

경유의 Model solution에서 고정화효소를 이용한 Dibenzothiophene의 산화

허정찬, 성현태, 류근갑

울산대학교 화학공학부

울산대학교 청정기술·화학공학부

전화 (052) 259-2822, FAX (052) 259-1689 (류근갑)

Abstract

Fossil fuels such as coal and crude oil contain various organic sulfur compounds. Combustion of these fuels emit sulfur oxides which are considered as major air pollutants causing acid rain problem. Among various organic sulfur compounds, aromatic sulfur compounds of thiophenes which constitute major sulfur fractions of heavy oils are not easily removed by hydrodesulfurization. Many peroxidase and hemoproteins are known to oxidize dibenzothiophene (DBT) to dibenzothiophene-sulfoxide(DBT-sulfoxide) then dibenzothiophene-sulfone (DBT-sulfone). The oxidation of DBT by the immobilized hemoproteins in n-octane was increased significantly when the hemoproteins were deposited on celites of the particle size between 0.75 - 1.0 mm and a conventional substrates, such as t-butyl hydroperoxide and cumene hydroperoxide. In anhydrous organic solvents with log P values larger than 4.0 DBT was completely oxidized by cumene hydroperoxide catalyzed by cytochrome c deposited on celites.

서론

산업체와 자동차등 운송기관의 연료로서 사용되는 석유 및 석탄 등의 화석연료는 다양한 유기 황 화합물을 함유하고 있으며 이들의 연소 시 발생되어지는 SO₂는 대기오염과 산성비의 원인으로 작용하여 토양오염 등의 환경오염을 일으키고 있다. 화석연료는 향후에도 많이 사용되어질 전망이기 때문에 이들 중에 함유되어있는 유기 황 성분의 효과적인 제거를 위한 연구가 필요하다.[1]

다양한 유기 황 화합물 중에서 mercaptan, sulfide류 및 thiol류는 물리, 화학적인 방법으로 쉽게 제거가 가능하여 재래의 고온, 고압에서 무기물 촉매(니켈, 코발트, 몰리브덴, 알루미늄 등)와 수소를 이용하는 수소화탈황법으로 이들을 황화수소(H₂S)로 변환시키고 있다. 그러나 수소화탈황법은 고온, 고압의 조건으로 인하여 비싼 장치비와 운전비용이 필요하며 황화합물의 농도가 낮아질수록 제거효율이 저하된다는 문제점을 가지고 있다. 특히 중질유에 많이 포함되어 있는 고리형 황화물질인

thiophene류의 제거효율이 낮고 이를 제거하기 위해서는 많은 양의 수소가 필요하다. 또한 기존의 수소화탈황법에 의해서 증유를 탈황시킬 경우 증유에 포함되어 있는 중금속에 의해서 사용하는 촉매의 활성이 저하되어 촉매의 수명이 짧아지는 문제점이 있다.

이러한 문제점을 보완하고 경유 및 증유에 많이 함유되어 있는 고리형 황화물질인 thiophene의 제거를 위해 생촉매인 미생물 및 효소를 이용한 탈황방법이 연구되어 왔다. 석유탈황 미생물을 이용한 화석연료의 탈황기술은 1940년대부터 시작되었으며, 탈황균주인 *Rhodococcus* 박테리아에 의한 미국특허가 Daniel J. Monticello 박사에게 의해서 취득되었고 이를 이용한 석유탈황기술을 개발하기 위한 회사인 Energy Biosystem사가 설립되었다. 또한 *Desulfovibrio* 균과 *Pseudomonas* 균에 의한 탈황 연구가 활발히 진행되어지고 있다.[2] 그러나 이러한 미생물 탈황기술이 환경 친화적이기는 하지만 미생물의 활성을 위하여 다량의 물을 사용하여야 하며 이를 최종적으로 분리해야되는 문제점을 가지고 있다.

