한국생물공학회지 제 14권 제 5호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 14, No. 5, 585-592(1999)

화학 · 생물학적 황화수소 제거 공정에 있어서 고정화 세포를 이용한 철산화 속도 증진

김 태 완 · 김 창 준 · †장 용 근
한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터
(접수 : 1999. 9. 3., 게재승인 : 1999. 10. 23.)

Enhancement of Iron Oxidation Rate by Immobilized Cells in Chemo-biological Process for H_2S Removal

Tae-Wan Kim, Chang-Joon Kim, and Yong-Keun Chang†
Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center,
Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea
(Received : 1999. 9. 3., Accepted : 1999. 10. 23.)

This study was aimed to enhance the Fe(II) oxidation rate using immobilized cells of *Thiobacillus ferrooxidans*. For this purpose, a medium for the minimization of jarosite formation was developed first. Secondly, cell immobilization in celite beads was carried out. And then, repeated-batch and continuous operations of Fe(II) oxidation by using immobilized cells were performed. In a series of flask cultures, three types of media were tested: media with a much lower salt concentration than that of the 9K medium; media which contained different nitrogen sources from that of the 9K medium, that is, $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4Cl and HNO_3; media which contained $(NH_4)_2HPO_4$ as nitrogen and phosphate source, but without K_2HPO_4, the phosphate source in the 9K medium. As a result, the M16 medium which contained 3 g/L of $(NH_4)_2HPO_4$ as nitrogen and phosphate source was found to be the optimal one. It sustained good cell growth allowing no jarosite formation. In the repeated-batch operations, the rate of Fe(II) oxidation gradually increased to reach a maximum value as the batch was repeated. As a result of repeated-batch operations, a maximum Fe(II) oxidation rate was 2.33 g/L · h. In the continuous operations, the iron oxidation rate could be increased to 2.14 g/L · h at a dilution rate of 0.25 h^{-1} which is greater than the maximum specific growth rate (0.12 h^{-1})of the bacteria.

Key Words : Ferrous iron oxidation, immobilized *Thiobacillus ferrooxidans*, minimization of jarosite formation

서 론

황화수소 가스는 주로 천연 가스 중에 함유되어 있거나 폐수 처리장에서 발생하며, 특히, 원유 정제 단계의 수첨 탈황 공정에서 다량으로 발생한다. 또한 황화수소 가스가 연소될 때 대기오염 물질인 SO_2 가스가 발생한다(1). 최근, 원유의 고유황화와 점차 심화되는 환경 규제로 인해 연료유 탈황 공정에서 발생되는 황화 수소의 양은 증가하고 있고, 따라서 sour gas로부터 황화수소 가스를 제거하는 공정에 대한 관심이 고조되고 있다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering and BioProcess Engineering Research Center, Korea Advanced Institute of Science and Technology, Taejon 305-701, Korea
Tel : 042-869-3927, Fax : 042-869-8800
E-mail : ychang@sorak.kaist.ac.kr

황화수소를 제거하기 위한 방법으로 대부분이 물리 · 화학적 방법을 이용하고 있다. 정유공장이나 천연가스 처리공장에서 많이 쓰이는 황화수소 처리 시설은 주로 Alkanolamine process, Claus process, Shell Claus off-gas treatment, Stretford process 등이 있다. 그러나 이러한 물리 · 화학적 탈황 공정들은 고온 고압에서 운전되므로 장치 및 운전비용이 많이 요구되며, 2차 오염물질인 아황산 가스와 폐촉매와 같은 폐기물들이 대량으로 발생된다. 또한, 각종 환경규제의 강화에 따라 오염물질의 배출기준이 강화되고 있을 뿐만 아니라, 2차 오염물질의 처리에 따른 처리비용이 증가하는 등 많은 문제점들이 있다. 이러한 문제점들을 해결하기 위해 미생물을 이용하여 황화수소를 처리하는 생물학적 기술 개발에 관한 연구들이 활발하게 진행되고 있다.

생물학적 황화수소 처리공정은 크게 두 가지로 분류할 수 있다. 하나는 미생물들이 sour gas중의 황화수소를 에너지원으로 사용함으로서 직접적으로 황화수소를 제거하는 것이고, 다른

하나는 미생물의 대사과정에서 생성된 대사산물이 황화수소의 강력한 산화제로 작용하여 황화수소를 유리황으로 산화시키는 생물·화학적 복합 반응 원리를 이용하는 것이다. 미생물을 이용하여 황화수소를 직접 처리하는 방법은 황화수소 가스가 배지에 대한 용해도가 낮고, 박테리아에 대한 황화수소의 저해 작용으로 인해 고농도의 황화수소 함유가스를 처리하는데는 적합하지 않다(2). 따라서 이런 경우에는 Fe(III)로 황화수소를 산화시킨 후 생성된 Fe(II)를 철산화 세균을 이용하여 Fe(III)로 재생시키는 화학·생물학적 복합 처리 방식이 적합하다. 이의 한 예가 일본에서 개발된 BIO-SR Process(3)이다.

철산화 세균을 이용한 황화수소의 제거 기작은 일련의 생물학적 반응과 화학적 반응에 의해서 진행된다(1, 4, 5). 미생물의 에너지원인 Fe(II)는 대표적인 철산화 세균인 *Thiobacillus ferrooxidans*에 의해 Fe(III)로 산화되고, Fe (III)는 황화수소와 반응하여 황화수소를 유리황으로 환원시키면서 자신은 Fe(II)로 환원된다. 이 과정에서 생성된 Fe(II)는 철산화 세균에 의해 Fe(III)로 산화·재생된다. 이러한 화학·생물학적 복합 공정은 상온·상압하에서 조업이 진행되므로 장치가 간단하고 조업이 손쉬워 투자비와 조업비가 적게 소요되고, 저농도는 물론 고농도의 황화수소 함유가스를 처리할 수 있으며 전체적으로 elemental sulfur만 배출되므로 공해 유발성 물질이 생성되지 않는 새로운 청정공정 기술이다(4). 그러나 철산화 세균에 의한 생물학적 촉매 재생 속도가 화학반응 속도에 비해 상대적으로 느리기 때문에 많은 연구자들이 Fe(II) 산화 속도를 증진시키기 위한 연구를 수행해왔다. 그러나 이들 대부분의 연구에서는 Fe(II) 산화가 진행되면서 생성된 철 침전물(jarosite)이 반응기 및 밸브나 파이프 등을 막아(plugging) 반응기 운전에 심각한 악영향을 초래하였다(5). 이러한 jarosite의 생성을 억제하기 위한 방법으로 pH를 1.8 이하로 낮게 유지하는 방법이 많이 사용되어 왔다(6, 7). 그러나 이러한 방법은 낮은 pH로 인한 세포의 활성 감소 및 장시간 운전시에는 역시 jarosite가 축적되는 문제점들이 발생하여 jarosite 축적 방지의 근본적인 대책이 되지 못하고 있다(8). 따라서 세포의 철산화 능력을 감소시키지 않으면서 철 침전물 생성을 억제하기 위하여 pH와 같은 공정 운전 조건을 최적화하는 것보다는 근본적인 배지 개발이 필요하다.

