

높은 유상비에서 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8를 이용한
탈황효율의 분석과 5-L 배양기에의 적용

김진홍, 박홍우

한양대학교 화학공학과

전화 (02) 2290-0487, FAX (02) 2299-9496

Abstract

Rhodococcus rhodochrous IGTS8 (ATCC 53968) can break organo sulfur compounds such as dibenzothiophene. Since the environment for biodesulfurization process is invariably hydrophobic, parameters in hydrophobic systems should be examined. For the model oil, hexadecane-containing 5.43mM dibenzothiophene, the volumetric desulfurization rate was decreased with the oil-to-aqueous phase ratio up to 50%. The rate declined sharply after 48h because the cell activity, which is refreshed by medium exchange, was lost. To supply the exhausted nutrients, medium exchange was performed. At 30% oil phase, most of DBT was removed by medium exchange on 48h, and the rate was 2.03mg DBT_{removed}/L_{dispersion}-hr. At 50% oil phase, medium exchange on 60h was performed and the rate was 1.79mg DBT_{removed}/L_{dispersion}-hr. The 300mL flask system was scaled up to a 5-L bioreactor system. On 60 h, a medium exchange was performed and the rate was 5.28mg DBT_{removed}/L_{dispersion}-hr and all of DBT was removed. It means that we can use the biodesulfurization process even in the high oil-to-water phase by some appropriate methods such as controlled feeding of key nutrients and the dilution or removal of some toxic metabolites by continuous reactor.

서론

현재 수소첨가 탈황법은 화석연료중의 황화합물을 제거하기 위한 가장 경제적인 방법이지만, 점차 엄격해지는 황함유량 규제에서 요구되는 고심도 탈황에는 부적합하다. 이로 인해 생물학적 탈황공정을 각국에서 개발중이며, *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, *Gordona* strain CYKS1, *Paenibacillus* sp. Strains A11-1, *Rhodococcus* sp. P32C1, *Rhodococcus erythropolis* KA2-5-1 등의 균주들이 개발되어 상용화에 박차를 가하고 있다. 이러한 균주들은 유기황 중의 황만을 선택적으로 산화시켜 dibenzothiophene (DBT)을 2-hydroxybiphenyl(HBP)과 sulfate로 분해

하는 특성을 갖고 있다. [1, 2] *Pseudomonas alcaligenes* DM220을 이용한 실험에서는 물과 기름의 비율은 탈황속도에 많은 영향을 주었는데 기름의 양이 10%씩 증가할 때마다 탈황속도는 심각하게 감소하였고 기름과 물의 부피비가 1:1이었을 때 탈황반응이 30%로 떨어졌다.[3] *Rhodococcus* sp. IGTS8 (ATCC 53968)을 균주로 하고 배지에 대한 기름의 비율을 25%로 하여 탈황반응을 시킨 실험에서는 첨가된 세포의 양에 따라 1~5mg 2HBP produced/(g dry of biocatalyst·h)의 활성을 보였다.[4] 본 실험에서는 배지에 대한 기름의 비를 최대 50%가 되도록 하여 탈황효율을 떨어뜨리는 원인을 분석하고 이 결과를 5-L 배양기에 적용하여 최대탈황효율을 조사하였는데 배지교환을 이용한 영양물질의 적절한 공급과 배양중 발생하는 독성 물질의 희석을 통해서 탈황효율의 증대를 이룰 수 있었다. 특히 50%의 오일함유비의 5-L배양기의 경우, 배지교환을 하지 않았을 경우 31.3%의 효율을 보이지만 초기 접종세포량을 2배로 증가시킨 경우 75%, 2.5배의 경우 90%, 그리고 3배의 경우 반응 96시간 이후로 5.28mg DBT_{removed}/L_{dispersion}-hr의 탈황속도로 100%의 탈황효율을 달성함을 알 수 있었다. 이들 결과를 바탕으로 상용화를 위한 대용량의 연속식 반응기의 가능성을 알아보려고 한다.

