

미생물 포괄고정화를 위한 고정화재의 비교검토

신동범*, 윤창훈, 강경수¹⁾

자연과학대학 식품영양학과, ¹제주환경개발(주)

A Comparative Studies of Immobilizing materials for Immobilization of Microorganisms

Dong-Bum Shin*, Chang-Hoon Yoon
and Keyung-Soo Kang¹⁾

*Dept. of Food Science and Nutrition, Cheju National
University, Cheju, Chejudo, 690-756, Korea*

¹⁾*Cheju Environmental Developments Co., Ltd, Cheju,
Chejudo, 690-756, Korea*

We conducted the experiments to find out the appropriate gelling materials for the treatment of waste water by immobilizing microorganisms inside the gels. The gelling materials known to immobilize microorganisms or cells in them are polyacrylamide, polyvinylalcohol, sodium alginate, κ -carrageenan and chitosan. The gel strengths were determined by the breaking points of the pellet using a rheometer with reaction time. The polyacrylamide gels were retained their solidities and activities excellently compared with the other pellets of polyvinylalcohol, sodium alginate and chitosan with reaction time.

It is considered that, in the other hand, the polyacrylamide gels

are toxic to the single microorganisms and cells by free radicals during the formation of gels. We used activated sludge for the immobilization, so it didn't matter the toxicity caused by free radicals. The profiles of waste water treatment by all the immobilized pellets using in this study were showed nearly similar patterns, but gel strength of all the gels except polyacrylamide pellets were getting weak and weak as reaction time goes by. It was concluded that the polyacrylamide gels are excellent for immobilization of activated sludge for waste water treatment, but in the case of immobilization of single microorganisms or cells, natural polysaccharides of sodium alginate, κ -carrageenan or chitosan are thought to be suitable, and it must be developed the techniques for elevating gel strength of natural polysaccharides.

서론

미생물을 포괄고정화하는 방법은 의약품, 화학품의 제조분야에 있어서 아미노산⁽¹⁾, 유기산⁽²⁾, 알코올 발효⁽³⁾ 등을 목적으로 이미 공업화되어 있다. 이것은 특정 물질을 생산하는데 자기자신은 촉매적으로 작용하지 않고 적절한 조건에서 지속적으로 반응에 공헌하고 있는 효소 또는 효소를 생산하는 미생물, 즉 생체매체를 반응조내에 고정화 시킨다면 연속운전이 가능하게 되어 생산성의 비약적인 효율화를 기대할 수 있기 때문이다. 이런 실용화 단계에 이른 미생물 포괄고정화방법은 이에 머물지 않고 폐수처리분야에 까지 확대되고 있는 실정이다⁽⁴⁾. 현재 여러 연구자에 의해서 활성 슬러지⁽⁵⁻⁷⁾를 비롯하여 탈질균^(8,9) 등의 단일균의 포괄고정화가 시도되고 있다.

폐수처리에서 포괄고정화법을 이용하게 됨으로서 얻어지는 이점은 여러가지면에서 검토되고 있다. 유기물 함유 폐수처리에는 처리비가 저렴한 활성오니법이 널리 이용되고 있으나, 이 방법은 미생물의 농도를 높게 유지할 수 없으므로 처리시간이 오래 걸리고, 잉여오니가 대량 발생함으로써 그 처리에 많은 비용이 필요하며, 특정의 균을 반응조내에 잡아둘 수 없으므로 난분해성물질 등을 처리할 수 없는 문제점이 있다⁽¹⁰⁾.

그 대책으로서 미생물을 모래 등의 담체표면에 부착시켜 미생물의 농도를 높이는 소위 고착형생물처리법 개발⁽¹¹⁾이 이루어지고 있으나, 이들 문제점은 충분히 해결되지 않고 있다.

최근 미생물을 포괄고정하여 폐수 처리에 이용하려는 연구가 이루어지고 있다. 즉, 활성오니를 고분자 gel로 포괄고정한 pellete인 고정화 미생물을 이용한다면 증식한 미생물이 pellete외로 누출되기 어려우므로 잉여오니의 발생량을 줄일 수 있고, 더욱이 pellete내부에 활성오니량을 고농도로 잡아둘 수 있으므로 처리의 고속화가 가능하다는 것등 여러 문제점들을 해결할 수 있는 가능성이 있다.

미생물을 포괄고정화하는데 사용되고 있는 고분자 gel은 현재 합성수지계인 아크릴아마이드(PAA), 폴리비닐알코올(PVC) 과 천연다당류인 알긴산나트륨, 캡과 카라기난 등이 사용되고 있으나, 여러가지 문제점을 안고있다. 즉, 합성수지계는 gel화의 강도가 높은 반면 gel화 시키는 물질들의 미생물에 대한 독성문제를 들 수 있으며^(12,13), 천연다당류의 경우에는 gel화가 간단히 이루어 지는 장점^(14,15)은 있으나 gel의 강도가 떨어지는 단점이 있다는 사실이 알려져 있다.

