한국환경과학회지 제13권(제9호), 827~833, 2004
J. of the Environmental Sciences

전분 충전 아크릴레이트 필름의 α-Amylase에 의한 생분해

김 정 두 · 유 수 용 · 갑 상 규* · 주 창 식 · 이 민 규
부경대학교 응용화학공학부, *제주대학교 토목환경공학부
(*2004*년 *5*월 *20*일 접수; *2004*년 *8*월 *13*일 채택)

Biodegradation of Starch-Filled Acrylate Film by α-Amylase

Jung-Du Kim, Su-Yong Yoo, Sang-Kyu Kam*, Chang-Sik Ju and Min-Gyu Lee
Division of Applied Chemical Engineering, Pukyong National University, Busan 608-739, Korea
**Division of Civil and Environmental Engineering, Cheju National University, Jeju 690-756, Korea*
(Manuscript received 20 May, 2004; accepted 13 August, 2004)

The biodegradability of vinyl acetate acrylate resin and corn starch blend was studied by determination of the reduced sugars produced after enzymatic hydrolysis. The starch hydrolysis reaction by α-amylase was achieved within 5 minutes. Optimal ranges of temperature and pH for the starch hydrolysis by α-amylase were around 80 °C and 6.5-7.2, respectively.

The biodegradability of the starch-filled acrylate films increased as the content of starch increased. The biodegradation of starch in the starch-filled acrylate film by α-amylase was about 48.6% of that of pure starch. This value of biodegradable starch-filled acrylate film gave a good result with enzymatic shortcut test. The surface morphologies of the starch-filled acrylate film after enzymatic hydrolysis were investigated by scanning electron microscopy (SEM).

Key Words : Biodegradation, α-amylase, Enzyme, Starch, Acrylate film

1. 서 론

고분자 재료는 가볍고 물성과 가공성이 뛰어나 금속이나 세라믹과 함께 여러 산업 분야에서 널리 사용되고 있으며, 편리하고 쾌적한 생활을 지탱하는 중요한 재료가 되기는 하지만 고분자 재료의 대부분은 사용 후 폐기될 때 자연환경에 존재하는 생물체 및 효소작용에 의해 쉽게 분해가 되지 않거나 분해속도가 매우 느리기 때문에 환경오염문제를 야기시키고 있다[1].

이러한 환경오염문제를 해결하기 위하여 분해성 고분자의 개발이 우리나라를 비롯하여 전세계적으로 활발하게 추진되고 있으며, 합성 고분자의 주쇄 중에 ester 구조, acetyl 구조, amide 구조 및 ortho-ester 구조 등을 가지면 생분해가 가능한 것으로 알려져 있다[2~4]. 특히 이들 중 주쇄에 ester 구조를 갖는 지방족 폴리에스테르 생분해성 합성 고분자에 대하여는 많은 연구[5~8]가 이루어지고 있으나 이들 분해성 합성 고분자는 대체로 기존 합성 고분자의 생산 원가에 비하여 고가이므로 실제 생분해성 고분자 소재의 상용화는 매우 어려운 실정이다. 따라서 비교적 손쉽게 다량으로 얻을 수 있는 천연물로써 생분해성이 뛰어나고 가격 또한 저렴한 전분과 같은 천연 생분해성 소재의 충전형[9~12]이나 합성 고분자의 범용 수지와의 블랜드에 관한 연구[13~16], 또는 첨가된 전분 분말과 매트릭스인 고분자와의 계면접착력을 높이기 위하여 그라프트 공중합하는 연구가 많이 진행되고 있다. 전분을 열가소성으로 변형시키면 분말 전분과는 달리 또 다른 열가소성 천연 고분자로서 여러 가지 고분자 블렌드에 이용될 수 있다[17~21].