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 medium의 조성은 glucose 10g/L, glycerol 16g/L, KH₂PO₄ 2.44g/L, Na₂HPO₄ 5.57g/L, NH₄Cl 4g/L, MgCl₂·6H₂O 0.4g/L, CaCl₂·2H₂O 0.002g/L, FeCl₂·6H₂O 0.002g/L, MnCl₂·4H₂O 0.008g/L를 사용하였다. DBT를 적정농도로 녹인 hexadecane을 model oil로 사용하였으며 전체 배양액 중 배지에 대한 hexadecane의 부피비가 30%, 50%가 되도록 하였다. DBT와 HBP는 배양액 중 오일상 300 μ L를 ethyl acetate로 5배 희석하여 μ Bondapak C18 steel column(3.9mm \times 150mm, Waters)을 장착한 HPLC로 분석하였다. 당분석은 HPLC를 이용 aminex HPX-87H column(Bio-rad)를 이용하거나 YSI 2700 Dual System을 이용하였고 ammonium의 농도는 ion chromatography(Dionex)로 분석하였다.

결과 및 토론

배지교환의 적정시간대 탐색

Fig. 1에서는 배지교환의 적정시간대를 탐색하기 위해서 30%의 오일 함유비에서 배양 시작후 48시간째와 96시간째에 배지를 교환하고 그때의 탈황효율을 관찰한 결과이다. 오일의 함유비가 10% 근방일 경우에는 탈황반응은 48시간이 되면 대부분 종료되는데 오일 함유비가 점점 증가하면 60시간을 전후해서 탈황반응이 정지한다.

그 원인을 파악하기 위해 DBT나 HBP, sulfate 등을 첨가물로 넣거나 질소원을 강화시켜 주거나 초기접종세포량을 늘리기도 하였다. 이들 실험의 결과로 탈황반응이 정지되는 원인은 오일상 보다는 수상에 있음을 알 수 있었고 이를 확인하기 위해 배양 시작 후 일정시간 후에 배지를 교환하는 실험을 하였다. 배지교환을 통해서 탈황효율의 증대를 확인할 수 있었고 배양 시작 후 48시간째에 배지를 교환해 주는 것이 96시간째에 교환해 주는 것 보다 높은 탈황효율을 보였고 $2.03\text{mg DBT}_{\text{removed}}/\text{L}_{\text{dispersion}}\text{-hr}$ 의 탈황속도를 얻었다.

여러 번의 배지교환을 통한 세포의 탈황 활성유지 여부 확인

Fig. 2는 50%의 오일 함유비에서 60시간마다 계속해서 배지교환을 해준 결과를 나타내었다. 이 실험은 세 가지 경우로 나누어서 실험하였는데, 배지의 경우는 모두 교환을 해주되 전체의 오일을 새 오일로 완전히 교환해준 경우, 반은 새 오일 그리고 나머지 반은 60시간동안 반응시킨 오일을 다시 쓰는 경우, 그리고 오일은 교환하지 않고 배지만을 새로운 배지로 교환한 경우 이렇게 세 가지 경우에 대해서 실험을 하였다. 오일을 교환하지 않고 배지만을 교환한 경우 최고 65% 이상의 탈황효율과 $1.79\text{mg DBT}_{\text{removed}}/\text{L}_{\text{dispersion}}\text{-hr}$ 의 속도를 보였고 배지교환을 두 차례 해 준 이후에도 탈황능이 계속 유지되는 것을 알 수 있었다.

특정 영양분의 결핍에 의한 탈황능의 변화

배지교환을 해 주었을 때 탈황의 활성이 다시 회복되는 원인이 새로운 영양분의 공급에 있다면, 어떤 영양분이 탈황능을 회복하는데 가장 필수 적인지를 확인하기 위해서 특정 영양분이 결핍된 배지를 이용하여 60시간이후 배지교환을 해 주었다. 배양시작 시에는 모든 영양분이 첨가된 배양액을 이용하여 배양을 시작하여 60시간 이후에는 탄소원, 질소원, 인, 무기염류 그룹이 각각 제거된 배지를 이용 배지교환을 실시하였다. Fig. 3에 각각의 결과를 나타내었는데, 특히 질소원이 제거된 배지로 배지교환을 하였을 경우 배지교환을 하지 않은 경우와 마찬가지로 탈황반응이 즉시 정지함을 알 수 있었다. 따라서 기존의 배지에서 배양시 질소원이 부족하였고 지속적인 질소원의 공급이 탈황의 활성유지에 영향을 미침을 확인하였다.

