

화석연료의 탈황을 위한 DBT 분해 미생물의 탐색

임성준, 이선복

포항공과대학교 화학공학과

전화 (054) 279-2268, FAX (054) 279-5528

Abstract

A microorganism which can desulfurize dibenzothiophene (DBT) to 2-hydroxybiphenyl (2-HBP) was isolated from coal samples. The rate of DBT desulfurization was enhanced by the presence of yeast extract. In the case of DBT desulfurization by resting cells the rate and extent of 2-HBP production was enhanced with the addition of Tween 80.

서 론

황이 포함되어 있는 화석연료의 사용은 황산화물인 아황산 가스나 황화수소 등을 발생시키며 이러한 물질들은 산성비의 원인이 되어 환경오염을 일으키거나 사람들의 건강에 악영향을 주며 공장의 설비를 부식시키는 등의 문제를 가져온다. 이런 이유로 각 나라의 정부들은 이러한 인식에 따라 이러한 오염물질의 배출을 규제를 하는 환경정책을 시행하고 있다. 따라서, 화석연료에서의 탈황공정의 개발이 필요해졌다.

기존의 탈황공정인 수소화 탈황공정은 고온·고압의 환경에서 수소가스와 금속 촉매를 사용하여 화석연료내의 황을 황화수소로 전환하여 탈황한다. 이 방법은 투자비와 운전비가 높으며 앞으로 새로운 규제치를 만족시키기 어려움이 있다. 반면에 생물학적 탈황공정은 비교적 싼 비용으로 강화되는 규제치를 만족시킬 수 있다. 따라서 선진국에서는 생물학적 탈황공정을 수소화 탈황공정을 대체할 수 있는 방법으로 연구하고 있다.

본 연구에서의 탈황의 대상인 DBT는 화석연료내의 thiophene 형태의 유기황의 구조를 대표한다고 할 수 있으며 대부분의 경우 DBT를 탈황 할 수 있는 미생물의 경우, 이와 유사한 형태의 유기황 구조에 대하여 정도의 차이는 있으나 탈황의 능력을 보인다는 보고가 있다. 또한 DBT는 수소화 탈황으로는 제거가 잘 되지 않는 황 화합물중 하나이다. 이러한 이유로 DBT는 탈황의 연구에서 model compound로 널리 사용되고 있다[1]. 여러 종류의 미생물들에서 DBT의 분해가 가능하다. 특히 어떤 미생물들은 Fig.1에서 보는 것 같이 DBT에서 탄소-탄소의 결합은 그대로 두고 탄소-황의 결합만을 선택적으로 끊을 수 있다. 이 경우 탄소-탄소 결합이 남아있게 되므로 탈황전후에 화석연료의 열량에 변화가 없게된다. 이러한 미생물들로 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, *Rhodococcus erythropolis* D-1, *Corynebacterium* sp. SY1 그리고 *Gordona* sp.

CYKS1 등이 보고되었다[2, 3]. 본 연구에서는 석탄에서 DBT를 탈황하는 미생물을 분리하고 DBT탈황 특성을 조사하였다.

실험 방법

배지는 BSM(basal salt medium)을 사용하였다[4]. 배지 조성은 KH_2PO_4 0.8g/L, Na_2HPO_4 2.2g/L, NH_4NO_3 0.8g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 0.01g/L 그리고 $\text{FeCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.001g/L이며 탄소원으로 10g/L의 glucose나 fructose 또는 sucrose를 사용하였다. DBT는 물에 잘 녹지 않으므로 25mM의 ethanol 용액으로 만들어서 배지에 공급하는 방식을 사용하였다.

초기 pH는 7.0으로 하였고, 배양온도는 30°C 그리고 180rpm에서 shaking incubator를 이용하여 배양하였다. 초기 DBT농도는 0.25mM로 하였다. Seed는 500ml Erlenmeyer flask에서 BSM배지에 10g/L의 glucose와 0.25mM DBT에서 48시간동안 배양하여 사용하였다. 분석을 위한 sample은 배양중인 mixture를 염산으로 산성화시킨 뒤에 배지의 같은 부피의 ethyl acetate를 가하여 추출한 뒤 ethyl acetate층을 원심분리하여 위쪽의 상등액을 사용하였다. 분석은 HPLC를 이용하였다. Nova-Pak[®] C18 column을 사용하였고, mobile phase로 70%(vol/vol)의 methanol 용액에 1%의 acetic acid를 가한 것을 사용하였다. Flow rate는 1ml/min 이고 280nm의 파장에서 측정하였다. 2-HBP의 생성은 Gibb's reagent를 이용한 발색반응으로 확인 할 수 있었다. 배양 mixture를 원심분리 후 상등액을 750 μL 를 취하고 여기에 150 μL 의 1M NaHCO_3 와 100 μL 의 Gibb's reagent를 가한 후 5분 정도 지나면 2-HBP가 생성된 경우 푸른색을 띠게되므로 이를 통해 선택적 탈황의 여부를 가려내었다.

