

*Penicillium pinophilum*에 의한 Poly (3-hydroxybutyrate)의 생분해

김말남 · 강우정

상명여자대학교 생물학과

Biodegradation of Poly (3-hydroxybutyrate) by *Penicillium pinophilum*

Mal-Nam Kim and Eun-Jung Kang

Department of Biology, Sangmyung Women's University, Seoul, 110-743, Korea

ABSTRACT: Biodegradability of poly (3-hydroxybutyrate) (PHB) by *Penicillium pinophilum* was investigated by the modified Sturm Test. The biodegradability measurement by this method was more reproducible than other conventional activated sludge methods. Optimum inoculum size for the PHB biodegradation was 1% (v/v). The degradation appeared to occur not only on the sample surface but also inside the sample because the biodegradation did not increase quite proportionally with the sample surface area. The biodegradation rate increased to an asymptotic value as the nitrogen content in the test medium increased, indicating the nitrogen source was needed for the synthesis of the PHB depolymerase.

KEYWORDS: *Penicillium pinophilum*, poly (3-hydroxybutyrate), biodegradation, modified sturm test

우리나라 플라스틱의 생산량은 1993년도에 이미 500만톤을 넘었으며 국민소득의 증대와 더불어 국민 1인당 플라스틱의 소모량도 70 kg/man·year를 넘어서 선진국의 수준에 접근해 있다(박종우, 1995). 그러나 사용후 폐기된 플라스틱은 반영구적으로 분해되지 않으며 밀도가 작기 때문에 폐기물의 부피가 커서 폐기물의 처리와 환경오염에 커다란 문제점을 던져주고 있다. 이와 같은 문제들을 해결하기 위하여 많은 연구자들이 자연 환경에서 분해되는 플라스틱을 개발하려는 노력을 계속하여 왔다. 그 결과 생분해성을 나타내는 플라스틱이 시험생산되기 시작되었다.

대표적 생분해성 고분자인 poly (3-hydroxybutyrate)(PHB)는 미생물에 의해 생합성되는 폴리에스테르로 이 고분자에 대한 연구가 활발히 진행되고 있다. PHB는 생분해성 고분자 중 가장 실용화가 능성이 큰 물질이지만 물성이 기존 합성수지에 비해

취약하고 원가가 높은 단점이 있다.

플라스틱의 생분해성은 대개

1) 토양 매립에 의한 고분자 물성의 변화(Colin *et al.*, 1981)

2) 활성오니를 이용한 BOD 및 대사 결과 생성되는 CO₂의 정량(ASTM D 5209-92, 1992)

3) 곰팡이나 박테리아등 특정 미생물을 이용한 고분자 분자량 및 물성의 변화(Fields *et al.*, 1974; Lee *et al.*, 1991)

4) 퇴비화 조건에서 고분자 물성의 변화 또는 CO₂ 발생량의 정량(Johnson *et al.*, 1993; ASTM D 5338-92, 1992)

5) 메탄 생성균등 혐기적 미생물에 의하여 발생되는 기체의 정량(ASTM D 5210-91, 1991)

6) 효소에 의한 분해(Tokiwa *et al.*, 1990)

등에 의해 평가되어 왔다.

플라스틱의 생분해 속도는 생분해 플라스틱의 용도를 결정하는 중요한 요소임에도 불구하고 재현성이 극히 희박하여 평가기준이 확립되어 있지 않다. 그 결과 플라스틱의 분자구조와 구성성분의 조성이

*Corresponding author

플라스틱의 생분해성에 미치는 영향에 대한 연구는 극히 미진한 상태이다.

본 연구에서는 미생물에 의하여 합성되는 PHB를 *P. pinophilum*이 대사함에 따라 발생하는 CO₂를 변형 Sturm Test 방법으로 측정하여 균체의 최적 접종량, 질소원의 영향 및 시료의 두께에 따른 PHB의 생분해성 거동을 조사하였다.

재료 및 방법

균주 및 배양

Penicillium pinophilum(ATCC 9644)을 Harrold's M40Y 사면 배지에 접종, 30°C에서 3일간 배양한 후 4°C에서 보관하였다.

