

적응진화에 의한 철산화세균(*Acidithiobacillus ferrooxidans*)의 망간내성높이기

전일광, 현철

경애하는 최고령도자 김정은동지께서는 다음과 같이 말씀하시였다.

《경제발전에서 전략적의의를 가지는 원료와 연료를 국내자원으로 보장하는 생산기술 공정을 확립하며 첨단설비를 비롯하여 절실히 요구되는 기술수단들을 우리의 실정에 맞게 자체로 생산보장하여야 합니다.》(《조선로동당 제7차대회에서 한 중앙위원회사업총화보고》 단행본 46페이지)

우리 나라에 풍부하게 매장되어있는 망간토로부터 망간을 효과적으로 침출해내는것은 인민경제의 자립성을 강화하고 나라의 국방력을 강화하는데서 대단히 중요한 의의를 가진다. 그러나 망간토의 선별성이 나쁘고 품위가 낮은데로부터 아직까지 공업적규모에서의 침출공정은 확립된것이 없다. 한편 미생물에 의한 유가금속의 침출기술은 산업적가치를 가지지 못하는 저품위광석들을 처리할수 있는 실용적인 기술로서 연구자들의 주목을 끌고[2, 6]있다. 우리는 미생물을 리용한 저품위망간토로부터의 망간침출기술을 확립하기 위하여 사지구망간광상에서 *Acidithiobacillus ferrooxidans*를 분리하고 분리균주의 망간내성을 높이기 위한 연구를 하였다.

재료 및 방법

침출균주로는 사지구 망간광상에서 분리한 *A. ferrooxidans* 015를 리용하였다.

기초배지로는 9K배지[3]를 리용하였다. 선발배지는 기초배지에 $MnSO_4 \cdot 7H_2O$ 를 Mn^{2+} 으로 환산하여 5~20g/L 되게 첨가하여 만들었다.

적응진화는 선행연구방법[4]에 따라 선발배지의 망간농도를 점차적으로 증가시키면서 지수기중기때 반복계대하는 방법으로 진행하였다.

미생물배양은 500mL들이 삼각플라스크에 배지를 300mL 넣고 30°C에서 통기(1L/(L·min))하는 방법으로 진행하였다.

망간침출은 사지구 망간토(Mn 4%)에 등지구 류화철(S 27%)을 망간토의 4% 되게 첨가하고 고액비 1 : 3, 종균접종량 10%(V/V), 초기pH 2.5, 침출온도 30°C, 교반속도 150r/min, 통기량 1L/(L·min)의 조건에서 진행하였다. 침출액중의 망간량은 모르염적정법[1]으로 정량하였다.

A. ferrooxidans 015의 최대비증식속도(μ_{max})는 선행연구의 생장모형[5]을 리용하여 결정하였다.

선발배지에서의 계대안정성은 $C_{Mn}=5g/L$ 인 선발배지에서 반복계대할 때 $C_{Mn}=20g/L$ 인 선발배지에서의 μ_{max} 가 출발균주의 90%이하로 떨어지는 계대회수($G_{S/S}$)로 평가하였다. 기초배지에서의 계대안정성은 기초배지에서 반복계대할 때 $C_{Mn}=20g/L$ 인 선발배지에서의 μ_{max} 가 출발균주의 90%이하로 떨어지는 계대회수($G_{S/B}$)로 평가하였다.

μ_{\max} 와 $G_{S/S}$, $G_{S/B}$ 를 결정하기 위한 비선형회귀계산과 예측은 수값처리프로그램 Origin 8.0을 리용하여 진행하였다.

결과 및 논의

미생물을 리용하여 망간을 침출할 때 망간은 2가이온상태로 침출액속에 존재하게 된다. 그러므로 *A. ferrooxidans*의 망간내성은 침출과정에 침출미생물의 성장과 침출속도에 직접적인 영향을 미친다. Mn^{2+} 농도에 따르는 *A. ferrooxidans* 015의 μ_{\max} 와 지수기 도달시간(T)은 그림 1과 같다.

