

돌연변이 균주 *Gordona* sp. EID의 dibenzothiophene 탈황 특성

조정숙*, 김윤정*, 성장현**, 류희욱**, 장용근***

*이화여자대학교 과학기술대학원 환경학과, **승실대학교 환경·화학공학과,

***한국과학기술원 생물공정연구센터

Characteristics of dibenzothiophene desulfurization by mutant *Gordona* sp. EID

Yoon Jung Kim*, Kyung-Suk Cho*, Jung Hyeon Sung**, Hee Wook Ryu**, and
Yong Keun Chang***

*Dept. of Environmental Science and Engineering, Ewha Institute of Science and Engineering,
Seoul, 120-750, Korea

**Dept. of Chemical and Environmental Engineering, Soong Sil University, Seoul, 156-743, Korea

***Dept. of Chemical Engineering and BPERC, KAIST, Taejon 305-701, Korea

요 약

석유탈황용 균주인 *Gordona* sp. CYKS1을 ethylmethanesulfone 처리하여 돌연변이 균주 EID를 개발하여, dibenzothiophene(DBT) 탈황 특성을 조사하였다. EID 균주는 DBT를 2-hydroxybiphenyl(2-HBP)와 sulfate로 대사하는 4S pathway를 가지며, wild type인 CYKS1이 $2.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 탈황속도를 보이는 반면, EID균주는 $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 탈황속도를 나타내었다. 탄소원으로 공급된 glucose의 농도가 EID 균주의 DBT탈황속도에 미치는 영향을 조사한 결과 glucose의 농도가 증가할수록 탈황속도가 증가하였다. 또한, DBT 분해속도에 미치는 DBT의 초기 농도의 영향을 알아본 결과, 2.0 mM에서 최대 DBT 분해활성($11.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)을 나타내었다. 최종 대사산물인 2-HBP와 sulfate 농도가 증가할수록 EID 균주의 DBT 분해능은 감소하였다. 0.2 mM의 2-HBP를 첨가한 배지에서는 EID 균주의 성장과 DBT 탈황능은 완전 저해 받았다. Sulfate가 0.5g/L 첨가된 조건에서의 EID 균주의 DBT 탈황속도는 $1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이었다.

ABSTRACT : Mutant strain EID was developed by treating *Gordona* sp. CYKS1 with ethylmethanesulfone, and the desulfurization characteristics of dibenzothiophene(DBT) by mutant EID was investigated. Strain EID desulfurized DBT to 2-hydroxybiphenyl (2-HBP) by 4S pathway. Desulfurization rate of the strain EID was $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, while that of the wild type CYKS1 was $2.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$. The effect of glucose concentration supplied as the carbon source on the DBT desulfurization showed that DBT desulfurization rate was enhanced as the glucose concentration increased. Maximum DBT desulfurization rate was $11.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ at 2.0 mM DBT concentration. As end-products such as 2-HBP and sulfate concentrations increase, DBT desulfurization activity of the strain EID decreased. When 0.2 mM of 2-HBP was added in the medium, no growth and desulfurization activity was observed. When 0.5 g/L Na_2SO_4 was simultaneously supplied with DBT, DBT desulfurization rate was $1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$.

1. 서론

화석연료에 포함되어 있는 각종 황화합물들은 연소 시 SO₂를 발생시켜 산성비 및 토양 오염 등의 환경문제를 야기한다. 전 세계적으로 화석연료 연소에 의해 약 9,000만톤 이상의 SO₂가스가 연간 발생하는 것으로 보고되어 있다[1, 2]. 국내에서도 pH 4 이하의 강산성비가 내리는 등 산성비에 의한 피해가 증가하고 있는 실정이다. 따라서, 화석연료의 효과적인 탈황을 통한 청정에너지 생산은 무엇보다도 시급한 과제이다.

지금까지는 수침 탈황공정(Hydrodesulfurization process)과 같은 물리·화학적인 탈황방법으로 석유 내에 있는 황성분을 제거하고 있으나, 수침 탈황공정은 경제적인 면과 기술적인 면에서 여러 가지 제한점이 있다. 우선, 수침 탈황공정은 고온·고압 하에서 이루어지기 때문에 장치비 운전비가 고가로 소요되는 문제점이 있다. 또한, 석유 내 전체 유기황 화합물 중 약 30~60%를 차지하는 thiophene류 등의 복잡한 구조를 가진 물질에 대해서 수침 탈황방법으로는 효과적인 탈황 효율을 얻을 수 없다. 따라서, 차세대 청정에너지 생산기술로 생촉매를 이용한 생물학적 탈황공정이 기존의 수침 탈황공정의 보완 또는 대체방법으로 대두되고 있다.