독성물질의 희석에 의한 탈황능의 변화

Table 1에 배지의 희석율과 그에 따른 실험결과를 나타내었다. 새 배지와 48시간 배양 후의 배지를 섞은 배지(set #2-#4)로 교환하여 독성물질의 희석을 최소화하면서 영양물질공급에 의한 영향을 확인하고, 인산완충액과 배양 후의 배지를 섞은 배지(set #5-#8)로 영양물질의 추가 없이 배지의 독성물질을 희석함으로써 독성물질에 의한 영향을 확인하였다. 질소원이 제거된 배지로는(set #9) 세포의 성장을 멈추게 한 후 탈황효율을 보기 위함이었으며, 세포의 성장을 멈추게 하면서 에너지원은 공급해주어 탈황효율을 관찰한 실험(set #10)은 에너지원의 고갈이 탈황저해의 원인인지 확인하기 위한 실험이었다. 탄소원과 질소원이 새로 추가되지 않는 경우(set

#5-#10)는 탈황반응이 배지교환 후 거의 진행되지 않거나 미약한 수준을 보였다. 따라서 영양분의 추가에 의한 세포의 성장이 탈황반응과 밀접한 관계가 있으며 배지교환을 적당한 간격으로 실시해 주거나 연속식 공정을 사용할 경우 독성물질에 의한 영향은 거의 없을 것으로 예측할 수 있다.

5-L 배양기에서의 배지교환과 초기세포접종량의 변화에 따른 탈황능의 변화

5-L 배양기를 통해 배지교환을 하지 않았을 경우 플라스크 배양에서와 마찬가지로 48시간째에 탈황효율이 정지되고 그 효율도 30%정도에 그쳤다. 그러나 배지교환을 이용한 새로운 영양분의 공급에 따른 탈황효율을 알아보기 위해 50%의 오일 함유비의 5-L 배양기에서 60시간마다 배지교환을 해주면서 초기접종세포량을 2배, 2.5배, 그리고 3배로 늘리면서 각각의 실험을 실시하였다. Fig. 4와 Fig. 5에 DBT의 분해량과 배양시의 glucose, glycerol 그리고 ammonium의 소모량을 나타내었다. 배지교환을 하지 않았을 경우 31.3%의 효율을 보이지만 2배의 경우 75%, 2.5배의 경우 90%, 그리고 3배의 경우 반응 96시간 이후로 100%의 탈황효율을 보였다. 초기접종세포량이 많을 경우 배양 초기에 세포의 증가 속도가 빨라서 훨씬 빠른 속도로 최대 세포량에 도달하고 그 사이에 더 많은 양의 탈황효소를 발현시켜 효소와 기질이 접하는 시간이 더 길어지기 때문에 탈황효율이 증가한 것으로 생각된다. 영양물질의 소모 측면에서도 배양시작후 20시간, 그리고 배지교환 후인 80시간을 전후해서 탈황속도가 급격히 증가하고 그 순간 많은 탄소원과 질소원이 소모되고 이로 인해 60시간과 120시간째에 탈황속도가 완만해지는 원인이 바로 영양물질의 고갈에 있음을 확인할 수 있다.

