

## High oil phase에서 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8의 Dibenzothiophene 분해능 향상을 위한 조건 조사

최윤규, 박홍우

한양대학교 화학공학과, 생물공학연구소  
전화 (02)2290-0531, fax (02)2299-9496

### abstract

Microbial desulfurization using a biocatalyst which is capable of selectively liberating sulfur from HDS-refractory organic sulfur compounds is an alternative biotechnology to the current technology of hydrodesulfurization. The system used in the experiments is a two phase system consisting of 0.1%(w/v) dibenzothiophene in hexadecane as model oil and a mineral medium for cell growth. *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, a desulfurization strain, was grown in flask culture at different oil phase ratio with 10% and 30%. Most of the dibenzothiophene was converted to 2-hydroxybiphenyl when the oil ratio was 10%, but wasn't when the oil ratio was 30%. However, the total degraded DBT amounts were similar. In experiments of adjusting pH to improve the efficiency of degradation, the amounts of degraded DBT were increased by 50%. When the modified medium which has two-fold nutrients than those of minimal salt medium was used, the amounts of degraded DBT were increased by 32%. When both of the methods were used, the efficiency was increased by 136%.

### 서론

화석연료의 연소시 발생하는 황화가스는 산성비를 유발하는 오염물질로서, 이를 원유에서 미리 제거하면 환경오염을 줄일 수 있다. 현재 사용되는 수소첨가 탈황법은 경제적이고 효율적이긴 하지만 고심도 탈황에는 부적합하여 이로 인해 보다 적은 비용으로 고심도 탈황을 하기 위한 생물학적 탈황공정이 개발중이며, 일부에서는 이미 상용화에 거의 근접하였다. 현재까지 개발된 탈황 가능 미생물중 상업적 발전이 유력한 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 균주는 유기황종의 황만을 선택적으로 산화시켜 dibenzothiophene(DBT)을 2-hydroxybiphenyl(2-HBP)과 sulfate로 분해하는 특성을 갖고 있다.

상용화를 위해서는 경제적 그리고 환경 친화적인 이유에서 처리되는 원유의 양이 사용되는 배지의 양에 비해 많을수록 유리하나, 기름의 양이 증가할수록 탈황속도는 급격히 감소하는 것으로 보고되어 있어 적합한 탈황공정의 개발에 어려움이 있

다. 따라서 높은 유상비에서도 높은 탈황효율을 얻을 수 있는 조건들에 대한 연구가 필요하며, 이에 본 연구에서는 이러한 조건들을 찾기 위해 10%와 30%의 유상비를 갖는 model oil system을 통하여, pH와 영양물질이 탈황능력에 미치는 영향에 초점을 맞추어 조사하고, 이를 이용하여 탈황효율을 높이는 방법에 대해 연구하였다.

### 재료 및 방법

균주는 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8(ATCC53968)을 사용하였다. 종배양을 위한 영양배지의 조성은 glucose 10g/L, yeast extract 0.5g/L, nutrient broth 8g/L이다. 본배양을 위한 minimal salt medium은 DBT 분해효소를 유도하기 위해 황원이 제거되어 있으며 그 조성은 glucose 5g/L, glycerol 8g/L,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  2.44g/L,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  5.57g/L,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  2g/L,  $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.2g/L,  $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$  0.001g/L,  $\text{FeCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$  0.001g/L,  $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$  0.004g/L를 사용하였다. 배양에 사용한 hexadecane은 DBT를 0.1%(w/v)의 농도로 녹여 사용하였으며 부피비로 10%, 30%가 되도록 최소염배지에 넣어 주었다.

본배양은 종배양한 균주를 1회 subculture한 후 36시간 후에 0.1M phosphate buffer로 2회 세척하고, 배지내에서 초기 세포량이 0.648g/L가 되도록 접종하였다. 그 후 shaking incubator에 넣고 30°C, 300rpm으로 96시간 배양하였다. 세포량은 spectronic OD(Milton Roy)를 사용하여 600nm에서 OD를 측정하여 dry cell weight로 환산하였다.

DBT와 HBP는 배양액 중 유상 300  $\mu\text{L}$ 를 ethyl acetate로 5배 희석하여 HPLC로 분석하였다.  $\mu\text{Bondapak C18}$  steel column(3.9mm $\times$ 150mm, Waters)을 장착하고 photodiode array detector(Waters 996)를 이용하여 254nm에서 분석하였으며 이동상은 acetonitrile/water (60:40v/v)을 사용하여 0.7mL/min의 유속으로 흘려주었다. HBP와 DBT의 retention time은 각각 3.6, 11.6 min이었다.

### 실험결과

#### 유상비에 의한 영향

배지 내에 0.1%(w/v)의 농도로 DBT를 녹여 넣은 hexadecane을 각각 10%, 30%의 부피비로 넣고 72시간 배양하여 DBT의 분해량을 측정하였다(Fig.1). 10% 유상에서 배양한 결과 DBT가 90%이상 분해되었으며 30% 유상에서는 30% 미만의 DBT가 분해되었다. 그러나 DBT가 분해된 총량으로 계산하면 그 분해된 총량은 거의 같았다. 이는 DBT의 분해 정도가 배지내 유상의 비율에 의존하지 않음을 의미하며 이를 확인하기 위해 0.033%(w/v)의 농도로 hexadecane에 DBT를 녹여 같은 조건에서 배양한 결과 DBT가 100% 분해되었다.

