

Citrobacter sp.에 의한 Triphenylmethane계 색소의 분해

민상기* · 조영배 · 전홍기†

*부산보건환경연구원, 부산대학교 미생물학과

Degradation of Triphenylmethane Dyes by *Citrobacter* sp.

Sang-Kee Min*, Young-Bae Jo and Hong-Ki Jun†

*Dept. of Microbiology, Pusan Institute of Health and Environment,
Pusan 608-104, Korea

Dept. of Microbiology, College of Natural Sciences, Pusan National University,
Pusan 609-735, Korea

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 triphenylmethane 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 200 ppm of crystal violet completely within 24 hours. *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 backborn were gradually demethylated to pentamethyl-, tetramethyl- and trimethylpararosaniline.

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

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 환경오염은 사회 문제화 되고 있으며, 그중에서도 직물 염색

공장 및 염료 제조공장에서부터 배출되는 염색폐수는 수계 환경 오염원으로 알려져 있다. 약 10,000여종 이상의 염료와 색소가 연간 7×10^5 톤 이상이 전 세계각지에서 생산되고 있으며^{1,2)}, 실제로 염색공정 과정에서 10~15%의 염료가 자연계로 유출되고 있다³⁾. 이러한 색소는 xenobiotic recalcitrant의 범주에 속하여 세척, 빛, 생분해에 매우 안정⁴⁾하여 일반적 폐수처리 공정에서는 제거되지 않는다^{5,6)}. 색소 폐수의 처리방법으로는 미생물을 이용한 생물학적 처리방법의 일환인 활성오니법과 활성탄, 흡착 응집제 또는

† Corresponding author

오존등을 사용한 물리 화학적 방법이 사용되고 있다⁷⁻¹⁰⁾. 그러나 염료 폐수는 색소가 가진 세포 독성으로 인하여 활성 오니속의 미생물의 성장을 저해시켜 생물학적 처리에 많은 문제를 야기하고 있다^{11, 12)} 고 알려져 있으며, Brown¹³⁾은 색소가 생물학적 처리 과정에서 슬러지에 흡착되어 침전물로 수계에 방류되며 그 독성으로 인한 수생태계의 변화를 지적했다. 물리 화학적 방법도 응집후의 과도한 슬러지 발생 및 이의 처리, 활성탄의 재생과 비용등의 면에서 단점을 가지고 있다. 오늘날은 이런 단점을 보완하여 물리적, 화학적, 생물학적 처리법¹⁴⁾을 상호 조합하여 처리효율을 높이고자 하였으나 여전히 색소 폐수는 환경 오염의 골칫거리로 남아 있다. Anliker등¹⁵⁾의 독성 정도에 따른 색소의 분류에 의하면 대부분 색소는 무독성으로 알려져 있으나 benzidine dye와 triphenylmethane type 등의 몇몇 색소는 독성으로 알려져 있다¹⁶⁾. 특히 triphenylmethane 계통의 색소중 crystal violet는 생체시료의 매염제, 향기생충, 향곰팡이, 항세균제로서 이용^{17, 18)}되며, brilliant green은 수질, 유제품등의 대장균군 검출시 gram(+)균의 억제제로도 첨가되며¹⁹⁾, malachite green은 양식업에서 fungicide로 사용된다²⁰⁾. 이외에도 triphenylmethane계통의 색소는 염색 공업 및 피혁공업에서도 상용되며 수계에 방류되어 수중 및 토양, 하수니토에 축적되어 수생태계의 변이원, 발암원(U. S. Environmental Protection Agency Genetox program. 1986), potent clastogen^{12, 19)}으로 작용하는 화학 물질로 알려져 있다. 색소의 분해에 관한 연구는 식품, 약품중의 식용 착색제의 분해에 관한 연구에서 비롯하여 근년산업 폐수 중의 색소 제거에 관한 연구가 진행되고 있다^{21, 22)}. 포유 동물의 간에서 azo계 색소 분해효소의 존재와 뇨에서의 대사 산물의 존재가 밝혀졌으며, 장내균총에의해 섭취된 색소의 분해 대사에 관해 연구보고^{23, 24)}

된 바 있다.

미생물에 의한 색소의 분해는 *Phanerochaete chrysosporium*²⁵⁻²⁷⁾, *Tinctporia* sp.²⁸⁾, *Schizophyllum commune*²⁹⁾, *Mycelia sterilia*³⁰⁾등의 곰팡이에 대한 연구와 *Rhodococcus*¹⁰⁾, *Bacillus cereus*³¹⁾, *Aeromonas hydrophilia*³²⁾, *Pseudomonas*³³⁾등 세균, 효모에 대한 연구가 진행되었으며, crystal violet의 생물학적 분해에 관한 연구는 *Pseudomonas* spp.³⁴⁾, oxidative red yeast³⁵⁾, *Phanerochaete chrysosporium*³⁶⁾등 세균, 효모, 곰팡이에서 각각 검토된 바 있다.

