

비이온 계면활성제인 SPAN 20 이 *Rhodococcus sp. strain IGTS8*을 이용한 미생물 탈황공정에 미치는 영향

박기돈·오성근·*박홍우
한양대학교 공과대학 화학공학과
(접수 : 2002. 6. 4., 게재승인 : 2002. 6. 25.)

Effect of Nonionic Surfactant SPAN 20 on the Biodesulfurization Process by *Rhodococcus sp. strain IGTS8*

Ki Don Park, Seong Geun Oh, and Hong Woo Park†
Department of Chemical Engineering, Hanyang University Seoul 133-791, KOREA
(Received : 2002. 6. 4., Accepted : 2002. 6. 25.)

The effects of nonionic surfactant (SPAN 20) on the desulfurization process by *Rhodococcus sp. strain IGTS8* have been investigated at various oil/water ratios, pHs and concentrations of surfactant. The hexadecane containing DBT was employed as model oil. The presence of surfactant in the oil/water mixture stabilized the oil/water interface, thus enhanced the efficiency of desulfurization. The volume percentages of oil in the oil/water mixture were 30, 50 and 70%. The concentrations of surfactant were varied from 0 to 0.33 wt% relative to water phase. In general, the biodesulfurization efficiencies were decreased as the concentration of SPAN 20 and the volume percentage of oil phase increased.

Key Words : biodesulfurization, surfactant, emulsion, DBT, *Rhodococcus sp. strain IGTS8*

서론

현재 사용되고 있는 원유는 1000 ppm에서 30000 ppm 이상의 황화합물을 함유하고 있으며 불과 12년 전만 해도 원유내 황의 허용치는 2000~5000 ppm으로 규제되었으나 현재는 법적으로 350 ppm 이하로 규정하고 있다. 이러한 sulfur 허용농도는 가까운 미래에 (2005~2007년) 10~15 ppm까지 감소될 것으로 예상된다(1).

원유내 황을 제거하기 위하여 많은 연구가 진행되고 있으며 현재 가장 대두되고 있는 방법에는 화학적 처리를 이용한 HDS (HydroDeSulfurization) 공정과 미생물을 이용하는 BDS (BioDeSulfurization) 공정이 있다. 먼저 화학적 처리에 의한 HDS공정은 공업적으로 가장 많이 사용되고 있으나 원유내에 존재하는 질소, 산소, 수소, 중금속 물질들은 HDS공정을 방해 하는 요소로 작용하므로 전처리 비용이 많이 드는 단점이 있다. 특히 황의 경우에는 촉매 독으로써 작용된다고 알려져 있다(2). 더구나 290℃에서 455℃사이의 높은 온도와 1 in²당

150~3000 pounds에 이르는 높은 압력이 필요하며 특별한 금속 촉매가 사용되므로 공정상에서의 고비용이 요구된다(3). 또한 HDS방법을 이용한 탈황은 DBT (DiBenzo Thiophene)와 같은 유기 황화합물의 분해가 어렵다는 단점을 가지고 있다. 이와는 상반되게 미생물을 이용하여 황을 제거하는 BDS공정은 HDS의 공정의 한계를 극복한 기술 중의 하나이다. BDS공정은 공정상에서 낮은 온도와 압력 그리고 기질의 낮은 비용과 간단한 공정 설계 및 건설이 장점이다(1). 그러나 BDS공정에서는 HDS공정보다 장시간이 소요되며 유화된 oil과 water상의 층 분리가 어렵다는 단점을 가지고 있다(4).

미생물 탈황에는 *Rhodococcus sp.*와 *Pseudomonas sp.*가 많이 이용되고 있으며 미생물 탈황에 이용되는 미생물은 oil과의 높은 친화력을 가지고 있어 생체 계면활성제를 스스로 생산해 내는 특성을 가지고 있으며 이러한 생체 계면활성제는 구조가 매우 다양하며 친수성 (지방산의 탄화수소 사슬)과 소수성 (알코올, 카르복실기, phosphate, 탄수화물)을 이루는 성분들이 많은 화합물을 포함하고 있는 유화제의 일종이다(5).

미생물을 이용한 탈황에 있어서 황성분이 함유된 원유와 미생물을 함유한 배지 수용액과의 효과적인 접촉이 탈황 효율에 있어 중요한 변수 중의 하나이므로 이를 위하여 계면활성제를 이용하고자 하는 연구들이 많이 수행되었다.

Kim은 산유지가 다른 원유를 M6라는 미생물을 이용하여

† Corresponding Author : Department of Chemical Engineering,
Hanyang University, Seoul 133-791, Korea
Tel : +82-2-2290-0487, Fax : +82-2-2299-9496
E-mail : hhwwpp@chollian.net

비이온성 계면활성제인 Neodol Series와 Tergitol Series에 대한 탈황효율 실험을 수행하였다(6). 이때 oil/배지의 비율은 1:1(v/v)로 실험했으며 그 결과 2종류의 계면활성제는 동일한 경향성을 나타냈으며 특히 Tergitol series의 계면활성제를 사용한 경우 26%라는 높은 탈황 효율을 얻을 수 있었다.

Monticello는 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8을 이용하여 탈황실험을 하였다(7). 이때 사용된 오일에는 4.75%의 황이 함유되어 있었으며, 이 실험은 oil과 배지의 접촉면적을 증가 시킴에 따른 탈황효율에 미치는 영향을 알아 보고자 하는 실험이었다. 이 실험에 이용된 계면활성제는 Triton N-101로써 탈황효율은 약 30%의 탈황효율을 얻을 수 있었다.

