

## 쪽 염료 니람으로부터 *Comamonas* sp.와 *Microbacterium* sp.의 분리 및 특성분석

장성은<sup>1,2</sup>, 이남근<sup>1</sup>, 이유리<sup>1</sup>, 최미성<sup>3</sup>, 정용섭<sup>1,2\*</sup>

### Isolation and Characterization of *Comamonase* sp. and *Microbacterium* sp. from Deep Blue Sediment Dye of *Polygoum tinctoria*, Niram

Seong Eun Jang<sup>1,2</sup>, Nam Keun Lee<sup>1</sup>, Yuri Lee<sup>1</sup>, Mee-Sung Choi<sup>3</sup>, and Yong-Seob Jeong<sup>1,2\*</sup>

접수: 2013년 1월 17일 / 게재승인: 2013년 1월 28일  
© 2013 The Korean Society for Biotechnology and Bioengineering

**Abstract:** Two strains were isolated from the traditional Deep Blue Sediment Dye of *Polygoum tinctoria*, Niram, and temporarily named Niram A and Niram B, respectively. The phylogenetic analysis revealed that strain Niram A and B were closely related to the members of the genus *Comamonas* and *Microbacterium*, respectively. Strain Niram A exhibited the highest 16S rRNA gene sequence similarity to *C. aquatica* LMG 2370<sup>T</sup> (98.06%). Strain Niram B showed 100% homology with *M. oxydans* DSM 20578<sup>T</sup> and *M. maritypicum* DSM 12512<sup>T</sup>. The growth of the strain Niram A and B was not inhibited in Niram medium containing high calcium concentration without free sugar as carbon source. The reducing Niram is greenish. Therefore, the reducing ability on the Niram of the strains Niram A and B were determined with the color difference of the  $a^*$  values of Niram fermented-fluids. The  $a^*$  value indicates the level of redness (positive value) or greenness (negative value). The green color is increasing towards the negative value. In all samples fermented for 10

days, the  $a^*$  values among samples were no significant difference. However, samples fermented for 15 days have an appreciable change. After fermentation for 15 days, the control Niram sample had  $-3.96 \pm 0.02$  of the  $a^*$  value. On the other hand, the Niram samples fermented with the strain Niram A and B showed  $-4.20 \pm 0.02$  of the  $a^*$  value and  $-7.86 \pm 0.03$  of the  $a^*$  value, respectively. In the reducing ability on the Niram, the strain Niram B was significantly better than the strain Niram A.

**Keywords:** *Polygoum tinctoria*, *Comamonas* sp., *Microbacterium* sp., fermentation

#### 1. 서론

쪽 (*polygoum tinctoria*)은 오래전부터 원산지인 인도와 중국을 필두로 전 세계에서 전통적으로 사용되어오고 있는 청색 천연염료의 소재이다. 현재 우리나라의 쪽은 인도, 필리핀 등지에서 재배되는 인도쪽, 유럽에서 재배되는 대청과는 달리 일본, 중국에서 재배되는 요람을 사용하고 있으며, 전라남도 나주를 중심으로 전 지역에서 재배되고 있다. 쪽을 이용한 염색 방법으로는 대표적으로 생잎을 바로 사용하는 생염 염법과 생잎을 물로 우려내 색소를 석회로 침전시켜 니람(泥藍)을 만든 후 필요할 때 발효하여 사용하는 침전 염법이 사용되고 있다 [1].

쪽의 생잎에는 인디고 전구체인 배당체 형태인 인디칸으로 존재하고 있으며, 인디칸은 잎 속의  $\beta$ -glucosidase에 의해

<sup>1</sup>전북대학교 바이오식품소재개발 및 산업화연구센터  
<sup>1</sup>Research Center for Industrial Development of Biofood Materials, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea  
Tel: +82-63-270-2571, Fax: +82-63-270-4344  
e-mail: ysjeong@jbnu.ac.kr

<sup>2</sup>전북대학교 식품공학과  
<sup>2</sup>Department of Food Science and Technology, Chonbuk National University, Jeonju 561-756, Korea

<sup>3</sup>동신대학교 의상디자인학과  
<sup>3</sup>Department of Costume Design, Dongshin University, Naju 520-714, Korea

인독실로 전환되어 공기와 접촉하면 바로 인디고로 변화된다. 이러한 인디고는 불용성 물질로 섬유와 친화성이 없어 알칼리 조건에서 환원을 통해 수용성 물질인 류코화합물로 변화시켜 섬유 염색에 사용하고 있다 [1,2].

