

## Polycaprolactone을 분해하는 토양미생물

김 말 남

상명대학교 자연과학부

## Soil Microorganism Degrading Polycaprolactone

Mal-Nam Kim

Devision of Natural Sciences, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

**Abstract** - Polycaprolactone (PCL), a synthetic aliphatic polyester, was buried in activated sludge soil for 66 days at 27°C and 37°C. The morphology of the surface of PCL film degraded by soil microorganisms was observed. Soil microorganisms degrading PCL were isolated and identified. Soil fungi and soil bacteria utilizing PCL as carbon or energy source were identified as *Paecilomyces fumosoroseus* KH27, *Penicillium digitatum* KH28, *Fusarium solani* KH29, *Aspergillus* sp. KH30 and *Ochrobactrum anthropi* KH31, respectively. Biodegradation test of PCL by the isolated strains showed that, *P. digitatum* KH28 exhibited the most PCL degrading activity at 27°C. However, at 37°C *O. anthropi* KH31 showed higher degrading activity than the other soil microorganisms tested.

**Key words** : Polycaprolactone, activated sludge soil, biodegradability

### 서 론

플라스틱은 그 물성이 다양하고 가공이 용이하여 매우 경제성이 높은 재료로서 음식이나 물건의 포장용기로 널리 이용되며 특히, 현대 산업사회에서는 일회용 포장용기 사용의 증가로 플라스틱의 소비량이 점차 늘어나고 있는 추세이다. 그러나 사용 후 남은 플라스틱 폐기물은 토양이나 하천 등의 자연환경에서 생물체 및 효소의 작용에 의해 분해되지 않고 축적되어 환경오염의 문제를 유발한다. 따라서 플라스틱 폐기물이 증가하고, 폐기물을 처리하는 쓰레기 매립지의 수용능력이 감소함에 따라 생분해성 고분자에 대한 관심이 고조되고 있다(Murphy *et al.*

1996). 생분해성 고분자들은 주사슬내에 에스테르 또는 펩티드 등의 결합을 포함하고 있어 생분해성을 보유하고 있기는 하나 공기 중에서도 수분에 의한 가수분해가 잘 일어나므로 일회용품 등 산업적으로 이용하기에는 불안정하다. 따라서 수분에 대해 저항성을 갖고 토양이나 해양에 서식하는 미생물이 분비하는 효소에 의해 분해가 가능한 합성고분자들의 개발이 필요하다(Mochizuki *et al.* 1995). 이러한 연구의 일환으로 개발된 polycaprolactone (PCL)은 polyethylene (PE)과 유사한 물리적 성질을 가진 반결정체의 열가소성 플라스틱이지만 토양매립 후에 PE보다는 훨씬 더 분해가 잘 되는 물질로써 의학 분야에서 약물조질 방출의 재료와 같이 생분해성이 요구되는 분야에 이용되고 있다(Raghavan 1995). 그러나 PCL은 신축성이 약하고 녹는점이 60~65°C로 낮기 때문에 용도가 극히 제한되고 있으며 다른 생분해성 고분

\* Corresponding author: Mal-Nam Kim, Tel. 02-2287-5150, Fax. 02-394-9585, E-mail. mnkim@smu.ac.kr

자인 poly ( $\beta$ -hydroxybutyrate)(PHB)보다는 분해가 더 느리다(Oda *et al.* 1995; Raghavan 1995). 인공적으로 합성한 PCL과는 달리 미생물의 에너지 저장수단으로 생합성되는 PHB는 PCL보다 더 높은 결정화도를 가지고 있으며 친수성이 더 높고 PHB의 분해에는 PCL보다 더 많은 종류의 미생물들이 참여한다. 본 연구는 활성오니토양에 존재하는 PCL 분해미생물을 분리, 동정하고 각 균주에 대한 PCL 분해능을 평가하여 활성이 우수한 PCL 분해미생물을 탐색하고자 수행되었다. 이를 위하여 PCL을 27°C와 37°C로 배양온도를 달리한 활성오니토양에 매립하고, PCL을 분해하는 토양진균과 토양세균을 분리, 동정한 후, PCL의 중량 감소를 측정하여 PCL 분해능을 조사하였다. 또한 토양미생물에 의해 분해된 PCL 필름 표면의 변화를 SEM으로 관찰하였다.

