

계면활성제가 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8에 의한 dibenzothiophene의 탈황에 미치는 영향

김 충 식 · 백 기 태 · 신 현 재 · 이 현 호 · 양 지 원

한국과학기술원 화학공학과

¹생명공학연구소 분자당생물학 R.U.

(접수 : 1999. 4. 10., 게재승인 : 1999. 5. 24.)

Influence of Surfactant on Biodesulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* IGTS8

Choong-Sik Kim, Kitae Baek, Hyun-Jae Shin¹, Hyun-Ho Lee, and Ji-Won Yang[†]

Dept. of Chemical Engineering, KAIST, Taejeon, 305-701, Korea

¹Molecular Glycobiology R.U., KRIBB, P.O. Box 115 Yusong, Taejeon, 305-600, Korea

(Received : 1999. 4. 10., Accepted : 1999. 5. 24.)

During the biodesulfurization of dibenzothiophene to 2-hydroxybiphenyl by *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, a surfactant-like substance was secreted into the medium resulting in the decrease of the surface tension of the medium. Due to the substance, the optical density (at 600 nm) of the medium had no co-relation with dry cell weight during cultivation. The growth rate of IGTS8 increased by the addition of 1 % Tween 80, but it was inhibited over Tween 80 concentration of 2 % (v/v).

Key word : *Rhodococcus erythropolis* IGTS8, dibenzothiophene (DBT), desulfurization, surfactant

서 론

석탄을 대체에너지로 이용하고자 하는 관심이 지속되면서 세계적으로 석탄의 생물학적 탈황에 관한 연구가 활발히 진행되어 왔다(1-4). 생물학적 석탄 탈황에 사용되는 미생물은 *Thiobacillus* sp., *Sulfolobus* sp., *Pseudomonas* sp., *Rhodococcus* sp.(5-6) 등이 있으며, 이 외에도 석유의 생물학적 탈황과 연계되어 지속적인 탐색이 이루어지고 있다. 석탄에 포함되어 있는 황은 크게 유기황과 무기황으로 구분되며, 이중 무기황은 생물학적 처리방법으로 90% 이상 제거된다고 보고되고 있다(7-8). 무기황과는 달리 제거가 매우 어려운 유기황 제거 연구에는 일반적으로 dibenzothiophene (DBT)을 모델화합물로 이용하고 있다(7,9). DBT는 석탄 내에 가장 많이 존재하는 thiophene 형태의 유기황을 대표한다고 볼 수 있으며, 또 많은 경우에 DBT 탈황능을 갖는 미생물의 경우, 정도의 차이는 있지만 유사한 형태의 유기황 구조에 대해서도 탈황능을 보인다는 보고가 있다(6,10-11). 또한 DBT 이외에도 dimethyl sulfide (DMS), benzyl methyl sulfide (BMS), thiophene 등이 유기황의 모델화합물로 사용될 수 있다(2,8,12). 일반적으로 탈황미생물의 성장과 황화합물의 분해는 비례하는 것으로 알려져 있으며

이 상관관계에서 미생물의 농도 수치는 실험의 편이성 등의 이유로 미생물의 건조중량 (DCW) 대신에 탁도 (O.D. at 600 nm)를 사용한다(11,13-14). 본 연구자들은 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8 (이전에는 *R. rhodochrous* IGTS8로 명명됨, 이하 IGTS8)에 의한 석탄의 생물학적 탈황을 연구하는 과정에서 특정 농도 이상이 되면 미생물 배양액의 탁도가 미생물 DCW와 무관하게 증가함을 발견하였다. 이는 IGTS8이 황원을 이용하기 위해 세포의 계면활성제를 분비하여 배양액의 탁도를 급격하게 증가시키기 때문인 것으로 추측되었다. 본 단보에서는 IGTS8이 DBT를 분해하는 과정에서 계면활성제를 분비하는 사실을 확인하고 인위적인 계면활성제의 첨가가 미생물의 성장 즉 DBT의 분해에 미치는 영향에 대해 고찰하였다.

재료 및 방법

실험재료

실험에 사용된 황화합물로는 dibenzothiophene (DBT), phenyl sulfide, diphenyl sulfide, propyl sulfide, thiophenol, tetrahydrothiophene (Sigma, USA) 등을 사용하였으며, GC 분석을 위한 내부표준물질은 2,6,10,14-tetramethylpentadecane (Aldrich, USA)을 사용하였다. 화학 계면활성제 Tween 80은 일본 Shinyo Pure Chemicals 사의 제품을 사용하였다.