접종액의 준비

접종액을 만들기 위해서 포자현탁액을 준비하고 멸균된 glass wool을 통하여 mycelial fragment를 제거한 후 여과된 포자현탁액을 3회 원심분리(8,000×g, 15 min, 4°C)함으로써 포자를 세척하였다. Counting chamber(Haemacytometer)를 이용하여 생분해도 측정용 test bottle에 주입되는 포자수를 1×10⁶~2×10⁶ spores/ml 정도 되도록 조절하여 사용하였다.

반응 배지

생분해도 실험에 사용되는 합성 stock 용액들은 ferric chloride(FeCl₃·6H₂O) 0.25 g, magnesium sulfate(MgSO₄·7H₂O) 22.5 g, calcium chloride(CaCl₂) 27.5 g, phosphate buffer(KH₂PO₄ 8.5 g, K₂HPO₄ 21.75 g, Na₂HPO₄·7H₂O 33.4 g, NH₄Cl 1.7 g), ammonium sulfate((NH₄)₂SO₄) 40.0 g을 각각 1 l 증류수에 용해시켜 제조하였고 반응배지에 사용한 stock 용액의 양은 Table 1과 같다.

생분해도의 측정

미국 ASTM D 5209-91을 바탕으로 실험 장치를 구성하였으며 기본 원리는 고분자를 탄소원으로 하여 호기적 조건에서 미생물을 배양할 때 미생물에 의해 고분자의 탄소원자가 대사되어 발생하는 CO₂를 Ba(OH)₂로 포집하여 HCl로 적정하여 분해도를

Table 1. Composition of the reaction medium

Stock solution	Composition
Magnesium sulfate	1 ml
Calcium chloride	1 ml
Phosphate buffer	2 ml
Ferric chloride	4 ml
Ammonium sulfate	1 ml
D.W.	1 l

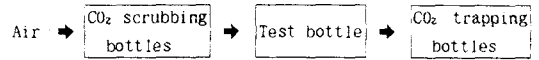


Fig. 1. Schematic diagram of the modified Sturm Test

측정하였다.

실험장치는 공기속의 CO₂를 제거하는 장치와 배양기 및 발생하는 CO₂의 포집기로 크게 세부분으로 나누어 Fig. 1과 같이 구성하였다. 배양기는 rotary shaker(Vision, KMC-8480SF)를 사용하였고 250 ml의 test bottle에 Table 1의 반응배지 100 ml와 미생물 균체 및 시료(PHB, 0.01 g)를 넣어 배양하였다.

Bottle에 공급되는 공기속의 CO₂를 제거하기 위하여 10N NaOH와 0.025N Ba(OH)₂ 수용액이 들어있는 bottle을 각각 4개 및 2개를 직렬로 연결하여 사용하였고, test bottle 내에서 발생하는 CO₂를 포집하기 위하여 0.025N Ba(OH)₂ 수용액 50 ml가 담긴 100 ml 용량의 삼각 플라스크 3개를 직렬로 연결하여 사용하였다.

발생되는 CO₂는 배양 시작 후 첫번째 포집병에 침전이 생기면 포집병을 분리하여 0.05N HCl로 적정하였다.

분해도 계산

분해도는 발생한 CO₂의 양을 시료의 이론적 CO₂ 발생량에 대한 백분율로 나타내었다. 이론적 CO₂ 발생량은 시료중 탄소 성분이 모두 CO₂로 전환된다 고 하였을 때의 CO₂ 총량에 해당한다.

결과 및 고찰

표준화된 생분해성 평가 방법은 ASTM 산하의

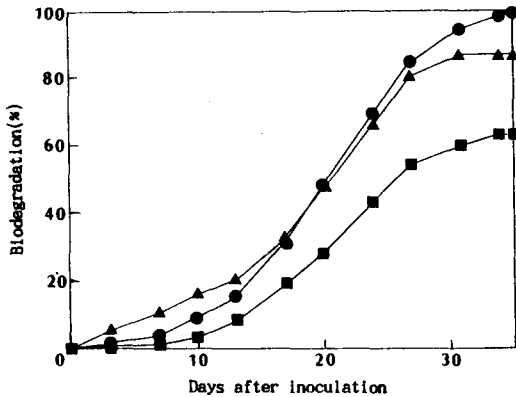


Fig. 2. Biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) by *P. pinophilum* at different inoculum size.