고정화 재료로서 gel이 가져야 할 조건으로서는 다음과 같은 사항들이 고려되어야 한다. 1)수용성으로서 상온에서 고정화시킬 수 있는것. 2)고정화 할때나 고정화 후에도 미생물에 대한 독성이 적을것. 3)폐수중의 기질의 투과성이 좋을것. 4)고정화재 자체가 생물분해성이 적고, 내구성이 좋을것. 5)미생물의 누출이 적을것. 6)물리적 강도를 가질것. 7)값이 저렴할것 등이다.

현재 이와같은 조건에 맞는 고정화재는 알려져있는 것이 드물고, 위에서 거론한 합성수지계인 PAA⁽¹⁶⁾와

PEG⁽¹⁷⁾가 위의 조건을 어느정도 충족시키면서 일본의 경우 이를 이용하여 폐수처리에 실제로 응용하고 있는 중이며, 이 방법에 의한 처리의 실용성 여부는 더 지켜 보아야 할 것이다.

따라서 본 연구에서는 위의 조건에 더욱 합당한 gel화제의 탐색과 더불어 PAA 및 PVA 또는 천연 다당류를 이용한 gel화 소재에 대한 탐색에 초점을 맞추어 실험을 수행하였다.

재료 및 방법

1. 실험재료

Gel 소재로서는 polyacrylamide (Sigma사,미), polyvinylalcohol(Wako사,일), carboxymethylcellulose(CMC, Aldrich사, 미)를 구입하였고, Sodium Alginate와 Chitosan은 (주)현대화성에서 제공받았다.

2. 실험방법

1) Activated sludge 수집처리

Aactivated sludge는 제주대학교 오수처리장의 폭기조에서 수집하여 사용될 인공폐수에서 15시간동안 미리 활성화시켰다. 고정화를 시키기 위하여 activated sludge를 실린더에서 3-4시간 정치 후 상등액을 버리고 농축된 것을 사용하였다.

인공폐수는 시판분유를 0.8 g/L의 농도로 만들어 사용하였다.

2) Polyacrylamide pellet 조제방법

(acrylamide 15% + N,N-bis-acrylamide 0.8%) 혼합액과 activated sludge, 25% TEMED, 1% potassium persulfate를 각각 24:40:1:5의 비율로 혼합하여 직경

3mm 플라스틱 튜브에 흘려넣고 20분 방치후 완성된 immobilized activated sludge gel을 뽑아내었다. 이것을 다시 3mm 간격으로 잘라내어 pellet을 만들고 이후의 실험에 사용하였다.

3) Sodium alginate pellet 조제방법
2% sodium alginate 와 activated sludge를 50:50으로 혼합한 후, 0.5M CaCl₂ 용액에 적하하여 하루동안 방치한후 Immobilized activated sludge gel pellet을 조제하였다. 만들어진 pellet들의 평균 직경은 5mm 였다.

4) Polyvinylalcohol pellet 조제방법
10% polyvinylalcohol과 activated sludge를 50:50으로 혼합하여 포화 분산용액(60g/L)에 적하하여 하루동안 방치하여 Immobilized activated sludge pellet을 얻은후 물에 충분히 세정하였다. 조제된 pellet들의 직경은 평균 3mm 였다.

5) Chitosan pellet 조제방법
Activated sludge 와 1% CMC나트륨 용액을 1 대 1로 혼합하여, 0.5% CMC 분산액을 만든다. 1% 초산용액에 0.7% chitosan 을 녹여 만든 용액을 소용돌이가 칠 정도로 교반하면서 위에서 만든 CMC 분산액을 주사기를 통하여 적하 시키면서 activated sludge pellet을 얻었다. 조제된 pellet의 평균직경은 4mm였다.

6) 조제된 pellet의 강도 측정
각각 조제된 pellet들은 강도를 측정하기 위하여 Rheometer(Model TA-XT2, Stable Micro Systems사)를 사용하였다. Pellet의 강도는 레오

메타를 이용하여 표면에 힘을 가했을 때 pellet이 부서지는 압력(Kg/cm²)으로서 측정을 하였다.

7) Immobilized activated sludge pellet의 반응성 검토

조제된 pellet의 폐수처리 능력을 검토하기 위하여 batch식으로 처리하여 폐수중의 유기물농도의 변화를 조사하였다. 반응장치는 2L mass cylinder를 이용하였으며, 주기적으로 폐수를 갈아주면서 유기물농도의 변화를 COD로 측정하여 반응성을 살펴 보았다.

