한국생물공학회지 제20권 제2호
Korean J. Biotechnol. Bioeng.
Vol. 20, No. 2, 100-105(2005)

Permeabilized *Paracoccus denitrificans*를 이용한 고정화 균주의 탈질화 반응기 설계

윤 미 선 · †송 주 영 · 박 근 호
창원대학교 화공시스템공학과
(접수 : 2005. 2. 8., 게재승인 : 2005. 4. 23.)

Design of Denitrification Reactor by Using Permeabilized and Immobilized *Paracoccus denitrificans*

Mi Sun Yun, Ju Yeong Song† , and Keun Ho Park
Department of Chemical Engineering, Changwon National University, Changwon 641-773, Korea
(Received : 2005. 2. 8., Accepted : 2005. 4. 23.)

Removal of nitrogen compound from waste water is essential and often accomplished by biological process. Denitrification bacterium, *Paracoccus denitrificans* (KCTC 2350) is employed to estimate the denitrification ability and the characteristics.
In the immobilized biological reactor system, the measurement of absolute amount of active strain in the reactor is comparatively difficult or impossible. In this study, a reactor was designed with the unwoven texture wrapped peep holed plastic tube to calculate the absolute amount of active strain by comparing the activity of the permeabilized and or immobilized reactor and the free cell reactor. The reactor system was continuous stirred tank reactor and the reaction rate of substrate consumption was assumed to satisfy the Michaelis-Menten equation. The effluent concentration of nitrate and nitrite was measured to estimate the apparent parameter of Michaelis-Menten equation.
As a result, we found that the amount of immobilized active strain was figured out to be half of the total active strain in the reactor and the time required to be reached in the equilibrium state in the permeabilized and or immobilized reactor system was figured out to be shorter than that of the free cell reactor system.

Key Words : *Paracoccus denitrificans*, CSTR, permeabilization, denitrification, immobilization, Michaelis-Menten

서 론

생활하수, 축산·산업 공정 중에 포함되어 폐수로 유입되는 질소 성분은 하천이나 바다의 부영양화의 주 원인이 되기도 한다(1, 2).

이러한 질소 성분은 생물학적 또는 물리화학적 처리방법에 의해 처리·배출될 수 있으며, 경제성과 효율적인 면에서 우수한 생물학적 처리법에 대한 많은 연구가 이루어지고 있다(3, 4).

본 연구에서는 *Paracoccus denitrificans* (KCTC 2530 *P. denitrificans*)를 이용한 화학적 permeabilization 처리를 통해 균주의 세포막을 손상시키고, 처리균주와 미처리 균주, 그리고 고정화 반응기와 미고정화 반응에서의 균주의 탈질 역가를 비교·분석하였다. 반응기는 이상적인 CSTR 모델을 도입하였으며, Michaelis-Menten (M-M)식의 적용을 통해 체류시간 (retention time: R.T)에 따른 탈질효율을 비교하였다.

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering, Changwon National University, Changwon 641-773, korea
Tel : +82-55-279-7585, Fax : +85-55-283-6465
E-mail : jusong@sarim.changwon.ac.kr

재료 및 방법

균주의 배양

본 연구에서 사용한 균주는 한국생명공학연구원의 유전자은행으로부터 동결건조상태로 분양받은 *P. denitrificans* (KCTC 2530)을 4℃냉장에서 보관 후 사용하였다(5). 동결건조 상태의 균주 앰플을 Clean bench (KMC-1400L, Vision Co. Ltd., Korea) 안에서 액체 배지 3 mL 정도에 녹여, 고형화시킨 평판 배지 위에 접종하였다. 균주 배양 배지 조성은 Table 1과 같으며, 균주의 최적 생장 조건인 pH 6.8은 묽은 황산을 이용하여 조절하였다. 제조된 액체배지 및

고형배지는 Auto Clave (KMC-1221, Vision Co. Ltd., Korea)로 120℃, 15분간 멸균 후에 사용하였고, 평판배지에 접종한 균주를 30℃의 Incubator (Shaking Incubator VS-8480SR, Vision Co. Ltd., Korea)에서 3일간 배양시킨 후, 콜로니의 일부를 액체 배지 10 mL 접종 후 3일간 Incubator에서 1차 배양하였다. 1차 배양된 균주 20 mL를 배지 200 mL에 주입하여 2차 배양시켰다.

