

## 프로판 및 부탄 이용 미생물에 의한 휘발유 첨가제 MTBE의 동시분해

장순웅\*

경기대학교 토목환경공학부 환경공학전공

## Cometabolic Biodegradation of Fuel Additive Methyl tert-Butyl Ether (MTBE) by Propane- and Butane-Oxidizing Microorganisms

Soon-Woong Chang\*

Dept. of Environ. Eng., Kyonggi University

### ABSTRACT

A gas-substrate degrading bacterium, *Nocardia* SW3, was isolated from the gasoline contaminated aquifer using propane and butane as carbon and energy sources. We have examined the effects of substrate concentration, temperature and pH on the gas substrate degradation as well as MTBE cometabolic degradation. The result for the effect of substrate concentration showed that the maximum degradation rates of propane and butane were 30.6 and 25.4 (nmol/min/mg protein) at 70  $\mu$ mol, respectively. The optimum temperature and pH for the degradation of gas substrate were 30°C and 7, respectively. Substrate degradation activity, however, was still active in broad range of pH from 5 to 8 and temperature between 15°C and 35°C. The degradation activity of *Nocardia* SW3 for the MTBE was similar to the both substrates. The observed maximal transformation yields ( $T_y$ ) were 46.7 and 35.0 (nmol MTBE degraded/ $\mu$ mol substrate utilized), and the maximal transformation capacities ( $T_c$ ) were 320 and 280 (nmol MTBE degraded/mg biomass used) for propane and butane oxidizing activity on MTBE, respectively. And also, TBA was detected as by-product of MTBE and it was continuously degraded further.

**Key words :** *Nocardia* SW3, propane, butane, MTBE, cometabolism

### 요 약 문

국내유류오염지역 토양에서 propane과 butane을 탄소원으로 이용하여 분리된 *Nocardia* SW3를 대상으로 가스기질농도, 온도, pH 변화에 따른 영향, 그리고 MTBE 공대사 분해 특성을 조사하였다. 초기농도변화에 따른 기질분해속도를 비교하면 propane 및 butane이 70  $\mu$ mol일때 각각 30.6, 25.4(nmol/min/mg protein)으로 관찰되어 빠른 기질이용을 보여주었으며, 최적온도 및 pH 조건은 30°C, 7이었으며, 실험조건인 온도 15°C~35°C, pH 5~8 범위내에서 약간의 차이는 있지만 전반적으로 propane과 butane이 효율적으로 이용되었다. *Nocardia* SW3를 대상으로 propane 및 butane이 탄소원으로 이용될 때 MTBE 분해특성을 비교·평가한 결과, propane 및 butane의 MTBE 분해활성도는 유사하였으며, 가스기질이 탄소원으로 이용시 MTBE의 분해량을 나타내는 transformation yield( $T_y$ )는 propane과 butane의 경우 각각 46.7, 35.0(nmol MTBE degraded/ $\mu$ mol substrate utilized), transformation capacity( $T_c$ )는 실험결과 각각 320, 280(nmol MTBE degraded/mg biomass used)로 나타났다. 또한 MTBE 부산물로 TBA가 검출되었으며, TBA의 지속적인 분해를 관찰하였다.

**주제어 :** *Nocardia* SW3, 프로판, 부탄, MTBE, 공대사

\*Corresponding author : swchang@kyonggi.ac.kr

원고접수일 : 2003. 10. 9 게재승인일 : 2003. 10. 14

질의 및 토의 : 2004. 3. 30 까지

## 1. 서 론

MTBE(Methyl *tert*-Butyl Ether)는 무연 휘발유의 첨가제로서 옥탄가를 향상시키고 자동차 배기가스중의 일산화탄소 발생을 감소시켜 결과적으로 대기오염도를 줄이는 환경 친화적인 효과 때문에 광범위하게 사용되고 있다. 이러한 목적에서 사용되기 시작한 이 물질은 메탄올과 이소부텐의 결합체로서, 알코올에 섞여 있는 높은 산소 함유량 때문에 휘발유에 섞어 쓸 경우 산소 첨가제의 역할을 해서 휘발유의 불완전 연소를 줄이게 된다<sup>1)</sup>. 산소 첨가제로 이용되는 물질로는 MTBE 이외에도 ETBE(Ethyl tertiary butyl ether), TAME(Tertiary amyl methyl ether), DIPE(Diisopropyl ether), TBA(Tertiary butyl alcohol), metahnol, ethanol 등이 있지만, 높은 옥탄가, 경제성, 가솔린과의 높은 혼합성 등의 이유로 국내 뿐만 전세계적으로 MTBE는 매우 광범위하게 사용되고 있다.

미국에서는 1979년부터 MTBE가 휘발유의 옥탄가 향상제 및 산소 첨가제로 사용되기 시작하였으며, 우리나라에서도 1984년부터 쓰이기 시작했다. MTBE의 생산량은 계속 증가해서 현재까지 계속 사용되고 있으며, 1993년에는 환경보전법에 의하여 MTBE의 휘발유 배합이 의무화되었고 상당량이 휘발유에 첨가되었다<sup>2)</sup>.