■: 0.1%, ●: 1%, ▲: 4% inoculum size.

환경 분해성 플라스틱 소위원회에서 여러가지의 표준방법을 발표 하였다(Narayan, 1993). 변형 Sturm Test 방법은 ASTM 5209-92에 수록되어 있는데 활성오니를 이용하는 호기적 조건에서 CO₂의 발생량을 측정함으로써 플라스틱의 생분해도를 평가하는 방법이다.

탄소 이외에 수소, 질소 혹은 유황과 같은 산화가 능 원소들이 생분해도 측정시료 내에 포함되어 있을 경우는 CO₂의 발생량보다도 O₂의 소모량을 측정하는 것이 생분해도의 평가를 더 정확히 할 수 있다는 관점에서 JIS 규격은(JIS K 6950, 1994) 합성 활성 오니의 플라스틱 분해에 따른 O₂의 소모량을 측정하는 표준 방법을 발표하였다. 그러나 이 표준 방법은 test bottle 내의 산소 농도를 일정하게 유지하기 위하여 유입되는 산소의 유량을 측정하므로 고가의 분석기기를 필요로 한다.

폐수 처리장에서 수거한 활성 오니를 사용할 경우에는 폐수 속의 유기물 종류와 농도가 일정하지 않으므로 활성 오니 속의 미생물 분포와 활성이 균일하게 유지되지 못하기 때문에(Seo et al., 1994) 생분해성 평가에서 재현성과 일관성을 얻기 어렵다.

본 연구에서는 플라스틱의 생분해성을 재현성 있게 평가하기 위하여 각종 재료의 곰팡이에 대한 저항성을 평가하는데 사용되는 *P. pinophilum* (ATCC 9644) 단일 균주를 이용하여 PHB의 생분해도를 변형 Sturm Test 방법으로 측정하였다.

Table 2. Effect of inoculum size on the biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) for 35 days.

Inoculum size (%)	Biodegradation (%)
0.1	62.6
1	98.9
4	86.5

균주 접종량의 영향

*P. pinophilum*에 의한 PHB의 분해는 test bottle에 초기 접종되는 포자의 수에 따라 다르게 나타났다. 접종액 중의 포자수를 $1 \times 10^6 \sim 2 \times 10^6$ spores/ml로 조절된 접종액을 test bottle의 내용물에 대하여 0.1, 1 및 4%로 접종하였을 때 PHB의 분해도 변화 과정은 Fig. 2와 같았다.

접종량이 적을수록 PHB 분해의 유도기가 더 길게 나타났으며, 접종량에 따라 생분해 속도가 빠를 것이라는 예상과는 달리 Table 2에 수록한 바와 같이 35일의 분해 시간이 경과한 후에는 1%의 접종량에서 PHB가 가장 많이 생분해되는 것으로 나타났다. Seo et al.(1994)도 활성오니에 의한 cellophane 및 PHB의 분해에서 최적 접종량이 존재함을 보고한 바 있다.

시료의 두께에 따른 생분해도

미생물이 분비하는 depolymerase는 생분해성 플라스틱을 표면으로부터 분해할 것으로 예상되기 때문에 시료의 단위 중량당 depolymerase의 접근이 가능한 표면적에 따라 생분해도가 다르게 측정될 수 있다. Fig. 3은 PHB 시료의 두께를 250, 350 및 450 μm 로 조절한 후 생분해 속도를 측정한 결과이며 PHB powder의 생분해 속도도 함께 제시하였다. 34일간의 분해시간이 경과한 후 서로 다른 두께의 PHB가 생분해된 정도는 Table 3과 같다.

시료의 단위 중량당 표면적이 증가함에 따라 생분해가 더 빠르게 진행함을 볼 수 있다. 그러나 생분해 속도가 표면적에 비례하여 증가하지는 않았다.

