

생합성 플라스틱 Poly- β -Hydroxybutyrate의 생분해와 토양온도의 관계

조강현 · 조경숙* · 이효혜미

인하대학교 생물학과, *이화여자대학교 환경공학과

Relationship between Biodegradation of Biosynthetic Plastics, Poly- β -Hydroxybutyrate, and Soil Temperature

Cho, Kang-Hyun, Kyung-Suk Cho* and Hyo Hye Mi Lee

Department of Biology, Inha University, Inchon 402-751, Korea

Department of Environmental Science and Engineering, Ewha Womans University, Seoul 120-750, Korea*

ABSTRACT

The microbial degradation of poly- β -hydroxybutyrate (PHB) films was studied in soil microcosms incubated at a constant temperature of 2, 10, 20, 30 and 40°C for up to 49 days. The degradation rate measured through loss of weight was enhanced by incubation at a higher temperature. At the soil temperature 40°C, poly- β -hydroxybutyrate was rapidly degraded at a decay rate of 3.5% weight loss per day. The degradation of poly- β -hydroxybutyrate did not affected significantly the chemical properties of soils such as pH and electric conductivity. However, microbial activity of soil in terms of dehydrogenase activity was increased by the degradation of poly- β -hydroxybutyrate.

Key words : Biodegradable plastics, Biodegradation, Dehydrogenase, Poly- β -hydroxybutyrate, Soil respiration, Temperature.

서론

합성 플라스틱은 가볍고 성형이 용이하여 소비량이 계속 증가하고 있으나 난분해성 물질이어서 여러 가지 환경 문제를 일으키고 있다. 더욱이 합성 플라스틱의 원료인 석유 자원이 앞으로 30~40년 이내에 고갈될 것으로 예상되어 분해성인 대체물질의 개발이 시급한 실정이다 (신 1997). 대표적인 생분해성 플라스틱인 PHB (poly- β -hydroxybutyrate)는 많은 종류의 세균들이 탄소원이 다량 존재하는 조건에서 다른 영양소가 부족할 때

체내에 합성 축적하는 polyester 구조의 탄소 및 에너지의 저장물질이다 (Doi 1990).

생합성 물질인 PHB는 자연계에서 토양미생물에 의하여 완전히 분해되므로 환경오염을 저감하는 환경친화물질이다 (Madigan *et al.* 1997). PHB가 토양에 매립되면 표면에 미생물이 정착함으로써 분해가 진행되는데, 부착 미생물은 depolymerase, esterase 등의 세포외 분해효소를 분비하여 PHB 중합체를 단량체로 전환시킨다 (Brucato and Wong 1991, Jendrossek *et al.* 1993). 이 수용성 분해 중간산물은 토양미생물의 세포 내로 흡수되어 대사과정에 의해 호기 또는 혐기 조건에서 CO₂ 또는

* 본 연구는 1996년도 한국학술진흥재단의 공모과제연구비에 의하여 연구되었음.

CH₄로 배출되어 완전히 분해된다. 토양에서 생분해성 플라스틱의 분해속도에 영향을 미치는 주요한 요인은 내적 요인으로서 플라스틱의 두께, 이차 구조물의 특성 등과 외적요인으로서 분해미생물 활성도, 수분 이용도, 온도, pH 등이 있다 (Mergaert *et al.* 1993, Doi *et al.* 1994).

본 연구의 목적은 토양 소우주계 (microcosm)를 이용하여 토양 온도가 PHB 분해속도에 미치는 영향을 규명하고, PHB 분해 과정에서 토양의 화학적 특성과 토양 미생물 활성의 변화를 추적하는데 있다.

연구 방법

시료의 준비

본 연구에서 사용한 생분해성 플라스틱은 이당류인 sucrose를 기질로 하여 *Alcaligenes latus* (DSM 1123)가 합성한 poly- β -hydroxybutyrate (PHB)를 성형하여 두께 0.24~0.58 mm의 막으로 만든 것이다 (조 등 1998).

