

## Curdlan과 활성탄을 이용한 미생물 고정화 담체개발

손 호 진 · 박 양 호 · 권 규 혁 · † 이 중 현  
조선대학교 화학공학과  
(접수 : 2003. 5. 30., 게재승인 : 2003. 6. 27.)

## Development of Supporting Materials with Curdlan and Activated carbon for Microbial Immobilization

Hyo-Jin Son, Yang-Ho Park, Kyu-Hyuk Kwun and Jung-Heon Lee†  
Department of Chemical Engineering, Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
(Received : 2003. 5. 30., Accepted : 2003. 6. 27.)

The microbial immobilization media with curdlan and activated carbon which has great immobilization capacity has been developed. Characteristics of porosity and mechanical strength of this support media are dependent on manufacturing method. The support media showed the best cell immobilization performance when the ratio of curdlan and activated carbon was 30 g/L to 6 g/L in this study. The immobilization of iron-oxidizing bacteria on the supporting particles was photographed with a scanning electron microscope. Since cell concentration on the surface of supporting particle increased with the reaction time, the iron oxidation rate also increased.

**Key Words :** Immobilization particle, Microbial immobilization, H<sub>2</sub>S removal

### 서 론

고농도 세포 배양을 위하여 담체를 이용한 미생물 고정화 기술이 요구되고 있고 각 연구기관에서 많은 연구가 되고 있다. 담체에 미생물을 고정시켜 사용하는 생물학적 처리방법은 반응기내 높은 미생물농도를 유지할 수 있으므로 처리효율이 증가하고 처리시간이 단축된다(1). 따라서 기존의 반응기 크기를 축소시켜도 같은 처리 능력을 가질 수 있게 되어 소형화, 고성능화를 요구하는 현대의 추세에 부응 할 수 있다. 또한 담체 입자에 미생물이 고정되어 있으므로 외부로 유출되지 않고, 담체 입자로부터 미생물을 분리시킬 수 있으므로 재생가능성이 높은 장점을 가지고 있다(2-6). 이러한 많은 장점 때문에 담체에 미생물을 고정화하여 환경오염물 처리효율을 향상시키기 위한 각종 담체에 대한 관심이 높아지고 있으며, 많은 종류의 담체가 제품으로 생산되고 있고, 또한 개발되고 있으며, 고정화 세포를 이용한 생물공학 산업과 생물학적 처리 공정에 유용하게 이용되고 있다(7). 담체에 미생물을 부착시키는 방법은 다른 방법에 비하여 많은 이점을 가지고 있다. 즉, 고정화 비용이 낮고, 담체에 부착되어 있는

미생물의 생존력과 높은 활성도를 유지할 수 있고, 재생 가능성이 높으며, 또한 기질과 생성물의 전달에 따른 확산 저항이 매우 낮다(8). 미생물이 쉽게 부착 성장되고 상용화될 수 있는 담체는 가급적 다음의 조건을 만족해야 한다. 미생물이 쉽게 부착 성장하여야 하고, 미생물이 충분히 부착될 수 있도록 넓은 비표면적과 다공성을 가져야 한다. 유체 흐름에 대한 저항성이 적고, 화학적 생물학적 및 물리적 변화에 대해서 안정성이 높아야 하고, 휘, 파괴 및 마찰에 대한 충분한 기계적 저항과 내구성이 있어야 한다. 또한 부유 미생물을 충분히 포획할 수 있을 정도로 용량이 크고, 가격이 낮고 공급이 안정되며, 제작이 용이해야 한다. 또한, 적절한 다공성을 가지면서 담체표면의 단면적을 크게 하여 접촉비율이 커서 미생물이 잘 부착될 수 있는 조건과 내구성을 만족시키는 것이 중요하다(5, 9).