일반적으로 소비되는 휘발유 내 MTBE 함량은 6~8% 정도이며 MTBE는 유류 및 유기 물질 저장 탱크가 주로 지하에 설치되어 있고 전국적으로 지하 탱크에 유류를 저장한 주유소가 대부분을 차지하고 있어 생활하는 가까운 곳에서 휘발유 유출로 인해 토양과 지하수가 MTBE로 오염될 가능성이 있으며 상당량 오염이 진행되었다고 추정할 수 있다<sup>3)</sup>.

외국의 연구사례를 보면, MTBE에 노출된 동물은 신경계, 혈청, 간, 신장, 등에 역효과를 나타냈고, 인간에 대해서는 발암 가능 물질로 분류하고 있다. Harty 등<sup>4)</sup>에 의하면 미국의 일반적인 음용수의 MTBE 농도는 10 µg/l 이하이며, 발암 가능성 때문에 음용수로서의 최대 허용 기준을 100 µg/l로서 제시하였다. 또한 미국환경청에서는 1997년 맛과 냄새를 기준으로 20~40 µg/l의 음용수 권고량을 발표했다<sup>5)</sup>.

MTBE로 오염된 토양이나 지하수를 처리하거나 복원하기 위해서는 물리·화학적 방법들이 많이 제시되고 있으나, 자연적인 정화작용 원리를 이용한 생물학적 복원 방법에 대한 관심이 높아지고 있다. 생물학적 방법은 크게 오염된 지역에 서식하는 미생물의 정화 활성도를 향상시키기 위해 영양물질과 공기 등을 주입해주는 biostimulation

방법과 오염 물질 분해 미생물을 오염지역에 인위적으로 접종하여 오염물질 분해 활성을 촉진시키는 bioaugmentation 방법이 있다. 두 방법을 현장에 적용하는데 있어 중요한 점은 오염물질을 효율적이고 안정적으로 분해할 수 있는 미생물의 확보 및 확보된 미생물의 활성을 최대로 유지할 수 있는 공정의 최적화이다.

MTBE는 탄소원 혹은 에너지원으로 이용하는 종속영양 미생물에 의해 혐기적 혹은 호기적으로 분해될 수 있다<sup>6-8)</sup>. 구체적으로 살펴보면, 생물학적인 MTBE 분해는 MTBE 자체를 탄소원으로 이용하여 직접 분해하거나<sup>6,7,9)</sup>, 기타 성장기질(growth substrate)을 이용하는 여러 종류의 박테리아<sup>10-14)</sup>와 곰팡이류<sup>8)</sup>에 의해 난분해성 오염원인 MTBE 분해를 유도하기도 한다. 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.

본 연구에서는 국내 유류오염지역의 토양으로부터 propane 및 butane을 탄소원 및 에너지원으로 이용하는 순수 미생물을 분리하여 분리 균주의 MTBE 분해능에 미치는 기질 농도, 온도 및 pH의 영향을 조사하였으며, MTBE 분해특성을 조사하였다.

## 2. 실 험

### 2.1. Propane 및 Butane 분해 균주의 분리

유류오염 지역에서 토양을 채취하여 propane 및 butane을 탄소원과 에너지원으로 이용하는 균주를 분리하였다. 토양시료 10 g을 50 ml 멸균수에 넣고 250 rpm에서 30분간 진탕 혼합한 후, 이 현탁액을 멸균수로 단계적으로 희석하였다. 희석액을 yeast extract 배지에 도말한 후 30°C의 항온기에 넣어 배양하였다. Yeast extract 배지의 성분은 KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1.5 g/l, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> · 12H<sub>2</sub>O 9 g/l, (NH<sub>4</sub>)<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 3 g/l, CaCl<sub>2</sub> 0.01 g/l, MgCl<sub>2</sub> 0.15 g/l, yeast extract 1.0 g/l, agar 15 g/l(pH 7)이었다. Yeast extract 배지에서 성장한 colony의 형태적 특성에 따라 5종의 균주를 분리하였다. 각 균주를 yeast extract 배지에 약 10회식 반복적으로 도말하여 형태와 성상이 지속적으로 유지되는 것을 확인하였다. 순수 분리한 5종의 균주를 무기염배지에 접종하고 propane 및 butane을 각각 첨가하여 그 배지 내에서의 성장과 시간에 따른 propane 및 butane 분해능이 동시에 우수한 *Nocardia* SW3 균주를 선정하였다. Propane 및 butane 분해능은 아래에 설명한 분해 활성 실험과 동일한 방법을

이용하여 확인하였으며 분리 균주의 동정은 16S rRNA sequence 분석을 통해 조사하였다.