Table 1. Composition of Culture Media for *P. denitrificans*(6)

Composition	Quantity (g/L)
Polypepton	4.0 g
Yeast extract	2.0 g
K_2HPO_4	10.0 g
Glucose	10.0 g
D.W	1000 mL
Agar (plate culture)	1.8 (W/V)%
pH 6.8	

실험 장치

실험에 사용된 반응기 장치는 그림 1과 같다. CSTR 반응기로 총 내용적은 15.488 L, immobilized cell 실험은 반응기내에 미세한 구멍을 뚫은 주름 유공관에 부직포를 씌워 고정화시킨 것으로 내용적은 15.12 L이다.

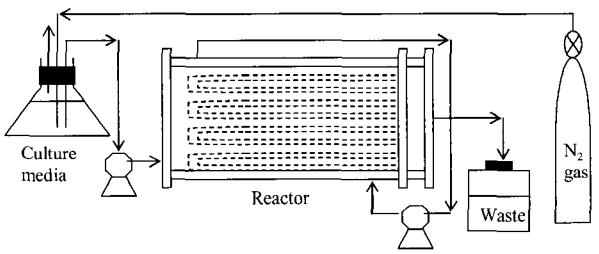

Figure 1. Schematic diagram of CSTR system.

반응기는 아크릴로 제작하였으며, 공급 펌프로는 미세하게 유량조절이 가능한 미량펌프 (SC-H6A6P, Yokogawa Ertec Co. Ltd., Japan)를, 순환펌프로는 마그네트 펌프(MX-30, Cheon Sei Ind. Co. Ltd., Korea)를 설치하였다. 이때 순환펌프 유속은 22 L/min의 빠른 유속을 유지시켜 배지가 반응기로 유입되는 즉시 반응기내의 액과 섞일 수 있도록 함으로써 CSTR의 효과를 최대화시켰다. 또한 반응기로의 유입 플라스크에 질소가스를 주입시켜, anoxic 상태의 분위기를 유지하여 탈질화 반응의 효율을 높혔다. 이때의 질소 가스 유속은 10 mL/sec이다.

Free cell의 체류시간에 따른 탈질 특성

2차 배양된 균주와 Table 1의 조성으로 만든 액체배지를 함께 반응기에 넣어 유공관을 제외한 Fig. 1의 반응기를 설치하였다. 질산칼륨 (KNO_3) 0.361 g을 초순수 100 mL에 녹여 (50 mg NO_3-N/L) 합성폐수 (질산성 질소)로 하고, 이 용액을 Table 1의 배지 성분과 함께 공급시켜 주었다. 탈질 효과를 높이기 위해 공급 플라스크에 질소 가스를 주입시켜 1시간 폭기시킨 후에 반응기로 공급시켰다. 체류시간은 58.1, 39.1, 29.3, 14.6, 11.6 그리고 9.8시간 6단계로 변화시켜 시료를 채취하여 이온크로마토그래피로 질산성 질소와 아질산성 질소의 농도를 분석하였다. 또한 haemacytomater를 이용하여 균주량을 측정하였다.

Immobilized cell의 체류시간에 따른 탈질 특성

Fig. 1의 반응기에 배양된 균주와 멸균된 배지액을 함께 넣어 순환시킴으로써 균주를 부직포와 유공관의 사이 공간 및 부직포에 고정화시켰다. 부직포 표면에 균주가 고정화된 정도는 눈으로도 확인이 가능하며, 3일 정도의 고정화 단계를 거친 후 미고정화 반응기의 탈질 특성 측정 방법과 동일한 실험 방법으로 각각의 유속에 따른 질산성 질소 농도와 아질산성 질소 농도, 그리고 균주량을 측정하였다.

화학적 permeabilization

선행 연구에서 *P. denitrificans*의 유기용매 별, 농도별 permeabilization은 아세톤보다는 톨루엔이 특히 5 (v/v)% 톨루엔 용액을 사용하여 permeabilization 처리한 균주의 탈질 효과가 우수함을 확인하였다(7). 본 실험은 이 결과를 바탕으로 균주를 처리하였다.