본 연구의 목적은 세포 농도를 높게 유지할 수 있는 고정화 세포 반응기를 이용하여 Fe(II) 산화 속도 증진은 물론 장기 연속조업이 가능한 반응기 시스템을 개발하는 것이다. 기존의 9K 배지에 비해 세포의 철 산화 능력을 크게 감소시키지 않으면서 jarosite의 생성이 거의 없는 배지를 개발하였고, celite beads내에 세포를 고정화하는 방법을 확립하였으며 고정화 세포를 이용한 반복 회분식 및 연속 조업을 수행하였다.

재료 및 방법

균주 및 종균배양

사용된 균주는 *Thiobacill us ferrooxidans*(ATCC 19859)이다. 균주 배양에는 초기 pH를 1.8로 조절한 Silverman의 9K 배지(9)를 사용하였다. 배양시 9K 배지가 5 L 들어있는 10 L 용량의 유리병에 공기를 충분히 불어 넣어주면서 30℃ 에서 4일간 배양하였다. 배양 후 배양액을 원심분리(6000 rpm, 20 min)하여 jarosite와 세포로 구성된 침전물을 회수하였고, 이를 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$가 없는 9K mineral salt 용액(pH 1.8)으로 현탁하였다. Jarosite를 분리 제거하기 위해 위 현탁액을 2000 rpm에서 10분간 원심분리한 후 상등액을 여과지(Whatman No. 1)를 이용하여 걸러내었다. 회수된 세포 용액을 원심분리(6000 rpm, 20 min)하여 세포를 분리 회수한 후 $FeSO_4 \cdot 7H_2O$가 없는 9K mineral salt 용액(pH 1.8)에 현탁 보관하여 접종원으로 사용하였다.

철 침전물(Jarosite) 생성 최소화 배지 탐색을 위한 플라스크 배양

250 mL erlenmeyer 플라스크에 50 mL의 대상 배지를 넣고 접종액을 10%(v/v) 접종하였다. 접종액의 초기 세포 농도는 600 nm에서의 optical density를 기준으로 하여 이 값에 해당하는 세포내 단백질 농도로서 조절하였다. 즉 접종원으로 사용한 현탁 세포용액을 세포내 단백질 농도를 기준으로 70 μg-protein/mL (OD_{600}=0.3)이 되도록 증류수로 희석하여 접종하였다. 배지의 초기 pH는 1.8로 조절하였고, 온도는 30°C를 유지하였으며 교반속도는 200 rpm으로 유지하였다.

Jarosite 생성 최소화 배지를 선정한 후, 이 배지의 초기 pH에 따른 철 산화 및 jarosite 생성 거동을 고찰하였다. 초기 pH는 1.5, 1.8, 2.3, 3.0으로 조절하였고, 그 외의 모든 조건은 위와 같다.

Celite beads를 이용한 세포 고정화

본 연구에서는 고정화 담체로서 크기가 100~500 μm인 Celite grade 560(Manville Co., USA)을 사용하였다. Celite는 실리카(SiO_2)로 이루어진 다공질의 규조토가 중량비로 거의 90%를 차지하고, 그 외로 Al_2O_3, Fe_2O_3, CaO등의 무기물들로 구성되어 있다(10). 세포 생장에 저해를 주지 않아 무해하고, 배지에 용해되지 않으며, 미생물에 의해 분해가 되지 않아서 고정화 담체로서 적합하다. Celite beads내 세포 고정화시, 세포 농도가 세포내 단백질 농도 기준으로 186 μg-protein/mL(OD_{600}=1.0)가 되도록 9K mineral salt 용액(pH 1.8)으로 희석한 종균액 90 mL(v/v=10%)와 celite beads 58 g(180 mL)을 airlift 반응기에 가한 후 pH가 1.8인 9K 배지를 총 부피가 900 mL가 되도록 넣어주었다. 이후 공기를 1 vvm의 속도로 공급하면서 41시간 동안 배양하였다. 반응기 온도는 30°C를 유지하였다.

고정화 세포 반응기

고정화 세포 반응기로는 자체 제작한 총 부피가 1.2 L인 airlift 반응기를 사용하였다(Figure 1). 본 반응기는 온도 조절을 위한 물 순환 장치가 있는 유리 반응기(내경 67.2 mm, 외경 85.7 mm, 높이 395 mm)로서, 공기와 celite beads 및 배지의 흐름을 일정한 방향으로 조절하기 위해 반응기내에 실린더형의 유리관(내경 30.6 mm, 외경 35.1 mm, 높이 249 mm)을 장착하였다. Celite beads의 유동을 원활하게 하기 위해 유리관 하단과 반응기 벽 사이에 0.5 cm 정도의 간격을 두었다. 유리관 하단부에 sintered glass air sparger를 장착하여 공기를 분산 공급해 주었다. 한편, 연속 조업시 유출액으로부터 celite beads를 분리하기 위해 decanter type의 고정화 세포 분리기를 유출액 라인에 설치하였다. 이는 Lee가(10) 개발한 것으로서, celite beads와 유출액의 밀도 차이에 의해 celite beads가 액으로부터 분리되도록 설계되어 있다.

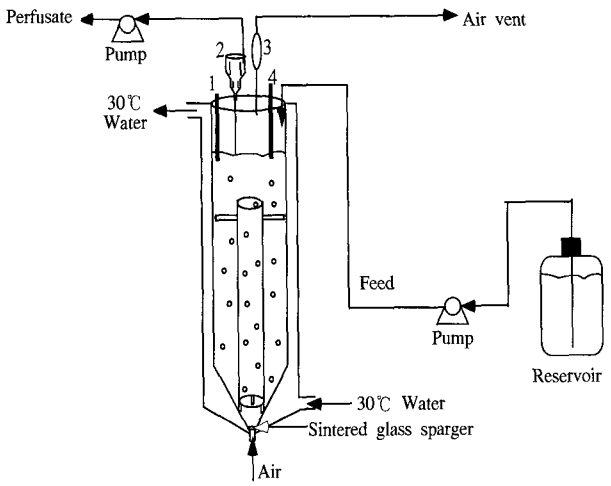


Figure 1. Schematic diagram of continuous operation in airlift reactor. (1, Redox potential probe; 2, Decantor; 3, Condenser; 4, DO probe)

