

석유 탈황용 미생물 분리 및 디젤유에 대한 탈황능 평가

손호용¹, 장재환¹, 장용근¹, 장호남¹, 류희욱², 조경숙³

¹한국과학기술원 화학공학과 및 생물공정연구센터,

²승실대학교 화학공학과, ³이화여자대학교 환경공학과

Isolation of Microorganisms for Petroleum Desulfurization and Evaluation of Its Desulfurization Activity for Diesel Oil

Ho-Yong Sohn¹, Je Hwan Chang¹, Yong Keun Chang¹, Ho Nam Chang¹,

Hee Wook Ryu² and Keoung Sook Cho³

¹Dept. of Chem. Eng. and BPERC, KAIST, Taejeon 305-701, Korea

²Dept. of Chem. Eng., Soongsil University, Seoul 156-743, Korea

³Dept. of Environ. Eng., Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea

요 약

석유 탈황을 위한 생물 촉매 개발 및 이를 사용하는 생물학적 공정에 관한 연구의 일환으로, DBT(Dibenzothiophene)를 모델 화합물로 선정하여, 국내 정유회사 주변의 원유 누출 오염토양으로부터 3개월간의 연속배양 및 집식배양을 통해 DBT를 효율적으로 탈황, 제거할 수 있는 60여종의 균주를 분리하였다. 선별된 균들 중 A23-3은 DBT를 유일황원으로 성장 가능하면서, 탄소원으로 hexadecane은 이용하지 못하였으며, DBT와 포도당을 포함한 기본염 최소 배지에서 만족할만한 속도로 DBT를 탈황하였다. 또 yeast extract나 trace metal solution을 첨가한 경우 DBT 제거속도는 약 4.5~6.5 배 정도 증가하였다. 실제의 디젤유를 직접 처리한 경우, DBT 제거속도는 0.045g DBT/g-cell · hr이었다. 특히 이 경우, DBT 이외의 C₁₄이상의 heavy aromatic 화합물의 제거도 효율적으로 이루어짐을 알 수 있었다. 따라서 A23-3 균주는 저유황, 저방향족 청정 디젤유 생산에 매우 유용하게 이용되리라 사료된다.

ABSTRACT : For the development of biocatalysts and processes for microbial desulfurization of petroleum, more than 60 microbial strains capable of DBT(Dibenzothiophene) degradation were isolated from oil-polluted soils through 3 months of continuous and enrichment cultures. Among them, A23-3 strain could grow on DBT as the only sulfur source, while hexadecane was not utilized as a carbon source. The rate of desulfurization by A23-3 in a DBT-glucose medium was satisfactory. The addition of yeast extract or trace metal solution accelerated the rate of desulfurization about 4.5~6.5 times. In case of actual diesel oil treatment, the specific rate of DBT degradation was 0.045g-DBT per g-cell · hour. A number of aromatic compounds heavier than C₁₄ in diesel oil were also degraded by A23-3. A23-3 strain was evaluated as a good catalyst for the production of low-sulfur, low-aromatic clean diesel oil.

1. 서론

석유속에 포함되어 있는 황성분은 연소시 대기오염의 주 원인중의 하나인 아황산가스를 발생시킨다. 이는 산성비를 유발하여 건물등의 부식을 일으키며, 장기적으로는 토양 오염을 가중시켜 생태계를 위협하게 된다.

최근에는 GR(Green Round)과 환경에 대한 국내외적 관심의 고조로 인해, 원유중의 황성분에 대한 규제가 전세계적으로 강화되고 있으며, 국내에서도 디젤유 및 벙커-C유 등의 황함유량의 규제가 강화되고 있는 실정이다.

따라서 석유내의 황성분은 연소전 단계에서 규제치 이하로 제거되어야만 한다. 연소전 탈황공정에 대한 연구는 이미 오래전부터 활발히 진행되어 왔으며, 현재 그 대부분은 수침탈황 공정의 개량 및 이에 필요한 화학촉매의 개발에 집중되어 있다.

그러나 이러한 화학적 수침탈황공정은 고온, 고압의 조건에서 이루어지므로[1] 높은 장치비 및 추가 운영비를 필요로 한다. 또한 고가의 화학촉매의 부가적인 경비를 요구하며, 고심도 탈황이 어려운 문제점을 가지고 있다.

