

## 실관막에 의한 미생물의 Cross Flow 여과

이울락·장호남

한국과학기술원 화학공학과  
(1987년 9월 9일 접수, 1987년 12월 24일 채택)

### Cross Flow Cell Filtration by a Hollow Fiber Membrane

Youl Lark Lee and Ho Nam Chang

Department of Chemical Engineering, Korea Advanced Institute of Science and Technology,  
P.O. Box 131, Chongryangri, Seoul 130-650, Korea  
(Received 9 September 1987; accepted 24 December 1987)

#### 요 약

미생물이나 단백질의 농축 수단으로 Cross flow(CF) 여과는 매우 유용하게 사용되어 왔는데 단백질의 경우 이에 대한 연구가 많이 진행되어 겔층 이론에 의해서 설명될 수 있었지만 미생물 균체에 있어서는 주로 농축과 같은 응용면의 연구가 이루어져서 본 연구에서는 미생물의 Cross flow 여과에 대해서 단백질의 경우처럼 이론적, 조직적인 연구를 수행하였다. 미생물 균체의 CF 여과는 단백질과 달리 겔층 이론에 의해서 설명될 수 없었으며 여과속도는 일정압력차 이상에서는 압력차에 영향을 받지 않았고 유속에 대해서는 대장균과 효모의 경우 각각  $U^{0.5}$ ,  $U^{0.8}$ 에 비례하였다. Stokes-Einstein 식에 의해 구한 미생물 균체의 확산도에 의해서 예측한 여과속도는 실험치보다 훨씬 작은 값을 나타내었는데 이와 같이 서로 큰 차이를 나타내는 것은 단순 확산 이외의 입자 이동현상이 존재하는 것으로 Tubular pinch 효과나 겔층 자체의 미끄러짐과 같은 다른 현상의 존재 가능성을 예측할 수 있었다.

**Abstract**—Cross flow filtration(CFF) has been successfully employed as a means of concentrating microbial cells and proteins. While the CFF of proteins has been investigated thoroughly and could be explained in terms of the gel layer theory, the investigations on the microbial cells have been limited to the applications like concentration. In this study we aimed at studying the characteristics of CFF of microbial cells more systematically. Unlike in proteins, CFF of microbial cells could not be explained in terms of the gel layer theory. Fluxes were independent of the pressure difference which exceeded a certain level, but they increased with the flowrate in the hollow fiber and were proportional to  $U^{0.5}$  and  $U^{0.8}$  in the cases of *E. coli* and yeast respectively. Gel layer theory employing the diffusivity based on the Stokes-Einstein equation was applied to the system. But the predictions were far apart from the experimental data. Thus we suggested that the causes of the discrepancies between the theory and the experiment might be due to the tubular pinch effect or other phenomena such as gel layer slippage.

#### 1. 서 론

막 분리공정은 그 원리 및 공정이 간단하고 공정도

중에 상변화가 일어나지 않아 에너지 절약이나 분리물 질의 안정성면에서 매우 유익한 공정이다. 최근 고분자 막의 발달로 막 분리공정은 구멍크기의 조절, 기능성기

