



저작자표시-비영리-동일조건변경허락 2.0 대한민국

이용자는 아래의 조건을 따르는 경우에 한하여 자유롭게

- 이 저작물을 복제, 배포, 전송, 전시, 공연 및 방송할 수 있습니다.
- 이차적 저작물을 작성할 수 있습니다.

다음과 같은 조건을 따라야 합니다:



저작자표시. 귀하는 원저작자를 표시하여야 합니다.



비영리. 귀하는 이 저작물을 영리 목적으로 이용할 수 없습니다.



동일조건변경허락. 귀하가 이 저작물을 개작, 변형 또는 가공했을 경우에는, 이 저작물과 동일한 이용허락조건하에서만 배포할 수 있습니다.

- 귀하는, 이 저작물의 재이용이나 배포의 경우, 이 저작물에 적용된 이용허락조건을 명확하게 나타내어야 합니다.
- 저작권자로부터 별도의 허가를 받으면 이러한 조건들은 적용되지 않습니다.

저작권법에 따른 이용자의 권리는 위의 내용에 의하여 영향을 받지 않습니다.

이것은 [이용허락규약\(Legal Code\)](#)을 이해하기 쉽게 요약한 것입니다.

[Disclaimer](#)

2010年 2月
碩士學位論文

고정화 *Pseudomonas aeruginosa*를
이용한 질소제거에 관한 연구

朝鮮大學校大學院

環境工學科

朴 庚 勳

고정화 *Pseudomonas aeruginosa*를
이용한 질소제거에 관한 연구

A Study on the Removal of Nitrogen by Immobilized
Pseudomonas aeruginosa

2010年 2月 日

朝鮮大學校大學院

環境工學科

朴 庚 勳

고정화 *Pseudomonas aeruginosa*를
이용한 질소제거에 관한 연구

指導教授 崔炯一

이 論文을 工學碩士學位申請 論文으로 제출함.

2009年 10月 日

朝鮮大學校大學院

環境工學科

朴 庚 勳

朴庚勳의 碩士學位論文을 認准함

委員長	朝鮮大學校 教授	<u>鄭 京 勳 印</u>
委 員	朝鮮大學校 教授	<u>申 大 允 印</u>
委 員	朝鮮大學校 教授	<u>崔 炯 一 印</u>

2009 年 11 月

朝鮮大學校大學院

목 차

List of Tables	iii
List of Figures	iv
ABSTRACT	vi
I. 서 론	1
II. 이론적 고찰	4
1. 생물학적 탈질화	3
1) 탈질화 반응	3
2) 탈질화 영향인자	5
2. 미생물 고정화법	9
1) 고정화법의 정의 및 역사	9
2) 고정화법의 종류 및 특성	11
3) 포괄고정화법의 원리	15
4) 포괄고정화 재료 및 조건	16
III. 실험방법 및 재료	17
1. 실험재료	17
1) 균주	17
2) 합성배지	17
2. 고정화 재료 및 방법	18
3. 실험장치	19
1) 회분식 실험장치	19
2) 연속식 실험장치	20
4. 실험방법	21
5. 분석방법	23

IV. 결과 및 고찰	24
1. 회분식 실험	24
1) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 균체농도에 따른 NO ₃ -N 제거	24
2) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 고정화 비드크기에 따른 NO ₃ -N의 제거	26
3) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 충진율에 따른 NO ₃ -N의 제거	28
4) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 C/N비에 따른 NO ₃ -N의 제거	30
5) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 탄소원에 따른 NO ₃ -N의 제거	32
6) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 NO ₃ -N의 농도에 따른 제거	34
7) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 pH에 따른 NO ₃ -N의 제거	36
8) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 온도에 따른 NO ₃ -N의 제거	38
2. 연속식 실험	40
1) 고정화 <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3의 NH ₄ -N, NO ₃ -N의 연속 제거	40
V. 결론	42

List of Tables

Table 1. Relationships for nitrate dissimilation and growth in denitrification reactions.....	7
Table 2. Comparison of energy yields of nitrate dissimilation vs oxygen respiration for glucose.....	8
Table 3. The applied range of the immobilized enzymes and microorganisms.....	14
Table 4. The comparative of feature by the immobilized method.....	19
Table 5. Composition of synthetic wastewater.....	21
Table 6. Analytical methods and parameters.....	28

List of Figures

Fig. 1. Schematic diagram of the immobilized method.....	13
Fig. 2. Procedure for immobilization of <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3.....	20
Fig. 3. Schematic diagram of the batch process.....	21
Fig. 4. Schematic diagram of the continuous process.....	22
Fig. 5. Effect of cell amounts in the immobilized beads on the removal of NO ₃ -N at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	27
Fig. 6. Effect of bead size on the removal of NO ₃ -N by immobilized <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	29
Fig. 7. Effect of bead amount on the removal of NO ₃ -N at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	31
Fig. 8. Effect of bead amount on the removal of NO ₃ -N by immobilized <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	33
Fig. 9. Effect of different carbon sources on the removal of NO ₃ -N by immobilized <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	35
Fig. 10. Effect of initial NO ₃ -N concentration on the removal of NO ₃ -N by immobilized <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	37
Fig. 11. Lineweaver-Burk plots for immobilized <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3.....	37
Fig. 12. Effect of pH on the removal of NO ₃ -N by immobilized <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	39
Fig. 13. Effect of different temperatures on the removal of NO ₃ -N by immobilized <i>P. aeruginosa</i> AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.....	41

Fig. 14. Variation of effluent $\text{NH}_4\text{-N}$ on continuous experiment by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3..... 43

Fig. 15. Variation of effluent $\text{NO}_3\text{-N}$ on continuous experiment by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3..... 44

ABSTRACT

A Study on the Removal of Nitrogen by Immobilized *Pseudomonas aeruginosa*

By : Gyoung-Hun, park

Advisor : Prof. Hyung-il, Choi

Department of Environmental Education,
Graduate School, Chosun University

The aim of this research is to develop a new process of Nitrogen removal. Whole cells of *Pseudomonas aeruginosa* AE-1-3 were immobilized by entrapment with polyethylene glycol(PEG), and various factors on the removal of nitrogen from synthetic wastewater were investigated by batch and continuous reactors.

The removal rate of $\text{NO}_3\text{-N}$ increased with increasing of cell concentration in the immobilized beads. A higher removal rate of $\text{NO}_3\text{-N}$ were observed when the smaller bead size and more visual column of the immobilized beads were used. When glucose, was added as a carbon source, 50 mg/l of $\text{NO}_3\text{-N}$ was completely removed in 9 hours. other carbon source, such as methanol was not utilized.

$\text{NO}_3\text{-N}$ was completely consumed at C/N of 5 and 10 and 20, but C/N 2.5 the removal efficiencies of $\text{NO}_3\text{-N}$ ranged from 76%. The removal efficiencies of $\text{NO}_3\text{-N}$ increased with increasing of temperature and the $\text{NO}_3\text{-N}$ removal efficiency of 96.8% could achieved at the low temperature(10°C) by the immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3. The average removal efficiencies of $\text{NO}_3\text{-N}$ at the HRT of 24 and HRT of 12 was 97.4% and 98.8% respectively during continuous treatment by the immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3 when NH_4NO_3 as a nitrogen source was used.

I. 서론

하수중의 질소화합물은 호소 및 하천에서 부영양화를 일으키는 물질이며, 질산화과정에서 많은 수생생물에 대한 독성작용을 일으키는 것으로 알려져 있다.

하수처리장 방류수의 T-N 수질기준은 특정지역이 20 mg/L, 기타지역이 60 mg/L지만, 2013년 부터는 기타지역도 특정지역과 마찬가지로 적용할 계획이어서, 그동안 유기물과 부유물질 등을 제거할 목적으로 운영되어온 처리장의 경우 고도처리 시설을 도입하거나 고도처리 기술이 겸비된 새로운 공법으로 교체하고 있다.

하수의 질소 제거 방법으로는 물리화학적 처리법과 생물학적 처리법이 있다. 물리화학적 질소제거에는 Stripping법이나 불연속점 처리법이 있으나 주로 암모니아성질소 제거가 목적이고 다른 형태의 질소는 거의 제거되지 않는다. 생물학적 처리법으로는 A/O 시스템, Bardenpho 시스템, 생물막법 등이 있으며 공통적으로 $\text{NH}_4\text{-N}$ 을 아질산 및 질산화 박테리아에 의해 $\text{NO}_2\text{-N}$ 및 $\text{NO}_3\text{-N}$ 으로 질산화한후 탈질균에 의해 N_2O , N_2 등의 가스를 생성시켜 외부로 배출한다.

생물학적 질소제거법은 슬러지를반송하고 다량의 잉여슬러지를 처분하여야 하며 높은 반응온도와 긴체류시간을 유지하기 위해 비용이 많이 소모된다¹⁾.

고정화법은 반응조에 특정 미생물을 부착한후 증식시켜 미생물의 농도를 높게 유지함으로써 반응조를 콤팩트화 잉여슬러지의 발생량을 저감하며 처리효율을 높이는 장점이 있다²⁾.

많이 사용되는 고정화 법은 불용성 media에 부착시키는 결합고정화법, 자기 조립법, 포괄고정화법 등이며 포괄고정화법의 경우 특정 미생물을 고정화하고 미생물농도를 높게 유지함으로써 특정물질의 처리효율을 높이고 시설은 compact화 하며 슬러지발생량이 매우적기 때문에 많은 하수처리장에서 도입되고 있다²⁾.

미생물의 고정화 재료로서는 천연 및 합성고분자 물질이 사용되나 알긴산염 및 카라기난 등 천연고분자 물질인 알긴산염 및 카라기난 등은 gel 강도가 낮아서 적용하기 어렵기 때문에 최근에는 합성고분자물질인 photo-crosslinked resin, polyvinylalcohol, polyacrylamide, 등 합성고분자물질이 사용되고 있다³⁾.

본 연구에서는 고정화 *Pseudomonas aeruginosa* AE-1-3를 dldydgku 하수의 질소를 제거하고자 한다. 이를 위해 Polyethylene glycol에 김⁴⁾이 분리한 질소제거 박테리아 *Pseudomonas aeruginosa* AE-1-3를 포괄고정화 하여 합성하수 중의 질소제

거에 영향을 회분식 및 연속식으로 처리하며 질소제거의 영향인자의 적용범위와 적정 운전조건을 모색하였다.

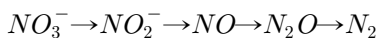
II. 이론적 고찰

1. 생물학적 탈질화

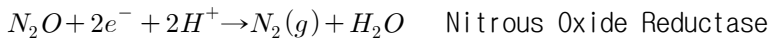
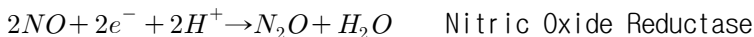
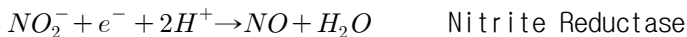
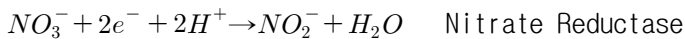
생물학적 탈질은 혐기성 조건에서 미생물이 최종 전자수용체로서 산소 대신 질산성 질소를 이용하고, 전자공여체로서 유기화합물을 이용하여 질소를 감소시키는 것으로 정의된다^{5,6)}. 생물학적 하 · 폐수처리에서 질산성 질소는 이러한 생물학적 탈질과정을 통해 질소 가스로 전환되어 대기로 방출하며, 무산소(anoxic)상태에서 일어나기 때문에 혐기성 호흡이라고 한다⁷⁾.

1) 탈질화 반응

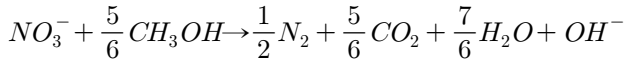
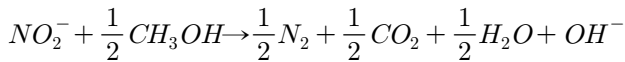
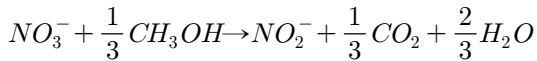
탈질화 과정은 2단계를 거치는데, 첫 단계가 질산성 질소에서 아질산성 질소로의 환원과정⁸⁾이고, 두 번째 단계가 질소가스까지 두 개의 중간 생성물을 거쳐 일어난다. 즉, 아래의 순서와 같이 질소가스로 환원된다.



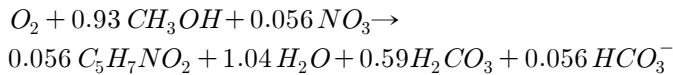
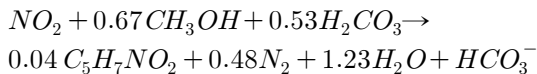
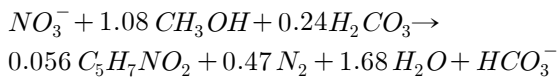
각 과정에서의 반쪽반응식 및 관련 효소는 다음에 나타내었다.



탈질화 과정에 관여하는 미생물은 임의성 종속영양 미생물(heterotrophs)로서 반응조내 무산소 상태의 유지와 전자공여체(electron donor)인 유기탄소원이 필수적으로 필요하게 되며 전자 공여체로는 경제적인 이유로 메탄올이 가장 많이 이용되고 있다. 메탄올을 전자공여체로 이용할 경우 탈질화 반응은 다음과 같다.⁹⁾



탈질화 반응을 위한 메탄올은 탈질화 미생물의 세포합성에 약 25 ~ 30%가 소요됨을 밝혔으며 세포합성을 고려한 총괄적인 질산염의 탈질화 반응을 실규모의 연구를 토대로 다음 식과 같이 제안하였다¹⁰⁾.