참고문헌

1. M. Kishimoto, M. Inui, T. Omasa, Y. Katakura, K. Suga, K. Okumura, Efficient production of desulfurizing cells with the aid of expert system,(2000), J. Biochem. Eng. 5 143-147
2. S. Maghsoudi, M. Vossoughi, A. Kheiriloom, E. Tanaka, S. Katoh, Biodesulfurization of hydrocarbons and diesel fuels by Rhodococcus sp. strain P32C1,(2001), J. Biochem. Eng. 8 151-156
3. Hartdegen, F. J., Coburn, J. M., Roberts, R. L., Grace, W. R., Microbial desulfurization of petroleum,(1984), Chem. Eng. Process. 80, 5, 63-67,
4. Kaufman, E. N., Harkins, J. B., Borole, A. P., Comparison of batch-stirred and electro-spray reactors for biodesulfurization of dibenzothiophene in crude oil and hydrocarbon feedstocks,(1998), Appl. Biochem. Biotechnol. 73, 127-143,

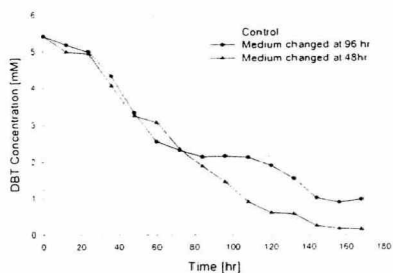


Fig. 1 Effects of medium change on DBT removal at 30% oil phase: control (○); medium change at 48h (●); medium change at 96h (▲).

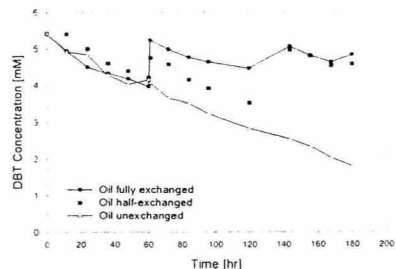


Fig. 2 Effects of medium exchange on DBT removal at 50% oil phase: oil fully exchanged (●); oil half exchanged (■); oil no exchanged (△)

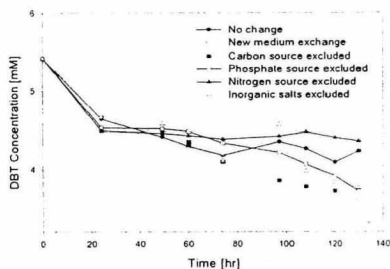


Fig. 3 Effects of the different nutrients after medium change; no change (●); new medium exchange (○); carbon source excluded (■); phosphate source excluded (□); nitrogen source excluded (▲); inorganic salt excluded (△).

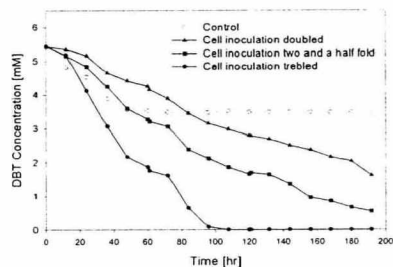


Fig. 4 Effects of medium change at different initial cell inoculation conc. in 5-L bioreactor; control (○); cell inoculation doubled (▲); cell inoculation two and a half fold (■); cell inoculation trebled (●).

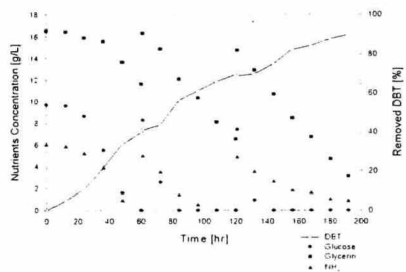


Fig. 5 Nutrients consumption in 5-L bioreactor: removed DBT concentration (○); glucose consumption (●); glycerol consumption (■); ammonium consumption (▲).

Table 1. Effects of medium dilution with fresh medium or other solutions

Set #	Medium for exchange	Desulfurization efficiency for 48h (%)	Desulfurization efficiency for 156h (%)
1	A 100%	15.2	29.6
2	A 80% + B 20%	15.8	33.5
3	A 50% + B 50%	18.0	38.7
4	A 20% + B 80%	16.9	36.5
5	A 80% + C 20%	18.0	31.2
6	A 50% + C 50%	16.1	25.9
7	A 20% + C 80%	15.4	22.0
8	C 100%	15.9	18.8
9	basal mineral medium without nitrogen source	18.2	24.5
10	phosphate buffer with carbon source	17.8	20.6