그러나 생물학적인 탈황방법은 상온, 상압의 온화한 조건에서 반응이 가능하므로, 시설 투자비 및 운전비 등을 감소시킬 수 있고[2], 현재의 탈황공정에 부가적으로 결합 가능하므로 그 파급효과가 극효적이며, 또한 여러 종류의 방향족 화합물의 동시제거도 가능한 등 여러 장점이 있을 것으로 사료된다.

현재 전세계적으로 석유류의 탈황에 이용될 수 있는 미생물을 분리하는 연구가 활발히 진행되고 있으며 많은 종류의 탈황가능 균주가 분리되었다[3-11]. 하지만 국내적으로는 많은 연구가 이루어져 있지 않다.

따라서 본 연구진은 석유 탈황을 위한 생물 촉매 개발 및 이를 사용하는 생물학적 공정에 관한 연구의 일환으로, 석유내의 유기황화합물중 많은 양을 차지하면서도, 가장 탈황이 어렵다고 알려진[12] DBT(Dibenzothiophene)를 모델 화합물로 선정하여, 원유 누출 오염토양으로부터 DBT를 효율적으로 탈황, 제거할 수 있는 균주를 분리하였다.

그리고 실제적 적용가능성 검토를 위해 디젤유 처리에 분리된 균주를 이용하였다.

2. 재료 및 방법

2-1 탈황 균주의 분리

국내 정유회사의 원유 저장탱크 슬러지 및 주변토양 30여점과 원유 누출 오염 토양 및 원유 오염폐수 20여점, 탄광주변 토양 10여점으로부터 탈황용 균주의 분리를 시도하였다. 각각의 토양 및 폐수, 원유 등을 멸균 생리식염수에 현탁하여 10분간 방치한 후, 각각의 상등액 0.1mL를 LB배지(tryptone 10g/L, yeast extract 5g/L, NaCl 0.5g/L)에 옮겨, 24시간 배양하였고, 다시 이 배양액을 DBT와 포도당을 포함하는 기본염 최소배지(DBT 20mM, 포도당 5g/L, NH₄Cl 2g/L, K₂HPO₄ 1g/L, MgCl₂ 1g/L, NaCl 0.5g/L, pH 6.5)에 접종한 후, 2~3개월간 연속배양하였다. 이후 연속 배양한 배양액을 대상으로 DBT를 포함한 최소 아가로오스 배지에서 bioavailability 조사를 행하여, DBT를 유일황원으로 생육이 가능한 탈황균주를 순수분리하였다.

2-2 탈황 균주의 배양

탈황 균주의 배양을 위해서 250mL 삼각플라스크에 포도당 5g/L를 포함하는 10mL의 기본염 최소배지를 첨가하여 사용하였다. DBT 농도는 1~2mM로 조절하였으며, 30℃에서 5일간 진탕배양하였다. 이때 DBT는 물에 녹지 않으므로 무수 에탄올(ethanol)에 100mM농도로 녹인 후, 적절한 농도로 배지에 첨가하였다. 탈황능에 미치는 미량금속이온의 영향과 효모추출물(yeast extract)의 영향을 조사하기 위해서, 위 배지에 별도로 살균한 미량금속용액(trace metal solution : FeCl₃ 2mg/L, ZnCl₂ 2mg/L, MnCl₂ · 4H₂O 2mg/L, Na₂MoO₄ 1mg/L, CuCl₂ 0.5mg/L) 또는 0.5g/L의 효모추출물을 각각 첨가한 후 배양하였다.

2-3 배양액의 잔류 DBT 추출

배양액으로부터 미생물과의 반응후의 잔류 DBT의 농도를 측정하기 위해, 배양액과 동일 부피의 n-부탄올(butanol) 또는 헥산(hexane)을 첨가하여 액-액 추출하였으며, 충분한 평형에 도달시키기 위해 상온에서 30분간 방치하였다. 이후 상등액을 회수하여 3분간 원심분리(10,000rpm)한 후, 그 상등액을 HPLC를 사용하여 분석하였다.