Fig. 2와 3에서 PHB의 생분해가 sigmoidal한 곡선을 나타내는 것은 *P. pinophilum*이 유도기가

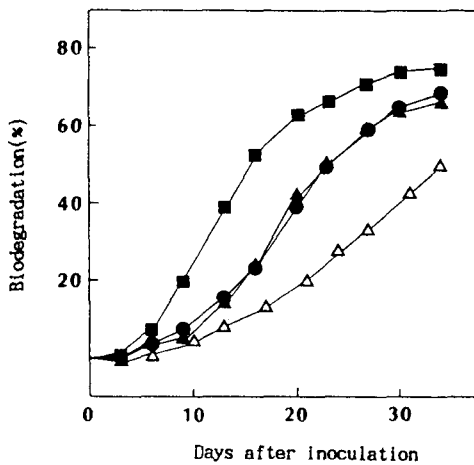


Fig. 3. Biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) by different thickness.

■: powder, ●: 250 μm thick, ▲: 350 μm thick, △: 450 μm thick.

Table 3. Effect of sample thickness on the biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) for 34 days

Sample thickness (μm)	Biodegradation (%)	Surface area ($\text{cm}^2/100 \text{ mg}$)
Powder (diameter 200 μm)	74.8	24.6
250 μm	68.0	3.3
350 μm	65.6	2.3
450 μm	49.7	1.8

필요한 이유도 있겠지만, PHB 시료가 분해 초기에는 결정성이 매우 높은 상태이므로, 가수분해 및 효소에 의한 분해의 경우 각각 물과 분해 효소가 시료 내로 침투하기 어려운 것이 한 원인이었다고 판단된다. PHB의 생분해는 depolymerase의 효소작용 이외에 가수분해에 의한 저분자량 물질의 용출 등이 수반되므로 시료 표면에서의 반응 이외에 시료 내에서도 일부 분해가 진행되는 것으로 보인다.

질소원 농도의 영향

PHB를 미생물 발효에 의하여 합성할 때 배양액 내의 질소 함량이 낮을 수록 PHB의 생성량이 증가하는 것으로 보고되어 있다(Lee *et al.*, 1991). 배양

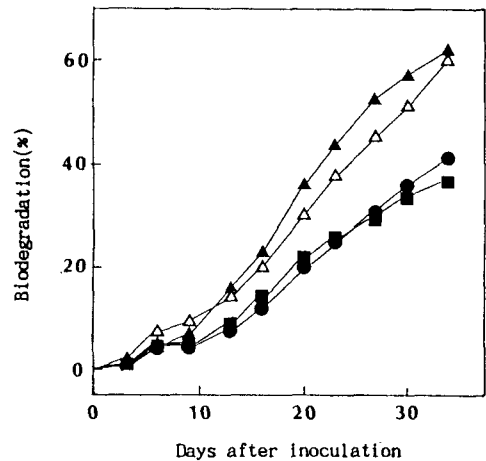


Fig. 4. Biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) by $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ ■: 0 g/l, ●: 0.02 g/l, ▲: 0.04 g/l and △: 0.2 g/l $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$.

Table 4. Effect of $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration on the biodegradation of poly (3-hydroxybutyrate) for 34 days

$(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ concentration (g/l)	Biodegradation (%)
0	36.2
0.02	40.8
0.04	61.4
0.2	60.0

액내의 질소함량은 미생물 체내의 단백질 합성에 필요한 원소이므로 depolymerase와 같은 효소의 합성이 억제되어 미생물 체내에 합성된 PHB가 분해되지 않고 축적되는 것이 그 원인이다. Fig. 4는 PHB의 생분해도 test medium속의 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 함량을(Kim *et al.*, 1990) 농도별로 조사하여 그 결과를 나타낸 것이다. 질소의 함량에 따라 생분해 속도가 빠른 속도로 증가하다가 $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ 의 함량이 0.04 g/l 이상이 되면 생분해 속도가 더 이상 증가하지 않음을 알 수 있다(Table 4). 이는 미생물이 PHB의 생분해에 필요한 최적 질소원의 양 이상일 때에는 질소원의 농도가 PHB 생분해도에 더 이상 영향을 미치지 않기 때문이라고 사료된다.