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

재료 및 방법

사용균주 및 배지

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

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

분해균의 생육도 측정은 UV-VIS Spectrophotometer (Varian Cary 13)를 이용하여 660nm에서 측정하였으며, 각 색소의 분해율은 일정 시간 간격으로 배양여액을

Table 1. Composition of basal inorganic salts medium

| | | | |
|---|-------|---------------------------------------|--------|
| K ₂ HPO ₄ | 2.1g | NaCl | 0.2g |
| KH ₂ PO ₄ | 1.6g | CaCl ₂ · 2H ₂ O | 0.1g |
| (NH ₄) ₂ SO ₄ | 0.5g | FeCl ₃ · 6H ₂ O | 0.05g |
| KCl | 0.2g | Distilled water | 1000ml |
| MgSO ₄ · 7H ₂ O | 0.2g | pH | 8.0 |
| Dye | 10ppm | | |

dichloromethane으로 추출³⁶⁾한 후 각 색소의 최대흡수 파장에서 흡광도의 감소율(%)로서 측정하였다²⁷⁾.

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

Citrobacter sp. SK-3에 의한 triphenylmethane계 색소의 최적 분해 조건 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 6.3×10^9 CFU/50 씨식을 5ml의 배지에 일정하게 접종하였다.

탄소원의 영향

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

질소원의 영향

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

C.V. 농도의 영향

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

온도의 영향

Citrobacter sp. SK-3의 배양온도에 따른 색소분해능을 검토하기 위하여 20-50℃까지 배양온도를 달리하여 색소 분해능을 검토하였다.

pH의 영향

Citrobacter sp. SK-3의 pH에 따른 색소분해능을 검토하기 위하여 배지의 초발 pH를 3.0-10.0 까지 조절하여 시간별로 색소분해능을 검토하였다.

C.V. 관련 색소에 대한 분해능 조사

Citrobacter sp. SK-3이 기질로서 이용가능한 색소의 종류를 알아 보기 위하여, 최적배지에 각종 색소를 10 ppm씩 첨가한 다음 40℃에서 48시간 배양하여 각 색소의 최대흡수 파장에서의 흡광도의 감소율(%)로서 분해능을 관찰했다.

분해 산물의 검정

Thin layer chromatography(TLC)에 의한 분해산물의 검정

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

High performance liquid chromatography(HPLC)에 의한 분해산물의 검정

배양시간별로 10ml의 배양액을 취하여 균체를 제거한 다음 배양액 10ml를 동량의 dichloromethane으로 추출하여 0.5ml정도로 감압농축 하였다. C.V.는 이온성 물질이므로 단순한 역상 HPLC에서는 컬럼에 머무르지 않고 바로 빠지므로 유기전해질을 첨가하여 이온 성분을 억제하여야 한다고 알려져 있다³⁶⁾. 본 실험에서는 PIC-A reagent(pH 7.5, 0.005M tetrabutylammoniumphosphate)와 PIC-B₆reagent(pH 3.5, 0.05M hexasulfonic acid)를 같이 사용하여 그 분리상을 비교하였다. HPLC의 분석 조건은 Table 2와 같다.

결과 및 고찰

Citrobacter sp. SK-3의 생육도 및 분해율 측정

Citrobacter sp. SK-3를 10 ppm의 C.V., B.G., P.A.를 각각 첨가한 최소배지(pH 8.0)에 접종한 후 40℃에서 배양하여 일정 시간 간격으로 균의 생육도 및 분해율의 변

Table 2. The conditions of H.P.L.C. analysis for degradation products of crystal violet

| | |
|--------------------|---|
| Pump | Water 510(isocratic) |
| Detector | Water 484(UV 254 nm) |
| Integrator | Waters 746 data module |
| Mobile phase | AcN/H ₂ O(80/20, v/v) with PIC A reagent AcN/H ₂ O(80/20, v/v) with PIC B ₆ reagent |
| Column | μ-Bondapak C ₁₈ |
| Column temperature | room temperature |
| Injection volume | 10μl |
| Flow rate | 1.5ml/min |
| Attenuation | 128 |
| Chart speed | 0.5 |
| Aufs | 0.1 |