2-4 디젤유에서의 DBT 제거능 평가

선별된 탈황용 미생물의 실제적 응용가능성을 조사하기 위해, 살균된 수돗물, 또는 포도당-기본염 최소배지 9mL를 포함하는 250mL 삼각플라스크에, 국내에서 시판되는 H 사의 디젤유를 1mL 첨가하여 배양하였으며, 초기 접종 세포농도는 약 3.5~4g/L로 조절하였다. 이때 시판 디젤유내의 DBT 농도가 실험에 적합하지 않았으므로, 약 10mM DBT/디젤유가 되도록 DBT를 별도로 첨가하여 사용하였다. 이후, 30℃에서 3일간 150rpm으로 진탕 배양후, 9mL의 n-헥산으로 디젤유를 액-액 추출하여, 그 추출 상등액을 HPLC로 분석함으로써 잔류 DBT 농도를 측정하였다.

2-5 분석방법 및 사용 시약

세포의 성장은 Spectrophotometer(Beckman DU-65)를 이용하여 600nm에서 측정하였으며, 미리 작성한 건조중량의 검량곡선에 따라 환산하였다. DBT와 DBT 반응산물의 정량은 히타치(Hitachi)사의 HPLC (Column: Novopak C18, Detector: UV 280nm, 용매: 메탄올 또는 70% acetonitrile, 시료주입량 5μL)를 이용하여 측정하였다. 대사산물중 페놀기(Phenolic ring)를 포함한 물질의 정성조사에는 Gibbs method[13]를 이용하였다. 실험에 사용한 DBT는 Aldrich Co.의 제품을, 미생물 배양을 위한 배지는 Difco사의 제품을 사용하였다. 기타 일반 시약은 Sigma사의 제품을 사용하였다.

3. 결과 및 고찰

3-1 탈황 균주의 분리

정유공장의 다양한 토양시료 및 원유오염 시료로부터 3개월간의 연속배양 및 DBT 최소배지에서의 집식배양을 통하여 60여 주의 탈황균주를 분리하였으며, 이 균주들은 DBT bioavailability 실험 결과, 별도의 황원 첨가물 없이도, DBT를 유일한 황원으로 DBT-포도당 기본염 최소배지에서 양호한 생육을 나타내었다. 전반적인 분리과정은 Fig. 1에 나타내었다.

3-2 탈황균주의 배양 및 탈황능 평가

DBT-포도당 기본염 최소 배지에서 60여주의 분리

균주를 각각 5일간 진탕 배양하였으며, 빠른 생육도, 높은 탈황능, 실제적 이용가능성을 기준으로 9종의 균주를 2차 선별하였다.

- ↓ Soil sample 1g
- ↓ Add 10 mL d-H₂O and vortex
- ↓ Agitate for intracellular sulfur consumption
- ↓ 0.1mL spread on LB and DBT-MM or continuous culture in DBT-glucose medium
- ↓ Single colony isolation by tooth pick in DBT-MM
- ↓ Liquid culture (10mL DBT-MM/250mL baffle flask)
- ↓ 4-5 days culture at 30℃ in rotary shaker (150 rpm)
- ↓ Tested by Gibbs reagent
- ↓ If positive, culture broth was extracted by n-butanol or hexane
- ↓ HPLC analysis for residual DBT concentration

Fig. 1. The procedure of desulfurization bacteria screening.

이 9종의 균주들 대부분이 배양시 초기 pH 7 정도에서 최종적으로 pH 3.5~4.0정도까지 다소간의 pH 감소현상을 보였다. 또한 페놀 화합물과 반응하는 Gibbs test에 강한 양성 반응을 보임으로써, 중간산물로 페놀 화합물을 생성함을 알 수 있었다. 2차 선별된 균주들은 DBT-기본염 최소배지와 1% 포도당을 첨가한 DBT-최소배지에서 5일간 배양하여, n-헥산으로 액-액 추출한 후, HPLC에 의해 잔류 DBT를 분석하였으며, 그 결과를 Table 1에 나타내었다. 그 결과 균주생육에 필요한 탄소원, 즉 포도당을 첨가하지 않은 DBT-기본염 최소배지에서 더 높은 탈황능을 나타내며, 또한 선별된 균주들이 DBT를 황원으로 뿐만 아니라, 탄소원으로도 이용할 수 있음을 알 수 있었다. 대조구의 선정은 Rhodococcus 속을 대상으로 이루어졌다. 이는 국내 초기적 미생물탈황에 대한 연구가 전무한 이유로 대조구 선정의 어려움이 있고, 외국에서 보고된 많은 탈황균주들이 Rhodococcus 속에 집중되어 있으며, 실제 미국에서 상용화를 위해 사용 중인 균주 또한 R. rhodochrous ATCC 53968로 알려져 있기 때문이었다(US patent 5,358,869). 실제 R. rhodochrous ATCC 9086, 12674, 19067, 19140, 21197, 21198, 29672, 32278 및 본 연구실에 보관 중인 Rhodococcus 6종을 대상으로 탈황능을 비교해본 결

