

생분해성 지방족 폴리에스테르에 관한 연구(II): Copolyesterethylene의 생분해성 평가

강 혜 정[†] · 박 태 욱 · 임 윤 택^{*}

국립기술품질원 고분자재료과, *유기화학과

(1996년 8월 5일 접수)

Biodegradable Aliphatic Polyester (II): Evaluation of Biodegradability of Copolyesterethylene

Hye Jung Kang[†], Tae Wook Park, and Yoon Taek Lim^{*}

Polymer Materials Division, *Organic Chemistry Division,

National Institute of Technology and Quality, Kwachon City 427-010, Korea

(Received August 5, 1996)

요 약: 합성한 aliphatic polyester인 copolyesterethylene (CPEE)의 생분해성을 토양미생물, 효소 및 실험실적 토양매립시험 (pot test)에 의해 평가하였다. CPEE의 생분해성을 평가하기 위하여 CPEE에 대해 친화성을 갖는 4종의 미생물을 토양으로부터 분리하였다. 이들 4종균주의 미생물학적 특성을 비교, 동정한 결과 각각 *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium olsonii* 및 *Fusarium semitectum*인 것으로 알려졌으며 이들 미생물의 enzyme activity는 pH 6~8 범위에서 증가하는 것으로 나타났다. 이들 미생물에 의한 CPEE의 분해성 평가결과 분해율은 각 균주별로 차이가 있었으나 8주 후 70~95%의 중량감소율을 나타내었다. 또한 실험실적 토양매립에 의한 분해성 평가결과 6개월 후 약 11%의 중량감소와 함께 분자량 감소를 보여주었으며 *Rhizopus Arrihzus* lipase를 이용한 효소에 의한 분해성 평가결과 48시간 후 35.5%의 분해율을 나타내었다.

ABSTRACT: Biodegradability of the aliphatic polyester synthesized, copolyesterethylene (CPEE), was investigated by the microorganism and enzyme treatment and the laboratory soil burial test (pot test). In order to evaluate the biodegradation of the CPEE, four kinds of microorganisms which have the affinity for CPEE were isolated from soil. These microorganisms were microbiologically identified as *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium olsonii* and *Fusarium semitectum*, respectively and showed an increase in the enzyme activity in the range of pH 6~8. With the microorganism treatment, the rate of biodegradation in terms of weight loss was 70~95%, depending on the kind of microorganism treated. Also the laboratory soil burial test showed about 11% weight loss and a decrease in the molecular weight of CPEE after 6 months of exposure to microbe present in the soil. With lipase (*Rhizopus Arrihzus*) treatment, the rate of biodegradation of CPEE was about 35% after 48 hrs of degradation.

서 론

합성 플라스틱은 그 내구성 때문에 현대생활의 여러 소비재 및 특수분야에 널리 이용되고 있으나, 그 사용량의 증가로 인하여 폐플라스틱이 발생하는 환경

오염문제를 야기시키고 있다. 이는 폐플라스틱이 토양이나 하천 등의 자연환경에서 생물체 및 효소작용에 의해 분해되지 않는다는 것이 그 근본원인이다. 이러한 환경공해 문제 해결의 일환으로 생분해성 플라스틱의 개발이 국내·외에서 활발히 진행되고 있다.^{1,2}

합성 고분자의 생분해성은 주쇄의 화학구조, 분자량, 결정성, 용점 등에 영향을 받으며 고분자 주쇄에 ester, peptide, ether, urethane 등 가수분해가 가능한 결합을 포함할 때 생분해성을 보유하게 된다.³ 이러한 생분해성 합성고분자로는 aliphatic polyester와 poly(vinyl alcohol), poly(ethylene glycol) 등이 알려져 있으며 토양이나 물속에 존재하는 자연계의 미생물에 의해 분해 및 자화되거나 또는 효소에 의해 분해되는 것으로 알려져 있다. 특히 ester결합을 갖는 polyglycolide, polylactide, polycaprolactone과 같은 aliphatic polyester는 생분해성이 우수한 물질로 이에 대한 합성 및 분해성에 관한 연구가 많이 수행되고 있다.⁴⁻⁶

새로운 분해성 고분자의 개발과 함께 분해성 평가 기준 설정은 매우 중요한 과제로서 생분해성 고분자의 분해 mechanism의 규명, 분해성의 정확한 평가 및 안정성의 평가에 관한 연구가 함께 병행되어야 한다. 그러나 현재로서는 확실히 설정된 분해성 평가방법은 없으나 일반적으로 효소에 의한 방법,⁷ 미생물에 의한 방법,⁸ 토양 매립에 의한 방법,⁹ C¹⁴ 동위원소법¹⁰ 등이 이용되고 있으며 분해 전과 후 고분자의 중량변화, 기계적 성질 및 분자량의 변화, TOC (total organic carbon, 전유기탄소) 등을 측정함으로써 합성 고분자의 분해성을 평가하고 있다.

최근 본 연구진에서는 hydroxy terminated poly(ϵ -caprolactone)과 diacid와의 polycondensation 및 chain extension 반응을 통해 높은 분자량의 aliphatic polyester인 copolyesterethylene (CPEE)을 합성하고 이의 물성에 대하여 연구, 보고하였다.¹¹

본 연구에서는 합성한 aliphatic polyester인 CPEE에 대하여 친화성을 갖는 분해미생물을 토양으로부터 분리하고, 이들 미생물과 효소에 의한 평가 및 실험실적 토양매립 등의 방법을 통하여 CPEE의 분해성을 평가하였다.

실 험

시편제조. 합성 CPEE 1.5 g을 15 mL의 chloroform용액에서 교반 용해하고 Petri dish에서 상온하에 용매를 증발시켜 두께 약 200 μ m의 필름을 얻고, 이로부터 2.5 $\times$ 5.0 cm 크기의 시편을 만들어 silica

gel 건조용기에서 24시간 건조하여 무게를 정확히 달아 자외선 살균기 내에 3-4시간 방치한 후 분해용 시험편으로 사용하였다.