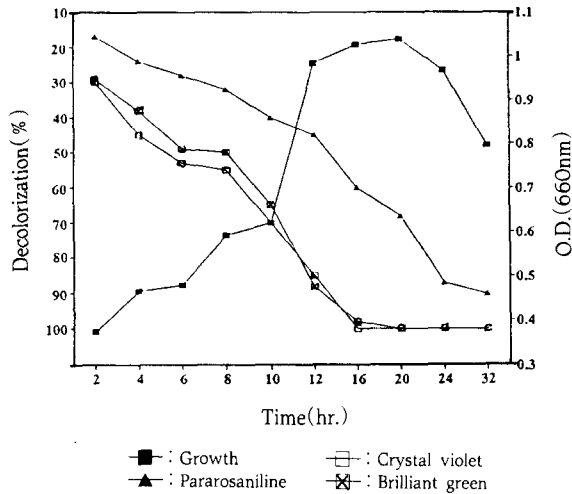


Fig. 1. Effect of incubation time on the degradation of triphenylmethane dyes and the growth of *Citrobacter* sp. SK-3.

화를 측정한 결과, 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.

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

C.V. 10ppm, B.G. 10ppm, P.A. 10ppm이 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 salicin을 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

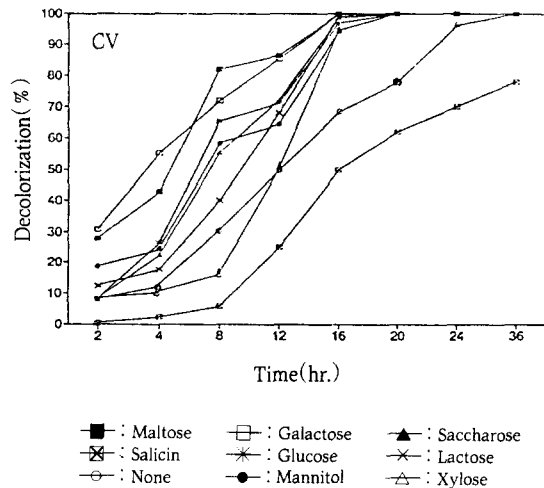


Fig. 2. Effect of carbohydrates on the degradation of crystal violet.

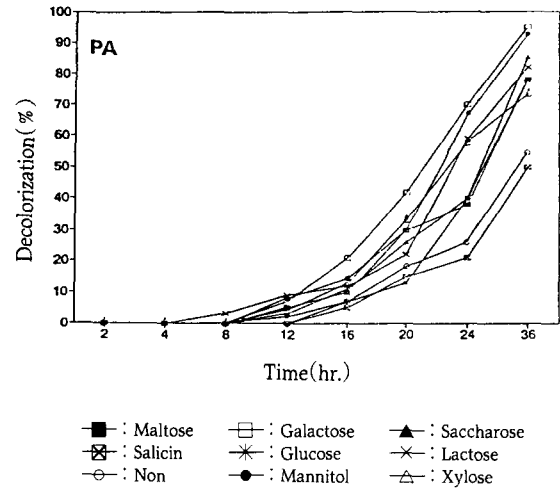
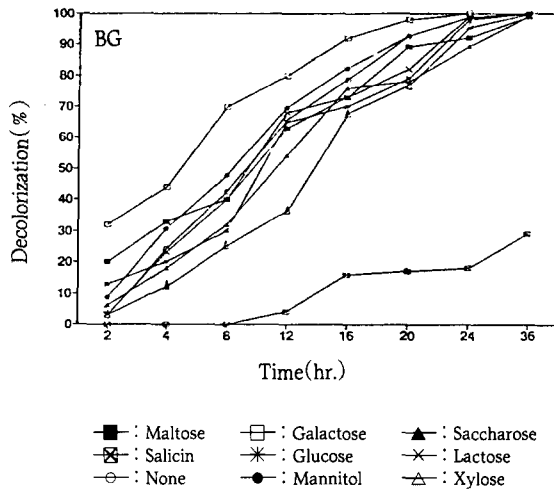


Fig. 3. Effect of carbohydrates on the degradation of brilliant green.

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

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 따로이 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 gala-

ctose의 농도비는 분해에 별 영향을 미치지 못하였다.

질소원의 영향

C.V., B.G., P.A.가 각각 10ppm씩 첨가된 최소 무기염 배지에 질소원으로 yeast extract, Bacto peptone, beef extract, $(NH_4)_2SO_4$, $(NH_4)_2HPO_4$, NH_4Cl , KNO_3 를 각각 0.1% 첨가하여 배양시간에 따른 분해율을 조사하였다. C.V.의 경우 Fig. 5에서와 같이 *Citrobacter* sp. SK-3균주는beef extract, yeast extract, peptone등의 유기질소

Table 3. Effect of various concentrations 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. |
| 0.0 | 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 |
| 1.0 | 97.4 | 98.3 | 12.6 | 100 | 100 | 51.2 |
| 3.0 | 97.3 | 96.2 | 10.2 | 100 | 100 | 32.3 |
| 5.0 | 96.3 | 95.8 | 10.5 | 100 | 100 | 23.5 |

Citrobacter sp.에 의한 Triphenylmethane계 색소의 분해

원을 첨가했을 때 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 첨가했을 때 배양 12시간 정도에 B.G.를 완전히 분해하였다. 무기질소원의 경우 KNO₃를 첨가했을 때 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 것으로서 0.1-0.5%에서

가장 우수하였다.