결과 및 고찰

1. Immobilized Activated Sludge Pellet의 특성

1) Polyacrylamide Pellet

조제된 gel은 강도면에서는 우수하지만, gel을 만드는데 사용되는 acrylamide 와 중합촉진제인 TEMED 는 미생물에 대한 독성이 심한 것이 문제점으로 대두되고있다. 본 실험에서 사용되는 activated sludge인 경우는 sludge내부에 미생물들이 flocc을 형성하고 있으며, 미생물군들이 주로 gram양성균이 우세하기 때문에 미생물에 대한 독성은 그다지 문제시 되지 않는다. 다만 탈질균등 gram음성균인 경우에는 보호제로 미리 코팅시킨후 고정화시킨다면 독성문제는 해결이 가능하다고 여겨진다. 본 연구에서는 사용된 고정화 소재 중에서 polyacrylamide를 중심으로 하여 실험을 진행하였다. 그 이유로는 우선 조제된 gel이 다른 어느 소재보다도 강

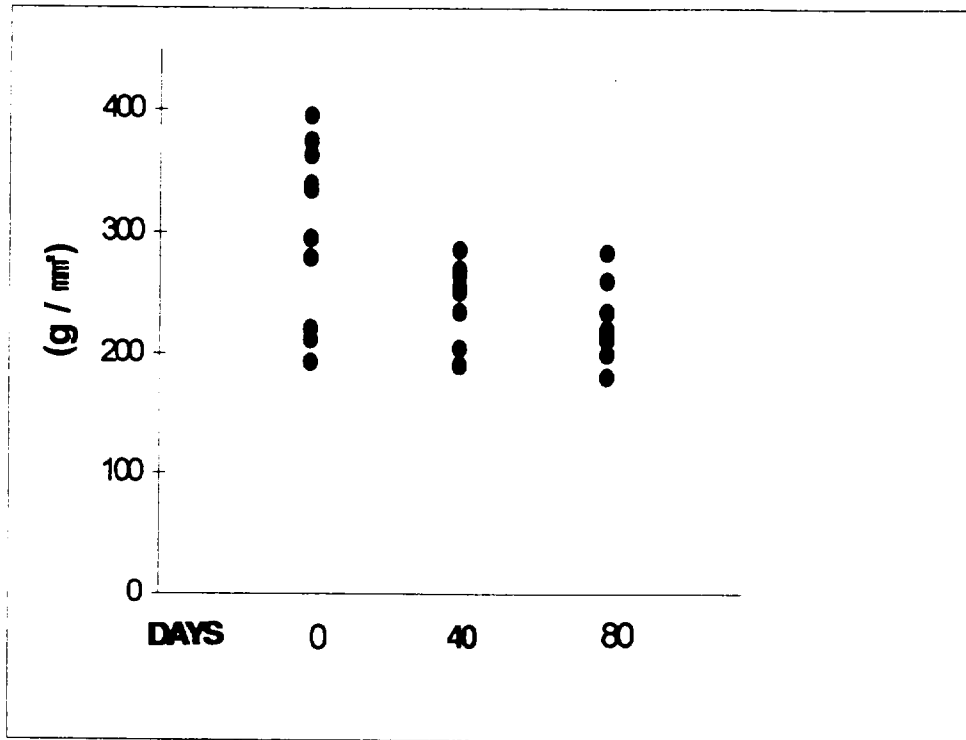


Fig. 1. Changes in Gel Strength of Polyacrylamide Pellets Immobilized Activated Sludge with Reaction Time (Days)

Activated sludge were collected from the Waste water disposal station at the university. Activated sludge for immobilization were cultivated for 15 days with supplying synthetic waste water made from the market powdered milk(0.8g/L), and used the concentrated bottom layer when activated sludge were stand for 3 to 4 hours. Immobilization was conducted by suspending activated sludge in an acrylamide monomer solution containing crosslinker and a promotor by ratio of 50 to 50, and mixed with an initiator. The individual gel strength was measured by the breaking point of gel using rheometer.

도면에서 우세하였고, gel의 내구성이 또한 다른 소재보다도 좋았기 때문이다.

80일간에 걸쳐 gel의 내구성을 측정한 결과(Fig. 1), 조제된 pellet의 개체 차이때문에 재현성 있는 결과는 얻지 못하였으나, 일수의 경과에 따른 내구성의 경향은 알 수 있었다. 80일이 경과한 후에도 젤의 내구성에는

큰 차이가 없었으며, 강도 역시 유지되고 있음을 알 수 있었다.