토양 미생물의 분리. 임야, 논, 밭 및 쓰레기 매립장 주변등지에서 채취한 토양시료를 1.0 g씩을 평량하여 멸균수로 3-5단계 희석하여 토양 용액을 제조하였다. PDA (potato dextrose agar) 배지를 준비하여 각 토양 용액 0.1 mL씩을 접종하고 30 $^{\circ}$ C, 습도 95%, 0.05% CO₂ 배양기를 사용하여 배양된 미생물의 colony를 분리하였다. 친화성 실험은 조제한 CPEE 무기염배지 15 mL씩을 샬레에 무균적으로 분주하여 굳히고, 여기에 토양 희석 용액 0.1 mL씩을 접종하였다. 이를 30 $^{\circ}$ C의 항온 배양기를 사용하여 약 48시간 배양 후 배양되는 균주 성장 colony 주변에 생성되는 clear zone을 확인하고 이를 CFU (culture forming unit)로 나타내었다.

CPEE 함유 무기염 배지에 성장된 미생물중 clear zone 형성이 가장 강력하고 빠른 속도로 확산되는 균주를 채취하여 PDA 배지에 100 μ L 분주하여 도말하였으며 액상 배양은 진탕 속도 80 rpm, 30 $^{\circ}$ C의 항온 진탕배양기에서 7일간 배양하여 생육이 왕성한 균주를 선별 분리하였으며 평판배양은 30 $^{\circ}$ C, 95%의 항온습기로 계대배양하여 균주를 순수 분리하였다.

분리균주의 동정. 상기의 선별균주를 Domsch 등의¹² Compendium of Soil Fungi, Samsons 등의¹³ Introduction to Food-Borne Fungi, 그리고 기타문헌의^{14,15} 방법에 따라 형태학적 및 배양학적 특징을 조사하여 동정하였다.

균주의 특성비교. 순수 분리 균주의 life cycle을 관찰하기 위하여 cell culture plate에 성장된 colony를 micro image analyzer (ZEISIS Corp., model Jenamed-2, Germany)를 사용하여 성장된 미생물의 생태를 관찰하였다. 배양 용액의 액성 측정 은 0.45 μ m의 Wattman filter를 사용하여 여과액을 pH/ion meter로 측정하였으며, lipase activity는 olive oil을 기질로 사용하여 emulsion 방법^{16,17} 따라 측정하였다. 성장된 미생물의량은 Wattman filter paper No. 1을 사용하여 여과하고 105 $\pm$ 1 $^{\circ}$ C의 건조기를 사용하여 중량법으로 하였다.

분해성 평가.

• 표본토양에 의한 분해성 실험 (Pot Test): 자연 환

경에서 생존하고 있는 토양 미생물중 토양 환경 구분이 가능하도록 삼림, 농경지, 하천변, 도로변, 해안 등 9개 지역을 대상으로 3월 초순에 채집하여 사용하였다. Pot test는 공기 및 투습이 잘 될 수 있는 지름 15 cm, 높이 15 cm의 원통형 상자에 각각의 채집 토양과 일정 비율로 섞은 혼합 토양을 담고 CPEE필름 시험편을 크기 2.5×5.0 cm로 잘라 토양 상자에 약 7 cm 깊이로 묻어 온도 30°C , 습도 $95 \pm 2\%$ 의 항온항습기를 사용하여 분해성능을 실험하였다.

효소에 의한 분해성 실험: 분해성 평가용 효소로는 독일 BMY사 제품인 *Rhizopus Arrihzus* lipase suspension을 사용하여 문헌에¹⁸ 따라 실험용액을 조제하여 사용하였으며, 평가시료는 가능한 한 잘게 쪼개어 사용하였다. Lipase에 의한 시료의 분해성은 항온진탕기 (Precision Corp., Model 50, U.S.A)를 사용하여 실험용액을 분해시간별로 효소분해시킨 다음 $0.2 \mu\text{m}$ membrane filter로 분해용액을 여과하고 이들 여과된 수용액중의 TOC함량을 TOC분석기 (Astro Corp., Model 2001, U.S.A.)로 측정함으로써 평가하였다.

미생물에 의한 분해성 실험: 균주 현탁 용액과 접종용액은 문헌에¹⁹ 따라 제조하였다. 미생물 접종에 의한 분해는 무기염 멸균 agar 배양액을 약 20 mL씩 사려에 분주하여 굳힌 평판배지상에 CPEE필름을 각 1매씩 삽입하여 균주 접종용액 0.1 mL씩 접종한 후 항온항습 CO_2 배양기를 사용하여 분해 성능을 실험하였다. 분해 잔류물의 측정에는 생분해 기간별 실험 완료 후, 미생물 균주 채취용 scraper와 멸균수를 사용하여 분리하고 무게를 아는 slide glass 위에 옮겨 40°C 의 건조기 내에서 3-4시간 건조하여 무게 변화량을 측정하였다.

결과 및 고찰

토양미생물의 분리. 채집한 각 토양 시료에 대하여 측정된 PDA 배지에 성장된 총 미생물군 (CFU/g)의 수와 CPEE와의 친화성 실험에서 형성된 생분해성 미생물의 개수 (CFU/g)결과를 Table 1에 나타내었다. 미생물의 함존량은 오염원이 많은 쓰레기 매립지역과 수분 및 유기물질이 많은 삼림 부숙 토양에

Table 1. Quantity of the CPEE Biodegradable Microorganism in Soil Samples

soil samples	total colonies	degradable colonies
	(CFU/g)	(CFU/g)
reclaimed land of waste	3×10^5	4×10^3
horticulture nuresery	5×10^3	2×10^2
side of waterways	3×10^3	2×10^2
forest soil rot	2×10^5	3×10^3
reclaimed land of waste industry	5×10^4	3×10^2
ginseng patch	1×10^3	70
field of farming	5×10^2	40
seaside	7×10^2	1×10^2
side of street	2×10^2	1×10^2
mixed soil	5×10^4	2×10^2