과 대부분 미약한 탈황능을 가지고 있었으나, 그중 R. rhodochrous ATCC 21198이 가장 우수한 것으로 확인되었다(data not shown). 따라서 본 실험에서는 대조군으로 Rhodococcus rhodochrous ATCC 21198을 사용하였다.

Table 1. Residual DBT concentrations in broth after treatment

Medium Strain	DBT - BSM	DBT + glucose-BSM
R rhodochrous ATCC 21198	0.310	0.767
A23-3	0.194	0.648
A23-4	0.140	0.230
J3	0.200	0.231
Jar-7	0.110	0.182
J2	0.321	0.310
S9	0.180	0.120
Q10	0.173	0.148
A33-2	0.423	0.360
QP3B	Not determined	0.160

Unit : mM

initial DBT 1mM, 5days culture

3-3 A23-3균주에 의한 DBT 탈황능 평가

실제적 적용을 위해서는 탈황능뿐만 아니라, 고농도 DBT에 세포내성을 가져야 하고, 주요 공정변수인 탈황속도도 고려되어야 한다. 따라서 2차 선별균주중 2mM DBT-포도당 배지와 2mM DBT-기본염 최소배지를 사용하여 48시간동안 배양하면서 초기탈황속도가 우수한 균주를 조사하였고, 그 결과 A23-3균주를 최종 선별하였다(Table 2).

이후 최종 선별된 A23-3균주를 대상으로 10g/L 포도당을 첨가한 DBT-기본염 최소배지를 이용하여, DBT 제거를 경시적으로 추적하였다. 이때 초기 DBT 농도는 0.68 mM이었으며, 100 mM 인산염 완충용액(Phosphate Buffer)을 사용하여 pH 7.0으로 조절하였다. 그 결과는 Fig. 2 에 나타내었는데, 초기 18시간 이내에 세포성장이 약 1g/L로 증가되며, DBT농도는 0.46 mM로 감소되어 0.012 mM-DBT/hr의 속도로 효율적인 탈황이 이루어짐을 알 수 있었다. 이후 세포성장이 stationary phase에 들어가면서 DBT 제거속도

도 다소 감소되는 현상이 나타났으며, 최종적으로 잔류 포도당 농도는 3-4g/L 정도였다.

Table 2. Residual DBT concentrations in broth after 48 hours of treatment

Medium Strain	DBT-BSM	DBT + glucose-BSM
R. rhodochrous ATCC 21198	0.135	0.218
A23-3	1.380	1.130
A23-4	0.261	0.243
J3	0.193	0.112
Jar-7	0.540	0.420
J2	0.216	0.120
S9	0.403	0.380
QP3B	0.360	0.160

Unit : mM

initial DBT 2mM, 48 hours culture

이는 세포증식에 필요한 다른 영양물질의 부족현상인지, DBT 분해산물의 저해효과인지는 확인되지 않았으나, 배양조건의 변화로 극복가능하리라 사료된다. 이 결과는 세포건조중량의 1/100정도가 황이라는 보고에 미루어 볼 때 DBT 분해시 대부분의 황이 세포균체 증식에 소모되리라 추측할 수 있다. 또한 A23-3균주는 디젤유의 세탄가에 영향을 미치는 n-헥사데칸(Hexadecane)을 탄소원으로 사용한 경우, 균주 성장이 거의 이루어지지 않아 디젤유의 세탄가에 거의 영향을 미치지 않으면서 DBT 탈황 및 제거가 가능하리라 추측되어, 이후 실제적인 디젤유 탈황에의 적용 가능성을 조사하였다.