2차 배양된 균주를 Clean bench 안에서 50 mL 원심분리관 (3119-0050, Nalgene Centrifuge Ware, Nunc. International, USA) 10개에 각각 30 mL씩 주입시킨 후 원심분리기 (MR1812, Juan Sa., France)로 8000 rpm에서 5분간 원심분리시킨다. 원심분리 시킨후 분리관 안의 상층액은 버리고, 미리 준비된 멸균된 완충용액 (0.2 M KOH 40 mL + 0.2 M KH_2PO_4 60 mL, pH 7.4)으로 수세시키고 이것을 다시 8000 rpm에서 5분간 원심분리 후 상층액은 버린다. 이러한 수세과정을 두 번 거친다. 수세시킨 후 분리된 균주에 5 (v/v)% 톨루엔 30 mL를 넣은 후 1분에 300번 흔들어 5분간 처리하였다. 처리된 균주 액은 다시 원심분리시키고 상층의 톨루엔 용액을 버린 후 하층의 균주만을 남긴다. Permeabilization 된 균주는 배양액 300 mL에 접종시켜 3일간 1차 배양하고, 이것을 다시 3000 mL의 배양액에 옮겨 3일간 2차 배양 후 탈질능력 실험에 이용하였다.

Permeabilized and immobilized cell의 체류시간에 따른 탈질 특성

Permeabilized cell의 탈질 능력 실험 방법은 immobilized cell의 탈질능력 실험 방법과 같다. Permeabilization 시켜 2차 배양된 균주와 멸균된 배양액을 Fig. 1의 장치에 넣어 3-4일간의 고정화 단계를 거친 후 미고정화 반응기의 탈질 능력 측정과 동일한 방법으로 각각의 유속에 따른 질산성 질소와 아질산성 질소 농도, 그리고 균주량을 측정하였다.

세포의 반응속도와 CSTR(8-10)

연속교반반응기 (CSTR)의 물질 수지 식은 다음과 같이 나타낼 수 있다.

$$\text{Input} - \text{Output} + \text{Generation} = \text{Accumulation} \quad (1)$$

$$FC_{si} - FC_s + rV = V\frac{dC_s}{dt} \quad (2)$$

$$r = -\frac{r_{max,app} C_s}{K_{M,app} + C_s} \quad (3)$$

여기서 F는 유량, V는 반응기 내용물의 부피, r은 효소반응에 의한 기질 소비속도이고, dC_s/dt는 반응기 내 기질농도의 변화이다. 정상상태 CSTR에서는 dC_s/dt는 0이다. 기질 소비속도(r)가 Michaelis-Menten (M-M) 식을 따른다고 가정하고 식(3)을 식(2)에 대입하면 식(4)와 같이 정리된다. 이때 식(4)에서 $K_{M,app}$와 $r_{M,app}$는 겉보기 M-M 매개 변수이다.

$$\frac{F}{V} = \frac{1}{\tau} = \frac{r_{max,app} C_s}{(C_{si} - C_s)(K_{M,app} + C_s)} \quad (4)$$

(τ : 체류시간, $r_{max,app}$: 단위 부피당 겉보기 최대 반응속도, $K_{M,app}$: Apparent Michaelis-Menten 상수)

이 식을 다음 식과 같이 기울기 $r_{max,app}$를 가지고 절편 $-K_{M,app}$을 가지는 C_s와 $\frac{C_s\tau}{C_{si}-C_s}$에 대한 선형 함수로 정리할 수 있다.

$$C_s = -K_{M,app} + r_{max,app}\frac{C_s\tau}{(C_{si} - C_s)} \quad (5)$$

따라서 유량을 달리 하여 일련의 정상상태 CSTR 실험을 하고, C_s와 $(C_s\tau)/(C_{si}-C_s)$의 관계로부터 각각의 $r_{max,app}$와 $K_{M,app}$를 구할 수 있는데 $r_{max,app}$는 식(6)과 같이 정리할 수 있다.

$$r_{max,app} = k_T \times C_X \quad (6)$$

k_T는 rate constant이고 C_X는 활성 균주의 농도이기 때문에 k_T가 일정하다고 보면, 각각 계산된 $r_{max,app}$로부터 각 반응기의 활성균주 총량을 계산하여 고정화된 활성 균주의 총량을 역으로 계산할 수 있다. 이렇게 계산된 각 반응기의 활성 균주 총량으로부터 고정화된 활성 균주의 총량을 계산할 수 있다.