최근 미생물고정화 담체로 세라믹, 섬유, 합성물질, 플라스틱 등을 소재로 만든 담체가 적용되어 왔다(10, 11). 이들 담체 중 세라믹은 내화특성과 강도가 우수하고 내구성이 우수하며 큰 비표면적의 다공성 담체를 제조하기 용이한 장점이 있어 최근에 미생물 담체로 가장 각광받고 있다. 세라믹 담체 제조방법으로 연소법, 압출법, 졸-겔법, 고분자-스핀지법 등이 있으나 담체의 모양이나 조성, 밀도의 조절이 용이한 장점 등을 가진 연소법과 발포법이 많이 이용되고 있다(12). 그러나 이들 고성능 담체를 얻기 위해서는 원소재와 첨가제를 혼합하여 성형 및 소결하여 제조하는 공정에서 첨가제가

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,  
Chosun University, Gwangju 501-759, Korea  
Tel : 062-230-7159 Fax : 062-230-7866  
E-mail : leejh@mail.chosun.ac.kr

2종류 이상이며, 고온 고압에서 운전하므로 운전 및 동력비가 많이 든다. 그리고 제조 공정이 다소 복잡하며, 담체가 완성되는 시간이 많이 걸린다. 또한, 대부분의 담체들이 반영구적일 뿐만 아니라, 무기물이므로 처리시 2차적인 환경오염 문제점을 야기 시킬 수 있다. 때문에 성능이 우수하면서 가격이 싼 담체의 보급이 절실한 상황이다.

미생물 다당류인 커들란은 고온에서 겔을 형성하여 낮은 온도에서도 이러한 형태를 유지한다. 겔화 된 커들란을 냉동 건조시킬 경우 부피는 동일하면서 수분 증발로 인하여 내부에 수많은 공극이 생겨 단위 질량 당 표면적을 증가시켜준다. 커들란 자체가 식품용으로 개발되어 있기 때문에 식품용의 담체로도 활용이 가능하다(13, 14). 또한, 커들란은 생분해성 고분자이므로 이를 이용한 담체는 2차적인 환경문제를 해결할 수 있을 것이다. 그리고 활성탄은 표면에 존재하는 탄소 원자의 관능기가 주위의 액체 또는 기체에 인력을 가하여 피흡착질의 분자를 흡착하는 성질이 있어 환경(대기, 수질), 식품공업 등 제반산업 분야에서 Filter, 탈색, 탈취, 용제 회수, 가스제거 등 다방면에 활용되고 있다.

본 연구에서는 입자의 비표면적이 크고 부착성이 우수하며, 경제적인 담체를 개발하기 위하여 생물고분자인 커들란과 흡착력이 우수한 활성탄을 혼합하여 담체를 만들어 공극률과 흡착면적을 높이고, 흡착제의 표면적과 강도를 커들란의 농도를 이용하여 제어할 수 있는 새로운 담체를 개발하였다. 담체 제조 방법과 고정화 방법에 따라 담체의 특성을 실험하고 이를 통하여 담체로서의 가능성을 고찰하였다.

## 재료 및 방법

### 담체 제조

본 연구에서 새로운 담체를 만들기 위해 생물고분자인 커들란 (Takeda Chemical, Japan)과 활성탄 (American Norit Co.)을 사용하였다. 커들란과 활성탄의 조성비(Table 1.)를 다르게 하여 담체를 제조하였다. 커들란의 양을 각각 달리하여 증류수 500 mL에 넣은 후 2 N NaOH를 넣어 녹인 후 각각의 용기에 활성탄 6 g/L를 첨가하여 혼합한다. 여기에 2 N HCl을 넣어 중화시킨다. 이 시료를 항온조 (100℃, 30 min: Labtech LCB-110)와 Autoclave (121℃, 1 atm, 15 min: Dasol DS-60A)에서 열처리한다. 겔이 된 담체를 식힌 후 대략 5 mm × 5 mm의 크기로 만든 후 초저온조 (-70℃, 삼원 냉열 엔지니어링)에서 3시간 이상 급냉각 시켜준다. 이로부터 얻어진 커들란·활성탄 담체를 냉동건조기 (-78.5℃, 삼원 냉열 엔지니어링)를 이용하여 동결 건조 시켜 상온에서 습기와 접촉하지 않게 보관한다.

