

***Proteus* sp. ST-1에 의한 Azo계 색소의 분해에 관한 연구**

박형숙 · 하상태* · 이영근*

경성대학교 생물학과, *부산광역시 보건환경연구원
(1995년 7월 18일 접수)

The Study on Degradation of Azo Dyes by *Proteus* sp. ST-1

Hyung-Sook Park, Sang-Tae Ha* and Young-Guen Lee*

Dept. of Biology, Kyungshung University, *Pusan Institute of Health & Environment
(Manuscript received 18 July 1995)

Abstract

Direct Sky Blue-5B is an Azo dye known as general for staining of textile and leather, etc., and as materials which are difficult to be biodegraded in nature. The bacterium strain which could degrade direct Sky Blue-5B was isolated from activated sludge of dyeing factory and identified as *Proteus* sp. by experiment on morphological, cultural and biochemical characteristics, and so named *Proteus* sp. ST-1. The optimum condition of the strain for degradation of Sky Blue-5B were at about 35°C and pH 7~8. The strain had been capable of degradation with organic nitrogen effectively and had completely degraded 200mg/l of the dye within 12hrs at 37°C. The enzyme system related to degradation of Azo dye may be intracellular, and so degraded the dye after absorption into cell. The degradation products of Sky Blue-5B by *Proteus* sp. ST-1 were analyzed by Gas Chromatography /Mass Spectrometry and Spectrophotometer, from this observation, it may be inferred that the strain degraded the dye directly without any mediate.

Key Words : Azo dye, Degradation, *Proteus* sp.

1. 서 론

오늘날 유기화학의 발달로 인해 현재 약 40,000여종의 합성 유기색소가 개발되어 전 세계에서 연간 7×10^5 톤 이상의 색소와 염료가 생산되어 산업 현장에서 사용되고 있으며(김동민과 김수생, 1988; 김공주 외, 1990; 윤경하, 1994), 실제 염색공정에서 10~15% 정도가 폐수로 유출되고 있는 것으로 알려지고 있다(Vaidya와 Datye, 1982). 이러한 색소와 염료가 함유된 폐수는 빛과 세척 및 생분해

에 매우 안정한 난분해성 물질로 일반 폐수처리방법으로는 제거되지 않는다(Shelley *et al.*, 1976; Bangert *et al.*, 1977; Meyer, 1981). 특히 사용염료의 60%이상을 차지하고 있는 azo계(Johnson *et al.*, 1978) 색소는 생태계에 유출되었을 때 이들의 특징적 화학구조인 azo기(-N=N-)와 방향족 sulfon기는 물리·생물학적으로 난분해성으로 알려져 있으며 또한 azo기의 환원으로 생성되는 방향족 amine은 어류와 포유동물에 독성을 나타낼 뿐만 아니라 인체에 방광암과 간종양을 유발하는

것으로 알려져 있다(Cripps *et al*, 1990; Rafii *et al*, 1990). 이러한 색소 및 염료가 함유된 폐수의 처리는 일반적으로 물리·화학적 방법과 함께 생물학적 방법을 병행하고 있다(Ogawa *et al*, 1981; Pagga와 Brown, 1986; Kurane와 Sazuki, 1988; Groff와 Kim, 1989). 물리적 처리로는 활성탄에 의한 흡착법이 사용되고 있으며, 화학적 처리로는 고분자응집제 등을 이용한 응집법과 오존을 이용한 산화처리가 주로 이용되고 있으나, 물리·화학적 방법에서는 사용된 활성탄의 재생등에 소요되는 과도한 비용과 다량의 화학슬러지 발생 및 처리에서 상당한 문제점이 발견된다. 또한 생물학적 처리로는 주로 활성오니법이 이용되나 색소가 가진 독성으로 인해 미생물 생장이 저해받는 문제점이 지적되었다(Au *et al*, 1978; Idaka *et al*, 1985). 따라서 날로 그 사용량이 증가하는 난분해성 색소폐수를 보다 안전하고 저렴한 비용으로 제거, 처리하는 것이 시급히 해결해야 할 과제로 대두되고 있다. 본 실험에서는 섬유염색, 피혁, 종이, 잉크등의 착색제로 널리 이용되고, 자연계에서 난분해성으로 알려진 azo계 색소중 직접 염료로서 사용빈도가 높은 Direct Sky Blue-5B (S/B-5B, C. I. Direct Blue 15)에 대한 분해능이 우수한 균주를 염색공장 폐수처리장 부근의 토양 및 활성오니로부터 검색, 분리하여 분류학적인 위치를 검토하고, 최적분해조건과 분해특성 및 기질특이성을 검토하여 azo계 색소폐수의 생물학적 처리에 응용하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1. 분해균의 분리 및 배지

S/B-5B 분해균의 분리를 위한 시료는 섬유 염색공장의 폐수처리장에서 나오는 활성오니, 방류수, 염료 오염지역의 토양을 사용하였다. 시료는 채취 후 즉시 실험실에 옮겨 yeast extract를 적당량 첨가한 식염수로 현탁하고, 20 mg/l의 S/B-5B 염료가 첨가된 L.B.(Luria-Bertani)배지가 들어 있

는 시험관에 접종하였고, 20~40°C에서 배양한 후, 빨리 탈색을 보이는 시험관을 선별하여 L.B. plate에서 순수 분리하였다. 분리된 균주는 L.B. 한천 배지에 이식하여 4°C의 냉장소에 보관하여 사용하였으며, 30일 간격으로 계대배양하였다. 균의 생육도, 색소감소율 및 배양조건 검토에 사용한 최소배지는 K₂HPO₄ 2.1g, KH₂PO₄ 1.6g, (NH₄)₂SO₄ 0.5g, KCl 0.2g, MgSO₄ 7H₂O 0.2g, NaCl 0.2g, CaCl₂ 2H₂O 0.1g, FeCl₃ 6H₂O 0.05g, yeast extract 5.0g 및 dye 20mg을 증류수에 녹여 1,000ml(pH 7.5)로 하였다.

