

부탄분해미생물에 의한 가솔린첨가제
MTBE (Methyl tert-Butyl Ether) 분해

장순웅·백승식·이시진

경기대학교 토목환경공학부 환경공학전공

**Biodegradation of Gasoline Oxygenate MTBE(Methyl tert-Butyl Ether) by
Butane-Utilizing Bacteria**

Soon-Woong Chang, Seung-Sik Baek and Si-Jin Lee

Dept. of Environ. Eng., Kyonggi University

ABSTRACT

In this study, we have examined the potential degradation of MTBE (methyl *tert*-butyl ether) by pure culture ENV425 and mixed culture obtained from gasoline contaminated soil using *n*-butane as the sources of carbon and energy. The results described in this study suggest that MTBE is degraded cometabolically by ENV425 and mixed culture grown on *n*-butane. Butane and MTBE degradation was completely inhibited by acetylene, which indicated that both substrates were degraded by butane monooxygenase. These cultures grown on *n*-butane generated TBA (*tert*-butyl alcohol) as a metabolite of MTBE oxidation. TBA production was accounted 54.7% and 58.6% for MTBE oxidation by ENV425 and mixed culture, respectively. In resting cell experiments, however, TBA and TBF were detected as the oxidation products of MTBE by ENV425 and mixed culture. The observed maximal MTBE degradation rates were 52.3 and 62.3 (nmol MTBE degraded/hr/mg TSS) by ENV425 and mixed culture, respectively, and the observed maximal transformation yields (T_y) were 44.7 and 34.0 (nmol MTBE degraded/ μ mol *n*-butane utilized), and the observed maximal transformation capacities (T_c) were 199 and 226 (μ mol MTBE degraded/mg TSS used).

Key words : MTBE, TBA, TBF, Butane, Cometabolism

요 약 문

본 논문에서는 순수균주인 ENV425와 오염된 토양으로부터 분리한 혼합균주를 이용하여 가솔린 산화제인 MTBE에 대한 분해 가능성을 조사했다. MTBE는 *n*-butane에서 성장한 ENV425와 혼합균주에 의해 공대사적으로 분해가 이루어졌다. 또한 아세틸렌의 첨가에 의해 *n*-butane과 MTBE의 분해가 완전히 방해되어짐에 따라 두 기질 모두 부탄 분해 효소에 의해 분해되어짐을 알 수 있었다. *n*-butane에서 성장한 ENV425와 혼합균주는 MTBE를 분해하고, MTBE의 분해산물로 TBA가 생성되었다. TBA의 생성은 분해된 MTBE에 대하여 ENV425와 혼합균주 각각 54.7%, 58.6%가 관찰되었다. 그러나, Resting cell 실험에서는 ENV425와 혼합균주에 의한 산화 생성물로 TBA와 TBF가 생성되었다. ENV425와 혼합균주에 의한 최대 MTBE 분해속도는 각각 52.3 그리고 62.3 (nmol MTBE degraded/hr/mg TSS), 최대 T_y (Transformation yield)는 각각 44.7, 34.0 (nmol MTBE degraded/ μ mol *n*-butane utilized)으로 나타났고, 최대 T_c (Transformation capacity)는 각각 199, 226 (nmol MTBE degraded/mg TSS used)으로 나타났다.

주제어 : MTBE, TBA, TBF, 부탄, 공대사

1. 서 론

MTBE는 생물학적으로 내분해성 물질 (Resistant compound)로 분류된다. 이는 MTBE의 구조 속에 포함되어있는 ether (C-O-C) 결합이 화학적으로 안정하기 때문이다¹⁾. 1979년부터 MTBE는 무연휘발유의 옥탄가 향상제로 사용되었으나, 1990년 휘발유내의 산소의 함량을 중량비로 최소 2.7%로 유지하게 한 미국의 Clean Air Act Amendments에 의해 일산화탄소 등의 대기 독성물질로 오염이 심각한 지역에 대해 휘발유의 완전산화를 보조하는 산소첨가제 (Oxygenates)로 사용되기 시작하였다²⁾.

현재 미국에서 산소첨가휘발유 (Oxyfuels)의 MTBE는 가장 일반적으로 사용되어 가솔린 전체 사용량의 30%이상 첨가되어진다. 가솔린에 첨가된 MTBE의 평균 부피비는 3.4%로 지역별 및 계절별로 함량이 조금씩 변화하며, 한대 지역에서는 부피비로 최고 15%까지 첨가되고 있다³⁾. 이외에도, 1994년부터는 오염을 유발하는 benzene, butadien, formaldehyde, acetaldehyde 등과 같은 유독한 유기물질 (VOCs)을 제어하기 위한 산소 첨가제 및 독성물질 저감제로 사용됨에 따라 MTBE의 생산량이 매

년 급격히 증가하였다. 1984년부터 1994년까지 연평균 24%로 생산이 증가되어 1992년 4백만 톤, 1994년 6.2백만 톤, 1995년 2천1백만 톤이 생산되었고, 앞으로도 지속적인 생산 증가가 예상된다. 우리나라의 경우, 1993년 환경보전법에 의하여 MTBE의 휘발유 배합이 의무화되어 상당량이 휘발유에 첨가되어지고 있다⁴⁾.

국내의 지하저장탱크 현황을 살펴볼 때 유류 및 유기물질 지하저장탱크 수는 54,461개소이며 이중 5년 이상의 기간이 지난 지하저장탱크는 26,038개소로 추정되고 있어, 4년이 지난 지금 주유소 거리제한 철폐에 따른 예상 증가량을 감안할 때 토양과 지하수의 오염이 계속해서 가속화되고 있는 실정이다. 유류오염 증가와 더불어 국내에서는 아직까지 법적 규제가 이루어지지 않고 있지만, 가솔린 첨가제로 이용되고 있는 MTBE에 의한 오염을 예측할 수 있다.

