

碩士學位論文

Zoogloea ramigera 115의 凝集 特性과
그것의 生物高分子를 利用한 重金屬 除去

濟州大學校 大學院

食品工學科



1994年 12月

Zoogloea ramigera 115의 凝集 特性과
그것의 生物高分子를 利用한 重金屬 除去

指導教授 高 榮 煥

玄 根 卓

이 論文을 工學碩士學位 論文으로 提出함.

1994年 12月

玄根卓의 工學碩士學位 論文을 認准함.



제주대학교 중앙도서관
JEJU NATIONAL UNIVERSITY LIBRARY

審査委員長

姜永周

委 員

員

河 璿 桓

委 員

員

고 영 환

濟州大學校 大學院

1994年 12月

Characteristic of Floc Formation by *Zoogloea ramigera* 115 and Removal of Heavy Metal Cations with Its Biopolymer

Guen-Tag Hyun

(Supervised by professor Young-Hwan Ko)



**A THESIS SUBMITTED IN PARTIAL FULFILLMENT
OF THE REQUIREMENTS FOR THE DEGREE OF
MASTER OF ENGINEERING**

**DEPARTMENT OF FOOD SCIENCE AND TECHNOLOGY
GRADUATE SCHOOL
CHEJU NATIONAL UNIVERSITY**

1994. 12.

目 次

Summary	1
I. 서 론	2
II. 연구사	3
1. <i>Zoogloea ramigera</i> 115 균주의 생태학적 특성	3
2. 생물고분자 물질의 일반적인 특성	4
3. 생물고분자 물질을 이용한 금속 결합 특성	5
4. 중금속 폐수 처리	6
III. 재료 및 방법	8
1. 실험균주	8
2. 실험방법	8
1) 회분식 배양에 따른 미생물 성장 특성	8
(1) vitamin 첨가여부에 따른 성장 특성	8
(2) pH 변화에 따른 성장 특성	9
2) C/N비 조성에 따른 응집 특성	9
3) 생물고분자 물질의 정량 및 분리	10
4) 회분식 및 연속식 처리 방법에 따른 중금속 제거	11
(1) 중금속 이온의 농도 측정	11
(2) 회분식 처리 방법을 이용한 중금속 제거	13
(3) 연속식 처리 방법을 이용한 중금속 제거	13

IV. 결과 및 고찰	16
1. 회분식 배양에 따른 <i>Zoogloea ramigera</i> 성장 특성	16
2. C/N비 조성에 따른 응집 특성	18
3. 생물고분자 물질 정량	19
4. 회분식 및 연속식 처리 방법에 따른 중금속 제거	20
1) 회분식 처리 방법에 따른 중금속 제거	20
2) 연속식 처리 방법에 따른 중금속 제거	23
V. 적 요	29
VI. 참고문헌	31



Summary

The cultural conditions for the cell growth of *Zoogloea ramigera* 115 and the production of its biopolymer were established. The removal of such heavy metal cations as Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} and Cr^{2+} by the biopolymer isolated from the culture of *Z. ramigera* 115 was investigated, in which batch and continuous type reactors were employed.

1. The optimum pH range for the bacterial growth was between 6.3 and 7.0 at 25°C, and a biotin or a vit. B₁₂ was required as a growth factor.

2. The higher C/N ratio had a tendency to give a better flocculation ability, which reached a maximum above a C/N ratio 27.0.

3. The concentration of a biopolymer in the culture of *Z. ramigera* 115 was 34.43g/ℓ.

4. Batch type reactor showed 98% and 67% removal of Cu^{2+} and Cd^{2+} , respectively, upon mixing for 2 minutes. The degree of removal remained almost unchanged thereafter. Correlation coefficient between the degrees of Cu^{2+} and Mn^{2+} removal was $r=0.999$.

5. Continuous type reactor showed 81% removal of both Cu^{2+} and Mn^{2+} after operation for 60 minutes. Correlation coefficient between the degrees of cation removal was slightly different from that in batch type reactor.

6. The degree of cation removal decreased in the order of $\text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$ regardless of a reactor type.

Based upon these data, the metal binding ability of the biopolymer produced by *Z. ramigera* 115 could be applied to wastewater purification and metal recovery.

I 서 론

Zoogloea 속은 폐수의 생물학적 처리방법인 활성슬러지법의 오타중에 여러 플러형성균과 함께 존재하는 우점종으로서 중요한 역할을 하는 미생물이다 (Wattie, 1942; McKinney 등, 1953).

최근에는 이 균주가 생산하는 생물고분자(biopolymer)물질을 여러 가지 방법으로 추출하여 그 구조를 밝히고 여러 가지 용도로 이용하려는 연구가 진행되고 있으며 여러 선진국들이 이 분야에 많은 인력과 비용을 투자하고 있는 실정이다(Norberg와 Enfors, 1982; Hunt, 1986; Ahn과 Chung, 1992).

일반적으로 생물고분자 물질은 몇몇 세균과 곰팡이에 의해서 생산되는데 (Hunt, 1986), 이 물질은 생분해성, 원료로서 재생 가능한 자원의 이용성, 구조의 다양성 등의 장점을 가지고 있기 때문에 그 용도가 크게 증가할 것으로 예상된다. 또한 생분해성이 있으면서 점성이 강하고 중금속 흡착 능력이 높은 생물고분자 물질은 수처리에 사용되고 있는 기존의 응집제 또는 침전제 대용품으로 사용될 수 있으며, 중금속 흡착제로도 이용 가능성이 높은 물질이라고 할 수 있다(Crabtree 등, 1966; Norberg와 Enfors, 1982). 현재 사용 중인 응집제는 생체에 미치는 영향의 불확실성과 무기응집제 사용으로 인한 과량의 침전물 형성 등으로 2차 오염을 야기시키는 문제가 있지만, 생물고분자를 응집제로 사용할 경우는 응집력이 높을 뿐만 아니라 유출수에 잔류되어도 자연적으로 분해가 되므로 2차 공해를 유발하지 않는 특성을 갖는다(Sinskey, 1986).

따라서 본 연구에서는 *Zoogloea ramigera* 115 균주가 생물고분자 물질을 생성하는데 적합한 조건을 찾고자하였다. 그리고 생성된 생물고분자 물질을 이용하여 회분식 및 연속식 처리 방법으로 중금속 제거와 선택적으로 금속을 회수할 수 있는 방안을 모색하였다.

II 연구사

1. *Zoogloea ramigera* 115 균주의 생태학적 특성

*Zoogloea ramigera*는 1935년에 Butterfield가 처음으로 하수처리장의 활성 슬러지중에서 분리하였으며(McKinney 등, 1953), 산업폐수중에서 발견되는 경우도 있다고 한다. 이 균주는 그람음성으로 둥그런 막대형이며, 아포와 포낭이 없고 그 크기는 0.5~3.0 μ m이다. 유세포인 경우는 길고 가는 한 개의 편모를 가지고 활발하게 운동을 하다가 어느 정도 성장이 되면 노세포가 되어 운동성이 없어지면서 서로 같은 세포들과 flocc을 형성하여 침전된다. 그리고 이 균주가 성장 발육하기 위한 적당한 온도는 28~30 $^{\circ}$ C이며, 10 $^{\circ}$ C에서는 서서히 성장하고 45 $^{\circ}$ C에서는 성장하지 못한다. 또한 적당한 pH는 중성 부근이며, pH 4.5 이하와 10이상에서는 성장하지 못한다고 한다.

이 균주는 절대 호기성균으로 xylose, fructose, glucose, ethanol, glycerol 과 몇몇 아미노산을 산화시키나, dulcitol, melibiose, melezitose, raffinose, glycogen, 용해성 전분과 inulin은 산화시키지 못하고, cellulose와 corn starch는 가수분해하지 못하는 특성을 가지고 있다. 그리고 *Zoogloea* 속은 *Pseudomonas*, *Acetobacter*와 아주 비슷한 성질을 가지고 있으며 이들 미생물은 sugar 및 alcohol(ethanol 포함)을 산화하는 성질을 가지고 있어 가장 중요한 특성 중의 하나라고 볼 수 있다. 또한 *Zoogloea*의 외부 편모는 *Acetobacter xylinum*와 *Pseudomonas denitrificans*의 편모와 유사하고 편모의 화학적 성분이 cellulose라고 하지만 *Acetobacter* 만큼 확실하지 않으며, *Zoogloea* 와 *Acetobacter*의 차이점은 *Zoogloea*가 pH 4.5이하에서는 자라지 못한다는 것이다(Ohad 등, 1962).

*Z. ramigera*는 0.5% glucose가 함유된 0.05% arginine 액체 배지에서 배양 시험관에 레이스 테이프 모양이나 밑바닥에 얇은 막을 형성하며, 진탕 배양에서는 별모양의 flocc을 형성한다(Dugan과 Lundgren, 1960). 또한 flocc의 형성은

박테리아의 대사 활성과 서로 관련되기 때문에 미생물이 활발하게 대사 하거나 재생되는 것이 오래 지속될수록 floc 형성이 안되며, floc의 크기와 고분자량은 배지의 성분이나 배양 시간에 의해 영향을 받는다고 한다(Crabtree 등, 1965).