고정화 세포를 이용한 반복 회분식 및 연속배양

세포고정화가 종료된 후, 반복 회분식 배양을 수행하였다. Celite beads를 제외한 반응기내 반응액을 peristaltic pump를 이용하여 뽑아내었고, 최종 선정배지인 M16 mineral salt 용액을 반응기에 채워 세척을 행하였다. 이 과정을 3번 반복하여 반응기에 남아있는 9K 배지 및 free cell들을 모두 제거하였다. 그 후 새로운 M16 배지(pH 1.8)를 반응기에 채워 회분식 배양을 수행하였다. 이때 총 조업 부피는 900 mL이었다. Fe(II)가 완전히 산화되었을 때 회분식 배양을 종료하였고, 한 단계의 회분식 배양이 끝날 때마다 3번의 세척 단계후 충전과정을 거쳐 다음 단계의 회분식 배양을 수행하였다. 회분이 반복됨에 따라 철산화 속도가 증가하였는데, 더 이상 철산화 속도가 증가하지 않을 때까지 회분식 실험을 반복하였다. 반복 회분식 배양이 종료됨과 동시에 연속 조업으로 전환하였다. 반복 회분식 배양과 연속 조업기간 동안 반응기의 온도는 30℃로 유지하였고, 공기는 1 vvm의 유속으로 공급하였다.

분석법

철 농도의 정량 분석을 위해 1,10-phenanthroline method (11)를 사용하였다. Fe(II) 농도 측정시, 원심분리(12000 rpm, 10 min)를 통하여 상등액중의 세포를 분리한 후 철 용액만을 채취하였다. 이를 증류수로 50배 희석하여 0.1 mL를 채취하였고 여기에 0.4 mL의 1,10-phenanthroline 용액과 2 mL의 증류수를 첨가하여 상온에서 10분간 발색시킨 후 UV/ VIS spectrophotometer(HP 8453, Hewlett-Packard Co., USA)를 사용하여 510 nm에서 흡광도를 측정하였다. Fe(total) 농도의 측정을 위해서는 환원력이 강한 환원제인 10% hydroxylamine hydrochloride 수용액을 사용하여 Fe(III)를 Fe(II)로 환원시킨 후 정량하였다. Fe(III) 농도는 Fe(total) 농도와 Fe(II) 농도의 차이로 계산하였다.

접종액의 세포내 단백질 농도 측정시, 원심분리(6000 rpm, 20 min)를 통하여 세포를 분리하고 0.1N NaOH 용액을 첨가해 주어 세포를 용리시킨 후 이를 물중탕(100℃, 25 min)시켰다. 그리고 나서 Bio-Rad DC Protein Assay(Bio-Rad laboratories, California, USA)를 이용하여 15분간 상온에서 발색시킨 후 UV/VIS spectrophotometer(HP 8453, Hewlett-Packard Co., USA)를 사용하여 750 nm에서 흡광도를 측정하였다.

Jarosite의 성분 분석을 위하여 EDX(Energy Diffractive X-ray)와 ICP(Induced Coupled Plasma)분석을 수행하였다. EDX 분석은 한국과학기술원내 SEM-EDX 분석실, ICP 분석은 기초과학지원연구소에 각각 위탁하였다.

결과 및 고찰

Jarosite의 성분 분석

Jarosite 생성 최소화 배지를 개발함에 앞서, 그 대상 물질인 jarosite의 성분을 확인하였다. 성분의 정성적인 분석을 위해 EDX 분석을 수행하였고, 정량적인 분석을 위해 ICP 분석을 수행하였다. 이들의 결과는 Figure 2와 Table 1에 각각 나타내었다. 두 분석 모두 주기율표 상의 Na 이하의 원자 번호를 갖는 원소들은 분석할 수 없는 이유로, jarosite중에 포함되었을 것으로 예상되는 NH_4^+의 농도를 분석할 수 없었다.

EDX 분석 결과로부터, jarosite를 구성하고 있는 주성분은 K, Fe, SO_4등임을 확인할 수 있었는데 이는 많은 문헌에서 보고된 결과와 일치하고 있다(5, 7, 12). 이는 ICP 분석 결과에서도 확인할 수 있었다. Jarosite 생성 메카니즘에서 알 수 있듯이, Fe와 일가 양이온의 이론적 양론비는 3 : 1이고 Fe와 S의 양론비는 3 : 2이다. 반면, ICP 분석 결과에서는 Fe와 S의 양론비는 5.64 : 4.21, 즉 Fe/S의 값으로 환산하면 1.34 이다. 이는 이론값인 1.5에 비해서 약간 낮으나 거의 이론값에 근접한 것임을 알 수 있다. 또한 일가 양이온의 경우 이론적 값에 비추어 보았을 때 jarosite중에 포함되어 있는 일가 양이온의 몰 수는 1.88 mmol이어야 한다. 실제값은 K의 몰수가 1.36 mmol로서 분석되지 않은 NH_4^+ 이온의 양을 고려한다면 이론치에 근접함을 예상할 수 있다. 이 결과로부터 칼륨 이온이 jarosite의 주성분임을 알 수 있었다. 이는 배지중의 일가 양이온, 특히 칼륨 이온이 jarosite의 생성을 촉진시킨다는 문헌의 보고(5, 7)와 거의 일치한다. 따라서 jarosite 생성 최소화 배지를 개발함에 있어 첫 번째로 배지중의 염 농도, 특히 칼륨이온과 SO_4^{2-}의 농도를 최소화 할 필요가 있다고 판단하였다.

Jarosite 생성에 미치는 염, 인 및 질소원의 영향

Jarostie의 생성을 최소화 할 수 있는 배지를 개발하고자함에 있어서, 첫째로, 배지중의 염 농도를 줄였을 때 이에 의한 Fe(II) 산화 거동 및 jarosite 생성에 대한 영향을 살펴보았고, 그 결과를 Figure 3에 도시하였다. 사용된 배지의 조성들은 Table 2에 나타내었다. Jarosite의 양은 초기 Fe(total) 농도와 최종 Fe(total) 농도의 차이로부터 추정될 수 있다. 결과에서 보듯이, 배지내의 염 농도를 성분에 따라서는 최고 500배까지 낮추거나 없애 보았으나 jarosite의 생성을 억제하지는 못하였다. 9K 배지에서의 결과와 비교해 볼 때, 배지중의 염 농도가 낮아지면서 Fe(total) 농도의 감소 현상은 많이 줄어들었으나, 그래도 상당량의 jarosite가 생성되었음을 알 수 있었다. 반면, Fe(II) 산화 속도는 조금 감소하였다.