Patel은 *Rhodococcus* sp. strain IGTS8을 이용하여 oil/배지의 비율을 1:1(v/v)으로 탈황실험을 하였다(8). 이때 oil/배지/surfactant/cell의 순서에 따른 탈황효율의 효과 및 탈황실험에 사용된 Triton N-101과 Oleic diethanolamine의 탈황 효율을 비교하였다. 이 실험은 생성된 HBP만의 양으로 탈황효율을 비교 하였으며 그 결과로 배지에 계면활성제와 n-hexadecane을 넣고 혼합한 후 균주를 넣어 주는 것이 가장 효과가 크게 나타났으며 계면활성제를 이용시 저농도에서 탈황효율이 높게 나타나는 결론을 얻을 수 있었다.

앞서 기술한 바와 같이 많은 연구는 소량의 oil을 이용한 실험이었으며 BDS공정을 상업화 하기 위해 oil의 양을 증가시키고 이 때 미생물 특성에 따른 최적의 조건을 찾는 실험을 한 연구는 아주 드물었다. 본 연구에 이용된 *Rhodococcus* sp. strain IGTS8은 자신이 가지고 있는 독특한 탈황 효소를 이용해 유기 황화합물 중 가장 분해가 어렵다는 DBT를 2-2'-HBP (HydroxyBiPhenyl)로 전환시키는 것과 oil/cell/water 상에서 정치되어 있을 때 이 미생물은 계면에 존재하는 특성을 가지고 있다. 이와는 다르게 *Pseudomonas* sp.는 water phase에 분산된 특성을 가지고 있다(1,9).

본 연구에서는 DBT가 함유된 hexadecane을 오일상으로 이용하여 물과의 혼합시 오일의 부피가 30, 50, 70%일 때와 계면활성제의 농도가 물상을 기준으로 0~0.33 wt%일 때 탈황 효율에 대하여 각각 연구하였다. 계면활성제로는 미생물에 대하여 독성이 적고 용액의 pH에 따라 계면물성 변화가 적은 비이온 계면활성제인 SPAN 20 (Sorbitan monolaurate)을 사용하였다. 그 이유는 SPAN 20의 HLB (Hydrophile-Lipophile Balance) 값이 7~8 사이로 oil soluble하면서도 water soluble 한 성질을 가지고 있으며 적은 친수기로 인해 oil에 존재하는 DBT와 수상에 존재하는 미생물이 오일/물 계면에서 접촉시 SPAN 20의 존재로 인한 방해 받음이 적을 것으로 예측되었기 때문이다(10).

재료 및 방법

재 료

본 실험에 이용된 미생물인 *Rhodococcus* sp. strain IGTS8은 North Dakota university의 Dr. Kevin Young으로부터 구할 수 있었고 n-hexadecane과 DBT는 Tokyo Kasei Kogyo Co.에서 구입하였으며 HBP와 manganese chloride는 Sigma Chemical Co., nutrient broth와 nutrient agar는 DIFCO Laboratories, glucose는 Samchun Pure Chemical Co. chloride hexahydrate

와 calcium chloride dihydrate는 KANTO Chemical Co., glucose 및 나머지 시약들은 Junsei chemical co.에서 구입하였다. 계면활성제로 사용한 SPAN 20 (Sorbitan monolaurate)은 Tokyo Kasei Kogyo Co.에서 구입하였다. HPLC 분석에 이용된 용매로 acetonitrile은 HPLC grade (99.9% Burdick & Jackson Brand)를 사용하였다.

실험 방법

계면활성제 SPAN 20의 농도와 oil의 비율에 따른 유화 안정성

이 실험은 oil의 변화량에 따른 계면활성제의 최적농도를 결정하기 위한 실험으로 실온에서 진행되었으며 우선 계면활성제로 사용하는 SPAN 20을 1 wt%로 고정하고 oil의 비율에 따른 유화된 시료의 안정성을 측정했다. 이때 oil의 비율은 전체 system을 40 mL로 고정하고 50%, 60%, 70 vol%로 변화시키면서 안정성을 관찰하였다.

계면활성제의 농도에 따른 유화 안정성을 조사하기 위하여 oil의 비율은 50 부피%로 system 자체를 고정시키고 물에 대한 계면활성제의 농도를 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 wt%로 변화시키며 계면활성제의 농도에 따른 유화 안정성을 측정하였다.

전체적인 실험방법은 우선 BSM (Basic Salt Media)에 SPAN 20을 녹여 물상을 제조한 후 n-hexadecane을 넣고 homogenizer (Ultra-Turrax mixer model T-25, basic IKA Labortechnik)를 이용하여 11000 rpm으로 5분간 유화시킨 후 메스실린더에 넣고 시간에 따른 안정성을 측정하였다.

pH에 따른 유화 안정성

Shaking 배양에서 미생물의 성장에 영향을 주는 변수로는 온도, 압력, pH를 생각할 수 있다. 그 중 온도는 실온으로 압력은 대기압으로 고정된 상태이므로 미생물에 영향을 끼치는 변수 중 pH에 따른 유화 안정성을 측정하였다.

실험은 0.5 N HCl용액을 이용하여 pH 7부터 0.5씩 낮추어 5개를 준비한 BSM과 SPAN 20 (BSM에 대한 0.2 wt%)을 넣어 물상을 제조한 다음 DBT가 1000 ppm이 녹아있는 n-hexadecane을 넣고 homogenizer를 이용하여 11000 rpm에서 5분간 유화시킨다. 이렇게 준비된 시료는 12시간 후에 메스실린더에 넣어 시간에 따른 안정성을 측정하였다.