Table 1. Particle composition and manufacturing processes

	Water bath(100℃, 30min)		Autoclave(1atm, 121℃, 15min)	
	Curdlan	Activated carbon	Curdlan	Activated carbon
1	30g/L	6g/L	30g/L	6g/L
2	40g/L	6g/L	40g/L	6g/L
3	50g/L	6g/L	50g/L	6g/L

### 사용균주

미생물 고정화 실험에 사용된 균주는 철산화 균인 *Thiobacillus ferrooxidans* (ATCC 19859)이다. 세포 성장을 위해 철 이온과 환원된 무기화합물을 산화하여 에너지를 얻는 이 균주를 초기 pH 1.8로 조절한 Silverman(15)의 9K 배지를 균주 배양에 사용하였다. 300 mL 삼각플라스크에 150 mL의 배지를 넣고 접종액을 10% (v/v)접종하고, 온도는 30℃를 유지하며 교반 속도는 200 rpm으로 유지하면서 3일간 배양한다. 배양 후 배양액을 여과지 (Whatman No. 2)를 이용하여 두 번 걸러내었다. 걸러진 용액을 원심분리 (6,000 rpm, 20 min)하여 균체를 회수하고, mineral salt용액으로 현탁한 후 이 과정을 되풀이 한 후 FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O가 없는 9 K mineral salt용액 (pH 1.8)에 현탁 보관하여 (at 4℃) 접종원으로 사용하였다. Silverman의 9 K 배지를 사용할 경우 jarosite가 많이 생기는 단점 때문에 미생물 고정화에 쓰이는 배지로는 Kim(16)에 의해 개발된 초기 pH를 1.8로 조절한 M 16배지를 사용하였다.

### 미생물 고정화

미생물을 고정화하는 방법으로는 담체를 유동화 시키면서 고정시키는 유동상식법과 담체를 Reactor 내에 충전시켜 미생물을 고정화시키는 고정상식법이 있다. 본 실험에서 고정화 담체를 충전할 수 있는 250 mL의 실린더형 유리관 (Packed-bed type)을 사용하였으며 2 L 규모의 유동층 반응기에서 반응물을 연속적으로 순환시켜 미생물의 고정화를 유도하였다. 본 연구에서 유동층 반응기와 고정화 담체 충전형 반응기 온도는 30℃로 일정하게 유지하였다. 반응물은 peristaltic pump (speed : 200 mL/hr)를 사용하여 유동층 반응기와 충전층 반응기에 순환시키면서 세포를 고정화시키는 방법을 사용하였다. MFC (Mass flow controller : GFC-1109)를 이용하여 주입하는 공기량을 조절하고, 담체 내 세포 고정화 시 9 K mineral salt 용액 (pH 1.8)으로 희석한 종균액 200 mL (v/v=10%)을 유동층 반응기에 가한 후 pH가 1.8인 M 16배지를 총 부피가 2 L가 되도록 넣어주었다(16). 먼저 유동층 반응기 내에 100 mL의 담체를 넣은 후 bubble과 함께 유동하면서 미생물 고정화 실험을 시행하였다. 다음은 유동층 반응기 옆 담체를 충전할 수 있는 250 mL 실린더에 100 mL 담체를 넣어주고, 펌프를 이용하여 유동층 반응기내 배지를 충전층에 있는 담체를 통과하면서 미생물이 고정화될 수 있게 순환시키면서 60시간 동안 배양 하였다. 시간에 따른 미생물 고정화의 변화를 측정하기 위하여 반복 회분식을 이용한 세포 고정화 방법을 이용하였다.

