

미생물에 의한 석유의 탈황에 관한 연구

Studies on the Microbial Desulfurization of Petroleum

연구기관
한국과학기술연구원

과 학 기 술 처

제 출 문

과학기술처장관 귀하

본 보고서를 “미생물에 의한 석유의 탈황에 관한 연구(Ⅳ)”
과제의 최종보고서로 제출합니다.

1991. 7.

주관연구기관명:한 국 과 학 기 술 연 구 원

연구책임자:김병홍(공정연구부 책임연구원)

연구원:이진성(공정연구부 연구원)

여 백

요 약 문

I. 제 목

미생물에 의한 석유의 탈황에 관한 연구(Ⅳ)

Ⅱ. 연구개발의 목적 및 중요성

오늘날 전 세계적으로 에너지 소비절약 및 새로운 대체에너지의 개발, 그리고 환경문제에 대한 위기의식의 고조 등으로 인하여 세계에너지 중 석유가 차지하고 있는 비중이 감소되고 있으며, 석유 수요 경향도 경질화, 저유황화되고 있다.

그럼에도 불구하고 절대적인 석유의 소비량은 꾸준히 증가하고 있으며, 세계 원유 시장에서는 중질, 고유황 원유의 생산비중이 늘어나고 있어 경질유 및 저유황유의 부족현상이 심화되고 있다. 원유내 질소화합물과 유황성분은 주요한 대기오염원으로, 이 중 유황성분은 석유연소시 아황산가스로 대기에 유입되며, 대기 중 아황산가스는 대부분이 물분자와 결합하여 산성비의 형태로 토양생태계와 담수생태계에 유입되어 이들 생태계에 막대한 피해를 입힐 뿐만 아니라 콘크리트, 석회석, 철 등을 부식시켜 건물의 수명을 단축시키기도 한다.

유황의 이런 심각한 영향을 줄이기 위하여 선진국에서는 사용하는 원료유의 유황함량을 법으로 제한하고 있을 뿐만 아니라 그 허용함량도 대폭 줄여가는 추세에 있다. 이러한 연료유의 저유

황화를 위하여 각국에서는 막대한 경비를 투자하여 석유탄황공정시설을 갖추고 있다. 현재 사용되고 있는 탈황공정은 주로 화학적 방법으로 탈황 효율이 매우 높고 중질유의 분해도 동시에 가능하다는 장점은 있으나 증금속 촉매의 사용과 경제성 등의 문제점이 부각되어 새로운 탈황방법의 개발이 시급하게 요구되고 있다. 이 중의 하나가 미생물을 이용한 탈황 방법인데 본 연구에서는 혐기적 호흡(anaerobic respiration)을 하는 황산염 환원 세균(sulfate reducing bacteria)에 전기화학적으로 환원력을 공급한 탈황 방법의 가능성과 효율을 검토하고자 하며, 현재까지의 실험결과와 문제점은 아래와 같다.

1. 현재까지의 연구결과

- (1) 토양으로부터 유기유황화합물의 분해도가 높은 황산염 환원 세균을 분리하였으며 이 균주가 *Desulfovibrio desulfuricans*에 속함을 밝혔다.
- (2) 전자매개체를 이용한 전기화학에너지의 생물학적 이용가능성을 확인하였다.
 - 1) 여러가지 전자매개체를 이용하여 유황화합물 분해도를 시험해 본 결과 methyl viologen(MV)과 benzyl viologen(BV)을 이용했을때 분해율이 가장 높았다.
 - 2) MV을 전자매개체로 사용하여 *Clostridium acetobutylicum*의 발효산물을 분석한 결과 전기화학적 환원력을 공급하지

않은 경우보다 환원된 형태의 산물이 훨씬 증가하였다.

(단위 : mM)

	Butanol	Acetone	Butanol/acetone
대 조 구	74.6	37.8	1.97
전기화학에너지 공급	93.7	28.4	3.30

3) 황산염 환원균에 MV를 이용하여 환원력을 공급하여 키운 결과 대조구보다 H₂S의 발생은 증가하였고, CO₂ 발생은 감소하였다.

(단위 : mmol/ml)

	H ₂ S	CO ₂
대 조 구	2.06	4.34
전기화학에너지 공급	2.12	3.24

(3) MV를 전자매개체로 이용한 system에서 황산염 환원 세균에 의한 석유의 탈황

1) 표준 유기유황성분의 분해;

Benzothiophene, dibenzothiophene 등 thiophene 계열의 분해도가 높은 반면 sulfide, disulfide 계열의 화합물은 거의 분해되지 않았다.

2) crude oil의 탈황;

중온성 균을 사용할 경우 19%까지 탈황되었으며, 고온성 균은 21%까지 탈황이 일어났다. 그러나 원유 산지에 따라 탈황되는

정도는 다양하였는데 이는 각 원유내의 유황성분이 지역에 따라서 다르기 때문일 것으로 생각된다.

2. 문제점

- (1) 경제적 측면 : MV이 매우 고가이므로 plant scale에 사용하기는 비경제적이다.
- (2) 환경, 독성학적 측면 : MV는 소수성이 큰 질소화합물로 탈황공정시 석유로의 유입이 일정 정도 일어날 것이 예상되며 이는 또 다른 환경오염원이 된다. 그리고 MV는 미생물에 뿐만 아니라 식물과 동물세포에도 독성을 나타내기 때문에 공정상 많은 어려움이 따른다.
- (3) 탈황공정상의 문제점 : MV이 다른 전자매개체보다 좋은 것으로 드러났지만 탈황에 직접 관여하는 황산염 환원 세균의 성장을 억제하여 탈황이 효율적으로 일어나는 것을 저해하였다.

실험결과 MV이 발효로만 성장하는 clostridia와 발효로 성장하게끔 조건을 갖춘 상태의 황산염 환원 세균과 *Bacillus licheniformis*의 성장은 억제하지 못하였지만 혐기적 호흡으로 성장하는 황산염 환원 세균과 *B. licheniformis*의 성장은 저해하였다.

따라서 MV는 “shuttle” mechanism으로 세포를 자유롭게 왕복하면서 세균의 전자대사에 관여하여 호흡으로 성장하는 세균의 성장을 억제하는 것으로 사료된다.

전기화학적 에너지의 생물학적 이용은 많은 연구가 진행되어

오고 있으며 본 실험에서는 황산염 환원 세균을 이용한 세균의 탈황에 적용시켜 그 환원력을 석유내 유황 성분의 환원에 이용됨을 밝혔다.

Ⅲ. 연구개발의 내용 및 범위

지금까지의 실험에 있어서는 전자매개체를 사용하여 전극으로부터의 전자를 세포내의 전자 대사 경로에 간접적으로 유입하여 세균의 환원력으로 이용할 수 있음을 밝혔다.

그러나 1970년대 이후 전자 매개체를 사용하지 않고 전극의 전자를 직접 효소나 생체내 고분자로 전달하여 산화-환원 반응을 직접 유도할 수 있다는 보고가 많이 나오고 있다. 보통의 백금 전극이나 무기물로 된 전극에서는 생체 고분자 물질로의 전자 전달이 되지 않지만 전극의 표면을 유기물질로 변형시키든지 전도성 유기 금속 전극을 사용할 경우 단백질 원래의 활성을 유지하면서 전자를 단백질의 금속 또는 active site로 전달할 수 있다고 보고하였다.

또한 Liposome이나 Bilayer Lipid membrane에 전도성 유기 물질을 처리할 경우 membrane의 전자 전도성이 증가된다는 보고가 되어 있다.

본 실험에서는 위의 전기 화학 실험의 결과에 의거하여 세포막을 전도성 유기 금속으로 변형시켜 전자가 이동할 수 있는 "pore" 내지 "channel"을 만들어 그 부위를 통하여 전극과의 interaction에 의해서 전자를 세포 내부로 보내어 탈황 반응을 일

으키는 방법을 개발하고자 한다.

이를 위한 실험 계획은 다음과 같다.

1. 세균의 outer membrane이나 원형질막에 내재되어 막의 전도성을 증가시키는 전도성 유기 물질의 개발

이런 기능을 하기 위해서는 일정 정도의 수용성을 지니면서 lipid에 대한 친화력이 커서 미생물이 생존하는 수용액에 처리했을 때 세포의 지질층에 내재되어야 할 뿐만 아니라 수층에서 안정하여 수용액에 처리하였을 때 특유의 전자 전도성을 상실해서는 안 된다. 위의 특성을 가지는 전도성 유기 금속을 찾기 위해,

- a. 전도성 유기 금속의 전기 화학적 특성
- b. 수용성과 유기 용매로의 전이도
- c. 세포 생육 억제 효과
- d. 세균의 막전위차 변화 여부
- e. 미생물에 처리하였을 때의 전기화학적 특성

을 조사하여 적합한 전도성 물질을 선택하기로 하였다.

2. 전도성 유기 물질이 미생물의 지질막에 내재되어 전자 전도성을 증가시키고 미생물의 전자 대사에 유입되는지 알아보기 위하여 전도성 유기 금속을 처리한 황산염 환원 세균에 전기 화학적 환원력을 공급하여 표준 유황 화합물과 원유가 분해되는지 살펴본다.

IV. 연구개발 결과 및 활용에 관한 건의

1. 생체막을 변형시키는 전도성 유기 금속으로는 TCNQ, LiTCNQ, PMS를 선별하여 성질을 조사하였는데 이중 LiTCNQ는 자체가 전기 전도성을 가질 뿐만 아니라 1% 정도의 수용성을 가지며 용매로의 전이도가 매우 높았으며 cell에 처리할 경우 세포막과 interaction하는 것으로 드러났다. 그러나 TCNQ는 소수성이 너무 강하여 물에 녹지 않는 관계로 수용액 상태에 존재하는 미생물에도달하기 전에 침전이 생기며 PMS는 용해도가 10% 정도이고 유기 용매로의 전이도는 40% 정도로 낮았으며 세균에 처리한 경우 많은 부분이 세균과 interaction하지 않고 수용액에 잔존하였다.

2. LiTCNQ와 PMS의 미생물 생육 저해 효과를 조사해 본 결과 LiTCNQ가 PMS보다 더 낮은 농도에서 생육을 저해시켰으며 Gram 음성 세균인 황산염 환원 세균보다 Gram 양성 세균인 *Clostridium* 이 더 생육저해 작용을 받았다.

이는 LiTCNQ와 PMS의 지질에 대한 친화도와 Gram 양성 세균과 Gram 음성 세균의 membrane structure의 차이로 설명할 수 있을 것으로 생각한다. 즉, LiTCNQ의 membrane에 대한 친화력이 PMS보다 크기 때문에 낮은 농도에서도 membrane을 변형시켜 세포의 생육을 저해할 수 있고 Gram 음성 세균은 원형질막 외에도 outer membrane을 가지고 있기 때문에 Gram 양성 세균보다 더 높은 막 변형 물질이 있어야 원형질막을 변형시켜 생육 저해 현

상이 일어날 것으로 사료된다.

3. 전도성 물질의 전기 화학적 특성은 PMS는 $\pm 0.02V$ 에서 산화-환원이 일어나지만 LiTCNQ는 약 $-0.5V$ 부근에서 환원이 일어나는 것으로 나타났다.

황산염 환원 세균에서 탈황에 중요한 역할을 하는 $cytc_3$ 가 표준전위가 $-0.2 \sim -0.3V$ 인 것을 고려할 때 $cytc_3$ 로 전자를 전달하기 위해서는 LiTCNQ가 더 적합한 물질이다.

4. PMS를 처리한 황산염 환원 세균으로 원유 탈황 실험을 한 결과 황의 제거는 전혀 이루어지지 않았다.

5. LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균으로 유기 유황 물질인 benzothiophene을 분해한 결과 대부분의 benzothiophene이 분해되었다. 한편, 전기 화학적 환원력을 공급하지 않은 황산염 환원 세균을 이용한 경우에도 benzothiophene의 분해가 일어나므로 실질적으로 전도성 유기 금속을 통하여 전자가 세포 내부로 유입되었는지는 불확실하다.

이상의 결과로 membrane을 변형시켜 탈황이 일어나게 하는 system은 우선 다음의 사항들이 먼저 고려되어야 할 것이다.

1. Intact한 세균의 membrane에 전도성 물질을 내재시키는 보다 효율적인 방법이 우선 개발되어야 한다. Liposome이나 Bilayer lipid

membrane은 제조시 전도성 물질을 처리하면 지질층에 완전히 integration시킬 수 있지만 완전한 cell membrane에 처리할 경우는 외부 표면 부분과 interaction하거나 일부만 파고들어갈 확률이 크다.

2. 동시에 새로운 유기 전도성 물질의 합성이 필요하다. TCNQ와 같은 분자는 분자 크기가 세포막의 두께에 비해서 작아 많은 분자가 동시에 membrane에 stacking되어야만 electron channel을 형성할 수 있다. 이런 점을 극복하기 위하여 전도성 유기 금속에 인지질의 탄화수소 chain과 유사한 구조를 갖는 amphipathic long chain을 붙인 유도체를 만들어 본 실험에 적용시킬 수 있을 것으로 본다.

3. 전극도 일반적인 전극보다는 표면을 유기물로 변형시켜 세균의 membrane 부위와의 친화도가 높은 전극을 만들어야 한다.

일반적으로 단백질과 같은 생체내 고분자와 전극 사이의 직접적인 전자 교환은 속도가 느리다고 보고되고 있으므로 세포-전극 사이의 효율적인 전자 전달을 위해서는 전극 표면을 변형시키는 것이 유리할 것이다.

여 백

SUMMARY

I. Project Title

Studies in the Microbial Desulfurization of Petroleum(IV)

II. Objectives and Importance of the Project

Owing to the recognition of the seriousness of the worldwide environmental disruption, many countries limited the content of the pollutive components in the usable fuels including petroleum. Sulfur is one of the most deleterious pollutant found in petroleum and coals. During the combustion of the fossil fuels, sulfur compounds are oxidized to SO_2 and SO_3 which cause the acid rain. Acid rain extensively devastates the aquatic and terrestrial ecosystem, so the endeavors are made to reduce the sulfur contents of the fossil fuels. The most extensively used method of desulfurization is the chemical treatments of petroleum during its refinery process. The sulfur compounds are reduced to hydrogen sulfide in the desulfurization process using hydrogen and catalyst at high temperature and pressure. This process requires much capital investment and operation cost.

Various attempts have been made to develop alternative desulfurization process. One of them is the method using microorganisms which have the degradability of sulfur compounds.

In our laboratory bioelectrochemical desulfurization process using

anaerobic sulfate reducing bacteria of whose reducing equivalents were supplied electrochemically has been studied.

1. Previous Results

- 1) We isolated sulfate reducing bacteria having high degradability of organic sulfur compounds, one of which has been identified as a strain of *Desulfovibrio desulfuricans*.
- 2) We ascertained the biological usability of the electrochemical energy via electron mediator.
 - a. *Clostridium acetobutylicum* produced enhanced amount of more reduced end product when reducing power was supplied electrochemically using methyl viologen as an electron mediator.
 - b. Supplied with electrochemical reducing equivalents, *D. desulfuricans* produced more H₂S but less CO₂ compared to the culture of it which was not supplied with electrochemical reducing power.
- 3) Degradation of organic sulfur compounds using *D. desulfuricans*.
 - a. Thiophenes were more easily degraded than sulfide and disulfides.
 - b. About 21% of the sulfur compounds were removed from

Kuwait crude oil using *D. desulfuricans* in the supply of electrochemical reducing equivalents.

2. Disadvantages

- 1) Methyl viologen was highly costly
- 2) Methyl viologen was highly toxic to human and *D. desulfuricans*, so the efficient desulfurization was impossible.

III. Contents and Scope of the project.

Based on the results described above, attempts were made to develop more efficient microbial desulfurization process in which electron mediators such as methyl viologen are not used. We are to develop the method of desulfurization using membrane-modified sulfate reducing bacteria which can utilize electrons from electrode without the mediation of electron mediator. Plans to develop this process are as follows:

1. Screening of conducting materials which confer electroconductivity to cell membrane when embedded in it.

2. Study of characteristics of membrane-modified cell which was treated with the screened conducting substances.

3. Study of the degradation of organic sulfur materials by membrane-modified sulfate reducing bacteria using electrochemical method.

IV. Results and Proposals for their applications.

Major findings in the fourth year of the project are as follows:

1. TCNQ, PMS and LiTCNQ were examined for the feasibility of our experiment. LiTCNQ was the most suitable substance which has appropriate water solubility and electroconductivity.

2. LiTCNQ inhibited growth of *D. desulfuricans* and *C. acetobutylicum* at the lower concentration than PMS. This result can be explained by the difference of affinity to cell membrane of each compound.

LiTCNQ is more hydrophobic than PMS and it interacts and modifies the cell membrane with ease at lower concentration, so bacterial cells were more easily affected by LiTCNQ.

The mechanism of the toxic effect of the LiTCNQ was not definitely explained but we thought LiTCNQ inhibited the growth by dissipating proton motive force across the cell membrane.

3. Sulfate reducing bacteria treated with LiTCNQ could reduce benzothiophene up to about 90% in the supply of electrochemical

reducing equivalent. Also, without the supply of the reducing equivalents benzothiophene was degraded up to 90% by sulfate reducing bacteria which was not treated with LiTCNQ.

PMS-treated sulfate reducing bacteria could not remove the sulfur compounds from petroleum.

From the results, it can be said that organic conducting materials modify the cell membrane and confer enhanced electroconductivity to cell membrane but electron transfer from electrode to cytoplasm or periplasm through them is impossible or requires more sophisticated method. The problems must be solved are as follows:

1. The more improved method to integrate or embed the conducting materials in cell membrane.
2. Screening of conducting materials which more easily transfer electron from electrode to cell inner portion.
3. Development of electrodes which have enhanced affinity to organic compound and organic conducting material.
4. It may be necessary to find the innocuous mediator which does not inhibit enzyme activity and easily react with metalloproteins.

여 백

CONTENTS

Summary	3
Chapter 1. Introduction	25
1. Necessity of desulfurization of petroleum	25
2. Methods of desulfurization of petroleum	26
3. Microbial desulfurization of petroleum	28
4. Bioelectrochemical desulfurization of petroleum	30
5. Conducting organic metals	41
6. Cyclic voltammetry	42
Chapter 2. Materials and Methods	46
1. Materials	46
1) Microorganisms	46
2) Reagents	46
3) Apparatus and Equipments	46
2. Methods	47
1) Media	47
2) Preparation of TTF. TCNQ organic metal electrode	49
3) Preparation of LiTCNQ	50
4) Properties of organic conducting materials	50

5) Cyclovoltammography	53
6) Bioelectrochemical desulfurization of petroleum using PMS-treated sulfate reducing bacteria	55
7) Quantitative analysis of sulfur content in petroleum	55
8) Bioelectrochemical degradation of Benzothiophene using LiTCNQ-treated sulfate reducing bacteria	57
9) Determination of proton motive force	58
 Chapter 3. Results and Discussion	 63
1. Properties of TCNQ	63
2. Cyclic voltammetry of TCNQ and TCNQ-treated sulfate reducing bacteria	66
3. Growth inhibitory effect of PMS and LiTCNQ	69
4. Determination of proton motive force	72
5. Properties of LiTCNQ and interaction of LiTCNQ with sulfate reducing bacteria	74
6. Cyclic voltammetry of LiTCNQ and LiTCNQ treated sulfate reducing bacteria	79
7. Bioelectrochemical degradation of benzothiophene using LiTCNQ-treated sulfate reducing bacteria	83
8. Properties of PMS and interaction of PMS with sulfate reducing bacteria	86
9. Cyclic voltammetry of PMS and PMS-treated sulfate	

reducing bacteria	89
10. Bioelectrochemical desulfurization of petroleum using PMS-treated sulfate reducing bacteria	91
References	95

여 백

목 차

요 약 문	3
제1장 서 론	25
1. 석유 탈황의 필요성	25
2. 석유 탈황 방법	26
3. 미생물을 이용한 석유의 탈황	28
4. 생물 전기화학적 석유 탈황	30
5. 전도성 유기 금속	41
6. Cyclic voltammetry	42
제2장 재료 및 방법	46
1. 재 료	46
1) 균 주	46
2) 시 약	46
3) 기구 및 기기	46
2. 방 법	47
1) 배 지	47
2) TTF, TCNQ 유기 금속 전극의 제조	49
3) LiTCNQ의 제조	50
4) 유기 전도성 물질의 성질	50
5) Cyclovoltammography	53

6) PMS를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 원유의 탈황	55
7) 원유의 유황 함량 정량	55
8) LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 benzothiophene의 분해	57
9) Proton motive force의 측정.....	58
제3장 결과 및 고찰.....	63
1. TCNQ의 성질.....	63
2. TCNQ 및 TCNQ를 처리한 황산염 환원 세균의 cyclovoltammetry	66
3. PMS와 LiTCNQ의 미생물에 대한 생육 저해 작용.....	69
4. LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균의 PMF 측정	72
5. LiTCNQ의 성질 및 황산염 환원 세균과의 상호작용.....	74
6. LiTCNQ 및 LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균의 cyclovoltammetry	79
7. LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 benzothiophene의 전기화학적 분해	83
8. PMS의 성질 및 황산염 환원 세균과의 상호작용	86
9. PMS 및 PMS를 처리한 황산염 환원 세균의 cyclovoltammetry	89
10. PMS를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 원유의 탈황 ...	91
참고문헌	95

제 1 장 서 론

제 1 절 석유 탈황의 필요성

자동차산업의 급속한 발달과 산업의 발전에 따른 에너지 수요의 증가에 따라 석탄, 석유와 같은 화석연료의 소비는 급격히 증가하였으며 이중 석유는 세계에너지 사용량 중 가장 많은 비중을 차지하고 있다⁽¹⁾.

석유의 성분은 대부분이 탄화수소(hydrocarbon)로 이루어져 있으며 황성분은 약 0.04~5 weight%로 탄소와 수소에 이어 세번째로 많은 원소이다⁽²⁾. 석유의 유황성분은 여러가지 문제를 유발시키는 것으로 보고되었는데⁽³⁾, 고유황 원유는 공정단계에서 생산과 정제에 이용되는 금속을 부식시키며⁽⁴⁾ 석유가 연소될 때 유황분은 아황산가스(SO₂)로 대기에 유입되어 물분자와 결합하여 산성비의 형태로 생태계로 유입된다. 산성비는 생태계 파괴의 주원인으로 농작물과 삼림지대에 큰 피해를 입히며 담수생태계에도 유입되어 상수도원과 물고기를 오염시킨다. 뿐만아니라 산성비는 카드뮴, 수은, 납 등 인체에 해로운 중금속을 용해되기 쉽도록 만들어 이들 중금속이 저수지로 흘러들어 인간에게 피해를 입히며 콘크리트, 석회석, 철 등을 부식시켜 건물의 수명을 단축시키기도 한다.

이런 심각한 환경피해를 막기 위하여 석유의 탈황이 요구되었으며 선진국가에서는 법으로 연료유의 유황함량을 제한하고 있을

뿐만아니라 그 제한함량도 대폭 줄여가고 있다⁽¹⁾. 현재 우리나라의 경유 유황 함량은 0.4 weight% 이하로 제한하고 있으나 이를 0.2 weight% 이하로 줄일 것을 계획하고 있으며 미국에서는 0.05% 이하로 줄일 계획을 하고 있다⁽¹⁾.

그러나 이러한 요구와는 반대로 국제 원유시장에서는 고유황 원유의 생산이 증가하고 있어 저유황유의 부족현상이 심화되고 있다. 따라서 석유의 탈황시설은 더욱 절실하게 되었고 우리나라에서도 정부가 각 정유사에 중질유 분해 및 탈황시설을 갖출 것을 요구하여 1993년까지 하루 10만 배럴의 석유를 탈황시킬 수 있을 것으로 전망된다.

제 2 절 석유 탈황 방법

원유내의 유기유황물질의 종류는 그림 1에서 보는 바와 같이 13개의 군으로 묶을 수 있으며 현재까지 200개 이상의 유기유황화합물이 밝혀졌다⁽⁴⁾. 무기유황화합물이나 지방족 유기유황화합물은 단순한 물리적 방법이나 화학적 방법에 의해 제거할 수 있으나 thiophene 계열의 방향족 유황물질은 특이한 금속촉매를 사용하거나 고온, 고압에서 처리해야 황성분을 제거할 수 있다.

화학적 탈황방법은 원유 중의 유황 함량 및 종류에 따라 다른 방법을 쓰게 되는데 천연가스처럼 황분이 적을 경우에는 활성탄 및 알루미나 등의 흡착제를 써서 상온에서 탈황한다. 이 때 황분이 많은 경우에는 360~400°C에서 산화아연(ZnO)층을 통해 황

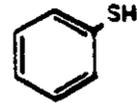
Thiols (mercaptans)



alkyli

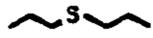


cyclic

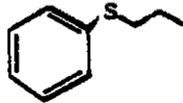


aromatic

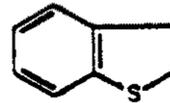
Sulfides



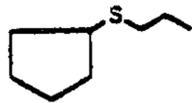
dialkyl



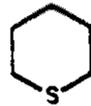
alkylaryl



thiaindan



alkylcycloalkyl



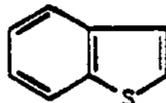
cyclic

Disulfides

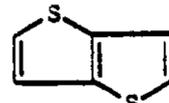
Thiophenes



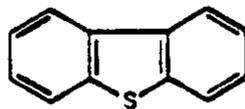
alkyli



benzo



thieno



dibenzo

Fig. 1. Major sulfur compounds present in petroleum

화아연(ZnS)으로 포착한다. 그러나 많은 황화합물이 이러한 방법으로 제거되지 않으므로 고온, 고압상태에서 촉매를 이용한 탈황법을 쓴다.

이 방법에는 수소 존재하에서 반응시키는 수소화 탈황법과 수소를 사용하지 않는 접촉 탈황법이 있다⁽⁵⁾.

1. 수소화 탈황법

원유를 고온, 고압상태에서 코발트-몰리브덴계 혹은 니켈-코

발트-몰리브덴계 촉매를 이용하여 탈황하는 방법으로 거의 100%까지 탈황시킬 수 있어 품질이 우수한 석유를 얻을 수 있다. 이 방법은 수소를 첨가하여 탈황시킨다는 의미에서 수첨탈황법이라고도 부른다. 이 방법은 경질유의 탈황에는 비교적 용이하나 중질유의 경우에는 asphaltene과 금속화합물이 많이 들어있어 탈황 촉매의 기능을 저해한다. 따라서 경질유의 경우에는 주로 직접탈황법을 쓰며 중질유는 상압잔사유를 감압증류하여 감압경유분을 분리한 후 감압증류 잔사유를 혼합하는 간접탈황법을 주로 사용한다⁽¹⁾.