## 재료 및 방법

### 1. PCL 시료

수평균 분자량(Mn) 23,000 g mol<sup>-1</sup>, 무게평균 분자량(Mw) 43,000 g mol<sup>-1</sup>, 두께 200~250  $\mu$ m인 PCL 필름을 사용하였다.

### 2. PCL 필름 표면의 변화 관찰

서울시 중랑하수처리장에서 채취한 활성오니토양에 PCL 필름을 묻고 27°C와 37°C의 배양기(Jeio Tech, IB-22)에서 각각 66일간 배양한 후 시료의 표면변화를 SEM(JEOL JSM-T220)으로 촬영하였다.

### 3. PCL 분해미생물의 분리와 동정

활성오니토양에 매립한 PCL 필름으로부터 미생물현탁

액을 만들고 이것을 무기염배지(Kim and Kang 1995)에 접종하였다. 액체배양을 실시하고, 항세균제를 첨가한 Sabouraud Dextrose Agar (SDA) 배지에서 진균을 순수 분리배양하였다. 순수분리된 진균의 포자현탁액을 만들어 Pitt(1991)가 제안한 진균 동정용 표준배지인 Czapek Yeast Extract Agar (CYA), Malt Extract Agar (MEA) 및 25% Glycerol Nitrate Agar (G25N)에서 각각 7일간 배양하여 배양적 특성을 관찰하고, 균체를 25°C에서 7일간 슬라이드배양한 후 현미경으로 형태적 특성을 관찰하고(Gams *et al.* 1987), Compendium of soil fungi(Domsch *et al.* 1980), The Genus *Fusarium* (Booth 1971)과 A Laboratory Guide to Common *Penicillium* species (Pitt 1991)를 참조하여 동정하였다. 세균은 Nutrient Agar (NA)에서 순수분리배양하고 Microbe Identification System (Bio-Mérieux)을 이용하여 동정하였다.

### 4. 분리주의 PCL 분해능 조사

순수분리된 진균은 Potato Dextrose Agar (PDA)에서 7일간 배양하여 포자현탁액을 준비하였고, 세균은 NA에 배양하여 세균현탁액을 준비하였다. 무기염배지에 포자현탁액과 세균현탁액을 접종하고 PCL 필름을 넣어 27°C와 37°C에서 각각 배양하였다. 배양 후 PCL의 중량 감소를 측정하여 각 분리주의 PCL 분해능을 비교조사하였다.

## 결과 및 고찰

### 1. 토양미생물의 분해에 따른 PCL 필름 표면의 변화

활성오니토양에 존재하는 미생물에 의한 PCL 필름의 분해양상을 관찰하기 위하여 토양에 매립한 PCL 필름을 회수하여 SEM 촬영을 하였다. Fig. 1은 활성오니토양에

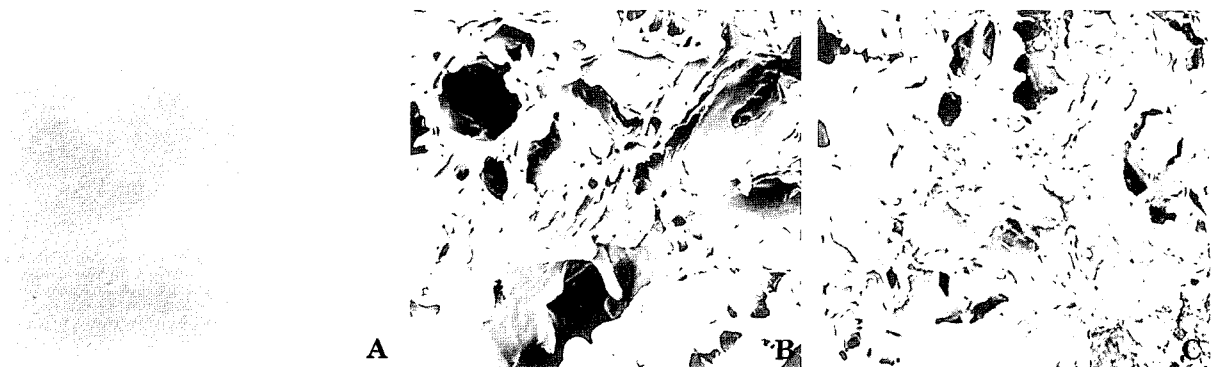


Fig. 1. SEMs of film buried in activated sludge soil at different temperatures after 66 days. A: neat PCL film, B: PCL film degraded at 27°C, C: PCL film degraded an 37°C.

