GOVP1199209238

제 1 차년도
연차보고서

61 / 100

수질오염 종합관리 신기술 개발

미생물을 이용한 폐수중 중금속 제거/회수기술 개발

Study on Removal/Recovery Technology of Heavy Metals in Wastewater using Microorganisms

연구기관
한국과학기술연구원

寄贈
과학기술처 寄贈
一九92年 4月 201.

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처 장관 귀하

본 보고서를 "수질오염 종합관리 신기술개발"의 세부과제인 "미생물을 이용한 폐수중 중금속 제거/회수기술 개발" 과제의 보고서로 제출합니다.

1991. 7. 20.

주관연구기관명 : 한 국 과 학 기 술 연 구 원

연 구 책 임 자 : 정윤철(한국과학기술연구원 수질환경연구실)

연 구 원 : 안대희(한국과학기술연구원 수질환경연구실)

김동하(한국과학기술연구원 수질환경연구실)

위탁연구책임자 : 서진호(서 울 대 학 교 식 품 공 학 과 교 수)

노수홍(연 세 대 학 교 환 경 과 학 과 교 수)

여백

요 약 문

Ⅰ. 제 목

미생물을 이용한 폐수중 중금속 제거/회수기술 개발

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

국내의 급속한 산업발전의 부산물인 환경오염은, 인구증가, 산업화, 도시화의 가속화와 함께 날로 증가 추세에 있다. 특히 각종 산업폐수를 통해 유입되는 중금속은 하천, 지하수를 오염시켜 지난 89년 여름과 같이 전국적인 식수오염 파동을 낳게 했고, 폐기물과 함께 유기된 중금속은 토양오염을 일으키고 있어 발생되는 중금속류의 적절한 처리와 정화가 요청된다 하겠다.

본 연구의 목적은 미생물, 세포 또는 그 생성물을 이용하여 폐수, 지하수, 토양등에 함유된 중금속을 제거, 회수할 수 있는 신기술 개발에 있다. 문헌조사 및 기초실험을 통해 적합한 균주 또는 바이오매스를 선택하여, 대량배양 및 생물고분자 생성연구에 의해 생물흡착제를 확보하고, 중금속 흡착실험을 통해 중금속 제거 및 회수 능력을 조사하고 실제 응용실험에 의해 효율적인 중금속 처리 시스템을 개발할 계획이다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

1차년도 연구결과의 주요내용은

1) 문헌조사를 통한, 중금속처리기술 현황과 생물흡착(biosorption)에 의한 중금속처리의 이론적 배경 및 기술현황 파악

2) 중금속 흡착제 사용을 위한 생물고분자 생성 미생물 배양실험

3) 생물고분자의 회수

4) 생물고분자의 중금속 제거/회수 실험

Ⅳ. 연구개발결과 및 활용에 대한 건의

미생물에 의한 중금속 제거/회수기술개발의 1차년도 기초연구를 위해, 선택한 균주는 활성오니에서 floc을 형성하여 유기물질 분해, 중금속 흡착등의 주요 기능을 갖는 Zoogloea ramigera 115이며 생물고분자 생산을 위한 최적 배양조건의 확립과 생물고분자의 생산성을 높히기 위하여 회분식 발효, 유가배양식 발효, 2단계 연속발효를 수행하였다. 탄소원으로는 glucose, lactose, molasses, cheese whey를 사용하여 각 기질에 대하여, 발효방법에 따른 미생물의 생장과 생물고분자 생성특성을 관찰하였다.

추출된 생물고분자는 카드뮴, 아연등의 중금속 흡착실험에서 높은 흡착률을 나타내었고, 특히 발효조 broth 자체도 높은 흡착성능을 나타내어 별도의 추출과정이 필요없이 생물고분자가 함유된 broth가 직접 흡착제로 사용될 수 있음을 보여주었다. 유가금속의 회수 목적으로 생물고분자를 고정화시킨 후 packed bed column을 이용하여 중금속 흡착/탈착 실험을 실시하였는데 초기 90% 이상의

높은 흡착률과 높은 안정성, 탈착을 통한 회수 및 흡착제의 재사용 가능성을 보여 주었다. 그러나 본 packed bed column의 bead 자체가 갖는 흡착능력이 한정되어 있기 때문에, 향후과제로는 고정화 방법의 개발, 다단계 column을 사용하여 흡착, 탈착, 새흡착제 공급등의 연속공정개발을 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.

본 연구결과는 현 시점에서 유가 중금속의 회수, 저농도 중금속 폐수 또는 중금속으로 오염된 지하수 처리, 오염토양 정화등에 활용이 가능할 것으로 기대되며, 제거효율이 높고, 에너지 절약, 처리장의 소형화, 경비 절감등의 특성을 갖는 유사생물학적 처리 공정에 응용이 가능하고 생물흡착의 기구규명을 위한 기초연구 자료로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

여백

SUMMARY

Ⅰ. Title

Study on Removal/Recovery Technology of Heavy Metals in Wastewater using Microorganisms

Ⅱ. Purpose and Significance of the Study

Population increases, industrialization and urbanization have accelerated environmental pollution as a costly price for the nation's developments. In particular, heavy metals, discharged through several industrial wastewater, pollute river, groundwater and soil, causing a tap water shcok waves across the nation in the summer of 1989, and then proper treatment of heavy metals becomes very urgent issues.

The purpose of this study is to develop new technology for removal and recovery of heavy metal in wastewater, groundwater, and soil using microorganisms or their products. Proper microorganisms or biomass is selected by literature survey and fundamental experiments, and biosorbents are secured through studies on mass culture and biopolymer production. Then the removal and recovery of heavy metal by the biosorbents are investigated by biosorption experiments, and an effective system of heavy metal treatment will be developed, which is applied to real system.

Ⅲ. Content and Scope of Study

1) Study on current status of heavy metal treatment technology and theoretical background and technology status on biosorption by literature survey.

2) Experiments on microorganism culturing and biopolymer production for biosorbent usage.

3) Recovery of biopolymer

4) Experiments on heavy metal removal and recovery by biopolymer.

Ⅳ. Results and Discussion

Zoogloea ramigera 115, well known type of bacteria to produce slime in sewage plants, was selected. Cultural conditions of the organism were examined with regard to high production fo microbial polysaccharide in batch, fed−batch, and two−statges continuous reactor. Glucose, lactose, molasses, and cheese whey were used as a carbon source, and the characteristics of both microbial growth and biopolymer production were examined for each carbon source.

The extracted biopolymer showed high ratio of absorption to metals such as cadmium and zinc. Especially the fermentor broth itself showed high absorption of metal and may be used a biosorbent without additional separation process.

Biopolymer was immobilzed into beads of calcium alginate and

used in vertical tube reactor for the purpose of valued metals recovery. The biosorbent showed high removal efficiencies of 90% or greater for Cu, Cd, Mn and Zn, and high stability in series of sorption—desorption experiments. The immobilized biopolymer systems were found to be comparable to other metal removal systems such as ion exchange resins and to be potential industrial application value. However, beads in packed bed column have a limited adsorbility and further reserach has been performed for improvement of immobilized method and development of continuous reacter for their multiple uses.

여백

CONTENTS

Chapter 1. Introduction ····· 21

Chapter 2. Technology Status of Heavy Metal Treatment from Wastewater ····· 24

Ⅰ. Status of heavy metal wastewater discharges ····· 24

1. Industrial wastewater ····· 24

2. Specified wastewater ····· 29

Ⅱ. Status in classification by industry ····· 33

1. Fabricated metal products, machinery & equipment industries ··· 33

2. Basic metal manufacturing industries ····· 36

3. Leather and fur skins manufacturing industries ····· 36

Ⅲ. Trends of treatment technology of heavy metal wastewater ····· 41

1. Treatment of cyan wastewater ····· 41

2. Treatment of chrom wastewater ····· 43

3. Sedimentation methods ····· 44

4. Neutralization methods ····· 47

Ⅳ. Research trends in the country ····· 47

Ⅴ. Summary ····· 48

Chapter 3. Theoretical Background on Biosorption ····· 51

Ⅰ. Heavy metal biosorption ····· 51

1. Theory of biosorption ····· 51

2. Bacteria and activated sludge ····· 53

3. Fungi and algae ····· 57

4. Biomaterials ····· 58

Ⅱ. Application of biosorption ····· 60

Ⅲ. Biosorption processes ····· 61

1. Immobilization of biosorbent ····· 61

2. Use of biosorption processes ····· 63

Ⅳ. Summary ····· 64

Chapter 4. Biopolymer ····· 66

Ⅰ. Introduction ····· 66

Ⅱ. Biopolymer production by Zoogloea ····· 67

1. Floc formation in activated sludge ····· 67

2. Structure and physical characteristics of the biopolymer ····· 67

3. Z. ramigera cultivation and biopolymer separation ····· 69

4. Heavy metal removal by the biopolymer ····· 70

Chapter 5. Experiments for Biopolymer production ····· 72

Ⅰ. Experimental methods ····· 72

1. Microorganism and culture composition ····· 72

2. Fermentor experiments ····· 74

3. Analysis ····· 79

Ⅱ. Experimental results and discussion ····· 80

1. Batch fermentation ····· 80

2. Fed−batch fermentation ····· 88

3. Continuous fermentation ····· 90

Ⅲ. Summary ····· 92

Chapter 6. Experiments for Heavy Metal Biosorption ····· 95

Ⅰ. Preliminary experiments ····· 95

1. Experimental methods ····· 95

2. Experimental results and discussions ····· 96

Ⅱ. Biosorption reactor experiments ····· 104

1. Experimental methods ····· 104

2. Experimental results and discussions ····· 107

Ⅲ. Summary ····· 118

Chapter 7. Conclusion and Future Plan ····· 120

References ····· 122

Appendices ····· 133

여백

목 차

제1장 서 론 21

제2장 중금속폐수 처리기술 현황 24

제1절 중금속폐수 발생현황 24

1. 산업폐수 발생현황 24

2. 특정폐수 발생현황 29

제2절 업종별 현황 33

1. 조립금속, 기계 및 장비업 33

2. 제1차 금속제조업 36

3. 가죽 모피제조업 36

제3절 중금속폐수의 처리기술 현황 41

1. 시안계 폐수의 처리 41

2. 크롬계 폐수의 처리 43

3. 침전법 44

4. 중화처리법 47

제4절 국내의 연구현황 47

제5절 요 약 48

제3장 생물흡착의 이론적 배경 51

제1절 중금속의 생물흡착 51

1. 생물흡착의 원리 ····· 51

2. 세균류와 활성슬럿지 ····· 53

3. 균류와 조류 ····· 57

4. biomaterial ····· 58

제2절 생물흡착의 응용 ····· 60

제3절 생물흡착 공정 ····· 61

1. 생물흡착제의 고정화 ····· 61

2. 생물흡착공정의 이용 ····· 63

제4절 요 약 ····· 64

제4장 생물고분자 ····· 66

제1절 개 요 ····· 66

제2절 Zoogloea에 의한 생물고분자 생산 ····· 67

1. 활성슬럿지의 floc 형성 ····· 67

2. 생물고분자의 구조 및 물성 ····· 67

3. Z. ramigera 배양과 생물고분자 분리 ····· 69

4. 생물고분자에 의한 중금속 제거 ····· 70

제5장 생물고분자 생성실험 ····· 72

제1절 실험 방법 ····· 72

1. 균주 및 배지조성 ····· 72

2. 발효조 실험 ····· 74

3. 분석방법 ····· 79

제2절 실험결과 및 고찰 ····· 80
1. 회분식 발효 ····· 80
2. 유가배양식 발효 ····· 88
3. 연속 발효 ····· 90
제3절 요 약 ····· 92

제6장 중금속 흡착실험 ····· 95
제1절 기초실험 ····· 95
1. 실험방법 ····· 95
2. 실험결과 및 고찰 ····· 96
제2절 흡착 반응기 실험 ····· 104
1. 실험방법 ····· 104
2. 실험결과 및 고찰 ····· 107
제3절 요 약 ····· 118

제7장 결론 및 향후계획 ····· 120

참고문헌 ····· 122

부록 : 위탁연구과제 ····· 133

표 목 차

표 2-1. 산업폐수 배출업소 및 폐수배출량의 연도별 변화 ····· 26

표 2-2. 업종별 폐수량 현황표 ····· 27

표 2-3. 방지시설 현황 ····· 30

표 2-4. 시·도별 특정 유해물질 및 중금속 폐수 배출량 현황 ····· 31

표 2-5. 특정 유해물질 및 중금속별 발생량 현황 ····· 32

표 2-6. 기계제조 시설에서의 폐수성상 및 처리효율 ····· 38

표 2-7. 일차금속 제조시설에서의 원폐수수질 ····· 39

표 2-8. 피혁폐수의 화학적 생물학적 처리에 사용된 약품 ····· 42

표 2-9. 가죽(우피) 제조시설에서의 폐수성상 및 처리효율 ····· 43

표 2-10. Treatment technologies for toxic priority pollutants ····· 46

표 3-1. Bacteria의 생물흡착 ····· 55

표 3-2. Biomaterial의 생물흡착 ····· 59

표 5-1. Arginine 첨가 medium ····· 73

표 5-2. 기질조성 ····· 73

표 6-1. Determination of qo and b in Langmuir isotherm model ····· 103

표 6-2. Determination of log k and 1/n in Freundrich isotherm model ····· 103

그 림 목 차

그림 2-1. 산업폐수 배출업소 및 폐수 배출량의 증가추이 ····· 25

그림 2-2. 전국 수계별 오염원 분포도 ····· 28

그림 2-3. 가공금속 제품 기계 및 장비제조 시설의 도금 공정 ····· 35

그림 2-4. 기계제조시설중 도금 폐수 처리 공정도 ····· 35

그림 2-5. 기계제조시설중 비도금 폐수처리 공정도 ····· 37

그림 2-6. 제철제강시설의 폐수처리 공정도 ····· 37

그림 2-7. 피혁폐수의 화학적 생물학적 처리공정도 ····· 40

그림 4-1. Z. ramigera 115의 생성 다당류의 추정 구조 ····· 69

그림 5-1. 회분식 배양실험 장치 ····· 75

그림 5-2. 유가배양식 발효실험 장치 ····· 76

그림 5-3. 2단계 연속 발효실험 장치 ····· 77

그림 5-4. 탄소원이 glucose(C/N 90)일때 생물고분자의 생성추이 ····· 82

그림 5-5. 탄소원이 lactose(C/N 30)일때 생물고분자의 생성추이 ····· 84

그림 5-6. 탄소원이 molasses(C/N 60)일때 생물고분자의 생성추이 ··· 85

그림 5-7. 탄소원이 cheese whey(C/N 90)일때 생물고분자의
생성추이 ····· 87

그림 5-8. molasses를 기질로 사용한 유가배양식 발효 결과 ····· 89

그림 5-9. molasses를 기질로 사용한 2단계 연속 발효실험 ····· 91

그림 5-10. cheese whey를 기질로 사용한 2단계 연속 발효 실험 ··· 93

그림 6-1. 바이오 매스에 따른 시간별 Cd 잔여농도의

변화(Cd 초기농도 100ppm) ····· 97
그림 6-2. 바이오 매스에 따른 시간별 Cd 잔여농도의
변화(Cd 초기농도 200ppm) ····· 98
그림 6-3. 바이오 매스에 따른 시간별 Cd 잔여농도의
변화(Cd 초기농도 300ppm) ····· 99
그림 6-4. 바이오 매스에 따른 시간별 Cd 흡착등온선(Langmuir model) ·····101
그림 6-5. 바이오 매스에 따른 시간별 Cd 흡착등온선(Fruendrich model) ····102
그림 6-6. Schematic diagram of immobilization apparatus ·····105
그림 6-7. Schematic diagram of the differential reactor ·····106
그림 6-8. 흡착반응기에서의 Cd 흡착량의 변화·····108
그림 6-9. 흡착반응기에서의 Zn 흡착량의 변화·····109
그림 6-10. 흡착반응기에서의 Mn 흡착량의 변화 ·····110
그림 6-11. 흡착반응기에서의 Cu 흡착량의 변화 ·····111
그림 6-12. NTA 처리시 중금속의 탈착량의 변화 ·····112
그림 6-13. NTA 처리후 흡착반응기에서의 Cd 흡착량의 변화 ·····114
그림 6-14. NTA 처리후 흡착반응기에서의 Zn 흡착량의 변화 ·····115
그림 6-15. NTA 처리후 흡착반응기에서의 Mn 흡착량의 변화·····116
그림 6-16. NTA 처리후 흡착반응기에서의 Cu 흡착량의 변화 ·····117

제1장 서 론

국내의 급속한 산업발전의 부산물인 환경오염은, 인구증가, 산업화, 도시화의 가속화와 함께 날로 증가 추세에 있다. 특히 각종 산업폐수를 통해 유입되는 중금속은 하천, 지하수를 오염시켜 지난 89년 여름과 같이 전국적인 식수오염 파동을 낳게 했고, 폐기물과 함께 유기된 중금속은 토양오염을 일으키고 있어 발생되는 중금속류의 적절한 처리와 정화가 요청된다 하겠다.

기존 중금속폐수의 처리방법으로는 산화/환원법, 응집침전법, 흡착, 이온교환법, 전기분해법, 중화법, 추출법등이 있는데 응집침전법과 이온교환수지를 이용하는 이온교환법이 가장 많이 쓰여지고 있다. 응집 침전법은 설치가 용이하고 유지비용과 에너지 소비가 상대적으로 낮은 장점을 지니고 있기 때문에 가장 보편적으로 사용되고 있는 처리방법이나, 중금속 제거율이 낮고 많은 양의 화학응집제가 사용되어 침전되는 슬럿지처리등이 큰 문제점으로 지적되고 있다. 이온교환수지법은 침전법에 비하여 제거율이 높고 저농도의 중금속 이온을 선택적으로 제거할 수 있는 장점을 지니고 있으나, 고가의 수지를 사용하여야 하기 때문에 금속의 회수 및 재사용이 병행되지 않을 경우 다른 처리방법에 비하여 비경제적이라 할 수 있다.

80년대에 들어서서 미국, 유럽의 환경보전기술은 지금까지 오염물질처리의 사후처리 차원에서 벗어나 오염물질의 발생을 원천적

으로 없애거나 극소화시키는 방향으로 전환하는 클린텍 연구개발로 점차적으로 전환되고 있는데, 결국 자원과 에너지의 절약 및 효율적 이용의 측면에서 중금속 등 유가자원의 회수의 중요성이 증대되고 있다 하겠다. 실제 여러 산업체에서는 폐수, 폐기물의 발생을 억제하고 유가자원의 회수를 통해 막대한 경비를 절감하고 있는 사례가 보고되고 있다.

따라서 날로 증가추세에 있는 중금속 오염의 심각성에 대처하여 중금속 폐수의 효과적인 처리를 위한 중금속을 선택적으로 분리 회수할 수 있는 저가의 수처리제 또는 처리공정개발이 앞으로 중요한 과제라 하겠다.

미국, 유럽에서는 기존 물리화학적 방법을 대체할 수 있는 생물학적 처리에 의한 고효율의 중금속 제거 회수기술개발을 추진하고 있다. 특히 생물고분자는 미생물에 의한 유기물질 분해에 의해 생성되며, 점성이 강하고 생분해성을 갖고 있기 때문에, 생물흡착에 의한 중금속 제거 및 회수에 널리 사용될 수 있을 걸로 기대되고 있는데, 유출수에 잔류시 자연적인 분해로 이차공해를 유발하지 않는 특성을 갖는다.

미생물에 의한 중금속의 제거, 농축, 회수는 지난 10년간 많은 관심을 끌어 왔지만, 중금속 제거를 위한 미생물의 실제 이용은 1940년 말로 거슬러 올라갈 수 있는 데, Ruthloft(1949)은 활성슬럿지(activated sludge)가 plutonium－239를 효과적으로 제거할 수 있는 것을 관찰하였다. 일단계 처리로써 96% 제거가 가능하였으며, 특히 젤라틴 성분을 갖는 미생물군이 제거 기능을 갖는 것을 설

명하였다. 그 후 생물학적 처리에 의한 도시 및 산업폐수로 부터의 중금속 제거에 관한 많은 연구가 진행 되어 왔는데, 광산 폐수로부터 Pb, Zn, Cu, Mn 등의 제거를 위해 광합성 생물의 사용 (Gale et al., 1979), Schumate 등 (1980)의 잔류 우라늄 제거를 위한 세균(pseudomonad)을 사용한 유동층 형태의 bioreactor 개발, Norberg등 (1984)등이 응집성 미생물인 Z. ramigera를 이용, 중금속 제거용 연속공정 개발을 들 수 있다. 아직 대규모의 상업적 이용은 드물지만, 해수로 부터 유용한 물질회수, 산업폐수로 부터 중금속 제거등을 위한 더욱 진보된 공정 및 조작 개발이 진행되고 있다.

본 연구의 목적은 미생물, 세포 또는 그 생성물을 이용하여 폐수, 지하수, 토양등에 함유된 중금속을 제거, 회수할 수 있는 신기술 개발에 있다. 문헌조사 및 기초실험을 통해 적합한 균주 또는 바이오매스를 선택하여, 대량배양 및 생물고분자 생성연구에 의해 생물흡착제를 확보하고, 중금속 흡착실험을 통해 중금속 제거 및 회수 능력을 조사하고 실제 응용실험에 의해 효율적인 중금속 처리 시스템을 개발할 계획이다.

본 연구결과는 현 시점에서 유가 중금속의 회수, 저농도 중금속 폐수 또는 중금속으로 오염도니 지하수 처리, 오염토양 정화 등에 활용이 가능할 것으로 기대되며, 제거효율이 높고, 에너지 절약, 처리장의 소형화, 경비 절감등의 특성을 갖는 유사 생물학적 처리 공정에 응용이 가능하고 생물흡착의 기구규명을 위한 기초연구 자료로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

제2장 중금속폐수 처리기술현황

제1절 중금속 폐수발생현황

1. 산업폐수발생현황

1989년 현재의 산업폐수배출업소는 11,203개 업소이고 1일 폐수배출량은 6,497,000m^3에 달하고 있으며 배출량의 25%인 1,656,100m^3 정도가 수역으로 방류되고 있다. 이는 1980년의 3,984개 업소의 1,962(m^3/일)과 비교해 볼때 업소수는 연평균 18%, 폐수배출량은 23%씩 급격히 증가하고 있다(그림 2-1 및 2-1 참조). 한편 1986년 경제기획원 자료에 의하면 전국의 총 제조업 사업체수는 218,952개 업소이며 산업폐수배출업소수에 비해 약 20배나 많다(환경처, 1989). 그러므로 실제 산업폐수배출업소와 폐수배출량은 위의 자료보다도 훨씬 많을 것으로 추측된다.

사업체규모별 폐수배출량을 살펴보면, 1일 3천톤이상 폐수배출업소인 1종업소수는 168개소에 불과하나 폐수배출량은 전체의 88.2%인 5,730,215톤에 달하고 있어 폐수량만을 고려할때에는 이들 대규모사업체의 폐수관리만을 집중적으로 하여도 상당한 오염절감효과를 얻을 수 있을 것으로 추측된다.

업종별 폐수량 배출현황은 표 2-2와 같다. 업종별 사업체수를 살펴보면 운수·수선업체가 전체업체의 33.7%에 달하나 폐수배출량은 전체의 0.16%에 불과하여 가장 폐수배출량이 적은 업종임을

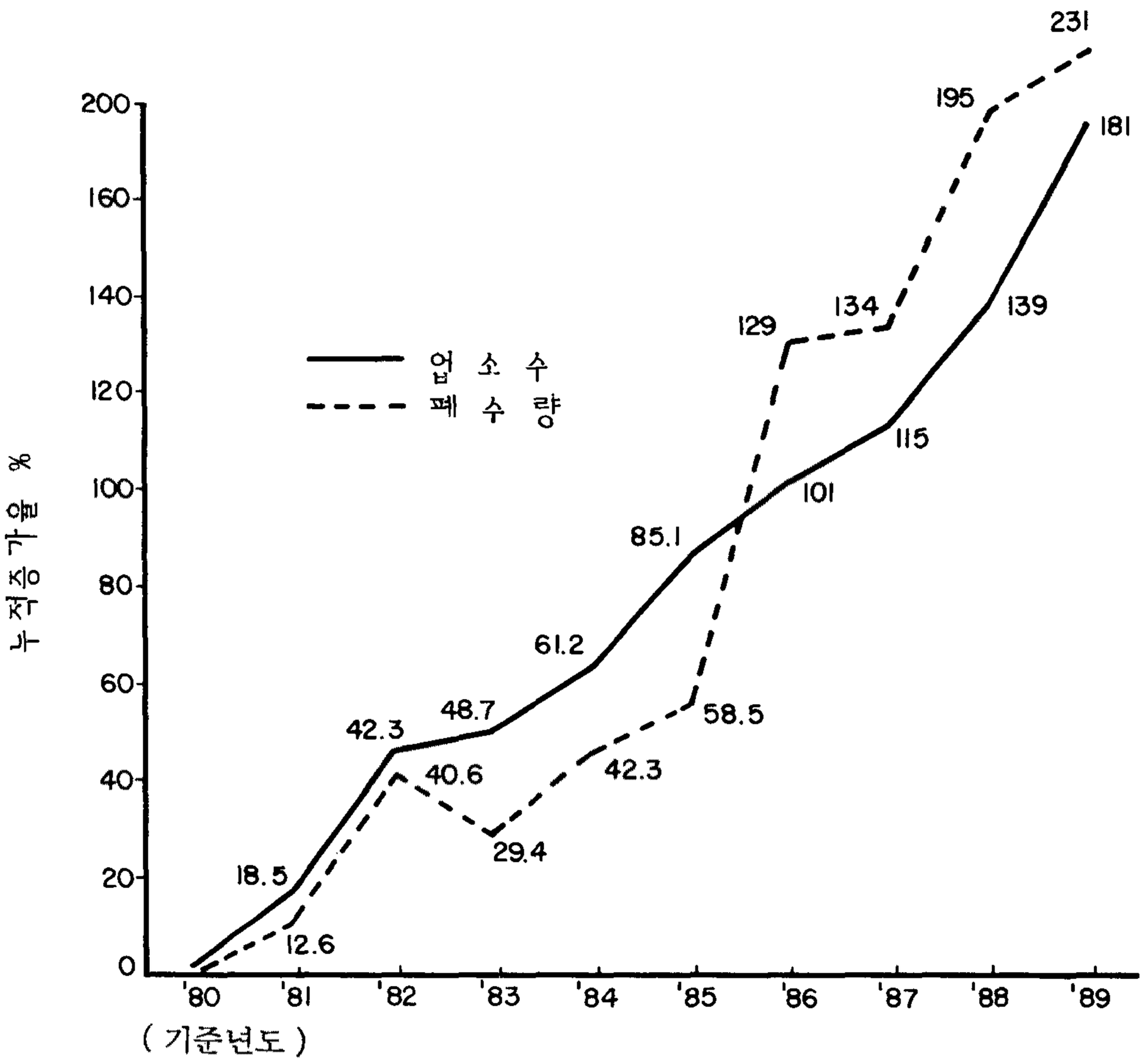


그림 2 - 1. 산업폐수 배출업소 및 폐수배출량의 증가 추이

(환경처, 1990)

알 수 있으며, 그 다음으로 조립금속업과 식료품업체가 각각 12.6%씩을 차지하고 있다. 폐수배출량을 기준으로 하면 제1차 금속업이 전체의 69.5%를 배출하고 있으며 그 다음으로 종이·담배업(8.8%), 섬유업(6%)순이다. 폐수방류량을 기준으로 살펴보면, 섬유(22.6%), 종이·담배(15.4%), 제1차금속(10.4%)순이다. 전국 수계별 오염원, 폐수량의 배출 및 방류량현황은 그림 2-2와 같다(환경처, 1990).

표 2-1. 산업폐수 배출업소 및 폐수배출량의 연도별 변화
(환경처, 1990)

구분 \ 년도	'80	'81	'82	'83	'84	'85	'86	'87	'88	'89
업 소 수 (개 소)	3,984	4,720	5,671	5,924	6,422	7,375	7,900	8,570	9,522	11,203
폐수배출량 (千m^3/日)	1,962	2,209	2,760	2,538	2,792	3,109	4,487	4,603	5,783	6,497

* '86년 이후 냉각폐수 포함

표 2-2. 업종별 폐수량 현황(환경처, 1990)

구 분	업소수	%	폐수배출량 (천m³/일)	%	폐수방류량 (천m³/일)	%	특정폐수배출량(m³/일)	%
합 계	11,203	100	6,496.7	100	1,656.1	100	211,574	100
산업용화학	272	2.43	183.6	2.83	145.9	8.81	10,209	4.8
기타화학	335	2.99	29.1	0.45	25.2	1.52	4,384	2.1
고무및프라스틱	111	0.99	13.4	0.21	6.5	0.39	302	0.1
제1차금속	282	2.52	4,512.9	69.46	172.4	10.41	55,490	26.2
조립금속	1,412	12.60	132.9	2.04	115.4	6.97	79,822	37.7
석유정제	45	0.40	32.4	0.50	32.3	1.95	125	0.1
가죽·모피	216	1.93	41.3	0.64	41.0	2.48	18,510	8.7
식료품	1,411	12.60	208.0	3.20	190.0	11.47	0	0
해산물판매	35	0.31	3.9	0.06	3.9	0.24	0	0
음료품	269	2.40	76.8	1.18	73.3	4.43	0	0
직유	718	6.41	391.7	6.03	374.0	22.58	9,158	4.3
종이·담배	229	2.04	571.6	8.80	254.4	15.36	0	0
비금속광물제품	724	6.46	161.2	2.48	127.5	7.70	6,077	2.9
운수·수선	3,771	33.66	10.5	0.16	10.5	0.63	0	0
세탁업	47	0.42	2.9	0.04	2.9	0.17	0	0
석탄광업	19	0.17	46.3	0.71	41.3	2.49	2,910	1.4
금속광업	26	0.23	21.9	0.34	16.8	1.01	17,157	8.1
비금속광업	8	0.07	0.4	0.01	0.1	0.01	0	0
인쇄·출판	208	1.86	1.0	0.02	0.9	0.05	641	0.3
사진처리	340	3.04	1.1	0.02	0.8	0.05	290	0.1
사회써비스	317	2.83	7.5	0.11	7.2	0.43	4,911	2.3
축산	290	2.59	6.8	0.10	6.9	0.42	0	0
전기	19	0.17	36.4	0.56	5.6	0.34	720	0.3
폐수처리업	28	0.25	0.3	0.01	0.3	0.02	357	0.2
기타	71	0.63	2.8	0.04	1.2	0.07	511	0.2

범 례

업 체 수 (개소)	
폐수배출량 (㎥/일)	
폐수방류량 (㎥/일)	
특정폐수량 (㎥/일)	

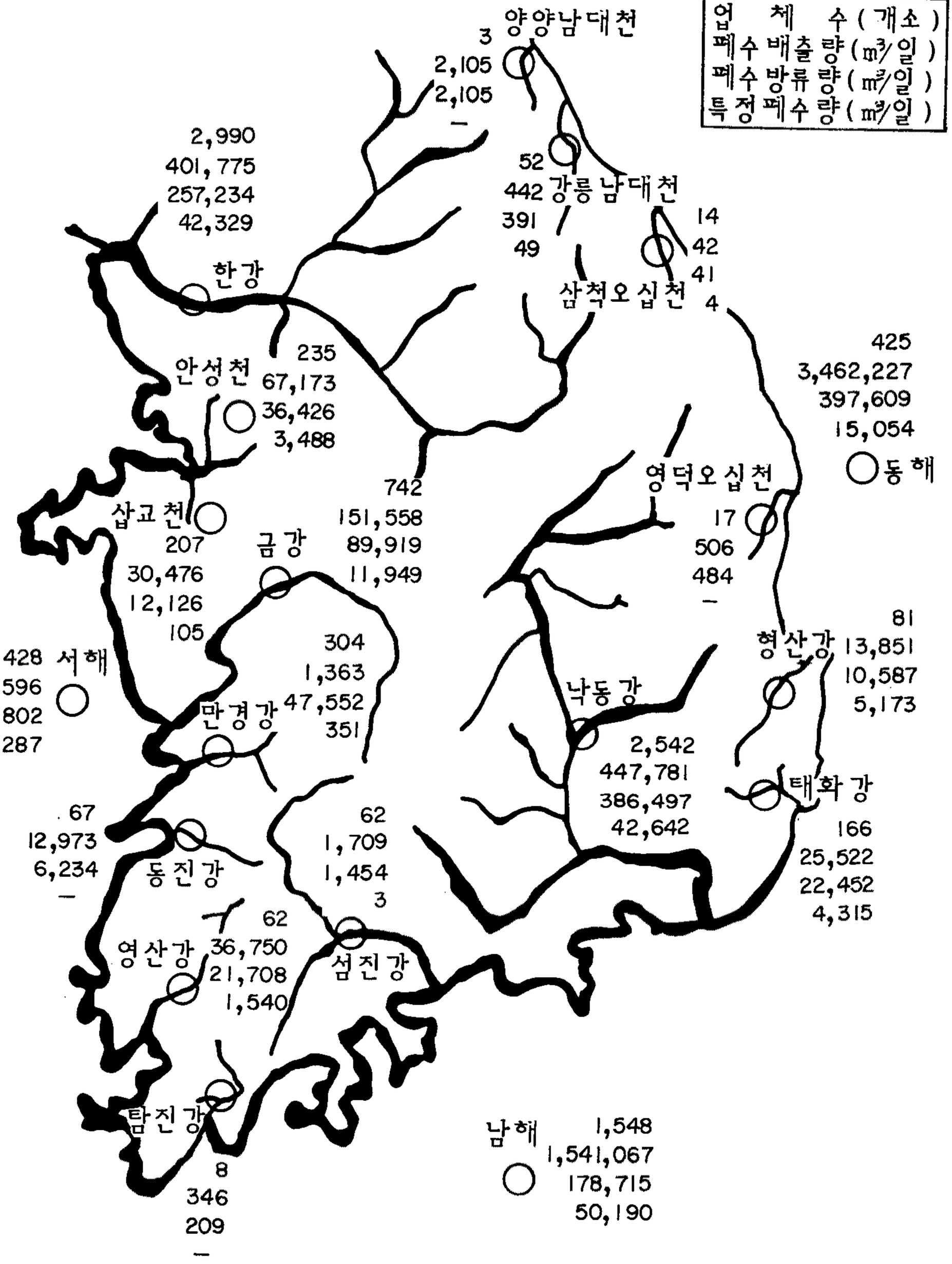


그림 2 - 2. 전국 수계별 오염원 분포도 (환경처, 1990)

방지시설현황을 살펴보면, 대부분의 업체(63.2%)가 화학적처리 시설만을 갖추고 있으며 나머지는 물리적처리(12.3%), 위탁처리(7.1%), 생물학적처리(6.6%), 종합처리(6.1%), 공동처리(4.7%)순으로 방지시설을 갖추고 있다(표 2-3). 발생폐수의 대부분은 종합처리(78.9%)되며 화학적으로 처리되는 폐수는 11.7%에 불과하였다. 폐수단위 톤당 처리비용은 평균 5,231원이었으며, 화학적처리가 톤당 6,535원으로 가장 비싸고 공동처리의 비용이 톤당 782원으로 가장 싼 것으로 나타났다. 처리비 구성요인을 살펴보면 일반적으로 약품비(34%), 인건비(26%), 전력비(20%), 슬러지 처리비(12%) 및 기타(10%)의 순으로써 약품사용비가 가장 많이 소요된다.