2. 접촉탈황법

백토, 보키사이트 등을 촉매로 하여 온도 340~450°C, 압력 35 kg/cm² 정도로 휘발유를 처리하면 황화합물을 분해하여 황화수소를 발생시킨다. 냉각후 가성소다 수용액으로 씻어 제거한다. 이 방법은 촉매 수명이 짧고 정제 손실도 0.5~2% 정도나 되어 거의 이용되지 않는다.

제 3 절 미생물을 이용한 석유의 탈황

이상에서 논술한 화학적 탈황 방법은 탈황효율이 100% 정도로 매우 효율적일뿐만 아니라 중질유의 분해도 동시에 할 수 있다는 장점을 가지고 있다. 그러나 이 방법은 고온, 고압을 유지해야 하고 값비싼 중금속 촉매를 사용하여야 할 뿐만 아니라 금속 촉매들은 석유내의 중금속 성분에 의해 활성이 저해를 받는 것으로

로 알려지고 있다. 이러한 문제를 해결하기 위하여 여러가지 방법들이 검토되고 있는데 이중 하나가 미생물을 이용한 탈황방법이다.

현재까지 미생물을 이용한 석유의 탈황에 관한 연구는 주로 호기성 세균을 통해서 이루어졌다. 이들 세균들로서는 *Pseudomonas* 속을 주축으로 하여 *Sulfolobus*, *Beijerinckia*, *Bacillus*, *Flavobacterium*, *Acinetobacter* 등이 포함된다. 이들은 석유내에 있는 thiophene 계열의 유기유황화합물을 수용성의 황화합물로 전환시켜 제거할 수 있다고 보고되었다⁽⁶⁾. 특히 *Pseudomonas*에서는 dibenzothiophene을 분해하는데 관여하는 효소들이 degradative plasmid에서 coding된다는 사실이 밝혀져^(7, 8) 유전자 제조합기술을 이용하여 석유 탈황 효율을 높이려는 연구가 진행되고 있다.

혐기성 세균을 이용한 석유의 탈황은 1953년 Zobell에 의해 처음으로 성공하였는데 그는 혐기성 상태에서 수소를 공급해주면 원유내의 세균에 의해 유황성분이 mercaptan이나 H₂S로 전환된다는 사실을 밝히고 또한 hydrogenase가 수소분자를 활성화시켜 유황화합물의 유황에 결합시켜 탈황이 일어난다고 발표하였다⁽⁸⁾.

이후에는 혐기상태의 석유탈황에는 수소 존재하에 methyl viologen이 필요하며⁽¹⁰⁾ 탈황에 관여하는 균은 *Desulfovibrio*임이 밝혀졌다⁽¹¹⁾.

미생물을 이용한 탈황은 여러가지 노력에도 불구하고 상업적으로 실용화된 공정은 없다. 미생물을 이용한 탈황 정도는 아직까지 50% 정도밖에 미치지 못하였는데 이는 미생물이 석유의 유황화합물에 쉽게 접근하지 못하는데 부분적인 이유가 있다. 또한 미

생물을 이용한 탈황에 결정적인 역할을 하는 효소는 기질에 대해 매우 특이적으로 작용하기 때문에 수백가지에 이르는 석유내 유황 성분을 효과적으로 분해하는데는 한계가 있을 것으로 보여진다. 이러한 문제점들을 보완하기 위하여 들연변이 유발을 통한 탈황 활성이 증대된 균주의 개발⁽¹²⁾, mixed population을 이용한 탈황에 대한 연구 등이 진행되고 있다.

제 4 절 생물 전기화학적 석유 탈황

생물전기화학이란 생물계나 생체물질에서의 전하의 이동과 배열, 생물현상을 연구함에 있어서의 전기화학적 방법의 사용, 전기화학적 목적을 위한 생체내 물질의 이용 등을 연구하는 학문이다⁽¹³⁾.

생물대사에 전기화학을 도입한 것은 1911년 Potter가 전극을 사용하여 균주 배양 중 산화-환원 전위를 측정함으로써 시작되었으며 오늘날에는 biosensor, fuel cell, stereospecific chemicals의 합성을 포함한 bioorganic synthesis, 발효를 포함한 광범위한 분야에서 이용되고 있다⁽¹³⁻¹⁵⁾. 뿐만아니라, 미생물의 에너지대사 측면에서 전기화학적 산화력 혹은 환원력을 직접 미생물이 사용할 수 있는 에너지로 전환될 수 있다는 연구도 계속 진행되어왔다. Hongo와 Iwahara는 200~300 $\mu\text{A}/\text{cm}^2$ 의 전류를 직접 *Brevibacterium flavum*의 L-glutamic acid 발효에 공급함으로써 L-glutamic acid의 생산을 10% 이상 증가시킬 수 있었는데, 이는 세균의 대사에 과잉의 환원력을 공급함으로써 인하여 생물체의 대사가 이 과잉전자를 빨리 제거하는

쪽으로 대사가 치우쳤기 때문이다^(16, 17).

Emde와 Schick는 *Propionibacterium freundenreichii*의 propionate 발효에서 전기화학적 환원력을 발효조에 공급하여 propionate의 생산을 약 50% 정도 증가시켰다고 보고하였다⁽¹⁸⁾. 전기화학적 환원력을 공급하지 않은 대조구에서는 acetate:propionate의 비율이 27:73이었으나 환원력을 공급한 경우에는 최고 3:97까지 증가되어 전기화학적 환원력의 공급에 의해 생물체내의 전자대사가 환원정도가 높은 산물의 생산쪽으로 이동한다고 보고하였다. 본 실험실에서도 *Clostridium acetobutylicum*의 butanol-acetone 발효에서 methyl viologen을 전자매개체로 사용하여 전기화학적 환원력을 미생물에 공급해 준 결과, 보다 환원된 산물인 butanol의 생산은 증가한 반면 산화정도가 높은 acetone의 생산은 감소함을 밝혔다⁽¹⁹⁾. 이는 세포내의 전자대사에 관여하는 여러 종류의 효소들이 전극으로부터의 전자를 공급받아 세포내 전자대사를 이동시켜 일어나는 것으로, 앞에 열거한 경우들은 전기화학적 에너지를 생물에너지로 전환시킬 수 있다는 것을 보여준 것이라 하겠다.

이 외에 전기화학을 생물학 분야에 이용한 예는 다양한데, 미생물의 분류⁽²⁰⁾, 핵산(DNA) 성질의 분석⁽²¹⁾, 단백질을 비롯한 생물체내의 화합물의 분석⁽²²⁾을 포함한 광범위한 분야에 응용되고 있다.

1. 황산염 환원 세균을 이용한 전기화학적 석유 탈황

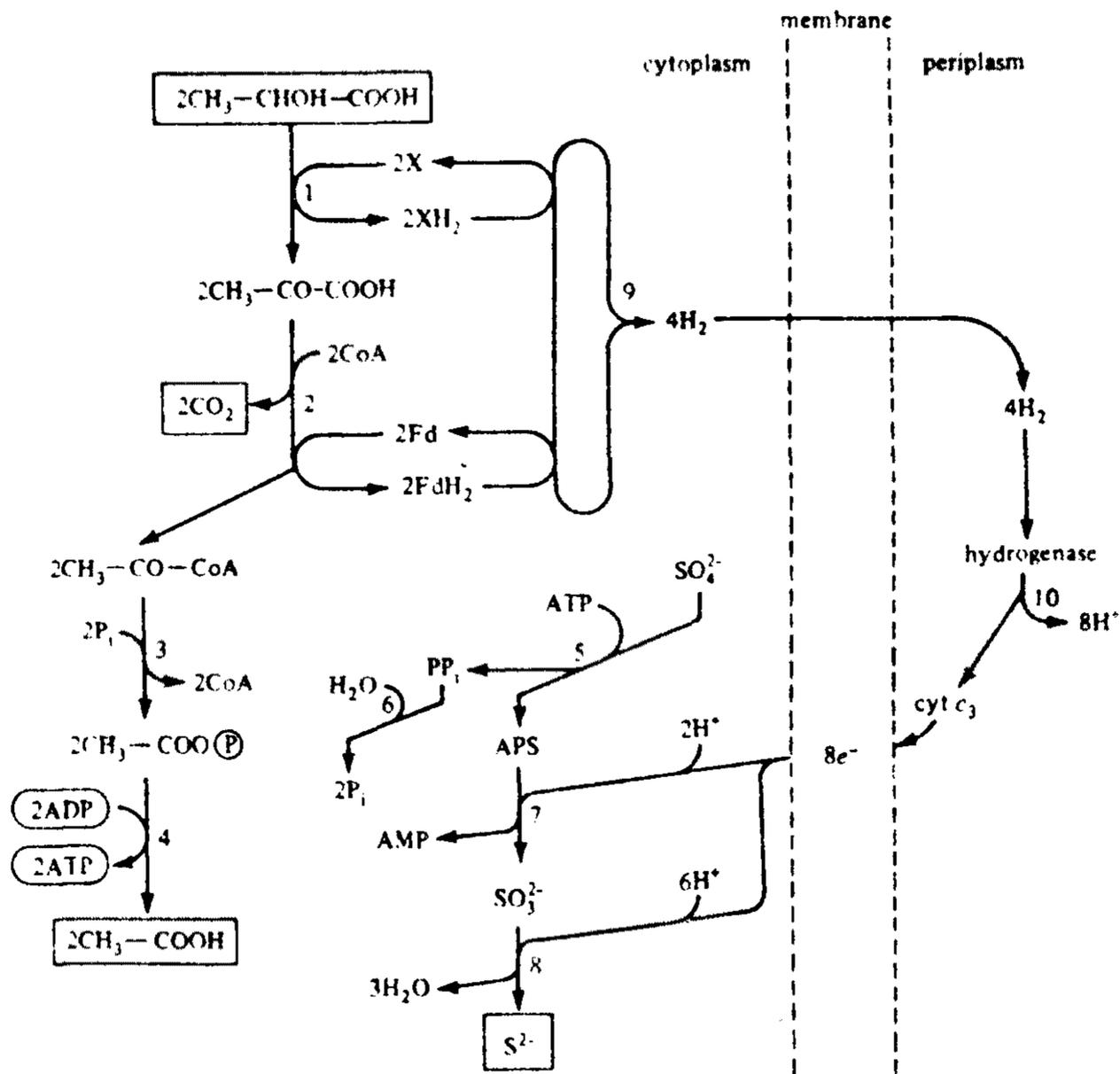
앞에서 언급한 황산염 환원 세균에 의한 석유 탈황의 경우에는 methyl viologen과 함께 수소가스를 환원력원으로 공급해 주어

야 하는데 이 방법은 scale-up 실험에서는 비경제적일 뿐만아니라 수소가스를 공급해주는 데는 공정상의 위험성이 있어 보다 안전하고 효율적인 환원력의 공급이 필요하게 되었다. 이 문제를 해결하기 위해 본 실험실에서는 전극으로부터의 전자를 미생물에 환원력 원으로 공급하여 석유 탈황이 일어나는지 연구하였다.

본 연구에서 사용한 황산염 환원 세균은 *Desulfovibrio desulfuricans*로 Malaysia의 토양에서 분리한 균 중에서 수소화효소 (hydrogenase)의 활성과 dibenzothiophene의 분해율이 높은 균주를 선발하였다.

*D. desulfuricans*는 편성 혐기성 세균으로, 성장에 필요한 에너지를 혐기적 호흡(anaerobic respiration)으로 얻는데 lactate를 전자 공여체로 하고 산소분자 대신 황산염(SO_4^{-2})을 최종 전자 수용체로 사용하여 호흡한다⁽²³⁾. 이 균의 생체대사활동 중 가장 두드러진 특징은 탄소대사와 에너지대사 가운데 수소분자가 관여하여 생명현상에 필수적인 ATP 생산에 중요한 역할을 한다는 것이다.

그림 2에서 보듯이 *D. desulfuricans*는 원형질내에서 두 분자의 lactate를 두 분자의 acetate로 산화하면서 두 분자의 ATP와 네 분자의 수소를 생산하는데, 수소 생산에는 원형질내의 수소화효소가 관여한다. 반면 SO_4^{-2} 의 환원에는 두 분자의 ATP가 필요한데 lactate가 acetate로 산화되면서 생산되는 ATP, 즉 substrate-level phosphorylation으로는 SO_4^{-2} 환원에 필요한 에너지밖에 충당하지 못하므로 세균의 성장을 위해서는 이 외의 다른 기작인 electron-transport phosphorylation(ETP)에 의한 ATP의 생산이 필요하다는



ATP balance

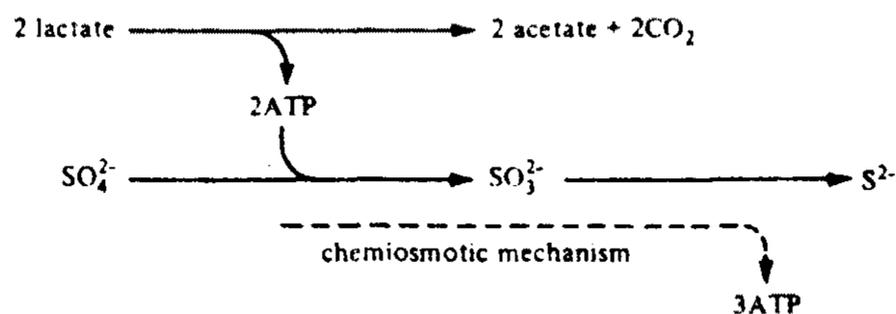


Fig. 2. Pathway of dissimilatory sulfate reduction in *Desulfovibrio* species and "hydrogen cycling" hypothesis. 1, Lactate dehydrogenase, membranebound, H-acceptor not known; 2, pyruvate-ferredoxin oxidoreductase; 3, phosphotransacetylase; 4, acetate kinase; 5, ATP sulfurylase; 6, pyrophosphatase; 7, APS reductase; 8, sulfite reductase; 9, cytoplasmic hydrogenase; 10, periplasmic hydrogenase.

것을 알 수 있다.

ETP 과정은 원형질내에서 lactate가 acetate로 산화되는 과정에서 수소화효소에 의하여 만들어진 네 분자의 수소가 원형질막을 통하여 periplasm으로 이동하면서 시작된다. Periplasm에서 H_2 는 periplasmic hydrogenase와 cytochrome c_3 의 작용에 의하여 산화되면서 전자는 $cytc_3$ 를 통하여 다시 원형질막의 전자전달체로 전달되어 SO_4^{-2} 를 환원하는데 이용되고 proton은 원형질막의 외부에 남게 된다. 따라서 이 과정의 net effect는 $8H^+$ 을 원형질막 외부로 방출하여 proton gradient가 형성되게 하는 것으로 이 proton gradient는 ATPase의 작용에 의하여 ATP를 합성하는 에너지로 작용한다. 이러한 ATP 합성기작을 “hydrogen cycling” 가설이라 부르며 이 과정에는 periplasm의 hydrogenase와 cytochrome c_3 가 중요하다는 것을 알 수 있다.

*D. desulfuricans*는 periplasm에 낮은 산화-환원 전위를 갖고 가역적으로 산화-환원이 되는 cytochrome c_3 와 hydrogenase를 가지고 있기 때문에 음극으로부터 세포에 전자를 공급해 주면 $cytc_3$ 와 hydrogen cycling 기작에 의해 외부로부터의 전자를 생체내에서 이용할 수 있게 될 뿐 아니라 석유내의 유기 유황물도 H_2S 형태로 환원시키게 된다. 그러나 세균의 가장 외부는 outer membrane이라는 지질막으로 둘러싸여 있기 때문에 전극으로부터의 전자가 $cytc_3$ 에 직접 접촉할 수 없으므로 전극과 $cytc_3$ 사이의 전자교환을 매개하는 전자매개체가 필요한데 이때 전자매개체로는 methyl viologen을 사용하였다.

이상의 *D. desulfuricans*를 이용한 전기화학적 탈황 방법은 그림 3과 같이 도식화할 수 있다.

전자매개체를 이용하여 생물 전기화학적 탈황을 해 본 결과 고유황원유인 Kuwait산 원유를 20%까지 탈황시킬 수 있었으며 원유를 증류시켜 비등점에 따라 분리하여 각 fraction을 탈황시킨 결과 비등점과 유기유황 함량이 높고 thiophene 계열의 유황 물질이 많이 함유된 중유분의 탈황 정도가 가장 높다는 것을 밝혔다.

그러나 이 system은 미생물로 이용한 전기화학적 탈황 방법의 가능성은 제시하였으나 전자매개체로 인한 많은 문제점들이 나타났다.

전자매개체로 이용되는 methyl viologen(MV)이 황산염 환원균의 성장을 억제하여 탈황의 효율을 어느 정도 이상 증가시키지 않으며, MV의 가격이 매우 비쌌 뿐만 아니라 질소를 함유한 hydrophobicity가 큰 화합물로 탈황 반응시 일부가 석유로 유입되어 석유 연소시 NO_x 형태로 대기에 유입되어 새로운 대기 오염원이 되므로 이런 문제점들을 유발하지 않는 경제적이고 효율적인 방법의 개발이 필요하였다.

전자매개체의 이런 단점들을 없애고 효율적인 탈황을 위해서 본 연구에서는 전도성 유기금속물질로 황산염 환원 세균에 처리하여 균의 outer membrane을 전도성을 갖게끔 변형시켜 전극으로부터의 전자가 직접 세균의 전자전달계로 전달되어 황을 분해하는 방법에 대해서 고찰하였다.

본 연구에서 membrane 변형 물질로는 1, 1', 7, 7'-tetracyano-

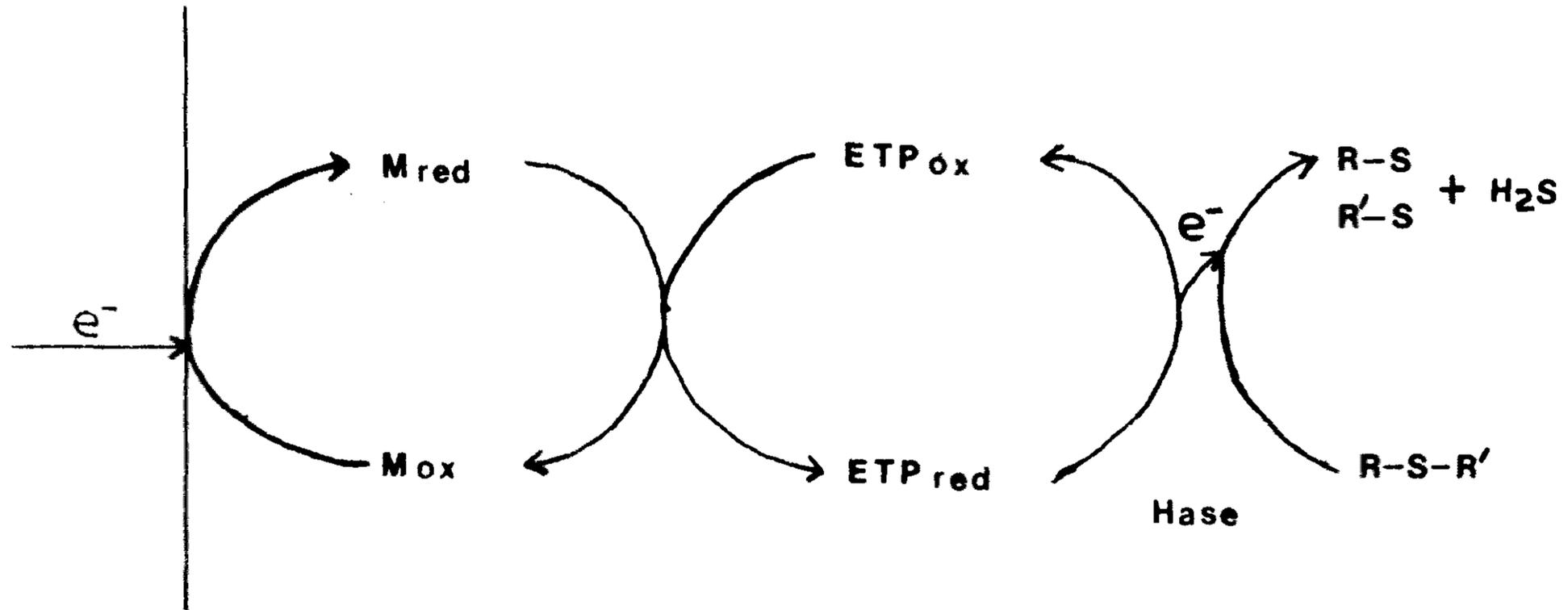


Fig. 3. Schematic diagram of electron mediator-mediated microbiological desulfurization

quinodimethane(TCNQ)을 사용하였는데, TCNQ는 1960년 이후로 organic superconductor 합성에 있어서 electron acceptor로 널리 이용되어 오고 있으며⁽²⁵⁾, Tien 등은⁽²⁶⁾ bilayer lipid membrane(BLM)을 만들 때 TCNQ를 섞어 만들면 전도성이 없는 BLM의 전도성이 TCNQ의 양에 따라 증가한다고 보고하였다. 또한 Tren, Higgins, Kell 등은 그 작용은 다르지만 TCNQ가 생체에 매우 toxic하다고 밝혔다.

그런데 TCNQ는 수용성이 전혀 없는 소수성 물질일 뿐만 아니라 BLM에 내재시 전자전도성을 증가시키는 것으로 미루어 보아, TCNQ가 toxic effect를 나타내는 이유는 세포의 막부위에 끼어 들어 막전위차를 제거하기 때문일 것으로 추측된다.

원형질막은 양극성의 인지질로 구성되어 proton을 비롯한 ion의 투과가 일어나지 않고 막의 절연성이 높아 전자의 이동이 일어나지 못하므로 막을 사이에 두고 세포 내부와 외부 사이에는 proton gradient와 막전위차가 동시에 존재하게 되며 이로 인해 생명 현상이 유지된다. 그런데 membrane에 전도성 물질을 처리하여 전자의 흐름을 자유롭게 만들어 준다면 membrane을 사이에 둔 proton motive force가 파괴되고 세포는 더 이상 생명을 유지하지 못하게 되는데 TCNQ도 원형질막에 내재되면 위의 기작으로 cell에 toxic한 효과를 줄 것이다.

황산염 환원 세균은 Gram 음성 세균으로 세포의 원형질을 둘러싸고 있는 원형질막 외에도 세포벽 바깥으로 outer membrane이라는 인지질을 기본으로 하는 막이 둘러싸고 있다. 이 outer

membrane(OM)은 대부분의 분자가 자유롭게 이동할 수 있고 proton motive force를 유지시키는데 아무 기능도 하지 않기 때문에 OM을 TCNQ와 같은 전도성 유기 물질로 처리하여 전자 전도성을 증가시킨다 하여도 생명 현상에는 크게 영향을 끼치지 못한다. 뿐만 아니라 황산염 환원 세균의 전자 전달과 “hydrogen cycling”(fig. 2)에 중요한 역할을 하는 hydrogenase와 cytochrome c_3 가 원형 질막과 OM 사이의 periplasm이라는 부위에 있기 때문에 OM만을 전도성 물질로 변형시켜도 외부의 전자가 OM을 통과하여 황산염 환원 세균의 전자 대사 경로에 직접 유입될 수 있다.

그러나, 전극으로부터의 전자가 전도성 유기 물질로 형성된 “electron channel”을 통하여 OM을 통과하여 세포 내부로 전달된다 하여도 이 전자가 미생물의 전자 대사에 이용되기 위해서는 세균의 cytochrome c_3 를 포함한 전자 대사 관련 효소들이 channel을 통해서 들어오는 전자를 직접 uptake할 수 있어야 한다. cyt c_3 를 포함한 전자 대사 관련 단백질 혹은 효소들은 polypeptide 자체만으로 전자 대사에 기능하는 것이 아니라 효소마다 특이한 prosthetic group이 있어 이 group들이 직접 산화-환원 반응에 참여한다⁽²⁷⁾. 그런데 이들 prosthetic group은 folding된 polypeptide의 내부에 amino acid와 결합하여 존재하기 때문에 전극으로부터의 전자 이동이 일어나지 못하거나 매우 느린 속도로 전자 교환이 일어난다. 이러한 단점을 극복하기 위하여 수용성의 작은 분자인 전자 매개체를 사용하는데 전자매개체는 분자 크기가 작아 효소의 active site나 전자 대사 효소의 prosthetic group에 자유롭게 들어갈

수 있고 전극 표면과도 쉽게 접촉하기 때문에 전극과 효소의 active site 사이의 전자 교환을 쉽게 일어나게 하기 위해서이다⁽²⁷⁾.

1970년대 말 이후 전극과 효소 사이의 직접적인 전자 전달에 관한 연구가 많이 진행되었는데, 일부 metal protein이나 flavo-protein은 수은, 백금, graphite 전극에서 직접적인 전자 교환이 일어남을 밝혔으며⁽²⁸⁾ Kulyk 등은⁽²⁹⁾ NMP.TCNQ 유기 금속 전극을 이용하여 heme-containing protein 혹은 flavoprotein과 전극 사이에 직접 전자 전달이 일어날 뿐만 아니라 전극을 변화시켜 생체내 고분자 물질과 전극 사이의 전자 전달 속도를 증가시킬 수 있을 것으로 보고하였다.

이후 유기 금속 전극과 graphite 등의 전극을 methyl viologen을 포함한 여러가지 electroactive 물질의 유도체로 표면을 변형시켜 전극과 효소 사이의 직접적인 전자 교환 효율을 높이려는 시도가 많이 진행되었으며⁽²⁸⁾ 이중 TTF. TCNQ 유기 금속 전극은 낮은 전압에서 효소의 산화-환원 반응을 유도할 뿐만 아니라 실온에서 다른 유기 금속 전극보다 전도성이 높고⁽³⁰⁾ 효소와의 직접 접촉에 의해서 효소를 denature시키지 않아 생물 전기화학 분야에서 널리 이용되고 있다.

TTF. TCNQ와 효소의 active site와의 전자 교환 기작은 아직은 정확하게 밝혀지지 않는 않지만 Hill과 Alberty⁽³¹⁾는 TCNQ가 매개되어 효소의 active site에서 산화-환원 반응이 일어난다고 하였다.

위의 사실들을 기초로 하여 TTF. TCNQ 전극을 working electrode로 사용하고 세포의 외막을 TCNQ로 변형시킨 세포에서의

전자의 흐름은 TTF, TCNQ 전극 \rightleftharpoons 막의 TCNQ \rightleftharpoons 막의 환원된 TCNQ \rightleftharpoons redox enzyme으로 표시할 수 있으며, 이를 황산염 환원 세균에 서의 유황 성분의 환원에 적용하면 그림 4와 같이 도식화할 수 있다.