2.2. Sky Blue-5B

기질로 사용한 S/B-5B는 diazo계 염료 중 직접 염료로서 색소 및 그 유도체(*o*-Dianisidine: 3,3'-dimethoxybenzidine)의 화학구조는 Fig. 1과 같으며, 색소는 Color Index(C.I.) No. 24400 (C.I. Direct Blue 15)이며 최대흡광도는 634.2 nm이고 수용액에서는 589.5 nm이다. 본 실험에 사용된 각 색소는 C.A.S. (Chemical Abstract Service)에 공인된 것으로 편의상 상용명을 사용하였다.

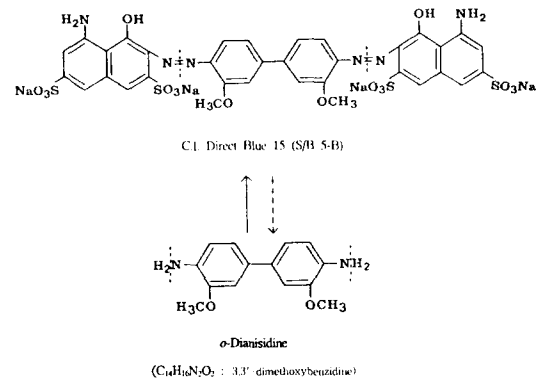


Fig. 1. Chemical structure of Sky Blue-5B and the derivative.

2.3. 분리균의 생육도 및 분해율 측정

분해균의 생육도는 순수분리된 S/B-5B 분해균을 최소배지에 접종하여 37°C에서 배양하면서 일

정 시간 간격으로 UV-VIS spectrophotometer (Varian Cary 13)를 이용하여 660 nm에서의 흡광도로 측정하였으며, S/B-5B 분해율은 S/B-5B의 탈색율로 측정하였다. 즉 37°C에서 일정 시간 간격으로 배양한 배양액을 12,000r.p.m.에서 15분간 원심분리한 후 상등액의 흡광도를 590 nm 부근에서 측정하여 대조군과 비교, 흡광도의 감소율(%)로서 측정(Cripps *et al.*, 1990)하였다.

2.4. 분리균주의 분류 및 동정

분리균주로 선정된 분해균의 분류학적 위치를 검토하기 위하여 형태학적, 배양학적, 생화학적인 제특성을 검토하였으며, 분류와 동정은 Bergey's Manual of Determinative Bacteriology(8th. ed., 1974)와 Bergey's Manual of Systematic Bacteriology vol. 1(1984)에 준하여 실시하였다.

2.4.1. 형태학적 특징

세포의 형태, 크기 등 형태학적 제반실험은 Bradshaw(1982)와 American Society for Microbiology(1981)의 방법에 준하여 colony의 형태, Gram 염색, 운동성 등을 광학현미경과 전자현미경으로 관찰하였다.

2.4.2. 배양적 특징

분리균의 배양적 특성을 알아보기 위하여 Jean과 Faddin(1980)의 Biochemical Tests for Identification of Medical Bacteria에 준하여 Blood agar, MacConkey agar, Endo agar, Desoxycholate Lactose agar 등의 배지에서 분리균을 배양하면서 colony 형태, color, swarming 현상 등을 관찰하였다.

2.4.3. 생화학적 특징

분리균의 생화학적 특성은 Jean과 Faddin(1980)의 방법에 준하여 API 20E kit를 사용하여 24시간

배양 후 ATB System(bioMérieux, France)에서 분석하였다.

2.5. 분리균에 의한 Sky Blue - 5B 색소의 최적 분해조건 검토

분리균에 의한 S/B-5B색소의 최적분해조건을 검토하기 위하여 S/B-5B를 기질로 하여 배양온도를 20~50°C, pH는 3.0~11.0의 단계별로, 그리고 각종 탄소원과 질소원, 색소농도 및 통기량을 달리하고 각각 8시간 배양하였으며, 이 때 접종균량은 균을 생리식염수에 균질하게 현탁시켜 10ml의 배지에 MacFrarland 탁도계로 0.5 정도가 되도록 일정량(약 1 ml) 접종하고 흡광도를 측정하였다.

2.6. 분리균의 분해효소에 대한 검토

색소의 탈색분해에 관련하는 효소가 균주의 세포내 혹은 세포외 어느쪽에 존재하는지를 확인하기 위하여 분리균을 색소첨가하에 완전 분해될 때까지 배양한 후, 배양액을 원심분리(4°C, 12,000 r.p.m., 10 min.)하여 균체와 상등액을 분리하였다. 상등액을 0.45µm membrane filter로 여과하여 얻은 여과상등액과 균체를 생리식염수로 3회 세척한 후 potassium phosphate용액(pH 7.0)에 희석한 것을 초음파 파쇄기(Nissei co. Ultra sonicator)로 파쇄한 다음 원심분리하고 상등액을 0.45µm membrane filter로 여과한 파쇄 균체액을 S/B-5B가 첨가된 L.B. 배지에 각 2ml 첨가하여 37°C에서 배양하면서 시간경과에 따른 흡광도 변화를 관찰하였다.