2. 특정폐수발생현황

특정유해물질 및 중금속이 포함된 폐수를 특정폐수라하며 특정폐수 배출업소는 2,064개수로 전체 산업폐수배출업소의 18.4%이며 특정폐수배출량은 211,574(m^3/일)로써 총폐수배출량의 3.3%에 해당한다. 각 시·도별 특정폐수배출 업소수 및 배출량은 표 2-4와 같은데 전체업체의 약 50%가 서울, 경기, 인천지역에 집중적으로 분포하고 있으며 나머지는 부산, 대구, 경남 지역에 주로 분포하고 있어 특정지역에 집중적으로 분포하고 있음을 알 수 있다. 특정폐수배출량은 경기(21.7%), 경남(18.7%), 경북(15.0%), 전남(14.2%)순으로 다량배출하고 있음을 알 수 있는데 전남과 경북지역의 업체수가 각각 전체의 2.1%와 0.6%임을 고려할때 이 지역에 특정폐수 대량배출업소가 집중적으로 분포하고 있음을 알 수 있다. 한편 수

표 2-3. 방지시설 현황(환경처, 1990)

구 분		계	물리적 처리	화학적처리 (물리+화학)	생물처리 (물리+생물)	종합처리 (물리+화학+생물)	공동처리 (물리+화학+생물)	기 타 (위탁처리)
업 체 수		10,786 (100%)	1,330 (12.3)	6,818 (63.2)	717 (6.6)	655 (6.1)	502 (4.7)	764 (7.1)
폐수배출량 (m^3/일)		6,496,687 (100%)	104,921 (1.6)	757,447 (11.7)	235.368 (3.6)	5,126,374 (78.9)	268,842 (4.1)	3,735 (0.1)
방지시설 설치비 (백만원)		1,032,406	16,746	362,900	215,490	358,874	21,047	1,198
폐수톤당 처리비용 (원/톤)		5,231.9	3,303.2	6,534.7	2,014.1	2,525.1	782.1	2,604.2
처리비 (백만원)	계	278,906 (100%)	7,183 (100%)	119,336 (100%)	30,368 (100%)	99,774 (100%)	21,047 (100%)	1,198 (100%)
	전력비	55,891 (20.0)	2,758 (38.4)	11,290 (9.5)	8,783 (28.9)	30,034 (30.1)	2,964 (14.1)	62 (5.2)
	약품비	93,326 (33.5)	549 (7.6)	39,947 (33.5)	9,654 (31.8)	33,788 (33.9)	9,232 (43.9)	156 (13.0)
	인건비	71,285 (25.5)	2,791 (38.9)	43,727 (36.6)	7,088 (23.3)	14,583 (14.6)	2,798 (13.3)	298 (24.9)
	슬러지 처리비	31,973 (11.5)	775 (10.8)	13,517 (11.3)	3,505 (11.6)	11,694 (11.7)	2,427 (11.5)	55 (4.6)
	기 타	26,431 (9.5)	310 (4.3)	10,855 (9.1)	1,338 (4.4)	9,675 (9.7)	3,626 (17.2)	627 (52.3)

* 휴업 417개 업소 미포함

표 2-4. 시·도별 특정유해물질 및 중금속 폐수배출량 현황
(환경처, 1990)

구 분	업 소 수	%	특정폐수배출량 (m^3/일)	%
합 계	2,064	100	211,574	100
서 울	383	18.56	11,198	5.29
부 산	247	11.97	8,214	3.88
대 구	209	10.13	4,801	2.27
인 천	220	10.66	7,863	3.72
광 주	27	1.31	1,472	0.70
대 전	38	1.84	2,328	1.10
경 기	424	20.54	45,821	21.66
강 원	39	1.89	14,099	6.66
충 북	46	2.23	7,422	3.51
충 남	22	1.07	6,503	3.07
전 북	44	2.13	408	0.19
전 남	12	0.58	30,035	14.20
경 북	87	4.22	31,828	15.04
경 남	248	12.02	39,518	18.68
제 주	18	0.87	64	0.03

* 특정폐수배출량 : 특정유해물질 및 중금속이 포함된 폐수배출량

표 2-5. 특정유해물질 및 중금속별 발생량 현황(환경처, 1990)

특정물질별	대상업체수	대상폐수량 (m^3/일)	원폐수중함량 (kg/일)	비 고
Cd	117	46,403	34.98	- 각 업체의 폐수속에 포함된 특정물질별로 집계하였으므로, - 1개 업체에 2종이상 오염물질발생시는 폐수량이 중복됨
Zn	1,185	56,035	3,096.02	
총 Cr	1,020	97,832	2,753.39	
pb	495	79,866	562.67	
Cr^{+6}	715	34,231	1,418.91	
Mn	204	64,658	4,715.95	
Hg	33	956	0.47	
PCB	15	294	0.22	
Cu	1,101	21,093	1,940.14	
As	66	14,773	156.53	
CN	843	63,048	1,172.28	
유기인	15	262	0.29	
F	267	46,550	4,862.32	
Phenol	133	38,352	249.66	
Fe	88	56,538	9,120.63	

계별 특정폐수오염원분포현황은 그림 2-2와 같다.

특정물질별 대상업체수, 폐수배출량 및 원폐수중의 함량은 표 2-5에 나타내었다. 대상업체의 84%인 1,735개소가 Cr을 함유한 특정폐수를 배출하고 있으며, 그 다음으로는 Zn(1,185개소), Cu(101개소), CN(843개소) 순이다. 폐수량을 기준으로 살펴보면 총 Cr(97,832m^3/일), Pb(79,866m^3/일), Mn(64,658m^3/일), CN(63,048m^3/일) 등을 함유한 폐수가 가장 많이 배출되고 있음을 알 수 있다.

업종별 특정폐수배출량을 보면 조립금속, 기계 및 장비업(79,822^3/일, 37.7%)과 제1차 금속제조업(55,490m^3/일, 26.2%)이 전체의 64%를 차지하고 있으며 이 외에도 가죽·모피제품제조업(18,510m^3/일, 8.7%)과 금속광업(17,157m^3/일, 8.1%)이 특정폐수 대량배출업종으로 손꼽을 수 있다(환경처, 1990).

제2절 업 종 별

중금속 폐수배출의 가장 큰 부분을 차지하는 조립금속, 기계 및 장비업과 제1차 금속제조업, 가죽·모피제조업 폐수의 특성 및 처리현황에 대해 알아본다.

1. 조립금속, 기계 및 장비업

조립금속, 기계 및 장비업은 제1차 금속제품을 원료로 하여

절단, 압연, 열처리, 표면처리 등의 과정을 거쳐 각종 기계 및 장비류를 제조하는 산업활동을 말하며, 환경보전법 시행규칙에는 25개 제조업을 규정하고 있다. 조립금속, 기계 및 장비업의 폐수수질에 크게 영향을 미치는 시설로는 도금시설이 있는데 한 조사에 의하면 조립금속, 기계 및 장비업의 약 67%가 도금공정을 포함하고 있는 것으로 나타났다. 그림 2-3과 같은 도금공정에서는 주로 산세정 및 도금액의 세척시 산, 알카리, SS, CN, Cr, COD, 중금속 등이 배출된다. 이들 오염물질 중 Cr, CN은 특히 독성이 강하고 처리방법이 타 중금속과는 달라서 처리시 주의가 요망된다.

도금공정 배출폐수는 동도금의 경우 pH9, Cu 32mg/L, CN 48mg/L이었고 크롬도금시 pH9, Cl 125mg/L, Fe 43mg/L, Cr^{+6} 8mg/l, 니켈도금시 Ni 10-11mg/L 등으로 나타났다. 기계제조시설중 일반적인 도금폐수처리 공정은 그림 2-4와 같다. 여기서 CN폐수는 산화조에서 NaOH에 의해 pH를 10-11로 조절하여 치아염소산 소다와 반응시켜 N_2와 CO_2로 제거시키고, Cr^{+6}는 중아황산소다를 사용하여 Cr^{+3}로 환원시켜 수산화물로 공침시켜서 제거하는데 이때의 pH는 8-9가 좋다. 그리고 비도금폐수의 처리는 대부분 pH조정후 응집침전법을 이용하고 있다(그림 2-5). 표 2-6은 기계제조시설에서의 폐수성상 및 처리효율을 나타낸 것이다(유재근 외, 1987).

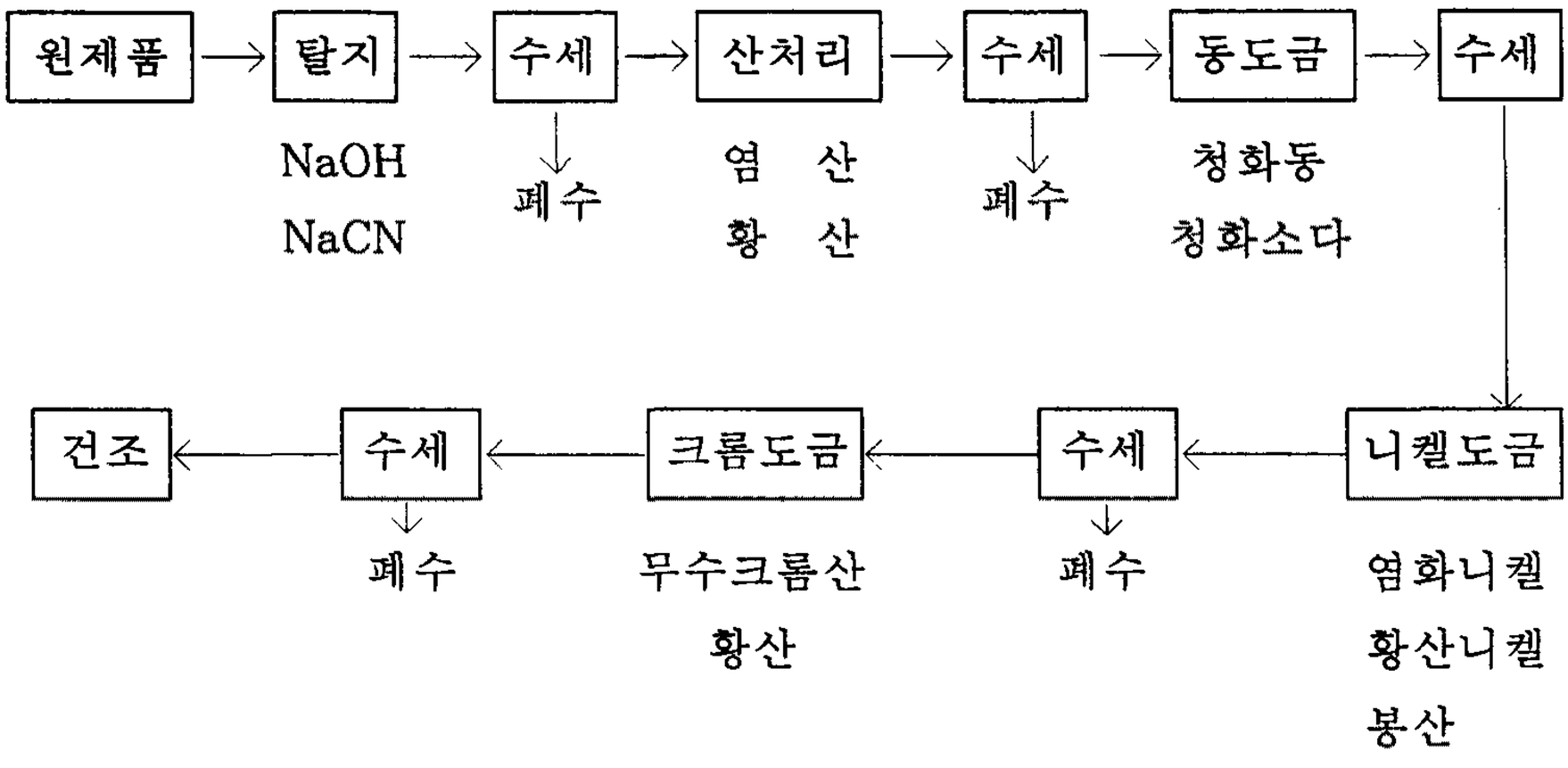


그림 2-3. 가공금속제품 기계 및 장비제조시설의 도금 공정(유지근외, 1987)

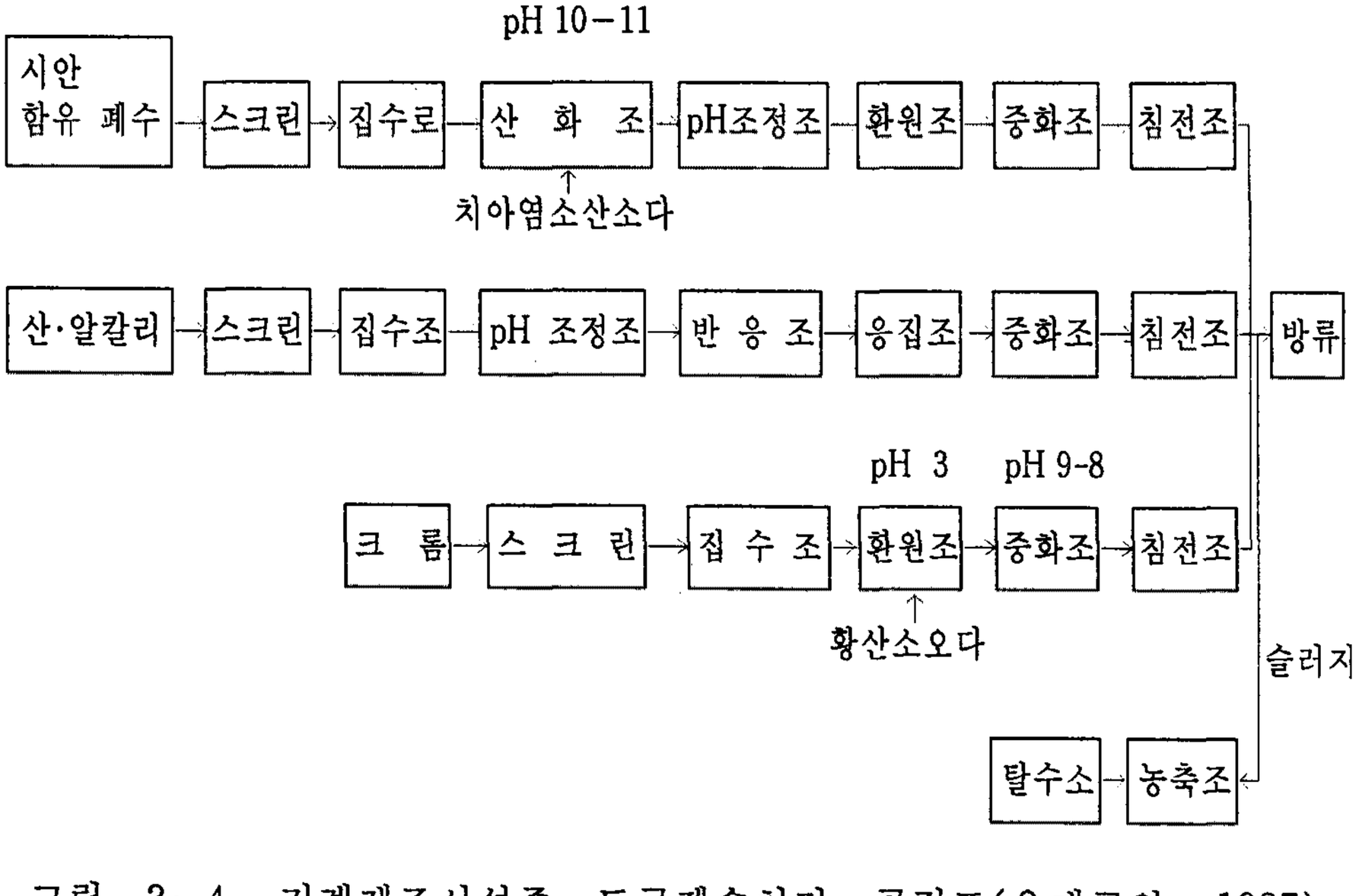


그림 2-4. 기계제조시설중 도금폐수처리 공정도(유재근외, 1987)

2. 제1차 금속제조업

제1차금속제조업의 업체수는 282개소로 전체의 2.5%에 불과하나 폐수발생량은 4,512,900(m^3/일)로서 전체폐수발생의 69.5%로 가장 많은 폐수를 발생하고 있다. 그러나 폐수방류량은 전체 방류량의 10.4%인 172,400(m^3/일)에 불과하여 폐수의 재잉용율 또한 가장 높은 업종 중의 하나이다. 일차금속제조시설에서는 제품자체가 유기오염물질을 함유하고 있지는 않으나 제조과정에서 다량의 SS를 유발하며 또한 산세척 및 표면처리과정에서 중금속 오염물질을 배출하는 경우가 많으므로 대부분의 업체들이 물리화학적 처리시설을 선택하고 있다.

제1차 금속제조업의 폐수의 수질은 표 2-7과 같고, 제철제강시설의 폐수처리공정은 그림 2-6과 같으며[4] 중화제로는 NaOH, H_2SO_4, 응집제로는 $Ca(OH)_2$, $NaHSO_3$, Na_2CO_3, 고분자 응집제 등이 주로 사용된다.

3. 가죽·모피제조업

가죽·모피제조업 폐수의 특성은 유기물질과 총경도, 부유물질 등의 농도가 매우 높고 황화물과 크롬을 상당량 함유하고 있으며 폐수의 성분변화가 매우 심한 특성을 지닌다. 그러므로 Screen과 균등조 그리고 1차침전지 등의 역할이 매우 중요하다. 그림 2-7과 같은 화학적 응집침전 및 생물학적 처리법이 널리 사용되고 있으며 표 2-8은 여기에 주로 사용되는 약품을 정리하여 나타낸 것이다(이상은 외, 1985). 표 2-9는 가죽제조시설의 폐수의 성상

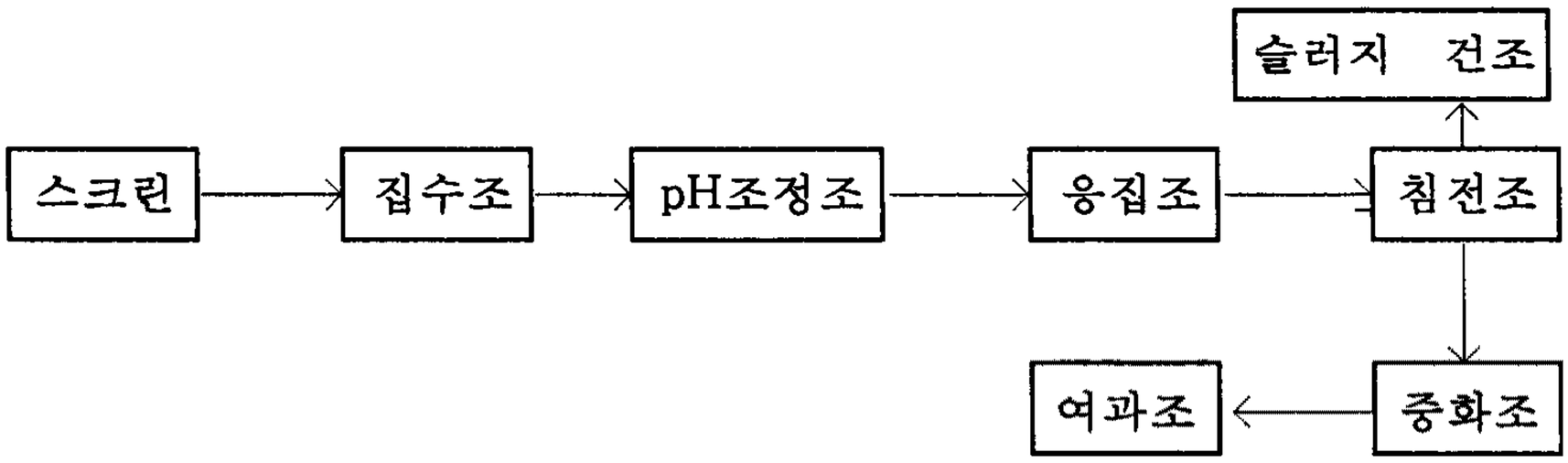


그림 2-5 기계제조시설중 비도금 폐수처리 공정도
(유재근 외, 1987)

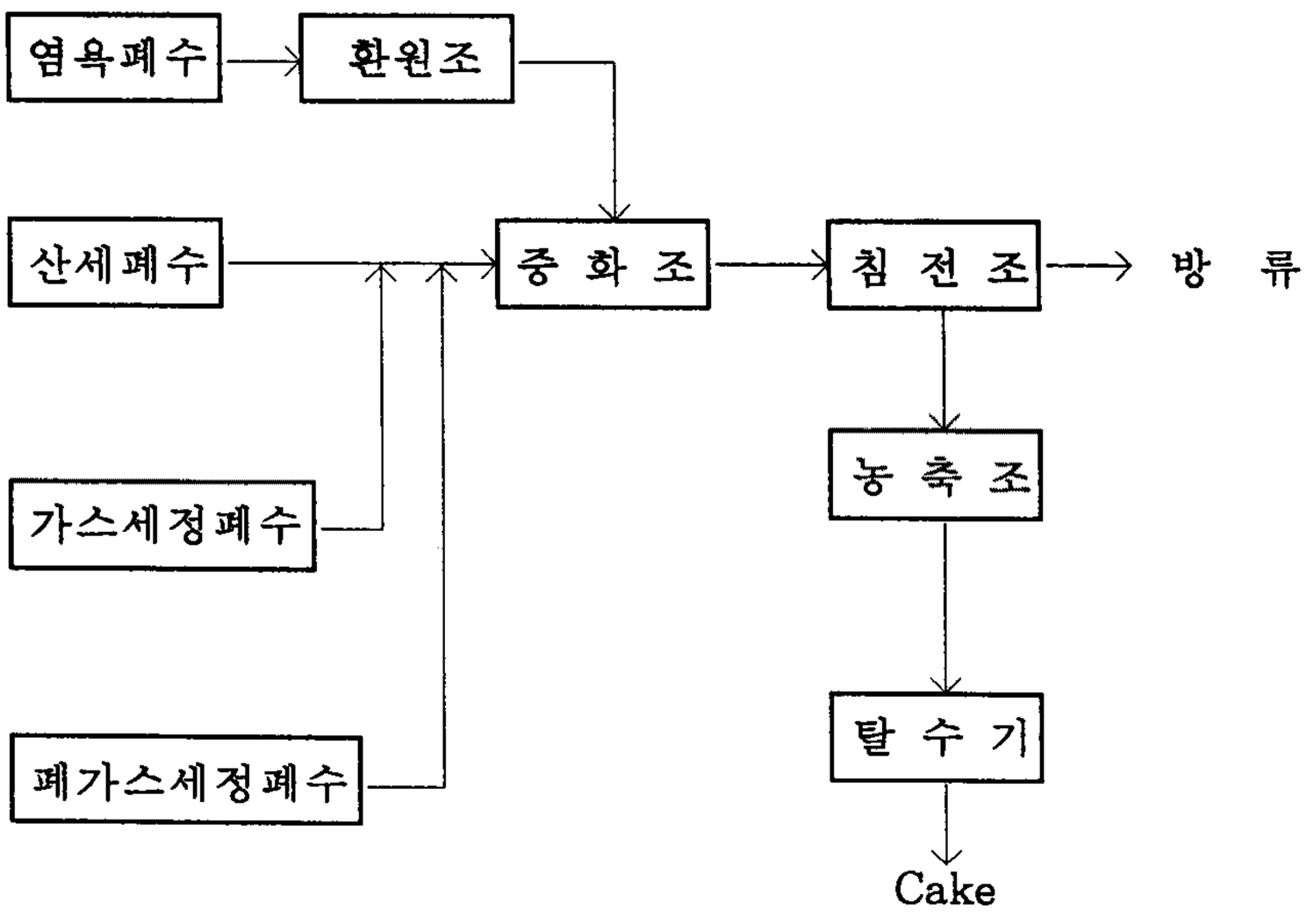


그림 2-6 제철제강시설의 폐수처리 공정도(유재근 외, 1988)

표 2-6. 기계제조시설에서의 폐수성상 및 처리효율(유재근 외, 1987)

	COD(mg/ℓ)				SS(mg/ℓ)				폐 수 량(m^3/d)			
	평 균	최 고	최 저	표준편차	평 균	최 고	최 저	표준편차	평 균	최 고	최 저	표준편차
원 수	158	321	15	93	169	754	19	137	40.15	362	1	73.89
처 리 수	52	95	9	28	36	98	7	22	—	—	—	—
처리효율	0.613	0.932	0.056	0.188	0.748	0.966	0.468	0.137	—	—	—	—

	Zn(mg/ℓ)			T-Cr(mg/ℓ)			Cu(mg/ℓ)			CN(mg/ℓ)		
	평 균	최 고	최 저	평 균	최 고	최 저	평 균	최 고	최 저	평 균	최 고	최 저
월 수	4.4	18.9	0.4	21.5	46.7	0.8	5.6	17.2	1.0	1.2	—	0.2
처 리 수	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
처리효율	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—

표 2-7 일차금속 제조시설에서의 원폐수수질(유재근 외, 1988)

구분 / 세분류업종	COD(mg/ℓ) 평균	COD(mg/ℓ) 범위	SS(mg/ℓ) 평균	SS(mg/ℓ) 범위
제철 및 제강시설	35	7－ 110	49	9－110
철강압연시설	330	40－1350	180	23－290
강관제조시설	150	89－ 190	310	36－920
철강연신시설	140	27－ 300	150	43－400
철강주조시설	100		90	
철강단조시설	110	95－ 130	90	73－110
표면처리강 제조시설	140	38－ 230	130	8－240
비철금속 제일차제련 및 정련시설	150	30－ 350	120	39－250
비철금속 제이차제련 및 정련시설	68	58－ 78	77	56－ 98
비철금속 압연 및 압출시설	140	73－ 340	140	32－340
비철금속 주조 및 단조시설	78	40－ 120	330	140－680
기타 제1차 금속제조 관련시설	150	47－ 340	270	160－390

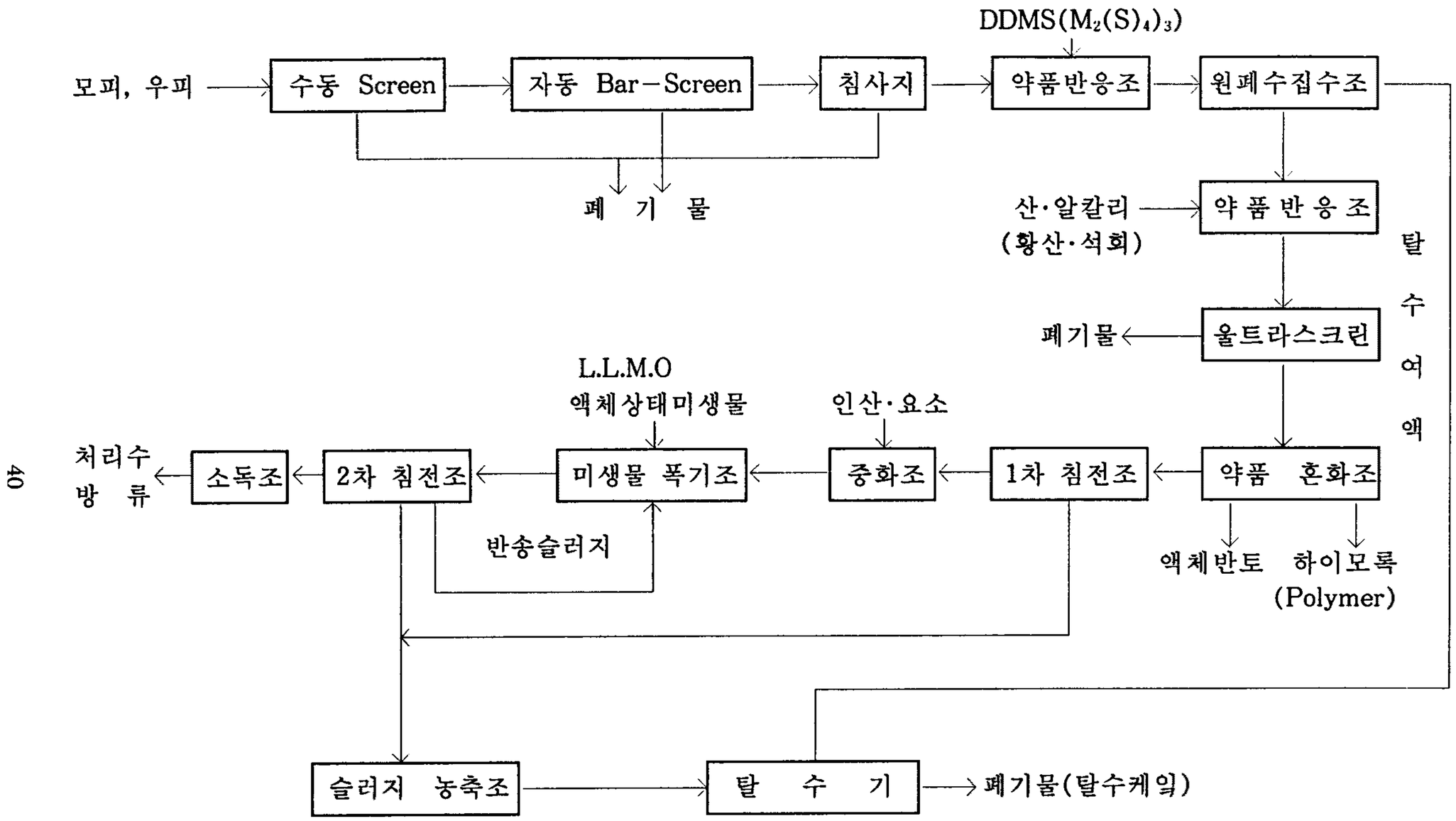


그림 2-7. 피혁폐수의 화학적·생물학적 처리공정도(이상은 외, 1985)

및 처리효율을 나타낸 것이다(유재근 외, 1988).

제3절 중금속 폐수의 처리기술현황

1. 시안계 폐수의 처리

이 방법은 도금 폐수중에 대부분 함유되어 있는 시안을 산화시켜 독성이 적은 CO_2 및 N_2 gas로 변환시키거나 독성 유기물질들을 산화시켜 독성이 적은 물질로 변화시키거나 생분해에 용이하도록 분해시키는 방법이다. 이에 사용되는 산화제로서는 Ozone, Chlorine, Potassium Permanganate, Hydrogen Peroxide, Chlorine Dioxide, Sodium Hypochlorites 등이 있다.

시안을 산화에 의한 처리 방법을 적용할 경우 우리나라에서 주로 사용되는 방법은 Hypochlorite, Caustic 및 Chlorine 등을 사용하는 Alkaline Chlorination 방법으로 그 기본 이론은 다음과 같다.

$$NaCN + NaOCl \rightleftarrows NaCNO + NaCN$$

$$2NaCNO + 3NaOCl + H_2O \rightleftarrows 2CO_2 + N_2 + 2NaOH + 2NaCl$$

$$2NaCN + 5NaOCl + H_2O \rightleftarrows 2CO_2 + N_2 + 2NaOH + 5NaCl$$

이외에도 산성상태에서 시안을 $(NH_4)_2\ SO_4$로 변환시키는 방법도 있으나 이 방법은 1단계에서는 pH가 10인 상태에서 2단계에서는 pH를 2−3으로 강화시켜야 하므로 이를 위한 Chemical 비용상의 문제 및 독성이 강한 CNCl gas가 발생하는 단점이 있어 보편적으로 사용되는 방법이라 할 수는 없다.

시안의 처리에는 Ozone에 의한 산화방법도 가능하며 이에 적용되는 기본식은 다음과 같다.

$$CN^- + \underset{\downarrow}{O_3} \rightarrow CNO^- + O_2 \rightarrow CO_2 + N_2$$

Ozonation에 의한 방법은 시안을 완전히 분해시키는지에 대한 의문점과 full-scale로 사용하는 데에 제한점이 있으나 처리과정중 Chemical의 투여가 불필요하다는 장점을 들 수 있다.

표 2-8. 피혁폐수의 화학적·산화학적처리에 사용된 약품
(이상은 외, 1985)

구분 / 품명	조성식및분자식	비고(폐수처리 목적상 용도)
디.디.엠.에스	$M_2(SO_4)_3$	1. 유화기(sulfide)제거 주목적 2. 유화수소가스제거 및 부식방지
황산(공업용)	H_2SO_4	1. 중화제로 사용(석회폐액 배출시)
소석회(공업용)	$Ca(OH)_2$	1. 중화제로 사용(황산폐액 배출시) 2. 슬러지탈수시 여과촉진 작용
액 체 반 토	$Al_2(SO_4)_3nH_2O$	1. 무기응집(주응집)제로 사용 2. 부유물질의 Floc화, BOD 및 COD응집
하 이 모 록	없음(고분자)	1. Polyacrylamide계로써 Cathion, Anion, Nonion으로 구분 2. 액체반토에 전해적으로 포집된 입자에 결합 Floc 극대화
인산(공업용)	H_3PO_4	1. 미생물 영양소작용(신진대사 촉진)
요소(농업용)	NH_3CO	
엘.엘.엠.오	없 음	L.L.M.O(liouid live micro-organisms):미생물활성제 적은 농도의 MLSS에서 운전기능 발휘.

표 2-9. 가죽(우피) 제조시설에서의 폐수성상 및 처리효율
(유대근 외, 1988)

구분 \ 수질	BOD_5(mg/ℓ)				COD(mg/ℓ)				SS(mg/ℓ)			
	평균	최고	최저	표준편차	평균	최고	최저	표준편차	평균	최고	최저	표준편차
원 폐 수	2,063	2,904	1,135	568	1,712	2,845	1,121	534	2,187	4,611	1,328	977
처 리 수	111	221	65	42	110	204	59	37	83	130	31	25
처리효율(%)	94	98	88	3	93	97	89	2	96	99	92	2

식염수를 전기분해하여 얻은 염소와 알카리로써 시안을 알카리처리하는 전해법이 있는데 고농도의 금속 시안화물폐수의 처리에 적합하다. 이외에도 미생물에 의한 시안처리법도 있는데 시안에 잘 적응된 미생물에 이해 살수여상법이나 활성슬러지법에서 시안부하량 0.05-0.2kg/m^3·일에서 90%까지 제거할 수도 있다고 한다(조순행, 1988).

2. 크롬계 폐수의 처리

6가 크롬의 일반적인 처리방법은 이를 3가 크롬으로 변환시킨후 chemical을 투여하여 3가 크롬을 불용성 상태로 만들어 용액으로부터 분리해 내는 방법이라 할 수 있으며 이는 다음식과 같이 표시할 수 있다.

$$Cr^{+6} \xrightarrow{\text{환원제}} Cr^{+3} \xrightarrow{OH} Cr(OH)_3$$

6가 크롬의 환원 방법으로는 다음과 같은 방법을 들 수 있다.

a. Reduction Using Sulfur Dioxide

$$SO_2 + H_2O \rightleftarrows H_2SO_3$$

$$2H_2CrO_4 + 3H_2SO_3 \rightleftarrows Cr_2(SO_4)_3 + 5H_2O$$

환원시킨후 lime을 투여하여

$$Cr_2(SO_4)_3 + 3Ca(OH)_2 \rightleftarrows 2Cr(OH)_3 + 3CaSO_4$$

b. Reduction with Sodium Metabisulfite

$$4H_2CrO_4 + 3Na_2S_2O_5 + 3H_2O + 6H_2SO_4 \rightleftarrows 2Cr_2(SO_4)_3 + 6NaHSO_4 + 10H_2O$$

c. Reduction with Ferrous Sulfate

$$2H_2CrO_4 + 6FeSO_4 + 7H_2O + 6H_2SO_4 \rightleftarrows Cr_2(SO_4)_3 + 3Fe_2(SO_4)_3 + 50H_2O$$

이 방법은 발생하는 슬러지의 과다함으로 인하여 대규모의 처리시설로는 사용하지 않는다(조순행, 1988).

3. 침전법

침전에 의한 방법은 중금속 처리에 가장 널리 사용되고 있는 처리방법으로 용해상태의 금속을 수산화물(Hydroxide), 황화물(Sulfide), 아철산염(Ferrite) 및 크산틴산염(Xanthate) 등을 폐수에

주입하여 불용성 상태로 변환시킨후 응집, 침전과정을 거쳐 용액으로부터 분리하는 방법이다. 이 방법의 효율적인 적응을 위해서는 금속별 용해도표 Ksp(Solubility Product)와 최적 pH의 선정이 요구된다. 수산화물 침전인 경우에는 석회 또는 가성소오다를 사용하는데 이 방법은 운전이 쉽고 경제적이나 제거효율에 제한이 있으며 생성된 슬러지가 많은 문제점을 유발시킨다.

Ferrite를 사용하는 방법은 Zn, Cd, Cu, Ni, Pb와 산성용액에서 Cr등을 제거시키는데 적용시킬 수 있는데 안정된 슬러지가 형성되므로 매립에 의하여 슬러지를 처분할 수 있다. 황화물 침전방법은 수산화물 침전방법과 유사한데 이 방법에 의하여 침전된 슬러지가 수산화물에 의한 슬러지보다 덜 용해되는 것이 특색이며 또한 높은 pH에서 잘 용해되지 않는 특징을 지닌다. 그러나 FeS나 Na_2S가 석회나 가성소오다보다 비싸며 또한 산성폐수에서 H_2S가 형성되는 단점들이 있기 때문에 수산화물 침전법이 더 선호되고 있다. 따라서 황화물 침전법은 수산화물 침전후 폐수내의 중금속 함량을 좀더 저하시키기 위한 2차 처리법으로 흔히 사용된다. 황하물 침전시 pH는 7~8로 조절되는데 그 이유는 H_2S의 생성위험 때문이다.

Xanthate 침전은 이온교환과 침전법을 결합한 처리방법으로 비교적 새로운 공법인데 Cd, Cr^{+3}, Cu, Pb, Hg, Ni, Ag, Zn 등을 제거시키는 능력을 가지고 있다(최의소, 1985).

표 2−10. Treatment Technologies for Toxic Priority Pollutants (조순행, 1988)

Pollutants	Treatment Technologies Available
Aluminum	Chemical precipitation, ion exchange(pilot scale)
Arsenic	precipitation, coprecipitation, adsorption, ion exchange
Cadmium	chemical precipitation, coprecipitation, ion exchange, evaporative recovery, electrodialysis
Hesavalent Chromium	reduction and precipition, ion exchange, electrochemical reduction, evaporative recovery, activated carbon
Trivalent Chromium	precipitation, ion exchange,
Copper	precipitation, evaporative recovery, ion exchange, electrolytic recovery, electrodialysis, granular activated carbon
Cyanide	chlorination, ozonation, electrolytic decomposition, Kastone process
Fluoride	lime precipitation, Alu, adsorption,
Iron	oxidation−precipitation, deep−well disposal
Lead	precipitation, coagulation, ion exchange
Manganese	aeration, chemical oxidation, ozone, ion exchange
Mercury	precipitation, ion exchange, coagulation, activated carbon, reduction proceses, solvent extraction
Nickel	precipitation, ion exchange, evaporative recovery
Selenium	sedimintation, filtration, coprecipitation, anion exchange
Silver	precipitation, ion exchange, reductive exchange, electrolytic recovery
Zinc	chemical precipitation, ion exchange, evaporative treatment
Toxic Organics	adsorption, air stripping, steam stripping, chemical organics oxidation, solvent extraction, biological treatment,

4. 중화처리법

이 방법은 강산성 또는 강알카리성 폐수를 중심으로 조절하는 방법으로 용액중에 용해되어 있는 중금속을 침전시키거나 금속의 부식방지 또는 효율적인 생물학적 처리를 위한 전처리등에 사용된다. 중화처리법은 매우 효율적인 처리법이며 자동제어가 가능하고 상온에서 운전할 수 있다는 장점을 지니고 있다. 단점으로는 화학반응으로 말미암아 대량의 열이 발생하며 화학약품의 첨가로 인해 용액내의 용존고형함량을 증가시키게 되는 점등이 있다. 각 중금속 및 유해물질의 일반적인 처리방법들를 표 2-10에 정리하여 나타내었다(조순행, 1988).