의 부착 등에 의해서 기체, 액체, 콜로이드 입자, 전해액 등의 분리에 광범위하게 이용되고 있다[1]. 특히 최근 생물공학 산업의 발달로 이 방법으로의 응용 및 연구가 활발히 진행되고 있는데 단백질, 아미노산, 알콜, 미생물균체의 분리, 농축에 이용되고 있다. 미생물 발효산물의 분리, 농축뿐만 아니라 전통적 회분식 발효공정의 문제점인 기질저해나 생산물저해를 줄여주고 연속식 발효에서의 wash-out 현상을 방지하기 위해서 흘러나가는 미생물 균체를 분리 재순환시켜 고농도 배양을 하는 시스템에 적용하게 되었다[2, 3, 4]. 이와 같은 미생물 발효산업에는 주로 한외여과막과 미세 다공성 막이 사용되는데 통상의 dead-end 분리공정에서는 분리가 진행됨에 따라 막 표면에 찌꺼기가 쌓여 분리효율이 급격히 떨어지지만 막 표면에 평행하게 유체를 흘려주어 쌓이는 찌꺼기를 제거해 주는 Cross flow 여과방식을 적용하여 효율면에서 100배 이상의 향상을 보았다[5]. 또한 막의 구조면에서 구멍의 막힘이 적고 여과에 대한 막 자체의 저항이 적은 비대칭성 막의 등장으로 더욱 더 성능을 향상시킬 수 있었다[6]. Cross flow 여과는 처음에는 다공성 막을 써서 Alumina나 Kaoline clay와 같은 광물질의 분리에 이용되었다[7, 8]. 지금까지의 Cross flow에 대한 연구는 주로 단백질과 같은 고분자 물질에 관한 것으로 겔층 이론에 의해서 성공적으로 해석할 수 있었지만[9, 10] 미생물 입자에 대한 연구는 주로 농축과 같은 응용면에 치우쳐서 이론적, 체계적 분석이 이루어지지 못했다[11]. 본 연구에서는 입자라는 면에서 단백질과 그 성질이 다른 대장균 및 효모 균체를 사용해서 미생물 균체의 Cross flow에 미치는 균체농도, 유속, 압력차 등의 변수의 영향을 분석하고 겔층 이론의 적용 가능성에 대해 살펴보다 실제 응용에 보다 유리한 운전 조건을 제공하고자 하였다.

## 2. 이론적 배경

### 2-1. 겔층 이론

단백질과 같은 고분자나 콜로이드 입자의 한외여과에 있어서 여과속도는 추진력과 저항의 관계에 의해서 주어지며 여기서 추진력은 막 양면의 압력차이며 저항은 막 및 겔층의 저항으로 다음의 (1)식과 같이 나타낼 수 있다.

$$J = \frac{\Delta P}{R_m + R_g} \quad (1)$$

그런데  $R_m$ 은 거의 변화가 없으므로 여과속도는  $R_g$ 에

의해서 결정된다. 일반 막 분리공정에서는 농도분극 현상이 일어나는데 이는 용질이 막 표면에 쌓여서 농도 기울기를 형성하는 것으로 역삼투와 같은 경우에는 높은 삼투압을 나타내어 분리 효율을 떨어뜨린다. 한외여과의 경우에 있어서도 마찬가지로의 현상이 일어나는데 다만 용질이 고분자나 콜로이드 입자이므로 이들이 막 표면에 겔층을 형성하여 삼투압은 크지 않으나 여과에 대한 저항층을 형성한다. 여과가 진행되면 막 표면에 입자가 축적되어 더 이상 입자의 농도가 증가할 수 없는 지경에 이르면 겔 상태가 되는데 그 이상의 입자의 축적은 단지 겔층의 두께만 두껍게 할 뿐이다. 이 때 겔의 농도는 용질이나 용매의 성질에 의해서 결정되는 물리량인데 이와 같은 현상을 겔분극 이론(gel polarization theory) 혹은 겔층 이론(gel layer theory)이라 한다. 이 현상을 도식적으로 나타내면 Fig. 1과 같은데 정상상태에서 경계층(boundary layer)에서 용질에 대한 물질수지를 세우면 (2)식과 같이 되며 여기에  $J_s = 0$  ( $C_p = 0$ , 즉 용질이 완전히 걸러지므로)과 경계조건 (3), (4)를 적용하면 결국 (5)식을 얻을 수 있다.

$$J_s = J C - D \frac{dC}{dx} \quad (2)$$

$$x = 0 : C = C_b \quad (3)$$

$$x = g : C = C_g \quad (4)$$

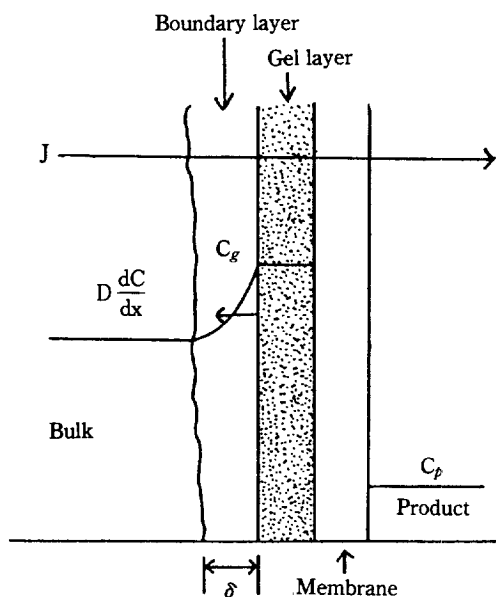


Fig. 1. Schematic diagram of the gel layer.