Friedman 등(1968)은 *Zoogloea* 속의 특징은 수지상으로 floc을 형성하고 각 캡슐 matrix에 의해서 이들 세포들이 작은 공모양으로 만들어지는 것이며, matrix에 해당되는 가는 섬유 polymer는 cellulase의 영향을 받기 쉬운 polyglucose로 볼 수 있다고 하였다.

따라서 *Z. ramigera* 는 활성 슬러지에서 유기물질의 안정화 및 floc 형성에 커다란 역할을 하며, 그람음성 간균인 *Pseudomonas*, *Alcaligenes*, *Flavobacterium* 등과 더불어 우점종으로 존재하는 균이다(McKinney 등, 1953; Crabtree 등, 1965).

2. 생물고분자 물질의 일반적인 특성

생물고분자 물질은 일반적으로 단백질(구상, 섬유상 단백질), 핵산(RNA, DNA), 다당류(녹말, 셀룰로오스)로 구성되어 있으며, 이 고분자물질은 동식물, 원생동물, 미생물에 존재한다. 그리고 미생물 배양액으로부터 생물고분자 물질을 추출하기 위한 방법은 autoclave법, ultrasonification법, high speed centrifuge법이 있으며, 최근에는 이러한 추출 방법을 병행하여 생물고분자 물질을 생산하려는 연구가 진행되고 있다(Norberg와 Enfors, 1982).

Sinsky(1986)은 *Z. ramigera* 115에서 분비되는 생물고분자의 구조는 현재 확실하게 밝혀지지는 않았지만, glucose, galactose, pyruvate등으로 구성되어 수용성 캡슐 형태의 다당류인 것으로 알려져 있다. 또한 *Z. ramigera* 에 대한 연구가 활기를 띠게 된 것은 1982년 Norberg와 Enfors 가 *Z. ramigera* 115 균주에서 생물고분자 물질을 추출하면서 부터이다.

Norberg와 Enfors(1982)는 *Z. ramigera*를 이용한 exopolysaccharide 생성 실험에서 회분식 방법으로 배양했을 때의 exopolysaccharide 생성은 세포 성장

단계 한 부분에서 가장 많이 생산되었고, 이 생물고분자 물질은 캡슐로서 세포 벽에 부착되어 있으며, 배양하는 액체 배지의 점도가 높기 때문에 150시간 이상 배양해야만 비로소 캡슐이 세포벽에서 떨어진다고 하였다. 그리고 glucose 을 기질로 하여 exopolysaccharide의 수율을 측정한 결과 회분식 배양에 glucose, 질소, 여러 성장 인자들을 공급한다면 38g/ℓ 이상의 exopolysaccharide를 얻을 수 있다고 하였다. Ahn과 Chung(1992)은 *Z. ramigera* 115 균주를 사용하여 생물응집제로서 사용되는 생물고분자 물질 생산 실험에서는 생물고분자 물질 생산을 높이기 위하여 회분식, 유가배양, 연속배양 방법을 이용하였는데, 탄소원으로는 glucose, lactose, molasses, cheese whey를 사용하여 glucose인 경우에는 C/N비 98일 때 생물고분자 생성 효과가 좋았으며, lactose의 경우에는 C/N비 30, molasses와 cheese whey의 경우에는 C/N비 60일 때 생물고분자 생성이 가장 좋았고 유가 배양 방법이 회분식배양 방법 보다 최종 생물고분자 생산이 우수하다고 보고하였다.

그리고 Dugan과 Pickrum(1972)은 *Z. ramigera* 115 균주에서 형성된 exopolysaccharide는 고분자 전해질(polyelectrolyte)과 같은 성질을 갖고 있어서 금속 이온에 강한 친화력을 보여준다고 보고하였다.

3. 생물고분자 물질을 이용한 금속 결합 특성

생물고분자를 구성하고 있는 것은 단백질, 핵산, 다당류이며, 미생물의 체외 다당류는 배양액으로부터 여러 가지 추출 방법에 의해 분리된다. 그리고 분리된 생물고분자 물질은 중금속 제거 및 유가금속을 선택적으로 회수하는데 이용할 수 있으며, 생물고분자 응집제로서 상품화도 가능하다.

Hunt(1986)는 일반적으로 생물고분자 물질의 금속이온 결합은 보통 두 가지 메커니즘으로 이루어지는데 첫째가 이온교환(ion exchange)이며, 둘째는 킬레이트화(chelate)로 대부분의 생물고분자는 구성 성분 및 구조상 두 가지 결합 과정이 한 시스템에서 동시에 이루어질 수 있다고 하였다.

Yakubu와 Dudeny(1986)은 중금속의 흡착에 이용되는 biomass는 bacteria,

fungi 등에서 추출되는데, fungi중에서도 *Aspergillus niger*는 우라늄 흡착능이 이온교환 수지(Amberlite IRA-400)보다 pH 4에서 우수하였고 pH 1에서는 급속히 탈착된다고 하였다. 또 Kiff와 Little(1986)은 *Aspergillus oryzae*의 biomass를 이용한 실험에서는 칼럼에서 5분 동안 잔류시킨 Cd^{2+} 을 흡착하여 99%까지 제거하였으며, 이 처리 공정을 이용하여 미량 함유된 고독성의 금속 물질을 제거하거나 회수하는데 응용이 가능하다고 하였다.

그리고 Mullen 등(1989)은 회분식 처리 방법으로 중금속 Ag^+ , Cd^{2+} , Cu^{2+} , La^{3+} 용액을 4종의 박테리아(*Bacillus cereus*, *B. subtilis*, *Escherichia coli* 및 *Pseudomonas aeruginosa*)를 이용하여 제거하는 실험에서, Ag^+ 의 박테리아에 의한 제거가 가장 효과적이었으며, 1mM Ag 용액에서는 전체 Ag^+ 의 89%가 제거되었고, Cd^{2+} , Cu^{2+} , La^{3+} 이 각각 12, 29, 27%가 제거되었으며, 이들 금속들을 제거하는 박테리아와의 친화력은 $Ag > La > Cu > Cd$ 순으로 감소한다고 보고하였다.

또한 Norberg(1983)은 *Z. ramigera*를 이용하여 금속 이온을 흡착시키기 위한 연속 공정을 개발하였는데, 그 결과 Cu^{2+} 의 흡착이 빠르고 효과적이었으며, 10분 동안 biomass에 흡착되는 Cu^{2+} 량은 0.17g/g(dry wt)이고, 고농도의 biomass에서 Cu^{2+} 제거 효과는 아주 높지만 biomass에 흡착되는 Cu^{2+} 의 양은 낮은 것으로 보고하였다.

최근에는 Trujillo와 Jeffers(1991)가 고정화된 biomass를 이용하여 폐수 중의 중금속을 제거하기 위한 수학적 모델링을 만들어 분석한 결과 $Al > Cd > Zn > Ca > Mn > Mg$ 순으로 금속 이온이 제거된다고 하였다.

4. 중금속 폐수 처리

많은 산업 폐수와 유해 폐수들은 중금속 이온이 함유된 상태로 자연 환경에 방출됨으로서 생태계에 악영향을 주고 있을 뿐만 아니라, 이들 폐수 중에 포함된 유가 금속들은 회수가 어려워 자원이 없는 우리 나라로서는 상당한 낭비 요인이라고 볼 수 있다.

그리고 기존 중금속 폐수의 처리 방법으로는 산화환원법, 응집침전법, 흡착에 의한 방법, 이온교환법, 전기분해법, 중화법, 추출법 등이 있는데 이들 방법 중에서 응집침전법과 이온교환 수지를 이용하는 이온교환수지법이 여러 산업 분야에 가장 많이 사용되고 있다.

이들 공정들은 용액 내에 1~100 mg/l 정도의 금속들이 함유되어 있을 때는 비효율적이거나 처리 비용이 아주 비싼 단점을 가지고 있다. 응집침전법은 설치가 용이하고 유지비용과 에너지 소비가 상대적으로 낮은 장점을 지니고 있기 때문에 가장 보편적으로 사용되고 있는 방법이나, 중금속제거율이 낮고 많은 양의 화학응집제가 사용되어, 침전되는 슬러지처리 등의 큰 문제점을 지니고 있다. 또한 이온교환수지법은 침전법에 비해 제거율이 높고 저농도의 중금속 이온을 선택적으로 제거할 수 있는 장점을 가지고 있으나 고가의 수지를 사용하여야 하기 때문에 금속의 회수 및 재사용이 병행되지 않을 경우 다른 처리법에 비하여 비 경제적이라 할 수 있다(Ahn과 Chung, 1992).

그러나 어떤 형태의 미생물들은 수동적인 흡착과 착화합물을 형성하여 비교적 많은 양의 금속 이온들을 흡착할 수 있는 능력이 있어 저농도의 금속 제거와 유가 금속을 선택적으로 회수할 수 있는 장점을 가지고 있다.

