한국지하수토양환경학회지 Vol. 8, No. 1, pp. 27~34, 2003 ≪原著≫

부탄 분해 미생물을 이용한 휘발유 첨가제의 분해특성

장순웅*
경기대학교 토목환경공학부 환경공학전공

Biodegradation Study of Gasoline Oxygenates by Butane-Utilizing Microorganisms

Soon-Woong Chang*
Dept. of Environ. Eng., Kyonggi University

ABSTRACT

In this study, potential degradation of MTBE and other gasoline oxygenates by pure culture ENV425 and mixed culture isolated from gasoline contaminated soil using butane as the sources of carbon and energy was examined and compared. Butane monooxygenases(BMO) of butane-grown ENV425 and mixed culture generated 1-butanol as a major metabolite of butane oxidation and addition of acetylene, specific inhibitor of monooxygenase, inhibited both butane oxidation and 1-butanol production. The results described in this study suggest that alkanes including propane, pentane, and butane are effectively utilized as a growth substrate to oxidize MTBE cometabolically. And also BTEX compounds could be the potential substrate of the MTBE cometabolism. Cell density also affected on the MTBE degradation and transformation capacity(Tc). Increasing cell density caused increasing MTBE degradation but decreased transformation capacity. Other result demonstrated that MTBE and other gasoline oxygenates, ETBE and TAME, were degraded by butane-grown microorganism.

Key words : MTBE, Gasoine Oxygenates, Cometabolism, Butane-Utilizing Microorganism

요 약 문

본 논문에서는 순수균주인 ENV425와 유류오염토양에서 butane을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 분리한 혼합균주를 대상으로 MTBE와 기타 가솔린 산화제 분해특성을 조사했다. ENV425와 혼합균주의 butane monooxygenase (BMO)에 의해 butane 분해시 1-butanol이 주요 부산물로 축적되었다. 또한 monooxygenase의 방해자로 알려진 acetylene의 첨가시에는 butane의 분해 및 1-butanol의 축적이 일어나지 않아 butane monooxygenase에 의한 분해임을 알 수 있다. 본 연구결과에서, propane, pentane, butane을 포함한 alkane류는 MTBE 공대사에 우수한 성장기질이었고, BTEX 화합물 역시 MTBE 공대사에 가능성 있는 기질임이 관찰되었다. 또한 균주농도 역시 MTBE 분해에 영향을 미치는 것으로 나타났는데, 균주 농도 증가에 따라 MTBE 분해량은 증가하나 transformation capacity는 상대적으로 감소하는 경향을 보였다. 그리고 대표적인 가솔린 산화제인 MTBE 외에 ETBE, TAME도 부탄분해균에 의해 효과적으로 분해가 이루어짐이 관찰되었다.

주제어 : MTBE, 가솔린 산화제, 공대사, 부탄분해균

*Corresponding author : swchang@kyonggi.ac.kr
원고접수일 : 2003. 1. 6 게재승인일 : 2003. 1. 29

1. 서 론

MTBE(Methyl Tertiary-Butyl Ether)는 생물학적으로 난분해성 물질로 분류되는데, MTBE의 구조 속에 포함되어있는 ether(C-O-C) 결합이 화학적으로 안정하기 때문이다[1]. 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 시작하였다[2].

가솔린산화제중 MTBE는 가장 일반적으로 사용되어 현재 미국에서 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 있다[3].

우리나라에서도 1984년부터 쓰이기 시작했으며, 생산량은 계속 증가해서 현재까지 계속 사용되고 있다. 1993년에는 환경보전법에 의하여 MTBE의 휘발유 배합이 의무화되었으며, 상당량이 휘발류에 첨가되었다. 국내에서 소비되는 휘발유내 MTBE 함량은 6~8% 정도이며, 우리나라의 유류 및 유기 물질 저장탱크는 주로 지하에 설치되어 있다. 특히, 최근 국내에서도 유류오염에 의한 토양 및 지하수 오염의 심각성이 대두되고 있어 MTBE에 의한 오염을 간접적으로 예상할 수 있다.

외국의 연구사례를 보면, MTBE에 노출된 동물은 신경계, 혈청, 간, 신장, 등에 역효과를 나타냈고, 인간에 대해서는 발암 가능 물질로 분류하고 있다4). Hartley 등[5]에 의하면 미국의 일반적인 음용수의 MTBE 농도는 10 μg/l 이하이며, 발암 가능성 때문에 음용수로서의 최대 허용 기준을 100 μg/l으로서 제시하였다. 또한 미국환경청에서는 1997년 맛과 냄새를 기준으로 2040 μg/l의 음용수 권고량을 발표했다[4].

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[6].

