

생물분리

생성물의 회수와 정제 전략

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

Biofuel related separation

- Ethanol: extracellular product
 - centrifugation
 - distillation
 - evaporation
- Cellulase: enzyme separation
 - intracellular product
 - traditional protein separation

발효 및 세포배양



세포제거 및 농축(여과, 원심분리, 응고와 응집)



세포파쇄



세포 잔해의 제거



단백질 침전 또는 수성 이성분계 추출



한외여과



액체 크로마토그래피



용매 침전



투석



동결건조

여과

- 여과(filtration)는 압력차(pressure difference)가 구동력이 되어 입자의 크기를 기준으로 하는 분리공정이다.
- 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.

- 용액의 점도(μ)가 높아지면 일정량의 용액을 여과하는 시간은 길어진다. 케이크의 압축률이 증가할수록 여과저항계수는 증가하게 된다.
- 대부분의 발효액은 비뉴턴 유체(non-Newtonian)의 성질을 가지며 압축성이 높은 케이크를 형성하기 때문에 열처리, 용액첨가 등의 전처리를 통해 발효액의 여과성을 개선시킨다.
- 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.
- 세포의 회수에 주로 사용되는 여과기는 가압여과기(filter press)와 회전 진공여과기(rotary drum filter)가 있다.

원심분리

- 여과로는 처리 속도가 느리거나 위생적인 연속공정을 수행해야 하는 경우에는 원심분리(centrifugation)를 이용한다. 원심분리는 원심력에 의해 0.1에서 100 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.
- 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 물은 세포 현탁액에서의 원심분리를 생각하자.
- 원심력에 의해 액체에서 고체입자를 침강시키는데 작용하는 주요 힘은 원심력(FC), 유체에 의해 고체입자에 작용하는 항력(drag force, FD), 그리고 부력(FB)이다. 입자가 종말 침전속도(terminal settling velocity)에 도달하면, 입자에 작용하는 세 힘은 서로 평형을 이룬다.
- Stoke법칙에 의해 뉴톤 유체에 현탁되어 있는 구형입자의 침강속도는 입자 직경의 제곱에 비례한다. 입자의 종말속도에 영향을 미치는 인자는 입자와 액체와의 밀도차, 입자직경, 액체의 점도 등이다.
- 입자의 직경이 클수록, 입자와 액체와의 밀도차가 클수록, 액점도가 낮으면 낮을수록 종말속도는 빨라지게 된다.

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.

세포파쇄

- 생성물이 세포 내에 있다면 세포를 발효액으로부터 분리한 후 세포 내 생성물을 방출시키기 위해 세포를 파쇄해야 한다. 세포파쇄(cell disruption) 방법에는 기계적인 방법과 비기계적인 방법이 있다.
- 기계적인 세포파쇄 장치에는 초음파 분쇄기, 압착기, 구슬 분쇄기 등이 있다.
- 초음파 분쇄기(sonicator)는 16kHz 이상의 음파를 발생시켜 압력의 변동으로 박테리아 세포의 세포벽과 세포막을 파쇄한다.
- 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.
- 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.

액-액 추출(용매추출)

- 원료 용액(원용매에 용질이 녹아 있는 상태) 중에 함유된 용질을 추제로 용해하여 분리하는 조작이다. 추출조작에는 회분식과 연속식이 있으며 연속식에는 향류 다단추출(counter-current multistage extraction)과 병류 다단추출법(cocurrent multistage extraction)이 있다.
- 회분식은 원료와 추제를 탱크에 넣고 충분히 교반한 후 가만히 정치하여 추출상과 추잔상을 분리하는 방법이다. 이때 용질은 원료(추잔상)로부터 추출상으로 이동한다. 추출은 물질전달이 잘 일어날 수 있도록 두 개의 상이 잘 접촉하도록 하는 것이 중요하다.
- 원하는 추출을 수행하기 위하여 소요되는 단수를 구하는 방법은 우선 삼각도표상에 용질의 원용매 및 추제에 대한 용해도 곡선(solubility curve)을 도시한다. 그리고 물질 수지를 세워 조작선을 구한다. 그리고 용해도 곡선(평형선)과 조작선을 교대로 이용하여 이론 단수를 구한다.