**Table 1.** Morphological and cultural characteristics of the isolated fungi from activated sludge soil

Characteristics	Strain KH27	Strain KH28	Strain KH29	Strain KH30
On CYA (25°C)				
Color	Cream	White	Cream	Cream
Size (diameter)	20~25 mm	30~40 mm	35 mm	22~26 mm
Growth on CYA at 5°C	No growth	No growth	No growth	No growth
Growth on CYA at 37°C	7 mm	15~18 mm	30mm	35 mm
On MEA (25°C)				
Color	Brown	White	Cream	Grey~brown
Size (diameter)	15~16 mm	35~40 mm	24~26 mm	35~40 mm
On G25N (25°C)				
Color	Nd	Nd	White	White
Size (diameter)	0 mm	0 mm	9~11 mm	10mm
Reverse color	Brown	Pale	pale	Yellow
Conidiophores				
Shape	Simple	Terverticillate	Simple	Simple
Wall	Smooth	Smooth	Smooth	Smooth
Vesicle	Nd	Nd	Nd	Spherical
Conidia				
Shape	Fusiform	Cylindrical	Curved (macro)/ Oval (micro)	Globose
Size (µm)	2.4~3.6	6~8	10~40	1.5~1.8
Wall	Smooth	Smooth	3~5 septate (macro)/ 0~2 septate (micro)	Smooth
Phialides	Ampulliform	Cylindrical	Simple	
Chlamydo spores	Nd	Nd	Globose	Nd

Nd: Not detected.

PCL 필름을 66일간 매립하고 필름의 표면변화를 SEM 촬영한 것이다. Fig. 1-B와 1-C를 보면 PCL 필름 표면에서 작은 구멍들을 볼 수 있는데, 이것은 토양미생물에서 세포외효소가 분비되어 PCL이 분해된 결과이다. Nishida와 Tokiwa(1995)에 의하면 미생물이 PHB를 분해하는 초기에는 PHB 필름 표면에 작은 구멍이 생기고 분해가 진행되면서 구멍이 더 커져서 PHB 필름 내부를 관통하게 된다고 하였다. 본 연구결과에서는 온도의 차이에 따른 PCL의 분해양상을 비교하였으므로, Fig. 1-B에서의 구멍의 크기보다 더 큰 점으로 미루어 보아 37°C가 최적인 미생물군집보다 27°C가 최적인 미생물군집의 PCL 분해활성이 더 큰 것으로 보인다.

## 2. PCL을 분해하는 토양진균의 분리 및 동정

PCL을 분해하는 토양진균 4주를 활성오니토양에서 분리하여 각 분리주의 배양적, 형태적 특성을 조사하여 Table 1에 수록하였다.

분리주 KH27은 Table 1에 수록된 배양적, 형태적 특성과 Domsch 등(1980)에 준하여 *Paecilomyces fumosoroseus* KH27로 동정하였다. Oda 등(1995)은 PHB와 PCL 모두를 분해하는 곰팡이를 토양에서 분리하여 *Paecilomyces lilacinus*로 동정한 바 있는데, 이 경우와 본 실험결과를 볼 때 *Paecilomyces*속에는 PCL을 탄소원과 에너지원으로 이용하는 다수의 종들이 있음을 알 수 있다.

**Table 2.** PCL degrading microorganisms isolated from activated sludge soil

Organism	Incubation temp. (°C)	
	27	37
Fungi	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> KH27	
	<i>Penicillium digitatum</i> KH28	
	<i>Fusarium solani</i> KH29	<i>Fusarium solani</i> KH29
	<i>Aspergillus</i> sp. KH30	<i>Aspergillus</i> sp. KH30
Bacteria	<i>Ochrobactrum anthropi</i> KH31	<i>Ochrobactrum anthropi</i> KH31