서 가장 많았고 수분량이 적은 밭 등의 토양에서는 보다 적은 수의 미생물군을 확인하였다. 0.5%의 CPEE를 함유한 plate상에 성장한 균주의 대사 작용으로 고분자 구조내의 ester 결합 부분이 가수분해되면서 생성되어 유리되는 수용성 유기탄소가 유일한 유기물질인 영양 공급원이다. 미생물의 에너지 대사 작용에 의해 고분자가 분해되면서 미생물의 개체 주변에 투명하게 형성되어 나타난 무리 (clear zone)를 관찰함으로써 생분해능 및 친화성을 비교하였으며, 채집 토양 모두에서 그 존재를 확인하였다. 유기물이 다량 함유되어 있는 삼림 부숙 토양의 경우 미생물의 양이 많아 4×10^3 CFU/g을 나타내었으며, 같은 비율로 혼합한 혼합토양에서는 CPEE분해성 미생물군이 2×10^2 CFU/g이 함존함을 확인하였다.

분리균주의 동정 및 미생물학적 특성. 검색한 토양 미생물중 CPEE를 강력하게 분해하는 균주를 선별하기 위하여 수차례의 계대배양을 거쳐 순수분리하였으며, 각 균주를 CPEE함유 plate 상에 접종하여 48시간 이후에 형성된 clear zone을 비교 관찰하였다. 그 결과 순수 분리된 aliphatic polyester 분해성 미생물 4종류에 대하여 비교 조사하였다. Glucose 첨가 또는 PDA 배지에 접종 후 온도 30°C , 습도 95% 및 0.05% CO_2 의 배양기에서 168시간 동안 배양한 후 외관을 관찰한 색조를 각각 Bw, Y, G 및 W로 구분하였다. 그 결과 Fig. 1에서와 같이 colony주변의 생분해 확산 속도가 가장 빠른 균주는 W 균주임을 알 수 있었으며, 가장 느리게 진행되는 균주는 Bw 균주

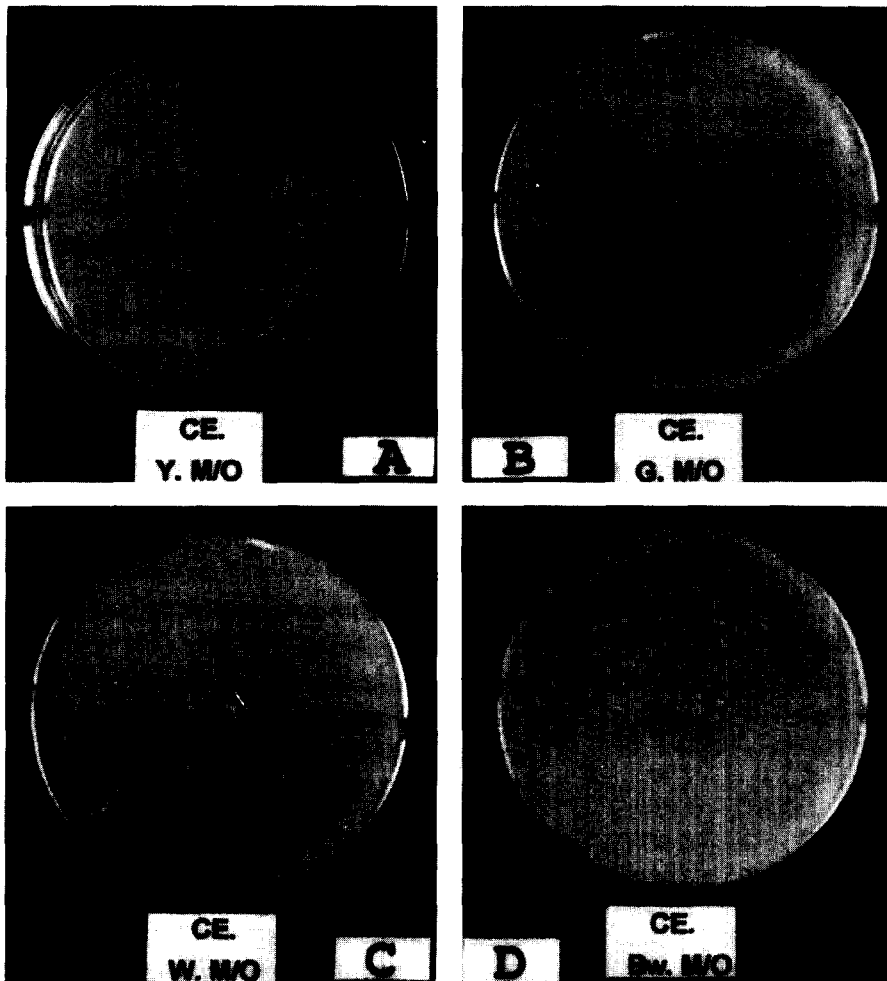


Figure 1. Clear zone formed on CPEE agar plate by 4 different biodegradable microorganisms: Y(A), G(B), W(C), and Bw(D).

임을 확인하였다. 또한 colony 주변에 형성된 clear zone의 투명성이 가장 선명하게 나타난 균주는 Y 및 Bw 균주였고, colony 주변에 2개의 ring을 갖는 형태로 확산되는 균주는 W임을 확인할 수 있었다.

이들 분리균주를 동정하기 위해 선별균주를 CYA (Czapek yeast extract agar)에 접종하여 25 °C에서 7일간 배양한 후 위상차 현미경 및 투사 전자현미경을 사용하여 선별균주 각각에 대한 형태적 특징들을 살펴보고 생리적 특징들도 살펴보았다.

선별균주 G의 동정 및 미생물학적 특성: Fig. 2은 선별 균주 G의 현미경사진이며 구조적으로 볼때

smooth-walled type의 분생자병을 지니고 있으며 그 윗부분이 팽창하여 주걱 모양의 정낭을 형성하고 정낭 위에 바로 경자가 형성되어 있고 경자 위에 원추형의 분생자두가 형성되어 있으며 분생자두를 따라 긴사슬의 분생자가 연결된 형태를 이루고 있었다. 분생자는 구형이며 표면은 smooth type이었다.

