

겔-스폰지 혼용 시스템에 고정화된 세포를 통한 질산염의 연속적 분해

조양희 · 함태식*

한국식품위생연구원 · *한서대학교 식품생물공학과

Continuous Nitrate Reduction by Gel and Foam Matrix (GFM) Immobilized Cells

Yang Hee Cho and Tae Shik Hahm*

Korea Institute of Food Hygiene,

*Department of Food and Biotechnology, Hanseo University

Abstract

In this study the anaerobic degradation of nitrate by in GFM (gel and foam matrix) and bead gel immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 in continuous culture was conducted. A novel GFM immobilization system was developed in order to improve conventional system (bead). With increasing nitrate concentration in water, the nitrate reduction rate was increased. The observed maximum denitrification rate by in GFM immobilized cells was 177 mg/L·h in buffered water, while that was 33 mg/L h in tap water. In comparison with bead system the reduction activity by GFM system showed 1.2~2.1 times better. The denitrification activity was not changed after 16 days storage at 5°C and also showed better activity than that of free cells or even bead immobilized cells.

Keywords: denitrification, nitrate reduction, immobilization, gel and foam matrix, *Paracoccus denitrificans*

서 론

지금까지 가장 널리 사용된 세포 고정화 방법은 겔 포탈법(gel entrapping method)으로써⁽¹⁾ 사용된 gel은 대부분 천연 중합체인 alginate, carrageenan, pectine, chitosane, agar 등이며^(2,3) 때로는 미생물의 고정화를 위해서는 합성 중합체도 사용되고 있다⁽⁴⁾. 천연 중합체는 합성 중합체에 비해 세포에 대한 독성이 적고 또한 고정화 방법이 비교적 간단하다는 장점을 가지고 있다⁽⁵⁾. 그러나 지금까지 겔포탈법의 가장 큰 단점으로 지적되어 온 점은 기질 또는 생성물이 겔매트릭스 투과시 확산에 방해(diffusion limitation)를 받는다는 점이다. 즉, 영양 공급, 산소 공급의 제한으로 bead 외부에 고정화된 세포들의 성장속도 및 생체 촉매 반응이 빨리 일어나게 된다^(4,7). 이러한 고정화방법의 단점을 극복함과 동시에 사용의 편리함을 위하여 겔-스폰지 혼용(GFM) 시스템을 개발하였으며, 동 시스템을 이용하여 이미 회분식 질산염 분해반응에 적용한 결과, 그 분해능력

은 자유세포와 유사하였으며, 반복사용할 경우에는 그 분해능력이 더 뛰어나다는 것이 입증되었다⁽⁸⁾.

본 실험에서 고정화에 이용된 *Paracoccus denitrificans*는 혐기적 상태에서 질소호흡을하는 미생물로서 nitrate를 질소가스로 변화시키는 탈질화작용(denitrification)을 한다⁽⁹⁾. 최근에는 물, 야채주스, 야채 가공식품 속에 함유된 nitrate가 문제화되면서 탈질화 작용이 크게 주목을 받고 있다⁽¹⁰⁾. nitrate는 그 자체로는 독성이 없으나 분해되면서 생기는 중간 대사물질인 nitrite는 methemoglobin을 생성하여 유아에게 있어서는 치명적인 청색증을 유발한다. 또 한편으로는 단백질 속에 함유된 amine과 결합하여 일반적으로 암을 유발하는 물질로 알려진 nitrosamine을 형성하게 된다^(11,12). 그러므로 nitrate를 무해한 물질로 분해하는 것은 식품가공 및 식품위생이나 환경위생 측면에 있어서 대단히 중요한 관심사 중의 하나로 대두되고 있다. 특히 폐수 오염 유발 및 기타 유해한 물질을 생성함이 없이 미생물을 이용하여 물속의 nitrate를 분해하는 생물학적 탈질화작용은 이러한 점에서 더욱 각광을 받고 있다고 할 수 있다⁽¹³⁻¹⁵⁾. 이러한 특성을 가진 미생물을 고정화 하므로써 자유세포에 비해 여러 가지 장점들을 도출