2.7. 분해 대사산물의 조사

2.7.1 Gas Chromatography /Mass Spectrometry에 의한 조사

S/B-5B색소가 실험균에 의하여 분해 될 때 Fig. 1에서 나타낸 바와 같이 diazo기를 azo reductase가 절단하면 유도체인 *o*-dianisidine이 중간물질 또는 잔존물질로 배양액 중에 존재할 것

으로 가정하고, 최소배지에 유도체를 첨가한 것을 대조군(control)으로 하여, 최소배지에 분리균을 접종하여 분해 진행중인 6시간 배양액 (약 70%분해)과 분해가 완료된 24시간 배양액 (100%분해)을 diethyl ether로 추출, 농축한 후 HP-5 column(0.2mm×50m, 0.2 μ m film thickness), He carrier gas(30ml/min.), split ratio 15:1, 주입구 온도 270 $^{\circ}$ C, 그리고 column initial temp. 200 $^{\circ}$ C (3min.), 15 $^{\circ}$ C/min.의 승온, final temp. 270 $^{\circ}$ C (30min.)의 조건에서 Gas Chromatography/Mass Spectrometry (GC/MS, Hewlett Packard 5989A)를 이용하여 조사하였다.

2.7.2 Spectrophotometer에 의한 검정

전자와 다른 방법으로 중간물질 및 잔존물질 유무를 확인하기 위하여 L.B. 배지에 분리균을 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 3, 5, 10시간 배양 후에 그 배양액을 0.45 μ m membrane filter로 여과하고, 이 여과액을 diethyl ether로 추출하여, 수층과 ether층으로 분리한 후, 수층과 농축시킨 ether층을 각각 spectrophotometer를 사용하여 전 파장에 걸쳐 scanning함으로써 분해산물 생성을 검토하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1. Sky Blue-5B 분해균의 생육도 및 분해율 측정

분리균주를 S/B-5B 20 mg/l가 첨가된 최소 배지에 접종하여 37 $^{\circ}$ C에서 배양하여 측정된 시간별 균의 생육도 및 탈색율의 변화는 Fig. 2와 같다. 균의 생육도는 8시간까지 급격한 대수증식을, 8~24시간까지는 안정기를 나타내었으며, 분해율은 배양 8시간까지 급격히 상승하였고 세균생육도가 증가함에 따라 분해율도 증가하는 양상을 보였다. Fig. 3는 색소 20 mg/l 가 첨가된 최소배지와 이 최소 배지에 분리균주를 접종하여 8시간 배양후에 탈색정도

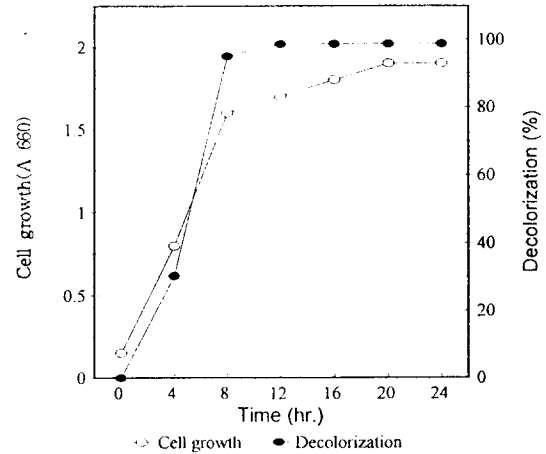


Fig. 2. Relationship between the cell growth and the decolorization of Sky Blue-5B by the isolated strain.

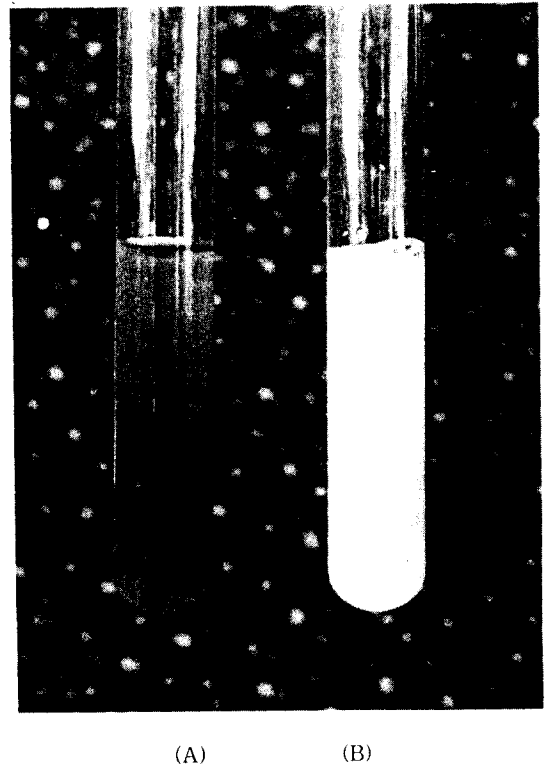


Fig. 3. Photograph of the decolorization of Sky Blue-5B by the isolated strain. (A), Control ; (B), After cultivation (8 hours)

3.2. 분리균주의 분류 및 동정

분리균주를 순수분리하여 형태학적, 배양적, 생화학적 특성을 조사하여 분류학상의 위치를 검토하였다.

3.2.1. 형태학적 특성

분리균주를 nutrient agar에 접종하여 4~16시간 시간대별로 배양하면서 광학현미경과 전자현미경으로 형태학적 특성을 검토한 결과, Table 1과 같이 분리균은 그람음성 간균으로 운동성이며, 포자를 형성하지 않는 주모를 가진 세균이었으며, Fig. 4는 분리균을 transmission electron microscope로 관찰한 것이다.