생물학적인 MTBE 분해는 MTBE 자체를 탄소원으로 이용하여 직접 분해하거나[7-9], 기타 성장기질(growth substrate)을 이용하는 여러 종류의 박테리아[6,10-17]와 곰팡이류[10]에 의해 난분해성 오염원인 MTBE 분해를 유도하기도 하는데, 이를 공대사(cometabolism)라고 하는데 대부분의 난분해성 유기물질들은 물질 자체의 독성 등으로 인해 미생물에 의해 직접 탄소원으로 이용되지 못하므로 오염된 토양 및 지하수 복원에 공대사의 원리가 많이 적용되고 있다.

국내에서도 MTBE에 의한 문제제기가 이루어지고 있으나 아직까지 본격적인 연구는 이루어지지 않고 있다. 본 연구에서는 기존에 MTBE 분해연구에 검증된 pure culture인 ENV425와 국내유류오염토양에서 직접 분리된 혼합균주를 대상으로 butane을 기질로서의 이용율, MTBE 및 기타 가솔린산화제의 분해특성, MTBE 공대사를 위한 기타 성장기질 조사 등을 비교·분석함으로써 현장적용에 있어 현실성있는 혼합균주의 효율성을 제시하고자 한다.

2. 실험방법

2.1. 미생물의 분리 및 배양

Serum bottl(120 ml)에 유류오염토양 10 g과 배양액(BSM, Basal Salts Medium) 50 ml를 첨가하고 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 밀봉하고 butane 30 ml, O_2 10 m, 그리고 air 30 ml로 나머지 headspace를 채웠다. 그리고 7일간 shaking incubator에서 25°C, 150 rpm의 조건으로 배양시켜 butane 분해가 관찰된 후 1 ml를 빼내 같은 조건의 serum bottle(120 ml)에 접종시켜 1주 간격으로 1개월간의 계대배양을 반복하여, butane을 탄소원으로 이용하는 혼합균주를 분리하였다[6].

그리고, 본 실험에 이용된 pure culture인 ENV425 (ATCC 55798)는 Envirogen, Inc.(U.S.A.)로 부터 기증 받아 본 실험에 이용하였다. ENV425는 propane을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 분리되었으며, 오렌지 colony로 빨간 형태의 gram-variable, acid-fast, filamentous, rod-shape을 보여주었고, fatty acid 분석으로 Nocardia속의 한 종류로 확인되었다[11]. 처음 밀봉된 유리 용기에 고형화 상태였던 ENV425를 영양한천배지에 도말하여 30°C에서 24시간 평판 배양한 후 50 ml의 탄소원이 존재하지 않는 BSM media와 butane 30 ml, O_2 10 ml, 그리고 air 30 ml로 headspace를 채운 serum bottle(120 ml)에 접종하여 7일간 shaking incubator에서 25°C, 150 rpm으로 배양시키고, 1 ml를 빼내어 배양액 50 ml, 그리고 butane 30 ml, O_2 10 ml, air 30 ml가 넣어져 있는 serum bottle(120 ml)에 접종시켜

혼합균주와 같은 방법으로 이용하였다.

2.2. Butane 분해 및 1-butanol 생성 실험

butane에 배양된 균주는 원심분리(5,000rpm×5min) 과정을 거쳐 농축시킨 후, phosphate buffer solution으로 2회 세척 후 OD를 기준으로 실험에 필요한 균주농도로 재현탁시키는 과정을 거쳤다. 2 ml vial은 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 밀봉한 후, 배지 1.5 ml, phosphate buffer 0.5 ml를 넣었다. 그리고 butane이 포화된 phosphate buffer 150 μl를 syringe로 추가시킨 후, 균주를 접종함으로써 실험을 시작하였다. vial은 shaking incubator에서 25°C, 150 rpm조건에서 운전하였으며, 액상시료(3 μl)를 추출하여 GC에서 분석하였다.

1-Butanol 분석은 10 ml serum vial에 900 μl phosphate buffer. 10 mM propanol을 넣은 후 teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 밀봉했다. 그리고 butane 900 μl를 vial headspace 부분에 주입한 후 배양된 균주 100 μl를 vial에 주입함으로써 실험이 시작되었다. Vial은 shaking incubator에서 25°C, 150 rpm조건에서 운전하였으며, 액상시료(3 μl)를 추출하여 GC에서 분석하였다.

2.3. 가솔린 산화제 분해 실험

실험에 사용된 모든 초자류 및 기기는 가능한 고압증기멸균기를 이용하여 121°C, 15분간 멸균하여 사용하였다. 1.2l amber serum bottle에서 약 7일 동안 25°C, 150 rpm의 조건에서 성장한 미생물의 OD_{550}는 0.5~0.6의 범위였다. TSS(Total Suspended Solid)를 측정하고 원심 분리하여 미생물을 농축시켰다. TSS의 값과 원심분리 후 농축시킨 미생물 농축액의 농도를 계산하여 필요량을 serum bottle에 주입하는 방식을 유지하였다[6]. MTBE 및 가솔린 산화제 분해실험은 120 ml serum bottle에 50 ml BSM과 MTBE 및 가솔린 산화제를 주입한 후, teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 밀봉하고 균주를 접종한 후에 실험을 시작되었다. 그리고, 비교 실험으로는 위와 동일한 조건에 acetylene(1.0%(vol/vol); gas phase)을 첨가하여 실험을 진행하였다[6].