분석 방법

CSTR 반응기는 이상적인 반응기로 배출 흐름의 성분과 농도는 반응기 내의 성분, 농도와 같다고 볼 수 있으므로 유출 액의 균주량을 측정함으로써 반응기내의 전체 균주량을 계산할 수 있다. 본 실험에서는 haemacytometer를 이용하여 현미경으로 관찰, 살아서 활동하고 있는 균주만을 측정하여 탈질화에 직접적으로 참여하는 정확한 균주 수를 측정하였다.

반응기 내의 탈질 정도를 알아보기 위하여 유출 폐수의 질산성 질소와 아질산성 질소의 농도를 이온크로마토그래피(DV-120 Dionex, USA)를 이용하여 분석하였다(7). 시료 5 mL를 채취하여 50 mL 메스플라스크에 10배 희석시킨 후 1 mL 주사기를 이용하여, 0.2 ㎛의 필터 (MFS-25, Disposable Syringe Filter Unit, J메무)로 여과하여 이온크로마토그래피에 주입시켜 농도를 분석하였다. 이온크로마토그래피의 이동상은 3.6 mM Na_2CO_3와 1.0 mM $NaHCO_2$를 초순수 1 L에 녹여 사용하였고, 분석 조건은 Table 2에서 정리하였다.

Table 2. Operating Conditions of I.C to Analyze Nitrate and Nitrite

Eluent flow rate	1.24 mL/min
Applied pressure	1400 psi.
Purge gas	N_2
Column	AS - 14

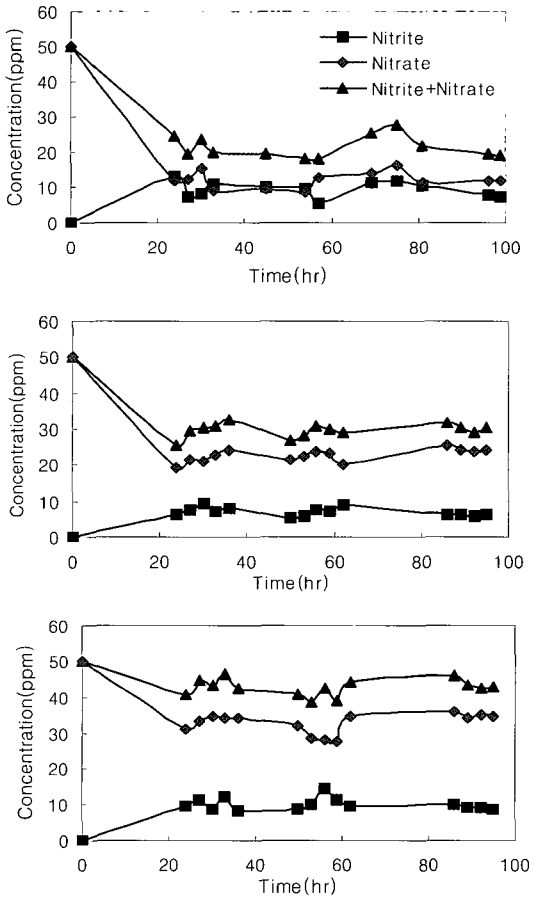

Figure 2. Denitrification ability of *P.denitrificans* in a free cell reactor (R.T 58.1 h, 29.3 h, 11.6 h).

결과 및 고찰

Free cell의 체류시간에 따른 탈질 특성

Fig. 2는 미고정화 반응기의 체류시간에 따른 합성폐수 내의 질산성 질소와 아질산성 질소농도 그리고 총 질소의 농도 변화를 나타낸 그래프이다. 탈질 능력은 공급 폐수의 반응기 내 체류시간이 58.1시간일 때 가장 우수하였으며, 공급 유속이 증가하고 폐수의 반응기 내의 체류시간이 감소함에 따라 탈질효과가 감소하였다. 이는 *P. denitrificans* 탈질 균주가 탈질화 공정을 행하기 위해서는 일정시간의 체류시간이 필요함을 나타내는 것으로 판단된다.