3-4 DBT 탈황능에 미치는 금속 이온 및 효모 추출물의 영향

미량 금속이온과 효모 추출물이 DBT 탈황능에 미치는 영향을 조사하기 위해 포도당을 포함한 DBT-기본염 최소배지에 별도로 살균한 미량 금속 성분 또는 효모추출물 0.5g/L을 각각 첨가한 후, 48시간 배양하였다. 이때 DBT 초기농도는 0.52mM로 조절하였다. 그 결과 Fig. 3 에서와 같이 초기 반응 14시간

동안에는 미량 금속이온을 첨가한 경우 포도당을 첨가한 DBT-기본염 최소배지와 비교하여 약 4.5배, 효모 추출물을 첨가한 경우에는 약 6.5 배 이상 DBT 제거 속도가 증가되었다. DBT 농도는 36시간 반응까지 지속적으로 감소하여 효모 추출물 첨가구에서는 0.076mM, 미량 금속이온 첨가구에서는 0.18mM까지 감소하였다. 그러나, 배양시간이 증가되면서 36시간 이후에는 DBT 감소가 나타나지 않았고, 미량 금속이온 첨가구에서는 DBT 농도가 0.307mM 로 증가되는 현상이 나타났다. 이는 세포 생리상태와 연관이 있으리라 추측되며, 이에 대한 연구는 앞으로 수행되어야 할 것으로 사료된다. 결론적으로 DBT 이외의 탄소원이 존재하는 경우, DBT의 효율적인 제거를 위해서는 미량 금속이온 또는 비타민(vitamin)이 요구됨을 알 수 있고, 0.5mM 정도의 낮은 초기 DBT 농도에서도 최종 0.076mM까지로 충분히 효율적인 탈황이 가능함을 알 수 있었다.

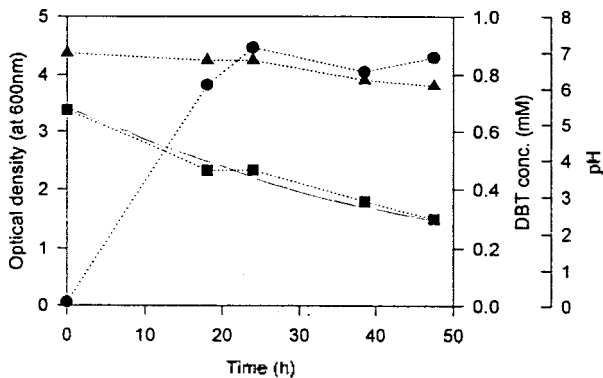


Fig 2. Growth of A23-3 in DBT-glucose medium (Initial glucose concentration 10 g/L).

Cell growth (●), pH (▲), DBT concentration (■).

3-5 디젤유에서의 DBT 제거능 평가

A23-3균주의 실제적인 적용 가능성을 조사하기 위해 디젤유를 처리함으로써 DBT 제거능을 평가하였다. 먼저 국내에서 시판되는 H 사의 디젤유를 구입하여 HPLC를 이용하여 UV 280nm에서 방향족 화합물을 분석한 결과(data not shown), 실험에 적합한 DBT 농도 이하였으므로, 디젤유에 별도의 DBT를 첨가하여, 10mM-DBT/디젤유의 농도가 되게 조절하였

다. 이를 멸균 수돗물 및 포도당을 첨가한 DBT-기본염 최소배지에 1mL 첨가하여 3일간 진탕배양한 결과는 Fig. 4와 같다.

