

Bacillus sp. SK31의 생물흡착제 흡착특성 및 생산

서현호·김형갑

진주산업대학교 환경공학과

Adsorption Properties and Production of Biosorbent from *Bacillus* sp. SK31

Hyun-Hyo Suh, Hyoung-Kab Kim

Department of Environmental Engineering, Chinju National University

ABSTRACT

A strain (designated SK31) which produces an excellent adsorption substance was isolated from soil samples and identified as *Bacillus* species. The major adsorption substance (biosorbent SK31) produced by *Bacillus* sp. SK31 was purified by ethanol precipitation and cetylpyridinium (CPC) precipitation. The adsorption characteristics of zinc and lead ions on bioadsorbent SK31 were investigated. The equilibrium isotherms showed that bioadsorbent SK31 took up zinc and lead from aqueous solutions to the extent of about 52 mg/g and 112 mg/g, respectively. The culture conditions at the flask level of *Bacillus* sp. SK31 were investigated for the production of polysaccharide bioadsorbent, SK31. The optimum pH and temperature for sorbent production were 7.5 and 30°C, respectively. The important carbon and nitrogen sources for sorbent formation were glucose and ammonium nitrate, respectively. In the optimized medium, sorbent production was improved three folds in comparison with the basal medium. In the jar fermenter, the highest sorbent production was obtained at 60 h cultivation time and the amount of

biosorbent SK31 at that time was 9.2 g/l.

Key words : *Bacillus* species, biosorbent, production

요 약 문

흡착제 생산균주를 선별하기 위하여 토양시료에서 분리한 흡착제 생산균주중 가장 뛰어난 흡착물질을 생산하는 균주, SK31을 선별하였으며 분리균주 SK31은 *Bacillus* 속으로 동정되었다. *Bacillus* sp. SK31에 의하여 생산된 흡착물질(생물흡착제 SK31)은 ethanol 침전과 cetylpyridinium(CPC) 침전을 통하여 정제하여, 아연과 납 이온에 대한 흡착특성을 조사하였다. 생물흡착제 SK31의 아연과 납 이온의 흡착량은 각각 52 mg/g과 112 mg/g 이었다. *Bacillus* sp. SK31 균주가 흡착제를 생산하기 위한 flask 수준에서의 배양조건들이 조사되었다. 흡착제 생산을 위한 최적 pH와 최적온도는 각각 7.5와 30℃로 나타났다. 흡착제 생산시 주요한 탄소원과 질소원은 glucose와 ammonium nitrate이었다. 최적화된 배지에서의 흡착제 생산은 기초배지에서 보다 약 3배 증가하였다. Jar fermentor 배양에서 배양 60시간에서 가장 많은 흡착제를 생산하였으며, 흡착제의 생산량은 9.2 g/l 이었다.

주제어 : *Bacillus* 속, 생물흡착제, 생산

1. 서 론

최근 미생물에 의한 중금속 흡착에 관한 연구는 유기금속이나 전략적으로 중요한 금속의 회수 및 환경보호에 있어서 생물 흡착제의 잠재능 때문에 상당한 관심을 갖게 되었다¹⁾. 기존 중금속폐수의 처리방법으로는 산화 환원법, 응집침전법, 흡착, 이온교환법, 전기분해법, 중화법, 추출법등이 있는데 응집침전법과 이온교환수지를 이용하는 이온교환법이 가장 많이 쓰여지고 있다²⁾. 응집침전법은 설치가 용이하고 유지비용과 에너지 소비가 상대적으로 낮은 장점을 지니고 있기 때문에 가장 보편적으로 사용되고 있는 처리방법이나, 중금속 제거율이 낮고 많은 양의 화학응집제가 사용되어 침전되는 슬러지처리 등이 큰 문제점으로 지적되고 있다. 이온교환수지법은 침전법에 비하여 제거율이 높고 저농도의 중금속 이온을 선택적으로 제거할 수 있

는 장점을 지니고 있으나, 고가의 수지를 사용하여야 하기 때문에 금속의 회수 및 재사용이 병행되지 않을 경우 다른 처리방법에 비하여 비경제적이라 할 수 있다²⁾.

이러한 문제를 해결하기 위하여 미생물에 의한 중금속의 제거에 관한 연구는 지난 10여 년간 관심을 끌어들였다. 생물흡착제(biosorbent)로서 갖추어야 할 조건은 1) 효율적이고 빠른 금속의 흡착과 탈리 2) 생물흡착제의 낮은 생산비와 재사용의 가능성 3) 금속용액으로부터 생물흡착제의 분리가 효율적이며, 빠르고, 간단할 것 4) 금속흡착과 탈리의 높은 선택성과 같다³⁾. 흡착과정에는 한가지 이상의 화학적인 과정이 관여하며, 생물흡착제가 흡착을 할 수 있는 주된 화학적인 기능기로는 electronegative groups (hydroxyl, sulfhydryl groups), anionic groups (carboxyl, phosphate groups)과 nitrogen-containing

groups (amino groups)들에 의해서 가능하다⁴⁾. 이러한 기능을 갖는 생물흡착제를 이용하여 산업폐수에 함유된 중금속을 제거하기 위한 연구가 진행되고 있다.