그리고 Hunt(1986)는 생물 흡착제를 이용한 방법은 이온교환수지법과 활성탄을 이용한 흡착법의 처리 메커니즘과 유사하다고 하였다.

Ⅲ 재 료 및 방 법

1. 실험균주

활성오니중에서 대표적인 flocc 생성균인 *Zoogloea ramigera* 115 (ATCC 25935)를 미국 종균협회(American Type Culture Collection)로부터 구입하였고, 이 균을 보존하기 위하여 NA배지(Becton Dickinson Co., pancreatic digest of gelatin 5.0g/l, beef extract 3.0g/l, agar 5.0g/l)를 이용하였다.

2. 실험방법

1) 회분식 배양에 따른 미생물 성장 특성

Zoogloea ramigera 115의 성장 발육 상태를 측정하기 위해서 vitamin첨가 여부와 pH 변화에 따른 균체 생성량을 측정하였다.

이 실험을 하기 위한 배지 조성은 Table 1과 같다.

(1) vitamin 첨가여부에 따른 성장 특성

Table 1 과 같은 조성의 최소 배지에 biotin, vit B₁₂(cobalamine), riboflavin을 첨가했을 때와 첨가하지 않았을 때를 비교하였다.

최소 배지 100ml를 300ml 삼각 플라스크에 넣고 pH를 6.5로 조절한 후 고압 멸균기를 사용하여 121℃에서 15분간 가열후, 각 vitamin을 최종 농도 5×10^{-6} g/l 가 되도록 첨가하여 사용하였다.

각 vitamin 용액은 0.2 μ m membrane filter로 제균처리한 다음에 배지에 첨가하였다.

Table 1. Composition of minimal medium for *Z. ramigera*

Ingredient	Composition (%)
Glucose	0.5
(NH ₄) ₂ SO ₄	0.05
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
KH ₂ PO ₄	0.1
K ₂ HPO ₄	0.2
FeSO ₄ 5H ₂ O	trace

접종된 삼각 플라스크를 진탕 항온배양기에서 25℃, 200rpm으로 48시간 동안 배양 후 균체를 0.45μm membrane filter로 여과하고 항온 건조기를 사용하여 105℃에서 1시간 동안 건조한 후, 데시케이터에서 방냉하여 그 무게를 측정하였다.

(2) pH 변화에 따른 성장 특성

Table 1과 같은 조성의 최소 배지를 100ml씩 300ml 삼각 플라스크에 넣고 pH를 5.5에서 8.0까지 단계적으로 조절한 후 고압 멸균기를 사용하여 121℃에서 15분 동안 가열하였다. 0.2μm membrane filter로 여과시킨 biotin을 최종 농도 5×10^{-6} g/l 이 되도록 첨가하고 *Z. ramigera*를 접종하였다.

접종된 삼각 플라스크를 진탕항온 배양기에서 25℃, 200rpm으로 48시간, 72시간 동안 배양 후 pH를 측정하였고, 삼각 플라스크내 배양된 균체량을 0.45μm membrane filter로 여과한 후 항온 건조기를 사용하여 105℃에서 1시간 동안 건조하여 데시케이터에서 방냉시키고 그 무게를 측정하였다.

2) C/N비 조성에 따른 응집 특성

biotin이 첨가된 Table 1 배지 조성에서 (NH₄)₂SO₄등 여타 성분은 일정하

게 유지하고, 단지 glucose량을 0.05~1.5%로 단계적으로 변화시켜 C/N 조성비가 1.5에서 45.0이 되도록 하여 실험하였다. 300ml 삼각 플라스크 10개에 glucose량을 변화시킨 액체배지를 100ml씩 주입하고 각각 pH 6.5로 조절한 후 고압 멸균기로 121℃에서 15분 동안 가열한 다음 biotin을 전술한 바와 같이 첨가하였다. *Z. ramigera*를 멸균된 각 배지에 접종한 후 진탕배양기를 이용하여 25℃에서 48시간 배양 후 삼각 플라스크내 응집된 균체를 육안으로 판단하였다.

3) 생물고분자 물질의 정량 및 분리

Z. ramigera 115에서 생성된 생물고분자 물질을 추출하기 위한 방법으로 가압멸균, 초음파 파쇄, 그리고 고속 원심분리 방법이 있는데, 본 실험에서는 이들 방법을 병행한 추출 방법인 Norberg와 Enfors(1982)에 의한 방법을 사용하여 추출하였으며, 추출된 상등액을 감압건조시켜 생물고분자 물질을 얻었다.

Table 2. 에서 제시된 것처럼 C/N비 90으로 조성된 배지를 pH 6.5로 조절하여 멸균시킨 후 *Z. ramigera* 를 접종하여 진탕배양기로 25℃에서 72시간 동안 배양한 배양액으로부터 생물고분자를 다음과 같이 추출 분리하였다.

*Z. ramigera*의 배양액을 고압 멸균기에서 121℃로 10분 동안 증자한 후 이것을 20초 동안 3회에 걸쳐서 초음파 파쇄하였다. 초음파 파쇄된 배양액과 증류수를 1 : 3의 비율로 섞은 다음 12,000g에서 40분 동안 원심 분리하여 남아 있는 균체등 침전물은 제거하고 상등액만 취하였다. 채취된 상등액을 2차 원심 분리하여 침전물은 제거하고 남은 상등액만 채취하여 1% KCl을 함유한 propanol과 1 : 2 비율로 섞은 다음 4℃ 냉장고에 1시간 이상 방치하여 침전을 유도하였다. 여기서 침전된 물질을 55℃ 감압건조기에서 건조시켜 생물고분자를 얻었고, 위 과정에서 생성된 침전물은 다시 원래의 부피만큼 증류수를 첨가한 후 20초간 4회에 걸쳐서 초음파 파쇄하였다.

Table 2. Composition of medium for biopolymer production by *Z. ramigera*

Ingredient	Composition (g/l)
Glucose	25
K ₂ HPO ₄	2
KH ₂ PO ₄	1
MgSO ₄ 7H ₂ O	0.2
NaNO ₃	0.68
FeSO ₄ 5H ₂ O	trace
Yeast extract	0.01
Biotin	5×10^{-6}
Vitamin B ₁₂	5×10^{-6}

위 과정중 시료와 증류수를 1 : 3의 비율로 섞는 과정부터 55℃ 감압건조기에서 건조시키는 과정을 반복하여 생물고분자를 정량 하였다. 한편 생성된 pellet은 0.45µm membrane filter를 이용하여 여과하고 105℃에서 1시간 동안 건조시킨 후 데시케이터에서 방냉하여 건조 균체량을 측정하였다.

위 실험 과정을 간단하게 나타내면 Fig. 1과 같다.

4) 회분식 및 연속식 처리 방법에 따른 중금속 제거

(1) 중금속 이온의 농도 측정

회분식 및 연속식 처리 방법에서 처리된 처리수를 각 체류 시간대 별로 20 ml 시험관에 10ml씩 채취하고 이 시료를 6,000g에서 10분 동안 원심 분리시킨 후 그 상등액에 잔류하는 중금속 이온 농도를 측정하였다. 그리고 중금속 이온의 농도를 측정하기 위해서 원자흡광광도계(Perkin Elmer - 2380)를 사용하였으며 분석 조건은 Table 3에 제시하였다.