또한 CYA에서 배양하였을 때 직경이 2.9 cm인 colony를 형성하였고 이때의 colony 색깔은 grey green이었다. MEA (malt extract agar)에서 배양하였을 때는 직경이 5.5 cm인 colony를 형성하였으며 CYA에서 보다 빠른 생육을 보였다. 또한 비교적



Figure 2. Microscopic photogram (A) and electromicroscopic photograms (B, C) of selected strain *Aspergillus fumigatus* G. (A) conidiophores and conidia, (B) apex of conidiophore with conidia, (C) conidia.

넓은 온도범위에서 생육하였으며 최적 생육 온도는 37 °C였다. 선별균주의 형태적·배양학적 특징들을 Table 2에 정리하여 나타내었다. 이상과 같은 특징들은 *Aspergillus fumigatus*와 그 특징이 거의 유사하였으므로¹²⁻¹⁵ 선별균주 G를 *Aspergillus fumigatus*로 최종 동정하였다. *Aspergillus fumigatus*는 전세계적으로 널리 분포하며 glucose, maltose, sucrose, lactose, cellobiose, inuline, starch, casein, peptone, urea, cyanamide 등에서 잘 생육하며, 석유자원으로부터 hydrocarbon들을 이용하여 부드러운 PVC물질 및 DDT 등을 분해한다고 알려져 있다.¹² 또한 *Aspergillus fumigatus*는 amylase, lipase, phosphatase 등과 같은 여러 가지 분해효소를 생산한다고 보고되고 있다.²⁰ 그리고 이 균은 항박테리아성 항생물질인 fumigatin을 생산하는 것으로 알려져 있다.^{13,14}

선별균주 Y의 동정 및 미생물학적 특성: Fig. 3는 선별균주 Y의 현미경사진이며 구조는 smooth-

Table 2. Morphological and Cultural Characteristics of Strain G and Y

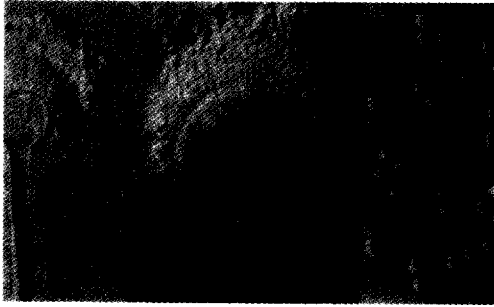
characteristics	G	Y
colony morphology		
on CYA*		
color	grey-green	cream
size(diam.)	29 mm	40 mm
on MEA**		
size (diam.)	55 mm	42 mm
growth at 5 °C	no growth	no growth
growth at 37 °C	80 mm, grey	70 mm, khaki
reverse color	pale	blond
conidial head	columnar	compact column
stipes	smooth-salled	smooth-walled
vesicle	spatulate	spherical
aspergilla	uniseriate	biseriate
phialides	cover 2/3 of vesicle	cover 2/3 of vesicle
conidia		
shape	globose, ovoid	globose
wall	smooth	smooth

*CYA : Czapek yeast extract agar.

**MEA : Malt extract agar.

walled type의 분생자병위에 구형의 정낭을 형성하고 그 위에 이중 배열의 aspergilla가 형성되어 있으며, 경자는 기저경자위에 형성되고 경자위에 원주형의 분생자두가 밀집되어 있으며 분생자두의 색깔은 옅은 황갈색이고, 분생자두를 따라 긴 사슬의 분생자가 연결된 형태를 이루고 있었다. 분생자는 구형이며 표면은 smooth type이었다.

또한 선별균주를 CYA에서 배양하였을 때 직경이 4.0 cm인 cream색의 colony가 형성되었으며, MEA에서 배양하였을 때에는 직경이 4.2 cm인 colony가 형성되었으며 CYA에서 배양하였을 때와 비슷한 생육을 보였다. 온도에 따른 생육양상을 살펴보았을 때 5 °C에서는 전혀 자라지 못했으며 37 °C에서는 아주 잘 자랐다. 선별균주의 형태적·배양학적인 특징들을 Table 2에 정리하여 나타내었다. 이상과 같은 특징들은 *Aspergillus terreus*의 특징과 거의 유사하였으므로¹²⁻¹⁵ 선별균주 Y는 *Aspergillus terreus*로 최종 동정하였다. *Aspergillus terreus*는 전세계적으로 널리 분포하는 토양균주로서 peptone, casein, urea 같은 N source에서 잘 자라며, starch, pectin, tannin, cellulose와 wheat 등과 같은 cellulosic 식물들 및 wool, keratin 등을 분해할 수 있으며, β -glucosi-



(A) (B)

Figure 3. Electromicroscopic photograms of selected strain *Aspergillus terreus* Y. (A) apex of conidiophore with conidia and (B) conidia.

dase, lipase, phosphatase 등과 같은 분해효소들을 생산한다고 알려져 있다.¹²

선별균주 Bw의 동정 및 미생물학적 특성: Fig. 4는 선별균주 Bw의 현미경사진이며 그 구조적 특징을 살펴보면, 크기가 4.0-1200 μ m이고 smooth walled type인 분생자병에 3중윤생의 penicilli를 가지고 있고, 그 위에 단지모양 (ampulliform)의 경자가 많이 형성되어 있으며, 타원체의 표면이 부드러운 분생자를 가지고 있었다.

선별균주를 CYA에 접종하여 배양하였을 때 직경이 2.1 cm인 colony가 형성되었으며, 이때의 colony 색깔은 pale lavender였다. 또한 MEA에서 배양하였을 때에는 2.5 cm의 colony가 형성되었다. 생육온도를 조사하였더니 5 $^{\circ}$ C에서는 전혀 성장하지 않았으며, 37 $^{\circ}$ C에서는 아주 작은 colony가 형성되었다. 선별균주의 형태적·배양학적 특징들을 Table 3에 나타내었다. 이상과 같은 특징들로 미루어 본 선별균주 Bw는 *Penicillium olsonii*와 그 특징이 유사하였으므로¹³ *Penicillium olsonii*로 최종 동정하였다.