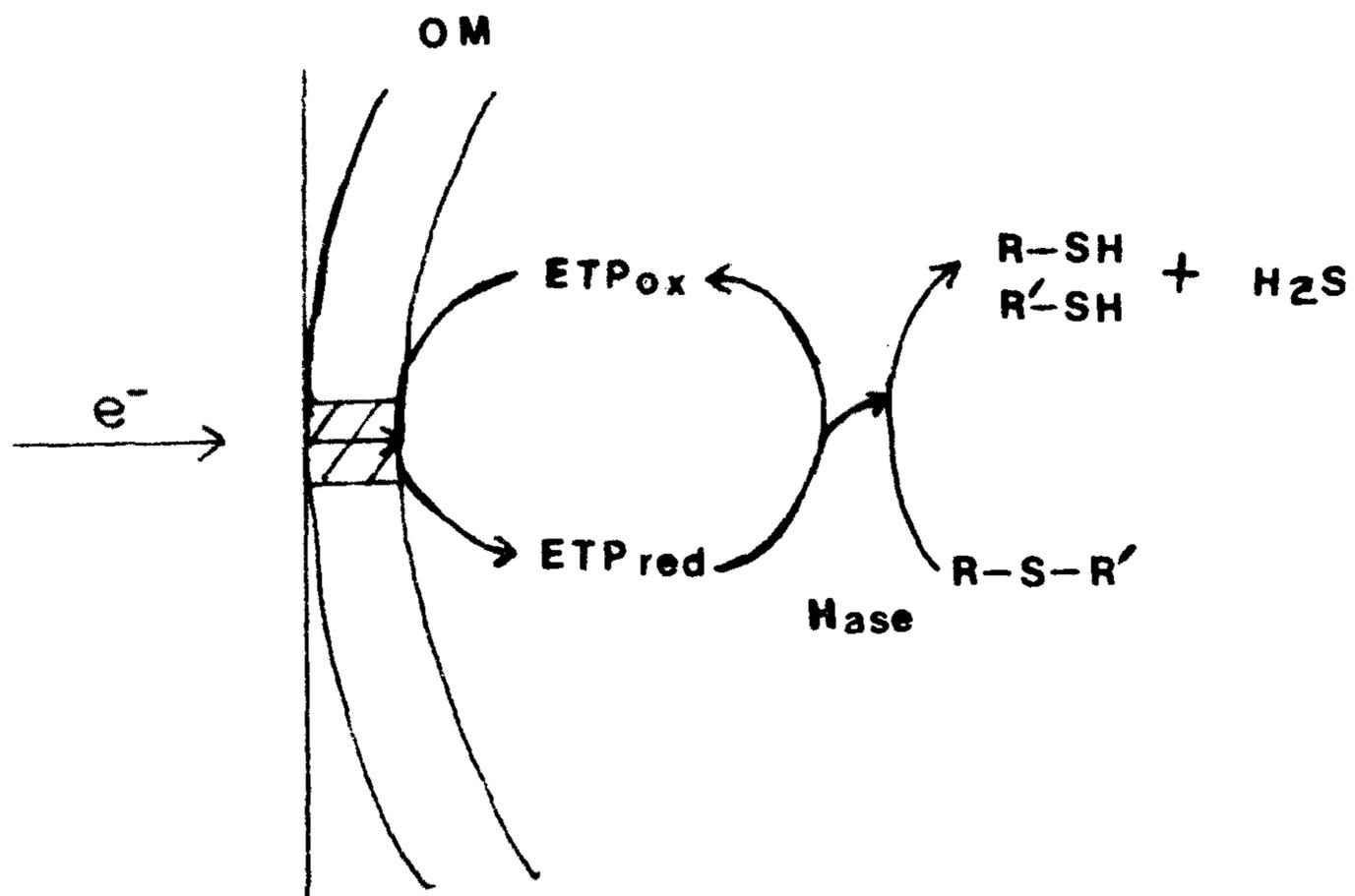


Fig. 4. Working model for the Bioelectrochemical desulfurization using sulfate reducing bacteria which have modified membrane by organic conducting metals.

Membrane 변형 물질로는 TCNQ와 같은 전도성 유기 금속 외에도 polyethylenimine(PEI)-linked porphyrin complex⁽³²⁾가 있는데 이 물질은 양극성을 가지고 membrane 인지질의 탄화수소와 유사한 구조와 수용성 부분이 지질막 바깥으로 길게 돌출된 구조를 가지고 있어 liposome에 associate되어 liposome 외부로부터 내부로의 전자

전달을 촉진한다고 보고되었다.

제 5 절 전도성 유기 금속(Conducting Organic Metals)

유기화합물은 일반적으로 전기 전도성을 띄지 않지만 20C초, 유기물도 금속과 유사한 전도성을 나타낼지도 모른다는 가능성이 제시된 이래 전도성 유기 물질을 찾으려는 많은 연구가 진행되었다. 현재, 전도성 유기 금속은 “charge-transfer complex”와 “polymeric hydrocarbon”의 두 부류로 나눌 수 있는데⁽³³⁾ 주로 “charge-transfer complex”에 대한 연구가 많이 이루어졌다.

유기금속 화합물이 전도성을 띤다는 최초의 증거는 1960년대 초 Melby 등이 강력한 전자 수용체인 7,7', 8,8'-Tetracyanoquinodimethane을 합성하고 그 성질을 밝힘으로 가능해졌다⁽³⁴⁻³⁶⁾.

이때부터 TCNQ를 전자 수용체로 하는 많은 유기금속 전도체가 만들어졌는데 이들은 대부분 $\sigma_{rt}=10^{-5}(\Omega\text{cm})^{-1}$ 정도의 반도체로 밝혀졌다.

이들 전도성 유기 금속의 전도성은 아래의 여러가지 성질에 의해 가능하다⁽³⁷⁾.

첫째, 전자 수용체와 공여체의 segregated stack 구조를 가져야 한다. 만약 mixed stack 구조를 가지면 그 물체는 부도체가 된다.

둘째, 전자 수용체와 공여체가 전자의 획득이나 손실에 의해 새로운 aromatic sextet을 형성해야 한다.

마지막으로 stack들 사이에서 partial charge transfer가 일어나야 한다. 만약 charge transfer가 완전하다면 그 물체도 부도체가 된다.

1970년대 이후 새로운 전자 공여체의 합성으로 전도성 유기 금속에 대한 연구는 획기적인 발전을 이루는데, tetrathiafulvalene (TTF) 혹은 N-methyl phenazinium(NMP)과 TCNQ와의 complex는 상온에서 각각 $\sigma_{rt}=500$ 과 $200(\Omega\text{cm})^{-1}$ 의 conductivity를 갖는 전도성 금속임을 밝혔다.

전도성 유기 금속은 잘 부서지기 때문에 광범위하게 이용되지는 못하고 있지만, 4절에서 설명한 바와 같이 TCNQ와 TCNQ를 전자 수용체로 하는 charge transfer complex는 생물 전기화학 분야에서 많이 이용하고 있다.

제 6 절 Cyclic voltammetry

Voltammetry란 같은 solution에 있는 한쌍의 전극 사이에 electrical potential을 걸어주어 그 결과 나타나는 전류의 흐름을 검사하는 전기 화학적 방법을 일컫는다. Voltammetric technique은 사용해 주는 potential sweep 방식 즉, pulse pattern에 따라 그 종류가 다양한데 cyclic voltammetry에서는 triangular wave form으로 potential을 변화시켜 전압 변화에 따른 전류의 흐름을 관측한다. 일정하게 정해진 두 potential값 사이를 일정한 scan rate로 sweep하다가 한 끝 점에 도달하면 scan rate는 일정하게 유지하면서 그 방

향만 바꿔 sweep을 계속하는 technique으로 potential sweep pattern 과 대표적인 current response는 그림 5와 같다⁽³⁸⁾.

용액내에 전기화학적으로 active한 물질이 존재하면 어떤 특정한 potential값에서 peak를 가지게 되는데 peak의 위치는 reference 전극에 대한 electroactive 물질이 산화 혹은 환원되는 potential을 나타내주는 것이다. 그런데 Reference 전극의 표준 산화-환원 전위 차는 알기 때문에 우리는 peak 위치를 보아 electroactive compound의 표준 산화-환원 전위를 알 수 있다.

뿐만 아니라, cyclic voltammetry의 결과는 그림 5에서와 같이 peak가 위로 향하는 것과 아래로 향하는 두 종류의 peak이 생길 수 있는데 전자는 산화, 후자는 환원 반응을 나타내는 것으로, E-i 관계를 보아 electroactive compound의 산화-환원 반응의 가역성도 확인할 수 있다.

Voltammetry에서는 두개의 전극만을 사용해주는 경우도 있기는 하지만 보통 세개의 전극을 사용한다. Working electrode(W.E.)는 산화-환원 반응이 일어나는 곳이고 reference electrode(R.E.)는 W.E./solution 사이의 potential을 측정하며 auxiliary 혹은 counter electrode로는 용액의 전류를 측정한다. W.E.의 직경이 1mm 이상되는 큰 전극일 경우에는 W.E.와 R.E. 사이의 간격을 1~2mm 이내로 매우 가까이하여야 되는데 이것은 용액의 높은 저항에 의한 potential drop을 최소화시키기 위한 것이다. 위의 전기화학 장치를 도식화 하면 그림 6과 같다.

본 실험에서는 cyclic voltammetry technique을 이용하여 전도

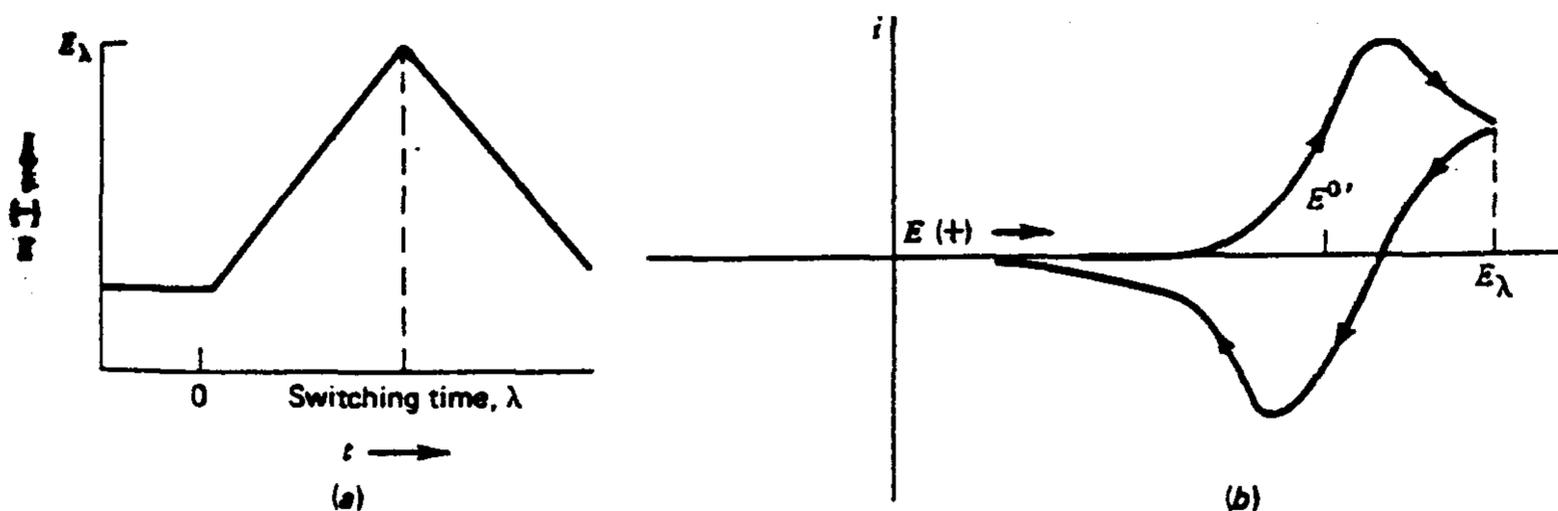


Fig. 5. Typical pattern of cyclic potential sweep (a) and resulting response (b) of cyclic voltammetry.

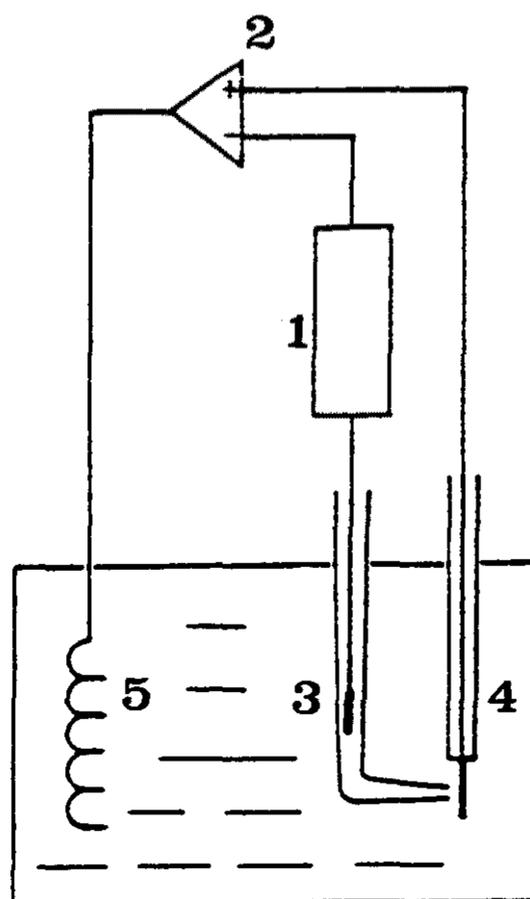


Fig. 6. Schematic diagram of three electrode electrochemical cell system

1; voltage source

2; amplifier

3; reference electrode

4; working electrode

5; counter (auxiliary) electrode

성 유기 금속과 전도성 유기 금속으로 처리한 세균의 전기화학적 특성을 밝히고 나아가 변형된 세균의 전기 전도성을 확인하고자 하였다.

제 2 장 재 료 및 방 법

1. 재 료

1) 균 주

황산염 환원 균주는 *Desulfovibrio desulfuricans* M6(KCTC 2490)였으며 발효 생육균인 *Clostridium acetobutylicum* ATCC 4259(KCTC 1037)도 사용하였다.

2) 시 약

모든 시약은 시약급으로 사용하였으며 주요 시약의 제조원은 아래와 같다.

Resazurin(Fluka), Sodium lactate(Shinyo), Benzothiophene (Aldrich), TCNQ(Sigma), PMS(Aldrich), Lithium iodide(Aldrich), Acetonitrile(J.T. Baker), $^3\text{H}_2\text{O}$, ^{14}C -Sorbitol, ^{14}C -Salicylic acid(NEN), ^3H -Tetraphenylphosphonium(Amersham), Silicone oil No. 556, No. 550 (Dowcorning),

3) 기 구 및 기 기

기구 ; Pressure tube, serum vial (Bellco)

electrolytic cell, Saturated Calomel electrode(Fisher)

기기 ; Ministat Potentiostat, Sweep generator, zero-resistance
ammeter(이상 Thompson electrochem.)
X-Y recorder(Lloyd)
Gas Chromatography(Varian GC 3300)
Centrifugal separator(Hitachi 20PR-52)
Shaking Water bath(한국 비전)
Oxygen Bomb Calorimeter(Parr)
Spectrophotometer(Jasco, UVIDEC 610)

2. 방법

1) 배지

D. desulfuricans M6의 성장 배지로는 Postgate C 배지를 사용하였으며 유기 유황 화합물의 분해와 원유의 탈황을 위한 반응용 배지로는 SO_4^{2-} 이온을 뺀 Postgate C 배지를 사용하였다.

*C. acetobutylicum*은 CAB 배지에서 키웠으며 각 배지들의 성분은 아래 Table1과 같다.

Table 1. Media used in the experiments.

a. Composition of Postgate C medium

Ingredients	Quantities	Ingredients	Quantities
KH ₂ PO ₄	0.5 (g/ l)	NH ₄ Cl	1.0 (g/ l)
Na ₂ SO ₄	4.5	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.06
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.06	Sodium lactate	6.0
Yeast Extract	1.0	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.004
Sodium citrate	0.3	0.2% Resazuri	1ml

PH=7.4, D.W. ; up to 1L.

b. Composition of SO₄²⁻-free Postgate C medium

Ingredients	Quantities	Ingredients	Quantities
KH ₂ PO ₄	0.5(g/ l)	NH ₄ Cl	1.0(g/ l)
Na ₂ SO ₄	4.5	CaCl ₂ ·6H ₂ O	0.06
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0.06	Sodium lactate	6.0
Yeast Extract	1.0	FeSO ₄ ·7H ₂ O	0.004
Sodium citrate	0.3	0.2% Resazurin	1ml

PH 7.4 D.W. up to 1 l iter.

c. Composition of CAB medium.

Ingredients	Quantities	Ingredients	Quantities
Glucose	45.0 (g/ℓ)	Yeast Extract	4.0 (g/ℓ)
Tryptone	1.0	K ₂ HPO ₄	1.5
0.2% Resazurin	1.0ml	Salt Solution I	1ml
pH 5.4 ; D.W. up to 1 ℓ iter			

2) TTF. TCNQ 유기 금속 전극의 제조

TTF. TCNQ 전극은 Barlett의 방법대로 만들었다[37]. 2.0g TTF와 2.0g TCNQ를 각각 120ml의 뜨거운 acetonitrile에 넣어 완전히 녹을 때까지 끓인 후 이들 두 용액을 섞었다. 이 때 검은 침전이 생기는데 이 침전물을 12시간 정도 stirring 하면서 식혀 주었다. 다음날 결정을 진공으로 거른 다음 먼저 소량의 acetonitrile로 씻고 diethyl ether로 씻겨 나오는 액의 색이 무색이 될 때까지 씻어 주었다. 실온의 진공 하에서 침전물을 밤새 건조시킨 후 그 무게를 재어 yield를 구하였다.

이 때 생기는 검은 색 결정 중 약 0.3~0.5g을 infrared spectroscopy 용 tablet 제조 장치(Perkin Elmer)를 사용하여 직경 13mm의 disc를 만들었다. Disc의 한면은 electroconductive silver-containing epoxy(Fujukura Kasei Co.)를 사용하여 직경 0.6mm의 전선을 연결한 다음 절연성 epoxy로 덧입혀 disc의 한면으로만 전류가 흐르게 만들었다.

3) LiTCNQ인 제조

2.0g TCNQ와 4.0g LiI(Aldrich)를 200ml acetonitrile에 넣고 두시간 동안 reflux 시킨 다음 용액을 stirring 하면서 밤새 냉각하였다. 다음 날 보라색 결정을 Whatman filter paper(No.11)로 걸러 소량의 acetonitrile과 diethyl ether로 차례로 씻은 후 실온의 진공 하에서 하루 동안 건조시켜 그 무게를 재었다.

4) 유기 전도성 물질의 성질

본 연구에서 탈황의 working model은 전도성 유기 금속에 의해 증가된 전도성을 갖는 OM을 가진 *D. desulfuricans* 균에 전기화학적 방법으로 전극으로부터의 전자를 전자매개체의 도움없이 직접 세포내로 전달하여 이 전자를 미생물의 에너지 대사에 직접 이용하고자 하는 것이다(Fig.2, Fig.4).

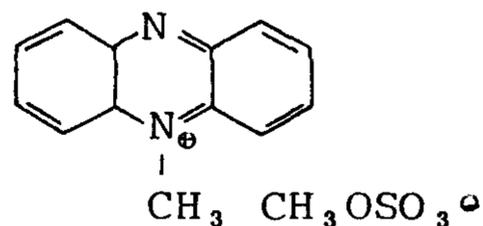
전도성 물질이 세포의 membrane과 integration하여 위에서 설명한 역할을 수행하기 위해서는 미생물이 성장하는 aqueous phase에 처리하였을 때 불안정하거나 쉽게 침전 되어 cell과 interaction할 확률이 떨어져서는 안될 뿐만 아니라 cell과 interaction할 때도 소수성이 강하여 cell membrane 부위 즉 지질층에 쉽게 접근하여 interaction되어야 한다. 그리고 membrane에 결합한 후에도 electroactivity를 계속 유지하여 전기 화학 반응이 일어나야 한다.

그러나, 처음 membrane 변형 물질로 생각한 TCNQ는 소수성이 크기 때문에 Tien(26)등이 사용한 방법, 즉 Bilayer Lipid membrane을 제조 할 때 TCNQ를 섞어 BLM을 만들어 주는 경우

에는 BLM을 만드는 용액이 모두 유기 용매와 인지질로 구성되어 있어 TCNQ를 어느 정도 녹여 BLM에 TCNQ로 형성된 electron channel을 만들 수 있지만 수용액에서는 쉽게 침전되고 변성이 일어나 수용액 상태에 존재하는 세균과 interaction하기가 힘들다. 또한 TCNQ가 쉽게 녹는 acetonitrile 용매에도 50mM 이상을 녹히기가 어려우므로 세균을 intact하게 유지하면서 TCNQ를 처리하기가 힘들다.

따라서 본 실험에서는 TCNQ외에도 전도성 유기 금속 전극의 제조에 사용되는 PMS(Phenazine methosulfate)와 LiTCNQ를 세포에 처리하여 membrane이 변형되는 지 살펴 보았다.

Phenazine methosulfate는 아래의 구조를 가지며 물에 대한 용해도는 약 10% 정도다.



LiCNQ의 물에 대한 용해도는 약 1% 정도로 ethanol에 더 안정하며 물에서는 푸른 색의 dimer 형태들이 존재하게 되고 ethanol이나 butanol등에서는 옅은 녹색의 안정한 형태를 갖는다.

본 연구에의 적합성을 살피기 위하여 TCNQ, PMS, LiTCNQ의 용매전이도, cell과의 interaction 여부, 배양액에 처리할 경우 세포 생육 저해도 등을 조사하였다.

a. 용매로의 전이도.

PMS, LiTCNQ를 각각 증류수 혹은 medium C에 녹인 후 동량의 butanol을 처리하여 세게 흔들어 섞어준 후 한 시간 정도 방치하였다. 수층과 용매층이 완전히 분리되지 않은 경우는 혼합액을 원심 분리하여 두 층을 완전히 나누어 수층과 butanol층을 각각 분리하여 흡광 spectrum을 구하였다.

b. 황산염 환원 세균과의 작용.

30°C medium C에서 이틀간 배양한 70ml의 황산염 환원 세균 배양액을 20배 농축시킨 후 전도성 유기 물질을 최종 5mM로 되도록 처리하여 한 시간 정도 incubation시킨 후 원심분리하여 상등액과 세포 침전층을 분리하였다. 상등액을 100배 희석하여 spectrophotometer로 scanning하여 전도성 물질의 흡광도 변화를 살펴 그 물질이 세포와 얼마나 interaction 하였나 추정하였다.

c. 세포에 대한 생육 저해 효과.

PMS와 LiTCNQ를 각각 100mM, 50mM 용액을 혐기적으로 만들어 0.45 μ m pore size의 membrane(Acrodisc , Gelman Science)으로 filtration하여 무균적으로 만들었다.

서로 다른 membrane 구조를 갖고, 다른 대사작용(발효-혐기적 호흡)으로 성장하는 미생물에 대한 독성 효과의 차이를 비교하기 위하여 *C. acetobutylicum*과 *D. desulfuricans*에 대한 성장 억제 효과를 조사하였는데, 전자는 Gram 양성 세균으로 산소가 없는 상태에

서 발효로 성장을 하며 후자는 Gram 음성 세균으로 혐기성 호흡을 하여 성장을 한다.

하루 동안 배양한 *C. acetobutylicum*과 *D. desulfuricans*를 각각 45ml과 62ml의 CAB 배지와 Postgate C medium에 5%씩 접종하고 PMS와 LiTCNQ를 0.1~2.0mM 첨가한 후 clostridia는 35°C water bath에 황산염 환원 세균은 30°C water bath에 키우면서 하루 간격으로 배양액을 채취하여 Gas Chromatography로 산물을 분석하여 균의 성장을 조사하였다.

*C. acetobutylicum*은 butanol의 양을 조사하였으며 *D. desulfuricans*는 acetate 양을 분석하여 균의 성장을 조사하였다. 사용한 column은 Chromosorb WAW(GP 10% SP-1200/1% H₃PO₄ on 80/100 mesh)으며 column 온도는 120°C, injector 210°C, detector 210°C FID, carrier gas의 flow rate는 30ml/min 였다.

5) Cycloveltammography.

PMS와 LiTCNQ, 이들을 처리한 황산염 환원 세균의 cyclic voltammogram을 여러 조건에서 수행하였다.

Working electrode로는 유기 금속 전극인 TTF.TNCQ 전극, 백금 전극, graphite 전극을 사용하였으며 auxiliary(counter) electrode는 백금선 전극 내지 백금판 전극을 사용하였다. Reference electrode는 saturated calomel electrode(Fisher)를 사용하였으며 one compartment system에서 voltammetry를 수행하였다. Scan rate는 10mv/sec였으며 potential vs. current response는 X-Y recorder를 사용하여 얻었다.

유기 전도성 물질로 변형된 *D. desulfuricans*의 전기 화학적 특성을 얻기 위해서는 먼저 막구조에 이들 물질을 처리한 세포를 얻어야 한다. 이를 동안 30°C water bath에서 배양한 *D. desulfuricans* M6 280ml을 4ml로 농축(70배)한 후 PMS와 LiTCNQ를 따로 5mM로 처리한 후 이들 물질의 색이 거의 없어질 때까지 조용히 흔들며 주면서 incubation하였다. 그 후 원심분리하여 얻은 cell pellet을 새로운 Postgate C 배지로 한 번 washing 한 후 그 cell pellet을 적당한 전해질로 resuspend하여 cyclovoltammetry를 수행하였다. 사용한 전해질은 PMS의 경우는 0.15M NaCl containing 0.15M sodium phosphate buffer, PH 7.4와 medium C, 1M KCl용액이었으며, LiTCNQ는 이들 전해질 외에도 0.15M LiClO₄가 포함된 전해질도 함께 사용하였는데 수용액에서의 LiTCNQ의 cyclovoltammetry에서는 LiClO₄가 꼭 필요한 것으로 보인다.

Cyclovoltammetry를 수행하기 전에 반응 Chamber는 약 20분 동안 질소를 사용하여 전해질의 산소를 제거하였으며 Cyclovoltammogram을 진행할 때는 질소 방출 속도를 느리게 하여 전해질 표면 위에서 불어 넣어 가능하면 전해질의 유동성이 없도록 하였다.

Working electrode의 전극이 큰 경우는 reference electrode 장치가 매우 중요하다. 즉, reference 전극과 working electrode 사이의 간격을 1-2mm 정도로 가까이 해야 하고 reference electrode의 끝부분을 통하여 전자를 제외한 다른 ion의 교환이 일어나지 않게 만들어야 한다. Working electrode를 tube의 끝부분을 1mm의 백금

선을 넣어 sealing한 tube에 넣고 saturated KCl로 그 tube에 채워 working electrode로 이용하였다.