체류시간 58.1시간에서의 탈질화 진행정도는 50 ppm의 질산성 질소가 유입되어 질산성질소 11.9 ppm, 아질산성

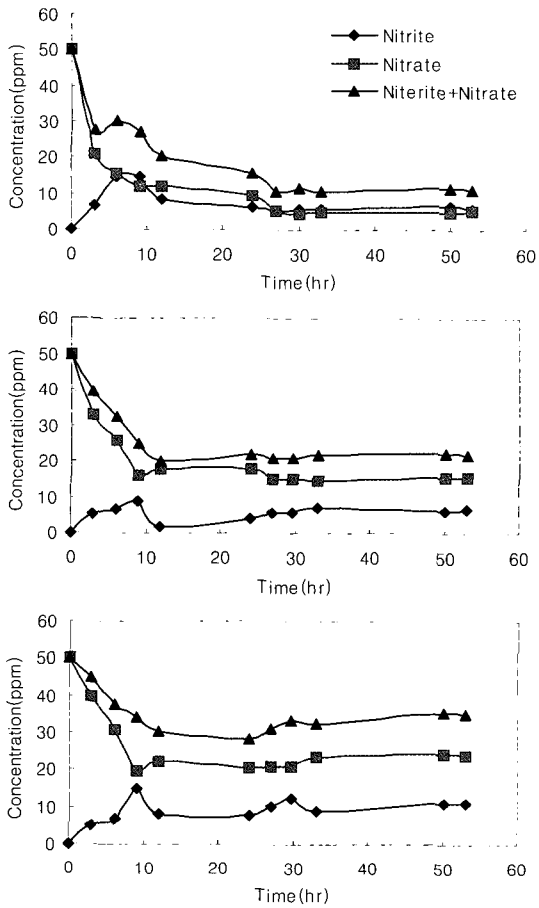

Figure 3. Denitrification ability of *P.denitrificans* in an immobilized cell reactor (R.T 58.1 h, 29.3 h, 11.6 h).

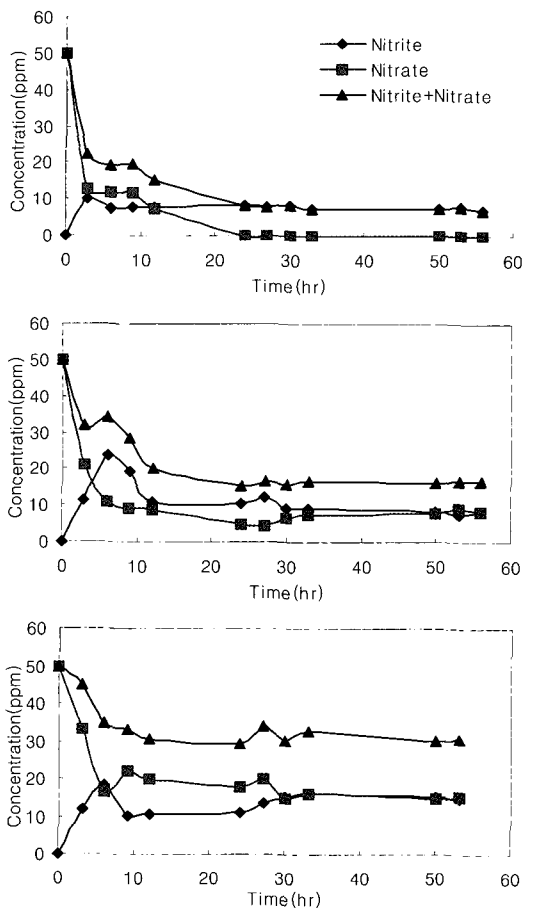

Figure 4. Denitrification ability of *P.denitrificans* in a permeabilized and immobilized cell reactor (R.T 58.1 h, 29.3 h, 11.6 h).

질소가 8 ppm으로 약 30 ppm의 질산성질소가 질소가스로 전환되었으나, 나머지 약 20 ppm은 질소로 전환되지 못하였다. 또한 각각의 데이터를 통해 미고정화 반응기는 약 75시간 정도의 안정화 단계를 거치는 것으로 판단되며, 약 30시간 동안 안정된 값을 가지는 데이터 값을 최종 유출농도로 정하였다. 유출농도는 질산성 질소와 아질산성 질소의 합으로 하였다. 이때 각 체류시간에 따른 균주의 농도는 Table 3과 같으며, 체류시간이 감소함에 따라 균주의 농도가 감소하는 경향을 보였다.