일반적으로 인디고의 환원은 하이드로설파이드와 같은 약품을 쓰는 화학적 환원과 미생물 발효를 통한 생물학적 환원을 들 수 있으며, 현재에는 대부분 화학적으로 불용성 인디고를 환원시켜 섬유 염색에 사용하고 있다 [2]. 그러나 화학적 환원 염색법은 환경과 안전성 등 많은 문제를 야기시킬 수 있어 전통 방식인 미생물 발효법에 대한 관심이 높아지고 있다 [3].

현재 쪽 염색의 미생물 발효법은 전통적으로 전승되고 있는 형식으로 쪽잎을 항아리에 넣고 2~3일 정도 방치하여 색소를 용출한 후 굴 또는 조개껍질을 구워 만든 석회가루를 넣어 공기 중에서 교반하여 얻어진 푸른색의 침전물인 니람을 발효하여 섬유에 염색하는 것으로 과정이 복잡하여 주로 염색 장인들과 애호가들에 의해 계승되고 있다 [4].

니람은 순수한 인디고 성분이 아닌 여러 성분들이 혼합되어 있는 것으로 니람의 품질 및 발효 환경에 따라 섬유에 대한 쪽 염색이 결정된다. 따라서 니람 제조뿐만 아니라 섬유 염색을 위한 니람 발효는 쪽 염색 과정에 있어서 매우 중요하다. 그러나 아직 니람 발효에 대한 연구는 미비하며, 특히 니람 발효의 핵심인 발효 미생물에 관한 연구 보고는 거의 없는 실정이다.

본 연구에서는 전통적으로 제조된 니람으로부터 미생물들을 분리·동정하고, 순수 니람 배양액만으로 분리된 미생물들의 생장과 발효에 따른 환원적 특성을 분석하여 향후 니람 발효 미생물들에 대한 기초자료로 활용하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1. 실험 재료

실험에 사용된 니람은 전라남도 나주시 천연염료 기능 및 마

케팅 활성화 사업단에서 전통방식으로 제조된 니람을 제공받아 사용하였다. 니람 내에 미생물을 분리하기 위한 배지로는 영양한천 배지 (Difco™ Nutrient Agar, BD, USA)를 사용하였으며, 미생물들의 생장 및 발효에 사용된 니람은 동결 건조하여 사용하였다.

### 2.2. 균주 분리

니람으로부터 미생물을 분리하기 위해서 니람 10 g을 멸균 식염수 10 배수로 희석하여 pH 10 (니람 pH)으로 맞춰진 영양한천배지에 도말하여 37°C 배양기에서 균의 집락이 보일 때 까지 배양하였다.

### 2.3. 분리 균주의 동정

미생물 동정은 16S rDNA 염기서열 분석으로 하였으며, 분석은 (주)솔젠트 (Daejeon, Korea)에 의뢰하였다. PCR 및 sequencer는 각각 ABI 9700 PCR (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)과 ABI 3730XL DNA Analyzer (Applied Biosystems, USA)가 사용되었다. 분석된 미생물의 16S rDNA 염기서열을 Clustal W 소프트웨어를 이용하여 EzTaxon 서버로부터 얻은 유사성이 높은 염기서열을 정렬 후 계통학적 분석 (phylogenetic analysis)을 실시하였다 [5,6]. 계통학적 분석은 Neighbor-Joining과 maximum-likelihood 알고리즘들을 이용하여 분석하였다 [7,8]. 진화적 거리는 Jukes-Cantor법 [9]을 이용하였으며, 1,000번의 재 샘플링을 통하여 부트스트랩 값을 분석하였다 [10]. 이 같은 계통학적 분석에는 MEGA5 소프트웨어 프로그램을 이용하여 분석하였다 [11].