균주

DBT 분해 균주인 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8은

[†] Corresponding Author : Dept. of Chemical Engineering, KAIST, Yusong, Taejeon, 305-701, Korea
Tel : 042-869-3924, Fax : 042-869-3910
e-mail : jwyang@kaist.ac.kr

American Type Culture Collection에서 분양받았다 (ATCC 53968). 동결건조된 균주는 배지에 적응시킨후 사면배지로 옮겼고, 이를 30°C 조건에서 배양시키고 4주에 한번씩 계대 배양하였다. IGTS8의 배지로는 BSM(basal salt medium)을 사용하였다(1). BSM의 조성은 KH_2PO_4 2.44 g/L, $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 14.05 g/L, NH_4Cl 2 g/L, $\text{MgCl}_2 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ 0.2 g/L, $\text{CaCl}_2 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$ 0.001 g/L, FeCl_3 0.0006 g/L이며 탄소원으로는 glycerol 4 ml/L을 사용하였다. 초기 DBT의 농도는 5 g/L의 농도로 일정하게 유지하였다. 특히 DBT는 불용성이기 때문에 에칠알코올에 녹여서 이를 배지에 공급하는 방법을 사용하였다. 전배양 배지는 영양완전 배지에서 72시간 배양한 후, 단독 콜로니를 500 mL Erlenmeyer flask에 접종하였다. IGTS8의 배양 온도는 30°C, 교반속도는 200 rpm 의 회전식 진탕기에서 24시간 배양한 후 본 배지에 접종하였다. 500 mL의 Erlenmeyer flask에 100 mL의 배지를 접종하였으며, seed 배양과 동일한 온도와 교반속도로 shaking incubator에서 3-5일간 배양하였다.

실험 방법

DBT 및 그 분해산물인 2-hydroxybiphenyl (2-HBP)의 정성 및 정량 분석을 위해 GC-MSD(HP 5890 series II, USA)를 사용하였다. 이동기체로는 헬륨을 사용하였으며, 분석 조건으로 초기온도는 180°C, 초기시간은 2 min, 온도 증가 속도는 5°C/min, 최종온도는 250°C, 최종 시간은 3 min, interface 온도는 280°C로 하여 분석하였다. IGTS8이 분해하는 계면활성물질에 의한 표면장력의 감소는 생명공학연구소내의 Digital Tensionmeter K10ST (KRUSS, FRG)를 이용하여 측정하였다. 미생물의 성장을 측정하기 위해서 spectrophotometer (HP 8452A, USA)를 이용하여 600 nm에서 탁도 (O.D.)를 측정하였으며, 배지와 미생물을 함께 원심분리 한후 침강된 균체를 증류수로 2회 세척하여 건조하고 건조중량 (DCW)을 측정하였다. 계면활성제가 DBT 분해에 미치는 영향을 확인하기 위하여 화학 계면활성제 Tween 80을 배지에 1% (v/v), 2% (v/v)의 농도로 첨가한 후 미생물의 성장을 관찰하였다.

결과 및 토의

미생물 성장과 DBT 분해

접종에 사용할 미생물의 전배양 결과 24시간 경과 후 미생물 농도가 지수 증식이 말기에 도달하였으며 이를 전배양 시간으로 결정하였다. Figure 1에서 알수 있듯이 미생물의 성장과 DBT의 분해는 동시에 일어나며 미생물의 DCW와 DBT의 분해는 정비례하였다(Figure 1). 또한 DBT 분해의 결과물로는 GC-MSD 분석을 통하여 2-HBP가 생성됨을 확인할 수 있었다(Figure 2). 이러한 결과를 통해 IGTS8이 자신의 증식을 위해 DBT로부터 황을 유리해 이용하여 탈황 결과물로 2-HBP를 생성함을 알 수 있다.