Table 3. Effluent Strain Concentration from the Free Cell Reactor at various R.T

R.T (hr)	Effluent strain concentration (unit / mL × 10^5)
58.1	1.721
39.1	1.455
29.3	1.326
14.6	1.160
11.6	1.087
9.8	0.926

Immobilized cell의 탈질 특성

각 체류시간 변화에 따른 *P. denitrificans*의 탈질화 정도를 Fig. 3에 나타내었다. 그래프를 통해 고정화 반응기의 안정화되기까지의 시간은 약 35시간으로 미고정화 반응기보다 2배 정도 빠른 것으로 나타났다.

체류시간에 따른 탈질화 능력은 58.1시간에서 가장 뛰어났으며, 미고정화 반응기가 약 30 ppm의 질산성 질소를 질소가스로 환원시킨 것에 비해 고정화 반응기는 약 40 ppm의 질산성 질소를 질소가스로 환원시켰다.

Table 4. Effluent Strain Concentration from the Immobilized Cell Reactor at various R.T

R.T (hr)	Effluent strain concentration (unit/mL × 10^5)
58.1	1.679
39.1	1.480
29.3	1.291
14.6	1.166
11.6	1.110
9.8	0.879

Table 4는 고정화 반응기의 각 체류시간에 따른 유출균주의 농도를 나타낸 것으로, 미고정화 반응기와 거의 차이를 보이지 않는다. 그럼에도 불구하고 효율성이 높은 이유는 유공관에 고정화되어 있는 균주에 의한 것이라 할 수 있다.

Permeabilized and immobilized cell의 탈질 특성

Permeabilization 처리를 시킨 후 몇 단계의 배양 과정을 거친 균주를 이용한 고정화 반응기에서 탈질 특성 실험의 결과는 Fig. 4와 같다. Fig. 3과 Fig. 4를 비교 분석하면, 처리 반응기가 미처리 반응기보다 안정화 속도가 약 5시간 정도 빨랐으며, 질산성 질소의 처리 효율 역시 좋은 결과를 나타내었다.

이는 균주를 permeabilization시킴에 따라 세포막의 일부분이 손상되어, 질산성 이온과 아질산성 이온이 탈질효소가 존재하는 outer membrane 안쪽으로 보다 자유로운 이동이 가능해져 탈질 균주의 처리효율이 높아졌음을 의미한다(7, 11, 12).

처리 균주를 이용한 탈질화 공정은 앞의 두 개의 공정과 마찬가지로 체류시간이 58.1시간일 때 가장 두드러진 처리효과를 볼 수 있었다. Free cell과 immobilized cell의 경우 질산성 질소가 모두 환원되지 않고 반응기내에 잔류하는 데에 비해 처리 균주를 이용한 고정화 반응기의 경우는 질산성 질소가 모두 환원되어, 질소가스로 전환 또는 약간의 아질산성 질소로 반응기내에 잔류하는 것으로 나타났다. 또한 처리균주를 이용한 반응기가 미처리 균주 반응기 보다 안정화 되는 시간 역시 짧은 것으로 평가되었다.

각 체류시간에 따른 유출 균주의 농도를 분석한 결과는 Table 5와 같으며, 선행된 두 반응기의 유출 균주의 농도와 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 5. Effluent Strain Concentration from the Permeabilized and Immobilized Cell Reactor at variable R.T

R.T (hr)	Effluent strain concentration (unit/mL × 10^5)
58.1	1.708
39.1	1.501
29.3	1.316
14.6	1.153
11.6	1.116
9.8	0.984