제4절 국내의 연구 현황

국내의 중금속 폐수처리에 관한 연구현황을 알아보기 위하여 1980년대 이후의 국내 주요 학술지에 발표된 중금속 폐수처리에 관한 논문을 조사하였는데, 이들 논문으로부터 국내의 중금속폐수처리에 관한 연구는 대부분이 물리·화학적인 처리방법의 연구에 국한되고 있으며 또한 대부분이 실험실 차원에서의 소규모실험에 그치고 있음을 알 수 있었다.

발표된 논문을 처리 방법별로 구분하여 살펴보면, 흡착이나 이온교환법에 관한 연구가, Zeolite의 이온교환작용을 이용한 폐수중의 중금속 제거와 Zeolite에 의한 중금속 폐수의 처리, 킬레이트 시약인 CDTA와 DTPA를 사용하여 중금속을 킬레이트화한 후 활

성탄 흡착을 이용하여 중금속을 제거하는 연구, 이온교환탑을 이용한 중금속의 제거 및 회수, 슬래그 여재에 의한 카드뮴과 Cr이온의 제거 등이 있었다.

중금속의 화학적인 처리방법에 관한 연구는, 중금속 폐수에 ferric hydroxide를 주입하여 카드뮴과 ferric hydroxide의 공침현상을 이용한 효율적인 카드뮴의 제거 및 공침처리를 위한 적정 pH 및 첨가량에 관한 연구와 Ferrite화법에 의한 중금속 폐수처리에 관한 연구, 충전 복극조에 의한 황산구리 및 질산카드뮴 폐액의 전해처리, 중금속폐수의 선별 침전을 위한 중금속의 침전성조사, 크롬과 시안폐수를 처리하기 위한 환원제 투여량의 조절 및 pH 조절등의 연구가 행하여졌다.

이 외에도 중금속 폐수의 생물학적인 처리법에 관한 연구로는 활성 슬러지 공법에 분말활성탄을 투입(PACAS공법)하여 Cr(Ⅵ)을 제거하는 연구와 활성슬러지법을 이용하여 제철공장의 폐수를 일차 처리한 후 잔존하는 미량의 난분해성 유기물을 오존산화시켜 처리하는 연구 및 활성슬러지법을 이용한 카드뮴폐수의 처리에 관한 연구등이 있다.

제5절 요 약

중금속폐수의 처리에 사용되고 있는 여러가지 처리방법의 장단점은 다음과 같다.

염소산화법의 장점으로는 상온에서 운영이 가능하고 자동조절

에 적당하며 비용이 저렴하다는 점이다. 단점으로는 pH조절이 어렵고, 유독한 부산물이 생성될 수도 있으며 보관 및 취급에 어려움이 많다는 점이다.

오존산화법의 경우 자동조절이 용이, 자체생산 가능, 보관 불필요, 염소계 유기화합물이 생성되지 않는 점 등의 장점이 있으며, 단점으로는 높은 에너지 소모와 비싼 처리비용을 들 수 있다.

흡착처리의 경우 주로 활성탄이나 실리카겔, 활성알루미나, Zeolite 및 이온교환수지 등이 널리 사용되며 처리효율이 높은 반면에, 비용이 많이 드는 단점을 지닌다. 이온교환에 의한 중금속 처리법은 저농도의 중금속 이온을 선택적으로 제거할 수 있는 장점을 지니고 있으나 금속의 회수 및 재사용이 병행되지 않을 경우 다른 처리방법에 비하여 비경제적이라고 할 수 있다.

폐수중의 중금속을 회수하거나 시안의 처리에 소규모로 사용되고 있는 전기분해법은 시설과 운영이 간편하고 부산물이 생성되지 않으며 금속의 회수가 가능한 장점을 지니는 반면에 반응속도가 느리며 운영비용이 과다한 단점을 지니고 있다.

응집침전법은 설치가 용이하고 유지관리비용과 에너지 소모가 상대적으로 낮은 장점을 지니기 때문에 경제적으로나 기술적인 면을 고려하여서 가장 보편적으로 사용되는 중금속 처리방법중의 하나이다. 침전법에 있어서 수산화물 침전인 경우에는 운전이 쉽고 경제적이나 제거효율에 한계가 있으며 부산물인 슬러지의 처리가 곤란하며 큰 침전조와 많은 양의 응집제가 필요하다. Ferrite 침전법은 침전된 슬러지가 수산화물에 의한 슬러지보다 덜 용해되는

장점을 지니나 경제성은 낮은 편이며 때에 따라 처리중에 H_2S가 형성되는 단점을 지닌다.

중화처리법은 매우 효율적인 처리법이며 자동제어가 가능하고 상온에서 운전이 가능한 장점을 지니나, 단점으로는 화학반응시 대량의 열이 발생하며 화학약품의 첨가로 인하여 용액내의 용존고형물의 함량을 증가시키게 된다는 점이다.

이에 따라 처리하고자 하는 폐수의 중금속 성분의 특성에 가장 알맞는 경제적이고도 효율적인 처리방법을 선택하여 처리하는 것이 매우 중요하다 하겠다. 이를 위해서 본 연구에서는 기존의 국내연구에서는 거의 연구가 진행되지 않은 미생물에 의한 중금속 제거 및 회수에 관하여 연구하고자 한다.

제3장 생물흡착의 이론적 배경

제1절 중금속의 생물흡착

1. 생물흡착의 원리

미생물이나 생물체에서 추출한 물질이 수용액중의 중금속을 선택적으로 흡착하는 현상을 생물흡착(biosorption)이라 하며 생물흡착은 살았거나 죽은 미생물에 적용할 수 있으며 다음과 같은 현상으로 나타난다 :

1) 미생물의 flagella 또는 세포외벽의 filament에 의한 미세 금속 침전물의 고정화.

2) 세포벽을 통한 금속이온의 대사이동.

3) 양이온 교환 또는 복합체 형성.

4) 흡착 또는 흡착된 금속의 침전.

생물흡착 현상 1)과 2)는 단지 신진대사가 활발한 세포에서만 일어나고 나머지 현상은 죽은 세포나 그 유도체에도 일어난다. 미생물에 흡착된 금속은 세포의 외벽고분자, 세포벽, 또는 원형질에 존재한다. 생물흡착에 쓰여진 미생물들은 혼합균주, 단일균주, 또는 세포에서 분리한 고분자 물질로 구분할 수 있다.

1982년 McMaster대학의 Tsezos(1982)와 McGill대학의 Volesky는 첨단의 분석기기들과 생물흡착속도 실험등을 통하여 우라늄과 Thorium이 곰팡이 Rhizopus의 세포벽에 흡착되었다는 사실을 확인

하여 생물흡착이 3단계로 일어난다는 가설을 설립하였다.

용액의 pH와 금속이온의 농도에 따라서 흡착특성이 일반적인 Langmuir isisotherm을 따르는지 또는 일반적인 이온교환법칙을 따르는지 규명하여 미생물과 금속이온의 결합상태를 확인한다.

수용액중의 금속이온이 세포의 어느부분에 흡착되는지 확인하기 위하여 금속을 흡착한 세포와 흡착전 세포의 구조를 전자현미경으로 비교한다. 위에서 일단 확인된 세포부분은 분리시켜 금속이온이 어떤 결합으로 되어 있는지 IR Spectrum을 분석하고 세포의 이온교환 성격도 조사한 후 금속이온이 순수한 이온결합인지 아니면 혼합체형성을 하는지를 규명한다. 특히 금속의 종류에 따라 생물흡착현상이 다르므로 화학적 특성이 다른 두 금속을 선택하여 흡착현상을 비교 검토한다.

일본의 미야자키 병원의 Sakaguchi, Nakajima, Horikoshi 연구팀은 바닷물속에서 우라늄과 다른 금속이온들을 미생물을 이용하여 분리 및 회수하는 연구를 활발히 진행하고 있다. 또 미국의 Oak Ridge 연구소의 Strandberg(1981) 연구팀은 원자력 발전소의 폐수중 방사능 물질을 박테리아를 사용하여 생물흡착시키는 연구와 생물흡착 기구를 규명하는 연구를 하였다. 최근에는 Muraleedharan(1990) 등이 Ganoderma lucidum이 구리 이온을 흡착하는 기구를 체계적으로 규명하였다.

2. 세균류와 활성슬럿지

활성슬럿지에서 중금속을 선택적으로 흡착하는 미생물을 분리 배양한 후 그 생화학적 특성을 연구하여 흡착능력이 크고 선택성이 좋은 미생물을 생물흡착제로 개발하려는 연구가 활발하다. Freidman과 Dugan(1968)은 활성슬럿지에서 분리시킨 Z. ramigerai 115가 구리, 코발트, 철, 닉켈 등의 흡착 실험을 통해 코발트 500mg/l농도의 500ml에 0.1g의 건조된 균주를 넣어서 18시간 안에 99.3%의 코발트가 흡착되었으며 구리는 800㎎/ℓ 농도의 50㎖에서 84.9%가 흡착되었다.

*Citrobacter sd*과 *Pseudomonas fluorescens*는 납을 함유한 완충용액(300mgPb/1)에서 건조미생물 무게의 10~11%에 해당하는 납을 흡착하였다(Aickin and Dean, 1977, 1979). 이 완충용액에 glycerol-2-phosphate를 첨가하였을 때 균주들의 흡착 능력이 증가하여서 성장기의 균주나 휴식기의 균주가 효과적으로 납을 흡착하였다.

오염된 물속에 흔히 존재하는 Slime-producing *Sphaerotilus natans*이 철, 카드늄, 구리, 코발트를 세포벽에 흡착됨을 보고하였다(Hatch and Menawt(1979), Patrick and Loutit(1972))

*Pseudomonas aeruginosa*가 수용액에서 접촉시간 1분내에 흡착하며 건조무게의 10~15%에 해당하는 우라늄을 흡착하였으며 흡착된 우라늄은 세포내에 축적되었다(Strandberg, et al, 1980, 1981). 또 2, 4-dinitrophenol, sodium azide, formaldehyde 같은 대사작용억제제가 존재해도 흡착능력에는 영향력을 미치지 못했다.

Brierley(1985)가 발표한 실험 결과에 따르면 박테리아를 주

성분으로 하는 생물흡착제가 수용액중에 녹아있는 납이온을 흡착제 질량의 60.1%에 해당하는 량을 흡착하여 분리하였으며 또 우라늄 용액에서 곰팡이의 일종인 *Rhizopus Arrhizus*을 사용하여 약 30%의 우라늄을 흡착하였다는 Tsezos의 보고도 있다(1983). 이와같이 미생물 또는 식물에서 분리한 생흡착제를 사용하여 수용액중의 금속이온을 선택적으로 분리하는 연구가 최근 활발히 진행되고 있다. 최근에 발표된 박테리아를 이용한 생물흡착 연구를 표 3-1에 정리하였다.

혼합박테리아로 구성된 활성슬럿지가 중금속을 축적하는 특성은 널리 알려져 있다. Ruchhoft(1949)는 활성슬럿지가 폐수에서 plutonium을 한단계 처리로 90% 이상 제거 했다는 보고가 있다. 이때 생흡착은 주로 생장하는 미생물의 gelatin에 의해 이루어 졌다. Floc을 형성하는 박테리아 Zoogloeal 또는 gelatinous matrix을 가지는 미생물들은 높은 금속흡착능력이 있다. 특히 Zoogloea 균주들은 구리, 코발트, 철, 아연 등을 많은 양 흡착한다(Friedman, 1968). Tezuka(1969)는 하수중에 있는 칼슘이나 마그네슘 이온이 박테리아 세포벽의 음이온과 결합하여 floc의 형성을 향상시킨다 하였다. 활성오니의 배양중 카드뮴을 첨가하면 10-30분 내에 흡착되는 현상과 열처리로 살균된 활성오니도 비슷한 결과를 얻어서 금속이온이 세포의 신진대사 활동에 영향을 받지 않는 물리적 현상이라 보고되었다(Cheng, 1975).

이와 비슷한 결과를 Tsezos도 우라늄과 thorium이 *R. arrhizus*에 생흡착되는 사실을 실험하였고 흡착현상이 Freundlich isotherm과

표 3－1 Bacteria의 생물흡착

Bacteria 종류	Metal종류	Metal 농도	Uptake or Capacity	Reference(Author, Year)	Remarks
Micrococcus luteus	Sr	50 ppm(Sr)	25mg Sr/g of cell dry wt	BRENDLYN D.FAISON CARMEN A.CANCEL SUSAN N.LEWIS	$SrCl_2$ at pH7
Bacillus cereus	Ag^+	1mM	89%	M.D.MULLEN	
Bacillus subtilis	Cd^{2+}		12%	D.C.WOLF	
Escherichia coli	Cu^{2+}		29%	F.G.FERRIS	
Pseudomonas aeruginosa	La^3		27%	T.J.BEVERIDGE C.A.FLEMMING 29 Sep. 1989	
Bacillus licheniformis	Na^+	8.2 μ mol of	0.259 μ mol metal bound/㎎ dry wt	ROBERT J.C.McLEAN	
	Mg^{2+}	anionic sites/	0.073	DIANE BEAUCHEMIN	
	Al^{3+}	mg on the basis	ND	LYNANN CLAPHAM	
	Ca^{2+}	of Na binding	1.044	TERRY J.BEVERIDGE	
	Cr^3		0.940	1 Oct.1990	
	Mn^{2+}		0.071		
	Fe^{3+}		1.340		
	Ni^{2+}		0.080		
	Cu^{2+}		0.890		
	K^+		0.223		
	Co^{2+}		0.100		
	Zn^{2+}		0.149		

Bacteria 종류	Metal종류	Metal 농도	Uptake or Capacity	Reference(Author, Year)	Remarks
Bacillus subtilis 168	Ag^{+}	pH 3,500 μ M EDTA	45−87%	C.A.FLEMMING	
(Remobilization)	Cu^{2+}	120ppm fulvic acid	100%	F.G.FERRIS	
	Cr^{3+}	160ppm Ca	32% (wt/wt)	T.J.BEVERIDGE	
Bacillus subtilis	Ag^{+}	5.0mM	423 μ mol/g(dry wt)	S.G.WALKER	
	Cu^{2+}		530	C.A.FLEMMING	
	Cd^{2+}		683	F.G.FERRIS	
	Ni^{2+}		654	T.J.BEVERIDGE	
	Pb^{2+}		543	G.W.BAILEY	
	Zn^{2+}		973	3.Aug.1989	
	Cr^{3+}		435		
Bacillus subtilis	Na^{+}	2613 μ mol/1	Zn(0 , 0)	I.Trent Mayers	Hamilton
	Ca^{2+}	1186	Mn(0.0020 , 0.001)	TERRY J.BEVERIDGE	Harbour
	Mg^{2+}	458.8	Cu(0.0290 , 0)	7.Apr. 1989	(Lake
	K^{+}	129	Ni(0 , 0.01)		Ontraio)
	NH_4^{+}	166.4	Cr(0 , 0.75)		Water
	Cl^{-}	2688	Fe(0.145 , nd)		
	So_4^{2-}	534.2	Al(0 , 0.53)		
	Co_3^{2-}	9.25			
	No_3^{-}	129	without Fe, with Fe		
	$H_2PO_4^{-}$	1.67	as a constant ingredient		
	SiO_3^{2+}	1146	unit : μ mole/mg cell wall dry wt		
	HPO_4^{2-}	1.41			

Langmuir isotherm에 잘 들어 맞는다고 보고하였다(Tsezos, 1981, 1982, 1987).

3. 균류와 조류

*S. cerevisiae*의 금속흡착능력은 여러사람에 의해 연구되었다(Norris & Kelly, 1977 a, 1977 b, Strandberg, 1980). 우라늄 흡착 연구에서 일반적으로 10~15%의 흡착능력을 지니나 전자현미경 조사결과, 모든 세포가 우라늄을 흡착하지 않았고 흡착속도는 매우 빠른 것으로 나타났다.

*Rhizopus arrhizus*의 생흡착특성은 Noh, Tsezos, Volesky등에 의해 많이 알려져 있다.(Tsezos and Noh,(1988, 1989), Tsezos and Volesky(1981, 1984)) 이 균주는 우라늄, Th, Ra등의 방사성 물질에 높은 흡착력을 지니고 있으며 세포벽의 Chitin이 흡착에 중요한 역할을 한다. 특히 Langumuir isotherm이나 Freundlich isotherm으로 흡착결과를 잘 표시할 수 있다.

*Aspergillus niger*류가 건조무게의 13%에 해당하는 납을 축적하였으며 또 15%에 해당하는 카드뮴을 축적하였다.

Algae류는 자연생태에서 상당량의 금속을 축적한다. Khummongkol et al(1982)는 *Chlorella vulgaris*가 2단계 과정을 거쳐 카드늄을 축적하는 것을 밝혀냈다. 첫단계는 급속한 흡착이었고 다음 단계는 느린 흡착속도를 나타냈다. 같은 조류의 *Chlorella regularis*도 우라늄 또는 구리를 대량 흡착하며 세포가 죽었을 때 흡착 능력이 현저히 향상되었다.(Horikoshi et al, 1977, 1979) Pro-

karyotes와 Eukaryotes의 외부 세포벽은 단백질과 여러 종류의 Carbohydrates로 구성되어 있으며 금속이온과 결합하는 중요한 역할을 한다. 예를 들면 *Sargassum natans*의 세포벽 cellulose의 carbonyl group이 금이온과 결합되며 *Ascophylum nodosum*이 가지는 alginic acid성분이 코발트 흡착에 중요한 역할을 한다.(Kuyucak and Volesky, 1987, 1988)

4. biomaterial

미생물의 생물고분자는 세포의 외부로 배출되거나 세포벽이나 원형질에 존재한다. 다른 식물이나 동물에서 추출된 생 고분자는 Brown과 Lester(1979, 1982, a.b.c)*K. Aerogenes*와 활성슬럿지에서 생물고분자를 추출하여 카드뮴, 닉켈, 코발트 등을 분리시켰다.

미생물에서 분리시킨 biomaterial의 생물흡착 특성의 대표적인 최근의 연구결과를 표 3-2에 종합하였다. 다른 생물체에게 추출한 biomaterial에는 다음과 같은 색물 색소가 있다: P. fluorescens에서 생산된 siderophore는 일반적으로 금속이온과 잘 결합된다. 노란 색소를 나타내는 D. hansenii pigment가 아연, 구리, 철(Ⅲ)이온과 결합되는 것이 보고되었다.(Gadd, 1986) 탄닌이나 멜라닌 성분도 중금속과 선택적인 결합을 하며 식물체에서 분리시킨후 고정화시켜 흡착제로 사용할 수 있다. 그러나 이 성분을 경제성 있는 규모로 생산하기 위해서는 대량의 식물체가 필요하므로 대량생산에는 아직 문제점이 존재한다.

표 3－2 Biomateria의 생물흡착

Bacteria 종류	Metal종류	Metal 농도	Uptake or Capacity	Reference(Author, Year)	Remarks
Hydantoin 5.5－dimethylhydantoin 5－ethyl－5－methyl hydantoin	Ca Ag^{+} Co^{2+} Cu^{2+} Cd^{2+} Ni^{2+} Zn^{2}		$\log\beta_1=1.8$ $\log\beta_1=2.4-4.5$ $\log\beta_2=4.2-9.3$ $\log\beta_3=5.2-11$ ($\log\beta_n$: complexation stability constant	GEORGE Z.PAVLOVICH RICHARD G.LUTHY Oct. 1987	sample conc. 1700 ppm
Hardwickia Binata Bark	Hg^{2+}	20mg/1	0.34mequiv/g	A.M.DESHKER S.S.BOKADE S.S.DARA Feb. 1990	
Gel-forming Biopolymer	Cu^{+}	60－200ppm	binding capacity K_1 $K_1=0.1226$g Cu/g algin	L.K.JANG G.G.GEESEY S.L.LOPEZ S.L.EASTMAN P.L.WICHLACZ Feb. 1990	synthetic aquenous solution
Microcystis aeruginosa	Cu	<0.1mg/dm^3	C_LS(complexing capacity) $C_LS=0.12-0.75\,\mu$mol/dm^3	TOSHIO OGIWARA KIYOSHI KODAIRA July. 1988	
Microbial Biofilm	Mn Fe Ni Cu Co	0.52－3.57ppm 2.71－62.50 2.08－62.92 0.02－1.74 0.05－5.76	0.06－20.09 μg/cm^2 9.55－11596.00 0.07－11.52 0.01－2.18 0.01－0.25	F.G.FERRIS S.SCHULTZE T.C.WITTEN W.S.FYFE T.J.BEVERIDGE 21.Feb. 1989	

제2절 생물흡착의 응용

생물흡착제의 선택적 흡착특성을 이용하여 etching, 도금공정, 표면처리 공정등에서 발생되는 폐수중에 함유된 유해한 중금속을 분리처리 하는데 응용되며, 희귀금속이온이 낮은 농도로 존재하는 수용액에서 금속이온을 분리 회수하는데 생물흡착제가 사용되어질 수 있다.

국내 폐수 발생량의 상당량을 차지하는 제철소 폐수는 1톤의 주철을 생산하는데 약 60ton의 용수가 사용된다. 제철소 폐수에 함유된 오일, 그리스, 부유물질등은 기존의 물리화학적 방법으로 처리되고 있으나 중금속의 경우 정부의 배출기준 강화로 Zn, Pb, Ni, Cr같은 중금속을 선택적으로 분리할 수 있는 생물흡착제의 연구가 필요하다. 특히 제철산업폐수는 배출양이 많고(예:포항제철의 폐수배출량:약 80,000ton/day) 여러종류의 금속이온을 함유하므로 제거하려는 중금속에 대한 선택성과 흡착능력이 큰 생물흡착제를 선정하는 것도 중요하지만 적절한 흡착공정의 개발이 경제성을 좌우한다.

색소 및 안료산업폐수는 일반적으로 금속이나 금속혼합물의 산화물, 염화물, 크롬염등이 주원료이다. 안료생산과정의 각공정에서 발생되는 세척액에 각 제품에서 용해된 금속이 용해되 있다.

납이나 아연 안료 1톤을 생산한는데 약 150톤의 폐수가 발생한다. 무기질 안료 제조 공정에서 발생되는 폐수에는 중금속이 일반적으로 다음과 같은 농도로 함유되어 있다(Cd;0.07－1.0mg/l, Cr total;0.5－0.1mg/l, Pb;0.5－1.3mg/l, Zn;0.5－5mg/l).

특히 카드뮴 농도가 1mg/l 이상이 되는 폐수는 기존의 물리화학적처리 방법보다는 카드뮴을 선택적으로 분리하는 chelating Ion－exchange resin이나 생물흡착제를 이용할 수 있다.

전자산업은 일반적으로 무공해산업으로 인식되고 있으나 전기회로를 동판에 형성하는 부품제조과정의 표면처리종에서 구리, 아연, 은, 금, 동등을 함유한 세척수처리에 생물흡착을 사용할 수 있다.

귀금속 세공과정에서 발생되는 폐수나 사진현생액등에서 금, 은 같은 귀금속을 회수하는데 생물흡착제가 적용되었다(Brierley, 1983, 1985). 생물흡착제의 흡착 능력이 크면 흡착된 미생물을 태워서 금속을 회수하는 방법도 연구되고 있다.

제3절 생물흡착 공정

1. 생물흡착제의 고정화

미생물의 물리적 특성을 강화시키는 고정화방법중에는 미생물을 통체로 고정화하는 방법이 생물흡착제 개발에 사용되었다(Noh, 1987, Tsezos, 1988, 1989, Chibata, 1983).

미생물의 물리적 특성을 강화시키기 위하여 이온교환수지나 활성탄같이 Packed Bed에서 사용할 수 있도록 Membrane Encapsulation Method가 사용된다. 이 방법에 의하면 미생물을 배양하여 살균한후 0.5－1.5mm 크기로 만든다. Spouted Bed를 이용하여 미생물 알맹이의 표면에 고분자 막을 입혀서 미생물의 물리적 강

도를 증가시킨다. 이 고정화장치는 Polyvinyl formal, cellulose acetate, polysulfone 같은 고분자용액을 spouted bed안에 부상되 있는 미생물 알맹이에 분사시켜 균일한 막을 형성시키는 역할을 한다.

미생물의 막의 두께는 분사되는 고분자용액의 농도 및 양에 따라 조절된다.

이렇게 고정화된 생물흡착제를 packed bed operation에 사용하면, 유속으로 인한 shear stress와 자체무게 때문에 파괴되거나 압축되어 압력손실이 커지는 것을 방지 할 수 있다. 그러나 생물흡착제의 기계적 특성만 강화시키기 위해 막 두께를 크게하고 porosity을 낮게하면 물질전달이 감소하므로 유의해야 한다. Particle membrane encapsulation은 spouted bed나 pan coater을 사용하는데 입자의 크기가 작으면 spouted bed을 주로 사용한다. Tsezos와 Noh (1989, 1987)가 개발한 membrane encapsulation장치는 membrane thickness와 porosity을 최적화 시키며 고정화 공정중 미생물의 생물흡착 특성을 유지시킨다.

고정화된 생물흡착제의 물리적 강도는 고정화된 흡착제를 packed bed에 사용할 때 흡착제가 자체의 무게 및 유체으 흐름에 따른 shear stress을 견딜 수 있는 지 여부를 간접적으로 packed bed를 이용하여 측정한다. 이때 유체의 유속을 5−30㎝/min 정도 변화시켜 흡착제층에서 발생되는 압력손실을 측정하며 흡착제의 파괴 여부를 조사한다. 고정화된 생물흡착제의 막 구조를 관찰하기 위하여 scanning electron microscope(SEM)이 사용된다. 특히 막 pore크기, 두께 등을 측정하여 압축강도, 물질전달에 미치는 영향을

조사한다.

금속이온이 세포에 흡착되는 속도는 modified liquid carberry reactor를 이용하여 일반적으로 측정한다. 특히 고정화된 흡착제 알맹이속으로 금속이온이 전달되는 과정을 연속적인 물질전달식으로 표현하여 수치해석방법으로 추정한다. 이렇게 얻은 값을 실험치와 비교 검토하며 막 porosity와 물질확산계수의 연관성을 조사험 흡착 공정 설계에 필요한 변수를 구한다.

2. 생물흡착공정의 이용

생물흡착공정은 살아있는 미생물을 이용하거나 미생물의 생산과 사용을 분리시켜 발효공정에서 생산된 미생물을 멸균가공하여서 사용하는 방법이 있다. 활발히 활동하는 균주의 사용에는 다음과 같은 단점이 있다.;

① 동절기의 성장률 저하

② 접촉조의 과다 공간

③ 필수 영양분의 공급가격

따라서 영양분의 별도공급이 필요없는 생활하수나 유기물이 충분한 폐수에는 사용할 수 있다.

생물흡착 공정이 경제성을 가지려면 미생물을 저렴한 가격에 공급받을 수 있어야 한다. 따라서 발효산업에서 발생되는 폐균주를 사용하는 방법이 있다. 그러나 생성되는 폐균주의 재연성이 문제가 될 수 있다. 생물흡착제의 경제성은 생산 단가, 흡착능력, 탈착효율, 사용기간등에 의하여 결정된다. 생산단가는 균주의 발효 생산과

고정화 경비로 구성된다.

탈착효율 및 사용횟수는 생물흡착제의 경제성을 결정하는데 가장 중요한 변수이다. Tsezos(1984)는 R. arrhizus에 흡착된 우라늄을 0.1N $NaHCO_3$을 사용하여 재생하였G으며 회수도니 우라늄 용액의 농도와 재생액과 흡착제의 양과의 실험식을 구하였다. 또 Volesky와 Kuyucak(1989)은 *Sargassum natan*조류에 흡착된 금을 0.1M thiourea와 0.02M ferric ammonium sulfate를 이용하여 효율적으로 회수하였다.

제4절 요 약

(1) 생물흡착의 원리는 복잡한 생물체구조 및 금속이온의 결합상태를 규명함으로써 알 수 있으나 일반적인 이온교환, 흡착, Complex formation 등이 알려졌지만 특정한 미생물과 금속의 경우만 부분적으로 규명되고 있다. 유전공학기법을 이용한 기구의 규명과 미생물의 Screening에 관한 연구가 진행되고 있다.

(2) 생물흡착의 기본재료인 미생물의 생산과 이용은 대사활동이 필요한 경우와 멸균된 미생물을 이용하는 경우를 구별할 수 있다. 멸균된 미생물은 적당한 고정화과정을 거쳐 기존의 이온교환수지나 흡착제와 같이 사용될 수 있으나 미생물의 생산 및 고정화경비가 생물흡착제의 경제성을 좌우한다. 대사활동중인 미생물의 이용은 기후조건 및 먹이공급이 문제점으로 제시된다.

(3) 미생물의 생물흡착제는 혼합균주, 단일균주, 생물유도체등으로 분

류된다. 혼합균주의 연구는 생물흡착원리 규명에 제한이 있으나 활성슬럿지 같은 폐균류를 대량 확보할 수 있는 장점이 있다. 단일균주의 사용시에는 발효를 해야하므로 생산비가 높으나 식품 및 제약산업에서 부산물로 생산되는 폐균주를 사용할 수 있다. 생물체에서 추출된 생물흡착제는 높은 선택성과 흡착양을 가지나 소량이 생물체에 존재하므로 많은 양의 생물체가 필요로 한다(예, 탄닌산 추출액).

(5) 생물흡착공정의 상업화는 아직 초보적인 단계에 있으나 생물흡착제의 고정화방법 개발과 흡착공정의 자동화로 인하여 폐수처리와 금속이온의 회수에 점차로 상업화가 확산되고 있다. 특히 수익성이 높은 희귀금속의 회수에 많은 연구가 진행중이다.

제4장 생물고분자

제1절 개 요

생물고분자 제품인 extracellular polysaccharide(ECP)는 다양한 미생물에 의하여 생산되며, 구조 및 물리적 성질에서의 다양성을 갖는 수용성 gum으로서 그 용도가 크게 증가할 것으로 기대된다. 대표적 용도로서는 식품, 의약 및 기타공업분야에서 유화제, 안정제, 접착제, 응집제, 윤활제, 농축제 등을 들 수 있다. 최근 생물공학 기술의 진보와 함께 생물고분자 제품의 기존합성고분자 제품 대체를 위한 많은 연구가 진행되고 있다(Magaritis et al, 1985).

미생물 생성 다당류는 크게 3가지 종류로 나눌수 있는데, 첫째, 세포의 탄소원과 에너지를 저장하기 위한 기구를 제공하는 세포내 다당류, 둘째, 세포벽의 성분으로서의 다당류, 세째로 본 연구에서 생물고분자로 이용하는 세포외 다당류이다. 세포 밖에 형성되는 점액물질은 쉽게 회수될 수 있기 때문에 상업적으로 대단히 중요성을 갖는다. 대표적인 것으로는 Xanthomonas campestris에 의한 Xanthan gum, Azotobacter vinelandii의 Alginate, Azotobacter pullulans의 Pullulan, Alcaligenes faecalis의 curdlan생산을 들 수 있다.

세포외 다당류가 상업적으로 갖는 중요성에도 불구하고 이들 생산을 위한 생물공정 개발의 밑바침이되는 다당류의 생합성 과정

은 아직 충분히 알려져 있지 않다. 그리고 생산비용이 합성고분자, 또는 천연 고분자에 비하여 고가이기 때문에 생산 수율을 높일수 있는 유전공학적 방법에 의한 균주의 개발, 반응기, 분리정제 기술의 확립이 향후 주요한 과제이다

제2절 Zoogloea에 의한 생물고분자 생산

1. 활성슬럿지의 floc형성

Zoogloea는 활성 슬럿지에 서식하는 주요 미생물로서 여러종류의 탄소, 질소원에서 다당류를 생성한다. 생성된 다당류는 세포의 응집과 중금속흡착 능력등의 오니의 물질성질에 영향을 미쳐, 오니의 분리, 궁극적인 폐수중의 BOD저감에 주요한 기능을 담당하고 있다. Friedman(1968)등이 하수로 부터 분리하여 Zoogloea ramigera로 분류하였다. Zoogloera외에 대표적인 floc형성균으로는 Bacillus cereus, Escherichia intermidium, Paracolobacterium aerogenoides, Pseudomons segins, Nocardia actinomorpha등을 들 수 있다. floc형성은 미생물의 증식과 밀접한 관계를 갖는 것으로 알려져 있는데, 배양액중 영양분이 결핍될 경우 세균의 성장이 억제되고 floc화를 촉진하게 된다. 반대로 영양분이 풍부할 경우 floc을 형성시키지 않고 분산상태를 이루게 된다.

2. 생물고분자의 구조 및 물성

Z.ramigera 115에 의해 생성된 고분자 물질은 아직 정확한

구조가 밝혀져 있지 않지만 대개 glucose, galatose, pyruvate등으로 구성되어 fibrillar cellulose형태인 Z. ramigera I-16-M 종류와 달리 수용성 capsule형태의 다당류인 것으로 알려져 있다. Ikeda등(1982)은 그림 4-1에서와 같이 glucose, galactose, pyruvate등이 11:3:1.5의 molar ratio로 구성되어 있는 것으로 밝혔다. 고분자의 main chain은 glucose chain이 연결되어있다. glucose chain 에 pyruvate가 연결되어 있는데 pyruvate의 carboxyl group이 음전하를 가지며 이 부분이 생물고분자의 중금속에 대한 친화력과 관련지워지는 것으로 알려져 있다. gum의 점도는 25℃, 0.75%수용액에서 2,000cp에 이르는 높은 점도를 나타낸다. 또한 높은 hydrodynamic volume을 가지며 분자량은 $2.5-9\times10^6$으로 Xanthan gum의 3×10^6 보다 높은 값을 갖는다 (Cooper et al., 1989;Sinsky et al., 1986). 그리고 낮은 농도(0.1-0.5%)에서 pseudoplastic성격을 가지는 데, 즉 shear rate가 증가함에 따라 점도가 감소하는 특성을 갖는다. 아울러 pH, 열, 기계적 전단응력에 대하여 매우 안정한 것으로 알려져 있다 (Nakamura et al., 1987; Sinsky et al.,1986). 이상의 장점으로 인하여 Zoogloea생산 다당류를 Zooglan으로 불리며 여러문헌에서 응집제로의 사용 가능성이 제시되고 있다(Esser et al., 1983; Magaritis et al., 1985;Sinsky et al., 1986). 또한 생성 floc의 중금속 흡착능력을 이용해서 폐수중 중금속 제거를 위해 Zoogloea생산 다당류를 이용하는 실험실적 규모의 연구도 진행되고 있다(Brown et al., 1979; Lester et al., 1984;Norberg et al., 1982; Norberg et al., 1984).