C.V., B.G., P.A.의 농도에 따른 분해능 검토

C.V., B.G., P.A.의 농도를 각각 20 ppm에서 300 ppm으로 조절하여 48시간 배양한 결과 Fig. 8에서와 같이 *Citrobacter* sp. SK-3균주는 C.V.농도 40ppm까지는 배양 24시간 이내에 완전히 분해하였으며 점차 농도를 높혀감에 따라 균의 생육뿐만 아니라 분해율도 감소하였다. 이는 C.V.농도가 증가함에 따라 세포독성을 야기하여 생육을 저해한 것으로 사료되었다. B.G.는 C.V.와 마찬가지로

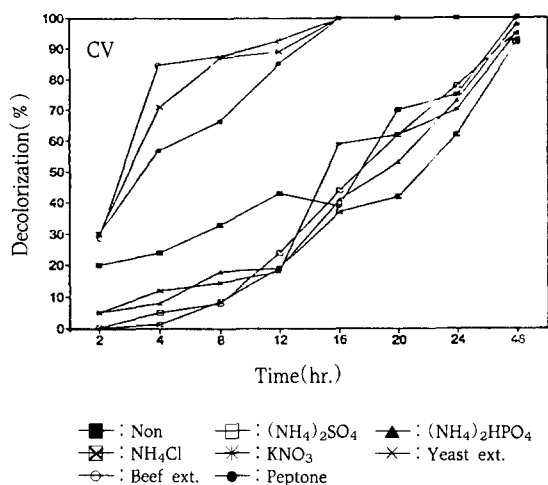


Fig. 5. Effect of nitrogen sources on the degradation of crystal violet.

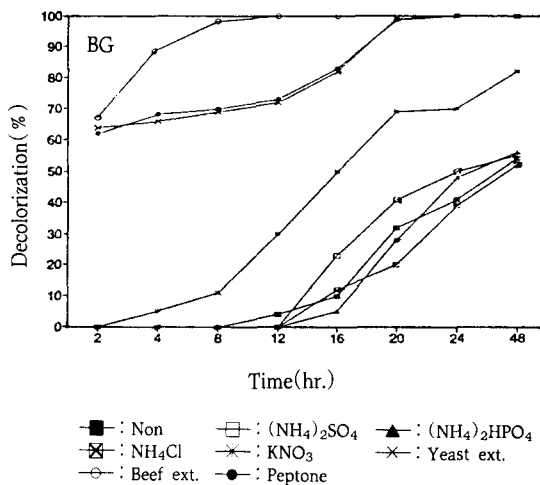


Fig. 6. Effect of nitrogen sources on the degradation of brilliant green.

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

| Beef extract conc.(%) | Degradation(%) | | | | | |
|-----------------------|----------------|------|------|---------|------|------|
| | 16 hour | | | 24 hour | | |
| | C.V. | B.G. | P.A. | C.V. | B.G. | P.A. |
| 0.0 | 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 |
| 1.0 | 75.3 | 68.4 | 48.9 | 98.4 | 95.3 | 78.6 |
| 3.0 | 73.6 | 70.1 | 38.6 | 98.7 | 81.8 | 69.7 |
| 5.0 | 72.6 | 55.9 | 30.1 | 90.2 | 72.8 | 62.6 |

로 B.G.농도 40ppm까지는 배양 24시간 이내에 완전히 분해하였으며, 점차 농도를 높혀감에 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.

배양온도의 영향

배양온도가 C.V., B.G., P.A.의 분해에 미치는 영향을 알아 보기 위하여 각각의 색소를 10ppm 씩 첨가한 후 배양 온도를 20°C~50°C 까지 단계별로 조절하여 18시간 배양한 결과 Fig. 11에서와 같이 C.V., B.G., P.A. 모두

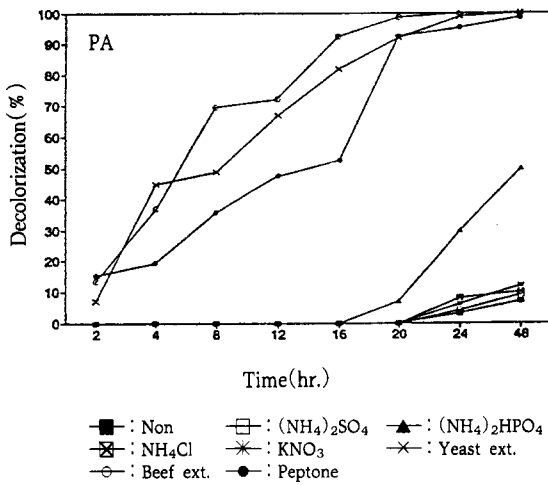


Fig. 7. Effect of nitrogen sources on the degradation of pararosaniline.