사용된 sugar의 종류가 탈황에 미치는 영향을 실험하기 위하여 SO_4^{2-} 가 들어간 배지에서 여러 종류의 sugar를 사용하여 그 이용정도를 조사하여 그중 균주가 잘 이용하는 sugar를 가지고 DBT의 분해를 실험하였다. 또한 yeast extract의 첨가가 DBT탈황에 주는 영향을 살피기 위해 0.05g/L, 0.15g/L, 그리고 0.25g/L의 yeast extract를 첨

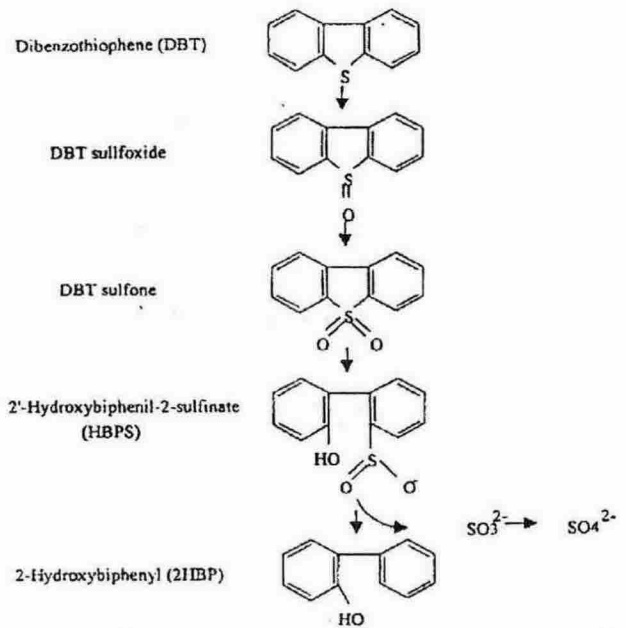


Fig 1. Metabolic pathway of DBT

가하여 실험하였다. 그리고 resting cell에 의한 DBT탈황은 성장이 끝난 미생물을 원심 분리 후 2차례 potassium phosphate buffer(pH 7.0)으로 두 번 세척한 후 potassium phosphate buffer에 1mM DBT를 넣고 실험하였다. 이때 계면활성제의 영향을 보기 위해 1%(vol/vol)의 Tween 80을 첨가하였다.

결과 및 고찰

석탄을 멸균된 증류수로 희석하여 DBT가 포함된 고체배지에 부은 후 배양하여 여러 개의 colony들을 얻을 수 있었다. 이들 각각을 다시 계대 배양하였고, 그 중에서 Gibb's reagent와의 반응에서 푸른색을 띠는 것을 찾을 수 있었다. 이어서 HPLC분석을 통하여 2-HBP의 생성을 확인하였다.

탈황 미생물의 분리와 분리된 미생물의 탈황 특성은 대부분 DBT/ethanol system에서 이루어졌다. SO_4^{2-} 가 있을 때 분리된 미생물은 fructose를 가장 잘 이용하였고, sucrose, glucose등을 다음으로 이용하였다. 그러나, trehalose, lactose, arabinose, xylose, galactose등은 이용하지 못하였다. Fig. 2는 sugar가 DBT탈황에 미치는 영향을 나타내고있다. 이 미생물은 fructose를 가장 잘 이용하며 sucrose, glucose등을 이용할 수 있었으며 DBT의 탈황도 fructose에서 가장 잘 이루어졌다. 이때의 탈황의 속도는 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8의 탈황 속도와 비슷하다.