후속 연구로써, 9K 배지의 질소원인 $(NH_4)_2SO_4$를, SO_4 성분을 포함하지 않는 질소원인 NH_4Cl, 암모늄 이온을 포함하지 않는 질소원인 HNO_3, 그리고 인 성분이 첨가된 질소원인 $(NH_4)_2HPO_4$ 등의 성분으로 각각 대체하여 이들에 의한 Fe(II) 산화 거동 및 jarosite 생성에 대한 영향을 고찰하였다. 사용된 배지들의 조성

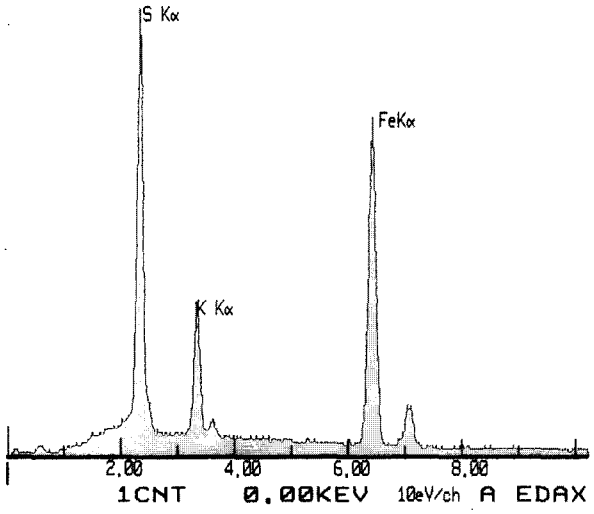
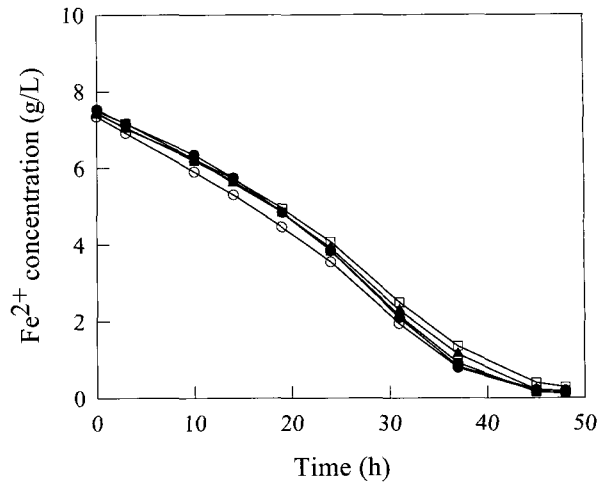


Figure 2. EDX spectra on the elemental composition of jarosite.

Table 1. Elemental composition of jarosite.

Element	Composition (weight %)	Concentration (mmol/g-jarosite)
Fe	31.5	5.64
S	13.5	4.21
K	5.32	1.36
P	0.1	0.03
Mg	9.87×10^{-4}	4×10^{-4}
Ca	7.61×10^{-4}	1.9×10^{-4}

은 Table 3에 도시하였고, 실험 결과는 Figure 4에 나타내었다. 질소원으로서 3 g/L의 HNO_3를 포함하는 배지에서는 균주가 거의 자라지 못하였는데, 이로부터 균주가 HNO_3를 질소원으로 사용하지 못하고 있음을 알 수 있었다. NH_4Cl을 질소원으로 사용한 배지에서는 상당량의 jarosite가 생성되었고 Fe(II) 산화 속도도 많이 감소하였다. 이는 배지중의 염화 이온이 다량 존재하고 있어 이들이 균주의 생장을 억제하였기 때문인 것으로 사료된다. 한편, 질소원으로 3 g/L의 $(NH_4)_2$ HPO_4를 사용했을 때, Fe(II) 산화 속도는 9K 배지와 비교하여 조금 감소하였으나 Fe(total) 농도가 초기 Fe(II) 농도와 거의 일치하고 있어 jarosite가 전혀 생성되지 않음을 알 수 있었다. 이 효과가 질소원의 변화에 의한 것인지, 또는 인산염 농도의 증가에 기인한 것인지를 확인하기 위해 인산염의 농도 변화에 따른 Fe(II) 산화 거동 및 jarosite 생성 변화를 살펴보았다(Figure 5). 대상 배지 및 그 조성들은 Table 4에 나타내었다. 결과에서 보듯이, 인산염의 농도가 높아질수록 Fe(II) 산화 속도가 조금씩 감소하는 것을 관찰할 수 있었다. 이는 인산염이 어느정도 세포 생장을 억제하기 때문인 것으로 판단된다. 반면, 인산염의 농도가 증가하면서 jarosite의 생성은 많이 억제된 것으로 나타났다. 따라서 철 산화 속도와 jarosite 생성 억제의 두 가지 측면을 고려하여 배지중의 인산염 농도를 최적화 할 필요성이 있었다. 이런 관점에서 볼 때, 배지중의 H_3PO_4 농도가 2 g/L일 때가 최적 농도인 것으로 판단되었다. 그 이상의 농도에서는 세포 생장이 많이 억제되어 철 산화 속도가 상당량 감소하였고, 그 이하의 농도에서는 상대적으로 많은 양의 jarosite가 생성되었다.



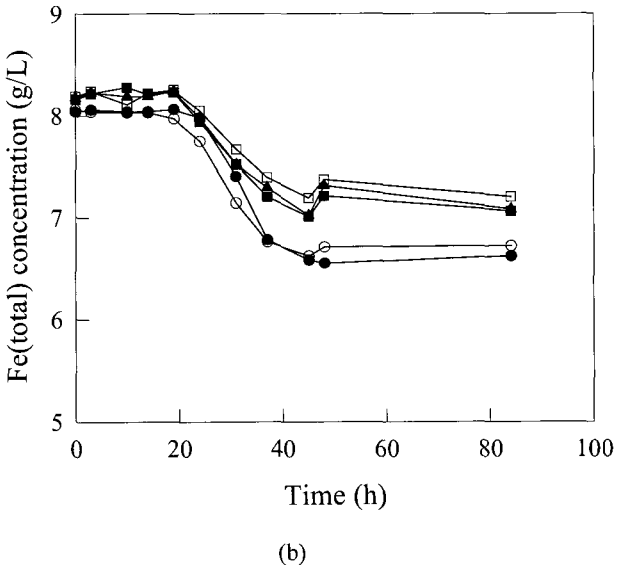


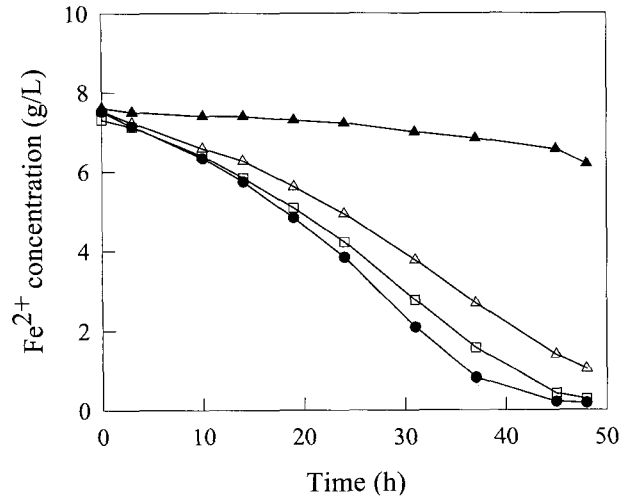
Figure 3. Effects of salt concentration on Fe(II) oxidation and jarosite formation. (● : 9K, ○ : M1, ■ : M2, □ : M3, ▲ : M4 medium)

Table 2. Media used for the study on the effects of salt concentration (g/L).