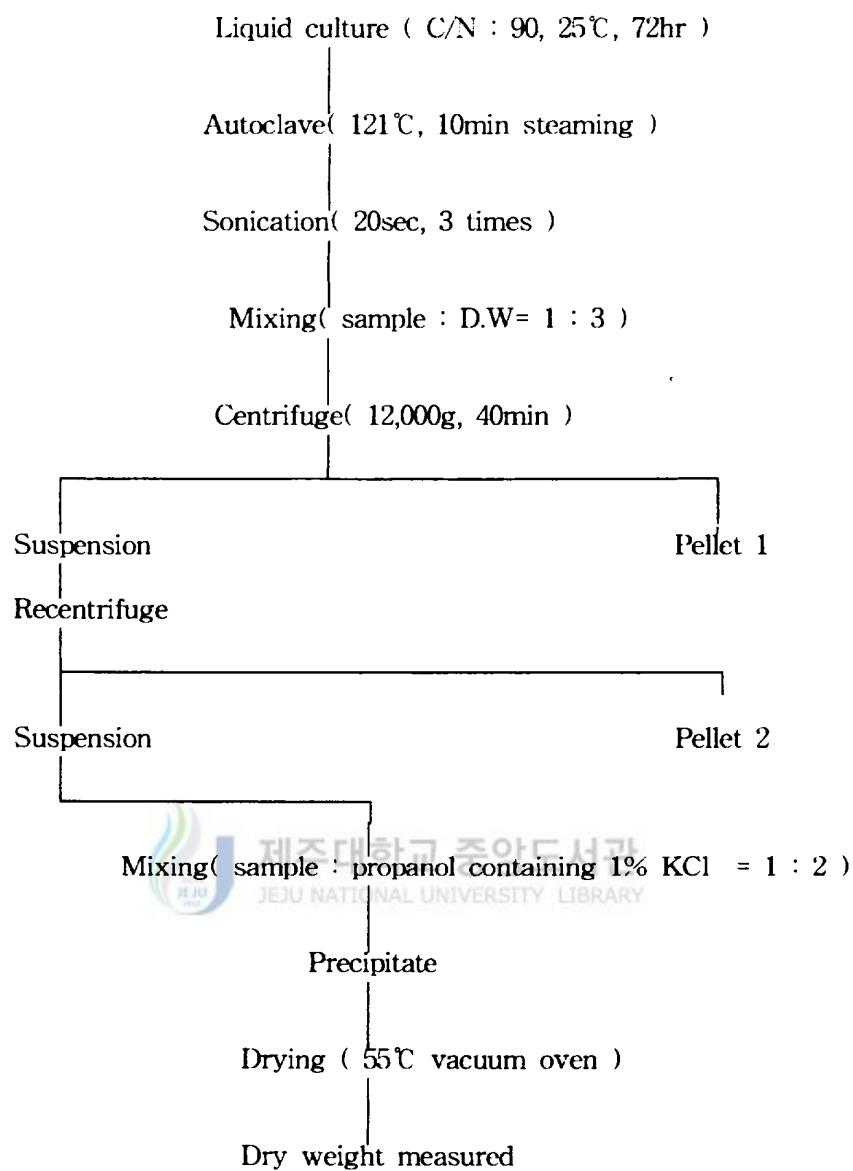


Fig. 1. Isolation procedure for biopolymer from a culture of *Zoogloea ramigera*.

Table 3. Conditions for analysis of heavy metal ions with atomic absorption spectrophotometer

Element	Wave length (nm)	Lamp current (mA)	Slit width (mm)	Air flow rate (ℓ/min)	Acetylene flow rate (ℓ/min)
Cd ²⁺	228.3	4	0.7	40	15
Cu ²⁺	324.8	15	0.7		
Cr ²⁺	852.1	10	0.4		
Mn ²⁺	279.5	20	0.2		

(2) 회분식 처리 방법을 이용한 중금속 제거

고농도의 중금속 흡착력을 측정하기 위해서 회분식 처리 방법으로 실험하였다.

CuSO₄·5H₂O(1.56mM Cu²⁺) 와 CdSO₄·8/3H₂O(0.51mM Cd²⁺)로 조성된 중금속 폐수와 0.04mM Cd²⁺, 0.10mM Cr²⁺, 0.09mM Mn²⁺, 0.08mM Cu²⁺ 혼합용액을 각각 500ml 삼각 플라스크에 300ml씩 넣고 pH 6.0 으로 조절한 다음, 농도 34.43g/ℓ 인 생물고분자 10ml를 각 삼각 플라스크에 첨가한 후 자석교반기를 이용하여 500rpm에서 15분간 연속적으로 교반시켰다.

그 다음 혼합 시간대 별로 각각 시료 10ml씩 채취하여 원심분리기로 6,000g에서 10분 동안 원심 분리시킨 후, 침전된 잔사는 버리고 상등액중에 잔류하는 중금속 이온 농도를 전술한 바와 같이 원자흡광광도계를 이용하여 측정하였다.

(3) 연속식 처리방법을 이용한 중금속 제거

Fig. 2와 같은 연속식 처리장치를 이용하여 중금속 제거 실험을 하였다. 이 반응조는 생물고분자 물질과 중금속 이온과의 혼합을 좋게 하기 위하여 가운데 얇은 장애판을 설치하였으며, 반응조 밑바닥에는 기포를 발생시키는 브

로위를 설치하였다.

그리고 10 l 용기에 일정한 농도로 조제한 중금속 용액을 저장해 놓고 peristaltic pump로 반응조에 보냈으며, 중금속 용액을 제거하기 위한 생물 고분자 물질은 500ml 삼각플라스크에 저장해 놓고 peristaltic pump로 일정하게 반응조에 흘려 보냈다. 또한 반응조에서 처리된 처리수는 1 l 용기에 받으면서 시간대별로 시료를 채취하여 잔류되는 금속이온 농도를 측정할 수 있도록 하였다.

중금속 폐수는 0.04mM Cd^{2+} , 0.10mM Cr^{2+} , 0.09mM Mn^{2+} 그리고 0.08mM Cu^{2+} 이 섞인 혼합 용액으로 pH 6.0 으로 조절하여 사용하였다. 한편, 생물고분자 용액의 농도는 34.43g/l 였다.

반응조에 들어오는 전체 유량은 20ml/min로 하였으며, 이 전체유량중에서 중금속 폐수 유량은 19.5ml/min이며, 생물고분자 용액은 0.5ml/min으로 유지하였다. 그리고 반응조에서 15분간 접촉하게 한 후 체류 시간대별로 각각 시료 10ml씩 채취하였고, 이 시료를 원심분리기로 6,000g에서 10분 동안 원심 분리시킨 후 상등액에 잔류하는 각각의 중금속이온 농도를 원자흡광광도계를 이용하여 측정하였다.

또한 생물고분자량에 따른 중금속 제거능을 측정하기 위하여 0.08mM Cu^{2+} 로 조성된 중금속 폐수에 생물고분자 용액을 1.0 또는 1.5ml/min로 조정하고 전체 반응조의 유량은 20ml/min으로 하여 위와 같은 방법으로 실험하였다.

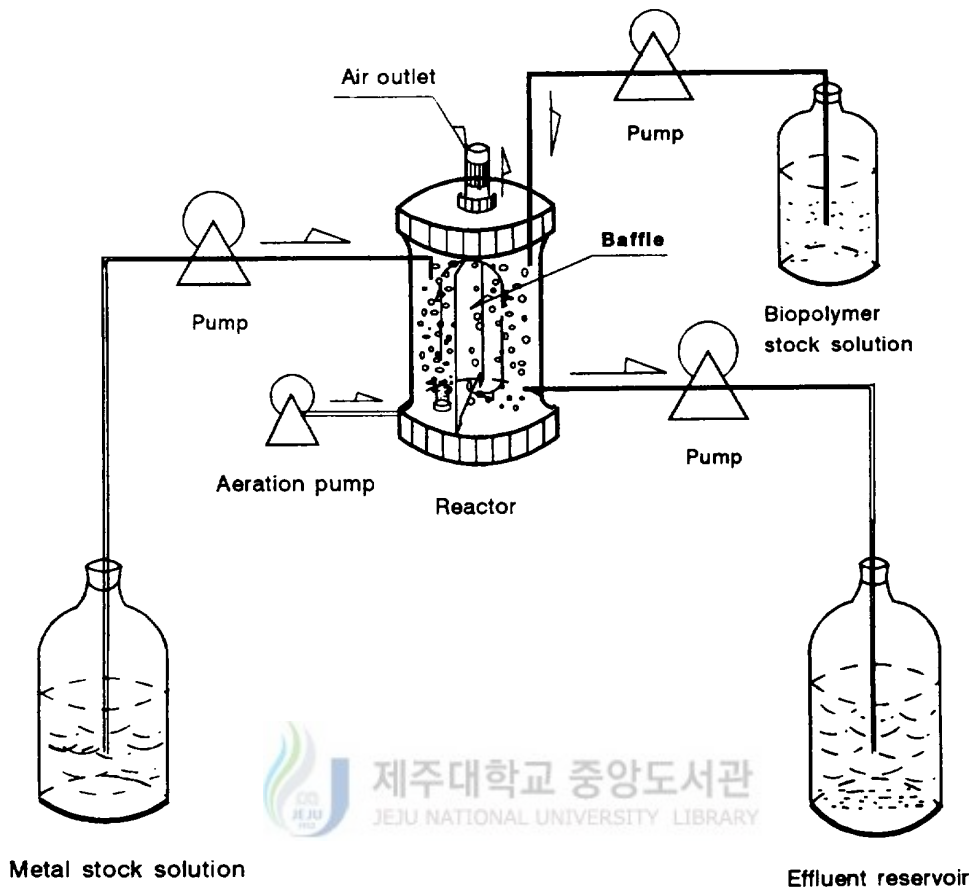


Fig. 2. Experimental setup of continuous type reactor for removal of heavy metal cations with biopolymer from *Z. ramigera*.

IV 결과 및 고찰

1. 회분식 배양에 따른 *Zoogloea ramigera* 성장 특성

vitamin 첨가에 따른 *Z. ramigera*의 성장 실험은 회분식 배양 방법을 이용하였으며 그 결과를 Table 4에서 나타내었다.

vitamin을 첨가하지 않은 배지와 riboflavin을 첨가한 배지에서는 건조 균체량이 각각 1.2, 1.5mg/100ml로 거의 성장되지 않았으며, biotin과 vit. B₁₂를 첨가했을 때는 건조 균체량이 각각 25.1 및 22.4mg/100ml이었고 biotin과 vit. B₁₂를 함께 배지에 첨가했을 때에는 건조 균체량이 28.3mg/100ml로 보다 많은 균체가 생성되었다.

따라서 이 균주의 생육 정도는 vitamin의 첨가 여부에 따라 현저하게 차이가 있을 뿐만 아니라, biotin 또는 vit B₁₂가 생육인자로 요구됨을 알 수 있었다.