2.4. 분석방법

MTBE(Methyl tert-Butyl Ether, $C_5H_{12}O$), ETBE(Ethyl tert-Butyl Ether, $C_6H_{14}O$), TAME(Tert-amyl Methyl Ether, $C_6H_{14}O$) 측정은 Hamilton 1710N gas-tight syringe를 이용하여 bottle의 headspace에서 100 μl를 채취하여 GC에 직접 주입하여 분석하였다. GC는 HP-5 칼럼(Crosslinked 5% Ph Me Silicone, 25 m×0.32 mm×0.52 μm 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°C, 200°C이며, 오븐은 40°C에서 등온으로 운전하였다. Carrier gas는 1 ml/min의 속도로 질소가스를 사용했다.

Protein 농도는 균주를 3 N NaOH 용액에 65°C의 조건에 30분 동안 용해시킨 후 Biuret assay 방법에 의해서 분석하였다[18].

3. 결과 및 고찰

3.1 ENV425와 혼합균주에 의한 Butane 분해 및 1-butanol 생성

유류오염토양에서 분리된 혼합균주와 ENV425를 대상으로 butane을 기질로서의 이용정도를 평가하기 위해 resting cell 조건에서 butane 분해속도를 비교하였다. ENV425는 propane을 탄소원으로 이용하여 분리된 균주이나, Table 1의 결과를 보면, ENV425에 의한 butane 분해속도는 38.4 nmol/min/mg protein으로 혼합균주 35.2 nmol/min/mg protein 보다 다소 빠른 것으로 관찰되었다. Nocadia TB1인 경우 4.9 nmol/min/mg protein으로 낮은 butane 분해속도를 보여주었고[19], Hamamura 등[20]은 실험대상인 3종류의 균주 중 CF8, *M. vaccae*인 경우 31.5 nmol/mg protein, 21.5 nmol/min/mg protein으로 본 연구에서 관찰된 ENV425나 혼합균주보다 다소 낮은 butane 분해속도를 보여주었으나, *P. butanovora*인 경우 42 nmol/min/mg protein으로 다소 높은 butane 분해속도를 보여주었다. ENV425인 경우 butane 분해속도는 균주상태에 따라 다소 다른 결과를 보여주었으나, 25~45 nmol/min/mg protein의 범위내에서 관찰되었다. 또한 butane 분해는 호기성조건에서만 일어났으며, 5 μM에서 50 μM까지의 범위에서는 선형적인 butane 분해경향을 보여주었다.

Table 1. Butane oxidation by two bacterial cultures, ENV425 and mixed culture

	Mean rate (nmol min^{-1} mg of $protein^{-1}$) ±SD[b] of:	
	Butane degradation	1-Butanol productiona
ENV425	38.4±2.6	27.6±2.3
Mixed culture	35.2±4.3	18.4±1.5

[a]1-Butanol accumulation was measured in the presence of 10% (vol/gas-phase vol) butane and 10 mM 1-propanol.
[b]Number of samples n=2

Butane 분해실험동안 1-butanol을 검출하기 위해, 1-butanol과 구조적으로 유사한1-propanol을 첨가해줌으로써 1-butanol의 추가 대사과정을 일시적으로 차단하였다[20]. ENV425 및 혼합균주에서의 butane 소비에 대한 1-butanol 축적은 각각 71.9%, 52.3%로 혼합균주인 경우 ENV425보다 상대적으로 낮은 결과를 보여주었는데, 이 결과는 일시적으로 축적된 1-butanol이 지속적인 추가 분해가 일어나거나, 2-butanol로 전환된 것으로 추측된다. 이와 유사한 실험결과로, Hamamura 등[20]에서는 P. butanovora에 의한 butane 이용시 1-butanol 축적율은 96.4%에 이르렀다. 그러나, CF 8 및 M. vaccae는 각각, 52.1%, 9.8%에 불과하였다. 1-butanol의 축적율이 다른 이유는 각 균주가 지니고 있는 monooxygenase의 능력의 차이에서 기인한다고 볼 수 있다. Monooxygenase의 방해자인 acetylene 1%(vol/gas-phase vol)를 butane과 동시에 주입시 butane 분해 및 1-butanol의 축적은 일어나지 않아 ENV425 및 혼합균주에서 butane monooxygenase(BMO)가 butane 분해에 중요한 역할을 수행하고 있음을 증명하고 있다.

Hamamura등[20]의 결과에서도 일부 언급되었지만, 본 연구에서 이루어진 ENV425 및 혼합균주의 butane monooxygenase가 직·간접적으로 관여하고 있는 사실은 다음의 사실로 증명된다. 1) 호기성 조건에서 butane 분해가 일어났다. 2) 1-butanol은 butane의 분해산물로 축적되었다. 3) acetylene 공급시 butane 분해 및 1-butanol 축적이 일어나지 않았다.