탈질화 반응에서 nitrate(NO_3^-)가 N_2 gas로 환원될 때 탄산염 (carbon acid)과 중탄산염(bicarbonate)이 생성된다. 1mg NO_3^- -N이 탈질화 되는데 약 2.3~3.0 mg/ℓ의 alkalinity가 생성되며, 이로 인한 반응조의 pH는 높아지기도 한다.

미생물(*Micrococcus*, *Pseudomonas*, *Denitrobacillus*, *Spirillum*, *Achromobacter*)들은 무산소 조건하에서 최종 전자수용체로서 질산성 질소를 사용한다. 한편, 산화질소를 암모니아까지 환원시키는 전 과정을 Nitrate assimilation이라고 하는데 여기에 관여하는 미생물은 *Neurospora*, *Achromobacter Aspergillus*¹¹⁾, *Lactobacillus*, *Escherichia coli*, *Azotobacter*가 있다.

2) 탈질화 영향인자

가) 온도

탈질 반응은 5 ~ 25 °C에서 주로 진행되고 5 °C 이하에서는 급격히 감소한다. 5 ~ 25 °C 범위에서 탈질율은 온도가 10 °C 증가할 때 대략 2배정도 빨라지는 것으로 보고되고 있다. 3 ~ 30 °C 범위에서 탈질 반응은 식 2-3 Arrhenius 온도 관계를 따른다⁷⁾.

$$K = Ae^{-E/RT}$$

여기서, K : 속도상수 (mol/l)

A : 상수

E : 활성화 에너지(cal/mol)

R : 기체상수 (0.082 l · atm / mol · K)

T : 절대온도

나) pH 및 알칼리도

탈질소화 반응은 알칼리도가 생성되는 반응이다. Table 1은 질산성 질소가 질소 가스로 탈질소가 이루어질 때 탄산(Carbonic acid)은 중탄산(Bicarbonate)으로 전환된다. 이론적으로 알칼리도의 생성량은 3.57 mg(as CaCO₃)/mg N_{reduced}인데, 실제로는 2.3 ~ 3.0 mg(as CaCO₃)/mg N_{reduced} 범위에 있다¹²⁾. 알칼리도의 생성은 시스템의 pH를 높이거나, 질산화와 복합된 시스템인 경우는 알칼리도 손실을 어느 정도 상쇄시킬 수 있다. 탈질소화의 최적 pH는 존재하는 bacteria의 종류나 폐수 내 성분에 따라 달라지지만 보통 pH 7 ~ 8사이에서 결정된다. 질산화 처리 공정이 탈질소화의 최적 pH에 가깝게 운전되므로 특별한 조정은 필요치 않다.

Table 1. Relationships for nitrate dissimilation and growth in denitrification reactions

Reaction	Equation
Nitrogen dissimilation Nitrate to nitrite	$\text{NO}_3^- + 0.33\text{CH}_3\text{OH}$ $= \text{NO}_2^- + 0.33\text{H}_2\text{O} + 0.33\text{H}_2\text{CO}_3$
Nitrite to nitrogen gas	$\text{NO}_2^- + 0.5\text{H}_2\text{CO}_3$ $= 0.5\text{N}_2 + \text{HCO}_3^- + \text{H}_2\text{O}$
Nitrate to nitrogen gas	$\text{NO}_3^- + 0.833\text{CH}_3\text{OH} + 0.167\text{H}_2\text{CO}_3$ $= 0.5\text{N}_2 + 1.33\text{H}_2\text{O} + \text{HCO}_3^-$
Synthesis - denitrifiers	$14\text{CH}_3\text{OH} + 13\text{NO}_3^- + 4\text{H}_2\text{CO}_3^-$ $= 3\text{C}_5\text{H}_7\text{O}_2\text{N} + 20\text{H}_2\text{O} + 3\text{HCO}_3^-$

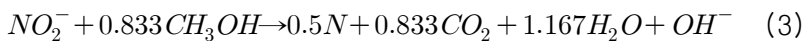
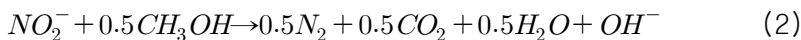
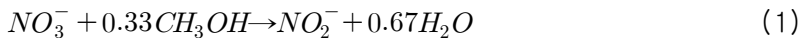
다) 용존산소

탈질 미생물들은 용존산소가 충분치 않은 상태에서 NO_3^- -N나 NO_2^- -N를 최종전자 수용체로 이용하지만 용존산소가 존재하는 경우 다른 무기성수용체보다 낮은 환원 전위를 갖는 산소를 선호하게 된다¹³⁾. 즉, 호기성 호흡으로 더 많은 ATP가 만들어 질 수 있고 무산소상태보다 호기상태에서 탈질 미생물 생성이 훨씬 많아진다. 이것이 탈질화 반응이 산소의 부재 시에만 일어나는 이유이다¹⁴⁾.

Table 2. Comparison of energy yields of nitrate dissimilation vs oxygen respiration for glucose

Reaction	Energy Yield per mole glucose kilocalories
Nitrate Dissimilation $5C_6H_{12}O_6 + 24KNO_3 \rightarrow 30CO_2 + 18H_2O + 24KOH + 12N_2$	570Kcal
Oxygen Respiration $C_6H_{12}O_6 + 6O_2 \rightarrow 6CO_2 + 6H_2O$	686Kcal

Table 2는 미생물의 내호흡 분해율이 탈질화의 제한단계(rate limiting step)로 작용하기 때문이다. 20 °C에서 실험치는 Methanol인 경우 0.25 kg NO₃⁻-N /kg MLVSS/day이고, 미생물내의 내호흡으로 인한 탄소원인 경우 0.04 kg NO₃⁻-N /kg MLVSS/day이다. 전자 공여체 기질로서 methanol을 사용하는 경우 탈질화 반응은 식 (1), (2), (3)에 표현되어 있다.



식(1), (2), (3)에 의거 이론적 methanol의 요구량과 biomass생산량은 각각 식 (4), (5)으로 구할 수 있다.

$$C_b = 0.53NO_3^- + 0.32NO_2^- + 0.19DO \quad (4)$$

$$C_b = 0.53NO_3^- + 0.32NO_2^- + 0.19DO \quad (5)$$

여기서,

C_m = 요구된 Methanol의 양, mg/ℓ

NO_3^- = 요구된 질산성 질소의 농도, mg/ℓ

NO_2^- = 요구된 아질산성 질소의 농도, mg/ℓ

DO = 제거된 용존산소의 농도, mg/ℓ

C_b = Biomass 생산량, mg/ℓ

최근에 내생호흡과 생 폐수의 유기탄소원에 대해서 활발하게 진행되고 있는데 탈질화 반응은 엄격한 혐기성조건보다 무산소조건에서 일어나고, 산소농도가 0.5 mg/ℓ 이하의 산화질소 존재 하에서 일어난다. 탈질화 반응에서 무산소 조건은 근본적인 단계를 약간 수정한 형태로 거치므로 산소부재의 환경조건을 말한다고 했다. DO 농도가 낮은 경우에 탈질에 관여하는 효소가 합성된다¹⁵⁾.

탈질균의 순수 배양 실험을 통하여 탈질을 저해하는 용존산소의 농도를 0.2 mg/ℓ 이상으로 보고 있으며 탈질을 제한하는 산소 농도가 0.3 mg/ℓ ~ 1.5 mg/ℓ 라고 제시하였다¹⁶⁾. 산소는 NO₂⁻-N 환원 미생물의 성장에 저해작용을 일으키는데, 산소가 NO₃⁻-N의 환원 미생물보다는 NO₂⁻-N 환원 미생물에 더 큰 저해작용을 일으킨다는 것이 밝혀졌으며¹⁷⁾, 5% 포화농도의 DO가 N₂O의 발생율을 감소시킨다고 하였다¹⁸⁾. 또한 NO₂⁻-N 환원 미생물은 13% 포화농도에 민감하나 NO₃⁻-N 환원 미생물은 산소에 덜 민감하여 13% 포화농도보다 큰 농도에서 저해작용을 받는다고 하였다.

2. 미생물 고정화법

1) 고정화법의 정의 및 역사

고정화 미생물(immobilized cells)이란 어떤 일정한 공간내에 갇힌 상태로 있는 미생물을 말하며, 연속적인 반응을 행할 수 있고 반응후에 재이용할 수 있는 상태에 있는 것을 말한다. 고정화 미생물은 원래 효소를 고정화 한 것으로부터 시작되었으며, 1916년 Nilson과 Griffin이 골탄의 미분에 흡착한 효소 이소베르타제가 활성을 유지하고 있다는 것을 발견한데서부터 발단이 되었다¹⁹⁾. 이처럼 처음에는 효소를 고정화에 이용하다가 효소는 고정화할 때에는 정제해야만 하는 번거로움을 없애기 위해서 점차 미생물을 고정화하게 되었다. 효소나 미생물을 고정화하는 궁극적인 목적은 유용한 물질의 생산, 미량 물질의 분석, 의료 등에 이용하려는 것으로 Table 3과 같이 여러분야에서 연구가 진행되고 있다²⁾. 최근에는 이러한 고정화 미생물을 이용하여 하수처리에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다.

Shirakami 등²⁰⁾은 다공질 폴리우레탄의 유동입자에 담지한 미생물 군에 의한 유기물 및 질소의 동시제거를 보고하였고, Kawamura 등²¹⁾은 담체로서 엠버라이트를 이용한 유동상에 의한 생물학적 질산화를 보고하였다.

Nilson 등²²⁾은 탈질균(*Pseudomonas denitrificans*)을 고정화하여 질소 제거의 가능성을 시사하였으며, Kokututa 등^{23,24)}은 질산균과 탈질균을 고정화하여 고정화하지 않은 탈질 미생물과 비교 검토하여 고정화 탈질균의 반복처리시 처리 성적이 우수함을 보고하였고, Hashimoto 등¹⁹⁾, Sumino 등⁸⁾은 활성슬러지를 고정화하여 질소 제거에 관한 연구를 보고한 바 있다.

Wang 등²⁶⁾에 따르면 미생물 고정화법은 자유 미생물에 비해서 다음의 특징을 가지고 있다고 하였다. 높은 미생물농도에 의한 생분해율의 증가와 생물공정의 조절이 보다 용이함, 미생물의 손실 없이 높은 희석율에서 연속공정이 가능함, 생촉매의 촉매안정성 뿐만 아니라 독성화합물에 대한 내성을 증가시킬 수 있다고 하였다.

단일 효소를 고정화하여 단순 반응을 촉매시키는 것으로부터 시작한 고정화에 대한 연구는 고정화 미생물, 동식물 세포의 고정화와 응용에 관한 고정화 생체촉매의 연구로까지 발전하였고 고정화 담체나 고정화법의 개발도 활발하게 진행되고

있다²⁾.

Table 3. The applied range of the immobilized enzymes and microorganisms

이용분야	응 용 및 연 구
발효공업	아미노산, 당, 핵산, 유기산, 항생물질, 스테로이드, 테르페노이드의 합성이나 변환, 호르몬, 효소 등의 생산
식품공업	유당의 분해, 치즈, 유지, 프룩토오스, 전화당 등의 제조, 우유나 식품의 살균, 알콜 음료의 제조, 과즙 쓴맛의 제거 등
화학공업	알콜 연료, 수소, 메탄가스의 제조, 기초 화학 공업 제품의 합성이나 변환 등
분 석	효소전극법, 미생물전극법, 효소면역측정법 등의 임상검사 및 여러 가지 화학분석에 이용, 측정의 자동화, 간편화 등
의 료	임상검사, 효소치료제, 인공장기 등
환경정화	페놀, 벤젠, 시안 등의 분해, 질산 또는 아질산의 환원, BOD 측정 등
생 화 학	효소반응기구, 효소의 기능이나 구조의 해석, 생체성분의 분리, affinity chromatography에 의한 정제, 생화학 시약의 합성 등

2) 고정화법의 종류 및 특성

효소가 촉매작용을 하려면 효소단백질의 일부에 기질과 상호작용을 하는 영역, 즉 활성중심 (active center)이 필요하며, 여기에는 기능이 다른 2개의 부위가 있다. 하나는 효소의 촉매로서의 반응성에 관여하는 반응부위 (reactive site) 또는 촉매부위 (catalytic site)이며, 다른 하나는 효소반응의 기질특이성을 지배하는 특이성부위 (specific site) 또는 결합부위 (binding site)라 불리 운다. 이들 부위는 몇 개의 아미노산 잔기로 형성되어 효소 고유의 고차구조를 지니고 있는데, 효소가 고정화된 상태에서 촉매작용을 나타내려면 활성중심의 아미노산 잔기가 변화를 받지 않고 고유의 고차구조를 유지해야만 한다. 이것들이 변화된 경우는 촉매작용의 저하, 또는 기질특이성 등의 효소적 성질에 변화가 생긴다. 고정화시 효소단백질중의 반응기를 변화시키지 않아야 한다. 또한 효소단백질의 고차구조는 수소결합, 소수결합, 이온결합 등 비교적 약한 결합으로 유지되고 있으므로 효소를 고정화할 때는 고온, 강산, 강알칼리 등의 처리는 피해야 하며, 유기용매, 고농도의 염류에 의해서도 변성되거나 활성을 잃게 되기 때문에 특히 온화한 조건이 필요하다.

효소의 고정화 방법은 다음 3가지로 분류할 수 있다.

- * 결합고정화법 - 물에 불용성인 담체에 효소를 결합시키는 방법
- * 자기고정화법 - 2개 또는 그 이상의 반응기를 갖는 시약을 사용하여
효소와 효소간에 가교를 형성시켜 고정화하는 방법
- * 포괄고정화법 - 효소를 겔 (gel)의 미세한 격자속에 가두든지,
반투막성 폴리머의 피막으로 피복하는 방법²⁷⁾

이들 고정화법을 Fig. 1에 나타내었다.

