

## 황산염 환원세균에 의한 Dibenzothiophene, 원유 및 Bunker C 유의 탈황

김해영 · 김태성 · 김병홍\*

한국과학기술연구원 유전공학센터

### Degradation of Dibenzothiophene, and Desulfurization of Crude Oil and Bunker C Oil by Sulfate Reducing Bacteria

Kim, Hae-Yeong, Tae-Sung Kim and Byung-Hong Kim\*

Genetic Engineering Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 130-650, Korea

Dibenzothiophene, crude oil and bunker C oil were used in the microbial desulfurization experiments using thermophilic and mesophilic strains of *Desulfovibrio* and *Desulfotomaculum*. Mesophilic *Desulfovibrio desulfuricans* M6 showed the degrees of sulfur removal about 42% and 17% from dibenzothiophene and crude oil, respectively. Thermophilic *Desulfovibrio thermophilus* showed the degrees of sulfur removal about 68% and 33% from dibenzothiophene and bunker C oil. The strains of *Desulfotomaculum* were much less efficient than strains of *Desulfovibrio*. The latter have more complex and stronger hydrogen metabolism. These results showed that desulfurization is closely related to the hydrogen metabolism of the sulfate reducing bacteria.

미생물을 이용한 석유 중 유황화합물의 제거 가능성에 대해 지난 40여년 전부터 연구되어 왔다. 호기적 미생물을 이용한 석유의 탈황연구에서 *Pseudomonas* (1, 2), *Sulfolobus* (3), *Beijerinckia* (4), *Bacillus* (5) 속 에 속하는 세균들이 thiophene 계열 화합물의 탄소-탄소 결합을 분해하여 수용성 유기 유황화합물로 전환하기 때문에 이들을 석유의 탈황에 이용할 수 있다는 많은 보고가 있다(6-8).

그러나 이들 균주들을 이용하는 탈황방법은 탄소-유황 결합을 분해하지 않고 탄소-탄소 결합을 분해함으로써 처리하는 도중에 열량 손실이 일어나며, 휘발성이고 발화점이 낮은 석유에 산소를 공급하는 것이 위험하므로 호기성 균을 이용하는 석유의 탈황공정은 문제가 있다. 반면 혐기성 상태에서 석유의 탈황에 관한 연구 결과는 많지 않다. Zobell(9)은 혐기성 상태에서 수소를 공급해 줄 때 원유에 존재하는 세균의 작용으로 유

황성분이 mercaptane 이나 H<sub>2</sub>S로 전환된다는 가설과 함께 여기에 hydrogenase가 수소를 활성화시켜 유황화합물의 유황에 작용한다고 보고하였다.

한편 Kurita(10) 등은 유기 유황화합물을 분해하는 균을 원유 저장탱크 sludge에서 순수분리하고 탈황 과정에서 수소가 존재할 때 전자 전달체로서 methyl viologen의 필요성을 발표하였다. 그리고 Koehler(11) 등은 표준 유기 유황물질로 dibenzylsulfide을 수소와 methyl viologen 존재하에 황산염 환원세균을 사용하여 H<sub>2</sub>S와 benzyl mercaptane의 형태를 검출하여 탄소와 유황결합의 분해 가능성을 입증하였다. 이와 같은 표준 유기 유황성분의 분해와 함께 석유의 총 유황성분들의 분해도 증명되었다.

Eckart(12) 등은 황산염 환원세균, micrococci, bacilli 및 clostridia 등이 포함된 혼합 배양균을 사용하여 수소 존재하에 석유의 유황성분을 40% 까지 분해시켰다고 발표하였다. 지금까지 혐기성 조건에서의 탈황 연구는 일정한 황산염 환원세균을 사용하여 표준 유기 유황성분의 분해 및 석유의 총 유황성분 감량을 측정하

Key words: Petroleum desulfurization, *Desulfovibrio*, sulfate-reducing bacteria, thermophilic.

\*Corresponding author

었다. 그러나, 이와 같은 방법에서는 균주 종류에 대한 탈황 능력의 특성은 고려되지 않았다. 그러므로 본 연구에서는 원유 및 Bunker C유와 함께 분해기작이 밝혀진 (13) dibenzothiophene 을 사용하여 균주 종류에 따른 탈황 정도를 측정하여 황산염 환원세균에 의한 탈황 가능성을 조사하였다.