### 분석 및 측정

담체의 표면 특성을 알아보기 위하여 담체에 전기 도금 피복과정을 거쳐 표면의 상태를 전자주사현미경 (SEM : Jeol JSM-840A)에서 관찰하였다. 레오메타 (Compac-100)를 이용하여 load cell 1 kg, table speed 60 mm/min의 조건에서 담체의 압축강도 (g/cm<sup>2</sup>)를 측정하였다. 담체의 팽윤도는 먼저 건조무게를 측정하고 증류수에 담지시켜 3시간 이상 가열하여 꺼낸 후 담체 표면의 물기를 제거하여 무게를 재고, 건조상태의 무게를 뺀 후 그 무게를 건조무게로 나눈다. 그리고

담체에 부착된 미생물의 성장 특성을 알아보기 위한 반응 전·후의 철산화 정도를 분석하였다. Fe(II) 농도를 측정 시, 시료에 포함된 세포와 침전물을 제거하기 위해 6000 rpm에서 20분간 원심분리한 후 상등액을 채취하였다. 이 상등액을 증류수로 10배 희석하여 0.1 mL에 O-phenanthroline 시약을 0.4 mL를 넣은 후 증류수 2.5 mL을 첨가하여 총 3 mL로 하여 상온에서 10분간 발색시킨 후 UV/VIS Spectrophotometer (Shimazu UV-1201)를 이용하여 560 nm에서 흡광도를 측정하였다. 총 철농도의 측정은 환원력이 강한 환원제인 10% hydroxylamine hydrochloride 수용액을 사용하여 Fe(III)를 Fe(II)로 환원시킨 후 정량하였다. Fe(III)는 철의 전체 농도와 Fe(II)의 농도차로 계산하였다.

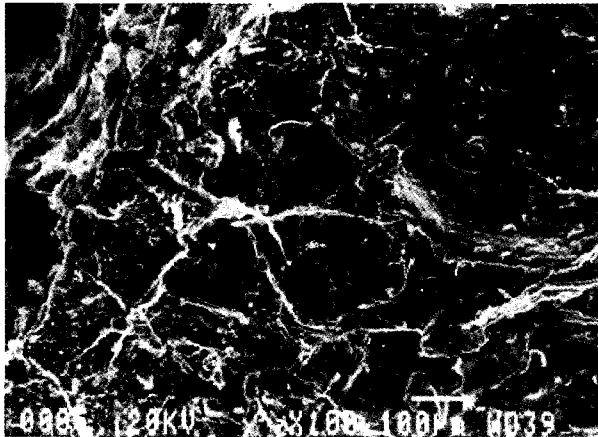
**결과 및 고찰**

**제조방법에 따른 담체의 특성**

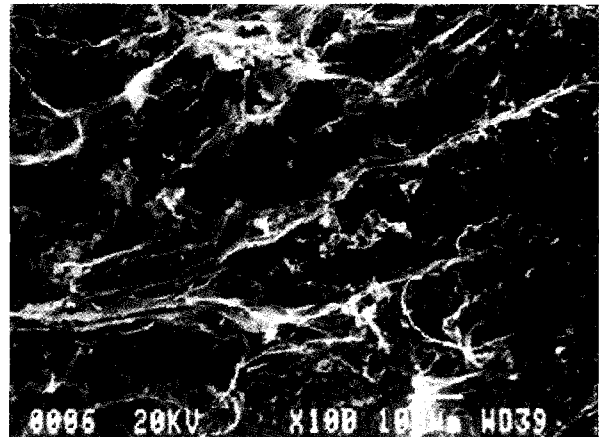
생물고분자인 커들란과 활성탄 담체는 고온 (80℃ 이상)으

로 가열하면 탄력이 있고 내구성이 향상된 겔을 형성하여 상온에서도 이러한 형태를 유지한다. 겔이 된 담체는 원하는 모양과 크기로 가공하기 쉽고 가공된 담체를 냉동 건조 시킬 경우 부피는 동일하면서 수분 증발로 인하여 내부에 수많은 공극이 생겨 단위 질량 당 표면적이 증가하여 성능이 우수한 담체가 완성되었다.