Corresponding author: Yang-Hee Cho, Department of Food Hygiene Research, Korea Institute of Food Hygiene, 57-1 Noryangjin-dong, Dongjak-gu, Seoul 156-050, Korea

해 낼 수 있다. 즉, 분리가 쉽고 연속공정에 이용하므로서 공정의 단가를 줄일 수 있고 외부의 환경변화, 즉 온도, 산도변화에 저항성이 강해질 수 있다⁽¹⁶⁾.

따라서 본 논문에서는 GFM 고정화시스템을 이용하여 모델시스템으로서 물속의 nitrate을 연속적으로 분해하는 능력과 저장중의 안정성을 전통적인 세포고정화 방법인 bead시스템 및 자유세포와 비교 고찰하였다.

실험 재료 및 방법

고정화에 사용된 미생물

고정화를 위한 미생물로서는 비교적 질산염의 분해능력이 뛰어난 것으로 알려진 *Paracoccus denitrificans* DSM 65를 선택하였으며 이는 독일중군협회로부터 분양받아 실험미생물로서 사용하였다.

미생물의 배양

실험균주는 영양배지(Nutrient II)에서 배양한 후 다시 저장용 밀폐용기를 이용하여 혐기적상태에서 24시간 배양한 것을 세포고정화에 사용하였다⁽¹⁷⁾. 미생물의 배양을 위하여 사용된 영양배지 II의 조성은 다음과 같다; 육류추출물 10 g/L, 펩톤 10 g/L, 염화나트륨 5 g/L, 질산칼륨 1.63 g/L.

세포고정화 방법

미생물의 고정화는 이미 발표한 조 등⁽⁸⁾의 방법에 따라 행하였다.

고정화 미생물을 이용한 nitrate의 연속분해

고정화 미생물 90 mL를 air-lift reactor (총용량 600 mL)내에 옮긴 후, medium의 회석속도를 0.14~1.21 h⁻¹으로 변화시키면서 nitrate 분해속도를 측정하였다. 이때 물속의 nitrate 농도는 100 mg/L에서 부터 800 mg/L까지 단계적으로 증가시켰다.

고정화 세포의 저장안정성

자유세포와 고정화 세포의 저장 안정성을 시험하기 위해 각 세포들을 nitrate 분해반응에 일차 적용시킨 후, 각각을 5°C와 20°C에서 저장하였다. 저장 후 진탕 배양기 속에서 재활성화없이 배양하여 nitrate와 nitrite의 분해능력을 측정하였다. 이 분해능력을 저장전의 처음 분해능력과 비교하여 상대 분해능력(%)으로서 나타내었다.

Nitrate와 nitrite의 정량 분석방법

Table 1. Operating conditions of HPLC for nitrate and nitrite quantitative analysis

Instrument	ssShimadzu
Column	Partisil SAX 10 m (Fa. Bischoff)
Solvent	15 mM Phosphate buffer (pH 3.2)
Sample size	20 µL
Flow rate	2 mL/min
Detection	UV at 220 nm

HPLC를 이용한 nitrate와 nitrite의 정량 분석은 Schuster와 Lee의 방법⁽¹⁸⁾을 변형하여 측정하였다. 분리조건은 Table 1과 같다.

Nitrate와 nitrite 분해속도 계산

시간당 변화하는 nitrate와 nitrite의 농도를 측정 한 후, 초기 nitrate양을 기준으로 상대 분해속도(%)를 계산하였다. Nitrate 분해속도(R)는 $R=(C_0/C_t) \times 100$, nitrite 분해속도(R_i)는 $R_i=(C_{i0}/C_{it}) \times 100$ 로써 계산하였다. 여기에서 C₀는 초기의 nitrate농도이고, C_t와 C_{it}는 각각 시간에 따라 변화하는 nitrate와 nitrite의 농도이다.

