

유기폐수처리를 위한 *Rhodospirillum rubrum* P17의 종균생산

조경덕 · 강성옥 · 임왕진* · 조홍연** · 양현철

고려대학교 식품공학과, *고려대학교 생물공학연구소, **고려대학교 식량공학과

초록 : 토양으로부터 생육도와 유기산의 자화도가 우수한 광합성세균 P17 균주를 분리하여 균학적 성질을 검토한 결과 이 균주는 *Rhodospirillum rubrum*으로 동정되었다. 유기폐수처리용 종균 생산을 위한 본 균주의 배양조건을 검토한 결과, 탄소원으로서 0.2% Na-acetate, 0.1% Na-propionate, 0.2% Na-lactate를 함유한 혼합 유기산이 효과적이었으며, 0.1% yeast extract를 첨가하였을 때 높은 생육도를 나타내었다. 최적배양조건의 환경인자들은 온도 30°C, pH 7.0, 조도 2,500 lux, 교반 50~100 rpm 등이었다. Jar fermentor를 이용한 회분배양과 반연속배양으로부터 각각 5.17 g/l와 7.93 g/l의 균체가 생산되었으며, 연속배양에서는 회석비율 0.21 h⁻¹에서 생산성이 0.206 g/l/h이었다. *R. rubrum* P17을 두부공업폐수에 적용시켰을 때, 4일간 배양으로 초기 COD(3,240 mg/l)를 250 mg/l까지 감소시켰다(1993년 10월 15일 접수, 1993년 11월 25일 수리).

서 론

미생물을 이용한 산업폐수 및 하수의 생물학적 처리는 미생물의 생리적 특성에 따라 크게 호기적 처리와 혐기적 처리로 구분된다. 이들 방법 중 현재 널리 이용되고 있는 활성슬러지(activated sludge)법은 유기물의 제거율이 높아 양질의 처리수를 얻을 수 있고 악취를 완화시킬 수 있는 점, 대상폐수가 광범위한 점 등이 장점이나 유지 관리상의 어려움과 처리비용이 높은 점, 잉여슬러지의 발생량이 많은 점 등이 단점으로 지적되고 있다.¹⁾

광합성세균은 영양요구성이 다른 미생물군보다 단순하고 혐기명, 호기암 및 호기명의 어떤 환경조건에서도 산소의 확산속도에 관계없이 활발히 생육할 수 있으며²⁾ 편모를 가지고 있기 때문에 폐수처리 조건하에서 기질의 섭취속도가 높은 특성을 가지고 있다.³⁾ 이러한 광합성 세균의 생리적 특성은 실제 폐수처리시 BOD의 용적당 부하율이 활성오니의 수배에서 수십배에 이르고 있으며 고농도의 유기폐수를 무회석으로 처리할 수 있기 때문에 설비면적은 물론 설비비 및 운영비의 측면에서 활성슬러지법보다 높은 경제성을 가져다 주는 것으로 알려져 있다.⁴⁾ 또한 bulking 현상이 없으며 수계 부영양화 요인인 질소의 제거율이 높고 악취의 발생을 억제할 뿐만 아니라 폐수처리시 발생하는 오니를 균체단백으로서 쉽게 자원화할 수 있는 점 등이 종래의 방법들보다 우수한

것으로 보고되고 있다.⁵⁻¹³⁾

본 연구에서는 광합성세균에 의한 고농도 유기폐수 처리공정의 확립을 위한 기초연구의 일환으로 고농도 유기산에서 생육이 우수하고 BOD 제거율이 높은 균주를 분리하고 최적배양조건 및 종균제의 공업적인 생산에 있어 요구되는 저가의 대체기질로 두부공업폐수의 이용 가능성 등을 검토하였다.