6) PMS를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 원유의 탈황
70ml의 황산염 환원균 배양액 12개를 원심분리하여 15ml로 농축시킨 후 25mM PMS를 6ml 처리하여 약 20분 정도 incubation 하였다. 다음에 원심분리하여 cell pellet만을 얻어 medium C로 한번 세척한 후 SO_4^{2-} -free Postgate C 배지 : 원유가 35:35ml씩 든 125ml vial에 5ml 접종하였다.

두 개의 vial을 그림 7과 같이 potentiostat에 연결한 후 0.45V의 전압을 일정하게 걸어 주어 30°C water bath에서 shaking 하면서 탈황 반응을 진행하였다.

사용한 전극은 음극과 양극 모두 TTF.TCNQ 유기 금속 금속 전극이었으며 salt agar bridge는 2% agar-containing 2M KCl이었다.

7) 원유의 유황 함량 정량

한국 공업 규격(KS M 2059)에서 제시한 oxygen bomb method(38)로 원유의 유황 함량을 분석하였다.

시료 접시에 원유 시료를 0.6~0.7g 정도 달아 5ml의 5% Na_2CO_3 가 든 bomb에 넣는다. 산소를 30~35Kg/cm²까지 bomb에 압입한 후 colorimeter에 넣고 점화시켜 완전히 연소시킨 후 적어도 20분 정도 냉수욕 속에서 냉각시킨 후 배기 valve를 서서히

열어 압력을 뺀다. Bomb의 내면, 시료 접시, 점화선, 뚜껑의 내면

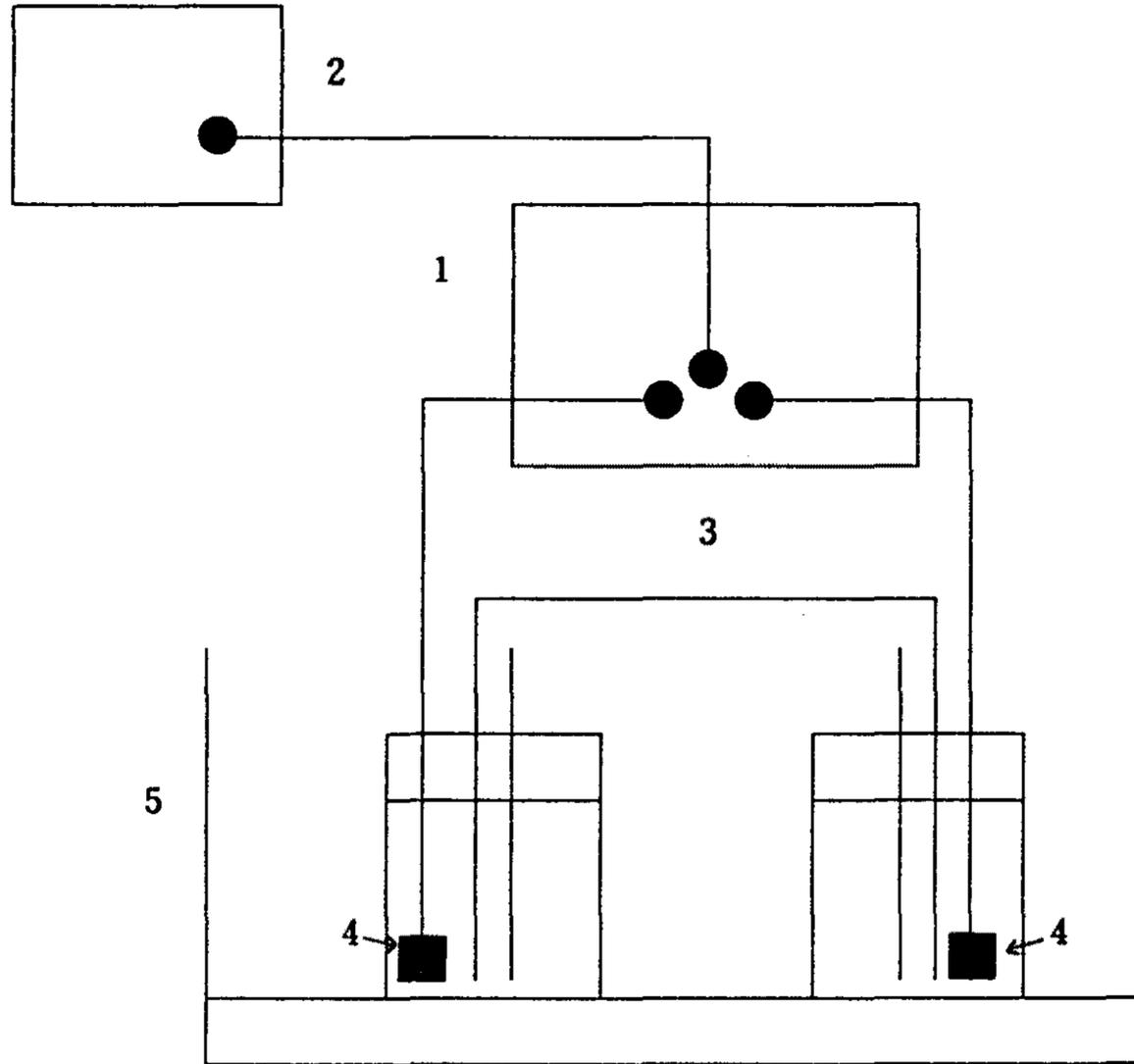


Fig. 7. Electrochemical reaction system for the desulfurization of petroleum

- | | |
|------------------------|---------------|
| 1 ; Potentiostat | 2 ; Ammeter |
| 3 ; Salt agar bridge | 4 ; Electrode |
| 5 ; Shaking water bath | |

을 증류수로 씻어 600ml의 비이커에 모으고 시료 접시는 별도로 5% HCl용액에 넣고 가볍게 끓여 준 다음 접시와 비이커를 깨끗이 씻어 앞의 비이커에 더한다. 비이커의 전체 용액 부피가 약 200ml이 될때 까지 끓인 다음 8.5% BaCl₂용액 10ml을 가한다. 이때 하얀 침전이 형성되는데, 이 용액을 부피가 75ml정도 될 때 까

지 다시 가열한 후 한 시간 이상 실온에서 방냉하여 filter paper로 침전물을 걸러 낸다. 침전물과 여과 종이를 도가니에 넣고 750~800°C의 furnace에서 강열하여 유기물은 모두 회화시킨 후 도가니를 dessicator에서 건조시킨 후 그 무게를 잰다.

황 함량은 아래의 공식대로 구할 수 있다.

$$S = \frac{(P-B) \times 13.74}{W}$$

여기에서 S ; 시료 중의 황분(%)

P ; 황산바륨(BaSO₄)의 무게(g)

B ; 바탕 시험에 있어서의 황산 바륨의 무게(g)

W ; 시료 채취량(g)

을 나타낸다.

8) LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 benzothiophene의 분해
70ml의 황산염 환원균 배양액 6개를 원심분리하여 8ml로 농축한 후 20mM LiTCNQ 2ml을 첨가하여 한 시간 정도 incubation 하였다. 이를 원심분리하여 cell pellet만을 얻어 fresh medium C로 세척한 후 다시 원심분리하여 cell pellet만을 얻었다. cell pellet을 8ml SO₄²⁻-free medium C로 resuspend하여 2.5ml씩 취하여 0.5% benzothiophene이 든 SO₄²⁻-free medium C에 접종한 후 그림 7과 같은 장치를 하여 70°C water bath에서 4일간 반응시켰다.

이 때 전압은 2.5V로 걸어 주었으며 사용한 전극은 음극과

양극 모두 graphite 전극이었다.

반응이 끝난 후 배양액 10ml과 butanol 10ml을 섞어 benzothiophene을 추출한 후 spectrophotometer와 G.C를 사용하여 benzothiophene의 분해 정도를 조사하였다.

대조구로는 LiTCNQ를 처리하지 않은 황산염 환원 세균에 전기화학적 환원력을 공급하지 않은 반응계를 사용하였다.

9) Proton motive force의 측정

미생물을 포함한 모든 생물은 그 세포의 원형질막을 중심으로 proton motive force(PMF : 양자동력)을 유지하고 있으며 PMF는 물질 운반, 세포의 운동성 등 미생물의 생육에 필수적인 과정의 에너지원으로 작용한다.

PMF는 원형질막 내의 전자전달계의 작용(호흡으로 생육하는 세균의 경우)이나 원형질막의 ATPase가 ATP를 소비하면서(발효 생육균과 진핵 세포)동반되는 proton의 세포막 외부로의 translocation과 원형질막의 Charged, hydrophobic 물질에 대한 비투과성에 의해 만들어진다.

PMF는 membrane potential(막 전위차 ; $\Delta\psi$)과 proton gradient(수소 이온 농도차 ; ΔpH)의 두 성분으로 구성되는데 proton이 양전하를 띠고 있는 막전위차와 막 내부의 수소 이온 농도가 낮은 proton gradient를 가지고 있으며 이를 식으로 표시하면 아래와 같다.

$$\text{PMF} = \Delta p = \Delta\psi - Z \cdot \Delta\text{pH}$$

여기에서 $Z=2.3RT/F$ 로 25°C에서는 59mV에 해당한다.

PMF는 세포의 생명 현상을 유지하는 데 절대적인 역할을 하기 때문에 proton을 비롯한 charged material의 이동을 자유롭게 하는 “ionophore”를 세포에 처리하면 세포의 생육은 저해를 받게 된다.

그런데, ionophore가 proton을 포함한 ion의 막 투과성을 비선택적으로 증가시켜 PMF를 파괴하여 세포의 생육을 저해하는 효과를 나타낸다면, 세포막의 전도성을 증가시켜 전자의 흐름을 증가시킨다면 막 전위차의 해소로 PMF가 파괴되어 결국에는 세포의 생육을 저해하게 될 것이다.

그러므로 본 연구에서는 PMS나 TCNQ, LiTCNQ등이 내재되어 세포막의 conductance를 높이는 데 기여하는 지 확인하기 위하여 이들 물질을 처리한 세포의 PMF를 측정하고자 하였다.

전도성 유기 물질로 처리한 세포의 PMF를 구하기 위해서는 이를 동안 배양한 황산염 환원 세균 배양액 10ml씩을 혐기적으로 처리한 멸균된 pressure tube에 넣고 전도성 물질을 최종 2mM 농도로 처리하여 한 시간 정도 incubation한 후 원심분리한 황산염 환원 세균을 다시 10ml의 새로운 medium C로 resuspend한 후 PMF를 측정하였으며, 그 방법은 Rottenberg와 Bronosky(39)의 방법에 따라 원심 분리법으로 하였으며, 대조구로 전도성 물질을 처리하지 않은 세포를 사용하였다.

a. Internal cell volume의 측정

배양액 10ml에 $^3\text{H}_2\text{O}$ (NEN)와 ^{14}C -sorbitol(NEN)을 각각 $2\mu\text{mCi}$ 씩 가하여 잘 섞은 후 3분간 정치하였다. 이 배양액 1ml을 silicone oil 혼합액(Dow corning, 556 : 550 = 3.5 : 6.5)이 0.4ml 들어 있는 Eppendorf tube에 넣고 원심분리하면 silicone oil의 비중이 상등액 보다 무겁고 세포보다는 가볍기 때문에 상등액과 cell pellet이 silicone oil의 위와 아래층에 깨끗이 분리된다. 상등액은 $200\mu\text{l}$ 를 취하여 4ml의 scintillation cocktail solution이 든 scintillation counting vial에 가하고 pellet은 남은 상등액과 silicone oil을 pellet이 떨어지지 않도록 조심스럽게 버린 후 tube의 pellet이 있는 부분을 잘라 4ml cocktail solution에 넣었다. 각 vial은 잘 흔들어 시료와 cocktail solution을 골고루 현탁시킨 다음 β -counter(Tricarb 1500, Packard)로 cpm을 읽었다. 이 때 ^3H 은 0-12.0eV, ^{14}C 은 12.0-156eV의 double channel의 cpm을 구하였다.

사용한 scintillation cocktail 용액은 toluene 667m ℓ 과 Triton X-100 333m ℓ 에 2,5-diphenyloxazol(PPO; Merck) 5.5g과 2,2'-p-phenyl-bisL5-phenyloxazol (POPOP : Merck) 0.1g을 녹여 만들었다.

이 때 물은 세포막을 자유롭게 투과하지만 sorbitol은 투과하지 않는다고 가정하여 pellet의 전체 물 함량에서 세포의 수분 함량을 빼주어 세포 내부 부피를 구하였다.

세포 내부 부피는 다음의 식으로 나타낼 수 있다.

Total water volume of pellet(μl)

$$= \frac{{}^3\text{H count in pellet (cpm)}}{{}^3\text{H counts in supernatant (cpm}/\mu\ell)} \dots \textcircled{1}$$

extracellular water volume($\mu\ell$) of pellet

$$= \frac{{}^{14}\text{C count in pellet (cpm)}}{{}^{14}\text{C count in supernatant (cpm}/\mu\ell)} \dots \textcircled{2}$$

Intracellular water volume of pellet($\mu\ell$)

$$= (\text{total water volume of the pellet}) - (\text{extracellular water volume of the pellet}) \dots \textcircled{3}$$

b. Proton gradient(ΔpH)와 membrane potential의 결정

10ml의 배양액 혹은 LiTCNQ를 처리한 배양액에 ($7-^{14}\text{C}$) Salicylate(NEN)와 ${}^3\text{H}$ -tetraphenyl phosphonium(TPP : Amersham)을 각각 $2\mu\text{Ci}$ 씩 넣고 잘 흔들어 준 후 10분간 정치하였다.

이 중 4ml의 시료는 $200\mu\ell$ 의 butanol로 30분 간 처리하였다. Butanol을 처리하지 않은 시료는 세포 내부 부피를 잴 때와 같은 방법으로 방사능을 측정하였으며, butanol을 처리한 시료는 silicone oil에서 원심분리한 후 cell pellet만을 얻어 방사능을 측정하였다. Butanol로 처리한 시료는 세포에 비특이적으로 흡착된 방사능을 제거하기 위한 것으로 pellet의 방사능을 측정하여 PMF계산에서 빼주었다.

이상의 결과에서 $\Delta\psi$ 와 ΔpH 를 구하는 공식은 아래와 같이 표현될 수 있다.

$$\Delta\text{pH}({}^{14}\text{C-salicylate counting})$$

$$= \log \frac{\text{Pellet (cpm)} - \text{butanol added pellet (cpm)}}{\text{supernatant (cpm}/\mu\ell) \times \text{cell volume}(\mu\ell)} \dots \textcircled{4}$$

$\Delta\psi$ (^3H -TPP counting)

$$= -\frac{RT}{ZF} \cdot \ln \frac{\text{Pellet(cpm)} - \text{butanol added pellet(cpm)}}{\text{Supernatant(cpm}/\mu\ell) \times \text{cell volume}(\mu\ell)} \dots\dots\dots \textcircled{5}$$

$$\text{PMF} = \Delta\psi - 2.303RT/F \cdot \Delta\text{pH}.$$

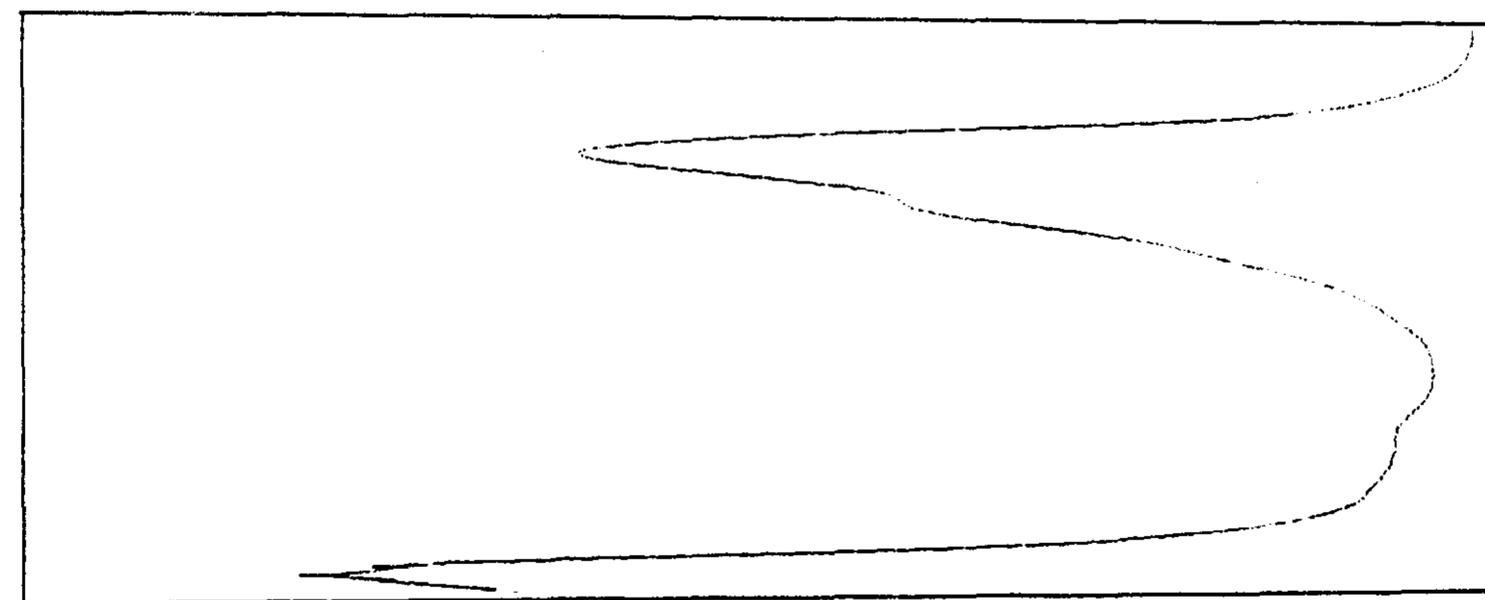
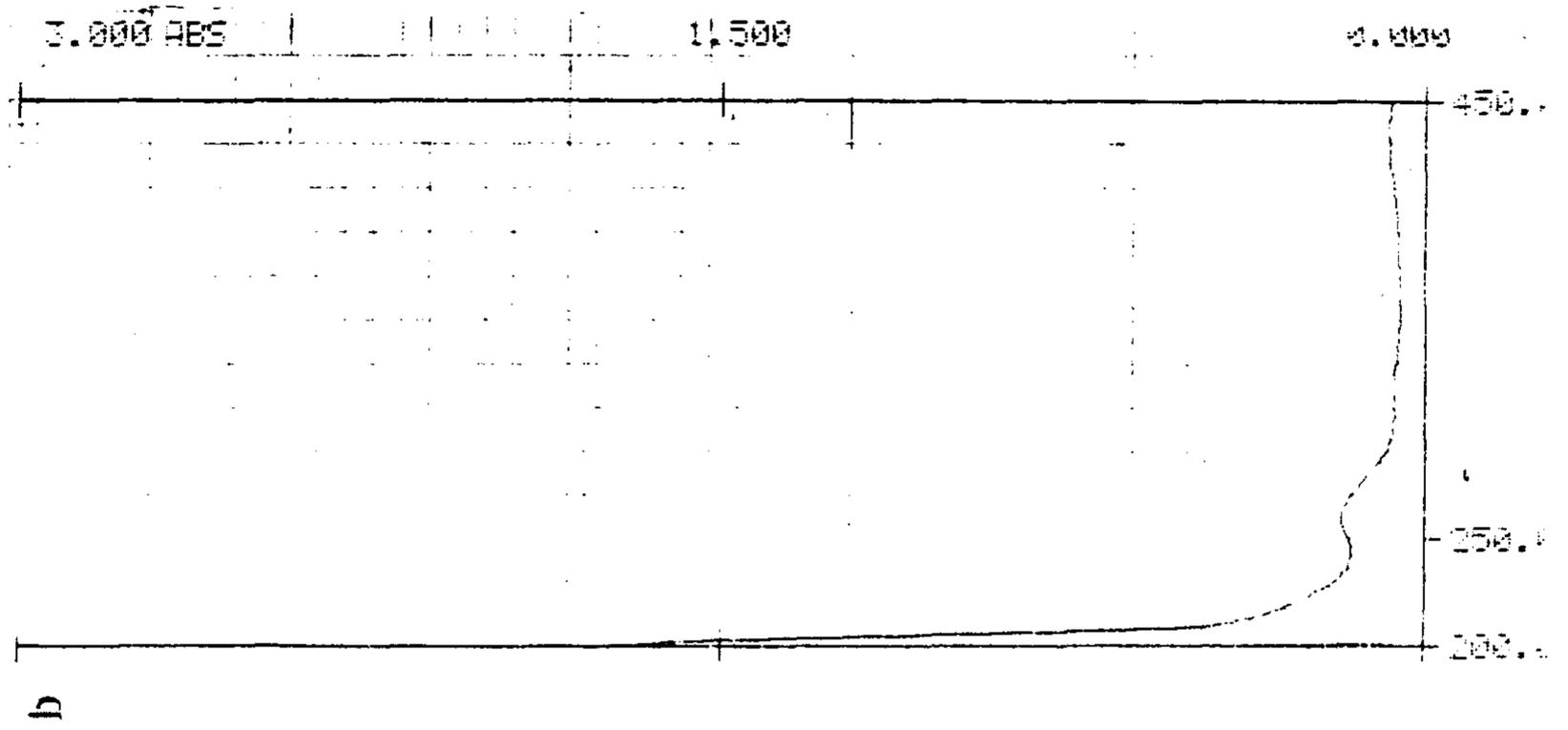
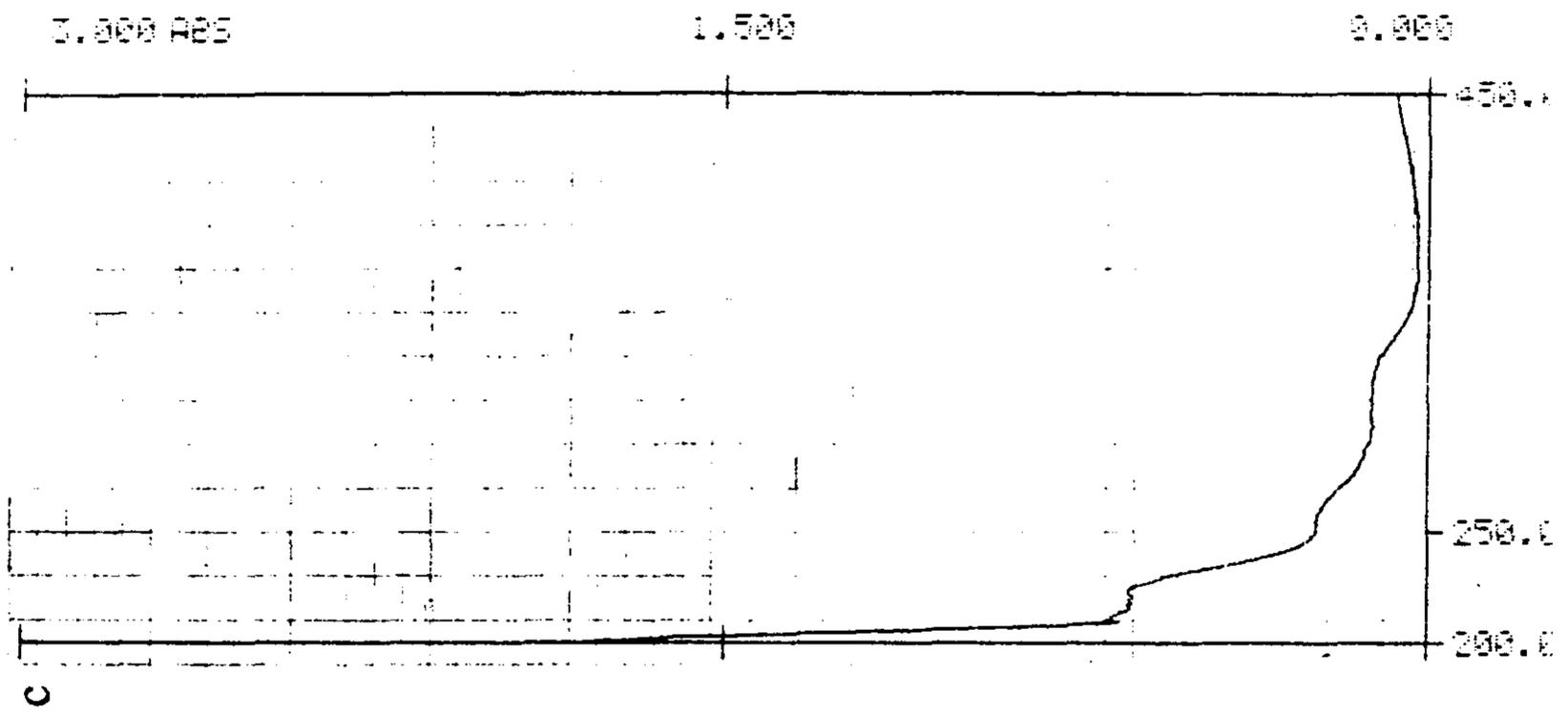
제 3 장 결과 및 고찰

1. TCNQ의 성질

그림 8은 TCNQ의 acetonitrile에서의 흡수 spectrum(a)과 배지와 균 배양액에 TCNQ를 처리했을 때의 흡수 spectrum의 변화를 나타낸 것인데 공히 acetonitrile에 녹인 2mM TCNQ용액을 최종 농도 20 μ m가 되도록 처리하였으며, 수용액 상태에 처리한 것은 butanol로 추출한 후 흡수 spectrum을 얻었다.

Acetonitrile에 녹인 TCNQ는 395nm 부근에서 최대 흡광도를 나타내고 있다. 따라서 세포에 처리할 때 395nm에서의 흡광도 변화를 비교하여 cell-TCNQ의 interaction 정도를 확인할 수 있을 것으로 판단하여 황산염 환원균 배양액에 TCNQ를 처리한 결과(b) TCNQ의 흡광도가 대부분 없어졌다. 대조 실험으로 균이 없는 medium C에만 TCNQ를 처리하여 TCNQ peak의 변화가 있는 지 확인하였는데(c,d) 이 때는 배지의 상등액에서는 TCNQ가 거의 나타나지 않고 침전층에만 TCNQ의 peak이 나타나는데, 그 흡광도가 acetonitrile에서의 흡광도 보다 상당히 줄어들었다. 그림 8-e는 medium C만의 흡수 spectrum으로 200-280nm의 peak들은 배지내의 질소원들에 의한 흡광도 때문이다.