생물학적인 탈황공정은 수침 탈황공정에 비해 장치비와 운전비가 저렴하고, 기존의 장치와 부가적으로 결합하여 전체적인 처리 용량 및 효율을 높일 수 있으며, 안전하고 공정의 유연성 및 효율성을 가지는 외에 부산물에 의한 오염물질이 없는 청정기술이다. 이러한 생물학적 탈황공정은 호기성 탈황 균주를 이용하는 호기적 공정과 혐기성 탈황 균주를 이용하는 혐기적 공정으로 나뉜다. 생물학적 탈황공정 연구에는 thiophene류 중 수침 탈황공정에서 탈황이 어려운 dibenzothiophene (DBT)이 모델 화합물로 이용되고 있다.

지금까지 밝혀진 호기적 미생물에 의한 대표적인 분해경로는 Kodama pathway와 4S pathway가 있는데, Kodama pathway는 DBT가 2-hydroxy-2-formyl-benzothiophene으로, 4S pathway는 DBT가 2-hydroxybiphenyl(2-HBP)와 sulfate로 분해되는 경로를 말한다. 호기적 탈황 공정에 주로 이용되는 균주로는 Kodama pathway를 갖는 *Pseudomonas* sp.,

Acinebacter sp., *Rhizobium* sp., *Cunningtmella elegans*, *Sulfolobus acidocaldarius* 등이 있다[3-12]. 또한, 1980년대 Kee와 Rhee에 의해 제안된 4S pathway를 갖는 *Rhodococcus rhodochrous*와 *Rhodococcus erythropolis* 등이 각각 미국과 일본에서 분리 동정되었다[13-24]. Kodama pathway는 DBT를 무기황 형태로 전환하였을 뿐 완전 탈황되지 않는 문제점이 있으나, 4S pathway는 DBT를 sulfate와 2-HBP로 완전 탈황할 수 있어, 현재 밝혀진 경로 중 생물학적 탈황 공정에 가장 적합한 것으로 알려져 있다. 한편, 혐기성 균주 중 *Desulfovibrio desulfuricans* M6는 DBT 내의 황만을 선택적으로 탈황하여 biphenyl과 황화수소로 전환시킬수 있는 것으로 밝혀졌다[25-27]. 일반적으로 혐기성 균주는 호기성 균주에 비해 넓은 범위의 유기황 화합물에 대한 탈황능을 지니지 못하며 혐기적 상태로 밀폐해야 되기 때문에 공정이 복잡하고 장치비가 많이 소요되는 것으로 알려져 있다.

본 연구진은 호기적 생물탈황공정을 개발하기 위해 염색 폐수 처리 슬러지로부터 DBT의 탈황능을 갖는 *Gordona* sp. CYKS1을 분리하였다[28]. *Gordona* sp. CYKS1은 호기적 공정 중 완전 탈황 경로인 4S pathway에 의해 DBT를 2-HBP와 sulfate로 탈황하는 것으로 밝혀졌다. DBT 탈황능을 갖는 균주의 DBT분해속도를 좀 더 향상시키기 위한 방법으로는 유전자 재조합 방법과 돌연변이 방법이 있다. 본 연구에서는 *Gordona* sp. CYKS1을 돌연변이 시켜 돌연변이 균주를 개발하였으며, 돌연변이 균주의 DBT탈황능에 미치는 여러인자들의 영향을 조사하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 배지조성 및 배양방법

염색 폐수 처리 슬러지로부터 분리한 균주 *Gordona* sp. CYKS1 및 돌연변이 균주의 배양을 위해 본 연구에서 사용한 minimal salt medium(MSM)은 황성분이 없는 배지로서 그 조성은 다음과 같다 : NH₄Cl 2 g/L, K₂HPO₄ 4.5 g/L, NaH₂PO₄ 1.5 g/L, MgCl₂ 0.2 g/L, CaCl₂ 0.02 g/L, Trace element solution 1 ml/L,