Griffin[22~23]은 폴리에틸렌(PE)에 전분을 혼합하여 전분이 6~20% 정도 함유된 성형물을 제조하였으며, Roper와 Koch[24]은 수분 함량이 2% 미만인 미처리 옥수수전분을 polyolefin에 도입시 물성이 향상된 필름을 얻을 수 있다고 보고하고 있다. 전분

Corresponding Author : Min-Gyu Lee, Division of Applied Chemical Engineering, Pukyong National University, Busan 608-739, Korea
Phone : +82-51-620-1468
E-mail : mglee@pknu.ac.kr

필름을 혼합효소용액 중에서 분해되는 전분의 양을 측정하였으며, Shan 등[25]은 저밀도 폴리에틸렌에 125~130℃에서 전분을 블렌딩하여 전분 충전 LDPE을 제조하여, 그 물리적 특성과 생분해도에 대하여 조사하였다. 또한, Wu 등[26]은 순수 전분에 폴리우레탄을 첨가함으로써 순수 전분 필름의 물리적 특성과 내수성을 향상시킬 수 있다고 보고하였다. 국내에서는 Lim 등[27]이 폴리올레핀에 전분을 물리적으로 혼합하여 생분해도에 대해 살펴보았고, Kim 등[28]은 폴리카프로락톤(PCL)/전분계 블렌드는 폴리올레핀/전분계와는 다르게 완전히 생분해되며 전분이 많이 첨가되어도 물성감소의 폭이 크지 않다고 보고하였다.

합성 고분자 물질인 아크릴레이트 중합체는 그 우수한 성질 때문에 공업용 점착테이프로써 그 용도가 넓을 뿐만 아니라 금속, 유리, 그 외 세라믹 기판 등 어디에나 적용이 가능하다. 자동차용뿐만 아니라 일반 수출 장비의 보호코팅제에도 이용 가능하다. 그러나 오늘날 환경에 대한 관심이 커지면서 이를 사용 후 처리가 심각한 문제로 대두되고 있다. 아크릴레이트 중합체에 관한 생분해 연구로는 Dennerbrg 등[29]이 전분과 폴리메틸아크릴레이트의 중합체를 제조하여 생분해성 멀칭 필름으로 응용할 수 있다고 한 보고가 있으나 최근, 벽지나 조선산업의 내장제 등에 많이 사용되는 vinyl acetate monomer(VAM)를 원료로 한 아크릴레이트 중합체의 생분해에 관한 연구는 보이지 않는다.

따라서 본 연구에서는 VAM을 원료로 하는 아크릴레이트 중합체를 합성하고 이를 전분과 블렌딩하여 제조한 필름의 효소에 의한 생분해능을 검토하였다. 아울러 효소 반응의 최적조건을 찾기 위해서 반응시간, 온도, pH, 효소 농도를 각각 변화시켜 그 특성을 살펴보았다.

2. 재료 및 실험 방법

2.1. 아크릴레이트 중합체 합성

본 실험에서 사용한 아크릴레이트 중합체는 직접 합성하여 사용하였다. 저속교반기, 환류냉각기, 분별깔때기, 온도계가 장착된 1 L 사구플라스크에 VAM와 메탄올을 혼합하여 60℃에서 개시제인 azobisisobutyronitrile(AIBN)을 넣고 3시간동안 반응시켜 합성하였다.

2.2. 전분의 효소 반응

천연고분자 물질인 전분은 옥수수 전분을 사용하였으며 분해도를 측정하기 위하여 사용한 효소는 Bacillus로부터 추출된 α-amylase를 Sigma(A6380)에서 구입하여 사용 사용하였다.

전분 자체만의 효소분해 반응을 살펴보기 위하여 전분을 인산 완충용액에 용해시킨 전분용액 1 mL를 시험관에 담아 shaking water bath에 5분간 담가 온도를 맞춘 후, α-amylase 효소용액 1 mL를 투입하여 일정시간동안 반응시켰다. 반응 후 분해산물인 환원당을 정량하기 위하여 3,5-dinitrosalicylic acid(DNS) 시약[30] 2 mL을 첨가하여 효소반응을 종결시키고 spectrophoto-meter(HANSON Technology Co. OPRON-3000)에 의해 575 nm에서 흡광도를 측정하여 환원당의 농도를 측정하였다.

2.3. 전분 충전 아크릴레이트 필름의 효소반응

합성한 아크릴레이트 중합체와 전분을 블렌딩하여 전분의 함량을 각각 5, 10, 20 및 30 wt%가 되게 끔 하여 전분충전 아크릴레이트 필름을 제조하였다. 필름의 크기를 0.5 cm × 0.5 cm × 0.4 mm로 자르고 이를 10 mg 채취한 뒤 0.1 M 완충용액 1 mL가 들어있는 시험관에 넣고(이때 전분의 농도를 환산하면 각각 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/mL이다) 80℃로 조절된 shaking water bath에 담그고 용액의 온도가 80℃에 달했을 때 효소용액 1 mL를 시험관에 주입하여 일정시간 반응시킨 다음 DNS 방법으로 환원당 농도를 측정하였다.