이상 TCNQ의 흡수 spectrum변화를 보아 TCNQ는 Medium C 즉 수용액의 배지에는 거의 녹지 않고 즉시 침전이 되거나 불안정하다는 것을 알 수 있다. 따라서 세포 배양액에 TCNQ를 처리했을



a

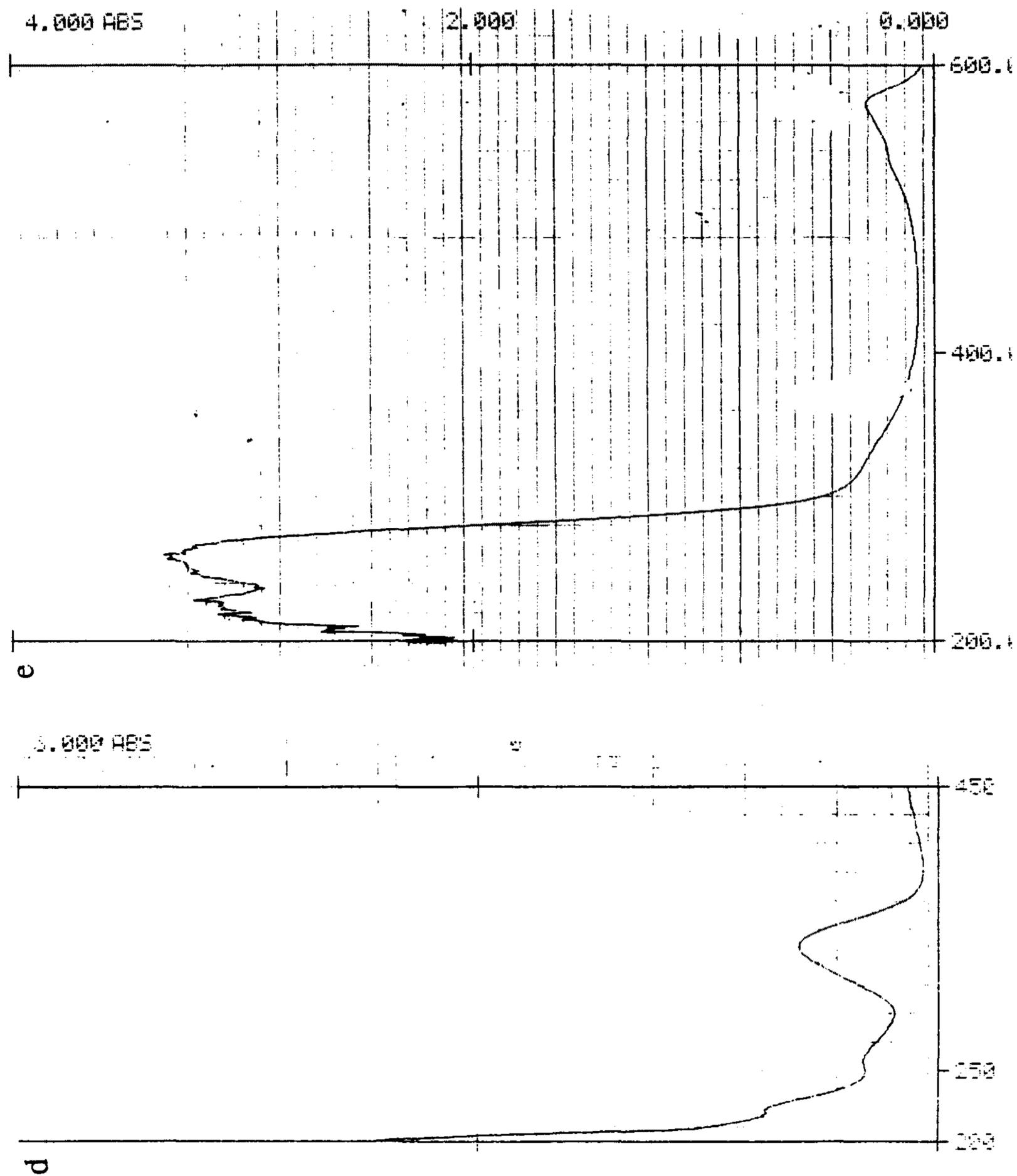


Fig. 8. Absorption spectrum of TCNQ in a)acetonitrile b)supernatant of TCNQ-treated cell culture c)supernatant of TCNQ-treated medium C d)precipitate of TCNQ-treated medium C and e)medium C without TCNQ as control.

때 흡광도가 감소하는 것은 TCNQ-세포와의 interaction이 아니라 TCNQ의 소수성에 기인한 침전물의 형성 때문이라 하겠다.

2. TCNQ 및 TCNQ를 처리한 황산염 환원 세균의 cyclovoltammetry 위에 설명한 바와 같이 TCNQ는 수용액에서 녹지 않고 침전으로 떨어지기 때문에 TCNQ 자체는 cyclic voltammogram을 할 수 없었다.

280ml 황산염 환원 세균 배양액을 5ml로 농축한 후 acetonitrile에 녹인 20mM TCNQ를 최종 5mM로 처리한 후 cell pellet만을 얻어 cyclovoltammetry를 수행하였으며(그림 9.a) 대조 실험으로는 acetonitrile만을 배양 농축액에 20% 처리한 후 cell pellet만을 얻어 cyclic voltammetry를 수행하였다(그림 9.b).

TCNQ는 용매 전해질에서는 두 개의 reversible 산화-환원 peak를 가지지만[36] 이 그림에는 뚜렷한 산화-환원 peak가 나타나지 않고 대조구와 TCNQ를 처리한 세균에서 뚜렷한 차이를 볼 수 없었다.

TCNQ의 성질과 cyclic voltammetry 결과를 종합했을 때 TCNQ를 cell에 처리했을 때 TCNQ의 산화-환원 반응이 관찰되지 않는 것은 첫째, TCNQ가 cell과 interaction되지 못하고 hydrophobic interaction에 의해 TCNQ가 침전되거나 둘째, 수용액 즉 medium C에서는 TCNQ의 산화-환원 반응이 일어나기에는 부적당한 조건이거나 셋째, TCNQ가 cell과는 interaction하였지만 전극-세포와의 전자 교환 반응에서 전극의 전자가 TCNQ로 전달되지 못했을 경우등을 생각해 볼 수 있겠다.

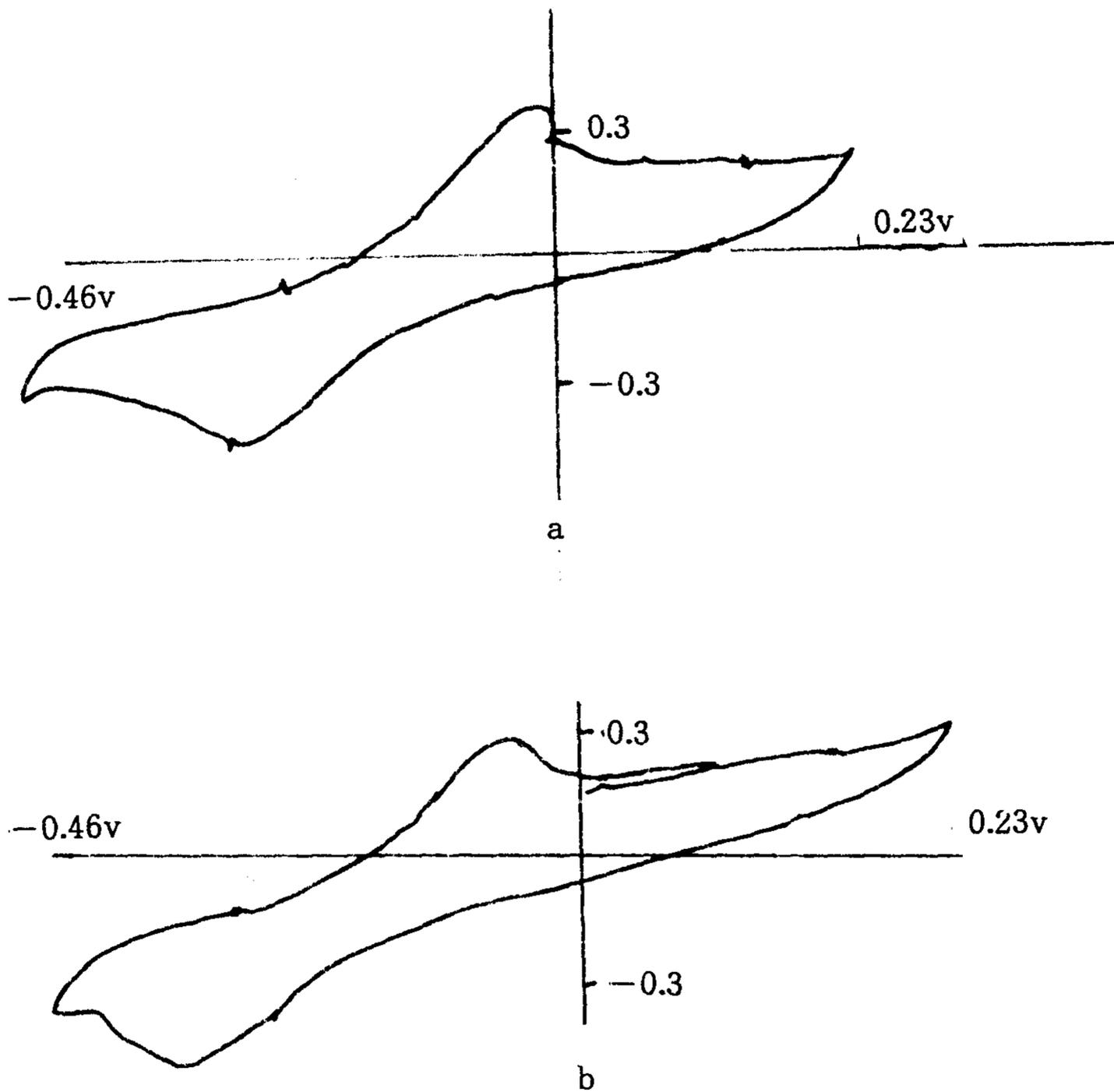


Fig. 9. Cyclic voltammogram of a) TCNQ-treated sulfate reducing bacteria and b) acetonitrile treated sulfate reducing bacteria.

Where the TCNQ is dissolved in acetonitrile.

electrolyte ; 1M KCl solution

Working electrode ; TTF.TCNQ disc.

counter electrode ; Pt plate, reference electrode ; SCE

scan rate ; 10 mV/sec

제2장에서 언급하였듯이 Tien(26)이 BLM에 TCNQ를 처리하여 BLM의 전자 전도성을 증가시키는 방법과 본 실험에서 intact한

세포의 막에 TCNQ를 처리하여 전도성을 높이려는 방법은 근본적으로 다른데, 본 실험을 수행하기 위해서는 전도성 물질을 intact cell membrane에 처리시켜 효과적으로 전자를 전달시킬 수 있는 “electron channel”을 만들어 주는 것이 선결 과제라 생각된다. 그리고 세포막에 전도성을 부여하는 방법도 TCNQ 이외의 다른 전도성 물질을 처리하는 것도 함께 고려해야 한다. TCNQ의 경우는 분자의 크기가 세포막의 두께에 비해 대단히 적으므로 이것이 membrane에서 channel을 형성하기 위해서는 많은 분자가 한 위치에서 stacking 되어야만 하는데 실제로 TCNQ가 세포막의 어느 부위와 interaction하는 지, 어떤 형태로 막에 파고 드는 지 모를 뿐만 아니라 고농도의 TCNQ를 처리해 주어야만 channel을 형성할 가능성을 갖게 되는 단점이 있다.

전도성을 갖는 동시에 세포의 지질막을 이루는 인지질과 유사한 구조를 갖는 amphipathic hydrocarbon의 사용이나 전도성 유기 물질을 긴 사슬 구조의 전도성을 갖는 물질로 변형시켜 사용하는 것이 막을 통한 전자 전달에 효과적일 것으로 생각된다.

TCNQ를 사용하여 membrane을 변형시키는 데 있어서의 첫 번째 문제점은 TCNQ의 water solubility라고 생각할 수 있다. 따라서 TCNQ 대신, 수용성을 가지면서 TCNQ와 같이 “Charge transfer complex”에서 전자 공여체로 작용하는 phenazine methosulfate와 TCNQ의 anion radical 형태인 LiTCNQ의 특성을 조사하고 이들이 cell membrane에 integration 되어 전자 전도성을 부여할 수 있는 지 조사하였다.

3. PMS와 LiTCNQ의 미생물에 대한 생육 저해 작용

*D. desulfuricans*와 *C. acetobutylicum* 공히 PMS와 LiTCNQ 1mM 이상을 처리했을 때 완전히 생육이 저해 되었으며, PMS 보다는 LiTCNQ에 의해 더 민감하게 영향을 받았다(그림 10,11).

이들 전도성 물질의 생육 저해 기능은 cell membrane과의 작용에 의한 membrane integrity의 손실 혹은 PMF의 파괴에 기인하는 것으로 추측된다. 왜냐하면 이들 물질은 hydrophobicity가 크기 때문에 세균 배양액에 처리하면 세포의 유일한 hydrophobic 부위인 outer membrane이나 원형질막과 쉽게 접촉을 할 것이고 이들 물질의 양이 일정 수준 이상이 되면 세포막을 변형시켜 세포막의 고유의 기능을 저해할 것이기 때문이다. 이런 생각은 생육 저해 작용 실험의 결과로 어느 정도 뒷받침 할 수 있다. LiTCNQ는 PMS보다 water solubility가 훨씬 낮을 뿐 아니라(1%:10%) 소수성이 훨씬 높다. 따라서 PMS보다 LiTCNQ에 대해 세포가 더 민감하게 영향을 받는 것은, 두전도성 물질의 hydrophobicity 차이로 인해 배양액에 이들을 처리할 경우 LiTCNQ는 membrane의 지질에 대한 affinity가 높기 때문에 PMS보다 낮은 농도에서 세포막을 변형시켜 integrity를 훼손시킬 수 있기 때문이라고 생각할 수 있다.

PMS와 LiTCNQ의 소수성과 그 정도의 차이로 봐서 이들 물질의 작용 부위가 지질막일 것이라는 추측은 쉽게 할 수 있으나 이 물질들이 지질막에 integration되어 어떤 작용 기작으로 세포의 생육을 억제하는지 혹은 Tien등이 실험한 대로 membrane의 전도성을 높여 세포막의 PMF를 제거하여 생육을 저해하는 지에

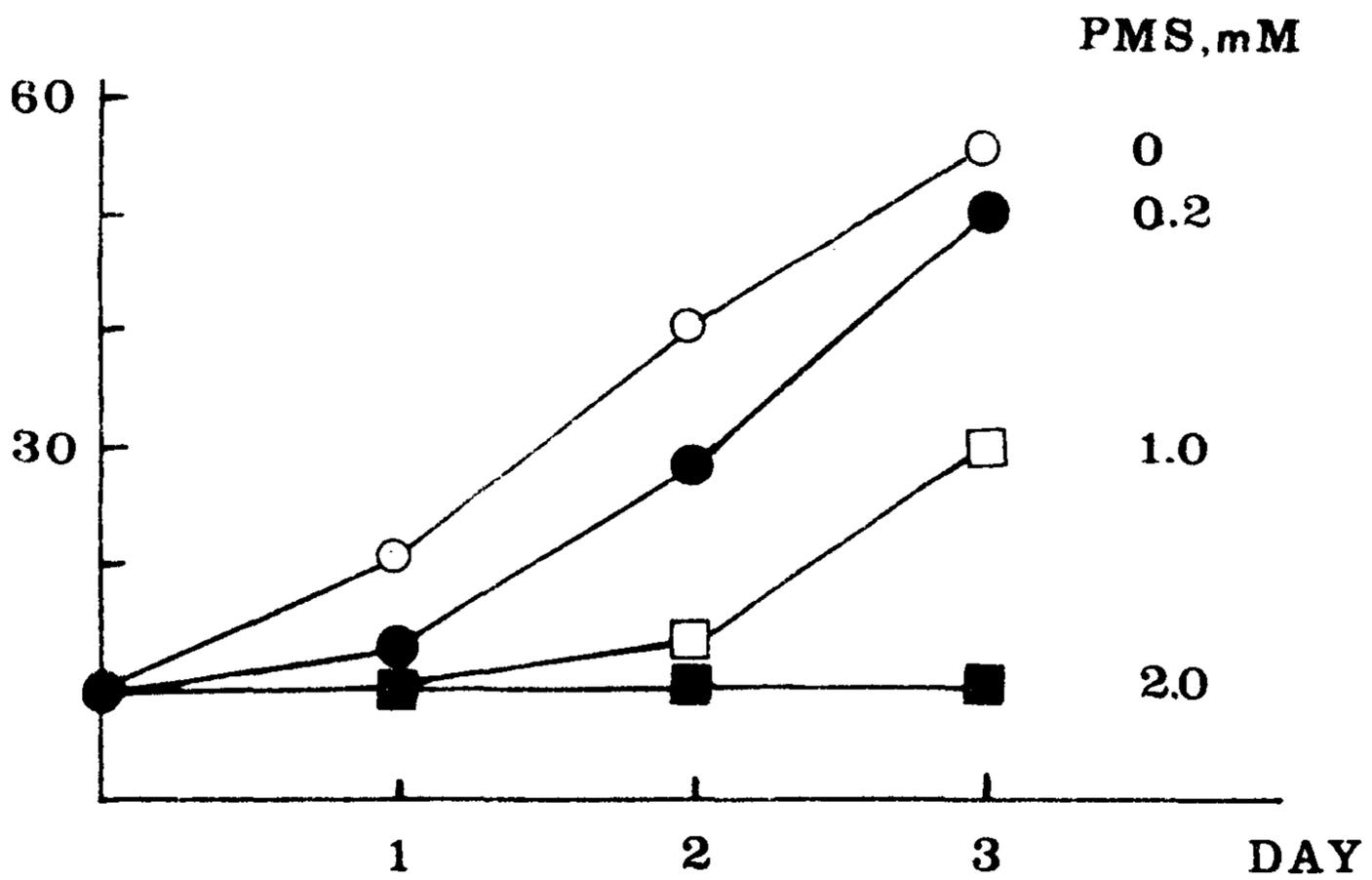
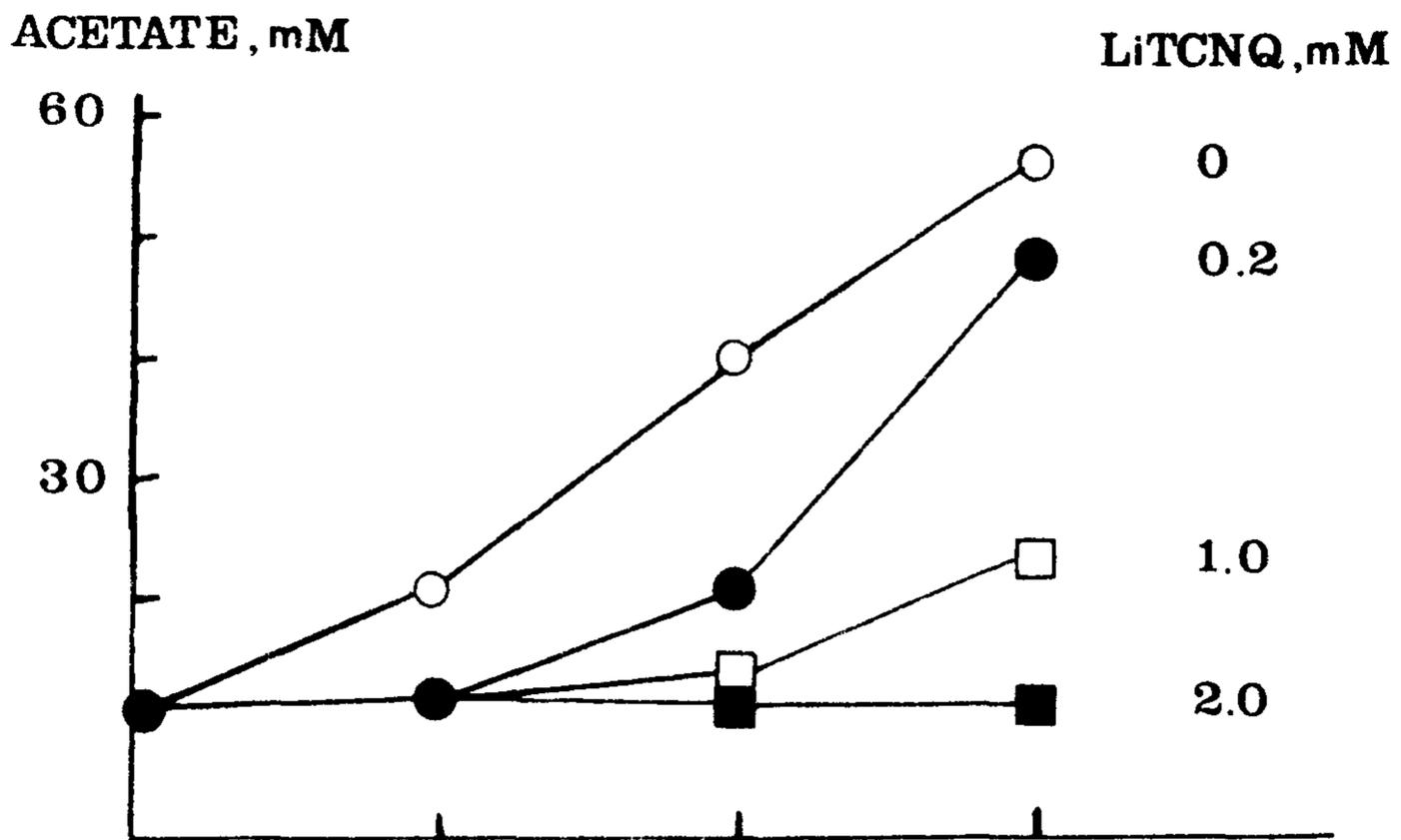


Fig. 10. Growth inhibitory effect of LiTCNQ and PMS on *D. desulfuricans*.

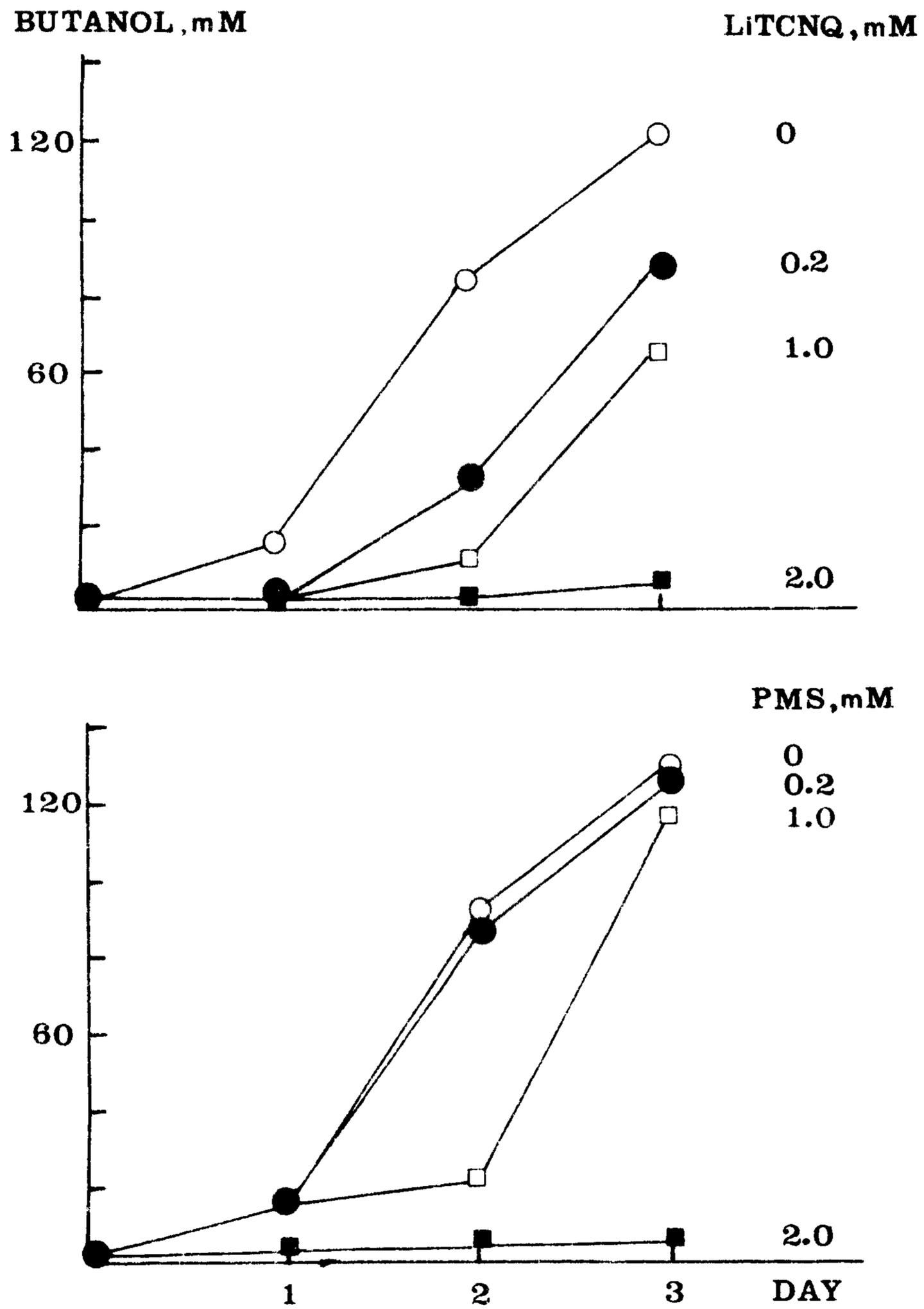


Fig. 11. Growth inhibitory effect of LiTCNQ and PMS on *C. acetobutylicum*.

대한 명확한 증거를 제시하지는 못한다.

만약, 이들 물질이 membrane에 내재되어 전자 전도성을 증가시킨다고 가정한다면 세포막을 통한 전자의 전달이 쉽게 일어나 membrane potential을 제거할 것이고 그 결과 PMF도 파괴 될 것이다. 따라서 전도성 유기 물질의 정확한 생육 저해 작용과 그 작용 부위를 밝히는 한 방법으로 PMF를 직접 측정하는 것을 생각할 수 있을 것이다.

4. LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균의 PMF 측정.

LiTCNQ를 처리하지 않은 황산염 환원 세균 대조구에서는 internal cell volume과 $\Delta\psi$, ΔpH 를 구할 수 있었으나, LiTCNQ에서는 internal cell volume을 측정할 수 없었다. 세포 내부 부피의 측정 원리는 물은 세포막을 자유롭게 투과하고 sorbitol은 통과하지 못하므로 $^3\text{H}_2\text{O}$ 는 세포 내부와 배양액에 고르게 분포하지만 sorbitol은 cell pellet보다는 배양액에 농도가 높다는 걸 이용하여 cell pellet과 배양 상등액에서의 $^3\text{H}_2\text{O}$ 와 ^{14}C -sorbitol의 농도비를 계산하는 것이다. 그런데 LiTCNQ를 처리한 경우는 cell과 상등액의 $^3\text{H}_2\text{O}$ 의 비율보다 ^{14}C -sorbitol의 비율이 더 크게 나타났기 때문에 internal cell volume을 측정할 수 없었다. LiTCNQ를 처리한 경우의 internal cell volume을 대조구의 internal cell volume과 같이 놓고 PMF를 측정하면 table 2와 같다.