### pH 조절에 의한 영향

10%, 30% 유상의 배지에서 배양하면 pH가 24시간 이후부터 급격히 감소하여 48시간 이후로는 4 근방에서 일정해진다. DBT의 분해도 48시간 이후에 멈추는 경향을 보이므로 pH에 의한 DBT 분해의 영향을 추론할 수 있다. 30% 배지에서 pH를 6 근방에서 조절하여 배양한 결과 50%의 효율 증가를 볼 수 있었다.(Fig.2)

### 영양물질 강화에 의한 영향

영양물질을 두배로 강화해 주어 30% 유상 배지에서 96시간 배양한 결과 강화하지 않은 배지에 비해 32% 탈황효율이 증가하였다.(Fig.3)

### pH 조절 및 영양물질 강화의 동시적용에 의한 영향

두가지 인자를 동시에 적용하였을 때의 영향을 알아보았다. 강화배지에서 pH를 조절한 결과 pH를 조절하지 않은 최소염배지에서의 배양에 비해 136%이상 탈황효율이 증가하였다.(Fig.4) 이는 세포량의 증가와 더불어 DBT 분해에 repressor로 작용하는 sulfate의 빠른 소비로 인한 결과로 보이며 이 부분에 대해 계속 연구중이다.

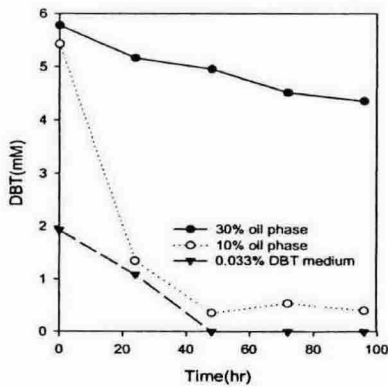


Fig.1 The effect of oil phase ratio

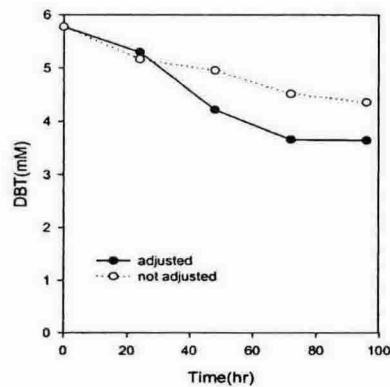


Fig.2 The effect of pH adjusting

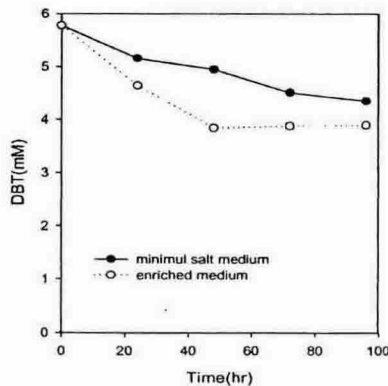


Fig.3 The effect of enriched medium

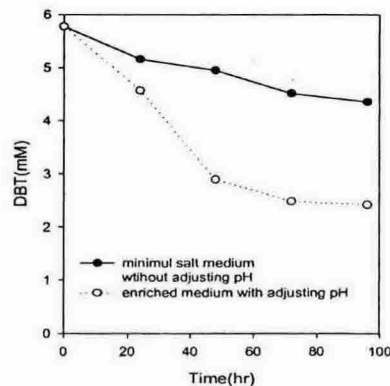


Fig.4 The effect of enriched medium with adjusting pH

## 요약

본연구에서는 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8 균주를 사용하여 고농도의 유상에서 탈황효율을 높이기 위한 오일 함유비, pH, 영양물질의 영향을 조사하였다. 오일 함유비에 의한 영향은 유상이 30%이하일 경우 그리 크지 않았으며, pH 조절에 의해 50%, 영양물질의 강화에 의해 32%의 탈황효율이 증가했다. 강화배지에서 pH를 조절하며 배양한 결과, 기존의 배양에 비해 136% 탈황효율이 증가했다.

## 참고문헌

- 1.Wang, P., and Krawiec, S. "Kinetic analyses of desulfurization of dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* in batch and fed-batch cultures" (1996) *Appl. Environ. Microbiol.* 62(5), 1670-1675
- 2.Ohshiro, T., Hirata, T., and Izumi, Y. "Microbial desulfurization of dibenzothiophene in the presence of hydrocarbon" (1995) *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 44, 249-252
- 3.Monticello, D.J., U.S 5,232,854 "Multistage system for deep desulfurization of fossil fuels" (1993)
- 4.Hartdegen, F. J., Coburn, J. M., Roberts, R. L., Grace, W. R., "Microbial desulfurization of Petroleum" (1984) *Chem. Eng. Process.* 80(5) 63-67