Vitamin solution 1 ml/L. Trace element solution의 조성은 $\text{FeCl}_2 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$ 2100 mg/L, $\text{CoCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 250 mg/L, NiCl_2 24 mg/L, CuCl_2 5 mg/L, MnCl_2 100 mg/L, ZnCl_2 144 mg/L, H_3BO_3 30 mg/L, $\text{Na}_2\text{MoO}_4 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$ 36 mg/L, EDTA이다. Vitamin solution의 조성은 folic acid 2.5 mg/L, riboflavin 200 mg/L, lipoic acid 5 mg/L, biotin 100 mg/L, nicotinic acid 350 mg/L, thiamine- Cl_2 300 mg/L, *p*-aminobenzoic acid 200 mg/L, pyridoxal chloride 100 mg/L, Ca^{2+} pantothenate 100 mg/L, Vit B₁₂ 50 mg/L이다. 고체 배지를 제조하기 위해서 agarose 10 g/L 또는 gellan gum 10 g/L을 배지에 첨가하였으며, MSM에 유일 황원으로 DBT를 첨가하였다. 불용성인 DBT를 99% 에탄올에 녹여 DBT 100 mM stock solution을 제조하였고, 이 DBT stock solution을 사용하여 DBT 농도가 0.3 mM이 되도록 배지에 첨가하였다. DBT를 첨가한 MSM배지에 균주를 접종한 후 진탕배양기에서 30 °C 180 rpm의 조건으로 48~72 시간 배양하였다. 배양액은 8000 × g에서 10 분간 원심분리 하여 균체를 회수한 후, 회수한 균체를 0.1 M phosphate 완충용액으로 2회 세척하였다. 세정한 균체를 0.1 M phosphate 완충용액에 현탁한 후, 이 균체 현탁액을 돌연변이 유도 실험과 돌연변이 균주 특성 실험을 위한 접종액으로 사용하였다.

2.2 탈황균주의 돌연변이 유도

Gordona sp. CYKS1보다 DBT 분해능과 성장속도가 향상된 돌연변이 균주를 개발하기 위하여 돌연변이 유도제로는 ethylmethanesulfone(EMS)를 사용하였다. DBT를 유일 황원으로 첨가한 MSM배지에서 *Gordona* sp. CYKS1 균주를 배양하여 흡광도 5~8(600nm)인 배양액을 10~100배 희석하여 돌연변이 유도 실험에 사용하였다. 희석 배양액에 EMS를 0.1 M이나 0.2 M이 되도록 첨가한 후 0, 2, 4, 6, 7 시간 동안 30 °C에서 교반 배양(180 rpm)한 후, 각 처리 시간별로 배양액 0.1 ml을 채취하였다. 돌연변이 처리한 배양액을 희석배수 $10^0 \sim 10^7$ 이 되도록 희석하여 DBT가 도포된 agarose에 도말한 후 30 °C에서 5~30 일간 배양하였다. 배양기간 동안에 agarose 고체배지(DBT

농도; 0.3mM)에서 성장한 colony의 DBT 분해작용에 의해서 생성되는 clear zone의 크기와 colony들의 크기를 관찰하여 돌연변이 균주를 선정하였다.

2.3 돌연변이 균주의 성장 및 DBT 분해 특성

본 연구의 모든 실험은 250 mL의 삼각플라스크에서 수행하였고, 탄소원으로 5 g/L의 glucose를 첨가하였으며, 2회 반복 수행하였다. 우선, EMS 처리에 의해 얻은 돌연변이 균주와 wild type *Gordona* sp. CYKS1의 비성장속도와 DBT 탈황속도를 비교하였다. 0.3 mM의 DBT가 함유된 MSM 50 ml를 250 ml 삼각플라스크에 *Gordona* sp. CYKS1과 돌연변이 균주를 각각 초기 접종농도가 17.1 mg/L 되도록 접종하였다. 30 °C와 180 rpm조건에서 배양하면서 8~12 시간 간격으로 접종 배양액을 4 ml씩 채취하여 DBT농도, 세포농도, glucose 농도 분석에 사용하였다.

돌연변이 균주의 성장과 DBT 분해속도에 미치는 glucose 농도의 영향을 조사하기 위하여 500 g/L의 glucose stock solution을 이용하여 glucose 농도가 0, 1, 3, 5, 10 g/L가 되도록 배지에 첨가하였다. 이때 DBT 첨가량은 glucose 농도에 상관없이 0.3 mM로 일정하게 하였다.

DBT의 농도 변화에 따른 돌연변이 균주의 성장과 DBT 분해능에 미치는 영향을 조사하였다. MSM에 DBT의 초기농도가 각각 0.3, 0.5, 1.0, 1.5, 2.0, 2.5, 3.0, 3.5, 4.0 mM이 되도록 첨가하였다. DBT가 물에 대한 용해도가 낮고, 배지에 미량의 DBT를 정확하게 첨가하기 위하여 용매로 에탄올을 사용한 DBT stock solution을 제조하여 사용하였다. 배지에서의 DBT 농도가 0.3~1.5 mM일때는 100 mM stock solution을 사용하였고, 2.0~4.0 mM에서는 200 mM stock solution을 사용하였다. 이러한 DBT 농도의 증가에 따라서 에탄올 첨가량이 증가하게 되므로, 에탄올 농도의 영향을 배제시키기 위해 모든 조건에서 에탄올의 양이 16 g/L가 되도록 조절하였다. 또한, 탄소원으로 5 g/L의 glucose를 첨가하였다.