생분해성 플라스틱 분해 실험에 사용한 토양 시료는 인천광역시 소재 인하대학교 교정의 리기다소나무 숲에서 채토하였다. 이곳의 임상에는 여뀌가 우점하였으며 매우 습한 토양이었다. 채취한 토양은 7일간 음건한 후 2 mm 체로 쳐서 실험 토양으로 준비하였다. 이 토양의 토성은 모래함량이 70.9%에 달하는 사양토이었다 (Table 1). 토양의 유기물함량은 7.0%로서 비교적 풍부하였으며, 토양의 pH(H₂O)와 pH(CaCl₂)는 각각 6.6 및 6.0으로서 중성에 가까웠다 (Table 1).

소우주계 실험

생분해성 플라스틱의 분해 실험은 PHB 분해주머니를

토양 소우주계 (microcosm)에 설치하여 실내에서 실시하였다. 100 ml 비커에 40 g의 음건한 토양 시료를 깔고 한 개의 PHB 분해주머니를 넣은 뒤 그 위에 30 g의 토양을 얹어서 소우주계를 제작하였다. PHB 분해주머니는 구멍 크기 0.02 mm인 망사로 5×5 cm² 크기의 주머니를 만들어서 4×4 cm² PHB 막과 그 무게를 기록한 알루미늄 판을 넣고 봉하였다. 대조구로서 PHB 분해주머니를 빼고 70 g의 토양만 넣은 소우주계를 준비하였다. 배양 중 토양의 수분함량은 자연 상태와 유사한 20%로 유지되도록 증류수를 공급하고 페트리디쉬를 덮어서 증발을 막았다.

온도에 따른 PHB의 분해 속도를 비교하기 위하여, 2, 10, 20, 30, 40℃에서 49일 동안 소우주계를 배양하였다. 배양 후 35일까지는 7일 간격으로 5회, 그리고 49일째에 각 온도별로 3개의 PHB 분해주머니를 회수하였다. 회수한 PHB는 수돗물에 깨끗이 씻고 60℃에서 건조한 후 무게를 측정하였다. 또한 PHB의 분해에 따른 토양의 미생물 활성과 화학적 특성의 변화를 조사하기 위하여 소우주계를 30℃에서 배양하면서 배양 후 0, 21, 42일에 각각 5개의 시료를 채취하였다.

토양의 물리, 화학적 분석

토성(soil texture)은 sodium hexametaphosphate 용액으로 현탁시킨 후 비중계 (ASTM No. 1. 152H)로 비중을 측정하여 구하였다 (Sheldrick and Wang 1993). 토양의 유기물함량은 550℃에서의 작열손실량 (loss on ignition)으로 추정하였다. 토양의 pH(H₂O)와 pH(CaCl₂)는 음건 토양에 각각 증류수와 0.01M CaCl₂를 1:4 (w/w)로 혼합하여 측정하였다 (Hendershot and Lalande 1993). 한편 토양의 전기전도도는 토양:증류수 = 1:4 (w/w)로 혼합하여 전기전도도계 (Orion model 162)로 측정하였다.

미생물 활성의 측정

토양 미생물의 활성은 토양 호흡량과 탈수소효소 (dehydrogenase) 활성도를 측정하여 나타내었다. 토양 호흡량은 PHB를 넣은 소우주계와 대조 소우주계를 각각 NaOH 용액이 든 플라스틱 용기에 넣고 밀폐하고 30℃에서 24시간 배양한 후 NaOH 용액에 흡수된 CO₂를 HCl로 적정하여 측정하였다 (Alef 1995a).

탈수소효소 활성도는 triphenyltetrazolium chloride

Table 1. Properties of soil samples used in the microcosm experiment (SD=standard deviation, n=replication)

Soil property	Mean	SD	n
Soil texture			
Sand (%)	70.9	0.04	3
Silt (%)	24.6	0.03	3
Clay (%)	4.5	0.01	3
Organic matter (%)	7.0	0.11	3
pH(H ₂ O)	6.60	0.04	5
pH(CaCl ₂)	6.00	0.02	5
Electric conductivity (μ S/cm)	134	10	5

용액을 토양에 처리하고 30℃에서 24시간 배양한 후 전환된 triphenyl formazan을 정량하여 측정하였다 (Alef 1995b).