선별균주 W의 동정 및 미생물학적 특성: Fig. 5는 선별균주 W의 현미경관찰 모식도이며 구조적 특징을 살펴보면 결속이 있는 분생자병의 윗부분에 polyphialide (多塑性的 분생자형성세포)가 형성되어 있고, 2종류의 분생자들을 가지고 있는데 대형분생자는 곡선모양에 3-5개의 격벽을 가지고 있으며 소형분생자는 방추모양에 0-2개의 격벽을 가지고 있었다. 또한 후막포자가 드물게 보이며 구형이고 표면은 smooth type이었다.



(A) (B)

Figure 4. Electromicroscopic photograms of selected strain *Penicillium olsonii* Bw. (A) apex of conidiophore with conidia and (B) conidia.

Table 3. Morphological and Cultural Characteristics of Strain Bw and W

characteristics	Bw	W
colony morphology on CYA*		
color	pale lavender	white
size(diam.)	21 mm	30 mm
on MEA**		
size(diam.)	25 mm	29 mm
on PDA***		
size(diam.)		50 mm(3 days)
growth at 5 $^{\circ}$ C	no growth	no growth
growth at 37 $^{\circ}$ C	2 mm	13 mm
reverse color	pale	magenta
conidiophores		
shape	terverticillate, smooth-walled	simple
size	4.0-1200 μ long	
sporodochia		absent
phialides	ampulliform	polyphialides
conidia		2 types
shape	ellipsoidal	(macro & micro) curved(macro) fusiform(micro)
wall	smooth	3-5 septate(macro) 0-2 septate(micro)
chlamydospores		sparse
shape		globose
wall		smooth

*CYA : Czapek yeast extract agar.

**MEA : Malt extract agar.

***PDA : Potato dextrose agar.

선별균주를 CYA에서 배양하였을 때 직경이 3.0 cm인 백색의 colony가 형성되었으며, MEA에서 배

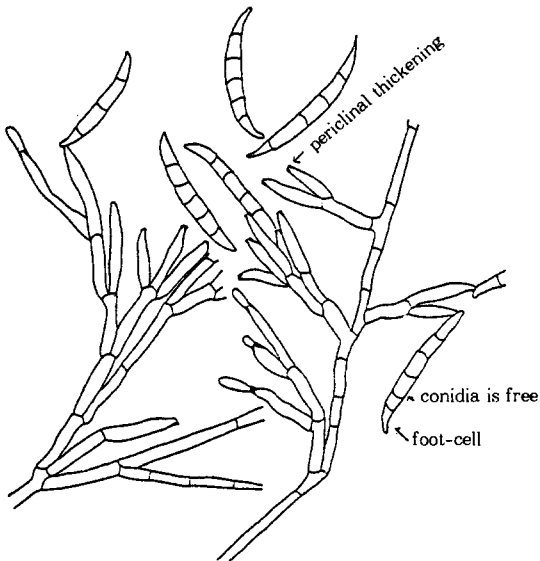


Figure 5. Schematic diagram of selected strain *Fusarium semitectum* W.

양하였을 때에는 직경이 2.9 cm인 colony가 형성되었다. 또한 PDA (potato dextrose agar)에서 3일간 배양하였을 때에는 직경 5.0 cm 이상의 colony가 형성되었으며 CYA와 MEA에서보다 빠른 생육을 보였다. 그리고 비교적 넓은 온도범위에서 생육하였다. 선별균주의 형태적·배양학적인 특징들을 Table 3에 나타내었다. 이상과 같은 특징으로 미루어 선별균주 W는 *Fusarium semitectum*과 그 특징이 유사하였으므로¹²⁻¹⁵ *Fusarium semitectum*로 최종 동정하였다. *Fusarium semitectum*는 주로 열대 및 온대지역의 토양에서 분리되어지며, starch, glycogen, inulin 및 cellulose를 분해할 수 있으며 다양한 polyphenols를 이용할 수 있고, *n*-phenoxyethyl penicillin에 대해 특이성이 있는 효소를 생산하며, 또한 높은 수율의 extracellular phosphomonoesterase를 생산한다고 알려져 있다.¹²

균주의 특성비교. Lipase 및 esterase는 유지류 등 지방족 화합물의 가수분해에 많이 이용되는 enzyme이다. 그중 *Rhizopus arrhizus* 및 *R. delemay*의 lipase는 지방족 polyester에 대한 강력한 가수분해능을 갖는 것으로 알려져 있다.²¹

순수 분리한 생분해성 미생물 4종에 대한 culture

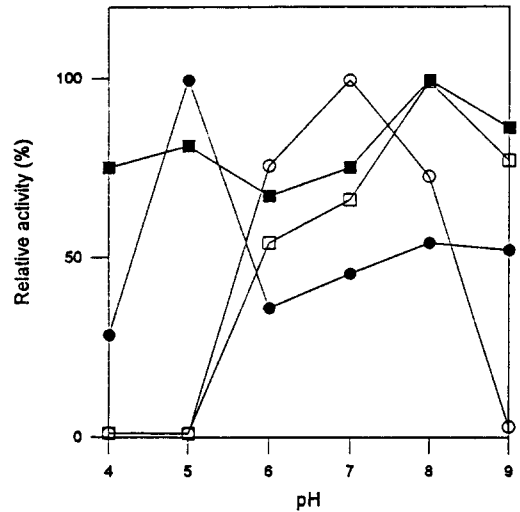


Figure 6. Effect of pH on the activity of lipase produced by 4 different biodegradable microorganisms: W (●), Bw (○), Y (■), and G (□).

media의 pH변화에 따른 enzyme activity 변화를 알아보기 위해 본 연구에서 합성한 CPEE 필름이 함유된 무기염 culture media에 각각의 미생물을 접종하여 2주일 동안 배양한 culture solution을 5 °C에서 24시간 동안 각 buffer용액에 투석시킨 후 실험용액으로 하여 Samad법에²² 따라서 lipase activity의 변화관계를 실험측정하였다. 실험 결과는 Fig. 6에서와 같으며 4종의 미생물별 pH와 enzyme activity의 상관관계를 보면 전반적인 현상으로서 배양액성이 pH 6-8의 범위내에서 enzyme activity가 증가됨을 알 수 있으며, 특히 W균주의 경우는 약산성 (pH 5)에서 예민한 활성을 보였다.