**2.2. 분리 균주의 기질 분해 특성 실험**

실험에 사용된 모든 초자류 및 기기는 가능한 고압증기 멸균기를 이용하여 121°C, 15분간 멸균하여 사용하였다. 1.2 L serum bottle에서 약 7일 동안 25°C, 150 rpm의 조건에서 성장한 *Nocardia* SW3는 OD<sub>550</sub>는 0.7~0.9의 범위였다. TSS 및 흡광도를 측정한 후 원심 분리하여 미생물을 농축시켰다. TSS의 값과 원심분리 후 농축시킨 미생물 농축액의 농도를 계산하여 필요량을 serum bottle에 주입하는 방식을 유지하였다<sup>15)</sup>. 기질분해실험 및 MTBE 분해실험은 120 ml serum bottle에 50 ml BSM과 기질 및 MTBE를 주입한 후, teflon-silicon septa와 aluminum crimp cap으로 밀봉하고 균주를 접종한 후에 실험을 시작되었다. 그리고 비교 실험으로는 위와 동일한 조건에 monooxygenase의 선택적인 방해자 역할을 하는 acetylene (1.0%(vol/vol); gas phase)을 첨가하여 실험을 진행함으로써 가스기질 이용시 MTBE 분해를 검증하는데 이용하였다<sup>13)</sup>.

**2.3. 분석방법**

Propane, butane 및 MTBE 측정은 Hamilton 1710N gas-tight syringe를 이용하여 bottle의 headspace에서 100 µl를 채취하여 GC에 직접 주입하여 분석하였으며, TBA는 CS2로 추출하여 1 µl를 GC에 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<sup>17)</sup>.

**3. 결과 및 고찰**

**3.1. 가스기질 분해 균주의 분리**

본 연구에서는 국내 유류오염토양에서 5종의 균주를 분리하였으며, 분리된 균주중 2종은 그람양성균, 3종은 그람 음성균이었다. 이중 2종의 균주는 *Pseudmonas*와 *Nocardia*로 판명되었고 다른 3종의 균주는 명확하게 명명이 되지 않았다.

Propane과 butane을 성장기질 이용가능성을 비교할 때, *Nocardia* 균주인 SW3가 가장 성장이 우수하였다. *Nocardia* SW3 균주는 우유빛 색을 띄었고, colony의 형태가 다른 균주에 비해 뚜렷했으며, 그람양성균이었다. 또한 Propane과 butane을 탄소원으로 이용하여 배양했을 때, OD<sub>550</sub>가 각각 0.85, 0.76 정도로 균주 성장이 우수하였다. 또한 기초검사로 배양된 균주를 대상으로 resting cell 실험을 한 결과 다른 균주에 비해 뛰어나 MTBE 분해활성도를 보였으며, propane이 탄소원으로 이용되어졌을 때보다 높은 MTBE 분해활성도를 보였다.

**3.2. *Nocardia* SW3 균주에 의한 기질농도, 온도 및 pH의 영향**

위 Table 1에서 제시된 바와 같이 가스기질에 대한 활성도가 높은 *Nocardia* SW3를 대상으로 MTBE 공대사에 적절한 기질 분해특성을 파악하기 위해 기질 농도, 온도 및 pH 변화에 따른 기질(propane, butane) 분해 특성을 조사하였다. 가스기질 농도 변화에 따른 분해 특성 실험은 초기 주입균주량 2 mg(건조기준량), 기질 주입량은 15, 30, 50, 75 µmol로, 시간에 따른 propane 및 butane의 분해 특성을 조사하였으며, Fig. 1에 나타내었다.

**Table 1.** Characteristics of alkane-utilizing strains

Strain	Gram Stain	Color	16SrRNA	Final OD <sub>550</sub> <sup>a</sup>		Relative activity (%) <sup>c</sup>	
				Propane	Butane	Propane	Butane
SW1	+	Bright Orange	ND <sup>b</sup>	0.25	0.36	45	48
SW2	-	Cream	<i>Pseudmonas</i>	0.45	0.25	55	21
SW3	+	Milky White	<i>Nocardia</i>	0.85	0.76	100	79
SW4	-	Yellow	ND	0.37	0.58	75	45
SW5	-	White	ND	0.73	0.46	68	57

<sup>a</sup>The initial OD<sub>550</sub> of each culture was 0.05. Cultures were incubated at 25°C with constant shaking at 150 rpm.

<sup>b</sup>ND, not determined.

<sup>c</sup>The MTBE degradation of activity of each culture was compared to MTBE dgradation by propane and butane-grown cells.