본 논문에서는 자연계에서 세포외 다당류(extracellular polysaccharide)를 생산하는 미생물들의 분리, 분리된 미생물의 동정, 생산된 다당류의 중금속 흡착제로서의 이용가능성과 흡착제 생산을 위한 배양조건에 검토 결과를 보고하는 바이다.

2. 재료 및 방법

2.1 생물흡착제 생산 균주의 분리 및 선별

흡착제 생산균주를 분리하기 위하여 부산, 울산, 경남, 전남, 충청일원의 산, 들, 하천, 공장지대 등에서 채취한 시료를 3배 희석하여 분리용 고체배지에 도말하여 30°C에서 2일 동안 배양하였다. 분리용 고체배지 조성은 glucose 20 g/l, NH₄NO₃ 1.0 g/l, K₂HPO₄ 1.0 g/l, KH₂PO₄ 0.8 g/l, NaCl 0.5 g/l, MgSO₄ 7H₂O 0.5 g/l, yeast extract 0.2 g/l와 tap water를 사용하였으며, pH는 7.0으로 조절하였다. 미생물이 생산하는 세포외 다당류를 생물흡착제로 이용하기 위하여 먼저 분리용 평판배지상에서 배양한 후 생성된 집락으로부터 점성을 가지거나 집락 표면이 탄성을 보이는 집락들을 1차 선별하였다. 이를 분리용 액체배지에 접종하여 30°C에서 3일간 진탕배양(120 rpm)하여 물성(점도, 열과 pH에 대한 안정성 등)이 우수한 다당류를 생산하는 균주를 최종 선별하였다.

2.2 균주동정

선별된 균주 SK31의 동정은 Bergey's manual of systemetic bacteriology⁵⁾,

Macfaddin의 Biochemical tests for identification of medical bacteria⁶⁾ 및 Cowan and Steel의 Manual for the identification of medical bacteria⁷⁾, Gordon의 The genus Bacillus⁸⁾에 준하여 동정하였다.

2.3 균체의 배양

균의 배양은 액체 분리배지를 250-ml의 Erlenmeyer flask에 50 ml 첨가한 다음 진탕배양기(120 rpm)로 30°C에서 72시간(pH 7.0) 배양하였으며, 배양조건 조사를 위한 기초배지 조성은 glucose 20 g/l, NH₄NO₃ 1.0 g/l, K₂HPO₄ 1.0 g/l, KH₂PO₄ 0.8 g/l, NaCl 0.5 g/l, MgSO₄ 7H₂O 0.2 g/l와 tap water를 사용하였다.

발효기 배양은 volume 2-l(working volume 1-l)인 jar fermentor(B. Brown, Biostat M, Germany)를 사용하였으며, pH 7.5와 30°C에서 통기량은 1 vvm으로 고정하였고 교반속도는 200~800 rpm으로 조절하면서 배양하였다.

2.4 흡착성분의 분리정제

배양액을 증류수로 10배 희석한 후, 9,000×g에서 30분간 원심분리하여 균체를 제거한 후, 상정액의 2배에 해당하는 ethanol을 첨가하여 흡착성분(다당류)을 침전시켰다. 침전된 다당류는 ethanol로 2회 세척한 후 진공 건조하여 백색분말의 다당류를 얻어 흡착실험에 사용하였으며, 이 백색분말 시료를 다시 증류수에 녹여 10% cetylpyridinium chloride(CPC) 용액에 침전시킨 후 침전물을 10% NaCl 용액에 용해시켰다. 용액에 2배의 ethanol을 가하여 다당류를 침전시키고 침전물은 증류수로 용해한 다음 증류수로 투석한 후, 동결 건조하였다.

2.5 흡착실험

본 실험에서는 *Bacillus* sp. SK31에서 추출한 생물고분자의 중금속 흡착능을 조사하기 위하여 Zn(II)과 Pb(II)등의 금속이온을 대상으로 생물고분자흡착제 SK31을 이용하여 중금속 흡착실험을 실시하였다. 각각의 중금속(50 mg/l)을 함유한 용액에 흡착제를 투여한 후, multipoint-stirrer(PMC industries Inc., U.S.A.)를 이용하여 흡착평형에 도달하기 위하여 6시간 동안 교반하면서 반응시켰다. 반응이 끝난 생물흡착제는 GF/C filter(47 mm ϕ circles, Whatman Co., U.S.A.)를 사용하여 제거한 후, 여과액을 atomic-adsorption spectrophotometry(Smith-Hieftje, SH4000, U.S.A.)를 이용하여 금속이온의 잔류농도를 정량분석하였다. 각각의 금속이온의 흡착량은 반응초기의 금속이온의 농도와 평형에 도달한 후 잔류한 납이온의 농도로서 구하였으며, 흡착량은 아래식에 근거하여 계산하였다.