분해성 평가.

Pot Test: 지역별 토양상태, 온도변화, 강우량 등 기후 변화가 고르지 못한 문제점과 지역 및 시간적 제약을 감소시켜 보려고 자연환경 조건에서 미생물이 생육할 수 있는 최적온도와 습도를 부여한 실험실적인 토양 매립 실험으로 CPEE 필름의 분해 성능을 6개월 동안 실험한 결과는 Fig. 7에서와 같다. 측정결과 평가시료별 편차는 1% 이내로 안정된 결과를 보였으며 평균적 중량감소는 처음 2주 동안에 0.6% 이상의 중량감소를 보이면서 1개월 후는 0.9%의 감소 결과를 보였고 4개월 후는 3.7%, 6개월째는 11.1%

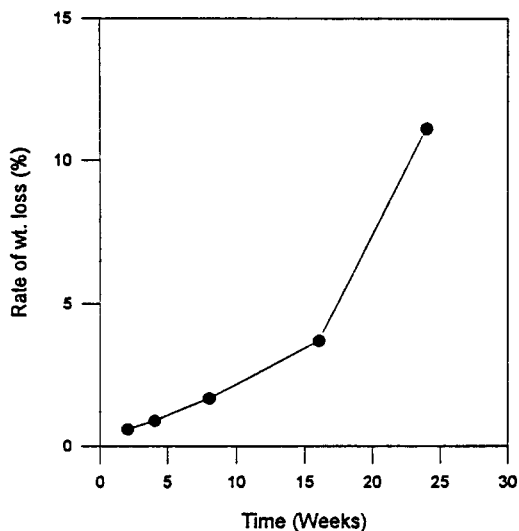


Figure 7. Weight loss of CPEE films by pot test.

의 중량감소 결과를 보였다. 그러나 실험실적 pot test의 경우에는 항온항습기를 사용했다 하더라도 자연환경의 반영이 어려워 분해속도가 자연환경하에서의 매립결과보다 느릴 것으로 예상된다.

효소에 의한 분해: 효소에 의한 biodegradable polymer의 분해성 평가 실험은 자연환경 중에서 미생물에 의한 생분해 정도를 신속히 예측할 수 있는 평가법으로서 Tokiwa 등은²³ lipase를 사용하여 합성 polyester 화합물에 대한 가수분해 반응실험을 하여 분해효과를 연구하였으며, Yamamoto 등은²⁴ 공중합된 copolyester에 대한 ester함량, 결정성, 용점의 변화에 따른 효소에 의한 분해성을 연구하였다. 이러한 효소에 대한 polymer 분해정도의 예측은 분해생성물 중의 TOC (total organic carbon)의 함량을 측정하여 평가할 수 있는데, 이는 고분자 사슬중에 결합된 ester bond가 효소의 공격을 받아 가수분해 반응되면서 유리된 수용액 중의 carbon함량을 정량적으로 확인하는 방법이다.

CPEE 필름에 대한 효소에 의한 분해성을 비교실험한 결과는 Fig. 8과 같다. 각 시료별 18-48시간 동안 3단계로 실험하였고 시료 2종을 동일 조건에서 비교 실험하였다. 그 결과 18시간 후 15.7%, 48시간 처리 후 35.5%의 분해결과를 보였으며, 효소를 첨가하지 않은 수용액에서의 TOC함량은 0.02-

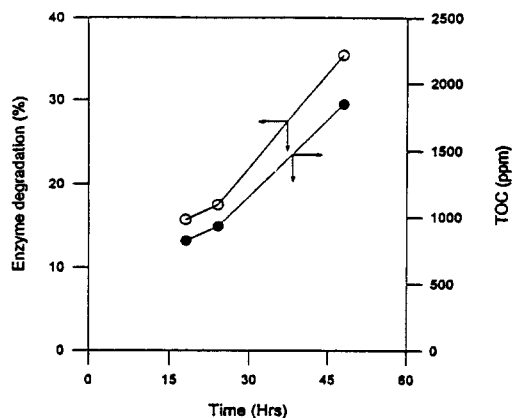


Figure 8. Degradation of CPEE film by enzymatic method: Enzyme degradation (%) (○) and TOC (ppm) (●).



Figure 9. The state of CPEE films biodegraded by mixed biodegradable microorganisms (M).

0.35%로 나타났다. 완전 분해될 경우 분해 생성물 중의 이론적 TOC 함량은 150 mg의 시료에서 5100 ppm/20 mL인 것으로 계산되었다.

미생물에 의한 분해: Fig. 9는 무기염 평판 배지상에 4종류의 미생물을 혼합한 혼합균주(M)를 접종한 후 1주 후의 상태로 분해가 진행되고 있는 CPEE 필름의 형태를 나타낸 것이다. 이들을 보면 필름 전체에 미생물이 왕성하게 자라고 있는 상태를 볼 수 있는 반면 주변의 무기염 배지상에는 잘 자라지 않음을 볼 수 있다. 이는 CPEE가 분해되어 유리된 유기탄소가 미생물의 영양원으로 소모되고 있음을 시사하는 현상이라고 볼 수 있다. Fig. 10는 각 균주별로 접종하여 분해진행 4주 후에 분해 잔류된 필름의 형태로