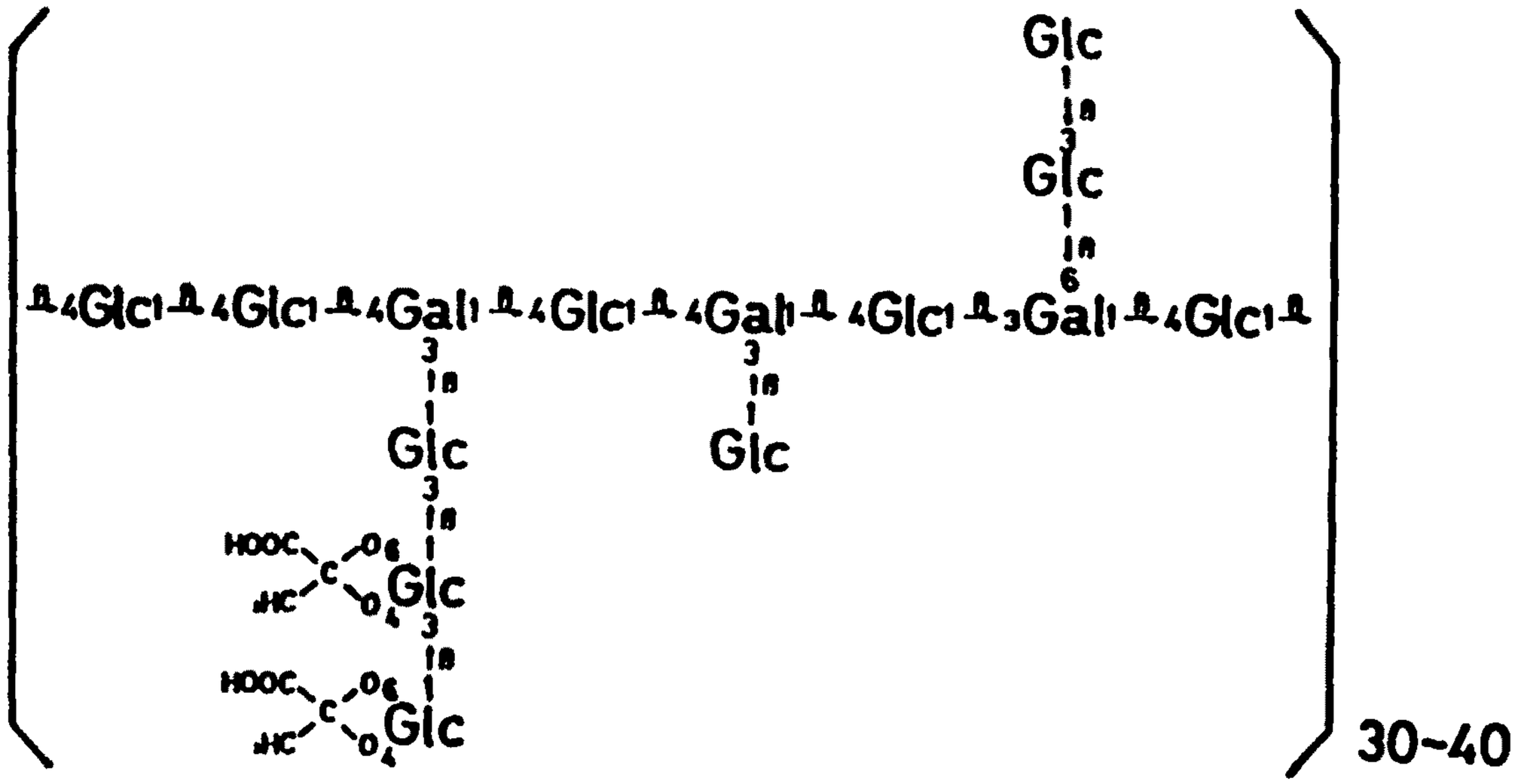


그림 4-1 Z. ramigera 115의 생성 다당류의 추정 구조[11]

3. Z. ramigera배양과 생물고분자 분리

Zoogloea ramigera 115를 각각 tryptic soy broth와 arginine medium에서 배양한 결과, tryptic soy broth경우 24시간 경과후 실타래처럼 늘어진 모양을 이루고 있고, 5일 경과한 후 매우 커다란 floc을 형성한다(정윤철 외, 1989). arginine medium에서는 24시간이 경과 한 후 세포 주변을 싸고 있는 matrix부분이 하얗게 관찰되며, 48시간 경과 후 균체량이 최대점에 이르며 72시간 후 점도는 Tryptic soy broth에서 배양한 것 보다 훨씬 높게 나타난다.

Norberg등(1982)의 Z. ramigera 115배양실험 결과를 보면 세포성장은 20시간후에 정지되었으나 기질로 사용한 glucose소비는 계속되었으며, 70시간후 capsul형태의 다당류가 세포에 부착되어 있는

것이 관찰되었고, 90시간 후 다당류가 외부로 떨어져 나가면서 점도가 증가하는 것으로 나타났다. 기질의 C/N비율이 다당류 생산에 중요한 역할을 하며, 산소소비는 초기 성장단계에 집중되어 있는 것으로 알려졌다.

생성된 다당류를 분리를 위한 대표적인 방법으로는 고속 원심분리, sonication, steaming extraction, NaOH추출, EDTA추출, 또는 이들 방법을 병행한 추출법이 제시되고 있다(Brown et al., 1980; Mannahan, 1979; Pavoni et al., 1972). 그러나 이들 방법은 실험실적 분석을 위해 제시된 것으로, 대량생산시에는 효율적이고 경제적인 분리방법이 검토되어야 할 것이다.

4. 생물고분자에 의한 중금속 제거

미생물 또는 생물고분자에 의한 중금속의 제거, 농축, 회수는 지난 10년간 많은 관심을 끌어왔지만, 중금속 제거를 위한 미생물의 실제 이용은 1940년 말로 거슬러 올라갈 수 있는데, Ruchloft (1949)가 활성오니 (activated sludge)가 plutonium－239를 효과적으로 제거할 수 있는 것을 관찰하였다. 일단계 처리로써 96%제거가 가능하였으며, 특히 젤라틴 성분을 갖는 미생물군이 제거기능을 갖는 것을 설명하였다. 그후 생물학적 처리에 의한 도시 및 산업폐수로 부터 중금속 제거에 관한 많은 연구가 진행 되고 있다. Gale등 (1979)은 광산폐수로부터 Pb, Zn, Cu, Mn등의 제거를 위해 광합성 생물을 사용하였는데, 특히 filamentous algae가 중금속 binding에 중요한 역할을 하는 것을 발견하였다. 또한 Spisak(1979)

은 As제거에 algae를 사용하였고, Schumate등(1980)은 탈질과 동시에 잔류 우라늄 제거를 위해 세균(pseudomonad)을 사용한 fluidized bed형태의 bioreactor를 개발하였다.

최근에 들어 Norberg등 (1984)응집성 미생물인 Z.ramigera를 이용, 중금속 제거용 연속공정 개발을 위한 실험실적 연구결과를 발표한 바 있다. 아직 대규모의 상업적 이용은 드물지만, 해수로부터 유용한 물질 회수, 산업폐수로 부터 중금속 제거등을 위한 더욱 진보된 공정 및 조작 개발이 진행되고 있다.

대표적인 응집성 미생물인 Z. ramigera 경우 Cu^{++}는 세포 질량의 34%, Co^{++}는 25%의 흡착능력을 가지며, 기타 Fe^{++}, Zn^{++}, Ni^{++}등에도 높은 흡착률을 보이는 것으로 알려져 있다 (Friedman et al., 1968). 그리고 흡착된 중금속은 HCl등의 산을 첨가하여 미생물로 부터 탈착, 분리시킬 수 있으며, 원심분리에 의해 생성된 생물고분자도, 회수, 재 사용할수 있는 것으로 알려져 있다. 산 첨가시 생물고분자 즉 floc의 강도를 저감 시키지 않도록 적절한 제어 조작이 필요하다 (Norberg et al., 1984).

제5장 생물고분자 생성실험

제1절 실험방법

1. 균주 및 배지조성

균주선택을 위해 폐수중에 함유된 중금속 흡착제로서 사용시 폐수중의 적응성 등을 고려해서 실제 하수처리장의 슬럿지에서 floc을 형성하는 미생물을 1차 대상으로 하였다. 앞장에서 기술한 바와 같이 대표적 floc 생성균이며 탁월한 중금속 흡착능력을 가지고 있는 Zoogloea ramigera 115(ATCC 25935)를 선정하여 미국 ATCC로 부터 구입 사용하였다. 분양받은 Zoogloea ramigera 115의 보관을 위해서는 표 5-1의 arginine medium을 사용하였고 균체배양을 위한 기질의 조성은 표 5-2와 같다 (Parsons et al., 1971;Norberg et al., 1984; 정윤철 외, 1989). 배지는 autoclave에 넣어 121℃, 1.2 기압에서 20분간 멸균하여 사용하였다. glucose와 $MgSO_4 \cdot 7H_2O$는 별도로 각각 멸균하였다.

플라스크 배양의 경우 500ml 삼각 플라스크에 100ml의 배지를 넣고 arginine medium에서 26℃로 3일 배양한 seed 1%를 접종하여 같은 온도에서 150rpm으로 rotary shaker에서 배양하였다.

표 5－1 Arginine 첨가 medium

(단위 : g/l)

성 분	양
Arginine Hydrochloride	0.5
Alanine	1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2
K_2HPO_4	2.0
KH_2PO_4	0.5
Glucose	5～25
Vitamin B_{12}	(1.5×10^{-6})

표 5－2 기질 조성

(단위 : g/l)

성 분	양
Glucose	25
K_2HPO_4	2
KH_2PO_4	1
$NaNO_3$	0.5～1.0
$MgSO_4 \cdot 7H_3O$	0.2
Yeast extract	0.01

2. 발효조 실험

가. 회분식 발효조 실험

보존중인 균주중 단일 군락을 분리하여 접종용 배지를 넣은 250ml Erlenmyer flask에 접종하여 26℃ incubator에서 72시간 배양한 후 발효조에 접종하였다. Extracellular Polysaccharide를 생산하기 위한 발효조는 5L jar fermentor(한국발효기 제작) 로서, 실험장치는 그림 5-1에 나타내었다. 발효조는 5%(v/v)로 접종되었으며 발효조건은 다음과 같다. working volume : 3L : temperature : 26℃ ; aeration : 1 vvm ; stirring speed : 300-800 rpm. 특히 발효가 진행되는 과정에서 점도의 증가로 인해 교반속도는 초기 300rpm 에서 최대 800rpm까지 증가시켰다.

기질은 glucose, lactose, molasses(제일제당 제공), cheese whey (서울인근의 우유제조업체로 부터 채취)를 사용하였다. 기질로 사용한 molasses는 glucose 8%, fructose 11%, sucrose 36%의 조성을 갖는 것으로 total sugar는 molasses의 55%이다. 기질로 사용한 cheese whey는 3.5%(w/v)의 lactose를 함유하고 있었다.

나. 유가배양식 발효조 실험

산업기질인 molasses를 사용하여 다당류의 생산을 증가시키기 위해 배양방법으로, 기질 저해 요인을 감소시키지 위해서, 세포의 생장을 증가시킨다음, 연속적으로 기질을 공급하는 유가식 배양방법을 사용하였다. molasses를 기질로 한 유가배양식 실험 방법은 5L

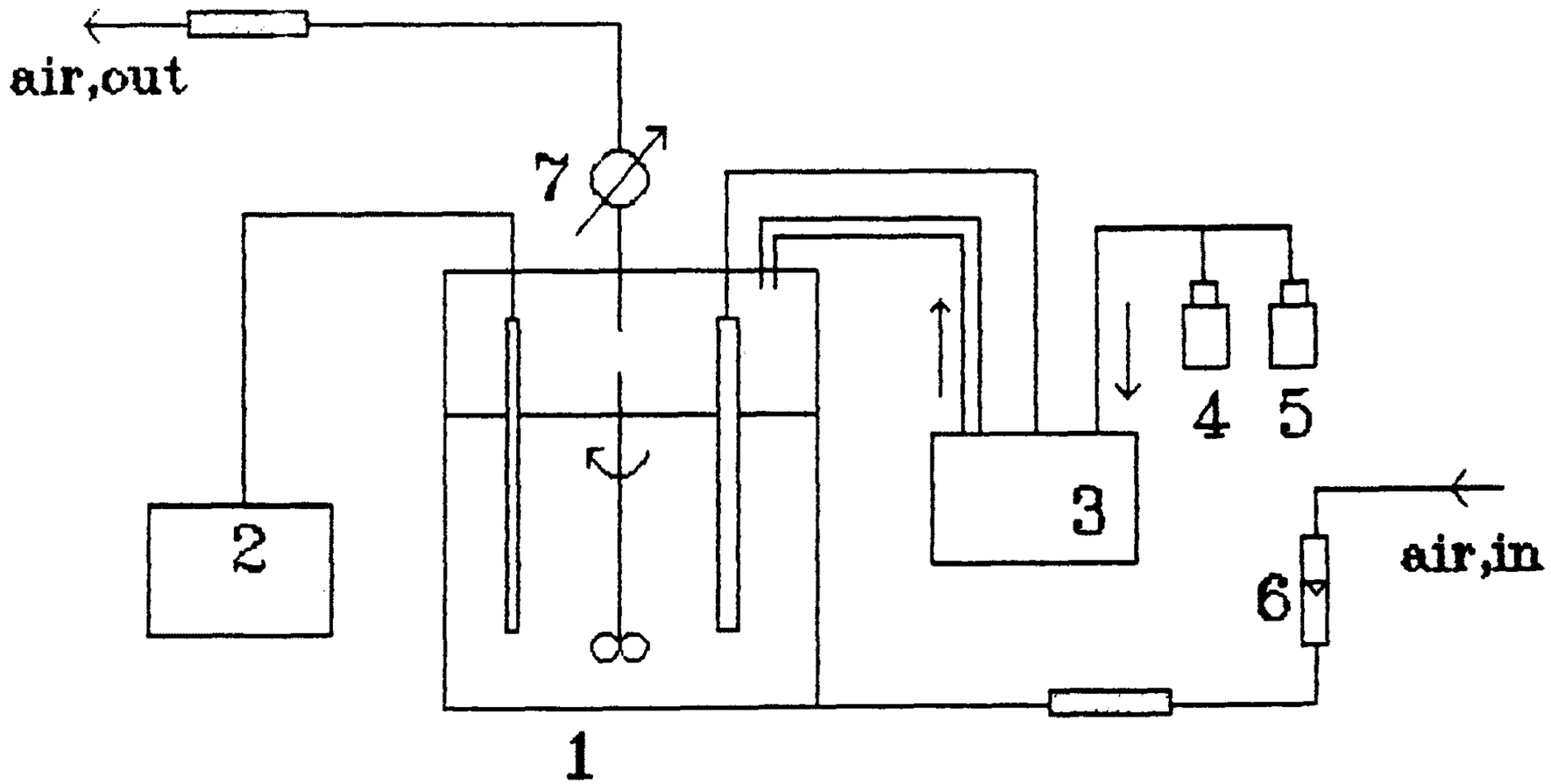


그림5－1. 회분식 배양실험장치
(1. fermentor, 2. 온도조절장치, 3. pH 조절장치
4. 산용액, 5. 알카리용액, 6. 공기유량계,
7. condensor)

의 jar fermentor를 사용하여 먼저 회분식 발효법으로 working volume 1L, aeration 1vvm, 온도 26℃, stirring speed 300rpm의 반응조건에서 40시간 발효시켰다. 실험장치는 그림 5-2에 나타내었다.

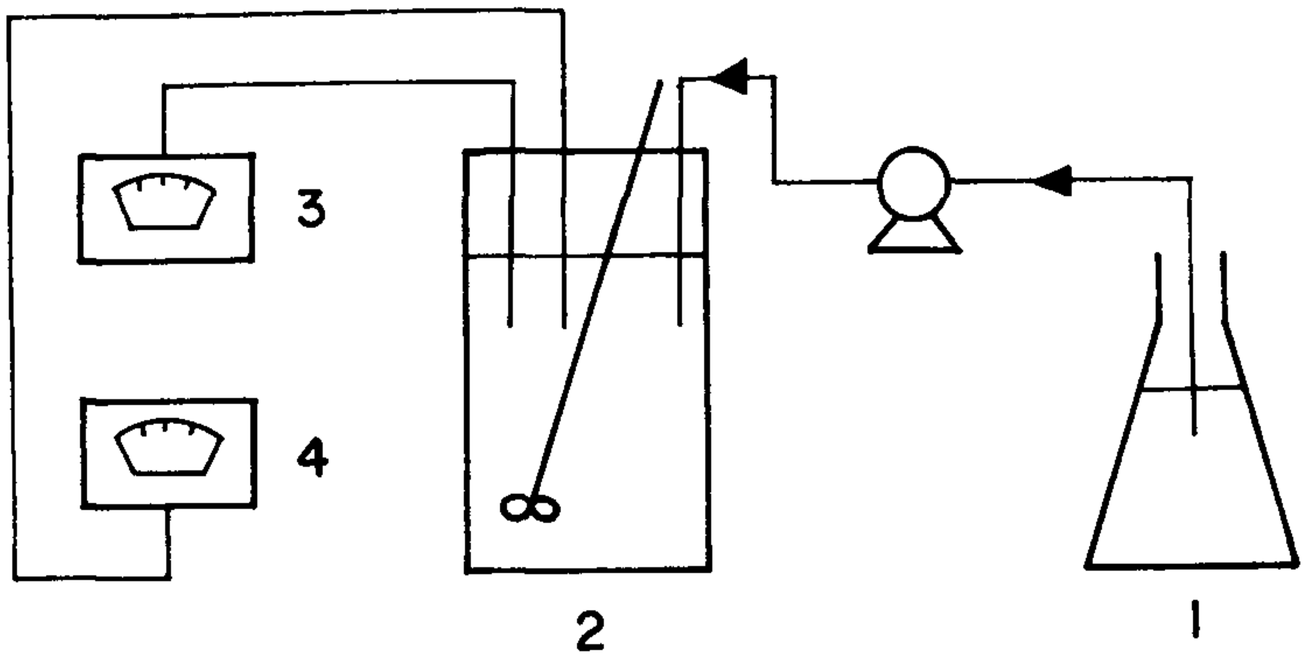


그림 5-2. 유가배양식 발효실험장치

(1. 공급액 2. 발효조

3. pH controller 4. D.O indicator)

다. 연속발효조 실험

반응을 두 단계로 나누어, 첫 단계에서는 세포의 생장을 극대화 시키고 다음단계에서 질소원을 제한하여 다당류 생성을 높이는 2단계 연속발효를 수행하였다. 실험장치는 그림 5-3에 나타내었다. 산업원료인 molasses와 cheese whey를 기질로 한 2단계 연속배양 방법은, growth phase용 2.5L와 prouction phase용 5L의 jar fermentor를 사용하여, 먼저 유가배양 방법으로 각각 working volume 1.5L, 2.5L, aeration 1vvm, 온도 26℃, stirring speed 300rpm

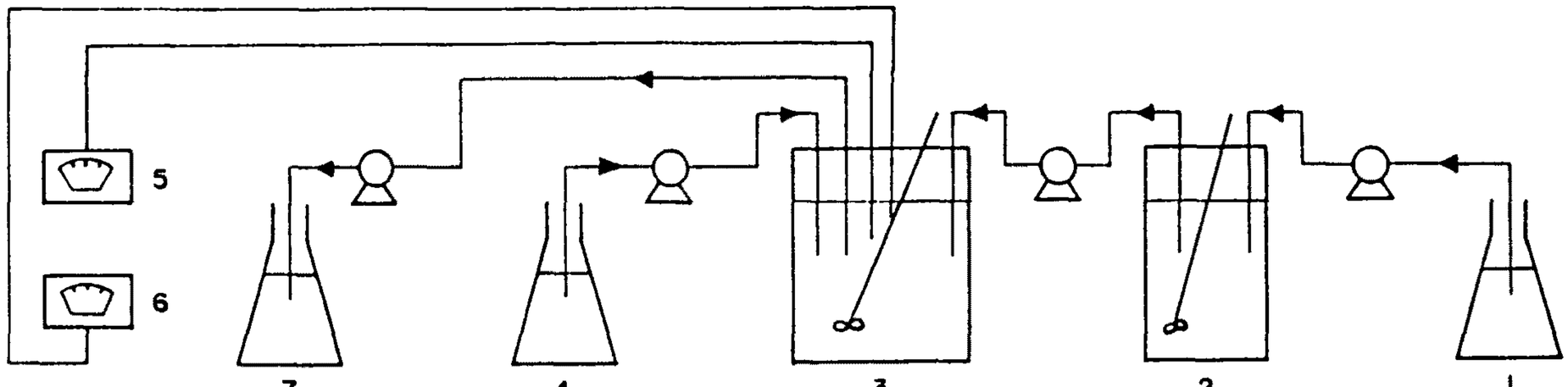


그림5-3. 2단계 연속 발효실험장치
(1. 공급액, 2. growth phase용 발효조,
3. production phase용 발효조, 4. 공급액,
5. pH controller, 6. D.O indicator 7. 유출액)

의 반응 조건에서 53시간 발효시켰다. 이때 발효액의 조성은 다음과 같다.

1) molasses를 기질로 사용한 경우

molasses의 경우에는 growth phase용, production phase용 공히 molasses 11.35g/L, $NaNO_3$ 1.01 g/L K_2HPO_4 1g/L, KH_2PO_4 0.5g/L, $MgSO_47H_2O$ 0.1 g/L이다.

2) cheese whey를 기질로 하는 경우

cheese whey의 경우 growth phase용 발효조에 공급할 배지조성은 cheese whey 1L당 $NaNO_3$ 2.83 g/L K_2HPO_4 2g/L, KH_2PO_4 1g/L, $MgSO_47H_2O$ 0.2 g/L이다.

그리고 53시간 이후 다음의 배지조성으로 연속발효 시험을 실시하였다.

1) molasses를 기질로 사용하는 경우

molasses의 경우 growthphase용 발효조에 공급할 배지조성은 molasses 45.45g/L, $NaNO_3$ 1.908 g/L, K_2HPO_4 2g/L, KH_2PO_4 1 g/L, $MgSO_47H_2O$ 0.2 g/L이고, production phase 용 발효조에 공급한 배지에는 질소원만을 제거하였다.

2) cheese whey를 기질로 하는 경우

cheese whey의 경우 growth phase용 발효조에 공급할 배지조성은 cheese whey 1L당 $NaNO_3$ 2.83 g/L K_2HPO_4 2g/L, KH_2PO_4 1g/L, $MgSO_47H_2O$ 0.2 g/L이고, production phase용의 발효조에 공급한 배지에는 질소원만을 제거하였다.

3. 분석방법

3.1. 생물 고분자 측정 과 건조세포농도 측정

생성된 생물고분자는 autoclave 방법과 ultrasonication과 high-speed centrifuge 방법(Norberg et al., 1982)을 병형하여 추출하였으며 그 방법은 아래와 같다.

가. 시료를 autoclave에서 10분간 steaming한다.

나. steaming을 거친 시료를 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate한다.

다. sonicate된 시료와 증류수를 1:3 의 비율로 섞은 다음 12,000 g 에서 40분간 원심분리한다.

라. Pellet은 제거하고 상등액만 채취한다.

마. 채취된 상등액을 2차 centrifuge하여 pellet은 제거하고 남은 상등액만 채취하여 KCl을 함유한 Propanol과 1:2의 비율로 섞는다.

바. 4℃냉장고에서 1시간 이상 보관한다.

사. 응집된 물질은 55℃ vaccum oven에서 일정한 무게가 될 때까지 건조시켜서 그 값을 측정한다.

아. 위 과정에서 생성된 pellet에 원래의 volume만큼 증류수를 첨가한 후 20초간 3번에 걸쳐서 sonicate한다.

자. 위 과정에서 다-사 까지의 과정을 반복하여 생물고분자량을 측정한다.

차. 생성된 pellet은 105℃에서 2시간 동안 desiccation시킨 후 0.2㎛의 pore size를 갖는 membrane filter를 사용한 다음 건조시켜 측정한 무게를 dry cell weight로 결정하였다.

위의 과정중 발효기질로써 complex medium을 사용하는 경우에는 pellet이 세포만으로 이루어져 있지 않기 때문에 생성된 pellet을 autoclave와 ultrasonication방법을 사용하여 세포를 분쇄한 다음 세포의 protein을 modify된 Lowry 방법으로 측정하여, 발효중의 세포의 변화를 간접적으로 추정하였다 (Waterborg et al, 1984).

3.2. 잔류기질 농도측정

발효중 잔류기질의 농도는 HPLC를 사용하여 측정하였다. 사용한 HPLG의 조건은 다음과 같다.

HPLC : Varian 2510, Column : Merck, Licrosord NH_2(10㎛), Dectector : Varian RI−40, flow rate : 1ml/min

3.3. 용액상의 점도측정

기초실험에서 낮은 점도의 경우 상온에서 Cannon Fenske점도계를 이용하여 측정하였고, 발효조 실험시 Brookfield helipatf stand type점도계를 사용하였다 (fixed shear rate 0.209 sec^{-1})

제2절 실험 결과 및 고찰

1. 회분식 발효

Z.ramigera 115의 탄소원으로 glucose, lactose, molasses, cheese whey를 선택하여 C/N ratio를 변화시키면서 생물고분자 생산 실험을 수행하였다. 특히 glucose나 lactose보다 원료비 면에서 저가인

molasses나 cheese whey를 사용하였을 때에도 Z.ramigera가 생물고분자를 생산할 수 있는지의 여부에 대해서 중점적으로 실험을 수행하였다.

Z.ramigera 115를 이용하여 생물고분자를 생산하는 방법에 있어서 자료에 의하면 C/N ratio가 높은 경우가 C/N ratio가 낮은 것에 비하여 생물고분자 생산이 훨씬 잘 되는 것으로 알려져 있으며, 또한 발효시간 150시간 되었을 때 세포벽으로 부터 capsule이 release되어, fermentation broth의 점도를 높이는 것으로 알려져 있다 (Norberg et al., 1982). 본 연구에서는 기질이 glucose인 경우 C/N ratio를 30, 60, 90으로 높여 가면서 생물고분자 생산실험을 수행한 결과 C/N 90의 경우에는 C/N 30, C/N 60의 경우보다 질소원이 훨씬 제한되어 균체량의 양은 낮았지만, 고분자의 생산은 C/N 30, C/N 60의 경우보다 훨씬 짧은 발효시간에서 부터 시작되어 계속 활발하게 이루어지는 것으로 나타났다. 그림 5-4에서와 같이 점도의 변화는 초기에는 낮은 점도를 보이다가 45시간 이후부터 점도가 급격히 증가하기 시작하여 발효시간 120시간에 이르러서는 123,000 cp.를 나타내었다. 균체량은 30시간 정도까지 증가하여 약 1g/L에 이르다가 그 이후 정지기를 나타냈다. 당소모는 원만하게 진행되다가 30시간 부터 60시간 까지 급격히 증가되고, 그 이후 부터는 당소모가 거의 이루어지지 않고서 120시간 까지 5g/L정도를 유지하였다. 생물고분자는 세포의 성장이 멈춘 30시간 이후부터 점점 증가하기 시작하여 120시간까지 일정한 비율로 증가하여 약 13g/L에 이르렀다.

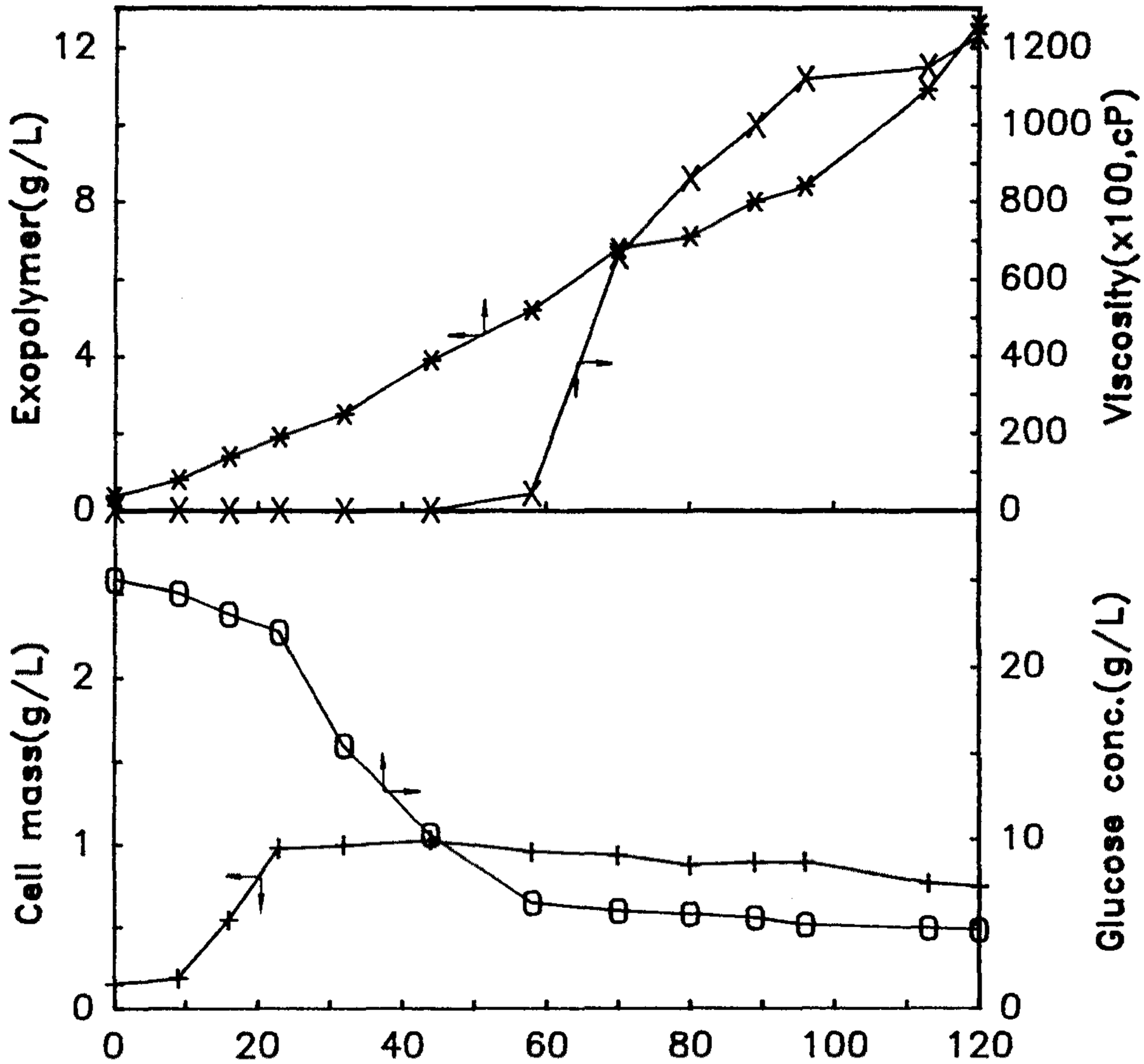


그림5－4. 탄소원이 glucose(C/N 90)일 때 생물고분자의 생성추이

탄소원이 lactose인 경우는 glucose와 달리 C/N 30의 경우, C/N 60 및 C/N 90에 비하여 생물고분자의 생산이 가장 높게 나타났다. C/N 30의 경우 그림 5-5에서와 같이 점도 변화는 초기에 낮은 값을 보이다가 30시간 에서 40시간 사이에서 점도가 급격히 증가하고 이후부터는 완만한 증가를 보이며, 발효시간 120시간에는 130,000cp.의 점도를 나타내었다. 균체량은 17시간 까지 급격히 증가하여 3.3 g/L에 이르렀다. 당 소모는 세포 성장이 활발한 구간에서 완만하게 일어나다 20시간 이후 당소모가 급격히 증가하다 60시간에 이르러 거의 모든 당이 소비되었다. 생물고분자는 30시간 이후부터 점차 증가하기 시작하여 그 이후 일정한 비율로 생성되어 120시간 에는 11g/L가 생산되었다. lactose의 경우, capsule이 release되는 시간이 30시간 이후부터로 아주 빠르게 세포벽으로 부터 생물고분자가 분리되어 나오기 시작하는 것으로 해석할 수 있다. 또한 이 실험 결과, 당소모는 세포의 성장 뿐 아니라 생물고분자 생성 구간에서도 활발하게 일어남을 알 수 있다.

탄소원이 molasses인 경우는 C/N비를 60으로 했을 경우, 발효시간이 120시간 이후 고분자 생산이 가장 높게 나타났다. 즉 그림 5-6에서와 같이, 점도는 초기에 낮은 값을보이다가 50시간 이후부터 점차 증가하기 시작하여 120시간 에는 점도가 19cp.를 나타내었다. protein 양은 20시간 까지 거의 변화하지 않다가 20시간 부터 45시간 까지 증가하여 45시간 에는 0.9g/L의 최대치를 나타내었고, 그 이후로는 거의 일정하게 유지되었다. 당 소모는 20시간 까지 거의 일어나지 않다가 32시간 까지 조금씩 이용되고,

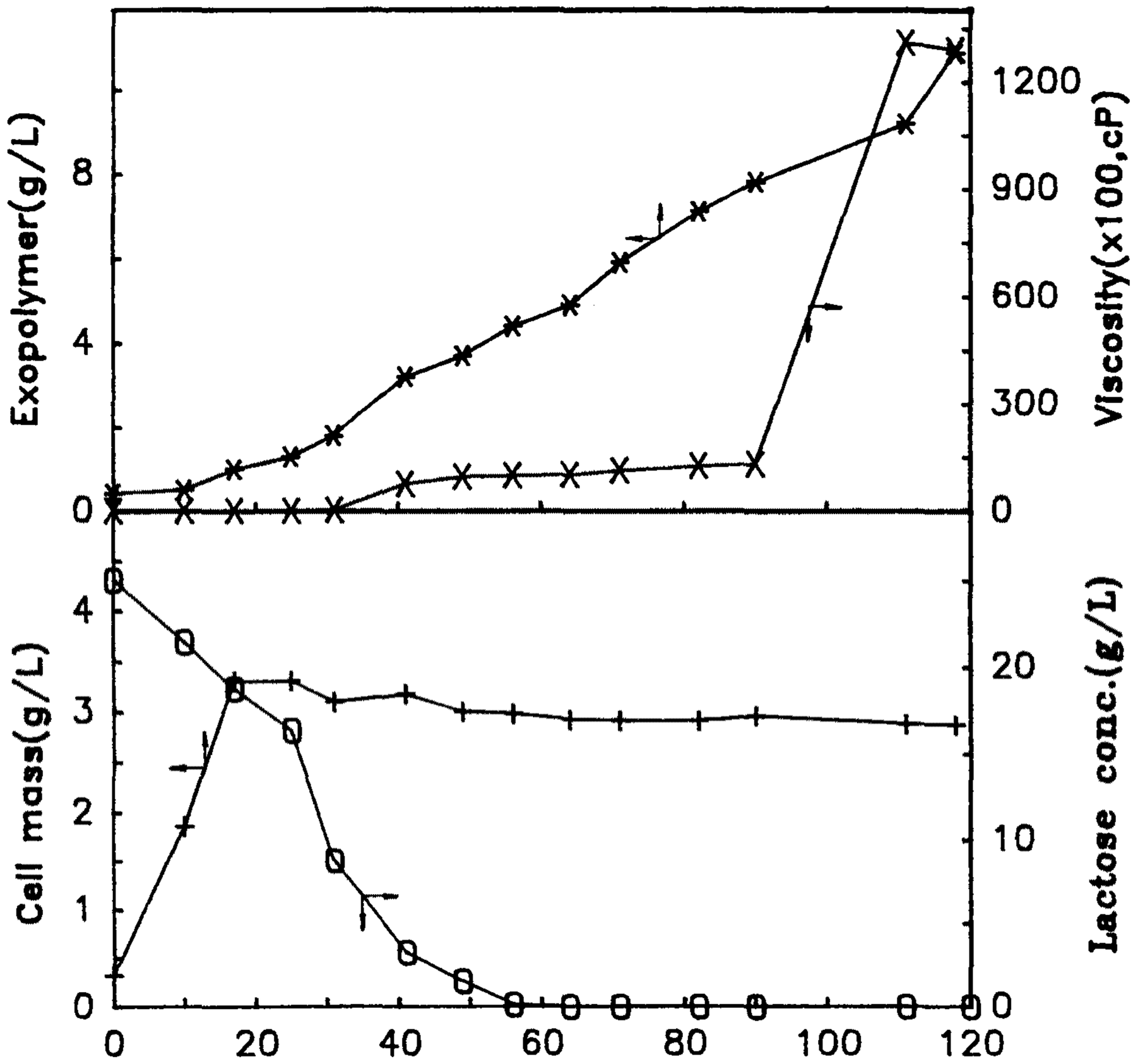


그림 5 - 5 . 탄소원이 lactose(C/N 30)일때 생물고분자 생성추이

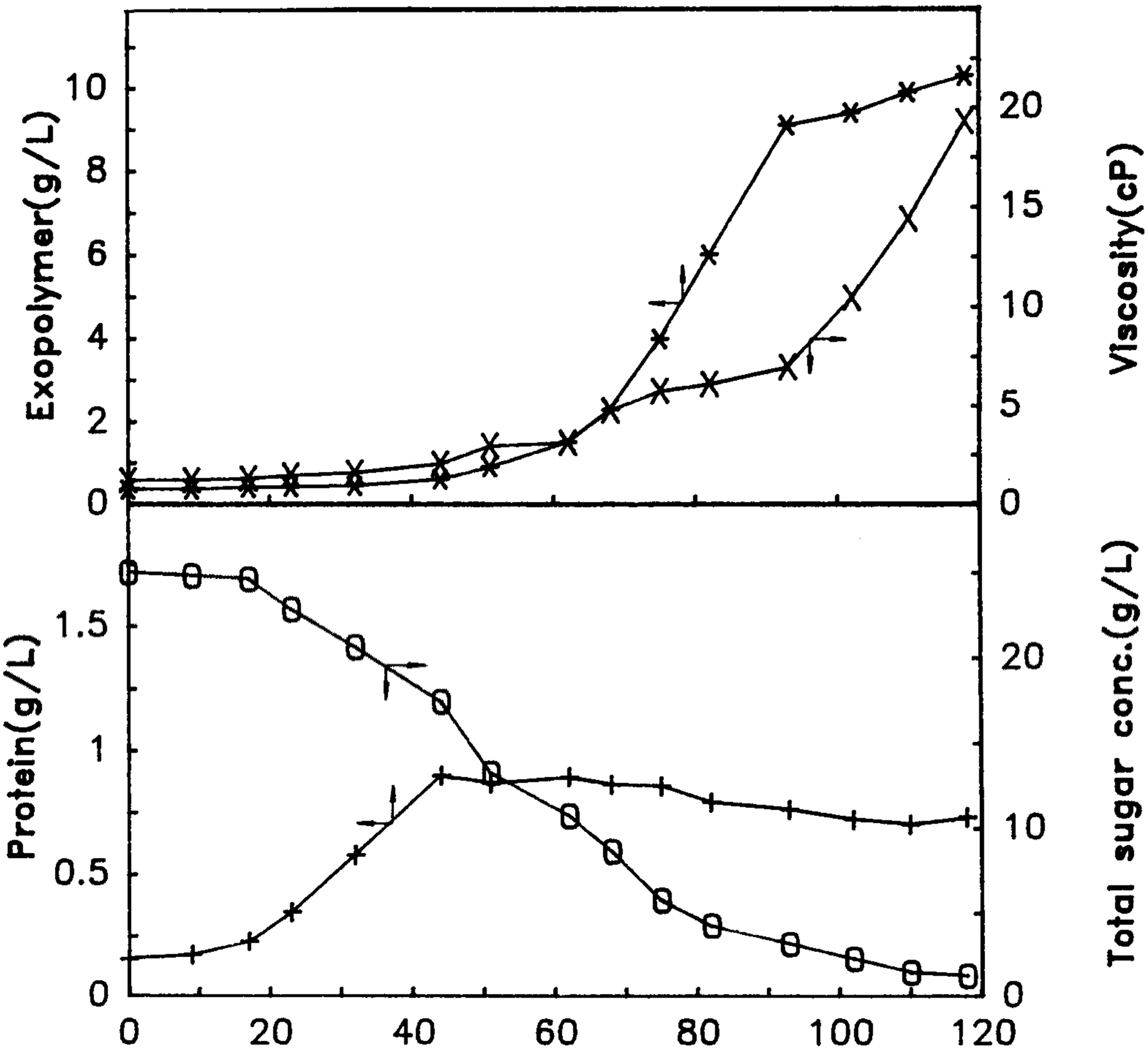


그림 5 - 6. 탄소원이 molasses(C/N 60)일때 생물고분자 생성추이

그 이후로는 당소모속도가 증가하여 120시간 에는 당 농도가 1.2g /L가 되었다. 생물고분자 생산은 거의 변화를 보이지 않다가 60시간부터 80시간 까지 생산이 급격히 증가 하고, 그 이후로는 완만한 증가속도를 나타내며 진행되어 120시간 에는 10g/L를 나타냈다.