Rhodococcus sp. strain IGTS8을 이용한 biodesulfurization에서의 계면활성제의 효과

Seed culture 조건

고체상의 세포를 액체상의 세포로 배양시키기 위하여 glucose 10 g/L, yeast extract 0.5 g/L, nutrient broth 8 g/L와 같은 조성으로 종 배양 배지 100 mL을 진탕 플라스크에 넣은 후 멸균 작업을 위해 autoclave 시킨다. 이렇게 autoclave된 플라스크에 고체상의 세포를 무균 작업으로 접종하고 28°C, 280 rpm으로 진탕 배양기에서 4일간 배양하였다.

Cell inoculation

이전 배양된 배지를 2000 rpm으로 15분간 이속시켜서

시킨 후 상등액은 버리고 세포벽에 붙어 있는 황을 제거하기 위하여 cell pellet만을 phosphate buffer (0.1 M)을 사용하여 2 번 세척한다. 세척된 cell pellet은 phosphate buffer 용액 10 mL에 현탁시킨 후 Spectronic 20D(Milton Roy Co.)를 이용하여 초기 세포량을 1 mL 기준 0.5 OD로 하여 세포를 주입한다. 이때 초기 세포량 1 mL는 0.5 OD로써 0.3 g/L 건조된 세포를 기준으로 하여 주입하였다.

SPAN 20을 이용한 미생물 탈황

세포가 탈황하는데 필요한 본 배양 배지 BSM의 구성은 Table 1과 같다. BSM은 4개의 그룹으로 나뉘어져 있으며 1) 그룹은 탄소원, 2)그룹은 질소원, 3)그룹은 buffer solution, 4) 그룹은 무기염류로 구성되어 있고 각각의 그룹을 2:2:1:1의 비율로 나누어 300 mL: 300 mL: 150 mL: 150 mL로 정량한 후 멸균 작업을 위해 autoclave를 시켰다. 이렇게 autoclave된 배지는 한 그룹씩 첨가하면서 혼합하였다.

구체적 탈황효율 측정 절차는 다음과 같이 수행하였다. 수용량이 250 mL에 working volume이 100 mL인 long neck 플라스크에 DBT가 1000 ppm이 함유된 n-hexadecane과 배지를 혼합한 후 SPAN 20을 0.0, 0.07, 0.17, 0.23, 0.33%의 비율로 하여 5개의 시료를 준비하고 여기에 동일 양의 세포를 주입한다. 초기 pH는 buffer solution에 의해 7.0으로 고정되어 있으며 이렇게 준비된 시료를 28℃, 280 rpm에서 4일간 배양하였다. Modeling oil인 n-hexadecane과 본 배양 배지는 3:7, 5:5, 7:3의 부피 비율로 실험하였으며 oil 30%에서 최적 조건을 선택하기 위해 조건을 달리한 2가지 실험을 수행하였다. 우선 본 배양 배지 그룹 중 3)그룹인 phosphate buffer만을 제외한 나머지 그룹의 구성물의 양을 2배로 하여 만든 강화 배지를 이용한 실험과 강화 배지 사용 및 미생물 배양에 중요 변수 중에 하나인 pH를 24시간 마다 1N NaOH 용액을 이용하여 pH 6.5-6.3으로 적정해 주면서 탈황효율을 관찰하며 최적 조건을 잡는 실험을 하였다.

HPLC를 이용한 DBT-HBP 분석

분해된 DBT양과 생성된 HBP양의 분석은 shaking incubator에서 플라스크를 꺼내어 5분 정도 정치시킨 후에 1 mL를 배양액 윗부분에서 뽑아내어 8000 rpm으로 원심분리시킨다. 이렇게 원심분리된 시료에서 상등액 300 μL에 ethyl acetate 1200 μL을 첨가하여 5배 희석 후 μ-Bondapak C18 steel column(3.9 mm×150 mm, Waters), 254 nm로 고정된 photodiode array detector (Waters 996), autosampler (Waters 717)가 장착되어 있는 HPLC를 이용하여 분석하였다.

결과 및 고찰

SPAN 20을 이용한 emulsion stability 측정

Table 2는 유화제로 사용하는 SPAN 20의 농도를 결정하는 실험으로 n-hexadecane 50 vol%로 고정된 상태에서 유화제로 사용하는 SPAN 20의 농도를 배지에 기준으로 하여 0.5, 1.0, 3.0, 5.0 wt%로 시료를 준비하고 homogenizer를 이용하여 11000 rpm에서 5분간 유화시킨 후에 정치시켜 층이 분리되는 시간을 측정한 것이다. 유화 안정성이 가장 좋은

Table 1. Organization of BSM (Basic Salt Medium)

Group	Component	Amount
1) Group	Glucose	15 g/L
	Glycerol	24 g/L
2) Group	KH ₂ PO ₄	7.32 g/L
	Na ₂ HPO ₄	16.71
3) Group	NH ₄ Cl	12 g/L
4) Group	MgCl ₂ · 6H ₂ O	1.2 g/L
	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	0.006 g/L
	FeCl ₂ · 6 H ₂ O	0.006 g/L
	MnCl ₂ · 4 H ₂ O	0.024 g/L

Table 2. The emulsion stability of changing a surfactant concentration at oil 50%

Surfactant concentration	0.5w%	1.0 w%	3.0 w%	5.0 w%
Stability time (hrs)	5	27	57	4day ± 3

것은 계면활성제의 농도가 높은 5.0 wt%에서 96±3 hrs로 나타났다. 안정성이 가장 낮은 것은 0.5 wt%에서 5hr 시간으로 관찰되었다. 이러한 결과를 가지고 계면활성제의 농도를 결정하고자 할 때 고려해야 될 것은 미생물을 배양시키는 incubator의 경우 280 rpm으로 4일 동안 shaking 된다는 것이다. 이것을 감안해 볼 때 계면활성제의 농도는 1.0 wt% 미만으로도 충분히 유화 안정성을 유지시킬 수 있다고 추정이 가능하다.