$$J = K \ln \left( \frac{C_s}{C_b} \right) \quad (5)$$

(5)식에서  $C_s$ 는 일정하므로 여과속도 ( $J$ )는  $K$ 와  $C_b$ 에 의해서 결정된다.  $K$ 는 유체역학적 인자에 의해서 결정되므로  $J$ 는 압력차에 영향을 받지 않으며 압력차가 커지면 단지 젤층의 두께만 두꺼워질 뿐 여과속도에는 변화가 없다.

한편 물질전달계수  $K$ 는 층류에서의 열의 대류전달에 관한 Leveque의 해[12]에 의해서 산출될 수 있는데 (6)식과 같이 주어진다. 그리고 확산계수  $D$ 는 콜로이드와 같은 입자의 경우 다음 (7)식의 Stokes-Einstein 식에 의해서 구할 수 있다.

$$K = 1.62 \left( \frac{UD^2}{d_h L} \right)^{0.33} \quad (6)$$

$$D = \frac{kT}{6 \pi \mu r_p} \quad (7)$$

### 2-3. Tubular pinch 효과

콜로이드용액이 관속을 흐를 때 그것의 점도로 부터 예측한 압력강하보다 낮은 압력강하를 나타내며 그와 같은 용액의 명목 점도는 관의 지름, 길이, 유체의 속도에 따라 다른 값을 갖는다[13]. 이것은 관의 벽 가까이 이의 입자가 안쪽으로 이동했기 때문이며 실제적인 예로 모세유리관을 흐르는 피의 적혈구 농도는 관의 입구나 출구의 농도보다 낮는데 이는 적혈구가 관의 중심으로 이동해서 혈장보다 빨리 이동하기 때문이다[14]. 이와 같은 현상을 tubular pinch 효과라 하는데 입자의 크기, 관의 크기, 유체의 속도에 따라 그 효과의 정도가 다르다.

## 3. 실험

### 3-1. 실험 장치

실험 장치는 Fig. 2에서와 같이 Stainless steel통을 feed tank로 해서 각 부분이 tygon tube에 의해서 연결되어 있으며 용액은 peristaltic pump에 의해서 순환시켰다. 밖으로 나온 여과액은 peristaltic pump에 의해 다시 feed tank로 되돌려지며 용액은 자기교반기로 저어주고 압력은 압축 공기에 압력조절기를 달아 조절했다.

### 3-2. 실험 재료

실관막은 독일 Berghof사의 polyacrylamide 재질

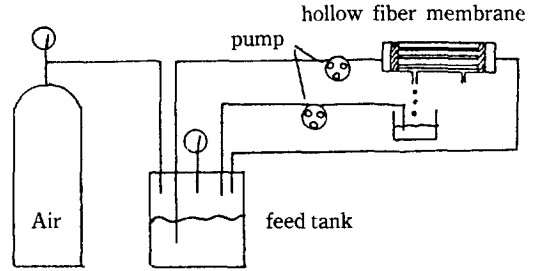


Fig. 2. Schematic diagram of the experimental set-up.

의 비대칭 한외여과막 (I. D. = 0.6 mm, O. D. = 1.1 mm, M. W. Cut-off = 50,000)을 사용했으며 미생물은 대장균과 효모를 썼는데 일단 발효조에서 배양한 다음 다른 성분에 의한 영향을 제거하기 위하여 원심분리 후 다시 Buffer saline용액 (0.85% NaCl, 0.6% NaHPO, 0.3% KH PO, pH=7.0)에 다시 녹여서 사용하였으며 저장시 냉장고 (4°C)에 보관하였다.

### 3-3. 실험 방법

실관막은 유리관에 넣어 polyurethane으로 potting 해서 사용했으며 실온 (25°C)에서 원하는 균체농도, 유속, 압력차를 조절한 다음 30분 간격으로 5분씩 여과액을 받아 측정한 후 앞뒤의 변화가 2%이내 일 때 이 값을 평형 여과속도로 간주했다. 그리고 여과액은 균체 농도를 일정하게 유지시켜 주기 위하여 pump로 feed tank에 되돌려 주었다.