탄소원이 cheese whey인 경우는 C/N 60의 경우, 120시간에 그림 5-7에서와 같이 20g/L의 생물고분자가 생성되었다. 점도는 초기에 낮은 값을 보이다가 30시간 이후부터 점점 증가하기 시작하여 100시간에는 130cp.에 이르렀고, 발효시간 120시간에는 약 400cp.의 높은 점도를 나타냈다. protein의 양은 45시간까지 증가하여 1.5g/L를 나타냈으며, 이후 거의 일정하게 유지되었다, 당소모는 세포 성장기와 생물고분자 성장기에 걸쳐서 일정한 속도로 일어났으며, 100시간에 이르러 모든 당이 소모되었다. 생물고분자는 세포 성장이 활발히 이루어지는 구간의 후반부에서부터 점점 많이 생기기 시작하여 70시간 까지 큰 증가율을 보이다가, 그 이후 완만하게 생물고분자의 생산이 증가되어 120시간에는 최고에 도달하였다. 세포성장이 활발히 후반기에서 부터 고분자가 생산되기 시작하고, 점도는 그에 따라서 점점 높아가는 것으로 보아서, 생성된 고분자가 세포벽으로 부터 release되는 시간이 매우 빠른 것으로 생각된다.

이상의 실험결과 각 탄소원의 종류에 따라서 최적 C/N비의 차이를 보이며, molasses 및 cheese whey를 기질로 사용하였을 경우, 미생물 분해가 용이한 glucose나 lactose보다 용액상의 점도가 현저히 낮게 관찰되었다.

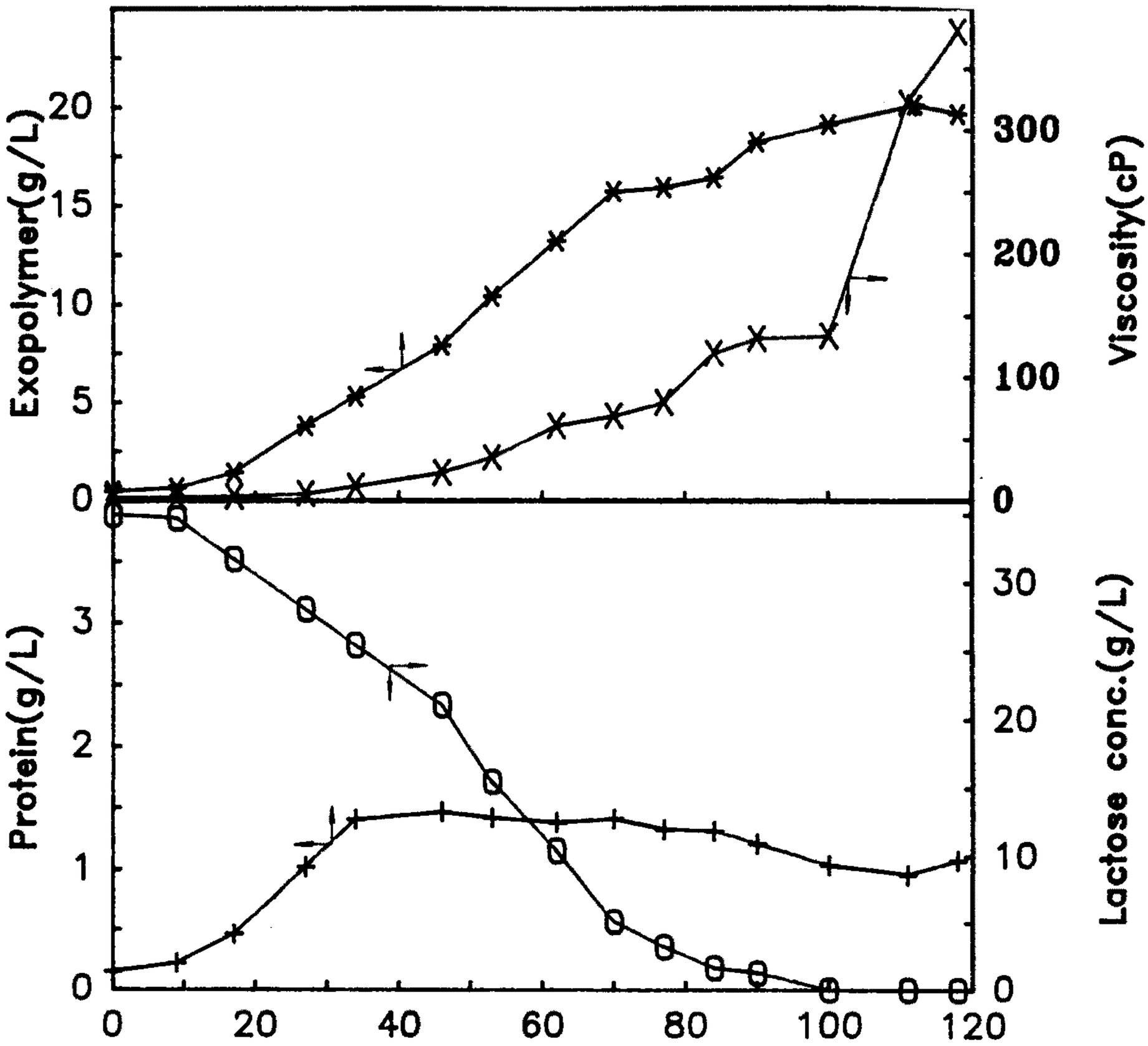


그림5-7. 탄소원이 cheese whey(C/N 90)일 때 생물고분자 생성추이

2. 유가배양식 발효

산업기질인 molasses를 사용하여 다당류의 생산을 증가시키기 위한 배양방법으로, 기절저해요인을 감소시키기 위해서, 세포의 생장을 증가시키다음, 연속적으로 기질을 공급하는 유가식 발효방법을 사용하였다. molasses의 경우 회분석 발효결과, 발효초기에서부터 많은 양의 기질을 공급 해 주면, 기질에 의한 저해현상이 나타나 생물고분자의 생산이 적어지는 것으로 생각되어 지기 때문에, molasses를 기질로 한유가식 발효 실험을 다음과 같이 수행하였다. 5L의 jar fermentor를 사용하여 먼저 회분식 발효법(working volume 1L)으로 발효 시켰다.

실험결과는 그림 5-8에 나타내었다. protein의 양은 발효시간 20시간 까지 급격히 증가하여 최대치인 약 1g/L를 나타냈고, 발효시간 40시간 까지 거의 변화하지 않는 일정한 값을 유지하였다. 기질의 소모는 발효시간8시간 이후부터 활발하게 시작되어 발효시간 40시간에는 당 소모가 다 일어났다. 세포의 성장이 정지기에 접어든 상태에서 당 소모가 활발히 진행된 상태인 40시간 부터 외부로 부터 펌프를 이용하여 0.5ml/min의 속도로 공급액을 발효조로 주입한 결과, protein양은 공급초기에 조금 증가하다가 변화하지 않은 채일정한 값을 유지하였고, 발효조내의 기질의 농도는 계속 0. 1g/L를 유지하였다. 생물고분자의 양은 세포가 정지기에 접어든 상태인 30시간 부터 증가하기 시작하여 발효시간 70시간 까지 일정한 속도로 증가하다가 88시간 이후부터 급격히 증가하기 시작하여 발효시간 70시간 까지 일정한 속도로 증가하다가 88시간 이후부터

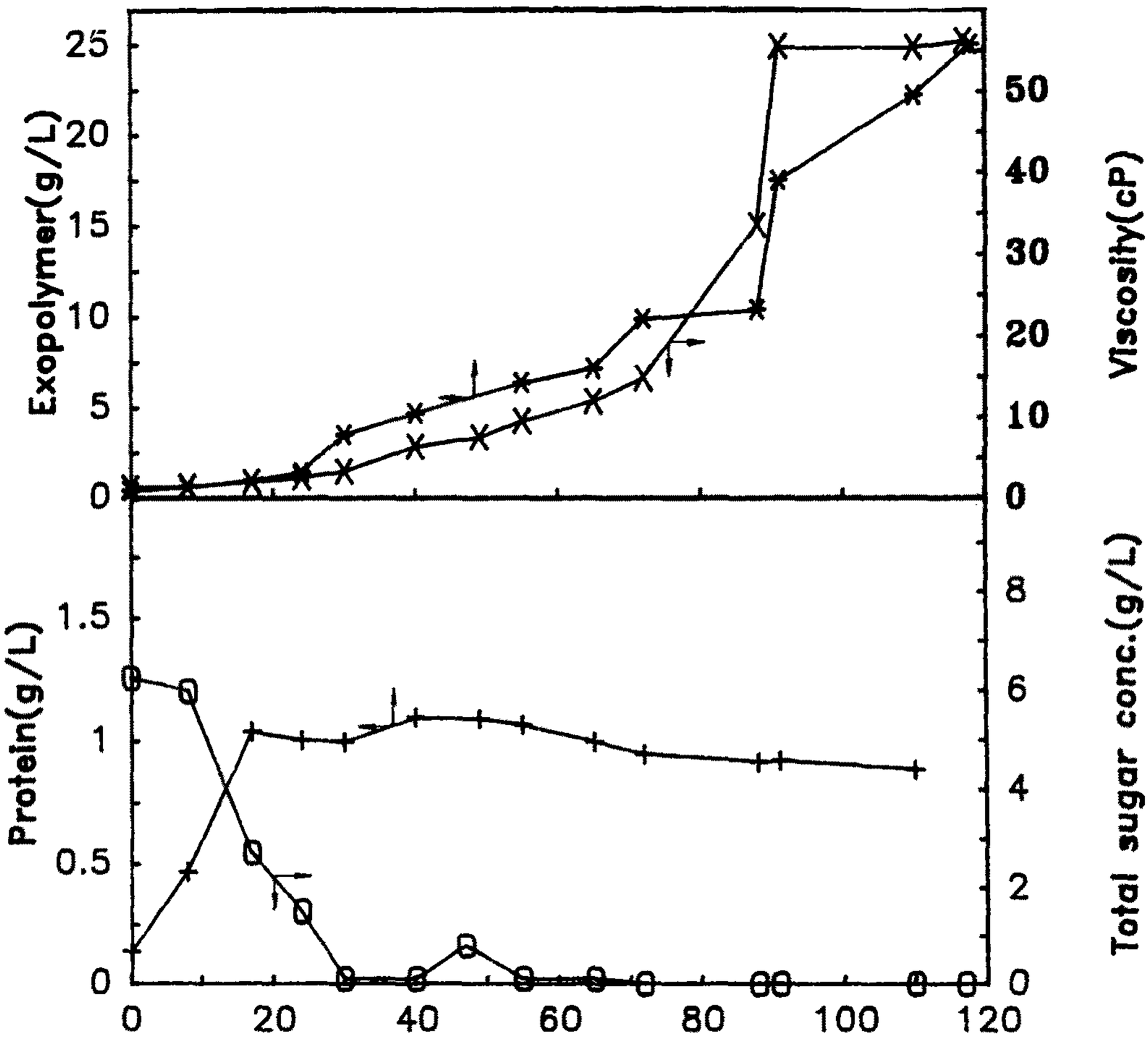


그림5-8. molasses를 기질로 사용한 유가 배양식 발효결과

급격히 증가하여 120시간 에는 25g/L를 나타내었다. 용액상의 점도는 30시간 이후부터 증가하기 시작하여 발효시간 70시간에는 12cp.의 점도값을 나타내었고, 그 이후부터 급격히 점도가 증가하여 120시간에는 60cp의 점도값을 나타내었다.

위의 실험결과로 부터, 세포성장을 돕고 기질의 저해현상을 줄인 유가식 발효방법이 회분식 발효보다 생산성이 3.5배 증가됨을 알 수 있었다. 이와 같은 결과는 세포성장이 빨리 일어나도록 질소원을 많이 공급해 준 다음, 외부로 부터 공급해주는 공급액에는 질소원을 제한 시킴으로써 기질이 세포의 성장보다 고분자를 생산하는 방향으로 이용된 결과로 생각된다.

3. 연속발효

반응을 두 단계로 나누어, 첫 단계에서는 세포의 생장을 극대화 시키고 다음 단계에서 질소원을 제한하여 다당류 생성을 높이는 2단계 연속발효를 수행하였다.

molasses를 기질로 한 2단계 연속배양 방법은 세포생장용(전단계) 2.5L와 생물고분자 생성용(후단계) 5L의 jar fermentor를 각각 사용하여, 먼저 유가배양 방법으로 각각 working volume 2.5L, 1.5L, aeration 1vvm, temp. 26℃, stirring speed 300rpm의 반응 조건에서 53시간 발효시킨 후, 전단계 발효조에는 질소원을 포함한 기질을 공급하고 후단계 발효조에는 질소원을 제거시킨 배지를 연속적으로 공급하였다.

실험결과는 그림 5-9에 나타내었다. protein 양은 희석속도가

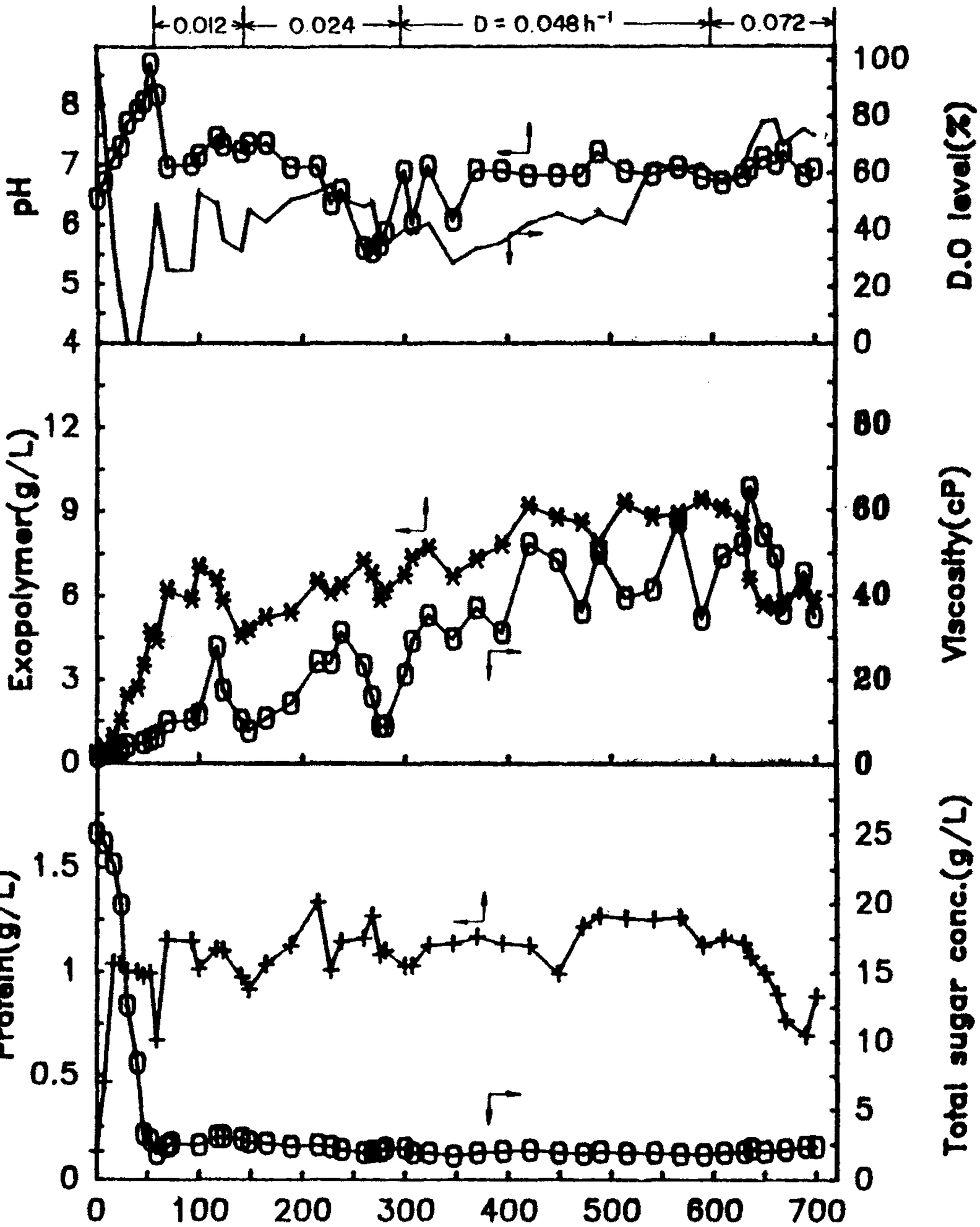


그림5－9. molasses를 기질로 사용한 2단계 연속 발효실험

증가함에 따라 생물고분자의 배출 농도는 증가하였으며, 이로 인하여 생물고분자의 생산성은 증가하여, 생산성은 희석속도 0.048 1/h에서 0.4g/L로 최대였다. 전환수율 또한 희석속도 0.048 1/h에서 34%로 최대였다. 희석속도를 0.0721/h로 증가시켰을때에는 세포의 wash out현상이 일어나며 생산성도감소하였다.

cheese whey를 기질로 한2단계 연속배양 방법은, molasses경우와 같이 먼저 유가배양 방법으로 53시간 발효시킨 후, 전단계 발효조에는 질소원을 포함한 기질을 공급하고 후단계 발효조에는 질소원을 제거시킨 배지를 연속적으로 공급하였다.

실험결과는 그림 5-10에 나타내었다. 실험결과 protein양은 희석속도를 증가시킴에 따라 조금씩 감소하였다. 희석속도가 증가함에 따라 생물고분자의 배출 농도는 증가하였으며, 이로 인하여 생물고분자의 생산성이 증가하여, 생산성은 희석속도 0.096 1/h에서 0.457g/L로 최대였다. 전환수율은 희석속도 0.072 1/h에서 18%로 최대였다. 희석속도를 0.168 1/h로 증가시켰을 때에는 세포의 wash out현상이 일어나며 생산성도 감소하였다.

제3절 요약

균주로 선택된 Z. ramigera 115의 배양 실험 결과, jar fermenttor를 이용한 회분석 발효에서는, 탄소원 glucose인 경우는 flask실험결과와 같이 C/N 90의 경우가 C/N 30, C/N 60 에 비하여 고분자의 생산이 활발하게 이루어지는 것으로 나타났다. 탄소

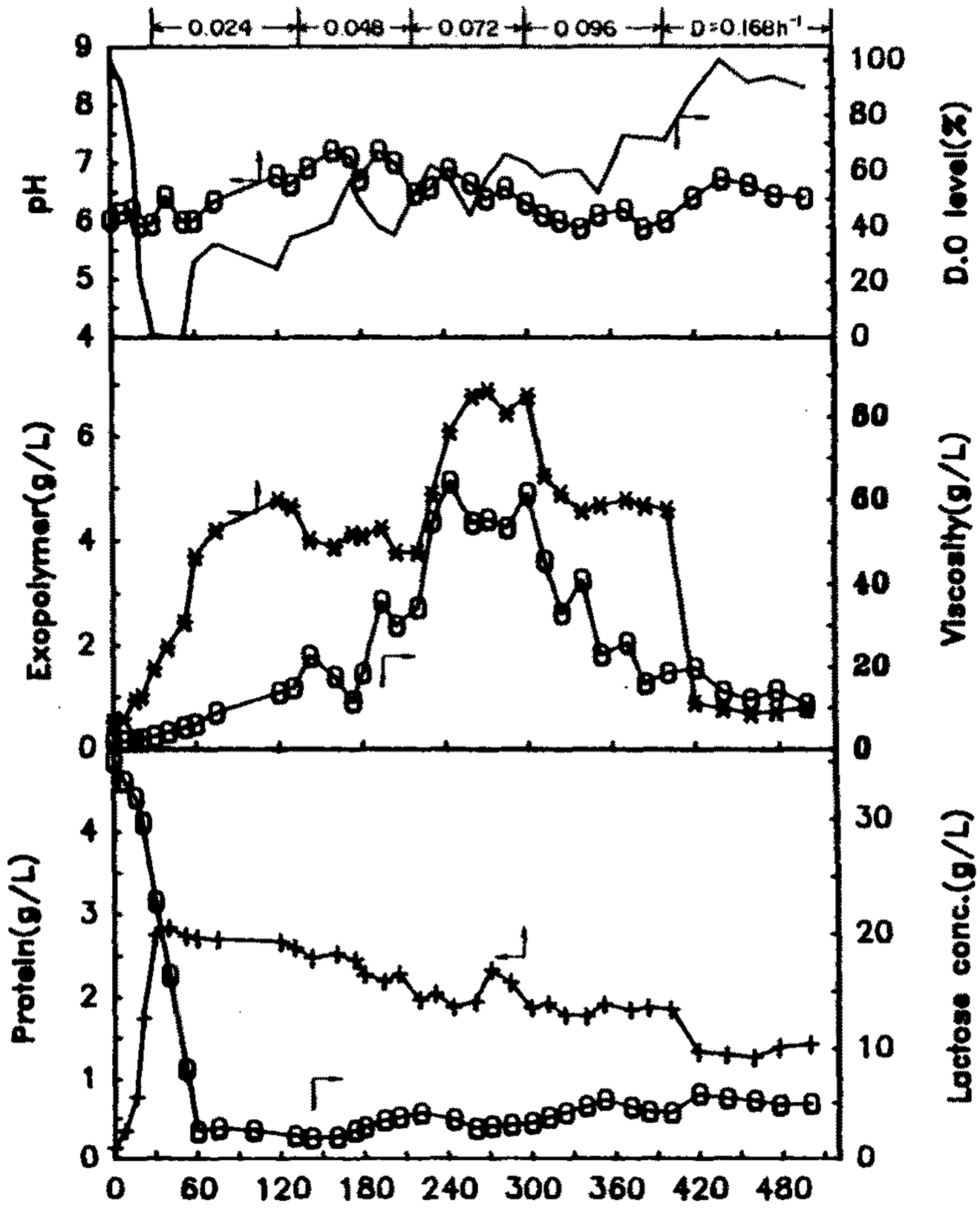


그림5－10. cheese whey를 기질로 사용한 2단계 연속 발효실험

원이 lactose인 경우에는 C/N 30의 경우, 발효시간 120시간 이후 고분자 생산이 가장 높게 나타났다. 탄소원이 cheese whey인 경우의 실험결과는 C/N 60의 경우, 120시간에 19.6 g/L의 생물고분자가 생산되었다. molasses 나 cheese whey를 기질로 사용할 경우에는 용액상의 점도가 glucose 나 lactose를 탄소원으로 사용했을 때보다 현저히 낮았다.

유가식 발효 실험결과 molasses 22.7 g/L를 사용시 회분식 발효보다 생산성이 3.5배 증가되었다. 2단계 연속발효 실험결과, molasses를 기질로 한 경우, protein의 양은 희석속도를 0.048 1/h까지 증가시켜도 희석속도에 관계없이 거의 일정한 값을 나타내었고, 생산성은 희석속도 0.048 1/h 에서 0.40 g/L으로 최고치를 나타내었다. cheese whey를 기질로 하는 경우, 실험결과 protein의 양은 희석속도를 증가시킴에 따라 조금씩 감소하였다. 생산성은 희석속도 0.096 1/h에서 0.46 g/L로 최대였다.

제6장 중금속 흡착실험

제1절 기초실험

1. 실험방법

본 실험에서는 Zoogloea ramigera 115에서 추출한 생물고분자의 중금속 흡착특성을 조사하기 위하여, 1) fermentor broth, 2) 건조세포 및 생물고분자, 3) 생물고분자 각각의 경우의 중금속 흡착실험을 실시하여 등온흡착선 (adsorption isotherm)을 결정하였다. 아울러 활성슬럿지, 주정폐수, 혐기성 반응기의 입상슬럿지 등 폐바이오매스의 중금속 흡착 특성을 조사하여 정량적으로 비교하였다.

각 경우의 등온흡착선은 활성탄소의 물리적 흡착의 경우와 유사한 방법을 금속성분과 접촉하여 주어진 온도에서 평형에 도달하게 된다. 평형에서는 흡착제에 의해서 흡착된 금속의 흡착량과 용액상의 잔여 금속농도와 평형이 이루어지게 되는데, 이결과는 등온흡착선으로 표시되어진다. 실험결과는 대표적인 등온 흡착선인 Langmuir형과 Freundlich형으로 나타내었다.

Langmuir등온흡착선의 일반식은

$$q = \frac{q_o b C}{1 + bC}$$

여기서 q=uptake of species (mg/g)

q_o=maximum uptake

C=equilibrium(final) concentration in solution (mg/L)

b=constant related to energy of adsorption

Freundrich등온흡착선의 일반식은

$$q = kC^{i/n}$$

또는 $\ln q = \ln k + 1/n \ \ln C$

여기서 q=uptake of species(mol/g)

C=equilibrium(final) concentration in solution (mol/L)

lnk=measure of adsorbent capacity

1/n=intensity of adsorption

중금속으로는 Cd(II), Zn(II)을 각각 100ppm, 200ppm, 300ppm, 400ppm농도에서 상기 biomass를 사용하여 Jar test에서 흡착실험을 실시하였다. 실험조건으로는 온도는 상온, 흡착시간은 각각 0.5, 1, 2, 3, 4hour, 회전속도 300rpm, pH2-10이며 각 플라스크에서 일정량씩 시료 채취하여 여과한 후 Atomic Asorption Spectrophotometer (AA)를 이용하여 중금속 농도를 분석하였다. AA는 Perkin Elmer, wavelength는 228.8nm, slit는 0.7nm, sensitivity 0.028mg/L, linear range 2.0mg/L, flame은 air-acetylene, oxidizing(lean, blue)이다.

2. 실험결과 및 고찰

초기 Cd농도 100ppm, 200ppm, 300ppm, 에서의 6가지 바이오매스의 시간에 따른 흡착의 변화량을 그림 6-1, 6-2, 6-3에 나타내었다. 각 흡착제의 흡착평형은 1시간 정도의 짧은 시간에서

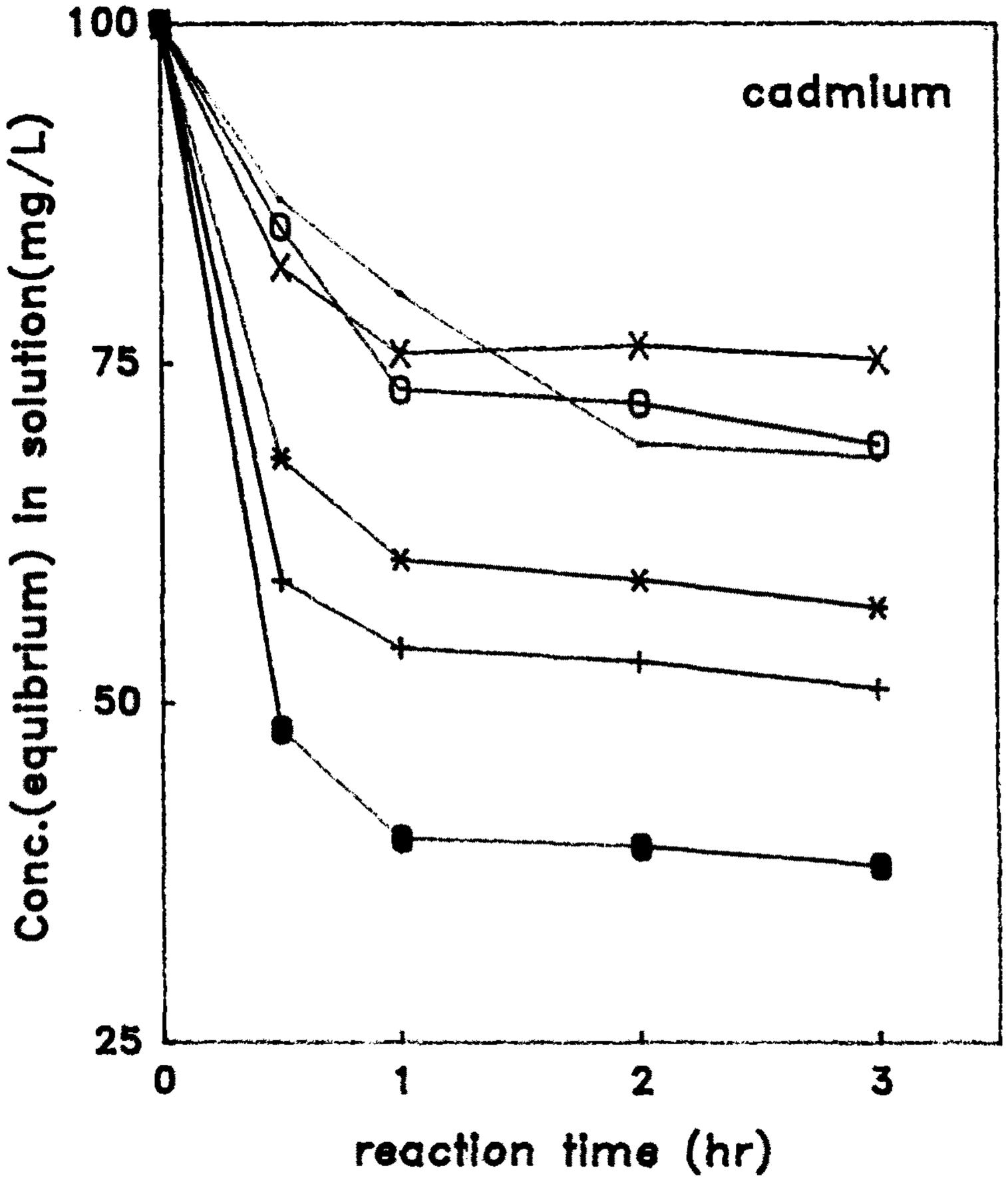


그림6-1. 바이오매스에 따른 시간별 Cd잔여농도의 변화
(Cd 초기농도 100ppm, sorbent 500ppm, (·)
중량천 sludge : (×) distillery waste : (○)
anaerobic sludge : (*) biopolymer : (+)
cell+biopolymer : (●) fermentor broth)

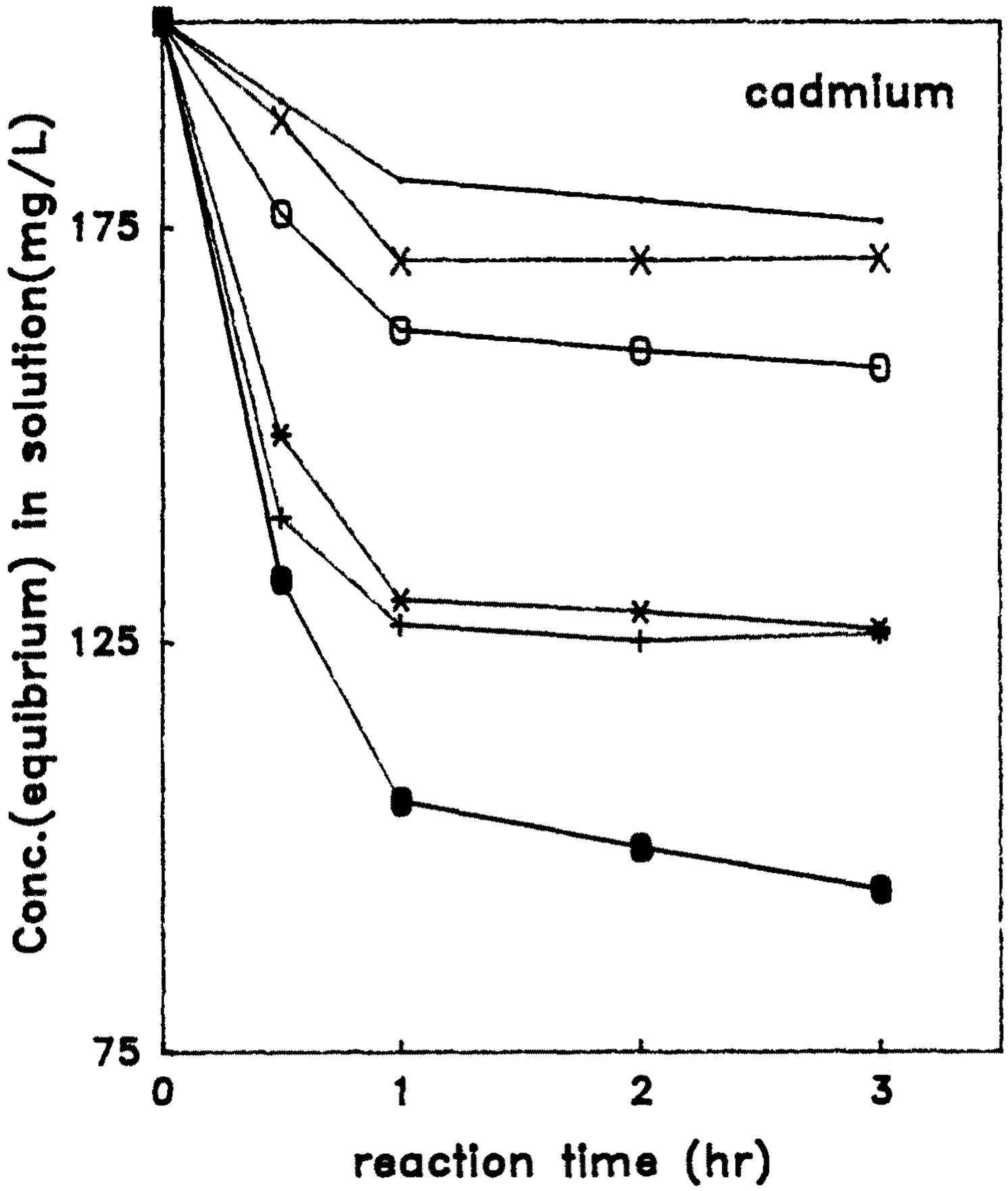


그림6-2. 바이오매스에 따른 시간별 Cd잔여농도의 변화
(Cd 초기농도 200ppm, sorbent 500ppm, (·)
중량천 sludge : (×) distillery waste : (○)
anaerobic sludge : (*) biopolymer : (+)
cell+biopolymer : (●) fermentor broth)

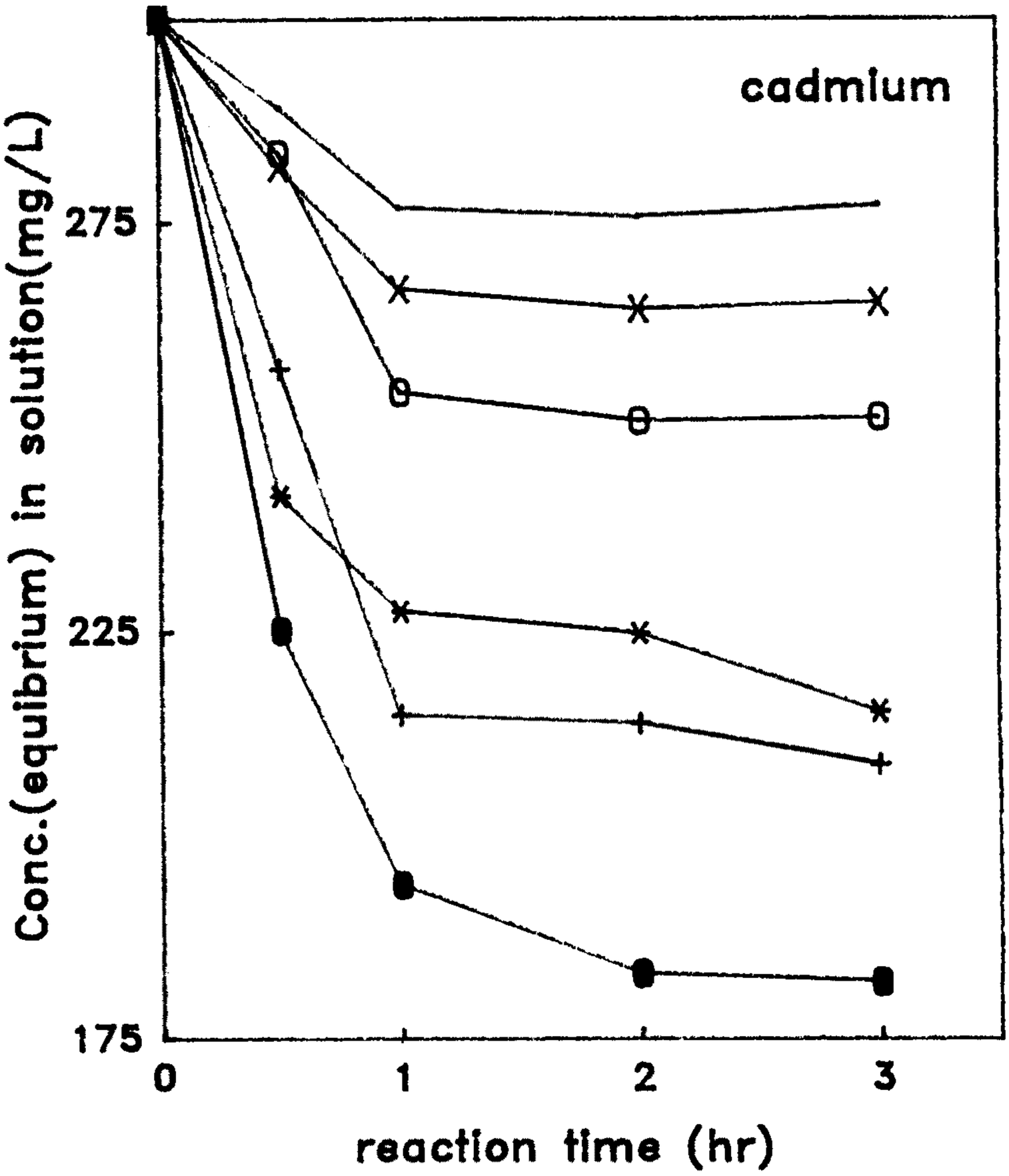


그림6－3. 바이오매스에 따른 시간별 Cd잔여농도의 변화
(Cd 초기농도 300ppm, sorbent 500ppm, (·)
중량천 sludge : (×) distillery waste : (○)
anaerobic sludge : (✱) biopolymer : (+)
cell+biopolymer : (●) fermentor broth)

이루어지며, 흡착성능은 Z. ramigera를 발효기에서 발효시킨 분리하지 않은 broth, 미생물을 포함한 생물고분자(건조후 사용), 추출한 생물고분자(건조후 사용), 혐기성 반응기의 입상슬럿지, 주정폐수(건조 후 사용), 중량천 슬럿지 순서대로 나타났다.