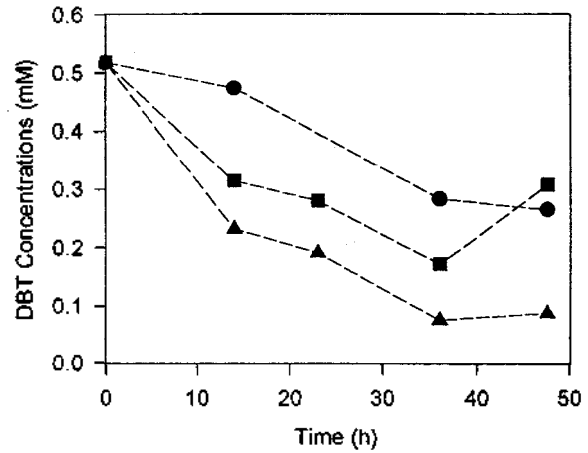


Fig. 3. Effects of trace metal ions and yeast extract on desulfurization of DBT by A23-3.

DBT-glucose medium (●),
 ● + trace metal solution (■),
 ● + yeast extract (▲)

A23-3균주의 초기 접종량은 4g/L 였다. 접종 직후 디젤유의 방향족 화합물의 분석결과 DBT의 체류시간은 3.33분임이 확인되었고, 이때 농도는 약 1.3 mM이었다. 이후, 재확인을 위해 DBT 0.1mM을 다시 첨가하여 분석한 결과, DBT 만이 증가됨을 알 수 있었다 (Fig. 4A). 멸균 수돗물에 DBT를 포함한 디젤유를 첨가한 경우, 48시간만에 DBT양은 0.76mM로 감소하였으며, 반응 72시간후에는 0.3mM로 감소하였다 (0.045g DBT degraded /g-cell · hr). 그러나, A23-3 균주는 DBT 만을 분해, 제거하는 것이 아니라 이중결합을 가진 거의 모든 방향족 화합물을 동시에 제거하는 것이 관찰되었다 (Fig. 4B). 한편 포도당을 탄소원으로 첨가한 경우, 48시간 반응후 DBT 농도는 0.97mM 이었으며, 72시간후에는 0.9mM이었다. 이 경우에도 DBT의 탈황뿐 아니라, 다른 많은 이중결합을 가진 방향족 화합물의 감소현상이 나타났으나, 단순히 멸균 수돗물에서 반응시킨 경우보다 많은 감소가 일어나지는 않았다(Fig. 4C). 그러나, DBT 이후의 체류시간을 갖는 peak들이 C₁₄이상의 방향족 화합물임을 감안할 때, 이들의 개환 및 제거는, 미생물 탈황에 의한 청정에너지 생산이라는 측면외에, 연료