결과 및 고찰

온도에 따른 PHB 분해 속도의 변화

토양 온도 2, 10, 20, 30, 40℃에서 분해주머니에 남아 있는 PHB의 무게는 2℃를 제외하고 시간이 경과함에 따라서 감소하였으며, 그 잔존량은 지수 함수 $W_t = W_0 e^{-kt}$ 에 유의하게 적합하였다 (Fig. 1, Table 2). 여기에서 W_0 과 W_t 는 각각 처음과 t 시간이 경과한 후의 PHB의 무게 (g DM)이고 k 는 분해상수 (day^{-1})이다. 토양에서 PHB의 분해는 지온 2℃에서는 전혀 이루어지지 않았고, 10, 20 및 30℃에서 분해상수 k 는 각각 0.001, 0.004 및 0.005 day^{-1} 로 서서히 증가하였고, 특히 40℃에서는 k 가 0.035 day^{-1} 로서 분해속도가 급격히 증가하였다 (Table 2). 이에 따라서 PHB의 분해 반감기

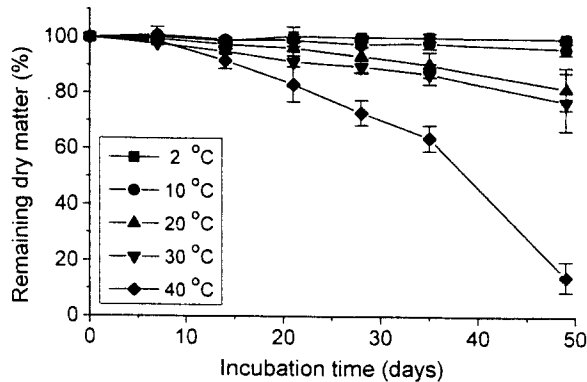


Fig. 1. Changes in remaining dry weights of poly-β-hydroxybutyrate in the soil microcosms at the various incubation temperatures. Error bar indicates 1 SD (n=3).

($t_{1/2}$)도 온도가 증가함에 따라 10℃에서 771 일, 20℃에서 173 일, 30℃에서 137 일인데 비하여 40℃에서는 20 일로 급격히 감소하였다 (Table 2).

토양에서 PHB 분해속도에 영향을 주는 가장 중요한 요인의 하나가 온도이다. PHB는 세포의 효소인 depolymerase에 의하여 주로 분해되는데, 각종 곰팡이와 세균이 분비한 depolymerase는 50℃에서 70℃까지의 온도 범위에서 최고의 활성을 나타낸다고 보고되고 있다 (Kasuya *et al.* 1994, Oda *et al.* 1995). 본 실험에서도 PHB의 분해가 40℃에서 가장 빠르게 나타나서, 토양에서의 PHB 분해는 비교적 고온에서 급격히 촉진되는 것으로 판단되었다.

PHB 플라스틱 분해에 따른 토양의 화학적 특성의 변화

30℃에서 PHB의 분해가 일어나는 처리구와 대조구에서 토양의 pH(H₂O)와 pH(CaCl₂)는 시간이 경과함에 따라서 증가하였으며, 두 구 사이에 유의한 차가 없었다 (Fig. 2). 또한 토양의 용존 이온 총량을 나타내는 전기전도도는 처리구와 대조구 사이에 유의한 차가 없었다 (Fig. 2). 이러한 결과로 보아 PHB가 토양에 매립되어 분해되더라도 토양의 화학적 성질에 큰 영향을 미치지 않을 것으로 생각된다. 이는 PHB가 탄수화물 중합체로서 호기 혹은 혐기 상태에서 완전히 분해되어 CO₂, H₂O, CH₄로 되기 때문에 pH, 전기전도도와 같은 토양의 화학적 특성에는 큰 영향을 주지 않기 때문이라고 생각된다.