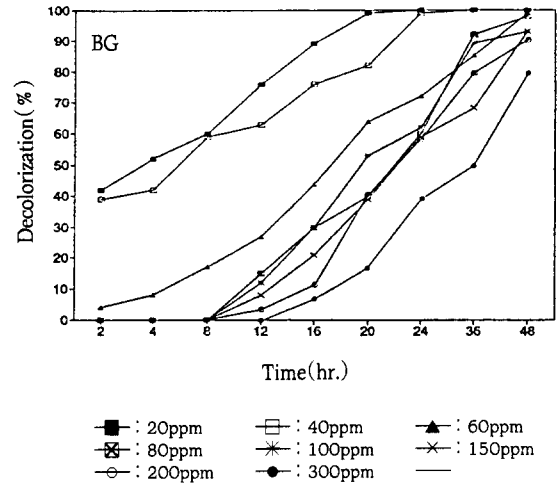


Fig. 9. Effect of concentrations of brilliant green on the degradation of brilliant green.

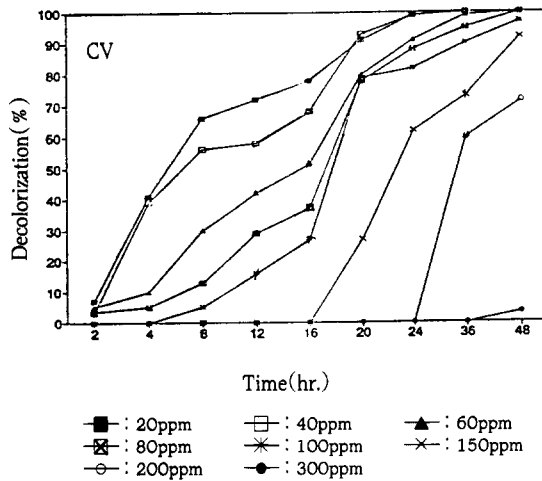


Fig. 8. Effect of concentrations of crystal violet on the degradation of crystal violet.

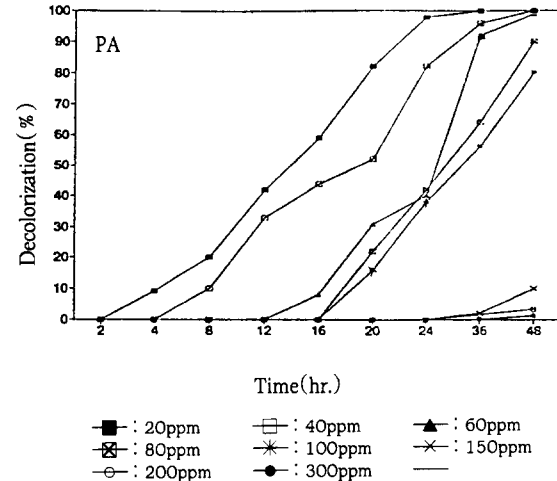


Fig. 10. Effect of concentrations of pararosaniline on the degradation of pararosaniline.

Citrobacter sp.에 의한 Triphenylmethane계 색소의 분해

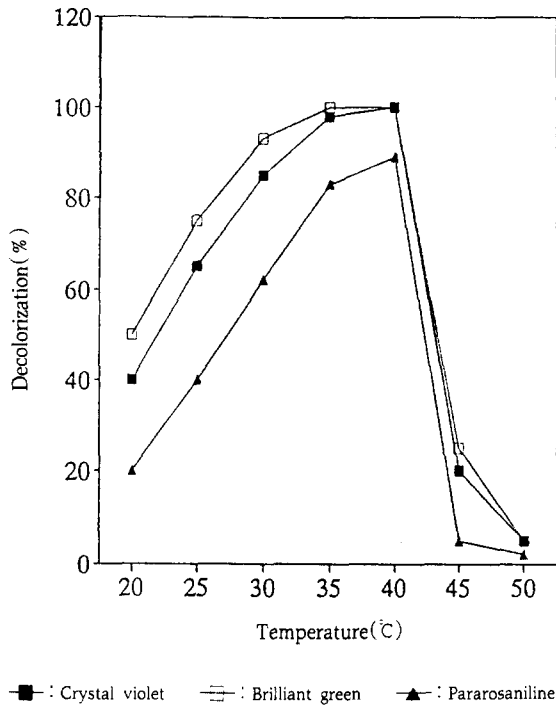


Fig. 11. Effect of temperature on the degradation of triphenylmethane dyes.