이렇듯 MTBE로 오염된 토양 및 지하수의 처리방법으로 물리·화학적인 방법들이 많이 이용되고 있으나, 최근 경제적인 측면에서 이점이 많은 생물학적 처리방법을 효율적으로 극대화하는 연구가 이루어지고 있으며, 이 방법을 적용할 경우 많은 비용이 절감된다는 것은 이미 널리 알려진 사실이다. 그러나, 가솔린

성분과 달리 MTBE는 생물학적으로 분해가 쉽지 않아, 적절한 외부탄소원의 공급에 의해 MTBE의 분해를 유도하는 방법이 호기성 생물학적 처리방법에서도 효율적인 방안으로 고려되고 있다. 미국의 예를 들어, 현재 사용되고 있는 물리·화학적 MTBE 처리 공정을 생물학적 복원 공법으로 대처할 경우, 미국 캘리포니아주에서만 30억 달러, 미국 전체에서는 약 400억 달러의 처리비용이 절감될 것으로 예측하고 있다⁹. 이상과 같이 경제적인 파급효과가 큰 생물학적 처리를 가능하게 하기 위해서는 MTBE를 효율적으로 분해하는 미생물의 발견과 그 분해 특성을 규명하여야 한다.

본 논문에서는 호기성조건에서 순수균주인 ENV425와 국내 유류 오염 토양에서 분리된 혼합균주를 이용하여 *n*-butane을 탄소원과 에너지원으로 사용했을 때 MTBE의 분해 특성을 관찰하였다.

2. 실험방법

2.1 미생물의 분리

유류로 오염된 지역에서 토양을 채취하여 *n*-butane을 탄소원과 에너지원으로 이용하는 혼합균주를 얻었다. 광합성에 의한 미생물 성장을 최소화하기 위해 amber serum bottle (120 mL)을 이용하였으며 bottle에 유류로 오염된 토양 10 g과 배양액 (BSM, Basal Salts Medium) 50 mL를 넣고 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 막은 후, 진공 펌프로 bottle 내부의 공기를 제거한 후 *n*-butane 30 mL, O₂ 10 mL, 그리고 air 30 mL로 나머지 headspace를 채웠다. 그리고 7~10일간 shaking incubator에서 25°C, 150 rpm의 조건으로 배양시킨 후 1 mL를 빼내어 같은 조건의 amber serum bottle (1.2 L)에 접종시켜 1주 간격으로 2개월간의 계대배양을 반복하여, *n*-butane을 탄소원으로 이용하는 혼합균주를 분리하였다.

그리고, 본 실험에 이용된 순수 균주인 ENV425 (ATCC 55798)는 Envirogen, Inc. (U.S.A.)로부터 기증 받아 본 실험에 이용하였다. ENV425는 propane을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 분리되

었으며, 오렌지 colonies로 빨간 형태의 gram-variable, acid-fast, filamentous, rod-shaped을 보여주고, fatty acid 분석으로 *Nocardia*속의 한 종류로 확인되었다⁶. 처음 밀봉된 유리 용기에 고형화 상태였던 ENV425를 영양한천배지에 도말하여 30°C에서 24시간 평판 배양한 후 50 mL의 탄소원이 존재하지 않는 BSM media와 *n*-butane 30 mL, O₂ 10 mL, 그리고 air 30 mL로 headspace를 채운 amber serum bottle (120 mL)에 접종하여 7~10일간 shaking incubator에서 25°C, 150 rpm으로 배양시키고, 1 mL를 빼내어 배양액 50 mL, 그리고 *n*-butane 30 mL, O₂ 10mL, air 30 mL가 넣어져 있는 amber serum bottle (120 mL)에 접종시켜 혼합균주와 같은 방법으로 이용하였다.

2.2 MTBE 분해 실험

실험에 사용된 모든 초자류 및 기기는 가능한 고압 증기 멸균기를 이용하여 121°C, 15분간 멸균하여 사용하였다. 1.2 L amber serum bottle에서 약 7~10일 동안 25°C, 150 rpm의 조건에서 성장한 미생물은 OD₅₅₀로 관찰하였다. 이 때 흡광도는 약 0.4~0.5 정도가 되며, TSS (Total Suspended Solid)를 측정하고 원심분리하여 미생물을 농축시켰다. TSS의 값과 원심분리 후 농축시킨 미생물 농축액의 농도를 계산하여 필요량을 serum bottle에 주입하는 방식을 유지하였다. MTBE 분해실험은 120 mL serum bottle에 50 mL BSM과 MTBE를 주입한 후, teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 막았다. 그리고 O₂ 10 mL와 필요량의 *n*-butane을 넣고 나머지 부분을 공기로 채운 후, 최종적으로 균주를 접종한 후에 실험이 시작되었다. 그리고, 비교 실험으로 위와 동일한 조건에 acetylene (1.0 % (vol/vol); gas phase)을 첨가하여 실험을 진행하였다.

Resting cell 실험인 경우, 위와 동일한 순서로 준비하였고, serum bottle에 탄소원인 *n*-butane를 첨가하지 않고 실험이 진행되었다.

2.3 분석방법

MTBE (Methyl *tert*-Butyl ether, $C_5H_{12}O$), TBF (*tert*-Butyl formate, $C_5H_{10}O_2$), *n*-butane (C_4H_{10})의 측정은 Hamilton 1710N gas-tight syringe를 이용하여 bottle의 headspace에서 100 μ l를 채취하여 기체크로마토그래피 (Gas Chromatography, GC)에 직접 주입하여 이루어졌다. GC는 HP-5 칼럼 (Crosslinked 5% Ph Me Silicone, 25m \times 0.32mm \times 0.52 μ m film)과 불꽃이온화검출기 (flame ionization detector, FID), 그리고 HP 3394의 integrator가 연결된 Hewlett-Packard 5890 series II를 사용했다. GC의 운전 조건은 주입부, 검출부의 온도가 각각 200 $^{\circ}C$, 200 $^{\circ}C$ 이며, 오븐은 40 $^{\circ}C$ 에서 등온으로 운전하였다. Carrier gas는 1 mL/min의 속도로 질소가스를 사용했으며, 이때 MTBE, TBF, *n*-butane의 체류시간은 각각 3.40, 4.36, 2.40 min 이었다.