3.2. MTBE 공대사를 위한 성장기질

MTBE는 생물학적으로 난분해성 물질로 분류되어 일반적인 유류오염지역에서는 MTBE를 탄소원으로 직접 분해하기가 쉽지 않다[13]. 이러한 이유로 호기성 생물학적 분해조건에서는 공대사에 의한 MTBE 분해를 유도하는 방법이 일반적이다. 본 연구에서는 propane을 탄소원으로 이용하여 분리된 ENV425와 butane을 탄소원으로 이용하여 분리된 혼합균주를 대상으로 성장기질로 이용 가능한 기질을 검토하고, MTBE에 대한 활성도를 비교·평가하였다.

Table 2를 보면, propane을 성장기질로 이용시에는 ENV425와 혼합균주 모두 butane을 기질로 공급한 경우보다 MTBE에 대한 활성도가 더 높았다. Pentane 공급시에도 효과적인 MTBE에 대한 활성도를 보였다. 1-butanol, ethanol은 OD_{550}가 7일 배양 후에 각각 1.1, 1.4로 성장기질로서는 높은 결과를 보여주었으나, MTBE 제거활성도는 없는 것으로 관찰되었다. Liu 등[17]의 연구에서도 성장기질로 1-butanol 공급시 Arthrobacter에 의한 MTBE 활성도는 없는 것으로 기록하고 있다. 또한 MTBE 및 TBA는 성장기질로도 이용되지 않았다(Table 2). 즉, ENV425와 혼합균주에 의해서 MTBE 및 TBA는 단독으로 생물학적 분해가 일어나지 않는다는 결과이다.

그리고, butane, propane, pentane, ethanol, BTEX에 의한 MTBE 분해시에 1% acetylene 주입시에는 MTBE 분해활성도가 차단되었다. 즉, butane인 경우 butane monooxygenase 등 기질분해 효소가 MTBE 분해에 관여하고 있음을 보여주는 결과이다. 그러나, butane monooxygenase는 1-butanol의 분해에 의해 MTBE 공대사에 영향이 미치지 못함을 알 수 있다. 이와 유사한 결과로 hyman등[13]은 propanol을 성장기질로 이용한 Xanthobacter와 M. vaccae는 MTBE를 분해할 수 없었으나, propane 공급시에는 효과적으로 MTBE를 제거 할 수 있었다. 이러한 결과는 일반적인 균주는 alkane류가 alkane 초기 분해과정을 거쳐 alchols로 분해가 일어나기 때문에 butane이나 butanol에 의해 성장된 균주는 유사하나, butane 초기 분해에 관

Table 2. Effects of growth substrate on MTBE degradation

Substrate	ENV425		Mixed culture	
	Final OD_{550}[a]	Relative activity (%)[b]	Final OD_{550}[a]	Relative activity (%)[b]
Butane	0.48	–	0.57	–
Propane	0.54	120	0.48	105
Pentane	0.42	84	0.43	78
MTBE	0.02	ND[c]	0.01	ND
TBA	0.06	ND	0.04	ND
1-Butanol	1.1	1	1.4	2
Ethanol	0.8	15	0.7	27
BTEX	0.1	35	0.14	37

[a]The initial OD_{550} of each culture was 0.05. Cultures were incuabted at 25°C with constant shaking at 150 rpm.
[b]The MTBE degradation capacity activity of each culture was compared to MTBE degradation by butane-grown cells.
[c]ND, not detected.
[d]BTEX, benzene, toluene, ethylbenzene, and xylenes.

여하는 효소(BMO)에는 차이가 있다고 설명 할 수 있다.

또한 BTEX를 성장기질로 배양하였을때, 일부 MTBE 분해활성도를 보였다. 이전 연구결과에 의하면, 방향족화합물에 의해 성장된 균주는 MTBE 분해활성도를 보여주지 못하였다. 그러나, 최근 Hyman 등[15]은 propane 분해균주인 VB-1에 의해 BTEX화합물중 *toluene*, *benzene*을 성장기질로 이용시에는 MTBE 분해활성도를 보였다고 기록하고 있고 Steffan 등[11]은 BTEX에 배양시 일부 MTBE가 분해되는 결과를 보고하기도 했다.

3.3. MTBE 분해의 균체농도 영향

본 실험에서는 균체농도 변화 및 초기 MTBE 농도변화에 따른 MTBE 분해 특성을 관찰하였다. ENV425와 혼합균주 모두 균주 주입농도는 0.14, 0.28, 0.42(mg/ml)로 변화를 주었으며 초기 MTBE 양은 2, 8, 16 μmol로 설정하였다.