## 4. 결과 및 토론

먼저 시간의 경과에 따른 여과속도의 변화를 살펴보면 Fig. 3과 같이 여과속도는 시간에 따라 매우 빠른 속도로 감소하였다. 여과속도를 초기부터 연속적으로 측정할 수 없어서 30초 간격으로 측정했기 때문에 실제로는 그 변화가 더 심할 것이다. 시간이 지남에 따라 막에 찌꺼기가 쌓이게 되어 차츰 여과속도가 떨어지고 그에 따라 막으로 이동하는 용질(입자)의 속도도 줄어들어 역으로 이동해 가는 속도와 같을 때 정상상태에 도달하게 된다. 또한 압력차가 높을수록 초기 여과속도는 크지만 그만큼 빨리 감소하게 되어 낮은 압력의 경우와 같아진다. 따라서 장시간 조업하는 막 분리공정의 경우 조업중 막을 청소하는 하나의 방법으로 쓰이는 back flushing은 특히 비대칭성 막으로 높은 압력차에

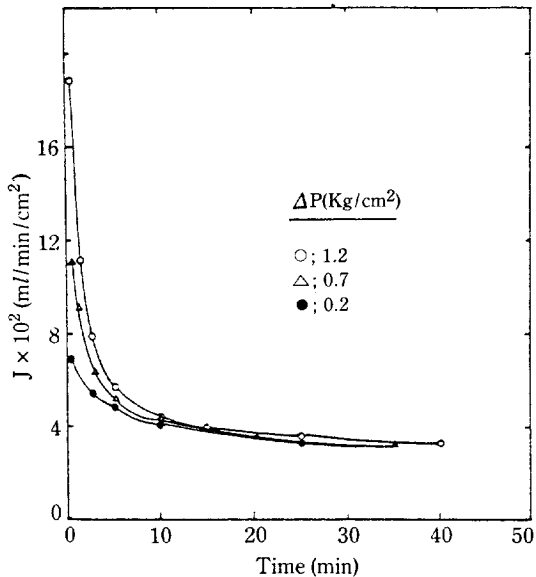


Fig. 3. The effects of pressure difference on the initial flux:  $U = 42$  cm/sec,  $C = 3.5$  g-*E. coli*/l

서 조압할 경우에는 일시적으로 여과속도가 증가하지만 곧 원상복귀되며 back flushing시 거꾸로 들어가는 용액의 양까지 고려한다면 조작의 번거로움에 비해서 큰 이득이 없다고 할 수 있다. Fig. 4는 순환속도(유속)의 변화에 따른 여과속도의 변화를 관찰한 것으로

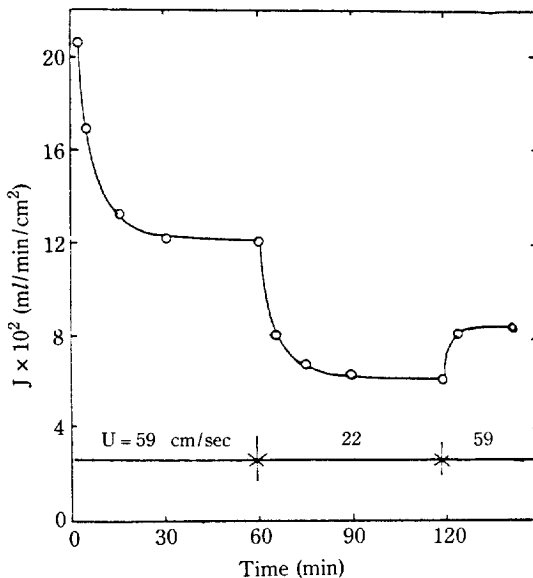


Fig. 4. Flux changes with time and its reproducibility under two different feed velocities;  $C = 2$  g-*E. coli*/l,  $\Delta P = 0.7$  Kg/cm<sup>2</sup>.