$$U = \frac{V(C_i - C_f)}{M}$$

U : Uptake capacity (mg/g)

M : Biomass (dry weight, g)

V : Volume of metal solution

C_i : Initial concentration of metal ion (mg/l)

C_f : Final concentration of metal ion (mg/l)

2.6 다당류 정량과 점도 측정

다당류(흡착물질)의 정량은 spectrophotometer를 사용하여 490 nm에서 phnol-sulfuric method⁹⁾로 측정하였으며, 배양시 점도의 측정은 viscometer (Brookfield, DV-II, U.S.A.)를 사용하였으며, 배양액 30 ml를 취하여 25°C에서

spindle No. 3을 사용하여 측정하였다.

2.7 균체량 측정

균체량은 세포 건조중량(dry cell weight, DCW)으로 나타내었다. 균체벽에 부착되어 있는 점질성 물질을 제거하기 위하여 균체배양액 10 ml를 증류수로 희석한 후 100°C에서 5분간 가열한 다음 9000 \times g로 원심분리하여 상정액을 제거하였다. 침전된 균체를 생리식염수에 현탁하여 0.2 μ m의 pore size를 갖는 membrane filter (Whatman, U.S.A.)를 이용하여 여과한 다음 105°C에서 8시간 동안 건조시킨 후 건조균체량으로 측정하였다.

3. 실험 결과 및 고찰

3.1 흡착제 생산균주의 분리

미생물이 생산하는 생물고분자의 흡착제로의 이용을 위하여 자연계에서 분리한 생물고분자 생산 미생물중 분리용 평판 배지상에서 딱딱한 집락을 형성하거나 점질물을 내는 집락들을 1차로 220여 종 분리하고, 각 균주를 분리용 액체배지에서 배양한 후 가장 물성이 좋은 다당류를 생산하는 균주 SK31을 선별하여 본 연구에 사용하였다.

3.2 분리균주의 동정

분리균주 SK31의 고체배지에서의 특성은 glucose-nutrient agar 배지에서 가장 생육이 좋았으며, glucose-asparagine agar와 glucose-nitrate agar에서도 잘 자랐다. 이들 배지에서의 집락은 유백색이었고 집락의 형태는 원형이었으며 불룩하였다. 이 균주의 형태학적 특징은 간균으로서 그 크기는 0.52~0.74 \times 3.9~5.2 μ m이며, 분리균주 SK31의 동정을 위한 생리, 생화학적 검토결

Table 1. Biochemical and Physiological Characteristics of Strain SK31

Characteristic	Result
Gram staining	+
Endospore	+
Shape	rod
Cell size	0.52-0.74 × 3.9-5.2 μm
Motility	+
Catalase	+
Oxidase	-
O/F test	F
Voges-Proskauer test	-
Indole reduction	-
Nitrate reduction	+
Growth at 2.0% NaCl	+
Growth at 5.0% NaCl	+
Growth at 7.0% NaCl	-
Growth at 5°C	-
Growth at 10°C	+
Growth at 30°C	+
Growth at 40°C	+
Growth at 50°C	-
Carbohydrates, acid from :	+
Glucose	+
Xylose	+
Arabinose	+
Mannitol	+
Sucrose	+
Galactose	+
Growth at pH 5.0	+
Growth at pH 7.0	+
Starch hydrolysis	+
Casein hydrolysis	+
Gelatin hydrolysis	+

과(Table 1), 본 균주는 혐기적 조건에서는 생육하지 않고 호기적 조건에서만 생육하였으며 catalase를 가지고 있었다. 운동성이 있었으며

Voges-Proskauer test와 indol 생산은 음성반응을 보였다. Nitrate를 환원하였고 arabinose, mannitol, sucrose와 galactose등의 당류에서 산을 생성하였으며 starch, casein을 잘 분해하였다. 이상과 같은 SK31의 형태적, 생화학적, 생리적 특징으로부터 본 분리균주는 *Bacillus* 속으로 동정되었으며, 최종적으로 *Bacillus* sp. SK31로 명명하였고, 또한 *Bacillus* sp. SK31이 생산하는 고분자 물질은 생물흡착제 SK31(biosorbent SK31)로 명명하였다.

