

<연구논문(학술)>

## 인디고 염색을 위한 친환경 환원공정 개발: 한세놀라 균주의 이용

신윤숙<sup>†</sup> · 손경희 · 류동일<sup>1</sup>

전남대학교 의류학과/생활과학연구소, <sup>1</sup>전남대학교 고분자·섬유시스템공학과

### Development of Eco-friendly Reduction Process for Indigo Dyeing : Using *Hansenula misumaiensis* Strain

Younsook Shin<sup>†</sup>, Kyunghee Son and Dong Il Yoo<sup>1</sup>

Department of Clothing and Textiles/Human Ecology Research Institute, Chonnam National University, Gwangju, Korea

<sup>1</sup>Department of Polymer and Fiber System Engineering, Chonnam National University, Gwangju, Korea

(Received: August 25, 2014 / Revised: September 15, 2014 / Accepted: September 16, 2014)

**Abstract:** The aim of this study is to develop an eco-friendly reduction process of indigo as an alternative choice. *Hansenula misumaiensis* was used and their reducing activity toward synthetic indigo as well as natural indigo was estimated by dyeing test in terms of indigo dye uptake. The changes in K/S value and pH were monitored on the time-based measurements. Also, reduction duration was evaluated. On the basis of the results described in this study, it was confirmed that *Hansenula misumaiensis* reduced indigo. Reducing power of *Hansenula misumaiensis* reached to maximum in two days. It can be possible to develop eco-friendly process of indigo reduction using *Hansenula misumaiensis* by the optimization of strain culture conditions and the optimization of reduction conditions.

**Keywords:** Indigo, reduction, eco-friendly, *Hansenula misumaiensis*, reducing activity

## 1. 서 론

인디고(indigo)는 산화된 형태로 불용성이지만 발효 등 반응 환경에서 제공되는 환원력에 의해 물에 용해가 가능한 류코인디고(leuco-indigo)로 전환되어 염색이 가능하게 된다<sup>1,2)</sup>. 현재 산업적으로는 재현성과 효율성이 낮은 전통적인 발효에 의한 인디고 환원공정 대신 화학적 환원제인 sodium dithionite ( $\text{Na}_2\text{S}_2\text{O}_4$ )를 이용하는 방법이 주로 사용되고 있다.

Sodium dithionite(hydrosulfite)는  $\text{Na}_2\text{SO}_4$ ,  $\text{SO}_3^{2-}$ ,  $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ 와 같은 독성 물질로 산화되고 또한 강한 환원력 때문에 환경오염을 유발하는 문제가 있다<sup>3-5)</sup>. 또한 반응 부산물에 의한 건강상의 문제도 상존하는 것으로 보고되고 있다. 대안으로 전기화학적 방법으로 인디고를 환원시키거나<sup>6)</sup> 글루코스(glucose)와 같은 환원당을 이용하여 인디고를 류코인디고로 전환하는 방법이 있으나<sup>7)</sup> 이들 역시 낮은 생산 효율 문

제와 함께 높은 온도와 강알칼리 환경이 요구되는 문제로 인해 실용성에 문제가 있다. 따라서 이러한 문제의 근본적인 해결책으로 순수한 생물학적 방법<sup>8)</sup>으로 인디고를 환원시키려는 연구가 재조명 받고 있다.

본 연구에서 인디고를 화학적으로 대량 환원시킴으로써 발생하는 환경오염이나 질환 유발 문제를 해결하기 위해, 인디고의 환원과정에 미생물을 이용할 수 있는 가능성을 제시하고자 한다. 이를 위해 이스트(yeast)의 한 종류인 한세놀라 균주(*Hansenula misumaiensis*)를 이용하여 인디고 환원력을 확인하고 친환경 인디고 환원과정을 규격화하는데 미생물의 이용가능성을 알아보았다.

## 2. 실험

### 2.1 균주배양 및 정량

인디고 환원에는 공시균주 *Hansenula misumaiensis* (KCCM 50134)를 사용하였다. 균주의 최적조건에서

<sup>†</sup>Corresponding author: Younsook Shin (yshin@jnu.ac.kr)

Tel.: +82-62-530-1009 Fax.: +82-62-530-1349

©2014 KSDF 1229-0033/2014-9/237-241

배양한 균주의 현탁액을 취하여 원심분리기(1580MGR, (주)자이로젠, Korea)를 사용하여(12000rpm, 1min, 4°C) 균을 가라앉힌 후 그대로 인디고 환원에 사용하였다.