높은 유속에서 낮은 유속으로 그리고 다시 원래의 유속으로 변화시켰을 때 원래의 여과속도로 돌아가는지의 여부를 실험한 것이다. 그림처럼 유속을 내릴 경우 여과속도는 급격히 감소하여 새로운 평형값을 갖지만 다시 유속을 올렸을 경우 쉽게 원래의 값으로 복귀하지 않았다. 여과속도를 결정하는 것은 찌꺼기층의 두께로 유속이 높은데서 낮은 값으로 변하면 입자의 역이동이 급격히 떨어져서 저항층의 두께가 두꺼워지며 이에 따라 여과속도가 떨어지지만 다시 유속을 올릴 경우 겔층(gel layer)의 성질이 점도가 크고 서로 응집력이 있어서 그 두께가 쉽게 감소하지 않기 때문이라 생각된다. 여기서는 단지 겔층의 변화만을 살펴보았는데 처음 사용한 막을 씻음 다음 증류수로 여과속도를 측정해 본 결과 사용전에 비해서 20% 정도의 감소를 가져왔지만 반복해서 사용하면서 측정해 본 결과 5% 이내의 변화만 관찰되었으며 더 이상의 감소는 없었다. 이것은 미생물 파편과 같은 미세입자의 구멍에 막히거나 단백질 등이 막에 흡착되는데 초기에는 그 양이 많지만 반복 사용함에 따라 평형에 이르기 때문이라 생각된다.

Fig. 5는 막 사이의 압력차와 균체농도에 따라 여과속도가 어떻게 변화하는가를 나타낸 것인데 일정 압력차 이상에서는 평형 여과속도에 도달하여 압력차에 무관하게 나타났다. 즉 평형의 조건은 용질의 이동이 평형을 이루어야 하므로 용질의 역이동은 압력차에 무관함을 말해준다. 압력차가 커지면 일시적으로 여과속도

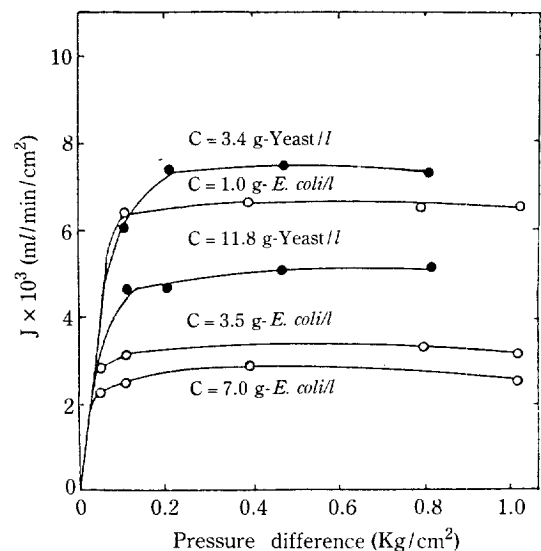


Fig. 5. Flux changes with pressure difference for the different cell concentrations;  $U = 42$  cm/sec.

가 증가하지만 젤층의 두께가 증가해서 평형 여과속도로 돌아오는 것이다. 농도가 증가함에 따라 여과속도는 점점 감소했으며 압력차가 낮은 부분에서는 여과속도가 압력차에 민감하여 순수한 물의 여과속도와도 큰 차이를 나타내지 않았다. 이것은 낮은 압력차에서는 젤층이 얇아-식(1)에서  $R_m$ 에 비해서  $R_g$ 가 매우 적어서 여과속도가 압력차에 거의 비례했기 때문으로 생각된다. 한편 낮은 압력차에서의 또 하나의 특징으로 평형 여과속도로의 전이가 일정압력차에서 상당히 급격히 일어나는 것을 볼 수 있는데 이는 낮은 압력차에서는 유체의 흐름에 의해서 막으로 이동되는 입자의 양보다 이를 제거할 수 있는 힘이 더 커서 막에 젤층이 거의 형성되지 않으나 일단 제거될 수 있는 양(back transport)과 막으로 이동되는 양이 같아지면 여기서 부터 젤층이 형성되어 평형 여과속도에 도달하기 때문이라 생각된다.  $C=1.0\text{ g-E. coli/l}$ ,  $\Delta P=0.8\text{ Kg/cm}^2$ 의 경우  $R_g/R_m=125/10=12.5$ 에 이르러 거의 모든 저항은 젤층에 있음을 알 수 있었다. 한편 효모의 경우에도 대장균과 마찬가지로의 경향을 나타내었다. Fig. 6에서는 대장균과 효모에 대해 젤층 이론의 적용가능성 여부를 알아보기 위해서  $J$  vs.  $\ln C_0$ 의 관계를 그린 것인데 단백질의 한외여과에서와 같은 선형을 나타내지 않았다. 그리고 농도가 높은 곳에서는 여과속도가 약간의 불안정성을 나타내어 외삽법에 의해  $C_g$ 를 구할 수 없었다. 이와 같이 단백질과 차이를 나타내는 것은 근본적으로 단백질은 분자 영역에 속하지만 미생물은 입자라는 사실 때문이라 생각된다.