Table 1. Morphological characteristics of the isolated strain

Contents	Characteristics
Shape	medium-long rod
Cell size	0.4~0.8 × 1.5~4.0 μ m
Motility	positive
Gram stain	negative
Spore	non spore forming
Flagella	peritrichous
Type of cell division	simple division



Fig. 4. Transmission electron microscopic observation of *Proteus* sp. ST-1 grown on nutrient agar.

3.2.2. 배양적 특성

분리균을 Blood agar plate(BAP), MacConkey agar, Endo agar, Desoxycholate Lactose agar (DL agar)에서 배양하여 형성된 colony의 특성은 Table 2와 같으며 Fig. 5는 분리균의 BAP상의 사진으로 용혈현상과 swarming 현상을 잘 나타내 주고 있다.

Table 2. Cultural characteristics of the isolated strain

Contents	Characteristics
BAP	swarming
MacConkey agar	colorless, swarming
Endo agar	pink-red, swarming
DL agar	colorless or gray white, swarming

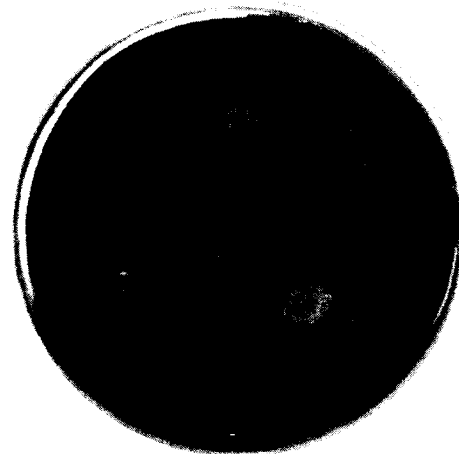


Fig. 5. Photograph of *Proteus* sp. ST-1 on Blood Agar plate.

3.2.3. 생화학적 특성

분리균에 대하여 API 20E kit를 사용하여 24시간 배양후 ATB system에서 자동분석한 생화학적 시험결과는 Table 3과 같으며 *Proteus* sp.로 확인되었다.

Table 3. Biochemical characteristics of the isolated strain

Contents	Characteristics
Ortho-nitro-phenyl-galactoside	Negative
Arginine dihydrolase	Positive
Lysine decarboxylase	Negative
Ornithine decarboxylase	Positive
Citrate	Positive
H ₂ S(TSI)	Positive
Urease	Positive
Tryptophane desaminase	Positive
Indole	Negative
Voges-Proskauer	Negative
Gelatin	Positive
Acid produced from	
Glucose	Positive
Mannose	Negative
Inositol	Negative
Sorbitol	Negative
Rhamnose	Negative
Saccharose	Positive
Melibiose	Negative
Amygdalin	Positive
Arabinose	Negative
Oxidase	Negative

이상의 형태학적, 배양적, 생화학적 여러 특징들을 종합해 볼 때 본 실험에 사용된 균주는 *Proteus*속의 여러 특성들과 거의 일치하여, 이 후 본 실험에서는 *Proteus* sp. ST-1으로 명명하여 사용하기로 하였다.

3.3. 분리균에 의한 Sky Blue-5B의 최적 분해조건 검토

분리균에 의한 색소의 분해율을 높이기 위하여 *Proteus* sp. ST-1균주의 S/B-5B에 대한 분해 조건을 다음과 같이 검토하였다.

3.3.1. 온도의 영향

배양온도를 20~50℃까지 단계별로 8시간 배양 후 분해율을 측정한 결과는 Fig. 6과 같다. 온도 변화에 따른 색소 분해율은 20℃부터 온도가 높아짐에 따라 서서히 증가하여 35℃ 부근에서 최고치를 나타내었고, 40℃ 이상에서는 급격히 저하되었다. 이와 같은 현상을 장내세균의 전형적인 증식 양상을 나타낸 것으로 분리균이 중온균에 속한다고 볼 수 있다.

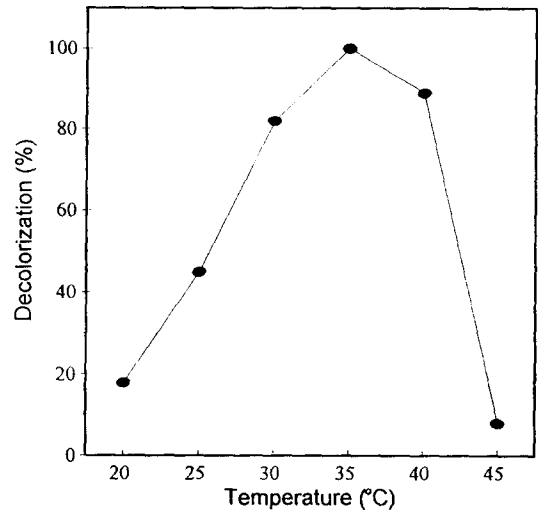


Fig. 6. Effect of temperature on the decolorization Sky Blue-5B dyes by *Proteus* sp. ST-1.

3.3.2. pH의 영향

pH에 따른 색소 분해율은 Fig. 7에 나타난 바와 같이 pH 6에서 높아지기 시작하여, pH 7~8에서 가장 높았고 pH 5 이하 및 pH 11 이상에서는 10% 미만이었다. 따라서 최적 pH는 7~8 사이로 알칼리 쪽으로 약간 치우치는 경향을 보였다.

