

## 페 페니실리움 균주를 이용한 중금속 흡착특성

서용찬 · 이혜진 · 김동욱\*†

상지대학교 환경공학과, \*공주대학교 환경공학과

## Characteristics of Heavy Metals Bio-sorption by *Penicillium* Biomass

Yong Chan Seo, Hye Jin Lee, and Dong Wook Kim\*†

Kongju National University Budae-dong, Cheonan-si, Chungcheongnam-do, Korea

\*Sangji University, Usan-dong, Wonju-si, Gangwon-do, Korea

The goal of this research was to investigate the characteristics of *Penicillium* biomass on the metal adsorption/desorption. Metal sorption capacity of *Penicillium* was determined by a series of batch experiments. Heavy metals studied in this research were  $Cd^{+2}$ ,  $Cu^{+2}$ ,  $Cr^{+3}$ ,  $Pb^{+2}$ , and  $Zn^{+2}$ . Experimental results showed that metal adsorption by *Penicillium* biomass was rapid and reached equilibrium in 30 minutes for most cases. Bio-sorption for all five metals was pH dependent and maximum sorption occurred at the range of pH 5.5 - 7.0 for the tested metals. The higher metal sorption was obtained with the smaller particle size of *Penicillium*, indicating the surface area of biomass relevant to metal binding capacity. Bio-sorption isotherms showed that the order of metal sorption capacity by *Penicillium* was  $Cu^{+2} > Pb^{+2} > Cr^{+3} > Cd^{+2} > Zn^{+2}$ .

**Key words :** *Penicillium* biomass, Heavy metals, Bio-sorption

### 1. 서 론

효과적인 중금속 처리 기술은 환경, 생태학적인 측면에서의 중금속 독성감소와 경제적 측면의 선택적 금속 회수를 위해 장기간 연구, 개발되고 있다. 이온교환, 활성탄, 화학적 침전, 화학적 산화 및 환원, 여과, 전기화학적 처리, 막분리 기술 등을 이용한 물리화학적인 기존의 중금속 처리기술은 비용이 많이 들고 다른 오염물질을 배출되므로 더 발전된 방법의 처리기술이 요구되어 왔다. 특히, 기존의 방법을 대체 할 수 있는 방법으로서 생물체에 의한 중금속 흡착 제거 기술은 최근 여러 연구진에 의해 시도되어졌으며 이는 수십 ppm 이하의 저 농도로 용존하고 있는 중금속을 효율적으로 제거할 수 있다고 보고되고 있다<sup>1-2)</sup>. 기존의 중금속 처리기술과 비교하여 미생물균체를 이용한 방법의 장점을 정리하면, 1) 중금속에 대한 흡착능(uptake capacity)이 커서 효율적이다 2) 폐기된 미생물을 이용할 수 있으므로 경제적이다 3) 중금속에 선택적이다 4)

재사용이 가능하다 5) 세포의 증식기와 중금속 흡착시기를 분리할 수 있어 효율적인 공정개발이 가능하다 6) 반응이 매우 빠르고 가역적이다<sup>3)</sup>. 이러한 생물흡착제의 중금속 흡착 메커니즘 현상은 미생물 고유의 세포벽을 구성하는 화합물의 여러 작용기와 금속사이에서 chelation, coordination, ion exchange에 의한 양론적 상호반응(stoichiometric interaction)에 의해 중금속이 흡착/제거되는 것으로 알려져 있다. 세균, 균류, 조류 등 생물학적 흡착제 종류에 따라 중금속 흡착 능에 큰 차이를 나타내며 생물흡착 현상에 영향을 주는 외부인자로는 용액에 존재하는 이온의 가수분해 정도에 영향을 주어 그 이온의 생 흡착능력에 영향을 주는 pH, 흡착 구동력에 영향을 주는 co-ion의 농도, biomass의 상태 등이 있다<sup>4)</sup>.

균류 및 갑각류 껍질로부터 나오는 폐부산물 내에 포함되어 있는 천연고분자 물질인 키틴 및 키토산은 과거 한때 소화·흡수 과정에서 생물·생리기능이 없는 유용하지 못한 물질로 취급되어 오랫동안 미 이용 자

†To whom correspondence should be addressed.