TBA (*tert*-Butyl alcohol, $C_4H_{10}O$)의 측정은 CS₂를 이용한 용매추출에 의해 GC로 분석되었다. 먼저 배양액 0.5 mL를 bottle로부터 채취하여 CS₂ 3 mL가 들어있는 15 mL amber serum bottle에 주입하여, 4.5 mm의 orbital diameter를 가진 IKA Minishaker MS1에 1,000 rpm으로 3분간 교반한 후, TBA가 추출된 CS₂를 5 μ l 채취해 위에 나타낸 GC 조건과 동일하게 분석하였다. 이때 TBA의 체류시간은 2.97 min이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1 순수균주 ENV425와 혼합균주의 성장 비교

본 실험에서는 우선적으로 propane을 탄소원으로 이용하여 분리된 순수균주인 ENV425와 *n*-butane을 탄소원으로 이용하여 국내 유류오염토양에서 분리된 혼합균주가 *n*-butane을 탄소원으로 이용할 때의 균주 성장률을 비교하였다.

BSM media 50 mL가 채워진 120 mL bottle에 *n*-butane 60 μ mol을 주입하고, ENV425와 혼합균주를 각각의 bottle에 동일하게 1.77 mg (건량기준)을 접종시켜 소비된 *n*-butane과 미생물 성장의 관계, 그

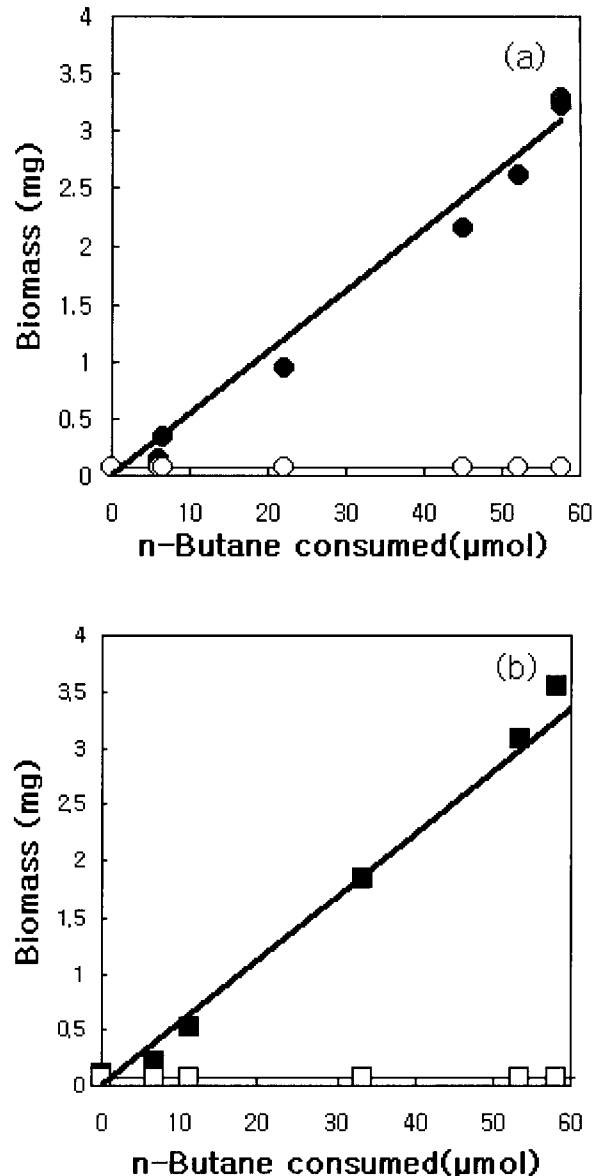


Fig. 1. Growth yields of (a) ENV425 (●) and (b) Mixed culture (■) on *n*-butane. The biomass yields obtained in the presence of acetylene (1.0% [vol/vol]; gas phase) and ENV425 (○) or mixed culture (□) were also shown.

리고 반응시간에 따른 남아있는 *n*-butane을 관찰하였다.

ENV425와 혼합균주를 비교해 보면, 두 경우 모두 소비된 *n*-butane에 대해 미생물성장이 선형적인 관계를 나타내고 있음을 볼 수 있다(Fig. 1). 즉, 기질 소모량에 따른 미생물 생성량이 비례하고 있음을 알 수 있다. ENV425와 혼합균주의 growth yield는 단일 탄소원으로 이용되는 *n*-butane의 소비 후에, 각각 56.9, 54.1 (g of biomass/mol of *n*-butane consumed)로 나타났다(Fig. 1). 그러나, *n*-butane을 주입하지 않고 MTBE를 탄소원 및 에너지원으로 공급하였을 때는 미생물의 성장이 관찰되지 않아 MTBE가 탄소원 및 에너지원으로 이용되지 않음을 알 수 있다(Data not shown).

위의 실험에서 시간에 따른 *n*-butane의 기질 소모량을 분석한 결과, 0~50 hr의 *n*-butane 초기 소비속도는 ENV425와 혼합균주 각각 0.14, 0.24 ($\mu\text{mol } n\text{-butane/hr}$)이고, 50~90 hr의 소비속도는 각각 0.96, 1.04 ($\mu\text{mol } n\text{-butane/hr}$)로 나타났다. 두 경우 모두 유사하게, 반응시간 120 hr 경과 후에 bottle의 모든 *n*-butane (60 $\mu\text{mol/bottle}$)을 소비한 것으로 관찰되었다(Fig. 2). 그러나, acetylene (1.0% [vol/vol]; gas phase)이 공급된 경우에는 *n*-butane의 분해 및 미생물 성장이 관찰되지 않아 Fig. 1에서의 미생물 성장은 *n*-butane 이용에 의한 것임을 설명해 준다.