또한 필름은 건조시킨 다음 금으로 코팅처리하여 주사전자현미경(Scanning electron micrograph, Hitachi, S-2700)을 사용하여 사진을 촬영하였다.

3. 결과 및 고찰

Fig. 1은 본 연구에서 합성한 아크릴레이트 중합체의 FT-IR 결과를 나타낸 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 1000~1050 cm^{-1}에서 나타나는 아크릴 특정피크인 CH_2=CH기와 1732 cm^{-1}에서 나타나는 C=O기의 특정흡수대의 생성으로부터 아크릴레이트 중합체가 성공적으로 합성되었음을 확인 할 수 있었다.

Fig. 2는 온도에 따른 전분과 전분충전 아크릴레

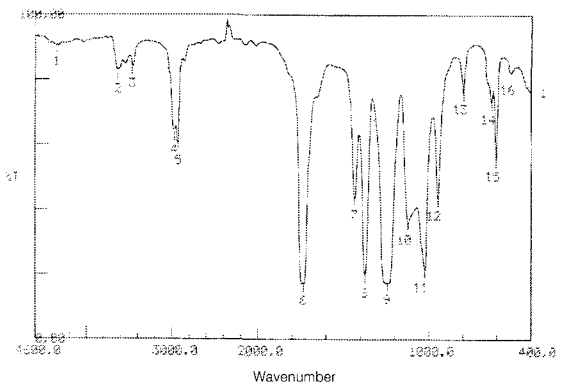


Fig. 1. FT-IR spectra of acrylate copolymer.

이트 필름의 효소반응의 특성을 검토한 결과를 나타낸 것으로 실험은 2 mg/mL의 전분과 100 unit /mL의 α-amylase를 pH 7.0인 조건하에서 일정 온도로 유지된 shaking water bath에서 15분간 반응시켰다. 결과에서 보듯이 반응온도가 증가함에 따라 효소에 의해 전분이 분해됨으로써 생성되는 환원당 농도는 증가하였으며 약 80℃ 부근에서 가장 높은 분해능을 보였다. 이는 전분은 60℃ 이하의 낮은 온도에서는 물에 잘 녹지 않아 반응이 잘 일어나지 않으나 온도가 이 보다 높아짐에 따라서는 전분이 호화됨에 따라 효소에 의한 전분의 가수분해반응이 촉진되지만 80℃ 이상의 너무 높은 온도에서는 효소의 변성에 의해 분해능이 감소하는 것으로 사료된다. 전분 충전 아크릴레이트 중합체 필름 역시 순수 전분과 같은 반응조건에서 온도의 영향을 살펴보았다. 그림에서 보는 바와 같이 순수 전분의 효소반응과 비교해 보면 분해도가 떨어지지만 온도에 대한 영향은 순수 전분의 효소반응과 동일한 경향을 나타내었다

Fig. 3은 순수 전분과 전분충전 아크릴레이트 필름을 α-amylase로 반응시켰을 때 시간에 따른 분해도를 나타낸 것으로 실험은 전분 농도 2 mg/mL, 효소 농도 100 unit/mL, pH 7.0, 온도 80℃에서 수행하였다. 그림에서 보는 바와 같이 α-amylase에 의한 전분의 가수분해 반응은 약 5 min 이내로 빠르게 완결되었다. 전분충전 아크릴레이트 필름 경우의 효소분해의 반응 시간도 역시 전분의 분해능과 유사한 경향을 나타내며 5 min 안에 반응이 완료됨을 알 수 있었다.

Fig. 4는 Fig. 3과 같은 조건에서 pH에 대한 영향을 살펴 본 결과로써 순수전분의 경우와 전분충전 아크릴레이트 필름의 경우도 역시 pH에 따라 동일한 경향을 보이며 pH가 약 6.5~7.2사이에서 분해능이 가장 높은 것으로 나타났다.