각 바이오매스 흡착제의 pH변화에 대한 흡착능력을 조사한 결과 중량천 sludge의 경우 최대 흡착은, pH 6-9근처에서, 주정폐수 원액은 pH 4.5-7, 혐기성 입상슬럿지의 경우는 pH 5-7, 생물고분자의 경우는 모두 pH 6-10에서 각각 이루어졌다.

각 흡착제별로 가장 좋은 결과를 얻은 pH에서의 실험 결과를 가지고, 실험결과를 Langmuir등온흡착선을 그림 6-4와 같이 나타내었고 maximum uptake capacity(mg/g) q_o와 adsorption energy와 관련된 상수값인 b를 결정하여 표 6-1에 나타내었다. 그림 6-5는 Fruendrich등온 흡착선인데 마찬가지로 adsorption capacity를 나타내는 지표인 k값과 adsorption indensity를 나타내는 1/n값을 결절하여 표 6-2에 나타냈다. Z.ramigera로 생산한 생물고분자가 포함된 fermentor broth의 경우 중량천 sludge에 비해 5-6배 정도의 높은 흡착성능을 나타냈다. 또한 broth상태로 투여한 생물고분자가 가장 높은 흡착율을 나타내고 있는데, 생물고분자를 따로 추출하여 사용하는 것보다도 직접 사용함으로써 추출하는데 들어가는 경비를 절감할 수 있을 걸로 기대된다.

중금속 Zn의 경우에도 동일한 실험을 실시하였는데, 각 바이오매스의 흡착능력은 동일한 순서를 나타내었으며, 용액상의 Zn 이거의 99%이상 제거되는 결과를 얻었다.

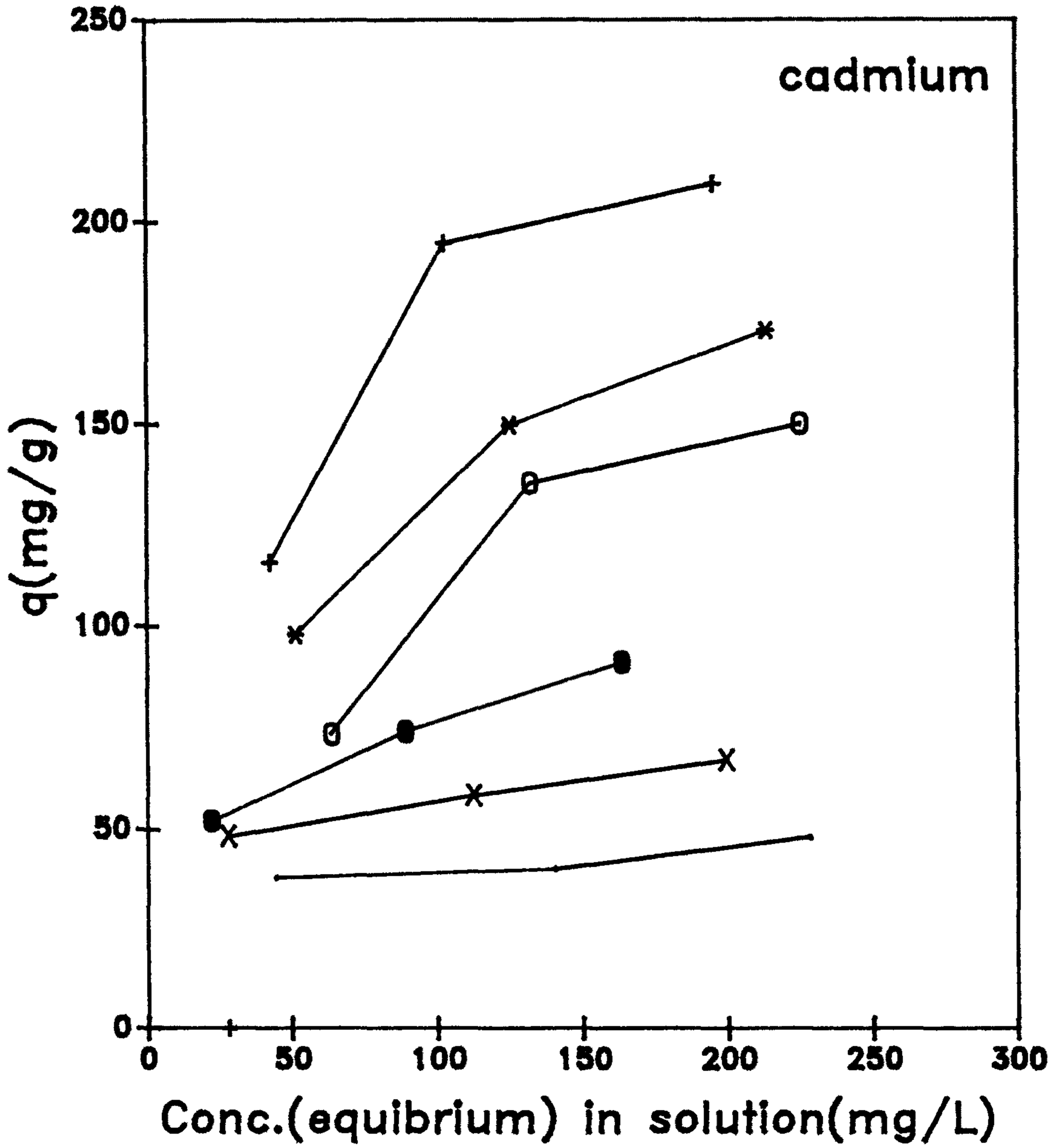


그림6－4. 바이오매스에 따른 시간별 Cd흡착등온천
(Langmuir model, sorbent 500ppm, (·)
중량천 sludge : (×) distillery waste : (●)
anaerobic sludge : (∗) biopolymer : (+)
cell+ biopolymer : (○) fermentor broth)

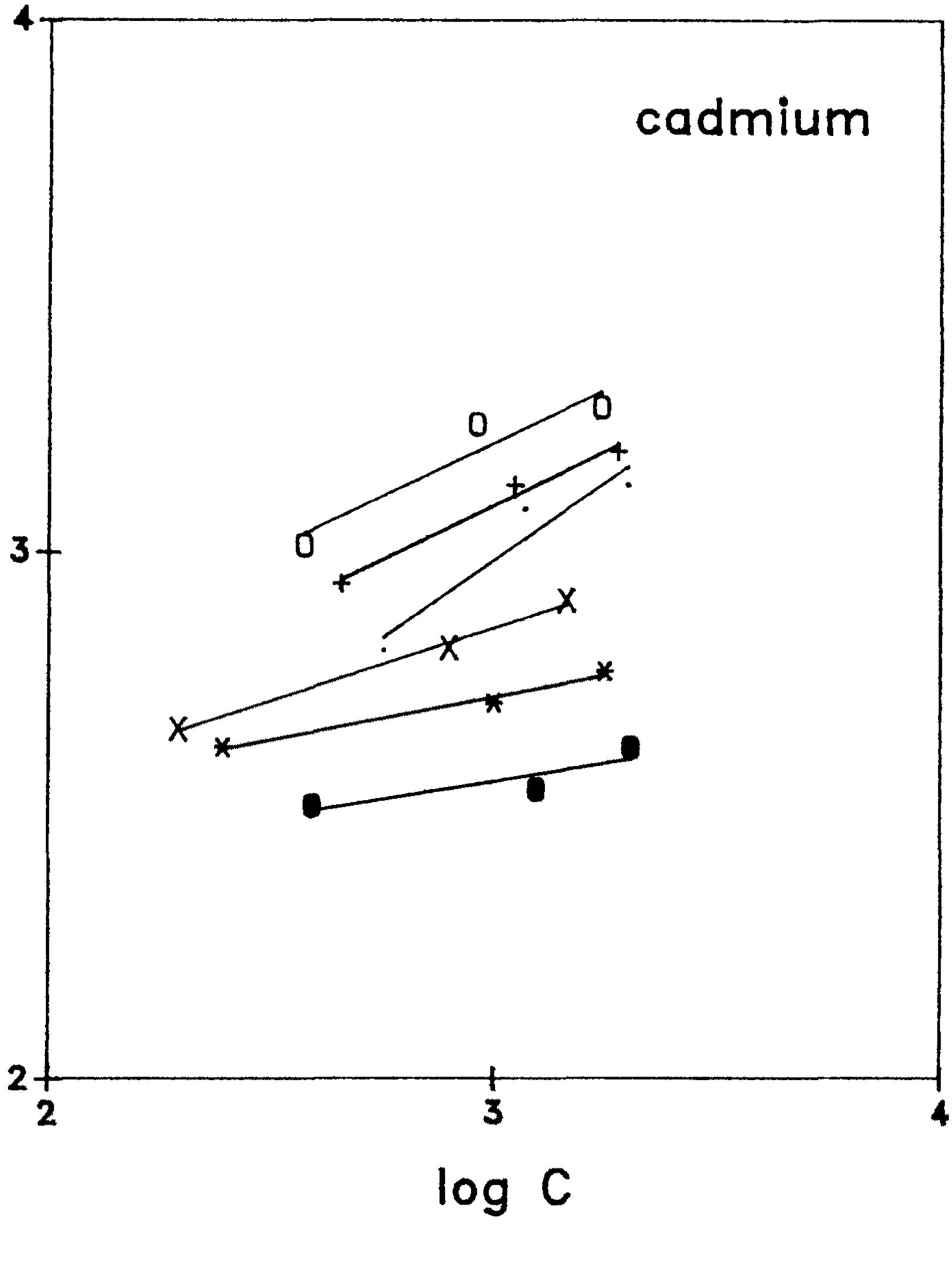


그림6-5. 바이오매스에 따른 시간별 Cd흡착등온선
(Freundrich model, sorbent 500ppm, (·)
중량천 sludge : (×) distillery waste : (●)
anaerobic sludge : (✱) biopolymer : (+)
cell+ biopolymer : (○) fermentor broth)

표 6－1 Determination of qo and b in Langmuir isotherm model

sorbent materials	maximum uptake capacity (qo)	constant related to energy of adsorption (b)
중량천 sludge	46.95	0.086
주정폐수 1	67.57	0.089
혐기성 sludge	95.24	0.054
polymer	294.12	0.005
cell＋polymer	232.56	0.015
fermentor broth	303.03	0.015

표 6－2 Determination of log k and 1/n in Fruendrich isotherm model

sorbent materials	log k	1/n
중량천 sludge	2.16	0.14
혐기성 sludge	2.24	0.16
주정폐수 2	2.03	0.27
polymer	1.23	0.58
cell＋polymer	1.86	0.41
fermentor broth	2.00	0.40

제2절 흡착 반응기 실험

1. 실험방법

유가금속회수를 대상으로 하는 생물흡착 반응기 개발을 위한 기초연구로서, Zoogloea ramigera115로 부터 추출한 생물고분자를 calsium alginate에 고정화 시킨후 packed bed column을 이용하여 여러가지 중금속 흡착실험을 수행하였다.

1.1. 생물고분자 고정화 방법

가. 건조시킨후 생물고분자(cell 미분리)3g과 2%의 sodium alginate를 0.85%의 NaCl용액에 첨가한 후, 잘 혼합이 되도록 교반한다.

나. 위의 용액을 고정화장치(그림 6-6)를 이용하여 1.47%의 $CaCl_2$용액에 주입하여 일정한 크기의 bead를 만든다.

다. 위의 만들어진 bead를 2h동안 hardening시킨다.

라. 1%의 polyethyleneimine(PEI)용액으로 안정화시키는 이유는 bead와 PEI와의 cross-linking으로 인하여 bead자체가 안정화될 뿐만 아니라, 금속회수 시, bead에 흡착된 금속의 탈착제인 NTA (nitrilotriacetic acid)에 의해서 bead의 안정성이 영향을 받지않도록 하는 효과를 가져올 수 있다.

마. pH를 5.0으로 유지시킨다.

바. 증류수로 고정화된 bead를 세척한다.

사. 고정화된 bead를 그림 6-7의 packed bed column에 충전시켜 사용하였다.

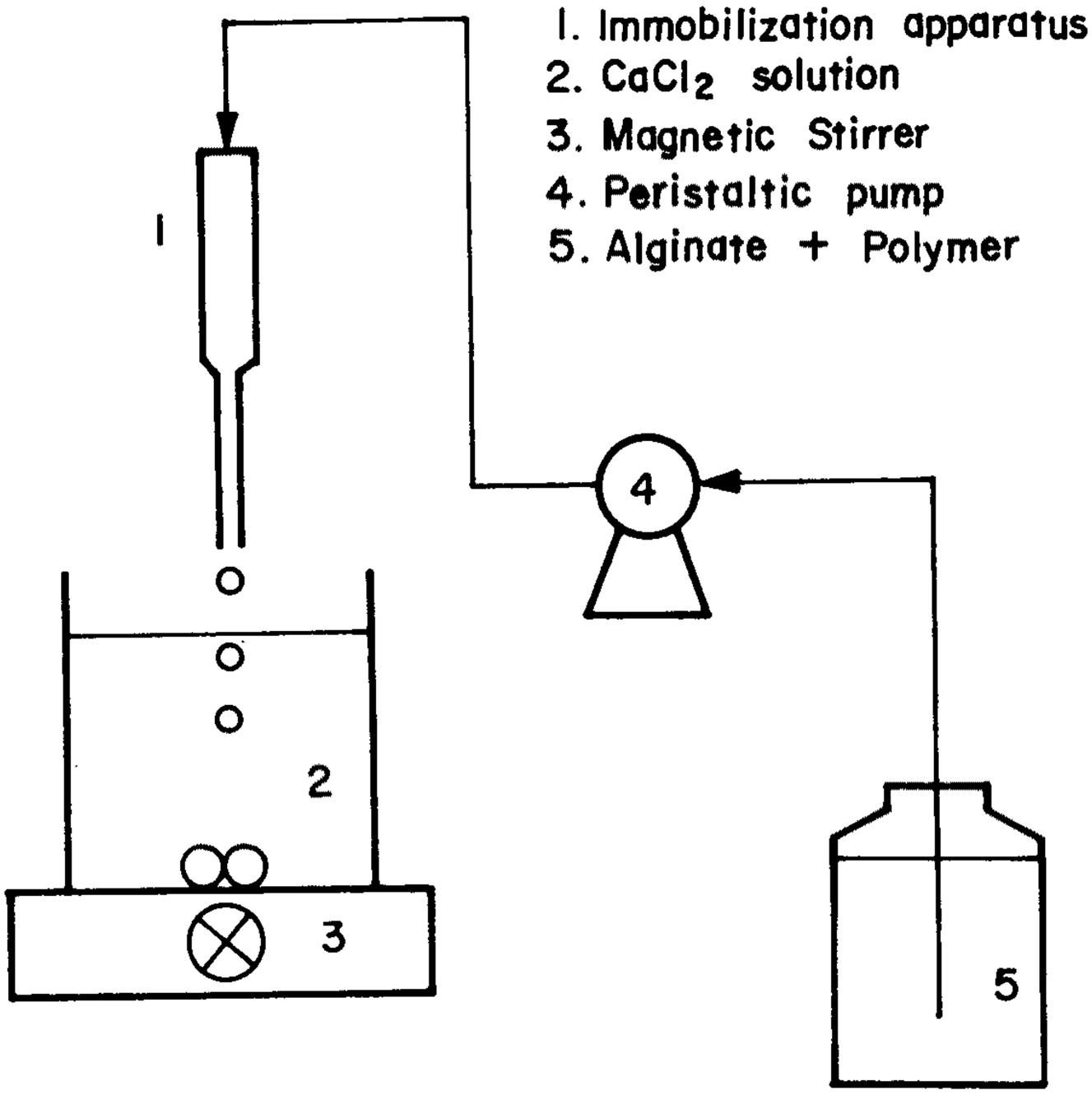


그림6-6 Schematic diagram of immobilization apparatus

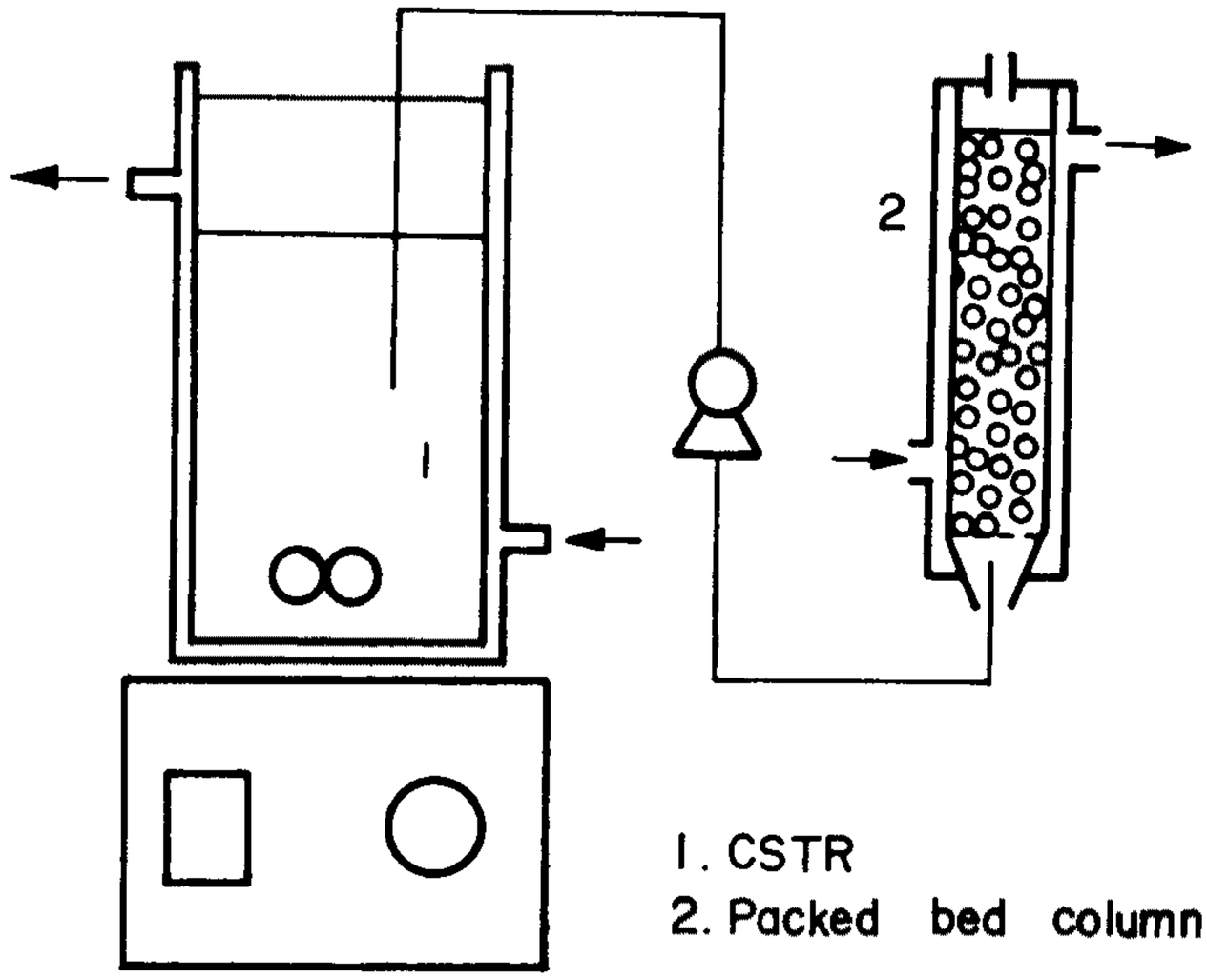


그림 6-7. Schematic diagram of the differential reactor

1.2. 금속의 흡착과 회수 방법

고정화된 bead에 금속을 흡착시킨 후, 회수를 위한 탈착실험을 실시하였다. 여러금속에 대하여 1시간씩 30batch 실험을 한 후, bead에 흡착되어 있는 금속은 0.48% NTA(nitrilattriacetic acid)를 이용하여, pH 6.0, 3hr 반응 시켜 탈착시켰다. 여기서 탈착제인 NTA는 양이온에 대한 킬레이트로써, bead에 흡착되어 있는 금속뿐만 아니라, Ca-alginate의 Ca^{2+}에도 킬레이트로써 작용하게 된다. 따라서 PEI를 사용하여 bead와 cross-linking을 시킴으로 인하여 bead를 안정화시키고, NTA로부터의 영향을 제거할 수 있다.

2. 실험결과 및 고찰

packed bed column에서의 고정화된 bead에 의한 Cd, Zn, Mn, Cu의 흡착실험결과는 그림 6-8, 6-9, 6-10, 6-11에 각각 나타내었다. Cd의 경우는 초기 92%의 흡착율에서 30batch 후 82%를 나타냈으며, Zn의 경우는 초기 96%에서 85%, Mn의 경우는 초기 92%에서 78%, Cu의 경우는 초기 94%에서 84%의 흡착율을 나타냈다. 각 금속의 경우 비슷한 흡착율을 나타내고 있는데 Zn의 경우 가장 높은 값을, Mn의 경우 가장 낮은 값을 나타내었다.

각 중금속의 흡착실험이후 0.48%의 NTA를 이용하여 탈착실험을 실시하였는데, 그림 6-12는 NTA처리시간에 대한 중금속의 탈착 회수율의 변화를 나타내고 있다. 대체로 처리시간 1시간 까지 급격한 증가를 보이다가 그후 완만한 상승을 보여주고 있다. NAT가 킬레이트로서 작용하는 효과는 각 금속 별로 차이를 나타