3.2 *n*-Butane 소비에 따른 MTBE 분해 특성

이전 실험에서 ENV425와 혼합균주는 단일탄소원과 에너지원으로서 MTBE를 이용하지 않음을 관찰했다. 본 실험은 *n*-butane과 MTBE를 혼합하여, ENV425와 혼합균주에 의한 MTBE의 분해특성을 조사하였다.

실험방법에 설명되었듯이 BSM 50 mL가 채워진 120 mL bottle에 *n*-butane 60 μmol 과 MTBE 2 μmol 을 주입하고, ENV425와 혼합균주를 각각의 bottle에 동일하게 9.4 mg (건량기준)씩 접종시켜 *n*-butane 및 MTBE 분해특성을 관찰하고, MTBE 분해 산물을 정성·정량 분석하였다.

ENV425의 경우 초기 (0~6 hr)에는 *n*-butane의

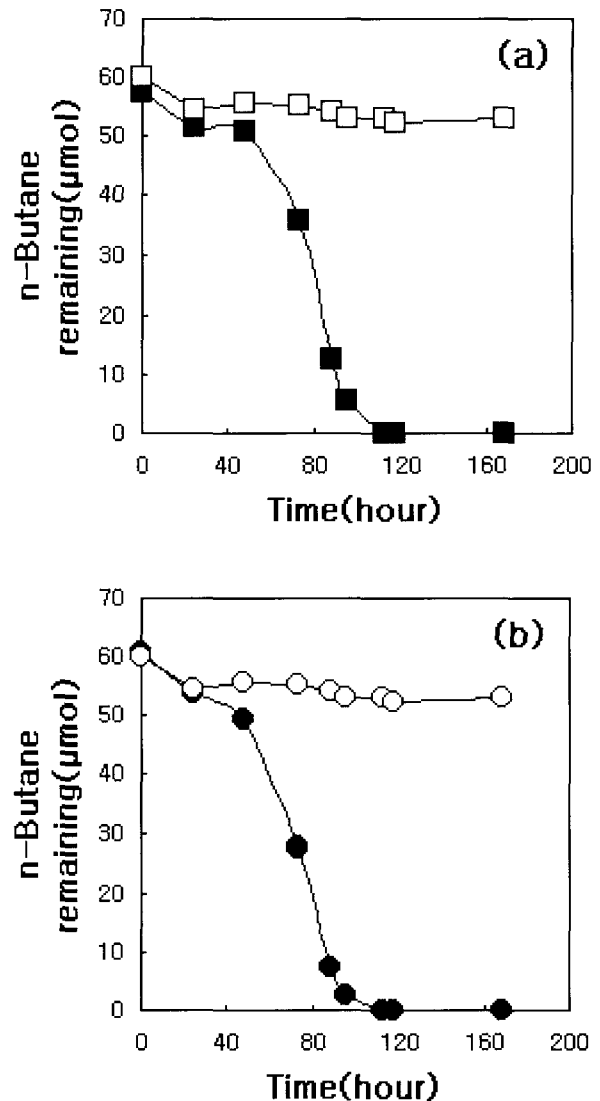


Fig. 2. Degradation of *n*-butane by *n*-butane grown (a) ENV425 (■) and (b) mixed culture (●). Shown are the time courses of *n*-butane consumption for ENV425 and mixed culture incubation with *n*-butane in the presence (□, ○) or absence (■, ●) of acetylene (1.0% [vol/vol]; gas phase).

소비가 지연기를 거쳐 소비되기 시작했으며, 혼합균주의 경우 접종 즉시 *n*-butane의 소비가 관찰되었다. (Fig. 3(a), Fig. 4(a)) 접종 후 20 hr에서 *n*-

butane의 분해율을 보면 ENV425의 경우 55.8%, 혼합균주의 경우 85.1%로 나타났다. 즉, 적절한 양의 균주가 초기에 공급된 상태에서 혼합균주가 ENV425 보다는 활발하게 *n*-butane를 분해한다고 설명할 수 있다. ENV425의 *n*-butane 소비속도는 9~20 hr 동안 217 nmol/hr/mg biomass (dry weight)로 나타났고, 혼합균주의 경우 0~20 hr 동안 300 nmol/hr/mg biomass (dry weight)으로 나타나, 혼합균주의 분해속도가 다소 빠른 것을 볼 수 있다. 그러나 두 균주 모두 20시간 이후에는 *n*-butane의 소비속도가 다소 감소하고 있음을 볼 수 있다.

Acetylene (1.0% vol/vol); gas phase)이 첨가된 경우에는 *n*-butane 및 MTBE의 분해가 일어나지 않아, *n*-butane이 분해되면서 생성된 효소에 의해 MTBE의 분해가 유도되고 있음을 알 수 있다. Fig. 3, Fig. 4에서 보듯이 두 경우 모두 MTBE 분해 경향과 *n*-butane 분해 경향이 유사함을 볼 수 있다. 즉, MTBE의 분해는 ENV425의 경우 *n*-butane과 마찬가지로 MTBE의 분해 지연기를 거쳐 분해되기 시작하였고, 혼합균주의 경우 접종 즉시, *n*-butane과 함께 MTBE의 분해가 관찰되었다. ENV425의 MTBE 분해속도는 9~21 hr 동안 11 nmol/hr/mg (dry weight)로 나타났고, 혼합균주의 경우 0~15 hr 동안 9 nmol/hr/mg (dry weight)으로 나타났다. 접종 후 20 hr에서는 ENV425의 경우 MTBE는 71.2% 분해되었고, 혼합균주는 89.8% 분해되었다. 40 hr 후에 ENV425의 경우 MTBE 분해율이 90%인 반면, 혼합균주의 경우 완전한 MTBE의 분해가 관찰되었다.