## 재료 및 방법

### 사용균주 및 시약

본 연구에 사용된 균주는 분리균주인 *Desulfovibrio desulfuricans* M6, KCTC 2740(13)과 표준균주로 *Desulfovibrio thermophilus* KCTC 2482, *Desulfotomaculum nigrificans* KCTC 1909, *Desulfotomaculum orientis* KCTC 3198, *Desulfotomaculum ruminis* KCTC 3183 을 사용하였으며, 사용한 시약은 모두 시약급으로 유기 유황화합물인 dibenzothiophene 은 Aldrich 사, 전자 매개체로 사용된 methyl viologen 은 Sigma 사, 추출용매인 *n*-butanol 은 Merck 사로부터 구입하여 사용하였다. 산유지별 원유 및 Bunker C 유는 경인에너지, 호남정유로부터 분양받아 본 실험실에서 유황함량을 측정하여 사용하였다(Table 1).

### 배지 및 반응조건

실험에 사용된 황산염 환원세균들은 Table 2 와 같은 배지 조성으로 혐기적으로 제조하여 중온균인 *Desulfovibrio desulfuricans* M6 은 30°C, *Desulfotomaculum orientis*, *Desulfotomaculum ruminis* 는 35°C, 고온균인 *Desulfotomaculum nigrificans* 는 55°C, *Desulfovibrio thermophilus* 는 60°C에서 3일간 배양하여 사용하였다.

탈황실험에 사용한 반응액으로 Sulfate-free me-

**Table 1. Sulfur content of crude oils used.**

Oils	Sulfur content (%)
Iranian light crude	1.53
Ras-Budran crude	2.37
Basrah crude	2.42
Oman crude	1.15
kuwait crude	3.15
Dubai crude	2.08
Bunker C	3.27

**Table 2. Postgate's medium C for sulfate reducing bacteria.**

Medium	g/l
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.5
NH <sub>4</sub> Cl	1
Na <sub>2</sub> SO <sub>4</sub>	4.5
CaCl <sub>2</sub> ·6H <sub>2</sub> O	0.06
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.06
Sodium lactate	6
Yeast extract	1
FeSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.004
Sodium citrate 2H <sub>2</sub> O	0.3

Distilled water 1 liter, pH 7.5

dium C (medium C에서 Na<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>를 제외한 배지) 64.1 ml, dimethyl formamide 에 녹인 2% dibenzothiophene 용액 3.5 ml, 70 ml 황산염 환원세균 세균 농축액 1.0 ml 과 전자전달체인 100 mM methyl viologen 1.4 ml 을 혼합한 용액 70 ml 을 150 ml serum vial 에 넣고 사용하였다. 원유 및 Bunker C 유의 반응액은 Sulfate-free medium 과 원유 및 Bunker C 유의 비율을 1:1 로 사용하였다. 환원력을 공급하기 위해 반응액의 headspace 는 H<sub>2</sub>로 채웠으며, 30°C에서 6 일간 반응시켰다.

### 유황성분의 분석

6 일간 반응 후 반응액 2 ml 을 syringe 로 뽑아낸 후, 동량의 *n*-butanol 로 추출하여 flame ionization detector 를 장치한 Varian 3700 gas chromatograph (Varian Associates, Inc., Sunnyvale, CA) 를 사용하여 분석하였다. 시료 분석에 10% OV 101 chromosorb W-HP 를 충전한 glass column (4 m×2 mm) 을 사용하였으며, injector 온도는 220°C, detector 온도는 250°C, column 온도는 200°C, carrier gas 는 질소로 20 ml/min 의 유속으로 사용하였다. 원유 및 Bunker C 유는 oxygen-bomb calorimeter (Parr Instrument Co., Moline, IL) 를 사용하여 반응 후의 시료를 증류수로 2 회 씻어낸 후 bomb 내에 시료 0.6-0.7g, 5% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액 5 ml 과 30-35 Kg/cm 의 산소를 압입하여 연소시킨 후, 10% BaCl<sub>2</sub> 용액을 부가하여 BaSO<sub>4</sub> 침전물을 형성시켜 건조하였다. 건조된 시료 중 무기형태의 시료만을 얻기 위해 800°C의 전기로에서 회화한

**Table 3. Reductions in sulfur contents of crude oils through the action of *Desulfovibrio desulfuricans* M6.**

Crude oils	Desulfurization (%)
Iranian light crude	10
Ras-Burdan crude	5
Basrah crude	6
Oman crude	10
Kuwait crude	17
Dubai crude	16

후, 3회 평량하여 그 평균값을 총 유황성분으로 구하였다.