Fig. 5는 전분을 효소가수분해 시키는데 있어서 적당한 효소의 양을 결정하기 위하여 전분의 농도를 일정하게 하고서 효소농도를 변화시킴에 따른 분해도를 살펴본 그림이다. Choi 등[31]에 의하면 전분의 주요성분인 amylose는 물속에서 시간이 지남에 따라 amylose 분자끼리 결합하여 α-amylase에 대한 내성을 갖는 현상이 일어나는데 효소 농도가 낮을수록 이와 같은 현상이 일어날 빈도가 높으며, 반면에 효소농도가 높으면 amylose 서로 간에 결합이 일어나기 전에 효소와 반응하므로 전환율이 높아진다고 하였다. 그림에서 보는 바와 같이 효소농도가 증가함에 따라 분해생성물인 환원당의 농도가 증가하지만 2 mg/mL의 전분의 경우 효소농도가

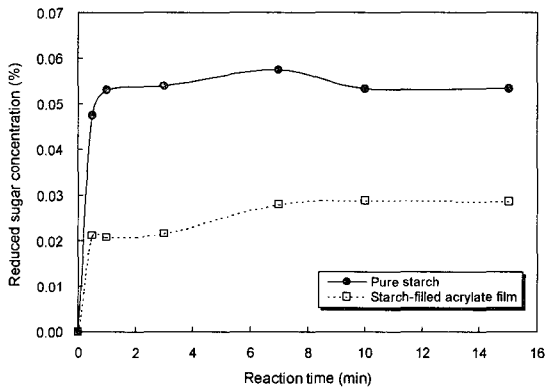


Fig. 3. Biodegradation profile of corn starch and starch-filled acrylate film by α-amylase (α-amylase : 100 units/mL, pH : 7.0, corn starch : 2 mg/mL).

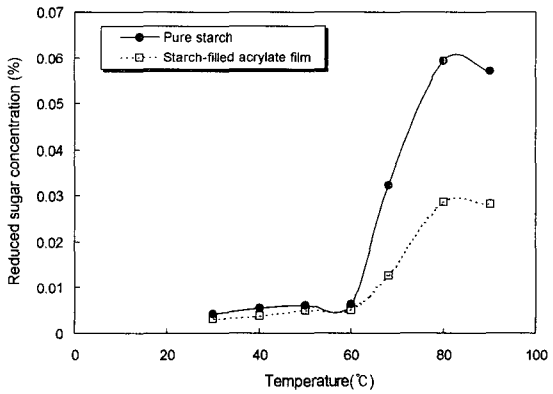


Fig. 2. Effect of temperature on the biodegradation of corn starch and starch-filled acrylate film by α -amylase (α-amylase : 100 units/mL, pH : 7.0, corn starch : 2 mg/mL).

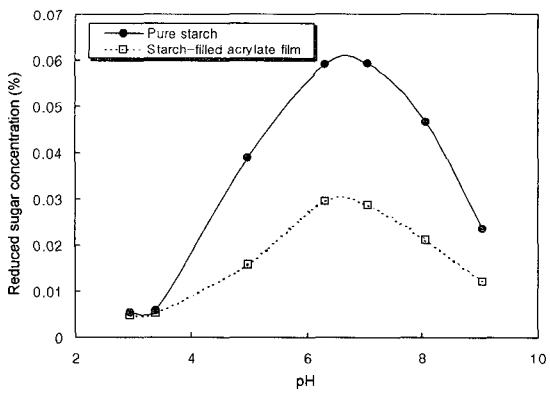


Fig. 4. Effect of pH on the biodegradation of corn starch and starch-filled acrylate film by α -amylase (α-amylase : 100 units/mL, temperature : 80℃, corn starch : 2 mg/mL).

100 unit/mL 이상에서는 환원당의 생성농도가 더 이상 증가하지 않고 거의 일정한 수준이 되는 것을 알 수 있다. 이는 2 mg/mL의 전분을 가수분해하는 데는 효소농도를 100 unit/mL가 적당하다는 것을 의미한다.

Fig. 6은 순수 전분의 가수분해효소인 α-amylase에 대하여 기질인 전분의 양을 달리함에 따른 분해능을 살펴 본 결과이다. 실험은 효소농도 100 unit/mL로 고정하고 pH 7.0, 온도 80℃에서 수행하였다. 그림에서 보여 지듯이 효소 100 unit/mL에 대하여 전분농도가 2 mg/mL 까지는 직선관계를 보이나, 전분농도가 2 mg/mL 이상에서는 증가기울기가 둔화되어 포화점에 도달하는 것으로 나타났다.