계면활성물질의 분비

석탄 내에 존재하리라 예상되는 유기황 화합물인 phenyl sulfide, diphenyl sulfide, propyl sulfide, thiophenol, tetrahydrothiophene을 200ppm 농도를 기준으로 첨가하여 미생물의 성장 및 분해능을 확인하였다. 이 황화합물들은 용해도가 매우 낮

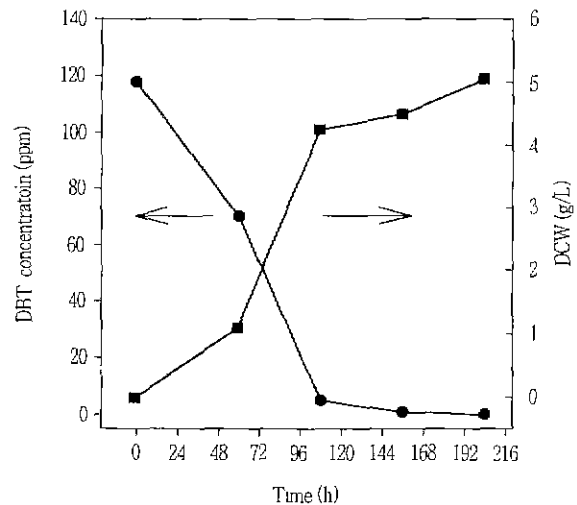


Figure 1. Time profile of cell growth and concentration of DBT

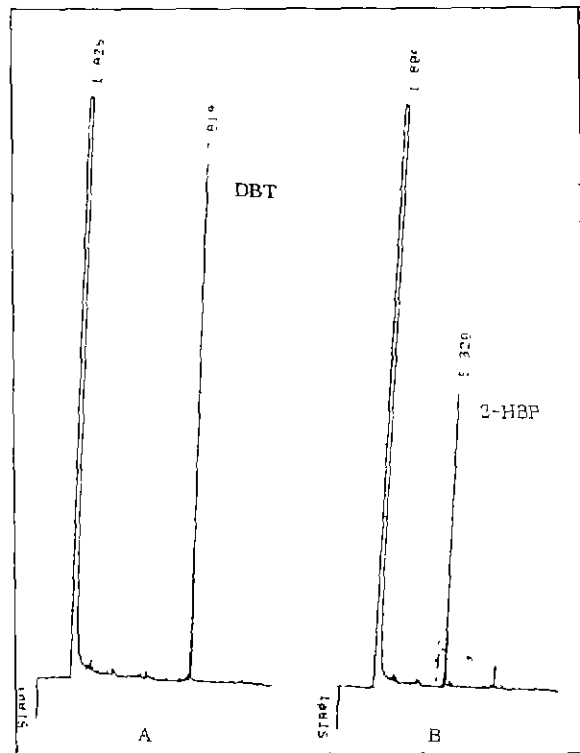


Figure 2. GC-MSD analysis of DBT degradation by *R. erytropolis* IGTS8. A : before reaction, B : after reaction.

아 배지에 첨가하기 전에 에칠알코올에 용해시켰으며, 황화합물이 첨가된 후 배지의 탁도가 0.2 (O.D.₆₀₀) 상승하는 현상이 관측되었다. 이는 황화합물이 불용성 입자 상태로 존재하기 때문으로 추측된다. 미생물의 성장을 확인하기 위해 탁도와 DCW를 각각 별도로 측정하였다. 낮은 미생물 농도에서는 탁도가 증가함에 따라 DCW도 증가하는 경향을 보이나 탁도 6 이상에서는 두 수치 사이의 심한 차이를 보였다 (data not shown). 이러한 현상은 실험에 사용된 모든 황화합물의 경우에 공통적으로 나타

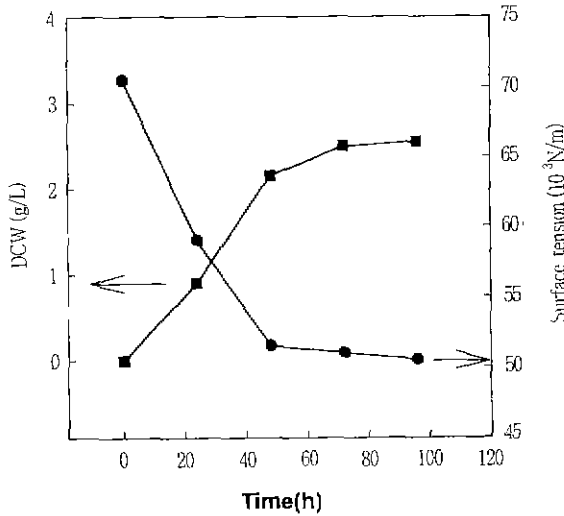


Figure 3. Time profile of cell growth and surface tension of medium. The concentration of DBT was 50 ppm

