키는 데 작용하는 주요 힘은 원심력( $F_C$ ), 유체에 의해 고체입자에 작용하는 항력(drag force,  $F_D$ ), 그리고 부력( $F_B$ )이다. 입자가 종말 침전속도(terminal settling velocity)에 도달하면, 입자에 작용하는 세 힘은 서로 평형을 이룬다. 즉,

$$F_C = F_D + F_B \quad (11.4)$$

이 된다. 그런데

$$F_C = \frac{\pi}{6} D^3 \rho_p \frac{r\omega^2}{g_c} \quad (11.5)$$

$$F_B = \frac{\pi}{6} D^3 \rho_f \frac{r\omega^2}{g_c} \quad (11.6)$$

$$F_D = \frac{C_D}{2g_c} \rho_f U_{0c}^2 A \quad (11.7)$$

여기서,  $\rho_p$ 는 입자의 밀도,  $\rho_f$ 는 액체의 밀도,  $r$ 은 중앙회전축에서 반지름 방향으로의

거리,  $\omega$ 는 회전각속도( $=2\pi Nr$ )이다. 또한 식 (11.7)에서,  $C_D$ 는 항력계수,  $U_{0c}$ 는 원심력장에서 유체와 입자 사이의 상대속도 또는 입자의 종말속도,  $A$ 는 유체흐름 방향과 수직인 입자의 단면적이다. 구의 경우에는  $A = \left(\frac{\pi}{4}\right)D_p^2$ 이며,  $D_p$ 는 입자의 직경이다.

구형입자에 대하여  $Re_p < 0.3$ 이면  $F_D$ 는 Stokes 방정식에 의해 주어진다. 즉,

$$F_D = 3\pi\mu D_p U_0 \frac{1}{g_c} \quad (11.8)$$

식 (11.4)에 식 (11.5), (11.6), 그리고 (11.8)을 대입하여 정리하면 종말 침전속도가 구해진다.

$$U_{0c} = \frac{r\omega^2 D_p^2 (\rho_p - \rho_f)}{18\mu} \quad (11.9)$$

식 (11.9)에 의하면 Stoke법칙에 의해 뉴턴 유체에 현탁되어 있는 구형입자의 침강속도는 입자 직경의 제곱에 비례한다. 입자의 종말속도에 영향을 미치는 인자는 입자와 액체와의 밀도차, 입자직경, 액체의 점도 등이다. 즉, 입자의 직경이 클수록, 입자와 액체와의 밀도차가 클수록, 액점도가 낮으면 낮을수록 종말속도는 빨라지게 된다. 그러나 실제로 분리대상 입자는 미립자로서 밀도도 낮고, 많은 경우 고점도의 액에 현탁되어 있다.

입자농도가 높을 때, 입자 간의 상호작용에 의해 입자군을 형성하는 간섭침강이 일어나며 원심력장에서 입자의 종단속도는 다음 식 (11.10)에 의해  $U_{0c}$ 에서  $U_c$ 로 감소한다.

$$\frac{U_c}{U_{0c}} = \frac{1}{1 + \alpha' a^{1/3}} \quad (11.10)$$

여기서,  $\alpha$ 는 입자 모양의 함수이며,  $\alpha'$ 은  $\alpha$ 와 경험적으로 연관되며 입자의 모양에 의존한다.

### 11.2.3 응고와 응집

응고(coagulation)와 응집(flocculation)은 보통 원심분리, 중력에 의한 침강(sedimentation), 또는 여과공정을 수행하기 전에 이들 분리공정의 효율을 증가시키기 위해 간단한 전해질을 가하여 세포 덩어리를 형성하는 데 이용한다. 응고는 콜로이드로부터 작은 덩어리를 형성하는 것이고, 응집은 작은 덩어리를 보다 큰 입자로 집적(agglomeration)시키는 것이다. 응집에 사용하는 응집제의 예로는 염화칼슘(calcium chloride), 음이온성 다가 전해질인 polystyrene sulfate, 양이온성 다가 전해질인 polyethylene imine 등이 있다. 점토, 활성탄, 또는 실리카같은 미세 고체입자는 응고를 위해 핵생성 자리를 공급한다.

### 11.3 세포파쇄

원하는 생성물이 세포 내에 있다면 세포를 발효액으로부터 분리한 후 세포 내 생성물을 방출시키기 위해 세포를 파쇄해야 한다. 세포는 단단한 세포벽으로 둘러 싸여있고 내부 삼투압이 높아 파쇄가 어렵다. 세포파쇄(cell disruption) 방법에는 기계적인 방법과 비기계적인 방법이 있다.

#### 11.3.1 기계적 방법

기계적인 세포파쇄 장치에는 초음파 분쇄기, 압착기, 구슬 분쇄기 등이 있다.

초음파 분쇄기(sonicator)는 16 kHz 이상의 음파를 발생시켜 압력의 변동으로 박테리아 세포의 세포벽과 세포막을 파쇄한다. 간균(bacilli)이 구균(cocci)보다 더 파쇄하기 쉬우며 그람음성균이 그람양성균보다 파쇄가 용이하다. 초음파 분쇄는 효소를 변성시키는 경우가 있다.

압착기는 실험실 규모에서 많이 사용되는 스테인레스 스틸로 된 속이 빈 실린더 모양이다. 여기에 세포 덩어리(cell paste)를 채운 후 세포를 고압하에서 실린더 바닥에 있는 니들 밸브(needle valve)를 통해 대기압 상태로 압출하면 파쇄된다.

고속 구슬 분쇄기(bead mills)는 유리 또는 쇠구슬로 채워진 분쇄실(grinding chamber) 형태이며 모터에 의해 구동축에 부착된 원판 또는 임펠러를 회전시켜 구슬을 교반하여 높은 전단력과 충격력에 의해 분쇄한다.

대규모의 세포파쇄 공정에는 볼밀(ball mill)이나 고압 분쇄기가 사용된다.

#### 11.3.2 비기계적 방법

리소자임(lysozyme)같은 효소를 이용하여 박테리아의 세포벽을 용해시키는 방법과 세포를 천천히 동결한 다음 녹여서 세포막을 파쇄하는 방법이 세포 내 효소를 방출하는데 사용된다. 배지의 삼투압을 변화시켜 그람음성균의 주변 세포질(periplasmic) 단백질을 방출시키기도 한다.