

# 세균에 의한 Triphenylmethane계 색소의 분해에 관한 연구

민상기 · 차인호 · 이주현 · 진성현 · 조경순 · 정구영

미 생 물 과

## 세균에 의한 Triphenylmethane계 색소의 분해에 관한 연구

미 생 물 과

민상기 · 차인호 · 이주현 · 진성현 · 조경순 · 정구영

## Microbial Degradation of Triphenylmethane Dyes

Microbiology Division

S. K. Min, I. H. Cha, J. H. Lee, S. H. Jin,  
K. S. Jo, K. Y. Jung

### Abstract

The optimal condition for degradation of crystal violet and other triphenylmethane dyes by *Citrobacter* sp. SK-3 isolated from the activated sludge of dye manufacturing

factory was investigated. The optimal culture medium for the degradation of tri-phenylmethane dye was composed of minimum inorganic salt medium supplemented with 0.5% galactose, 0.1% beef extract with the initial pH of 8.0 to 9.0 Under this condition, *Citrobacter* sp. SK-3 degraded 200ppm of crystal violet completely within 24hours. *Citrobacter* sp. SK-3 also degraded efficiently malachite green, pararosaniline, brilliant green, methyl violet, basic fuchsin and methyl red. Analysis of the degradation products of crystal violet through thin layer chromatography and high performance liquid chromatography indicated that the methyl groups bound to crystal violet backbone were gradually demethylated to pentamethyl-, tetramethyl- and trimethyl pararosaniline.

Key words : *Citrobacter* sp., biodegradation, crystal violet, pararosaniline, brilliant green

## I. 서 론

자연 생태계의 미생물은 다양한 천연 또는 합성 유기물을 변화, 분해시켜 성장할 수 있는 능력이 있어 자연계 물질의 재순환에 매우 중요한 역할을 담당하고 있다. 따라서 자연과 환경의 보존적인 차원에서 미생물의 이러한 생분해능(biodegradative activity)을 증가시키기 위한 연구가 활발히 진행되고 있다. 특히, 최근 산업화 공업화에 따라 각종 환경 오염물질은 사회 문제화 되고 있으며, 그중에서도 직물 염색공장 및 염료 제조공장에서부터 배출되는 염색폐수는 수계 환경 오염원으로 알려져 있다. 약 10,000여종 이상의 염료와 색소가 연간  $7 \times 10^5$  톤 이상이 전 세계 각지에서 생산되고 있으며,<sup>1,2)</sup> 실제로 염색공정 과정에서 10~15%의 염료가 자연계로 유출되고 있다.<sup>3)</sup> 이러한 색소는 xenobiotic recalcitrant의 범주에 속하여 세척, 빛, 생분해에 매우 안정<sup>4)</sup> 하여 일반적 폐수처리 공정에서는 제거되지 않는다.<sup>5,6)</sup> 색소 폐수의 처리방법으로는 미생물을 이용한 생물학적 처리방법의 일환인 활성오니법과 활성탄, 흡착응집제 또는 오존등을 사용한 물리 화학적 방법이 사용되고 있다.<sup>7-10)</sup> 그러나 염료 폐수는 색소가 가진 세포 독성으로 인하여 활성 오니속의 미생물 성장을 저

해시켜 생물학적 처리에 많은 문제를 야기하고 있다<sup>14,15</sup> 고 알려져 있으며, Brown<sup>16</sup> 은 색소가 생물학적 처리 과정에서 슬러지에 흡착되어 침전물로 수계에 방류되며 그 독성으로 인한 수서생태계의 변화를 지적했다. 물리·화학적 방법도 응집 후의 과도한 슬러지 발생 및 이의 처리, 활성탄의 재생과 비용등의 면에서 단점을 가지고 있다. 오늘날은 이런 단점을 보완하여 물리적, 화학적, 생물학적 처리법을 상호 조합하여 처리효율을 높이려고 하였으나 여전히 색소 폐수는 환경 오염의 골칫거리로 남아 있다. Anliker등<sup>17</sup> 의 독성 정도에 따른 색소의 분류에 의하면 대부분 색소는 무독성으로 알려져 있으나 benzidine dye와 triphenylmethane type 등의 몇몇 색소는 독성으로 알려져 있다.<sup>18</sup> 특히 triphenylmethane 계통의 색소중 crystal violet는 생체시료의 배양제, 항기생충, 항곰팡이, 항세균제로서 이용<sup>17,19</sup> 되며, brilliant green은 수질, 유제품등의 대장균군 검출시 gram(+)균의 억제제로도 첨가되며<sup>19</sup>, malachite green은 양식업에서 fungicide로 사용된다<sup>20</sup>. 이외에도 triphenylmethane계통의 색소는 염색 공업 및 피혁공업에서도 상용되며 수계에 방류되어 수중 및 토양, 하수泥土에 축적되어 수서생태계의 변이원, 발암원(U.S. Environmental Protection Agency Genetox program, 1986), potent clastogen<sup>12,21</sup> 으로 작용하는 화학 물질로 알려져 있다. 색소의 분해에 관한 연구는 식품, 약품중의 식용 착색제의 분해에 관한 연구에서 비롯하여 근년 산업 폐수 중의 색소 제거에 관한 연구가 진행되고 있다.<sup>21,22</sup> 포유동물의 간에서 azo계 색소 분해효소의 존재와 뇨에서의 대사 산물의 존재가 밝혀졌으며, 장내균총에 의해 섭취된 색소의 분해 대사에 관해 연구 보고<sup>23,24</sup> 된 바 있다. 미생물에 의한 색소의 분해는 *Phanerochaete chrysosporium*,<sup>25-27</sup> *Tinctoria* sp.,<sup>28</sup> *Schizophyllum commune*,<sup>29</sup> *Mycelia sterilia*<sup>30</sup> 등의 곰팡이에 대한 연구와 *Rhodococcus*<sup>10</sup>, *Bacillus cereus*<sup>31</sup>, *Aeromonas hydrophilia*<sup>32</sup>, *Pseudomonas*<sup>33</sup> 등 세균, 효모에 대한 연구가 진행되었으며, crystal violet의 생물학적 분해에 관한 연구는 *Pseudomonas* spp.,<sup>34</sup> oxidative red yeast<sup>35</sup>, *Phaenerochaete chrysosporium*<sup>36</sup> 등 세균, 효모, 곰팡이에서 각각 검토된 바 있다.