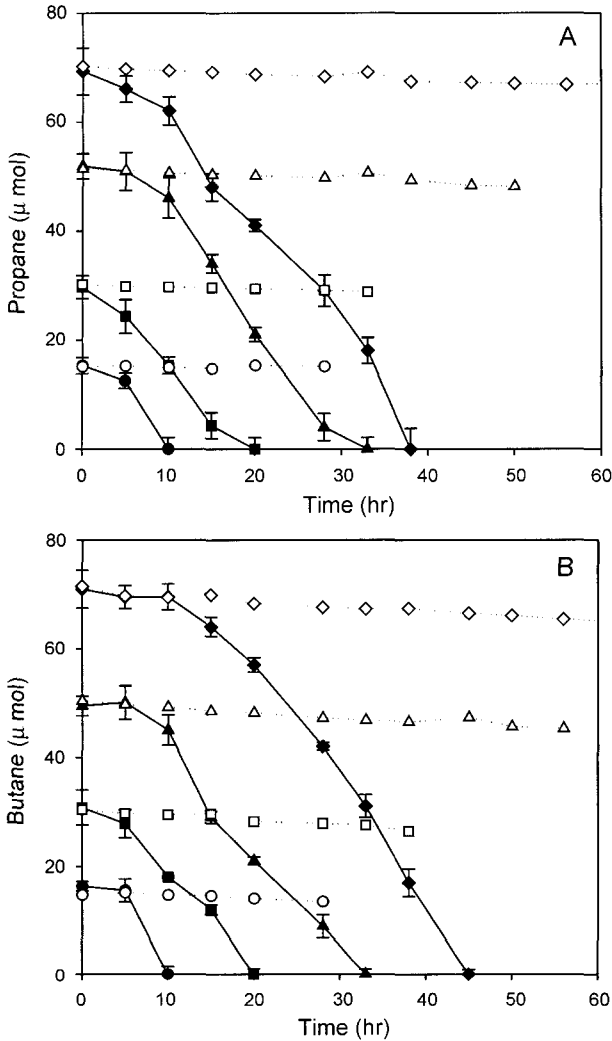


Fig. 1. Propane and butane degradation at different initial propane and butane concentration by *Nocardia* SW3.

Propane과 butane 분해는 서로 유사한 경향을 보이고 있으며, 초기 주입농도 증가에 따라 지체기 증가와 더불어 완전하게 분해되는 시간이 길어짐을 볼 수 있다.

Table 1에서 간략하게 조사한 결과와 더불어 propane이 butane보다는 다소 기질 분해율이 높게 나타났다. 초기 농도변화에 따른 기질분해속도를 비교하면 propane 및 butane의 초기 기질주입량이 75 μmol일 때 각각 30.6 nmol/min/mg protein, 25.4 nmol/min/mg protein으로 관찰되었다. 이 결과는 장<sup>24</sup>에서 ENV425 및 혼합균주를 대상으로 도출된 butane 분해속도 38.4, 35.2 nmol/min/mg protein보다는 다소 느렸지만, 본 실험에서 분리된 균주인 *Nocardia* SW3와 비슷한 *Nocardia* TB1<sup>15</sup>에 의한 butane 분해속도 4.9 nmol/min/mg protein보다 매우 빠른 분해속도를 보여주고 있으며, Hamamura 등<sup>16</sup>이 대상으로 한

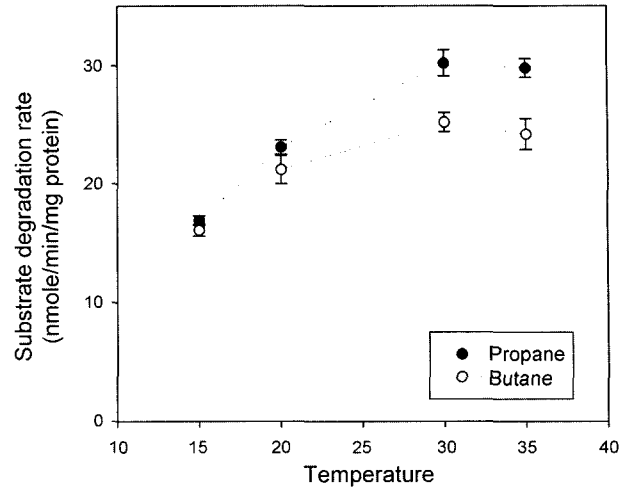


Fig. 2. Comparison of propane and butane degradation at different temperature condition by *Nocardia* SW3.

균주인 CF8, *M. vaccae*에 의한 butane 분해속도 31.5, 21.5 nmol/min/mg protein 보다도 빠른 분해속도를 보여주고 있다.

Fig. 2는 초기 기질주입량 60 μmol이고 주입온도변화(15, 20, 30, 35°C)에 따른 균주 *Nocardia* SW3에 의한 기질 분해영향을 보여주고 있다. 온도변화에 무관하게 propane이 butane 보다 효율적인 기질 이용성을 보여주고 있으나, 15°C~20°C 조건에서는 분해속도가 16.1~23.1 nmol/min/mg protein 범위로 온도 증가에 따라 분해속도가 다소 증가하나, 두 기질에 따른 분해속도 경향은 유사하게 나타났다. 그러나 온도가 30°C에서는 propane과 butane 분해속도가 각각 30.2, 25.2 nmol/min/mg protein으로 급격하게 증가하여 15°C일때 보다 1.5~1.8배 이상 빠르게 분해됨을 알 수 있다.