3.3 중금속 흡착

3.3.1 초발 pH의 영향

생물고분자 흡착제와 중금속 이온이 흡착되는 과정에서의 반응계는 pH에 크게 의존하므로 각 금속이온 수용액의 pH는 매우 중요한 인자로 알려져 있다¹⁰⁾. 금속이온 수용액에서의 pH 변화에 따른 흡착제 SK31의 흡착효과를 시험하기 위하여 수용액 pH를 3.0에서 10.0까지로 조절한 후 아연과 납에 대한 흡착능을 시험한 결과 Fig. 1과 같다. 아연이온의 경우 pH 4.5, 납이온의 경우 pH 5.0에서 가장높은 흡착효율을 나타내었다. 아연이온의 경우 pH 6.0, 납이온의 경우 pH 8.0 이상에서 흡착이 잘 일어나지 않았으며, 이는 Kuycak과 Volesky¹¹⁾에 의하여 보고된 바와 같이 수용액중의 H⁺가 경쟁적으로 이온흡착에 관여하여 용액내의 이온강도를 변화시킴으로써 흡착제 SK31의 기능기 활성화에 영향을 주기 때문인 것으로 사료된다. 또한 pH 7.0 이상의 영역에서의 낮은 흡착력은 Norberg와 Persson¹²⁾이 보고한 수산화 이온의 농도가 높아짐에 따라 금속이온이 수산화물(hydroxide complex) 형태로 침전되어 흡착제와 결합 부위에서의 결합이 저해를 받음으로써 금속이온 흡착량이 감소한다는 보고와 일치하였다.

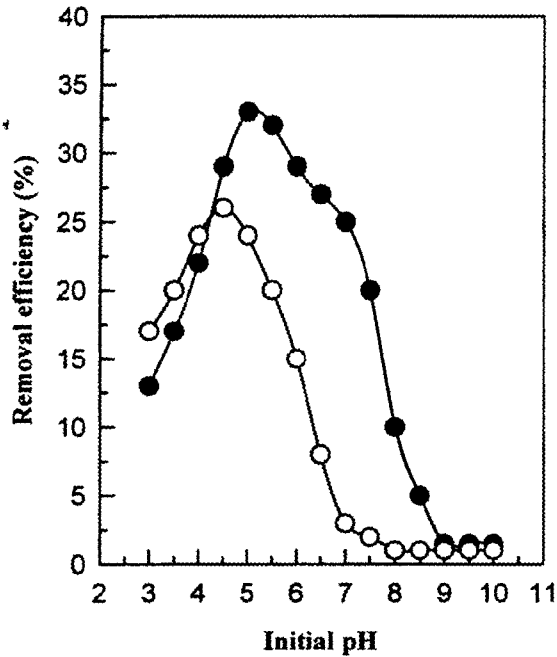


Fig. 1. Removal efficiency of Zn(II) and Pb(II) according to initial pH. The reaction was done for 60 min at room temperature (200 rpm). Initial pH was controlled with 1.0 N HNO₃ and 1.0 N NaOH. Symbols : (○) Zn(II), (●) Pb(II).

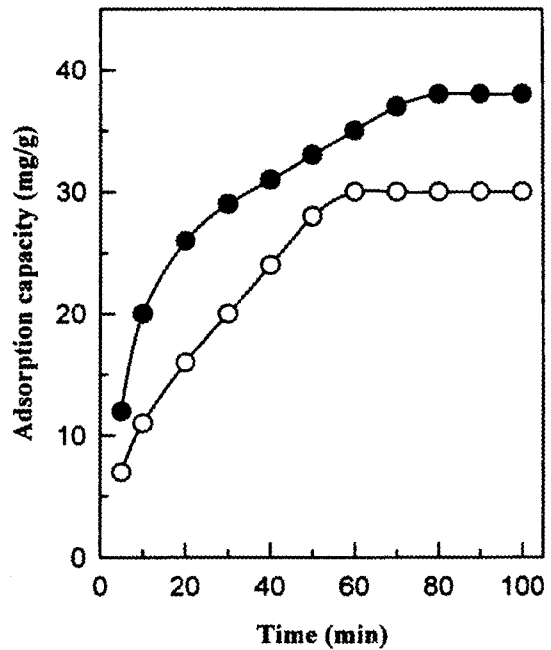


Fig. 2. Adsorption capacity of Zn(II) and Pb(II) on the reaction time. The reaction was done at room temperature (200 rpm). Symbols : (○) Zn(II), (●) Pb(II).

3.3.2 반응시간과 생물흡착제 SK31 농도의 영향

반응계가 흡착평형에 도달하기 위해서는 충분한 반응시간이 요구된다. 따라서 흡착평형에 요구되는 반응시간을 알아보기 위하여 50 mg/l의 아연과 납 수용액에 흡착제 SK31을 각각 0.1 g/l씩 첨가하여 반응시간별로 아연과 납이온 흡착량을 조사한 결과(Fig. 2), 아연이온의 경우 반응 60분, 납이온의 경우 80분 이상에서는 흡착량이 더 이상 증가하지 않고 흡착평형에 도달하였다. 이러한 결과는 흡착제 SK31의 경우 짧은 반응시간을 통한 중금속이온의 흡착이 가능한 것으로 사료된다.