Table 2. Proton motive force of Desulfovibrio desulfuricans intact cell and LiTCNQ-treated cell.

	Internal cell volume(μ l)	pH	$\Delta\psi$ (mV)	PMF (mV)
1	0.228	0.877	-107	-160
2	(a)	0.996	-127	-186

1:control, *D. desulfuricans* intact cell

2:LiTCNQ-treated *D. desulfuricans*

(a):internal cell volume

of control was taken

$$PMF = \Delta\psi - 2.303RT/F \Delta pH$$

LiTCNQ를 처리한 세포의 내부 부피를 $0.228\mu l$ 로 잡는다면 PMF가 더 증가하므로 LiTCNQ에 의해 세포의 전자 전도성이 증가하지 않는다고 볼 수 있다. 그러나, 앞에서 설명하였듯이, LiTCNQ를 처리한 세포에서는 internal cell volume을 측정할 수 없을 정도로, 세포막의 성질이 완전히 변했음을 알 수 있다. Sorbitol이 cell pellet 부위에 많이 있다는 것으로 보아 cell membrane의 permeability가 변하였거나, cell surface 표면이 변하였다고 생각할 수도 있을 것이며, 또한 세포막의 인지질의 탄화수소 chain과 다른 구조인 TCNQ분자가 membrane에 끼어 들어감으로 인하여 membrane 구조가 더 느슨해 졌다고 볼 수 있다. 그러므로 이렇게 막구조가 변화된 세포의 internal volume과 intact membrane을 갖는 cell의 internal volume을 같이 보는 것은 비합리적이다.

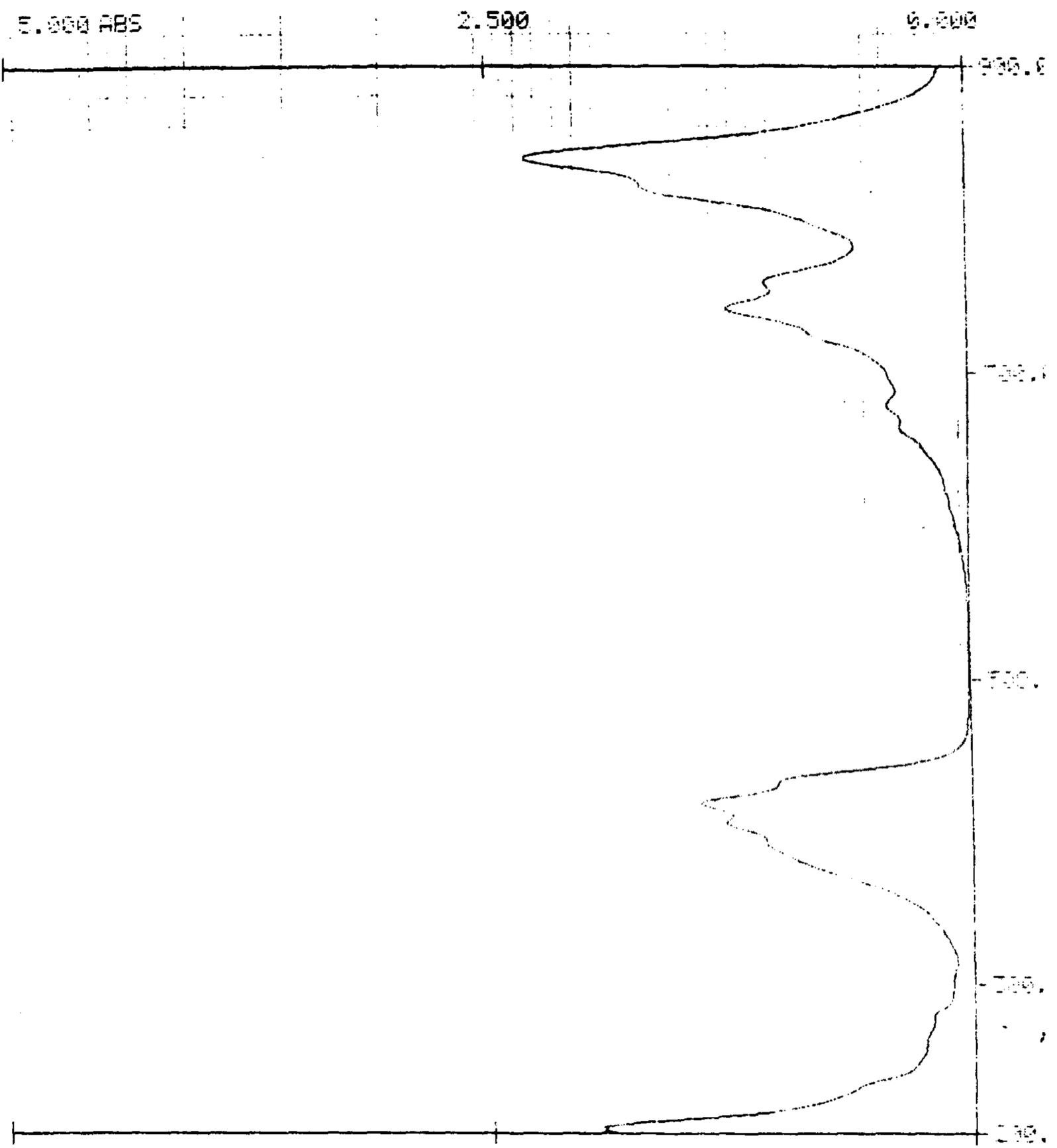
어쨌든, 이 결과로 보아 전도성 물질인 LiTCNQ를 처리함으로써 인하여 세포막이 어떤 형태로든 변화되었음을 알 수 있으나, 전도성이 증가되었다는 증거는 제시할 수 없다. 이것은 LiTCNQ를 처리할 경우 세포막의 전도성은 증가하지만 LiTCNQ의 resistivity로 인하여 외부에서 어느 정도의 potential을 가하지 않을 경우 전자의 이동이 매우 느리게 일어나기 때문에 PMF에는 큰 차이가 나타나지 않았다고 추측할 수 있을 것이다. 따라서 전도성 유기 물질을 처리한 세포의 membrane의 전도성을 보기 위해 막의 resistivity를 직접 측정하는 방법도 개발되어야 할 것으로 본다.

5. LiTCNQ의 성질 및 황산염 환원 세균과의 상호 작용

LiTCNQ는 증류수에서와 ethanol에 있을 때의 흡수 spectrum에 차이가 있었는데, 외관상으로도 물에 있을 때는 진한 푸른 색을 띠었으며 ethanol에서는 연두색 내지 옅은 녹색을 나타내었으며, scanning한 결과도(fig. 12) 두 용질에서의 peak들의 양상이 다르게 나타났다. 그 이유는 물에서 LiTCNQ가 dimer 형태로 많이 존재하기 때문이며 물에서 보다는 ethanol에서 LiTCNQ가 더 안정하였다.

LiTCNQ의 hydrophobicity를 확인하기 위하여 butanol로 처리한 후의 용매 전이도를 시험해 본 결과 수층에서는 LiTCNQ의 특징적인 peak들이 전혀 나타나지 않고 butanol층에서만 나타났다(fig. 13)

따라서 LiTCNQ는 물에 대한 친화력 보다는 hydrophobicity가 더 크며 미생물 배양액에 이를 처리할 경우 배양액 보다는 지질로 이루어진 cell membrane과 interaction 할 확률이 더 크다고 할 수 있다.



a

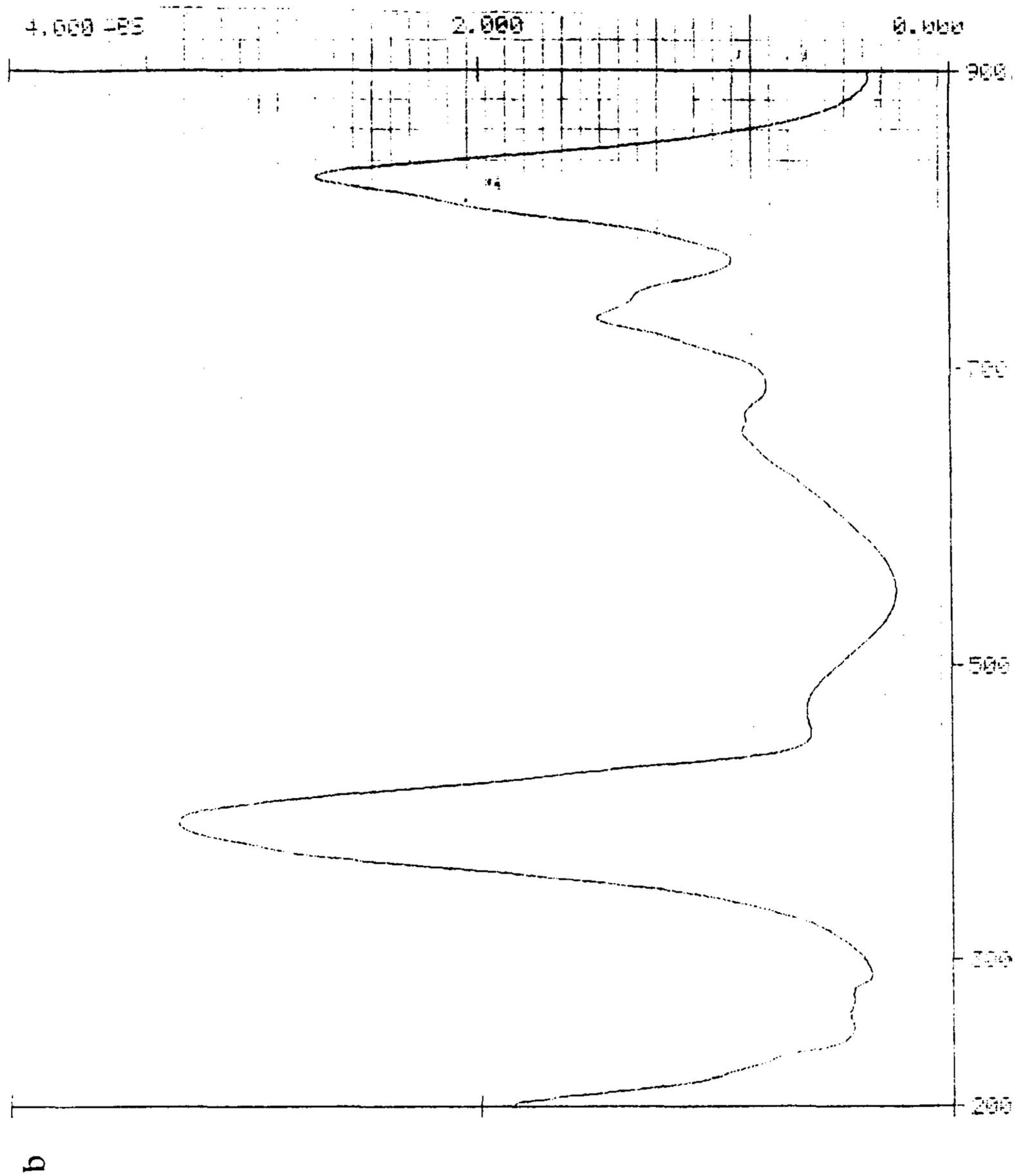
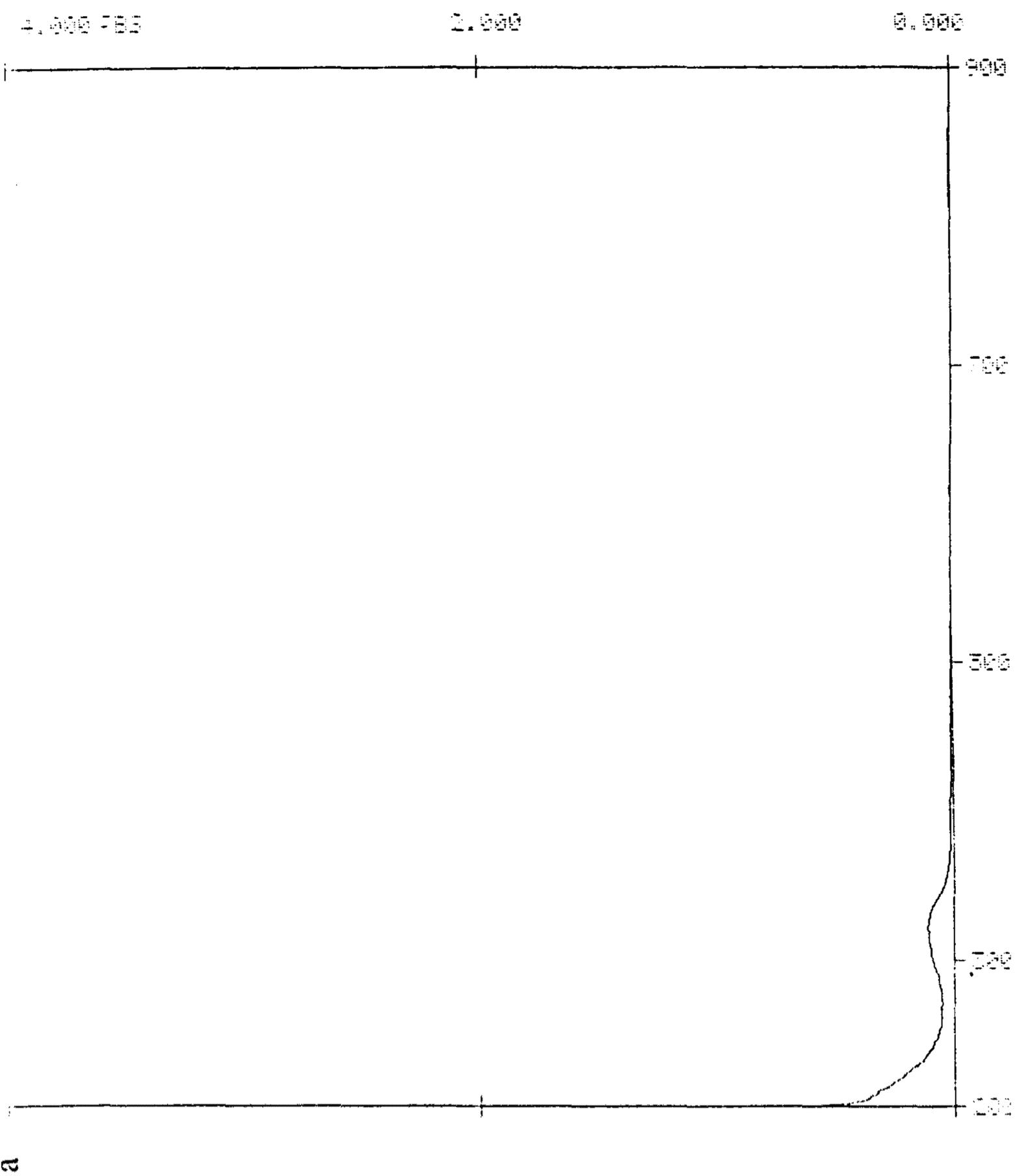


Fig. 12. Absorption spectrum of LiTCNQ in a)water and b)ethanol.



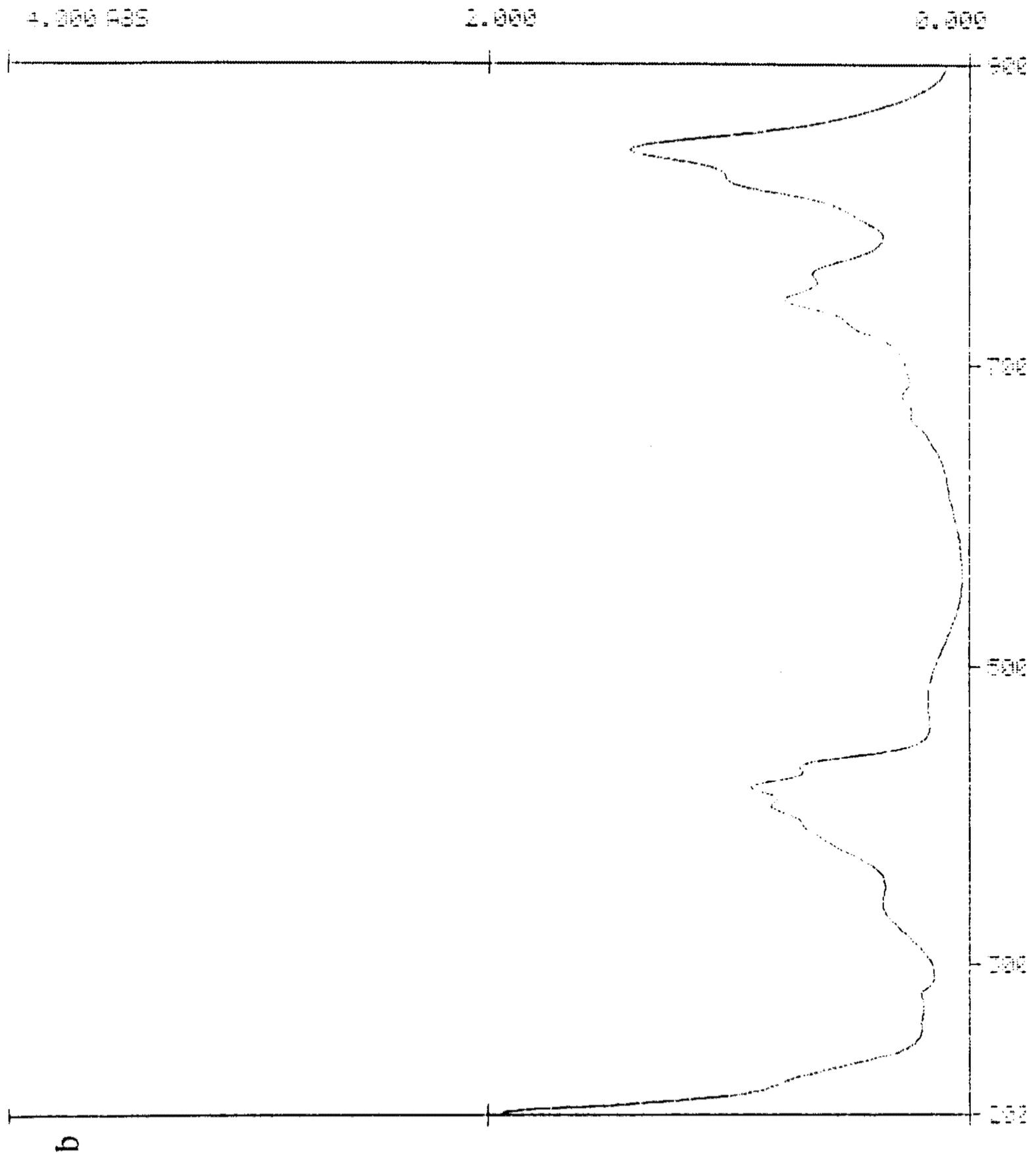


Fig. 13. Butanol extraction of LiTCNQ
a) Aqueous layer b) Butanol layer.

황산염 환원 세균 10배 농축액에 LiTCNQ를 1mM 처리한 후의 배양상등액을 butanol로 추출하여 흡수 spectrum을 조사하여 본 결과(fig. 14) 상등액에서는 LiTCNQ가 전혀 존재하지 않았다.

이 실험으로 LiTCNQ는 또 배양액에서 세균과 interaction을 하는데 그 interaction 부위는 용매로의 전이도로 보아 세포의 소수성 부위인 원형질막이나 outer membrane일 것으로 여겨지며, 따라서 LiTCNQ의 생육 저해 작용의 활성 부위도 원형질막 일 것으로 사료된다.

6. LiTCNQ 및 LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균의 cyclovoltammetry.

LiTCNQ는 Phosphate buffer, medium C, KCl 용액에서는 어떤 전극을 사용하더라도 LiTCNQ의 산화-환원 반응을 관찰할 수 없었다. 그러나 0.2M LiClO₄를 전해질로 사용한 경우는 -0.37 V 부근에서 cathodic reaction이 일어났으며 -0.15V와 +0.07V 부근에서 anodic reaction이 일어나는 것으로 보인다.

LiTCNQ를 황산염 환원 세균에 처리하여 cyclovoltammetry를 수행한 경우에도 LiTCNQ의 특징적인 peak들이 나타나긴 했지만 anodic reaction의 peak들이 불분명 하였고 cathodic reaction의 peak height도 낮게 나타났다.

이상에서 볼 때, LiTCNQ의 수용액에서의 산화-환원 반응에는 LiClO₄가 필수적인 것 같으며, 세포에 처리한 경우에도 특징적인 산화-환원 반응은 유지하는 것으로 보인다. 그러나 이 결과만으로 LiTCNQ가 세포막에 내재되어 세포 외부로부터의 전자를 내

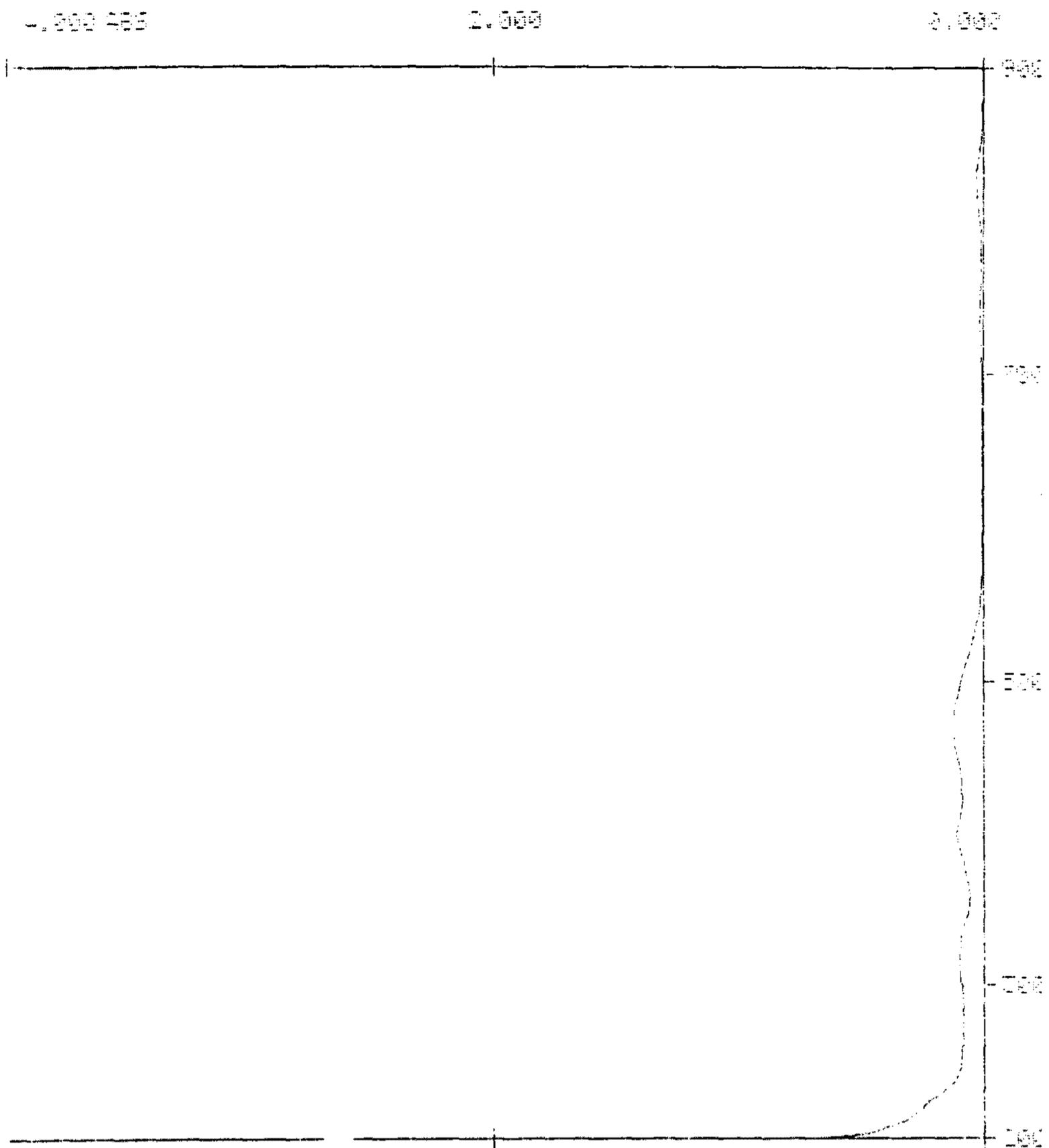
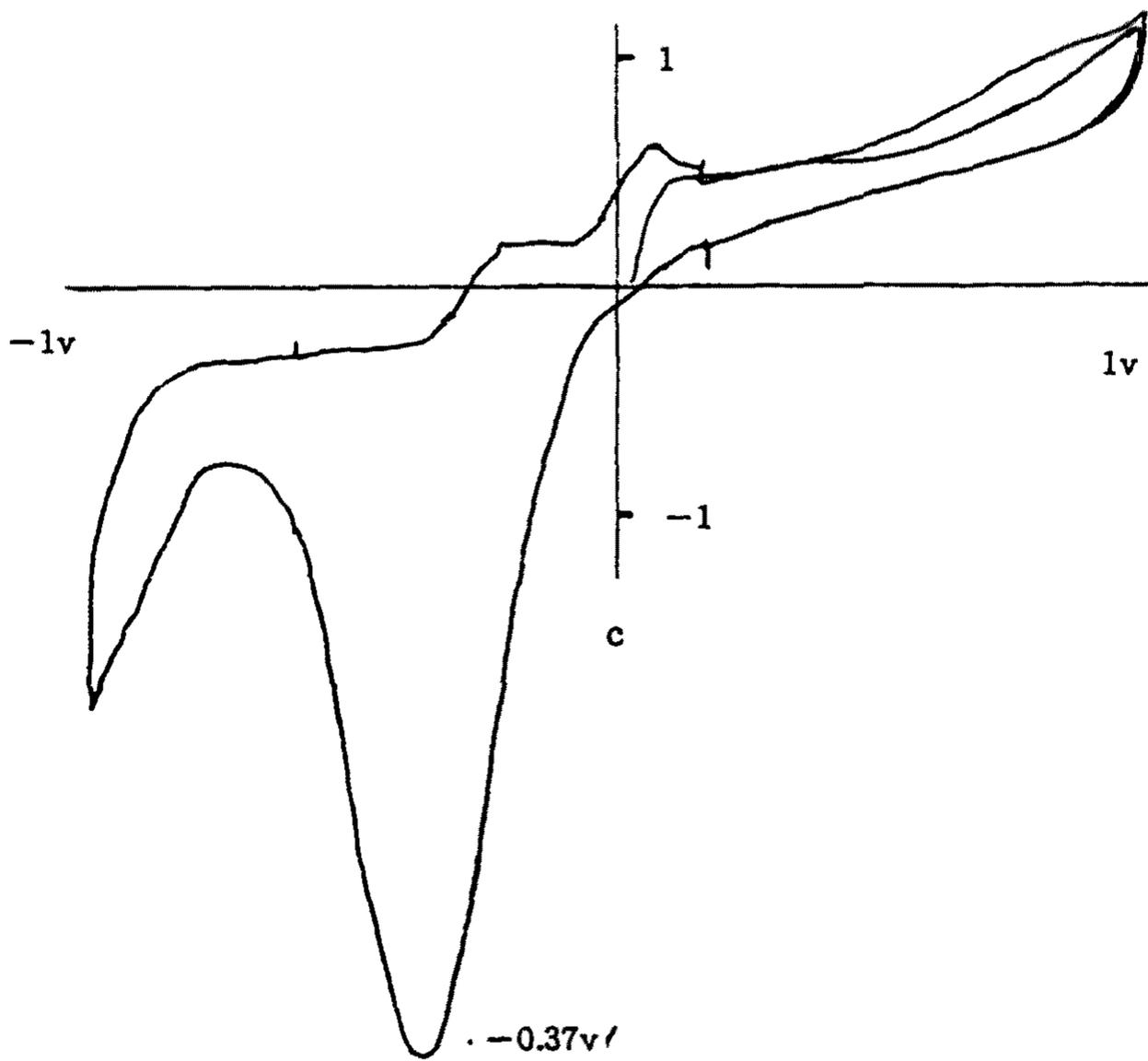
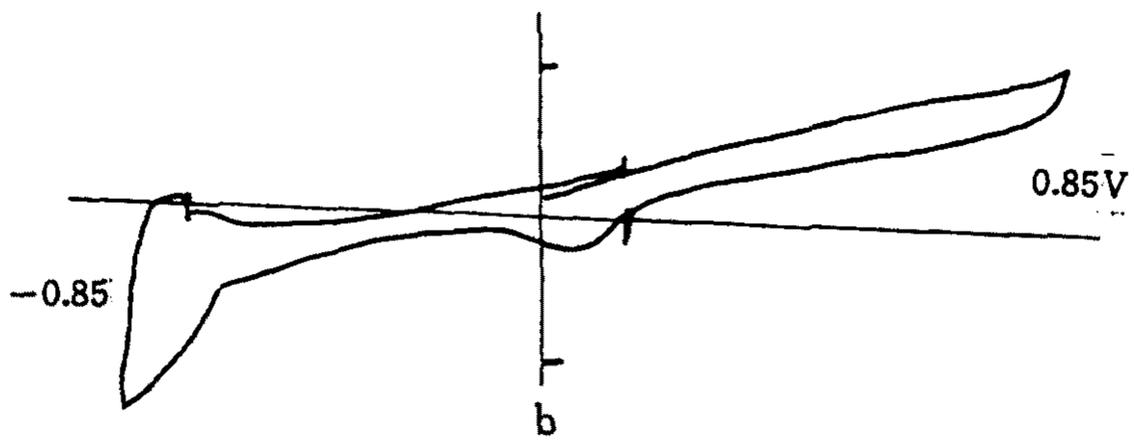
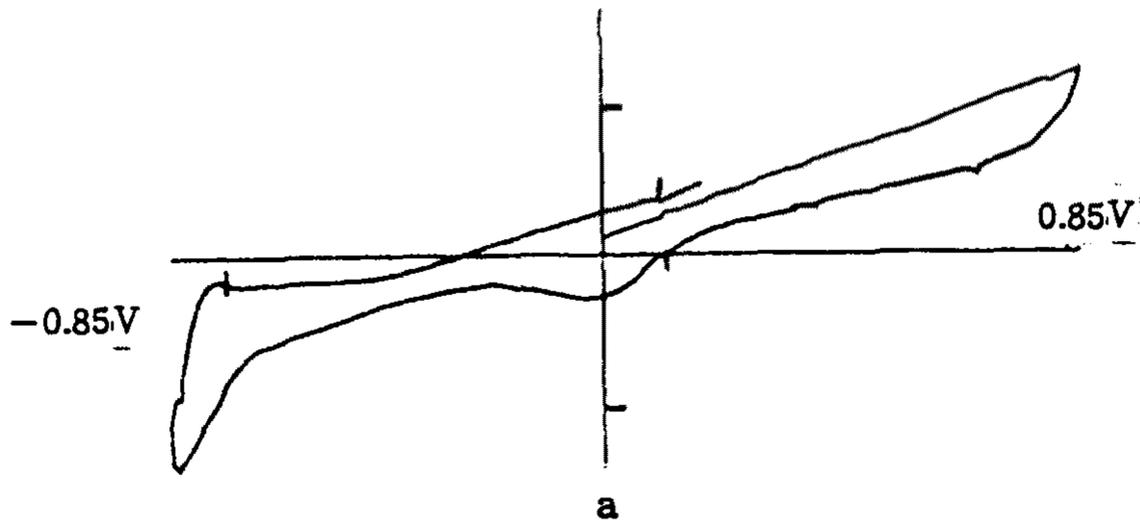