Amstrong 등<sup>19</sup>은 유류물질중 toluene을 대상으로 실험한 결과, 11°C에서 25°C까지 온도가 증가함에 따라 toluene 분해속도가 약 3배까지 증감함을 보여주었다. 또한 Deeb 등<sup>20</sup>은 20°C에서 농화 배양된 균을 이용하여 toluene의 분해능에 미치는 온도의 영향을 조사한 결과, 35°C에서 최적의 toluene 분해활성을 보여주었으며 20°C에서는 35°C에서 얻은 toluene 분해속도의 약 56%의 활성을 나타낸다고 보고하기도 하였다. 본 연구결과에서는 30°C에서 최적의 가스기질 분해속도를 보여주었으며, 35°C에서는 분해속도가 다소 감소되었다. 그러나 유류 및 MTBE로 오염된 토양/지하수의 생물학적 정화를 위해서는 현장복원방법이 현실적인 접근방안임을 고려할 때, 저온(10°C~20°C)에서 MTBE 분해활성도를 높일 수 있는 연구가 필요하다고 사료된다.

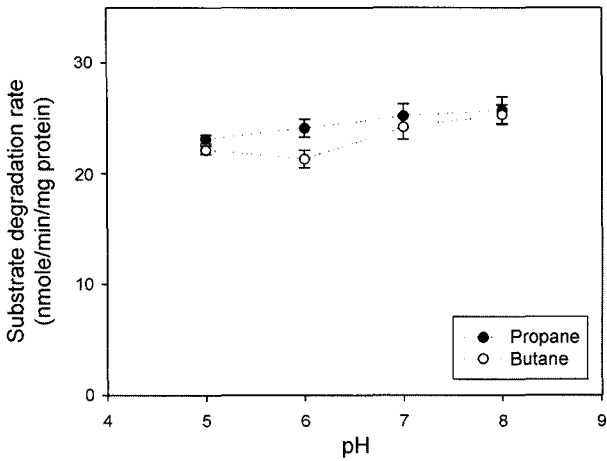


Fig. 3. Comparison of propane and butane degradation at different pH condition by *Nocardia* SW3.

*Nocardia* SW3 균주의 두 기질 분해 활성에 미치는 pH의 영향(초기 기질주입량 60  $\mu$ mol)을 조사한 결과는 Fig. 3에 나타내었다. pH 7에서 *Nocardia* SW3 균주에 의한 propane 및 butane 분해속도는 25.2, 24.2 nmol/min/mg protein으로 관찰되었다. 그러나 균주 *Nocardia* SW3에 의한 두 기질의 분해속도는 pH가 5에서 8까지의 범위에서 거의 유사하게 나타났다. 즉, pH 문제로 인한 *Nocardia* SW3 균주의 적용성 문제는 없다고 사료된다.

### 3.3. *Nocardia* SW3 균주에 의한 MTBE 분해 특성

기질농도, 온도, pH 변화에 따른 1차기질 분해특성을 조사하였고, 이를 바탕으로 균주 *Nocardia* SW3에 의한 MTBE 공대사 분해 특성을 살펴보았다.

MTBE는 생물학적으로 난분해성물질로 분류되어 일반적인 오염지역에서는 MTBE가 탄소원으로 직접 분해가 어렵다<sup>12)</sup>. 이러한 이유로 호기성 생물학적 분해 조건에서