균 현탁액의 배양정도는 UV 흡광광도계(Aglient 845, Aglient Technologies, Waldbronm, Germany)를 이용하여 600nm에서의 Optical density(O.D.) 값으로 확인하였으며, 최종 O.D.값은 1.8-2.0이 되도록 하였다. 단 사용한 균주량은 원심분리하여 얻은 균주를 오븐에서 완전히 건조하여 정량(dry weight)한 값으로 제시하였다.

## 2.2 환원력 평가

환원은 필터링한 0.2% 탄산나트륨 수용액(pH 11.32) 35mL에 고온고압(120°C, 20min) 멸균한 인디고(천연인디고 2.5g, 합성인디고 0.25g)를 사용하여 32°C의 인큐베이터에서 행하였다.

천연인디고는 전라남도 나주에서 재배된 쪽에 소석회를 사용하여 색소를 침지시켜 니남을 만든 후<sup>9)</sup> 50°C 오븐에서 건조한 분말색소(Indigo 10.05% (W/W))를, 합성인디고(Indigo, Vat Blue 1, Aldrich, Germany)는 시판 중인 제품을 구입하여 사용하였다.

한세놀라 균주의 환원력을 평가하기 위해 인디고 염욕에 배양한 균주를 첨가한 후 경과일에 따라 마직물 염색을 행하여 환원정도와 pH를 모니터링 하였다. 환원용액의 상등액에 마직물을 20분 동안 침지 후 공기 중에서 산화, 발색, 수세하고 0.1% 아세트산 수용액으로 10분 중화 후 수세 건조하였다.

염색된 직물은 색차계(Color-Eye 3100, Macbeth, USA)를 이용하여 최대 흡수파장에서의 K/S 값으로

환원력을 평가하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 한세놀라 균주의 환원력

천연인디고에 대한 한세놀라 균주(strain III)의 환원능을 알아보기 위해 한세놀라 균주의 양을 0.1, 1.0, 2.0g으로 하여 인디고 환원실험을 행하였다. 환원력은 염색된 시료의 염착량(K/S값)으로 측정하였다.

염욕의 pH와 염착량을 시간에 따라 측정하였고, 그 결과를 Figure 1에 제시하였다. 균주량에 상관없이 염욕 pH는 경과시간이 증가함에 따라 계속 저하되었으며, 균주량이 많을수록 pH 저하 정도가 더 컸다. 따라서 같은 경과일수에서는 균주량이 많을수록 더 낮은 pH값을 보였다. 이는 균주가 대사과정에서 유기산과 같은 물질을 생성하기 때문에 균주가 많으면 많을수록 그 만큼 pH의 저하가 커지게 된다.

염착량은 균주량이 많을수록 높아 인디고의 환원이 더 잘 이루어진 것을 알 수 있다. 0.5g과 1.0g의 양에서는 환원의 정도가 낮고 환원력을 유지하는 기간도 더 짧았다.

Table 1에 한세놀라 균주량에 따른 천연인디고의 환원개시일, 최적 환원일, 그리고 최종 환원일에서의 염욕의 pH와 K/S 값, 그리고 염색된 샘플의 색상을 제시하였다.

한세놀라 균주량이 0.5g인 경우에는 2일 경과 후부터 환원이 일어나 염색되었고 4일째 최대염착량(염욕 pH 9.23, K/S 값 2.26)을 보였으나 이후에는