DBT 분해산물인 2-HBP가 돌연변이 균주의 DBT 분해능에 미치는 영향을 조사하였다. 5 g/L의 glucose와 0.3 mM DBT를 첨가한 MSM에 100 mM

2-HBP stock solution을 사용하여 2-HBP를 0.05, 0.10, 0.15, 0.20 mM가 되도록 첨가하였다.

돌연변이 균주의 DBT 분해능에 미치는 sulfate의 영향을 조사하기 위해 5 g/L의 glucose와 0.3 mM DBT를 첨가한 MSM에 Na_2SO_4 가 각각 0.01, 0.10, 0.20, 0.50 g/L이 되도록 첨가한 후 세포성장과 DBT 탈황 특성을 조사하였다.

2.4 분석 방법

세포 농도는 spectrophotometer(Milton Roy Company, U.S.A.)를 이용하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다. DBT 농도는 HPLC(Waters, U.S.A.)를 사용하여 측정하였다. 채취한 배양액을 5 N HCl로 pH 2 정도로 낮춘 후 ethyl acetate를 동일한 부피로 첨가하여 30 분간 추출한 후 다시 30 분간 정치시켜 상등액 10 μl 를 분석하였다. 분석은 UV-VIS 검출기 (Waters, U.S.A.)와 역상 C_{18} column(3.9 \times 150 mm Nova-Pak, Waters, U.S.A.)을 사용하였다. 용매는 100% methanol을 사용하였고, 유속은 0.6 ml/min으로 하였다. 탄소원으로 제공된 glucose 농도는 glucose analyzer(YSI model 2700, U.S.A.)를 이용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 돌연변이 균주의 성장속도와 DBT 분해속도

EMS의 농도를 0.1 M과 0.2 M로 하여 CYKS1 균주를 각각 5 시간과 4 시간 처리하였을 때 생존율은 20 %정도를 얻을 수 있었고, 다수의 돌연변이 균주가 얻어졌다. DBT 분해능을 가진 균주를 DBT를 도말한 교체배지에 배양하면 colony 주변의 DBT입자가 분해되어 투명한 clear zone이 형성된다. DBT 탈황능이 우수할수록 clear zone의 크기가 커지므로, 돌연변이 균주의 탈황능은 이러한 clear zone의 크기로 간접적으로 확인할 수 있다. 따라서, EMS처리에 의해 얻은 돌연변이 균주들을 DBT를 도포한 agarose에 배양하였을 때 colony 크기와 clear zone크기가 가장 큰 균주를 선별하여 EID로 명명하였다. 탈황균주의 DBT분해는 일단 세포내로 DBT를 흡수하여, 여러 종류의 효소반응

을 통해 4S pathway에 의해 분해되며, 최종산물인 2-HBP를 배지로 배출하고, sulfate는 황원으로 균체가 이용한다[29].

Wild type CYKS1 균주와 돌연변이 균주 EID의 비성장속도와 DBT 탈황속도를 Table 1에 정리하였다.

Table 1. Comparison of specific growth rate and DBT desulfurization activity.

	Wild type CYKS1	Mutant EID
Specific growth rate (h^{-1})	0.07	0.06
DBT desulfurization rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	2.6	4.0
Specific DBT desulfurization rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	0.9	2.0
Yield (mmol of DBT degraded/mole of carbon)	0.8	1.4

Wild type *Gordona* sp. CYKS1의 세포성장속도, DBT 탈황속도 및 DBT 비탈황속도는 각각 0.07 h^{-1} , $2.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $0.9 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 이었다. 이와 비교하여 돌연변이 균주 EID의 세포성장속도 DBT 탈황속도 및 DBT 비탈황속도는 0.06 h^{-1} , $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$, $2.0 \mu\text{mol} \cdot \text{g-DCW}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 조사되었다. 돌연변이 균주 EID의 비성장 속도는 wild type 균주에 비해 약간 감소하였다. 그러나, DBT 탈황속도의 경우에 CYKS1 균주와 비교하여 돌연변이 균주 EID가 약 1.5배 향상되었고, DBT 비탈황속도는 2.2배 향상되었다. 또한, 기질로 사용하는 glucose 농도에 대한 DBT 분해 수율을 비교하였을 때, wild type *Gordona* sp. CYKS1은 0.8 mmol DBT/mol glucose인 반면, 돌연변이 균주 EID의 수율은 1.4 mmol DBT/mol glucose로 향상되었다.

3.2 돌연변이 균주EID의 성장과 탈황능에 미치는 glucose 농도의 영향

돌연변이 균주 EID의 glucose 농도변화에 따른

세포성장속도와 DBT분해속도를 Fig. 1에 도시하였다.