### 2.4. 니람 배지를 이용한 생균수 측정

니람에 어떠한 영양분도 첨가 없이 분리된 균주들이 생장할 수 있는지를 확인하기 위하여 50 mL 증류수에 1% 동결 건조된 니람을 첨가하고 121°C, 15분간 멸균 후 분리된 균주를 각각 10<sup>4</sup> cell 씩 접종 후 전통 니람 발효 조건과 유사하게 설정된 배양조건 (pH 10, 30°C, 100 rpm)으로 배양하면서 배양물을 샘플링 하여 도말법을 이용해 생균수를 측정하였다. 사용

**Table 1.** The content of free sugars, free amino acid, and inorganic matters in Niram

Component	Content (mg/g)	Component	Content (mg/100 g)
Free amino acids		Free sugars	
phosphoserine	0.21 ± 0.03	glucose	ND <sup>1)</sup>
taurine	11.55 ± 2.19	fructose	ND
asparagine	0.13 ± 0.00	sucrose	ND
aspartic acid	0.22 ± 0.12	Inorganic matters	
α-amino adipic	0.17 ± 0.02	Ca	22328.23 ± 545.45
citrulline	0.21 ± 0.04	Mg	1308.51 ± 12.95
isoleucine	0.23 ± 0.14	Na	288.87 ± 1.85
leucine	0.17 ± 0.05	K	224.55 ± 0.67
tyrosine	0.52 ± 0.47	Fe	242.41 ± 2.32
phenylalanine	0.16 ± 0.01	Cu	0.88 ± 0.01
ammonia	0.02 ± 0.00	Zn	21.64 ± 0.08
GABA	0.11 ± 0.02		

<sup>1)</sup>ND: not detected.

된 니람 원료의 성분은 Table 1과 같다.

## 2.5. 니람 발효물의 색차 측정

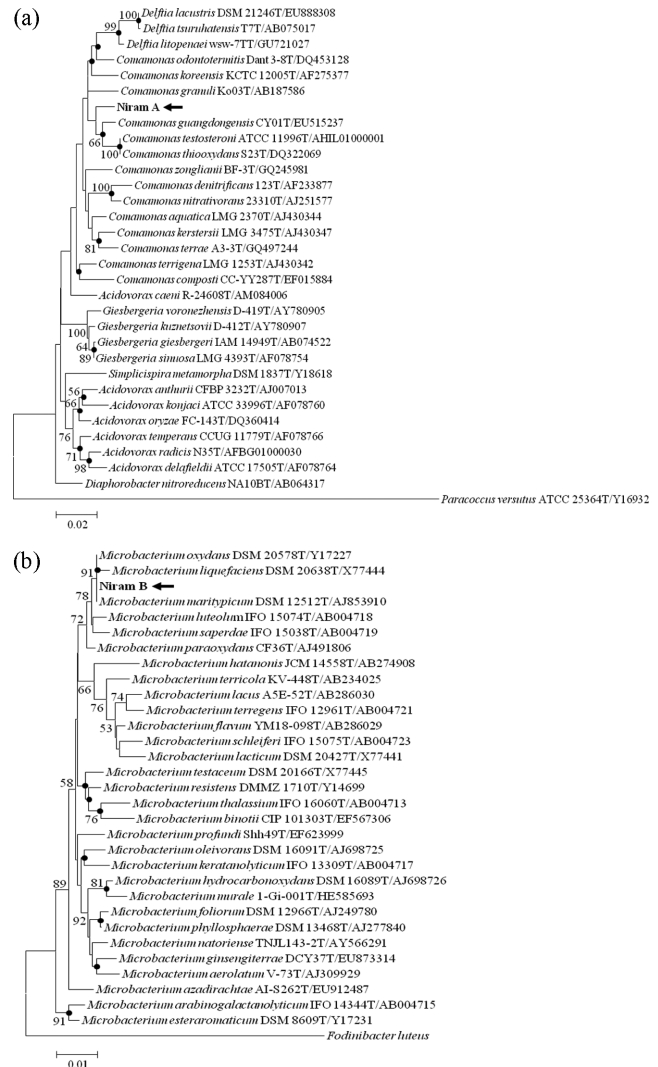
니람 발효물의 색차 변화를 측정하기 위해 동결 건조된 니람을 0.5 g을 취하여 증류수 50 mL에 넣고 121°C, 15분간 멸균한 후 분리된 각 균주들을 2%씩 접종하여 30°C, 100 rpm의 조건에서 니람을 15일간 발효 하였다. 대조구로서는 균주를 접종하지 않은 니람 배지를 동일한 조건으로 배양하였다. 발효물의 색차는 Color and Color Difference Meter (Super Color SP-80, Tokyo Denshoku Co. Ltd., Japan)를 이용해 측정하였다. 색차를 측정하기 위해 발효물을 5일차 간격으로 샘플링하여, 3000 rpm, 3분간 원심분리 한 후 상등액을 취해 색차를 측정하는데 사용하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1. 균주 분리 및 동정