위의 결과를 분해된 *n*-butane에 대한 MTBE의 분해량을 나타내는 Transformation yield로 비교해 보면 ENV425의 경우 20, 40 hr 일 때 각각 44.7, 31.9 (nmol of MTBE degraded/ μ mol of *n*-butane consumed), 그리고 혼합균주의 경우 34.0, 32.3 (nmol of MTBE degraded/ μ mol of *n*-butane consumed)로 나타났다(Table 1). 본 실험과 유사한 결과는 곰팡이류인 Graphium sp.를 이용한 Hardison 등⁷의 실험에서는 MTBE의 농도가 약 200 μ M일때, *n*-butane를 탄소원으로 이용했을 때 관

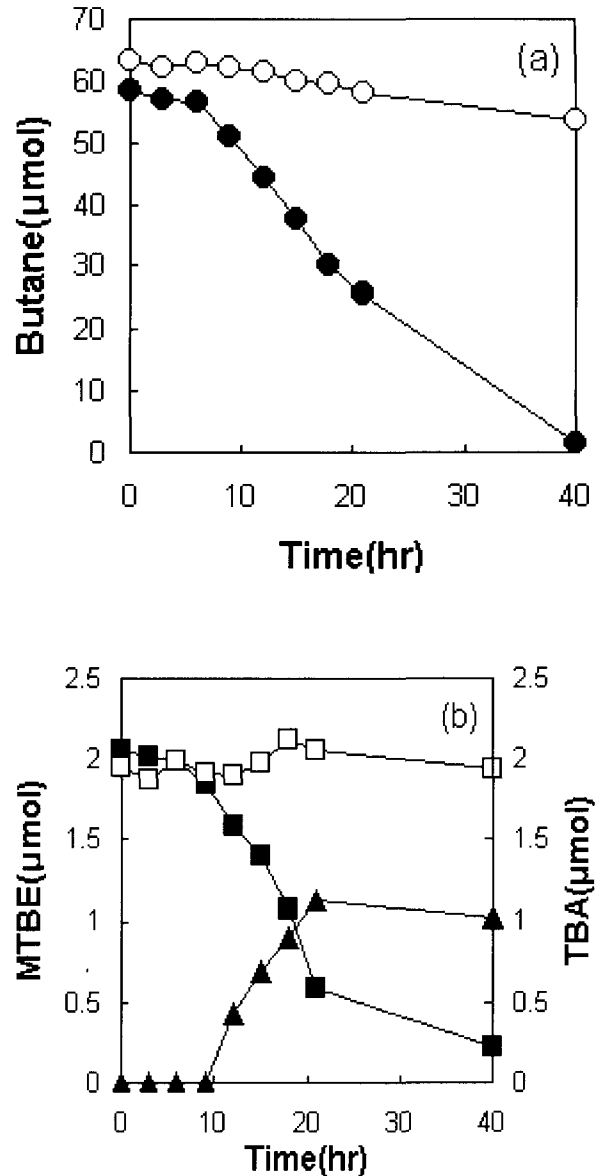


Fig. 3. Cometabolic degradation of MTBE by *n*-butane grown ENV425. (a) Time course for *n*-butane consumption in the absence (●) and presence (○) of acetylene (1.0% (vol/vol); gas phase). (b) Time course for MTBE degradation and TBA production (▲) in the absence (■) and presence (□) of acetylene (1.0% (vol/vol); gas phase).

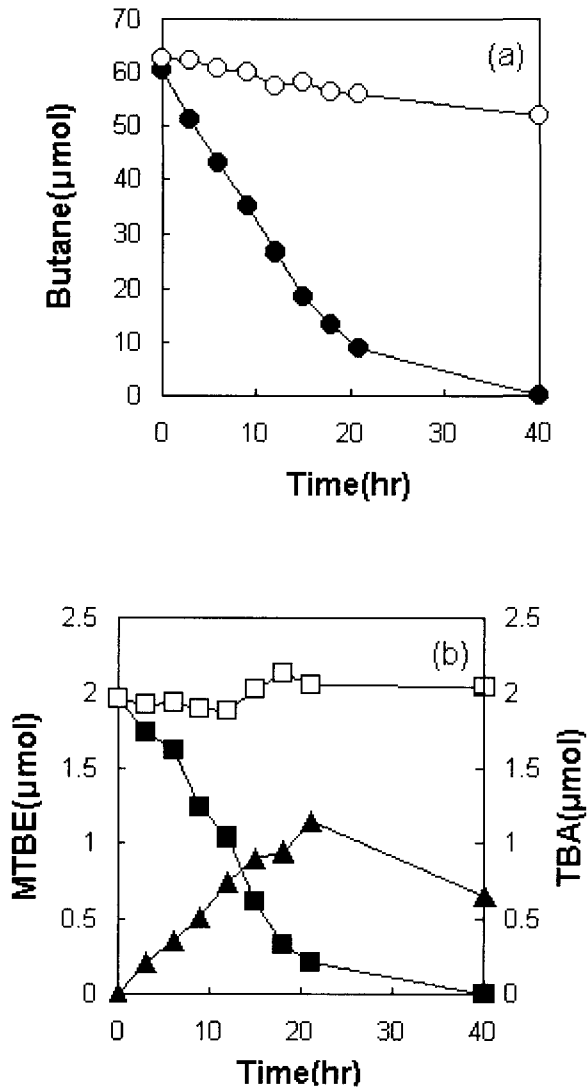


Fig. 4. Cometabolic degradation of MTBE by *n*-butane grown mixed culture. (a) Time course for *n*-butane consumption in the absence (●) and presence (○) of acetylene (1.0% (vol/vol); gas phase). (b) Time course for MTBE degradation and TBA production (▲) in the absence (■) and presence (□) of acetylene (1.0% (vol/vol); gas phase).