Z. ramigera 115 균주의 성장 적정 pH 범위를 결정하기 위하여 pH를 달리 하여 일정 시간 배양한 후 균체량을 측정하였다. Fig. 3은 이 균주의 pH 변화 및 배양 시간에 따른 성장곡선을 나타내었다.

이 그림에서 pH 5.5에서 48시간 배양한 경우는 건조균체량이 0.4mg/100ml이고, 72시간 배양한 것은 2.5mg/100ml로 거의 균체성장이 이루어지지 않고 있다가 pH가 증가함에 따라 점차적으로 성장되어 pH 6.3~7.0에서는 48시간 배양한 것이 27.2~29.3mg/100ml이며, 72시간 배양한 것은 32.0~36.0 mg/100ml로 거의 일정하게 미생물이 성장하였다. 그리고 pH 7.0이후부터 균체 성장이 떨어지면서 pH 7.5에서는 48시간과 72시간 후에 각각 9.2mg/100ml, 10.5mg/100ml로 pH 5.5에서 보다 다소 높게 나타났지만 낮은 균체 성장률을 보였다.

따라서 이 균주는 pH 6.3~7.0 범위에서 가장 생육이 좋은 것으로 생각된다.

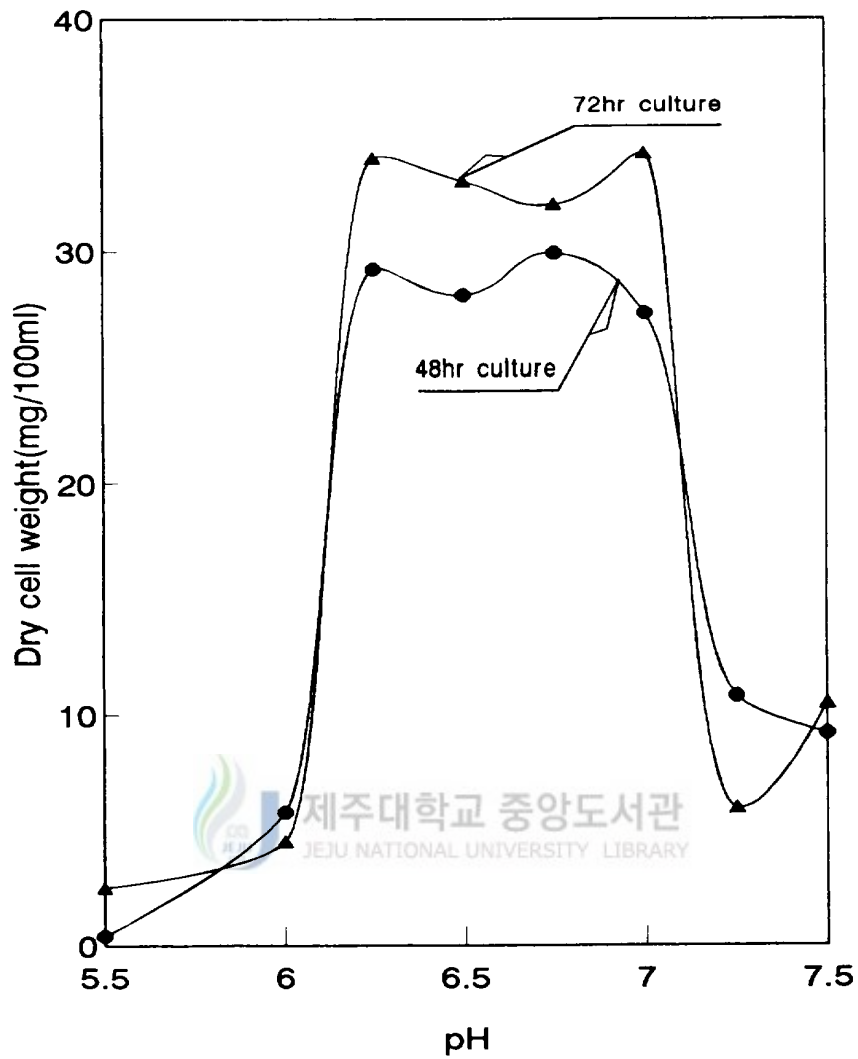


Fig. 3. Effect of pH on cell growth of *Z. ramigera*.

Table 4. Effect of vitamin addition on growth of *Z. ramigera*

Culture medium	Dry cell weight (mean \pm SD) (mg/100ml)
Medium* only	1.20 \pm 0.52
Medium* + riboflavin	1.50 \pm 0.75
Medium* + biotin	25.10 \pm 1.25
Medium* + vit B ₁₂	22.40 \pm 1.50
Medium* + vit B ₁₂ + biotin	28.25 \pm 2.30

* Minimal medium as shown in Table 1.

2. C/N비 조성에 따른 응집 특성

*Z. ramigera*의 응집 특성은 생물고분자 물질의 합성과 관련되어 있다. 배지중 C/N비 변화에 따른 균체의 응집 정도를 육안으로 판단하였으며, 그 결과는 Table 5에 나타내었다.

여기서 C/N비는 glucose 함량에 따라 1.5~45.0으로 조정되었고, 그 결과 1.5~21.0사이에서는 조금 응집이 형성되다가 27.0이상에서는 응집능이 최고에 도달했음을 알 수 있었다.

Norberg와 Enfors(1982)은 C/N비 조성을 점차적으로 높일수록 균체의 응집량이 많아지며, 일정한 배양 시간이 지난 후에는 생물고분자도 많이 생성된다 하였으며, 배양 시간이 길수록 배지의 점도가 증가하여 200시간 경과 후에는 약 800cP로 된다고 하였다.

Table 5. Distribution of flocculation ability of *Z. ramigera* according to C/N ratio

Glucose (%)	C/N ratio	Flocculation ability
0.05	1.5	+
0.08	2.4	+
0.10	3.0	++
0.30	9.0	++
0.50	15.0	++
0.70	21.0	++
0.90	27.0	+++
1.10	33.0	+++
1.30	39.0	+++
1.50	45.0	+++

+ : weakly flocculated ++ : flocculated

+++ : completely flocculated



3. 생물고분자 물질 정량

*Z. ramigera*의 생물고분자 생산은 C/N비에 따라 크게 차이가 있는데 C/N비가 높을 경우가 낮은 경우에 비하여 생물 고분자 생성이 훨씬 잘 생성되며, 배양 시간에 따라서 현저한 차이가 보여진다.

본 실험에서도 이 균주의 적절한 배양 조건인 pH 6.5와 실온에 가까운 온도 25°C로 유지하여, C/N비 90으로 생물고분자 물질 생성 조건을 갖추고 진탕 항온배양기에서 배양한 결과 34.43g/l를 얻을 수 있었으며, 건조 균체무게는 3.23g/l였다.

Ahn과 Chung(1992)의 실험에서는 glucose를 기질로 이용한 경우 C/N비 30, 60, 90일 때에 각각 8.8g/l, 11.4g/l 그리고 12.6g/l의 생물고분자 물질을

얻었다고 보고한 바 있다.

이와 같이 많은 생물고분자를 생성하게 된 것은 vit. B₁₂와 biotin을 함께 첨가하고 C/N비 90으로 조성한 결과라고 볼 수 있다.

그리고 Ahn과 Chung(1992), Norberg와 Enfors(1982)은 생물고분자 물질을 많이 생성하기 위해서 glucose, nitrogen 과 성장 인자들을 배지에 첨가하여 회분식으로 배양한다면 38g/ℓ 이상의 생물고분자 물질을 얻을 수 있다고 하였다.

Cooper(1989)은 *Z. ramigera* 115에 의해서 생성된 고분자 물질은 아직 정확한 구조가 밝혀져 있지 않지만 대개 glucose, galactose, pyruvate등으로 구성되어 섬유상 섬유소 형태인 *Z. ramigera* I-16-M이 생산하는 고분자와는 달리 수용성 capsule형태의 다당류인 것으로 알려져 있다고 보고하였다. 또한 생성된 생물고분자는 높은 점도와 분자량, 그리고 pH, 열, 기계적 전단응력에 대하여 매우 안정한 것으로 알려져, 여러 문헌에서 새로운 미생물산 응집제로의 가능성이 제시되고 있다(Norberg와 Enfors, 1982; Logan과 Wilkinson, 1991).

4. 회분식 및 연속식 처리 방법에 따른 중금속 제거

1) 회분식 처리 방법에 따른 중금속 제거

1.56mM Cu²⁺와 0.51mM Cd²⁺ 중금속 용액을 각각 조제하여 회분식 처리 방법으로 혼합 시간대별로 시료를 채취하여 중금속 이온 제거율을 측정된 결과를 Fig. 4에 나타내었다.

Cu²⁺인 경우 접촉 시간 5분이 지나 98% 제거되었고, Cd²⁺인 경우는 67%가 제거되었다. 그리고 점차 시간이 지남에 따라 Cd²⁺은 70~71% 제거되었으나, Cu²⁺ 제거율은 거의 변화가 없었다.