Fig. 14. Interaction of LiTCNQ with *D. desulfuricans*-supernatant after treatment of cell culture.



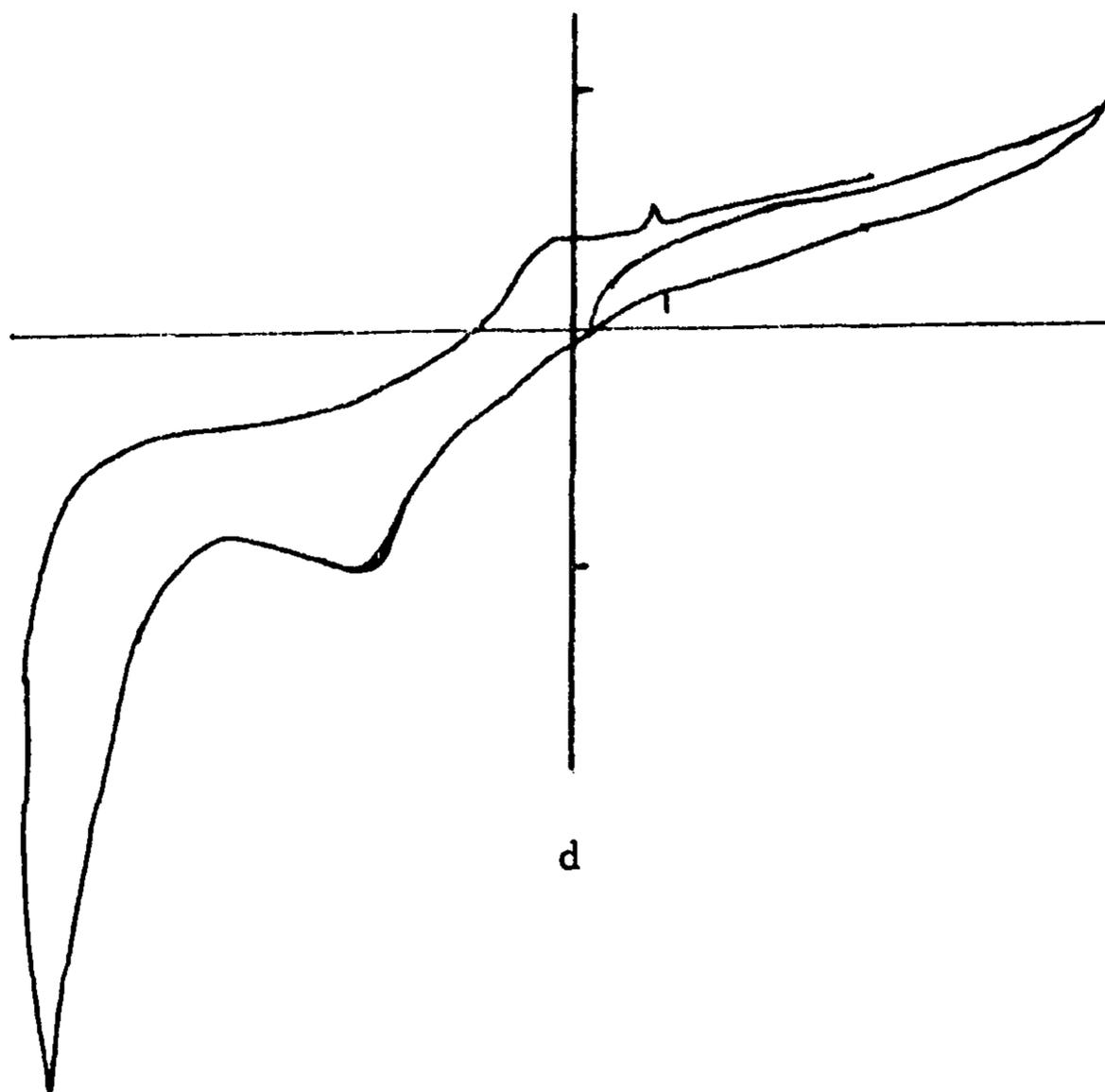


Fig. 15. Cyclic voltammogram of LiTCNQ

- a. 1mM LiTCNQ in 0.15M phosphate buffer, pH 7.4
W.E. ; TTF.TCNQ
- b. 1mM LiTCNQ in 0.15M phosphate buffer, pH 7.4
W.E. ; graphite.
- c. 1mM LiTCNQ in 0.2M LiClO₄, W.E. ; graphite.
- d. LiTCNQ-treated cell in 0.15M LiClO₄-containing medium C,
W.E. ; graphite.

부로 전달한다고 결론 지을 수는 없다. 왜냐하면 LiTCNQ가 세포막 외부의 표면에만 binding하고 있어도 전극과의 접촉에 의해 산화-환원 반응이 일어나기 때문이다.

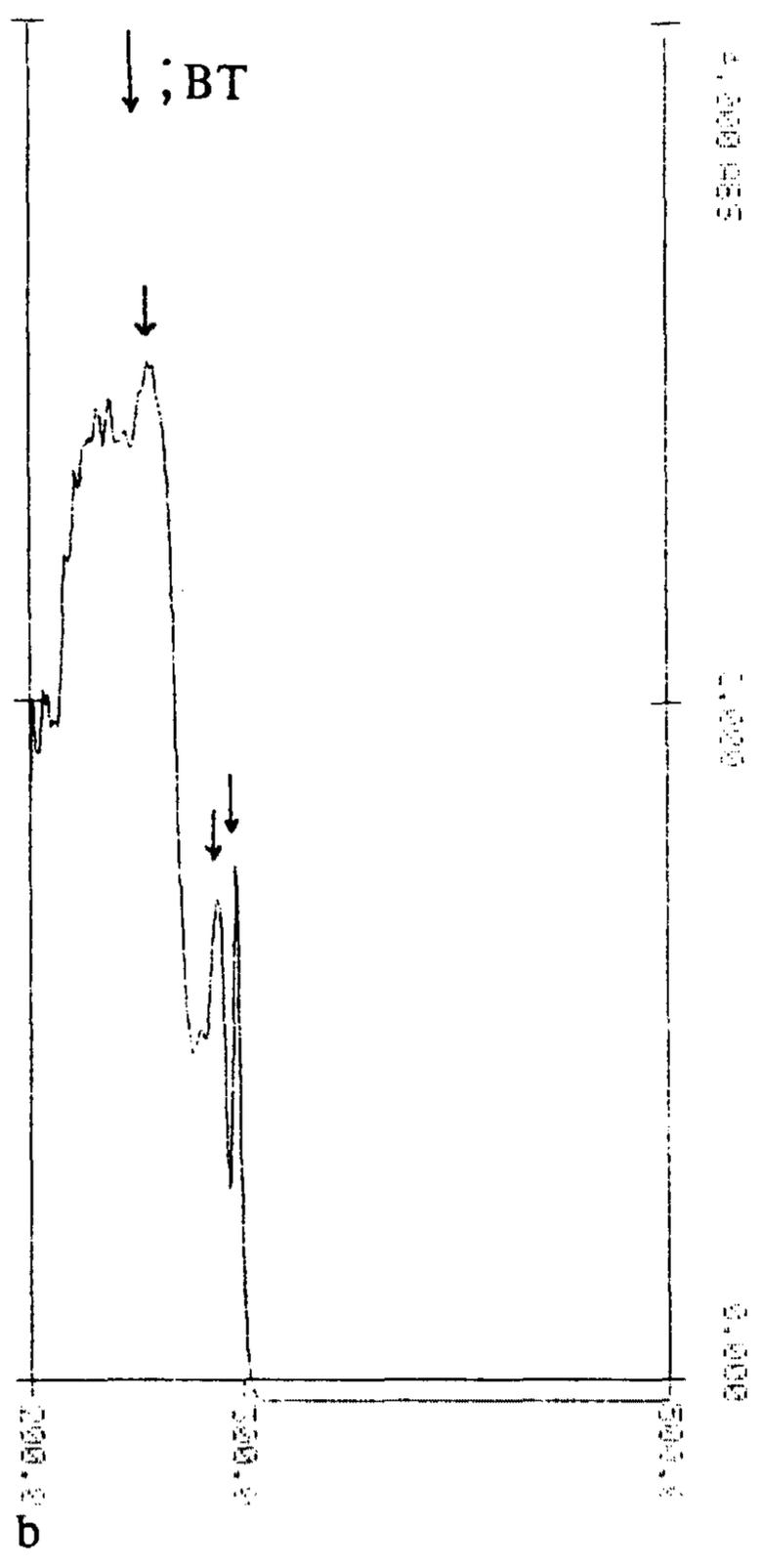
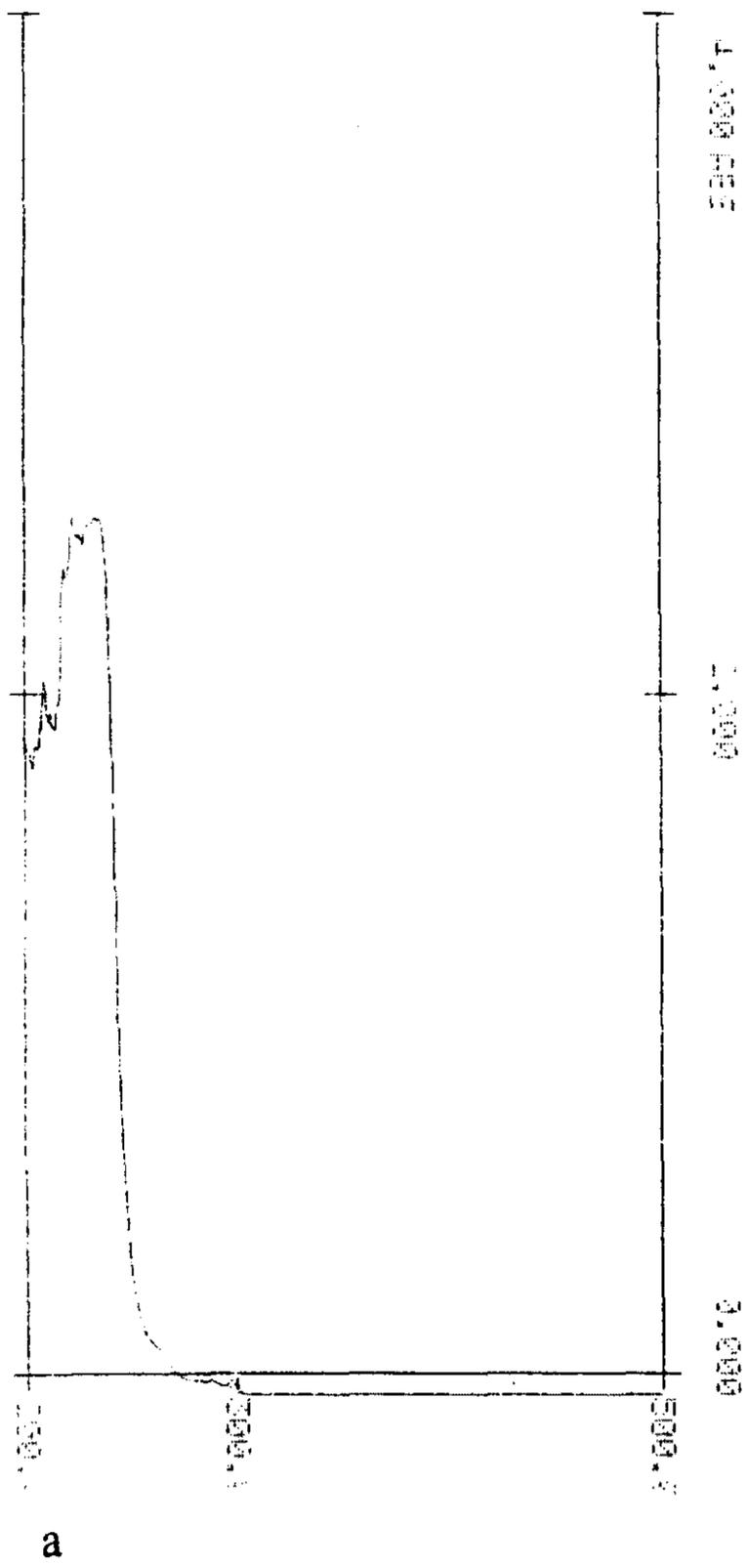
7. LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 benzothiophene의 전기화학적 분해

0.5% benzothiophene이 든 SO_4^{2-} -free postgate C 배지에 LiTCNQ를 처리한 황산염 환원 세균을 접종하여 전기화학 장치를 한 뒤 4일 동안 shaking water bath상에서 반응시켜 benzothiophene의 분해율을 조사하였다.

그림 16과 같이 benzothiophene이 대부분 없어졌으나, 대조구와 anode compartment에서도 benzothiophene이 분해되는 것으로 보아 BT의 분해 정도를 보아 LiTCNQ로 처리된 세포가 전극으로부터의 전자를 직접 받아 이를 이용한다고 결론 내리기는 부족하다.

Benzothiophene은 thiophene의 유황 화합물 중 분해가 가장 잘 되는 물질인데, 넣어주는 황산염 환원 세균의 양이 많고(70ml 반응조에 약 300ml의 균 배양액을 농축하여 넣어줌) BT이 황산염 환원균의 thiophene 분해에 관여하는 효소의 작용에 의해 쉽게 분해되기 때문에 anode compartment에서도 반응조가 완전히 산화된 상태로 넘어가기 전에 BT의 분해가 완결될 것으로 추측된다.

다음에는 BT대신 분해율이 BT보다 낮은 Dibenzothiophene을 분해하는 정도를 보아 전기화학적 에너지의 이용가능성을 살펴볼 계획이다.



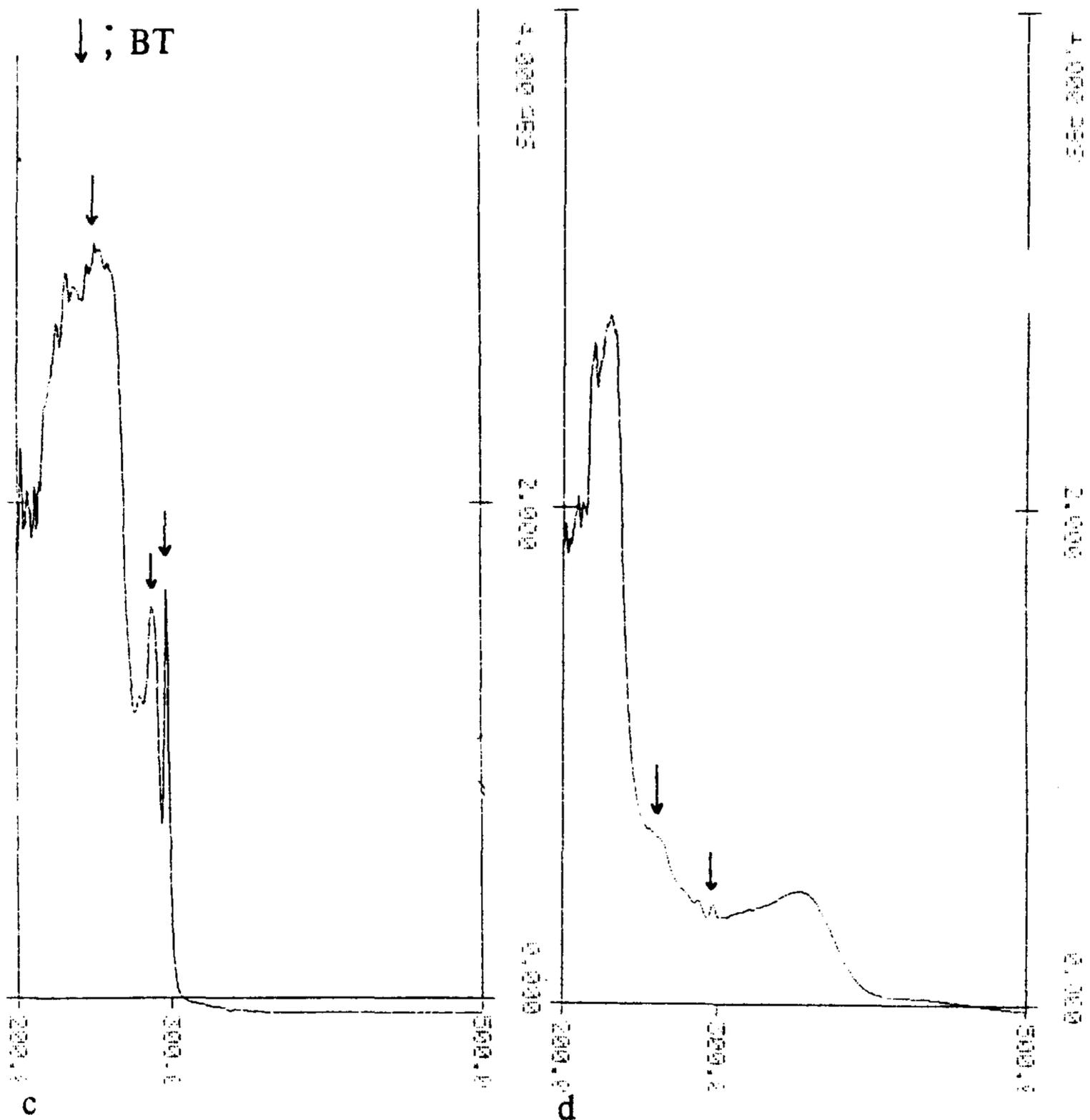


Fig. 16. degradation of Benzothiophene using LiTCNQ modified *D. desulfuricans*.

- a. Spectrum of 0.5% dimethylformamide (DMFA) in butanol
- b. Spectrum of 0.01% BT in butanol containing 0.5% DMFA
- c. Spectrum of BT before reaction
- d. Spectrum of BT after reaction

Table 3. Degradation of benzothiophene using LiTCNQ-treated *D. desulfuricans* M6.

	Benzothiophene (%)
before reaction	0.5
control	0.057
cathode	0.062
anode	0.078

*control : reaction was carried out by *D. desulfuricans* M6 which was not modified with LiTCNQ without the supply of electrochemical reducing power.

8. PMS의 성질 및 황산염 환원 세균과의 상호 작용

Phenazine methosulfate(PMS)는 NMP.TCNQ 유기 금속 전극을 만드는데 electron donor로 이용되는 물질로 물에 대한 용해도가 약 10% 정도로 hydrophilicity가 다소 높기 때문에 물에 녹지 않는 TCNQ의 대체 물질로 선정하여 세포막에 내재되어 전도성을 높일 수 있을지 실험하여 보았다.