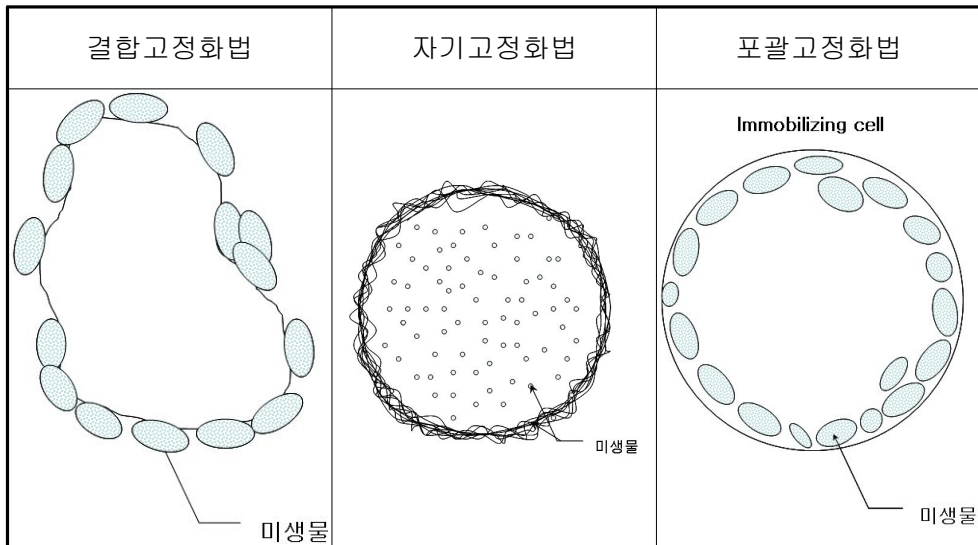


Fig. 1. Schematic of the immobilized method.²⁸⁾

가) 결합고정화법

하천수에 오염물질이 유입될 경우 자갈 표면 등에 부착된 미생물들에 의하여 오염물질이 제거되는 현상에서 시작된 생물막법은 접촉재 표면에서 형성된 생물막을 이용하여 생물막과 오폐수의 접촉을 반복시킴으로써 오염물질을 생물학적으로 산화 분해시키는 방법이다. 대표적인 방법으로 살수여상법(Trickling Filter), 회전원판법(Rotating Biological Contactor), 접촉산화법 등의 고정생물막법과 입상매체를 유동화시켜 처리하는 유동상 생물막법 등이 있다.

고형물의 표면에는 미생물이나 유기물이 부착하여 거기에서 미생물의 증식과 함께 세포 외 폴리머 등을 생산함으로써 생물막이 형성되며, 생물막의 두께가 기질이 투과할 수 있는 두께(유효 두께) 이상이 되면 그 두께보다 내부에 존재하는 미생물의 활성력이 없어지고, 마찰 저항도 커지기 때문에 생물막은 박리현상이 일어난다.

생물막법의 형성은 먼저 유기성 분자가 접촉재 표면에 흡착되어 막을 만들고 그 표면에 세균이 흡착을 하게 된다. 흡착된 미생물은 주로 다당류로 구성된 고분자 물질을 세포외로 분비하게 되어 단단히 결합하게 된다. 생물막의 두께는 미생물과 환경조건에 의하여 결정되는데 보통 100~200 μ m 정도의 막이 형성된다. 그러나 조류, 고등생물이 자갈 경우 수 cm 이상 되는 경우도 있다. 일반적으로 생물막에서

물질대사가 활발한 부분은 계면으로부터 70~100 μ m의 두께이다.

생물막법과 활성슬러지법을 비교하면, 생물막에서는 다양한 미생물의 생식이 가능하여 안정된 생태계가 구성되므로 외부조건의 변동에 대응력이 상대적으로 높다. 생물막법을 다단으로 할 경우 각 단별로 우점종 미생물이 존재하게 되며, 먹이사슬이 길어 발생 슬러지의 감소가 가능하다. 특히 영양성분 제거와 관련되는 질산화 미생물 및 탈질 미생물이 잘 증식하므로 활성슬러지에 비하여 질소 제거율이 높다. 이는 이들 미생물이 성장속도가 낮아 활성슬러지법에서는 씻겨나가기 쉽지만, 생물막에서는 안정하게 증식할 수 있으며, 생물막의 내부는 혐기성으로 되기 때문에 탈질이 일어나면서 질소제거가 가능하기 때문이다.

미생물을 고정화시키는 담체의 재질에는 다당류(셀룰로스;덱키스트린 및 아가로스), 단백질(젤라틴, 알부민 등), 합성수지, 합성고분자(폴리비닐·클로라이드 등) 및 무기물(모래, 세라믹스, 다공성 유리 등)이 있으며, 폐수처리에 이용 가능하며 값이 싸고 내구성이 있는 재질을 사용한다. 최근에는 종래의 쇠석 대신 플라스틱이 이용되고 있다. 또한 유동 증식 활성슬러지법 등에서는 활성탄, 모래, 안트라사이트와 같은 무기물질이 이용되고 있다. 혐기성 질소제거에 있어서는 발포연석, 세라믹스, 용융슬래그 등 무기물질 및 그 가공제품이 이용되고 있다.

나) 자기 고정화법

자기고정화법은 미생물이 적정한 수리조건 하에서 활성슬러지 floc과 비교하여 아주 치밀하고 비중이 높은 직경 수 mm의 조립체를 형성하게 하는 방법으로, 균체를 pellet형으로 고농도로 보유할수 있고, 고부하 운전이 가능하며, pellet의 활성이 매우 높은 특성을 지닌 새로운 처리방식중의 하나이다. 현재 혐기성 조건하의 UASB, 호기성의 자기고정화법인 AUSB, 통성혐기성 자기고정화법인 USB(Upflow Sludge Blanket), 호기성 조건하에서의 유기물 제거를 위한 MRB(Multi-stage Reversing Flow Bioreactor)등이 있다. 당초에 조립체는 UASB와 같은 혐기성 처리에서만 생성되는 것으로 생각하였으나 호기성 조건하에서도 생성되는 것이 알려졌기 때문에 고도처리 또는 효율적인 처리방법으로서 중요성이 더욱 더 높아지고 있다. 이 방법들은 생물반응기 내에서 미생물이 생산한 생물고분자 물질이 접착제의 역할을 하여 사상형 미생물이 접착되는 반응이 계속 발생하여 조립체를 형성하는 것으로 추정된다. UASB법은 완전 혐기성 처리 공법이지만 호기성 처리 공법과 조합하여 순환을 계속하면 유기물의 메탈발효와 질소성분의 질산화 및 탈질이 가능

하게 된다. USB법은 질산성 질소제거가 가능한 공법으로 UASB법을 질소제거에 응용한 것이다. 그러나 본 공법을 더욱 더 발전시키기 위해서는 조립화의 star-up 시간단축과 인의 제거의 어려움 등의 문제를 해결해야만 한다.

다) 포괄고정화법

결합고정화법에서는 자연적으로 부착하기 쉬운 균이 우점종이 되고, 후밀화 하는데 정기적인 역세 시기를 놓치게 되면 내부가 혐기 상태로 되고 생물막이 떨어져서 나중에는 처리조 내의 미생물 유지량이 적어져, 처리능력이 저하하는 원이 된다. 이에 반해 포괄고정화 방법은 이러한 생물막법의 단점으로 보완하여 특정의 미생물이나 효소를 고농도로 고정화할 수 있다.

포괄고정화법의 장점은 미생물을 고농도로 안정하게 유지할 수 있어 하·폐수의 고속처리를 도모할 수 있으며, 특정미생물을 고정화시킴으로써 특정물질의 처리가 가능하고, 슬러지 발생량의 저하를 기대할 수 있는 점등이 있다. 특히 질산화 미생물을 포함하는 복합 미생물을 고정화시킨 pellet를 사용할 경우 암모니아성 질소의 빠른 산화가 가능하며 이미 일본 등지에서 실용화되고 있다.

하·폐수 내에 존재하는 질소의 제거에 관계하는 질산화 미생물의 증식속도는 온도의 영향을 받기 쉽기 때문에 포괄고정화법을 이용하여 질산화 미생물을 다른 미생물로부터 격리시킴과 동시에 적절한 환경에서 고농도로 증식시켜 그 능력을 충분히 발휘시킬 수 있다.

포괄고정화법에 이용되고 있는 고분자 재료로서는 콜라겐, 젤라틴, 한천, 알긴산, 칼라기논, 셀룰로스, 아세테이트, 폴리아크릴·아미드, 폴리·우레탄 등 많은 재료가 사용되고 있으나 질소제거용 생물반응조에 이용되는 질산화 미생물 고정화법으로는 PEG 고정화 방법이 질산화 활동을 높여주는 것으로 보고되었으며, 실용화된 pellet의 재질은 poly-ethylene glycos(PEG)이었으며 질산화균을 포괄고정화하여 고농도의 암모니아성 질소를 함유한 하·폐수 처리에 효율적으로 사용하고 있다.

현재까지 모든 효소에 적용 가능한 이상적인 고정화법은 없고, 각각의 방법에 따라 특징이 있고 이점과 결점이 따른다. 따라서 실제로 그 효소의 이용목적에 맞는 고정화방법을 검색하여 채용하고 있는 실정으로 Table 4 에 고정화 효소의 제법과 특성을 나타내었다.

Table 4. The comparative of feature by the immobilized method

특 성	결합고정화법			자기고정화법	포괄고정화법
	공유결합법	이온결합법	물리적흡착법		
제 법	어렵다	쉽 다	쉽 다	어렵다	어렵다
결 합 력	강하다	중 간	약하다	강하다	강하다
효 소 활 성	높 다	높 다	낮 다	중 간	높 다
기질 특이성	변 함	불 변	불 변	변 함	불 변
재 생	불 가	가 능	가 능	불 가	불 가
제법의 보편성	중 간	높 다	낮 다	낮 다	높 다
고정화 가격	높 다	낮 다	낮 다	중 간	낮 다

활성슬러지, 혐기성세균, 질산화세균, 탈질균, 난분해성물질 분해균 또는 중금속속적세균 등의 특수한 세균이 고정화 미생물로서 이용되며, BOD로 대표되는 유기물은 물론이고 질소, 인 또는 PVA, 페놀 등의 난분해성 및 독성물질, 카드뮴 등 중금속 등을 광범위한 처리대상으로 삼고 있다. 고정화재료인 고분자 겔은 인공재료와 천연재료가 있는데, 인공재료에는 알긴산칼슘, 카라기난, 아크릴아미드, 광경화성수지, PVA(Polyvinyl alcohol), 폴리에틸렌글리콜(polyethylene glycol ,PEG) 등이 사용되고 있으며, 천연재료의 경우에는 아르긴산칼륨, k-Carrageenan, 한천 등이 있다.

3) 포괄고정화법의 원리

하수에 있어 반응조중에서 정화력을 인공적으로 효율 좋게 진행시키는 폐수처리법으로 생물막법이 있다. 생물막의 형성은 자연적으로 부착하기 쉬운 균이 우점종이 되고 정기적인 역세시기를 놓치게 되면 내부가 혐기적으로 되고 생물막이 떨어져서 나중에는 처리조내의 생물보존량이 적게 되고 처리성능이 저하하는 단점이 있는데 이러한 결점을 개선하기 위해 포괄고정화법을 도입하게 되었다.

포괄 고정화는 미생물을 고분자 겔로 둘러싸는 방법으로 온도, pH, 충격부하 등 환경조건에 대한 대응능력이 우수하며 미생물의 활성을 높게 한다고 보고하고 있다²⁹⁾

또한, 비증식속도가 매우 작은 질산화세균 및 난분해성 물질을 분해하는 세균을 반응조내에 집적시키는 것이 가능함으로써 질소제거 및 독성폐수 등의 처리에 이용되고있다³⁰⁾

포괄고정화법에서는 비드 내부에 미생물이 갇혀 있어서 임의의 균을 임의의 균체량으로 고정화 할 수 있다. 이 때문에 균체의 박리에 의한 균체의 감소는 없으며 균체보존량은 대체로 안정하다.

포괄고정화법은 폐수중의 유기물 및 질소, 인 등은 비드를 투과하여 미생물에 의해 섭취된다. 비드의 소공 크기는 재질에 따라 달라지며, 활성슬러지의 간극은 재질의 투과성과 통기성이 좋은 비드로 형성되어 있기 때문에 생물막에 비해 혐기성이 되기 어렵다²⁾.

미생물 보존량은 비드 내부에 100,000 mg/l 까지 가능하다. 또한 특정한 균으로서 *Nitrosomonas*, *Nitrobacter* 등의 질산화균, 메탄균, 혐기성균, 그리고 시안균 등을 고정화에 이용할 수 있다. 슬러지발생량은 종래의 활성슬러지법 보다 적다고 보고되고 있다²⁷⁾. 슬러지발생량 저감의 매카니즘으로서는 아직 확인된 이론은 아니지만, ① 비드로부터 균이 누출되지 않기 때문에 슬러지단이 길게 증식하여 균의 자기 소화가 쉽다. ② 비드내부에 증식환경이 다르기 때문에 균체 생성을 위한 ATP수율이 저하하므로 균체 생성량이 저하된다고 보고된다.

4) 포괄고정화 재료 및 조건

포괄고정화법은 의약, 식품공업에서 이미 실용화된 기술로서 여기에 사용하는 재료는 천연 유기 고분자인 카라기난과 알긴산, 그리고 합성 고분자인 아크릴아미드, 폴리에틸렌글리콜 등이 있다. 천연 고분자 재료는 미생물에 대한 독성이 작고 저렴하나 미생물에 의해 분해되기 쉬워 내구성이 약하다는 결점을 가지고 있다²⁷⁾.