Fig. 2 는 4 - 7일 간격으로 폐수를 교환해 주면서 한달여 동안 폐수 중의 유기물 성분의 처리능력을 검토한 것이다. 매회 측정된 결과 하루가 지난후 유기물 성분의 농도가 거의 일정해 지는 것을 알 수 있었는데, 한

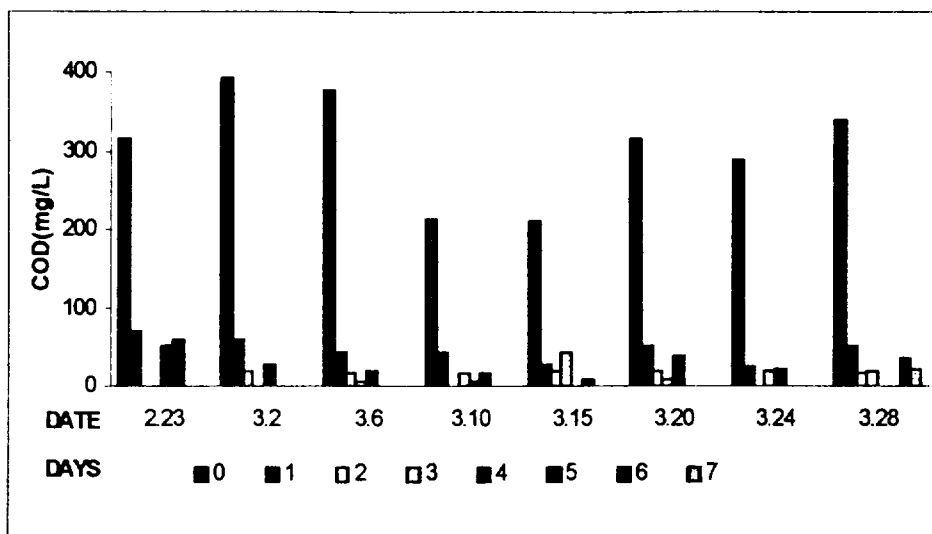


Fig. 2. Profiles of Waste Water Treatment by Polyacrylamide Pellets Immobilized Activated Sludge.

Immobilized activated sludge pellets were added by 10%(v/v) to the waste water solution. COD(mg/L) was measured everyday during Feb. 23 to Mar. 28 exchanging the waste water at intervals of 4 or 7 days.

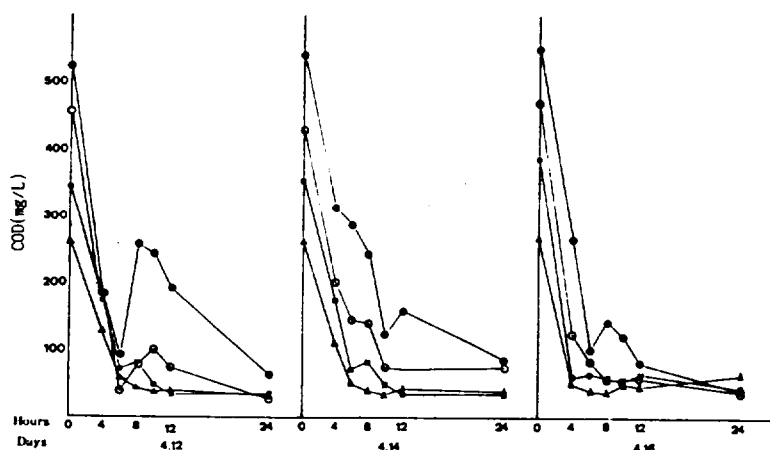


Fig. 3. Effect of Initial Concentration of Waste Water on the Waste Water Purification by Polyacrylamide Gels Immobilized Activated Sludge within 24 hours.

Immobilized activated sludge pellets were added by 10%(v/v) to the waste water solution. COD(mg/L) was measured every 2 hours during Apr. 12 to 16 exchanging the waste water at intervals of 2 days. The initial concentrations of waste water were 1.2g-COD_{Mn}(●—●), 1.0g-COD_{Mn}(○—○), 0.8g-COD_{Mn}(■—■) and 0.6g-COD_{Mn}(▲—▲).

달이 지나도록 처리능력에 변화가 없는 것은 polyacrylamide내에 포괄고정화된 미생물은 안정화되고 있으며, 이는 polyacrylamide가 미생물에 대한 손상을 주지않고 있는 것이라고 추정할수 있었다.

Fig. 3 은 초기 인공폐수의 농도를 달리 했을때 고정화 미생물의 유기물성분의 처리능력을 검토한 것이다. 처리능력은 세차레 실험결과 초기반응 8시간 까지는 COD제거율이 85% 정도로 모두 비슷한 경향을 나타내고 있으며, 처리능력에 약간의 차이를 보이는 것은 pellet 조제시에 사용되는 활성오니중의 수처리 미생물 개체수나 종류에 따른 처리능력의 변화로 여겨진다. 그러나 폐수처리 시간의 경과에 따라 polyacrylamide pellet내부에 어느정도의 미생물들이 포괄되고 있는지에 대해서는 더욱 검토가 요구된다.