토양의 pH는 PHB 분해에 큰 영향을 미치는데, depolymerase 활성의 최적 산도는 대개 pH 7.0~9.0이다 (Briese *et al.* 1994, Kita *et al.* 1995, Kasuya *et al.* 1994). 본 실험에 사용된 토양은 pH가 약산성으로서 PHB 분해에 최적 조건이 아닌 것으로 판단된다.

PHB 플라스틱 분해에 따른 토양 미생물 활성의 변화

Table 2. Degradation rate and half-time of poly-β-hydroxybutyrate at the various incubation temperatures

Incubation temperature (°C)	Decomposition rate (k)* (day ⁻¹)	Half-time (t _{1/2}) (days)	Coefficient of determination (R ²)	Significant level (p)
2	0.0000	∞	0.000	not significant
10	0.0009	771	0.880	0.01
20	0.0040	173	0.916	0.01
30	0.0051	137	0.959	0.01
40	0.0345	20	0.720	0.05

* $W_t = W_0 e^{-kt}$ (W_t and W_0 , dry weights at the time t and 0)

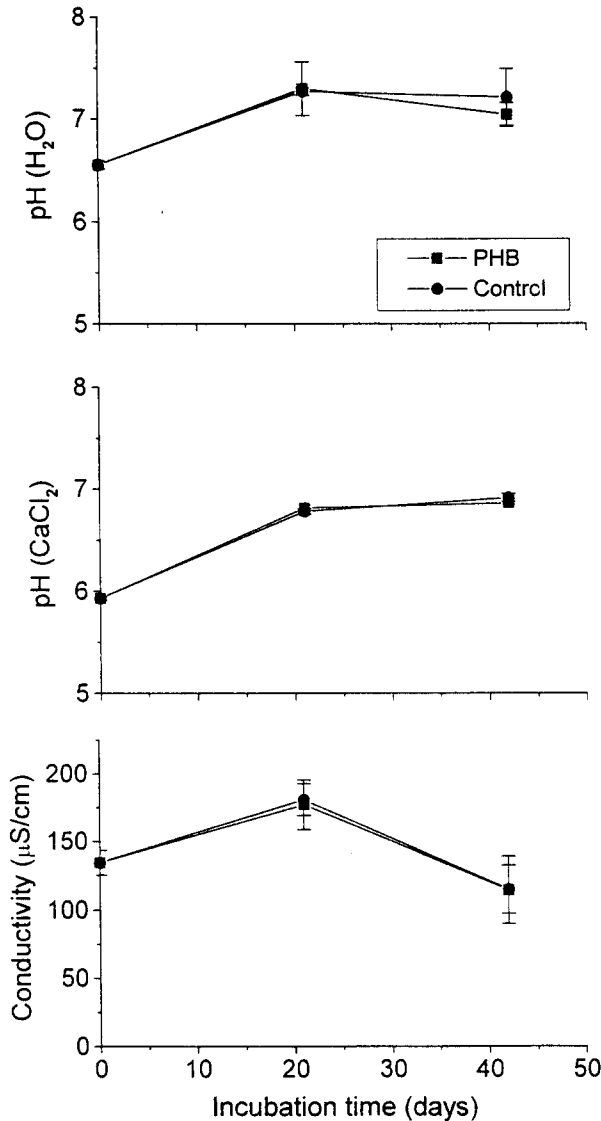


Fig. 2. Changes in pH(H₂O), pH(CaCl₂) and electric conductivity of soils in the microcosm with poly-β-hydroxybutyrate and the control. Error bar indicates 1 SD (n=5).