결과 및 고찰

연속운전에서 nitrate 분해능력 (in buffered water)

본 실험에서는 연속배양에서 bead와 GFM에 고정화된 *P. denitrificans*의 nitrate와 nitrite의 분해능력을 각각 비교하기 위하여 air-lift reactor에서 물속의 nitrate 농도를 100 mg/L에서 800 mg/L으로 단계별로 증가시키며 분해능력을 측정하였다.

GFM에 고정화된 세포의 nitrate 분해능력은 Fig. 1에서 볼 수 있듯이 100 mg/L의 nitrate를 유입시 nitrate는 거의 완전히 분해되었으며 nitrate의 양을 점차로 늘릴 경우에 배출되는 medium속에서 분해되지 않은 nitrate가 검출되기 시작하였다. 유입되는 medium에서 nitrate의 농도가 높아짐에 따라 분해 속도는 증가하였는데, 100에서 500으로 농도를 증가시켰을 경우에 속도는 약 31% 증가하였다. 최대 nitrate 분해속도는 medium속의 nitrate농도가 250 mg/L인 경우로서, 속도는 177 mg/L h였다(Fig. 2). Nitrate의 분해속도는 reactor내의 medium 회석속도에 많은 영향을 받는 것으로 나타났다. 같은 농도에서 회석속도의 증가는 분해능력을 증가시키는 경향을 나타내고 있는데, 100 mg/L의 nitrate 농도에서 회석속도를 0.7에서 1.21 h⁻¹으로 증가시켰을 경우에 분해속도는 74% 증가 하였다.

전체 실험을 통하여 nitrite분해속도는 medium의 회석속도 및 물속의 nitrate의 농도 등에 커다란 영향을

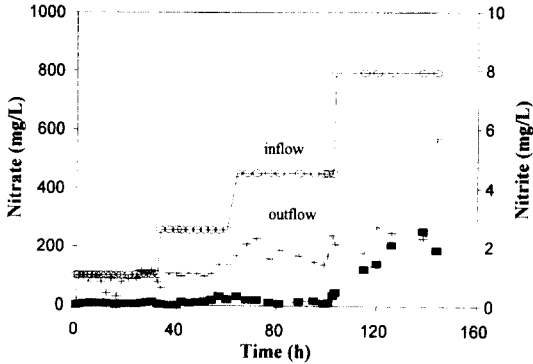


Fig. 1. Continuous nitrate reduction by GFM immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 (in buffered water). ○—○: nitrate concentration in inflow, ■—■: nitrate concentration in outflow, +—+: nitrite concentration in outflow. Dilution rate: 0.7~1.2/h at 100 mg/L nitrate in inflow, 0.5~0.8/h at 250 mg/L nitrate in inflow, 0.3~0.4/h at 500 mg/L nitrate in inflow, 0.1~0.2/h at 800 mg/L nitrate in inflow

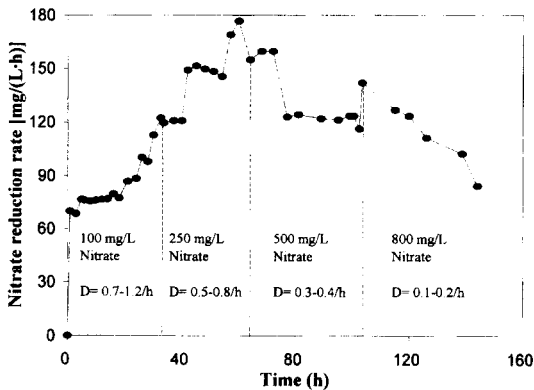


Fig. 2. Nitrate reduction activity by GFM immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 in continuous process (in buffered water).

받지 않았으며 medium에서 검출된 nitrite의 함량은 4 mg/L 이하였다.