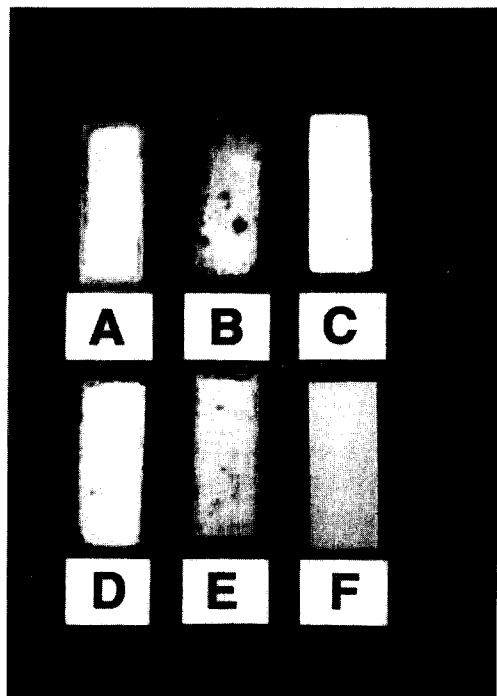


Figure 10. The state of biodegraded CPEE films after 4 weeks by 4 different biodegradable microorganisms: W (A), Y (B), Bw (C), mixed microorganisms(D), G (E), and CPEE blank test (F).

서 서로 다른 분해정도를 확인할 수 있었다. 미생물 접종배양 후 가장 먼저 친화력을 나타낸 균주는 G였으며 48시간 이내에 시험편상에 균사의 발육이 육안 관찰 가능하였고 5일째에는 polymer 시험편 전체를 덮는 친화력이 있음을 확인하였다. 이에 반해 Y균주는 다른 균주에 비해 늦은, 접종 72시간 후 친화성을 확인할 수 있었다. Fig. 11에서 알 수 있듯이 각 균주별 중량감소율은 다소 차이가 나지만 평균 2주 간격으로 약 20%의 중량감소 효과를 나타내며 약 3개월 이내에 완전분해가 가능할 것으로 예상된다. 분해 기간별 평균적 분해 감소율은 2주 후에 분해력이 점점 가속화되는 현상을 보이며 균주 Y와 G가 분해력이 우수한 효과를 나타내었다. 또한 본 연구에서 사용한 혼합균주(M)도 단독균주 W 및 Bw에 비하여 분해력의 상승효과를 나타낼 경우도 있어 분해성 평가를 위한 예비판정 혼합균주로 효과가 있음을 알 수 있었다.

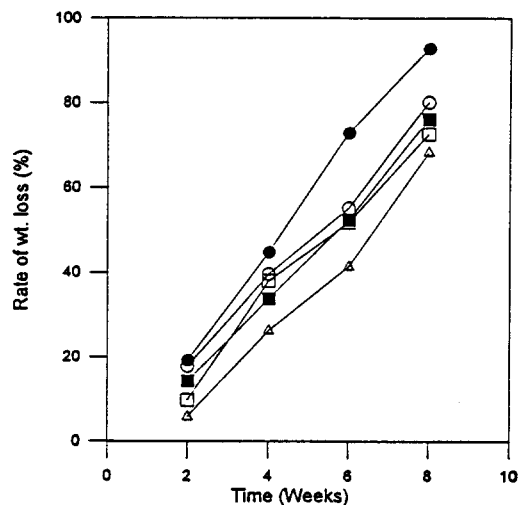


Figure 11. Weight loss of CPEE film by 4 different biodegradable microorganisms: Bw (△), W (□), Y (○), G (●), and mixed microorganisms(■).

전술한 바와 같이 이들 토양 미생물은 균체의 enzyme 효과를 나타내는데 이러한 효소에 의한 분해는 먼저 사상균의 균사로부터 균체외로 분비된 효소가 polymer의 비결정성 부분에 침투되어 비결정성 부분을 먼저 분해시키고 물리적 결합력을 약화시키면서 서서히 결정성 부분을 공격하게 되어 전체 polymer의 분해를 진행시키게 된다. 이와 같은 분해과정은 polymer의 표면부터 분해되어 생성된 저분자의 물질이 반응용액내로 용출된 후 미생물 대사작용의 활성 물질로 순환공급되므로서 연속적으로 진행되어 진다.

또한 미생물에 의한 분해가 진행됨에 따른 CPEE의 물성변화를 조사하기 위해 분해 전후의 물성변화, CPEE 필름 시편에 대한 인장강도 및 신장율을 인장 시험기 (Instron Corp., Model 1011, U.S.A.)를 사용하여 측정하였으며 Fig. 12에 그 결과를 각각 나타내었다. Fig. 12에서 알 수 있듯이 분해 후 CPEE의 인장강도 및 신장율은 평가기간이 지날수록 점점 감소하는 경향을 보여 인장강도는 분해 전 185 kg/cm^2 에서 16주 후 42 kg/cm^2 로서 77%만큼 감소되었다. 신장율 역시 분해 전 630%에서 8주 후 15%로 97%의 감소율을 보였다. 또한 pot test에 의한 분해 전후의 분자량 변화는 GPC (Waters Corp., Model 150C gel permeation chromatograph, U.S.A.)로 측정하

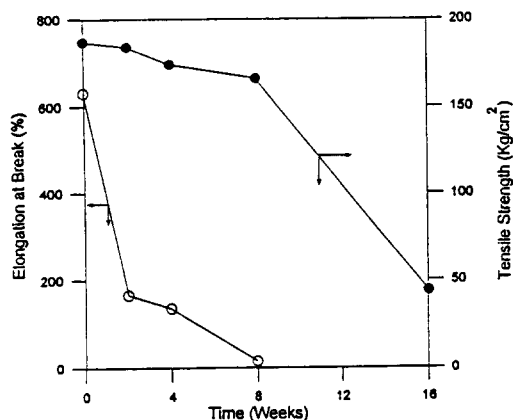


Figure 12. Changes of mechanical properties of CPEE by pot test: Elongation at break(kg/cm²) (○) and tensile strength(%) (●).

Table 4. Changes of Molecular Weight of CPEE by Pot Test

periods	molecular weight	M_n	M_w	M_w/M_n	reduction rate(%)
before burial		34275	94867	2.7	—
after 2 weeks		33213	88664	2.6	3
after 4 weeks		30566	81435	2.7	11

였으며 그 결과는 Table 4에 나타내었다. Table 4에서 알 수 있듯이 분해가 진행될수록 분자량 감소 현상도 뚜렷이 진행되고 있음을 확인할 수 있으며 4주 후 약 11%까지 감소된 결과를 나타내었다.