그리고 여러 가지 중금속 용액(0.04mM Cd²⁺, 0.1mM Cr²⁺, 0.09mM Mn²⁺, 0.08mM Cu²⁺)을 혼합 조제하여 회분식으로 중금속 이온 제거율을 측정된 결과는 Fig. 5와 같다. 이 그림에서 Cu²⁺와 Mn²⁺은 혼합 시간 2분이 경과된 후 제거율이 각각 33% 및 32%이었으며, 50분 경과 후는 79% 및 77%로 시간이 지

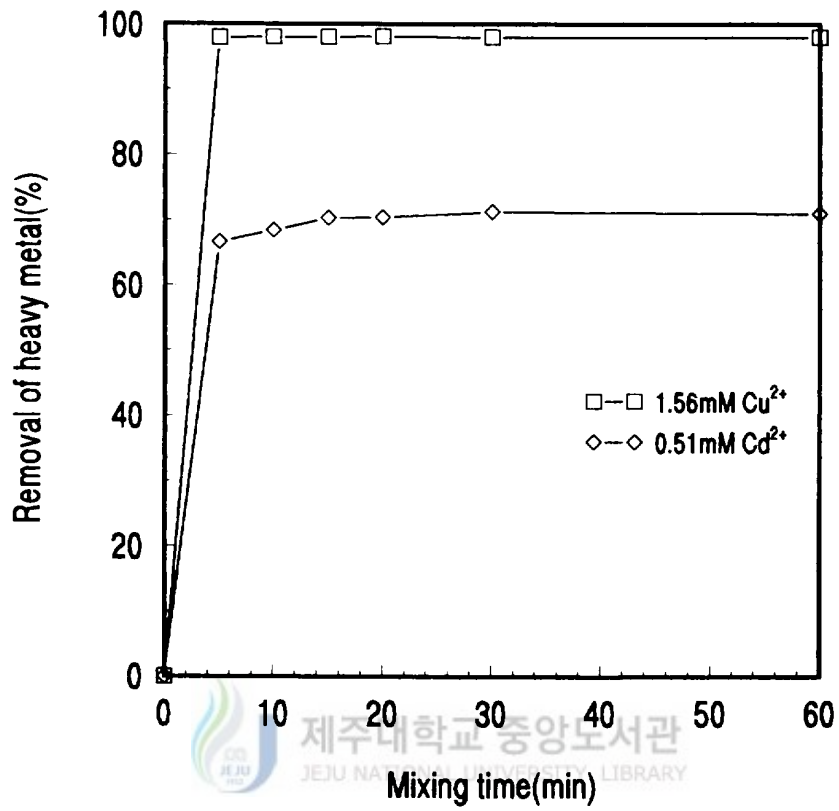


Fig. 4. Heavy metal removal using batch type reactor by biopolymer from *Z. ramigera*.

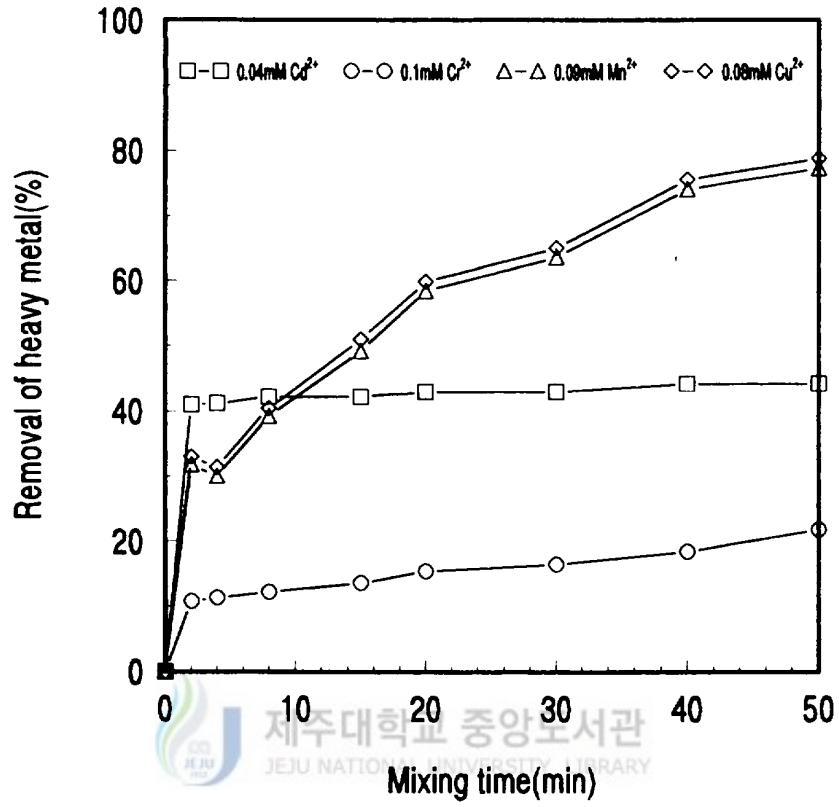


Fig. 5. Heavy metal removal using batch type reactor by biopolymer from *Z. ramigera*.

남에 따라 점차적으로 제거율이 증가되었고 Cu^{2+} 인 경우는 단일 성분으로 조제한 것보다 중금속 용액을 혼합하여 제조하였을 경우가 제거율이 떨어졌다.

한편 Cd^{2+} , Cr^{2+} 인 경우는 혼합 후 2분이 경과 되었을 때 41% 및 11% 제거되었으며, 50분 경과된 후는 44% 및 22%로 시간이 지남에 따라 Cd^{2+} 은 거의 변동이 없었으나 Cr^{2+} 제거율은 조금씩 증가하였다.

따라서 회분식 처리 방법을 이용한 중금속 제거 효율은 $\text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$ 순이었다. 또한 이 처리 공정에서 혼합 조제한 중금속 상호간의 상관관계를 Fig. 6에서 보면 Cu^{2+} 와 Cd^{2+} 인 경우는 $r=0.969$ 로 유의성을 가지고 있으며, Cu^{2+} 와 Cr^{2+} 는 $r=0.992$, Cu^{2+} 와 Mn^{2+} 는 $r=0.999$ 로 1%이내의 유의성을 가지고 있어 고도의 상관관계를 나타내었다. 그리고 이러한 상관관계로부터 생물고분자에 의한 중금속 상호간의 제거 추이를 예측할 수 있으리라 생각된다.

Williams(1984)은 생물고분자인 단백질의 금속결합능은 $\text{Cu} > \text{Zn} > \text{Ni} > \text{Co} > \text{Fe} > \text{Mn} > \text{Mg} > \text{Ca}$ 순이라고 하였다.

2) 연속식 처리 방법에 따른 중금속 제거

Fig. 2와 같은 연속 처리 실험 장치를 설치하여 중금속 폐수(0.04mM Cd^{2+} , 0.1mM Cr^{2+} , 0.09mM Mn^{2+} 및 0.08mM Cu^{2+})를 조제한 후 그 중금속의 제거량을 측정된 실험 결과를 Fig. 7에 나타내었다.

Fig. 7에 의하면 Cu^{2+} 과 Mn^{2+} 인 경우는 혼합 시간 5분 후 각각 71% 및 70% 제거되었고, 60분 경과 후에는 두경우 모두 81% 제거되어 시간이 경과함에 따라 제거율이 증가함을 알 수 있었다.

하지만 Cd^{2+} 및 Cr^{2+} 인 경우에는 혼합 시간 5분 후에 각각 43% 및 22% 제거되었으며, 60분 경과된 후에도 44% 및 25%가 제거되어 시간이 경과되어도 제거율은 거의 일정하였다.

그리고 회분식 처리 방법과 비교하였을 때 Cu^{2+} , Mn^{2+} 인 경우는 초기에는 제거율이 증가하였지만 시간이 경과하여도 제거율은 거의 유사하였으며, Cd^{2+} , Cr^{2+} 도 역시 비슷하게 제거되었다.