일반적으로 세포 고정화에 사용되는 겔방법(bead)에 의해 고정화된 *P. denitrificans*의 연속적 nitrate와 nitrite의 분해능력은 Fig. 3과 4에서 볼수 있듯이 GFM의 경우와 분해 경향이 비슷하였다. 그러나 GFM과 비교할 때 분해되지 않고 검출되는 nitrate의 양이 더 많음을 알 수 있었으며, 특히 medium속에 높은 농도의 nitrate가 유입될 경우에는 분해되지 않은 nitrate가 다량(10~550 mg/L)으로 검출됨을 알 수 있었다. 동 실험에서 분해 최고속도는 250 mg/L의 nitrate를 주입했을 때로서 그 값은 117 mg/L h이였으며, 이는 GFM의 약 66%에 해당하는 속도이다. 이와 같은 분해속도의 차이

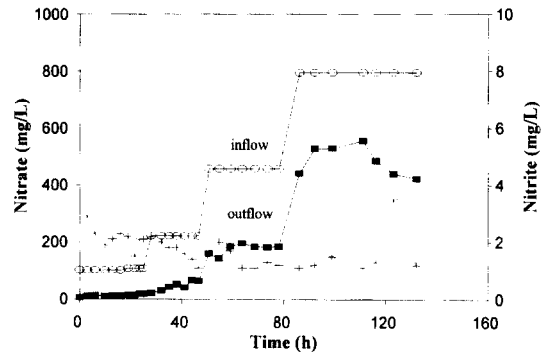


Fig. 3. Continuous nitrate reduction by bead immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 (in buffered water). ○—○: nitrate concentration in inflow, ■—■: nitrate concentration in outflow, +—+: nitrite concentration in outflow. Dilution rate: 0.7~1.2/h at 100 mg/L nitrate in inflow, 0.5~0.8/h at 250 mg/L nitrate in inflow, 0.3~0.4/h at 500 mg/L nitrate in inflow, 0.1~0.2/h at 800 mg/L nitrate in inflow

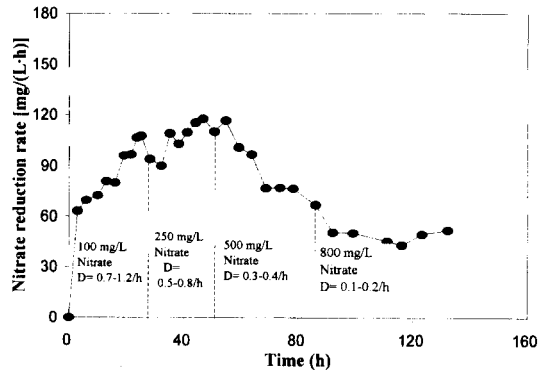


Fig. 4. Nitrate reduction activity by bead immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 in continuous process (in buffered water).

는 기질의 확산속도와 고정화 생체축매의 저장안정성에 기인한다고 볼 수 있다. 보통 연속운전의 경우에는 생물반응조 안에 존재하는 기질의 농도가 낮기 때문에 전체 반응속도는 회분식 운전의 경우에 비해서보다 기질의 확산속도에 더 많이 의존한다고 볼 수 있다. 앞의 경우와 마찬가지로 같은 농도의 nitrate함량에서 medium의 회석속도를 증가 시켰을 때 분해속도는 63 mg/L·h에서 108 mg/L·h으로 증가하였다. 전체적으로 배출되는 medium 속의 nitrite 함량은 4 mg/L 이하로 관찰되었다.