분해 최적온도는 40°C 부근으로 C.V., B.G.의 경우 95% 이상의 분해율을 나타내었으며 45°C 이상에서는 분해율이 급격히 감소하였다.

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 생육최적 pH가 8.0인 점을 고려해 볼 때 생육저해로 인한 결과로 사료되었다.

C.V. 관련색소에 대한 분해능 조사

Citrobacter sp. SK-4균주에 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 조건에 *Citrobacter* sp. SK-3에 의한 분해율은 Table 5와 같았다. *Citrobacter* sp. SK-3균주는 *p*-aminotriphenylmethane계 색소에는 강한 분해 활성을 보이거나 benzene환에 amino radical(-NH₂) 대신 Br, I 와 같은 halogen원소가 결합한 bromthymol blue, bromphenol blue, erythrosine

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

| Dye | Degradation (%) | |
|------------------|-----------------|---------|
| | 24 hour | 48 hour |
| Basic fuchin | 98.0 | 100 |
| Brilliant green | 97.7 | 100 |
| Malachite green | 94.7 | 100 |
| Pararosaniline | 98.0 | 100 |
| Methyl violet | 95.5 | 100 |
| Ethyl violet | 97.0 | 100 |
| Bromophenol blue | 2.0 | 3.0 |
| Bromthymol blue | 2.0 | 3.2 |
| Fast blue FCF | 1.5 | 2.7 |
| Erythrosine | 3.0 | 4.0 |
| Methyl red | 94.4 | 100 |

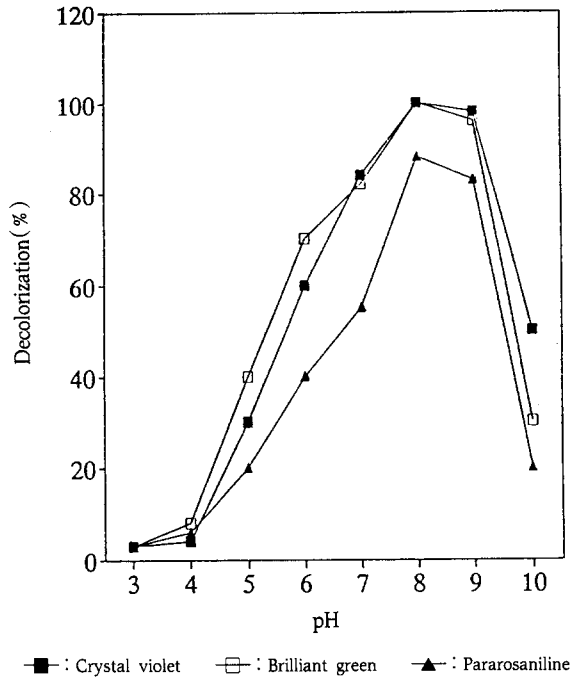


Fig. 12. Effect of pH on the degradation of triphenylmethane dyes.

과 sulfon radical(-SO₂)이 치환된 fast blue FCF는 분해하지 못하였다. 특히하게 AZO계 색소인 methyl red에 높은 분해활성을 나타내었다.

C.V. 분해 대사산물의 검정

C.V.를 50ppm 첨가한 최소 무기염 배지에서 배양 기간 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.