재료 및 방법

분리원 및 배지

폐수처리용 광합성세균은 *Rhodospirillaceae*(purple nonsulfur bacteria)과에 속하는 통성협기성세균으로 균주의 분리를 위한 시료는 부영양화된 하천, 호수, 논, 도랑, 습한토양 등으로부터 채취하였으며 분리배지로는 Cohen-Bazire 등¹⁴⁾과 Sawada 등⁷⁾이 사용한 합성배지를 변형(sodium acetate 1 g, sodium propionate 1 g, sodium butyrate 1 g, yeast extract 1 g, NH₄Cl 1 g, MgSO₄ 7H₂O 0.4 g, NaCl 0.1 g, CaCl₂ 2H₂O 0.05 g, NaHCO₃ 0.3 g, KHPO₄ 1 g, trace metal solution 1 mL, distilled water 1 L, pH 7.0)하여 사용하였다.

균주의 분리

채취한 시료를 상법에 따라 분리배지에 도말한 후 30

Key words : Photosynthetic bacteria, starter culture, waste water treatment

Corresponding author : Corresponding author: H. C. Yang

℃, 5,000 lux의 협기적 광조건에서 배양시 적자색을 나타내는 colony를 1차로 선별하였다. 1차로 분리된 균주들을 동일한 배양조건에서 액체배양을 실시한 후 생육도 (μ_{max})와 유기산의 자화도를 측정하여 가장 활성이 높은 균주를 3차에 걸쳐 선별하였다.

선별균주의 동정

선별된 균주의 형태학적 특성 및 생리학적 특성은 Bergey's Manual¹⁵⁾과 Manual of Methods for General Bacteriology¹⁶⁾에 준하여 동정하였다.

배양방법

Flask 배양은 shaking incubator(KMC, 8480L)의 상부에 100 W 백열전구를 장치, 조도를 조정하였으며 배양 중 협기상태를 유지하기 위하여 flask 입구를 고무마개로 밀폐시킨 500 ml round flask를 사용하였다. 종균은 본 배양과 동일한 배양조건에서 48시간 flask 배양하여 조제한 후 10%(V/V)를 접종하였다. 발효조에서의 회분배양은 총용량이 6.4 L(B. Braun, E)인 Jar fermentor 외부에 100 W 백열전구를 장치하여 working volume 5 L, 온도 30℃, 조도 2,500 lux 및 stirring 50 rpm에서 5일간 배양하였다. 유가배양은 working volume 2 L에서 균체의 증식이 mid-log기까지 회분배양한 후 0.5 ml/min으로 멸균배지를 정량공급하여 발효조의 working volume이 5 L가 될때까지 배양하였다. 연속배양은 working volume을 2 L로하여 균체가 mid-log기에 도달될 때까지 배양한 후 멸균된 배지를 정량공급하였으며 working volume의 3배 정도 기질이 주입되었을 때 일정한 간격으로 시료를 채취하면서 steady-state를 세포농도에 의해 조정하였다.

건조 균체량 및 성장계수의 측정

균체농도에 따라 작성한 A_{660} 과 건조균체량간의 검량곡선으로부터 일정시간 배양한 시료의 흡광도를 측정하여 건조균체량을 환산하였다. 최대 비증식 속도(μ_{max})와 productivity는 Wang¹⁷⁾의 방법에 준하여 계산하였다.

유기산 분석

유기산의 분석은 Gas chromatography(Shimadzu 14A)를 사용하여 실시하였다. 채취한 시료를 7,500×g에서 5분간 원심분리한 후 상동액에 0.3 M oxalic acid를 첨가하여 최종농도 0.03 M로 하여 분석하였다. Flame ionization detector(FID)와 column material이 Cabopack B-DA 80/120 4% CW20M로 만들어진 3.2 mm ID×1.5 m의 glass column을 사용, 시료 1 l를 주입하여 분석하였다.

배양액의 CODcr 측정

배양액의 Chemical Oxygen Demand(COD)는 COD 값에 영향을 줄 수 있는 배양 중의 균체를 제거하기 위하여 7,500×g에서 10분간 원심분리한 후 상동액을 취하여 standard method¹⁸⁾에 따라 측정하였다.

결과 및 고찰

균의 분리 및 선정

폐수처리시에 적응성 및 폐수처리 효율이 우수한 균주를 최종 선별하기 위하여 분리배지에서 1차로 250여 종의 균을 선별한 후 동일한 조건에서 생육활성이 좋은 80여종의 균을 2차 선별한 다음 배양온도 30℃, 협기적 광조건(3,000 lux)에서 60시간 액체배양에 의해 유기산 자화율, 균체량, 생육도가 가장 우수한 균주로 P17을 최종 선정하였다.