원으로 방치되어 왔으나, 폐지원의 재활용이라는 측면에서 최근 키틴 및 키토산에 대한 물성과 각종 기능에 대한 연구성과로 인하여 생체 및 공업 분야에 응용 가치가 매우 높은 물질로 평가되고 있다. 이러한 폐부산물 내 천연고분자 물질 또는 미생물을 이용한 유해중금속폐수의 처리방법은 폐수처리의 효율성과 경제성을 향상시킬 수 있는 성과를 기대할 수 있으며 수질보존과 유용 미량금속의 회수 및 재활용 등에 관한 신기술 개발의 차원에서 그 중요성과 가능성이 크게 인식되기 시작하였다.

따라서, 본 연구에서는 제약 원료 생산 공정 과정에서 폐기되는 페니실리움(penicillium)속 균주를 이용하여 폐수중의 중금속을 경제적, 효율적으로 제거하기 위하여 (1) 페니실리움(penicillium)에 대한 중금속의 흡착능을 결정하고, (2) 최적의 중금속 흡착조건(pH, 입경, co-ion)을 결정하고자 하였다.

## 2. 실험방법

### 2.1. 재료

#### 2.1.1. 흡착제

본 실험에 사용한 생물 흡착제는 균류의 일종으로 항생물질인 페니실리움(Penicillium) 제조과정에서 발생한 부산물로 증류수로 2차 세척 후 건조하여 사용하였다. 폴리에틸렌 병에 10 g/L의 농도로 6시간 동안 200 rpm에서 교반한 후 원심 분리하여 1차 세척을 하였다. 여기에 증류수 1 L를 다시 첨가하여 6시간 동안 교반한 후 원심 분리하여 건조시킨 후 흡착 실험에 사용하였다.

#### 2.1.2. 대상중금속의 선정 및 시약

생물 흡착제에 의한 제거 공정의 대상이 되는 중금속 선정은 도금폐수에서 주로 발생하는 중금속으로서 구리, 크롬, 아연, 카드뮴, 납을 선택하여 biosorb 흡착 및 탈착 능력을 조사하였다. 중금속 흡착실험에서 사용된 시약은 Junsei 사의 특급시약으로, 납 표준용액은 Lead(II) nitrate ( $Pb(NO_3)_2$ ), 아연표준용액은 Zinc nitrate hexahydrate ( $Zn(NO_3)_2 \cdot 6H_2O$ ), 크롬표준용액은 Chromium(III) nitrate enneahydrate ( $Cr(NO_3)_3 \cdot 9H_2O$ ), 카드뮴표준용액은 Cadmium nitrate tetrahydrate ( $Cd(NO_3)_2 \cdot 4H_2O$ ), 구리표준용액은 Copper(II) sulfate pentahydrate ( $CuSO_4 \cdot 5H_2O$ )를 사용하였으며, pH 조절을 위해 0.1 N NaOH, HNO<sub>3</sub>을 사용하였다. 중금속 측

정은 원자흡광광도계(Atomic absorption spectrometer (AAS) : 5100PC, Perkin Elmer)를 사용하여 분석하였다.

### 2.2. 실험방법

#### 2.2.1. 중금속에 따른 흡착 능력 비교

중금속 종류에 따른 흡착율을 알아보기 위해 일정한 양 (1,000 mg/L)의 흡착제를 함유한 시료에 대해 중금속 초기농도를 달리하여 중금속 흡착 실험을 수행하였다. 2차 세척 후 건조한 250~1000  $\mu m$  크기의 흡착제를 선택한 후 0.1 M NaNO<sub>3</sub> 표준용액에 첨가하였다. 초기 중금속 농도는 중금속 침전을 배제한 범위인 1~20 mg/L로 하여 계산된 양의 중금속 표준용액을 첨가하였으며 0.1 N NaOH, HNO<sub>3</sub> 용액으로 pH를 5.5로 조절하였다. 전체 시료에 대해 200 rpm 속도로 24시간 교반한 후 막여과지를 사용하여 고형물을 여과하였으며 이때 분리된 여액의 중금속 평형농도는 AA를 이용하여 측정하였다. 실험과정 및 분석결과의 신뢰성을 위해 반복하여 실험하였다.