Table 3은 계면활성제의 농도를 1.0 wt%로 하고 n-hexadecane의 양을 변화시키면서 실험한 결과이다. 이 결과로도 알 수 있듯이 SPAN 20의 농도를 1.0 wt% 미만으로 하는 것이 적당하다는 추정을 뒷받침해 줄 수 있다. 이러한 미세 입자를 광학현미경을 이용하여 size distribution을 측정해 본 결과 2.0~4.0 μm 정도 됨을 알 수 있었다.

pH에 따른 유화 안정성

미생물이 활동하는데 있어 가장 민감한 것은 온도, pH와 배지의 조성 등 여러 가지가 존재한다. 이러한 변수 중에서도 계면활성제와 관련하여 가장 변칙 요인으로 들 수 있는 것은 pH이다. 비록 비이온 계면활성제가 pH에 민감하지 않다고 알려져 있지만 그 경우의 system 구성은 BSM 대신 물로 구성되어 있기 때문이며 BSM에 존재하는 많은 salt와 무기물은 pH변화에 따른 유화력에 영향을 끼칠 수 있으므로 이에 대한 실험을 수행 하였다.

아래 Figure 1은 준비된 배지에 0.5 N HCl용액을 이용하여 시료를 pH7부터 우측으로 0.5씩 pH를 줄이면서 5개의 시료를 준비했다. 이렇게 적정된 시료에 DBT가 포함된 30%의 n-hexadecane에 0.2 wt%의 계면활성제와 70%의 배지를 준비한다. 준비된 시료는 incubator 배양기에 30℃, 280 rpm으로 유화시키고 12시간 후에 꺼내어 메스실린더에 넣어 정치시켜 두고 1시간 후에 유화 안정성을 측정할 결과이다.

실험 결과로 본다면 배지는 pH가 낮을수록 더 안정한 결과를 얻었으며 pH가 7일 때 가장 빨리 층 분리가 일어났다는 것을 알 수 있었다. 이 실험으로 pH가 낮을수록 oil의 입자 크기가 작아짐을 간접적으로 알 수 있었다. 그러나 실험

Table 3. The emulsion stability of changing an-hexadecane at surfactant 1 w%

n-hexadecane : BSM	50 : 50	60 : 40	70 : 30
Stability time (hrs)	27	15	0.5



Figure 1. Stability with n-hexadecane 30%/water70% at various pHs.

에 사용될 *Rhodococcus* sp. strain IGTS8는 지름이 0.5이고 크기는 2~4이므로 이것을 감안해 볼 때 작은 유화입자 보다는 입자 크기가 큰 것이 더 큰 효율을 보일 수가 있다. 또한 미생물이 가장 성장하기 좋은 pH는 보통 6~7사이로 알려져 있으므로 미생물 탈황공정 실험시 초기 pH는 6~7에 적정하고 실험을 하는 것이 좋다는 결론을 얻을 수 있었다.

SPAN 20을 이용한 미생물 탈황

Oil 30%에서 계면활성제를 이용한 미생물 탈황

Oil 30%에서는 탈황실험에 있어서 그 효율을 높이기 위한 일환으로 일반 배지를 사용한 실험과 그 배지의 2배인 강화 배지를 이용한 실험 및 강화 배지를 사용한 계에 24시간 마다 pH를 적정해 주는 실험을 행하였다.

계면활성제로 사용하는 SPAN 20은 비이온 계면활성제로써 적은 양으로 충분히 유화시킬 수 있는 특성을 갖고 있으며 앞서 본 안정성 실험을 통해서도 충분히 증명된 바 있다. 비록 불안정한 상태이나 실험 중 지속적으로 280 rpm으로 shaking 되고 있다는 것을 감안하여 SPAN 20 농도는 0.07, 0.17, 0.23, 0.33% (물에 대한 wt%)로 고정하여 실험하였다.

Figure 2는 oil 10%에서 계면활성제를 사용하지 않은 실험으로 oil/cell/배지로 구성되어 있으며 long neck flask을 이용하여 28℃, 280 rpm으로 4일 동안 배양시키면서 시간에 따른 DBT 분해농도와 HBP 생성농도를 나타낸 결과이다. 초기 24시간까지는 급격히 DBT분해가 이루어지다 48시간이 지남에 따라서는 거의 일정한 값을 나타내는 결과를 나타내었고 HBP의 생성량은 96시간까지 꾸준히 생성되는 것을 알 수 있었다. 이때 초기 DBT의 농도는 5.43 mM로 시작하여 96시간이 지난 후에는 0.4 mM까지 분해되었고 96시간 이후의 HBP의 생성량은 2.29 mM로써 화학적 양론으로 판단해 볼 때 DBT의 분해량과 HBP 생성량은 일치하지 않았다는 결론을 얻을 수 있었다. 이것은 다른 연구자의 논문에서도 이미 유사한 결과를 보고된 바 있다(1). DBT분해로 인해 생성되는 HBP의 mechanism은 oil내의 DBT가 cell 벽으로 확산을 통해 cell과 접촉을 한 후 desulfurizase(dsz) A, B, C에 의해 분해되면서 HBP와 SO₃가 생성된다. 이때 HBP는 확산을 통해