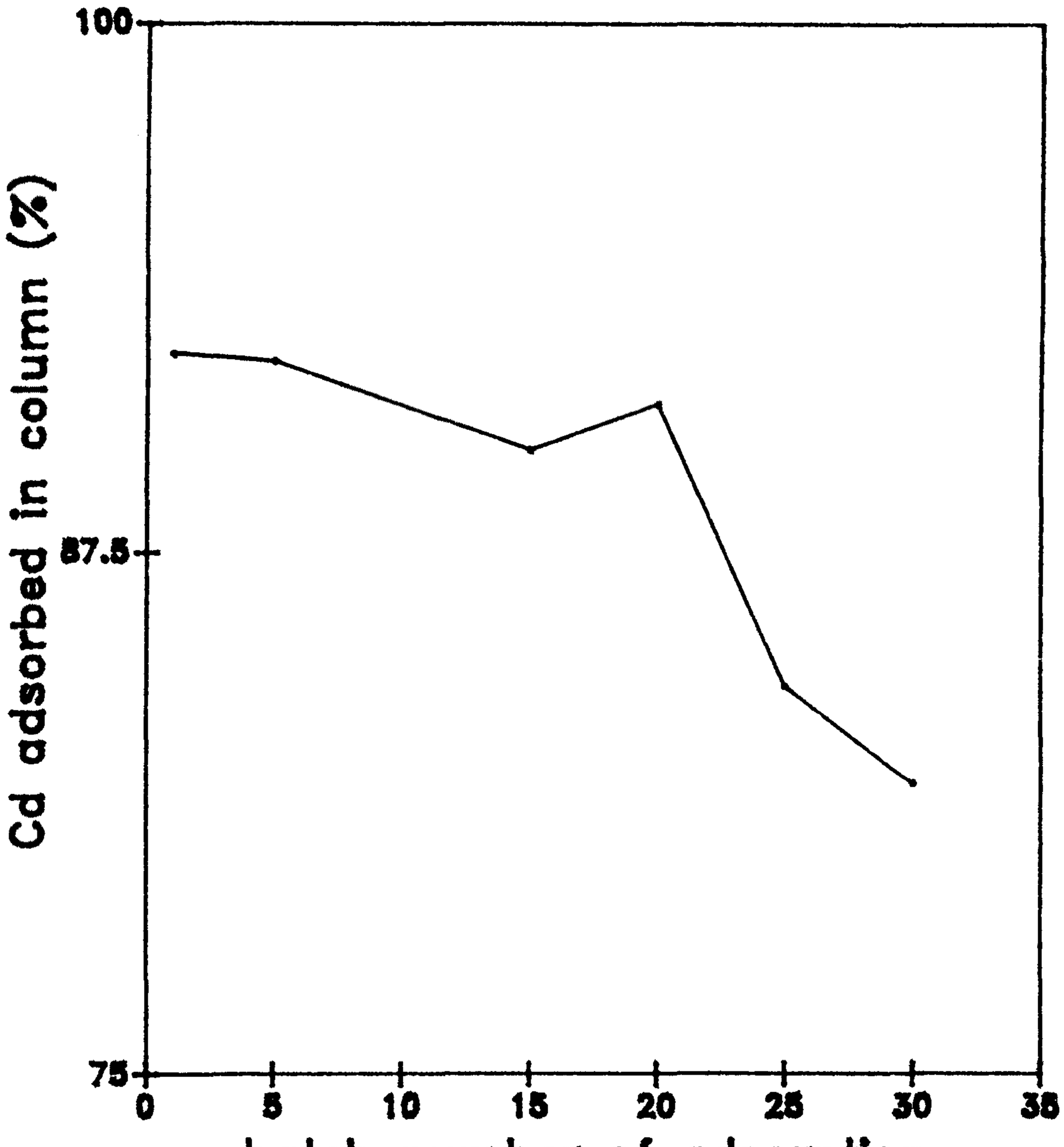


그림6-8. 흡착반응기에서의 Cd흡착량의 변화

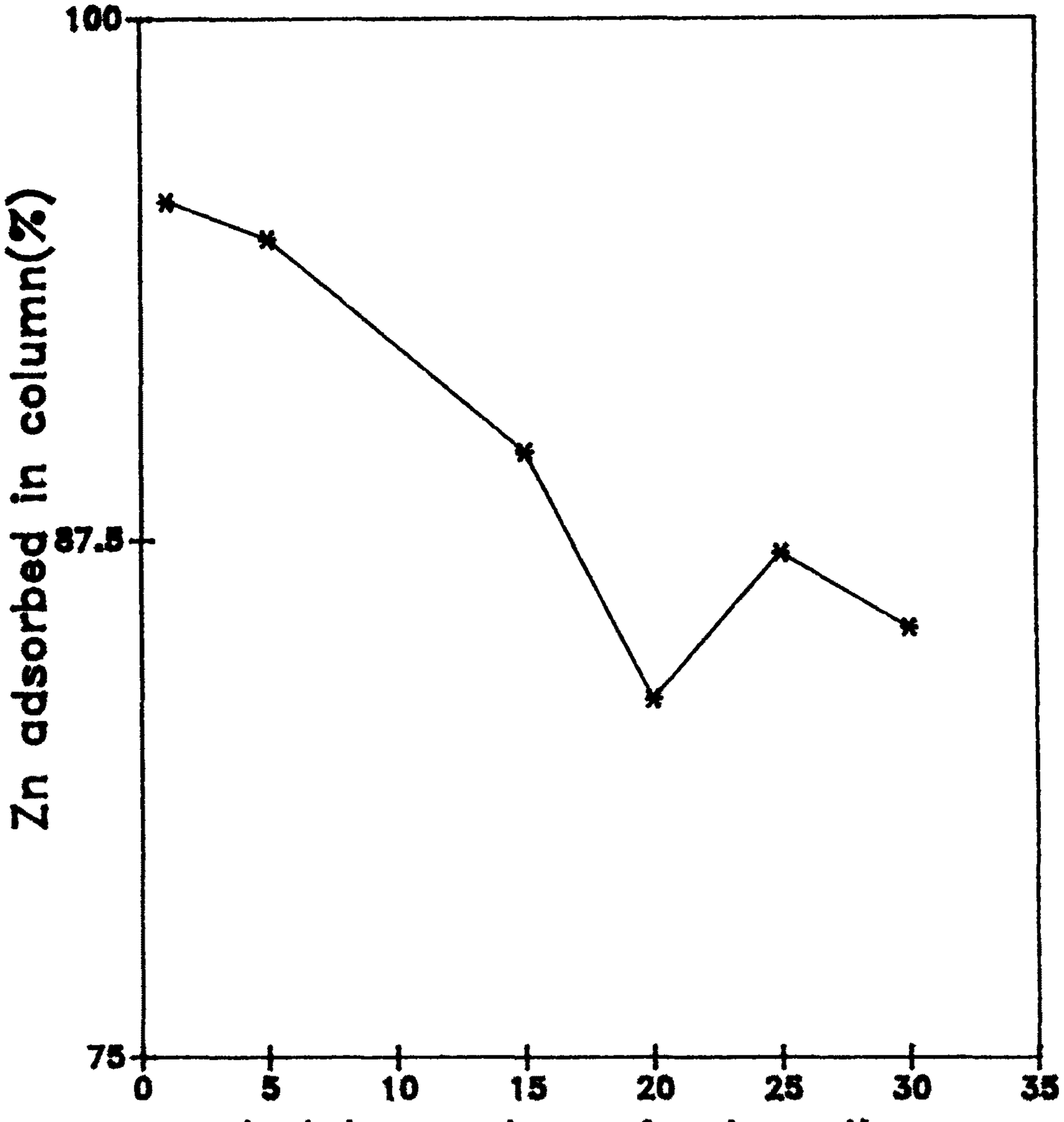


그림6－9. 흡착반응기에서의 Zn흡착량의 변화

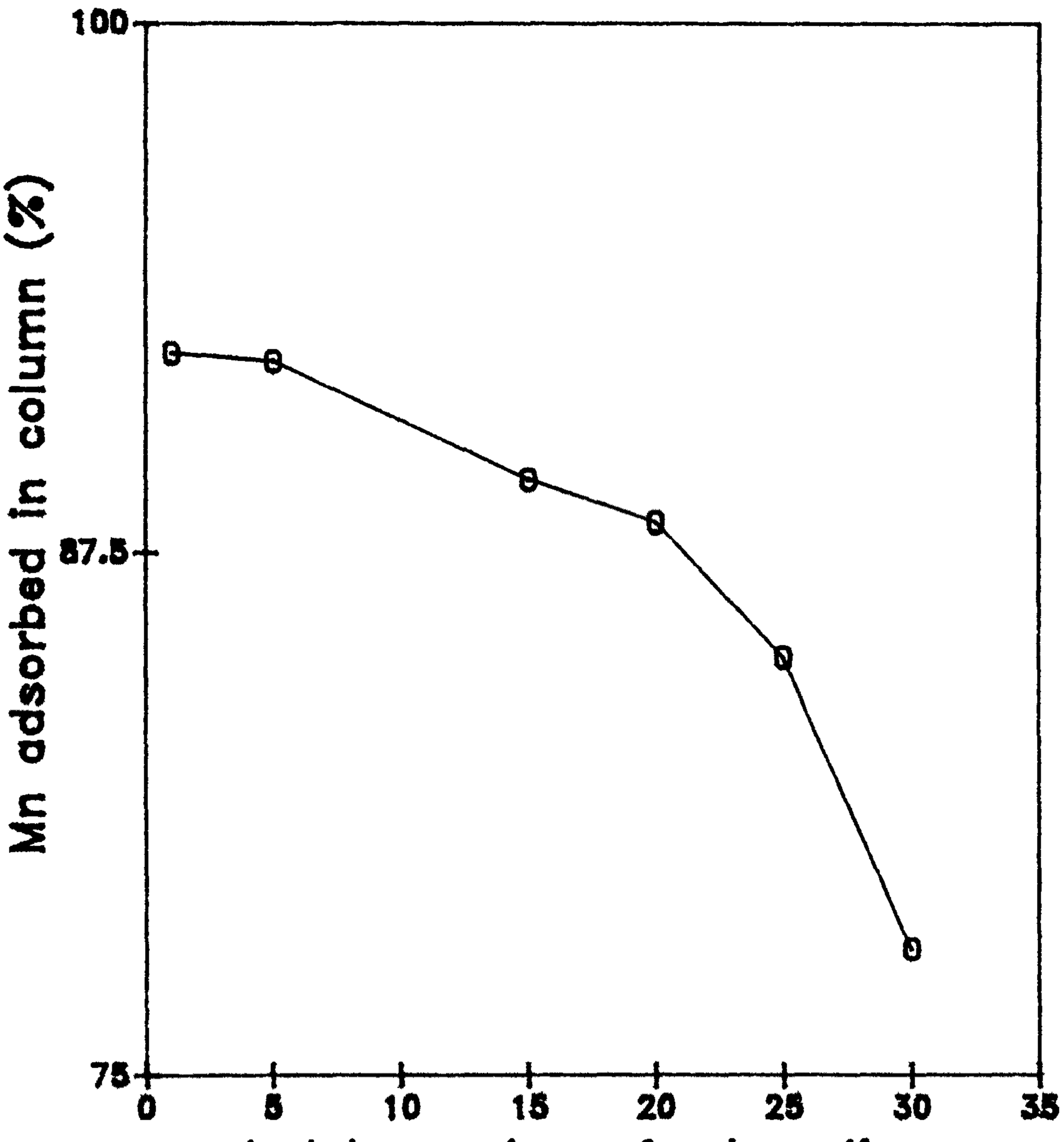


그림6－10. 흡착반응기에서의 Mn흡착량의 변화

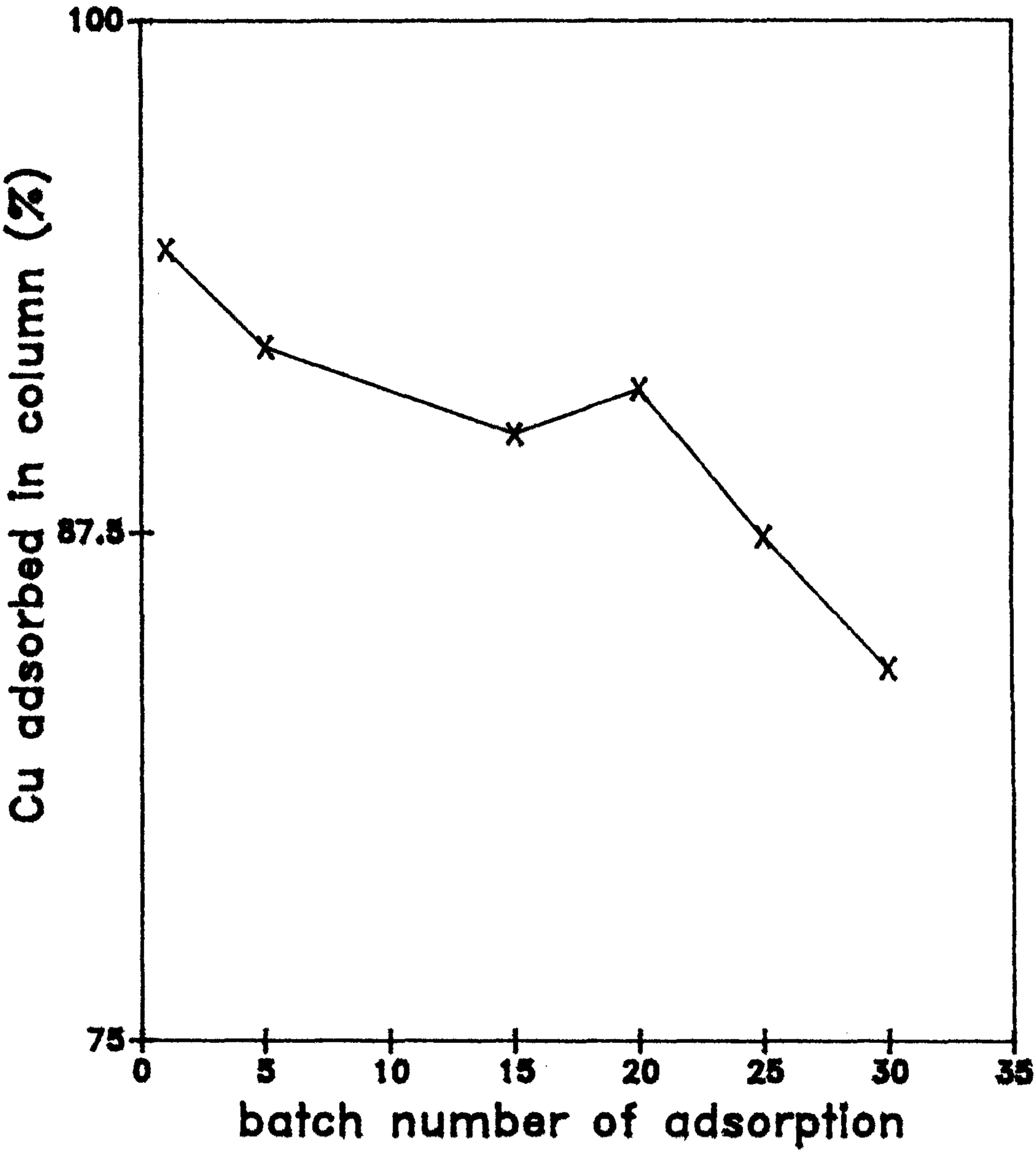


그림6－11. 흡착반응기에서의 Cu흡착량의 변화

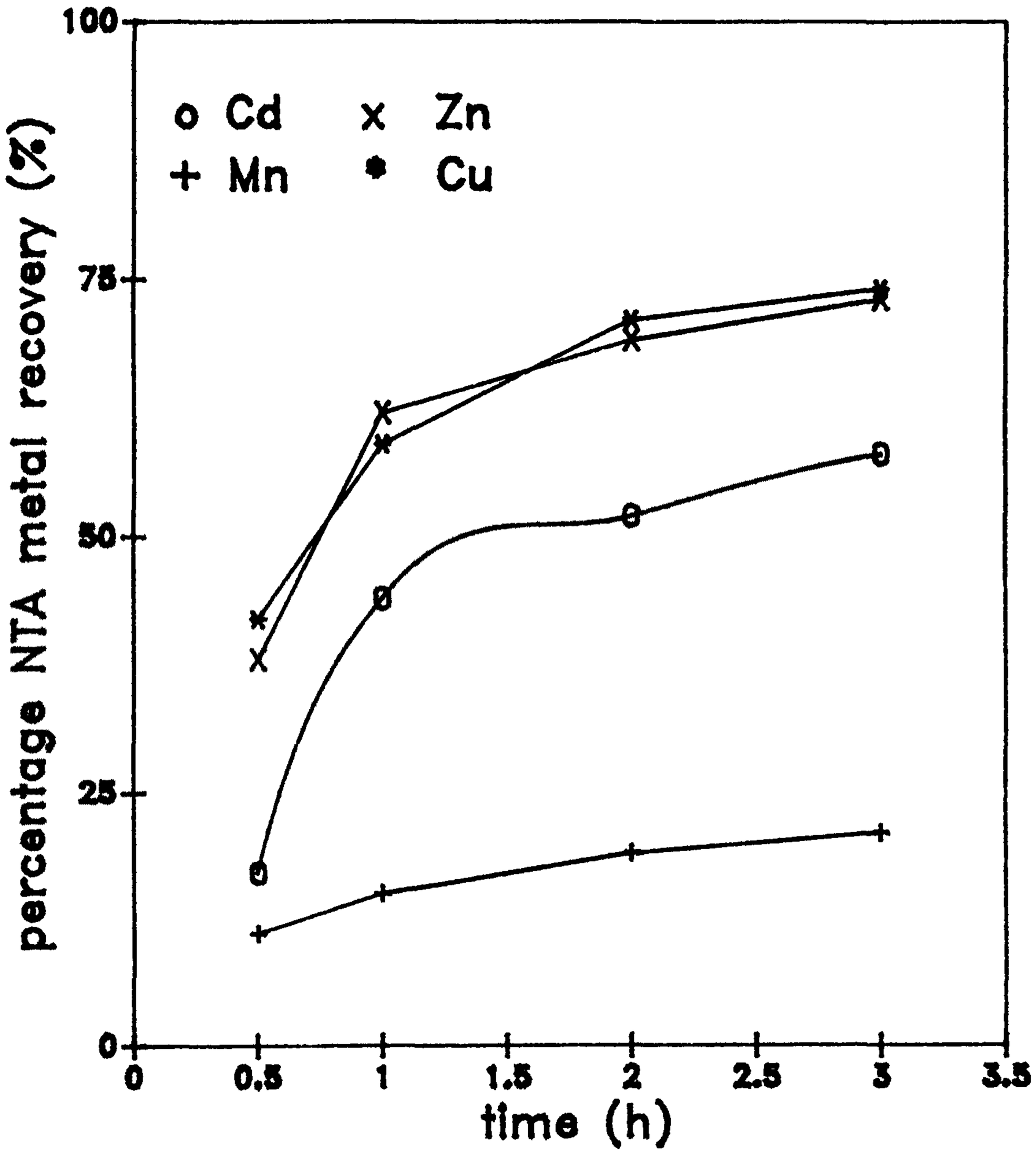


그림6－12. NTA처리시 중금속의 탈착량의 변화

내어, Zn, Cu의 경우는 3hr동안 73%, 74%의 탈착율을 나타 냈으며, Cd의 경우는 58%, Mn의 경우는 21%의 낮은 탈착율을 보였다.

중금속 탈착이후, 탈착된 bead를 재사용하여 packed bed column에서의 흡착성능을 조사하였다. 그림 6-13, 6-14, 6-15, 6-16에서와 같이 Cd는 초기 88%에서 30baatch후 78%, Zn은 초기 92%에서 81%, Mn은 90%에서 75%, Cu는 89%에서 81%의 흡착율을 보이고 있다. 각 중금속에 대한 흡착실험 결과와 탈착시킨 후의 각 중금속에 대한 흡착실험을 비교하면 Cd의 경우 4%, Zn의 경우 5%, Mn의 경우 2.5%, Cu의 경우 3% 정도씩 흡착성능이 떨어지는 것으로 나타났다.

Kuhn 등(1989)은 Z.ramigera세포를 calcium alginate bead로 고정화 시켜 air-bubble column반응기 3개를 연결하여 합성중금속 폐수를 통과시켜 중금속 흡착실험을 실시하였는데 Cd, Zn, Mn, Cu, Sr등의 금속을 96%이상 제거되는 것으로 보고하였다. 그러나 Kuhn등의 air-bubble column의 단점은, 흡착실험에서 10일 동안 조업을 시켰을 경우 첫번째 반응기의 효율이 급격히 떨어지며, 중금속을 탈착시키고 난 후 미생물의 활성회복을 위해 bead를 일정시간 fresh medium용액에 넣은 후 사용해야하는 등의 번거로움이 있다.

본 packed bed column실험에 있어서는 bead자체가 갖는 흡착능이 한정되어 있기 때문에 30batch에서 흡착성능이 80%정도로 유지되는 것처럼 장기간 안정성을 유지할 수 없는 단점이 있다. 이

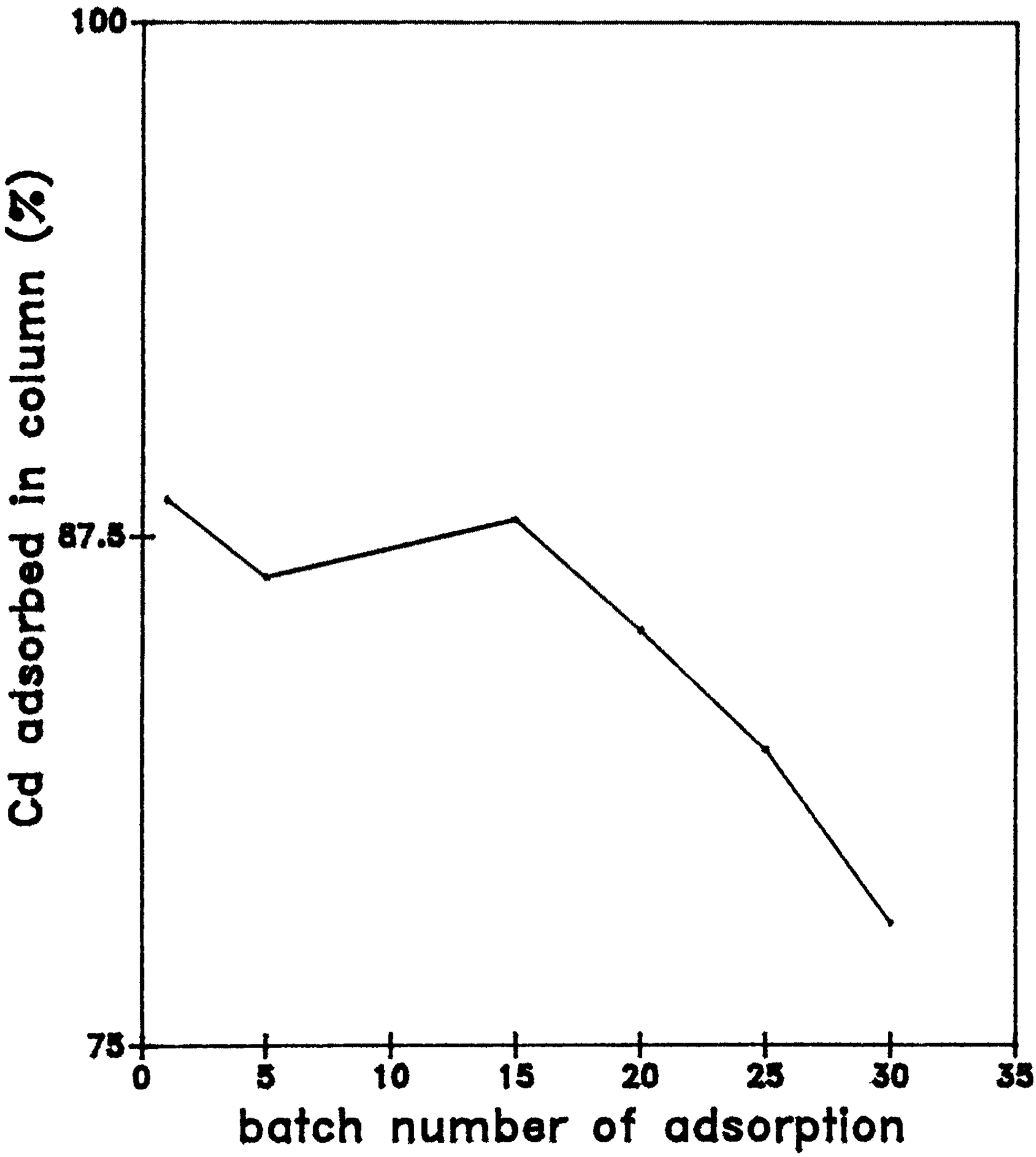


그림6－13. NTA처리후 흡착반응기에서의 Cd흡착량의 변화

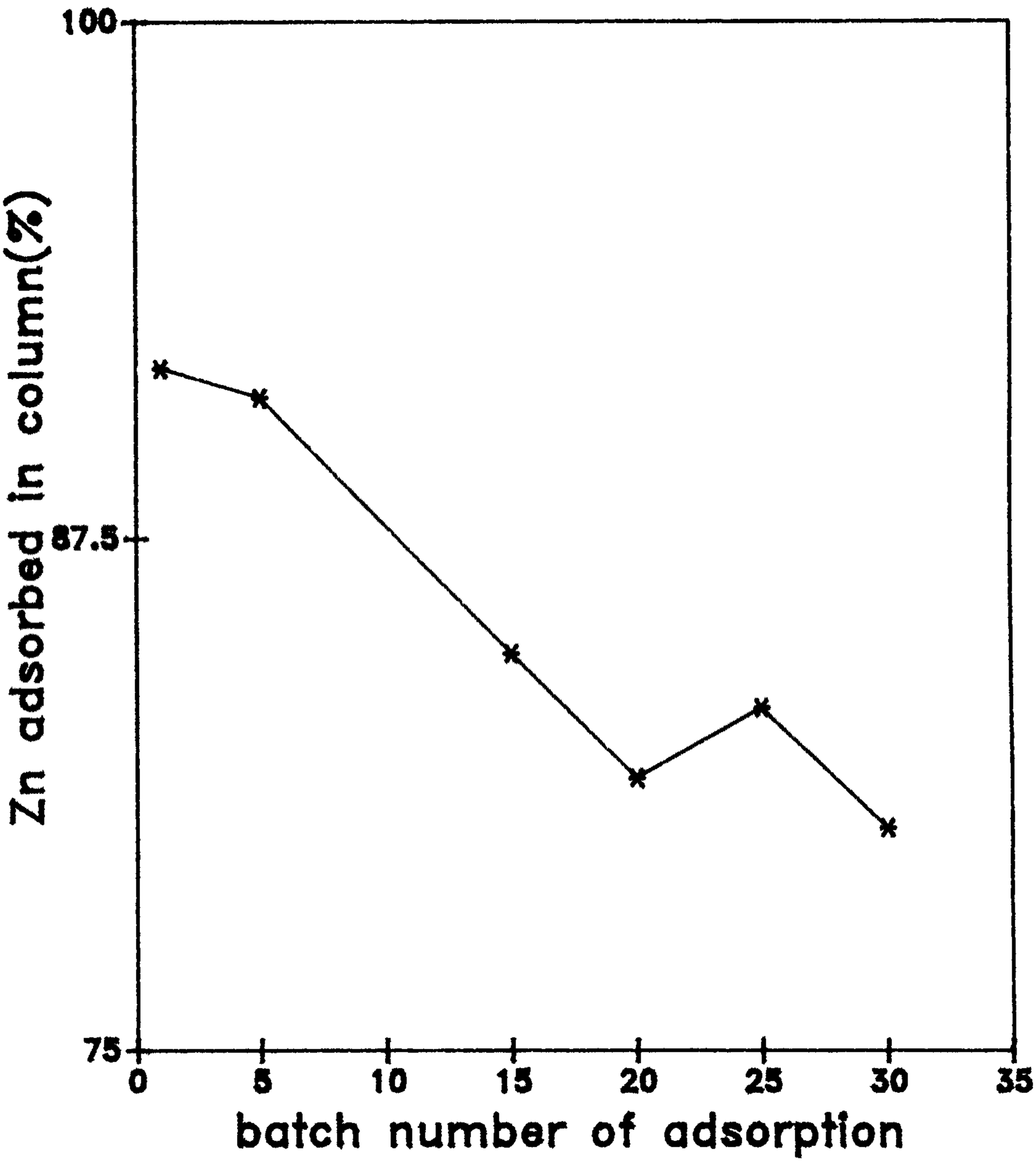


그림6－14. NTA처리후 흡착반응기에서의 Zn흡착량의 변화

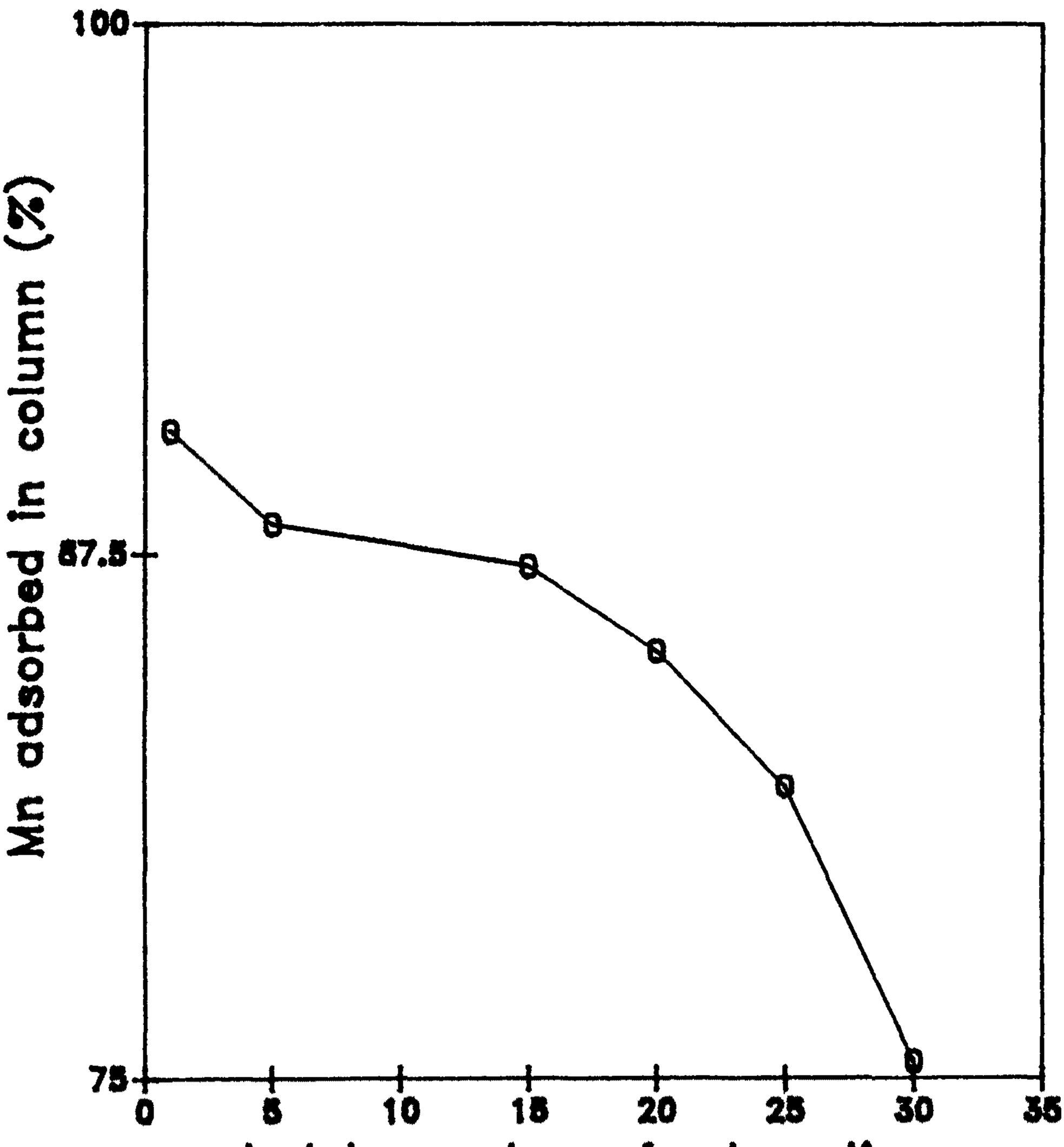


그림6－15. NTA처리후 흡착반응기에서의 Mn흡착량의 변화

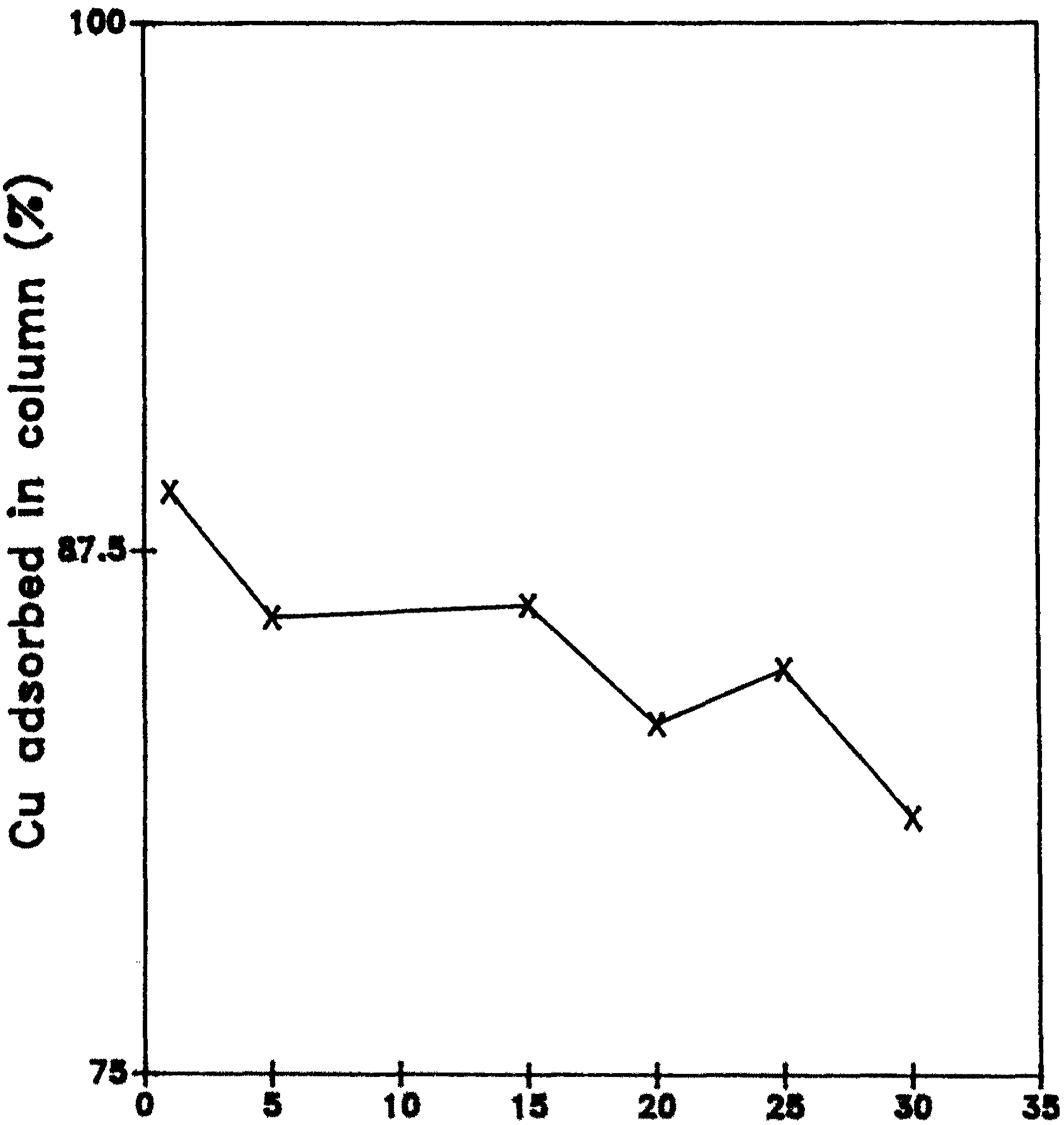


그림6－16　NTA처리후　흡착반응기에서의　Cu흡착량의　변화

와같은 단점은 일정시간 조업을 한 후, 흡착된 중금속을 탈착시킨 후 재사용하는 방법으로, 다단계 packed bed column을 사용하여 흡착, 탈착, 새 흡착제의 공급등의 연속처리 공정의 개발로 해결될 수 있을 것으로 본다.

제3절 요 약

본 실험에서는 Zoogloea ramigera 115에서 추출한 생물고분자의 중금속 흡착특성을 조사하기 위하여, fermentor broth, 건조 세포 및 생물고분자, 생물고분자 각각의 경우의 중금속 흡착실험을 실시하였고, 아울러 중량천 활성슬럿지, 주정폐수, 혐기성 반응기의 입상슬럿지 등 폐바이오매스의 중금속 흡착 특성을 조사하여 정량적으로 비교하였다.

각 흡착제의 흡착평형은 1시간 정도의 짧은 시간에서 이루어지며, 흡착성능은 Z.ramigera를 발효기에서 발효시킨 분리하지 않은 broth, 미생물을 포함한 생물고분자, 추출한 생물고분자, 혐기성 반응기의 입상슬럿지, 주정폐수, 활성 슬럿지 순서대로 나타났다. 생물고분자가 포함된 fermentor broth의 경우 중량천 sludge에 비해 5-6배 정도의 높은 흡착성능을 나타냈다. 또한 broth상태로 투여한 생물고분자가 가장 높은 흡착율을 나타내고 있는데, 생물고분자를 직접 사용함으로써 추출하는데 들어가는 경비를 절감할 수 있는 걸로 기대된다.

유가금속회수를 대상으로 하는 생물흡착 반응기 개발을 위해,

추출한 생물고분자를 calsium alginate에 고정화 시킨후 packed bed column을 이용하여 여러가지 중금속 흡착실험을 수행하였다. Cd, Zn, Mn, Cu의 흡착실험결과 Cd의 경우는 초기 92%의 흡착율에서 30batch 후 82%를 나타냈으며, Zn의 경우는 초기 96%에서 85%, Mn의 경우는 초기 92%에서 78%, Cu의 경우는 초기 94%에서 84%의 흡착율을 나타냈다. 각 금속의 경우 비슷한 흡착율을 나타내고 있는데 Zn의 경우 가장 높은 값을, Mn의 경우 가장 낮은 값을 나타내었다.

각 중금속의 흡착실험이후 0.48%의 NTA를 이용하여 탈착실험을 실시하였는데, Zn, Cu의 경우는 3hr동안 73%, 74%의 탈착율을 나타 냈으며, Cd의 경우는 58%, Mn의 경우는 21%의 낮은 탈착율을 보였다.

탈착된 bead를 재사용하여 packed bed column에서의 흡착성능을 조사하였는데, 탈착 전과 비교해서 Cd의 경우 4%, Zn의 경우 5%, Mn의 경우 2.5%, Cu의 경우 3%정도씩 흡착성능이 떨어지는 것으로 나타났다. 본 실험의 bead자체가 갖는 흡착능이 한정되어 있기 때문에 장기간 안정성을 유지할 수 없는 단점이 있는데, 이는 다단계 packed bed column을 사용하여 흡착, 탈착, 새 흡착제의 공급등의 연속처리 공정의 개발로 해결될 수 있을 것으로 기대된다.

제7장 결론 및 향후계획

본 연구는 미생물에 의한 중금속 제거/회수기술개발의 1차년도 기초연구로서, 문헌에 의한 국내외 중금속처리 현황 및 생물흡착의 이론적 배경을 조사하고, 적합한 응집성 균주를 확보하여 생물고분자 생성실험과 생성된 생물고분자의 중금속 흡착능력을 조사하였다.

선택한 균주는 활성오니에서 floc을 형성하여 유기물질 분해, 중금속 흡착등의 주요기능을 갖는 Zoogloea ramigera 115이며 생물고분자 생산을 위한 최적 배양조건의 확립과 생물고분자의 생산성을 높이기 위하여 회분식 발효, 유가배양식 발효, 2단계 연속 발효를 수행하였다. 탄소원으로는 glucose, lactose, molasses, cheese whey를 사용하여 각 기질에 대하여, 발효방법에 따른 미생물의 생장과 생물고분자 생성특성을 관찰하였다.

추출된 생물고분자는 카드뮴, 아연등이 중금속 흡착실험에서 높은 흡착률을 나타내었고, 특히 발효조 broth자체도 높은 흡착성능을 나타내어 별도의 추출과정이 필요없이 생물고분자가 함유된 broth가 직접 흡착제로 사용될 수 있음을 보여주었다. 유가금속의 회수 목적으로 생물고분자를 고정하시킨 후 packed bed column을 이용하여 중금속 흡착/탈착 실험을 실시하였는데 초기 90%이상의 높은 흡착률과 높은 안정성, 탈착을 통한 회수 및 흡착제의 재사용 가능성을 보여 주었다. 그러나 본 packed bed column의 bead자

체가 갖는 흡착능력이 한정되어 있기 때문에, 향후과제로서 고정화 방법이 개발, 다단계 column을 사용하여 흡착, 탈착, 새흡착제 공급등의 연속공정개발을 위한 연구가 수행되어야 할 것이다.

본 연구결과는 현 시점에서 유가 중금속의 회수, 저농도 중금속 폐수 또는 중금속으로 오염된 지하수 처리, 오염토양 정화등에 활용이 가능할 것으로 기대되며, 제거효율이 높고, 에너지 절약, 처리장의 소형화, 경비 절감등의 특성을 갖는 유사생물학적 처리 공정에 응용이 가능하고생물흡착의 기구규명을 위한 기초연구 자료로 활용이 가능할 것으로 판단된다.

참 고 문 헌

(1) Adamson, A.W. "Physical Chemistry of surfaces." John Wiley and sons, NY, 1(1976).

(2) Aickin, R.M. and A.C.R. Dean.(1979) "Lead Accumulation by *Pseudomonas fluorescens* and by a *Citrobacter sp.*". Microbios Lett. 9,55−66.

(3) Brierley, J.A., C.L. Brierley and G.M. Goyak(1985), "AMT−BIO CLAIM: A New Wastewater Treatment and Metal Recovery Technology", International Symposium on Biohydrometallugy, Aug. 21−24, Vancouver, Canada

(4) Some Heavy Metals=Biotechnological Application". In Biominerallization and Biological Metal Accumulation, P. Westbroek and E.W. dejong(Eds.) D. Riedel Pub. Co. pp. 499−509.

(5) Brown, M.J. and J.N. Lester(1979). "Metal Removal in Activated Sludge. The Role of Bacterial Extracellular Polymer". Water Res. 13,817−837.

(6) Brown, M.J., and Lester, J.N., "Comparison of Bacterial Extracellular Polymer Extraction Methods." Appl. Environ. Microbiol., 40, 179(1980).

(7) Brown, M.J. and J.N. Lester(1982a), "Role of Bacterial Extracellular Polymers in Metal Uptake in Pure Culture and Acti-

vated Sludge", Water Res. 16, 1549－1560.

(8) Brown, M.J. and J.N. Lester(1982b). "Role of Bacterial Extracellular Polymers in Metal Uptake in Pure Bacterial Culture and Activated Sludge. I Effects of Metal Concentration". Water Res. 16, 1539－1548.

(9) Cheng, M.H., J.W. Patterson, and R.A. Minear(1975). "Heavy Metals Uptake by Activated Sludge". J. Water Pollut Control Fed. 47, 362－376.

(10) Chibata, I. and L.B. Lingard Jr.(Ed.), "Immobilized Microbial Cells", Appl. Biochem. Bioeng. Vol. 4 Academy Press, New York, 1983.

(11) Chiu, Y.S. and J.E. Jajic(1976), "Biosorption Isotherm for Uranium Recovery", J. Environ. Eng. Div. ASCE 102, 1109－1111.

(12) Cooper, T.A., et al., "Exopolysaccharide Production from Lactose by Wild－type and Polyhydroxybutyrate minus Strains of Zoogloea Ramigera." Presented as poster paper at ACS 198th National Meeting, Miami, USA, (1989).

(13) Dugan, P.R. and H.M. Pickrum(1972). "Removal of Mineral Ions from water by Microbially Produced Polymers". Proc. 27th Ind. Waste Conf., Purdue Univ. 1019－1038.

(14) Esser, K., and Kues, U., "Flocculation and its Implication for Biotechnology." Process Biochem., 21 (1983).

(15) Friedman, B.A. and P.R. Dugan(1968), "Concentration and Accumulation of Metallic Ions by the Bacterium *Zooglea*", Dev. Ind. Microbiol. 9, 381－388

(16) Friedman, B.A., and Dugan, P.R., "Identification of Zoogloea Species and the Relationship to Zoogloeal Matrix and Floc Formation." J. Bacteriol., 95, 1903(1968).

(17) Gadd, G.M. and S.W. Edwards(1986), "Heavy metal－induced flavin production by Debaromyces hansenii and passible connections with in iron metabolism." Trans. Br. Mycol. Soc., 87, 533.

(18) Gale, N.L. and B.G. Wixson(1979). "removal of Heavy Metals from Industrial Effluents by Algae". Dev. Ind. Microbiol. 20, 259－273.

(19) Galun, M., P. Keller, D. Malki, H. Feldstein, E. Galun, S.M. Siegel and B.Z. Siegel(1983a). "Removal of Uranium(vi) from Solution by Fungal Biomass and Fungal Wall－Related Bipolymer". Science. 219, 285－286.

(20) Galun M., P. Keller, D. Malki, H. Feldstein(1983b). "Using Precultured *Penicillium* Biomass". Water, Air, and Soil Pollut. 20, 221－232.

(21) Horikoshi, T., A. Nakajima and T. Sakaguchi(1977). "Concentration of Copper Ion by *Chlorella* Cells Pretreated with metabolic Inhibitors or Heating". Nippon Nogeikagaku Kaishi 51, 583

−623.

(22) Horikoshi, T., A. Nasajima and T. Sakaguchi.(1979) "Uptake or Uranium by *Chlorella regularis*". Agric. Biol. Chem., 42−617−623.

(23) Horikoshi, T.A. Nakajima, and T. Sakaguchi(1981). "Accumulation of Uranium by Chlorella Cells Grown under Autotrophic, Heterotrophic and Mixotrophic Culture Conditions". Agric. Biol. Chem., 45, 781−783.

(24) Horitsu, H., H. Kato and K Tomoyeda(1979). "Uptake of Cadmium by a Cadmium Chloride−tolerant Bacterium, *Pseudomonas aeruginosa*". J. Ferment. Technol. 57, 273−279.

(25) Ikeda, F., et al., An Extracellular Polysaccharide Produced by Zoogloea Ramigera 115". Eur. J. Biochem., 123, 437(1982).

(26) Jellinek, H.H.G. and S.P. Sanga(1972). "Complxation of Metal Ion with Natural Polyelectrolytes(Removal and Recovery of Metal Ions from Polluted Waters)" Water Res. 6, 305−314.

(27) Khummonqkol, D., G.S. Canterford and C. Fryer(1982). "Accumulation of Heavy Metals In Unicellular Algae". Biotech. Bioeng. X X i V, 2643−2660.

(28) Kuyucak, N. and B. Volesky(1987)," The nature of gold binding on a new biosorbent," in Precious Metals 1987, IPMI, Allentown, PA, P. 571.

(29) Kuyucak, N. and B. Volesky(1988)," The mechanism of cobalt

biosortion", Biotech. Bioeng., 33(7), 823.

(30) Kuyucak, N. and B. Volesky(1989), "The elution of gold sequested on a natural biosorbents", Biorecovery, I, 155.

(31) Lester, J.N., Sterritt, R.M., et al., "Microbiological Methods for Environmental Biotechnolog Assessment of the Role of Bacterial Extracellular Polymers in Controlling Metal Removal in Biological Waste Water Treatment." 197 (1984).

(32) Magaritis, A., and Pace, G.W., "Microbial Polysaccharide." Comprehensive Biotechnology(Edited by M. Moo-Young), Pergamon Press, New York, 3, 1005(1985).

(33) Mannahan S.E., "Environmental Chemistry." Willard Grant Press, Boston (1979).

(34) Masri, M.S., F.W. Reuter and M. Friedman(1974). "Binding of Metal Cations by Natural Substances". J. App 1. polymer. Sci., 18, 675-681.

(35) Nakajima, A., T. Horikoshi, and T. Sakaguchi(1982). "Recovery of Uransium by Immobilized Micro-organisms". Eur. J. App 1. Microbiol. Biotechnol. 16,88-91.

(36) Nakajima, A., T. Horikoshi, and T. Sakaguchi(1979). "Ion Effects on The Uptake of Uranium by *Chlorella regularis*". Agric. Biol. Chem. 43, 625-629.

(37) Nakajima, A., T. Horikoshi, T. Sakaguchi(1977). "Chemical State of Copper Accumulated In *Chlorella Regularis*". Nippon No-

geikagaku Kaishi, 51, 507−511.

(38) Nakamura, T., Koo, S.J., Pradipasena, P., Rha, C, and Sinskey, A., Solution Properities of Polysaccharide Flocculant Produced by Zoogloea ramigera 115. "Elsevier Science Publ., Amsterdam, 399 (1987).

(39) Neufield, R.D. and E.R. Hermann(1975). "Heavy Metal Removal by Acclimated Activated Sludge". J. Water Poll. Control. Fed. 47, 310−329.

(40) Noh, S.H.(1987), "Separation of Uranium by Immobilized Inactive Microbial Biomass", Ph. D. Thesis, McMaster Univ. Ont. Canada

(41) Noh S.H., M. Tsezos, and M.H.I. Baird(1987), "Development of a Noble Biomass Immobilization Technique for Separation of Uranium", Proc. The 10th Korea Symposium on Science and Technology, Vol 3, 1987

(42) Noh, S.H., M. Tsezos and M.H.I. Baird(1990), "Membrane Encapsulation of Microorganisms for Uranium Biosorption", Proc. APBioChEC '90 pp568−572, April 1990, Kyungju, Korea

(43) Noh, S.H.(1989), "Biosorption of Heavy Metals: Mechanism and Application", 제5회 생물화공 심포지움, 한국화학공학회 1989년 4월 20일, pp45−50.