*Penicillium*속에서 속하는 다른 종들의 분생포자의 크기는 보통 2.5~4 µm 정도인데 반해 분리주 KH28은 크기가 6 µm를 초과하는 큰 크기의 원통형 분생포자를 가지고 있는데 이것은 *Penicillium*속 중에서도 *Penicillium digitatum*의 대표적 특성이다(Domsch et al. 1980). 이러한 점과 Table 1에 수록된 배양적, 형태적 특성에 의하여 이 분리주를 *Penicillium digitatum* KH28로 동정하였다. *P. digitatum*은 감귤류의 부패를 일으키며, 토양이나 다른 자연환경에서 분리되기도 한다(Pitt 1991). 분리주 KH29는 Table 1에 수록된 배양적, 형태적 특성에 따라 *Fusarium solani* KH29로 동정하였다(Booth 1971). *F. solani*는 토양병원균으로 병든 식물체와 함께 월동하고, glycogen, inulin, starch와 cellulose를 분해하며(Domsch

**Table 3.** Biodegradability of PCL by the isolated strains at different temperatures after 21 days

Strain	<i>Paecilomyces fumosoroseus</i> KH27		<i>Penicillium digitatum</i> KH28		<i>Fusarium solani</i> KH29		<i>Aspergillus</i> sp. KH30		<i>Ochrobactrum anthropi</i> KH31	
	27	37	27	37	27	37	27	37	27	37
Temp. (°C)	27	37	27	37	27	37	27	37	27	37
Biodegradability <sup>a</sup> (%)	10	-	46	-	26	33	10	18	10	52

<sup>a</sup> Biodegradability: Weight loss (%) of PCL film by isolated strains.

et al. 1980), Kavelman과 Kendrick(1978)에 의해 토양으로 부터 PCL 분해균주로 분리되었다. 분리주 KH30은 분생자병 위에 구형의 정낭이 형성되고 그 위에 구형의 분생포자가 긴 사슬로 연결된 형태를 나타내며, Table 1에 제시한 여러 특성과 Domsch 등(1980)에 준하여 *Aspergillus* sp. KH30으로 동정하였다. *Aspergillus*속은 성장온도의 범위가 넓고, 온대의 토양, 퇴비, 부패한 식물체와 저장곡식에 서식하며 (Domsch et al. 1980), Kavelman과 Kendrick(1978)은 토양에서 PCL 분해균주인 *Aspergillus puniceus*와 *A. ustus*를 분리한 바 있다.

### 3. PCL을 분해하는 토양세균의 분리과 동정

27°C와 37°C의 활성오니토양에서 PCL을 분해하는 세균 6주는 그람양성균 2주와 그람 음성균 4주이었으며, 가장 PCL 분해능이 우수한 균주는 *Ochrobactrum anthropi* KH31로 동정되었다. 이 세균은 PHB를 탄소원으로 이용하고 유당과 전분을 가수분해한다 (Holt et al. 1993). PCL을 분해하는 토양세균으로는 Benedict 등(1983)이 미국 Connecticut의 강과 호수의 퇴적물로부터 분리한 *Acinetobacter calcoaceticus*와 토양과 활성오니혼합물에서 Oda 등(1997)이 분리한 *Alcaligenes faecalis*가 보고된 바 있다.

### 4. 분리주의 PCL 분해능 조사

Table 2는 27°C와 37°C의 활성오니토양으로부터 분리된 PCL을 분해하는 토양진균과 토양세균을 수록한 것이며, PCL 분해능을 조사하여 Table 3에 제시하였다.

27°C에서는 *P. digitatum* KH28이 가장 높은 PCL 분해능을 보였고, 37°C에서는 *O. anthropi* KH31이 가장 우수하였다. *P. fumosoroseus* KH27은 27°C에서 10%의 분해능을 보여 본 실험에서 분리된 토양진균 중에서 가장 낮은 PCL 분해능을 보였다. 이 균주는 *P. fumosoroseus* KH27과 마찬가지로 37°C의 토양에서는 분리되지 않았으므로 37°C에서는 분해능이 없는 것으로 나타났다. *F. solani* KH29와 *Aspergillus* sp. KH30은 37°C에서의 분해도가 27°C보다도 약간 더 높은 것으로 나타났는데 이는 최적 성장온도가 27°C보다는 37°C에 가깝기 때문으

로 보인다. 한편 토양세균인 *O. anthropi* KH31은 27°C에서는 10%의 낮은 분해능을 보였으나, 37°C에서는 52%의 PCL 분해능을 나타낸 것은 이 세균의 생장이 27°C에서보다 37°C에서 더 활발한 것이 그 원인으로 보인다. 한편 *Penicillium* sp.를 분리하여 pH 7.0, 30°C의 조건에서 PCL에 대한 분해능을 실험한 결과 12일 후에 PCL을 완벽하게 분해하였다고 보고한 Tokiwa 등(1976)의 연구 결과에 비교해볼 때 본 실험에서 분리된 *Penicillium*속의 PCL 분해능은 다소 부진한 것으로 나타났다.

