

## Pot-Test에 의한 Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate의 생분해성 평가

손 홍 주<sup>\*</sup> · 김 회 구 · 김 전 기 · 이 상 준  
부산대학교 환경문제연구소<sup>\*</sup> · 부산대학교 미생물학과  
(1995년 12월 23일 접수)

### Assesment of Biodegradability of Poly- $\beta$ -Hydroxybutyrate by Pot-Test

Hong-Joo Son<sup>\*</sup>, Hee-Gu Kim, Jeon-Ki Kim, and Sang-Joon Lee  
<sup>\*</sup>Institute of Environmental Studies, Department of Microbiology,  
Pusan National University, Pusan, 609-735, Korea  
(Manuscript received 23 December 1995)

The biodegradable characteristics of poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB) film by fungi and soil burial are investigated. As the results of the American Standards for Testing and Materials(ASTM) method, the growth of *Aspergillus niger* was apparent on the PHB containing plate. This suggests that PHB was utilized as the sole carbon source by *Aspergillus niger* and ASTM method may have applications as measuring means of biodegradability of polyhydroxyalkanoic acid(PHA). PHB film was studied by monitoring the time-dependant changes in weight loss of PHB film under 30°C and relative humidity 80 % during pot-test. As the results of pot-test, PHB film was decomposed about 87 % in 30 days by soil microorganisms. PHB film was more slowly degraded than PHB/HV film.

Key words : Poly- $\beta$ -hydroxybutyrate(PHB), ASTM method, fungi, pot-test

#### 1. 서 론

합성플라스틱이 우리의 일상생활과 밀접한 관련을 맺으면서 그 사용량이 급격히 증가하고 있다. 그러나 사용하고 난 후의 합성플라스틱 폐기물은 하천, 호수, 토양 등의 자연환경에서 반영구적으로 분해되지 않고 남아있어 생태계의 파괴 및 환경오염이라는 큰 사회문제를 초래하고 있다.

이 문제를 해결하기 위하여 분해성 고분자라는 새로운 연구분야가 대두되었으며, 많은 분해성 고분자중에서 생분해성 플라스틱은 자연계에서 생분해가 가능한 플라스틱을 만들어 합성플라스틱 폐기물이 환경에 미치는 피해를 줄이

기 위한 방향으로 활발히 연구, 개발되고 있다(서인선 외, 1994).

효율적인 생분해성 플라스틱의 개발을 위해서는 정확한 생분해성의 평가방법이 필요하다. 다시 말해 새로이 개발된 생분해성 플라스틱에 대한 그 생분해성 평가방법이 부적절하다면, 생분해성이 없다고도 판단될 수 있기 때문에 정확한 생분해성 평가기준의 확립이 무엇보다 시급하다고 하겠다. 고분자 물질의 생분해성 측정방법에 대한 연구는 표준화된 방법의 정착을 위해 미국, 일본 등에서 활발히 진행되고 있다. 그러나 아직까지 생분해성 고분자 또는 생분해성 플라스틱의 정의나 생분해도 평가방

법 등이 통일되어 있지 않기 때문에 많은 논란이 계속되고 있는 상태이다. 따라서 국제적으로 인정될 수 있는 통일된 정의 및 용어, 분해성 평가방법의 확립이 요망되고 있다.