측된 최대 MTBE 분해속도는 25℃에서 10.5 nmol/hr/mg 이었고, ENV421과 ENV425를 이용한 Steffan 등⁶⁾의 실험에서는 MTBE의 230 μM 에서 propane을 탄소원으로 이용했을 때, 최대 MTBE 분해속도는 각각 28℃에서 9.2 nmol/min/mg of protein, 4.6 nmol/min/mg of protein으로 나타났으며, Garnier 등⁸⁾의 실험에서는 pentane을 탄소원으로 이용하여 MTBE가 약 3500 μM 일 때 최대 MTBE 분해 속도가 25℃에서 3.9 nmol/min/mg of protein로 나타났다(Table 2). 본 실험에서 얻어진 MTBE 제거량은 위의 실험에 비해 주입된 MTBE 농도가 4-5배 적었음에도 불구하고 미생물량에 대한 MTBE의 제거량이 상대적으로 높게 관찰되었음을 알 수 있다. 즉, 유류오염지역에 직접 분리해서 얻은 혼합균주의 MTBE 분해능력이 뛰어나다고 설명할 수 있다.

MTBE의 분해 산물인 TBA는 *n*-butane과 MTBE가 분해되기 시작하면서 생성이 관찰되었다. ENV425의 경우 MTBE와 *n*-butane의 지연기인 0~6 hr 동안에는 TBA의 생성이 관찰되지 않았으나, MTBE의 분해가 시작되고, 반응 9 hr부터 생성되어 축적되었다. 혼합균주에서는 MTBE와 유사하게 접촉 즉시, TBA의 생성이 관찰되었다. ENV425의 TBA 생성속도는 9~21 hr 동안 9.9 nmol/hr/mg(dry weight)로 나타났고, 혼합균주의 경우 0~15 hr 동안 6.4 nmol/hr/mg(dry weight)로 나타났다. 그러나 두 경우 모두 TBF (*tert*-butyl formate)의 생성은 관찰되지 않았다. 접촉 20 hr에서 TBA의 생성은 ENV425와 혼합균주 각각 1.12, 1.15 μmol 이 생성되었고, 20 hr 이후에는 TBA가 ENV425보다 혼합균주에서 점차 감소됨이 관찰되어 TBA의 분해가능성을 보여주고 있다.

ENV425의 MTBE 초기 (0~6 hr) 분해속도 (1.24 nmol of MTBE degraded/hr/mg of biomass)가 혼합균주의 MTBE 초기 (0~6 hr) 분해속도 (6.03 nmol of MTBE degraded/hr/mg of biomass)보다 느리게 떨어지는 결과는 혼합균주가 ENV425보다 초기 적응 능력이 뛰어나 MTBE 분해

Table 1. Experimental conditions of column tests

	MTBE degradation (%)	<i>n</i> -Butane degradation (%)	TBA production (μ mol)	Transformation yield (nmol degraded MTBE/ μ mol degraded <i>n</i> -butane)
ENV425	71.2	55.8	1.12	44.7
Mixed culture	89.8	85.1	1.15	34.0

Table 2. Comparison of maximal MTBE degradation rate with other researches.

Substrate	Microorganism	Maximal degradation rate	Reference
Propane	ENV421	9.2 nmol/min/mg of protein =276 nmol/hr/mg(dry weight)	Steffan <i>et al.</i> ⁶⁾
Propane	ENV425	4.6 nmol/min/mg of protein =138 nmol/hr/mg(dry weight)	Steffan <i>et al.</i> ⁶⁾
Butane	<i>Graphium</i> sp.	10.5 nmol/hr/mg(dry weight)	Hardison <i>et al.</i> ⁷⁾
Pentane	<i>P. aeruginosa</i>	3.9 nmol/min/mg of protein =117 nmol/hr/mg(dry weight)	Garnier <i>et al.</i> ⁸⁾
Butane	ENV425	11 nmol/hr/mg(dry weight)	In this study
Butane	mixed culture	9 nmol/hr/mg(dry weight)	In this study
Butane	ENV425 (resting cell)	52.31 nmol/hr/mg(dry weight)	In this study
Butane	mixed culture (resting cell)	62.25 nmol/hr/mg(dry weight)	In this study

가 빠르게 일어나기 때문이다. 위와 같은 결과들로 MTBE 분해에 대하여 혼합균주가 ENV425보다 효과적이라고 할 수 없는 이유는 Transformation yield에서 ENV425의 효율이 좋게 관찰되었기 때문이다. 이것은 분해시간을 고려하면 혼합균주가 더 빠른 시간 내에 MTBE를 분해하지만, *n*-butane 이용율을 고려하면 ENV425가 더 효과적인 것을 알 수 있다. 즉, 직접적으로 순수균주와 혼합균주를 비교하는데는 다소 어려움이 있다. 또한 혼합균주에서 분리된 순수균주와의 비교가 더 합리적일 수도 있다. 그러나 본 실험은 MTBE 분해와 관련한 기초실험으로서 MTBE 분해특성을 파악하는데는 순수균주를 이용하는 것이 결과의 일관성을 높여줄 수 있다. 그러나, 유류오염지역이 광범위하여 현장실험 및 현장적용을 고려한다면, 혼합균주에 의한 실험 결과가 타당성이 있으며 현장결과를 예측하는데 도움이 될 수 있을 것이다. Mo 등⁹⁾은 일

정한 기간에 MTBE를 단일 탄소원으로 이용한 실험에서 순수균주는 혼합균주에 비해 MTBE 분해에 대한 활성도가 적었다고 보고했다.