#### 2.2.2. pH 변화에 따른 영향

pH 변화에 따른 중금속 흡착 영향을 알아보기 위해 본 실험을 실시하였다. 사용된 중금속 종류는 구리, 크롬, 아연, 카드뮴, 납이며 pH를 3, 4, 5, 5.5, 6, 7로 변화시켜 중금속 흡착량을 비교하였다. 250~1000  $\mu m$  크기의 흡착제 0.1 g을 100 mL의 폴리에틸렌 병에 첨가하였고 초기 중금속 농도를 20 mg/L로 일정하게 하여 표준용액에 투입하였다. 용액의 초기 pH는 0.1 N NaOH, HNO<sub>3</sub> 용액을 사용하여 조절하였다. 각 시료는 200 rpm속도로 24시간 교반한 후 여과하여 중금속 평형농도를 측정하였다.

#### 2.2.3. 균주 입경에 따른 흡착성능 비교

2차 세척 건조된 흡착제의 입경을 250  $\mu m$  이하, 250~1000  $\mu m$ , 1000  $\mu m$  이상의 크기로 구분하여 각 입경별 중금속 흡착성능을 비교 실험하였다. 폴리에틸렌 병에 20 mg/L 농도의 각 중금속 표준용액을 100 mL 투입하였으며 각각의 크기별 0.1 g의 흡착제를 첨가한 후 pH를 5.5로 고정하였다. 흡착실험의 수행은 위와 동일한 방법으로 수행하였다.

#### 2.2.4. 시간별 흡착능 변화

각 중금속에 대한 흡착제의 흡착평형시간을 결정하

기 위해 반응시간을 변화해 가면서 흡착제거에 대한 변화율을 알아보았다. 각각의 중금속 농도는 20 mg/L로 하였으며 표준용액 100 mL 부피에 0.1 g의 흡착제를 첨가한 후 교반하였다. 5분에서 12시간까지의 지정된 교반시간에 흡착제와 여액을 분리, 여과하여 중금속 평형농도를 측정하였다.

2.2.5. 탈착실험

중금속 흡착 후 흡착제의 재사용 가능성을 알아보기 위해 탈착실험을 실시하였다. 선행조건으로 흡착제를 초기농도 20 mg/L인 용액에서 중금속을 흡착시킨 후 잔존하는 중금속을 제거하기 위해 증류수로 여러 번 세척하였다. 여과를 통해 여액과 분리한 흡착제는 완전 건조시켰으며 무게를 측정하여 탈착실험을 하였다.

모든 실험은 앞서 언급한 과정으로 처리된 흡착제 0.1 g을 100 mL eluant에 투입하여 12시간에 걸쳐 탈착정도를 살펴보았다. 탈착실험은 pH에 대한 영향을 고려하여 pH를 3~7까지 변화시켜 실험하였다. 탈착시 교반속도는 200 rpm에서 실시하였다. 탈착정도는 eluant에 녹아있는 중금속의 양을 AA로 측정하여 간접적으로 계산하였으며 탈착실험에 사용한 eluant는 0.1 M EDTA, KCl, CaCl<sub>2</sub>을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 흡착평형

중금속이 균주에 흡착제거 되어 평형에 도달하는 시간을 결정하기 위하여 본 실험을 수행하였다. 동일한 실험조건을 전제로 하여 시간별 흡착평형을 실시하였으며, 용액조건을 pH 5.5로 조정하고 이온강도 NaNO<sub>3</sub> 0.1M 하에서 균주(biomass)농도 1,000 mg/L에 대한 시간별 납 제거율을 Fig. 1에 나타내었다. 구리, 니켈, 납은 30분 내에 균주에 의해 흡착제거 되었으나 선택적으로 아연과 카드뮴은 6시간 후에도 지속적으로 흡착제거반응이 진행되었다. 이는 혼합 중금속에 대해 균주 벽에 존재하는 음이온 작용기의 결합력이 반응초기에 선택적으로 경쟁하여 작용하고 이후 잔여 중금속에 대해 계속 반응이 진행됨을 알 수 있었다. 이 결과를 기초로 할 때 모든 혼합 중금속이 균주에 등온흡착 할 수 있는 반응시간을 1일로 하여 실험을 진행시키는 지표로 삼았다. 미생물에 의한 생화학적 흡착반응속도는 단시간에 진행된다고 여러 참고문헌에서 보고되었으며 본 균주의 흡착평형도 이에 유사한 반응속도를 보였다.