이러한 결과들을 종합 했을때 polyacrylamide에 의한 고정화 미생물의 폐수 처리능력은 실험실 규모이기는 하지만 대형처리에의 가능성도 충분할 것이라 여겨졌다.

2) Sodium Alginate Pellet

해조류의 한성분이며 천연다당류인 알긴산 나트륨은 비교적 간단하게 gel화가 이루어지는 장점이 있다. 미생물에 대한 독성도 전혀 없으므로 고정화 재료로서 바람직한 소재이지만, 시간의 경과에 따라 gel의 강도가 떨어지는 단점이 있다. 본 연구에서도 알긴산 나트륨을 이용하여 활성오니를 포괄 고정화 시킨 pellet을 조제하여 실험을 행하였다.

Table I은 반응일수에 따른 pellet의

Table I. Comparison of Immobilized Alginate Gel Strength according to the Concentration of Sodium Alginate Before and After the Reaction for 40 Days.

Concentration of Na-alginate (%)	Gel Strength (Kg/cm ²)	
	Before reaction	After reaction
3	0.745	0.116
2	0.531	0.048

내구성을 측정 한 것이다. 그러나 알긴산 나트륨의 경우에는 반응일수의 경과에 따라 pellete의 직경이 작아지는 것을 볼 수 있었는데, 이것은 처리기간에 따라 pellet의 표면이 서로의 마찰에 의해 깎여져 나가기도 하지만, 겔응고에 관여하는 Ca²⁺ 이온이 폐수중에 존재하는 인산이온 등에 의하여 이탈이 되면서 겔이 용해되기도 하고 활성슬러지에 의해 다당류인 알긴산이 분해되기도 한다고 알려져있다⁽¹⁴⁾. 이러한 결점을 보완하기 위하여 폐수중에 염화칼슘(CaCl₂)을 첨가하여 겔의 강도저하를 방지하고 있기도 하다⁽¹⁵⁾.

활성슬러지를 포괄시킨 알긴산나트륨 pellet이 유기물성분을 처리한 결과를 Fig. 4에 나타내었다. 처리능력은 다른 pellet과 큰 차이를 나타내지는 않았다.

그러나 알긴산 나트륨에 의한 포괄고정화는 활성슬러지를 이용할 경우에 활성슬러지에 의한 알긴산나트륨의 분해가 예상되어 적당하지 않다고 여겨진다. 그러나 폐수의 탈질화에 응용할 때 단일균인 질화균 또는 탈질균의 경우에는 적당하다고 여겨지지

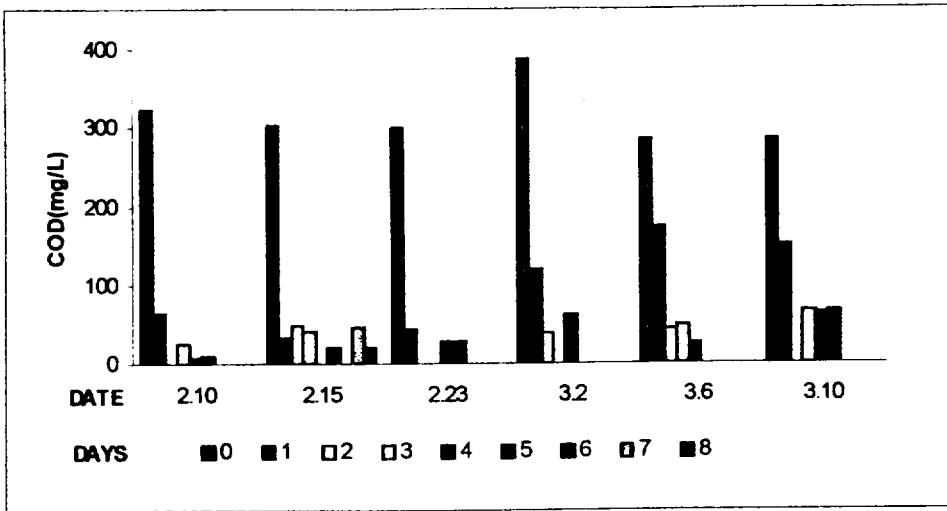


Fig. 4. Profiles of waste water Treatment by Alginate Pellets Immobilized Activated Sludge.

Immobilized activated sludge pellets were added by 10%(v/v) to the waste water solution. COD(mg/L) was measured everyday during Feb.10 to Mar. 10 exchanging the waste water at intervals 4 or 8 days.