선별균주의 동정

선별균주를 협기적 광조건에서 48시간 배양한 후 원심분리하고 2차 증류수로 수세한 다음 전자현미경(JOEL 100C' XII)으로 관찰한 결과 나선형을 나타내었다(Fig. 1). 균체를 acetone : methanol=7 : 2의 유기용매로 추출한



Fig. 1. Electron micrograph of the selected strain P17(2.2×10,000).

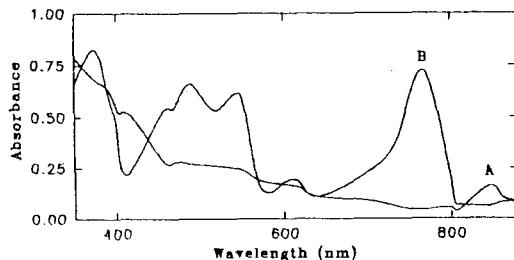


Fig. 2. The absorption spectra of whole cells(A) and photopigments(B) extracted from the selected strain P17.

photopigment는 485 nm, 600 nm, 770 nm에서 최대 흡광도를 나타내었고 이 spectrum은 purple nonsulfur bacteria의 carotenoides 및 bacteriochlorophyll a의 최대 흡광도와 일치함을 보임으로써 전형적인 홍색 비유황세균임을 확인할 수 있었다(Fig. 2). 본 균주의 형태학적, 생리학적, 배양학적 특성을 검토한 결과 배양액의 색깔이 pink 빛을 나타낸다는 점과 growth factor로 biotin을 요구하고 있는 점, gelatin을 분해하지 못하며 catalase 양성인 특성과 기질이용성 특히 benzoate, formate, thiosulfate를 탄소원으로 이용할 수 없는 점 등에서 *Rhodospirillum rubrum*과 유사한 성질을 나타내었다(Table 1, 2).

탄소원의 영향

Rhodospirillum rubrum P17의 생육도에 미치는 유기산의 종류와 농도를 알아보기 위해 Na-acetate, Na-propionate, Na-butyrate, Na-lactate의 농도를 각각 0.1~0.5%가 되게 배지를 조제한 다음 혼기적 광조건으로 5일 동안 flask 배양하였다. 그 결과 Na-lactate를 단독으로 0.2% 첨가시 균체량이 1.83 g/l로 가장 높았으며, 다음으로 acetate 자화율이 높음을 보였으나 Na-acetate 0.3%, Na-propionate 0.2%, Na-butyrate 0.2% 이상 첨가시는 균의 생육이 저해됨을 알 수 있었다(Table 3). 이 결과는 *Rhodospirillaceae*과의 광합성세균을 단독으로 혼기적, 광조건에서 배양하였을 경우 acetate를 잘 이용하며 propionate의 경우 0.1% 이상 첨가되면 균의 생육이 감소하는 결과를 보인 Sawada 등⁷⁾의 보고와 일치하는 경향을 나타내었다. 한편 탄소원으로 이를 유기산의 혼합첨가가 균의 생육에 미치는 영향을 검토한 결과 단독 사용시에 비하여 동일한 배양조건에서 acetate : propionate : lactate = 2 : 1 : 2(5 g/l)의 비율로 첨가했을 경우 약 2.3배 이상의 균체량을 증가시켰다(data 제시하지 않음). 반면 유기산을 단독으로 첨가시 최대 균체량을 보였던 0.3% acetate, 0.2% propionate 0.1% lactate를 혼합 첨가시 상기의 비율에 비해서 균체량은 차이를 보이지 않았지만

Table 1. Morphological, physiological and cultural characteristics of the selected strain P17