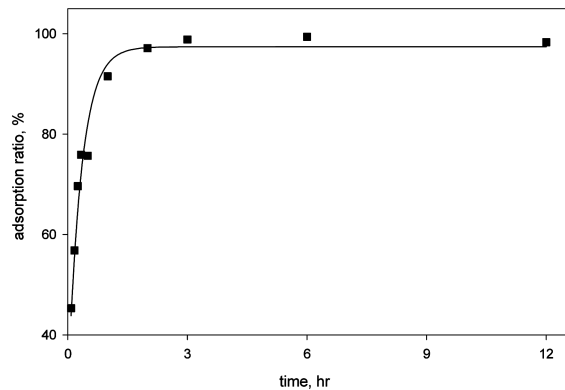


Fig. 1. Kinetics of lead adsorption by *penicillium* biomass.

또한 이와 같은 빠른 흡착속도는 도금폐수처리에 이용할 수 있는 기본적인 조건이라고 할 수 있다.

3.2. pH 영향

중금속 제거 기작에 있어서 용액속의 수소이온농도가 흡착능력에 미치는 영향을 알아보기 위하여 용액의 초기 pH를 변화하면서 중금속의 흡착실험을 실시하였다. 일반적으로 용액의 pH가 증가하면 수소이온농도가 감소하여 biomass에 대한 흡착경쟁이 상대적으로 약해지므로 중금속이온의 흡착량이 증가한다. 중금속 침전에 미치는 영향을 고려하여 초기 중금속 농도를 결정하였으며 pH 범위는 4에서 7까지 약산성으로 결정하였다.

Fig. 2는 pH 변화에 따른 중금속 흡착율 (초기농도 20 ppm)을 나타내었다. pH 5.5~7에서 가장 높은 흡

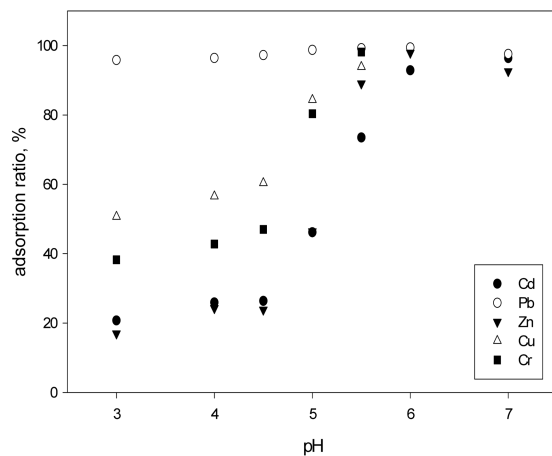


Fig. 2. Effect of solution pH on metal sorption by *Penicillium* biomass.

착능이 나타났고, pH 5 이하에서 수소이온의 농도가 증가할 수록 흡착량이 급격히 감소하는 것을 알 수 있다. 전체적으로 살펴보면 중금속 흡착능력은 용액 내 pH가 증가할수록 흡착능력이 커졌으며, 납 이온을 제외한 대부분의 중금속에 대해 비슷한 경향을 보였다. 이를 앞서 언급한 중금속 흡착기작을 바탕으로 생각해 보면 외부 환경의 수소이온 농도가 증가하면 평형작용에 의하여 용액속의 중금속과 이온교환이 감소된다고 설명할 수 있다.

### 3.3. 균주입경의 영향

흡착제의 물리적 특성중 하나인 비표면적이 중금속 흡착능에 미치는 영향을 살펴보기 위해 본 실험을 실시하였다. 실험에 사용한 건조 균주 입경을 0.25 mm 이하, 0.25~1 mm, 1 mm 이상으로 분류하여 중금속 흡착능력을 비교실험 하였다. 이때 실험조건은 pH 5.5, 0.1 M NaNO<sub>3</sub>의 이온강도, 온도 20°C이며 초기 중금속 농도 (20 mg/L)를 동일하게 하여 중금속 흡착능을 비교하였다. 카드뮴에 대한 실험 결과를 Fig. 3에 나타내었다. 실험에 사용된 모든 중금속이 거의 동일한 경향을 나타내었는데, 균주의 입경이 감소할수록 중금속 흡착능이 증가하는 결과를 보였다. 이는 흡착제의 입경이 작아질수록 비표면적은 증가하며, 균주 단위 무게 당 흡착 제거되는 흡착능을 고려할 때 균주입경이 감소할수록 흡착능을 증가시킬 수 있는 조건이었기도 하다. 또한 균주 입경의 흡착능 비교를 각각 다른 조건의 pH (4, 5.5, 7)에서 수행하였다. 이미 언급한 바 있지만 흡착능의 pH 영향은 각각의 입경에서 서로 다른 결과를 보여주었다. 동일한 입경에서 pH가 증가할수록 중금속 흡착능은 증가하였다.