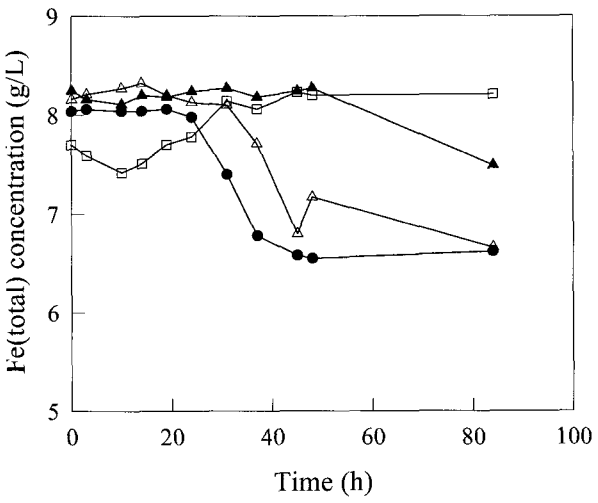
Composition	9K	M1	M2	M3	M4
$(NH_4)_2SO_4$	3	0.4	0.04	0.004	0.002
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.2	0.02	0.002	0.001
K_2HPO_4	0.5	0.4	0.04	0.004	0.002
KCl	0.1	-	-	-	-
$Ca(NO_3)_2$	0.01	-	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	45	45	45	45	45

M1 ; Grishin et al., *Appl. Environ. Microbiol.*, 1988

이상의 결과로부터, 인 및 질소원으로서 사용되는 $(NH_4)_2$ HPO_4의 농도를 최적화 함으로써 Fe(II) 산화 속도의 뚜렷한 감소 없이 jarosite의 생성을 상당량 억제할 수 있을 것으로 판단되었다.

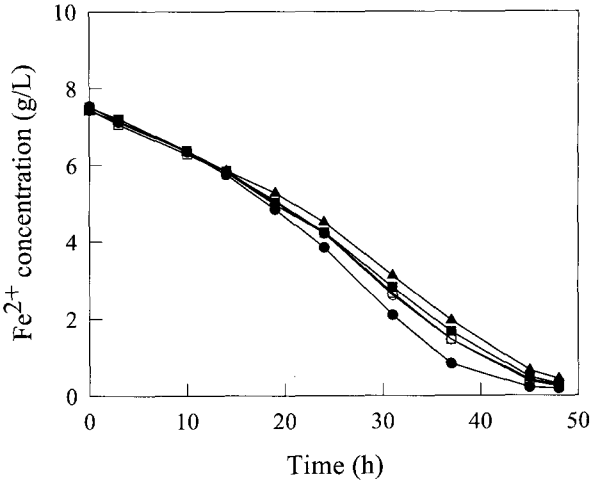


(a)

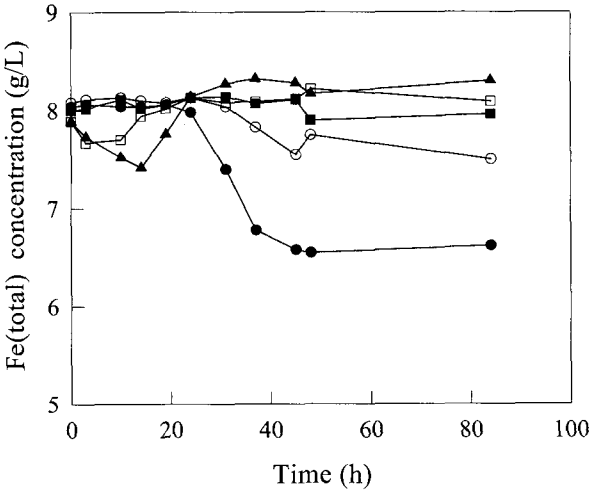


(b)

Figure 4. Effects of nitrogen sources on Fe(II) oxidation and jarosite formation. (● : 9K, □ : M7, ▲ : M8, △ : M9 medium)



(a)



(b)

Figure 5. Effects of phosphate concentration on Fe(II) oxidation and jarosite formation. (● : 9K, ○ : M10, ■ : M11, □ : M12, ▲ : M13 medium)

이런 관점에서, $(NH_4)_2HPO_4$의 농도 변화에 따른 Fe(II) 산화 거동 및 jarosite 생성 변화를 살펴보았고 그 결과를 Figure 6에 도시하였다. 대상 배지 및 그 조성들은 Table 5에 나타내었다. $(NH_4)_2HPO_4$ 농도의 증가에 따라 Fe(II) 산화 속도가 조금씩 감소하였고, 4 g/L 이상의 농도에서는 급격히 감소함을 알 수 있었다. 또한 $(NH_4)_2HPO_4$ 농도가 3 g/L 이상에서는 jarosite가 거의 생성되지 않았으나 그 이하에서는 상대적으로 많이 생성됨을 확인할 수 있었다. 이는 앞의 실험 결과들로부터 이미 예견되었던 결과로서, 결국 Fe(II) 산화 속도의 유지와 jarosite 생성 억제라는 두 가지 측면에서 볼 때, 인 및 질소원으로서 3 g/L의 $(NH_4)_2HPO_4$를 포함하는 M16 배지가 최적 배지임을 확인할 수 있었다.

결론적으로, 본 연구에서는 9K 배지와 비교시 jarosite 생성 억제 및 Fe(II) 산화 속도의 유지에 중점을 두었는 바, jarosite의 주성분으로 알려진 칼륨 이온과 SO_4^{2-}이온의 농도를 최소화하고 적정 농도의 인산염을 함유하는 jarosite 생성 최소화 배지인 M16 배지를 개발하였다.

Table 3. Media used for the study on the effects of nitrogen sources (g/L).

Composition	9K	M7	M8	M9
$(NH_4)_2SO_4$	3	-	-	-
$(NH_4)_2HPO_4$	-	3	-	-
HNO_3	-	-	3	-
NH_4Cl	-	-	-	3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.2	0.2	0.2
K_2HPO_4	0.5	0.5	0.5	0.5
KCl	0.1	0.1	0.1	0.1
$Ca(NO_3)_2$	0.01	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	45	45	45	45

Table 4. Media used for the study on the effects of H_3PO_4 concentration (g/L).