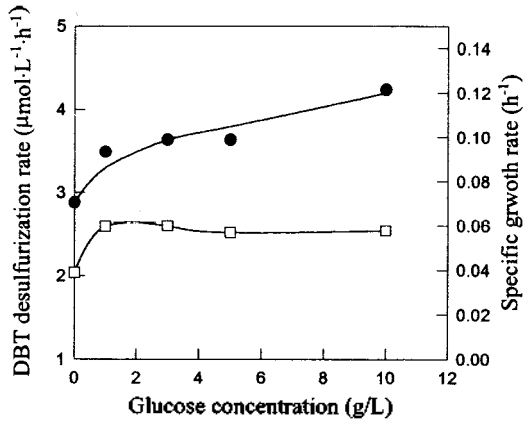


Fig. 1. Specific growth rate and DBT desulfurization rate with different glucose concentration.

● DBT desulfurization rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$);
 □ Specific growth rate (h^{-1}).

초기 glucose 농도를 0, 1, 3, 5, 10 g/L로 변화시키면서 돌연변이 균주 EID의 비성장속도, DBT 탈황속도를 비교하였다. 세포성장 속도를 glucose 농도별로 비교해보면, glucose 농도가 0 g/L에서 가장 낮은 값인 0.04 h^{-1} 이었으며 1~10 g/L의 glucose 농도에서는 약 0.06 h^{-1} 로 유사한 값을 보였다. 본 연구에서는 DBT를 ethanol에 녹여 배지에 첨가하기 때문에 탄소원으로 glucose를 첨가하지 않는 조건에서는 DBT와 함께 첨가된 3 g/L의 ethanol을 탄소원으로 사용하여 EID 균주가 성장한 것으로 사료된다.

DBT 탈황속도의 경우, glucose의 농도가 0, 1, 3, 5, 10 g/L로 높아짐에 따라 DBT 탈황속도도 각각 2.9, 3.5, 3.7, 3.6, 4.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 증가하였다. 이러한 결과로, 본 연구에서 사용하는 glucose 0~10 g/L의 농도는 돌연변이 균주 EID의 성장과 DBT 탈황능에 전혀 저해를 주지 않는 농도임을 확인할 수 있었고, 10 g/L에서 가장 좋은 DBT 분해 활성을 나타내었다.

3.3 돌연변이 균주의 성장과 DBT 분해 속도에 미치는 초기 DBT 농도의 영향

유일 황원으로 사용한 DBT는 농도가 증가할수록 세포성장과 DBT탈황능에 저해를 줄 수 있다. 그러

므로 초기 높은 DBT 농도에서의 탈황능을 조사할 필요가 있다. 본 연구에서는 초기 DBT의 농도를 0.3~4.0 mM로 다양하게 변화시켜 시간에 따른 세포성장속도와 DBT 탈황속도를 비교하여 조사하였다(Fig. 2).

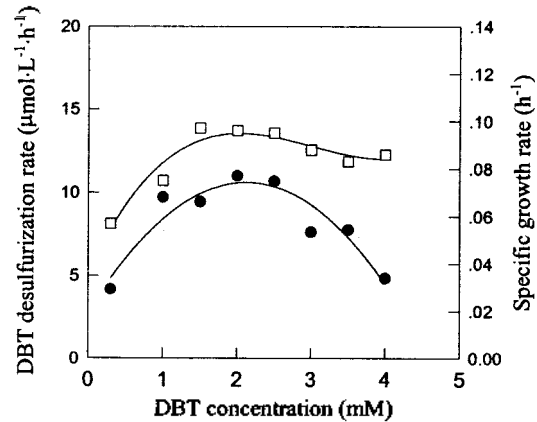


Fig. 2. Specific growth rate and DBT desulfurization rate with different DBT concentration.

● DBT desulfurization rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$);
 □ Specific growth rate (h^{-1}).

EID의 세포성장 속도에 대한 DBT 농도의 영향은 DBT 농도가 0.3 mM에서 1.5 mM로 증가함에 따라 세포성장속도가 0.06 h^{-1} 에서 0.10 h^{-1} 로 증가하다가 1.5~2.5 mM 사이에서 약 0.10 h^{-1} 로 유지되다가 그 이상의 농도에서는 DBT 농도가 증가할수록 세포성장속도가 완만하게 감소함을 관찰하였다. DBT분해속도는 DBT 0.3 mM에서 4.2 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 이었고, 2.0 mM에서 11.1 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 2.0 mM까지는 초기 DBT 농도가 증가할 수록 커지는 경향을 보였지만, 4.0 mM의 고농도에서는 DBT분해속도가 4.9 $\mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 로 감소하였다. 결과적으로 DBT의 농도가 증가함에 따라 EID의 활성이 저해됨을 알 수 있었다.