Table 3의 결과는 반응 시작 후 15시간 후의 MTBE 분해량과 transformation capacity(T_c: amount of MTBE degraded/amount of biomass added)를 보여 주고 있다. 실험결과 ENV425와 혼합균주 모두 최대 T_c가 균체밀도 0.14 mg/ml, MTBE 16 μmol일 때 각각 0.67, 0.41(μmol of MTBE degraded/mg of biomass added)로 나타났다. 주입 균체농도에 따라 MTBE 분해량은 다소 증가하였으나, T_c는 감소하는 경향을 보이고 있다.

Lie 등[17]에서는 butane을 성장기질로 이용하였을때 *Arthrobacter*에 의한 2.5 μmol MTBE에 대한 T_c는 0.23 μmol/mg biomass로 본 연구에서의 결과보다는 다소 높은 결과를 보여주었다. 그러나 다른 화합물의 공대사에 의한 T_c 결과에 비하면 상당히 낮은 값이다. 예를 들어 TCE를 분해하는 *M. trichosporium* OB3b의 T_c는 농도에 따라 26~108 μg/mg biomass[21]에 이른다. Lie 등[17]에서는 MTBE의 분해산물인 TBA가 축적되면서 MTBE 분해활성도를 떨어뜨릴 수 있어, TBA 축적에 의한 영향을 최소화시켰다고 기록하고 있다. 그러나, MTBE 분해시 축적되는 TBA 역시 지속적인 분해가 일어남으로 농도에 따라 균주의 활성도에 미치는 영향이 달라질 수 있다.

장 등[6], Lie 등[17]의 결과를 볼때, MTBE 분해시 TBA는 30~40%의 범위로 일시적인 축적이 일어났다. 기존의 연구결과를 볼 때, 8, 16 μmol MTBE가 주입된 경우에는 MTBE 중간생성물로 축적된 TBA에 의한 독성 영향으로 butane monooxygenase의 활성도를 떨어뜨릴 수 도 있다고 사료된다. 아직까지 공대사에 의한 MTBE 분해경로에 대한 명확하게 알려진바 없으나, [^{14}C] MTBE에 의한 실험결과 최종적으로 CO_2까지 완전한 분해가 가능한 것으로 알려지고 있다[11]. 즉, TBA 및 기타 부산물에 의한 butane 균주의 활성도 저해도 예상 할 수 있다.

ENV425의 경우 MTBE가 2 μmol일 때 균체농도에 따라 거의 일정한 MTBE 분해량이 관찰되었고, 16 μmol일 때는 균체농동에 따라 MTBE 분해량이 약 1.8배 정도의 차이를 보였다. 혼합균주의 경우도 · 유사하게 MTBE가 2 μmol일 때 균체농도에 따라 거의 일정한 MTBE 분해량이 관찰되었고, 16 μmol일때는 균주밀도에 따라 MTBE 분해량이 약 2.4배의 차이를 보였다. 이처럼 MTBE의 양이 적을 경우 균체농도에 따라 MTBE의 분해량에는 영향을 미치지 않으나, MTBE의 양이 증가할수록 균체농도에 따라 큰 차이를 보이고 있다(Table 3, Fig. 1). 균주량에 따른 MTBE 분해결과는 T_c 값 자체를 비교할 수도 있으나, 위에서 언급된 것처럼 MTBE의 중요 부산물인 TBA의 생성량과 TBA 농도에 따른 butane 분해균주의 활성동에 미치는 독성영향에 대한 구체적인 연구가 필요할 것으로 사료된다.

3.4. MTBE 및 기타 가솔린 산화제의 분해

기존 현장조사 결과[9,11]에 의하면, MTBE 이외에도 여

Table 3. Effect of cell density and MTBE concentration on the MTBE degradation and transformation capacity

Biomass	Amount of Biomass (mg/ml)	Amount of MTBE degraded at the following conc of MTBE					
		2 μmol		8 μmol		16 μmol	
		MTBE	T_c[a]	MTBE	T_c	MTBE	T_c
ENV425	0.14	1.09±0.03	0.15±0.003	3.41±0.15	0.48±0.020	4.78±0.0	0.67±0.000
	0.28	1.07±0.21	0.08±0.015	2.57±0.04	0.18±0.003	5.55±0.6	0.39±0.042
	0.42	1.18±0.09	0.06±0.004	4.05±0.18	0.19±0.004	8.35±0.4	0.39±0.018
Mixed culture	0.14	0.84±0.22	0.12±0.031	2.56±0.12	0.36±0.016	2.91±0.1	0.41±0.014
	0.28	0.79±0.04	0.06±0.003	2.79±0.08	0.20±0.005	4.39±0.3	0.31±0.021
	0.42	1.19±0.17	0.06±0.008	4.11±0.07	0.19±0.003	6.88±0.7	0.32±0.032

[a]T_c : Transformation capacity (amount of MTBE degraded/amount of biomass added).
[b]Number of samples n=2