Composition	9K	M10	M11	M12	M13
$(NH_4)_2SO_4$	3	3	3	3	3
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2
K_2HPO_4	0.5	-	-	-	-
H_3PO_4	-	0.5	1	2	3
KCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$Ca(NO_3)_2$	0.01	-	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	45	45	45	45	45

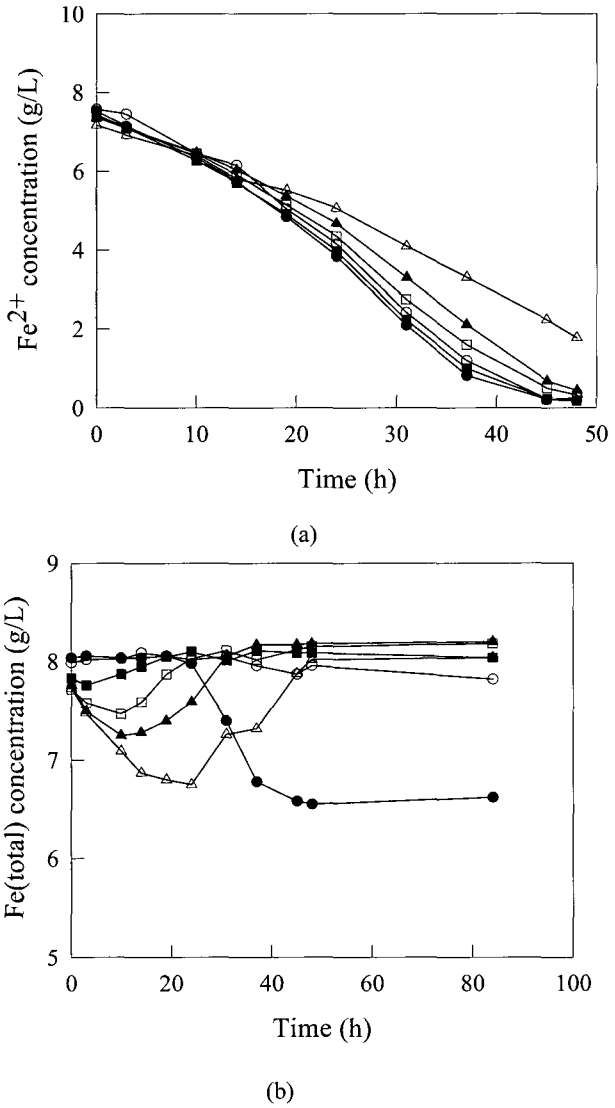


Figure 6. Effects of $(NH_4)_2HPO_4$ concentration on Fe(II) oxidation and jarosite formation. (● : 9K, ○ : M14, ■ : M15, □ : M16, ▲ : M17, △ : M18 medium)

초기 pH에 따른 철 산화 거동

이 실험에서는 jarosite 생성 최소화 배지(M16 배지)의 초기 pH에 따른 Fe(II) 산화 거동 및 jarosite 생성 변화를 고찰하였으며 그 결과를 Figure 7에 도시하였다. 초기 pH가 1.5인 경우,

Table 5. Media used for the study on the effects of $(NH_4)_2HPO_4$ concentration (g/L).

Composition	9K	M14	M15	M16	M17	M18
$(NH_4)_2SO_4$	3	-	-	-	-	-
$(NH_4)_2HPO_4$	-	1	2	3	4	6
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.5	0.2	0.2	0.2	0.2	0.2
K_2HPO_4	0.5	-	-	-	-	-
KCl	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1	0.1
$Ca(NO_3)_2$	0.01	-	-	-	-	-
$FeSO_4 \cdot 7H_2O$	45	45	45	45	45	45

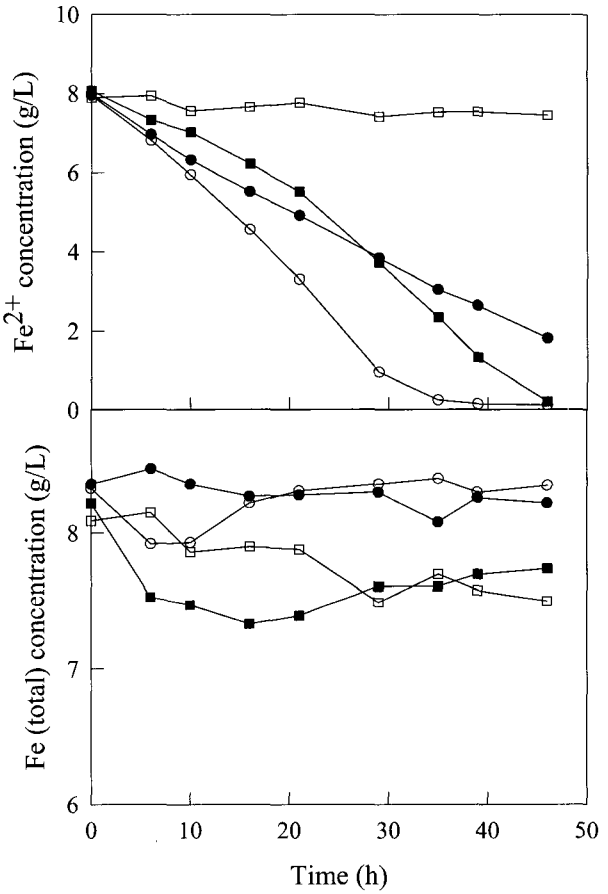


Figure 7. Effects of initial pH on Fe(II) oxidation in M16 medium. (● : pH 1.5, ○ : pH 1.8, ■ : pH 2.3, □ : pH 3.0)

Fe(II) 산화 속도가 상당히 감소하였다. 이는 낮은 pH로 인해 세포 생장이 억제되었기 때문인 것으로 사료된다. 또한 초기 pH가 2.3인 경우에도 Fe(II) 산화 속도가 많이 감소하였는데, 이는 인산염에 의한 세포 생장의 억제 때문인 것으로 판단된다. 그 이상의 초기 pH에서는 인산염이 세포 생장을 완전히 억제하고 있어서 Fe(II)의 산화가 거의 이루어지지 않았던 것으로 사료된다. 이는 9K 배지에 2.75 g/L 이상의 K_2HPO_4 첨가시 세포 생장이 완전히 억제된다는 Silverman의 보고(9)와 일치한다. 즉, M16 배지에서의 *T. ferrooxidans*에 의한 Fe(II) 산화의 경우, 배지의 초기 pH가 적정 pH(약 1.8) 이상이면, 인산염의 세포 생장 억제로 인해 Fe(II) 산화 속도가 많이 감소하는 것이고, 그 이하의 pH에