Characteristics	Selected strain P17	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
I. Morphology		
Cell size(μm)		
width	0.8~0.9	0.8~1.0
length	2.3~3.4	1.5~2.5
Cell shape	Spiral	Spiral
Motility	+	+
Spore formation	-	-
Gram staining	-	-
Color of culture	Pink to red	Pink to red
II. Physiology		
Growth		
anaerobic, light	+	+
anaerobic, dark	+	+
aerobic, light	+	+
aerobic, dark	+	+
Bacteriochlorophyll	a	a
λ _{max} of whole cell(nm)	590,804,880	377,550,807
λ _{max} of cell extract(nm)	493,600,768	493,600,768
Gelatine liquefaction	-	-
Nitrate reduction	+	+
H ₂ S formation	+	+
Catalase activity	+	+
Vitamins required	B	B

+, present or positive; -, absent or negative; ±, present or positive in some strain but negative in other strain; B, biotin.

Table 2. Utilization of electron donors and organic compounds by the selected strain P17

Electron donor* or carbon source	Selected strain P17	<i>Rhodospirillum rubrum</i>
Acetate	+	+
Butyrate	+	+
Propionate	+	+
Lactate	+	+
Citrate	+	-
Malate	+	+
Fumarate	+	+
Succinate	+	+
Tartrate	+	-
Benzoate	-	-
Formate	-	-
Glutamate	+	+
Aspartate	+	+
Glucose	-	-
Fructose	+	+
Mannose	+	0
Glycerol	+	-
Mannitol	+	-
Sorbitol	+	0
Ethanol	+	+
Thiosulfate	-	-

* Substrates were added to a concentration of 0.1% (W/V). Acids were added as sodium salt. +, Growth; -, no growth; 0, not tested.

전체적인 유기산 자화율이 감소되었다. 이상의 결과들은 본 균주가 수종의 유기산이 다양 함유되어 있는 고농도 유기폐수의 처리에 적용될 수 있을 뿐만 아니라 폐수 처리용 종균제의 생산 기질로서 유기폐수를 이용할 수 있음을 시사해 주었다.

질소원의 영향

Rhodospirillum rubrum P17의 생육에 미치는 무기질 소원의 영향을 알아보기 위해 NH_4Cl , $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, NaNO_3 , urea를 혼합유기산 배지에 0.1%씩 각각 첨가하여 검토한 결과 NH_4Cl 이 무첨가시에 비하여 약 8배 정도의 높은 균체 생육성을 나타내었다. 혼합유기산과 NH_4Cl 간의 최대 생육에 미치는 C/N ratio는 25 부근에서 가장 양호한 생육을 나타냄으로써 타 균주들의 일반적인 값에 비해 높은 경향이었다(data 제시하지 않음). Fig. 3은 균체생산에 미치는 유기질소원들의 영향을 검토한 결과로 각 0.1%의 첨가에 의해 약 2배의 균체생산이 증가되었으며, yeast extract의 대체물질로 비교적 저가인 soybean flour의 사용이 가능함을 나타내었다. 이들 첨가에 의한 초기 COD 값의 증가는 5일간 배양시 무첨가시와 거의 동일한 값까지 COD가 제거됨으로써 폐수처리상의 문

제를 야기시키지는 않았다.

환경인자들의 최적조건

통성협기성 홍색 비유황 광합성세균인 본 균주의 생리적 특성은 일반세균과 달리 환경인자들에 의해 균체 생육이 크게 영향을 받고 있다. Table 4는 최적배지에서 5일간 배양한 후 각 환경인자들에 따른 균체생육을 조사한 것으로 조도 2,000~4,000 lux, 온도 30°C, 초기 pH는 중성영역에서 최대 생산량을 나타내었다. 혐기형, 호기암에서 최적 생육조건을 보이는 광합성세균의 일반적인 특성에도 불구하고 본 균주는 명조건에서 교반에 의해 생육이 촉진되는 결과를 보였으나 이는 산소공급의 필요성보다 정치배양시 일어나는 균체의 침강과 배양용 기벽에의 부착 현상이 억제됨으로써 일어나는 생육증가인 것으로 추측되었다. 접종량에 따른 대수기까지의 균체생육은 통상적인 발효의 접종량보다 많은 3~10%일 때 양호하였으며 이 값은 폐수처리 공정에 있어 일반적으로 채용되고 있는 반송 sludge의 량에 상당하였다.