3.3.3. 탄소원의 영향

탄소원의 영향은 Table 4에서와 같이 실험균은 별도의 탄소원을 첨가하지 않은 배지와 arabinose, lactose, galactose를 첨가한 배지에서는 8시간 이

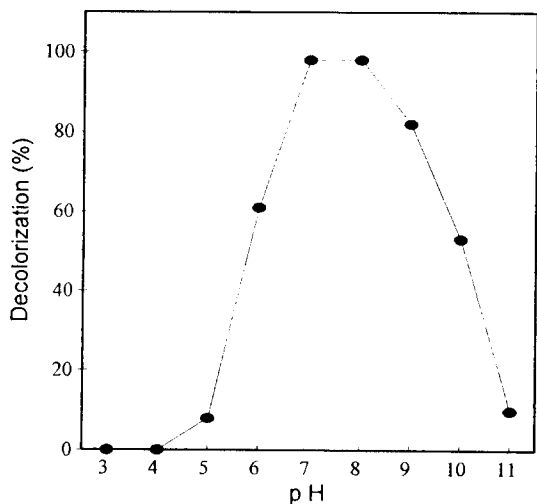


Fig. 7. Effect of pH on decolorization of Sky Blue-5B dyes by *Proteus* sp. ST-1.

Table 4. Effect of carbon sources on the decolorization of S/B-5B by *Proteus* sp. ST-1

Carbon sources (0.5%)	Decolorization (%)		
	8 hrs	16 hrs	24 hrs
None	99.8	99.9	99.9
Arabinose	99.7	99.8	99.9
Lactose	99.3	99.8	99.9
Galactose	88.6	99.8	99.9
Maltose	87.5	99.8	99.9
Manitol	86.1	99.8	99.9
Saccharose	50.6	79.5	88.4
Fructose	40.3	68.1	85.6
Glucose	25.4	59.3	78.5

내에 88% 이상의 색소 분해율을 보인 반면, saccharose, fructose, glucose 등이 첨가된 배지에서는 24시간 경과 후에 78~88%의 색소분해율을 보였다. 이를 고찰해 보면 ST-1 균주는 색소 그 자체를 유일 탄소원으로 이용하여 빠른 시간내에 분해가 가능하다는 것을 알 수 있었고, 분리균이 이용 가능한 탄소원인 saccharose, glucose 등이 첨가된 배지에서의 분해율이 이용 불가능한 arabinose 등의 첨가 배지 보다 낮았다. 이로써 분리균은 색소와 이용 가능한 탄소원이 동시에 제공되었을 때는 이용 가능한 탄소원부터 선택적으로 이용하는 것으로 보인다.

3.3.4. 질소원의 영향

S/B-5B 각 20 mg/l가 유일탄소원으로 첨가된 최소 배지에 각종 무기질소원과 유기질소원을 0.5%씩 첨가하여 시간대별로 배양하면서 분해율을 측정 한 결과는 Table 5와 같다. 분리균은 무기질소원에서 보다 유기질소원에서 높은 색소 분해율을 나타내었으며, 유기질소원중에서도 yeast extract 첨가시 가장 높은 분해율을 보였으나, 질소원을 첨가하지 않은 경우에는 거의 분해능을 보이지 않았다. Cripps *et al*(1990)은 질소원이 제한된 조건에서 *Phanerochate chrysosporium*이 azo계 색소를 효과적으로 분해한다고 보고 하였으나, 본 실험에서는 유기질소원이 첨가된 조건에서 더 효과적인 분해능이 관찰되었다. 이는 색소의 탈색이 배지내 질소원이 존재할 때 일어난다는 보고(윤경하, 1994)와 비슷하였다.

Table 5. Effect of nitrogen sources on the decolorization of Sky Blue-5B by *Proteus* sp. ST-1

Nitrogen sources (0.5%)	Decolorization (%)			
	4 hrs	8 hrs	12 hrs	16 hrs
Yeast extract	30.2	99.8	99.8	99.8
Bacto-peptone	15.0	23.4	36.1	45.8
Tryptone	13.7	20.6	28.9	38.7
Casein	14.4	14.9	17.4	29.1
NaNO ₃	20.3	22.5	25.0	28.9
NH ₄ Cl	14.4	16.7	23.2	26.0
NH ₄ NO ₃	10.1	10.3	10.8	11.4
None	5.1	5.6	7.3	10.1

3.3.5. 통기량의 영향

분리균의 S/B-5B 분해에 미치는 통기량의 영향은 S/B-5B 20 mg/l를 첨가한 L.B.배지에서 혐기적 정지배양과 진탕배양을 실시하였으며 그 결과는 Fig. 8과 같다. 배양초기에는 호기성 상태에서의 분해율이 혐기성 상태에서 보다 약간 양호하였으나, 6시간 이후에는 호기상태 및 혐기상태에서의 분해율에 차이가 없었다. 이는 분리균이 통성 혐기성인 때문으로 생각된다.

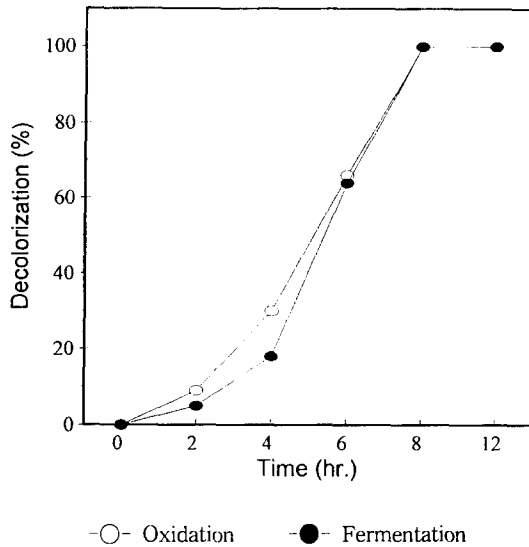


Fig. 8. Effect of aeration on the decolorization of Sky Blue-5B by *Proteus* sp. ST-1.