본 실험의 결과와 Hardison⁷⁾의 결과부터 추론해 본다면, ENV425 및 혼합균주는 MTBE를 다음과 같은 원인으로 공대사에 의해 분해한다고 결론지을 수 있다. 첫째, MTBE의 분해는 *n*-butane의 소비가 시작됨으로서 분해가 일어나기 시작했다 (Fig. 3, Fig. 4). 즉, *n*-butane이 성장기질 (growth substrate)로 이용되었을 때 MTBE 분해 활동도가 유지된다. 둘째, MTBE 분해는 *n*-butane의 분해를 저해하고 acetylene에 의해 방해를 받았다. 즉, 이 결과는 *n*-butane 및 MTBE 분해는 같은 효소에 의한 반응이라고 설명할 수 있다. 셋째, MTBE 분해에 따른 분해 생성물인 TBA가 관측되었으며, TBA 생성량이 MTBE 소모량보다 적은 이유는 한정된 MTBE 공대

사에 의한 것과 MTBE가 성장기질로 이용되고 있지 않음을 보여주는 결과라고 볼 수 있다.

3.3 ENV425와 혼합균주의 resting cell에 의한 MTBE 분해 특성

n-butane에 의해 성장한, 즉, *n*-butane에 의해 활성화된 ENV425와 혼합균주의 resting cell에 의한 MTBE 분해 특성을 조사하였다. 본 실험과 위의 실험의 차이점은 *n*-butane에 활성화된 균주의 공대사에 의한 MTBE 분해를 효과적으로 관찰할 수 있으며, 미생물량에 따른 MTBE 분해능력을 측정할 수 있다. 그러나 탄소원인 *n*-butane이 첨가되어 있지 않음으로 활성화된 균주는 MTBE의 첨가와 더불어 활성도는 급격히 떨어지게 된다. 60 μ mol *n*-butane에서 7~8일간 성장한 ENV425와 혼합균주의 동일한 양 (9.4 mg(dry weight))을 MTBE 2 μ mol 과 BSM 50 mL가 채워진 120 mL bottle에 접종하고 반응시간에 따라 분해된 MTBE 분해율과 중간생성물질을 관찰하였다.

ENV425와 혼합균주의 resting cell 실험에서 중요한 관찰은 MTBE 분해생성물질로 TBA (*tert*-butyl alcohol)와 TBF (*tert*-butyl formate)가 동시에 검출되었다는 사실이다. 이전의 실험, 즉, *n*-butane과 MTBE가 동시 존재시에는 TBA만 검출된 결과와 달리 TBF가 검출되었다. Fig. 5의 결과를 볼 때, MTBE 분해와 동시에 TBF가 빠른 속도로 생성 됐다가 소멸됨에 따라 TBA의 생성이 증가했다. 곰팡이류인 *Graphium* sp.를 이용한 Hardison 등⁷에서도 TBA만이 주 생성물질로 검출되었고, Filter-attached mycelia 실험에서는 TBA와 소량의 TBF 모두 검출되었으나 TBF는 빠른시간내에 다시 소멸되었다. 이 결과는 다음의 2가지 반응으로 설명할 수 있다. 첫째, MTBE가 *O*-dealkylation 반응에 의해 TBA와 formaldehyde (HCHO)의 생성과정이라 할 수 있다. 즉, MTBE가 분해되면서 TBA로 전환되는 과정을 예상할 수 있다. 둘째, *O*-dealkylation 반응을 통한 TBA 생성과 다른 효소의 작용에 의한 TBF 생성시 가수분해 과정을 통해 빠르게 TBA로 전환되

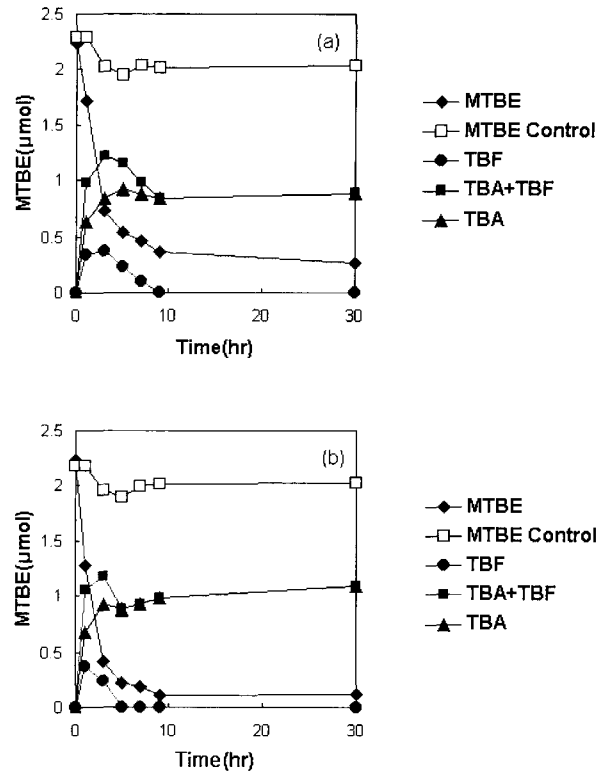


Fig. 5. Time courses for TBA and TBF production during MTBE degradation without *n*-butane by *n*-butane-grown ENV425 (a) and mixed culture (b). The symbol (\square) is indicated the MTBE degradation in the presence of acetylene (1.0% (vol/vol); gas phase).

는 것이다. 본 실험의 결과를 볼 때는 위의 2가지 반응이 동시에 일어나는 것으로 보인다.

n-butane으로 활성화된 균주의 MTBE 분해는 ENV425와 혼합균주 모두 유사한 특성을 보였다. ENV425의 경우 접종 후, MTBE는 즉시 분해되기 시작했으며, 접종 9 hr 후에는 분해가 정체되는 것을 보였다. 즉, resting cell 실험이므로 균주의 활동도가 거의 떨어졌기 때문이다. TBA는 접종 5 hr에 최대 생성량을 보였으며 9 hr 이후에는 MTBE와 같이 분해가 정체되는 것을 보였다. TBF의 경우 생성 3 hr

Table 3. Comparison of MTBE degradation rate between ENV425 and mixed culture.