본 연구에서는 염색공장 폐수처리장의 폭기조로부터 분리한 *Citrobacter* sp. SK-3균주의 생육 특성과 triphenylmethane계의 염기성 염료로 그 사용빈도가 높은 crystal violet(N,N,N',N',N'',N''-hexamethylpararosaniline)을 비롯한 몇가지 triphenylmethane계 색소에 대한 분해능을 검토하였다.

## II. 재료 및 방법

### 1. 사용균주 및 배지

본 실험에 사용한 균주는 염색 공장의 폐수 처리장에서 분리한 *Citrobacter* sp. SK-3균주를 사용하였으며, 균의 생육도 및 색소 분해율의 측정을 위한 최소 배지의 조성은 Table 1과 같다.

Table 1. Composition of basal inorganic salts medium

$K_2HPO_4$	2.1 g	NaCl	0.2 g
$KH_2PO_4$	1.6 g	$CaCl_2 \cdot 2H_2O$	0.1 g
$(KH_2)_2SO_4$	0.5 g	$FeCl_2 \cdot 6H_2O$	0.05 g
KCl	0.2 g	D.W	100ml
$MgSO_4 \cdot 7H_2O$	0.2 g	pH	8.0
Dye	10ppm		

### 2. *Citrobacter* sp. SK-3의 생육도 및 triphenylmethane계 색소의 분해율 측정

분해균의 생육도 측정은 UV-VIS spectrophotometer(Varian Cary 13)를 이용하여 660 nm에서 측정하였으며, 각 색소의 분해율은 일정 시간 간격으로 배양여액을 dichloromethane으로 추출<sup>26)</sup>한 후 각 색소의 최대흡수 파장에서 흡광도의 감소율(%)로서 측정하였다.<sup>27)</sup>

본 실험에 사용된 각 색소는 C.A.S.(Chemical Abstract Service)에 공인된 것으로 편의상 상품명을 사용하였다.

### 3. *Citrobacter* sp. SK-3에 의한 triphenylmethane계 색소의 최적 분해조건 검토

*Citrobacter* sp. SK-3에 의하여 완전 분해되는 triphenylmethane계 색소 중 crystal violet(이하 C.V.로 약함), brilliant green(이하 B.G.로 약함), pararosaniline(이하 P.A.로 약함) 각각을 기질로 하여 그 분해 조건을 검토하였다. 접종 균량은 균을 생리 식염수에 MacFarland 탁도계 0.5 정도로 균질하게 현탁시켜  $6.3 \times 10^8$  CFU/50 $\mu$ l씩을 5ml의 배지에 일정하게 접종하였다.

#### 1) 탄소원의 영향

C.V., B.G., P.A. 각각 10ppm씩 첨가된 분리용 최소 무기염 배지와 각종 탄소원이 0.5% 첨가된 무기염 배지에서 *Citrobacter* sp. SK-3을 접종하여 각 색소가 유일한 탄소원으로서의 이용 가능 여부 및 각종 탄소원이 분해에 미치는 영향을 시간별로 검토하였다.

#### 2) 질소원의 영향

질소원을 제외한 최소 무기염 배지에 C.V., B.G., P.A.을 각각 10ppm씩 첨가한 다음 각종 무기 및 유기 질소원을 0.1%씩 첨가하여 질소원의 종류에 따른 분해율을 시간별로 검토하였다.

#### 3) C.V. 농도의 영향

상기의 결과 최적의 탄소원과 질소원이 첨가된 배지에 C.V., B.G., P.A.의 농도를 10ppm-300ppm으로 조절하여 분해율을 시간별로 검토하였다.

#### 4) 온도의 영향

*Citrobacter* sp. SK-3의 배양 온도에 따른 색소분해능을 검토하기 위하여 20-50

℃까지 배양온도를 달리하여 색소 분해능을 검토하였다.

#### 5) pH의 영향

배지의 최적 pH를 결정하기 위해 배지의 초발 pH를 3.0-10.0까지 조절하여 시간별로 색소 분해능을 검토하였다.

### 4. C.V. 관련 색소에 대한 분해능 조사

*Citrobacter* sp. SK-3이 기질로서 이용가능한 색소의 종류를 알아보기 위하여 최적 배지에 각종 색소를 10ppm씩 첨가한 다음 40℃에서 48시간 배양하여 각 색소의 최대 흡수 파장에서의 흡광도의 감소율(%)로서 분해능을 관찰했다. 본 실험에 앞서 사용된 색소의 pH, Eh, 자연광에서의 안정성을 조사하였다.

pH의 조절은 HCl, NaOH로, 산화제로서는 30% hydrogen peroxide를, 환원제로서는 10% ascorbic acid를 균을 접종치 않은 배지에 넣어 며칠간 태양광선하에 두었다가 각 색소의 최대 흡수 파장에서 흡광도의 변화를 관찰했다. 사용된 색소는 triphenylmethane계로서는 crystal violet, basic fuchsin, pararosaniline, malachite green, brilliant green, ethyl violet, methyl violet, bromphenol blue, fast green FCF, bromthymol blue, erythrosine 등이었으며, Azo계 색소로서는 methyl red 등이었다. 각 색소의 최대 흡수 파장치는 색소 미첨가 최적배지를 blank로 하여 구하였다.

### 5. 분해 산물의 검정

#### 1) Thin Layer Chromatography(T.L.C.)에 의한 분해 산물의 검정

균체를 제거한 배양액 10ml를 동량의 dichloromethane으로 추출한 다음 약 0.5 ml정도로 감압 농축하여 Merck's GF 254 aluminium sheet에 10µl 점적하였다. 전개 용매는 dichloromethane : methanol(97 : 3, v/v)을 사용하였으며 약 3시간 정도 전

개시켰다.