3.3.6. 색소농도에 의한 영향

상기 검토된 최적조건과 배지상태에서 S/B-5B의 농도를 20 mg/l에서 500 mg/l로 조절하여 농도에 따른 분해율을 측정된 결과는 Fig. 9와 같다. 분리균은 20 mg/l는 6시간내에, 50 mg/l는 8시간, 100 mg/l는 10시간, 200 mg/l는 12시간내에 완전

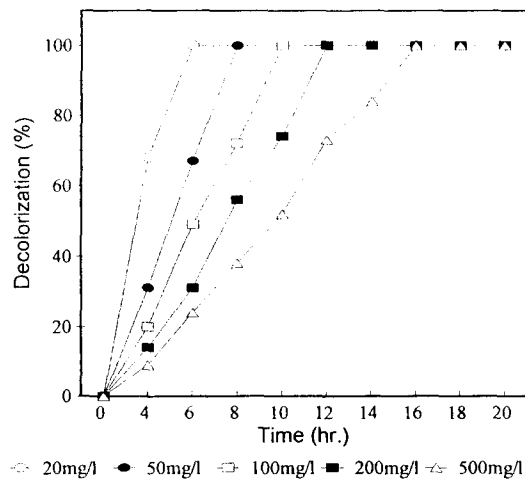


Fig. 9. Effect of Sky Blue-5B concentration on the decolorization by *Proteus* sp. ST-1.

분해하였고, 500 mg/l의 경우 12시간만에 73%, 16시간만에 완전 분해하였다. 이로 미루어 분리균은 배지중의 S/B-5B의 농도에 크게 영향을 받지 않으므로 생산현장의 색소폐수원수의 농도가 약 200 mg/l임을 고려할 때 본 공시균주는 현장에서 실제 적용이 가능할 것으로 생각된다.

3.4. 분리균의 분해효소에 대한 검토

분리균의 색소 분해활성에 관여하는 효소의 존재 부위를 확인하기 위해 S/B-5B를 첨가한 L.B.배지에 분리균을 배양한 후 원심분리하여 얻은 상등액과 균체를 완충액으로 희석하여 초음파 파쇄한 파쇄균체액을 각각 S/B-5B 20 mg/l가 첨가된 L.B.배지에 2 ml씩 넣어 배양하면서 시간대별 흡광도 변화를 측정된 결과는 Fig. 10과 같이 나타났다. 그 결과 배양상등액을 첨가한 배지에서는 흡광도의 변화가 나타나지 않았고 파쇄된 균체액을 첨가한 배지에서는 흡광도가 낮아졌다.

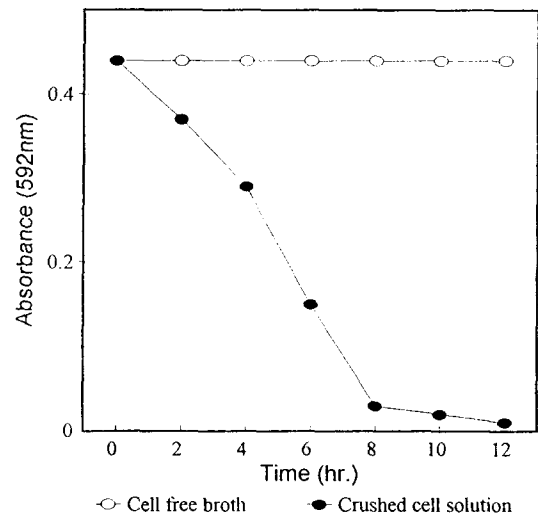


Fig. 10. Change of absorbance by the cell-free broth and the crushed cell solution.

이러한 결과는 색소의 분해에 관여하는 효소는 균체내에 존재하는 효소이며, 색소를 균체내로 흡수한 후 분해하는 것을 반영하고, 이는 배 등 (1993)의 보고와 일치하였다. 그러나 본 공시균주

의 azo계 색소분해효소는 앞으로 더 검토하여야 할 문제라고 생각된다.

3.5. 색소분해 대사산물의 조사

3.5.1. Gas Chromatography /Mass Spectrometry에 의한 조사

분리균에 의해 S/B-5B가 분해될 때 분해과정에서 유도체의 중간물질 또는 잔존물질을 조사하기 위하여 유도체(*o*-dianisidine : 표준품)를 첨가한 최소배지를 control로 하고, 접종 후 분해가 진행 중인 6시간 배양액(약 70% 분해)과 분해가 완료된 배양액(100% 분해)을 각각 diethyl ether로 추출하여 GC/MS로 조사한 결과 중 대조액의 total ion chromatograph(TIC)를 Fig. 11에 나타내었다. 6분대에 나타난 피크는 용제피크이었으며, 7.9분대의 peak는 용제에 함유된 phenol류로 밝혀졌고, *o*-dianisidine은 21.5분대에서 나타났다. 이의 mass spectrum과 library research결과는 Fig. 12와 같다. 6시간 배양액과 분해완료된 배양액에서는 *o*-dianisidine이 검출되지 않았으며 몇가지 검출된 물질들은 mass spectrum분석상 S/B-5B 및 그 유도체인 *o*-dianisidine와는 구조적으로 무관한 것으로 나타났다. 이와 같이 6시간 이상 배양 후에는 중간대사산물로 추정될 만한 물질이 검출되지 않으므로 중간물질이 수용성이거나 분해세균의 세포 내에 흡수되어 나타나지 않은 것으로 추정되었다.