또 하나의 생촉매를 이용하는 방법으로는 효소를 이용한 thiophene류의 제거방법으로 이전의 연구자들에 의해 다양한 peroxidase와 hemoprotein이 dibenzothophene을 dibenzothophene-sulfoxide와 dibenzothiophene-sulfone의 형태로 산화시킨다고 알려져 있으며 유기물질인 효소를 사용할 경우에는 사용할 수 있는 온도 및 압력의 범위가 미생물 보다 넓고 환경에 전혀 유해하지 않은 생분해성 촉매 그리고 최소량의 물을 사용할 수 있다는 장점을 가지고 있다.[3]

본 연구에서는 석유에 있는 난분해 황성분의 하나인 Dibenzothiophene(DBT)을 선택하고 이를 유기용매에서 고정화효소를 이용하여 산화시키는 연구를 수행하였다.

이론

Hemoglobin과 같은 Hemoprotein과 hydrogen peroxide에 의한 DBT의 산화반응에 대한 메카니즘이 Natalia L. Klyachko와 공동연구자들에 의해 제시되어졌으며 Fig. 1에 나타나있다. Hydrogen peroxide에 의해 생성되어진 compound I은 DBT와 hydrogen peroxide 사이의 경쟁적인 반응에 의해 진행됨으로써 이러한 산화반응은 DBT, hydrogen peroxide, hemoglobin의 농도에 의존한다.

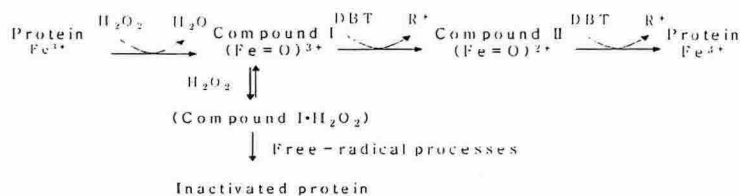


Fig.1 Schematic representation of mechanism of hemoglobin catalased oxidation of dibenzothiophene by hydrogen peroxide.

실 험

본 연구에서 thiophene의 model compound로 사용되어진 dibenzo-thiophene(99%)과 HPLC calibration에 사용되어진 DBT sulfone(97%) 및 Hemoglobin, Cytochrome c, 그리고 Myoglobin은 Aldrich로부터 구입하였다.

Model solution으로는 n-octane, hexadecane 그리고 여러 유기용매를 사용하였으며, 이 용액에 molecular sieve를 넣어 수분을 제거한 다음 150 μ M의 DBT용액을 만들어 실험을 수행하였다. 반응은 실온에서(30 $^{\circ}$ C) 이루어졌고, 다양한 peroxide인 hydrogen peroxide와 t-butyl hydroperoxide, cumene hydroperoxide를 농도별로 혼합한 후 고정화효소를 첨가하여 실험을 진행하였다.

반응분석은 HP-5 capillary column(10m \times 0.53mm)이 부착된 Hewlett-Packard gas chromatograph(HP 5890)와 μ BondapakTM C₁₈ column (3.9 \times 300mm, Waters)이 부착된 HPLC(영인과학, M930)를 이용하여 실시하였다.

GC의 이동상으로는 N₂를 사용하였으며 injector 온도를 250 $^{\circ}$ C, detector(flame photometry detector) 온도를 200 $^{\circ}$ C, column 온도를 초기에 120 $^{\circ}$ C에서 2분 동안 유지시킨 후 300 $^{\circ}$ C까지 10 $^{\circ}$ C/min으로 증가시켰다. HPLC의 이동상으로는 acetonitrile과 distilled water를 6:4의 비율(1ml/min)로 하였으며 column의 온도를 상온으로 하고 검출기로는 UV/VIS detector (M720)가 사용되었다.

결과 및 토론

본 연구에서는 n-octane 및 다양한 유기용매에서 난분해성 황화합물인 DBT를 고정화효소와 다양한 peroxide를 이용하여 상온에서의 산화반응에 대해 검토하였다.

