

Stenotrophomonas maltophilia EJ-211에 의한 Remazol Black B의 분해 특성 분석

이은정 · 임광희¹ · 임동준² · 이은열*

경성대학교 공과대학 식품공학과

¹대구대학교 화학공학과

²영남대학교 화학공학과

Characterization of Remazol Black B-Biodegradation by Stenotrophomonas maltophilia EJ-211

Eun Jung Lee, Kwang Hee Lim¹, Dong Joon Lim² and Eun Yeol Lee*

Department of Food Science and Technology, College of Engineering,
Kyungsoong University, Busan 608-736, Korea

¹Department of Chemical Engineering, Daegu University, Kyongbuk 712-714, Korea

²Department of Chemical Engineering, Yeungnam University, Kyongbuk 712-749, Korea

Abstract

A reactive dye-degrading bacterium was isolated from textile waste water and it was identified as *Stenotrophomonas maltophilia* based on its biochemical characteristics. The effects of additional carbon and nitrogen sources were investigated for the development of an optimal medium for biodegradation of Remazol Black B by *S. maltophilia*. The optimal pH and temperature were determined to be 6.5 and 30°C, respectively. Remazol Black B with the initial concentration of 50 ppm could be degraded up to 86% within 28 h.

Key words – Remazol Black B, *Stenotrophomonas maltophilia*, biodegradation

서 론

염색 가공 산업의 발전과 함께 약 100,000 종류 이상의 염료가 제조되었으며, 연간 7×10^5 ton이 생산되고 있다[1,6]. 이들 염료 중 반응성 염료인 azo계 염료가 색의 선명성, 사용 편리성, 그리고 안정성 등의 장점으로 인하여 섬유 가공 산업에 많이 사용된다[11]. 일반적으로 섬유 염색 공정 중에

사용된 염료들은 염료 사용량의 10% 정도가 염색 폐수로 배출되는데, 그 중 대부분을 azo계 염료가 차지한다[12]. Azo계 염료는 인공적으로 합성된 염료로서 배출된 염색 폐수는 생물학적 분해가 어려워 심각한 수질 오염을 야기시키고 있다. 따라서, 보다 효율적인 염색 폐수 처리 방법의 개발이 요구되고 있다.

일반적인 염색 폐수 처리는 흡착, 침전, 산화, 막분리 등의 물리적·화학적 방법으로 빠르게 처리할 수 있는 장점이 있지만, 고가의 처리시설과 과도한 유지비가 필요하며, 특히 화학적 처리의 경우 화학약품의 사용에 따른 2차 오염

*To whom all correspondence should be addressed
Tel : 82-51-620-4716, Fax : 82-51-622-4986
E-mail : eylee@star.ac.kr

문제가 있다. 반면에, 생물학적 처리방법은 환경 친화적이며 비용이 저렴하여 염색 폐수 처리 기술로서 선호되고 있다[1,5].

가장 많이 사용되고 있는 염료 중 하나인 azo 계 염료는 구조상 자연계에 존재하는 화합물이 아니기 때문에 전형적인 활성 슬러지 공정으로는 효율적인 처리가 힘들기 때문에 색도 배출 허용 기준을 충족시키기 어렵다[3,4,9]. 따라서, 난분해성 염료에 대한 생분해능이 우수한 미생물의 분리가 요구되고 있으며[8], 몇몇 박테리아는 혐기적·호기적 조건에서 azo dye를 완전히 분해시킬 수 있는 것으로 알려져 있다[2,7,10].

본 논문에서는, 염색 폐수에 존재하는 난분해성 diazo 계 반응성 염료인 Remazol Black B에 대한 생분해능이 우수한 미생물을 새로이 분리하여 생화학적 특성을 조사하였다. 보조 탄소원 및 질소원의 영향, 초기 pH 그리고, 온도 등이 미생물의 염료 생분해에 미치는 영향을 분석하여 최적 분해 조건을 결정하고자 하였다.