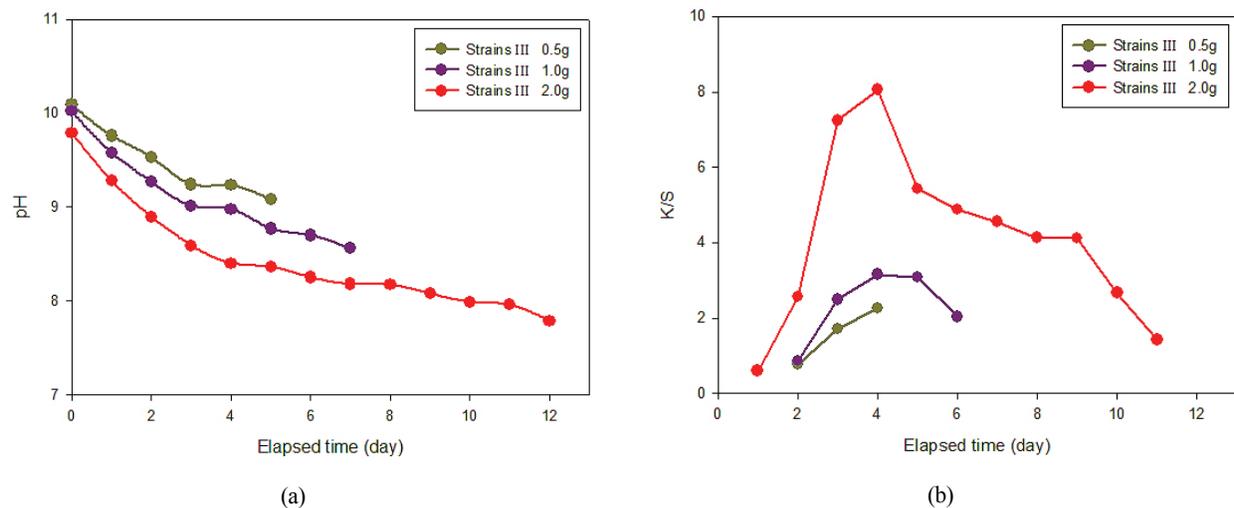


Figure 1. Changes in pH of natural indigo bath (a) and reducing ability (b) of *Hansenula misumaiensis* towards natural indigo.

Table 1. Summary of indigo reduction using *Hansenula misumaiensis*(0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution 35mL, natural indigo 2.5g)

Strain	0.5g				1.0g				2.0g			
	Reduction	Time (day)	pH	K/S	Dyed sample	Time (day)	pH	K/S	Dyed sample	Time (day)	pH	K/S
Start	2	9.53	0.78		2	9.27	0.86		1	9.28	0.60	
Peak	4	9.23	2.26		4	8.98	3.15		4	8.40	8.05	
End	4	9.23	2.26		6	8.70	2.04		11	7.96	1.43	

염색되지 않았다. 한세놀라 균주량이 1.0g인 경우에도 2일 경과 후부터 환원이 일어나 염색되었으며, 4일째 최대 염착량(염욕 pH 8.98, K/S 값 3.15)을 보였고 6일 후까지 염색되어 환원상태가 유지된 것을 알 수 있다. 한편, 한세놀라 균주량이 2.0g인 경우에는 1일 경과 후부터 바로 환원되어 염색되었으나, 균주량이 더 적은 경우에 비해 약간 낮은 염착량(염욕 pH 9.28, K/S 값 0.60)을 보였다. 4일 경과 시에 최대 염착량(염욕 pH 8.40, K/S 값 8.05)을 보였으며 11일 후까지 환원염색 되었다.

환원 개시일로부터 최종 환원일까지의 경향을 보면, 염욕의 pH는 계속 저하되었으며 균주량이 많을수록 pH 저하 속도가 크며 더 낮은 값을 보였다. 균주량이 많을수록 더 높은 최대 염착량 값을 보였으며, 이때의 염욕 pH는 더 낮은 값을 나타내었다. 또한 균주량이 많을수록 더 오랫동안 환원상태가 유지되었다.

색상은 K/S 값이 1이하인 경우에는 B계열을, 이외에는 모두 PB계열을 나타내었다. 한편, 한세놀라

균주는 합성인디고에 대해 훨씬 낮은 환원력을 나타냈다.

Figure 2는 균주량 0.5g를 사용한 경우의 합성인디고 염욕의 pH변화와 한세놀라 균주의 합성인디고에 대한 환원력(K/S 값)을 나타낸 것이다. 균주가 명백하게 환원력을 보이는데 천연인디고를 사용할 때보다 시간이 더 걸리는 것으로 나타났다.

염착량을 나타내는 K/S값 최고치가 1.66로서 천연인디고 사용시의 2.26과 비교하면 합성인디고에 대한 한세놀라 균주의 환원력이 더 낮은 것을 알 수 있다.

인디고의 환원과정은 인디고 분자의 표면에서 전자의 이동에 의해 일어나므로 분자들의 분리(deaggregation and delamination)과정과 연결되어 있는 것으로 알려져 있다<sup>10,11)</sup>. 따라서 큰 입자보다는 입자가 작을수록 환원이 더 용이하게 일어난다<sup>12)</sup>.

인디고의 결정구조는 판상(sheet)과 같은 인디고 분자가 수소결합에 의해 여러 층으로 접합(layered packing)되어 있다. 따라서 환원이 용이하게 일어나