연속 처리 공정에 의한 중금속 제거에서 각 중금속과의 상관관계를 Fig. 8에서 살펴보면 Cu^{2+} 와 Cd^{2+} 인 경우는 $r=0.874$ 이며, Cu^{2+} 와 Cr^{2+} 는 $r=0.874$ 로 회분

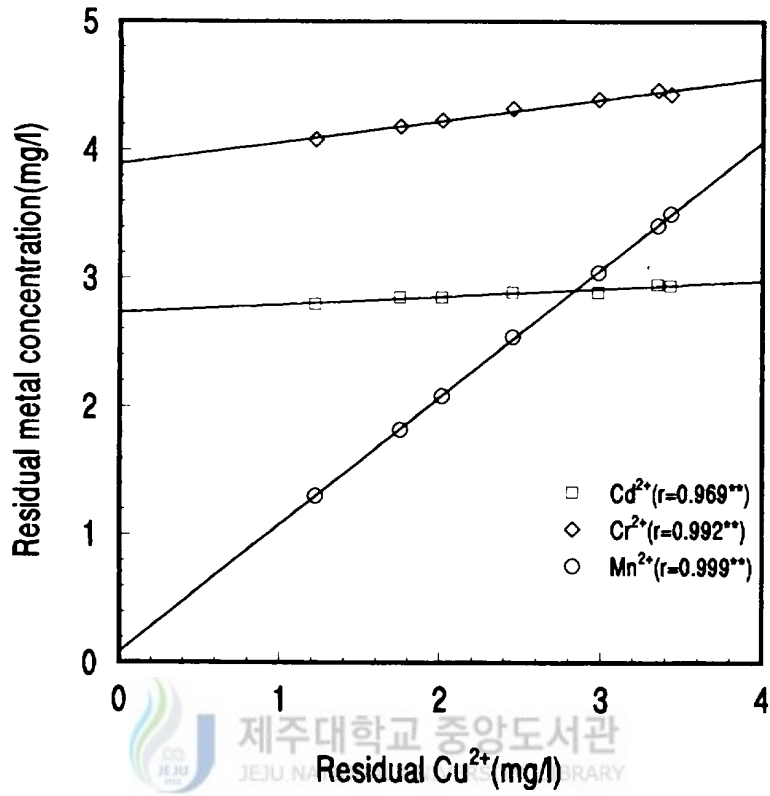


Fig. 6. Correlation of metal cation removal by biopolymer in batch type reactor.

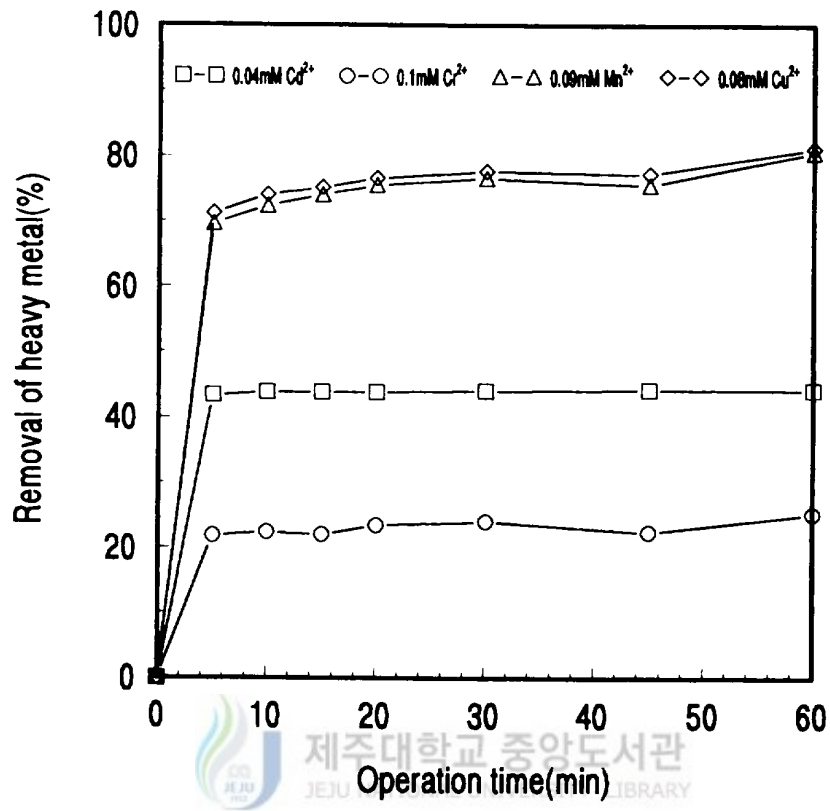


Fig. 7. Heavy metal removal using continuous type reactor by biopolymer from *Z. ramigera*.

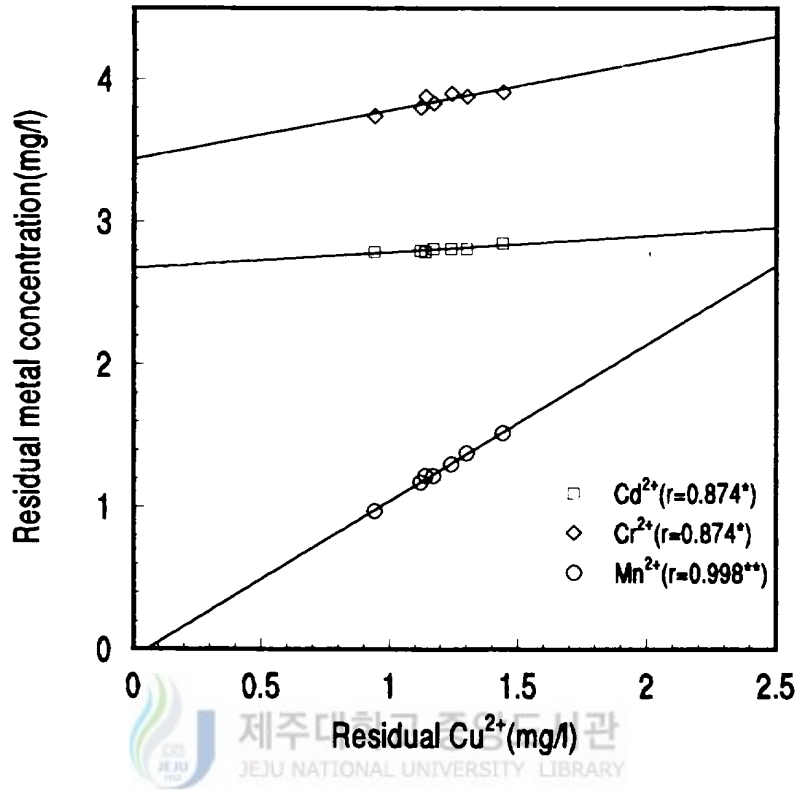


Fig. 8. Correlation of metal cation removal by biopolymer in continuous type reactor.

식 처리 공정 보다 다소 떨어지지만 5% 이내의 유의성을 가지고 있고 Cu^{2+} 와 Mn^{2+} 는 $r=0.998$ 로 회분식 공정 처리와 마찬가지로 1%이내의 유의성을 가지고 있어 고도의 상관관계를 나타내었다.

Fig. 9은 생물고분자 물질 투입량에 따른 중금속 제거율을 알기 위한 실험인데 그 결과를 살펴보면 생물고분자량을 1.0ml/min로 투입했을때는 0.08mM Cu^{2+} 가 혼합 시간 5분이 경과 후에 68%가 제거되었고, 60분 경과 후에는 69% 제거되었다. 그리고 생물고분자의 투입량을 1.5ml/min로 증가하였을때는 혼합 시간 5분이 경과된 후에는 71%제거되었고, 60분 경과 후에는 81%가 제거됨을 알 수 있었다.

그러므로 연속식 처리 방법에 의한 중금속 제거 효율은 회분식 처리 방법에 의한 중금속 제거 때와 마찬가지로 $\text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$ 순으로 효율이 좋았으며, 다만 제거율에 다소 차이가 있음을 알 수 있었다.

Hunt(1986)는 일반적으로 생물고분자에 의한 중금속 결합은 이온교환과 킬레이트 복합체 형성으로 동일한 시스템에서는 동시에 이러한 두 가지 결합 반응이 함께 일어날 수도 있다고 하였다.



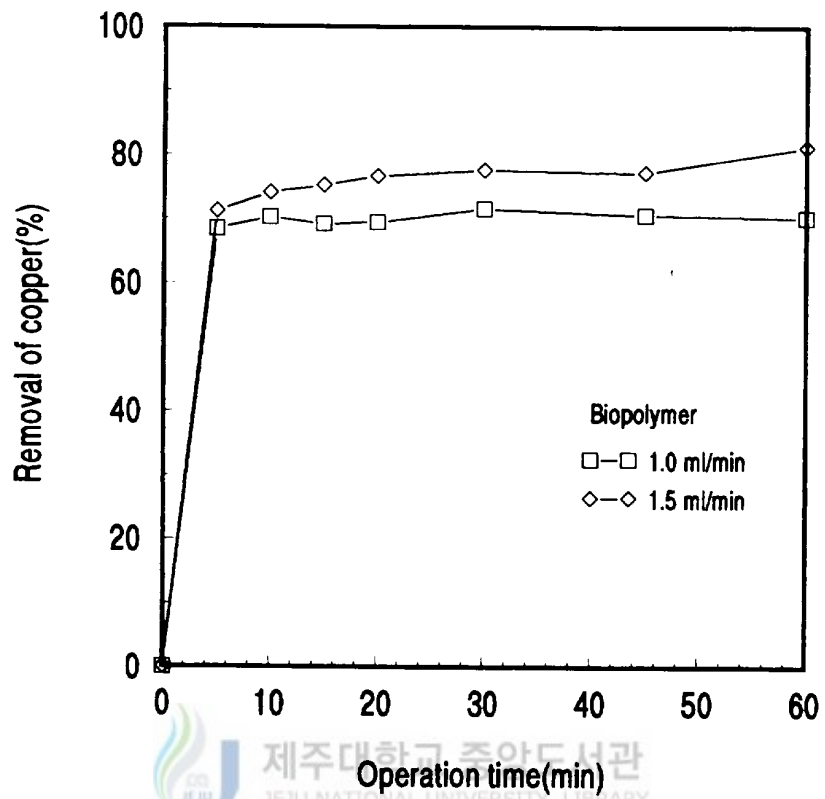


Fig. 9. Removal of copper ion according to biopolymer concentration using continuous type reactor. The concentration of Cu^{2+} was 0.08mM.