담체를 제조하는 방법을 다르게 [항온조 (80℃, 100℃, 30min)와 Autoclave (1atm, 121℃, 5min, 15min)] 하여 실험한 결과, 제조 조건에 관계없이 커들란의 양이 증가할수록 담체의 강도는 증가하지만 표면 거칠기와 기공율은 감소함을 보였다. 항온조에서 가열한 담체는 80℃와 100℃에서 실험하였는데 80℃에서 가열한 담체는 탄력성이 떨어지고 약간 부서지는 현상을 보였다. 100℃에서 가열한 담체는 탄력성과 균기 정도는 우수한 편이나 가열 시간이 오래 걸릴 뿐만 아니라, 가공의 수가 많지 않았다. Autoclave를 이용하여 제조한 담체의 경우에는 가열 시간에 따라 특성이 달라지는데, 5분과 15분에서 비교하였다. 15분 동안 가열한 담체의 강도는

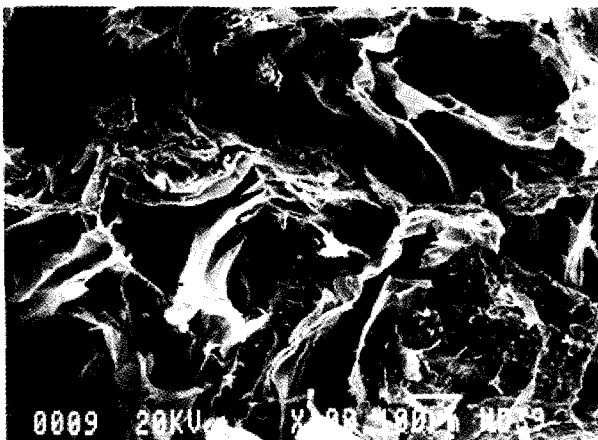


(a)

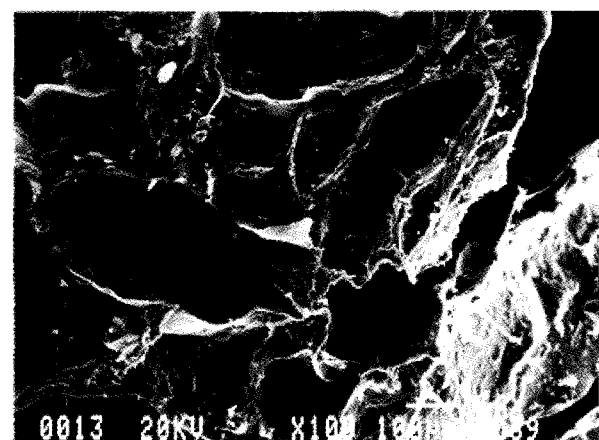


(b)

**Figure 1.** Effect of curdlan to activated carbon ratio on particles manufactured in a boiled water for 30 min. (a) Curdlan 30 g/L and activated carbon 6 g/L (b) Curdlan 50 g/L and activated carbon 6 g/L.



(a)



(b)

**Figure 2.** Effect of curdlan to activated carbon ratio on particles manufactured in a autoclave(1 atm, 121℃) for 15 min. (a) Curdlan 30 g/L and activated carbon 6 g/L (b) Curdlan 50 g/L and activated carbon 6 g/L.

5분 동안 가열한 담체보다 좋지만 갈라지는 현상을 보였다. 전체적으로는 15분 동안 가열한 담체가 5분 동안 가열한 담체보다 탄력성이나 강도 등이 우수함을 보였다. 기공 특성을 보면 Autoclave에서 가열한 담체의 기공 수가 항온조에서 가열한 조건보다 더 우수하였다. 기공율은 항온조 100℃와 Autoclave 121℃, 15 min에서 제조한 담체를 SEM 촬영을 통해 비교하였다(Fig. 1과 Fig. 2).