Michaelis-Menten 식의 매개변수 평가

각각의 반응기에 대한 효율성과 고정화 반응기에 실제 고정화 되어 있는 활성균주의 양을 역으로 계산하기 위하여 M-M식을 적용하였다. 식(5)에 따라 C_s와 $(C_s\tau)/(C_{si}-C_s)$의 관계로부터 $r_{max,app}$와 $K_{M,app}$의 관계를 알아보기 위하여 Fig. 5와 같이 도식화 하였다. 이때 그래프에서의 기울기는 겉보기 반응속도인 $r_{max,app}$를 나타내는 것으로써 식(6)에 의해 활성균주의 양을 계산해 볼 수 있다. $r_{max,app}$의 값은 미고정화 반응기는 0.6897, 고정화 반응기는 1.3177로 k_T가 일정하다고 보면 $r_{max,app}$의 차이는 각각 반응기의 활성 균주량의 차이에 의한 것으로 볼 수 있다. 고정화 반응기의 $r_{max,app}$는 미고정화 반응기의 약 2배이고, 반응기의 효율성이 가장 뛰어난 체류시간 58.1시간에서의 유출 균주의 농도를 Table 3과 Table 4에서 비교해 보면 두 반응기의 유출 균주량의 차이가 거의 없음을 알 수 있다. 즉, 고정화 반응기의 활성 균주가 미고정화 반응기의 활성 균주의 2배라는 점을 감안할 때 유출된 양만큼 균주가 반응기내에 고정화되어 있음을 유추할 수 있다.

미처리 고정화 반응기와 permeabilization 처리를 한 고정화 반응기의 경우 $r_{max,app}$가 각각 1.3177과 1.8067로 처리 고정화 반응기가 약 1.4배 정도로 높은 값을 보였다. 이것은 처리 고정화 반응기와 미처리 고정화 반응기의 실험조건이 모두 동일하고, 균주의 성장 속도 역시 동일하다고 가정할 때 $r_{max,app}$의 차이는 균주량보다는 동일한 균주에서의 활성의 차이에 의한 것으로 판단할 수 있다. 즉, permeabilization 처리에 의해 균주의 활성이 증가하였고, 이에 따라 탈질화 효율도 증가한 것으로 볼 수 있다.

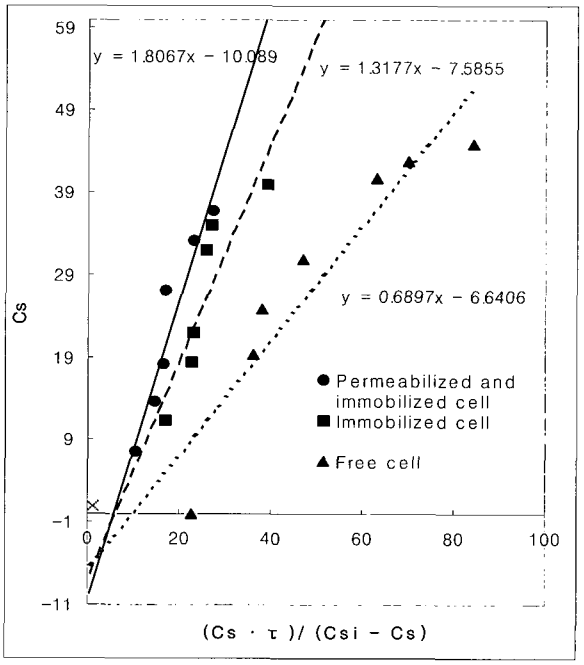

Figure 5. Parameter estimation of Michaelis - Menten equation (Slop = $r_{max,app}$, Intercept = $K_{M\,app}$).

또한 Fig. 5에서 절편 값인 $K_{M\,app}$은 낮은 값을 가질수록 반응기가 평형에 빨리 도달하게 된다. 그래프에서 미고정화 반응기, 고정화 반응기, permeabilized 고정화 반응기 각각의 $K_{M\,app}$ 값을 비교해 보면, Free cell 〉 Immobilized cell 〉 Permeabilized and immobilized cell과 같이 나타난다. 이것을 통해 permeabilized 고정화 반응기가 가장 평형에 이르는 속도가 빠름을 알 수 있다.

결 론

탈질화 균주인 *Paracoccus denitrificans*를 이용한 미고정화 반응기와 고정화 반응기, 그리고 화학적 permeabilization을 시킨 고정화 반응기의 탈질특성을 파악하고 효율성을 비교 분석한 본 연구의 결론은 다음과 같다.

1. Free cell reactor는 정상상태에 이르기까지 약 75시간이 소요되며, 체류시간이 58.1시간일 때 탈질 효율이 가장 높고 약 30 ppm의 질산성 질소의 처리 능력을 보였다.
2. Immobilized cell reactor는 free cell reactor보다 약 2배 정도 안정화 속도가 빠르며, 동일한 공급 유속에서 탈질

효율은 약 33% 정도 우수한 것으로 나타났다.