2) High performance liquid chromatography(H.P.L.C)에 의한 분해산물의 검정

배양시간별로 10ml의 배양액을 취하여 균체를 제거한 다음 배양여액 10ml을 동량의 dichloromethane으로 추출하여 0.5ml정도로 감압농축하여 검액으로 사용하였다. C. V는 이온성 물질이므로 단순한 역상 HPLC에서는 컬럼에 머무르지 않고 바로 빠져므로 유기전해질을 첨가하여 이온 성분을 억제하여야 한다고 밝혀져 있다<sup>30)</sup>. 본 실험에서는 PIC-A reagent(pH 7.5, 0.005M tetrabutylammoniumphosphate)와 PIC-B<sub>5</sub> reagent(pH 3.5, 0.05M hexasulfonic acid)를 같이 사용하여 그 분리상을 비교하였다. HPLC의 분석 조건은 Table 2와 같다.

Table 2. Conditions of H.P.L.C. for degraded products

Pump	Waters 510(isocratic)
Detector	Waters 484(UV 254nm)
Integrator	Waters 746 data module
Mobile phase	(A) AcN/H <sub>2</sub> O(80/20)with PIC A reagent (B) AcN/H <sub>2</sub> O(80/20)with PIC B <sub>5</sub> reagent
Column	$\mu$ -Bondapak C <sub>18</sub>
Column temperature	room temperature
Injecton volume	10 $\mu$ l
Flow rate	1.5ml/min
Attenuation	128
Chart speed	0.5
Aufs	0.1



### III. 결과 및 고찰

#### 1. *Citrobacter* sp. SK-3의 생육도 및 분해율 측정

*Citrobacter* sp. SK-3를 10ppm의 C.V., B.G., P.A.를 각각 첨가한 최소 배지(pH 8.0)에 접종한 후 40℃에서 배양하여 일정 시간 간격으로 균의 생육도 및 분해율의 변화를 측정한 결과는 Fig. 1에서와 같이 대수증식기 말기인 배양 16시간 만에 C.V., B.G.는 완전 분해되었고 P.A.는 균체의 소멸기에서도 분해가 계속되어 32시간째 85%의 분해율을 나타내었다.

#### 2. *Citrobacter* sp. SK-3에 의한 C.V., B.G., P.A.의 최적 분해 조건 검토

##### 1) 탄소원의 영향

C.V. 10ppm, B.G. 10ppm, P.A. 10ppm의 각각 첨가된 최소 무기염 배지에 탄소원으로 maltose, galactose, saccharose, salicin, glucose, lactose, manitol, xylose를 각각 0.5% 첨가하여 배양시간에 따른 분해율을 조사하였다. C.V.의 경우 Fig. 2에서와 같이 배양 16시간 이후에 salicine을 제외한 대부분의 탄소원을 잘 이용하였으며, 달리 탄소원을 첨가하지 않은 경우에도 C.V. 자체를 탄소원으로 이용할 수 있었다. B.G.의 경우 Fig. 3에서와 같이 탄소원으로 galactose를 첨가했을 때 가장 잘 분해하였으며, B.G.를 유일한 탄소원으로 했을 경우에도 24시간 이후에는 B.G.를 완전히 분해하였다. P.A.의 경우 Fig. 4에서와 같이 전반적으로 분해율이 저조하였으며 galactose를 탄소원으로 한 경우가 P.A.를 가장 잘 분해하였다.

C.V., B.G., P.A. 모두 달리 탄소원을 첨가하지 않아도 *Citrobacter* sp. SK-3균주에 의해 그 자체를 탄소원으로 이용할 수 있는 것으로 나타났다. 최적 탄소원으로 밝혀진 galactose의 농도별 분해율을 조사해 본 결과 Table 3에서와 같이 galactose의 농도비는 분해에 별 영향을 미치지 못하였다.

## 2) 질소원의 영향

C.V., B.G., P.A.가 각각 10ppm 첨가된 최소 무기염 배지에 질소원으로 yeast extract, bacto peptone, beef extract,  $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ,  $(\text{NH}_4)_2\text{HPO}_4$ ,  $\text{NH}_4\text{Cl}$ ,  $\text{KNO}_3$ 를 각각 0.1% 첨가하여 배양시간에 따른 분해율을 조사하였다. C.V.의 경우 Fig. 5에서와 같이 *Citrobacter* sp. SK-3 균주는 beef extract, yeast extract, peptone등의 유기질소원을 첨가했을때 배양 16시간만에 C.V.를 완전히 분해하였다.

B.G.의 경우 Fig. 6에서와 같이 C.V.와 마찬가지로 유기질소원을 첨가한 경우에 B.G.를 더 잘 분해하였으며 beef extract를 첨가했을때 배양 12시간 정도에 B.G.를 완전히 분해하였다. 무기질소원의 경우  $\text{KNO}_3$ 를 첨가했을때 B.G.를 가장 잘 분해하였다. P.A.의 경우도 역시 무기질소원보다 유기질소원을 첨가한 경우에 P.A.를 더 잘 분해하였으나 질소원을 첨가하지 않은 경우 분해가 거의 되지 않았다.(Fig. 7). Table 4는 최적의 질소원으로 밝혀진 beef extract의 농도별 분해율을 조사한 것으로 0.1-0.5%에서 가장 우수하였다.

Table 3. Effect of various concentration of galactose on the degradation of triphenylmethane dyes by *Citrobacter* sp. SK-3

galactose conc. (%)	degradation (%)					
	16 hour			24 hour		
	C.V.	B.G.	P.A.	C.V.	B.G.	P.A.
0	43.2	88.2	5.1	98.8	100	15.3
0.1	98.5	94.2	38.1	100	100	73.3
0.5	98.4	98.1	46.1	100	100	75.1
1	97.4	98.3	12.6	100	100	51.2
3	97.3	96.2	10.2	100	100	32.3
5	96.3	95.8	10.5	100	100	23.5

Table 4. Effect of various concentration of Beef extract on the degradation of triphenylmethane dyes by *Citrobacter* sp. SK-3

beef ext.conc. (%)	degradation (%)					
	16 hour			24 hour		
	C.V.	B.G.	P.A.	C.V	B.G.	P.A.
0	67.5	32.1	3.1	80.4	53.1	6.2
0.1	100	100	76.2	100	100	89.3
0.5	100	100	72.3	100	100	88.3
1	75.3	68.4	48.9	98.4	95.3	78.6
3	73.6	70.1	38.6	98.7	81.8	69.7
5	72.6	55.9	30.1	90.2	72.8	62.6