이에 반해 합성 고분자는 미생물에 대한 독성이 있고 약간 고가이지만 미생물에 의한 분해성이 약하여 내구성이 뛰어나다. 운전비용을 줄이기 위해서는 장기간 사용에 견딜 수 있는 합성고분자가 좋을 것으로 사료된다. 이 밖에 비드 재료에 요구되는 조건으로는 다음과 같은 것이 있다.

기질 및 산소투과성이 좋아야 하고, 미생물 누출, 침입이 적고 안정성이 양호해야 하며, 상온, 상압에서 고정화가 가능해야하고, 조립조작이 용이하고, 처리처분이 용이해야하는 조건 등이 있다.

Ⅲ. 실험방법 및 재료

1. 실험재료

1) 균주

본 실험에 사용한 균주는 김 등⁴⁾이 토양에서 분리한 *Pseudomonas aeruginosa* AE-1-3이다.

2) 합성배지

균주 배양에 사용한 분해배지의 조성은 Table 5와 같으며, $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 와 NH_4NO_3 는 별도로 조제하여 autoclave로 살균한 후 사용하였다.

Table 5. Composition of medium for the growth of *P. aeruginosa* AE-1-3

Components	Concentration	Remarks
Glucose	30 g	Carbon Source
NH_4NO_3	1 g	Nitrogen Source
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ KH_2PO_4	15 g 3 g	Phosphorus Source
NaCl $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$	0.5 g 0.2 g 27.03 mg 2 mg	Minerals

2. 고정화 재료 및 방법

본 실험에 사용된 고정화 재료로서 PEG-1000(Shin-Nakamura Chemical, wakayama)이며, 가교제는 N,N'-methylene-bis-acrylamide(Wako Pure Chemicals, osaka)이고, 촉진제는 N,N,N',N'-tetramethylethylene-diamine(Tokyo Kansai Co.) 이고, 개시제는 potassium persulfate(Kanto Chemical Co.)이다. 이 고정화 재료는 천연고분자인 알긴산 또는 카라기난보다 강도가 높아서 폭기나 교반에 대해서 안정하다⁴⁾.

고정화 활성슬러지 제조과정은 Shumino 등⁸⁾의 방법을 적용하여 Fig. 5와 같이 제작하였다. 즉, 고분자 물질 PEG 15%에 대해서 가교제는 1%, 촉진제는 0.25%의 비율로 혼합하여, 이 혼합물에 원심분리(3000 rpm, 5 min, 25 °C)한 *P. aeruginosa* AE-1-3 현탁액 8%을 혼합한 후 개시제 0.25%을 넣어 플레이트에 시트 형태로 넣고 10분 동안 방치 한 후 직경 3 mm로 자른 후 흐르는 물에서 세척한 후 합성폐수를 사용하여 2주간 순화시켜서 회분식 실험 및 연속식 실험에 사용하였다.

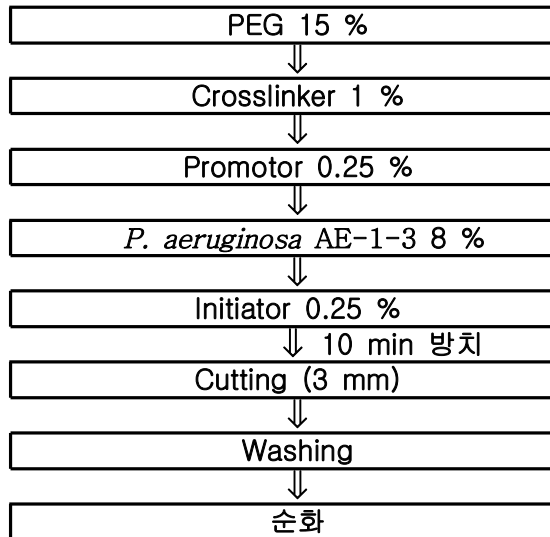


Fig. 2. Procedure for immobilization of *P. aeruginosa* AE-1-3 .

3. 실험장치

1) 회분식 실험장치

PEG고정화 활성슬러지 실험장치는 Fig. 3과 같다. 원통형의 반응기 용량은 1 ℓ이며 반응조내의 완전혼합을 위해서 mixer장치를 설치하였다.

pH는 0.1N NaOH와 0.1N HCl을 사용하여 pH 7.0으로 조절하였고, 실험은 25±2℃가 유지되는 항온실에서 수행하였다.

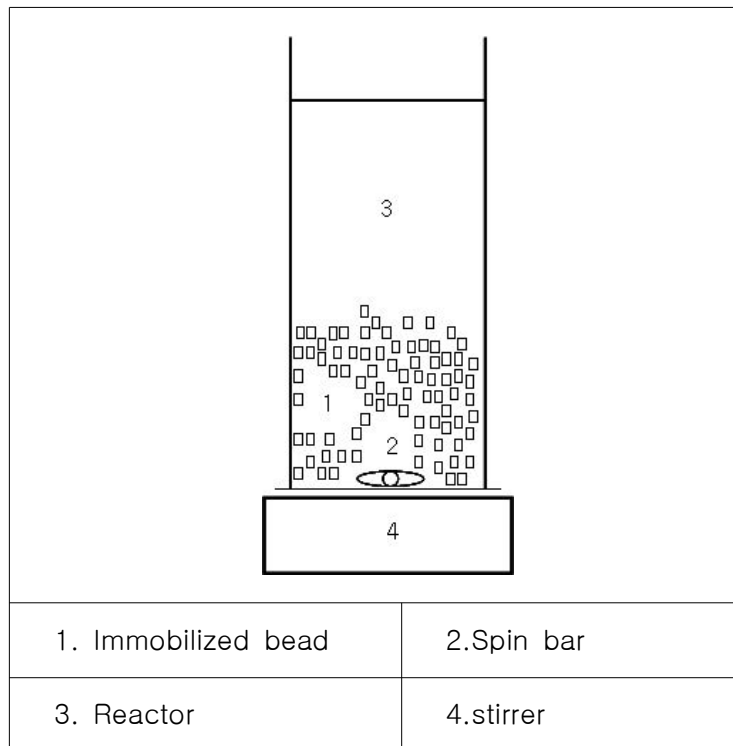


Fig. 3. Schematic diagram of the batch process.

2) 연속식 실험장치

연속식 실험장치는 Fig. 4와 같다. 반응기의 주요 구성 장치는 반응기와 인공 폐수 주입펌프와 교반기, 산기관을 설치하였다.

원통형의 투명 아크릴를 이용하여 제작하였고, 반응조 부피는 3ℓ 이며, 비드 충전율은 20%이다. pH는 7.0으로 조절해 주었고, HRT는 24, 12, 6시간으로 변화시켜서 실험을 수행하였다.

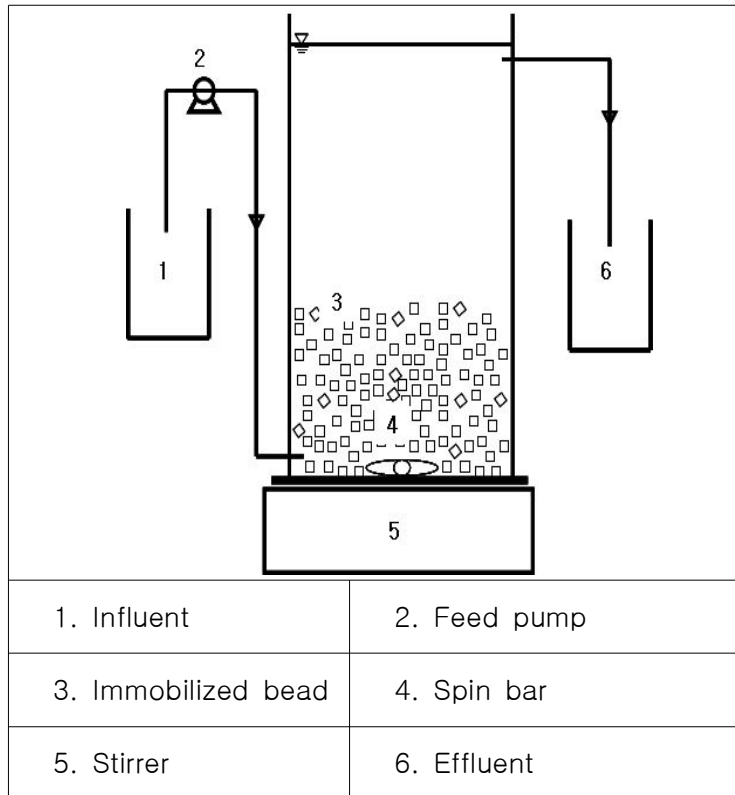


Fig. 4. Schematic diagram of the continuous process.

4. 실험방법

- 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 균체농도에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

고정화시 균체의 양은 2-10g이며, 질소원으로는 NH_4NO_3 를 사용하여 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 50 mg/ℓ 이 되도록 하였으며 C/N비는 5이다. 반응조에 고정화 비드를 넣은 후 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

- 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 고정화 비드크기에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

고정화 비드를 2mm, 3mm 및 5mm의 크기로 제조하여 회분식 반응조에 주입하였으며 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 50 mg/ℓ 이다. C/N비는 5이다. 반응조에 고정화 비드를 넣은 후 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

- 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 충전율에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

실험은 회분식 반응조에 고정화 비드를 반응조 용적의 10~50%가 되도록 주입하였으며 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 50 mg/ℓ 이고 C/N비는 10이다. 반응조에 고정화 비드를 넣은 후 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

- 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 C/N비에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

실험은 회분식 반응조에 고정화 비드를 반응조 용적의 20%가 되도록 주입하였으며 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 50 mg/ℓ 이고 C/N비는 2.5~10이 되도록 조절하였다. 반응조에 고정화 비드를 넣은 후 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

- 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 탄소원에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

실험은 회분식 반응조에 고정화 비드를 반응조 용적의 20%가 되도록 주입하였으며 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 50 mg/ℓ 이고 C/N비는 5이다. 탄소원으로는 glucose와 acetate 및 methanol을 사용하였다. 반응조에 고정화 비드를 넣은 후 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜

경을 제작하였다.

◦ 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 초기 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

실험은 회분식 반응조에 고정화 비드를 20%를 충전하였으며, $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 25~200 mg/l 이고 C/N비는 5이다. 반응은 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

◦ 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 온도에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

실험은 회분식 반응조에 고정화 비드를 반응조 용적의 20%가 되도록 주입하였으며 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 각각 50 mg/l 이고 C/N비는 5이며 실험은 10°C, 20°C, 30°C에서 수행하였다. 반응은 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

◦ 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 pH에 따른 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

실험은 회분식 반응조에 고정화 비드를 반응조 용적의 20%가 되도록 주입하였으며 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 각각 50 mg/l 이고 C/N비는 5이며 pH는 6,7,8,9가 되도록 조절하였다. 반응은 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

◦ 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 연속제거에 따른 $\text{NH}_4\text{-N}$ 및 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거

실험은 연속식 반응조에 고정화 비드를 반응조 용적의 20%가 되도록 주입하였으며 $\text{NH}_4\text{-N}$ 및 $\text{NO}_3\text{-N}$ 농도는 각각 50 mg/l 이고 C/N비는 5이며 HRT는 24, 12, 6이 되도록 조절하였다. 반응은 교반만을 행하였고 무산소 상태로 유지하기 위해 반응조 윗부분에 대기로부터 공기가 유입되지 않도록 뚜껑을 제작하였다.

5. 분석방법

회분식 및 연속식 실험에 사용된 분석항목 및 분석방법을 Table 6 에 나타내었으며 실험 및 분석방법은 수질오염공정시험법³¹⁾에 의거하여 분석하였다.

Table 6. Analytical methods and parameters

Items	Analytical methods
pH	pH meter , TOA HM-14P
NH ₄ -N	UV Spectrophotometric method,Shimadzu UV-2450
NO ₃ -N	UV Spectrophotometric method,Shimadzu UV-2450

IV. 결과 및 고찰

1. 회분식 실험

1) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 균체농도에 따른 NO₃-N 제거

Fig.5 에 나타난 바와같이 고정화 제조시 *P. aeruginosa* AE-1-3 균체농도에 따른 NO₃-N 제거변화를 나타내었다. 합성하수중의 질소원은 NH₄NO₃이며 C/N비는 5로 조절하였고 고정화 제조시 균체 양은 2~10 g이다.

P. aeruginosa AE-1-3 균체농도 2 g, 4 g에서는 9시간만에 78.78%, 82.82%의 제거율을 보였고 균체농도 8 g, 10 g에서는 95.48%, 98.9%의 제거율을 보였다. 이와 같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3를 사용하였을 때 균체농도가 높을 경우 NO₃-N이 빠르게 제거됨을 나타내고 있다. 실험 데이터로 나타내지 않았지만 10 g이상의 균체를 사용하면 고정화 제조시 고정화 비드의 탄성이 떨어져 강도가 약해질 뿐만 아니라 부서지는 경향을 나타내어 제거효율이 저하되는 것으로 사료된다.

Sheldon 등³⁹⁾은 *Pichia pastoris*를 고정화하여 에탄올을 아세트 알데히드로 전환할 때 고정화 균체농도에 대한 영향을 조사한 결과 고정화에 사용한 균체농도가 높을수록 알코올 산화의 비활성도가 낮음을 나타낸바 있다. 또한 Morikawa 등⁴⁰⁾은 bacitracin 생성에 있어서의 균체 영향을 조사한 결과 역시 균체량이 많을수록 bacitracin 생성율이 낮아지는 것을 나타내었다. 이러한 이유로써 Sheldon 등⁴⁰⁾은 고농도의 균체를 함유하는 고정화 비드에서는 산소나 기질의 확산속도가 고정화 균체의 활성에 대한 제한인자로 되기 쉽기 때문인 것으로 판단하였다.