**결과 및 고찰**

***Desulfovibrio desulfuricans* M6에 의한 원유 종류별 탈황**

토양에서 순수분리한 황산염 환원세균인 *Desulfovibrio desulfuricans* M6을 이용하여, 산유지에 따라 1.15%에서 3.15%까지 유황함량이 다른 원유 시료를 분양받아 탈황실험을 하였다. 원유의 종류에 따라 5-16%의 탈황 정도가 다르게 측정되었다(Table 3).

원유는 산지에 따라 유황함량이 서로 다를 뿐 아니라 유황화합물의 구조도 서로 다른 것으로 알려져 있다. 일반적으로 저유황 원유(유황함량 1.6% 이하)보다 유황함량이 높은 고유황 원유(유황함량 3.0% 이상)에서 분해율이 높은 경향을 보였다. Ras-Burdan 및 Basran 산 원유의 유황함량은 2.0% 이상이었으나 탈황 정도는 6%로 매우 낮았다. 이처럼 분리균 *Desulfovibrio desulfuricans*의 유기 유황성분을 분해하는 능력이 원유의 산지에 따라 다른 것은 원유의 유기 유황성분 중에서 쉽게 분해되는 형태와 잘 분해되지 않는 형태가

**Table 4. Degradation of dibenzothiophene and organic sulfur compounds of kuwait crude oil by mesophilic sulfate reducing bacteria (SRB).**

SRB strains	DBT degradation (%)	Decrease in sulfur content from crude oil (%)
<i>Desulfovibrio desulfuricans</i> M6	42	16
<i>Desulfotomaculum ruminis</i>	2	2
<i>Desulfotomaculum orientis</i>	6	8

있기 때문으로 판단된다.

**중온성 황산염 환원세균에 의한 Dibenzothiophene (DBT) 및 원유의 분해**

석유의 유황성분 중 많은 부분이 DBT 유도체로 존재하므로 일반적으로 탈황 연구에서 DBT를 표준물질로 사용하고 있으며, DBT가 황산염 환원세균에 의해 탄소-유황 결합이 분해되어 biphenyl이 생성됨이 확인되었다(13). 황산염 환원세균 중에 *Desulfovibrio*속 세균은 황산염 환원반응을 통해 protonmotive force를 형성하여 ATP를 합성하는 혐기적 호흡작용을 갖고 있으나 *Desulfotomaculum*속에 속하는 세균은 황산염 환원반응이 ATP 합성에 연결되지 않으며, 이 때문에 *Desulfovibrio*속 세균의 hydrogenase 활성이 훨씬 높은 것으로 알려져 있다(14-16). 이같이 다른 생리적 특성을 갖는 세균의 유기 유황화합물의 분해 정도를 측정하기 위해 DBT와 원유를 사용하여 유황화합물의 분해 정도를 측정하였다(Table 4). 토양에서 분리한 균주인 *Desulfovibrio desulfuricans* M6을 이용한 경우 DBT와 원유 중의 유기 유황화합물의 분해율이 각각 42%, 17%이었으며 *Desulfotomaculum ruminis*의 경우 각각 2%, 2%, *Desulfotomaculum orientis*의 경우 각각 6%, 8%의 낮은 분해율을 보였다. 이러한 결과는 유기 유황화합물 분해가 황산염 환원에서 ATP를 합성하는 hydrogen cycling 기작에 필요한 높은 hydrogenase 활성을 갖는 *Desulfovibrio*속 세균의 특이한 작용임을 나타낸다.

**고온성 황산염 환원세균에 의한 DBT 분해 및 Bunker C 유 탈황**

전 실험결과 중온성 SRB에 의한 유기 유황성분의 분해는 *Desulfovibrio*속에 속하는 세균의 특징적 작용으로 밝혀졌다. 고온성 SRB로 *Desulfovibrio thermo-*

**Table 5. Degradation of dibenzothiophene and organic sulfur compounds of bunker C oil by thermophilic sulfate reducing bacteria.**

SRB strains	DBT degradation (%)	Decrease in sulfur content from bunker C oil (%)
<i>Desulfovibrio thermophilus</i>	68	33
<i>Desulfotomaculum nigrificans</i>	12	5

**Table 6. Degradation of dibenzothiophene and organic sulfur compounds from Kuwait crude oil by *Desulfovibrio desulfuricans* M6 with H<sub>2</sub> and N<sub>2</sub> head space.**

Head space gas	DBT degradation (%)	Decrease in sulfur content from Kuwait crude oil (%)
H <sub>2</sub>	42	16
N <sub>2</sub>	>1	1

*philus* 와 *Desulfotomaculum nigrificans* 가 알려져 있다. 이들을 이용하여 DBT 및 Bunker C 유의 탈황 실험을 실시하였다 (Table 5).