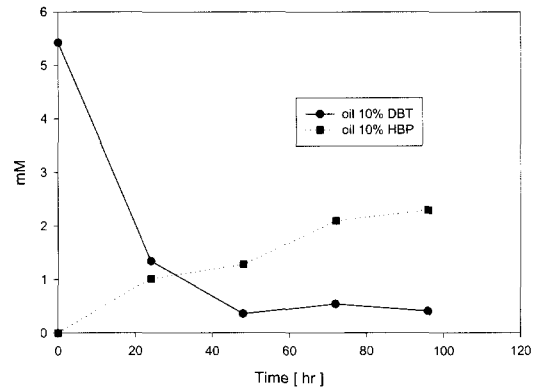


Figure 2. A graph of DBT degradation & HBP production data by *Rhodococcus* sp. Strain IGTS 8 at n-hexadecane : BSM = 1:9(v/v).

에서 생화학 반응을 일으키기 위한 일환으로 사용되고 SO₄²⁻는 물로 확산되어 SO₃²⁻, SO₄²⁻와 S²⁻로 존재하게 된다. 이러한 이유로 탈황 효율에 관계되는 것은 생성된 HBP의 양 보다는 분해된 DBT의 양으로 탈황효율로 판단하는 것이 더 정확하다고 할 수 있다.

Figure 2에 나타난 DBT 분해량에 따른 탈황효율은 아래와 같은 식으로 구했다.

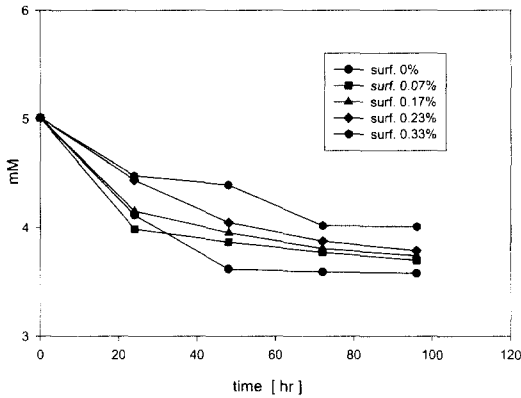
$$\text{탈황효율} = (\text{DBT총량} - \text{DBT분해량}) / \text{DBT총량} \times 100$$

Oil 10%에서 탈황효율은 92.63%의 높은 효율을 보였다. 이렇게 높은 효율을 보인 이유는 oil과 BSM사이에 cell이 존재하는 독특한 성질과 total 30ml을 기준으로 할 때 oil의 양은 3 mL로 아주 적은 양의 oil이 사용되어 높은 효율을 보였다고 추정할 수 있다.

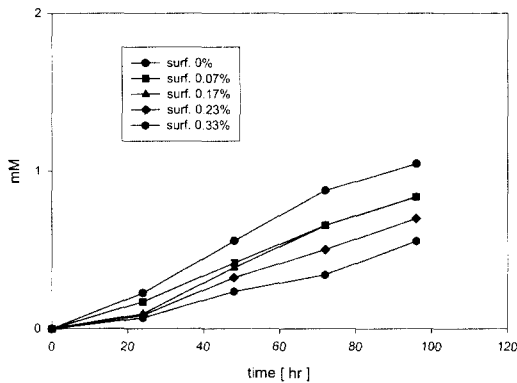
Figure 3의 (a)는 Oil/계면활성제/cell/BSM의 system에서 SPAN 20의 농도 변화와 시간에 따른 DBT의 분해량을 측정된 것이다. 일반 배지를 사용한 이 실험에서는 DBT의 분해량이 48시간 이후부터 일정해지는 경향성이 나타났으며 SPAN 20의 농도가 높을수록 DBT의 분해량은 더 낮아짐을 알 수 있었다. 이때 DBT 분해량은 SPAN 20의 농도가 0%, 0.07, 0.17%, 0.23%, 0.33%순으로 나타났으며 탈황효율은 28.54%, 26.15%, 25.35%, 24.35%, 19.96%로 나타났다. 결과적으로 보면 SPAN 20이 0%에서 가장 탈황효율이 가장 좋았고 oil 10%와 절대적으로 비교해 볼 때 미생물에 의해 분해된 DBT의 양은 거의 같다는 결론을 얻을 수 있었다.

Figure 3의 (b)는 HBP의 생성량을 나타낸 그래프로써 SPAN 20이 0%일 때 가장 많은 HBP가 생성됨을 알 수 있었으며 이때 96시간 후 HBP는 1.05 mM 만큼 생성되었으며 oil 10%의 실험데이터와 같이 꾸준히 생성됨을 알 수 있었다. Oil 30%의 생성된 HBP양을 Oil 10%와 절대적으로 비교해 볼 때 oil 30%에서는 127% 만큼 더 많은 HBP를 생성했다는 것을 알 수 있었다.

Figure 4는 최적 탈황효율을 증가시키기 위한 방법 중 하나로 일반 배지 대신 강화 배지를 이용할 때 시간에 따른 DBT 분해량과 HBP 생성량을 나타낸 것이다. 강화 배지는 일반 배지의 3그룹인 buffer solution을 제외한 나머지 그룹의



(a) A profile of DBT degradation



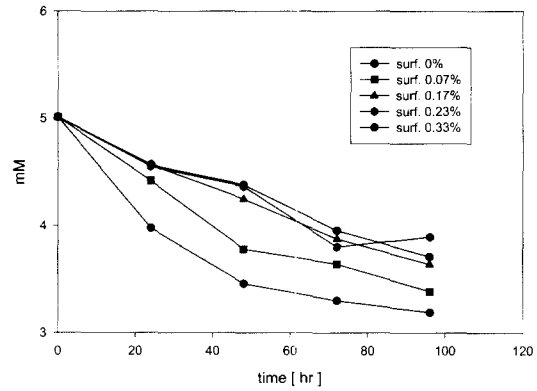
(b) A profile of HBP production

Figure 3. A graph of DBT degradation and HBP production of being consisted in oil(30%)/surf./cell/BSM(70%) at a total 30 mL.