한편 角野 등²⁵⁾은 질산화균을 고정화 할 때 생균수가 적으면 고정화 비드내에 질산화균이 존재하지 않는 쓸모없는 공간이 너무 많아 장기간 순화시켜도 고정화 비드용적당 활성도를 얻을 수 없기 때문에 고정화시에는 가능한한 활성도가 높은 질산화균을 고농도로 고정화 하는 것이 중요하다고 하였다.

본 실험에서도 고정화 제조시 균체량이 많을수록 NO₃-N 제거가 빠르게 진행되는 것으로 보아 본 실험의 균체 농도범위에서는 고농도의 균체를 사용하는 쪽이 바람직할 것으로 사료된다.

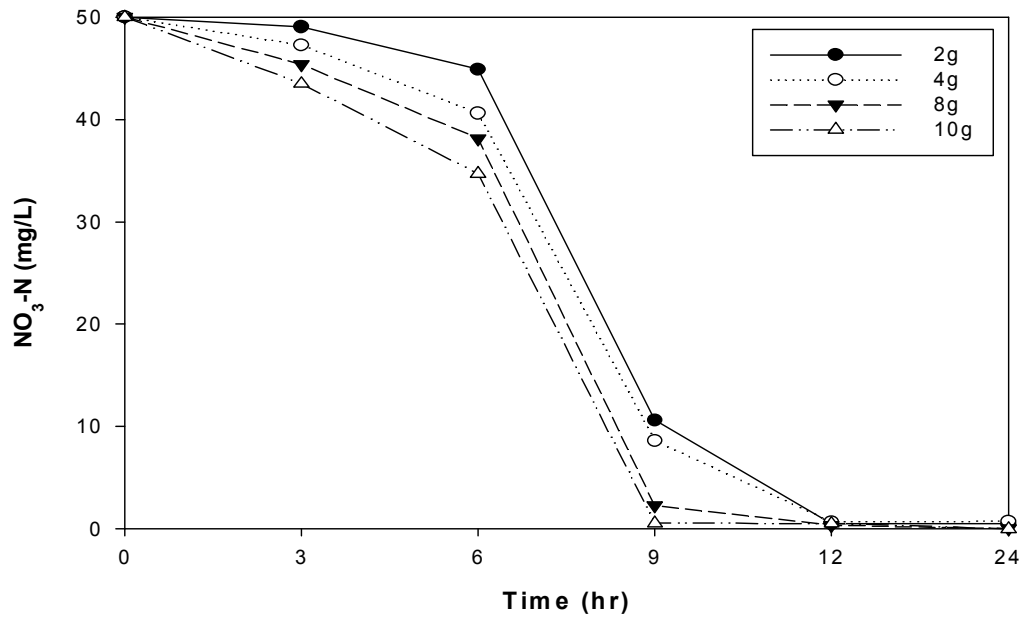


Fig. 5. Effect of cell amounts in the immobilized beads on the removal of $\text{NO}_3\text{-N}$ at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

2) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 고정화 비드크기에 따른 NO₃-N의 제거

Fig.6 에 나타난 바와같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3 의 고정화 비드크기에 따른 NO₃-N의 제거변화를 나타내었다. 질소원은 NH₄NO₃이며 C/N비는 5이고 고정화 비드 크기는 겉보기로 1mm, 3mm, 5mm이다. 각각의 고정화 비드를 사용하였을 때 NO₃-N는 비드크기가 작을수록 NO₃-N제거율이 높았다.

고정화 비드 1mm, 3mm를 사용한경우 9시간만에 각각 NO₃-N 제거율 96.2%, 97.6%을 나타냈으나 5mm의 고정화 비드의 경우 56.82%를 나타내었다. 고정화 비드직경이 작을수록 NO₃-N 제거율이 증가하지 않았으나 3mm이하의 제거율에는 큰 차이가 없었다. 정 등³⁵⁾은 SCN⁻분해균을 고정화하여 고정화 비드 평균 직경 1.8, 2.3, 2.7mm크기로 만들어 티오시안 분해능력을 검토한 결과 고정화 비드 직경이 작을수록 분해시간이 짧음을 보고한 바 있으며, Bettman 등³⁶⁾도 페놀 분해균을 Polycrylamide-hydrazid에 고정화하여 고정화비드 크기에 따른 페놀 분해성을 조사한 결과 0.1%의 페놀을 분해하는데 있어서 직경 1.5mm의 비드의 경우 24시간만에 분해되는데 비해 1.5mm의 비드를 사용한 경우에는 12시간만에 분해되어 고정화 비드 직경이 작을수록 빨리 분해됨을 보고 하였다.

이와 같이 고정화 비드 직경이 작을수록 분해시간이 빠른것은 戶田 등³⁷⁾이 효모를 한천에 고정화 하여 회분 배양한 결과 비드 직경이 작을수록 증식속도가 증가하였으며 이것은 고정화 비드 내부로 산소 및 기질의 확산이 원활한 이유로 설명하였다. Matinsen³⁸⁾도 메탄올과 glycine으로부터 L-serine 생성율에 있어서 고정화 비드 직경이 작을수록 L-serine 생성율이 증가하는데 이 원인도 기질과 산소확산에 기인한 것으로 보고있다. 본 실험에서도 고정화 비드 직경이 작을수록 NO₃-N 제거율이 높은 것은 고정화 내부로 원활한 기질확산에 기인하는 것으로 사료된다. 그러나 본 연구에서는 3mm이하의 고정화 비드를 만드는데 어려움이 있어 이후의 실험에서는 평균 크기 3mm의 고정화 비드를 사용하였다.

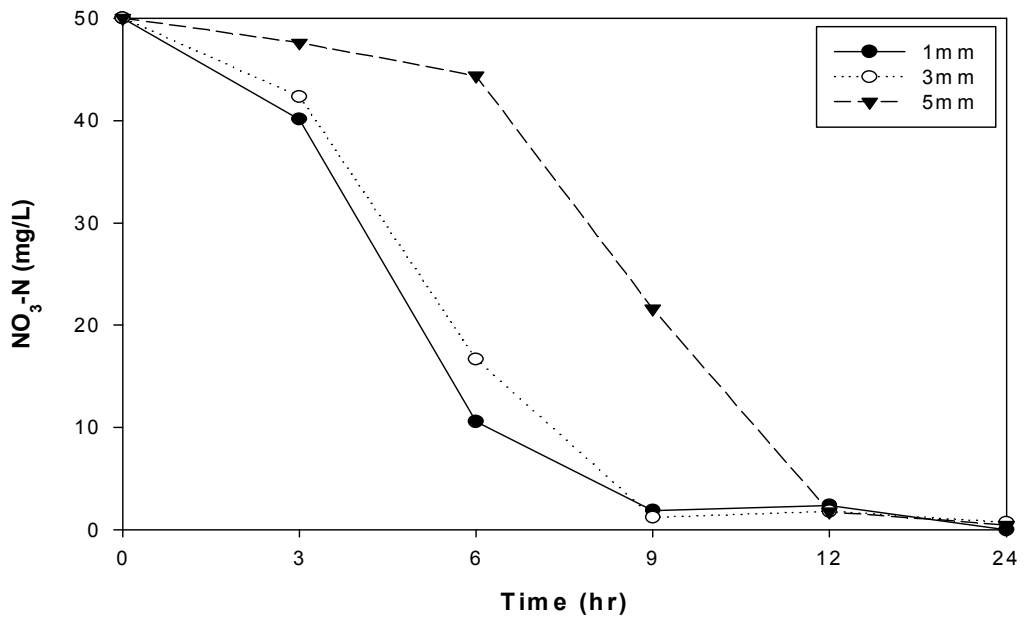


Fig. 6. Effect of bead size on the removal of NO₃-N by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

3) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 충전율에 따른 NO₃-N의 제거

Fig. 7 에 나타낸 바와같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 충전율에 따른 NO₃-N의 제거변화를 나타내었다. 질소원은 NH₄NO₃이며, 초기 NO₃-N농도는 각각 50 mg/ℓ이다. C/N비는 5가 되도록 조절 하였으며 각 반응조에 고정화 비드를 반응용적의 10~50%가 되도록 주입하였다.

반응 6시간째 고정화 충전량이 많을수록 NO₃-N이 빠르게 제거되는 경향을 보이고 있으며 이 시간에서 NO₃-N는 충전율 50%일 때 95.58%, 30%일 때 89.96%, 20%일 때 79.5%, 10%일 때 63.48%로 NO₃-N제거에 있어서 다소 차이를 나타냈으나 반응 9시간때에는 50%,30%,20%,10% 각각 99.94%, 99.74%, 99.08%, 99.14%의 제거율을 보이고 있다. 고정화 비드 충전율에 따라 비례하여 NO₃-N제거율이 증가하지 않았으나 충전량이 많을수록 NO₃-N이 빠르게 제거되었고, 또한 NO₃-N제거율도 높았다. 이것은 고정화 비드 충전율이 많을수록 균체량이 많기 때문인 것으로 사료된다.

정 등³⁴⁾은 고정화 활성슬러지를 사용하여 합성하수 중의 질소를 제거할 때 고정화 비드 주입량이 많을수록 NH₄-N가 빠르게 제거됨을 나타낸바 있으며, 박 등³⁴⁾도 한천 아크릴아미드로 포괄 고정화한 미생물을 사용한 PVA처리특성 연구에서 PVA처리율은 반응기에 주입한 고정화 비드량에 비례하지는 않았으나 주입량이 많을수록 처리효율이 높음을 보고한 바 있다. 그러나 반응조 내에 비드 충전율을 30%나 50%로 유지하기 위해서는약품값이 과다하게 소요되므로 이후의 실험에서는 비드 충전율을 20%로 하여 회분식 실험을 수행하였다.

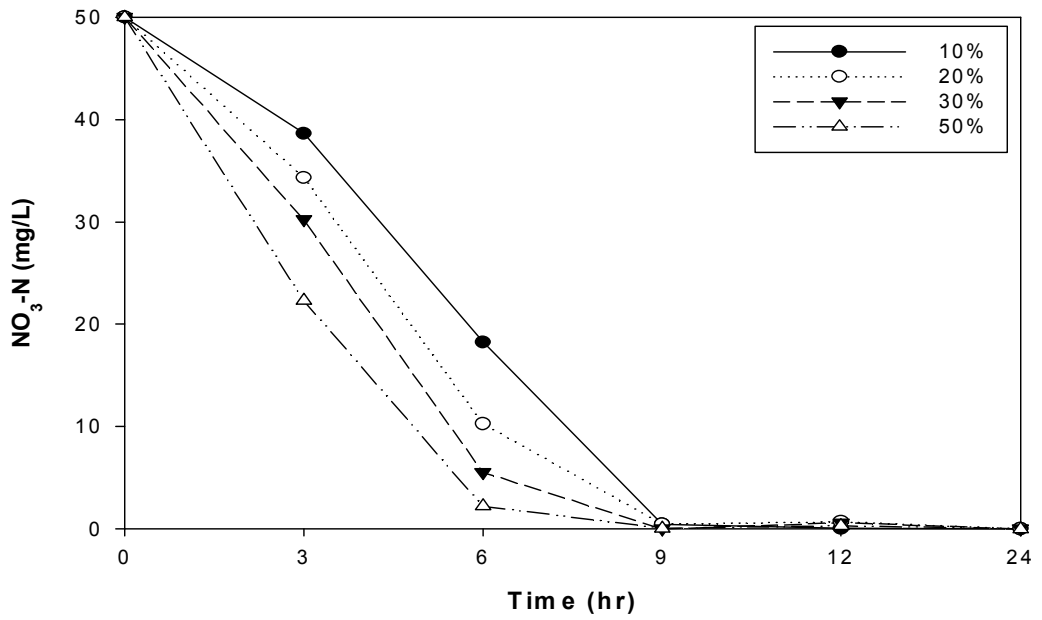


Fig. 7. Effect of bead amount on the removal of $\text{NO}_3\text{-N}$ at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

4) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 C/N비에 따른 NO₃-N의 제거

Fig. 8 에 나타낸 바와같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3을 사용하여 C/N비에 따른 NO₃-N의 제거변화를 나타내었다. 질소원은 NH₄NO₃이며, NO₃-N 농도는 50 mg/ℓ 이었다. 고정화 비드충진율은 20%이며 C/N비는 2.5~20이다.

NO₃-N제거의 경우 C/N비 5에서는 9시간만에 100%의 제거율을 나타냈으나 C/N비 2.5에서는 실험 9시간째 90%까지 제거된후 12시간만에 완전제거가 되었고, C/N비 10, 20에서는 9시간만에 각각 87.59%, 48.66%가 제거된후 C/N비 10에서는 12시간만에 완전 제거가 되었고 C/N 20에서는 15시간만에 완전 제거되었다.

이와 같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3를 사용하였을 때 C/N비 5이상 이어야만 NO₃-N를 9시간만에 빠른제거가 가능하다.

김³²⁾은 본 실험에 사용한 *P. aeruginosa* AE-1-3를 사용하여 C/N비에 따른 NO₃-N의 제거를 검토한 결과 C/N비 2.5에서는 NO₃-N이 76%만 제거됨을 보고한 바 있다.

본 실험에서와 같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3를 사용하여 NO₃-N를 빠른제거 하기 위해서는 C/N비 5이상이 필요할 것으로 사료된다.