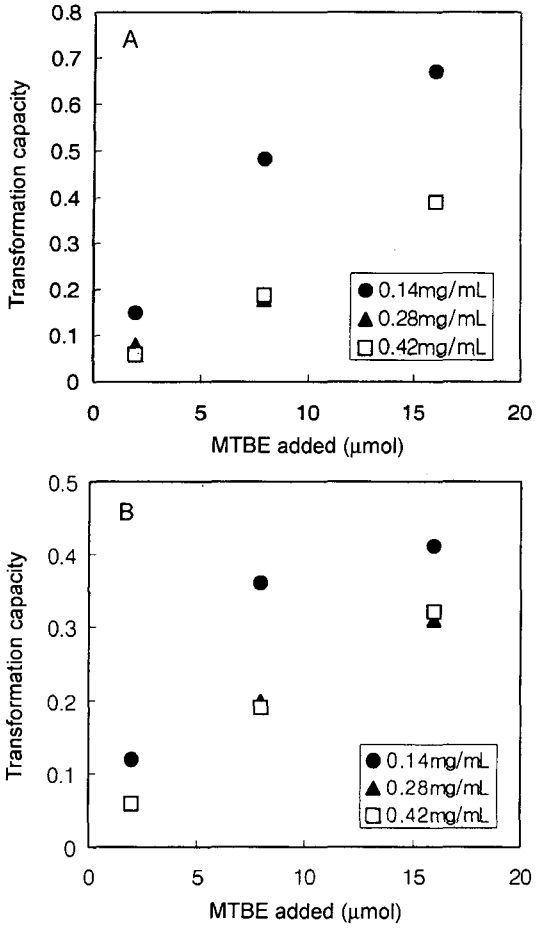

Fig. 1. Transformation capacity (T_c) as a function of the cell density and initial MTBE concentration by ENV425 (a) and mixed culture (b).

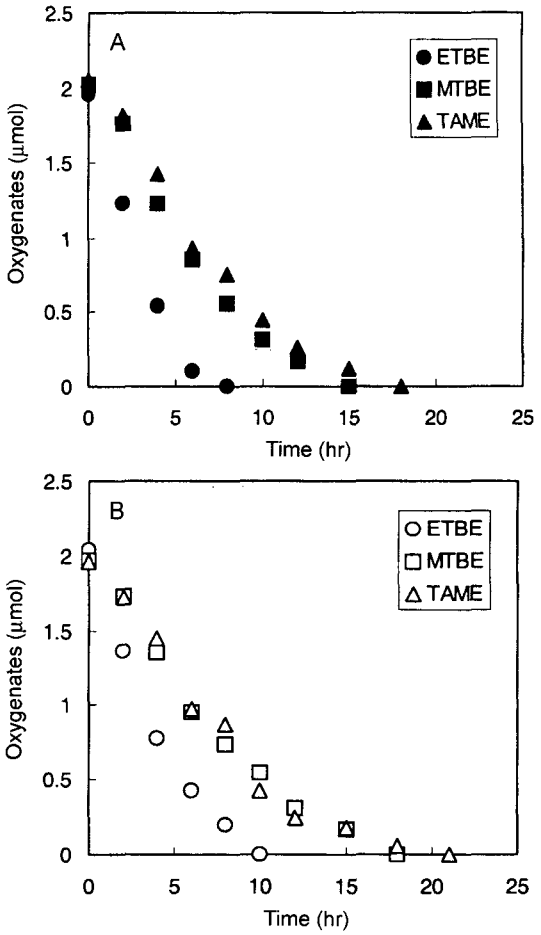

Fig. 2. Batch activity test for MTBE and other oxygenates by butane grown ENV425, as described in Materials and Methods. ENV425 (7 mg[dry weight]) was transferred to MSM (50 ml) in serum bottle (120 ml) sealed with teflon-silicon septa and aluminum crimp caps. The reactions were initiated by the addition of MTBE and other oxygenates (2 μmol). (A) Time course for degradation of MTBE and other oxygenates individually. (B) Time course for degradation of MTBE and other oxygenate mixtures.

러 종류의 가솔린첨가제가 동시에 오염될 수도 있어 이에 대한 연구 필요성을 제시하였다. 본 연구에서는 장 등[6]과 Chang 등[16]의 연구에서 MTBE 분해특성 파악 결과를 바탕으로 휘발유에 첨가되는 MTBE 외 다른 여러 가지 가솔린산화제(oxygenates)의 ENV425와 혼합균주에 의한 공대사적 분해에 대한 가능성을 조사하였다.

Fig. 2는 ENV425를 대상으로 MTBE, ETBE, TAME가 단독, 혼합으로 존재할 때의 분해경향을 나타내고 있다. 가솔린산화제가 단독 또는 혼합으로 존재할 때 모두 ETBE가 가장 빠르게 분해가 일어났으며, MTBE, TAME 순서로 분해가 일어났으며, 분해속도는 각각 111±12, 44±8, 37±6 nmol/hr/mg(dry weight)이었다. 즉, ETBE가 MTBE, TAME에 비해 2.5배 이상 빠른 분해속도를 보여주고 있다(Fig. 3(A)). 혼합균주인 경우에도 ENV425와 유사한 결과가 관찰되었으나 ENV425에 비해서는 다소 느린 분해 경향을 볼 수 있다(Table 4).