생물흡착제 SK31 농도에 따른 흡착능을 조사하기 위하여 흡착제 SK31의 최종농도를 10 mg/l에서 100 mg/l까지 조정하여 아연 및 납이온에 대한 흡착능을 조사한 결과, 각각 60 mg/l와 50 mg/l의 농도로 결정되었으며, 생물흡착제 SK31의 모든 농도에서 납이온에 대한 흡착력이 아연이온의 흡착력보다 높았다(data not shown). 아연과 납이온에 대한 흡착시 생물흡착제 SK31의 적정농도(아연 60 mg/l, 납 50 mg/l)에 대한 흡착평형을 조사한 결과(Fig. 3), 반응계가 흡착평형에 도달하였을 때 아연과 납이온에 대하여 각각 52 mg/g과 112 mg/g의 최대흡착량을 보였다.

이와같은 결과로 보아 미생물이 생산하는 생물고분자 물질인 생물흡착제 SK31의 경우 다당류의

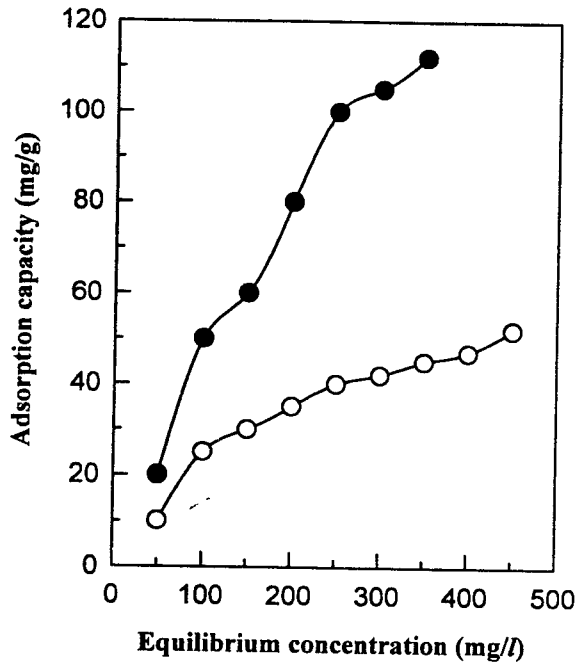


Fig. 3. Equilibrium sorption isotherms of Zn(II) and Pb(II) by biosorbent SK31.
The reaction was done for 90 min at room temperature (200 rpm).
Symbols : (○) Zn(II), (●) Pb(II).

기능기인 carboxyl의 salt bridges와 hydroxyl기의 전기적결합에 의하여 흡착이 일어나는 것으로 보이며, Bacillus sp. SK31이 생산하는 생물흡착제 SK31은 폐수처리공정의 중금속제거 측면에서 사용 가능성이 높다고 하겠다.

3.4 생물흡착제 SK31의 생산

분리균주 Bacillus sp. SK31이 생산하는 흡착제의 생산성 향상을 위한 최적화 조건을 검토하였다.

3.4.1 배양온도와 초기 pH의 영향

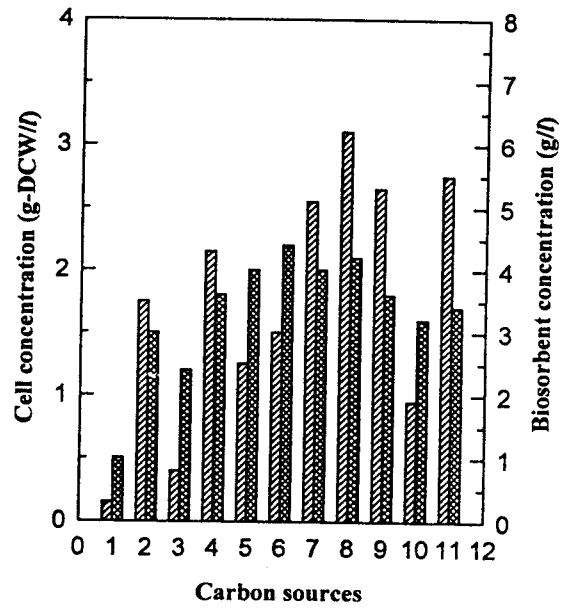


Fig. 4. Effect of carbon sources on biosorbent production and cell growth.

Cells were incubated with shaking at 30 °C for 3 d in the culture medium containing 20 g/l of each carbon source. Initial pH was adjusted to 7.5 with 1.0 N NaOH solution. Lanes : (1) Gluconate, (2) Soluble starch, (3) Fructose, (4) Inositol, (5) Maltose, (6) Dextrin, (7) Sucrose, (8) Glucose, (9) Lactose, (10) Xylose, (11) Galactose.
Symbols : (▨) cell concentration, (■) biosorbent concentration.

본 균주의 생육과 흡착제 생산에 미치는 온도 및 초기 pH의 영향을 조사하기 위하여 기초배지에 균을 접종하여 각 온도별, pH별로 72시간 배양하여 균의 생육과 흡착물질 생산성을 조사하였다(data not shown). 생육 최적온도는 30~32℃이었고, 흡착물질 생산성은 30℃에서 최고치를 보였으며, 27℃ 이하와 35℃ 이상의 온도에서는 낮은 흡착물

질 생산성을 나타내었다. 균의 생육과 흡착물질의 생산성은 pH 7.5에서 가장 높았으며, pH 6~9 이외의 범위에서는 균의 생육저하가 일어났으며, 흡착물질 생산도 감소하는 것으로 나타났다. 일반적으로 고분자 물질 생산을 위한 적정 pH는 미생물의 균화적 특성에 따라 다르나 일반적으로 pH 6.0에서 pH 8.0 사이의 중성 및 약알칼리 부근으로 보고되고 있다¹⁹⁾. 이는 본 실험의 결과도 거의 같은 경향을 보이고 있었다. 이하의 배양에서 초기 pH는 7.5로 조절하였다.