Fig. 6의 실험결과를 효소반응에서서 대표적으로 사용되는 속도식인 Michaelis-Meten 식의 형태로 나타내면 다음과 같은 식이 얻어졌다.

$$v=\frac{1.186[S]}{34.25+[S]} \quad (1)$$

실험결과와 식 (1)으로부터 구한 이론 결과치는 Fig. 6에서 보여 지는 것처럼 잘 일치하였다.

Fig. 7은 전분의 함량을 5%, 10%, 20%, 30%로 달리하여 제조한 전분충전 아크릴레이트 필름의 생분해 결과를 나타낸 것이다. 실험은 효소농도를 100 units/mL로 고정하고 pH 7.0 온도 80℃에서 수행하였으며 필름 내 전분의 함량이 5~30%로 증가(이 경우 전분의 농도를 환산하면 0.5, 1, 2, 3, 4 mg/mL에 상당) 할수록 분해생성물인 환원당의 농도가 증가하였다.

Fig. 8은 순수한 전분의 경우와 전분충전 아크릴레이트 필름의 효소에 의한 생분해 정도를 비교하여 나타낸 것으로 전분을 블렌딩한 필름의 경우는 순수 전분에 비하여 현저히 낮은 분해능을 보였는

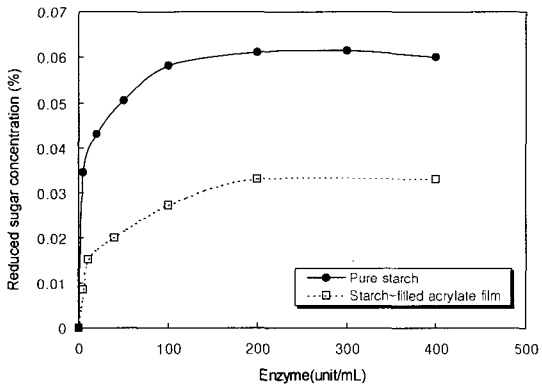


Fig. 5. Effect of α-amylase concentration on the biodegradation of corn starch and starch-filled acrylate film by α-amylase (starch : 2 mg/mL, pH : 7.0, temperature : 80℃).

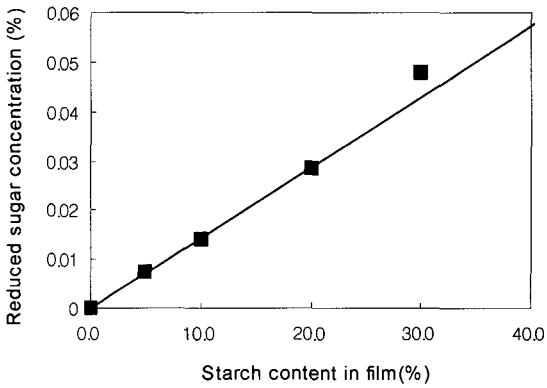


Fig. 7. Biodegradation of starch content of film by α-amylase (film : 10 mg/mL, α-amylase : 100units /mL, pH : 7.0, temperature : 80℃).

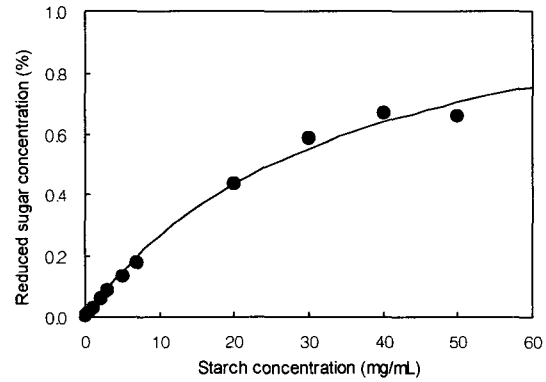


Fig. 6. Effect of starch concentration on the biodegradation of corn starch by α-amylase (α-amylase : 100 units/mL, pH : 7.0, temperature : 80℃).