알칼리 영양한천배지를 이용하여 전통적으로 제조된 니람 내 서식하는 미생물들을 확인한 결과, 황색의 집락을 보이는 균주와 흰색의 집락을 보이는 균주 각각 1종 씩 총 2종이 확인되었으며, 장기간 배양하여도 이들 균주 외에 새로 집락이 형성된 균주들은 보이지 않았다. 알칼리 영양한천배지 상에서 나타난 두 균주들을 계대 배양하여 순수 분리한 후 황색 집락 미생물을 Niram A로, 흰색 집락 미생물을 Niram B로 임의적으로 명명하였다.

니람으로부터 분리된 Niram A와 B 미생물의 16S rDNA 염기서열은 각각 1455 bp와 1388 bp가 분석되었으며, EzTaxon Clustal W 프로그램을 이용한 균주 유사성 검사 및 neighbour-joining과 maximum-likelihood 법에 의한 최종 계통분석 결과 (Fig. 1(a,b)), Niram A는 그람 음성세균인 *Comamonas* 종들과, Niram B는 그람 양성세균인 *Microbacterium* 종들과 계통적 유사성이 높게 나타났다. Niram A 균주는 *Comamonas* 종들에서 *C. aquatica* LMG 2370<sup>T</sup> 타입 균주와 16S rDNA 염기서열이 98.06%로 가장 높은 유사성을 보였으며, Niram B 균주는 *Microbacterium* 종들에서 *M. oxydans* DSM 2370<sup>T</sup>과 *M. maritpicum* DSM 12512<sup>T</sup>의 타입 균주들과 16S rDNA 염기서열의 유사성이 100%로 나타났다. *Comamonas* 종들은 토양, 활성슬러지, 해양퇴적물 등 다양한 곳에 서식하고 있는 환경 미생물들로서 대다수의 종들이 당을 동화하지 않는 특성을 가지고 있으며 [12], 최근 나프탈렌 디옥시제네이즈를 이용하여 인돌로부터 인디고를 생성하는 연구 결과가 보고되어 [13] *Pseudomonas* [14], *Acinetobacter* [15] 종들과 함께 인디고 생성 미생물로 알려져 있다. *Microbacterium* 종들 또한 공기, 토양, 물, 유제품 등 다양한 곳에서 분리되고 있으며, *Comamonas* 종들처럼 인디고와 관련된 연구 보고는 없으나 keto 에스터를 hydroxyl 에스터로의 환원 [16]과 불용성 플라보노이드들을 당을 붙여 수용성 플라보노이드로 전환한 연구 [17]가 보고되어져 있다. 추가적인 연구가 필요하



**Fig. 1.** Neighbour-joining phylogenetic tree, based on almost-complete 16S rRNA gene sequences, showing the relationships between strain Niram A (a) and Niram B (a) and representative members of the genus *Comamonas* (a) and *Microbacterium* (b). Bootstrap percentages over 50% (based on neighbour-joining analyses of 1,000 resampled datasets) are shown at nodes. Filled circles indicate generic branches that were present in both neighbour-joining and maximum likelihood algorithms. *Paracoccus versutus* ATCC 25364T/Y16932 (a) and *Fodimibacter luteus* (b) was used as an outgroup. Bar, 0.02 (a) and 0.01 (b) nucleotide substitutions per position.

지만 본 실험에서 *Comamonas* 종과 *Microbacterium* 종으로 동정된 Niram A와 B 균주들은 *Comamonas* 종과 *Microbacterium* 종들에서 보고된 인디고 생성, keto 에스터 환원, 글루코시화 등과 같은 유사한 기능을 보일 수 있다고 판단되었다.