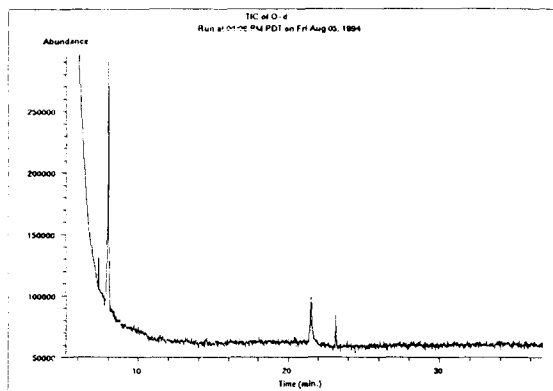


Fig. 11. Total ion chromatograph of ether extract of minium basal salt medium containing *o*-dianisidine.

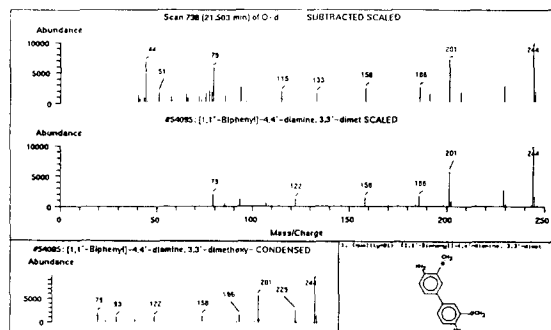


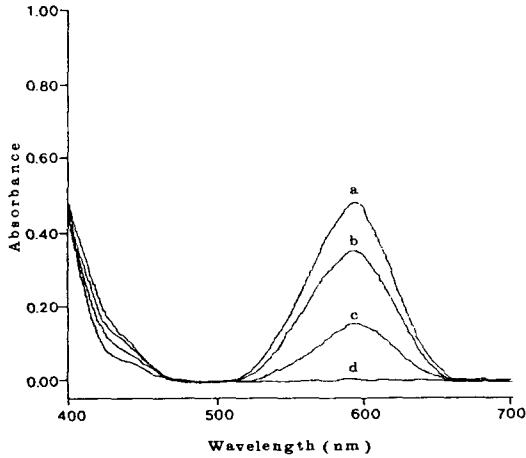
Fig. 12. Mass spectrum of compounds corresponding to peak of 21.503 min. in Fig. 11 and spectral data identified as *o*-dianisidine from Willy data base.

3.5.2. Spectrophotometer에 의한 조사

전자와 다른 방법으로 잔존물질 유무를 확인하기 위하여 S/B-5B가 첨가된 L.B.배지에 분리균주를 접종하고, 시간대별로 배양 후, 수층과 ether추출 농축액을 각각 spectrophotometer을 이용하여 scanning한 결과는 Fig. 13, Fig. 14와 같다. Fig. 13는 수층의 spectra인데 여기서 590 nm부근의 색소 peak는 시간이 지나면서 점차 감소하여 10시간 후에는 완전히 낮아져서 평평하게 되었으며, 시간경과에 따라 감소하는 peak 외에 새로운 peak는 나타나지 않았다.

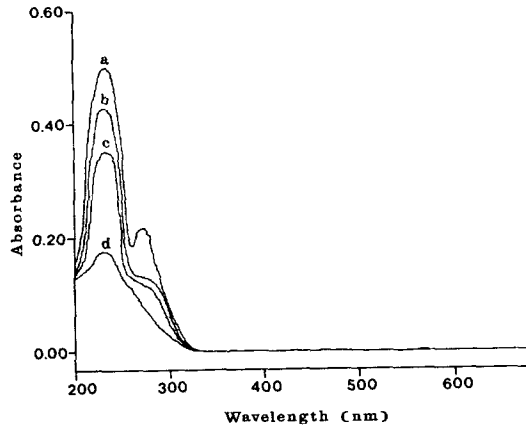
Fig. 14는 ether층의 spectra로서, U.V. 200 nm ~300 nm대에 걸친 spectrum 역시 시간경과에 따라 점차 낮아졌고, 새로운 peak는 나타나지 않았다.

GC/MS와 Spectrophotometer를 이용한 분해산물 확인시험결과를 고찰해 볼 때 Direct Black 38이 장내세균에 의해 benzidine과 같은 중간물질을 거쳐 분해한다는 보고(Manning *et al*, 1985)와 달리 분리 균주는 S/B-5B 분해시에 중간대사물질 및 잔존물질을 거치지 않고 간단한 유기산 또는 무기물질로 분해되는 것으로 추정되며, 이 대사는 세포내에서 이루어 지는 것으로 생각된다.



a. control; b. 3 hrs; c. 5 hrs; d. 10 hrs

Fig. 13. VIS scanning spectra of water phase from ether extract of the cultures containing Sky Blue-5B biodegrading by *Proteus* sp. ST-1.



a. control; b. 3 hrs; c. 5 hrs; d. 10 hrs

Fig. 14. UV/VIS scanning spectra of ether extract of cultures containing Sky Blue-5B biodegrading by *Proteus* sp. ST-1.

4. 결론

섬유, 피혁등의 염색에 가장 널리 쓰이고, 자연계에서 난분해성으로 알려진 azo계 색소중 Direct Sky Blue-5B를 기질로 하여 분해하는 세균을 염색 공장 폐수처리장의 활성오니로부터 분리, *Proteus* sp.로 동정하였다. 그리고 분리균의 최적 분해조

건, 분해에 관여하는 효소 및 분해산물을 검토한 결과는 다음과 같다.