*Desulfovibrio thermophilus* 를 이용한 경우 DBT 및 Bunker C 유 중의 유기 유황 분해율이 각각 68%, 33% 이었으며, *Desulfotomaculum nigrificans* 의 경우 각각 12%, 5% 의 낮은 분해율을 나타내었다. 이러한 결과 (Table 5) 는 중온성 황산염 환원세균을 이용한 전 실험결과에서와 같은 경향이다.

#### 수소가 Dibenzothiophene 과 원유의 유기 유황성분의 분해에 미치는 영향

Hydrogenase 의 활성이 강한 SRB 인 *Desulfovibrio desulfuricans* M6 가 유기 유황화합물을 분해할 때 수소의 영향을 조사하기 위해 headspace 를 질소로 채운 실험구와 수소로 채운 구를 비교하였다 (Table 6). 표에서 보는 바와 같이 질소를 공급했을 때는 유기 유황 성분이 거의 분해되지 않았다.

이상의 결과 *Desulfovibrio* 속 세균은 환원력이 공급되면 유기 유황화합물을 H<sub>2</sub>S 로 환원하는 능력을 보유하고 있음을 알 수 있다. 이러한 성질을 석유의 탈황에 이용하기 위해 수소를 공급보다 간편한 환원력 공급 방법과 탈황 능력이 강력한 SRB 의 분리가 이루어져야 할 것으로 생각된다.

#### 요 약

중온성과 고온성인 황산염 환원세균들을 사용하여 dibenzothiophene, 원유 및 Bunker C 유의 탈황

실험을 하여 중온성인 분리균주 *Desulfovibrio desulfuricans* M6 는 dibenzothiophene, crude oil 를 42%, 17% 까지 탈황시켰으며, 고온성은 *Desulfovibrio thermophilus* 에서 dibenzothiophene, Bunker C 유를 각각 68%, 33% 탈황시켜, 황산염 환원세균에 의한 석유의 탈황 가능성을 보였다. 또한 *Desulfovibrio* 속과 *Desulfotomaculum* 속의 탈황 능력의 차이로부터 탈황 기작이 hydrogenase 와 환원력 원인 수소가 관련이 있다는 것을 알았다.

#### 참고문헌

- Kodama, K., S. Nakatani, K. Umehari, K. Shimizu, Y. Minoda and K. Yamada: *Agr. Biol. Chem.* **65**, 10 (1975).
- Hou, C.T. and A.I. Laskin: *Dev. Ind. Microbiol.*, **17**, 351 (1976).
- Kargi, F. and J.M. Robinson: *Biotech. Bioengin.* **26**, 687 (1984).
- Alice, L.L. and D.T. Gibson: *Appl. Environ. Microbiol.* **34**, 783 (1977).
- Kopacz, E.P.: U.S. Patent 4,632,906 (1966).
- Malik, K.A.: *Process Biochem.*, **13**, 10 (1978).
- Hartdegen, F.J., J.M. Coburn and R.L. Roberts: *Chem. Eng. Process* **80**, 63 (1984).
- Finnerty, W.R. and M. Robinson: *Biotech. Symp.*, **16**, 205 (1986).
- Zobell, C.E.: U.S. Patent 2,641,564 (1953).
- Kurita, S., T. Endo, H. Nakamura, T. Yagi and N. Tamia: *J. Gen. Appl. Microbiol.*, **17**, 185 (1971).
- Koehler, M., I. Genz, B. Schicht and V. Eckart: *Zbl. Mikrobiol.*, **139**, 239 (1984).
- Eckart, V., M. Koehler and W. Hieke: *Zbl. Mikrobiol.*, **141**, 291 (1986).
- Kim, B.H., T.S. Kim and H.Y. Kim: MOST Technical Repoert., **90** (1988).
- Odom, J.M. and H.O. Peck: *Ann. Rev. Microbiol.*, **141**, 291 (1986).
- Lupton F.S., R. Conard and J.G. Zeikus: *J. Bacteriol.*, **159**, 843 (1986).
- Liu, C.L., N. Hart and H.D. Peck: *Science* **217**, 363 (1982).

(Received December 18, 1989)