### 3.2. 분리 균주 성장 및 니람 발효물 색차

니람에 어떤 첨가물도 가하지 않고 1% 배지화하여  $10^4$  cell을 접종시켜 성장을 관찰한 결과, Niram A 균주의 경우 유도

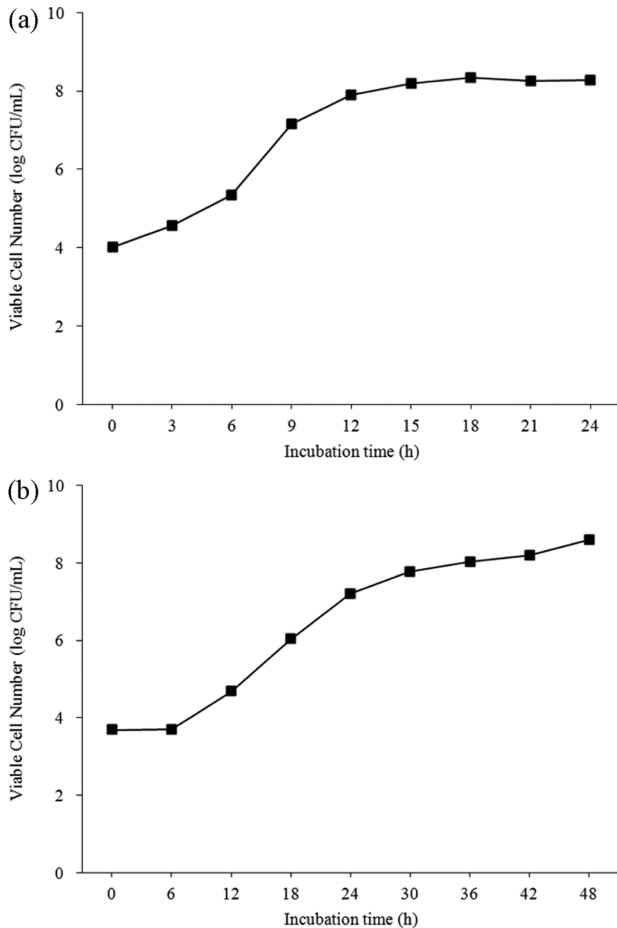


Fig. 2. The growth of the strain Niram B (a) and Niram A (b) in the Niram medium without any additives.

기가 거의 없이 바로 성장하였으며, 15시간에 정지기에 도달하는 것을 확인하였고, Niram B 균주는 6시간의 유도기를 거쳐 30시간에 정지기에 도달함을 확인하였다 (Fig. 2(a,b)). 이러한 결과를 통해 Niram A와 B 균주들은 탄소원으로서 유리당이 존재하지 않고 높은 농도의 갈습을 함유한 니람(Table 1)에서 저해 받지 않고 생장이 가능한 것으로 판단되었다.

전통적인 쪽 염색에서 푸른색의 불용성 니람이 발효되어 환원되면 녹색의 수용성 물질로 변화된다 [4]. 이것을 기초로 하여 분리된 균주들을 이용한 니람에 대한 환원은 니람을 발효시켜 그 발효물의 색차 값으로 결정하였으며, 색차 값 중  $a^*$  value의 변화 값을 분석하였다.  $a^*$  value의 경우 양의 값일 때 빨강, 음의 값일 때 녹색을 나타낸 값으로 음의 값이 증가할수록 색도 증가한다. 분리된 균주들에 의해 발효된 니람 발효물의 색차 값은 Fig. 3에 나타내었다. 대조구와 Niram B 균주의 경우 발효 기간 동안  $a^*$  value 값이 주기적으로 증가와 감소를 반복하였으며 발효가 진행되면서 점차 감소한 반면 Niram A균주의 발효물은 지속적으로 감소함을 확인할 수 있었다. 10일차 발효까지는 모든 시료에서  $a^*$  value가 큰 차이가 없으나, 15일차 발효물에서는 대조구의 경우  $a^*$  value가  $-3.96 \pm 0.02$ , Niram A 발효물은  $-4.20 \pm 0.02$ , Niram B 발효물은  $-7.86 \pm 0.03$ 으로 색차가 뚜렷하게 변화되는 양상을 보였으며, Niram A균주 보다는 Niram B균주에서 니람 발효에 따른 색차 변화가 크게 나타났다. 이상의 결과는 영양적 제한이 있는 강한 알칼리 상태의 니람 내에서 니람 발효에 관련된 미생물들을 분리한 것으로 쪽 발효