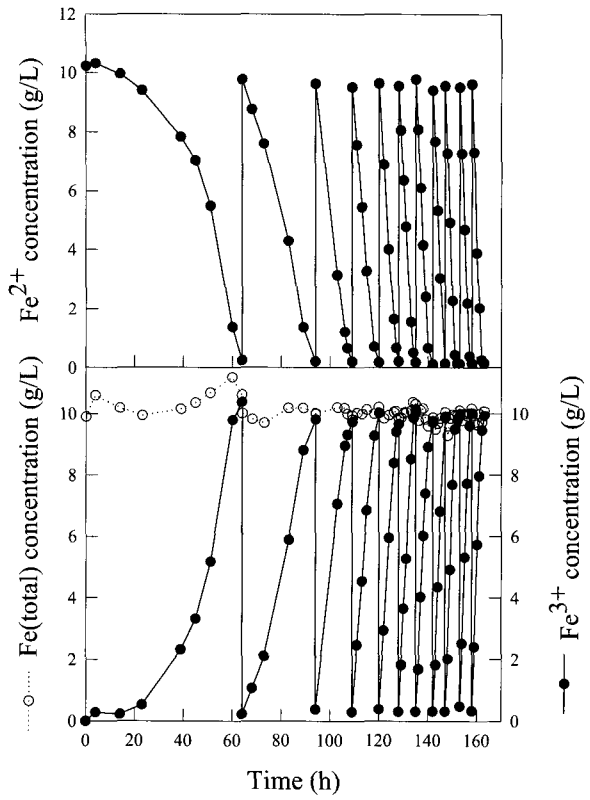


Figure 8. Fe(II) oxidation by immobilized cells in celite beads in repeated-batch operation using airlift reactor.

서는 그 자체가 세포 생장을 위한 조건을 제공해 주지 못함으로 인해 세포 생장이 억제되어 Fe(II) 산화 속도가 감소하는 것으로 해석된다. 이상의 결과로부터 초기 pH가 1.8인 M16 배지가 세포 생장 유지 및 jarosite 생성 억제를 위한 최적 배지임이 재확인되었다.

Airlift 반응기에서 고정화 세포를 이용한 반복 회분식 배양 및 연속배양

반복 회분식 배양에 앞서 celite beads내 세포 고정화를 수행하였다. 세포 고정화에는 Karamanev(13)에 의해 제안된 biofilm 생성 기작의 원리가 도입되었다. 즉, jarosite를 일단 생성시켜 이들이 celite beads의 표면에 biofilm이 원활히 형성될 수 있는 교두보를 형성하게 하고, 여기에 세포가 흡착되어 biofilm을 형성함으로서 celite beads내 세포의 고정화가 이루어지도록 하였다.

Airlift 반응기를 이용한 celite beads에 고정화된 *T. ferrooxidans*의 반복 회분식 배양 과정에서의 Fe(II) 산화 특성을 Figure 8에 나타내었다. 총 11번의 회분식 배양을 반복하였다. 첫 번째 회분에서는 64시간만에 약 10 g/L의 Fe(II)가 완전 산화되었고, 회분수가 증가함에 따라 Fe(II) 산화 시간이 현저하게 단축되어 아홉 번째 회분부터는 5시간만에 Fe(II) 산화 반응이 완료되었다. 반복 회분식 배양에서의 평균 Fe(II) 산화 속도를 Figure 9에 도시하였다. Fe(II) 산화 속도는 회분식 배양이 반복될 수록 계속 증가하다가 아홉 번째 회분부터 거의 일정한 값을 나타내고 있다. 첫 번째 회분에서는 산화 속도가 0.17 g/L · h이었고 아홉 번째 회분부터는 2.33 g/L · h로 유지되었다. 이는 첫 번째 회분보다 13.7배나 증가한 값이다. 회분이 반복될수록 철 산화

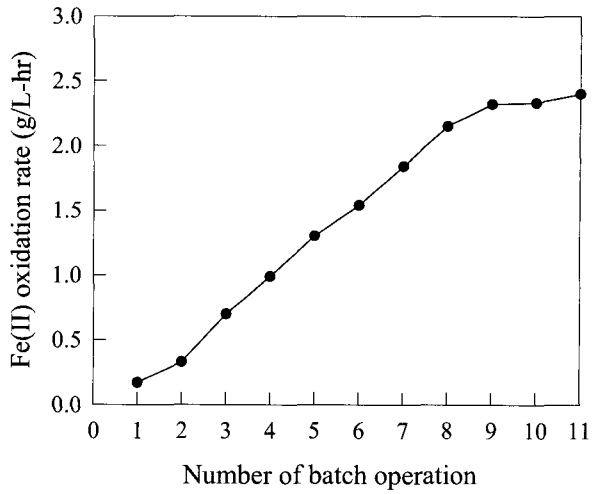


Figure 9. Rate of Fe(II) oxidation by immobilized cells in celite beads in repeated-batch operation using airlift reactor.

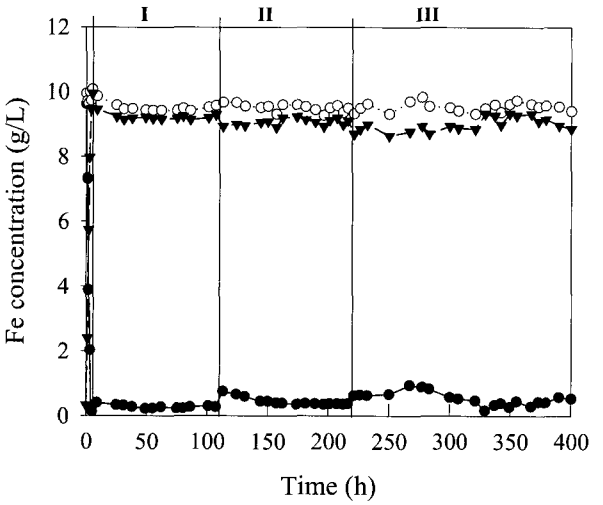


Figure 10. Fe(II) oxidation by immobilized cells in celite beads in continuous operation using airlift reactor. (● : Fe(II), ○ : Fe(total), ▼ : Fe(III) ; I, dilution rate = 0.1 h^{-1} ; II, dilution rate = 0.2 h^{-1} ; III, dilution rate = 0.25 h^{-1})

속도가 증가한 것은 고정화 세포의 농도가 계속해서 증가했기 때문인 것으로 사료된다. 배양기간 동안 jarosite는 전혀 생성되지 않았고, 따라서 Fe(total) 농도는 초기 Fe(II) 농도와 거의 같은 값으로 일정하게 유지되었다.

반복 회분식 배양이 종료됨과 동시에 연속 배양을 수행하였고 그 결과를 Figure 10에 나타내었다. 반복 회분식 배양을 통해 고정화 세포의 농도를 충분히 높인 결과 0.1 h^{-1}의 희석속도에서는 Fe(II) 산화가 95% 이상 이루어졌다. 이때의 최대 산화속도는 0.92 g/L · h이었다. 정상상태에 도달한 후, 희석속도를 0.2 h^{-1}로 증가시켰다. 배양 시작후 Fe(II) 산화속도가 조금 떨어지고 있음을 알 수 있는데, 이는 희석 속도의 증가에 따른 영향으로서 고정화 세포가 새로운 희석속도에 적응하는 transition period에 해당한다. 이 기간이 지나면서 새로운 정상 상태에 도달하였고, 이 때의 최대 산화속도는 1.82 g/L · h이었다. 희석속도가 0.25 h^{-1}로 증가하였을 때도 이와 비슷한 결과를 나타내었고 최대 산화속도는 2.14 g/L · h이었다. 이러한 결과로부터, 고

정화 세포에 의해 Fe(II) 산화가 원활히 이루어지고 있었음을 알 수 있었다.