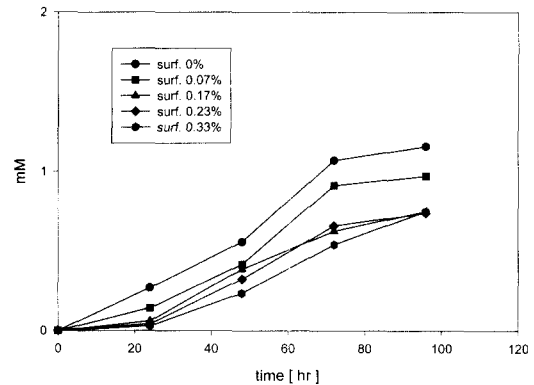
와 같이 Figure 3에서도 탈황효율은 SPAN 20의 농도 0%에서 가장 높았고 SPAN 20의 농도가 높을수록 분해된 DBT의 양에 값은 작아지는 경향성을 띄었다. HBP 생성량의 경우는 일반 배지를 사용한 것보다 약간의 양이 증가됨을 알 수 있었으나 DBT 분해량 만큼은 크게 영향을 끼치지 않는 것으로 나타났다.

Bozdemir은 미생물을 이용한 탈황에 있어서 *Rhodococcus rhodochrous* IGTS8을 미생물 성장변수의 최적조건을 잡는 실험을 했다. 이 연구 결과에 의하면 28℃, 초기 pH는 6.5에서 가장 미생물의 성장이 좋았다는 결론을 얻을 수 있었다(11).

이러한 연구 결과를 바탕으로 Figure 5는 1N HCl 용액을 이용하여 초기 pH를 6.5로 하고 강화 배지를 이용하여 24시간마다 pH를 측정하여 pH를 6.3으로 적정한 후 시간에 따른 분해된 DBT양과 생성된 HBP양을 나타낸 그래프이다. Figure 5의 (a)에 나타난 분해된 DBT양의 결과와 일반 배지를 이용할 때와 강화 배지를 이용할 때의 각각의 경우를 비교해 볼 때 DBT 분해량이 시간이 지남에 따라 일정해지는 그 전의 결과와는 다르게 계속해서 분해가 이루어지고 있음을 알 수 있다. 그 원인은 12시간마다 미생물의 활동성이 가장 좋은 상태인 pH를 6.3으로 보정해 줌으로써 이러한 결과를 나타낸 것으로 추정된다. 생성된 HBP의 양도 강화 배지만을 이용한 경우보다 조금 높게 나타나는 결과를 얻을 수 있었다. 이 조건에서도 SPAN 20의 농도가 높을수록 분해된 DBT의 양은 감소하는 동일한 경향성을 나타냈다.



(a) a profile of DBT degradation of using fortified BSM at a oil 30%



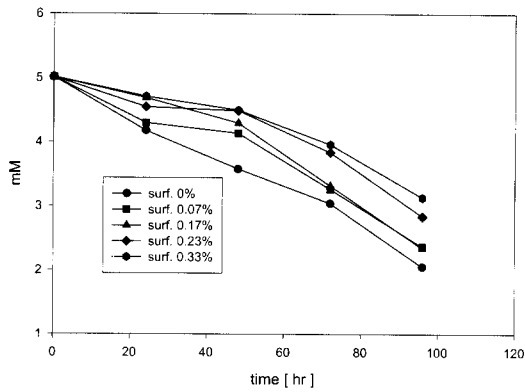
(b) a profile of HBP production of using fortified BSM at a oil 30%

Figure 4. A graph of DBT degradation and HBP production of being consisted in oil (30%)/surf./cell/fortified BSM(70%) at a total 30 mL.

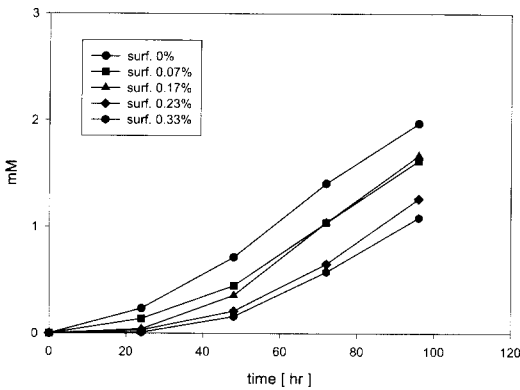
Figure 6은 BDS공정에서 oil 30%일 때 각각의 조건에서 SPAN 20의 농도변화에 따른 탈황효율을 나타낸 것이다. 그 결과로 본다면 일반 배지에서는 SPAN 20의 농도에 따른 탈황 효율이 그렇게 크게 차이가 없으나 강화 배지와 강화 배지 및 24시간마다 pH6.3으로 적정된 조건에서는 탈황 효율의 차이가 아주 크게 나타남을 알 수 있었다. 동일한 조건에서 탈황 효율이 가장 높은 것은 SPAN 20의 농도가 0%일 때였고 계면활성제의 농도가 증가할수록 탈황 효율은 낮아지는 경향을 나타냈다. 일반 배지의 최고 탈황 효율은 SPAN 20이 0%에서 28%로 가장 높았고 강화 배지를 이용했을 때는 35%, 강화 배지와 pH를 적정한 시료의 탈황효율은 59%으로 나타났다. 일반 배지 사용보다 강화 배지 및 pH적정한 조건에서는 2배 이상의 탈황효율을 얻을 수 있었으며 이러한 결과로 본다면 탈황에 이용된 *Rhodococcus sp. strain IGTS8*의 특성은 배지에 사용된 영양분의 양보다는 미생물의 활동성에 영향을 주는 pH에 더 민감하다는 결론을 내릴 수 있다.