만, 겔의 강도를 높힐 수 있는 방법이 더욱 강구 되어져야 할 것이다.

3) Polyvinylalcohol Pellet

Polyvinylalcohol은 고정화 소재로서 응용 가능하다는 보고는 다수 있으나^(12,13), 실제 본연구에서 시도해 본 결과로는 겔은 형성이 되지만, 조제 과정 중에 서로 달라붙어 떨어지기가 어려울 뿐만 아니라, 만들어진 고정화 pellet을 반응조에서 반응시켰을 때 많은 거품을 일으키면서 겔의 강도가 약해지는 것을 볼 수 있었다. 만들어진 겔은 부서지는 성질이 없으므로 강도의 측정은 불가능 하였으나, 반응 중 또는 반응후 겔이 해면체와 같이 변하는 것이 관찰되어 겔의 견고성은 없었다. 이러한 현상은 polyvinyl alcohol이 반응 중에 붙어넣어 주는

산소와의 반응에 의해 녹아나오는 것이라 여겨진다. 따라서, 이 소재를 이용하여 겔을 조제할 시에는 이 문제점은 해결해야 할 필요가 있으며, 다른 가교제의 검색이 필요하다고 여겨진다.

활성슬러지를 포괄시킨 polyvinyl alcohol pellet에 의한 유기물성분의 처리능력은 다른 pellet과 거의 비슷한 처리경향을 나타내고 있었다 (Fig.5).

Pellet 조제시 겔 응고제인 포화붕 산용액은 미생물에 대해 독성을 나타낸다고 알려져 있으나⁽⁵⁾, 본 실험인 경우 활성슬러지에는 커다란 영향이 없는 것으로 나타나고 있었다.

4) chitosan - CMC

이 소재들 역시 천연물로서 여러분

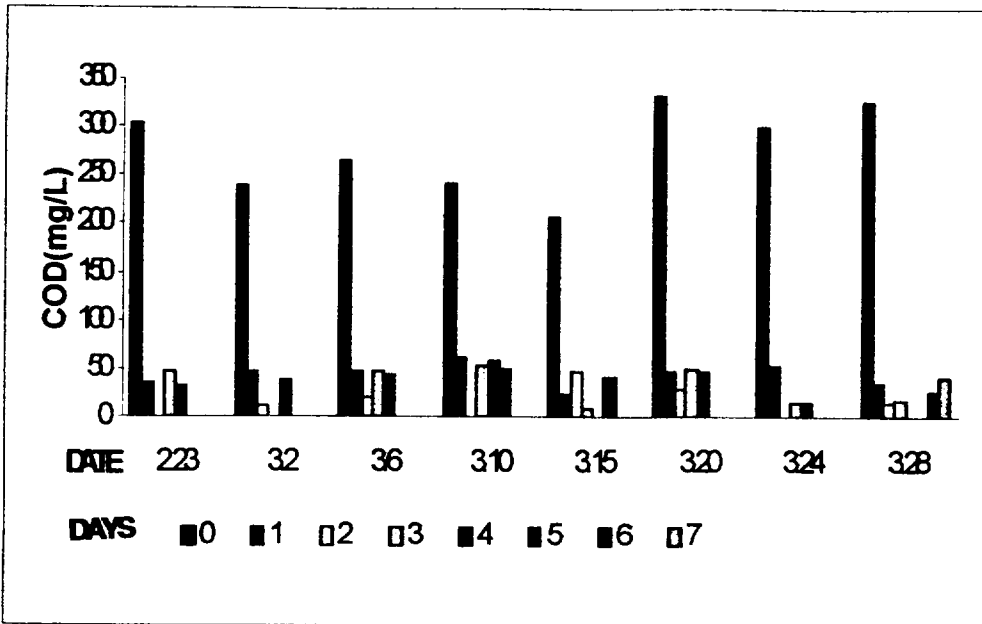


Fig. 5. Profiles of waste water Treatment by Polyvinylalcohol Pellets Immobilized Activated Sludge.

Immobilized activated sludge pellets were added by 10%(v/v) to the waste water solution. COD(mg/L) was measured everyday during Feb. 23 to Mar. 28 exchanging the waste water at intervals of 4 or 7 days.

야에 응용되고 있는 물질들이다. 본 연구에서도 고정화 재료로서 이용 가치가 있다고 판단이 되어 시도하여 보았다. 이들 물질은 다당류의 유도체로서 gel이 이루어지기 위한 가교제의 탐색이 중요하다. KCl등의 염은 그 가교반응이 이온성 결합이므로 강도가 약한 것이 결점이어서 새로운 가교제의 탐색이 필요하다고 여겨졌다. 본 실험에서는 chitosan 과 CMC를 이용하여 capsule화를 시도하여 보았다. 즉, 내부에 polyanion 물질인 CMC를 Activated sludge와 혼합한 상태로 외부를 polycation인 chitosan 으로 둘러쌓이게 만든 것이며, 이 방법은 세포를 포괄 고정화 시켜 연속 반응을 행할때 이용하기도 한다⁽¹⁸⁾.