3.4 돌연변이 균주의 성장과 DBT 분해 속도에 미치는 2-HBP의 영향

탈황능을 가진 균주들은 DBT가 분해되는 과정에서 생성되는 대사물질에 의해서 저해를 받는 것으로 알려져 있다[30, 31]. 돌연변이 균주 EID의 성장과 DBT 탈황특성에 미치는 2-HBP의 영향을 조사하여 Fig. 3에

도시하였고, 성장속도와 DBT분해속도를 Table 2에 정리하였다.

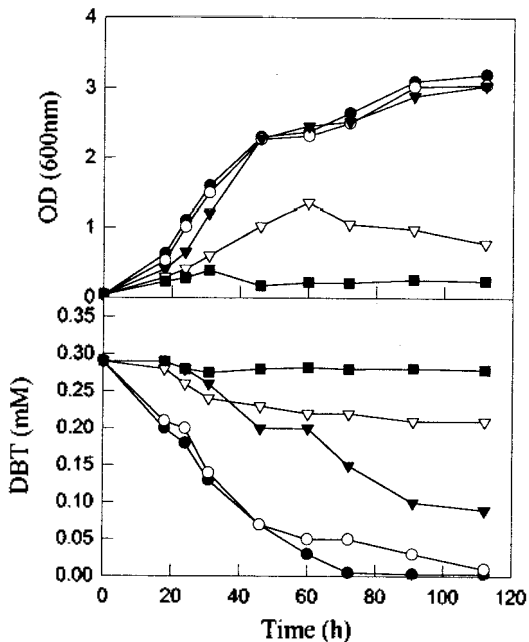


Fig. 3. Effect of 2-HBP concentration on growth and DBT desulfurization activity.

●, 0 mM; ○, 0.05 mM; ▼, 0.10 mM;
▽, 0.15 mM; ■, 0.20 mM.

Table 2. Effect of 2-HBP on the growth and DBT desulfurization of *Gordona sp.* EID.

	DBT desulfurization rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Specific growth rate (h^{-1})
0mM	4.1	0.12
0.05mM	3.3	0.09
0.10mM	1.9	0.09
0.15mM	1.0	0.07
0.20mM	0	0

0.05 mM과 0.1 mM의 2-HBP를 배지에 첨가한 경우, 거의 유사한 경향으로 세포 성장이 관찰되었다. 그러나, DBT분해는 0.05 mM 2-HBP가 첨가된 경우에는 60시간에 약 0.05 mM까지 분해되었으나 0.1 mM 2-HBP가 첨가된 경우에는 약 0.2 mM까지 밖에 분해

하지 못했다. 0.15 mM 2-HBP가 첨가된 배지에서는 흡광도 1정도의 세포성장이 관찰되었고, DBT는 약 0.05 mM 분해되었다. 또한, 0.2 mM 2-HBP농도에서는 EID 균주의 세포성장과 DBT 분해능이 완전 저해 작용을 받음을 알 수 있었다.

2-HBP 첨가 농도별로 세포성장 속도와 DBT 분해속도를 비교해보면 0.05 mM인 경우 세포성장속도는 0.09h^{-1} , DBT분해속도는 $3.3 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 이었고, 0.01 mM인 경우는 0.09h^{-1} , $1.9 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 였다. 그리고, 0.15 mM에선 0.07h^{-1} , $1.0 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 를 나타내었다. 즉, 비성장속도와 DBT 분해속도 모두 2-HBP농도가 증가할수록 감소하는 경향을 보였다. 2-HBP는 살균제의 주요 성분이기 때문에, 2-HBP의 독성에 의해 EID 균주의 성장과 DBT 탈황능이 저해를 받은 것으로 사료된다[30,31]. 그러나, 2-HBP는 휘발성이 강하기 때문에 실제 배양액에서 관찰되는 2-HBP농도는 0.05~0.10 mM이하이다. 또한, *Gordona sp.* EID를 이용한 석유탈황공정은 호기공정이므로 생성된 대부분이 휘발된다. 따라서, 실제 탈황공정에서는 2-HBP의 존재가 탈황능에 미치는 영향도 미미한 것으로 사료된다.

3.5 돌연변이 균주의 성장과 DBT 분해 속도에 미치는 sulfate의 영향

대부분의 미생물들의 황 요구량은 건조세포중량으로 약 0.1 % 내외의 소량을 필요로 한다. 또한, 미생물들도 sulfate와 같이 이용이 편리한 형태의 황화합물을 우선적으로 사용하려는 경향이 있다. 그러므로, DBT와 다른 유기황화합물을 탈황할 수 있는 석유 탈황균주들의 경우, 배지내 sulfate가 존재할 때 DBT의 탈황능이 저해되는 것으로 일부 연구에서 보고되고 있다[30, 31]. 이는 DBT의 탈황능과 관련된 Dsz genes의 발현이 sulfate에 의해 저해 받기 때문이다.