3.4.2 탄소원의 영향

본 균주의 생육과 흡착물질 생산성에 미치는 탄소원의 영향을 조사하기 위하여 기초배지에 각종 탄소원을 2.0% 되도록 첨가하여 pH 7.5, 배양온도 30℃에서 72시간 배양한 결과는 Fig. 4와 같다. 균의 생육은 dextrin 첨가시 가장 높았으나, 흡착물질 생산성은 glucose와 galactose 첨가시 높은 생산성을 나타내었다. 단당류가 starch나 dextrin과 같은 다당류보다 높은 흡착물질을 생산하였다. 이하의 실험에서는 탄소원으로 glucose를 사용하였다.

3.4.3 무기질소원의 영향

Glucose 2.0%를 탄소원으로 한 배지에 각종의 무기질소원을 각각 0.1% 첨가하여 흡착물질 생산성과 균체생육을 조사하였다. 사용한 무기질소원중 ammonium nitrate와 ammonium phosphate 첨가시 높은 흡착물질 생산성을 보였다(Fig. 5). 특히 ammonium nitrate 첨가배지에서는 균체생육 및 흡착물질 생산성이 가장 높아 흡착제 생산에 가장 적합한 질소원으로 생각되었다.

3.4.4 유기질소원의 영향

무기질소원으로 ammonium nitrate를 포함하는 배지에 각종 유기질소원을 0.01% 첨가하여 흡

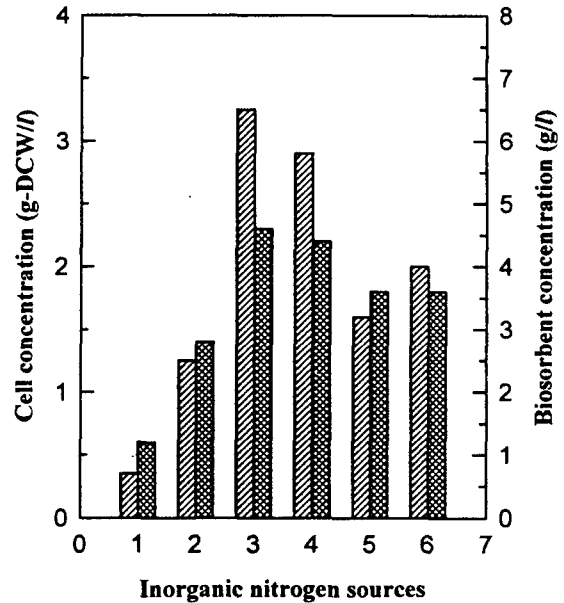


Fig. 5. Effect of inorganic nitrogen sources on biosorbent production and cell growth. Cells were incubated with shaking at 30℃ for 3 d in the culture medium containing 1.0 g/l of each inorganic nitrogen source. Initial pH was adjusted to 7.5 with 1.0 N NaOH solution. Lanes : (1) None, (2) Ammonium sulfate, (3) Ammonium nitrate, (4) Ammonium phosphate, (5) Ammonium citrate, (6) Sodium citrate. Symbols : (▨) cell concentration, (■) biosorbent concentration.

착물질 생산성과 균체생육을 조사한 결과(data not shown), 조사된 유기질소원중 yeast extract와 tryptone을 1:1의 비율로 혼합첨가했을 때, 흡착물질 생산성이 가장 우수하였으며, 유기질소원을 첨가하지 않은 경우보다 약 1.8배 향상된 생산성을 보였다. 유기질소원(yeast extract + tryptone)을 농도별로 첨가한 결과, 균체량은 0.2

% 첨가시까지 증가하였고, 흡착물질 생산성은 0.04% 첨가시까지 비례적으로 증가하였다. 따라서 이하의 실험에서는 yeast extract와 tryptone 을 1 : 1의 비율인 0.03%씩 첨가하였다.

3.4.5 무기염류의 영향

본 균주의 흡착물질 생산성과 균체생육에 미치는 무기염류의 영향을 조사하기 위하여 각 무기염류를 0.01% 농도로 첨가하였다. Ca²⁺이온(CaCl₂, CaCO₃)과 MnSO₄, MgSO₄ 첨가시 효과적인 흡착물질 생산성을 보였으며, CaCO₃, MnSO₄과 MgSO₄ 혼합 첨가시 무첨가의 경우보다 2배이상의 생산성을 나타내었다(data not shown). MnSO₄ 과 MgSO₄ 첨가가 다당류 생산을 촉진한다는 사실을 Appanna¹⁴의 *Rhizobium* 속 균주에 의한 균체의 다당류 생산에서 보고된바 있으며, CaCO₃의 경우 pH 저하를 막는 역할을 하여 다당류 생산을 높인 것으로 사료된다. CaCO₃ 0.03%, MnSO₄ 0.01%와 MgSO₄ 0.02% 첨가시 가장 높은 생산성을 보였다.