1. 분리균은 형태학적, 배양적, 생화학적 특성을 검토한 결과 *Proteus* 속으로 동정되었으므로 *Proteus* sp. ST-1으로 명명하였다.

2. 분리균주의 Sky Blue-5B에 대한 최적 분해 조건은 최적 온도 35°C 부근, 최적 pH 7~8이었고, 배지내 유기질소원(yeast extract등) 존재하에서 효과적으로 색소를 분해하였으며, S/B-5B 200 mg/l를 첨가하여 37°C에서 배양하였을 때 12시간 이내에 100%의 분해율을 나타내었다.

3. 분리균주 *Proteus* sp. ST-1의 아조계 색소 분해효소는 세포내에 존재하며, 세포내 흡수에 의해 분해되는 것으로 추정되었다.

4. *Proteus* sp. ST-1 균주에 의한 Sky Blue-5B 분해산물은 Gas Chromatography /Mass Spectrometry 및 Spectrophotometer로서 분석한 결과 중간물질을 거치지 않고 분해되는 것으로 추정되었다.

5. 산업적 응용가능성을 검토해보면 염색폐수원수 유입온도가 20~50°C이며 생물학적 처리시간이 약 12시간(조정조 4~6시간, 폭기조 6~8시간)인 활성오니 표준 설계기준에 비추어 볼 때 실제 염색폐수처리에 적용가능할 것으로 보여진다

참고문헌

- 김공주, 이종문, 근순채, 1990, 염료화학, 대광서림, 5~41.
- 김동민, 김수생, 1988, 수질오염방지기술, 녹원출판, 487~521.
- 배재근, 배광욱, 正田 誠, 1993, Biodegradation and decolorization of reactive Dye by Fungus Decoll, 대한환경공학회지, 15(3), 517-525.
- 윤경하, 1994, 구름버섯(*Coriolus versicolor* IFO 30388)에 의한 POLY R-478 염료의 탈색, *Jour.Microbiol.*, 182~185.
- American Society for Microbiology, 1981, Manual of Method for general Bacteriology, U.S.A.

- Au, W., S. Pathak, C. J. Collie, and T. C. Hsu, 1978, Cytogenic Toxicity of Genetian Violet and Crystal Violet on mamalian Cells in Vitro, *Mutation Res.*, 58, 269~276.
- Bangert, R., W. Aichele, E. Schollmeyer, B. Neimann, and H. Herlinger, 1977, Photo oxidation von malchitgrun und kristallviolett, *Melliand Textilber.*, 5, 399~404.
- Bergey's, Manual of Determinative Bacteriology, 1974, 8th ed., the William and Wilkams Co., U.S.A.
- Bergey's, Manual of Systemic Bacteriology, 1984, vol. 1, The William and Wilkams Co., U.S.A.
- Bradshaw, L. T., 1982, Laboratory Microbiology, 3rd ed., W. H. C. Brown Co. Publishers.
- Cripps, C., J. A. Bumpus, and S. D. Aust, 1990, Biodegradation of Azo and Heterocyclic Dyes by *Phanerochaete chysosporium*, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 1666~1671.
- Groff, K. A. and B. R. Kim, 1989, Textile Wastes, *J. Water pollution control Fed.*, 61(6), 872~876.
- Idaka, E., T. Ogawa, C. Yatome and H. Horitsy., 1985, Behavior of Activated Sludge with Dyes, *Bull. Environ. Toxicol.*, 35, 729~734.
- Jean, F. and Mc Faddin, 1980, Biochemical Test for Identification of Medical Bacteria, The William and Wilkams Co., U.S.A., 441.
- Johnson, R. F. A., Zenhausern and H. Zollinger, 1978, Azo Dye, in F. F. Mark, J. J. Maketta, Jr, D. F. Othmer, and A. Standen(ed), *Kirkothmer encyclopedia of chemical technology*, 2nd, ed, vol. 2, John Wiley and Sons, Inc., New York. 868~910.
- Kurane, R., and Sazuki, T., 1988, Biological Decolorization of industrial Waste Water containing soluble Dyes, *Jpn. Kokai Tokkyo Koho JP 63/129596A2*, Japan.
- Manning, B. W., C. E. Cerniglia and T. W. Federle, 1985, Metabolism of the Benizidine based Azo Dye Direct Black 38 by Human intestinal Microbiota, *Appl. Environ. Microbiol.*, 50(1), 10~15.
- Meyer, U., 1981, Biodegradation of Synthetic Organic Colorants, in *Microbial Degradation of Xenobiotics and Recalcitrant Compounds*, Academic Press., London, 371-375.
- Ogawa. T., E. Idaka and Y. Yatome, 1981, Acclimation of Activated Sludge to Dye, *Bull Environ. contam. Toxicol.*, 26, 31~37.
- Pagga, U. and D. Brown, 1986, Dyestuffs in aerobic Biodegradation Tests, *Chemosphere.*, 15, 479~491.
- Rafii, F., W. Flanklin and C. E. Cerninglia, 1990, Azoreductase Activity of anaerobic Bacteria isolated from Human Intestinal Microflora, *Appl. Environ. Microbiol.*, 56, 2146~2151.
- Shelley, M. L., C. W. Randall and P. H. King, 1976, Enalation of Chemical-Biological and Chemical-Physical Treatment for Texile Dyeing and finishing Waste, *J. Wat. Poll. Control Fed.*, 48(4), 753~761.
- Vaidya, A. A. and K. V. Datye, 1982, Enviromental Pollution during Chemical Processing of Synthetic Fibers Colourage, *European J. Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 14, 3~10.