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 등³⁶⁾에 의하

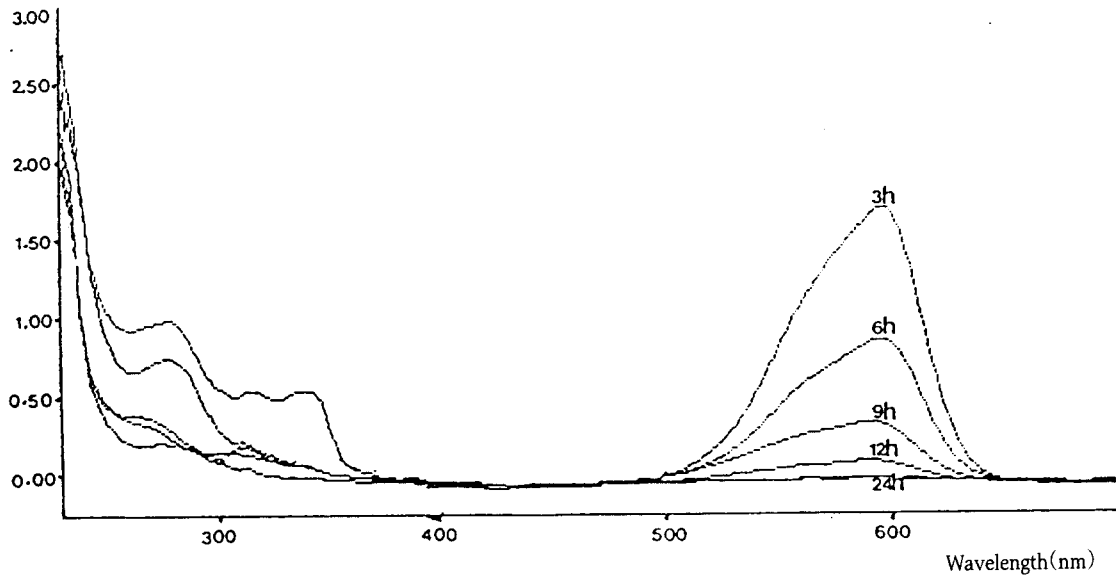


Fig. 13. UV-VIS scanning spectra of the culture filtrates of minimum basal salts containing crystal violet.

면 methyl violet를 같은 조건에서 TLC 전개하여 생성되는 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'',N''-hexamethylpararosanilin, N,N,N',N',N''-pentamethylpararosanilin, N,N,N',N'-tetramethylpararosanilin, N,N,N'-trimethylpararosanilin이라 보고하였다. 본 실험에서도 methyl violet를 standard물질로서 TLC분획하여 각각의 band를 dichloromethane으로 추출하여 사용하였다. 분해균은 C.V.의 amino기에 N-demethylation을 차례로 일으켜 배양 18시간 안에 hexamethylpararosaniline은 점

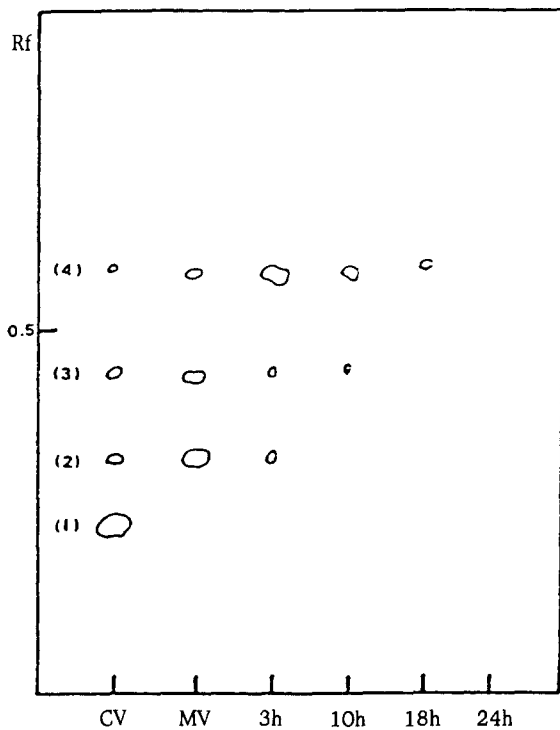


Fig. 14. TLC profile of the metabolites formed upon incubation of crystal violet with minimum basal salts medium.

- (1) hexamethylpararosaniline
- (2) pentamethylpararosaniline
- (3) tetramethylpararosaniline
- (4) trimethylpararosaniline

차적으로 소멸되는 반면, penta-, tetra-, trimethylpararosaniline이 순서대로 많이 생성되다가 완전소멸함을 확인할 수 있었다.

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(hexamethylpararosaniline), RT 4.95분(pentamethylpararosaniline), RT 4.53분(tetramethylpararosaniline), RT 3.39분(trimethylpararosaniline)로 분리되었고 PIC-B₆의 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.

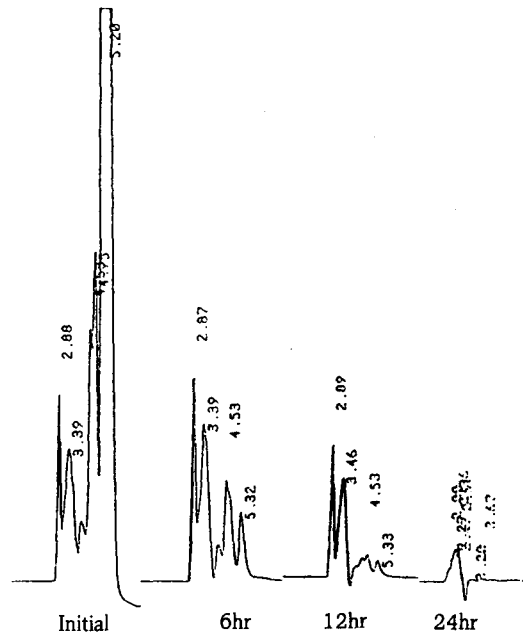


Fig. 15. HPLC chromatogram of the culture filtrates of minimum basal salts medium containing crystal violet. Mobile phase was AcN/H₂O(80/20, v/v) with PIC A reagent.