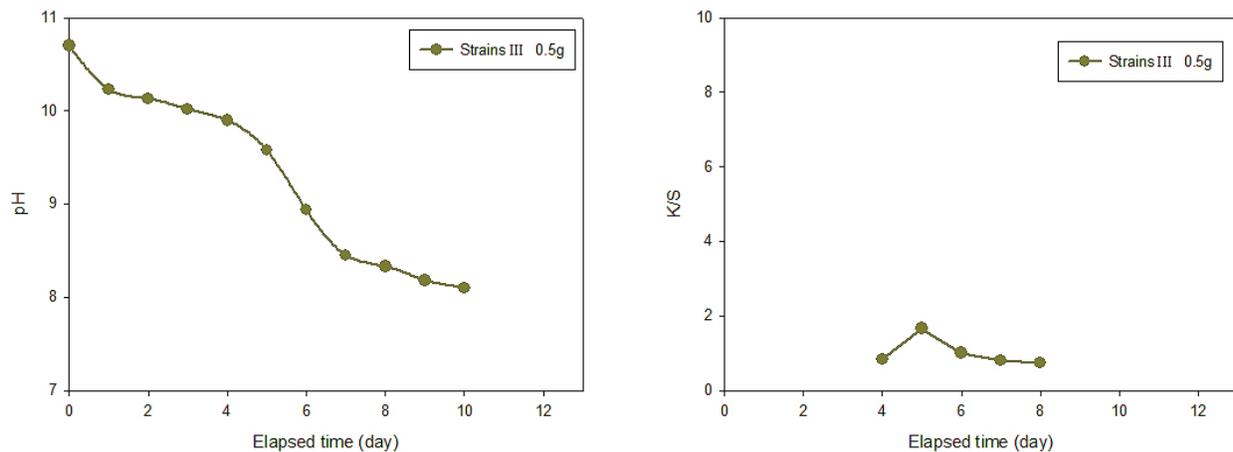


Figure 2. Changes in pH of synthetic indigo bath and reducing ability of *Hansenula misumaiensis* towards synthetic indigo.

**Table 2.** Effect of freezing of *Hansenula misumaiensis* and stirring before adding strain(0.2% Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution 35mL, indigo dye 0.25g, cultured strain 0.5g)

Reduction	Fresh strain addition with no stirring				Fresh strain addition after stirring				Defrozen strain addition after stirring			
	Time (day)	pH	K/S	Dyed sample	Time (day)	pH	K/S	Dyed sample	Time (day)	pH	K/S	Dyed sample
Start	5	9.58	0.84		5	9.86	0.47		7	9.81	2.13	
Peak	6	8.94	1.66		7	8.90	2.26		8	9.17	5.30	
End	9	8.18	0.75		9	8.22	1.25		9	8.08	1.05	

기 위해서는 판과 판간의 상호작용과 인디고 분자간의 인력을 극복해야 한다. 특히 합성인디고의 결정구조는 천연인디고에 비해 이러한 상호 작용력이 크기 때문에 균주가 인디고 분자에 접근하는 것이 용이하지 않을 것으로 판단된다.

본 실험에 사용한 천연인디고는 순수 인디고 함량이 약 10.66%이며 나머지 89% 이상이 알칼리(소석회)와 쪽식물로부터 추출된 다른 성분의 물질로 되어 있다. 따라서 사용한 천연인디고 분자들은 패키지가 느슨하여 상대적으로 상호작용하는 힘이 약해 균주의 접근이 용이하여 환원이 더 잘 일어날 것으로 사료된다.

### 3.2 교반과 냉동보관이 균주의 환원력에 미치는 영향

본 연구에서는 균주를 실험실에서 배양하여 사용하였다. 배양하여 즉시 생균을 사용하는 경우와 냉동보관하고 있다가 필요할 때 균주를 다시 해동하여 사용하는 경우가 있다. 따라서 생균과 냉동 후 해동한 균의 환원력에 차이가 있는지 조사하였다. 또한 인디고를 넣은 환원욕에 균주를 첨가하기 전에 교반(12시간)의 유무가 환원정도에 차이가 있는지도 알아보았다. 그 결과를 Table 2에 제시하였다.

생균인 경우 5일 만에 환원 염색 되었으며, 6일 만에 최대 염착량을 보였고(염욕 pH 8.94, K/S 값 1.66) 9일까지 환원 염색되어, 총 5일동안 환원력을 유지하였다. 인디고 염욕을 2시간 교반 후 생균을 첨가한 경우에는 환원개시일과 환원유지일이 인디고를 미리 교반하지 않은 경우와 같으나 7일 만에 더 높은 최대 염착량을 보였다(염욕 pH 8.90, K/S 값 2.26). 인디고 염욕을 12시간 교반한 후 냉동/해

동한 균을 첨가한 경우에는 2일 더 늦은 7일 만에 염색 되었으나 더 높은 염착량을 보였으며(염욕 pH 9.81, K/S 값 2.13), 최대 염착량도 더 높게 나타났다(염욕 pH 9.17, K/S 값 5.30). 염색된 시료의 색상은 K/S 값 1.25이상에서는 모두 PB 계열로 염색되었다.