그림 1에서 보는바와 같이 μ_{\max} 는 초기의 $0.11h^{-1}$ 로부터 점차 감소되어 5g/L이상에서는 $0.04h^{-1}$ 로 되었으며 T 도 초기의 24h로부터 10g/L이상에서는 52h로 되었다. *A. ferrooxidans* 015의 성장에 대한 망간의 저해작용에서 특징적인것은 μ_{\max} 의 감소와 T 의 지연에서 명백한 한계가 있는것이다. 즉 $\lim_{C_{Mn} \rightarrow \infty} \mu_{\max} = 0.042h^{-1}$, $\lim_{C_{Mn} \rightarrow \infty} T = 52.0h$ 이다.

A. ferrooxidans 015를 리용하여 망간을 침출할 때 침출시간에 따르는 몇가지 침출지표들의 변화는 그림 2와 같다.

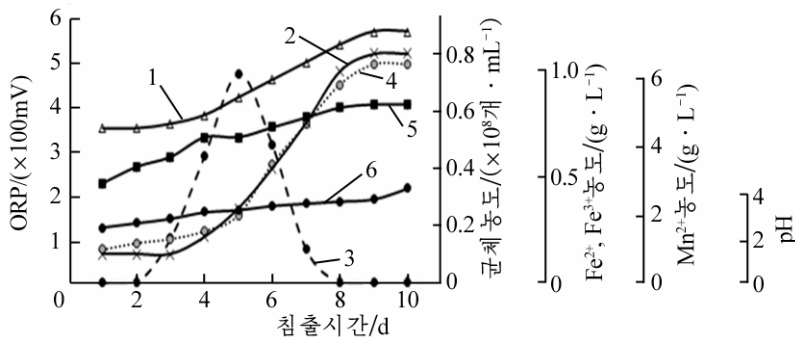


그림 1. Mn^{2+} 농도에 따르는 *A. ferrooxidans* 015의 μ_{\max} (1)와 T (2)

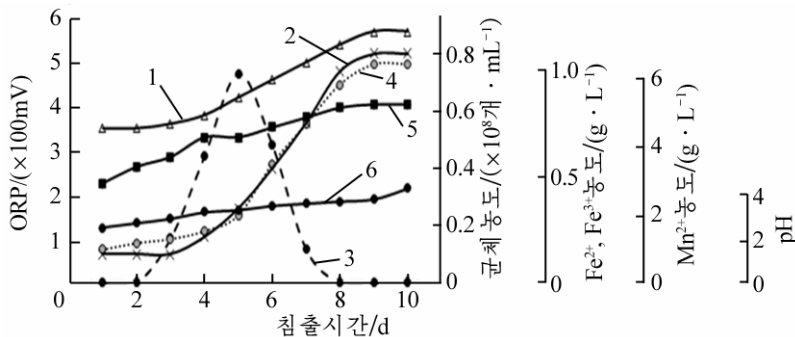


그림 2. 침출시간에 따르는 침출액중 몇가지 침출지표들의 변화
1-ORP, 2-균체농도, 3- Fe^{2+} , 4- Fe^{3+} , 5- Mn^{2+} , 6-pH

그림 2에서 보는바와 같이 침출용균주는 서서히 증식하여 침출 10일만에 균체농도가 8×10^7 개/mL에 달하였으며 망간침출농도는 침출 7, 10일에 각각 4.54, 4.91g/L(총침출량의 37.8, 40.9%)였다. 이 결과는 침출액속의 Mn^{2+} 농도가 높아짐에 따라 *A. ferrooxidans* 015의 성장과 침출활동이 저해를 받는다는것을 보여준다.

이에 기초하여 우리는 저해작용이 뚜렷한 5g/L로부터 출발하여 망간에 대한 *A. ferrooxidans* 015의 적응진화를 진행하였다. 계대회수에 따르는 μ_{\max} 와 T 의 변화는 그림 3과 같다.