고정화시스템의 비교

앞의 실험결과에서 보듯이 GFM 고정화시스템은 전통적으로 겔포괄법에서 사용되는 고정화방법인

bead시스템에 비하여 여러 가지 장점이 있음을 알 수 있었다. 두가지 경우 모두 다 medium속의 nitrate양이 250 mg/L일 때, 최대속도를 나타내었는데, GFM의 경우가 bead에 비하여 더 높은 분해능력을 나타내었다. 특히 medium속의 nitrate농도가 증가할수록 양 시스템의 분해속도 차이는 더 커짐을 알 수 있는데, 100 mg/L일 경우에는 약 14%, 250 mg/L은 약 50%, 500 mg/L은 약 37%, 800 mg/L은 약 112%증가함을 나타내고 있다.

Nitrate분해경향과는 달리 nitrite는 두 경우 모두 4 mg/L 이하를 나타내었다. 이는 GFM의 경우에 있어서 nitrate의 분해능력이 더 높았음에도 불구하고 비슷한 양의 nitrite가 검출되는 것으로 보아 nitrite 분해능력도 더 높음을 알 수 있다.

이러한 실험결과는 저장안정성과 회분식운전에서 단계별로 nitrate농도를 증가하면서 nitrate분해능력을 측정 한 실험결과와 일치하고 있다⁽¹⁹⁾. 회분식운전 결과로부터 이미 알 수 있듯이 단계별 nitrate농도를 증가시켰을 때 농도변화에 대한 저항성(resistance)이 더 뛰어나기 때문이다. GFM고정화체는 스폰지형태의 구조를 가지고 있기 때문에 겔부피가 더 크다고 할 수 있다. 따라서 분해반응에 기여하는 고정화체의 외부 표면적이 더 넓고 확산이 더 뛰어난다는 것이 또 다른 이유이다. 연속적 nitrate분해는 chemo-stat반응으로서 reactor내의 기질의 농도가 매우 낮기 때문에 이 경우에 기질의 확산은 회분식운전의 경우보다 더 큰 영향을 미친다고 할 수 있다.

연속운전에서 nitrate 분해능력(in tap water)

실제 정수시스템에 본 고정화시스템을 이용하고자 하는 목적으로 물에 buffer를 가하여 pH를 고정시키지 않고 air-lift reactor내에서 연속적으로 nitrate의 분해능력을 측정 한 결과는 Fig. 5와 6과 같다.

35일간의 실험기간동안 비교적 고정화세포는 안정하였으나 15일 이후부터는 nitrate분해능력이 떨어져 outflow에서 검출되는 nitrate농도(약 12 mg/L)가 점차 증가하였다. buffer를 가한 경우와 비교할 때 분해능력이 떨어짐을 알 수 있었으며 이 경우 최고속도는 33 mg/L·h였다. 이는 전자의 경우보다 분해능력이 27% 수준으로 감소하였음을 나타내고 있다. 그 결과로 보아 분해능력은 pH에 매우 의존적임을 알 수 있었으며 air-lift reactor내에서 nitrate의 연속적 분해반응에서 산도와 완충능력은 매우 중요한 역할을 하는 것을 알 수 있다. 산도를 조절하지 않은 경우에 pH는 분해과정중에 8.5~9로 증가하였는데, 이는 탈질화작용중에 방출

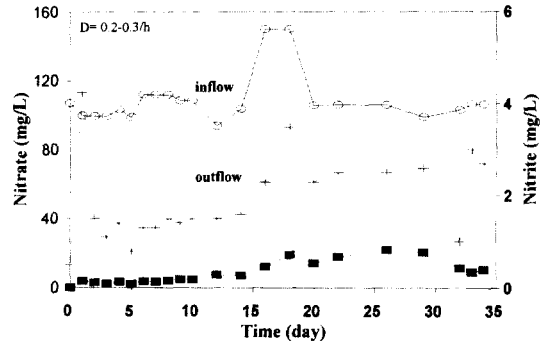


Fig. 5. Continous nitrate reduction by GFM immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 (in tap water). ○—○: nitrate concentration in inflow, ■—■: nitrate concentration in outflow, +—+: nitrite concentration in outflow. Dilution rate: 0.2~0.3/h