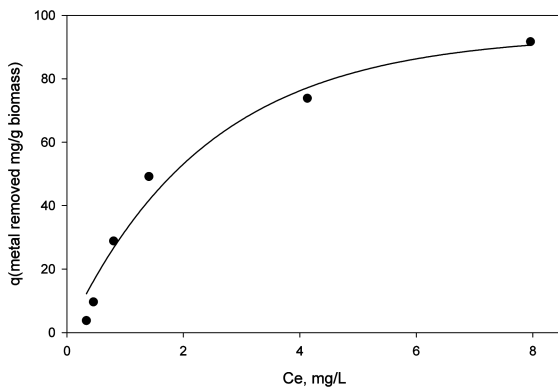


Fig. 3. Effect of particle size on Cd-sorption by *Penicillium* biomass.

### 3.4. 흡착등온곡선

본 연구에서 중금속 흡착제로 선택한 페니실리움에 대한 기본적인 흡착능과 흡착반응기작에 대하여 알아보기 위하여 흡착등온곡선을 구해보았다. 흡착실험은 초기 중금속 농도를 1에서 20 mg/L까지 변화시키면서 중금속 흡착실험을 수행하였으며, 이미 언급했듯이 흡착평형에 도달하는데 필요한 시간을 1일로 하여 흡착제와 중금속이온이 충분히 반응하도록 하였다. Fig. 4는 본 실험에서 사용된 biomass에 대한 크롬의 흡착등온곡선을 나타내었다. 페니실리움 부산물에 의한 혼합 중금속 흡착 거동은 Langmuir 흡착등온선과 매우 유사하였다. 실험결과를 Langmuir 식에 선형화시켜 적합성 여부를 조사해 보았다. 아래 소개된 식은 Langmuir 등온흡착식으로서 최대 중금속 흡착량 ( $q_{max}$ )와 Langmuir 상수 ( $b$ )를 구할 수 있다.

$$q = \frac{q_{max} b C}{1 + b C}$$

여기서,  $q$  = 중금속 흡착량

$q_{max}$  = 최대 중금속 흡착량

$C$  = 흡착평형농도

$b$  = Langmuir 상수

Langmuir 등온 흡착식으로 부터 구한 최대 중금속 흡착량 ( $q_{max}$ )와 Langmuir 상수 ( $b$ )는 Table 1에 나타내었다.

본 실험에 사용된 균주의 중금속 흡착특성은 Cr을 제외한 모든 분석에서 상관계수 값이 0.97 이상으로 선형관계식에 상당한 신뢰도를 보여주고 있다. 각 중금속에 대한  $q_{max}$ 값을 비교 하면  $Cu > Pb > Cr > Cd >$

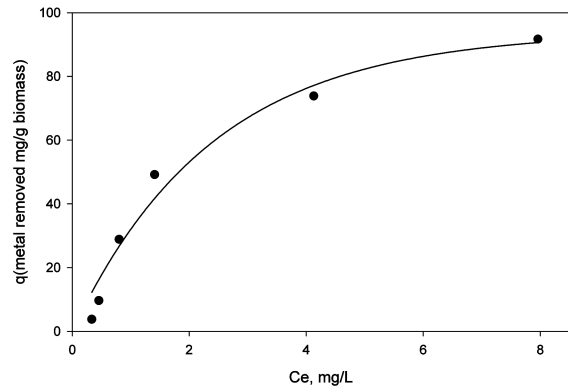


Fig. 4. Adsorption isotherm for chromium with *Penicillium* biomass.