Jar fermentor 배양

공업적인 종균제 생산을 위한 일부 기초실험으로 flask 배양에서 검토한 최적배지 및 배양조건을 토대로 Jar fe-

Table 3. Effect of organic acids on growth of *Rhodospirillum rubrum* P17

Organic acid	Concentration (%)	Absorbance at 660 nm	Cell growth (g/l)
Na-Acetate	0.1	2.0	1.07
	0.2	3.1	1.68
	0.3	3.7	1.81
	0.4	2.5	1.34
	0.5	0.5	0.28
	0.1	2.2	1.17
Na-Propionate	0.2	2.2	1.17
	0.3	1.6	0.83
	0.4	0.6	0.31
	0.5	0.5	0.28
	0.1	2.3	1.25
	0.2	3.1	1.66
Na-Butyrate	0.3	1.7	0.91
	0.4	0.8	0.42
	0.5	0.6	0.28
	0.1	1.2	0.64
	0.2	3.8	1.83
	0.3	2.8	1.34
Na-Lactate	0.4	2.2	1.22
	0.5	1.9	1.03

Cultivation was carried out at 30°C under 2,500 lux with shaking at 50 rpm in the basal medium.

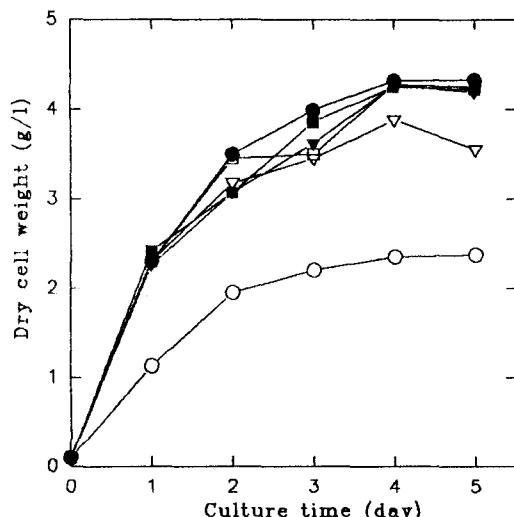


Fig. 3. Effect of growth factor sources on growth of *Rhodospirillum rubrum* P17.

Cultivation was carried out 30°C under 2,500 lux with shaking at 50 rpm in the basal medium containing 0.2% Na-acetate, 0.1% Na-propionate and 0.2% Na-lactate as carbon source.

○—○, None; ●—●, Yeast extract;

■—■, Malt extract; □—□, Soybean flour;

▲—▲, Bacto peptone; ▽—▽, Casamino acid.

rmentor를 사용하여 회분, 유기, 연속배양한 결과는 Fig. 4와 같다. Working volume 5 L, 최적 배양조건에서 5일간 회분배양시 균체량은 5.17 g/l로 flask 배양보다 약 20% 이상 균체 생산성이 증가되었으며 탄소원인 혼합유기산은 배양 1일인 exponential growth phase에서 40% 이상, 배양 완료시는 거의 자화되었다. 최적배지농도를 1/2로 조정한 발효조의 초기 working volume 2 l, 상기와 동일한 조건에서 48시간 회분배양한 후 1/2 농도의 최적배지를 0.5 ml/min의 속도로 정량공급하면서 유기 배양한 결과 균체량은 7.93 g/l로 회분배양에 비하여 50% 이상의 균체생산성을 나타냈다. 연속배양은 working volume 2 L, 상기와 동일하게 배양한 후 균체가 대수 증식기에 도달되었을 때 외부로부터 멀균배지를 0.5 ml/min의 속도로 정량공급하여 배양하였다. 3시간 간격으로 흡광도를 측정하여 새로운 steady-state에 도달됨을 확인하고 균체량을 분석하였다. Dilution rate가 0.06 hr⁻¹

Table 4. Effect of culture conditions on growth of *Rhodospirillum rubrum* P17 in synthetic medium