V 적 요

Z. ramigera 115 균주의 성장 및 그에 따른 생물고분자 물질 생산에 적합한 조건을 설정하였다. 그리고 균주 배양액으로부터 분리된 생물고분자 물질을 이용하여 회분식 및 연속식 처리 방법으로 Cu^{2+} , Mn^{2+} , Cd^{2+} , Cr^{2+} 등 중금속 이온 제거능을 검토하였다.

1. *Z. ramigera* 115 균주의 25℃에서 최적 성장 pH 범위는 6.3~7.0 이었고, 생육 촉진 인자로 biotin 또는 vit. B₁₂를 요구하였다.

2. C/N비가 높을수록 균체 응집능이 개선되는 경향이었고, C/N비 27.0 이상에서는 균체 응집능이 최고에 도달하였다.

3. *Z. ramigera* 115 균주 배양액으로부터 분리된 생물고분자 물질 생산량은 34.43g/ℓ 이었다.

4. 회분식 처리 방법에 의한 중금속 제거에서 Cu^{2+} 는 혼합 시간 2분이 경과된 후 98% 제거되었고, Cd^{2+} 은 67% 제거되었으며, 그 이후 시간의 경과하여도 제거율은 거의 일정하였다. 그리고 중금속 제거율 간의 상관관계는 Cu^{2+} 와 Mn^{2+} 사이의 $r=0.999$ 로 고도의 상관관계를 나타냈으며, 나머지 금속들도 1%이내의 유의차를 나타내었다.

5. 연속식 처리 방법에 의한 중금속 제거율은 Cu^{2+} 와 Mn^{2+} 이 모두 60분 지난 후 81% 제거되었으며, 중금속 제거율 간의 상관성은 회분식 처리 방법과 다소 차이를 보였다.

6. 회분식 및 연속식 처리 방법에서의 중금속 제거 효율은 $\text{Cu}^{2+} > \text{Mn}^{2+} > \text{Cd}^{2+} > \text{Cr}^{2+}$ 순이었다.

이상의 실험 결과로 볼 때 *Z. ramigera* 115 균주가 생산하는 생물고분자 물질은 중금속을 제거하는 효과를 가지고 있어서, 폐수 정화와 금속 회수에 이용될 수 있는 가능성을 보여주었다.

VI 참 고 문 헌

- Ahn, D. H. and Y. C. Chung, 1992. Biopolymer of *Zoogloea ramigera* in batch, fed-batch and continuous culture processes. *Kor. J. Appl. n Microbiol. Biotechnol.*, 20(2). 196-202.
- Amin, P. M. and S. V. Ganpati, 1967. Occurrence of *Zoogloea* colonies and protozoans at different stages of sewage purification. *Appl. Microbiol.*, 15. 17-21.
- Butterfield, C. T., 1935. Studies on sewage purification. II. A zoogloea-forming bacterium isolated from activated sludge. *Public Health Repts. U.S.*, 50. 671-684.
- Cooper, T. A., 1989. Exopolysaccharide production from lactose by wild-type and polyhydroxybutyrate minus strains of *Zoogloea ramigera* presented as poster paper at ACS 198th National Meeting, Miami, USA.
- Crabtree, K. and E. McCoy, 1967. *Zoogloea ramigera* Itzigsohn, identification and description. *Internat. J. Syst. Bacteriol.*, 17. 1-10.
- Crabtree, K., McCoy, E., Boyle, W.C. and G. A. Rohlich, 1965. Isolation, idenfication, and metaboic role of the sudanophilic granules of *Zoogloea ramigera*. *Appl. Mirobiol.*, 13. 218-226.

- Dugan, P. R. and D. G. Lundgren, 1960. Isolation of the floc-forming organism *Zoogloea ramigera* and its culture in complex and synthetic media. *Appl. Microbiol.*, 8. 357-361.
- Dugan, P. R., and H. M. Pickrum. 1972. Removal of mineral ions from water by microbially produced polymers. *Purdue Univ. Eng. Ext. Ser. Eng. Bull.*, 141. 1019-1038.
- Friedman, B. A. P. R. Dugan, R. M. Pfister, and C. C. Rensen, 1968. Fine structure and composition of the zoogloal matrix surrounding *Zoogloea ramigera*. *J. Bacteriol.*, 96(6). 2144 - 2153.
- Hunt, S., 1986. Diversity of biopolymer structure and its potential for ion-binding applications, Immobilisation of ions by bio-sorption. *Society of Chemical Industry*, pp.15 - 46.
- Kiff, R. J. and D. R. Little, 1986. Biosorption of heavy metals by immobilised fungal biomass, Immobilisation of ions by bio-sorption. *Society of chemical Industry.*, pp.71 - 80.
- Logan, B. E. and D. B. Wilkinson, 1991. Fractal dimensions and porosities of *Zoogloea ramigera* and *Saccharomyces cerevisiae* aggregates. *Biotechnol. Bioeng.*, 38. 389 - 396.
- Murgel, G. A., D. Zmerson, and W. C. Giorse, 1991. Experimental apparatus for selection of adherent microorganisms under stringent growth conditions. *Appl. Environ. Microbiol.*, 57(7). 1987 - 1996.

- Mullen, M. D., D. C. Wolf, F. G. Ferris, and G. W. Bailey, 1989. Bacterial sorption of metals. *Appl. Environ. Microbiol.*, 55(12). 3143 - 3149.
- Norberg, A. B. and S. O. Enfors, 1982. Production of extracellular polysaccharide by *Zoogloea ramigera*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 44(5). 1231 - 1237.
- Norberg, A. B. and Stefan Rydin, 1982. Development of a continuous process for metal accumulation by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.*, 26. 265 - 268.
- Norberg, A. B., 1983. Accumulation of heavy-metal ions by *Zoogloea ramigera*. *Biotechnol. Bioeng.*, 26. 239 - 246.
- Ohad , I., D. Danon, and S. Hestrin. 1962. Synthesis of cellulose by *Acetobacter xylinum*. V. Ultrastruture of polymer. *J. Cell Biol.*, 12. 31 - 46.
- Rich, L.G., 1955. Respiration studies on the organic nitrogen preferences of *Zoogloea ramigera*. *Appl. Microbiol.*, 3. 20 - 25.
- Ross, I. S and C. C. Townsley, 1986. The uptake of heavy metals by filamentous fungi, Immobilisation of ions by bio-sorption. *Society of Chemical Industry*, pp.49 - 58.
- Sinskey, A. 1986. Biopolymers and modified polysaccharides, In Harlander S. K., and T. P. Labuza(ed.), *Biotechnology in Food Processing*, Noyes Publ., New Jersey pp. 73 - 114



-
- Trujillo, E. T. and T. H. Jeffers, 1991. Mathematically modeling the removal of heavy metals from a wastewater using immobilized biomass. *Environ. Sci. Technol.*, 25(9). 1559 - 1565.
- Unz, R. F. and Norman C. Dondero. 1967. The predominant bacteria in natural *Zoogloea* colonies(1. Isolation and Identification). *Can. J. Microbiol.*, 13. 1671 -1682.
- Wattie, E., 1942. Cultureal characteristics of zoogloea-forming bacteria isolated from activated sludge and tricking filters. U.S. *Public Health Repts.*, 57. 1519 - 1534.
- Williams, R. J. P., 1984. Endeavour-New Series, 8, 65.
- Yakuba, N. A. and A. W. L. Dudeney. 1986. Biosorption of uranium with *Aspergillus niger*. Immobilisation of ions by bio-sorption. *Society of chemical Industry*, pp183 - 200.



감사의 글

본 논문이 완성되기까지 지속적인 지도를 아끼지 않으신 고영환 교수님께 깊은 감사를 드립니다. 또한 심사하시면서 귀중한 조언과 격려를 주신 강영주 교수님, 하진환 교수님, 그리고 송대진 교수님, 김재하 교수님, 김수현 교수님, 임상빈 교수님께 감사드립니다.

아울러 바쁜 가운데서도 논문과정을 마칠 수 있도록 배려해주신 보건환경연구원 고용구 원장님, 김식유 과장님, 김영주 선생님, 양경하 연구사, 송영철 연구사를 비롯한 여러 직원들에게도 감사를 드립니다. 그리고 본 과정을 같이 마친 이창환 선생님과 도움을 주신 여러 선배님께 감사의 뜻을 표합니다.

끝으로 어려운 여건에서도 성심성의로 뒷바라지를 아끼지 않은 내아내와 유정, 며칠 전에 낳은 내아들, 오늘이 있기까지 보살펴주신 부모님과 모든 가족들에게 감사를 드리며, 내년에 회갑을 맞으신 장인어른께 자그마한 선물을 드립니다.