**Table 1.** Langmuir isotherm constants

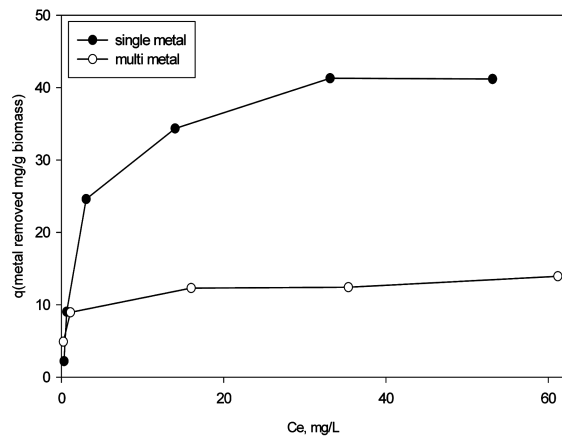
Element	$q_{max}$ (mg/g)	Langmuir constant (b)
Cadmium (Cd)	20.7	0.68
Chromium (Cr)	32.25	2.74
Copper (Cu)	76.34	0.43
Lead (Pb)	75.76	3.22
Zinc (Zn)	18.94	1.98

Zn의 순으로 나타나 Cu와 Pb에 대해 가장 큰 흡착능을 보이며, Cd와 Zn에 대해 낮은 흡착능을 나타내고 있다.

**3.5. 단일 중금속과 혼합 중금속 흡착능비교**

중금속 흡착에 영향을 미치는 요소인 수소이온과 더불어 물속에 존재하는 다양한 금속들도 흡착제의 흡착 site에 경쟁적으로 흡착됨으로써 생물흡착에 변화를 주는 중요한 인자가 될 수 있다. 따라서 본 실험에서는 다른 금속의 존재 하에서 지정 중금속의 흡착능 변화에 대하여 실험을 실시하였다.

Fig. 5는 지정 중금속 (Cd)과 성질이 비슷한 중금속들이 (Cu, Cr, Ni, Pb) 동시에 존재할 때 지정 중금속 흡착능과 단일 중금속 흡착능을 비교한 결과이다. 일반적으로 알칼리 금속이 존재하는 것과는 달리 혼합 중금속 흡착능은 단일 중금속 흡착능에 비해 감소현상이 나타났으며, 같은 중금속들에서도 그 종류에 따라서 지정 중금속흡착에 미치는 영향이 달랐다. 카드뮴의 경우 혼합 중금속 흡착능이 단일 중금속 흡착능에 비해 약 70% 감소하였다. 이 결과에서 지정 중금속 이외의 중

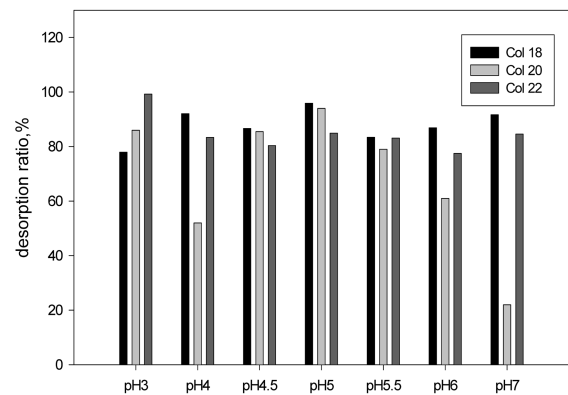


**Fig. 5.** Comparison of Cd-sorption isotherms for single and multi metal with *Penicillium* biomass

금속들도 지정 중금속이 흡착되는 site에 경쟁적으로 흡착하는 성질이 있음을 짐작할 수 있으며, 이들 중금속이 수중에서 알칼리 금속과 동일한 positive charge를 띄고 있음에도 불구하고 지정 중금속흡착에 미치는 결과에서 차이가 나는 것은 균주의 중금속 흡착기작에는 electrostatic attraction 이외에 다른 기작들이 관여한다고 생각할 수 있다. 이러한 균주가 가지는 성질은 수처리제로 균주를 사용할 경우에 인체에 유해한 중금속은 종류에 따라서 흡착능의 차이는 있으나 균주에 의하여 흡착제거 할 수 있으며, 반대로 인체에 유용한 알칼리 금속의 경우에는 흡착하지 않으므로써 수질의 향상을 도모하는 동시에 균주의 흡착능도 유지하는 우수한 효능을 나타낼 것으로 생각된다.