Culture condition	Cell growth(g/l)	
Illumination intensity (klux)	0.5	0.80
	1.0	1.68
	2.0	2.22
	2.5	2.25
	3.0	2.20
	4.0	2.18
Temperature (°C)	10	0.75
	20	1.30
	30	2.30
	40	0.20
Initial pH	5	0.10
	6	1.95
	7	2.40
	8	2.00
	9	1.21
Agitation (rpm)	0	2.35
	50	2.78
	100	2.84
	150	2.78
pH adjust	7.0	2.95
	7.5	2.92
	8.0	2.86
Inoculum size (%)	1	2.55
	3	2.80
	5	2.83
	10	2.85

Cultivation was carried out in optimal culture medium for 5 days at various environmental conditions.

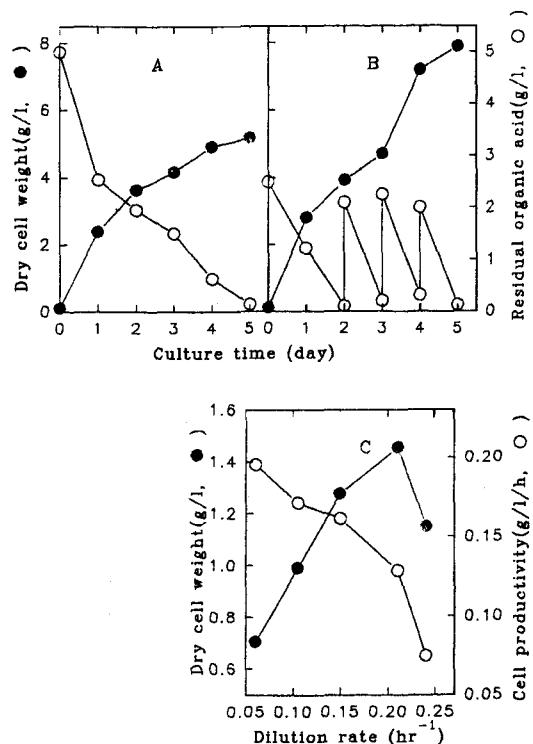


Fig. 4. Cell production of *Rhodospirillum rubrum* P17 in different culture process.

Cultivations in batch (A), fed-batch (B) and continuous (C) processes were carried out as described in Materials and Methods.

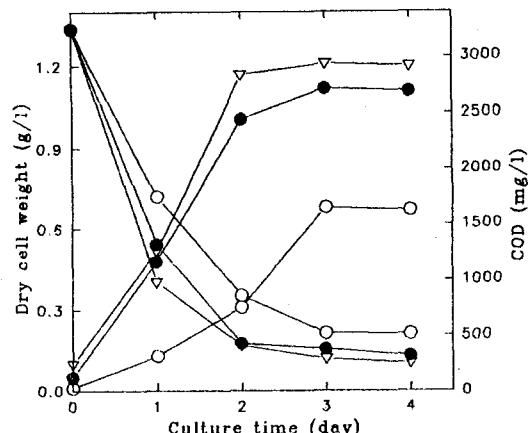


Fig. 5. Changes of cell growth and COD removal in soybean flour waste water by *Rhodospirillum rubrum* P17.

Cultivation was carried out under the optimum environmental culture conditions with various inoculum size.
 ○—○, 1%; ●—●, 5%; ▽—▽, 10%.

에서 0.24 hr^{-1} 까지 증가함에 따라 균체량은 감소하는 결과를 보였으나 productivity는 0.21 hr^{-1} 에서 0.206 g/l/h 로 최대를 나타내었다.

종균제 생산용 기질로서 두부공업폐수의 이용 가능성

폐수처리용 *Rhodospirillum rubrum* P17의 종균제 생산을 위한 저가 기질의 개발을 목적으로 두부공업폐수의 이용 가능성을 검토하였다(Fig. 5). 합성배지에서 seed culture한 전배양액 10%(v/v)를 대상폐수에 접종하여 4일간 flask 배양한 후 균체량을 측정한 결과 1.23 g/l 를 나타냈고 이때 COD는 초기 $3,240 \text{ mg/l}$ 인 폐수가 250 mg/l 로 감소되었다. 이 결과는 두부공업 폐수가 실제 공업적인 종균제 생산에 있어 저가의 배지로 사용될 수 있을 뿐만 아니라 두부공업에서 문제시 되어온 폐수처리를 동시에 해결할 수 있음을 제시해 주었다.