현재까지 이용되고 있는 분해성 플라스틱의 분해성 평가방법으로는 토양 매몰에 의한 분해, 효소에 의한 분해, 미생물에 의한 분해, 열침이나 조직에서의 분해 및 *in vivo degradation* 등의 평가방법이 있다(Young, 1985). 토양 매몰시험은 실제로 플라스틱을 포함한 각종 폐기물이 자연계에 방출되었을 때 최종적으로 도달되는 환경이 토양이기 때문에 폐기물 처리 입장에서 보면 가장 실질적인 분해평가 방법이며, 새로운 고분자를 개발하였을 때 반드시 실시해야 하는 방법이다(이용현, 1991). 그러나 기후 환경과 생태계의 다양한 생물학적 인자들을 조절하기 어렵기 때문에 재현성이 낮은 것이 단점이다. 재현성의 향상을 위하여 각종 토양을 수집하여 혼합 후, 실험실내에서 실시하는 pot-test가 개발되었다(Mergaert et al., 1993). 일반적으로 시료를 수 개월에서 수 년간 매몰한 후 중량감소, 기계적 성질의 변화, 표면구조 및 형태의 변화 등을 관찰하여 분해성을 평가한다. 미생물에 의한 생분해도 평가방법은 시료 고분자가 세균 및 곰팡이의 의하여 탄소원 및 질소원으로 이용되는 것에 기초를 두고있다. 시료에 세균 및 곰팡이를 접종하여 배양한 후 집락의 증식, 세포수의 계수, CO<sub>2</sub> 방출량, O<sub>2</sub> 소비량, tensile strength의 변화, 분자량의 변화 및 분해산물의 정량 등을 통하여 분해성을 평가한다. 오래전부터 합성 플라스틱의 곰팡이 내성을 조사하는데 사용된 ASTM G21-70이 여러가지 생분해성 고분자의 생분해성을 1차적으로 screening하는데 응용되고 있다(Kim et al., 1994).

최근 국내에서도 매립방법, 활성오니에 의한 생분해, 특정 미생물에 의한 생분해, 효소에 의한 생분해 등을 중심으로 polyhydroxyalkanoate (PHA)의 생분해도 측정방법에 관한 많은 연구가 수행중에 있으나 아직까지 초기단계에 머무르고 있다.

따라서 본 실험에서는 공시균 *Actinobacillus* sp. EL-9로부터 생산된 poly-β-hydroxybutyrate(PHB)의 생분해도를 토양 매

Table 1. Composition of nutrient-salt agar medium

NH <sub>4</sub> NO <sub>3</sub>	0.1 %
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0.07 %
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	0.07 %
MgSO <sub>4</sub> ·7H <sub>2</sub> O	0.07 %
Stock solution*	1 ml/ℓ
Agar	1.5 %

\* NaCl 0.5 g, MnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.1 g, FeSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g, ZnSO<sub>4</sub>·7H<sub>2</sub>O 0.2 g per 100 ml distilled water.

몰시험의 변법인 pot-test와 곰팡이 등에 의하여 검토하여 생분해성 고분자의 생분해도 평가 방법 확립을 위한 기초자료를 제공하고자 하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 PHB 필름의 제조

PHB 필름시료는 solvent-casting technique (Doi et al., 1990)에 의하여 제조하였다. 즉 casting surface로 유리 petri dish를 이용하였고, 클로로포름 100ml에 공시균 *Actinobacillus* sp. EL-9로부터 생산된 PHB 분말 2 g(w/v)을 용해하여, 25ml을 petri dish에 casting하였다. 실온의 hood에서 24 시간동안 방치하여 클로로포름을 증발시킨 후, 잔존하고 있는 클로로포름을 완전히 제거하기 위하여 90℃에서 24 시간동안 건조시켰다. 이들 solvent-casted film을 모두 5 cm x 6 cm의 크기로 일정하게 자른 후, 생분해도 평가시험에 사용하였다.

### 2.2 곰팡이에 의한 PHB의 생분해성 검토

#### 2.2.1 사용 균주

사용한 균주는 *Aspergillus niger*(KCTC 2118)이었으며, potato dextrose agar(PDA) slant에서 30℃, 48 시간동안 배양한 후 4℃에서 보존하였다. 보존용 PDA slant는 한달마다 계대배양하여 사용하였다.

#### 2.2.2 사용배지

사용한 배지는 ASTM G21-70에 나와있는 nutrient-salt 한천배지(ASM, 1989)로, 그 조성은 Table 1에서 보는 바와 같으며, 탄소원은 첨가되지 않은 배지이다. pH는 멸균 후, 1 N NaOH를 사용하여 6.5가 되도록 조정하였으며, agar는 bactoagar(Difco Co.)를 사용하였다.