**3.6. 탈착**

중금속의 흡착기작은 크게 두 가지 가설로 많이 설명하고 있는데 그 하나는 앞서 언급했듯이 중금속이 균주에 포함된 이온들과 이온교환작용에 의하여 흡착이 이루어진다는 가설이며, 다른 하나는 균주의 다양한 기능들과 complex formation을 이루어서 흡착된다는 가설이다. 따라서 중금속의 탈착에서도 이들 흡착기작에 기초를 두고 효과적인 탈착용액을 선택하기 위한 실험을 수행하였다. 조사대상의 용액으로는 이온교환의 효과를 기대할 수 있는 KCl, CaCl<sub>2</sub>와 chelating agent로 잘 알려진 EDTA에 대하여 중금속의 탈착능을 조사하였다. 우선 고려의 대상으로 앞서 pH에 대한 영향 실험에서 중금속의 흡착능이 pH에 따라서 현저히 변화함을 알 수 있었다. 이는 탈착 시에도 pH가 탈착에 현저히 기여할 수 있으므로 pH를 고려하여 여러 pH 조건에서 비교실험을 실시하였다.



**Fig. 6.** Comparison on elution efficiency for zinc by *penicillium* biomass.

Fig. 6의 실험결과를 보면 모든 eluant에서 pH가 낮을수록 탈착효과가 높았다. 대상 용액들 중에서 가장 탈착효과가 뛰어난 eluant는 EDTA로서 pH에 영향을 거의 받지 않았으며 실험농도에서 100%의 탈착효과를 나타내었다. 반면 KCl, CaCl<sub>2</sub>를 eluant로 사용한 경우에는 EDTA에 비해 탈착효과가 미미하였다. 이는 앞서 타금속에 대한 영향을 조사한 결과와 일관된 결과로 생각할 수 있다. pH에 대한 효과는 EDTA를 제외한 KCl, CaCl<sub>2</sub>에서 산의 농도에 따라서 즉 pH에 따라서 탈착효과가 달리 나타났는데 이는 산에 의한 탈착작용이 H<sup>+</sup>와 중금속의 이온교환에 의한 것으로 짐작할 수 있다.

#### 4. 결 론

본 연구는 제약원료 폐부산물인 penicillium의 재활용 및 고 부가치화의 일환으로 이를 이용한 중금속 흡착 제거를 목적으로 도금 폐수처리 응용에 필요한 기초시험 결과를 수행하였다.

중금속의 흡착실험결과 비활성 생물균주의 흡착성능이 우수한 것으로 나타났으며, 활용가치를 고려해 볼 때 경제성과 함께 중금속 실패수에 충분한 가능성이 있다고 판단되며 본 연구를 통하여 얻어진 결과를 정리하면 다음과 같다.

1. 페니실리움에 적용시킨 최대 중금속 흡착능은 Cu > Pb > Cr > Cd > Zn 순이었으며, 혼합 중금속 상

태에서 Cu와 Pb의 경우 약 70 mg/g 값을 보여 주었다. 단일 중금속 흡착능은 혼합 중금속 상태보다 우수한 중금속 흡착능을 갖으며 친화도는 혼합 중금속과 비슷한 경향을 보였다.

2. pH가 증가함에 따라 중금속 흡착능이 증가하였다. Pb의 경우 pH에 큰 영향을 받지 않았으나 중금속 흡착제거를 고려할 경우 가장 큰 영향요소로서 pH 조절을 통해 중금속 흡착능을 향상시킬 수 있다.

3. 중금속 흡착능은 균주입경에 따라 차이를 보여 주었다. 작은 입경에서 큰 비표면적을 가지므로 높은 중금속 흡착능을 보였고 큰 입경에서는 오히려 최대 흡착능을 저하시켰다.

#### 참고문헌

1. Brierley C. L., Brierley, J. A., and Davidson, M. S. : Applied microbial processes for metals recovery and removal from wastewater. In *Metal Ions and Bacteria* (Edited by Beveridge, T. J. and Doyle, R. J.), 1989, pp. 359-382, John Wiley, New York.
2. Volesky, B. : Removal and recovery of heavy metals by biosorption. In *Biosorption of Heavy Metals* (Edited by Volesky, B.), 1990, pp. 7-44., CRC Press, Boca Raton, FL.
3. Volesky, B. and Holan, Z. R, *Biotechnol. Prog.*, 1990, 11, pp. 235-250 (1995).
4. Nelson, P. O., Chung, A. K., and Hudson, M. C., *J. Wat. Pollut. Control Fed.*, 1981, 53, pp. 1323-1333.