## 적 요

유기합성적으로 제조된 지방족 폴리에스테르의 일종인 polycaprolactone (PCL)을 27°C와 37°C로 온도를 달리한 활성오니토양에 66일간 매립하여 토양미생물에 의해 분해된 PCL 필름의 표면변화를 관찰하고, PCL을 분해하는 토양진균과 토양세균을 분리, 동정하였다. PCL을 탄소원과 에너지원으로 이용하는 토양진균으로는 *Paecilomyces fumosoroseus* KH27, *Penicillium digitatum* KH28, *Fusarium solani* KH29와 *Aspergillus* sp. KH30, 토양세균으로는 *Ochrobactrum anthropi* KH31이 분리되었다. 27°C에서는 *P. digitatum* KH28이 가장 높은 PCL 분해능(46%)을 보였고, 37°C에서는 *O. anthropi* KH31의 분해능(52%)이 가장 우수하였다.

## 참 고 문 헌

- Benedict CV, JA Cameron and SJ Juang. 1983. Polycaprolactone degradation by mixed and pure cultures of bacteria and a yeast. *J. Appl. Poly. Sci.* 28:335-342.
- Booth C. 1971. The Genus *Fusarium*. Commonwealth Mycological Institute. Kew Survey. England.
- Domsch KH, W Gams and TH Anderson. 1980. Compendium of soil fungi. Vol. 1-2. Academic Press, London.
- Gams W, HA Van der Aa, Van der HJ Plaats-Niterink, RA Samson and JA Stalpers. 1987. *Cetraalbureau voor Schimmelcultures*. CBS course Mycol. pp.16-18.

- Holt JG 1993. Bergey's manual of determinative bacteriology. 9th. Williams & Wilkins. Baltimore.
- Kavelman R and B Kendrick. 1978. Degradation of a plastic-poly epsilon-caprolactone-by hyphomycetes. Mycologia 70:87-103.
- Kim MN and EJ Kang. 1995. Biodegradation of Poly(3-hydroxybutyrate) by *Penicillium pinophilum*. Kor. J. Mycol. 23:354-358.
- Mochizuki M, M Hirano, Y Kanmuri, K Kudo and Y Tokiwa. 1995. Hydrolysis of polycaprolactone fibers by lipase: Effects of draw ratio on enzymatic degradation. J. Appl. Poly. Sci. 55:289-296.
- Murphy CA, JA Cameron, SJ Huang and RT Vinopal. 1996. *Fusarium* polycaprolactone depolymerase is cutinase. Appl. Environ. Microbiol. 62:456-460.
- Nishida H and Y Tokiwa. 1995. Confirmation of colonization of degrading bacterium strain SC-17 on poly(3-hydroxybutyrate) cast film. J. Environ. Polym. Degrad. 3:187-197.
- Oda Y, H Asari, T Urakami and K Tonomura. 1995. Microbial degradation of poly(3-hydroxybutyrate) and polycaprolactone by filamentous fungi. J. Ferment. Bioeng. 80:265-269.
- Oda Y, N Oida, T Urakami and K Tonomura. 1997. Polycaprolactone depolymerase produced by the bacterium *Alcaligenes faecalis*. FEMS Microbiol. Lett. 152:339-343.
- Pitt JI. 1991. A laboratory guide to common *Penicillium* species. Common Scientific and Industrial Research Organization Division of Food Research.
- Raghavan D. 1995. Characterization of biodegradable plastics. Polym. Technol. Eng. 34:41-63.
- Tokiwa Y, T Ando and T Suzuki. 1976. Degradation of polycaprolactone by a fungus. J. Ferment. Technol. 54: 603-608.

Manuscript Received: April 23, 2004

Revision Accepted: July 1, 2004

Responsible Editorial Member: Ho Yong Lee  
(Sangji Univ.)