돌연변이 균주 EID의 sulfate의 농도변화에 따른 세포성장과 DBT분해특성을 Fig. 4에 도시하였고, Table 3에 비성장속도와 DBT 탈황속도를 sulfate 농도별로 제시하였다.

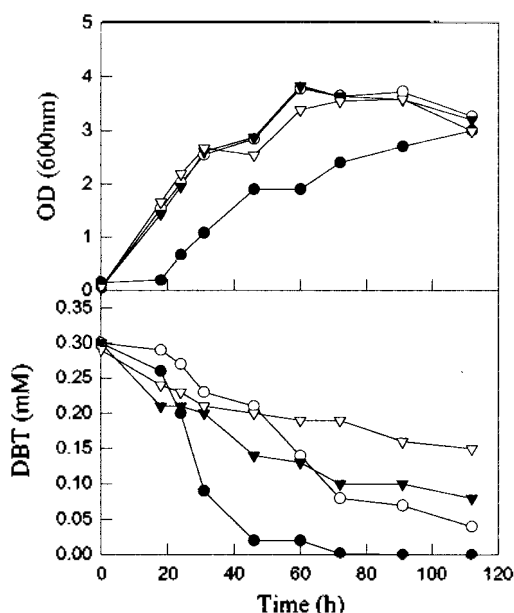


Fig. 4. Effect of sulfate concentration on growth and DBT desulfurization activity.

●, 0 g/L; ○, 0.1 g/L; ▼, 0.2 g/L; ▽, 0.5 g/L.

Table 3. Effect of sulfate on the growth and DBT desulfurization of *Gordona* sp. EID

Sulfate concentration (g/L)	DBT desulfurization rate ($\mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)	Specific growth rate (h^{-1})
0g/L	4.0	0.06
0.1g/L	3.1	0.17
0.2g/L	2.8	0.17
0.5g/L	1.4	0.17

DBT만을 첨가한 경우 growth rate이 0.06 h^{-1} 인 데 반해 Sulfate 농도 0.5 g/L 일 때 0.17 h^{-1} 로 2~3배 증가되었다. 탈황균주 중 *Corynebacterium* sp. SY1은 DBT만을 첨가한 경우보다, dimethyl sulfide, sulfate, dimethyl sulfone등과 같은 황화합물을 첨가하였을 때 성장이 촉진되었으며[32], *Rhodococcus erythropolis* D-1도 DBT만을 첨가한 경우보다, sodium sulfate, methanesulfonic acid, DBT sulfone, dimethyl sulfone 등을 첨가하였을 때 성장이 촉진되었다[29].

첨가한 0.3mM 의 DBT를 대부분 분해하는데 걸린 소요시간은 sulfate를 첨가하지 않은 대조군의 경우, 약 70 시간이 소요되었다. 그에 반해, sulfate를 첨가하게 되면 DBT 분해에 소요되는 시간은 약 100여 시간으로 증가하였다(Fig. 4). 112 시간째 배지내 잔존하는 DBT의 양을 첨가된 sulfate농도별로 비교해보면, $0.1, 0.2, 0.5 \text{ g/L}$ 에 대해 각각 $0.04, 0.08, 0.15 \text{ mM}$ 이었다. 즉, sulfate 농도 0.1 g/L 와 0.2 g/L 에서 DBT 분해속도가 $3.1, 2.8 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 이었고, 0.5 g/L 에서는 $1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{h}^{-1} \cdot \text{L}^{-1}$ 로, sulfate 첨가량이 증가할수록 DBT 탈황속도는 감소함을 알 수 있었다.