그림 3에서 보는바와 같이 반복계대과정에 *A. ferrooxidans* 015의 μ_{\max} 는 점차 증가하다가 일정한 단계에 이르러서는 변하지 않았으며 T 는 반대로 점차 감소하다가 24h로 고착되었다. 또한 적응진화의 첫 단계($C_{Mn}=5g/L$)에서는 계대회수 5회만에 μ_{\max} 와 T 값이 각각 최대값과 최소값에 도달하였다면 그 다음단계들에서는 3~4회만에 μ_{\max} 와 T 값이 각각 최대값과

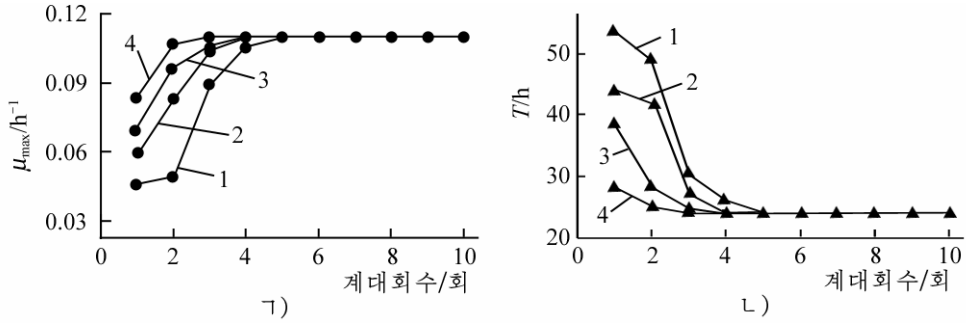


그림 3. 계대회수에 따르는 μ_{\max} 과 T 의 변화
 1) μ_{\max} , 2) T ; 1-4는 C_{Mn} 이 각각 5, 10, 15, 20g/L인 경우

최소값에 도달하였다. 이것은 적응진화과정을 통하여 *A. ferrooxidans* 015가 Mn^{2+} 에 대한 저항성뿐만아니라 보다 높은 농도의 Mn^{2+} 에 대해서도 신속히 적응될수 있는 능력도 함께 획득하였다는것을 의미한다. 20g/L이상의 조건에서는 한번의 계대로 최대 μ_{\max} 의 95%이상(또는 최소 T 의 95%이하)에 도달한 균주를 얻을수 있었다. *A. ferrooxidans* 015는 4단계의 실험에서 모두 10회이하의 계대과정에 적응진화가 완성되었으며 선행연구[4]의 결과와 비교하여보면 이 균주의 적응진화능력이 대단히 높다는것을 알수 있다.

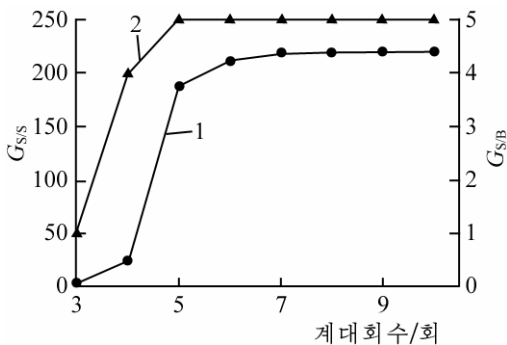


그림 4. 계대회수에 따르는 $G_{S/S}$ 와 $G_{S/B}$ 의 변화
 1- $G_{S/S}$, 2- $G_{S/B}$

적응진화의 마지막단계($C_{Mn}=20g/L$)에서 계대회수 3~10회에 해당하는 균주들의 계대안정성을 검토하기 위하여 선발배지와 기초배지에서의 계대회수에 따르는 $G_{S/S}$ 와 $G_{S/B}$ 의 변화를 보았다.(그림 4)

그림 4에서 보는바와 같이 계대회수에 따라 $G_{S/S}$ 와 $G_{S/B}$ 가 증가하였다. 그림 3에서 본바와 같이 계대회수 3이상에서는 μ_{\max} 과 T 의 차이가 거의 없었다. 그럼에도 불구하고 $G_{S/S}$ 와 $G_{S/B}$ 에서 뚜렷한 차이가 나타나는것은 적응진화과정에 미생물이 유전적안정성을 획득하는데 일정한 계대과정이 필요하다는것을 보여준다.