### 2.2.3 포자현탁액의 제조

*A. niger*를 PDA 평판배지에 접종하여 30℃에서 5 일동안 배양하였다. 여기에 증류수 10ml를 첨가하여 백금선으로 곰팡이가 생육한 부분을 부드럽게 긁고, 증류수로 포자를 세척하였다. 이 포자를 nutrient-salt solution으로 적당하게 희석하여  $10^6 \pm 10^5$  spore/ml가 되도록 하였다.

### 2.2.4 생분해성 평가방법

상기에서 제조된 PHB 필름시료를 70%에탄올로 살균하여, nutrient-salt 한천평판배지 표면에 놓은 후, *A. niger*의 포자 현탁액 ( $10^6 \pm 10^5$  spore/ml)을 200 $\mu$ l 접종하였다. 이것을 상대습도 90% 정도로 유지한 데시케이타에 넣고, 30℃에서 두 달간 배양하면서 주기적으로 PHB 필름에서의 생육 정도를 관찰하였다. 생육의 구분은, 전혀 자라지 않은 경우, 전체 필름 면적의 10% 미만, 10 ~ 30%, 30 ~ 60%, 60% 이상 자란 경우로 나누어 각각 0, 1, 2, 3, 4로 등급을 표시하였다 (ASTM, 1989). Nutrient-salt 한천배지는 탄소원이 함유되어 있지 않은 배지로서 PHB 필름이 유일한 탄소원으로 작용한다. 따라서 PHB 필름에서의 생육은 PHB 필름이 생분해되었음을 의미한다. 이때 *Pseudomonas* sp. HJ로부터 생산된 poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric) acid(PHB/HV) 필름(손흥주 외, 1995)을 비교실험하였다.

### 2.3 Pot-test에 의한 PHB의 생분해성 검토

부산대학교 생물관 주변의 양지 및 음지의 표토, 저토, 부식토 등을 수집한 후, 각각 1:1(w/w)의 비율로 혼합하여 30cm x 25cm x 5cm 규격의 용기에 넣었다. 여기에 PHB 필름 시료를 매몰한 후, 상대습도 80% 정도를 유지하면서 30℃에서 배양하였다. 주기적으로 시료의 표면을 육안으로 관찰한 후 촬영하였으며, 또한 감소된 중량도 측정하였다. 이때 *Pseudomonas* sp. HJ로부터 생산된 poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric) acid (PHB/HV) 필름을 비교실험하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 곰팡이에 의한 생분해성

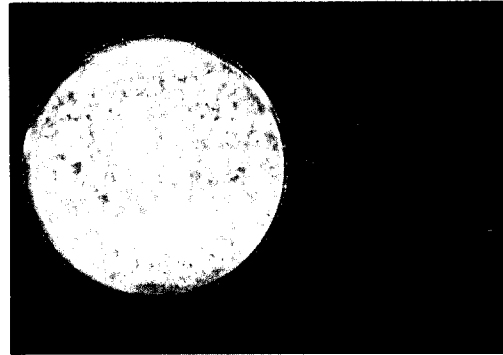


Fig. 1. Photographs of PHB extracted from *Actinobacillus* sp. EL-9 and chloroform-casted PHB films.

본 공시균으로부터 추출, 정제된 PHB 분말과 solvent-casting technique으로 제조된 필름은 Fig. 1에서 보는 바와 같다. 즉 추출된 PHB 및 PHB/HV는 물에 불용성인 흰색의 분말이었으며, 제조된 필름은 casting solvent인 클로로포름에 용해된 농도에 따라 약간의 색상과 투명도의 차이를 나타내었다. 또한 PHB/HV 필름이 PHB 필름보다 투명하였으며, 상당히 유연성이 있었으나, PHB 필름은 잘 부수지는 성질을 가지고 있었다.