4. 결론

돌연변이제 ethylmethanesulfone를 사용하여 석유탈황균주인 *Gordona* sp. CYKS1을 처리하여 돌연변이 균주 EID를 개발하였고, 이를 이용한 대표적 유기황 화합물인 dibenzothiophene(DBT) 탈황 특성을 조사한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. EID 균주는 wilde type과 마찬가지로 DBT를 2-hydroxybiphenyl(2-HBP)와 sulfate로 대사하는 4S pathway를 유지하였고, wild type인 CYKS1이 $2.6 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 탈황속도를 보이는 반면, EID균주는 $4.0 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 의 탈황속도가 향상되었다.
2. EID 균주의 DBT탈황속도에 미치는 영향을 조사한 결과 glucose의 농도가 증가할수록 탈황속도가 증가하였다.
3. DBT 분해속도에 미치는 DBT의 초기 농도의 영향을 알아본 결과, 2.0 mM 농도까지는 DBT 농도가 증가함에 따라 탈황속도가 증가하여 최대 DBT 분해활성($11.1 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$)을 나타내었고, 2.5mM 이상의 DBT 농도에서는 DBT 농도가 증가함에 따라 탈황속도가 저해 받았다.
4. DBT의 최종 대사산물인 2-HBP와 sulfate 농도가 탈황균주의 DBT 분해능을 저해 하였다. 0.2 mM 의 2-HBP를 첨가한 배지에서는 EID 균주의 성장과 DBT 탈황능은 완전저해 받았고, sulfate가 0.5g/L 첨가된 조건에서의 EID 균주의 DBT 탈황속도는

sulfate가 없는 경우의 약 1/3수준인 $1.4 \mu\text{mol} \cdot \text{L}^{-1} \cdot \text{h}^{-1}$ 로 감소하였다.

감 사

본 연구는 산업자원부 에너지 기술 개발 사업 연구비에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참고문헌

- Mack M. : Gen. Eng. News, 15, 20(1993).
- Malik, K. A. : Process Biochem., 13, 10(1978).
- Constanti M., Giralt J., Bordons A., and Norris P. R. : Appl. Biochem. Biotechnol., 34, 767(1992).
- Constanti M., Giralt J., and Bordons A. : Enzyme Microbiol. Technol., 19, 214 (1996).
- Cork D. J., Garunas R., and Sajjad A. : Appl. Environ. Microbiol., 45, 913 (1983).
- Crawford D. L. and Gupta K. K. : Curr. Microbiol. 21, 229(1990).
- Fedorak P. M. and Weserlake D. W. S. : Can. J. Microbiol., 29, 291(1982).
- Hou C. T. and Laskin A. I. : Dev. Ind. Microbiol., 17, 351(1976).
- Kargi F. and Robinson J. M. : Biotechnol. Bioeng., 26, 687(1984).
- Kargi F. : Biotechnol. Lett., 9, 478(1987).
- Kim B. H., Shin P. K., Na J. U., Park D. H., and Bang S. H. : J. Microbiol. Biotechnol., 6, 299(1996).
- Sagardia F., Rigau J. J., Lahoz A. M., Fuentes F., Lopez C., and Flores W. : Appl. Microbiol., 29, 722(1975).
- Gallagher J. R., Olson E. S., and Stanley D. C. : FEMS Microbiol. Lett., 107, 31(1993).
- Izumi Y., Ohshiro T., Ogino H., Hine Y., and Shimao M. : Appl. Environ. Microbiol., 60, 223(1994).
- Kayser K. J., Bielaga-Jones B. A., Fackowxki K., Odusan O., and Kilbane J. J. : J. Gen. Microbiol., 139, 3123(1993).
- Kilbane J. J. : US patent 5,002,888(1991).
- Kilbane J. J. and Jackowski K. : Biotechnol. Bioeng., 40, 1107(1992).
- Kilbane J. J. : US patent 5,132,219(1992).
- Kilbane J. J. : US patent 5,104,801(1992).
- Kilbane J. J. : US patent 5,198,341(1992).
- Kilbane J. J. : US patent 5,358,869(1994).
- Ohshiro, T., Hine Y., and Izumi Y. : FEMS Microbiol. Lett., 118, 341(1994).
- Olson, E. S., Stanley D. C., and Gallapher J. R. : Energy Fuel, 7, 159(1993).
- Wang, P. and Krawiec S. : Arch. Microbiol, 161, 266(1994).
- Kim H. Y., Kim T. S., and Kim B. H. : Biotechnol. Lett., 12, 761(1990).
- Kim H. Y., Kim T. S., and Kim B. H. : Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol., 18, 31(1990).
- Kim H. Y., Kim T. S., and Kim B. H. : J. Microbiol. Biotechnol., 1, 1(1991).
- Rhee S. K., Chang J. H., Chang Y. K., and Chang H. N. : Appl. Environ. Microbiol., 64, 2327(1998).
- Ohshiro, T., Suzuki K., and Izumi Y. : J. Ferment. Bioeng., 81, 121(1996).
- Ohshiro, T., Hirata T., and Izumi Y. : Appl. Microbiol. Biotechnol., 44, 249(1995).
- Ohshiro, T., Kanbayashi Y., Hine Y., and Izumi Y. : Biosci, Biotech. Biochem., 59, 1349(1995).
- Omori, T., Monna L., Saiki Y., and Kodama T. : Appl Environ. Microbiol., 58, 911(1992).