

부탄 이용 미생물에 의한 MTBE(Methyl *tert*-Butyl Ether) 분해 특성

장순용, 백승식, 이시진
경기대학교 토목환경공학부
swchang@kyonggi.ac.kr

요 약 문

In this study, we have examined potential degradation of MTBE (methyl *tert*-butyl ether) by pure culture ENV425 and mixed culture isolated 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 *n*-butane, and the disappearance of TBA after complete degradation of MTBE suggest the further degradation of TBA. Butane and MTBE degradation was completely inhibited by acetylene, which indicated that both substrates were degraded by butane-utilizing bacteria. MTBE was degraded by ENV425 and mixed culture grown *n*-butane, and TBA (*tert*-butyl alcohol) was produced as product of MTBE oxidation. TBA production was accounted 54.7% and 58.6% for MTBE oxidation by ENV425 and mixed culture, respectively. The observed maximal transformation yield (T_y) were 44.7 and 34.0 (nmol MTBE degraded/ μ mol *n*-butane utilized) by ENV425 and mixed culture, respectively.

key word : MTBE, TBA, TBF, Butane, Cometabolism

1. 서론

MTBE는 생물학적으로 내(耐)분해성 물질(Resistant compound)로 분류된다. 이는 MTBE의 구조 속에 포함되어있는 알킬에테르가 화학적으로 안정하기 때문이다. 1979년부터 MTBE는 무연휘발유의 옥탄가 향상제로 사용되었으나, 1990년 휘발유내의 산소의 함량을 중량비로 최소 2.7%로 유지하게 한 미국의 Clean Air Act 수정안에 일산화탄소 오염이 심각한 지역에 대해 휘발유의 완전산화를 보조하는 산소첨가제(Oxygenates)로 사용되기 시작하였다.¹⁾ 우리나라의 경우, 1993년 환경보전법에 의하여 MTBE의 휘발유 배합이 의무화되어 상당량이 휘발유에 첨가되어지고 있다¹⁾. 국내의 지하저장탱크 현황을 살펴볼 때 유류 및 유기물질 지하저장탱크 수는 54,461개소 (1996년 자료)이며 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. 이렇게 오염된 토양이나 지하수 오염제거에 생물학적 복원공법을 적용할 경우, 많은 비용이 절감된다는 것은 널리 알려진 사실이다. 현재 사용되고 있는 물리화학적 MTBE 처리 공정을 생물학적 복원 공법으로 대체할 경우, 미국 캘리포니아 주에서만 30억 달러, 미국 전체에서는 약 400억 달러의 처리비용이 절감될 것으로 예측하고 있다.²⁾ 이상과 같이 경제적인 파급효과가 큰 생물학적 처리를 가능하게 하기 위해서는 MTBE를 효율적으로 분해하는 미생

물의 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 혼합균주 (mixed culture)를 분리하고, 순수 균주인 ENV425 (ATCC 55798)를 Environ, Inc.(U.S.A.)로 부터 기증 받아 본 실험에 이용하였다. ENV425는 propane을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 분리되었으며, 오렌지 colonies로 빨간 형태의 gram-variable, acid-fast, filamentous, rod-shaped을 보여주고, fatty acid 분석으로 *Nocardia*속의 한 종류로 확인되었다³¹.

2.2 MTBE 분해 실험

실험에 사용된 모든 초자류 및 기기는 가능한 고압증기 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. MTBE 분해실험은 120 mL serum bottle에 50 mL BSM media와 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.

2.3 분석방법

MTBE (Methyl *tert*-Butyl ether, C₅H₁₂O), TBF (*tert*-Butyl formate, C₅H₁₀O₂), *n*-butane (C₄H₁₀)의 측정은 microsyringe를 이용하여 bottle의 headspace에서 100 μL를 채취하여 GC에 직접 주입하여 이루어 졌다. GC는 HP-5 칼럼과 FID, 그리고 integrator가 연결된 HP 5890 series II를 사용했다. GC의 운전 조건은 주입부, 검출부의 온도가 각각 200°C, 200°C이며, 오븐은 40°C에서 등온으로 운전하였고, carrier gas는 질소가스를 사용하였다. TBA (*tert*-Butyl alcohol, C₄H₁₀O)의 측정은 용매추출에 의해 위와같은 GC의 조건으로 분석되었다.

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 때, 각각의 균주 성장률을 비교하기 위한 실험을 하였다.

BSM media 50 mL가 채워진 120 mL bottle에 *n*-butane 60 μmol을 주입하고, ENV425와 혼합균주를 각각의 bottle에 동일하게 1.77 mg (건량기준)을 접종시켜 소비된 *n*-butane과 미생물 성장의 관계, 그리고 반응시간에 따른 남아있는 *n*-butane을 관찰하였다.

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. 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)

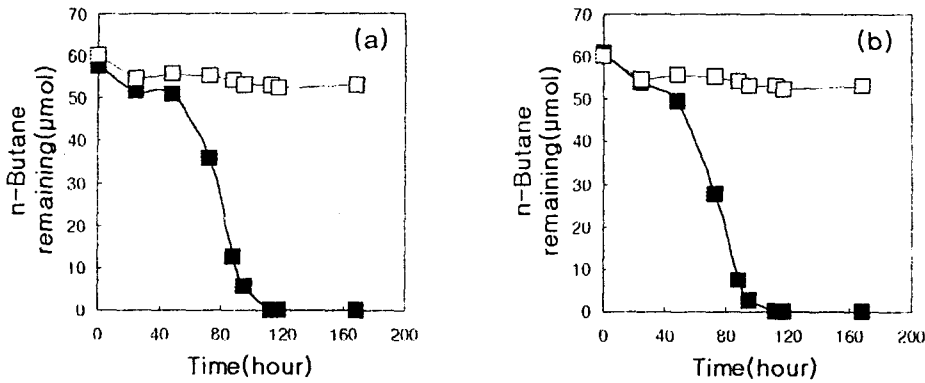


Fig. 1. Degradation of *n*-butane by *n*-butane grown (a) ENV425 (●) and (b) mixed culture (■).