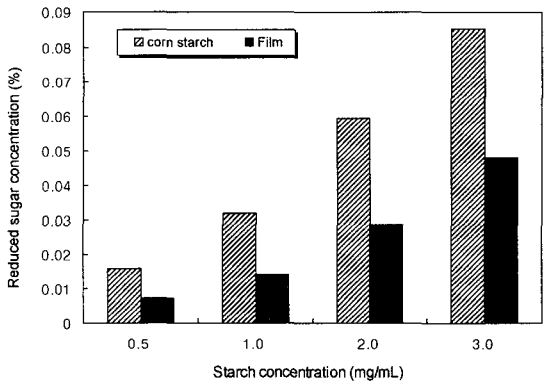


Fig. 8. Comparison of biodegradation of corn starch and starch-filled acrylate film.

데 이는 효소가 필름 내부로 침투하지 못하므로 인하여 필름 내에 충전된 전분의 모든 양을 분해하지 못하기 때문으로 사료된다. 또한 순수전분의 경우에 생성되는 환원당의 농도와 전분충전 아크릴레이트 필름의 경우에 생성되는 환원당의 농도로부터 전분충전 아크릴레이트 필름의 생분해도를 구한 결과를 Table 1에 나타내었다. 표에서 보여지듯이 전분충전 필름의 경우는 평균적으로 충전된 전분의 약 48.6% 정도가 분해되는 것으로 나타났다.

Fig. 9는 전분 충전 아크릴레이트 필름의 효소에 의한 생분해 정도를 관찰하기 위하여 SEM으로 필름의 표면을 관찰한 결과이다. 전분충전 농도를 0%, 10%, 20%, 30%로 각각 달리하여 블렌딩한 필름의 효소 분해 후 표면상태를 관찰한 것이다. 그림에서 보는 바와 같이 전분충전 농도가 증가 할수록 분해 정도가 확연히 진행됨을 확인할 수 있었다.

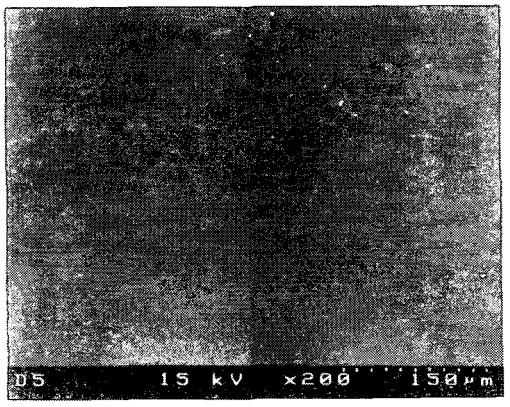
Table 1. Degradation of starch in film by α-amylase

Starch content (%)	Reduced sugar concentration of pure starch (%)	Reduced sugar concentration of film (%)	Degradation (%)
5	0.0160	0.0072	45.3
10	0.0318	0.0141	44.4
20	0.0593	0.0286	48.3
30	0.0853	0.0480	56.3
Average			48.6

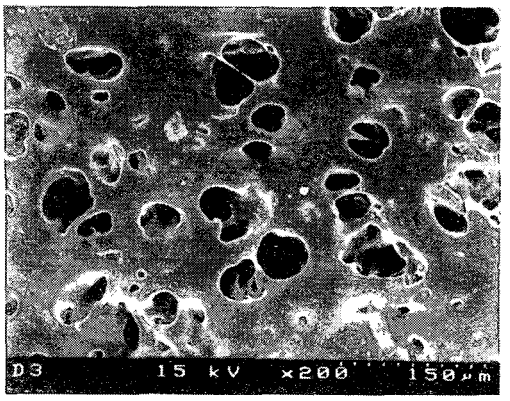
4. 결 론

비닐 아세테이트 아크릴레이트 중합체와 전분을 블렌딩하여 제조한 필름의 효소에 의한 생분해능 실험으로부터 다음의 결과를 얻었다.