한편 입자의 확산도(diffusivity)를 Stokes-Einstein식에 의해 구해서 식(6)에 대입해서  $K$ 값을 구했으며 이를 다시 식(5)에 대입하여 예상 여과속도를

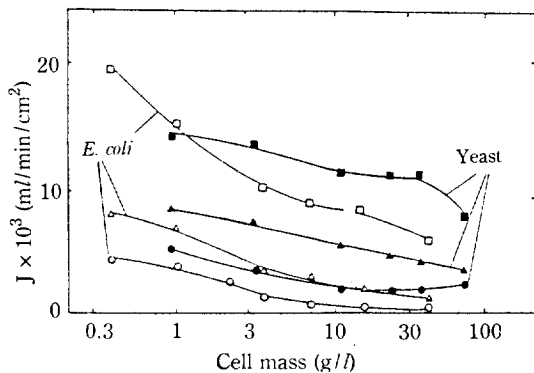


Fig. 6. Flux changes with the cell concentration;  $\square, \blacksquare$ :  $U=59\text{ cm/sec}$ ;  $\triangle, \blacktriangle$ :  $U=42\text{ cm/sec}$ ;  $\circ, \bullet$ :  $U=22\text{ cm/sec}$ .

구한 결과  $D=2.2 \times 10^{-9}\text{ cm}^2/\text{sec}$ ,  $K=7.2 \times 10^{-4}\text{ cm/min}$ ,  $J=1.66 \times 10^{-3}\text{ cm/min}$ 의 값을 얻었다. 한편 이 때 사용한 자료는 다음과 같다.  $C_0=20\text{ g/l}$ ,  $C_g=200\text{ g/l}$ ,  $\mu=0.02\text{ poise}$ ,  $r_p=0.5\mu\text{m}$ ,  $U=42\text{ cm/sec}$ ,  $d=0.06\text{ cm}$ ,  $L=12\text{ cm}$ . 이와 같은 값들은 실제 실험치  $J=3.3 \times 10^{-2}\text{ cm/min}$ 의 1/20에 불과하다. 물론 대장균은 살아있는 생물로 움직일 수 있으며 Stokes-Einstein식에 의해 구한  $D$ 의 오차를 고려해 준 다하더라도 너무 큰 차이이며 단순히 Diffusion 차원에서 설명하기는 곤란하다. 이와 같은 사실은 이동성도 없고 입자의 크기도 약 4배나 되는 효모의 경우 대장균의 1/4의  $D$ 값을 갖지만 오히려 더 큰 여과속도를 갖는 것을 봐도 입증된다. 이와 같이 효모에 대한 여과속도가 대장균에 대한 여과속도보다 빠른 것은 입자가 커서 공극물이 큰 것이 그 원인의 하나로 생각된다. 결국 이와 같은 사실로 부터 막으로 부터의 입자의 역이동(제거)이 단순한 확산에 의해서만 일어나는 것이 아니고 다른 어떤 기작(mechanism)에 의해서도 일어남을 알 수 있다. 그 하나의 가능성으로 tubular pinch effect를 들 수 있으며 다른 하나는 막에 대한 직각 방향의 이동(확산)뿐만 아니라 막에 평행한 방향으로 이동할 가능성이다. 즉 막위에 쌓인 젤층이 점도가 매우 높기는 하지만 유체의 흐름에 의한 전단응력(shear stress)이 작용해서 젤층 자체가 미끄럼 이동을 할 가능성이 있다. 그러나 이러한 현상들이 어느 정도의 비