MTBE, ETBE, TAME가 혼합으로 첨가되었을 때도 가솔린 산화제가 단독으로 존재할 때 보다 완전하게 분해되는 시간이 다소 길어졌으나 resting cell 실험으므로 지연기 없이 분해가 일어났으며, 분해순서도 유사하였다(Fig. 2(B)). 그러나 분해속도는 MTBE, ETBE, TAME 각각 68±12, 36±9, 32±5 nmol/hr/mg(dry weight)으로 가솔린 첨가제가 단독으로 존재할 때 보다 다소 느려짐을 관찰하였다.

혼합균주인 경우에도 가솔린 첨가제의 분해경향은 ENV425와 비슷한 경향을 보였으나, ETBE, MTBE, TAME 모두 ENV425보다 분해속도가 다소 느렸다(Table 4). Kharoune 등[9]은 upflow fixed bed reactor 실험에서 가솔

Table 4. Degradation rates achieved in the resting cell condition with the target oxygenates in individual and mixture

Culture condition		Degradation rate (nmol/hr/mg (dry weight))		
		ETBE	MTBE	TAME
ENV425	Individul	111±12	44±8	37±6
	Mixed	68±12	36±9	31±5
Mixed culture	Individul	101±8	38±5	32±5
	Mixed	62±4	32±4	27±3

[a]Number of samples n=2.

린 산화제 농도는 다르지만, ETBE, MTBE, TAME 순으로 분해되었다고 보고하여 본 연구의 결과와 유사성을 보여주었다. Steffan 등[11]에서는 ENV425, *M. vaccae*, ENV420, ENV421등을 대상으로 한 가솔린 산화제 실험에서 균주 및 성장기질의 종류에 따라 다양한 결과를 보여주었다.

ENV425인 경우, propane, 2-propanol을 성장기질로 이용했을 때, MTBE가 ETBE보다 분해율이 우수했다. 그러나, ethanol, acetone을 성장기질로 이용했을 때는 MTBE 및 ETBE의 분해율이 유사했다. 24시간 배양 후 제거된 양을 비교하였으므로 Table 4에 제시된 본 연구의 결과와 직접적으로 비교하기는 어려우나, 균주 및 성장기질에 따라 다른 결과를 보여줌을 알 수 있다. 본 실험에서는 butane을 성장기질로 이용시 ENV425 및 혼합균주에서 MTBE 및 TAME 분해경향이 유사했으나, propane 및 기타 성장기질로 이용한 Steffan 등[11]의 결과에서는 TAME 분해율이 MTBE에 비해 확연히 떨어짐을 제시하였다. 그러나, *M. vaccae* JOB5는 MTBE, ETBE, TAME 모두 효과적으로 분해하였다. ENV420인 경우, MTBE, TAME는 효과적으로 분해하였으나, ETBE는 전혀 분해가 일어나지 않은 상반적인 결과를 보여주었다[11]. 기존 연구결과와 본 연구에서의 결과를 종합할 때, MTBE를 비롯한 가솔린 산화제는 공대사에 의한 분해시 성장기질에 따라 생성되는 효소의 역할에 따라 많은 차이를 나타냄을 알 수 있다. 그러므로 생물학적방법에 의한 오염토양/지하수 현장 적용시에는 오염지역 토착미생물의 특성 파악에 따른 정화방법 및 방안이 제시되어져함을 예상 할 수 있다.

4. 결 론

본 연구에서는 기존에 MTBE 공대사에 검증된 순수균주 ENV425와 국내유류오염토양에서 분리된 혼합균주를 대상으로 MTBE 및 기타 가솔린산화제 분해특성 파악에 대한 연구를 수행하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. ENV425 및 혼합균주의 기질로서 butane 분해속도는 유사하였으나, 1차 부산물인 1-butanol 축적속도에서는 ENV425가 우수했다. 즉, monooxygenase의 역할에 따라 부산물 형성의 차이점이라고 사료된다.

2. 국내유류오염토양에서 분리된 혼합균주의 MTBE 및 기타 가솔린산화제 분해능력이 기존에 검증된 ENV425에 비교해 뒤떨어지지 않음을 관찰하였다. 즉, 혼합균주의 분해특성 결과는 유류오염지역의 생물학적 현장적용의 가능성을 높여준다.

3. MTBE 분해활성에 영향을 미치는 성장기질로는 butane, propane, pentane 등의 alkane류가 효과적이었으며, butanol, ethanol 등 alchol류는 기질로서 MTBE 분해 유도에 효과적인 못했다. 또한 MTBE 중요 부산물인 TBA 역시 MTBE 분해를 유도하지 못했다. 그러나, 유류성분인 BTEX 존재시 MTBE 분해가 일부 관찰되어 유류오염지역에서의 공대사에 의한 MTBE 분해가능성을 높여줄 것으로 사료된다.