### 3) C.V., B.G., P.A.의 농도에 따른 분해능 검토

C.V., B.G., P.A.의 농도를 각각 20ppm에서 30ppm으로 조절하여 48시간 배양한 결과 Fig. 8에서와 같이 *Citrobacter* sp. SK-3균주는 C.V.농도 40ppm까지는 배양 24시간 이내에 완전히 분해하였으며 점차 농도를 높여감에 따라 균의 생육 뿐만 아니라 분해율도 감소하였다. 이는 C.V.농도가 증가함에 따라 세포독성을 야기하여 생육을 저해한 것으로 사료되었다. B.G.는 C.V.와 마찬가지로 B.G.농도 40ppm까지는 배양 24시간 이내에 완전히 분해하였으며 점차 농도를 높여감에 따라 균의 생육뿐만 아니라 분해율도 감소하였다. 그러나 전반적으로 B.G.가 고농도인 경우에도 C.V.보다 더 잘 분해하는 것으로 나타났다(Fig. 9). P.A.의 경우 Fig. 10에서와 같이 20ppm의 P.A.를 완전히 분해하는데 36시간이나 걸렸으며 100ppm까지는 어느 정도 분해하였으나 그 이상의 농도에서는 C.V.에서와 마찬가지로 거의 분해가 일어나지 않았다.

#### 4) 배양온도의 영향

배양온도가 C.V., B.G., P.A.의 분해에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 각각의 색소를 10ppm씩 첨가한 후 배양 온도를 20℃~50℃까지 단계별로 조절하여 18시간 배양한 결과 Fig. 11에서와 같이 C.V., B.G., P.A. 모두 분해 최적 온도는 40℃ 부근으로 C.V., B.G.의 경우 95% 이상의 분해율을 나타내었으며 45℃ 이상에서는 분해율이 급격히 감소하였다.

#### 5) pH의 영향

pH를 3.0-10.0으로 단계별로 조절하여 C.V., B.G., P.A.의 분해에 미치는 영향을 검토한 결과 Fig. 12에서와 같이 pH 8.0-9.0부근에서 최고의 분해율을 나타내었으며 pH 4 이하에서는 C.V., B.G., P.A.를 거의 분해하지 못하였다. 이는 본 균주의 생육 최적 pH가 8.0인 점을 고려해 볼때 생육저해로 인한 결과로 사료되었다.

### 3. C.V. 관련색소에 대한 분해능 조사

*Citrobacter* sp. SK-3균주에 의한 C.V. 관련색소의 분해능을 검토하기 전에 본 실험에 사용된 색소의 pH 변화, Eh변화, 자연광에 따른 흡광도의 변화를 조사해 본 결과, 자연분해율은 5%이하로 큰 변화는 없었다. 최적배지 조건에서 공시균에 의한 분해율은 Table 5와 같았다. 공시균은 p-aminotriphenylmethane계 색소에는 강한 분해 활성을 보이나 benzene환에 amino radical(-NH<sub>2</sub>) 대신 Br, I 와 같은 halogen원소가 결합한 bromthymol blue, bromphenol blue, erythrosine과 sulfon radical(-SO<sub>2</sub>)이 치환된 fast blue FCF는 분해하지 못하였다. 특이하게 Azo계 색소인 methyl red에 높은 분해활성을 나타내었다.

Table 5. Decolorization of various dyes by *Citrobacter* sp. SK-3

Dye	Absorption max (nm)	Decolorization (%) after	
		24h	48h
Basic fuchin	548	98.0	100
Brilliant green	620	97.7	100
Malachite green	614	94.7	100
Pararosaniline	541	98.0	100
Methyl violet	583	95.5	100
Ethyl violet	577	97.0	100
Bromphenol blue	590	2.0	3.0
Bromthymol blue	616	2.0	3.2
Fast blue FCF	628	1.5	2.7
Erythrosine	526	3.0	4.0
Methyl red	514	9.4	100

#### 4. Crystal violet 분해 효소의 성질 검토

C.V.가 첨가된 완전배지에서 배양하여 균체를 제거한 여액과 균체를 파쇄하고 난 뒤 원심분리하여 얻은 상등액을 C.V.과 반응시킨 결과 배양여액의 경우 C.V.의 분해가 전혀 일어나지 않았으나, 균체파쇄 여액에서 24시간 후 100%의 분해활성을 나타내었다. 이로서 C.V.의 분해에 관여하는 효소는 세포내에 존재함을 알 수 있었다. 또한 C.V.를 첨가하여 배양한 균체의 파쇄 여액과 C.V.를 첨가하지 않고 완전배지에서 배양한 균체의 파쇄여액으로 C.V.의 분해활성을 검토한 결과, C.V.를 첨가하여 배양한 균체의 파쇄 여액에서만 분해활성을 나타내어 관여 효소군은 C.V.첨가에 의해 유도됨을 알 수 있었다.

## 5. C.V. 분해 대사산물의 검정

C.V.를 50ppm 첨가한 최소 무기염 배지에서 배양 전기간 동안 일정 간격으로 흡광도를 측정하여 본 결과, C.V.는 591nm에서 최대 흡광도를 보이나, 254nm, 331nm에서도 고유의 약한 peak를 보였다. 배양 12hr이후 부터 591nm에서의 급격한 흡광도 감소와 더불어 254nm, 331nm의 peak도 소실되어졌다. 반면 250nm이하의 파장에서는 O.D.의 증가를 관찰할 수 있었다. 배양 시간별 UV-VIS overlay scanning spectrum은 Fig. 13과 같다. C.V.의 소실과 대사산물의 생성은 TLC와 HPLC방법으로 확인이 가능하였다.