적 요

Poly (3-hydroxybutyrate)(PHB)의 *Penicillium pinophilum*에 의한 생분해성을 변형 Sturm Test 법으로 조사하였다. 활성오니를 사용한 경우보다 PHB의 생분해성이 비교적 재현성있게 측정되었으며 PHB의 생분해를 가장 빠르게 진행시키는 최적 포자 접종량은 1%(v/v)이었다. 생분해 속도는 시료의 표면적에 따라 증가하였으나 비례적으로 상승하지 않아 분해가 시료의 표면 뿐만 아니라 내부에서도 진행됨을 나타내었다. 반응 배지내의 질소원 함량에 따라 PHB의 생분해 속도는 증가하다가 접근값을 보여 질소원이 depolymerase 효소의 합성에 필요한 원소임을 보였다.

감사의 글

본 연구는 한국과학재단 특정기초연구(94-0900-07-01-3)의 연구비 지원에 의하여 이루어 졌으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

- ASTM D 5210-91. 1991. Standard test method for determining the anaerobic biodegradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge. *Annual Book of ASTM Standards*, Vol.08.03. American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- ASTM D 5209-92. 1992. Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastic materials in the presence of municipal sewage sludge. *Annual Book of ASTM Standards*, Vol.08.03, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- ASTM D 5338-92. 1992. Standard test method for determining the aerobic biodegradation of plastic materials under controlled composting conditions. *Annual Book of ASTM Standards*, Vol.08.03, American Society for Testing and Materials, Philadelphia, USA.
- Colin, G., J.D. Cooney, D.J. Carlsson and D. M. Wiles. 1981. Deterioration of plastic films under soil burial conditions. *J. Appl. Poly. Sci.* 26: 509-519.
- Fields, R.D., P. Rodirguez and R.K. Finn. 1974. Microbial degradation of polyesters: polycaprolactone degraded by *P. pullulans*. *J. Appl. Poly. Sci.* 18: 3571-3579.
- JIS K 6950. 1994. Plastics-Testing method for aerobic biodegradability by activated sludge. *Japanese Industrial Standard Committee*. Japanese Standard Association, Tokyo, Japan.
- Johnson, K.E., A.L. Pometto III, and Z. Nikolov. 1993. Degradation of degradable starch-polyethylene plastics in a compost environment. *Appl. Environ. Microbiol.* 59: 1155-1161.
- Kim, J.-H., T.-H. Park, D.-M. Shin, S.-H. Lee and G.-Y. Han. 1994. Biodegradable Characteristics of starch-filled polyethylene film by fungi. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 9: 412-417.
- Kim, J.M., J.H. Kim and M.H. Cho. 1993. Growth characteristics and optimal culture conditions. Bacterial strains degrading ethylene glycol and terephthalic acid in polyester weight loss wastewater. *Kor. J. Biotechnol. Bioeng.* 8: 156-163.
- Lee, B.T., A.L. Pometto III, and A. Fratzke. 1991. Biodegradation of degradable plastic polyethylene by *Phanerochaete* and *Streptomyces* species *Appl. Environ. Microbiol.* 57: 678-685.
- Lee, Y.W. and Y.J. Yoo. 1991. Kinetics for the growth of *Alcaligenes eutrophus* and the biosynthesis of poly- β -hydroxybutyrate. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 19: 186-192.
- Narayan, R. 1993. Development of standard for degradable plastics by ASTM subcommittee D-20.96 on environmentally degradable plastics(personal communication).
- Seo, I.S., M.C. Lee, B.H. Kim and P.K. Shin. 1994. Characteristics of municipal sewage

sludge affecting the biodegradation of a plastic material under aerobic condition. *Kor. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* **22**: 436-442.

Tokiwa, Y.A., Iwamoto and Koyama M. 1990. Development of biodegradable plastics containing polycaprolactone and/or starch. *Polym. Mater. Sci. Eng.* **63**: 742-746.