(44) Norberg, A.B., and Enfors, S., "Production of Extracellular Polysaccharide by Zoogloea Ramigera." Appl. Environ. Microbiol., 44, 1231 (1982).

(45) Norberg, A., and Rydin, S., "Development of a Continuous Process for Metal Accumulation by Zoogloea Ramigera." Biotechnol. Bioeng., 26, 265(1984).

(46) Parsons, A.B., and Dugan, P.R., "Production of Extracellular Polysaccharide Matrix by Zoogloea Ramigera." Appl. Microbiol., 21, 657(1971).

(47) Pavoni, J.L., et al., "Bacterial Exocellular Polymers and Biological Flocculation." J. Water Pollut Control Fed., 44, 414(1972).

(48) Ruchloft, C.C., "The Possibilities of Disposal of Radioactive Wastes by Biological Treatments Methods." Sewage Works J., 21, 877 (1949).

(49) Sabine P. Kuhn, Robert M. Pfister.," Adsorption of mixed metals and cadmium by calcium－alginate immobilized Zoogloea ramigera. " Appl., Microbiol., Biotech., 31:613－618(1989).

(50) Sakaguchi T. and A. Nakajima(1989), "Recovery of Uranium by Biological Sub－stances", Proceedings of 2nd Inter－natinal Conf. on Separation Sci & Tech.

(51) Shumate, S.E., et al., "Separation of Heavy Metals from Aqueous Solution Using Biosorbents－Development of Contacting Devices for Uranium Removal. "Biotechnol. Bioeng. Symp., 10, 27 (1980).

(52) Sinskey, A., Jamas, S., Easson Jr., D., and Rha, D., "Biopolymers and Modified Polysaccharides". Biotechnology in Food

Processing(3ed. Harlander S.K., and Labuza, T.P.) Noyes Publ., New Jersey, Ch. 6 (1986).

(53) Spisak, J.F., "Metallurgical Effluents—Growing Challenges for Second Generation Treatment." Dev. Ind. Microbiok., 20, 249 (1979).

(54) Sterritt, R.M. and J.N. Lester(1980). "Metal Removal by Adsorption and Precipition in the Activated Sludge Process". Environ. Pollut. (A) 24, 313—323.

(56) Strandberg, G.W., S.E. Shumate, Ⅱ and J.R. Parrott Jr(1981). " Microbial Cells as Biosorbents for Heavy Metals: Accumulation of Uranium by *S. cerevisiae.* and *P. Aeruginosa*". App 1. Environ. Microbiol. 41, 237—245.

(57) Strandberg, G.W., S.E. Shumate Ⅱ, J.R. Parrott Jr., and D.A. McWhirter(1980). "Microbial Uptake of Uranium, Cesium and Radium". symp. on Microbial Process for Metals Accumulation and S/N Removal from Fuels. ACS Meeting, SanFrancisco, California, August 24—29.

(58) Tezuka, Y(1969), "Cation Dependent Flocculation in a Flavobacterium Species Predominent in Activated Sludge", Appl. Microbiol. Feb. 222—226

(59) Tsezos M. and S.H. Noh(1984), "Extraction of Uranium from Sea Water Using Biological Origin Adsorbents", Canadian J. Chem. Eng. 62 p559

(60) Tsezos M. and S.H. Noh(1988a), "A New Immobilized Biomass Technical Adsorbents for Uranium Recovery from Bioleach Solutions in the Mine", IEX−88 International Conference on the Development of Use of Ion Exchange fr Industry, Cambridge U. K. July 1988

(61) Tsezos M., S.H. Noh, and M.H.I. Baird(1988b), "A Batch Reactor Mass Transfer Kinetic Model for Immobilized Biomass Biosorption", Biotech. Bioeng. 32, p545.

(62) Tsezos, M. and S.H. Noh(1989), "Particle Encapsulation Technique", U.S. Patent 4, 828, 882

(63) Tsezos, M. (1983), "The Role of Chitin in Uranium Adsorption by R. arrhizus", Biotech. Bioeng. XXVI, 1323−1329.

(64) Tsezos, M. and B. Volesky(1982), The Mechanism of Uranium Biosorption by *R arrhizus*", Biotech. Bioeng. XXIV, 385−401.

(65) Tsezos, M. and B. Volesky(1982a). "The Mechanism of Uranium Biosorption by *Rhizopus Arrhizus*". Biotechnol. Bioeng. XXIV, 385−401.

(66) Tsezos, M. and B. Volesky(1981). "Biosorption of Uranium and Thorium". Biotechnol. Bioeng. XXIII

(67) Tsezos, M. and B. Volesky(1982b). "The Mechanism of Thorium Bioadsorption by *Rhizopus Arrihizus*". Biotechnol. Bioeng. XXIV, 955−969.

(68) Tsezos, M. and D.M. Keller(1983a). "Adsorption of Radium −

226 by Biological Origin Absorbents". Biotechnol. Bioeng. XXV, 201−215

(69) Tsezos, M(1983b). "The Role of Chitin in Uranium Adsorption by *R. arrihizus*". Biotechnol. Bioeng. XXV, 2025−2040.

(70) "Use of Membrane−Coated Sorbents and Resins in Gold Processing", submitted to American Cyanamid Company, Stamford, CT by Zenon Environmental Inc. May 1987

(71) Volesky, B. and M. Tsezos(1982). "Separation of Uranium by Biosorption". U.S. Patent. 4, 320, 093.

(72) Waterborg, J.H., Matthew, H.R., "The Lowry Method for the Protein Quantitation", Ch. 1 of methods in Molecular Biology, Hamana, Clifton 4 NJ(1984).

(73) Weber, W.J., "Physiochemical Processes for Water Quality Control.", John Wiley and Sons, New York, 200, 1972.

(74) 이상은 외, 폐수처리시스템 개발현황조사연구, 한국건설기술연구원, 1985. 12.

(75) 유재근 외, 폐수배출시설 표준원단위조사연구(Ⅰ), 국립환경연구원, 1987. 12.

(76) 유재근 외, 폐수배출시설 표준원단위조사연구(Ⅱ), 국립환경연구원, 1988.

(77) 정윤철 외, "응집제 생산을 위한 생물공정기술 개발(Ⅰ)." 과기처 보고서, 1989.

(78) 조순행, "물리화학적 처리", 유해폐기물 관리기술 심포지움, 한

국과학기술원, 1988. 11.

(79) 최의소, 폐기물처리와 자원화, 청문각, 1985

(80) 환경처, '89폐수배출시설조사결과보고서, 1990

(81) 환경처, 한국환경연감, 제2호, 1989.

부록 : 위탁연구과제

연구과제명 : 유전공학을 이용한 중금속폐수의 생물학적 처리기술 개발 및 응용
(Process Development for Biological Treatment of Heavy Metal containing Wastes Using Recombinant DNA Technology)

연 구 책 임 자 : 서 진 호
서울대학교 식품공학과

연구개발기간 : 1990년 9월 1일－1991년 6월 30일(10개월)

여백

Ⅰ. 요 약

본 연구의 목적은 효모에서 발견된 금속결합단백질인 Metallothionein(MT)을 유전 공학적으로 처리하여 효모의 중금속에 대한 내성을 향상시키는 것이다. Baker's yeast로 알려진 효모(*s. cerevisiae*)에서 분리한 Metallothione(MT)의 유전자를 plasmid pJW9을 사용하여 효모에 재투입하였다. 샐로이 형질전환된 효모의 구리 내성과 생육특성을 재조합이전의 숙주세포와 비교하였다. 구리의 내성은 3mM에서 10mM이상으로 3배이상 향상되었으며, 배지중 구리 농도 2mM에서의 비성장속도도 0.054hr^{-1}에서 0.34hr^{-1}로 증가하였다. 5mM구리농도에서 배양한 재조합효모의 구리제거율은 24.1mg Cu/g dry cell로 고무적인 결과를 나타내었다. 1차년도의 결과를 토대로 하여 구리의 내성이 강화된 superbug를 이용한 중금속처리기술을 개발할 계획이다.

Ⅱ. 연구배경

중금속 오염문제는 날로 심각해져서 식수뿐만 아니라 공업용수, 농업용수까지 그 피해가 확대되고 있다. 공단주변의 하천이 납, 카드늄, 구리 등의 중금속으로 오염된 것으로 나타나 어패류 물론 생태계의 먹이사슬을 통한 인체피해마저 우려되고 있다. '생태계의 어머니'인 토양의 중금속에 의한 오염이 해를 거듭할수록 심해지고 있어 죽어가는 국토에 대한 경각심을 불러일으키고 있다.

폐수에 함유된 중금속을 제거하기 위하여 화학침전, 이온교환, 용매추출, 전기화학적 방법 등의 기술이 사용되고 있다[1]. 이러한

방법들은 처리비용이 비쌀 뿐 아니라, 오염 물질제거를 위하여 다른 오염물질을 배출하여 효율적인 처리방법이 되지 못한다. 특히 중금속 농도가 낮거나, 방사성 금속을 처리해야 할 경우 제거효율이 높고 보다 경제적인 기술이 개발되어야 한다. 이러한 방법으로 미생물에 의한 중금속 제거기술이 제안되었다. 미생물에 의하여 중금속이 제거(또는 농축)되는 원리는 다음 3가지로 요약될 수 있다[2-4]. (1) 미생물 세포내로의 흡수(uptake), (2) 미생물 세포표면 흡착(adsorption), (3) 미생물이 분비한 다당류 물질로의 포착(sequestration)등이다. 이러한 기술을 개발하기 위하여는 높은 중금속 농도에서 생존할 수 있도록 미생물의 중금속 내성을 증진시키는 것이 무엇보다도 중요하다.

최근 환경미생물에 대한 연구가 활발이 진행되어 왔다. 미생물이 중금속에 대한 내성을 갖는 기작(mechanism)과 중금속 흡착제로서의 사용가능성, 그리고 제거기술개발에 대한 연구가 수행되었다[5, 6]. 중금속과 특이한 (specific) 결합을 하는 단백질인 metallothionein(MT)이 중금속 해독에 관여하고 있음이 최근 밝혀졌다[7]. 이 단백질은 주로 고등생물에 존재하여, 구리, cadmium의 해독작용에 관여한다. 효모(*s. cerevisiae*)에서도 이와 비슷한 성질을 갖는 단백질이 발견되었다[8]. 효모의 *CUPI* 유전자에서 생성되며 53개의 아미노산으로 구성된 분자량이 5655이다. 구리이온과 결합할 뿐 아니라 은(Ag), Zn, Cd 이온과도 결합한다. 미생물의 중금속에 대한 내성은 MT 단백질의 양에 비례하므로 MT 유전자를 유전공학적 방법으로 처리하여 중금속 내성이 향상된 superbug yeast를

개발하는 것이 본 연구의 목표이다.

3. 배지 조성

YEPD혼합배지

Yeast Extract 1%, Bacto Peptone 2%, Dextrose 2%,포함하는 배지로서 효모의 생육이 가장 빠르다.

선별배지

형질전환된 균체를 숙주세포와 구분 선별하기위한 배지로서 trpmedia와 5mM $CuSO_4$ media를 함께 사용하였다.

4. DNA Transformation

LiAc를 이용한 transformation방법으로 효모를 형질전환시켰다.

5. 효모 배양조건

구리배지중에서 효모가 자라는 특성은 온도 30℃, 초기 pH5.2배지는 YEPD혼합배지, 배양기는 shaking incubator에서 150rpm, 500ml삼각 flask를 사용하였고, 구리농도는 2mM고 5mM에서 각각 배양하였다.

6. 배지중 구리농도 측정

Colorimetric method를 사용하였는데, Sodium diethyldithiocarbamate(DDTC)가 구리와 황금색의 착화합물을 만드는

성질을 이용하는 것이다. 배양액을 8000rpm으로 3분간 원심분리한 후 상등액을 취하여 HNO_3(1+1)로 배지중 유기물을 분해하고, 98℃ oven에서 질산을 날려버리고, 동일한 과정을 한번 더 수행하였다. 남은 잔류물을 HCl(1+1)로 녹이고, NH_4OH로 pH를 9.0으로 조정한 후, DDTC를 첨가하여 나타내는 색을 440nm에서 흡광도를 측정하였다.

Ⅲ. 실 험 방 법

1. plasmid DNA

유전자 재조합에 사용한 plasmid pjw9은 yeast-E shuttle vector로 흔히 사용하는 plasmid YRP17을 모체로 하여 MT유전자인 CUPI gene이 cloning되어 있고, selection marker로서 Tryptophan과 Uracil의 생합성과 관련된 효소의 유전자(TRPI과 URA3)를 포함한다[8].(그림1)

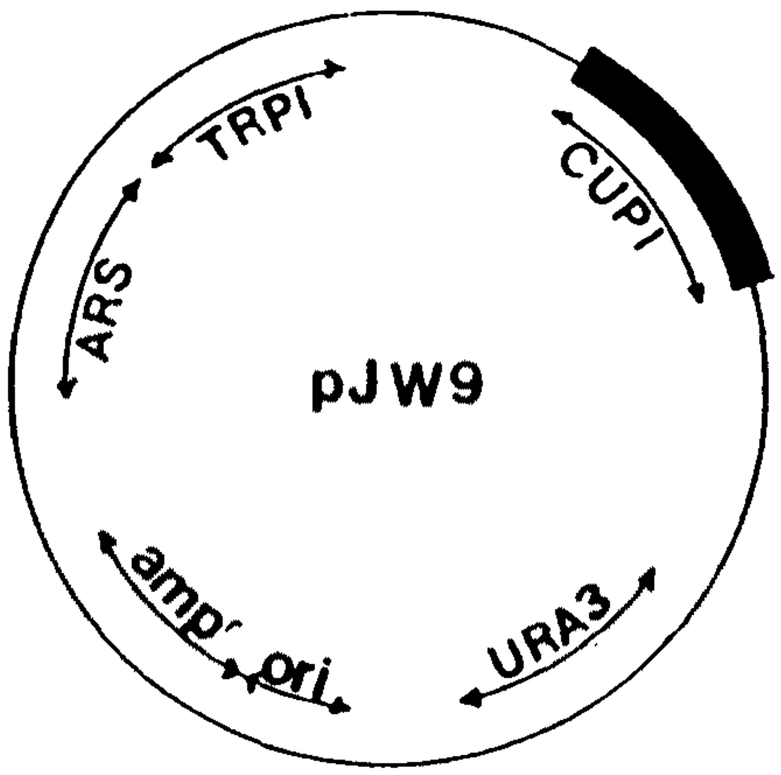


그림 1 Plasmid DNA (pJW9)

2. 사용한 효모균주

형질전환에 사용한 숙주세포는 s.cerevisiae BZ31-1-7Ba로서 표현형은 구리에 저항성이 없으며(합성배지에서 0.3mM $CuSO_4$배지에서 생육이 저해), Tryptophan, Adenine Arginine, Uracil의 영양원을 생합성할 수 없는 영양요구성 균주이다. 숙주세포의 염색체에 plasmid pJW9가 삽입된 균주를 YJW9이라 명하고 표현형으로는 구리에 내성을 갖으며 Adenine, Arginine요구성이다. 숙주세포에 plasmid pJW9으로 형질전환시킨 재조합 효모는 BZ-pJ라 명하고 표현형은 YJW9과 동일하다.

Ⅳ. 결과 및 고찰

1. 재조합효모(BZ-pJ)의 개발

intact host cell에 LiAc를 처리하여 competent cell을 만든 후 plasmid pJW9와 혼합하여 plasmid DNA를 주입하였다. Plasmid pJW9을 함유하는 transformant는 구리에 내성을 가지며 tryptophan이 없는 배지에서 생육이 가능하다. 따라서 trp배지에서 자라는 colony를 선별한후 5.0mM $CuSO_4$함유 배지에서도 자라는 재조합효모를 구분 선별하였다.

2. 최대 생육기능 구리농도 결정

구리에 대한 내성을 결정하기 위하여 구리농도를 달리하는 plate에서 여러 균주의 생육여부를 조사하였다.

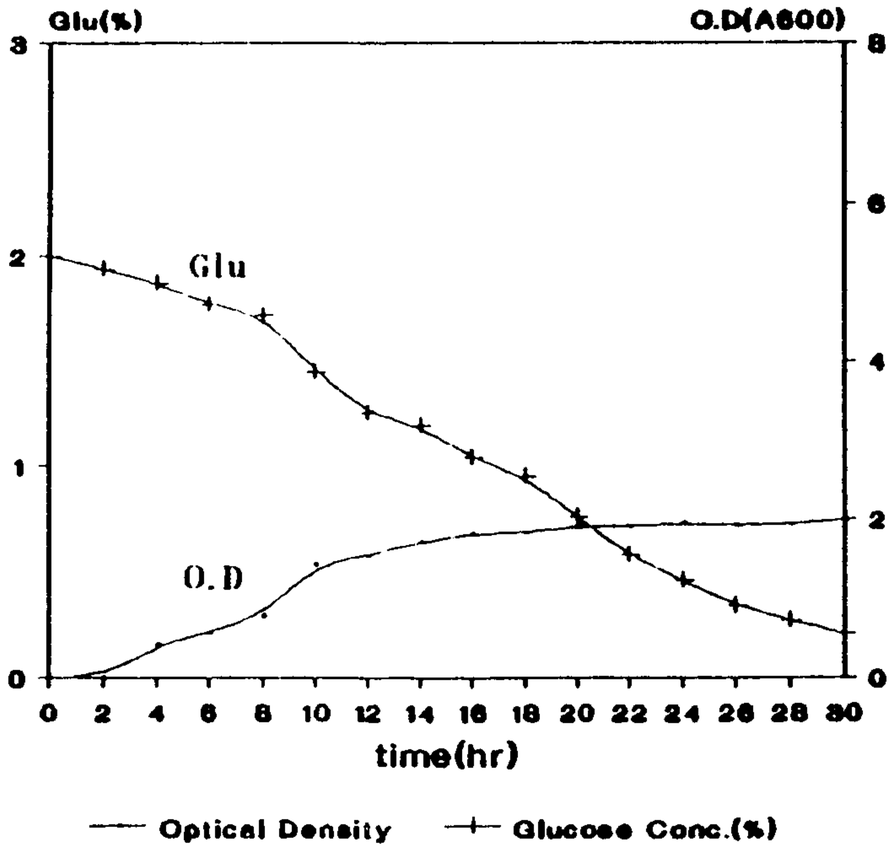
구리에 민감한 숙주세포(BZ31－1－7Ba)는 3.0mM $CuSO_4$를 포함하는 배지에서 생육이 완전히 저해된 반면, MT유전자(CUPI)가 염색체에 삽입된 균주(YJW9)는 9mM, MT유전자를 plasmid에 함유하는 재조합효모(BZ－pJ)는 10mM $CuSO_4$배지까지 생육하였다. 즉, 구리의 내성이 MT유전자를 도입함으로써 3배 이상 증가되었다. 이는 세포내에서 MT단백질이 많이 생산되는 세포내로 유입된 구리와의 결합능력이 향상되었기 때문이다.

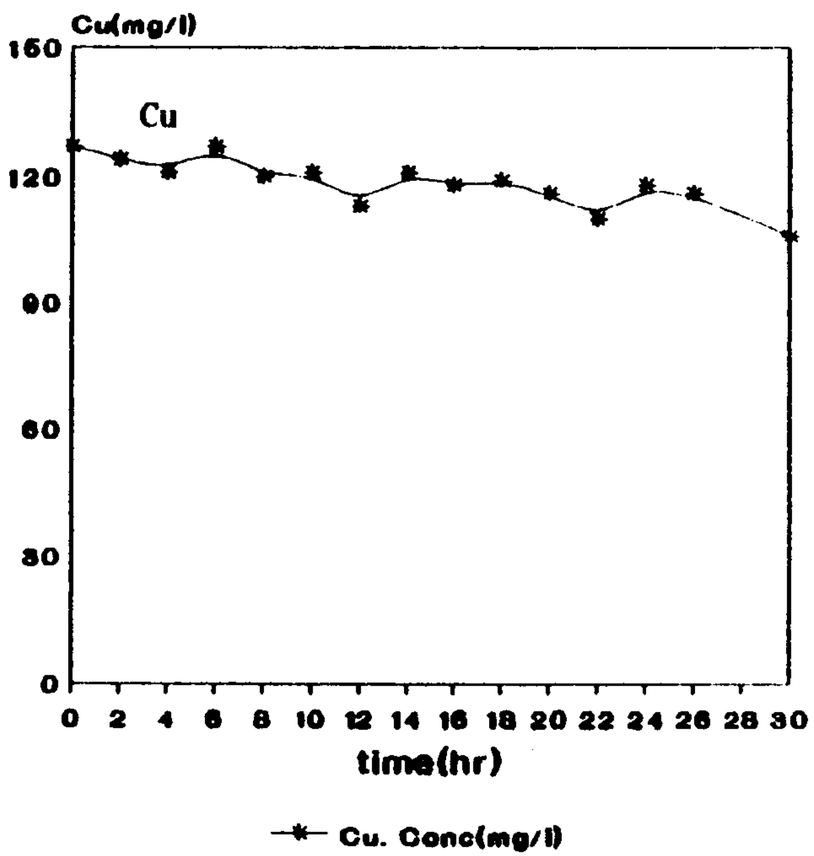
3. 2.0mM $CuSO_4$에서의 최대비성장속도(μmax)

세가지의 효모균주가 공통으로 성장할 수 있는 구리농도인 2.0mM $CuSO_4$배지에서 배양하여 대수증식기에서 비성장속도를 측정하였다. 구리에 대한 저항능력이 없는 숙주세포는 느리게 성장하여 0.04hr^{-1}의 속도를 보인 반면 형질전환된 나머지 두균주는 모두 0.34hr^{-1}의 빠른 속도로 성장하였다.(그림2, 3, 4) 포도당 감소속도는 비성장속도와 비례함을 알 수 있었다. 최종세포농도는 재조합효모인 BZ－pJ균주가 0.D30으로 숙주세포보다 15배 이상 증가하였다. MT유전자의 도입은 구리의 내성을 향상시킬 뿐 아니라 비성장속도도 현저하게 증가시켰다.

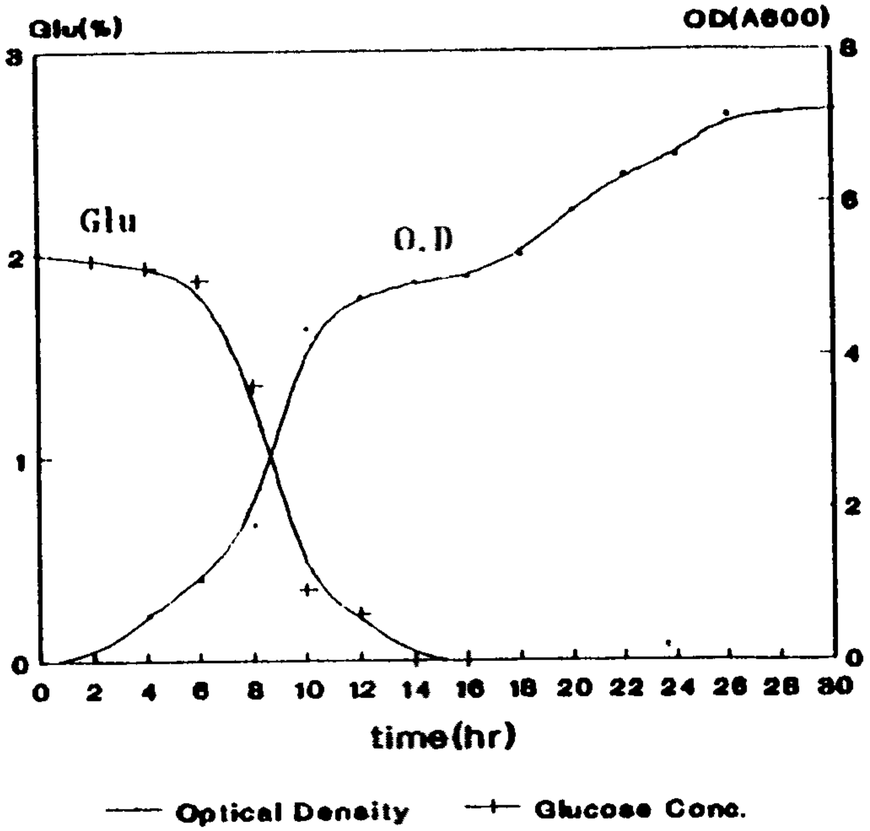
4. 재조합 효모의 구리제거 능력

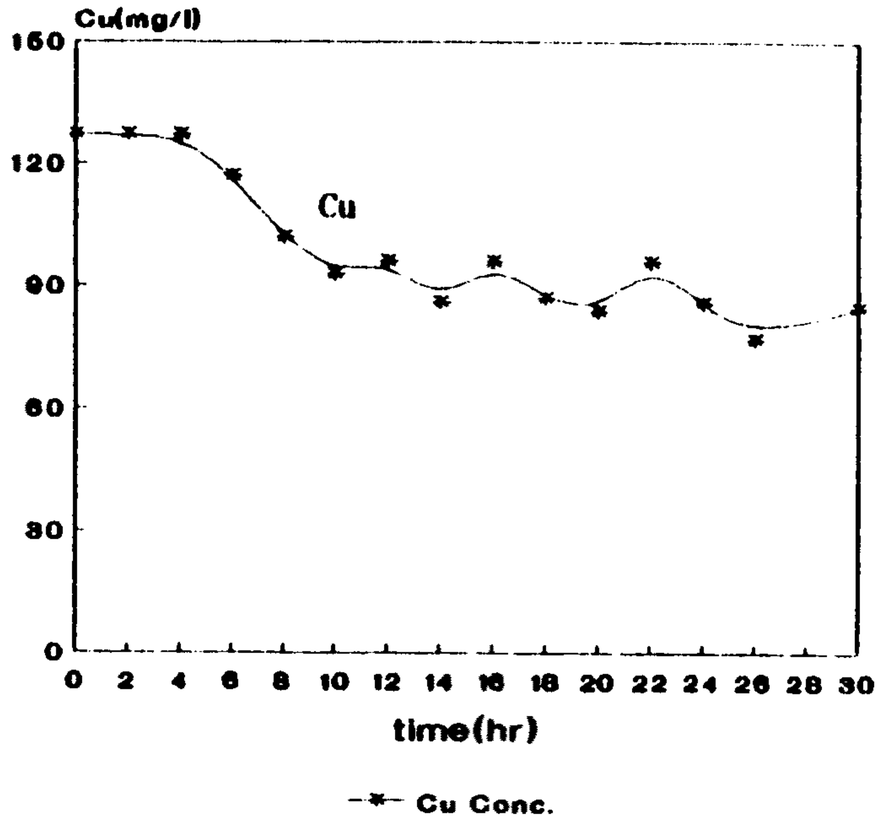
MT유전자를 multicopy로 함유하고 있는 재조합효모의 구리제거 능력을 측정하기 위하여 2mM, 5mM $CuSO_4$용액에서 배양하였다. 2mM구리용액에서는 최대균체량이 9.4g dry cell/1로 생성되면서 배지





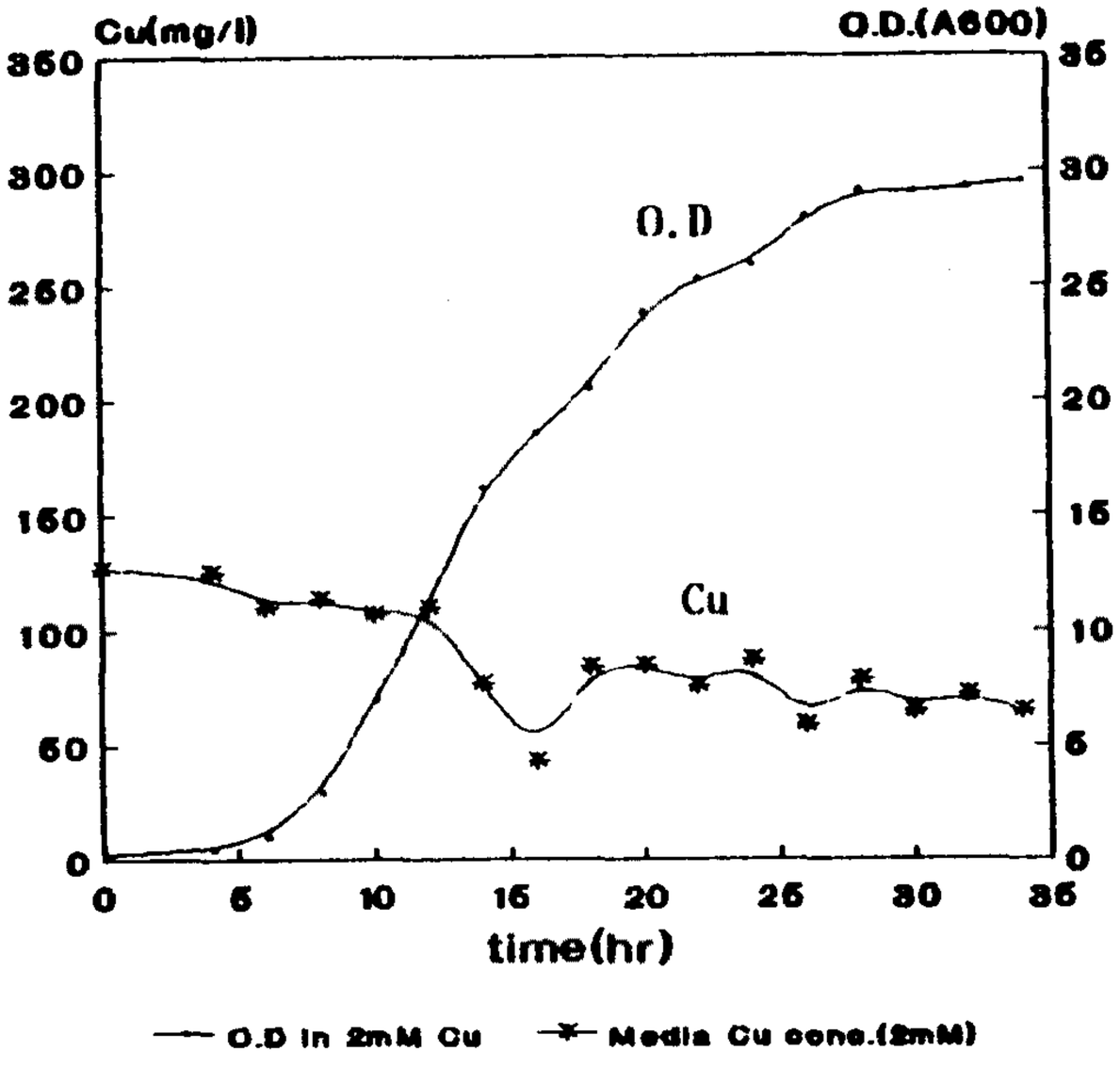
(그림 2) 숙주효모 (BZ31-1-7Ba)의 생육곡선



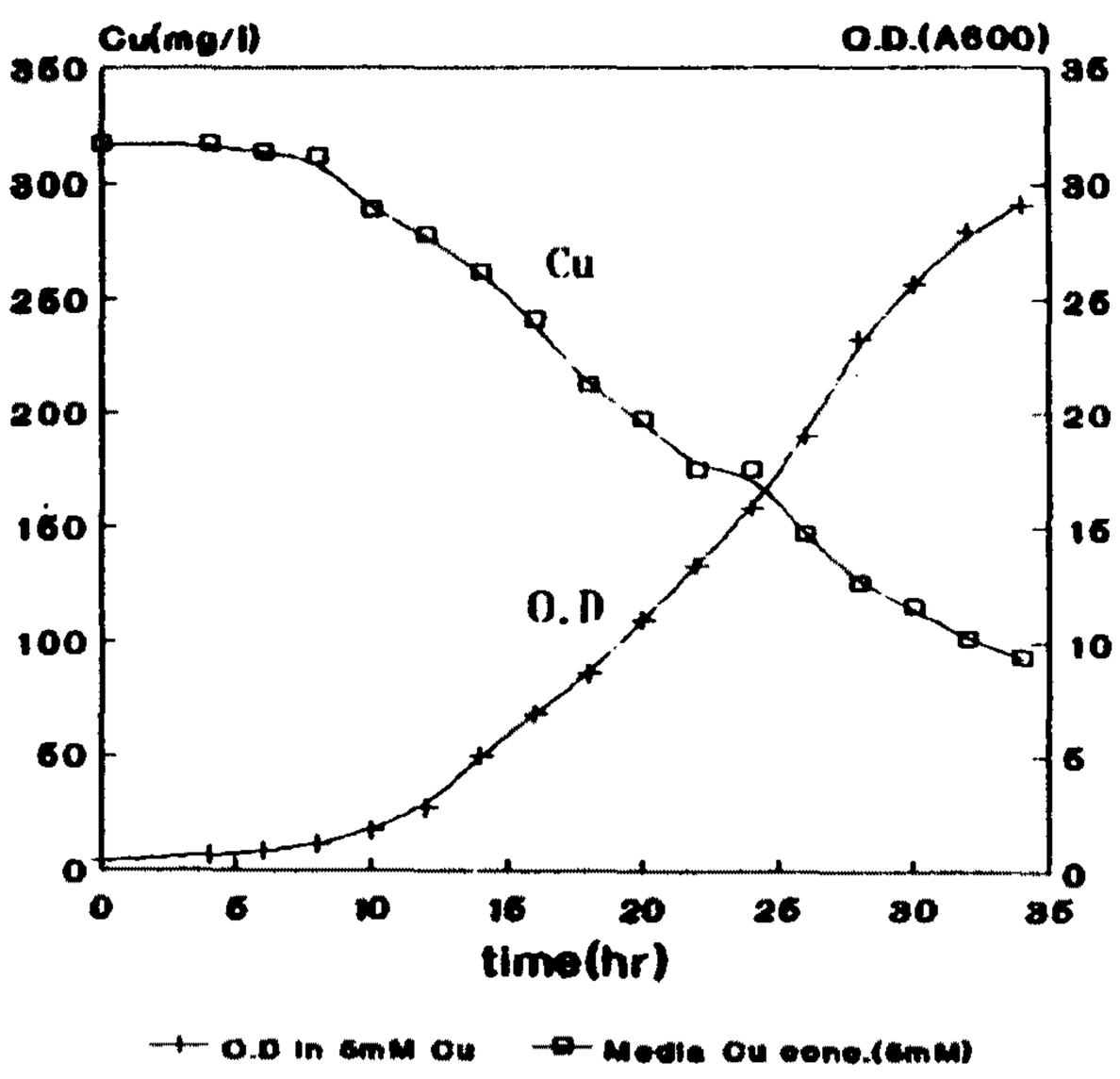


(그림 3) Chromosome에 형질도입된 효모(YJW9)의 생육곡선

(in 2. 0mM $CuSO_4$)



(그림 4) Plasmid함유 재조합효모(BZ-pJ)의 생육곡선
(in 2.0 mM $CuSO_4$)



(그림 5) Plasmid함유 재조합효모(BZ-pJ)의 생육곡선
(in 5.0 mM $CuSO_4$)

중 제거된 구리량은 62mg/1이므로 건조균체 1g당 6.6mg의 구리가 제거되었다. 그러나 5mM구리배지에서는 증식된 균체량은 별 변화가 없었으나(그림). 배지중 구리농도는 317mg/1에서 93mg/1로 224mg/1감소하였다. 즉 건조균체 1g당 24.1mg의 구리가 제거되어 2mM용액보다 4배이상 증가하였다(표1참조). 특기할 사항은 배지중 구리농도가 2mM에서 5mM로 증가하였을때 비성장속도는 $0.34hr^{-1}$에서 $0.23hr^{-1}$로 감소한것이다. 즉 높은 구리농도는 세포의 성장속도를 감소시키면서 세포내의 MT단백질의 발현을 유도하고 있음을 간접적으로 알 수 있다. 이렇듯이 세포의 성장속도와 제품단백질(본 연구의 경우 MT)의 생장속도와의 반비례 관계는 다른 재조합세포에서도 흔히 발견되었다[9].

(표 1) Recombinant yeast의 구리제거 능력

구분 / 구리 농도	Max ⊿Cu (mg/1)	Max ⊿biomass (g.d.c/1)	mg Cu / g dry cell
2mM Cu	62	9.4	6.6
5mM Cu	224	9.3	24.1

V. 문 헌

1. 노수홍, 제5회 생물화공심포지움, (환경생물공학기술). p45 (1989)
2. Mullen, M.D.D.C.Wolf, F.G.Ferris, T.J.Beveridge, C.A.Fleming and G.W. Bailey, Appl. Environ. Microbiol., 55, 3143(1989)
3. Volesky, B., Biotech, Bioeng, Symp., 16, 121(1986)
4. Kelly, D.P., P.R.Norris, and C.L.Brierley, "Microbial Technology: Currenr Sate, Future Prospects", Ed. A.T.Bell, D.C.Ellwood, and C.Ratlege, Cambridge Univ. Press. Cambridge(1979)
5. Silver, S.and T.K. Misra, Ann. Rev. Microbiol., 42, 717(1988)
6. Kojima, Y. and J.M. Kagi, Trends. Biol. Sci., 3. 90(1978)
7. Hamer, W.H., Ann. Rev. Biochem., 55,913(1986)
8. Karin, M., R.Najarian, A.Hasilinger, P.Valenzuela, J.Welch and S. Fogel, PNAS, 81 337,(1984)
9. Seo, J.H. and J.E.Bailey, Biotech. Bioeng., 27, 1668－1674(1985)