### 1) TLC에 의한 분해 산물의 확인

상기 실험 방법에 의거 배양 시간별로 spotting한 결과(Fig. 14) 배양 3시간 이후부터 C.V.고유의 band 양상과 다른 TLC profile을 나타내었다. Bumpus 등<sup>34)</sup>에 의하면 methylviolet를 같은 조건에서 TLC 전개하여 생성하는 band I (blue ; Rf=0.26), band II (bluish purple ; Rf=0.35), band III (purple ; Rf=0.43), band IV (pink ; Rf=0.61)의 각각 band를 N,N,N',N',N"-hexamethylpararosanilin, N,N,N',N',N"-pentamethylpararosanilin, N,N,N',N'-tetramethylpararosanilin, N,N,N'-trimethylpararosanilin이라 보고하였다. 본 실험에서도 methyl violet를 standard 물질로서 TLC분획하여 각각의 band를 dichloromethane으로 추출하여 사용하였다. 분해균은 C.V.의 amino기에 N-demethylation을 차례로 일으켜 배양 18시간 안에 hexamethylpararosaniline은 점차적으로 소멸되는 반면, penta-, tetra-, trimethylpararosanilin이 순서대로 많이 생성되다가 완전 소멸함을 확인할 수 있었다.

### 2) HPLC에 의한 분해 산물의 검정

앞의 실험 방법에 의거하여 배양 시간별로 여액을 이동상의 유기 전해질을 달리하여 HPLC로 분석한 결과, PIC-A reagent의 경우(Fig. 15) crystal violet는 RT 5.20분(hexamethylpararosanilin), RT 4.95분(pentamethyl-), RT 4.53분(tetramethyl-),

RT 3.39분(trimethyl-)로 분리되었고 PIC-B<sub>0</sub>의 경우(Fig. 16) 각 화합물이 4.82분, 4.22분, 3.71분, 3.10분, 2.34분대로 각각 분리되었다. 각 peak는 TLC의 각 band에서 얻어진 추출물로 확인한 결과 동일한 물질로 확인되었다.

#### IV. 결 론

염색공장 폐수처리장의 폭기조로부터 분리한 *Citrobacter* sp. SK-3균주의 생육 특성을 검토하고, triphenylmethane계 색소중 염기성 염료로 사용빈도가 높은 crystal violet를 비롯한 pararosaniline, brilliant green 등에 대한 분해능을 조사하였으며 crystal violet의 분해산물을 HPLC로 추정하였다. *Citrobacter* sp. SK-3균주의 triphenylmethane계 색소를 분해하기 위한 최적 배지 조성은 최소 무기염배지에 탄소원으로서는 galactose 0.5%, 질소원으로서는 beef extract 0.1%, 초발 pH는 8.0-9.0였으며, 이 배지 조성에서 crystal violet 200ppm을 첨가하여 40℃ 부근에서 배양하였을 때 24시간 이내에 100%의 분해율을 나타내었다.

*Citrobacter* sp. SK-3균주는 triphenylmethane계 색소중 crystal violet 뿐만 아니라 malachite green, pararosaniline, brilliant green, methyl violet, basic fuchsin 등과, azo계 색소인 methyl red를 분해하였다. *Citrobacter* sp. SK-3균주가 생산하는 색소 분해 효소군은 세포내에 존재하였으며, 색소 첨가에 의해 유도되어졌고 또한 본 균주는 무기염 배지상에서 crystal violet, brilliant green을 유일한 탄소원, 질소원으로 이용하여 생육 가능하였다. *Citrobacter* sp. SK-3균주에 의한 crystal violet 분해 산물을 TLC 및 HPLC로서 분석한 결과, crystal violet의 기본골격에 결합된 methyl기가 점차 demethylation되어 pentamethyl-, tetramethyl-, trimethylpararosaniline등의 물질들로 분해되어짐을 확인할 수 있었다.

## 참고문헌

1. Zollinger, H., 1987, Color chemistry-syntheses, properties and applications of organic dyes and pigments. p. 92-102. VCH Publishers, New York.
2. 김공주, 이종문, 조순채, 1990, 염료 화학, 대광서림.
3. Vaidya, A. A., and K. V. Datye. 1982, Environmental pollution during chemical processing of synthetic fibers. *Colouage*, 14 : 3-10.
4. Bangert, R., W. Aichele, E. Schollmeyer, B. Weimann, and H. Herlinger. 1977, Photooxidation von malachitgrun und kristalviolett. *Melliand Textilber*. 5, : 399-404.
5. Shelley, M. L., C. W. Randall, and P. H. King. 1976, Evaluation of chemical-biological and chemical-physical treatment for textile dyeing and finishing waste. *J. Wat. Poll. Control Fed.* 48(4) : 753-761.
6. Meyer, U. 1981, Biodegradation of synthetic organic colorants. *FEMS/Symp.* 1 2 : 371-385.
7. Kurane, R., and Suzuki, T. 1988, Biological decolorization of industrial wastewater containing soluble dyes. Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63/12 6596 A2
8. Pagga, U., and D. Brown. 1986, The degradation of dyestuffs. Part II. Behavior of dyestuffs in aerobic biodegradation tests. *Chemosphere*. 15 : 479-491.
9. Ogawa, T., E. Idaka, Y. Yatome. 1981, Acclimation of activated sludge to dye. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 26 : 31-37.
10. Groff, K. A., and B. R. Kim. 1989, Textile wastes. *J. Water Pollut. Control Fed.* 61(6) : 872-876.
11. Idaka, E., t. Ogawa, C. Yatome, and H. Horitsu. 1985, Behavior of Activated Sludge



- with Dyes. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 35 : 729—734.
12. Au, W., S. Pathak, C. J. Collie, and T.C. Hsu. 1978, Cytogenic toxicity of gentian violet and crystal violet on mammalian cells *in vitro*. *Mutation Res.* 58 : 269—276.
  13. Brown, D. 1988, Effects of Colorants in the Aquatic Environment. *Ecotoxicol. Environ. Safety.* 13 : 139.
  14. Zhang, X. R. You, Z. Li, and W. He. 1990, A new decolorizing flocculant for dyeing wastewater. *Chin. J. Environ. Sci(Beijing)*. 11(5) : 25—29.
  15. Anliker, R. 1988, List of Colorants to be Classified as Toxic. *J. Soc. Dyers and Colourists.* 1204 : 223.
  16. Lin, G. H. Y., and D. J. Brusick. 1992, Mutagenicity studies on two triphenylmethane dyes, bromphenol blue and tetramethane dyes. *J. Appl. Toxicol.* 12(4) : 267—274.
  17. Kingsland, G. V., and J. Anderson. 1976, A study of the feasibility of the use of gentian violet as a fungistat for poultry feed. *Poultry Sci.* 55 : 852—857.
  18. Kean, B. H., and D. W. Haskins. 1978, Drugs for intestinal parasitism, p. 371—381. In W. Modell(ed.), *Drugs of choice*. C. V. Mosby Co., St. Louis.
  19. Au, W., M. A. Butler, S. E. Bloom and T. S. Matney. 1979, Further Study of The Genetic Toxicity of Gentian Violet. *Mutation Res.* 66 : 103—112.
  20. Abidi, S. L. 1983, High Performance Liquid Chromatography of Quinodial Iminium Compounds Derived from Triphenylmethanes. *J. Chromatography.* 255 : 101—114.
  21. 吉田高年, 太田洋. 1989, 染色廢水處理. 水處理技術. 30(10) : 575.
  22. 山中信行. 染料工業廢水における脱色技術の現況. 公害の對策 27(8) : 741—745.
  23. Fouts, J. R., J. J. Kamm, and B. B. Brodie. 1957, *J. Pharmac. Exp. Ther.* 120 :