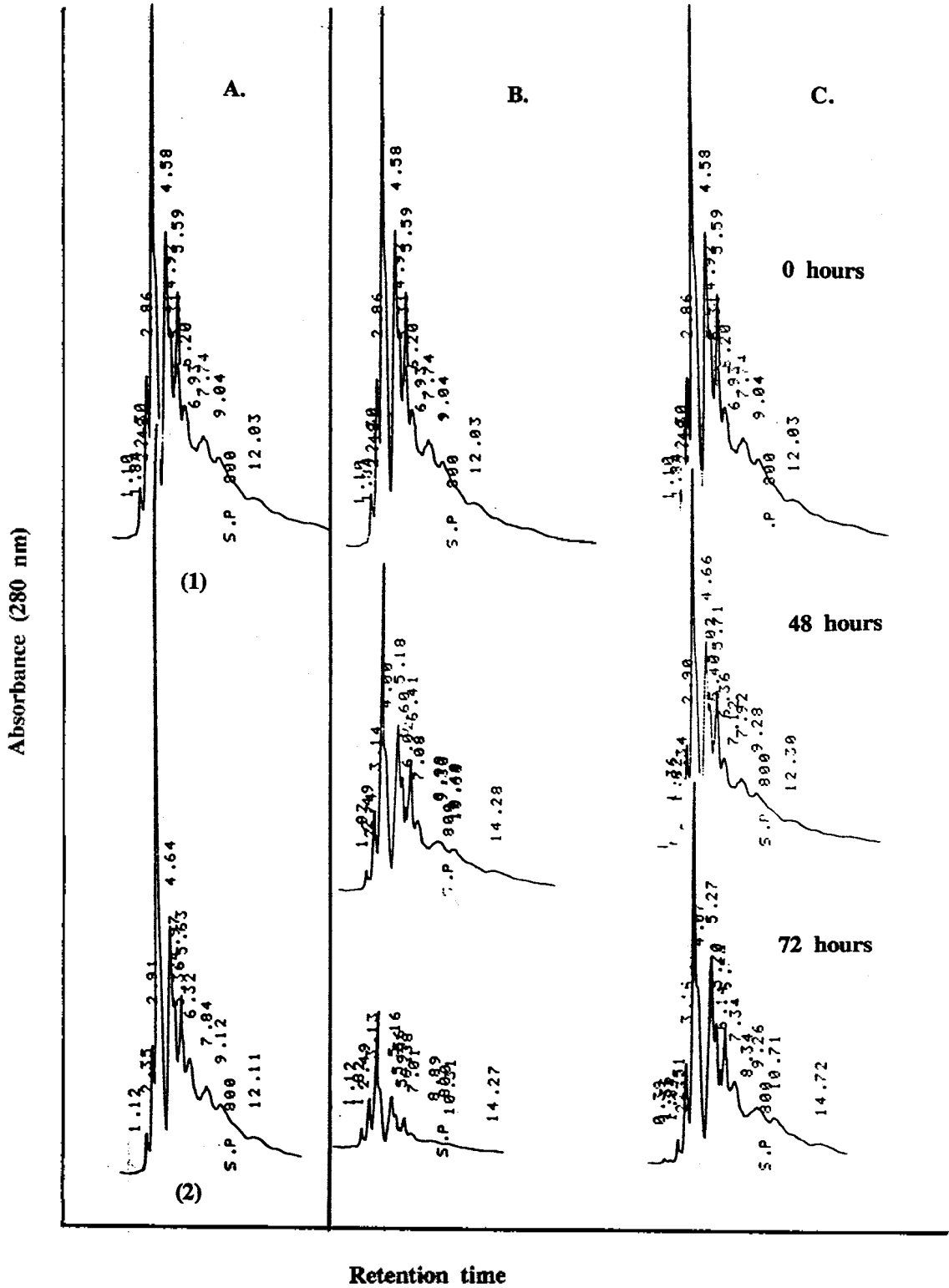


Fig.4. HPLC diagrams of DBT and heavy aromatic compounds in diesel oils.
 panel A : (1) control : diesel oil in tap water medium (2) : (1) + DBT supplement
 panel B : (1) + A23-3
 panel C : diesel oil (1)+A23-3 in DBT-glucose medium

의 과도한 감소현상은 나타나지 않으면서 디젤유의 세탄가의 증대, 방향족 화합물의 농도 감소 등에 큰 기여를 하리라 추측된다.

감 사

이 연구는 통상산업부와 에너지 자원기술개발 지원센터가 주관하는 청정에너지 사업의 일환으로 수행되었습니다. 연구비 지원에 감사드립니다.

참고문헌

- 1) Gates : "Chemistry of Catalytic Process", McGraw-Hill Book Company (1979)
- 2) Mack, M : Genetic Eng. News, Oct., 15, 20(1993)
- 3) Kilbane, J. J. : US Patent 5,104,801 (1992)
- 4) Kilbane, J. J. : US Patent 5,002,888 (1991)
- 5) Monticello, M. J. : US Patent 5,358,870 (1994)
- 6) Afferden M. V., Schacht, S., Klein, J. and Trüper, H. : Arch. Microbiol., 153, 324(1990)
- 7) Miller, K. W. : Appl. Environ. Microbiol., 58, 2176(1992)
- 8) Wang, P. and Krawiec, S. : Arch. Microbiol., 161, 266(1994)
- 9) Omori, T. Monna, L, Saiki, Y. and Kodama, T. : Appl. Environ. Microbiol., 58(3), 911(1992)
- 10) Izumi, Y., Ohshiro, T., Ogino, H., Hine, Y. and Shimao, M. : Appl. Environ. Microbiol., 60(1), 223 (1994)
- 11) Kim, H. Y., Kim, T. S. and Kim, B. H. : Biotechnol. Lett., 12(10), 761(1990)
- 12) Kilbane, J. J. : CHEMTECH, Dec., 747(1990)
- 13) Kayser, K. J., Bielaga-Jones, B. A., Jackowski, K., Odusan, O. and Kilbane, J. J. : J. General Microbiol., 139, 3123(1993)