

## Ca-Alginate Gel Bead에 고정된 *Pseudomonas aeruginosa*에 의한 카드뮴이온( $Cd^{2+}$ )의 제거

### Removal of Cadmium ion( $Cd^{2+}$ ) by *Pseudomonas aeruginosa* Immobilized in Ca-Alginate Gel Beads

최 광 수\* · 김 경 태 · 양 승 남 · 김 진 옥 · 고 창 응\*\* · 김 남 기  
(주)SKC\*, 삼척산업대학교 화학공학과\*\*, 성균관대학교 화학공학과

#### 1. 서론

산업발달과 더불어 우리의 일상 생활과 밀접한 관계를 갖게된 각종 중금속은 직접적으로는 직업병을 유발함을 물론 간접적으로는 식품류, 수질, 대기 및 토양 등을 오염시켜 만성적 혹은 급성적으로 인체에 피해를 가져온다. 이와 관련해서 특히 문제시되는 중금속류로는 납, 카드뮴, 수은, 니켈, 크롬, 비소 등이 있다. 이 중에서도 카드뮴에 의한 중독은 대표적인 예의 하나이다. 동물생체에 대한 카드뮴의 주요 유해작용으로는 신장, 간장 및 폐의 기능장애, 골연화증, 빈혈등이 있으며, 인체내에 흡수되면 세뇨관에 축적되어 장애를 일으키는 "itai itai"병의 원인이 되기도 한다. 중금속 폐수를 처리하는 가장 보편적인 방법은 화학적 침전법이나 독성 폐 슬러지(sludge)가 생성과 같은 환경보전상의 문제가 발생하게 된다. 폐수의 생물학적 처리에 있어서 균주의 형태는 유리균체(free cell)가 주종을 이루고 있었으나 최근에는 고정화균체(immobilized cell)를 사용하고 있다.<sup>(1)(2)</sup> 고정화균체의 장점으로서는 생산량이 증가하고, 저해요소(inhibitory compounds)와 영양분 고갈(nutrient depletion)에 의한 영향을 줄일 수 있다.<sup>(3)(4)</sup> 균체의 고정화 방법으로는 gel matrix에 포획시키는 방법<sup>(2)(5)(6)</sup>으로 alginate gel에 균체를 고정시키는 방법을 선택하였다.<sup>(7)</sup> 본 실험에서 사용한 균주는 현재 생물학적 폐수처리의 연구에서 많이 사용되고 있는 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 사용하였다. 또한 본 실험은 수직 원통형 충전층반응기 (packed bed reactor)에서 연속적으로 실시되며, 카드뮴이온( $Cd^{2+}$ )농도의 변화(20, 100, 200ppm)와 유속변화(30, 45, 60ml)에 따른 카드뮴이온( $Cd^{2+}$ )의 제거율 및 제거량을 측정하여 최적처리조건에 관한 자료를 얻음으로써 카드뮴이온( $Cd^{2+}$ )을 함유한 폐수처리 및 다른 중금속이 함유된 폐수처리 연구의 기초자료가 되는 것을 목적으로 한다.

## 2. 이론

많은 생물체는 중금속이온에 대하여 다음과 같은 적응(adaptation)이나 해독(detoxification) 기작을 지니고 있다.

1. 중금속 결합 단백질인 metallothionein 또는 CdS복합체와 같은 중금속 이온과 결합하여 침전시킬 수 있는 대사산물의 생성.
2. 휘발성 화합물로 전환시키거나 원자가를 변형시키는 작용과 같은 중금속 이온의 내부 변형에 의한 방법.
3. 세포막의 불 투과성을 증가시키므로써 중금속의 세포내 도입을 감소시키는 방법.