### 담체 조성에 따른 담체의 특성

생물고분자이므로 인체에 해가 없고 온도가 높을수록 단단해지며, 다공성이 많은 커들란의 특성과 흡착능력이 우수한 활성탄을 이용하여 담체로서의 물성을 실험하였다. 몇 가지 종류의 제조 담체 중에서 성형성, 건조강도, 다공성을 측정하여 담체로서의 물성이 우수한 담체를 선정하여 미생물 부착 성능을 실험하였다. 커들란 양이 많으면 균기의 정도는 우수하지만 흡착력이 약간 감소함을 보인다. 반면 활성탄의 양을 늘리면 흡착력은 우수하지만 반응기내에서 뿐만 아니라 밖에서 부서지는 현상이 관찰되었다. 담체의 비표면적(BET)은 52.63 m<sup>2</sup>/g이며, 본 실험의 담체를 증류수에 담가놓은 결과 시간이 지남에 따라 팽윤도가 높아지는데 본 실험에서는 담체가 완전히 수분흡수한 후의 팽윤도를 측정한 결과 평균 17(w/w)이다. Fig. 2의 (a)에서 보는 바와 같이 저배율에서 5~200 μm 정도인 기공이 관찰되며 미생물이 흡착할 수 있는 넓은 비표면적을 가지고 있고, 활성탄으로 인한 흡착력이 우수한 담체임을 알 수 있었다.

### 세포 고정화

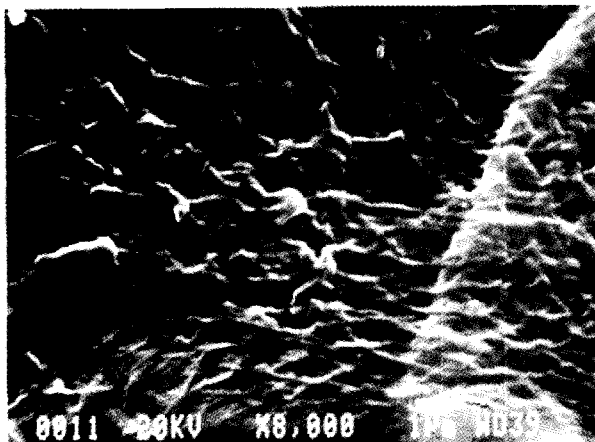
유동층 반응기 실험에서 미생물 고정화의 어려움으로 담체를 컬럼에 충전하고 미생물이 들어있는 배지를 담체 표면으로 순환시키면서 미생물을 고정화시키는 packed-bed 반응기를 사용하여 실험을 수행하였다. 그 결과 다소 반응은 느리지만 미생물의 고정화가 잘 이루어지고, 비표면적이 넓어 이를 반복 실험함으로써 담체에 고농도의 미생물이 고정화됨을

확인할 수 있었다. 미생물의 성장 과정에서 Fe(II)이 Fe(III)로 산화되면서 pH가 낮아지는데 초기 pH 1.8에서 pH 1.87로 미세 증가하였다가 균주 최대 성장(Fe(II) 최소)시 약 pH 1.6으로 감소하였다. pH 1.5 이하에서는 균주의 활성이 다소 떨어지는 특성이 있지만 본 실험에서는 큰 영향을 미치지 못하였다. 따라서 pH control의 필요가 없었고, 충전층 반응기를 이용함으로써 담체 및 미생물을 회수하는데 기존의 공정보다 간단해졌다.

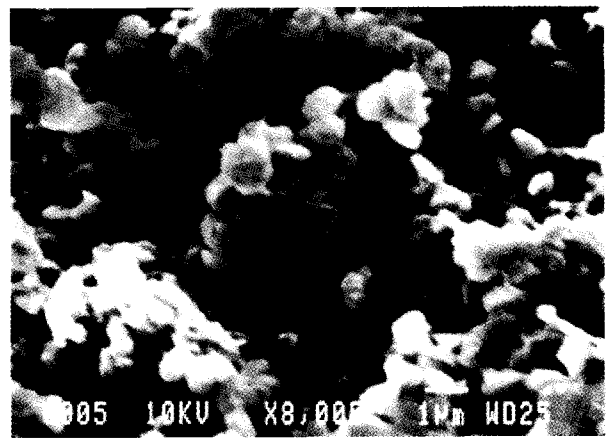
### 반응시간에 따른 미생물 고정화

담체의 흡착력을 알아보기 위하여 먼저 bubble column reactor에서 담체를 유동화 시키면서 미생물 고정화 실험을 수행 하였다. 유동하는 상태에서는 흡착력의 변화는 거의 없지만 시간이 증가할수록 담체가 활성탄과 커들란이 분리되면서 깨지는 현상을 보여 담체를 고정시키고 배지를 흘려보내는 packed-bed batch 방법을 사용하여 반복 회분식 방법으로 미생물 고정화 실험을 수행하였다.