우선 hemoglobin을 여러 가지 고체입자에 코팅시켜 실험을 수행한 결과 크기가 (0.75-1.0mm, 0.125-0.25mm)인 celite를 고정화 물질로 사용하였을 경우, 그리고 cumene hydroperoxide나 t-butyl hydroperoxide를 사용했을 경우 n-octane에서 DBT 제거효율이 우수하였다.(Table. 1)

Celite에 고정화한 hemoglobin을 n-octane 용액에서 반응 후 HPLC 분석결과인 chromatograph를 Fig. 1에 나타내었다. 유출시간이 10분인 DBT의 peak가 cumene hydroperoxide나 t-butyl hydroperoxide를 사용했을 경우 상당량 감소하는 것을 보여주고 있다.

Table. 1 Removal percent of DBT oxidation in n-octane by immobilized hemoglobin on several supports.

고정화 고체입자	hydrogen peroxide	cumene hydroperoxide	t-butyl hydroperoxide
glass beads (150-212 μ m)	0	0	0
silanized glass beads(150-212 μ m)	0	0	0
celite (1/8" rod)	0	32.9	29.1
celite (1.7-2.0mm, 12-10mesh)	8.9	43.0	38.6
celite (0.75-1.0mm, 25-18mesh)	16.5	57.0	49.4
celite (0.125-0.25mm, 120-60mesh)	12.0	53.2	44.9

DBT 제거효율이 가장 좋은 cytochrome c를 celite에 고정화하여 여러 가지 유기용매에서 DBT 산화실험을 수행한 결과를 Fig. 2에 나타내었다. 250mg의 고정화 효소(10mg hemoprotein on 1g solid supports)를 0.15mM DBT 용액 1mL에서 4시간 반응결과 hexadecane, decane, n-octane 등 비극성 유기용매에서 거의 100%의 DBT 제거효율을 얻을 수 있었다.

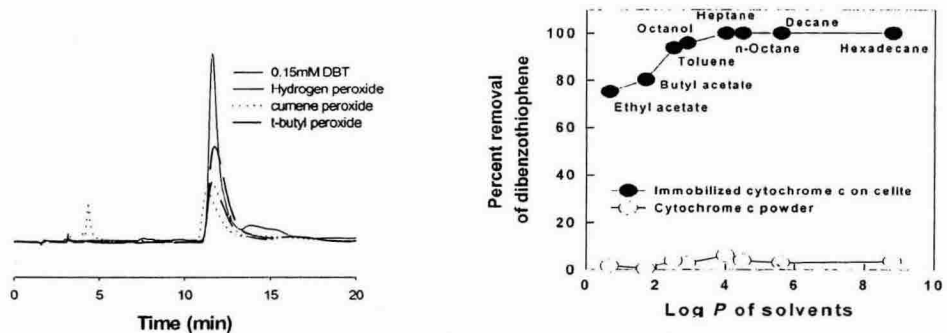


Fig. 2 Oxidation of dibenzothiophene by cumene hydroperoxide catalyzed by immobilized cytochrome c (●) or cytochrome c powder (○) in various anhydrous organic solvents.

Fig. 1 Typical chromatogram for oxidation products of dibenzothiophene by immobilized hemoglobin on celite in n-octane.

참고문헌

- Andrews, G. F. and J. Maceuga, "Bacterial Coal Desulfurization" (1982), *Proc. Biotech. Bioeng. Symp.*, 337-348
- Monticello DJ. "Biodesulfurization and the upgrading of petroleum distillates" (2000). *Current Opinion in Biotechnol* 11, 540-546
- Natalia L. Klyachko and alexandra M. Klibanov, "Oxidation of Dibenzothophene Catalyzed by Hemoglobin and other Hemoproteins in Various Aqueous-Organic Media" (1992), *Biochemistry and Biotechnology*, 37, 53-68