3. Permeabilized and immobilized cell reactor는 미처리 균주를 이용한 고정화 반응기보다 안정화 속도가 5시간 정도 빨랐으며, 탈질효율 역시 우수함을 알 수 있었다.
4. 반응기내의 체류시간이 길어질수록 탈질 효율이 증가하는 양상을 보였으며, 이는 탈질 균주가 탈질화 공정을 행하기 위해서 일정시간의 체류시간을 필요로 함을 나타내는 것이며, CSTR 시스템을 이용한 탈질 공정은 적정 체류시간의 조작이 필요함을 나타낸다.
5. 고정화 반응기의 활성균주 양이 미고정화 반응기의 활성균주 양의 약 2배임을 알 수 있었으며, 동일한 유출균주량을 감안할 때 고정화 반응기에는 유출량만큼의 활성균주가 고정화 되어있는 것으로 보인다.
6. 고정화 반응기와 permeabilized 고정화 반응기의 $r_{max,app}$은 1.4배 정도의 차를 보였으며, 이것에 의한 반응속도의 차이는 균주의 양보다는 균주의 역가의 영향인 것으로 사료되며, permeabilization 처리한 균주의 활성이 미처리 균주의 활성보다 우수한 것으로 판단된다.

요 약

탈질화 균주인 Paracoccus denitrificans를 이용한 탈질화 공정에 있어서 탈질 효율의 증대를 위해 선행 연구를 바탕으로 화학적 permeabilization 처리 후 균주를 고정화시키는 방법을 이용하였다. 반응기는 이상적인 CSTR을 도입하여 free cell reactor와 immobilized cell reactor 그리고 permeabilized and immobilized cell reactor의 세 가지 형태의 실험을 실시하였으며, 탈질효율의 비교를 위해 M-M 식을 적용시켰다. 각 반응기의 체류시간에 따른 탈질 효과는 permeabilized and immobilized cell reactor가 가장 우수하였으며 또한 반응 평형에도 다른 두 반응기에 비해 빨리 도달하는 것으로 나타났다.

감 사

본 연구는 2003년도 창원대학교 공모과제 연구비 지원에 의하여 수행된 결과이며 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Kim, Y. J. (2002), Improvement of biological denitrification efficiency by ORP control, M. S. thesis, Seoul National University, Seoul.
2. Yun, D. I., J. T. Lee, D. J. Kim, and K. Y. Lee (1998), The effect of external carbon source on batch denitrification process, *Kor. J. Appl. Microbiol.*, **2**, 96-101.
3. Lee, S. I., S. K. Park, and W. H. Lee (1994), Temperature dependency of denitrification rate with addition of various electron doners, *Jaurnal of Korean Society of Environmental Engineers* **16**, 677-683.
4. Choi, H. S. (1995), Nitrogen · phosphate (N,P) Removal Technology (II), *J. of Environmental Hi-technology* **3**(1), 12.
5. Park, Y. H., and K. S. Bae, KCTC catalougue of strain, 3rd ed. KCTC, korea.
6. Wodara, C. S., K. M. Egert, D. P. Kelly and C. G. Friendrich (1994), Identification and sequence analysis of the soxB gene essential for sulfur oxidation of *Paracoccus denitrificans* GB17, *J. Bacteriol.* **176**(20), 6188-6191.
7. Hwang, S. Y. (1999), A study on the denitrification characteristics of permeabilized *Paracoccus denitrificans*, M. S. thesis, Dept. of Chemical Engineering, Changwon National University, Korea.
8. Kim, S. H. (2000), A study on the design of denitrification reactor and characteristics, M. S. thesis, Dept. of Chemical Engineering, Changwon National University, Korea.
9. Kim, S. W., J. S. Lee, Y. S. jung, Y. I. Cho, and S. I. Hong (1997), Biochemical Engineering, 1st ed., p146, Heejungdang, Seoul, korea.
10. Ye Ni and R. Rachel (2004), Accelerating Whole-Cell by Reducing Outer Membrane Permeability Barrier, *J. Biotechnol. Bioengin.* **87**(6), 804-811.
11. Flelix, H. (1982), *Analytical Biochemistry* **120**, 211.
12. Jung, S. B. (1998), A study on the ammonia removal from. waste water by using permeabilized and immobilized strain, M. S. thesis, Dept. of Chemical Engineering, Changwon National University, Korea.