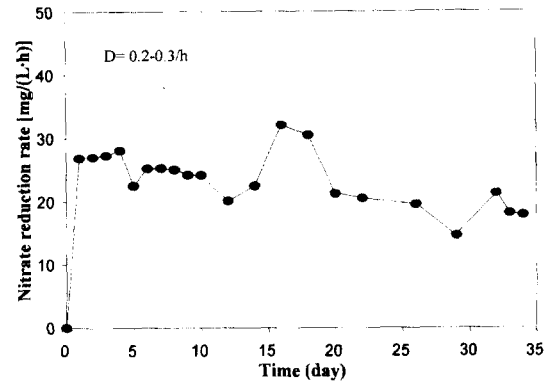


Fig. 6. Nitrate reduction activity by GFM immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 in continuous process (in tap water).

되는 수산화이온(OH⁻)에 기인한 것이다. 따라서 생체 촉매의 외부에 pH-gradient가 생기며, pH의 증가에 따라 nitrate분해속도는 감소하게 되나, 내부에 고정화된 세포의 경우는 외부와는 다른 환경에서 nitrate를 분해하는 것으로 보여진다. 분해속도 감소의 또 다른 이유로 추정할 수 있는 요인은 고정화체의 외부에 형성된 막이다. 이는 수돗물속의 석회성분으로서 장기간의 실험기간중에 고정화체의 외부에 서서히 형성된 막으로서, 이로 인하여 medium의 확산속도에 많은 영향을 받은 것으로 보여진다.

전 실험기간 동안 배출되는 medium속에서 검출된 nitrite농도는 0.5~4.3 mg/L이었다.

고정화세포의 저장안정성

저장안정성을 비교하기 위해 자유세포와 고정화 세포를 5°C와 20°C에서 저장하였다. Fig. 7에서 볼 수 있

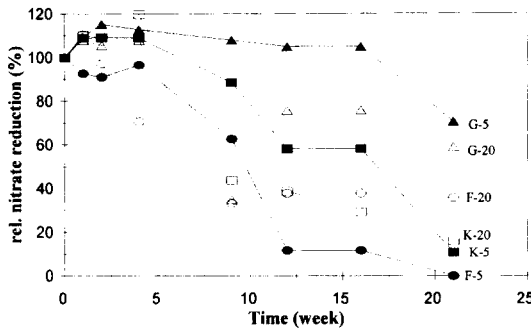


Fig. 7. Change of nitrate reduction activity by free and immobilized *Paracoccus denitrificans* DSM 65 during storage at 5°C and 20°C. K-20: Bead immobilized cells stored at 20°C, G-20: GFM immobilized cells stored at 20°C, F-20: Free cells stored at 20°C, K-5: Bead immobilized cells stored at 5°C, G-5: GFM immobilized cells stored at 5°C, F-5: Free cells stored at 5°C

듯이 낮은 온도에서 저장하였을 때가 높은 온도에서 저장한 경우보다 안정성이 뛰어난 것을 알 수 있다. 9주간 자유세포를 20°C에 저장하였을 경우에는 처음 분해속도의 33%, 5°C의 경우에는 63%를 발견하였다. GFM에 고정화된 미생물은 5°C에서 16주간 저장한 후에도 분해속도는 거의 영향을 받지 않았으며 21주간 저장하여도 처음 속도의 70%를 발견할 수 있었던 반면에, bead에 고정화된 미생물은 같은 조건에서 16주간 저장하였을 때, 처음 속도의 57%만을 나타내었다. 이러한 실험 결과, GFM에 고정화된 *P. denitrificans*가 자유세포나 bead에 고정화된 세포보다 저장 안정성이 두드러지게 뛰어난 것을 알 수 있었고 전체 저장 기간동안 고정화에 사용된 겔은 매우 안정됨을 관찰할 수 있었다.