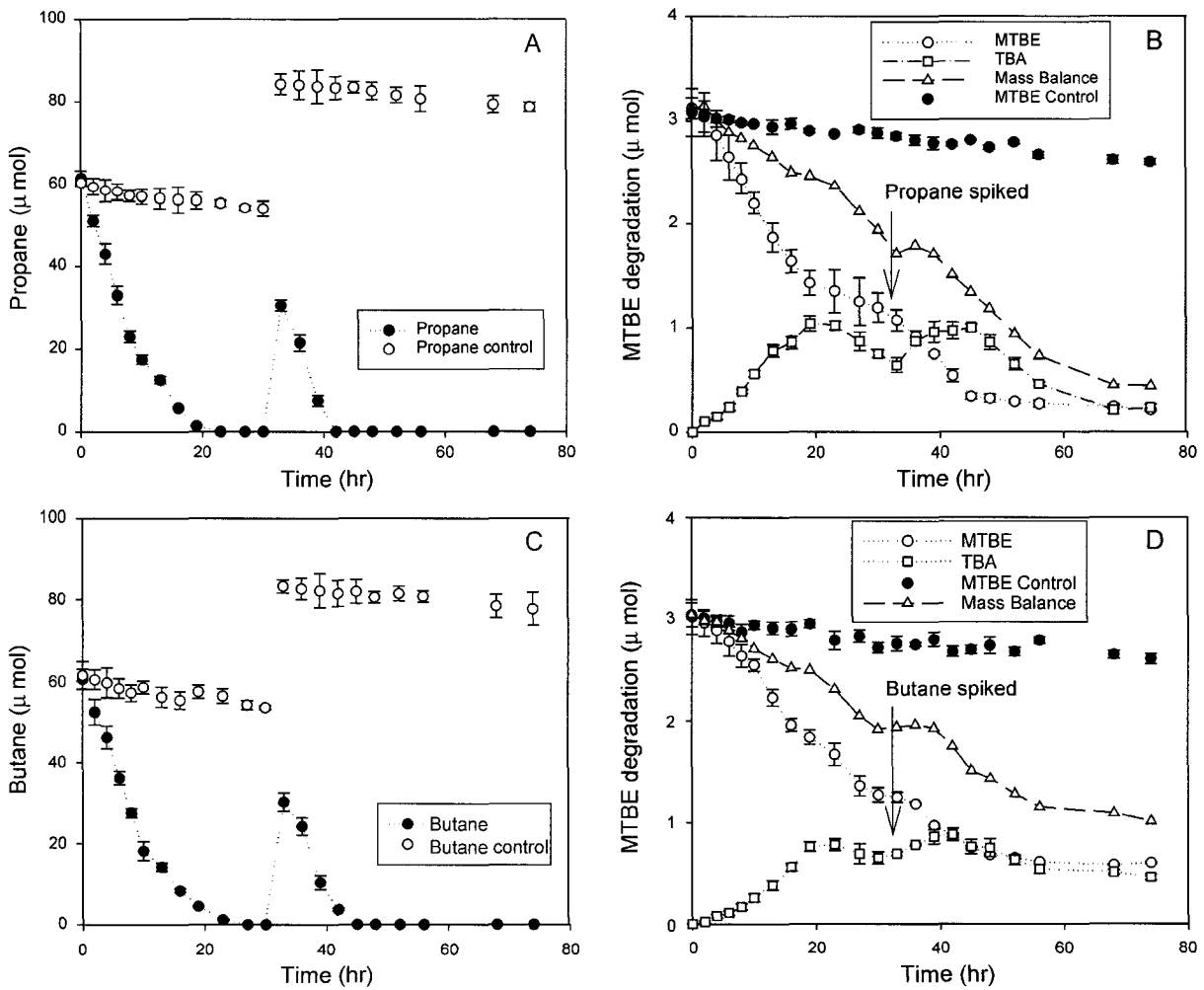


Fig. 4. The cometabolic MTBE degradation in the presence of propane and butane by *Nocardia* SW3.

는 공대사에 의한 MTBE 분해를 유도하는 방법이 적절하다. 본 연구에서는 국내유류오염지역에서 분리된 5종의 균주중 가장 우수한 활성도를 보인 *Nocardia* SW3를 대상으로 propane 및 butane이 이 탄소원으로 이용될 때 MTBE 분해특성을 비교·평가하였다.

Fig. 4(a), (b)는 균주 *Nocardia* SW3가 propane을 탄소원으로 공급했을 때 propane 및 MTBE 분해 경향을 보여주는 결과이다. 실험조건은 실험방법에 설명된 바와 같이 120 ml serum bottle에 배지 50 ml, propane 60  $\mu$ mol, 그리고 원심 분리된 균주 2 mg(건조기준량)를 접종하여, 25°C, 150 rpm 조건으로 실험을 진행하였다. 초기 주입된 propane 60  $\mu$ mol은 20h 이내에 완전히 분해가 일어났으며, MTBE 역시 propane 감소와 더불어 분해가 일어나기 시작하였다. 35 h 경과 후 30  $\mu$ mol propane을 재주입한 후 propane은 초기와 유사한 속도로 42h만에 완전하게 제거되었으며, MTBE 분해속도는 다소 빨라졌다. 이때 관찰된 propane 분해속도는 50.0 nmol/min/mg protein으로 Table 1에서 제시된 분해속도보다 빠르게 나타났다. Fig. 4(c), (d)에서는 butane 공급시 MTBE 분해특성을 보여주고 있으며, propane의 경우와 같이 빠른 기질 분해속도를 보여주었다. Table 1에서 제시된 결과보다 빠른 기질 분해속도 결과는 *Nocardia* SW3 활성도가 일정주기로 반복적으로 배양해줌으로써 균주의 활성도가 좋아졌기 때문으로 사료된다.

MTBE 분해와 더불어 MTBE 부산물인 TBA 생성이 관찰되었으며, 생성된 TBA 역시 시간경과에 따라 지속적인 분해가 관찰되었다. Fig. 4(b)에서 보면, 75h 후 MTBE 분해 및 TBA 생성 결과를 MTBE control과 물질수지를 비교한 결과 MTBE 및 분해산물의 총량은 MTBE control의 약 17%로 관찰되었으며 MTBE 및 MTBE 부산물인 TBA 역시 지속적으로 분해가 일어남을 알 수 있다. TBA 생성 후 monooxygenase의 방해물질인 acetylene (1%(v/v); gas phase) 첨가시에는 TBA의 분해가 더 이상 지속적인 제거가 일어나지 않았다. 즉, MTBE 초기 분해 반응에 관여하는 alkane monooxygenase가 TBA 분해도 관여하고 있음을 간접적으로 추측할 수 있다.