4. 균체농도 및 MTBE 초기농도에 따른 MTBE 분해특성 실험에서 주입 균체농도에 따라 MTBE 분해량은 다소 증가하였으나, T_c(transformation capacity)는 오히려 감소하는 경향을 보였다.

5. MTBE 및 기타 가솔린산화제의 분해특성 실험에서는 ENV425 및 혼합균주에 의해 MTBE, ETBE, TAME를 효과적으로 제거할 수 있었다. 그러나, ETBE가 2차기질로는 가장 우수했으며, MTBE, TAME 순으로 관찰되었다. 또한 여러 종류의 가솔린 산화제가 혼합된 경우에는 분해순서는 유사했으나, 전반적으로 분해시간이 길어졌으며, 분해속도도 다소 느려지는 것으로 관찰되었다.

6. 본 연구 내용과 기존 연구내용을 비교 검토한 결과, 난분해성 오염원인 MTBE 및 가솔린산화제를 생물학적인 방법에 의해 효과적으로 제어하기 위해서는 오염지역 토착미생물의 특성 파악 후 적절한 오염지역 복원방안이 제시되어져야 한다.

사 사

본 연구는 2000년도 경기대학교 교내학술 연구비 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

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. USEPA, Drinking Water Advisory: Consumer Acceptability Advice and Health Effects Analysis on Methyl Tertiary-Butyl Ether, U.S. Environmental Protection Agency, Office of Water, EPA-882-F-97-009 (1997).
5. Harty, W.R., Englande, Jr., A.J. and Harrington, D.J., "Health risk assesment of groundwater contaminated with methyl tertiary butyl ether (MTBE)", *Wat. Sci. Tech.*, **39**(10-11), pp. 305-310 (1999).
6. 장순응, 백승식, 이시진 "부탄분해미생물에 의한 가솔린첨가제 MTBE(Methyl tert-Butyl Ether) 분해", 한국지하수환경학회지, **6**(3), pp. 31-41 (2001).
7. Salanitro, J. P., Diaz, L. A., Williams, M. P. and isniewsji, H. L., "Isolation of a bacterial culture that degrades methyl t-butyl ether", *Appl. Environ. Microbial*, **60**, pp. 2593-2596 (1994).
8. 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).
9. Kharoune, M., Pauss, A. and Lebeault, J.M, "Aerobic biodegradation of an oxygenates mixture: ETBE, MTBE, and TAME in an upflow fixed-bed reactor", *Wat. Res.*, **35**(7), pp. 1665-1667 (2001).
10. 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).
11. 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).
12. 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).
13. Hyman, M.R., Kwon, P., Williamson, K. and O'Reilly K., "Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganism". In G.B. Wickramanayake aand R.E. Hinche (Eds.), Natural Attenuation: Chlorinated and Recalcitrant Compounds, pp. 321-326, Battelle Press, Columbus, OH(1998).
14. Hyman, M.R., and O'Reilly, K., "Physiological and enzymatic features of MTBE-degrading bacteria". In B.C. Alleman and A. Leeson (Eds.), In Situ Bioremediation of Petroleum Hydrocarbons and Other Organic Compounds, pp. 7-12, Battelle Press, Columbus, OH(1999).
15. Hyman, M.R., Smith, K. and O'Reilly, K., "Cometabolism of MTBE by an aromatic hydrocarbon-oxidizing bacterium", In V.S. Magar and M.R. Hyman (Eds.), Bioremediation of MTBE, Alchols, and Ethers, pp. 145-152, Battelle Press, Columbus, OH(2001).
16. Chang, S.W., Baek, S.S. and Lee, S.J., "Cometabolic degradation of MTBE and other gasoline additives by butane-utilizing microorganisms", In V.S. Magar and M.R. Hyman (Eds.), Bioremediation of MTBE, Alchols, and Ethers, pp. 161-166, Battelle Press (2001).
17. Liu, C.Y., Speitel, G.E., and Georgiou, G., "Kinetics of methyl t-butyl ether cometabolism at low concentrations by pure cultures of butane-degrading bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, **67**(5), pp. 2197-2201 (2001).
18. Gornall, A.G., Bardawill, C.J. and David, M.M, "Determination of serum proteins by means of the Biuret reaction", *J. Biol. Chem.*, **177**, pp. 751-766 (1949).
19. Ginkel V., Welten H.J., Hartmans S. and De Bont J.A.M, "Metabolism of trans-2-butane and butane in Nocardia TB-1", *J. Gen. Microbiol.* **133**, pp. 1713-1720 (1987).
20. Hamamura N., Storfa, R.T., Semprini, L. and Arp D.J., "Diversity in butane monooxygenases among butane-grown bacteria", *Appl. Environ. Microbiol.*, pp. 4586-4593 (1999).
21. Fitch, M.W., "Trichloroethylene degradation by *Methylosinus trichrosporium* OB3b in a hollow fiber membrane reactor", Ph.D. thesis, University of Texas, Austin (1996).