291-300.

24. Childs, J. J., C. Nakajima, and D. B. Clason. 1967, *Biochem. Pharmac.* 16 : 1555-1561.
25. Spadaro, J. T., M. H. Gold, and V. Renganathan. 1992, Degradation of Azo Dyes by the Lignin-Degrading Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 58(8) : 2397-2401.
26. Fernando, T., J. A. Bumpus, and S. D. Aust. 1990, Biodegradation of TNT(2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1666-1671.
27. Cripps, C., J. A. Bumpus, and S. D. Aust. 1990, Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 56 : 1114-1118.
28. Fukuzumi, T. 1980, Microbial decolorization and defoaming of pulping waste liquors. In : Kirk, T. K., T. Higuchi, and H. M. Chang(eds) Lignin biodegradation : microbiology, chemistry and potential applications vol. 1, RC Press, Boca Raton, Fla, pp 215-230.
29. Belsare, D. K., and D. Y. Prasad. 1988, Decolorization of effluent from the bagasse-based pulp mills by white-rot fungus, *Schizophyllum commune*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 28 : 301-304.
30. Suntud, S., S. Praphaisri, and S. Prakitsin. 1988, Microbial decolorization of molasses waste water by *Mycelia sterilia* D90. *Agric. Biol. Chem.* 52(2) : 393-398.
31. Han, S., and H. Yang. 1988, Decolorization of acid red B by immobilized cells of *Bacillus cereus* No. 45. *Huanjing Kexue Xuebao.* 8 : 93.
32. Idaka, E., and T. Ogawa. 1978, Degradation of azo compounds by *Aeromonas hydrophila* var. 24B. *JSDC.* 91-94.

33. Zimmermann, T., H. G. Kulla, and T. Leisinger. 1982, Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiation azo dye degradation by *Pseudomonas* KF46. *Eur. J. Biochem.* 129 : 197–203.
34. Yatome, C., T. Ogawa, D. Koga, and E. Idaka. 1981, Biodegradability of Azo and Triphenylmethane Dyes by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. *JSDC.* 97 : 166–169.
35. Kwasniewska, K. 1985, Biodegradation of Crystal Violet by Oxidative Red Yeasts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.* 34 : 323–330.
36. Bumpus, J. A., and B. J. Brock. 1988, Biodegradation of Crystal Violet by the White Rot Fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.* 54(5) : 1143–1150.

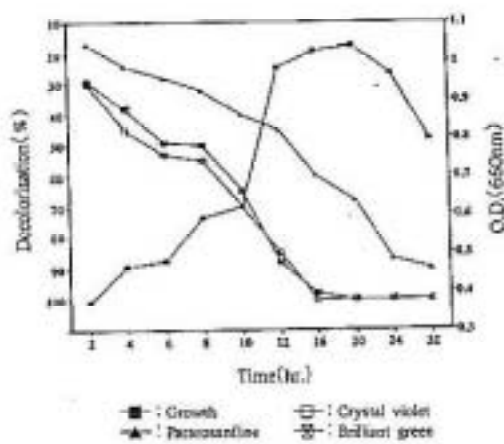


Fig. 1 Effect of incubation time on the degradation of triphenylmethane dyes and the growth of *Citrobacter* sp. SK-3.

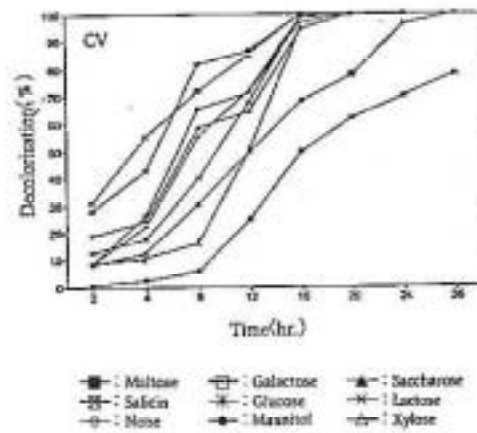


Fig. 2 Effect of carbohydrates on the degradation of crystal violet.

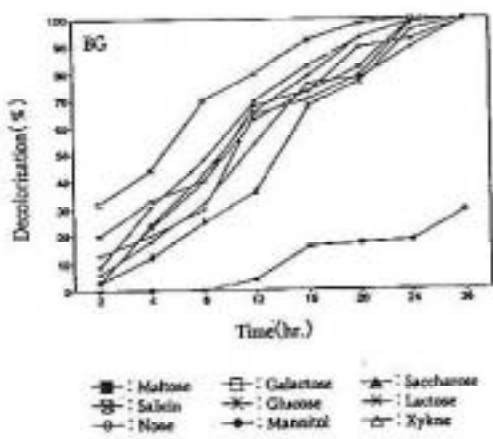


Fig. 3 Effect of carbohydrates on the degradation of brilliant green.