3.4.6 C/N ratio 영향

이상의 실험에서 최적화된 배지성분에 탄소원 (glucose)과 질소원 (NH₄NO₃)의 비(C/N ratio)를 달리하여 흡착물질 생산성과 균체생육을 조사하였다. 균체생육은 glucose 농도 2.0%에서는 C/N ratio의 영향을 받지 않는 것으로 나타났으며, glucose 농도 2.0%일 때 C/N ratio 40에서 가장 높은 흡착물질 생산성을 보였고, glucose농도에 관계없이 C/N ratio가 높을수록 흡착물질 생산성이 증가하였다. *Zoogloea ramigera*에 의한 균체와 다당류 생산에서 Norberg와 Enfors¹⁵는 glucose 농도 2.5%에서 C/N비 30일 때 10 g/l의 다당류를 생산하였다고 보고하였다. 이상과 같이 최적화된 배지(glucose 20 g/l, NH₄NO₃ 0.5 g/l,

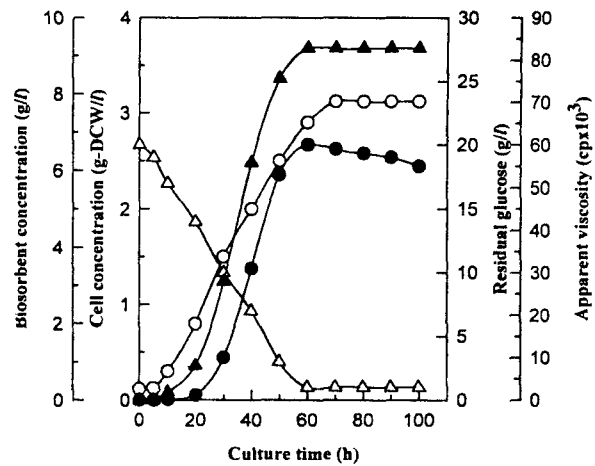


Fig. 6. Time course of the biosorbent SK31 in the jar fermentor.

The cultures were performed with a working volume of 5.0 l, stirred at 200~800 rpm, the pH was maintained at 7.5. Aeration was maintained at a rate of 1.0 vvm. Cells were incubated at 30°C for 100 h in the optimized medium. Symbols : (○) cell concentration, (●) apparent viscosity, (△) residual glucose, (▲) biosorbent concentration.

K₂HPO₄ 1.5 g/l, KH₂PO₄ 0.2 g/l, MgSO₄ 7H₂O 0.2 g/l, MnSO₄ 4~5H₂O 0.1 g/l, CaCO₃ 0.3 g/l, yeast extract 0.3 g/l 및 tryptone 0.3 g/l)에서의 흡착물질 생산성은 기초배지에서 보다 약 3배 향상하였으며, 균체량은 약 2배정도 증가하였다.

3.4.7 Jar fermentor에서의 흡착제 생산

Flask 수준에서 최적화된 배지를 이용한 jar fermentor 배양에서는 배양시간 20시간부터 대수 증식기에 접어들어 70시간까지 지속되었으며, 배

양 60 시간에 최고의 흡착물질 생산성을 보였다 (Fig. 6). Shu 등¹⁶⁾의 *Xanthomonas campestris*를 이용한 xanthan의 생산이 균체대수증식기부터 시작하여 정지기까지 계속된다는 보고와 비슷하게 흡착물질 생산성이 균체량증가와 함께 증가하는 것을 보였다. 한편, 흡착물질의 생성과 발효조내의 점도는 같은 비율로 증가되었으며, 배양 50시간 이후 부터는 glucose가 거의 고갈되었고, 배양 70시간 이후부터는 발효조의 배양액에 dead volume 및 channelling 현상이 발생하였다. 이때 배양액의 점도는 60,000 centipoise(cp)까지 도달하였으며, 흡착제 생산량은 9.2 g/l였다.

이상의 결과로부터 *Bacillus* sp. SK31이 생산하는 생물흡착제 SK31의 경우 생분해성이며, 이차적인 환경오염의 우려가 없고, 인체에 해가 없는 생물고분자 흡착제로서 또한 각종 중금속에 대한 높은 친화력으로 인해 실제 폐수처리공정의 중금속 제거 측면에서 활용한다면 생물흡착제로써 사용 가능성이 높다고 하겠다.