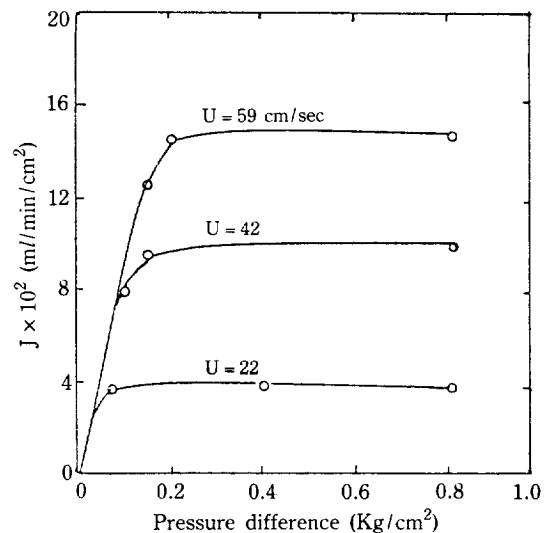


Fig. 7. Flux changes with pressure difference for the different feed velocities;  $C=1\text{ g-E. coli/l}$

중으로 일어나는지 현재로서는 분명치 않다.

Fig. 7은 대장균의 경우 여과속도에 대한 유속의 영향을 나타낸 것인데 그 영향이 매우 컸다. 이것을 정량적으로 그린 것이 Fig. 8인데 기울기가 0.5 이상으로 겔층 이론에 의한 이론치 0.33보다 높았다. 이는 확산

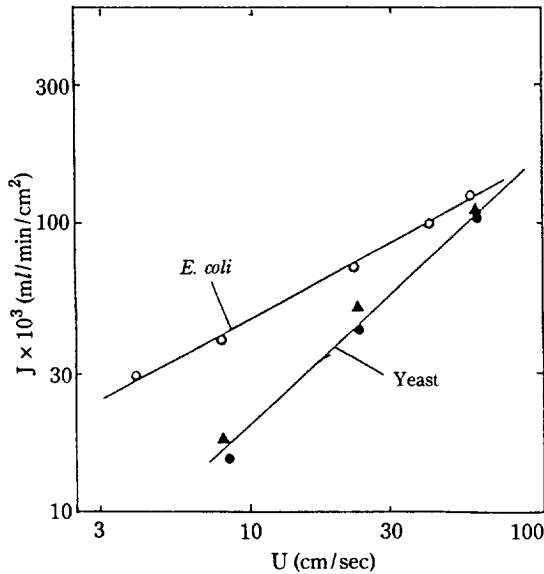


Fig. 8. The effects of the feed velocity on the flux;  
○ :  $C = 1 \text{ g/l}$ , ▲ :  $11.8 \text{ g/l}$ , ● :  $23.6 \text{ g/l}$ .

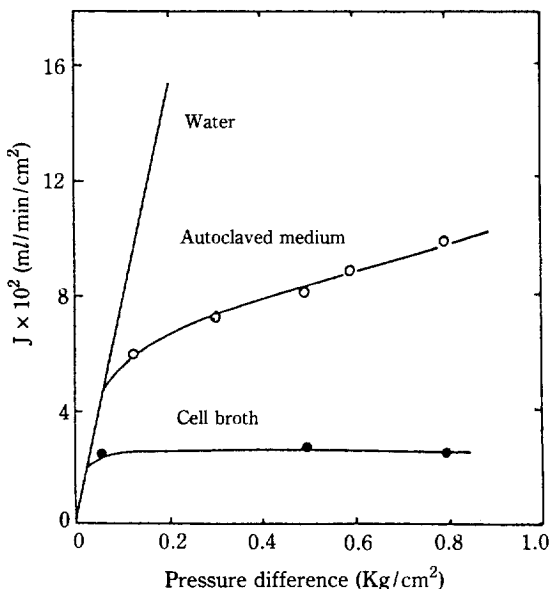


Fig. 9. Flux differences among the water, autoclaved medium and cell broth.

이외의 유속의 영향을 더 크게 받는 기작이 있음을 시사해 준다. 그리고 Fig. 5와 Fig. 7로부터 균체의 농도가 낮을수록, 유속이 빠를수록 평형 여과속도에 도달하는 압력차가 높음을 알 수 있다. 이는 결국 막 여과조업시 균체농도가 높고 유속이 느릴수록 압력차를 크게 유지할 필요가 없음을 나타내는 것으로 일반통념과 반대의 현상이다. Fig. 9는 순수한 물과 배지 및 발효 후의 미생물 용액의 압력차에 대한 여과속도의 영향을 본 것으로 물은 역시 압력차에 비례하고 배지의 경우 물보다 떨어지는데 이는 배지중에 단백질이나 입자들이 들어있기 때문이라 생각된다.