또한 Fe(total) 농도가 거의 일정하게 유지되고 있는 결과로부터 jarosite가 거의 생성되지 않고 있음을 알 수 있었다. 많은 문헌에서 보고되었듯, jarosite는 반응기 및 펌프, 라인 등을 막아 조업을 불가능하게 한다. 일례로, Kim등은(2) 9K 배지에서 depth filter에 고정화된 세포를 이용하여 연속조업을 수행하였으나 조업 기간중 다량의 jarosite가 생성되어 더 이상 연속조업을 수행하지 못하였다. 그러나 본 연구에서는 연속조업 기간동안 jarosite가 거의 생성되지 않았고, 따라서 jarosite로 인한 공정상의 문제점은 전혀 나타나지 않았다. 따라서 본 연구의 결과 개발된 jarosite 생성 최소화 배지인 M16배지와 고정화 세포 반응기 시스템은 철산화 속도 증진에 있어서 효과적이고 안정적인 장기 연속조업을 가능하게 하였다.

요 약

본 연구는 황화수소 가스 제거를 위한 화학·생물학적 복합공정의 전체 효율을 결정하는 생물반응기에 의한 Fe(II) 산화 속도를 증진시키고자 배지 최적화와 함께 고정화 세포 반응기 시스템을 개발하는 것을 목표로 하였다. 고정화 담체로는 celite beads를 선정하였고 반응기는 airlift type의 반응기를 사용하였다. 먼저, 철 침전물(Jarosite) 최소화 배지 개발을 위한 연구를 수행하였고, 그 결과 기존에 사용되어졌던 9K 배지 사용시 질소원 및 인 공급원으로 사용된 $(NH_4)_2SO_4$와 K_2HPO_4가 제외되고 $(NH_4)_2HPO_4$가 대체된 M16 배지를 사용하였을 때 Fe(II) 산화 속도의 감소가 없음은 물론 jarosite 생성이 거의 없음을 확인할 수 있었다. 또한 M16 배지의 초기 pH 변화에 따른 철 산화 거동 및 jarosite 생성 측면을 조사한 결과 초기 pH 1.8이 최적임을 확인할 수 있었다. 다음으로 celite beads에 세포를 고정화 한 후 jarosite 생성 최소화 배지(M16 배지)에서의 고정화 세포에 의한 철 산화 거동을 고찰하였다. 반복 회분식 배양 결과, 회분식 배양이 반복 될수록 철 산화 속도가 계속 증가하다가 최대 Fe(II) 산화 속도에 이르러서는 거의 일정해지는 결과를 보였다. 반복 회분식 배양의 결과 최대 Fe(II) 산화 속도가 2.33 g/L·h이었다. 연속 조업을 수행한 결과 현탁 세포의 최대 비성장 속도보다 높은 희석속도에서 최대 Fe(II) 산화 속도가 결정되었다. 최대 Fe(II) 산화 속도는 2.14 g/L·h이었으며, 이때의 희석속도는 0.25 h^{-1}이었다. 반복 회분식 및 연속 조업기간 동안 Fe(total)의 농도는 초기 Fe(II) 농도와 거의 비슷하게 유지되었고 이러한 사실로부터 jarosite가 거의 생성되지 않았음을 확인하였다.

감 사

본 연구는 1997년도 교육부 생물화학공학 학술연구조성비 지원사업(과제번호: 997-020-E0002)에 의한 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Jensen, A. B. and C. Webb (1995), Treatment of H_2S-containi ng Gases: A Review of Microbial Alternatives, *Enzyme Micr obiol. Technol.*, **17**, 2-10.
2. Kim, C. J., T. H. Lee, and Y. K. Chang (1997), Ferrous Iro n Oxidation by Immobilized Cells in H_2S Removal Proces s Using Ferric Sulfate and Microorganism, *Korean J. Biotechno l. Bioeng.*, **12**, 565-570.
3. Satoh, H. and T. Shiratori (1990), Method of Treating H_2S Containing Gases, US Patent, 4,931,262.
4. Satoh, H., J. Yoshizawa, and S. Kametanl (1988), Bacteria Help Desulfurize Gas, *Hydrocarb. Process. Int. Ed.*, **76**, 76D-76 F.
5. Jensen, A. B. and C. Webb (1995), Ferrous Sulfate Oxidati on Using *Thiobacillus ferrooxidans*: A Review, *Proc. Bioche m.*, **30**, 225-236.
6. Grishin, S. I. and O. H. Tuovinen (1988), Fast Kinetics of Fe^{2+} Oxidation in Packed-Bed Reactors, *Appl. Environ. Microbiol.*, **5 4**, 3092-3100.
7. Grishin, S. I., J. M. Bigham, and O. H. Tuovinen (1988), Chara cterization of Jarosite Formed upon Bacterial Oxidation of Ferrous Sulfate in a Packed-bed Reactor, *Appl. Environ. Mic robiol.*, **54**, 3101-3106.
8. Armentia, H. and C. Webb (1992), Ferrous Sulfate Oxidati on Using *Thiobacillus ferrooxidans* Cells Immobilised in Poly urethane Foam Support Particles, *Appl. Microbiol. Biotechno l.*, **36**, 697-700.
9. Silverman, M. P. and D. G. Lungren (1959), Studies on the Chemoautotrophic Iron Bacterium *Ferrobacillus ferrooxidans*, I. An Improved Medium and a Harvesting for Securing High Cell Yields, *J. Bacteriol.*, **77**, 642-647.
10. Lee, T.-H. (1997), Development of two stage continuous fermen tation process for cyclosporin A production by using immobi lized fungal cell, *Tolypocladium inflatum*, Ph. D. Thesis, Dep t. of Chem. Eng., KAIST, Taejon.
11. Vogel, AI (1989), Textbook of Quantitative Chemical Analysi s, 5th ed., Longman, London.
12. Lazaroff, N., W. Siegal, and A. Wasserman (1982), Iron oxidati on and precipitation of ferric hydroxysulfates by resting *Thio bacillus ferrooxidans* cells, *Appl. Environ. Microbiol.*, **43**, 92 4-938.
13. Karamanev. D. G. (1991), Model of the Biofilm Structure of *Thiobacillus ferrooxidans*, *J. Biotechnol.*, **20**, 51-64.