재료 및 방법

Remazol Black B 분해균의 분리 및 동정

유일탄소원으로 Remazol Black B의 최종 농도가 200 ppm이 되게 한 M9 (Na₂HPO₄ 6 g/l(w/v), KH₂PO₄ 3g/l(w/v), NH₄Cl 1 g/l(w/v), NaCl 0.5 g/l(w/v), 그리고 CaCl₂ 3 mg/l(w/v)) 고체 배지에 1000배 희석한 염색 공단 폐수 시료를 100 µl씩 분주하여 spreading하고, 30 °C에서 7일간 배양한 후 탈색 여부를 육안으로 확인하여 탈색능이 있는 콜로니를 1차 선별하였다. 탈색능이 있는 콜로니들을 최종 염료 농도가 40 ppm인 5ml LB (Luria-Bertani)가 들어 있는 15 ml의 test tube에 접종하여 30 °C, pH 6.5에서 24 hr 정도 진탕 배양하여 600 nm 파장에서 UV/VIS Spectrophotometer (아나랩 사, 한국)를 이용하여 흡광도 측정을 통해 탈색능이 가장 우수한 콜로니를 2차로 선별하였다. 분리된 균주의 동정은 API 2E kit (bioMerieux 사, 한국)를 이용하여 수행하였다.

기본 배지별 염료 분해능 평가

Remazol Black B 분해균을 배양하기 위한 기본 배지를 선택하기 위하여 Table 1에 제시되어 있는 변형된 LB 배지,

Table 1. The compositions of various media used in this study

Composition	LB (%)	Modified LB (%)	Modified YEPG (%)	Modified YMPG (%)
Ammonium sulfate			0.02	
Glucose	1.0	1.0	0.1	1.0
K ₂ HPO ₄		0.13		
KH ₂ PO ₄		0.44		0.2
Malto extract				1.0
MgSO ₄ · 7H ₂ O		0.0147		0.1
NaCl	1.0	0.2		
NaH ₂ PO ₄		0.13		
Trypton peptone	1.0	1.0	0.2	0.2
Yeast extract	0.5	1.0	0.02	1.0

변형된 YEPG 배지, 변형된 YMPG 배지, 그리고 LB 배지를 이용하여 염료 분해능을 비교·분석하여 보았다. Remazol Black B 탈색을 측정은 최종 염료 농도가 50 ppm인 20 ml의 배지들을 각각 300 ml 삼각 플라스크에 넣은 후, 분리균 1백 균이를 취하여 접종하고, 250 rpm, 30°C에서 배양하면서, 일정 시간 간격으로 0.5 ml씩 sampling하여 20분간 10,000 rpm으로 고속 원심분리를 한 후, 상등액을 취하여 600 nm에서의 흡광도 감소율로 염료 분해능을 조사하였다. 또한, 이때의 세포 생장률을 알아보기 위해 상등액을 완전히 제거하고 남아있는 pellet을 증류수로 두 번 세척하여 염료를 완전히 제거하고, 증류수로 시료가 0.5 ml이 되게 한 후 현탁하여 600 nm에서 흡광도를 측정하였다.

보조 탄소원과 질소원의 영향

분리균의 Remazol Black B 탈색율에 미치는 보조 탄소원의 영향을 알아보기 위해 기본 배지로는 변형된 YEPG 배지를 사용하였으며, 초기 접종 균량은 OD₆₀₀ 값이 3.0 정도 되도록 조정하여 실험하였다. 포도당의 농도는 0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0 그리고 10.0%(w/v)로 변화시키면서 염료 분해 정도와 성장 정도를 비교·분석하였다.

질소원의 영향은 1.0%(w/v)의 포도당이 첨가된 기본 배지인 변형된 YEPG 배지에서 질소원에 해당되는 ammonium sulfate, trypton peptone, yeast extract를 각각 0.5%(w/v)씩 첨가하여 질소원의 종류별 염료 분해 정도를 흡광도를

측정하여 비교·분석하였다.

초기 pH와 온도의 최적화

배양액의 초기 pH가 분리균이 염료 분해에 미치는 영향을 알아보기 위하여 최적화시킨 변형된 YEFG 배지의 pH를 5.5, 6.5, 7.5, 8.5 그리고 9.5로 조절한 후 초기 염료 분해율을 측정하였다. 또한, 최적의 분해능을 주는 온도를 알아보기 위해 온도를 20, 30, 35, 40, 그리고 45℃로 조절한 후 염료 분해 속도를 비교·분석하였다.