Propane 공급시와 유사하게 butane을 공급한 경우 Fig. 4(d)에서도 유사한 MTBE 분해특성을 보여주고 있다. Hyman 등<sup>8)</sup>에서는 곰팡이류인 *Graphium* sp.는 propane을 탄소원으로 공급시 MTBE 분해산물로 TBF 및 TBA가 생성되고 TBF는 가수분해 반응을 통해 TBA로 빠르게 전환되나, TBA는 더 이상 분해가 일어나지 않고 지속적인 축적이 일어났다. 반면에 Hyman 등<sup>14)</sup>에서는 alkane

분해균에 의한 TBA의 지속적인 관찰을 보고하기도 하였다. 또한 백 등<sup>21)</sup>에서는 순수균주인 ENV425 및 혼합균주를 대상으로 한 MTBE 분해실험에서는 TBF가 검출되지 않았고, resting cell 실험에서는 TBF가 초기에 검출되었으나 빠르게 감소되어 TBA로 전환됨을 보여주었다. Hyman 등<sup>8)</sup>에서는 MTBE 분해시 물질수지 비교에서 생성된 부산물의 총량(TBF+TBA)은 감소된 MTBE보다 적은 양이 관찰되어 부산물의 추가적인 분해 가능성을 제시하기도 하였으나, 이 연구에서는 지속적인 TBA 축적이 일어나 분해경로에 대한 명확한 결과를 제시하지는 못했다. 또한 propane 분해균주가 toluene 및 benzene 등 방향족기질을 탄소원으로 재이용시 MTBE 분해는 유도되었지만, TBA의 추가적인 분해는 일어나지 않아, MTBE 및 부산물의 반응에 관여하는 효소 작용이 균주의 종류에 따라 다르게 나타남을 알 수 있다<sup>8,14)</sup>. Lie 등<sup>22)</sup>에서는 MTBE의 부산물인 TBA가 축적되면서 MTBE 분해 활성도를 떨어뜨릴 수 있어, TBA 축적에 의한 영향을 최소화할 필요가 있다고 보고하기도 하였으며 MTBE 분해시 TBA는 30~40%의 범위로 일시적인 축적이 일어났다. 아직까지 공대사에 의한 MTBE 분해경로에 대한 명확하게 알려진바 없으나, [<sup>14</sup>C] MTBE에 의한 실험 결과 최종적으로 CO<sub>2</sub>까지 완전한 분해가 가능한 것으로 추정하고 있다<sup>11)</sup>. Fig. 4에 보여진 결과를 바탕으로 두 가스기질이 탄소원으로 이용시 MTBE의 분해량을 나타내는 transformation yield(T<sub>y</sub>)를 비교해 보면, propane 및 butane 초기주입량이 완전히 이용된 30h 기준으로 46.7, 35.0(nmol MTBE degraded/ $\mu$ mol propane utilized)으로 나타나 장<sup>23)</sup>에서 ENV425 및 혼합균주에 의한 butane이 탄소원으로 이용될 때 T<sub>y</sub> 값 31.9, 32.3보다 다소 높은 결과를 보여주었다. 또한 propane 및 butane이 탄소원으로 이용될 때 균주양에 대한 MTBE 제거량을 나타내는 transformation capacity (T<sub>c</sub>)는 resting cell 실험결과 각각 320, 280 nmol/mg biomass로 Lie 등<sup>22)</sup>이 butane을 성장기질로 이용했을 때 *Arthrobacter*에 의한 T<sub>c</sub> 0.23  $\mu$ mol/mg biomass 다소 높았으며 장<sup>23)</sup>에서 혼합균주에 의해 butane을 성장기질로 이용한 실험 결과인 0.06~0.12  $\mu$ mol/mg biomass보다 훨씬 높은 T<sub>c</sub> 결과를 보여주고 있다.

#### 4. 결 론

본 연구에서는 국내유류오염지역 토양에서 propane과 butane을 탄소원으로 이용하여 분리된 균주 5종중 MTBE 분해활성도가 우수한 *Nocardia* SW3을 대상으로 기질농

도, 온도 및 pH 변화 등 환경적 요인에 따른 propane과 butane이 *Nocardia* SW3의 기질로 이용될 때 영향을 조사하고, MTBE 분해특성을 비교·평가하였으며, 다음과 같은 결론을 얻었다.

1. 국내유류오염지역 토양에서 propane과 butane을 탄소원으로 이용하여 5종의 균주를 분리하였으며, 이중 탄소원인 propane, butane 뿐만 아니라 MTBE 분해활성도가 뛰어난 *Nocardia* SW3를 본 연구의 대상 균주로 선정하였으며, *Nocardia* SW3는 유유티 색을 띄고, 그람양성균이며, OD<sub>550</sub>가 0.7~0.9정도로 다른 균주에 비해 성장이 매우 우수하였다.