났으며, 특히 propyl sulfide의 경우가 두 결과 사이에 가장 큰 차이를 나타내었다. 이는 첨가된 황화합물의 종류에 따라 미생물이 분비하는 계면활성물질의 양이 달라지고, 이에 따라 배지의 탁도가 증가하였기 때문이라고 추측된다. 또한 계면활성물질이 분비되는 것을 확인하기 위해 미생물의 성장에 따른 배지의 표면장력을 측정하였는데, 배양시간이 증가함에 따라 표면 장력이 감소하는 것이 확인되었다 (Figure 3) 배지의 표면 장력의 감소는 미생물에 의한 계면활성물질의 분비를 암시하며 미생물은 성장에 필요한 황원을 보다 쉽게 이용하기 위하여 계면활성물질을 만든다고 추측할 수 있다. 이러한 현상은 불용성 기질을 사용하는 미생물의 배양에 있어서 나타나는 일반적인 현상이며 최근에 Kaufman 등(15)도 유사한 보고를 한바 있다. 이러한 계면활성제의 일종으로, *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80이 생산하는 당지질계 생물유래 계면활성제의 구조가 밝혀지기도 했다(16). 한편 계면활성물질을 생산하는 것은 미생물의 성장에 필요한 에너지가 다른 곳에 사용됨을 의미하기도 한다. 무기황인 SO₄²⁻만을 배지에 공급하면 계면활성물질의 분비가 없으며 DBT만을 황원으로 공급할 때보다 미생물의 성장속도가 더 빠른 것을 확인할 수 있었다 (data not shown). 이는 IGTS8에 의해 무기황이 DBT보다 더 쉽게 이용될 수 있으며, 계면활성제의 생산에 소모되는 에너지가 미생물의 성장에 사용될 수 있기 때문으로 추측된다. 따라서 모델 황화합물을 사용하여 석유나 석탄의 생물학적 탈황을 연구하는 경우, 미생물 성장과 탈황과의 관계를 명확히 규명하기 위해서는 미생물의 농도 수치로서 탁도가 아닌 DCW를 사용하는 것이 바람직하다.

계면활성제의 영향

계면활성제가 미생물과 유기황의 접촉 및 이로 인한 탈황 반응에 미치는 영향을 관찰하기 위해 화학계면활성제인 Tween 80을 배지에 1%(v/v) 첨가한 후 미생물의 성장을 관찰하였다. 계면활성제를 첨가해 준 경우 미생물의 성장속도가 향상됨을 알 수 있었다(Figure 4). Tween 80의 농도를 바꾸어 가면서 미생물의 성장에 미치는 영향을 조사한 결과 Tween 80의 농도가

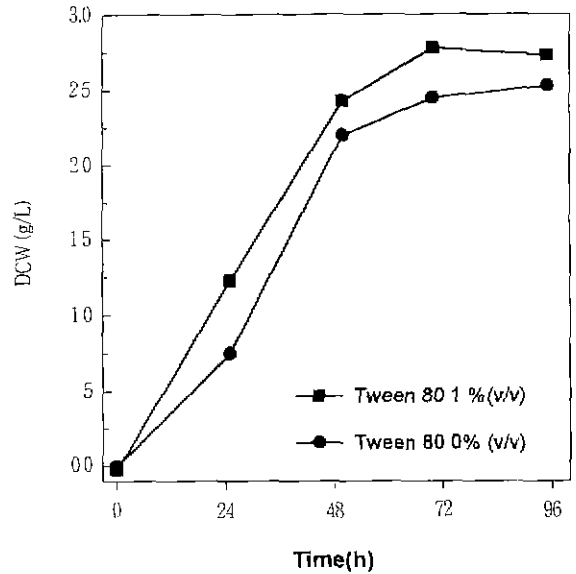


Figure 4. Effect of surfactant on cell growth. The concentration of DBT was 50 ppm and Tween 80 was used at 1% (v/v).

2%(v/v)를 넘어가면 미생물 성장에 저해가 일어남을 확인하였으며 따라서 탈황을 위한 최적 계면활성제 농도가 존재함을 유추할 수 있었다. 그러나 Tween 80을 첨가했을 때 IGTS8은 자체의 계면활성물질을 분비하는지는 확인하지 못했다.