감사의 말

본 연구는 과학재단의 연구비(91-0204-10) 지원에 의하여 수행된 연구의 일부로 연구비 지원에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. 小林達治: 化學と生物, 8 : 604(1970)
2. Schlegel, H. G., Barnea, J. and Eriich Goltze, K. G.: Microbial Energy Conversion, Gottingen, p. 443 (1976)
3. Sawada, H., Parr, R. C. and Rogers, P. L.: J. Ferment. Technol., 55 : 326(1977)
4. Kobayashi, M. and Tchan, Y. T.: Water Res., 7 : 1219(1973)
5. Hiraishi, A., Shi, J. L. and Kitamura, H.: J. Ferment. and Bioengin., 68 : 269(1989)
6. Kobayashi, M. and Kurata, S. I.: Process Biochem., 13 : 27(1978)
7. Sawada, H. and Rogers, P. L.: J. Ferment. Technol., 55 : 297(1977)
8. Siefert, E. and Koppenhagen, V. B.: Arch. Microbiol., 132 : 173(1982)
9. 小林達治: 用水と廢水, 27 : 1128(1985)
10. Boyd, C. E., Hollerman, W. D., Plumb, J. A. and Saeed, M.: The progressive fish-culturist, 4 : 36 (1984)
11. Hirotani, H., Augi, Y., Kobayash, M. and Takahashi, E.: Wat. Sci. Tech., 22 : 59(1990)
12. Kobayashi, M., Fujii, K., Shimamoto, I. and Maki, T.: Prog. Wat. Tech., 11 : 279(1978)
13. Kobayashi, M. and Haque, M. Z.: Plant and Soil, 443(1971).
14. Cohen-Bazire, G., Sistrom, W. R. and Stainer, R. Y.: J. Cell. Comp. Physiol., 49 : 25(1957)
15. James T. Staley *et al.*: Bergey's Manual of Systematic Bacteriology, Williams & Wikins, Co., New York (1980)
16. Pilipp Gerhardt *et al.*: Manual of Methodes for General Bacteriology(1981)
17. Daniel I. C. Wang: Ferment and Enzyme Technology., John Wiley and Sons, Inc., 63(1979)
18. American Public Health Association: Standard Method for Examination of Water and Waste Water 17th ed., New York(1989)

Starter culture production of *Rhodospirillum rubrum* P17 for use in treatment of organic waste water

Kyung Dug Cho, Seong Og Kang, Wang Jin Lim*, Hong Yon Cho** and Han Chul Yang
(Dept. of Food Technology, *Institute of Biotechnology, Korea University, Seoul 136-701,
Korea and **Dept. of Food Science and Industry, Korea University, Chochiwon 330-800,
Korea)

Abstract : A photosynthetic bacterium strain P17 having high growth rate and assimilating ability of organic acids was isolated from several soil samples, which was identified as *Rhodospirillum rubrum*. Cultural conditions of the strain P17 were examined for the production of starter culture used in the treatment of organic waste water. The addition of organic acids mixture as carbon source containing 0.2% Na-acetate, 0.1% Na-propionate and 0.2% Na-lactate and 0.1% of yeast extract as growth factor stimulated the cell growth. The maximal cell production was obtained at 30°C, pH 7.0, 2,500 lux of illumination and 50~100 rpm of agitation. Under the optimal conditions of batch and fed-batch culture systems in a Jar fermentor, 5.17 g/l and 7.93 g/l of cells were obtained after 5 days of cultivation, respectively. In continuous culture system, the cell productivity was 0.206 g/l/h at a dilution rate of 0.21 h⁻¹. When *R. rubrum* P17 was cultivated in a soybean curd waste water, initial COD level(3,240 mg/l) of the waste water was reduced to 250 mg/l after 4 days of cultivation.