PMS는 물과 butanol에서 공히 395nm와 260nm부근에서 최대 흡수치를 보였으며 butanol로 처리하여 butanol로의 전이도를 확인해 본 결과 butanol층 보다는 수층에 더 많은 부분이 전이 되었다 (fig. 17). 황산염 환원 세균에 PMS를 처리하여 incubation시킨 후 배양상등액만을 얻어 PMS가 세포와의 interaction에 의해 얼마나 감소되었나 측정 한 결과(fig. 18) 세포가 없는 배양액에서보다 PMS

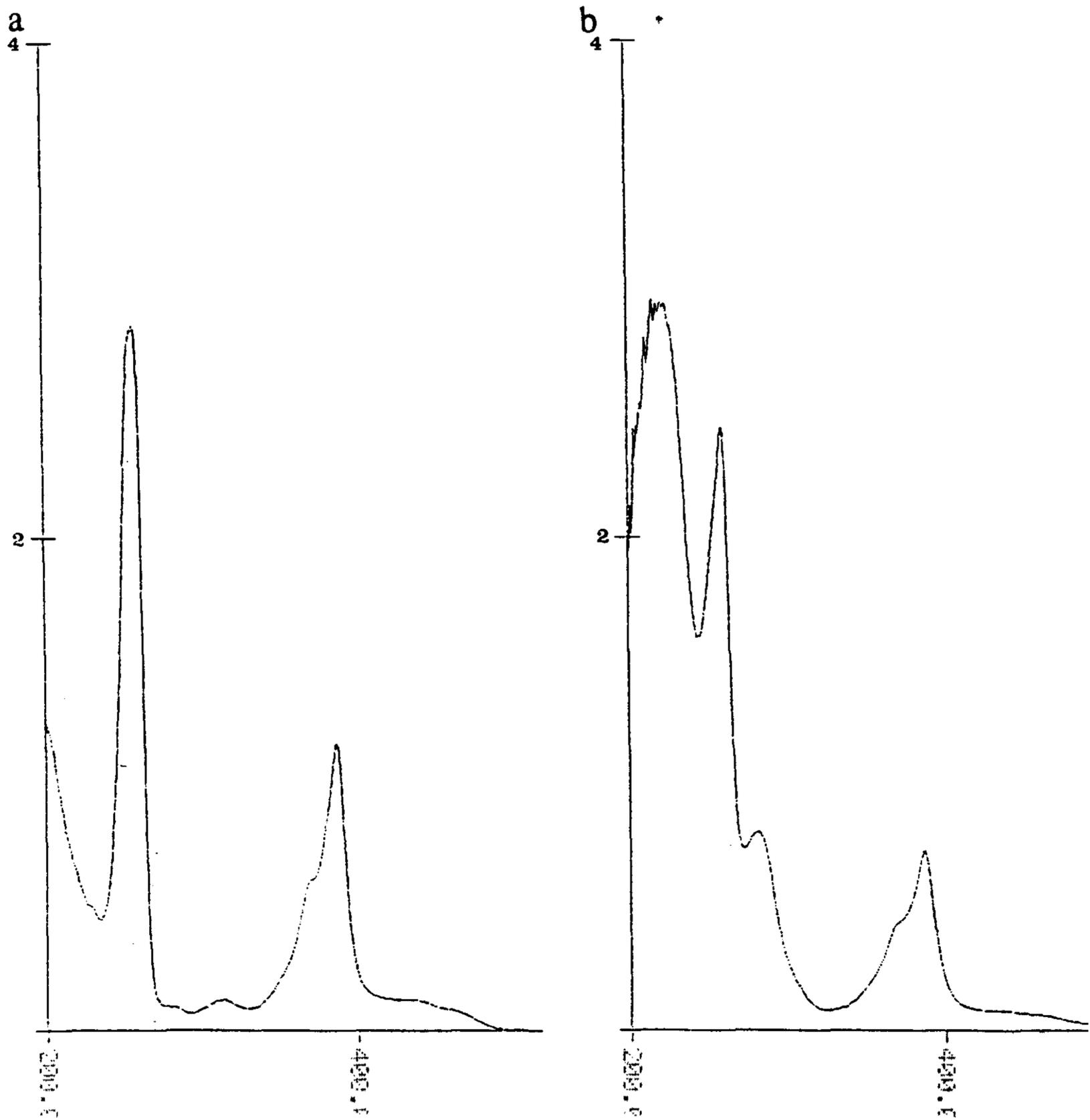


Fig. 17. Butanol extraction of PMS
a. Aqueous layer
b. Butanol layer

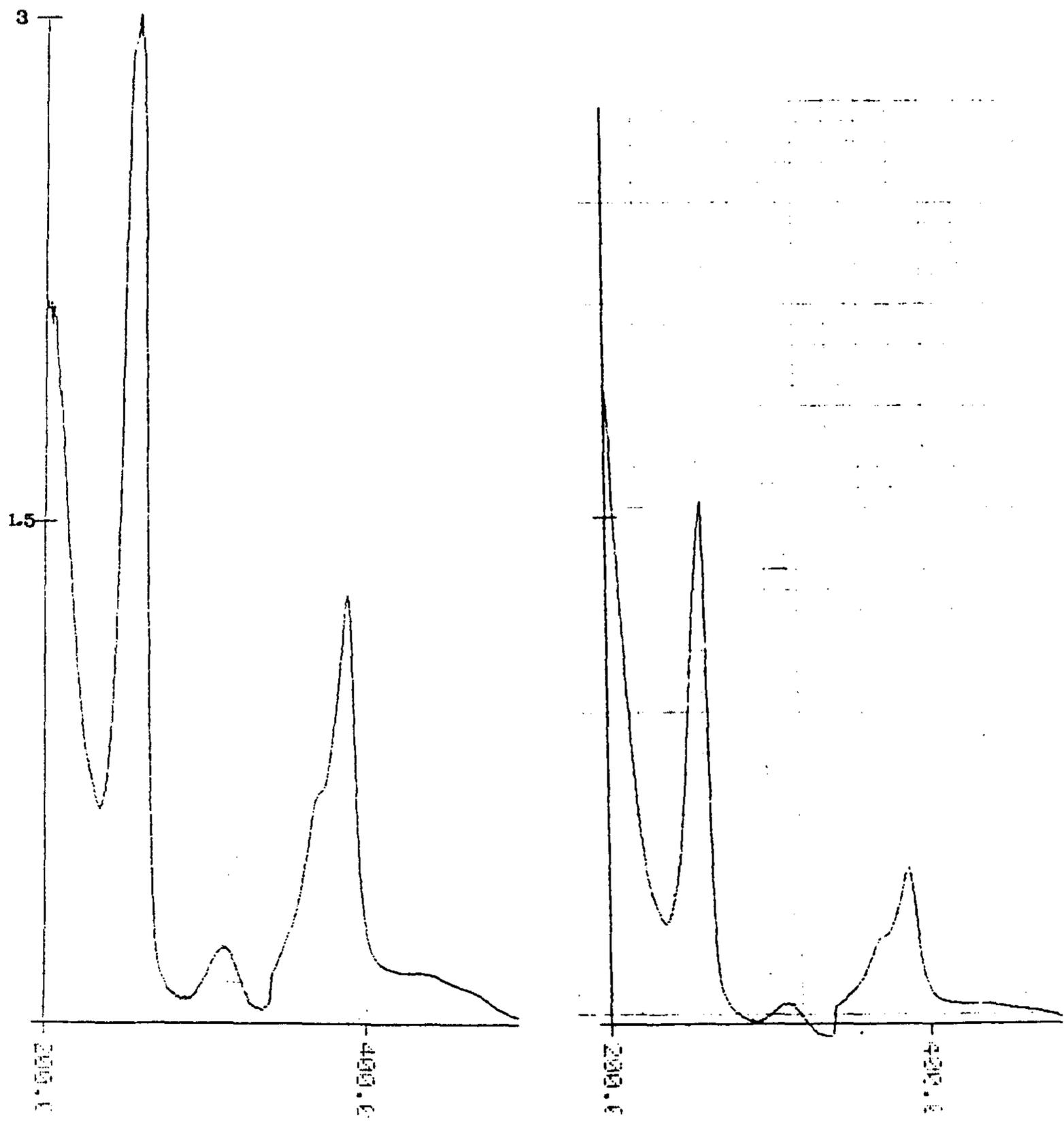


Fig. 18. Absorption spectrum of PMS in
 a. medium C
 b. supernatant after treatment in cell culture.

의 흡광도가 약 1/2로 줄어들었다.

이 실험의 결과로 PMS는 용매보다는 물에 대한 친화력이 더 크기는 하지만 소수성도 함께 가지고 있어 butanol로의 전이도 일어나며 또한 세포 배양액에 처리할 경우에도 세포와의 interaction이 일어나는데, 상등액에서 없어진 PMS의 양을 추측컨대 일정 부분은 세포막이나 outer membrane에 stacking 되었을 것으로 보이며 처리해 주는 PMS의 농도를 높이면 세포막에 PMS channel을 형성시킬 수 있을 것으로 사료된다.

9. PMS 및 PMS를 처리한 황산염 환원 세균의 cyclovoltammetry

Working electrode로 TTF, TCNQ 전극을 사용하여 PMS의 cyclovoltammogram을 수행한 결과 0.15M phosphate buffer와 post-gate C 배지에서 모두 +0.05, -0.07V 근방에서 anodic reaction이 일어났으며 -0.05V 부근에서 cathodic reaction이 일어나 PMS는 가역적인 산화-환원 반응을 보임을 알 수 있었다(fig. 19-a, b).

PMS를 처리한 황산염 환원 세균에서도 PMS와 비슷한 위치에서 산화-환원 반응을 보이는데 그 peak height는 PMS만의 산화-환원에 의한 peak보다 훨씬 낮게 나타났다. 세포에 결합된 PMS는 PMS 분자의 농도에 의해서가 아니라 세포의 농도에 의해 반응이 결정되는 것이므로 당연한 결과라 볼 수 있다.

LiTCNQ를 처리한 세포에서와 마찬가지로, PMS를 처리한 cell에서 PMS의 고유한 산화-환원 반응이 관찰된다 해도 그것이 꼭

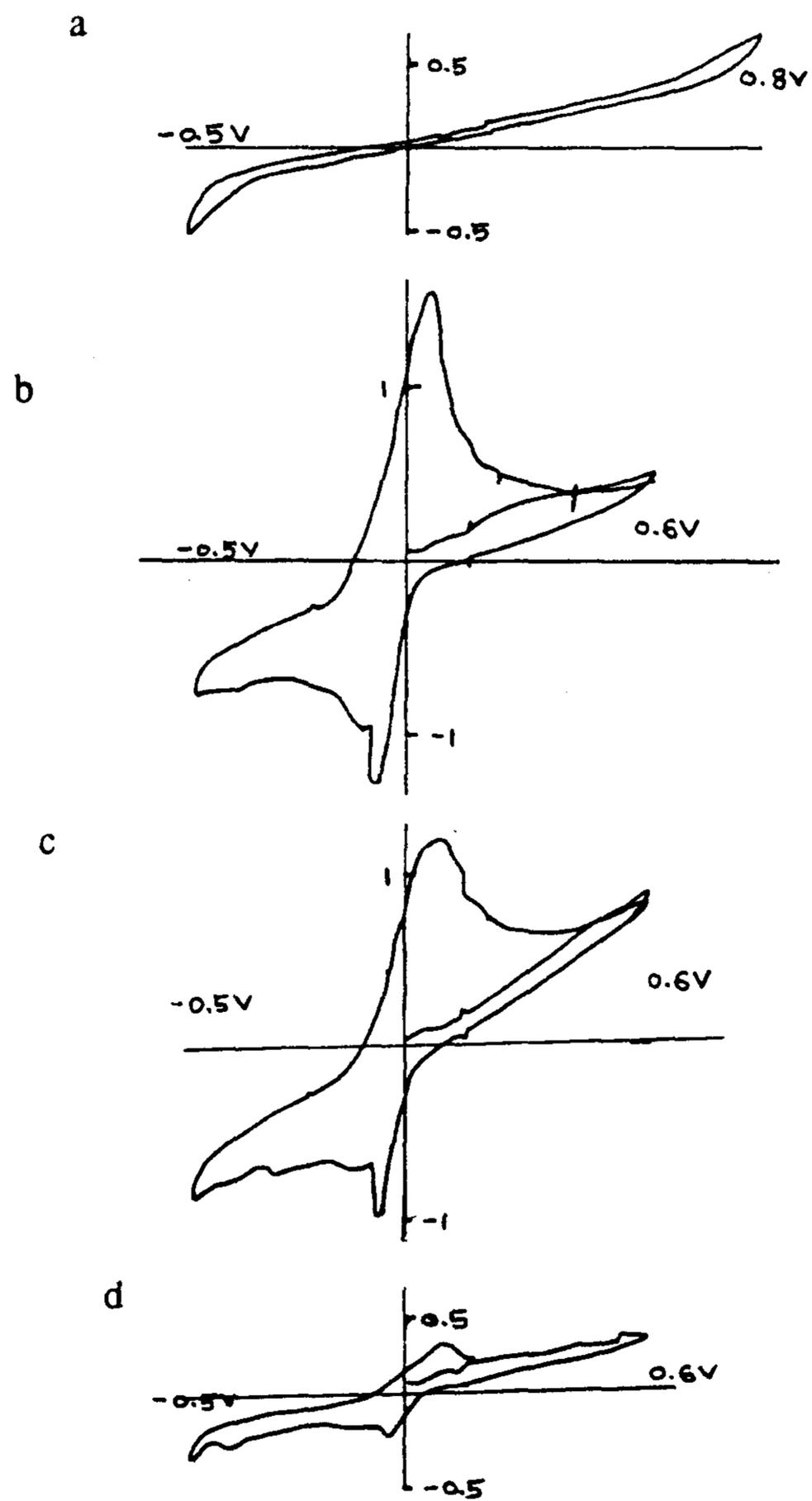


Fig. 19. Cyclovoltammogram of PMS
 a. medium C without PMS
 b. 0.5mM PMS in 0.15M phosphate buffer, ph 7.4
 c. 0.5mM PMS in medium C
 d. PMS-treated cell
 W.E. ; TTF. TCNQ

막의 전자 전달을 유도하였다고 볼 수는 없다. 우리가 내린 가설에 대한 검증을 하기 위해서는 membrane의 resistivity나 conductance를 직접 측정할 수 있는 장비가 절실히 요구된다.

10. PMS를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 원유의 탈황

Table 4에서 보듯이 PMS를 처리한 황산염 환원 세균을 이용한 전기화학적 석유의 탈황은 전혀 일어나지 않았는데, 실험 진행상의 문제점은 다음의 사항들을 들 수 있다.

Table 4. Desulfurization of crude oil using PMS-treated *D. desulfuricans*

	황함량(%)	탈황률(%)
원유	1.78	
1	1.74	2.5
2	1.78	0
3	1.78	0

1 : PMS-treated cell, without electrochemical e⁻

2 : PMS-treated cell, cathode compartment

3 : PMS-treated cell, anode compartment

첫째, TTF, TCNQ 전극 표면에 1mm 가량의 원유 피막이 형성되어 있는 것을 관찰하였는데, 전극 표면이 석유로 차단되면 석유는 전도성이 없기 때문에 전극으로부터 황산염 환원 세균까지 전자가 전달되는 것이 차단되어 유황 성분을 환원시킬 수 없다.

둘째, PMS가 소수성을 가지고 있어 outer membrane이나 원형질막과의 interaction을 통하여 막구조에 내재되었다 하더라도 이런 세포를 PMS의 농도가 0인 수용액에 다시 처리하게 되면 PMS의 친수성이 소수성보다 더 크기 때문에 수용액으로 diffuse out될 것이다. 그러면 PMS는 더 이상 electron channel의 기능을 하지 못하고 외부로부터의 전자는 세포내부로 전달될 수 없다.

셋째, PMS가 효율적으로 cell membrane에 내재되고 전극으로부터 전자를 받아 환원된다 하더라도 PMS의 redox potential이 cytc₃의 heme group이나 hydrogenase의 Fe-S cluster보다 낮을 경우는 PMS로부터 이들 cell component까지 전자의 전달이 일어날 수 없기 때문에 유황 성분의 환원은 진행될 수 없다.

이상의 실험 결과들을 최종적으로 평가해볼 때, LiTCNQ나 PMS 등 전도성 유기 물질에 의해 세포막 구조의 변형은 일어나지만 전극으로부터 이들 물질로 혹은 이들 전도성 물질로부터 cell component로까지의 전자전달이 효율적으로 일어나지 못하기 때문에 유황 성분의 환원이 일어나지 않는다고 볼 수 있다. 따라서 다음 년도에는 세포막에 효율적인 “electron channel”을 만들어주는 데 역점을 두어야 할 것으로 생각하며 다음의 문제들을 해결하기 위한 실험을 구상해야 할 것으로 본다.

첫째, membrane을 modification하는 새로운 전도성 물질을 개발해야 한다. TCNQ나 LiTCNQ, PMS 등은 크기가 적은 분자로 membrane에 channel을 형성하기 위해서는 여러 분자가 stacking되어야 하고, 이들의 구조가 membrane의 지질과 다른 구조를 가지

고 있기 때문에 얼마나 효율적으로 membrane에 내재되어 전도성을 증가시킬 수 있을지는 의문이 간다.

Membrane 변형 물질을 선택함에 있어서 이들 물질보다는 지질의 탄화수소와 유사한 구조를 갖는 polymeric hydrocarbon을 사용하여 한 두 개의 분자로 membrane을 완전히 가로지르는 electron channel을 만들어주든지, TCNQ나 PMS 등을 전도성을 갖는 amphipathic hydrocarbon chain으로 변형시켜 지질의 탄화수소와 유사한 구조를 갖게끔 한 후에 membrane의 전도성을 높이는데 사용하는 것이 훨씬 효율적일 것으로 보인다.

둘째, 황산염 환원 세균은 세포벽 바깥에 outer membrane을 가지며 우리들의 실험 목표는 이 외막을 변형시켜 periplasm에 있는 전자전달 효소에 전자를 전달하고자 하는 것이었다. 그런데 그림 20에서와 같이 세균의 outer membrane은 그 바깥쪽 표면에 polysaccharide로 이루어진 lipopolysaccharide가 돌출하고 있어 전도성

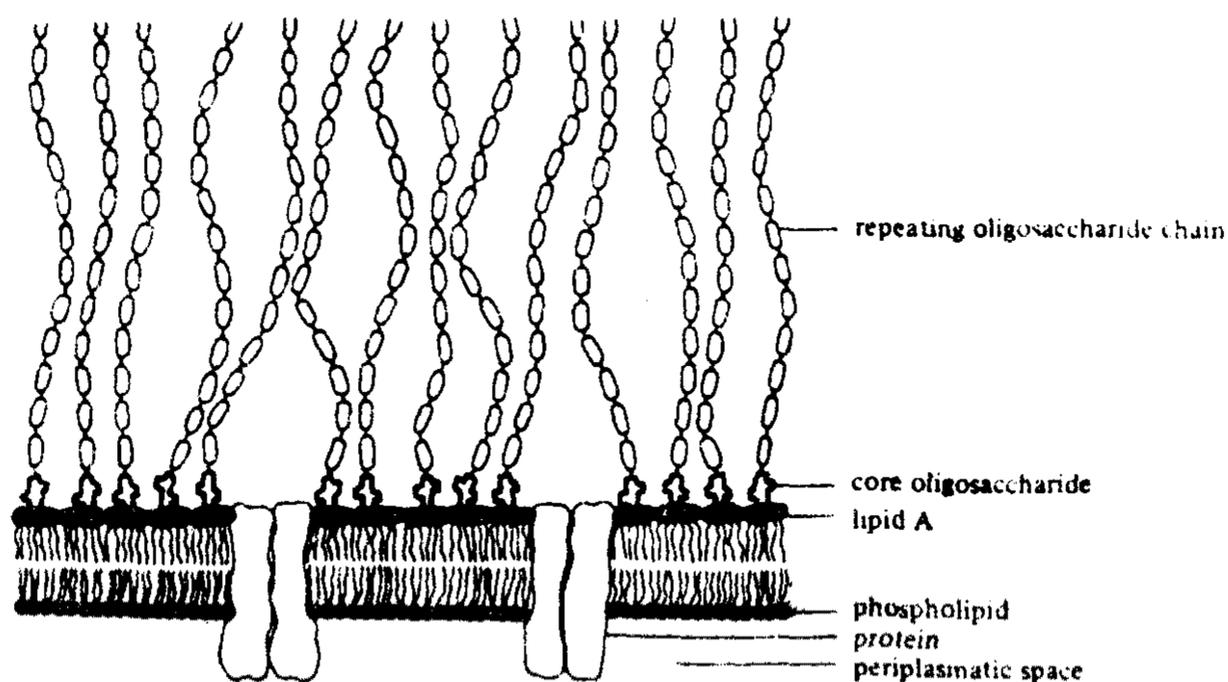


Fig. 20. Structure of outer membrane of Gram negative bacteria

유기 물질이 outer membrane에 내재되어 있다 하더라도 lipopolysaccharide에 의해 전극-outer membrane의 전도성 물질과의 접촉이 차단되어 전자 전달이 불가능할 것이다. 그러므로 막 변형물질로 amphipathic long chain을 만들든지, 이로 전도성 물질을 변형시키는 것이 꼭 필요하다고 본다.

셋째, intact cell의 membrane과 쉽게 접촉하여 cell-전극과의 전자 전달 효율이 높은 전극을 개발하는 것도 진행되어야 한다. 위의 두 문제는 membrane 변형 물질이 전극과 잘 접촉하도록 변형시키는 것이라고 한다면 이 문제는 전극의 표면에 polymeric methyl viologen이나 유기 고분자로 변형시켜 변형된 이 물질에 의해 전극-세포막 사이의 접촉 확률을 높여 전자를 효율적으로 전달하기 위한 것으로 막 변형 물질의 개발보다 더 중요한 문제일 것 같다.

그러나 이상에서 언급한 문제들은 결코 생물학 분야의 연구진들만의 힘으로는 모두 해결할 수 있는 문제가 아니라 고분자, 전기화학 분야의 전문가들과 그 분야의 장비의 적극적인 지원이 따라야 하므로 이들과의 cowork이 불가피하다.

Membrane을 변형시키지 않고 mediator를 사용하여 탈황의 효율을 높이는 방법도 함께 진행되어야 한다. 황산염 환원 세균을 이용한 전기화학적 탈황의 첫 단계를 전극의 전자를 세균의 전자 전달 효소중의 하나인 cytc₃나 hydrogenase에 전달하는 것이므로, 이들 metalloprotein과의 반응은 잘 일어나면서 toxicity나 enzyme inhibitory 효과가 없는 mediator를 개발하여 탈황에 이용하는 방법도 연구되어야 한다.

참 고 문 헌

- (1) 대한석유협회홍보실, 1987, 석유협회의보 6, 94-95.
- (2) Speight, J.G., 1980 The Chemistry and Technology of Petroleum, Dekker, New York.
- (3) Rall, H.T., Thompson, C.J., Coleman, H.J., and Hopkins, R.L. 1972 Sulfur compounds in crude oil, U.S. Department of the interior, Bureau of Mines, Bulletin 659.
- (4) Julia M.F., Phillip, M.F., Murray, R.G., and Donald, W.S.W. 1990, Microbial Treatment of Coal, "Microbial mineral recovery" eds. Ehrlich, H.L., and Brierley, C.L., McGraw Hill, New York.
- (5) 대한석유협회홍보실, 1987, 석유협회의보 9, 85-96.
- (6) Komada, K., Nakatani, S., Umehari, K., Shimizu, K., Minoda, Y., and Yamada, K., 1970. Microbial conversion of petrosulfur compounds; Isolation and identification of products from dibenzothiophene. Agr. Biol. Chem. 34:1320-1324.
- (7) Monticello, D.J., Bakker, D., and Finnerty, W.R. 1985. Plasmid-mediated degradation of dibenzothiophene by *Pseudomonas* sp. Appl. Environ. Microbiol. 49(4):756-760
- (8) Monticello, D.J., and Finnerty, W.R. 1985. Microbial desulfurization of fossil fuels. Ann. Rev. Microbiol. 39:371-389.
- (9) Zobell, C.E. 1953. Process and removing sulfur from petroleum

- hydrocarbons and apparatus. US patent. 2, 641, 564
- (10) Kurita, S., Endo, T., Nakamura, H., Yagi, T., and Tamiya, N. 1971, Decomposition of some organic sulfur compounds in petroleum by anaerobic bacteria. *J. Gen. Appl. Microbiol.* *17*, 185–198
- (11) Köhler, M., Genz, I.-L., Schicht, B., and Eckart, V. 1984. Anaerober Abbau organischer Schwefelverbindungen des Erdöl. *Zbl. Mikrobiol.* *139*, 239–247.
- (12) Isbister, J.D., and Kobylinski, E.A. 1985. Microbial desulfurization of coal, in Y.A. Attia(ed.) "Processing and Utilization of high Sulfur Coals, Coal science and Technology, Elsevier, Amsterdam
- (13) Higgins, J., and Hill, H.A.O. 1985. Bioelectrochemistry. *Essays Biochem.* *21*:119–145
- (14) Koryta, J. 1984. What is bioelectrochemistry. *Electrochim. Acta.* *29(9)*:1291–92
- (15) Simon, H.J., Bader, J., Günther, H., Neumann, S., and Thanos, J. 1985. Chiral compounds synthesized by biocatalytic reactions. *Angew. Chem. (Engl).* *24*:539–553.
- (16) Hongo, M., and Iwahara, M. 1979. Application of electro-energizing method to glutamic acid fermentation. *Agric. Biol. Chem.* *43(10)*:2075–2081.
- (17) Iwahara, M., and Hongo, M., 1982 Effect of electro-energizing

- conditions on cellular permeability toward L-glutamic acid. *Agric. Biol. Chem.* 46(1):183–189
- (18) Emde, R., and Shinck, B., 1990, Enhanced propionate production by *Propionibacterium freundenreichii* subsp. *freundenreichii* in a three-electrode amperometric culture system. *Appl. Environ. Microbiol.* 56(9):2771–2776
- (19) Kim, T.S., and Kim, B.H., 1988. Electron flow shift in *Clostridium acetobutylicum* fermentation by electrochemically introduced reducing equivalent. *Biotech. Lett.* 10(2):123–128.
- (20) Matsunaga, T., and Nakajima, T. 1985. Electrochemical classification of Gram-negative and Gram-positive bacteria. *Appl. Environ. Microbiol.* 50(2):238–242.
- (21) Paleček, E., Kolár, V., and Jelen, F. 1990. Electrochemical Analysis of the self-complementary B-DNA decamer d (CCAGGCC TGG) *Bioelectrochem. Bioenerg.* 23:285–299
- (22) deMele, M.F.L., Videla, H.A., and Arvia, A.J. 1982. Comparative Study of the electrochemical behavior of glucose and other compounds of biological interest. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 9:469–487.
- (23) Postgate, J.R. 1984 “The sulfate reducing bacteria” 2nd. ed. Cambridge University Press, Cambridge.
- (24) Lupton, F.S., Conrad, R., and Zeikus, J.G. 1984. Physiological functions of hydrogen metabolism during growth of sulfidogenic

- bacteria on organic substrates. *J. Bacteriol.* 159:843–849.
- (25) Siemons, W.J., Bierstedt, P.E., and Kepler, R.G. 1963 Electronic properties of a New Class of highly conductive organic solid. *J. Chem. Phys.* 39(12):3523–3532
- (26) Krysinki, P., and Tien H. Ti, 1988. Some electrochemical studies on charge transfer of TCNQ-modified BLMs. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 19:227–233.
- (27) Trasevich, M.R., and Bogdanovskaya. 1983. Bioelectrocatalysis. Enzyme as Catalysts of electrochemical reactions. Topics in Bioelectrochem. Bioenerg. Vol.5:225–260.
- (28) Cenas, N.K., and Pocius, A.K., and Kulys, J.J. 1983 Electron exchange between flavin and heme-containing enzymes and electrodes modified by redox polymers. *Bioelectrochem. Bioenerg.* 11:61–73.
- (29) Kulys, J.J., Samalius, A.S., and Svirmickas, G.-J.S. 1980. Electron exchange between the enzyme active center and organic metal. *FEBS Lett.* 114(1):7–10.
- (30) Perlstein, J.H. 1977 “Organic metals” –The intermolecular migration of aromaticity. *Angew. Chem.(Engl.)* 16:519–534
- (31) Alberty, W.J., and Bartlett, P.N. 1984. An Organic Conductor electrode for the oxidation of NADH. *J. Chem. Soc., Chem. Commun.* 234–236.
- (32) Thomas, J.D., Mamoru, N., Naoto, O., Kakunori, A., and Paul,

- A.L. 1986. Transmembrane electron transfer as catalyzed by poly(ethylenimine)-linked manganese porphyrins, *J. Am. Chem. Soc.* *108*:5865–5871
- (33) Bryce, M.R., and Murphy, L.C. 1984. Organic Metals, *Nature* *309*:119–126
- (34) Acker, D.S., Harder, R.J., Hertler, W.R., Mahler, W., Melby, L. R., Benson, R.E., and Mochel, W.E. 1960 7,7, 8,8,-tetracyanoquinodimethan and its electrically conducting anion-radical derivatives. *J. Am. Chem. Soc.* *82*:6408–6409.
- (35) Kepler, R.G., Bier Stedt, P.E., and Merrifield, R.E. 1960 Electronic conduction and exchange interaction in a new class of conductive organic solids. *Phys. Rev. Lett.* *5*:503–504
- (36) Melby, L.R., Harder, R.J., Hertler, W.R., Benson, R.E., and Michel, W.E. 1962. Substituted quinodimethans. II. Anion-Radical Derivatives and complexes of 7,7, 8,8,-tetracyanoquinodimethan. *J. Am. Chem. Soc.* *84*:3374–3387
- (37) Bartlett, P.N. 1990. Conducting Organic Salt electrodes. in "Biosensors; A practical approach" ed. by Cass, A.E.G., Oxford University Press, NY.
- (38) Bard, A.J., and Faulkner, L.R. 1980. "Electrochemical methods; Fundamentals and Applications" pp.213–248. John Wiley & Sons. NY.
- (39) Baronosky, J.J., Schreurs, W.A.J., and Kashket, E.R. 1984 Un

coupling by acetic acid limits and acetogenesis by *Clostridium acetobutylicum*.