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. 1) 그러나, acetylene (1.0% [vol/vol] : gas phase)이 공급된 경우에는 *n*-butane의 분해 및 미생물 성장이 관찰되지 않았다. 즉, Fig. 1에서의 미생물 성장은 *n*-butane 이용에 의한 것임을 설명해 준다.

3.2 *n*-Butane 소비에 따른 MTBE 분해 특성

n-butane과 MTBE를 혼합하여, ENV425와 혼합균주에 의한 MTBE의 분해특성을 조사하였다.

실험방법에 설명되었듯이 BSM media 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.

접종 후 20 hr에서 *n*-butane의 분해율을 보면 ENV425의 경우 55.8%, 혼합균주의 경우 85.1%로 나타났고, MTBE의 분해율은 ENV425의 경우 71.2%, 혼합균주의 경우 89.8%를 분해시켰다. 40 hr 후에는 ENV425의 경우 MTBE 분해율이 90%로 나타났고, 혼합균주의 경우 거의 완전한 분해가 관찰되었다. 분해된 *n*-butane에 대한 MTBE의 분해량을 나타내는 Transformation yield를 비교해 보면 ENV425의 경우 20[40] hr 일 때 44.7[31.9] (nmol of MTBE degraded/ μmol of *n*-butane consumed), 그리고 혼합균주의 경우 34.0[32.3] (nmol of MTBE degraded/ μmol of *n*-butane consumed)로 나타났다(Table 1).

본 실험의 결과, ENV425 및 혼합균주는 MTBE를 다음과 같은 원인으로 공대사에 의해 분해한다고 결론지을 수 있다. 첫째, MTBE의 분해는 *n*-butane의 소비가 시작됨으로서 분해가 일어났다. 즉, *n*-butane이 성장기질 (growth substrate)로 이용되었을 때 MTBE 분해 활동도가 유지된다. 둘째, MTBE 분해는 *n*-butane의 분해를 저해하고 acetylene에 의해 방해받았다. 즉, 이 결과는 *n*-butane 및 MTBE 분해는 같은 효소 (Enzyme)에 의한 반응이라고 설명할 수 있다. 셋째, MTBE 분해에 따른 분해 생성물인 TBA가 관측되었으며,

TBA 생성량이 MTBE 소모량보다 적은 이유는 한정된 MTBE 공대사에 의한 것과 MTBE가 성장기질로 이용되고 있지 않음을 보여주는 결과이다.

Table 1. Comparison of MTBE and *n*-butane between ENV425 and mixed culture*.

	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

*Values are determined after 20 hr of incubation.

4. 결론

본 연구에서는 유류로 오염된 지역의 토양에서 *n*-butane을 탄소원 및 에너지원으로 이용하여 분리한 혼합균주와 순수균주인 ENV425에 의한 지하수 오염원인 MTBE의 분해 특성을 관찰하였다.

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 분해활동도가 유지되고, 같은 효소가 작용하므로써 MTBE 분해는 공대사에 의한 MTBE 분해를 저해하고, MTBE가 성장기질로 이용되지 않아 한정된 MTBE가 관찰된 것으로 보아 MTBE를 공대사에 의해 분해한다.
4. MTBE 분해시 *n*-butane의 양이 많을 경우, 서로 같은 효소를 사용하는 관계로 경쟁적으로 접근하여 MTBE의 초기 분해가 지연되고 상대적으로 미생물의 활동도가 높아져 효소에 의한 MTBE 후기분해속도는 자연히 빨라지게 된다.

5. 참고문헌

- 1) 배범한, 조중수, "휘발유 첨가제 MTBE에 의한 지하수오염의 문제점과 정화방안", 土木, 46(3), 41~51(1998).
- 2) Anonymous, Current state of MTBE in the United States, Underground Tank Technology Update, Jan., 9~11(1997).
- 3) Steffan, R. J., K. McClay, S. Valnberg, C. W. Condee, and D. Zhang, "Biodegradation of the gasoline oxygenates Methyl *t*-Butyl Ether, Ethyl *t*-Butyl Ether, and *tert*-Amil Methyl Ether by Propane-Oxidizing Bacteria", Appl. Environ. Microbiol, 63(11), 4216~4222(1997).
- 4) Hardison, L. K., S. S. Curry, L. M. Ciuffetti, and M. R. Hyman, "Metabolism of diethyl ether and cometabolism of methyl *t*-butyl ether by a filamentous fungus, a *Graphium* sp", Applied and Environmental Microbiology, 63(8), 3059~3067(1997).
- 5) Garnier, P. M., R. Aurio, C. Augur, and C. Revah, "Cometabolic biodegradation of methyl *t*-butyl ether by *Pseudomonas aeruginosa* grown on pentane", Appl Microbiol Biotechnol, 51, 498~503(1995).