## 5. 결 론

위의 사실들로부터 다음과 같은 결론을 얻을 수 있었다.

1. 평형 여과속도는 막의 저항에 큰 영향을 받지 않았으며 겔층의 저항에 의해서 결정되었다.
2. 일정 압력차 이상에서는 여과속도는 압력차에 영향을 받지 않았으며 균체의 농도와 유속에 의해서 결정되었다.
3. 단백질에 적용되는 겔층 이론은 미생물 입자의 여과에는 성공적으로 적용할 수 없었으며 단순한 확산 이외의 입자의 역이동 기작의 가능성을 보였다.
4. 여과속도는 유체의 유속에 큰 영향을 받았으며 대장균과 효모의 경우 각각  $U^{0.5}$ ,  $U^{0.6}$ 에 비례했다.
5. 평형 여과속도에 이르는 압력차는 균체의 농도가 높을수록 유속이 느릴수록 낮았다.
6. 막의 세척수단으로써의 back flushing은 일시적 효과밖에 거둘 수 없었다.

## NOMENCLATURE

- $C$  : concentration of solute,  $\text{g/l}$   
 $C_b$  : concentration of solute at the bulk stream,  $\text{g/l}$   
 $C_g$  : concentration of solute at the gel layer,  $\text{g/l}$   
 $C_p$  : concentration of solute at the permeate,  $\text{g/l}$   
 $D$  : diffusivity of solute,  $\text{cm}^2/\text{sec}$   
 $d$  : equivalent hydraulic diameter,  $\text{cm}$   
 $J$  : flux of the permeate,  $\text{cm}^3/\text{min}$   
 $J_s$  : flux of solute,  $\text{g}/\text{cm}^2 \cdot \text{min}$   
 $K$  : mass transfer coefficient,  $\text{cm}/\text{sec}$   
 $k$  : Boltzman constant ( $1.38 \times 10^{-16} \text{ erg. deg}$ )  
 $L$  : channel length,  $\text{cm}$   
 $\Delta P$  : pressure difference between inner and outer parts of the membrane,  $\text{Kg}/\text{cm}^2$

$R_g$  : resistance of the gel layer, Kg.min/ml  
 $R_m$  : resistance of the membrane, Kg.min/ml  
 $r_p$  : radius of the particle, cm  
 $T$  : absolute temperature, °K  
 $x$  : distance from the membrane, cm  
 $\mu$  : fluid viscosity, poise  
 $U$  : fluid velocity, cm/sec

## REFERENCES

1. Patrick Meares: "Membrane Separation Processes," Elsevier Sci. Pub. Co., New York (1969).
2. Gu Man Bok: M.S. Thesis, KAIST, Seoul, Korea (1986).
3. Lee, Chang Woo: Ph. D. Thesis, KAIST, Seoul, Korea (1987).
4. Margaritis, A. and Wilke, C.R.: *Adv. Appl. Microbiol.*, **12**, 121 (1970).
5. Henry, J.D.: "Recent Developments of Separation Science," Vol. 2, CRC Press, New York (1972).
6. Michaelis, A.S.: *Chem. Eng. Prog.*, **64**, 31 (1968).
7. Zhevnovatyi, A.I.: *Int. J. Chem. Eng.*, **4**, 124 (1964).
8. Dahlheimer, J.A.: *IEC Proc. Des. Dev.*, **9**, 566 (1970).
9. Porter, C.: *Ind. Eng. Chem. Prod. Res. Dev.*, **11**, 234 (1972).
10. Deverreux, N. and Hoare, B.B.: *Biotechnol. Bioeng.*, **28**, 422 (1986).
11. Kroner, K.H., et al.: *Proc. Biochem.*, **19**, 67 (1984).
12. Leveque, M.A.: *Ann. Mines*, **13**, 201 (1928).
13. Eirich, R.R.: *Rheology, Theory and Appl.*, Vol. 4, Acad. Prec., New York, N.Y. (1967).
14. Segre, G. and Silberg, A.: *Nature*, **187**, 209 (1961).