2. 초기농도변화에 따른 기질분해속도를 비교하면 propane 및 butane이 70 µmol/l일 때 각각 30.6, 25.4 nmol/min/mg protein으로 관찰되어 빠른 기질이용율을 보여주었으며, *Nocardia* SW3는 이전에 유사한 *Nocardia* 균주에 비해 뛰어난 기질이용율을 보여주었다.

3. 온도변화에 따른 균주 *Nocardia* SW3에 의한 기질 분해 결과는 전반적으로 propane이 butane 보다 다소 효율적인 기질 이용성을 보여주고 있으나, 15°C~20°C 조건에서는 분해속도가 16.1~23.1 nmol/min/mg protein 범위로 온도 증가에 따라 분해속도가 다소 증가하나, 두 기질에 따른 분해속도 경향은 유사하게 나타났다. 그러나 30°C에서는 15°C의 조건보다 1.6~1.8배 정도 분해속도가 향상되어 온도조건은 중요한 영향인자로 사료된다. 그러나 pH는 5~8 범위를 벗어나지 않는 한 propane 및 butane이 효율적인 이용에 영향을 미치지 않는 것으로 조사되었다.

4. *Nocardia* SW3를 대상으로 propane 및 butane이 탄소원으로 이용될 때 MTBE 분해특성을 비교·평가한 결과, propane 및 butane의 MTBE 분해활성도는 유사하였다. 또한 MTBE 분해 물질수지 비교 결과, MTBE는 TBA로 변환된 후 지속적으로 추가 분해가 일어남을 관찰하였다.

5. 본 연구 결과는 난분해성 토양/지하수 오염원인 MTBE를 생물학적인 처리방법으로도 효과적으로 제어할 수 있는 기초 자료를 제시했다고 사료된다. 특히, 본 연구에서 의 결과는 MTBE의 물리화학적 특성상 오염지역의 광범위함을 고려하여 현장정화처리방안을 제시할 때, 적절한 외부탄소원의 주입을 통한 MTBE 분해를 유도하는 enhanced natural attenuation이나 오염현장에서 분리된 균주를 배양하여 주입해줌으로써 현장작용성을 높여줄 수 있는 bioaugmentation 기술이 MTBE 오염토양/지하수를 정화하는데 효율적으로 이용하는 방안이 될 수 있음을 제시했다고 사료된다.

## 사 사

이 논문은 2000년도 한국학술진흥재단의 지원에 의하여 연구되었음(KRF-2000-003-E00418).

## 참 고 문 헌

1. 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)
2. 배범한, 조종수, "휘발유 첨가제 MTBE에 의한 지하수오염의 문제점 및 정화방안", 대한토목학회, **46**(3), pp. 41-51 (1998).
3. 이지훈, 이진용, 천정용, 이강근, "유류 오염 물질 MTBE에 대한 연구동향", 대한지하수환경학회지, **7**(1), pp. 55-58 (2000).
4. 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), pp. 305-310 (1999).
5. 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).
6. Salanitro, J.P., Diaz, L.A., Williams, M.P. and isniewski, H.L. "Isolation of a bacterial culture that degrades methyl t-butyl ether", *Appl. Environ. Microbiol.*, **60**, pp. 2593-2596 (1994).
7. 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).
8. 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).
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. 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).
11. 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).
12. Hyman, M.R., Kwon, P., Williamson, K. and O'Reilly K. "Cometabolism of MTBE by alkane-utilizing microorganism".

- In G.B. Wickramanayake and R.E. Hinche (Eds.), *Natural Attenuation: Chlorinated and Recalcitrant Compounds*, pp. 321-326, Battelle Press, Columbus, OH (1998).
13. 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).
  14. 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, Alcohols, and Ethers*, pp. 145-152, Battelle Press, Columbus, OH (2001).
  15. 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, Alcohols, and Ethers*, pp. 161-166, Battelle Press (2001).
  16. 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).
  17. 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).
  18. 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).
  19. Armstrong, A.Q., Hudson, R.E., Hwang, H.M., and Lewis, D.L. "Environmental factors affecting toluene degradation in groundwater at a hazardous waste site", *Environ. Toxicol. Chem.*, **10**, pp. 147-159 (1991).
  20. Deeb, R.A. and Alvarez-Cohen, L. "Temperature effects and substrate interactions dueing the aerobic biotransformation of BTEX mixtures by toluene-enriched consortia and *Rhodococcus rhodochrous*", *Biotech & Bioeng.*, **62**, pp. 526-536 (1999).
  21. 백승식, 장순웅, 이시진 "부탄분해미생물에 의한 가솔린첨가제 MTBE(Methyl tert-Butyl Ether) 분해", *한국지하수환경학회지*, **6**(3), pp. 31-41 (2001).
  22. 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).
  23. 장순웅, "부탄 분해 미생물을 이용한 휘발유 첨가제의 분해 특성", *한국지하수토양환경학회*, **8**(1), pp. 27-34 (2003).