반복 회분식 고정화 동안 담체 표면에 미생물이 부착되는 것을 알아보기 위하여 주사전자현미경으로 촬영하였다. 미생물이 부착되기 전의 담체 표면과 미생물이 부착된 후의 담체 표면을 Fig. 3에 보였다. 미생물 고정화 전의 담체 표면은 깨끗한데 반응시간이 경과할수록 미생물의 부착이 많아짐을 알 수 있다. 미생물의 부착정도는 반복적인 철 산화과정에서 철의 산화 속도가 증가하는 현상을 관찰할 수 있었다. 담체에 고정된 철산화 세균인 *Thiobacillus ferrooxidans*의 반복 회분식 배양 과정에서의 Fe(II) 산화 특성(Fig. 4)으로 미생물의 고정화 정도를 측정 할 수 있다. 첫 번째 회분에서는 60시간 만에 약 9 g/L의 Fe(II)이 완전 산화되었고, 회분수가 증가함에 따라 Fe(II) 산화가 현저하게 단축되어 네 번째 회분부터는 약 23시간 만에 Fe(II)이 완전히 산화되었다. 시간이 지날수록 철 산화 속도가 증가한다는 것은 담체에 고정화된 미생물의 농도가 계속해서 증가하기 때문이다.



(a)



(b)

Figure 3. Surface of supporting particles before and after cell immobilization (a) before cell immobilization (b) 3 days after immobilization.

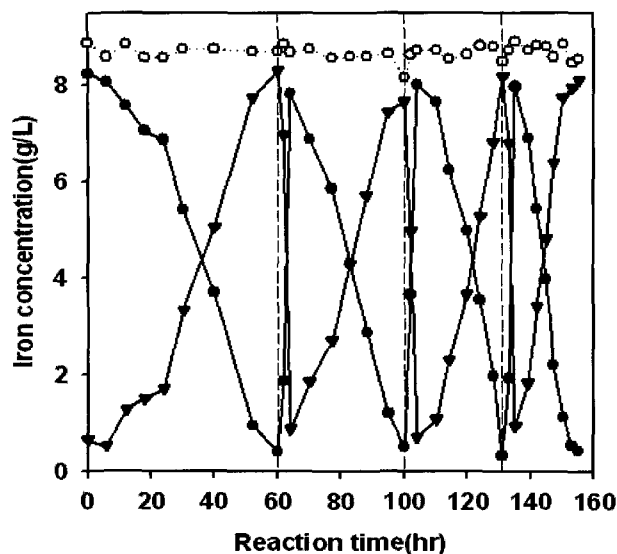


Figure 4. Fe(II) oxidation by *Thiobacillus ferrooxidans* in an iron oxidation reactor with repeated fedbatch operation (Packed bed type immobilized cell reactor was used) ● : Fe(II), ▼ : Fe(III), ○ : Fe(total).

요약

커들란과 활성탄의 조성을 몇 가지로 나누어서 실험한 결과 커들란 30 g/L과 활성탄 6 g/L의 비로 제조하여 Autoclave (121℃, 1 atm, 15 min)에서 가열한 담체의 물성이 다공성 특성 및 세포의 고정화 측면에서 우수함을 보였다. 충전층 반응기를 설치하여 담체를 고정시킨 후 미생물 부착 능력을 실험한 결과, 철 산화 세균에 의하여 시간이 증가할수록 철 산화 속도가 빨라지고, 이 과정을 주사전자현미경으로 촬영한 결과 시간이 증가할수록 담체에 부착되는 미생물의 농도가 증가함을 확인할 수 있었다. 그리고 본 실험에서 사용된 담체는 환경 친화적인 고분자로 2차적으로 발생할 수 있는 환경문제를 해결 할 수 있으며 기존의 담체에 비교하여 비표면적이 넓고, 인체에 해가 없는 생물고분자 담체이므로 식품용도의 흡착제 등으로도 유용하게 사용될 수 있다.