최적 조건에서의 분해능 평가

최적화시킨 기본 배지에 OD₆₀₀ 값이 3.0이 되도록 초기 균량을 조절한 후 30℃, 200 rpm의 shaking incubator에서 배양하면서 일정시간 간격으로 시료를 채취하여 염료가 분해되는 정도를 관측하였다.

결과 및 고찰

균주의 동정 및 생리·생화학적 특성 분석

장립 염색 공단 폐수 시료로부터 Remazol Black B를 유일 탄소원으로 제공하여 반응성 염료 분해능이 우수한 미생물을 채취한 시료에서 순수 분리하였다. 분리된 균주는 그람 음성균이며, 간균으로 LB 고체 배지 상에서는 우유빛의 불투명한 색을 지닌 콜로니를 형성하였다. Oxidase 활성 평가에서는 양성 반응을 보였으며, galactose, lysine, citrate, gelatine 등을 이용하는 것으로 나타났다. API 20E kit를 이용해 생화학적 특성을 알아본 결과(Table 2), 분리된 균주는 *Stenotrophomonas maltophilia*로 동정되었으며, *S. maltophilia* EJ-211로 명명하였다.

기본 배지별 염료 분해능 평가

S. maltophilia EJ-211 세포 배양 및 염료 분해능 평가를 위한 기존 연구에서 많이 사용되고 있는 배지 중 4개를 선택하여 염료 분해 정도를 평가해 보았다. 초기 염료 분해 정도는 변형된 YEFG 배지가 나머지 배지에서보다 약 2배 수준으로 높게 나타났다(Table 3). 그러나, 54 시간 후 최종 분해 정도는 오히려 나머지 배지들보다 1.5-2배 정도가 낮은 것을 관찰할 수 있었는데, 변형된 YEFG 배지에서 세포 성장 정도도 다른 배지에 비해 약 1.5-2 배정도 낮은 것으로 보아,

Table 2. Biochemical characteristics of *Stenotrophomonas maltophilia* EJ-211 examined by the API 20E Kit

Characteristics	Reaction
ortho-nitro-phenyl-β-D-galactopyranoside (ONPG) or isopropylthiogalactopyranoside (IPTG)	+
arginine	-
lysine	+
ornithine	-
sodium citrate	+
sodium thiosulfate	-
urea	-
tryptophane	-
creatine sodium pyruvate	-
Kohn's gelatin	+
glucose	-
mannitol	-
inositol	-
sorbitol	-
rhamnose	-
sucrose	-
melibiose	-
amygdalin	-
arabinose	-
oxidase	-

이는 배지에 포함되어 있는 주요 성분의 농도가 낮기 때문으로 판단된다. Table 1에서 변형 YEFG 배지의 조성을 살펴보면, 다른 배지에는 함유되어있지 않은 ammonium sulfate가 들어있으며, 세포 성장에 가장 영향을 많이 미치는 탄소원인 glucose의 농도가 0.1%(w/v)로 다른 배지에 비해 농도가 10배정도 적게 함유되어 있다. 따라서, 기본 배지로 변형된 YEFG 배지를 사용하기로 하고, 주요 배지 성분인 보조 탄소원, 질소원의 영향을 살펴보기로 하였다.

보조 탄소원의 영향

보조 탄소원이 Remazol Black B 분해능에 미치는 영향을 살펴보기 위하여 보조 탄소원으로 포도당을 0.1~1.0%(w/v)의 농도로 첨가한 후 초기 염료 분해능을 평가해 보았다. 포도당이 0.1~1.0%(w/v)경우에 염료 이외에 보조탄소원이 제공되지 않은 대조군 대비 약 7~20% 정도 향상되었다. 포도당 1.0% (w/v)로 제공된 경우 24시간 후에 약 83% 정

Table 3. Initial degradation extent, final extent of dye degradation by *S. maltophilia* EJ-211 and cell growth extent on various media

Medium	Initial extent of degradation ^a	Final extent of degradation (%) ^b	Cell growth extent ^c
LB	26	82	4.56
Modified LB	25	60	5.48
Modified YEPCG	50	39	3.02
Modified YMPG	26	56	5.08