Oil 50%, 70%에서 계면활성제를 이용한 미생물 탈황

oil 30% 결과를 기준으로 하여 강화 배지 사용 및 시간별 pH를 적정하는 조건으로 oil의 양을 50%, 70%로 증가시켜 미생물 탈황 실험을 하였다. 이 실험은 oil 30%때와는 달리 oil의 양을 증가시킬 때 SPAN 20의 효과를 보기위한 실험이다. 이 실험에서는 무엇보다도 oil의 양이 증가됨에 따라 SPAN 20의 유효력을 증가시켜 탈황효율을 높이는데 그 목



(a) A profile of DBT degradation of using fortified BSM at a oil 30%



(b) A profile of HBP production of using fortified BSM at a oil 30%

Figure 5. A graph of DBT degradation and HBP production of being consisted in oil (30%)/surf./cell/fortified BSM(70%) at a total 30 mL where initial pH was titrated pH 6.5 and this system was titrated pH 6.3 every 24 h.

적을 두고 있다.

Oil 50% 공정에서는 12시간, oil 70% 공정에서는 6시간을 기준으로 pH를 6.3으로 적정하였고 이때 분해된 DBT양과 생성된 HBP양을 측정하였다. 탈황효율은 oil 30% 공정에서 측정했던 방법과 동일한 방법으로 실행했다.

Figure 7은 이러한 조건에서 SPAN 20의 농도에 따른 oil 50%와 oil 70%의 탈황효율을 비교한 것이다. 이 결과를 본다면 두 oil의 양을 상대적으로 비교했을 때 oil 50% 공정에서 더 큰 탈황효율을 보였으나 절대적으로 비교시에는 oil 70% 공정에서 더 큰 탈황 효율을 보였다는 것을 알 수 있었다.

Oil 30, 50, 70%의 실험 결과로 판단해 볼 때 이 연구를 처음 실행할 때의 목적이었던 계면활성제를 이용했을 때가 이용하지 않았을 때 보다 뛰어난 유효력 인해 탈황효율이 증가될 것이라 예상과는 다른 결과를 얻을 수 있었다.

그러나 oil의 양이 늘어나면서 SPAN 20의 탈황효율이 계면 활성제를 사용하지 않은 시료의 탈황효율과 비교해 보았을 때 oil의 양이 적은 30% 보다는 크게 나아짐을 보였으며 또한 HBP의 생성량은 pH를 적정해 줌으로써 더욱 그 양이 더욱 감소하는 경향을 나타냈다.

SPAN 20이 0%에서도 유효가 일어나는 것을 확인할 수 있었는데 이것은 *Rhodococcus* sp. strain IGTS8이 oil과 친화력을 증가시키기 위해 미생물 스스로가 생체 계면활성제인 biosurfactant을 생산해내는 결과라고 할 수 있다. 탈황효율의

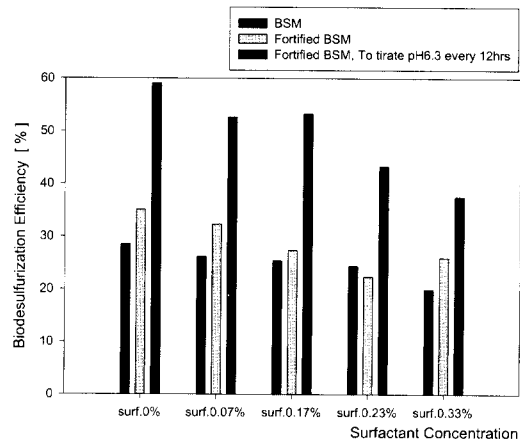


Figure 6. A graph of biodesulfurization efficiency about surfactant concentration at oil 30%.

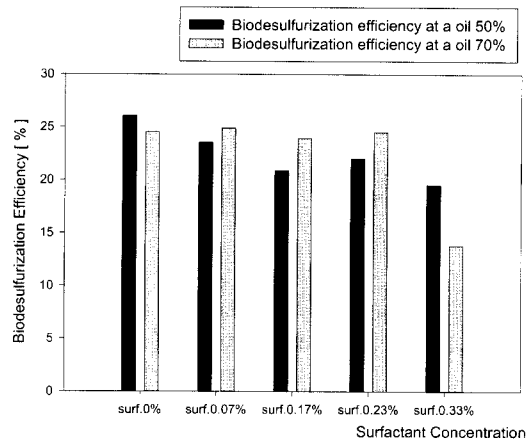


Figure 7. A bar graph of biodesulfurization efficiency about Surfactant concentration at oil 50, 70% Oil 50% was experimented with being titrated pH 6.3 every 12 hrs. Oil 70% was experimented with being titrated pH 6.3 every 6 hrs.