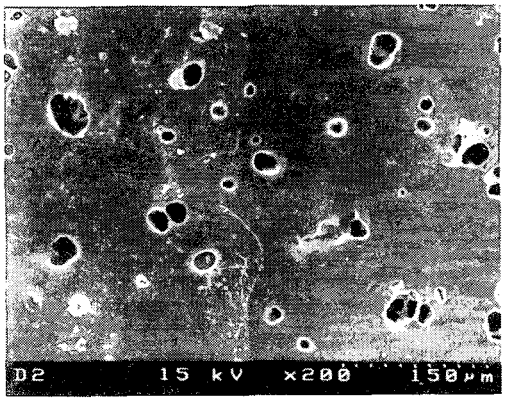
전분 충전 아크릴레이트 중합체 필름의 효과적인 반응 온도는 약 80℃ 부근에서 pH는 6.5~7.2에서



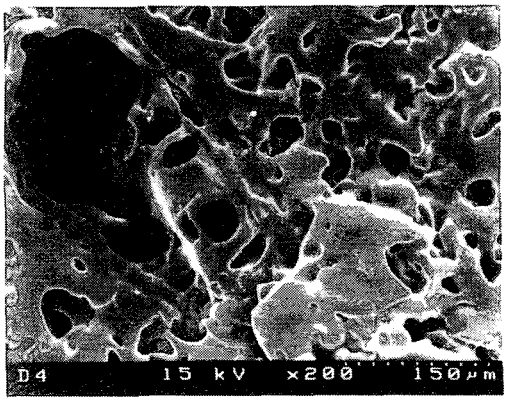
(a) Starch 0%



(c) Starch 20%



(b) Starch 10%



(d) Starch 30%

Fig. 9. Scanning electron micrograph of the surface of acrylate/starch composites after the biodegradation by α-amylase. (a) acrylate/starch (100/0) (b) acrylate/starch (90/10), (c) acrylate/starch (80/20), and (d) acrylate/starch (70/30).

가장 높은 분해도를 보였다. 온도 80℃, pH 7.0에서 전분충전 아크릴레이트 필름의 효소에 의한 가수분해 반응은 5 min 안에 빠르게 완결됨을 알 수 있었다. 전분충전 아크릴레이트 필름의 경우 전분충전 함량이 증가 할수록 생성되는 환원당의 농도가 증가하는 경향을 보였다. 따라서 생분해 소재의 전분 함유량이 생분해의 속도와 그 정도를 결정하는 것으로 사료되었다.

순수한 전분의 경우와 아크릴레이트 전분을 블렌딩한 필름의 경우에 대해 효소에 의한 분해도를 비교해 본 결과 아크릴레이트 중합체와 전분을 블렌딩한 필름의 경우에 효소에 의한 분해능은 순수 전분의 경우에 비하여 약 48.6% 정도가 분해되는 것으로 나타났다

감사의 글

본 연구는 산업자원부 지역전략산업 석박사 연구인력 양성사업의 지원에 의해 수행되었으며, 이에 감사드립니다.