위의 실험 결과를 보면, 균주를 첨가하기 전에 염욕을 교반하는 것은 시간과 경제적인 측면을 고려할 때 이점이 크지 않아 교반은 생략해도 될 것으로 판단된다. 또한, 냉동/해동균을 사용하는 경우에 생균을 사용하는 경우보다 최대 환원력이 더 증가하는 결과를 보임으로써 균주를 냉동해서 사용하여도 큰 문제가 없을 것으로 판단된다. 이는 균주를 동결 건조하여 분말상태로 보관하여 사용하는 것이 가능하고 또한 환원공정의 규격화가 용이할 것으로 기대된다.

## 4. 결 론

인디고 염욕에 한세놀라 균주의 첨가 양을 증가할수록 최대 염착량은 증가하였으며, 냉동하여 사용하여도 환원력에 감소가 없는 것으로 나타났다.

실험 결과로부터, 미생물을 이용한 친환경 인디고 환원염색 공정을 개발하는데 한세놀라 균주의 이용가능성을 확인하였다. 균주의 대량생산과 함께 보다 사용하기 편리한 형태로 분말화하여 공정을 규격화할 수 있을 것으로 보여진다.

## 감사의 글

이 논문은 전남대학교 연구년연구비의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

## References

1. A. N. Padden, V. M. Dillon, J. Edmonds, M. D. Collins, N. Alvares, and P. John, An Indigo-reducing Moderate Thermophile from a Woad Vat, *Clostridiumisatidis* sp. nov., *Int. J. Systematic Bacteriol.*, **49**, 1025(1999).
2. Y. Shin, M. Choi, and D. I. Yoo, Utilization of By-products for Organic Reducing Agent in Indigo Dyeing, *Fibers and Polymers*, **14**(12), 2017(2013).
3. J. Y. Kim, J. Y. Lee, Y. S. Shin, and G. J. Kim, Mining and Identification of a Glucosidase Family Enzyme with High Activity toward the Plant Extract Indican, *J. Mol. Catal. B-Enzym.*, **57**, 284(2009).
4. T. Bechtold, E. Burtcher, A. Amann, and O. Bobleter, Alkali-stable Iron Complexes as Mediators for the Electrochemical Reduction of Dispersed Organic Dye-stuffs, *J. Chem. Soc. Faraday Trans.*, **89**, 2451(1993).
5. A. Vuorema, P. John, M. Keskitalo, M. A. Kulandainathan, and F. Marken, Electrochemical and Sono Electro Chemical Monitoring of Indigo Reduction by Glucose, *Dyes Pigments*, **76**, 542(2008).
6. A. Roessler, O. Dossenbach, U. Meyer, W. Marte, and P. Rys, Direct Electrochemical Reduction of Indigo, *Chimia*, **55**, 879(2001).
7. N. Meksi, M. B. Ticha, M. Kechida, and M. F. Mhenni, Using of Ecofriendly A-hydroxycarbonyls as Reducing Agents to Replace Sodium Dithionite in Indigo Dyeing Processes, *J. Cleaner Production*, **24**, 149(2012).
8. Y. Park, Investigation into the Ecological and Natural Dyeing with Medicinal Plants after Fermentation by NURUK and the Effect of Natural Additives, *Textile Coloration and Finishing (J. of Korea Soc. Dyers and Finishers)*, **24**(4), 260(2012).
9. Y. Shin, D. I. Yoo, and K. Kim, Process Balance of Natural Indigo Production based on Traditional Niram Method, *Textile Coloration and Finishing (J. of Korea Soc. Dyers and Finishers)*, **24**(4), 253(2012).
10. A. Vuorema, P. John, M. Keskitalo, M. F. Mahon, M. A. Kulandainathan, and F. Marken, Anthraquinone Catalysis in the Glucose-driven Reduction of Indigo to Leuco-indigo, *Phys. Chem.*, **11**, 1816(2009).
11. A. M. Bond, F. Marken, E. Hill, R. G. Compton, and H. Hügel, The Electrochemical Reduction of Indigo Dissolved in Organic Solvents and as a Solid Mechanically Attached to a Basal Plane Pyrolytic Graphite Electrode Immersed in Aqueous Electrolyte Solution, *J. Chem. Soc. Perkin Trans.*, **2**, 1735(1997).
12. A. Roessler, D. Crettenand, O. Dossenbach, and P. Rys, Electrochemical Reduction of Indigo in Fixed and Fluidized Beds of Graphite Granules, *J. Appl. Electro Chem.*, **33**, 901(2003).