Fig. 3는 yeast extract의 첨가가 DBT탈황에 미치는 영향을 나타낸다. Yeast

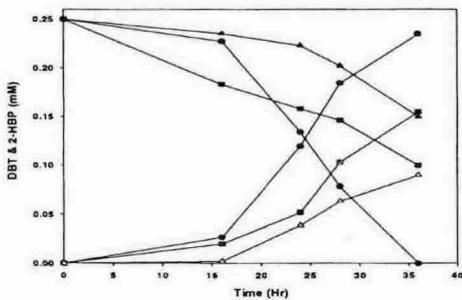


Fig 2. Effect of sugar on DBT desulfurization: Fructose: ■, Sucrose: ▲, Glucose

extract가 소량 첨가되었을 때는 탈황의 속도가 증가하였다. 그러나, yeast extract의 첨가가 늘어나면서 탈황 속도는 감소하여 0.25g/L일 때는 첨가하지 않은 경우와 비슷한 탈황속도를 보였다. 이로써 yeast extract에 DBT탈황속도를 증가시키는 물질이 존재하며 최적의 첨가량이 존재함을 알 수 있다.

Fig. 4에서는 resting cell을 이용한 DBT탈황을 나타내었다. 이 실험은 추출을 하지 않고 원심분리한 배지를 직접 HPLC에 주입하여 분석하였다.

따라서, DBT의 양을 측정하기 어려우므로 최종 생성물인 2-HBP의 양으로 탈황정도를 나타내었다. 이 경우 초기에 빠른 DBT탈황을 보이나 시간이 지남에 따라 속도가 감소함을 볼 수 있었다. 또한 계면 활성제의 첨가는 DBT의 탈황 속도를 증가 시켰다. 이것은 계면 활성제의 첨가로 인해 DBT의 용해도가 증가하게 되어, cell과 접하게 되는 DBT의 양이 증가하기 때문이라고 추측된다.

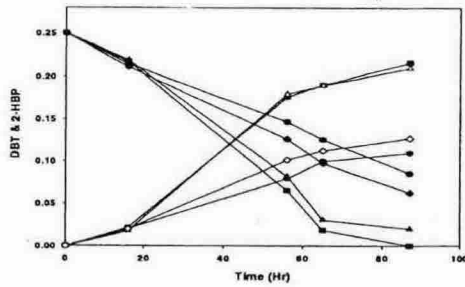


Fig 3. Effect of yeast extract on DBT desulfurization: ●, Yeast extract 0g/L; ■, Yeast extract 0.05g/L; ▲, Yeast extract 0.15g/L; ◆, Yeast extract 0.25g/L

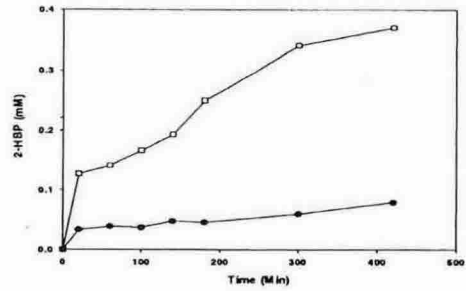


Fig 4. DBT desulfurization by resting cell: ●, Tween 80 0%(v/v); ■, Tween 80 1%(v/v)

요약

본 연구의 석탄에서 분리한 미생물은 유기황인 dibenzothiophene을 2-hydroxybiphenyl로 탈황하며 yeast extract의 첨가로 그 속도가 증가할 수 있음을 관찰할 수 있었다. Resting cell을 이용한 탈황의 경우 화학 계면활성제의 첨가에 의해 그 속도와 정도가 증가함을 관찰할 수 있었다.

지원

본 연구는 POSCO의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Rhee, S. K., Chang, J. H., Chang, Y. K. and Chang, H. N., "Desulfurization of dibenzothiophene and diesel oils by a newly isolated *Gordona* strain, CYKS1"(1998) *Appl. Environ. Microbiol.*, 64, 2327-2331.
2. Maghsoudi, S., kheirrolomoom, A., Vossoughi, M., Tanaka, E. and Katoh S., "Selective desulfurization of dibenzothiophene by newly isolated *Corynebacterium* sp. strain P32C1"(2000) *Biochem. Eng. J.*, 5, 11-16.
3. McFarland, B., L."Biodesulfurization"(1999) *Current Op. Microbiol.*, 2, 257-264.
4. Setti, L., Farinelli, P., Di Martino, S., Frassinetti, S., Lanzarini, G. and Pifferi, P. G., "Development in destructive and non-destructive pathways for selective desulfurizations in oil-biorefining processes"(1999) *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 52, 111-117.