우리는 얻어진 망간내성균주를 *A. ferrooxidans* 016으로 명명하고 *A. ferrooxidans* 016의 망간침출특성을 조사하였다.(그림 5)

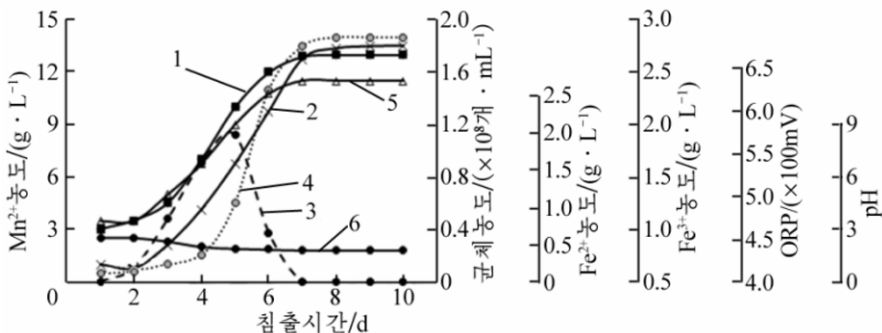


그림 5. 침출시간에 따르는 몇가지 침출지표들의 변화
 1- Mn^{2+} , 2-균체 농도, 3- Fe^{2+} , 4- Fe^{3+} , 5-ORP, 6-pH

그림 5에서 보는바와 같이 *A. ferrooxidans* 016에 의하여 사지구 망간토로부터 침출 7일만에 97%의 망간이 침출되고 균체농도는 1.8×10^8 개/mL에 달하였다. 또한 침출매질의 pH가 낮아지고 ORP가 증가한것은 *A. ferrooxidans* 016에 의한 류화철의 산화가 매우 효과적으로 진행되었다는것을 보여준다. 그림 2의 결과와 비교하여보면 *A. ferrooxidans* 016은 선발균주인 *A. ferrooxidans* 015에 비하여 망간침출속도와 침출매질에서의 증식특성이 뚜렷하게 개선되었다는것을 알수 있다.

이상의 연구를 통하여 우리는 망간에 대한 내성이 개선된 망간침출용철산화세균 *A. ferrooxidans* 016을 얻었다.

맺는 말

$C_{Mn}=20$ g/L인 때 적응진화법을 리용하여 얻은 망간내성균주 *A. ferrooxidans* 016의 μ_{max} 와 T , $G_{S/S}$, $G_{S/B}$ 는 각각 0.11 h^{-1} , 24h, 220, 5이다.

선발균주는 사지구 망간토로부터 고액비 1 : 3, 증지구 류화철첨가량 4%, 초기 pH 2.5, 침출온도 30°C , 교반속도 150r/min, 통기량 1L/(L·min)의 조건에서 7일만에 97%의 망간을 침출할수 있다.

참고 문헌

- [1] 조선민주주의인민공화국 국규 3253-1, 1987.
- [2] M. Renata et al.; Polish Journal of Microbiology, **55**, 3, 203, 2006.
- [3] L. G. Leduc et al.; World Journal of Microbiology & Biotechnology, **13**, 453, 1997.
- [4] W. J. Swanson; Current Opinion in Genetics & Development, **13**, 617, 2003.
- [5] M. S. Liu et al.; Can. J. Chem. Eng., **66**, 445, 1988.
- [6] 马蟲梅 等; 微生物学通报, **39**, 11, 1551, 2012.

주제 106(2017)년 5월 5일 원고접수

Increasing the Tolerance of *Acidithiobacillus ferrooxidans* to Manganese by Adaptive Laboratory Evolution

Jon Il Gwang, Hyon Chol

When C_{Mn} is 20g/L the μ_{max} and T of manganese-tolerant strain *Acidithiobacillus ferrooxidans* 016 selected by adaptive laboratory evolution are 0.11 h^{-1} , 24h. $G_{S/S}$ and $G_{S/B}$ of this strain are 220 and 5, respectively.

Almost 97% of manganese from the mad of “s” area could be leached 7 days later by using the selected strain under the following conditions; pulp density—33%, additive ratio of sulphids from “h” area—4%, initial pH—2.5, leaching temperature— 30°C , stirring rate—150r/min, aeration—1L/(L · min).

Key words: *Acidithiobacillus ferrooxidans*, manganese, bioleaching