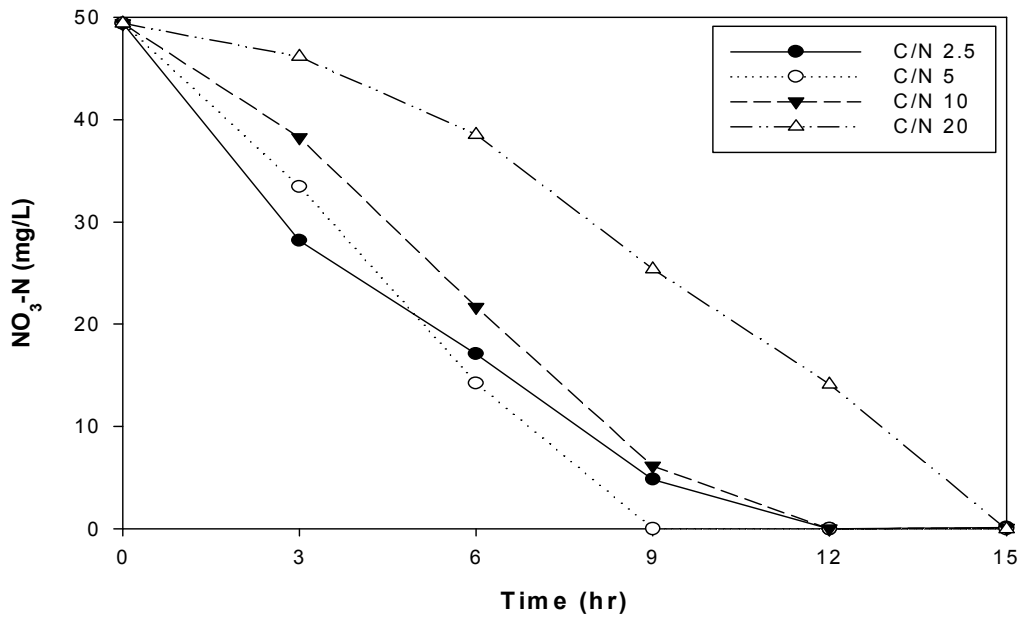


Fig. 8. Effect of bead amount on the removal of $\text{NO}_3\text{-N}$ by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

5) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 탄소원에 따른 NO₃-N의 제거

Fig.9 에 나타낸 바와같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 탄소원에 따른 NO₃-N의 제거변화를 나타내었다. 고정화 비드 충전율은 20%이며 C/N비는 5이고, 탄소원으로는 glucose, acetate 및 methanol을 사용하였다.

glucose를 탄소원으로 사용한 경우 약 9시간만에 98.3%의 제거율을 보였으나, methanol을 탄소원으로 사용한 경우 9시간 기준으로 NO₃-N가 49.76% 제거율을 보였고 48시간까지 관찰한 결과 81.3%의 제거율을 보였다. acetate를 탄소원으로 사용한 경우에는 약 9시간만에 NO₃-N가 57.52%의 제거율을 보였고 24시간만에 98.62%의 제거율을 보였다. 이와 같이 탄소원으로써 glucose를 사용하였을 때에는 NO₃-N가 9시간만에 98.3% 제거되었으나 methanol은 탄소원으로 이용하지 못했다. acetate를 사용하는 경우에도 NO₃-N 제거시에 탄소원으로 이용가능하나 glucose와 비교하여 약 50%정도 밖에 발휘하지 못함을 알수있다.

이것은 김³²⁾의 연구에서와 같이 고정화하지 않는 *P. aeruginosa* AE-1-3을 사용하여 여러 탄소원에 따른 NH₄-N 및 NO₃-N제거를 검토한 결과 methanol 탄소원으로 사용한 경우에는 *P. aeruginosa* AE-1-3이 증식하지 않았고 acetate를 탄소원으로 사용하였을 경우에는 glucose를 사용하였을 때의 약 반정도 밖에 증식하지 않음을 보고한 바 있다. 따라서 본 실험의 결과에서 처럼 acetate를 탄소원으로 이용시 NO₃-N가 약 60%정도밖에 제거되지 않는 것은 박테리아의 생육과 깊은 관계가 있는 것으로 사료된다.

일반적으로 활성슬러지를 사용한 질소 제거시에는 탄소원으로써 메탄올을 첨가하는 경우가 많은데 김 등⁴¹⁾은 COD/NO₃-N비가 3.0일 때 NO₃-N제거효율이 93%임을 보고한바 있고 안 등⁴²⁾은 C/N비 5~10에서 96%의 총질소 제거효율을 보였으나 C/N비 3과 2.8에서는 각각 83%와 81%를 나타낸 바 있다.

정 등⁴⁵⁾은 토양컬럼을 사용한 질소제거에 관한 연구에서 탄소원이 부족한 경우 메탄올을 C/N비 4.4이상 이 되도록 조절한 결과 안정적인 탈질효과를 보고한 바 있다.

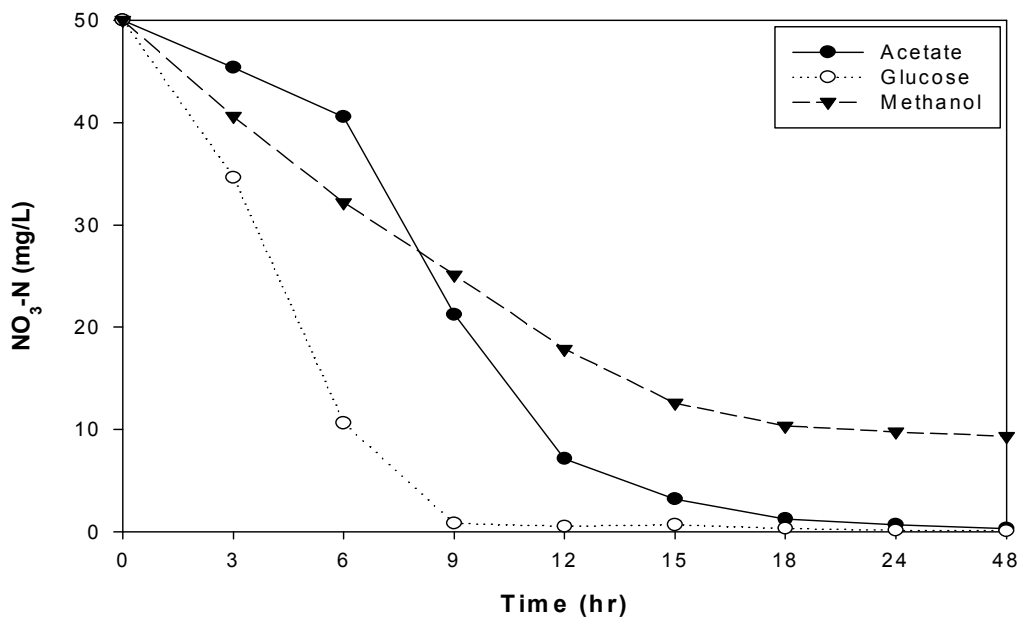


Fig. 9. Effect of different carbon sources on the removal of $\text{NO}_3\text{-N}$ by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

6) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 NO₃-N의 농도에 따른 제거

Fig. 10 에 나타낸 바와같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 NO₃-N의 제거 변화를 나타내었는데, 고정화 비드 충전율은 20%이며 C/N비는 5이고 초기 NO₃농도는 25~200 mg/ℓ 이다.

NO₃-N의 초기 NO₃-N농도 50 mg/ℓ까지는 9시간만에 완전히 제거되었으나 초기 NO₃-N농도 100 mg/ℓ 이상에서는 완전히 제거되지 않았다. 초기 NO₃-N농도 100 mg/ℓ, 150 mg/ℓ 및 200 mg/ℓ 일 때의 제거율(18시간기준)은 각각 99.2%, 98.47% 및 96.64%이었다.

한편 김³⁶⁾은 고정화하지 않은 *P. aeruginosa*를 사용하여 초기 NH₄NO₃농도에 따른 NO₃-N제거 연구에서 NO₃-N 350 mg/ℓ 까지도 18시간 만에 완전히 제거됨을 나타내었다.

이와 같이 *P. aeruginosa* AE-1-3을 고정화하지 않고 사용하는 경우에는 고농도의 NO₃-N이 제거되지만 본 균을 고정화 하면 초기 NO₃-N 농도가 50 mg/ℓ 이하까지만 완전히 제거되었다.

이것은 박테리아를 고정화하면 고정화 비드내로 기질 및 산소확산 저항이 크기 때문에 NO₃-N 제거효율이 저하되는 것으로 사료된다.

Fig. 11 은 Fig. 10 의 데이터(NO₃-N)를 이용하여 Lineweaver-Burk plot을 작성한 그림이다. Fig. 11 에서 처럼 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3을 사용하였을 때의 반속도 정수 K_m 값은 118.5 mg/ℓ 로 계산되었다. 반면에 김³²⁾의 연구결과에서의 K_m 값은 74.22 mg/ℓ 로 고정화하였을 때의 K_m 값이 높음을 알수 있다. K_m 값은 원래 효소와 기질간의 화학친화력의 관계를 나타내는 것으로서 K_m 값이 작을수록 친화력이 큼을 의미한다.

이와 같이 균체를 고정화 함으로써 K_m 값이 변화하는 것은 고정화 비드내에서의 기질 또는 생성물의 확산이 율속단계가 되기 때문에 겉보기 K_m 값이 증대되는 것으로 생각 할 수 있으며 본 실험의 결과와 같이 고정화 균체가 고정화하지 않은 균체보다 K_m 값이 큰 것은 고정화 비드내로 기질확산 저항이 커서 기질에 대한 친화성이 작기 때문인 것으로 사료된다.

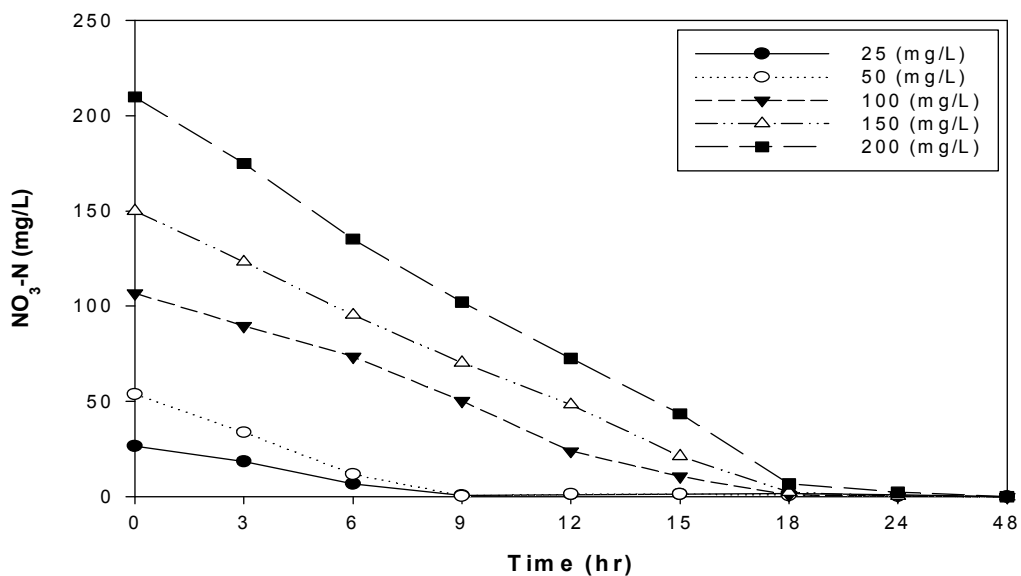


Fig. 10. Effect of initial $\text{NO}_3\text{-N}$ concentration on the removal of $\text{NO}_3\text{-N}$ by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

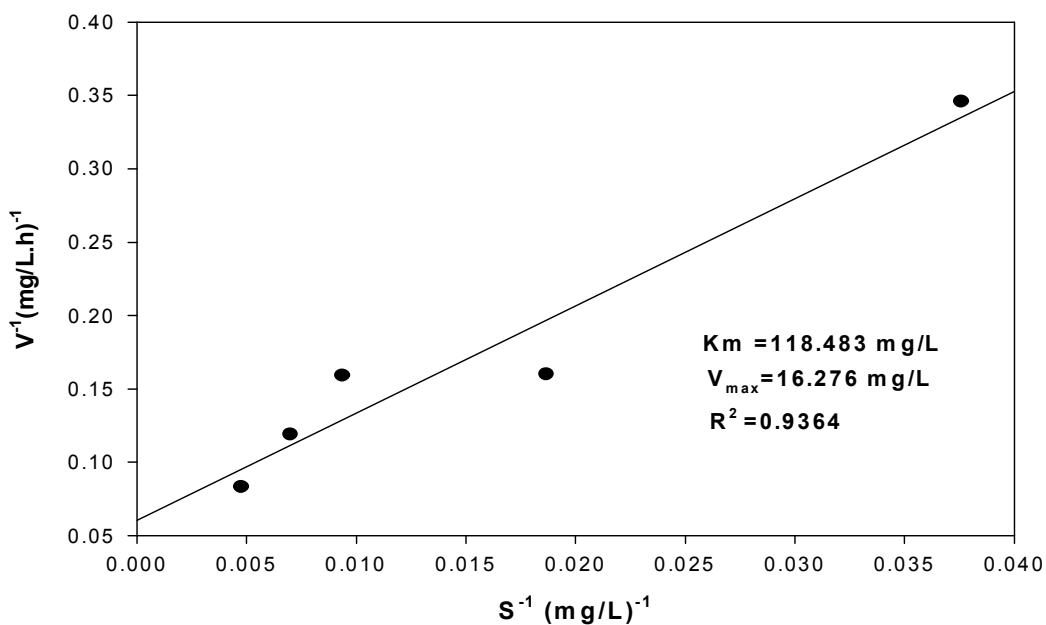


Fig. 11. Lineweaver-Burk plots immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3.

7) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 pH에 따른 NO₃-N의 제거

Fig.12 에 나타낸 바와같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3을 사용하여 pH에 따른 NO₃-N의 제거변화를 나타내었다. 고정화 비드 충전율은 20%이며 질소원은 NH₄NO₃이었으며, C/N비는 5이고 pH는 5~8으로 조절하였다.

NO₃-N제거를 보면 pH 5, 6에서의 실험 9시간째를 기준으로 할 때 NO₃-N제거율은 각각 96.8%, 96.8% 이고, pH 7, 8에서의 실험 9시간째를 기준으로 할 때 NO₃-N는 완전히 제거되었다.

김 등⁴⁾은 본 실험에 사용한 *P. aeruginosa* AE-1-3을 분리 동정할 때 최적 pH는 7.1이고 pH 8과 9 에서는 NH₄-N 및 NO₃-N의 제거율이 pH 7.1일 때보다 60~70%정도로 낮아짐을 보고한 바 있다.

Imai 등⁴⁵⁾ 및 Batsalova 등⁴⁵⁾은 효소를 PVA(polyvinyl alcohol)에 고정화 하여 pH 활성도를 조사한 결과 고정화 효소 쪽이 고정화하지 않은 효소보다 pH 활성도가 높았으며, Kobayashi 등⁴⁷⁾ 및 Canterella 등⁴⁸⁾ 역시 고정화 효소 쪽이 보다 넓은 pH 범위에서 반응하고 있음을 보고하였다.

또한 Tanaka 등⁴⁹⁾도 photo-crosslinkable resin을 이용하여 효소를 고정화하고 이 고정화 효소의 pH 활성도를 조사한 결과 고정화 효소가 고정화하지 않은 효소보다 넓은 pH범위에서 활성이 있음을 나타내었다. 이와 같이 미생물을 이용하여 하-폐수를 처리할 때 환경의 pH가 다른 경우에는 미생물을 고정화하면 미생물의 활성을 나타내는 pH보다 어느 정도 이동시킬 수 있을 것으로 사료된다.

이처럼 박테리아를 고정화하였을 때 최적 pH나 pH 활성도가 다른 이유는 고정화 재료의 정전기적 성질에 의한 것이라는 보고가 있지만 앞으로 pH 이동현상에 따른 연구가 필요할 것으로 판단된다.

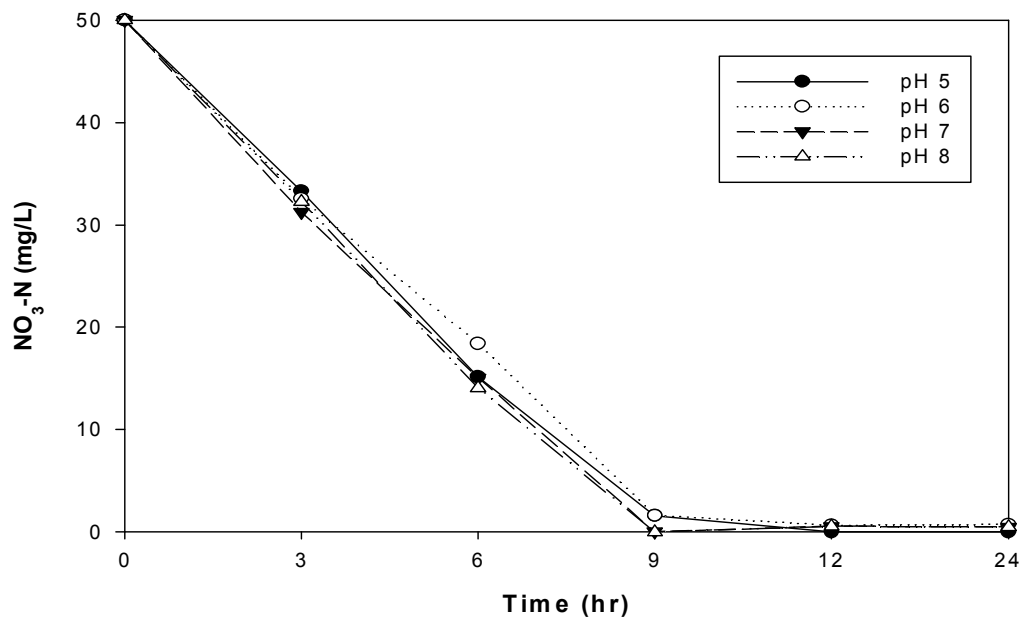


Fig. 12. Effect of pH on the removal of $\text{NO}_3\text{-N}$ by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

8) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 온도에 따른 NO₃-N의 제거

Fig.13 에 나타낸 바와 같이 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3을 사용하여 온도에 따른 NO₃-N의 제거변화를 나타내었다. 고정화 비드의 충전율은 20%이며 질소원은 NH₄NO₃이고 C/N비는 5이었으며 반응온도는 10℃, 20℃ 및 32℃이다.

NO₃-N제거의 경우 실험 9시간 일 때 반응온도 10℃, 20℃ 및 32℃에서 NO₃-N 제거율은 각각 96.8%, 96.8% 및 100%로 온도가 높을수록 NO₃-N의 제거율은 높았으며, 본 실험에서 사용한 *P. aeruginosa* AE-1-3의 온도변화에 따른 연구 결과는 없기 때문에 직접 비교하기는 어려우나 정⁴⁸⁾의 경우에서 처럼 활성슬러지를 고정화하면 낮은 온도인 10℃에서도 64%정도의 NH₄-N제거율을 보였듯이 *P. aeruginosa* AE-1-3을 고정화하였을 때 낮은 온도에서도 96.8%의 NO₃-N제거율을 나타내었다. 포괄고정화 담체의 경우 고정화하지 않는 미생물에 비해 온도에 대한 영향이 적은 것은 포괄 고정화 담체내에 서식하는 미생물의 경우 담체라는 보호막을 갖고 있어 외부환경에 덜 민감하기 때문일 것으로 사료되나 이 부분에 대한 고찰은 좀 더 많은 연구를 통하여 입증해야 할 것으로 사료된다.

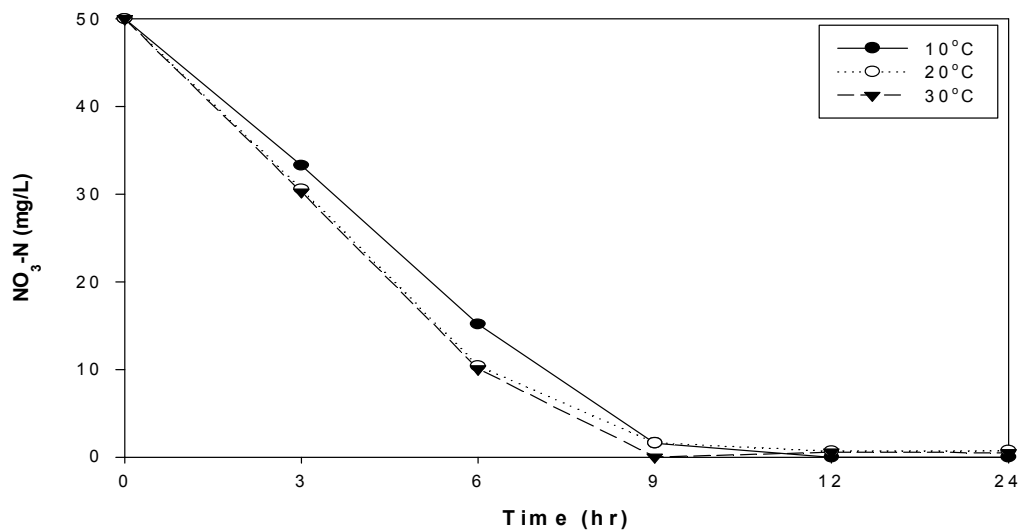


Fig. 13. Effect of different temperatures on the removal of NO₃-N removal by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3 at a C:N ratio of 5:1 and anoxic condition.

2. 연속식 실험

1) 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3의 NH₄-N, NO₃-N의 연속적 제거

Fig. 14와 15에는 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3을 이용하여 연속적으로 NH₄NO₃를 처리하였을 때의 NH₄-N 및 NO₃-N 제거변화를 나타내었다. 질소원은 NH₄NO₃이며 초기 C/N비는 5이고, 유입수 NH₄-N 및 NO₃-N농도는 각각 50 mg/ℓ 이다.

HRT 24시간일 때 유출수 NH₄-N는 35 mg/ℓ 에서 50.95 mg/ℓ 으로 변동하였으며 평균제거율은 3.14%이었고, 실험 8일째부터 HRT 12시간으로 낮추어 25일까지 운전하였다. 이 기간동안의 유출수 NH₄-N농도는 40 mg/ℓ 에서 50.45 mg/ℓ 까지 변동하였으며 평균 제거율은 6.83%이다. 실험 26일째부터는 HRT를 6시간으로 낮추어 39일까지 운전하였고 유출수 NH₄-N의 값은 36.95 mg/ℓ 에서 50.9 mg/ℓ 까지 변동하였으며 이때의 평균 제거율은 11.30%이었다.

P. aeruginosa AE-1-3을 고정화 하면 C/N비 5일때는 거의 제거가 되지 않는 것으로 사료된다.

NO₃-N의 제거의 경우 HRT 24시간일 때 유출수 NO₃-N는 0 mg/ℓ 에서 5.32 mg/ℓ 으로 변동하였으며 평균제거율은 97.43%이었다. 실험 8일째부터 HRT 12시간으로 낮추어 25일까지 운전하였고 이 기간동안의 유출수 NO₃-N농도는 0 mg/ℓ 에서 5.23 mg/ℓ 까지 변동하였으며 평균 제거율은 98.8%이다. 실험 26일째부터는 HRT를 6시간으로 낮추어 39일까지 운전하였고 유출수 NO₃-N의 값은 9.3 mg/ℓ 에서 33.2 mg/ℓ 까지 변동하였으며 이때의 평균 제거율은 45.7%이었다.

P. aeruginosa AE-1-3을 고정화 하면 C/N비 5일 때 HRT 12시간에서도 NO₃-N 제거율 98.8%를 얻을 수 있을 것으로 사료된다. 일반적으로 하수중의 질소를 제거하기 위해서는 C/N비가 3~5정도가 필요한 것으로 볼 때 가능하다면 C/N비를 증가시키는 것 보다는 낮은 C/N비에서 운전하는 것이 바람직 할 것으로 판단된다.

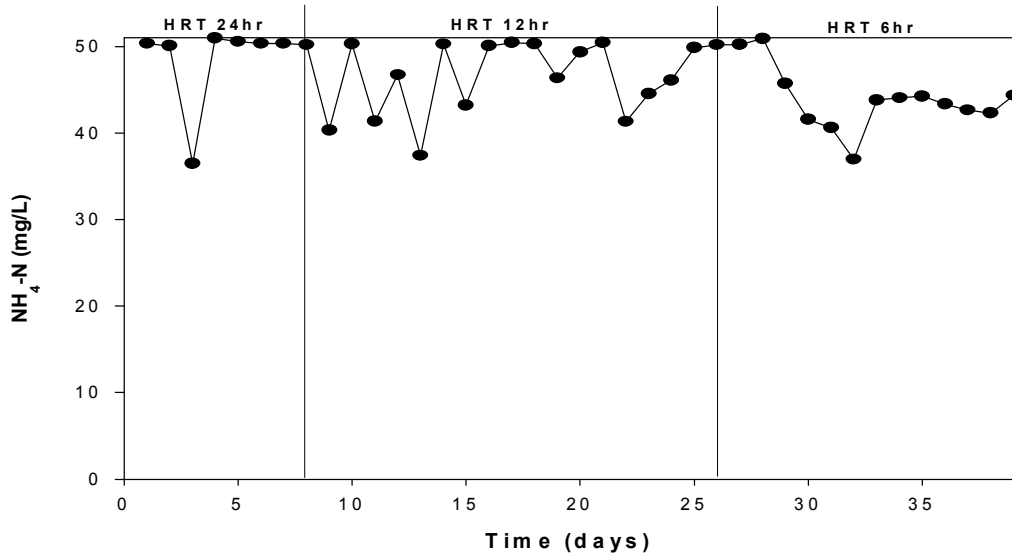


Fig. 14. Variation of effluent NH₄-N on continuous experiment by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3.

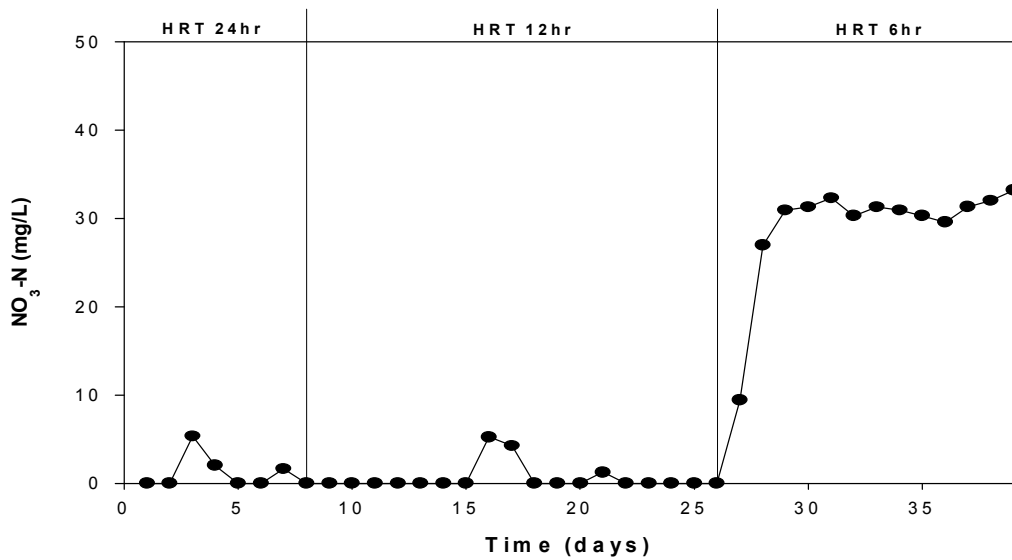


Fig. 15. Variation of effluent NO₃-N on continuous experiment by immobilized *P. aeruginosa* AE-1-3.