카드뮴이온( $Cd^{2+}$ )의 적응 또는 해독 mechanism에 대한 연구중에서 *Escherichia coli*의 경우 카드뮴이온( $Cd^{2+}$ ) 첨가 배양시 중금속에 대한 내성을 지닐수 있다는 가능성이 Mitra와 Gray<sup>(8)</sup>에 의해 보고 되었으며, *Klebsiella aerogenes*의 경우 adaptation되어진 후 Cd와 inorganic sulfide가 동일한 mole비로 축적되어짐을 알고 세포내에 불용성 CdS복합체의 생성이 Cd에 대한 1차 해독작용이라고 추정한 보고서가 있었으며<sup>(9)</sup>, sulfate 제한조건하에서 Cd에 대한 adaptation 여부에 가리는 연구에서는 Cd기작 이외에 무기인산중합체(inorganic polyphosphate)의 기작이 제2의 Cd detoxification이라고 추정한 보고서가 발표되었다.<sup>(10)</sup> 일반적으로 척추동물<sup>(11)</sup>, 무척추동물과 진핵미생물<sup>(12)</sup>, 조류<sup>(13)</sup>에서는 Hg, Cd과 같은 중금속에 대한 해독작용 방법은 주로 금속결합 단백질에 의하여 수행된다고 알려져 있다. Metallothionein으로 알려진 Cd-binding protein은 저분자량이며, cystein 함량이 높고 방향족 아미노산이 거의 없다. 근래에는 blue-green algae(*Synechococcus sp.*)와 같은 원핵생물에서도 metallothionein의 존재가 보고 되었으며, 최근에는 *Escherichia coli*를 재료로 metallothionein과는 다른 성질의 Cd-binding protein의 존재를 확인하였지만<sup>(14)</sup>, 세균류에서는 *klebsiella aerogenes*의 경우처럼 CdS복합체의 형성이나 무기인산중합체의 축적에 의한 중금속의 해독 작용도 중요하게 생각되어 많은 연구가 되어지고 있다. 수질계의 중금속 오염을 미생물을 이용하여 처리하는 방법으로는 첫 번째 이론이 가장 널리 알려져 있다.

## 3. 실험방법

### 1. 균주와 배양조건

본 실험에서 사용한 미생물(microorganism)은 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853이다. 이균의 특성은 cell diameter가  $0.5\sim 3.0\mu m$  이고, cell length는  $1.5\sim 3.0\mu m$ 이다. 형태학적으로 발견되는 특징은 직선 막대형이고, 하나 또는 여러개의 극성 편모를 가지고 있다. 이균주는 Agar slant에서 scratch하여  $4^{\circ}C$ 에 보관하였

다. Agar slant는 Autoclave에서  $1\text{Kgf/cm}^2_{\text{gauge}}$ ,  $121^\circ\text{C}$  이상에서 15분간 살균하였으며, 살균전  $1\text{N-NaOH}$  또는  $1\text{N-HCl}$  수용액으로 pH를 7.0으로 조절하였다.<sup>(15)</sup> 배양은 stock culture로부터 단일균체(singlecolony)를 취하여 접종 배양액(seed culture medium) 10ml에 접종하여 incubator에서  $37^\circ\text{C}$ 로 유지시키며 24시간 배양하였고, 이것을 다시 접종 배양액 90ml에 재접종하여  $37^\circ\text{C}$ 에서 24시간 배양하였다. 배양시킨 100ml를 접종 배양액 900ml에 재접종하여 shaking water bath에서 위와 같은 조건으로 진탕배양하여 균체고정에 필요한 충분한 양의 균체를 배양하였다.<sup>(16)</sup>

Table 1. Composition of stock culture medium

Component	Weight
Casein pepton	17.0 g
Soy pepton	3.0 g
Dipotassium phosphate	2.5 g
Sodium chloride	5.0 g
Dextrose	2.5 g
Agar-agar	20.0 g
Distilled water added to make one liter solution	