고정화시스템은 자유세포(free cell)에 비해서 실제 수돗물 정화에 이용할 경우에 여러 가지 장점이 있으며 그 중의 하나가 저장안정성인데, 이 경우에도 GFM은 전통적인 겔포괄법인 bead시스템에 비하여 뛰어난 것을 알 수 있다. 따라서 추후 이러한 system을 이용한 water filter-system의 고안도 생각해 볼 수 있을 것이다.

결 론

본 실험의 결과로 알 수 있듯이 고정화 세포는 자유 세포에 비해 저장안정성이 뛰어나며 반복 사용으로 분해능력을 증가시킬 수 있으며, 또한 높은 농도의 기질에서도 효소의 활성을 보호할 수 있다는 장점을 보여 주었다. GFM에 고정화된 미생물은 기존의 겔 고정화시스템인 bead와 비교할 때에, 분해 능력이 뛰어

나고 또한 그 사용이 편리하여 앞으로는 지금까지 사용되어온 고정화 시스템에 대체하여 다양하게 사용될 수 있을 것으로 보여진다. 또한 기존의 교반식 생물반응조에서 보다 외부 물리적인 힘으로부터 고정화 세포의 보호능력이 뛰어나고 칼럼형 생물반응조에서도 작은 gel 조각들을 활용할 수 있을 것이다. 그외 동 시스템은 스폰지와 같은 특이한 구조를 가짐으로써 정수기 또는 여러가지 생물분자(biological molecules)들을 분리할 있는 여과장치에도⁽²⁰⁾ 사용될 수 있다.

요 약

본 연구에서는 세포 고정화를 위해 기존의 고정화 방법의 단점을 보완하기 위하여 새롭게 개발된 GFM 시스템에 *Paracoccus denitrificans*를 고정화하여 물속의 nitrate를 분해하는데 적용하였다. 고정화 조건으로써 스폰지 구멍의 크기 20 P.P.I. (pore per inch)와 겔로서 alginate가 이미 최적의 조건으로서 선택되었다. 고정화 세포의 연속 nitrate 분해능력을 air-lift reactor내에서 측정된 결과, 물속의 nitrate함량이 증가함에 따라 분해능력이 증가함을 나타내었다. 또한 연속운전에서 본 시스템은 기존의 고정화시스템인 bead 겔포괄법과 비교할 때 1.2~2.1배 정도 분해능력이 향상되었다. 최고 nitrate 분해속도는 buffer를 함유한 medium에 있어서 177 mg/L·h이었으나 buffer를 첨가하지 않은 경우에 있어서는 33 mg/L·h이었다. 또한 저장안정성을 측정된 결과, 5°C에 저장하였을 때 분해능력은 16주간 거의 변화가 없었으며 고정화하지 않은 자유세포나 bead에 고정화된 세포에 비하여 저장안정성이 두드러지게 뛰어났음을 알 수 있었다.

문 헌

- Hartmeier, W.: Immobilisierte Biokatalysatoren, Springer-Verlag, New York, Berlin (1986)
- Klein, J. and Vorlop, K.D.: Immobilisierung von ganzen Zellen. In *Jahrbuch Biotechnologie* 1986/87. Pr ve, P. et al. (Ed.), Hanser Verlag, Darmstadt, p. 369 (1986)
- Knorr, D. and Daly, M.: Mechanics and diffusional changes observed in multilayer chitosan/alginate coacervate capsules. *Process Biochem.*, **48**, 48-50 (1988)
- Klein, J. and Wagner, F.: Immobilized whole cells. In *Dechema Monographien* 82. Biotechnology. Verlag Chemie, Weinheim, p. 142 (1978)
- Brodelius, P. and Vandammen, E.J.: Immobilized cell systems. In *Biotechnology Vol. 7a*, Kennedy, J.F. (Ed), VCH Publishers, Weinheim, p. 405-464 (1987)
- Kierstan, M. and Bucke, C.: The immobilization of microbial cells, subcellular organelles, and enzymes in