참 고 문 헌

1) Shin, C. H., Y. J. Kim, B. S. Kim and B. Y. Shin, 2000, Mechanical properties and biodegradability of PCL/TPS blends, Polymer(Korea), 24(1), 48-57.
2) Tokiwa, Y. and T. Suzuki, 1977, Hydrolysis of polyesters by lipases, Nature, 270, 76-78.
3) Mang, M, J. White, S. Kram, D. Rick, R. Bailey and P. Swanson, 1997, Synthesis and properties of new biodegradable polyesters derived from diacids and diglycidyl ethers, Polym. Mater. Sci. Eng., 76, 412-413.
4) Rick, D. L., J. W. Davis, S. L. Kram, M. N. Mang and T. D. Lickly, 1998, Biodegradation of an epoxy-based thermoplastic polyester, poly(-hydroxy ester ether) in a laboratory-scale compost system, J. Environ. Polym. Degrad., 6, 143-157.
5) Tokiwa, Y. and T. Suzuki, 1981, Hydrolysis of copolyesters containing aromatic and aliphatic ester blocks by lipase, J. Appl. Polym. Sci., 26, 441-448.
6) Suyama, T. and Y. Tokiwa, 1997, Enzymatic degradation of an aliphatic polycarbonate, poly (tetramethylene carbonate), Enzyme Microb. Technol., 20, 122-126.
7) Park, T. W., H. J. Kang, Y. J. Kim and C. G. Lee, 1994, Study on the biodegradable aliphatic polyester (V), J. of Kor. Ind. & Eng. Chem., 5(6), 1068-1077.
8) Hakkarainen, M., 2002, Aliphatic polyesters: abiotic and biotic degradation and degradation products, Adv. Polym. Sci., 157, 113-138.
9) Gage, P., 1990, Degradable polyethylene film, Tappi Journal, 73, 161-169.
10) Griffin, G. J. L., 1974, Biodegradable fillers in thermoplastic, Advances in Chemistry Series, 134, 159-170.
11) Otey, F. H. and W. M. Doane, 1984, in Starch Chemistry and Technology, 2nd ed. Whistler, P. L., Bemiller, J. N. and Paschall, E. F., Academic press, New York, Chap. 11, 154-159 and 667-669.
12) Kim, Y. O., W. Y. Jo and D. M. Jo, 1994, Characteristics of starch-filled biodegradable plastics, Polymer Sci. and Technol., 5(1), 19-23.
13) Alvarez, V. A. and A. Vázquez, 2004, Thermal degradation of cellulose derivatives/starch blends and sisal fibre biocomposites, Polymer Degradation and Stability, 84(1), 13-21.
14) Raj, B., V. Annadurai, R. Somashekar, M. Raj and S. Siddaramaiah, 2001, Structure - property relation in low-density polyethylene - starch immiscible blends, European Polymer Journal, 37(5), 943-948.
15) Mani, M. and M. Bhattacharya, 2001, Properties of injection moulded blends of starch and modified biodegradable polyesters, European Polymer Journal, 37(3), 515-526.
16) Zuchowska, D., R. Steller and W. Meissner, 1998, Structure and properties of degradable polyolefin-starch blends, Polymer Degradation and Stability, 60, 471-480.
17) Swanson, C. L., R. L. Shogren, G. F. Fanta and S. H. Imam, 1993, Starch. plastic materials preparation, physical properties, and biodegradability (a review of recent USDA research), J. Environ. Polym. Degrad., 1, 155-166.
18) Vaidya, U. R. and M. Bhattacharya, 1994, Properties of blends of starch and synthetic polymers containing anhydride groups, J. Appl. Polym. Sci., 52, 617-628.
19) Liu, Z., Y. Feng and X. S. Yi, 1999, Thermoplastic starch/PVAl compounds: preparation, processing, and properties, J. Appl. Polym.

Sci., 74, 2667-2673.
20) Ratto, J. A., P. J. Stenhouse, M. Auerbach, J. Mitchell and R. Farrell, 1999, Processing, performance and biodegradability of a thermoplastic aliphatic polyester/starch system, Polymer, 40, 6777-6788.
21) Averous, L, N. Fauconnier, L. Moro and C. Fringant, 2000, Blends of thermoplastic starch and polyesteramide: processing and properties, J. Appl. Polym. Sci., 76, 1117-1128.
22) Griffin, G. J. L., 1977a, Biodegradable synthetic resin sheet material containing starch and a fatty material, U.S. Patent, 4,016,117.
23) Griffin, G. J. L., 1977b, Synthetic resin sheet material, U.S. Patent, 4,021,388.
24) Roper, H. and H. Koch, 1990, Starch/Strake, 42, 123.
25) Shan, P. B., S. Bandopadhyay and J. B. Bellare, 1995, Environmentally degradable starch filled low density polyethylene, Polymer Degradation and Stability, 47, 165-173.
26) Wu, Q. and L. Zhang, 2000, Structure and properties of casting films blended with starch and waterborne polyurethane, J. of Appl. Polym. Sci., 79, 2006-2013.
27) Lim, D. L. and S. S. Im, 1992, Biodegradable polyolefin composites containing starches, J. of Kor. Ind. & Eng. Chemistry, 3(3), 361-370.
28) Kim, S. H., I. J. Chin, J. S. Yoon, K. H. Lee, M. N. Kim and J. S. Jung, 1998, Biodegradable blends of PCL and starch graft derivatives, Polymer(Korea), 22(2), 335-343.
29) Dennerbrg, R. J., R. J. Bothast and T. P. Abbott, 1978, A new biodegradable plastic made from starch graft poly (methyl acrylate) copolymer, J. Appl. Polym. Sci., 22, 459-465.
30) Miller, L. G., 1959, Use of dinitrosalicyclic acid reagent for determination of reducing sugar, Anal. Chem., 3, 426-428.
31) Choi, S. H., K. N. Kang, T. H. Park and P. K. Shin, 1996, Measurement for determining the biodegradation of starch-filled polyethylene film by α-amylase, Kor. J. Biotechnol. Bioeng., 11(1), 86-91.