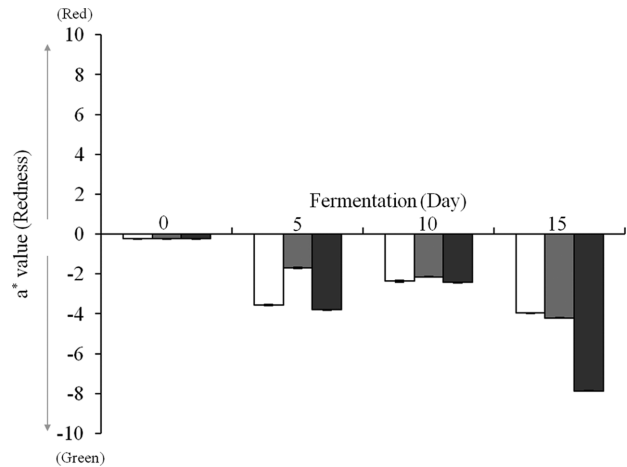


Fig. 3. The color difference of the  $a^*$  values of Niram fermented-fluids. White bar, Niram sample without the strains Niram A and B (control); Gray bar, Niram sample fermented by the strain Niram A; Black bar, Niram sample fermented by the strain Niram B.

효물은  $-7.86 \pm 0.03$ 으로 색차가 10일 니람 발효물 보다는 뚜렷하게 변화되는 양상을 보였다. 이는 니람이 분리된 균주들에 의해 발효가 진행되면서 환원이 되고 있는 결과로 판단되었으며, 향후 Niram A와 B 균주의 니람 발효 및 발효물을 이용한 섬유 염색 최적화 연구가 필요할 것으로 판단되었다.

#### 4. 결론

전통적으로 제조된 니람으로부터 미생물 2종을 분리하였으며, 이들의 16S rDNA 염기서열을 이용하여 계통분석을 한 결과 Niram A는 그람 음성세균인 *Comamonas* 종들과, Niram B는 그람 양성세균인 *Microbacterium* 종들과 유사성이 높게 나타났다. Niram A 균주는 *Comamonas* 종들에서 *C. aquatica* LMG 2370T 타입 균주와 98.06%로 가장 높은 유사성을 보였으며, Niram B 균주는 *Microbacterium* 종들에서 *M. oxydans* DSM 2370<sup>T</sup>와 *M. maritopicum* DSM 12512<sup>T</sup> 타입균주와 100%로 가장 높은 유사성을 보였다. 니람을 어떤 첨가물도 가하지 않고 1% 배지화 하여 생육을 관찰 결과, Niram A 균주는 15시간, Niram B 균주는 30시간에 정지기에 도달함을 확인하였으며, 유리당과 같은 탄소원이 없이 높은 농도의 갈습이 함유된 니람 배지에서 저해 받지 않고 잘 생장함을 확인 하였다. 니람에 대한 분리된 균주들의 환원에 따른  $a^*$  value의 색차는 발효 10일까지 대조구를 포함한 모든 시료에서  $a^*$  value가 큰 차이가 없으나, 15일차 발효물에서는 대조구의 경우  $a^*$  value가  $-3.96 \pm 0.02$ , Niram A 발효물은  $-4.20 \pm 0.02$ , Niram B 발효물은  $-7.86 \pm 0.03$ 으로 색차가 뚜렷하게 변화되는 양상을 보였으며, Niram A균주 보다는 Niram B균주에서 니람 발효에 따른 색차 변화가 크게 나타났다. 이상의 결과는 영양적 제한이 있는 강한 알칼리 상태의 니람 내에서 니람 발효에 관련된 미생물들을 분리한 것으로 쪽 발효

산업에서 아직 보고되지 않은 니람 발효 미생물들에 대한 기초적인 연구 결과로 판단된다.