- calcium alginate gels. *Biotech. Bioeng.*, **19**, 387-397 (1977)
7. Ogbonna, J.C., Matsumura, M. and Kataoka, H.: Effective oxygenation of immobilized cells through reduction in bead diameters: a review. *Process Biochemistry*, **26**, 109-121 (1991)
 8. Cho, Y. H. and Knorr, D.: Development of a gel and foam matrix as immobilization system for cells for microbial denitrification of water. *Food Biotechnology*, **7**, 115-126 (1993)
 9. Mayer-Miebach, E., Rathjen, A. and Kerner, M.: Biologische Nitratentfernung aus Lebensmitteln unter Verwendung des Bakteriums *Paracoccus denitrificans*. In *Berichte der Bundesforschungsanstalt für Ernährung BFE-R-89-01*, Kutsch, T. (Ed.), Karlsruhe, p. 129-133 (1989)
 10. Walker, R.: Nitrates, nitrites and N-nitrosocompounds: a review of the occurrence in food and diet and the toxicological implication. *Food Add. Contam.*, **7**, 717-768 (1990)
 11. Haug, M., Dirks, U. and Vorlop, K.: Denitrification of vegetable juices by immobilized cells. In *Engineering and food*. Vol. 3 (*Advanced Processes*), Spiess, W.E.L. and Schuster, H. (Ed.), Elsevier Applied Science, London and New York, p. 536 (1990)
 12. Askar, A.: 'Amine und Nitrosamine' Vorkommen, Bedeutung, Stoffwechsel und Bestimmung. In *Fortschritte in der Lebensmittelwissenschaft*. TU Berlin, Institut für Lebensmitteltechnologie, Berlin, p. 141 (1979)
 13. Jimenez, B., Becerril, E. and Scola, I.: Denitrification in a fluidized bed system using low cost packing material. *Environ. Technol.*, **11**, 409-420 (1990)
 14. Kerner, M., Mayer-Miebach, E., Rathjen, A. and Schuster, H.: Verringerung des Nitatgehaltes pflanzlicher Lebensmittel-Verfahrenskonzepte bei Verwendung immobilisierter Mikroorganismen. *ZFL Int. Z. Lebensm.-Technol.-Verfahrenstech.*, **39**, 564-570 (1988)
 15. Lemoine, D., Jouenne, T. and Junter, F.A.: Reduction of nitrate by *Pseudomonas putrefaciens* entrapped in composite agar layer, microporous membrane structures. *Biotechnol. Letters*, **10**, 399-402 (1988)
 16. Mattiasson, B., Ramstorp, M., Nilsson, I. and Hahn-Hagerdal, B.: Comparison of the performance of a hollow-fiber microbe reactor with a reactor containing alginate entrapped cells : Denitrification of water using *Pseudomonas denitrificans*. *Biotechnol. Letters*, **3**, 561-566 (1981)
 17. Riebe, K.: Mikrobielle Nitratreduktion in Gemuesesaften insbesondere Rote Beete-Saft. *M.S. Thesis*, Technical University Berlin, Berlin, Germany (1990)
 18. Schuster, B. and Lee, K.: Nitrate and nitrite methods of analysis and levels in raw carrots, processed carrots and in selected vegetables and grain products. *J. Food Sci.*, **52**, 1632-1636 (1987)
 19. Cho, Y.H.: Entwicklung von Gel-In-Matrix (GIM)-Systemen zur Immobilisierung von *Paracoccus denitrificans* DSM 65. *Ph. D Thesis*, Technical University Berlin, Berlin, Germany (1994)
 20. Kirkpatrick, F.H. and Willis, T.S.: Gel-in-matrix: A new technology for manufacturing separations devices. Paper presented at *Proceeding of the 1991 Membrane Conference*, Business Comm., Norwalk, C.T., p. 116-121 (1991)

(1997년 12월 10일 접수)