결과로 본다면 biosurfactant의 영향으로 인해 이 연구의 목적인 SPAN 20을 이용하여 oil과 BSM사이에 존재하는 계면의 활성화에너지를 낮추어 접촉면적을 넓혀 고 효율을 창출 하는 데는 기대 이하의 효과를 나타낸 것으로 나타났다(12).

결론

이 연구의 목적은 계면활성제를 이용하여 미생물 탈황의 효율을 증대시키는데 있었다. 그러나 결과적으로 본다면 계면활성제로 사용한 SPAN 20은 미생물이 생산한 biosurfactant의 영향으로 기대 이상의 효과를 내지 못했다는 결론을 얻을 수 있었다.

Oil 30%에서 여러 가지 조건 중 최적의 탈황 실험의 조건은 강화 배지와 시간별 pH적정의 조건으로 나타났으며 그때의 효율은 59%라는 높은 탈황효율을 얻었다. 이러한 최적 조건을 잡기 위한 실험 결과로써 미생물 탈황은 배지의 영향 보다는 pH에 더 큰 영향을 받는다는 것을 알 수 있었다. 이러한 결과가 나타내는 것은 탈황 효율에는 미생물에 필요한

영양분보다는 미생물의 활동성에 더 영향성이 큰 것으로 해석할 수 있다.

Oil양의 증가에 따른 탈황효율에서는 50%와 70%로 비교 실험을 해 본 결과 Oil 50%와 70%의 탈황효율은 각각 26%와 24%로 나타났다. 비록 상대적인 비교는 oil 50%가 더 높지만 절대적인 비교를 해 본다면 70%가 탈황효율이 더 뛰어났다.

이 연구에 이용된 *Rhodococcus sp. strain IGTS8*은 물과 oil의 계면에 존재할 만큼 oil 친화력이 강한 미생물로서 미생물 스스로가 oil 친화력을 높이기 위해 생체 계면활성제를 생산하고 이 biosurfactant의 영향으로 인해 SPAN 20의 효과가 떨어졌다고 추정할 수 있다.

요 약

본 연구에서는 *Rhodococcus sp. strain IGTS8*을 이용한 미생물 탈황공정에 있어서 비이온 계면활성제인 SPAN의 영향을 조사하였다. 탈황 효율 연구에 있어서 모델 오일로는 DBT가 함유된 hexadecane, 수상으로는 배지 용액을 이용하였다. 연구에 있어서 실험 변수로는 오일/물 혼합물에 있어서 오일의 부피 %, SPAN 20의 농도, 용액의 pH로 하였으며 일반적으로 오일의 부피 비율, 계면활성제의 농도가 증가할수록 탈황 효율이 감소되었다. 이러한 결과는 오일의 부피비가 증가할수록 계면활성제의 농도가 증가할수록 오일상의 DBT와 균주의 효율적인 접촉이 저해되기 때문으로 고려된다.

감 사

본 연구는 에너지관리공단의 청정에너지기술개발사업에 의한 지원으로 수행되었으므로 이에 감사드립니다.

REFERENCES

1. Monticello, D. J. (2000), Biodesulfurization and Upgrading of Petroleum Distillates, *Current Opinion Biotechnology*, **11**, 540-546.
2. Chang, J. W., S. K. Rhee, Y. K. Chang, and Ho Nam Chang (1998), Desulfurization of Diesel Oils by a Newly Isolated Dibenzothiophene-Degrading *Nocardia sp. Strain CKYS2*, *Biotechnol. Prog.*, **14**, 851-855.
3. Speigh, J. G. (1981), *The Desulfurization of Heavy Oils and Fuel*, New York, Marcel Dekker.
4. David, S. R., J. L. Hittle, H. W. Blanch, and J. D. Keasling (2000), Biodesulfurization of Dibenzothiophene in *Escherichia Coli* Enhanced by Expression of a *Vibrio harveyi* Oxidoreductase Gene., *Biotechnology and Bioengineering*, **67**, 72-79.
5. Patel, S. B., J. J. Kilbane II, and D. A. Webster (1997), Biodesulfurization of Dibenzothiophene in Hydrophobic Media by *Rhodococcus sp. Strain IGTS8*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **69**, 100-106.
6. Han, J. W., H. S. Park, B. H. Kim, P. G. Shin, S. K. Park, and J. C. Lim (2001), Potential Use of Nonionic Surfactant in the Biodesulfurization of Bunker-C Oil, *Energy & Fuels*, **15**, 189-196.
7. Monicello, D, J (1993), Biocatalytic Desulfurization of Organosulfur Molecules., WO 93/25637.
8. Patel, S. B., J. J. Kilbane II, and D. A. Webster (1997), Biodesulfurization of Dibenzothiophene in Hydrophobic Media by *Rhodococcus sp. Strain IGTS8*, *J. Chem. Tech. Biotechnol.*, **69**, 100-106.
9. Sagardia, F., J. J. Rigau, A. Martinez-Lahoz, F. Fuentes, C. Lopez, and W. Flores (1995), Degradation of Benzothiophene and Related Compounds by a Soil *Pseudomonas* in an Oil-Aqueous Environment, *Appl. Environ. Microbiol.*, **61**, 468-475.
10. Fujimoto, T. (1985), *New Introduction to Surface Active Agent*, Sanyo Chemical Industries. LTD.
11. Bozdemir, T. O. (1996), Biodesulfurization of Turkish lignites 1. Optimization of the Growth Parameters of *Rhodococcus rhodochrous*: a Sulfur-Removing Bacterium, *Fuel*, **75**, 1596-1600.
12. Finnerty, W. (1994), Biosurfactants in Environmental Biotechnology, *Current Opinion in Biotechnology*, **5**, 291-295.