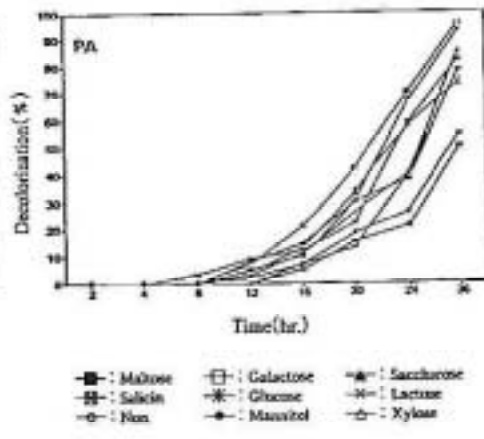


Fig. 4 Effect of carbohydrates on the degradation of pararosaniline.

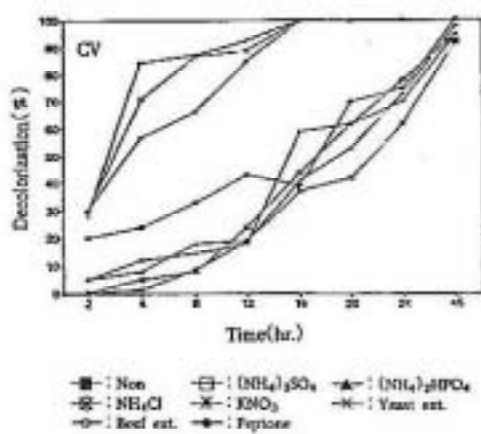


Fig. 5 Effect of nitrogen sources on the degradation of crystal violet.

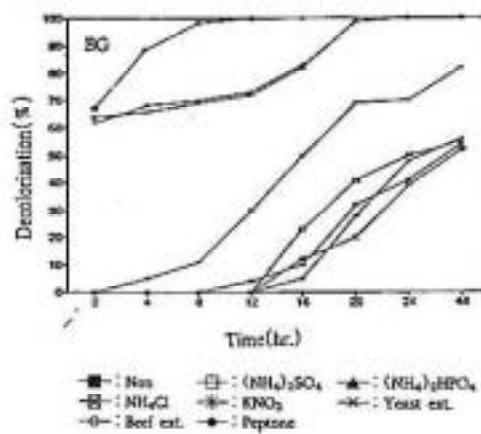


Fig. 6 Effect of nitrogen sources on the degradation of brilliant green.

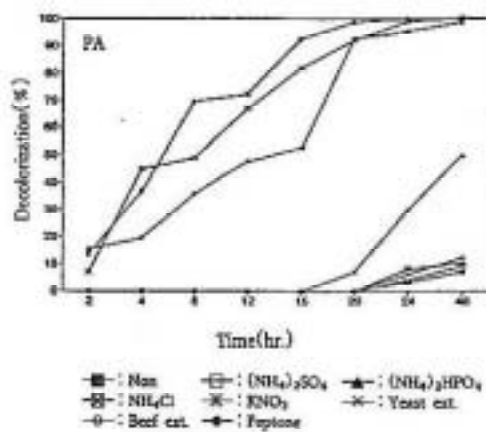


Fig. 7 Effect of nitrogen sources on the degradation of pararosaniline.

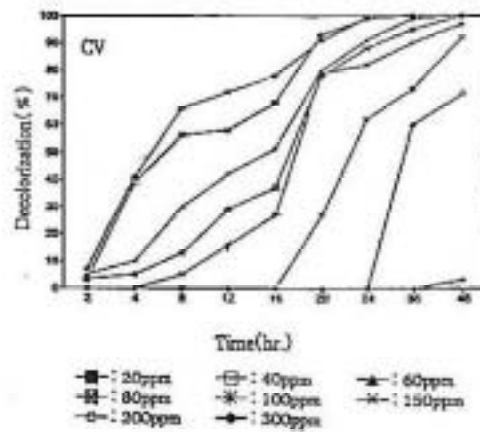


Fig. 8 Effect of concentrations of crystal violet on the degradation of crystal violet.

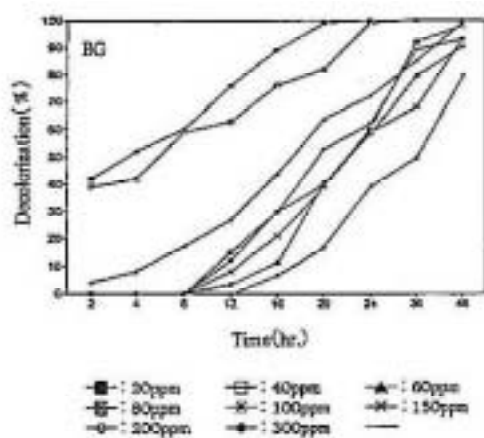


Fig. 9 Effect of concentrations of brilliant green on the degradation of brilliant green.

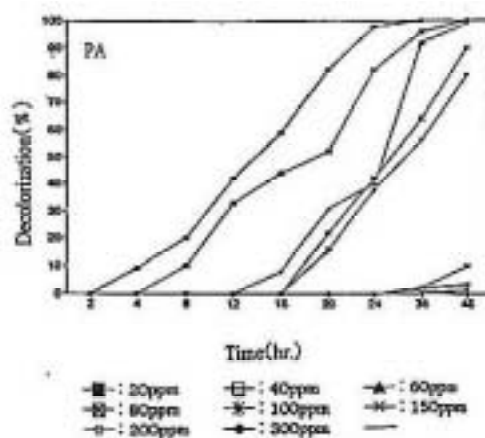


Fig. 10 Effect of concentrations of pararosaniline on the degradation of pararosaniline.

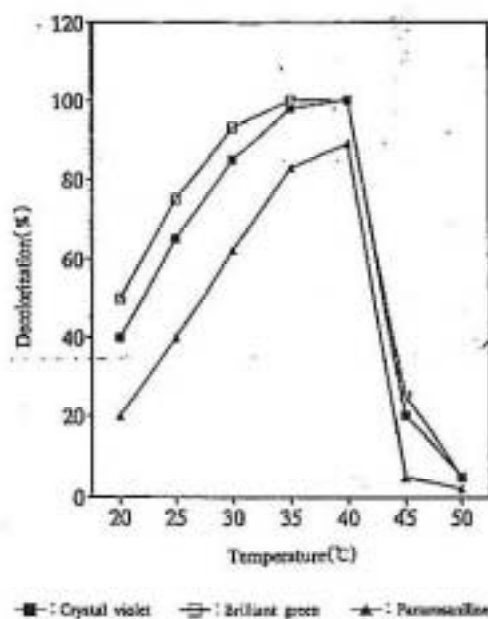


Fig. 11 Effect of temperature on the degradation of triphenylmethane dyes.