- 한 성분 A 가 서로 섞이지 않는 두 액체 사이에 분배될 때 두 상(two phases)에서의 농도비를 분배계수(K_A)라 한다. 즉,

$$K_A = Y_A / X_A$$

여기서, Y_A 와 X_A 는 각각 추출상과 추잔상에서의 용질(A)의 농도이다.

- 1단 추출에 대하여 K_A 가 일정하고 추출상(Extract)과 추잔상(Raffinate)이 섞이지 않으며 R 과 E 를 추잔상과 추출상이라고 가정하면, 추출되는 용질에 대한 물질수지식은 아래와 같다.

$$X_1/X_0 = 1/(1 + EK_A/R)$$

침전 (precipitation)

- 침전 (precipitation)은 세포파쇄 후 세포내 생성물을 분리정제하기 위하여 사용하는 첫 번째 공정으로 단백질 또는 항생제 회수에 사용된다.
- 침전을 일으키는 첫째 방법은 Na_2SO_4 , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 같은 무기염을 첨가하여 용액의 이온 세기를 증가시켜 단백질을 염석 (salting-out) 시키는 것이다. 이때 첨가된 이온은 물과 더 강하게 상호 작용하여 단백질분자를 침전시킨다. 단백질의 용해도는 다음식으로 표시된다.
- $$\log S_0/S_1 = -K I$$
- 여기서, S 는 용액 내 단백질의 용해도, I 는 용액의 이온세기, S_0 는 $I=0$ 일 때의 단백질 용해도, 그리고 K 는 염석상수이다.

흡착(adsorption)

- 흡착(adsorption)이란 기체나 액체 내에 있는 용질을 흡착제 표면에 결합시켜 제거하는 방법이다. 흡착공정은 극히 묽은 농도의 용액 중 용질의 분리에 적합하며, 발효 배지로부터 생성물을 회수하기 위해 사용할 수 있다.
- 흡착이란 용질이 액체상으로부터 흡착제(고체상)의 표면으로 이동하여 계면(interface)에 머물게 되는 현상이므로 흡착을 증가시키기 위해서 흡착제는 단위부피(질량)당 표면적이 넓은 기공이 많은 물질인 활성탄, 이온교환수지, 고분자 흡착제 등이 사용된다.
- 기공들은 일반적으로 대단히 작기 때문에 내부 표면적이 외부 면적보다 훨씬 크다. 흡착을 이용하여 혼합물을 분리할 수 있는 것은 분자량, 모양, 또는 극성의 차이때문에 일부 분자들이 다른 것들보다 표면에 더 강하게 붙들리거나 또는 기공이 너무 작아서 큰 분자들이 들어갈 수 없기 때문이다. .

- 흡착현상에는 여러 기작이 포함될 수 있는데, 물리적인 흡착에서는 반데르발스힘같은 약한 힘이 우세하나, 이온교환흡착에서는 강한 이온결합을 사용한다
- 주어진 온도에서 흡착제 단위질량당 흡착될 수 있는 최대량은 배지 내의 용질의 농도가 커지면 그에 따라 증가하는데, 이 관계를 흡착등온선(adsorption isotherm)을 이용하여 정량적으로 설명할 수 있다. 흡착등온선의 예로는 Langmuir 등온선, Freundlich 등온선, BET 등온선 등이 있다. Langmuir 등온선은 기체가 약하게 흡착되었을 때 상당히 잘 맞는 식이며, BET 등온선은 다공성 흡착제에 다분자 층이 흡착되는 경우에 사용된다.