^aInitial extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 24hr) / O.D. at 0hr] × 100

^bFinal extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 54hr) / O.D. at 0hr] × 100

^cCell growth extent = O.D. at 54hr - O.D. at 0hr

Table 4. The Effects of various glucose concentrations on initial dye degradation extent, final extent of dye degradation and cell growth extent

Glucose conc. (%(w/v))	Initial extent of degradation (%) ^a	Final extent of degradation (%) ^b	Cell growth extent ^c
0	25	45	1.64
0.1	31.67	50	2.60
0.2	36.67	68	2.76
0.5	43.33	70	3.72
1.0	45	83	3.92
10.0	31.67	47	4.88

^aInitial extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 6hr) / O.D. at 0hr] × 100

^bFinal extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 24hr) / O.D. at 0hr] × 100

^cCell growth extent = O.D. at 24hr - O.D. at 0hr

도까지 염료가 분해된 반면, 대조군의 경우 45% 수준의 분해률을 보여 분리균은 보다 효율적인 염료 분해를 위해서는 보조 탄소원 제공이 필요함을 알 수 있었다. 포도당 10% (w/v)의 고농도로 제공하는 경우 균의 성장 및 염료 분해능이 저하되는 것을 관찰할 수 있어, 보조 탄소원의 최적농도를 1.0%(w/v)로 결정하였다.

질소원의 영향

질소원이 Remazol Black B 분해능에 미치는 영향을 살펴 보기 위하여 질소원으로 ammonium sulfate, trypton peptone, yeast extract를 제공하고 염료 분해능을 측정하였다. 0.5%(w/v)의 trypton peptone를 넣어준 경우, 초기 염료 분해 정도가 질소원이 없는 대조군에 비해 약 2 배, yeast extract를 질소원으로 제공한 경우보다 약 1.3 배 높았다. 24시간 후 균체량은 대조군에 비해 약 3 배 증가하였으며, 분해 정도도 81%로 약 24% 정도 향상되었다. 반면에, yeast ex-

tract의 경우 균 생장률은 가장 높았으나 대조군 및 ammonium sulfate가 들어간 경우와 거의 비슷한 분해 정도를 보여주었다(Table 5). 따라서, 본 실험에서 trypton peptone을 질소원으로 결정하고 농도별 영향을 분석해 보았다. Trypton peptone이 0.5%(w/v) 이하의 농도로 제공된 경우 염료 분해 향상 결과를 얻을 수 없었으며, 1.0~5.0%(w/v)에서는 염료 분해 정도가 27~30%로 수준으로 향상된 것을 관찰할 수 있었다(Table 6). 질소원을 trypton peptone 1.0%(w/v)을 사용하였다.

초기 pH 및 온도가 염료 분해에 미치는 영향

초기 pH 변화가 Remazol Black B 분해능에 미치는 영향을 분석하기 위하여 pH를 5.5, 6.5, 7.5, 8.5, 9.5로 변화시키면서 초기 염료 분해능을 평가해 보았다. Fig. 1에 제시된 바와 같이 pH 6.5에서 분해률이 약 17%로 가장 높았으며, pH 5.5와 7.5에서는 각각 14.6%와 13.3% 수준을 나타내어 중성

Table 5. The Effects of various nitrogen sources (0.5%(w/v)) on initial dye degradation extent, final extent of dye degradation and cell growth extent

Nitrogen sources (0.5%(w/v))	Initial extent of degradation (%) ^a	Final extent of degradation (%) ^b	Cell growth extent ^c
None	27	57	1.04
Ammonium sulfate	23	60	1.45
Tryptone peptone	50	81	3.53
Yeast extract	38	60	4.40

^aInitial extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 6hr) / O.D. at 0hr] × 100

^bFinal extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 24hr) / O.D. at 0hr] × 100

^cCell growth extent = O.D. at 24hr - O.D. at 0hr

Table 6. The effects of trypton peptone on degradation extent and cell growth extent at various concentrations (0, 0.1, 0.2, 0.5, 1.0, and 5.0% (w/v))