배양시간에 따른 PHB의 생분해성을 검토하기 위하여 적당한 시간 간격으로 *A. niger*의 생육정도를 촬영하였으며, 그 결과는 Fig. 2에서 보는 바와 같이 탄소원인 PHB 필름이 놓인 부분에서 균체의 생육이 훨씬 양호하였고, 탄소원이 없는 부분에서도 약간의 균체 생육이 관찰되었다. 배양초기의 균체 생육은 PHB 필름의 중앙부보다 가장자리에서 먼저 시작되었다. 이것은 질소원을 위시한 다른 무기염들이 nutrient-salt 한천배지로부터 공급되고, 탄소원이 비교적 풍부한 PHB 필름의 가장자리에서 일차적으로 균체의 생육이 시작된 것으로 추정된다. 배양시간이 경과함에 따라 PHB 필름상에서 균체 생육이 더욱 왕성해졌으므로 *A. niger*가 PHB/HV를 탄소원으로 하여 생육하였음을 알 수 있었다. 결론적으로 PHB가 생분해되었음이 확인되었기 때문에 ASTM G21-70 방법이 PHB의 생분해성 검토에 이용될 수 있음을 알 수 있었다.

Potts 등(1984)은 ASTM G21-70에 의해서 곰팡이의 생육 정도를 조사할 때 배지의 탈수

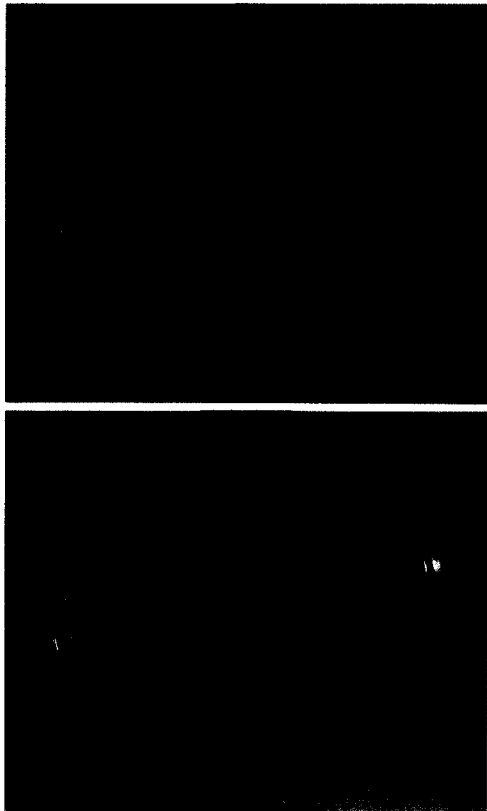


Fig. 2. Photographs of PHB film after the culture of *A. niger*. a, after 30 $^{\circ}$ C days; b, after 45 days.

로 인해서 한천이 균열되므로, 한 달 이상 실험을 지속할 수 없었다고 보고하였으나, 본 실험에서는 한천을 두껍게 증층시킨 후, 배양기간동안 상대습도를 90 % 정도로 유지시켰기 때문에 두 달이상 지속적으로 곰팡이의 생육 유무를 검토할 수 있었다.

### 3.2 Pot-test에 의한 PHB의 생분해성

실제로 토양에서 PHB가 분해되는지를 알아보기 위하여 토양매몰 실험의 변법인 pot-test를 실시하였다. Pot-test는 토양매몰 실험의 단점인 재현성을 향상시킨 방법으로서, 실험실내에서 간단하게 실시할 수 있는 장점이 있다. PHB 필름을 매몰한 용기를 30 $^{\circ}$ C 에서 상대습도 80 %를 유지하면서 일정기간 배양하면서 촬영한 PHB 필름의 형태 변화는 Fig. 3에서 보는 바와 같다. 특징적으로 곰팡이가 집락화되어 있음이 관찰되었고, 필름의 표면이

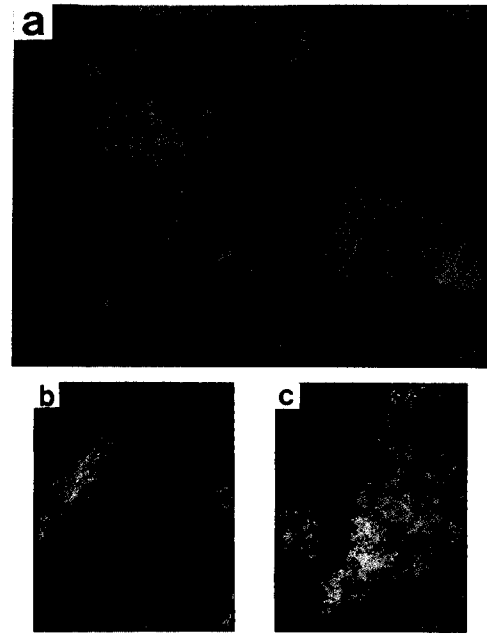


Fig. 3. Photographs of PHB film placed in indoor soil box(pot) at 30 $^{\circ}$ C. a, after 7 days; b, after 11 days; c, after 21 days.