한외여과(ultrafiltration, UF)

- 한외여과(ultrafiltration, UF)는 제약, 화학, 식품산업 등에서 백신, 발효 생성물, 효소, 기타 단백질 분리에 많이 사용하는 에너지 효율적이고 경제적인 분리방법으로 보통 침전공정에 이어서 사용한다.
- 한외여과막은 비등방성구조(anisotropic structure)로서 미세구멍이 있는 얇은 표피와 두껍고 다공성이 높은 지지체구조가 밀착되어 있다. 이 얇은 표피층은 용질에 대한 선택성(selectivity)을 제공하는 반면에 더 두꺼운 층은 기계적인 지지기능을 한다.
- 한외여과 시스템은 막의 양면에 걸리는 압력차에 의해 진행되는 공정으로 고분자량의 용질(분자량 2,000 ~ 500,000달톤의 단백질 등)은 막을 통과하지 못하고 물과 저분자량의 용질은 막을 통과한다. 그러므로 막표면과 유체본체 사이에 농도 기울기(concentration gradient)가 생기며 농도분극(concentration polarization)을 형성하게 된다.

결정화(crystallization)

- 균일한 액상으로부터 일정한 모양과 크기를 갖는 고체입자를 형성하는 것이다. 의약품과 유기정밀 화학제품들은 결정화된 형태로 판매된다. 결정화는 일정 크기의 결정을 만들어 내기 때문에 여과 또는 건조 같은 마무리 단계가 잘 이루어지게 한다.
- 실험실 규모에서 결정화는 용해도 한계 가까이 용질이 녹아 있는 투명한 농축 용액을 먼지가 없는 환경에서 서서히 냉각하면 작은 결정이 형성된다. 흔히 'seeds'라고 하는 더 작은 결정을 가하여 결정의 형성을 돕는다. 냉각을 계속하면 더 많은 결정이 형성되고 원래 있었던 결정은 더욱 커진다.
- 결정화는 침전과 유사하지만 결정화는 모양과 크기가 일정한 입자를 생성하는 데 비하여 침전은 모양과 크기가 일정하지 않은 무정형(amorphous) 고체입자를 생성한다. 결정이란 고도의 정돈된 입자로서 공간격자라는 규칙적인 3차원 배열(array)로 이루어져 있다.

결정화에 관계되는 네 가지 개념(포화, 순도, 핵 생성, 단일 결정성장)

- 포화(saturation)란 용액 내에 열역학적으로 안정되게 녹아 있을 수 있는 용질의 최대 농도이다. 포화는 고체결정상과 주변의 용액이 동일한 화학포텐셜(chemical potential)을 가짐으로 이루어지는 상평형(phase equilibrium)의 결과이다. 이러한 평형 데이터는 보통 용해도-온도 그림으로 표시된다
- 순도 : 추출에서 사용되는 분배계수(distribution coefficient)와 유사한 K_A 를 분리 대상물질 A 에 대하여 도입하면
- $K_A = (\text{결정 중에 포함된 용질 } A \text{의 질량} / \text{결정형성 후 남은 여액 중에 포함된 용질 } A \text{의 질량})$, 불순물 B 에 대한 추출인자 K_B 는
- $K_B = (\text{결정 중에 포함된 용질 } B \text{의 질량} / \text{결정형성 후 남은 여액 중에 포함된 용질 } B \text{의 질량})$
- 분리인자(separation factor) β 는 두 추출인자의 비(ratio)로서 β 가 크면 효과적인 분리가 된다.

- 결정핵 생성속도 : 새로운 결정이 형성되는 속도 (nucleation rate)를 설명하기 위하여 공학적인 관점에서 쉽게 적용할 수 있는 것이 power law model이다. 이 모델은 일종의 경험식으로서 핵 생성속도(J)를 과포화도의 지수승으로 표시한다.
- 단일 결정성장: 기존의 단일 결정(single crystal)이 성장하는 속도를 수학적으로 묘사하기 위하여 2단계 성장 모델(two step growth model)이 있다. 첫 단계는 물질전달 단계(mass transfer step)로서 용액 내에 용존해 있는 분자가 농도차에 의해 결정입자의 표면으로 확산하여 이동한다고 본다. 두 번째 단계는 입자표면으로 이동한 분자가 표면의 격자에 최종적으로 고정되는 과정인 표면반응 단계(surface reaction step)로 구성되어 있다.