Tryptone peptone conc. (% (w/v))	Extent of degradaton (%) ^a	Cell growth extent ^b
0	50	0.94
0.1	47	0.94
0.2	47	2.14
0.5	52	2.98
1.0	77	2.42
5.0	80	4.86

^aExtent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 24hr) / O.D. at 0hr] × 100

^bCell growth extent = O.D. at 24hr - O.D. at 0hr

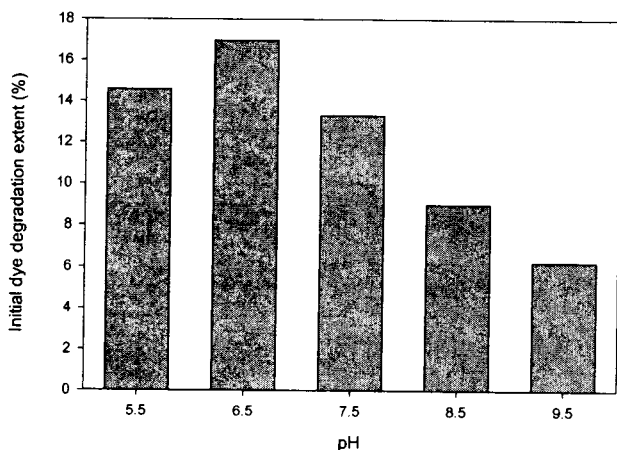


Fig 1. Effect of initial pH (5.5, 6.5, 7.5, 8.5 and 9.5) on initial dye degradation extent.

부근에서 염료 분해능이 우수함을 알 수 있었다. 반면에 염기성 영역인 pH 8.5와 9.5에서는 pH 6.5에 비해 약 37~52.6

% 정도 분해률이 저하되는 것을 볼 수 있었다.

온도에 따른 *S. maltophilia* EJ-211에 의한 염료 분해 정도를 알아보기 위해 30, 35, 40°C에서 염료 분해능을 평가해 보았다. 초기 염료 분해 정도는 거의 비슷하지만, 24시간 후 30°C에서의 분해 정도가 다른 온도에 비해 6.7~14.1% 가량 향상된 61.7%를 나타내어 최적 온도를 30°C로 결정하였다 (Table 7).

Remazol Black B 분해 동력학

최적 농도의 보조탄소원 및 질소원을 첨가시킨 변형된 YEPG에서 *S. Maltophilia* EJ-211에 의한 Remazol Black B 분해 동력학을 살펴보았다. Fig. 2에서와 같이 초기에는 빠른 분해능을 보여주어 18시간 내에 60%수준의 분해률을 보였으며, 28시간 경과 후 약 86% 분해률을 보여주어 염색 공단 폐수에서 분리한 *S. maltophilia* EJ-211은 난분해성 염료인 Remazol Black B에 대해 우수한 생분해능을 보임을 알 수 있었다.

Table 7. Dye degradation extent at 30, 35 and, 40°C

Temp. (°C)	Initial dye degradation extent (%) ^a	Final dye degradation extent (%) ^b
30	33.9	61.7
35	38.3	55.0
40	27.7	47.6

^aInitial extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 6hr) / O.D. at 0hr] × 100

^bFinal extent of degradation = [(O.D. at 0hr - O.D. at 24hr) / O.D. at 0hr] × 100

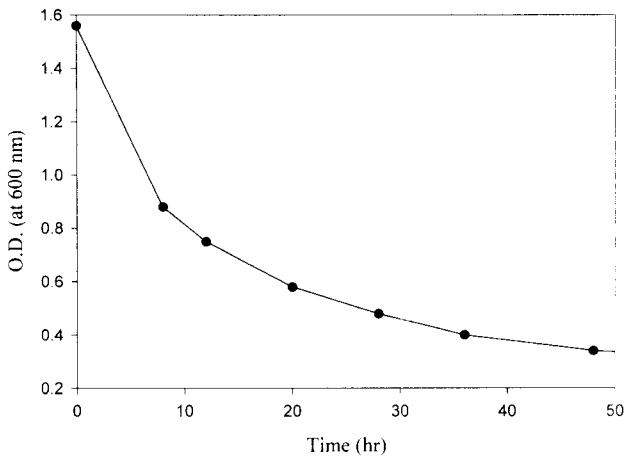


Fig. 2. Biodegradation of Remazol Black B by *S. maltophilia* EJ-211.