활성슬러지를 포괄 고정화시켜 조제된 capsule의 유기물성분의 처리능력을 Fig. 6 에 나타내었다. 처리능력은 다른 pellet들에 비교했을 때 비슷한 경향을 나타내고 있으나, 시간의 경과에 따라 capsule의 내구성이 약해지는 것을 관찰할 수 있었다. 이것은 조제초기에도 비슷한 현상을 나타내는데, capsule을 손으로 눌렀을 때 그냥 꺼져버리는 현상이 관찰되었다. 따라서 capsule의 강도 측정은 불가능하였다. Capsule의 강도를 높이기 위해서는 재료의 배합비율 및 capsule내부에 들어가는 polyanion 물질들의 검색과 이들 물질들의 chitosan과의 겔 형성 적합성 여부에 대한 검토가 더욱 필요하다고 여겨진다.

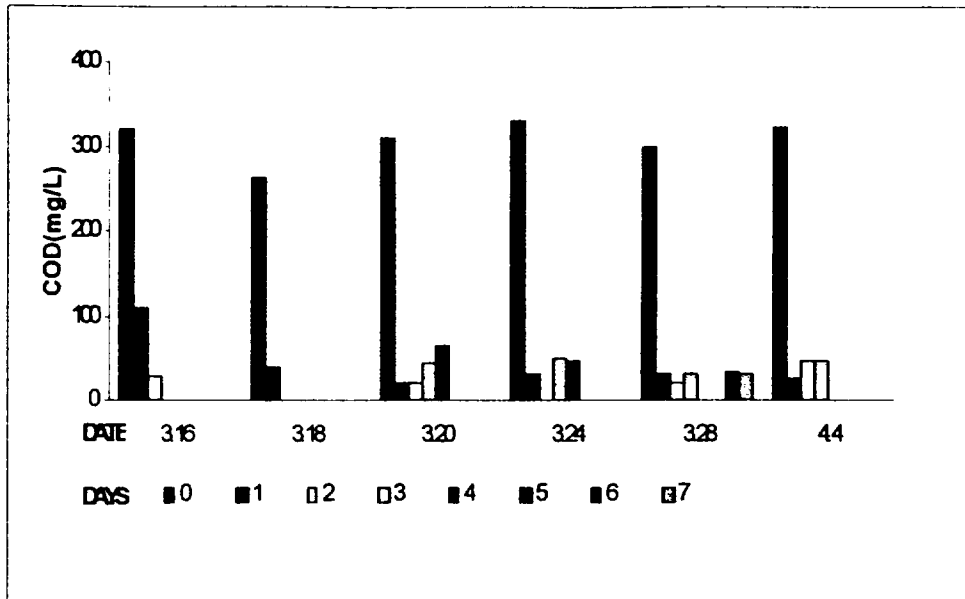


Fig. 6. Profiles of waste water Treatment by Chitosan-CMC Pellets Immobilized Activated Sludge.

Immobilized activated sludge pellets were added by 10%(v/v) to the waste water solution. COD(mg/L) was measured everyday during Mar. 16 to Apr. 4 exchanging the waste water at intervals of 4 or 7 days.

결론

포괄 고정화법에 의한 폐수처리는 일본 몇몇 군데에서 실제로 응용되고 있다^(16,17). 그 중에서 polyacrylamide에 의한 고정화 pellet은 비교적 쉽게 조제될 수 있으며 Matsudo시(일본)에서 폐수처리에 이용되고 있다. 그러나 이 polyacrylamide에 의한 고정화 gel의 문제점으로는 독성을 들 수 있겠는데, activated sludge의 조성은 80-90%가 gram positive bacteria로 이루어져 있으므로⁽¹⁶⁾ 독성이 그다지 문제가 되지 않는다. 본 실험에서도 polyacrylamide에 의한 고정화 pellet이 나타내는 제반 성질로 미루어 본다면 내구성 면에서는 충분히 실용가

치가 있다고 여겨진다. 그러나 검토를 더욱 해야될 부분이 있다면, 보다 더 장기적인 실험으로 연속반응을 시켰을 때의 유기물의 분해능력을 살펴 보아야 하며, 장기적인 실험에서 pellet 내부의 미생물들의 분포상황을 조사할 필요가 있으며, 또한 그 미생물들이 어떠한 생육곡선을 그리며 생존해 나가는지를 미생물학적인 관점에서 조사할 필요가 있다고 여겨진다. 또한, pellet 내부의 공간을 pellet의 농도에 따라 측정하여 공간넓이와 미생물수와의 함수관계를 정립하므로써 보다 효율적인 유기물성분들의 처리능력을 나타낼 수 있을 것이다. 그러나 이에 못지않게 효과적인 처리를 위한 장치의 설계 또한 매우 중요한