PHB 분해 배양이 시작된 후 시간 경과에 따라서, PHB가 든 실험구와 대조구 사이에 토양 호흡량은 감소하였으며, 실험구의 토양 호흡량이 대조구보다 많은 경향이 있었으나 0.05 유의수준에서 유의한 차가 없었다 (Fig. 3). 배양 후 42일이 경과했을 때 토양 호흡량은 실험구가 22.1 mg CO₂ · g⁻¹ · hr⁻¹, 대조구가 11.6 mg CO₂ · g⁻¹ · hr⁻¹이었다. 한편 초기 토양의 호흡량이 많은 것은 음건토양에 증류수를 공급하여 습윤하게 하였는데 이때 탄산염이 이산화탄소로 배출되기 때문이라

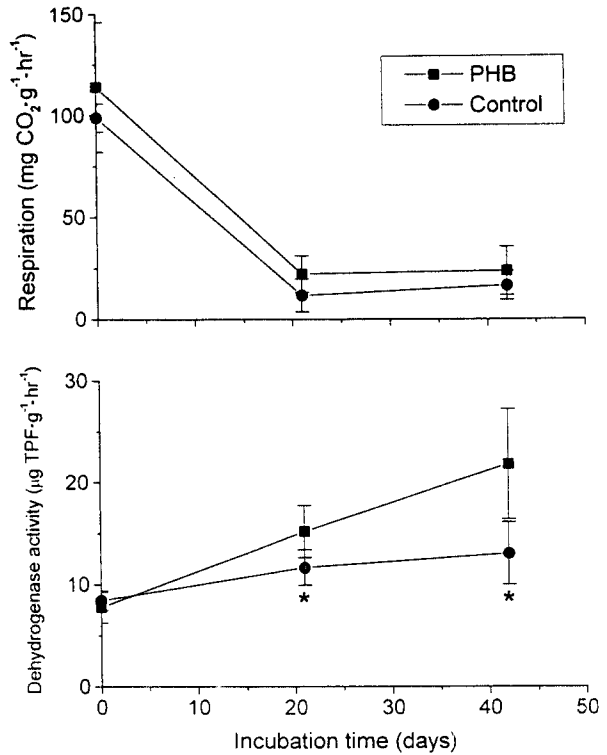


Fig. 3. Changes in soil respiration and dehydrogenase activity of soils in the microcosm with poly-β-hydroxybutyrate and the control. Error bar indicates 1 SD (n=5). Asterisk indicates a significant difference (p<0.05) between treatment and control.

고 생각된다 (Kieft *et al.* 1987).

토양의 탈수소효소 활성도는 배양 후 42일까지 PHB가 처리된 실험구가 7.8 µg TPF · g⁻¹ · hr⁻¹에서 21.8 µg TPF · g⁻¹ · hr⁻¹로 크게 증가된 반면에 대조구에서는 8.5 µg TPF · g⁻¹ · hr⁻¹에서 13.0 µg TPF · g⁻¹ · hr⁻¹로 큰 변화를 보이지 않았다 (Fig. 3).

토양 호흡량과 탈수소효소의 활성도는 토양에서 전반적인 미생물 활성의 척도로 간주되고 있다 (Chendrayan *et al.* 1979, Kieft and Rosacker 1991). 그러므로 본 실험에서 PHB가 첨가된 토양에서 호흡량과 탈수소효소 활성도가 높은 것은 토양미생물의 활성이 증가했기 때문이며, 특히 PHB 분해 미생물의 활성이 크게 증가하였기 때문일 것이다. 실제로 20℃, 30℃ 및 40℃에서 PHB가 분해되는 동안에 그 주변 토양은 녹색으로, PHB 표면은 적색으로 변색되고 악취가 심하여 많은 미생물이 정착하였음을 짐작할 수 있었다.

적 요

생분해성 플라스틱인 poly- β -hydroxybutyrate (PHB)의 미생물에 의한 분해에 대하여 2, 10, 20, 30 및 40°C의 항온이 유지되는 토양에서 49일간 배양하면서 조사하였다. 무게 감소로 측정된 poly- β -hydroxybutyrate의 분해속도는 배양 온도가 높을수록 증가하였다. 배양 온도 40°C에서 poly- β -hydroxybutyrate는 하루당 3.5%의 무게감소 속도로 빠르게 분해되었다. 한편 토양에서 poly- β -hydroxybutyrate의 분해는 토양의 pH, 전기전도도와 같은 화학적 특성에는 큰 영향을 미치지 않았다. 그러나 탈수소효소 활성도로 나타난 토양미생물의 활성도는 poly- β -hydroxybutyrate의 분해에 따라서 증가하였다.