요 약

염색 공단 폐수로부터 채취한 시료에서 Remazol Black B를 유일 탄소원으로 성장할 수 있는 미생물들을 순수 분리하고, 염료 분해능이 가장 우수한 균주를 API 20E kit를 이용해 생화학적 특성을 분석해 본 결과, *Stenotrophomonas maltophilia* EJ-211로 명명하였다. *S. maltophilia* EJ-211에 의한 난분해성 반응염료인 Remazol Black B 분해 반응을 분석한 결과, 보조 탄소원으로 포도당 1.0%(w/v), 질소원으로 trypton peptone은 1.0%(w/v), 30°C, pH 6.5의 최적 조건을 결정할 수 있었다. 호기적 조건에서의 *S. maltophilia* EJ-211의 Remazol Black B는 28시간 동안 약 86% 수준의 염료 분해능을 보여주어 Remazol Black B에 대한 생분해능이 아주 우수함을 확인할 수 있었다.

감사의 글

본 연구는 2001년도 차세대 핵심 환경 기술 개발 사업(단위사업명: 지역환경 현안 기술 개발)의 지원으로 수행된 연구결과이며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. Banat, I. M., P. Nigam, D. Singh and R. Marchant.

1996. Microbial decolorization of textile-dye-containing effluents: a review. *Biores. Technol.* **58**, 217-227.

2. Blumel, S., M. Contzen, M. Lutz, A. Stolz and H. J. Knackmuss. 1988. Isolation of a bacterial strain with the ability to utilize the sulfonated azo compound 4-carboxy-4-sulfoazobenzene as sole source of carbon and energy. *Appl. Environ. Microbiol.* **64**, 2315-2317.

3. Bromley-Challenor, K. C. A., J. S. Knapp, Z. Zhang, N. C. C. Gray, M. J. Hetheridge and M. R. Evans. 2000. Decolorization of an azo dye by unacclimated activated sludge under anaerobic conditions. *Water Res.* **34**, 4410-4418.

4. Brown, M. A. and S. C. DeVito. 1993. Predicting azo dyes. *Crit. Rev. Environ. Sci. Technol.* **23**, 249-324.

5. Chang, J. S. and Y. C. Lin. 2000. Fed-batch bioreactor strategies for microbial decolorization of azo dye using a *Pseudomonas Luteola* strain. *Biotechnol. Prog.* **16**, 979-985.

6. Correia, V. M., T. Stephenson and S. J. Judd. 1994. Characterization of textile wastewaters: a review. *Environ. Technol.* **15**, 917-929.

7. Coughlin, M. F., B. K. Kinkle, A. Tepper and P. L. Bishop. 1997. Characterization of aerobic azo dye-degrading bacteria and their activity in biofilms. *Water Sci. Tech.* **36**, 215-220.

8. Hayase, N., K. Kouno and K. Ushio. 2000. Isolation and characterization of *Aeromonas* sp. B-5 capable of decolorizing various dyes. *J. Bioshi. Bioeng.* **90**, 570-573.

9. Kiby, N., R. Marchant and G. McMullan. 2000. Decolourisation of synthetic textile dyes by *Phleia tremellosa*. *FEMS Microbiol. Lett.* **188**, 93-96.

10. Oxspring, D. A., G. McMullan, W. F. Smyth and R. Marchant. 1996. Decolourisation and metabolism of the reactive textile dye Remazol Black B, by an immobilized microbial consortium. *Biotechnol. Lett.* **18**, 527-528.

11. Phillips, D. 1996. Environmentally friendly, productive and reliable : priorities for cotton dyes and dyeing processes. *J. Soc. Dyes Colourists* **112**, 183-186.

12. Zollinger, H. 1987. Colour Chemistry : Synthesis, Properties and Applications of Organic Dyes and Pigments. pp 92-100. VCH Publishers, New York.

(Received April 17, 2002; Accepted May 28, 2002)