	Degradation rate (nmol MTBE/hr/mg) (0~3hr)	Degradation rate (nmol MTBE/hr/mg) (3~9hr)	Transformation capacity (nmol MTBE/mg biomass) (0~9hr)
ENV425	52.3	6.3	199
Mixed culture	62.3	5.1	226

이후 급격히 소멸되고 있음을 볼 수 있다. 즉, 가수분해과정을 거쳐 TBA로 변형되는 것으로 사료된다. 혼합균주의 경우, MTBE 주입 후 3 hr까지 급격히 분해되어 접종 9 hr 후에는 분해가 정체되었다. MTBE가 분해됨에 따라서 TBA와 TBF도 생성되기 시작했으며, TBA의 경우 접종 3 hr에 최대생성율을 보였고, 이후 분해가 정체되기 시작하였다. TBF는 접종 1 hr 후에 최대생성율을 보였고 접종 5 hr 후에 모두 소멸되었다.

ENV425의 경우 0~3 hr사이 MTBE 분해속도는 57 (nmol of MTBE degraded/hr/ mg of biomass)이고, TBA의 생성 속도는 30 (nmol of TBA produced/hr/ mg of biomass)로 관찰되었다. 혼합균주의 경우 0~3 hr사이 MTBE 분해속도는 62.3 (nmol of MTBE degraded/hr/ mg of biomass)이고, TBA의 생성 속도는 33 (nmol of TBA produced/hr/ mg of biomass)로 관찰되었다. 이 전 실험의 *n*-butane이 존재할 때 TBA의 최대생성 속도는 ENV425와 혼합균주 각각 9.9 (nmol of TBA produced/hr/ mg of biomass), 6.4 (nmol of TBA produced/hr/ mg of biomass)로 나타났다. 3~9 hr 에서는 MTBE 분해 속도가 ENV425와 혼합균주 각각 6.3, 5.1 (nmol of MTBE degraded/hr/ mg of biomass)로 관찰되었다. 접종 후 9 hr 에서의 Tc (Transformation capacity)를 보면 ENV425의 경우 199 (nmol of MTBE degraded/ mg of biomass)로 나타났고, 혼합균주의 경우 226 (nmol of MTBE degraded/ mg of biomass)으로 나타났다 (Table 3).

본 실험에서 ENV425나 혼합균주의 경우, 매우 유사한 MTBE 분해특성을 가지고 있다. 두 경우 모두

n-butane이 존재하는 MTBE 분해에서는 검출되지 않았던 TBF의 검출이 관찰되었다. 이는 TBF의 소멸속도가 MTBE 분해속도보다 빠르기 때문에 비교적 MTBE의 분해속도가 약 6배 느린 *n*-butane이 존재하는 MTBE 분해실험에서는 검출되지 않는 것으로 판단된다.

4. 결 론

본 연구에서는 국내의 유료오염지역의 토양에서 *n*-butane을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 얻은 혼합균주와 순수균주인 ENV425에 의한 토양·지하수 오염원인 MTBE의 분해 특성을 관찰하였으며 얻어진 결과를 요약하면 다음과 같다.

1. ENV425와 혼합균주는 *n*-butane를 탄소원 및 에너지원으로 이용하고, *n*-butane 이용 및 미생물 생성량은 선형관계를 보였다. 그러나 MTBE를 탄소원 및 에너지원으로 공급하였을 때는 미생물의 성장이 관찰되지 않았다.
2. ENV425 및 혼합균주는 *n*-butane이 성장기질로 이용되었을 때 MTBE의 분해를 유도하고, 두 기질 모두 부탄 분해효소에 의해 분해가 일어남에 따라 MTBE는 공대사 작용에 의해 분해가 이루어졌다.
3. MTBE의 분해산물로는 TBA와 TBF가 검출되어졌고, TBF는 빠른시간내에 TBA로 전환됨을 관찰하였다.
4. 최대 MTBE 분해속도는 ENV425와 혼합균주 각각 52.3 과 62.3 (nmol MTBE degraded/hr/mg TSS), 최 대

Transformation yield는 (T_y)는 각각 44.7 과 34.0 (nmol MTBE degraded/ μ mol *n*-butane utilized)로 나타났고, 최대 Transformation capacity는 (T_c)는 각각 199와 226 (nmol MTBE degraded/ mg TSS used)로 관찰되었다.

5. 참고 문헌

- 1) White, G.E., Russel, N.J., and Tidswell, E.C., "Bacterial scission of ether bonds", *Microbial Rev.*, 60, pp.216-232(1996).
- 2) Peaff, G., "Court ruling spurs continued debate over gasoline oxygenates", *Chem. Eng. News*, 72, pp.8-13(1994).
- 3) U.S. Environmental Protection Agency, Health risk perspective on fuel oxygenates, U.S. Environmental Protection Agency publication no. EPA 600/R-94/217, U.S. Environmental Protection Agency, Washing, D.C.(1994)
- 4) 배범한, 조종수, "휘발유 첨가제 MTBE에 의한 지하수오염의 문제점과 정화방안", *대한토목학회지*, 46(3), pp.41~51(1998).
- 5) Anonymous, Current state of MTBE in the United States, *Underground Tank Technology Update*, Jan., pp.9~11(1997).
- 6) Steffan, R.J., McClay, K., Valnberg, S., Condee, C.W. and Zhang, D., "Biodegradation of the gasoline oxygenates methyl *t*-butyl ether, ethyl *t*-butyl ether, and *tert*-amyl methyl ether by propane-oxidizing bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, 63(11), pp.4216~4222(1997).
- 7) Hardison, L.K., Curry, S.S., Ciuffetti, L.M., and Hyman, M.R., "Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *t*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp", *Appl. Environ. Microbiol.* 63(8), pp.3059~3067(1997).
- 8) Garnier, P.M., Aurio, R., Augur, C., Revah, C., "Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane", *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 51, pp.498~503(1995).
- 9) Mo, K., Lora, C.O., Wanken, A.E., Javanmardian, M., Yang, X., and Kulpa, C.F., "Biodegradation of methyl *t*-butyl ether by pure bacterial cultures", *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 47, pp.69~72(1997).