## 감사

본 연구는 지식경제부 및 한국산업기술진흥원의 지역연구 산업육성사업의 연구결과로 수행되었음 (R000 1096).

## REFERENCES

- Oh, J. E. and C. S. Ahn (2011) A study on the current status and dyeing characteristics of natural indigo powder dye. *Journal of the Korean Society of Clothing and Textiles* 35: 736-747.
- Kim, M. K. and D. G. Jeon (2011) A study on the effect of the changes of dyeing conditions on the dyeability of cotton fabrics dyed with natural *Polygonum tinctoria*. *Journal of Fashion Business* 15: 144-154.
- Chung, I. M., I. H. Kim, and S. W. Nam (1998) Structural analysis of natural indigo colorants extracted from *Polygonum tinctorium*. *Journal of the Korean Society of Dyers and Finishers*. 10: 20-28.
- Lee, S. P. and S. H. Kim (2011) Study on the development of practical application of indigo dyes. *The Research Journal of the Costume Culture* 19: 612-621.
- Kim, O. S., Y. J. Cho, K. Lee, S. H. Yoon, M. Kim, H. Na, S. C. Park, Y. S. Jeon, J. H. Lee, H. Yi, S. Won, and J. Chun (2012) Introducing EzTaxon-e: a prokaryotic 16S rRNA gene sequence database with phylotypes that represent uncultured species. *Int. J. Syst. Evol. Microbiol.* 62: 716-721.
- Thompson, J. D., D. G. Higgins, and T. J. Gibson (1994) CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Res.* 22: 4673-4680.
- Saitou, N. and M. Nei (1987) The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Mol. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Felsenstein, J. (1981) Evolutionary trees from DNA sequences: a maximum likelihood approach. *J. Mol. Evol.* 17: 368-376.
- Jukes, T. H. and C. R. Cantor (1969) Evolution of protein molecules. In *Mammalian Protein Metabolism*, vol. 3, pp.21-132. Academic Press, NY, USA.
- Felsenstein, J. (1985) Confidence limits on phylogenies: an approach using the bootstrap. *Evolution* 39: 783-791.
- Tamura, K., D. Peterson, N. Peterson, G. Stecher, M. Nei, and S. Kumar (2011) MEGA5: Molecular Evolutionary Genetics Analysis using maximum likelihood, evolutionary distance, and maximum parsimony methods. *Mol. Biol. Evol.* 28: 2731-2739.
- Ni, B., Y. Zhang, D. W. Chen, B. J. Wang, and S. J. Liu (2012) Assimilation of aromatic compounds by *Comamonas stenospori*: characterization and spreadability of protocatechuate 4,5-cleavage pathway in bacteria. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 21: Published online.
- Qu, Y., X. Zhang, Q. Ma, F. Ma, Q. Zhang, X. Li, H. Zhou, and J. Zhou (2012) Indigo biosynthesis by *Comamonas* sp. MQ. *Biotechnol. Lett.* 3: 353-357.
- Bhushan, B., S. K. Samanta, and R. K. Jain (2000) Indigo production by naphthalene-degrading bacteria. *Let. Appl. Microbiol.* 31: 5-9.
- Qu, Y., W. Pi, F. Ma, J. Zhou, and X. Zhang (2010) Influence and optimization of growth substrates on indigo formation by a novel isolate *Acinetobacter* sp. PP-2. *Bioresour. Technol.* 101: 4527-4532.
- Christopher, R., K. Anthony, P. Victor, G. Randolph, and C. Michel (1996) Asymmetric bioreduction of a keto ester to its corresponding (S)-hydroxy ester by *Microbacterium* sp. MB 5614. *J. Ferment. Bioeng.* 81: 530-533.
- Jiang, J. R., S. Yuan, J. F. Ding, S. C. Zhu, H. D. Xu, T. Chen, X. D. Cong, W. P. Xu, H. Ye, and Y. J. Dai (2008) Conversion of puerarin into its 7-O-glycoside derivatives by *Microbacterium oxydans* (CGMCC1788) to improve its water solubility and pharmacokinetic properties. *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 81: 647-657.