4. 결 론

1. 미생물 유래 생물흡착제의 개발을 위하여 자연계로부터 분리한 130여종의 흡착제 생산균주 중 가장 흡착능이 뛰어난 균주 SK31을 선별하였다.
2. 분리균주 SK31의 형태학적, 배양학적, 생리학적 특성을 조사한 결과 *Bacillus* 속으로 동정되어, 분리균주 SK31을 *Bacillus* 속 SK31로 명명하였다.
3. *Bacillus* 속 SK31에 의하여 생산된 흡착물질(생물흡착제 SK31)은 ethanol 침전과 cetylpyridinium(CPC) 침전을 통하여 정제하였다.
4. 생물흡착제 SK31을 이용하여 아연과 납 이온

의 흡착량을 조사한 결과 각각 52 mg/g과 112 mg/g이었다.

5. *Bacillus* 속 SK31 균주가 흡착제를 생산하기 위한 최적배지조성은 1 당 glucose 20 g, NH_4NO_3 0.5 g, K_2HPO_4 1.5 g, KH_2PO_4 0.2 g, $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g, $\text{MnSO}_4 \cdot 4\sim 5\text{H}_2\text{O}$ 0.1 g, CaCO_3 0.3 g, yeast extract 0.3 g, tryprone 0.3 g이었다. 최적 배양온도는 30°C였으며, 최적 pH는 7.5였고 최적 C/N비는 40이었다.
6. 최적화된 배지에서의 흡착제 생산은 기초배지에서 보다 약 3배 증가하였다. Jar fermentor 배양에서 배양 60시간에서 가장 많은 흡착제를 생산하였으며, 배양액의 점도는 60,000 centipoise(cp)이고 흡착제의 생산량은 9.2 g/l이었다.

감사의 글

본 연구는 진주산업대학교 기성회의 지원에 의한 연구 결과의 일부이며, 연구비 지원에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Tsezos, M. "The Selective Extraction of Metals from Solutions by Microorganisms," A Brief Overview. *Can Metal Q.*, 24, pp.141~144 (1985).
2. 정윤철, 안대회, 김동하, 서진호, 노수홍. "미생물을 이용한 중금속 제거/회수 기술개발," 과학기술처 연구보고서 (I), pp.21~23 (1991).
3. Al-Ash, S. and Duvujak, Z. "Adsorption of Copper and Chromium by *Aspergillus carabonarius*." *Biotechnol. Prog.*, 11, pp.638~642 (1995).
4. Tobin, J. M., White, C. and Gadd, G. M. "Metal Accumulation by Fungi : Application in

- Environmental Biotechnology," *J. Ind. Microbiol.*, 13, pp.126~130 (1994).
5. Peter, H. A. S., Nicholas, S. M., Sharpe, M. E. and Holt, J. G. "Bergey's Manual of Systemetic Bacteriology vol. II," Williams and Willkins, Baltimore, pp.1104~1139 (1986).
 6. Macfaddin, J. F. "Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria," Williams and Willkins, Baltimore, pp.353 (1984).
 7. Cowan, N. R. and Steel, K. J. "Manual of Identification of Medical Bacteria," Cambridge University Press, London, pp.215 (1965).
 8. Gordon, R. E., Heynes, W. C. and Pang, C. H. "The Genus *Bacillus*," Agriculture Handbook Stock Number 202-275-2091. United States Department of Agriculture, Washigton DC (1975).
 9. Chaplin, M. F. and Kennedy, J. F. "Phenol-Sulfuric Acid Assay," In M. F. Chaplin and J. F. Kennedy (eds.), *Carbohydrate Analysis ; A Practical Approach*. IRL Press, Washington DC, pp.2 (1986).
 10. Mittelman, M. W. and Geesey, G. G. "Copper-binding Characteristics of Expolymers from a Freshwater-Sediment Bacterium." *Appl. Environ. Microbiol.*, 49, pp.846~851 (1984).
 11. Kuyucak, N. and Volesky, B. "Biosorbents for Recovery of Metals from Industrial Solution," *Biotechnol. Lett.*, 10, pp.137~142 (1988).
 12. Norberg, A. B. and Persson, H. "Accumulation of Heavy-Metal Ions by *Zoogloea ramigera*," *Biotech. Bioeng.*, 26, pp.239~246 (1984).
 13. Toeda, K. and Kurane, R. "Microbial Flocculant from *Alcaligenes cupidus* KT201." *Agr. Biol. Chem.*, 55, pp.2793~2799 (1991).
 14. Appanna, V. D. "Stimulation of Exopolysaccharide Production in *Rhizobium meliloti* JJ-1 by Manganese." *Biotechnol. Lett.*, 10, pp.205~206 (1988).
 15. Norberg, A. B. and Enfors, S. "Production of Extracellular Polysaccharide by *Zoogloea ramigera*," *Appl. Environ. Microbiol.*, 44, pp.1231~1237 (1982).
 16. Shu, C. H. and Yang, S. T. "Effects of Temperature on Cell Growth and Xanthan Production in Batch Cultures of *Xanthomonas campestris*," *Biotech. Bioeng.*, 35, pp.454~468 (1990).