V. 결 론

고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3를 이용하여 무산소조건에서 $\text{NO}_3\text{-N}$ 를 제거하기 위하여 회분식 및 연속실험을 수행한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. C/N비 5이상이면 $\text{NO}_3\text{-N}$ 가 9시간만에 제거가 가능하였다. 또한 C/N비 2.5에서도 12시간만에도 제거가 되었다.
2. 초기 질소 농도에 따른 실험에서 $\text{NO}_3\text{-N}$ 제거시 $\text{NO}_3\text{-N}$ 200 mg/ℓ 에서도 18시간만에 96%의 제거율을 보였다.
3. 고정화 비드 충전률을 10%, 20%, 30%, 50%로 변화시켰을 때 고정화 비드 충전량에 따라 비례하여 증가하지는 않았으나 충전량이 많을수록 빠르게 제거되었다.
4. 고정화 비드는 *P. aeruginosa* AE-1-3의 균체농도가 높을수록, 비드크기가 작을수록 탈질화 시간이 단축되었다.
5. 탄소원으로 glucose를 이용하는 것이 $\text{NO}_3\text{-N}$ 를 제거하기 위해서는 바람직하고, acetate도 50% 제거 가능하였다.
6. $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 제거율은 온도가 증가할수록 증가하였다.
7. 최적 pH는 7-8사이 이다.
8. 고정화 *P. aeruginosa* AE-1-3을 이용하여 NH_4NO_3 를 질소원으로 하고 C/N비 5에서 연속적으로 처리한 결과 HRT 12시간에서도 $\text{NO}_3\text{-N}$ 의 평균 제거율은 98.8%이었다.

참 고 문 헌

- 1) Painter, H. A. : A Review of Literature on Inorganic Metabolism in Microorganism, *Wat. res.*, 4(6), 393-450, 1970.
- 2) 정재춘 : 미생물고정화법에 의한 배수처리, *동화기술*, 1991.
- 3) 김선일, 윤영재, 정경훈 : 광경화성 수지에 고정화된 활성슬러지에 의한 폐놀 분해, *한국생물공학회지*, 11(5), 577-585, 1996.
- 4) 김영주, 송영채, 김종오, 박홍석 : 혐기성 상태에서 암모늄 이온과 질산성 질소를 제거하는 미생물의 분리 및 배양조건, *Microbiol. Biotechnol.*, 33(1), 65~69, 2005.
- 5) Zumft W. G., Dreusch A., Lo'chelt S., Cuypers H., Friedrich B. and Schneider B., Derived amino acid sequences of the nosZ gene(respiratory N₂O reductase) from *Alcaligenes eutrophus*, *pseudomonas aeruginosa* and *Pseudomonas stutzeri* reveal potential copper-binding residues: implications for the CuA site of N₂O reductase and cytochrome-c oxidase. *Eur. J. Biochem.*, 208, 31-40, 1992
- 6) Knowels R., Denitrification, *Microbial. Rev.*, 46(1), 43-70, 1982.
- 7) Tchobanoglous, G., Burton, F.L. and Stensel, H.D. *Wastwater engi neering*, McGraw Hill Inc., New York, N.Y. 2003.
- 8) Sumino, T. Nakamura, H. and K. Yukio, Immobilization of Nitrifying Bacteria by Polyethylene Glycol Prepolymer, *J. Ferment. Bioeng*, 73:37-42, 1992.
- 9) U.S. EPA, Manual : Nitrogen Control, EPA/625/R-93/010, Washington, D.C., 1993
- 10) U.S. EPA, Process Design Manual Nitrogen Control, Washington, D.C., 1975
- 11) Cincinnati, Ohio.. Process Design Manual for Nitrogen Control, Environmental Protection Agency, Office of Technology Transfer, 1975.
- 12) Wanger, M., Rath, G., Amann, R., Koops, H.p. and Schleiferm, K.H. In situ Identification of ammonia - Oxidizing Bacteria, *sys. Appl. Microbio.*, 18:251-264, 1995.
- 13) WEF, Design of Wastewater Treatment Plants, 4th ed., Manual of Practice No.8, Water Environmental Federation, Alexandria, 1998.

- 14) Simpkin, T.J. The Lack of Repression by Oxygen of the Denitrifying Enzymes in Activated Sludge. *Water res.*, 22:201-206, 1981.
- 15) Payne, W. J, Denitrification, Wiley-interscience, New York,N.Y.1981.
- 16) Smolder, G.J.F., van der Loosdrecht, M.C.M., Heijnen, J.J. Model of the Anaerobic Metabolism of the Biological Phosphorus Removal Process : Stoichiometry and pH influence, *Biotechnol* 44:837-848, 1995.
- 17) Hockenbury, M.R. and Grady, C.P.L. Inhibition of Nitrification Effects of Selected Organic Compounds. *J. Water Pollu. Cont. Fed.*, 49:768,1977 13-33, 1985.
- 18) Hochstein, P., Ramasarma, T. and Muakkassah-Kelly, S. Inhibition of Nitrification of Dissolved Oxygen. *Water Res.*, 20(3):243-250, 1984.
- 19) 橋本 奨, 古川 憲治 : 活性汚泥の固定化とその浄化機能に関する研究, *下水導 協會 誌*. 22, 42-50, 1985.
- 20) Xing, X. H., Shiragami, N, and Unno, H. : Simultaneous of organic substances and nitrogen by retained microbial community accumulated in porous polyurethane particles, *水質汚濁研究會誌*, 14(2), 127-130, 1991.
- 21) Kawamura, J., Umita, T., Omura, Y., Aizawa, J. and Onuma, M. : Biological nitrification in the fluidized bed reactor with amberlite IRA-938 as a support medium, *水質汚濁研究會誌*, 14(3), 190-198, 1991.
- 22) Nilson, I., Hilson, S., Molin, N. and Mosbach, K. : Denitrification of Water using Immobilized *Pseudomonas* Denitrification Cells, *Eur. J. Appl. Microbiol. biotechnol.*, 10, 261-274, 1991.
- 23) Kokufuta, E., Matsumoto, W. and Nakamura, I. : Immobilization of *Nitrosomonas europaea* cells with polyelectrolyte complex, *Biotechnol. Bioeng.*, 24, 1591-1603, 1982.
- 24) Kokufuta, E., Shimohashi, M. and Nakamura, I. : Immobilization of *Paracoccus denitrificans* cells with polyelectrolyte complex and denitrifying activity of the immobilized cells, *J. Ferment. Technol.*, 64, 533-538, 1986.
- 25) 角野 立夫, 大竹 康友, 中村 紀 : アクリルアミド 包括固定化法による排水処理, *用水と 廃水*, 29, 735-741, 1987.

- 26) Wang, J.L., 2002, Microbial immobilization techniques and water pollution control[M]. Beijing: Science Press.
- 27) Van Huyssteen, J. A., Barnard, J. L. and Hendriksz, J. : The Olifantsfontein Nutrient Removal Plant, Water Science and Technology, 22, 1~8, 1990.
- 28) 일본하수도신기술추진협회, "담체를 이용한 하수처리공법 기술 Manual". 1994.
- 29) 順藤隆一, 微生物固定化法による排水處理, 初版發行, 産業用水調査會, 26-31, 1988.
- 30) 橋本蘚, ベイオテクノロジー活用の高機能型活性汚泥法, 第1版發行, 技報堂版, 101-102, 1995.
- 31) 김종택, 수질오염공정시험법 해설, 서울: 신광출판사, 1999.
- 32) 김세영 : *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 NH_4^+ 및 NO_3^- -N의 동시 제거에 관한 연구, 조선대학교 대학원 석사논문, 31-32, 2008.
- 33) 정경훈, 최형일, 정오진 : 고정화 활성슬러지에 의한 폐수중의 질소제거 가능성 평가, 한국물환경학회지, 19, 17-24, 2003.
- 34) 박영규, 이철희, 박수정 : 포괄고정화법에 의한 PVA 함유 폐수의 처리특성, 대한환경공학회지, 16(8), 985-993, 1995.
- 35) 정경훈, 최형일 : 고정화 *Thiobacillus* sp. 011에 의한 티오시안 분해에 미치는 성질, 대한환경공학회지, 16, 381-390, 1994.
- 36) Bettmann, H. and rehm, H. J. : Degradation of phenol by polymer entrapped microorganisms, appl. microbiol. Biothechnol., 20, 285-290, 1984.
- 37) 戸田 清 : 固定化 微生物の 廢水處理への 應用, 用水と廢水, 27, 992-999, 1985.
- 38) Martinson, A., Brak, G. and Smiderod, O. : Alginate as immobilization material : Corelation between chemical and physical properties of alsinate of gel beads, Biotechnal. Bioeng., 33, 79-89, 1989.
- 39) Sheldon, J., O. Duff, B. and William, D. M. : comparison of free and immobilized *pichia pastoris* cells for conversion of ethanol to acetaldehyde, Biotechnal. Bioeng., 31, 790-795, 1988.

- 40) Morikawa, Y., Ohiai, K., Karube, I. and Suzuki, S. : Bacitracin production by whole cells immobilized in polyacrylamide, *Antimicrob. Agent. Chemother.*, 15, 126-130, 1979.
- 41) 김형석, 은종국, 방승조 : 각종 수소공여체의 첨가에 의한 NO₃-N 함유 폐수 탈질, *한국환경과학회지*, 4(3), 229-237, 1995.
- 42) 안윤찬, 배민수, 이종호, 조윤경, 조광명 : 교대로 간헐포기 되는 부직포 여과막 생물반응조에서 C/N비가 유기물 및 질소 제거효율에 미치는 영향, *대한환경공학회지*, 27(5), 499-506, 2005.
- 43) 정경훈, 임병갑, 최형일, 박상일, 문옥란 : 토양컬럼을 이용한 합성하수종의 질소제거, *한국환경과학회지*, 16(6), 707-714, 2007.
- 44) 정종령 : 고정화 활성슬러지를 이용한 합성폐수종의 질소제거에 관한 연구, *조선대학교 대학원 석사논문*, 33-34, 2002.
- 45) Imai, K., Shiomi, T., Uhida, K. and Miya, M. : Immobilization of enzyme into poly(vinyl alcohol) membrane, *Biotechnol. Bioeng.*, 28, 1721-1726, 1986.
- 46) Batsalova, K., Kunchev, K., Popova, Y., Kozhukharova, A. and Kirova, N. : Hydrolysis of lactose by β -galactosidase immobilized in polyvinylalcohol, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 26, 227-230, 1987.
- 47) Kobayashi, T. et al. : Elimination of glucose in egg white by co-immobilized glucose oxidase and catalase, *J. Ferment. Technol.*, 56, 506-510, 1978.
- 48) Canterella, M. et al. : Immobilization of yeast cells in hydroxyethylmethacrylate gels, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 20, 233-237, 1984.
- 49) Tanaka, A., Hagi, N., Yasuhara, S. and Fukui, S. : Immobilization of catalase with photo-crosslinkable resin prepolymers, *J. Ferment. Technol.*, 56(5), 511-515, 1978.

저작물 이용 허락서

학 과	환경공학과	학 번	20087115	과 정	(석사) 박사
성 명	한글 박 경 훈 한문 朴 庚 勳 영문 Gyoung Hun Park				
주 소	광주광역시 남구 봉선2동 쌍용아파트 107동 1001호				
연락처	E-mail : cromdark@lycos.co.kr				
논문제목	한글 : 고정화 <i>Pseudomonas aeruginosa</i> 를 이용한 질소제거에 관한 연구				
	영문 : A Study on the Removal of Nitrogen by Immobilized <i>Pseudomonas aeruginosa</i>				

본인이 저작한 위의 저작물에 대하여 다음과 같은 조건 아래 -
 조선대학교가 저작물을 이용할 수 있도록 허락하고 동의합니다.

- 다 음 -

1. 저작물의 DB구축 및 인터넷을 포함한 정보통신망에의 공개를 위한 저작물의 복제, 기억장치에의 저장, 전송 등을 허락함.
2. 위의 목적을 위하여 필요한 범위 내에서의 편집과 형식상의 변경을 허락함. 다만, 저작물의 내용변경은 금지함.
3. 배포·전송된 저작물의 영리적 목적을 위한 복제, 저장, 전송 등은 금지함.
4. 저작물에 대한 이용기간은 5년으로 하고, 기간종료 3개월 이내에 별도의 의사 표시가 없을 경우에는 저작물의 이용기간을 계속 연장함.
5. 해당 저작물의 저작권을 타인에게 양도하거나 출판을 허락을 하였을 경우에는 1개월 이내에 대학에 이를 통보함.
6. 조선대학교는 저작물 이용의 허락 이후 해당 저작물로 인하여 발생하는 타인에 의한 권리 침해에 대하여 일체의 법적 책임을 지지 않음.
7. 소속 대학의 협정기관에 저작물의 제공 및 인터넷 등 정보통신망을 이용한 저작물의 전송·출력을 허락함.

동의여부 : 동의(○) 반대()

2010년 2월

저작자: 박경훈 (인)

조선대학교 총장 귀하