요약

본 연구를 통하여 *Rhodococcus erythropolis* IGTS8은 배양 중에 유기 황화합물인 dibenzothiophene을 2-hydroxybiphenyl로 탈황하며 이 과정에서 계면활성 물질을 분비함을 확인하였다. 생산된 계면활성제로 인하여 배지내의 탁도와 균체의 건조증량 사이에는 비례관계가 없음을 확인하였다. 인위적으로 Tween 80을 넣어준 결과 균체성장 속도, 즉 DBT 분해율은 증가되었으며 2%(v/v) 이상의 Tween 80 농도에서는 오히려 저해 효과를 보였다.

감사

본 연구는 에너지관리공단의 대체에너지기술개발사업(과제번호 1996N-CD02-P-01)의 연구비 지원으로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고 문헌

1. Kilbane II, J.J. and K. Jackowski (1992), Bidesulfurization of Water-Soluble Coal-derived Material by *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8, *Biotechnology and Bioengineering*, 40, 1107-1114.
2. Afferden, M., D. Tappe, D. Beyer, H.G. Trupper, and J. Klein (1993), Biochemical mechanisms for the desulfurization of coal-relevant organic sulfur compounds, *Fuel*,

- 72, 1635-1643.
3. Stoner, D.L., K.S. Miller, J.K. Polman, and R.B. Wright (1993), Modification of organosulfur compounds and water-soluble coal-derived material by anaerobic microorganisms, *Fuel*, **72**, 1651-1656.
 4. Erincin, E., T. Durusoy, T.O. Bozdemir, and Y. Yurum (1998), Bodesulphurization of Turkish lignites. 3. The effect of lignite type and particle size on microbial desulphurization by *Rhodococcus rhodochrous*, *Fuel*, **77**, 1121-1124
 5. Kilbane II, J.J. (1995), Coal Bioprocessing Research at the institute of Gas Technology, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **54**, 209-221
 6. Izumi, Y., T. Ohshiro, H. Ogino, Y. Hine, and M. Shimao (1994), Selective Desulfurization of Dibenzothiophene by *Rhodococcus erythropolis* D-1. *Applied and Environmental Microbiology*, **60**, 223-226.
 7. Olson, G.J. (1994), Prospects for biodesulfurization of coal: mechanisms and related process designs, *Fuel Processing Technology*, **40**, 103-114.
 8. Calikins, W.H (1994), The chemical forms of sulfur in coal : a review, *Fuel*, **73**, 475-484.
 9. ElSawy, A and D. Gray (1991), A critical review of biodesulfurization systems for removal of organic sulfur from coal, *Fuel*, **70**, 591-594.
 10. Kilbane II, J.J. and Woodstock III, Enzymes from *Rhodococcus rhodochrous* strain ATCC no. 53968, *Bacillus sphaericus* strain no. 53969 and mixtures thereof for cleavage of organic C-S bonds of carbonaceous material, *US Patent* no. 5,132,219.
 11. Omori, T., L. Monna, Y. Saiki, and T. Kodama (1992), Desulfurization of Dibenzothiophene by *Corynebacterium* sp. Strain SY1, *Applied and Environmental Microbiology*, **58**, 911-915.
 12. Omori, T., Y. Saiki, K. Kasuga, and T. Kodama (1995), Desulfurization of Alkyl and Aromatic Sulfides and Sulfonates by Dibenzothiophene-degrading *Rhodococcus* sp. Strain SY1, *Biosci. Biotech. Biochem.*, **59**, 1195-1198
 13. Ohshiro, T., K. Suzuki, and Y. Izumi (1996), Regulation of Dibenzothiophene Degrading Enzyme Activity of *Rhodococcus erythropolis* D-1, *J. of Fermentation and Bioengineering*, **81**, 121-124.
 14. Chang, J.-H., S.-K. Rhee, Y.-K. Chang, and H.N. Chang (1998), Desulfurization of Diesel Oils by a Newly Isolated Dibenzothiophene-Degrading *Nocardia* sp. Strain CYKS2, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 851-855.
 15. Kaufman, E.N., J.B. Harkins, and A.P. Borole (1998), Comparison of batch-stirred and electro-spray reactors for biodesulfurization of dibenzothiophene in crude oil and hydrocarbon feedstocks, *Applied Biochemistry and Biotechnology*, **73**, 127-144.
 16. Park, O.-J., Y.-E. Lee, J.-H. Cho, H.-J. Shin, B.-D. Yoon, and J.-W. Yang (1998), Purification and Structural Characterization of Glycolipid Biosurfactants from *Pseudomonas aeruginosa* YPJ-80, *Biotechnol. Bioprocess. Eng.*, **3**, 61-66.