결 론

합성한 aliphatic polyester인 CPEE의 생분해성을 평가하기 위하여 CPEE에 대하여 친화성을 갖는 분해미생물을 토양으로부터 분리, 동정한 후 이들 균주의 특성을 비교하고 이들 미생물, 분해효소 및 실험실적 토양매립 등의 방법에 의해 생분해성을 평가한 결과 다음과 같은 결론을 얻었다.

(1) 토양으로부터 분리한 미생물을 계대배양하여 생분해성이 우수한 4종의 균주를 순수 분리하였고 이들을 CPEE 필름에 접종한 결과, 필름 표면에서 미생물이 왕성하게 자라고 있음을 관찰함으로써 이들이 CPEE를 분해할 수 있는 균주임을 확인하였다.

(2) 이들 4종의 선별균주의 미생물학적 특성을 비교, 동정한 결과 각각 *Aspergillus Fumigatus*, *Aspergillus terreus*, *Penicillium olsonii* 및 *Fusarium semitectum*인 것으로 최종 동정하였다.

(3) 분해미생물 4종에 대하여 pH 변화에 따른 enzyme activity 측정결과 전반적으로 배양액성이 pH 6-8 범위에서 enzyme activity가 증가함을 알았다.

(4) CPEE 필름의 실험실적인 토양매립 실험에 의한 분해성 평가결과, 평균적으로 2주, 1개월, 4개월 및 6개월의 기간 동안 각각 0.6%, 0.9%, 3.7% 및 11.1%의 중량감소를 보여주었다.

(5) Enzyme에 의한 분해성 평가결과 18시간 후 15.7%, 48시간 처리 후는 35.5%의 분해 결과를 보였다.

(6) 미생물에 의한 분해 평가 결과 각 균주별 중량감소율은 2주 간격으로 약 20%의 중량감소 효과를 나타내어 8주 후에 70-95%의 중량감소를 보였다.

(7) 분해 전후 CPEE 필름의 인장강도 및 신장율은 시간이 지날수록 감소하였으며, pot test에 의한 수평균 분자량은 약 34000에서 4주 후에 약 30000으로 감소하였다.

감사의 글: 본 연구는 통상산업부의 공업기반기술과제로 수행된 연구결과의 일부이며 미생물 동정에 도움을 주신 유전공학연구소의 배경숙 박사님께 감사드립니다.

참 고 문 헌

1. A. L. Andrady, J. E. Pegram, and S. Nakatsuka, *J. Environ. Polym. Degrad.*, **1**, 31 (1993).
2. H. Nishida and Y. Tokiwa, *J. Appl. Polym. Sci.*, **46**, 1467 (1992).
3. W. Schnabel, "Polymer Degradation: Principles and Practical Applications", Hansen International, München, 1981.
4. F. Kawai, *CRC Critical Reviews in Biotech.*, **6**, 273 (1987).
5. H. R. Kricheldorf, J. M. Jonte, and M. Berl, *Makromol. Chem. Suppl.*, **12**, 25 (1985).

6. X. M. Deng, C. D. Xiong, L. M. Cheng, and X. P. Xu, *J. Polym. Sci., Polym. Letter*, **28**, 411 (1990).
7. T. Tanio, T. Fukui, Y. Shirakura, T. Saito, K. Tomita, T. Kaiho, and S. Masamune, *Eur. J. Biochem.*, **124**, 71 (1982).
8. Y. Tokiwa, T. Ando, and T. Suzuki, *J. Ferment. Technol.*, **54**, 603 (1976).
9. Y. Otake, T. Kobayashi, Y. Gomi, S. Ito, and K. Hyakutake, *J. Japan Rubber Soc.*, **64**, 688 (1991).
10. A. C. Albertsson and Z. G. Banhidi, *J. Appl. Polym. Sci.*, **25**, 1655 (1980).
11. H. J. Kang, T. W. Park, Y. J. Kim, and C. G. Lee, *Polymer(Korea)*, submitted.
12. K. H. Domsch, W. Gams, and T-H. Anderson, "Compendium of Soil Fungi", vol. 1, Academic Press, London, 1980.
13. R. A. Samson, E. S. Hoekstra, and C. A. N. Van Oorschot, "Introduction to Food-borne Fungi", Centraalbureau voor Schimmelcultures, Baarn, 1981.
14. O. Fassatova, "Moulds and Filamentous Fungi in Technical Microbiology", Elsevier, Amstrdam, 1986.
15. J. I. Pitt and A. D. Hocking, "Fungi and Food Spoilage", Academic Press, Sydney, 1985.
16. H. Brokerhoff and R. G. Jensen, "Lipolytic Enzyme", Academic Press, New York, 1974.
17. S. Yamamoto, "Industrial Enzyme Technology and Market", p. 116-129, CMC Press, Tokyo, 1985.
18. Y. T. Lim, M. S. Thesis, SungSil Univ., Korea (1994).
19. H. J. Kang, S. W. Kim, C. K. Lee, and T. U. Park, "Study on the Synthesis and Evaluation of the Biodegradable Polymer(II)", Research Report of the Ministry of Trade, Industry and Energy 1993.
20. Y. W. In and H. B. Lee, 1st Symp. Biodegradable Polym., p. 58, Seoul, 1992.
21. Y. Tokiwa and T. Suzuki, *Agric. Biol. Chem.*, **41**, 265 (1977).
22. Y. Samad, *J. Microbiol. Methods*, **9**, 51 (1989).
23. Y. Tokiwa, T. Suzuki, and K. Takeda, *Agric. Biol. Chem.*, **52**, 1937 (1988).
24. N. Yamamoto, A. Nakayama, K. Hayashi, and J. Iyoda, *Polymer Preprints, Japan*, **39**(7), 2301 (1990).