- Cytogenic toxicity of gentian violet and crystal violet on mammalian cells *in vitro*. *Mutation Res.*, 58, 269(1978)
13. Brown, D. : Effects of Colorants in the Aquatic Environment. *Ecotoxicol. Environ. Safety*, 13, 139 (1988)
 14. Zhang, X., You, R., Li, Z. and He, W. : A new decolorizing flocculant for dyeing wastewater. *Chin. J. Environ. Sci(Beijing)*, 11(5), 25(1990)
 15. Anliker, R. : List of colorants to be classified as toxic. *J. Soc. Dyers Colourists.*, 1204, 223(1988)
 16. Lin, G. H. Y. and Brusick. D. J. : Mutagenicity studies on two triphenylmethane dyes, bromphenol blue and tetramethane dyes. *J. Appl. Toxicol.*, 12(4), 267(1992)
 17. Kingsland, G. V. and Anderson, J. : A study of the feasibility of the use of gentian violet as a fungistat for poultry feed. *Poultry Sci.*, 55, 852(1976)
 18. Kean, B. H. and Haskins, D. W. : Drugs for intestinal parasitism, p. 371, In W. Modell(ed.), *Drugs of choice*. C. V. Mosby Co., St. Louis(1978)
 19. Au, W., Butler, M. A., Bloom S. E. and Matney. T. S. : Further study of the genetic toxicity of gentian violet. *Mutation Res.*, 66, 103(1979)
 20. Abidi, S. L. : High Performance Liquid Chromatography of quinodial imminium compounds derived from triphenylmethanes. *J. Chromatography*, 255, 101(1983)
 21. 吉田高年, 太田伴 : 染色廢水處理. 水處理技術. 30(10), 575(1989)
 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
 23. Fouts, J. R., Kamm, J. J. and Brodie. B. B. : *J. Pharmac. Exp. Ther.*, 120, 291(1957)
 24. Childs, J. J., Nakajima, C. and Clayson. D. B. : *Biochem. Pharmac.*, 16, 1555(1967)
 25. Spadaro, J. T., Gold, M. H. and Renganathan. V. : Degradation of azo dyes by the lignin-degrading fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 58(8), 2397(1992)
 26. Fernando, T., Bumpus, J. A. and Aust. S. D. : Biodegradation of TNT(2,4,6-trinitrotoluene) by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1666(1990)
 27. Cripps, C., Bumpus, J. A. and Aust. S. D. : Biodegradation of azo and heterocyclic dyes by *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1114(1990)
 28. Fukuzumi, T. : Microbial decolorization and defoaming of pulping waste liquors. In : Kirk, T. K., Higuchi, T. and Chang H. M.(eds) *Lignin biodegradation : microbiology, chemistry and potential applications*, Vol. 1, p. 215, RC Press, Boca Raton, Fla(1982)
 29. Belsare, D. K. and Prasad, D. Y. : Decolorization of effluent from the bagasse-based pulp mills by white-rot fungus, *Schizophyllum commune*. *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 28, 301(1988)
 30. Suntud, S., Praphaisri, S. and Prakitsin, S. : Microbial decolorization of molasses waste water by *Mycelia sterilia* D90. *Agric. Biol. Chem.*, 52(2), 393(1988)
 31. Han, S. and Yang, H. : Decolorization of acid red B by immobilized cells of *Bacillus cereus* No. 45. *Huanjing Kexue Xuebao*, 8, 93(1988)
 32. Idaka, E. and Ogawa, T. : Degradation of azo compounds by *Aeromonas hydrophila* var. 24B. *JSDC*, 91(1978)
 33. Zimmermann, T., Kulla, H. G. and Leisinger, T. : Properties of purified orange II azoreductase, the enzyme initiating azo dye degradation by *Pseudomonas KF46*. *Eur. J. Biochem.*, 129, 197(1982)
 34. Yatome, C., Ogawa, T., Koga, D. and Idaka. E. : Biodegradability of Azo and Triphenylmethane Dyes by *Pseudomonas pseudomallei* 13NA. *JSDC*, 97, 166(1981)
 35. Kwasniewska, K. : Biodegradation of crystal violet by oxidative red yeasts. *Bull. Environ. Contam. Toxicol.*, 34, 323(1985)
 36. Bumpus, J. A. and Brock. B. J. : Biodegradation of crystal violet by the white rot fungus *Phanerochaete chrysosporium*. *Appl. Environ. Microbiol.*, 54(5), 1143(1988)