감사

본 연구는 2001년도 조선대학교 학술연구진흥사업비로 추진되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Pringle, J. H. and M. Fletcher (1983), Influence of substratum wettability on attachment of freshwater bacteria to solid surfaces, *Appl. Environ. Microbiol.* **45**, 811-817.
2. Chatib, B. (1981), Biological wastewater treatment in a three-phase fluidized-bed reactor, *In biological fluidized bed treatment of a water and wastewater*, Cooper P. E. and B. Atkinson (Eds.), p190, Ellis Horwood Ltd., New York.
3. Kawase, M., T. Nomura and T. Majima (1989), An anaerobic fixed bed reactor with a porous ceramic carrier, *Water Sci. Tech.* **21**, 77-82.
4. Valentis, G. and J. Ledavre (1990), Wastewater treatment by attached-growth microorganisms on a geotextile support, *Water Sci. Tech.* **22**, 43-52.
5. Breitenbacher, K., M. Siegl, A. Knupfer and M. Radke (1990), Open-pore sintered glass as a high-Efficiency support medium in bioreactors: new results and long-term experiments achieved in high-rate anaerobic digestion, *Water Sci. Tech.* **22**, 25-32.
6. Hermesse, M. P., C. Derpee, Y. Bartholme and P. Rouxhet (1987), Immobilization of *Acetobacter acetiby* adhesion, *Can. J. Microbiol.* **34**, 638-647.
7. Pae, J. K., H. S. Shim, J. O. Choi, and E. K. Sung (1994), A study on development of advanced media for waste water treatment, *Korean Society of Environmental Engineers Symposium*, 265-268.
8. Iwai, S. and T. Kitao (1994), Wastewater treatment with microbial films, p85, Technomic Publishing Company, Inc., New York.
9. Park, Y. S. and K. H. Ahn (2001), Preparation of ceramic support carrier and investigation of performance. *J. KSEE* **23**, 507-512.
10. Buisman, C. J., B. Wit, and G. Lettinga (1990), Biotechnological sulfide removal in three polyurethane carrier reactors: stirred reactor, bioreactor reactor and upflow reactor, *Wat. Res.* **24**, 245-252.
11. Park, T. J. (1995), Development of organic materials and nitrogen removal process using immobilized biomembrane reactor, Busan University Environmental Research Center, 15-24.
12. Kim, C. I., J. H. Lee and S. J. Park (2001), A study on the development of ceramic microbial carriers for biofilters to remove odor and volatile organic compounds emitted from industries, *J. Korean Solid Wastes Eng. Society* **18**, 103-110.
13. Funami, T., M. Funami, H. Yada and Y. Nakao (1999), Rheological and thermal studies on gelling characteristics of curdlan, *Food Hydrocolloids* **13**, 317-324.
14. Kim, M. K., I. Y. Lee, J. H. Lee, K. T. Kim, Y. H. Rhee, and Y. H. Park (2000), Residual phosphate concentration under nitrogen-limiting conditions regulates curdlan production in *Agrobacterium sp.*, *J. Ind. Microbiol. Biotechnol.* **25**, 180-183.
15. Silverman, M. P. and D. G. Lungren (1959), Studies on the chemoautotrophic iron bacterium *Thiobacillus ferrooxidans*, I. An improved medium and a harvesting for securing high cell yields, *J. Bacteriol.* **77**, 642-647.
16. Kim, T. W., C. J. Kim and Y. K. Chang (1999), Enhancement of iron oxidation rate by immobilized cells in chemo-biological process for H<sub>2</sub>S removal, *Korean J. Biotechnol. Bioeng.* **14**, 585-592.