## 2. 고정화 공정

Sodium alginate는 흰색 또는 황백색의 분말로 거의 무미, 무취이며, 다시마나 그 이외의 해초중 다량 포함되어 있는 고점성의 물질이다. 물에는 쉽게 녹지만 에틸 알코올에는 녹지 않는다. 중성이고 금속염과 결합 응고하여 그들의 불용성 금속염을 만든다. Ca-alginate의 기계적 특성은 mannuronic acid와 guluronic acid residues의 분배에 관계되는데 polyguluronic acid와 blocks의 농도가 증가함에 따라 gel은 더 견고해지고 딱딱해 진다. 높은 산성상태나 높은 온도에서는 alginate의 카르복실기가 분해되는 단점이 있다. 균체의 포집은 원심분리기로 8,000rpm에서 15분간 원심분리하여 포집하였다. Sodium alginate 2.5%(w/v)수용액 400ml에 건조중량 5g의 균체를 균일하게 섞은후 0.1M  $\text{CaCl}_2$  수용액에 미량 pump로 한방울씩 떨어뜨려 bead를 제조하였으며, 생성된 bead는 0.1M  $\text{CaCl}_2$  수용액에서 2시간동안 숙성시킨 뒤 증류수로 세척하여 사용하였다.<sup>(17)</sup>

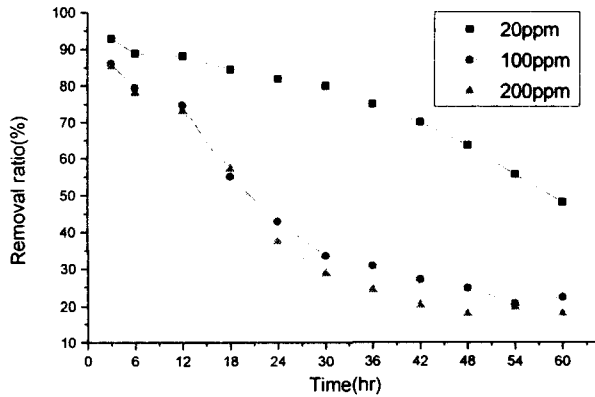
## 3. 실험장치 및 실험방법

반응기의 재질은 투명 아크릴이며 이중관이다. 외관의 내경은 10cm이고, 내관의

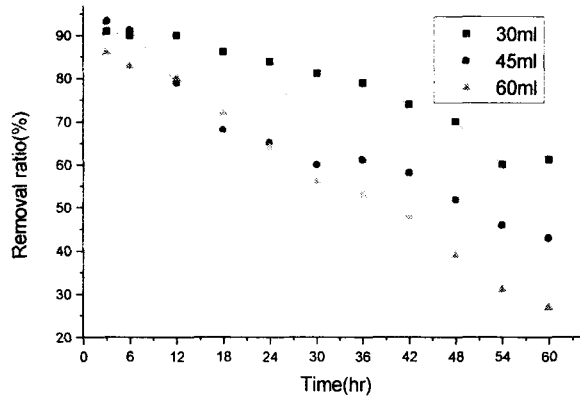
내경은 3.4cm이며, 관의 두께는 각각 0.6cm, 0.3cm이다. 반응기 전체의 높이는 40cm이며, 반응기 내부용적은 363ml이다. 균체가 고정된 bead는 반응기 하단으로부터 30cm지점까지 충전시켰다. bead를 충전시킨 후 공극률은 0.25 였으며, working volume은 272ml이었다. 반응기는 70% 에틸 알코올(ethyl alcohol)로 소독하여 clean air bench내에서 건조시켜 사용하였다. 반응기 내부의 온도를 일정하게 (27, 37, 47°C) 유지시키기 위해 반응기 외부의 물자켓(water jacket)을 통하여 하향식으로 물을 순환시켰다. 배양액의 공급은 peristaltic pump를 이용하여 순환시켰다. 반응기 하단에서 배양액을 공급하고 상단으로 유출되는 상향식으로 설치하였다. 반응은 수직원통형 반응기의 하단에 중금속이 함유된 배양액을 공급하면서 시작되고, 반응기 상단으로 유출되는 흐름으로부터 매 3시간마다 시료를 채취하였다.