인자이다. 고정화 pellet에 의한 폐수 처리는 기존의 처리방식 보다는 장치의 콤팩트화가 가능할 수 있으며 처리시간이 단축된다는 장점이 있어서 효율적인 장치의 고안도 아울러 병행할 필요가 있기 때문이다. 본 실험에서는 polyacrylamide에 의한 고정화 pellet을 중점으로 연구를 하였다. 그러나, 폐수 처리에 이용될 수 있는 탈질균등의 gram negative 이면서 단일균인 경우에는 polyacrylamide에 의한 고정화 pellet 보다는 chitosan, alginate등의 천연 다당류를 이용하는 방법이 바람직 하다고 여겨진다. 왜냐하면 활성오니와는 다르게 단일균인 경우에는 균에 의한 gel의 분해가 쉽게 일어나지 않을 뿐만 아니라, gel소재 자체가 독성이 없기 때문이다.

참 고 문 헌

1. 千畑一朗, 土佐哲也 : 바이오リアクター-의 응용技術, p.70-78, シ-엠シ- (1986).
2. 千畑一朗, 土佐哲也 : 固定化法と擔體に關する最近の話題, 化學工學, 43(5) 276-282, (1979).
3. Williams, D. and Munnedke, D.M. : The Production of Ethanol by Immobilized Yeast Cells, Biotech. Bioeng., 23, 1813-1825 (1981).
4. 角野立夫, 大竹康友, 中村健二 : 固定化微生物による下水再利用技術, 日本工業用水協會第19回研究發表會講演集, 74 (1984).
5. 橋木 獎, 古川憲治, 濱 宏 : 活性汚泥の固定化による淨化機能に關する研究, 下水道協會誌, 22, 253, 42-50 (1985).
6. 中村裕紀, 大竹康友, 森 直道, 中島一郎 : 包括固定化微生物による排水中の窒素除去技術, 公害と對策, 22, 2, 136-138 (1986).
7. 角野立夫, 大竹康友, 中村裕紀, 宮入 篤, 川口幸男, 富澤健二 : アクリルアミド包括固定化法による排水處理, 用水と廢水, 29, 8, 735-741 (1987).
8. Tramper, J. and Grootjen, D.R.J. : Operating performance of *Nitrobacter agilis* Immobilized in carrageenan, Enzyme Microb. Technol., 8, 477-480(1986).
9. Nilson, I. and Ohlson, S. : Columnar Denitrification of Water by Immobilized *Pseudomonas denitrificans* Cells, European J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 14, 86-90 (1982).
10. 角野立夫, 中村裕紀, 大竹康友, 森直道 : 包括固定化微生物を用いた廢水處理, PPM, 6, 28-35 (1987).
11. 角野立夫, 昆 正浩, 森 直道, 中島一郎 : 包括固定化微生物を用いた廢水處理技術 用水と廢水, 27, 10, 1024-1029 (1985).
12. 橋木 獎, 古川憲治, 濱 宏 : 活性汚泥の固定化とその淨化機能に關する研究, 下水道協會誌, 23, 262, 41-48 (1986).
13. 橋木 獎, 古川憲治, 濱 宏 : 活性汚泥の固定化とその淨化機能に關する研究, - PVA-冷凍法について -, 下水道協會誌, 23, 261, 16-22 (1986).
14. Tamper, J. and de Man, A.W.A. : Characterization of *Nitrobacter agilis* immobilized in calcium

- alginate, Enzyme Microb. Technol., 8, 472-476 (1986).
15. 和田信行, 新井喜明, 石井忠浩, 矢島博文 : 固定化 *Chlorella* spによる生物學的 リン除去の基礎的検討, 第23回下水道研究發表會講演集, 446 (1986).
 16. Sumino, T, Nakamura, H. and Mori, N. : Immobilization of activated sludge by the acrylamide method, J. Ferment. Bioeng., 72, 141-143 (1991).
 17. 角野立夫, 中村裕紀, 森直道, 江森弘祥 : 包括固定化微生物を用いた排水處理, 用水と廢水, 34, 935-940 (1992).
 18. Groboillot, A.F., Champagne, C.P., Darling, G.D., Poncelet, D. and Neufeld, R.J. : Membrane formation by intergacial cross-linking of chitosan for Microencapsulation of *Lactococcus lactis*, Biotech. Bioeng., 42, 1157-1163 (1993).