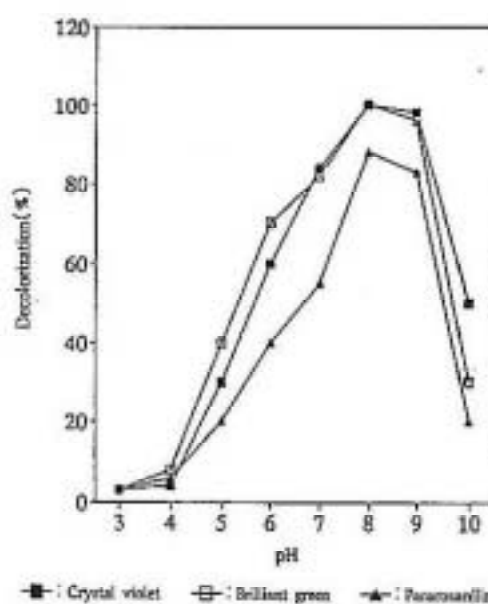


Fig. 12 Effect of pH on the degradation of triphenylmethane dyes.

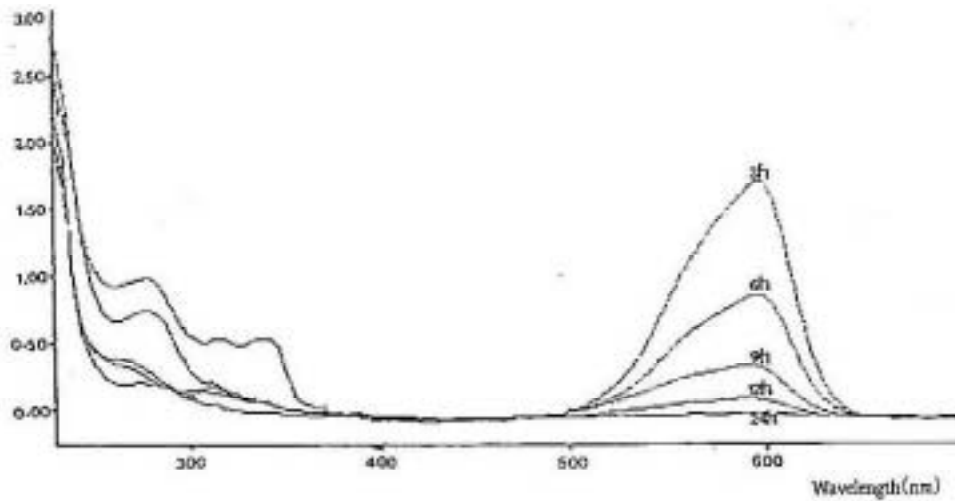


Fig. 13 UV-VIS scanning spectra of the culture filtrates of minimum basal salts containing crystal violet.

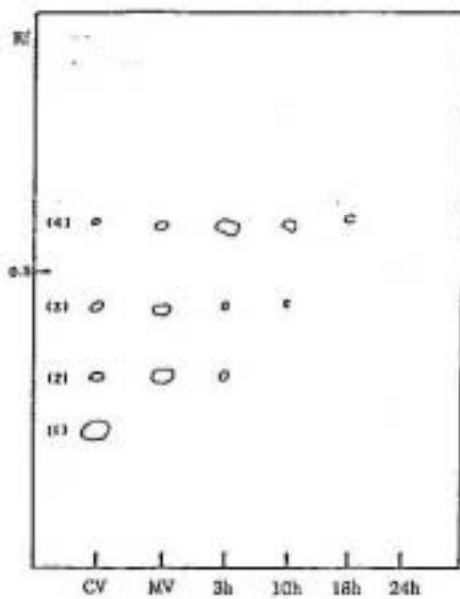


Fig. 14 TLC profile of the metabolites formed upon incubation of crystal violet with minimum basal salts medium.  
 (1) hexamethylpararosaniline  
 (2) pentamethylpararosaniline  
 (3) tetramethylpararosaniline  
 (4) trimethylpararosaniline

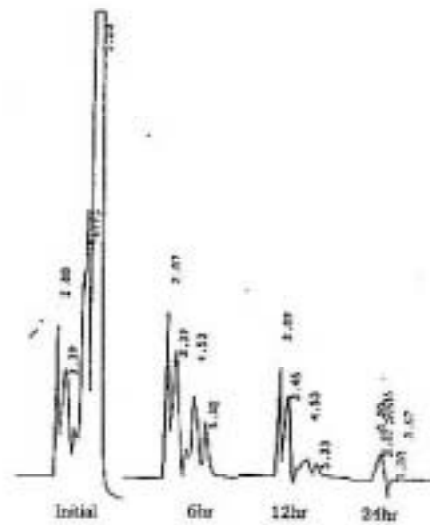


Fig. 15 HPLC chromatogram of the culture filtrates of minimum basal salts medium containing crystal violet  
 Mobile phase was AcN/H<sub>2</sub>O (80/20, v/v) with PIC A reagent.

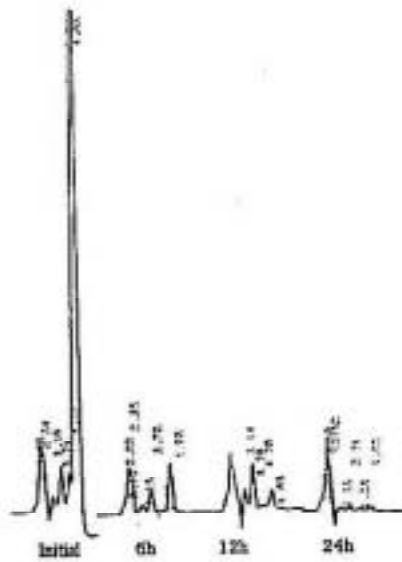


Fig. 16 HPLC chromatogram of the culture filtrates of minimum basal salts medium containing crystal violet. Mobile phase was AcN/H<sub>2</sub>O(80/20, v/v) with PIC B<sub>9</sub> reagent.