#### 4. 분석 및 측정방법

균체의 농도측정은 채취한 시료를 원심분리기로 8,000rpm에서 15분간 원심분리한 후에 이를 증류수로 2-3회 세척하여 freeze dryer에서 서서히 24시간 건조하여 건조중량(g dry weight / L)을 측정하였다. 또한 시료를 660nm의 파장에서 흡광도(absorbancy)를 측정하였다. 균체의 건조중량 대 흡광도의 검량선을 작성하여 실험중 균체의 무게를 이 검량선을 이용하여 환산하여 사용하였다.



Removal ratio of cadmium ion( $Cd^{2+}$ ) vs. time  
at 30ml/hr, 37°C



Removal ratio of cadmium ion( $Cd^{2+}$ ) vs. time  
at 10ppm, 37°C

#### 4. 결론

Ca-alginate gel bead에 고정된 *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853을 사용한 충전층반응기(packed bed reactor)에서의 유속변화, 초기 카드뮴이온( $Cd^{2+}$ )농도 변화에 따른 연속적 실험의 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 농도변화에 의한 카드뮴이온 ( $Cd^{2+}$ )의 제거율은 유속 30ml/hr에서 20ppm, 100ppm, 200ppm의 순으로 좋게 나타났다.
2. 유속변화(30, 45, 60ml/hr)에 따른 카드뮴이온 ( $Cd^{2+}$ )의 제거율은 10ppm, 37°C에서 30ml/hr, 45ml/hr, 60ml/hr의 순으로 좋게 나타난다.

이상의 결과로부터 본 시험에서 카드뮴이온 ( $Cd^{2+}$ )의 제거량이 가장 좋은 최적처리 조건은 실험변수중 최저유속, 최저농도 조건인 30ml/hr, 20ppm인 것으로 나타났다.

#### 5. 참고문헌

1. D.Williams, J. De Lay, Bacteriological Review, Vol.41, 1 (1977)
2. P.J. Halling, P. Dunnill, Enzyme Microb. Tech., Vol.2, 2 (1980)
3. D.M. Munnecke, Biotech. and Bioeng., Vol.23, 1813 (1981)
4. Y.Y. Linko, L. Rohjola, FERS Letters., Vol.62, 77 (1976)
5. C.A. White, W.F. Kennedy, Enzyme Micro. Technol., Vol.2, 82 (1980)

6. J.F. Kennedy, S. A. Baker, Nature, Vol.261, 242 (1976)  
241 (1979)
7. S.J. Peter, K.W. Blunt "Physical studies on cell immobilization using Calcium Alginate Gels", Vol.21, 2155 (1979)
8. R. S Mitra, R.H. Gray, J. Bacteriol. Vol.121, 1180-1188 (1975)
9. H. Aiking, K. Kok, Appl. Environ. Microbiol. Vol.44, 938-944 (1982)
10. J. Aiking, A. Stijnman, Appl. Environ. Microbiol. Vol.47, 374-377 (1984)
11. T. Kojiman Proc.natl. Acid, U.S.A. Vol.73, 3413-3417 (1976)
12. R.W. Olafson, K. Abel, Arch. Biochem. Biophys., Res. Commu., Vol. 86, 36-43 (1979)
13. N.J. Robinson, "Algal metallalothioneins : secondary metabolites and proteins", J. Appl. Microbiol. Vol.1, 5-18, (1989)
14. M.B. Khazaeli and R.S. Mitra, "Cadmium binding component in Escherichia coli during accumulation to low levels of this ion" Appl. Environ. Microbiol., Vol.41, 46-50 (1981)
15. 최석순, 김남기, Cd(II)이 함유된 폐수처리에서 *Pseudomonas aeruginosa*의 거동특성, 성균관대학교 논문집, vol 47, no. 2, 123 (1996)
16. 최동진, "충전층 반응기를 이용한 전분의 분해에 의한 에탄올 제조연구", 석사 학위논문, 성균관대학교 (1989)
17. Cheetham, P.H.J., Blut, K.V. and Bucke, C., Biotech. Bioeng., 21, 2155 (1979)
18. 김영환, "환경오염 측정 분석법", 산업공해연구소, 223-252 (1980)