인 용 문 헌

- 신평균. 1997. 생분해성 고분자의 분해성 측정 및 평가방법 표준화 동향. 한국산업미생물학회지. 10: 27-33.
- 조경숙, 최희식, 류희옥, 조강현, 박성연. 1998. *Alcaligenes latus*에 의한 생분해성 플라스틱의 생산. 한국환경생물학회지 16: 47-55.
- Alef, K. 1995a. Soil respiration. In K. Alf and P. Nannipieri (eds.). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London. pp. 214-219.
- _____. 1995b. Dehydrogenase activity. In K. Alf and P. Nannipieri (eds.). Methods in Applied Soil Microbiology and Biochemistry. Academic Press, London. pp. 228-231.
- Briese, B.H., D. Jendrossek and H.G. Schlegel. 1994. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) by aerobic sewage-sludge. FEMS Microbiology Letters 117: 107-111.
- Brucato, C.L. and S.S. Wong. 1991. Extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Penicillium funiculosum*: general characteristics and active site studies. Arch. Biochem. Biophys. 290: 497-502.
- Chendrayan, K., T.K. Adhya and N. Sethunathan. 1979. Dehydrogenase and invertase activities of flooded soils. Soil Biol. Biochem. 12: 217-273.
- Doi, Y. 1990. Microbial Polyester. CVH, New York.
- _____, K. Mukai, K. Kasuya and K. Yamada. 1994. Biodegradation of biosynthetic and chemosynthetic polyhydroxyalkanoates. In Y. Doi and K. Fukuda (eds.), Biodegradable Plastics and Polymers. Elsevier, Amsterdam. pp. 39-51.
- Hendershot, W.H. and H. Lalonde. 1993. Soil reaction and exchangeable acidity. In M.R. Carter (ed.), Soil Sampling and Methods of Analysis. Canadian Society of Soil Science, Boca Raton. pp. 499-511.
- Jendrossek, D., I. Knoke, R.B. Habibian, A. Steinbuchel and H. G. Schlegel. 1993. Degradation of poly(3-hydroxybutyrate), PHB, by bacteria and purification of a novel PHB depolymerase from *Comamonas* sp. J. Environ. Polymer Degrad. 1: 53-63.
- Kasuya, K., Y. Doi and T. Yao. 1994. Enzymatic degradation of poly((R)-3-hydroxybutyrate) by *Comamonas testosteroni*-ATSU of soil bacterium. Polymer Degradation and Stability 45: 379-386.
- Kieft, T.L. and L.L. Rosacker. 1991. Application of respiration- and adenylate-based soil microbiological assay to deep subsurface terrestrial sediments. Soil Biol. Biochem. 23: 563-568.
- _____, E. Soroker and Firestone. 1987. Microbial biomass response to a arid increase in water potential when dry soil is wetted. Soil Biol. Biochem. 12: 119-126.
- Kita, K., K. Ishimaru, M. Teraoka, H. Yanase and N. Kato. 1995. Properties of poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from a marine bacterium, *Alcaligenes faecalis* AE122. Appl. Environ. Microbiol. 61: 1727-1730.
- Madigan, M.T., J.M. Martinko and J. Parker. 1997. Biology of Microorganisms. Prentice Hall, London. p. 986.
- Mergaert, J., A. Webb, C. Anderson, A. Woutens and J. Swings. 1993. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) in soils. Appl. Environ. Microbiol. 59: 3233-3238.
- Oda, Y., H. Asari, T. Urakami and K. Tonomura. 1995. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous

- fungi. *Journal of Fermentation and Bioengineering* 80: 265-269.
- Sheldrick, B.H. and C. Wang. 1993. Particle size distribution. *In* M.R. Carter (ed.), *Soil Sampling and Methods of Analysis*. Canadian Society of Soil Science, Boca Raton. pp. 499-511.
- (1998년 4월 14일 접수)