검은색으로 심하게 변색되었으며, 표면의 일부가 부식되는 것을 육안으로 관찰할 수 있었다. 이것은 토양내에 존재하는 미생물에 의하여 PHB 필름이 분해되었음을 간접적으로 시사한다. Mergaert 등(1993)은 hardwood soil, sandy soil, pinewood soil, clay soil 등과 같이 여러가지 종류의 토양에서 PHA를 매몰하여 15 $^{\circ}$ C, 28 $^{\circ}$ C, 40 $^{\circ}$ C 에서 생분해도를 조사한 결과, 토양의 종류에 따라 다소간의 차이가 있지만 40 $^{\circ}$ C 로 배양하였을 경우 가장 생분해도가 높았다고 보고하였다.

### 3.3 PHB와 PHB/HV의 생분해성 비교

*A. niger*의 생육 정도를 육안으로 관찰한 후, 그 결과를 ASTM G21-70의 scheme에 기초하여 나타낸 것은 Table 2에서 보는 바와 같다. 즉 *A. niger*는 PHB보다 PHB/HV에서 생육속도가 훨씬 빨랐으며, 상대적으로 PHB에서는 생육상태가 매우 불량하였다. 다시 말해 PHB가 PHB/HV보다 생분해 속도가 훨씬 느린 것으로 나타났다. 일반적으로 두 가지 이상의 단량체가 random하게 중합된 copolymer는 규칙

Table 2. Fungal degradability of PHB, PHB/HV films as measured by ASTM G21-70

Films	Organisms	Fungal degradability*			References
		20	30	45	
PHB	<i>A. niger</i>	1	3	3	in this study
PHB/HV	<i>A. niger</i>	2	3	4	Son Hong Joo

\* Numbers represent determinations using the ASTM rating scheme: % area of plate covered by mycelial growth, i.e.: 0(no growth); 1(0-10: traces of growth); 2(10-13: light growth); 3(30-60: medium growth); 4(60-100: heavy growth).

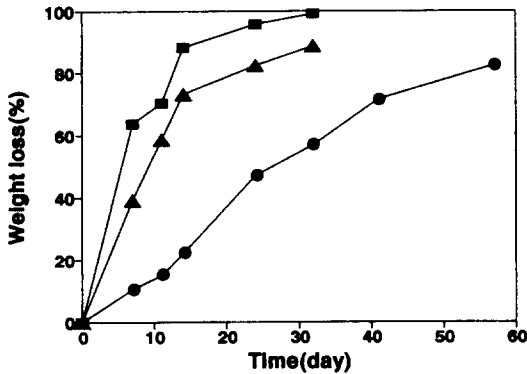


Fig. 4. Weight loss of solvent-casted PHA films under indoor soil box(pot). Reference to Son Hong Joo in case of PHB/HV. -●-, PHB/HV at 25°C; -■-, PHB/HV at 30°C; -▲-, PHB at 30°C.

적인 반복구조가 상실되어 crystallinity가 저하되고, melting temperature의 감소가 수반된다. 이러한 copolymer는 homopolymer에 비하여 가수분해 효소의 공격을 받기 쉬워 분해가 가속된다고 하였다(유영태와 허영림, 1991). 이러한 이유로 공시균들로부터 생산된 PHB 및 PHB/HV copolymer의 생분해속도가 차이를 나타내는 것으로 추정된다.

Pot-test를 실시하였을때, 배양경과에 따른 PHB 및 PHB/HV 필름의 중량 감소의 변화율은 Fig. 4에서 보는 바와 같다. PHB/HV 필름의 경우 25°C, 30°C 에서 배양하였을때, 배양 30 일, 58 일만에 각각 79 %, 100 %의 중량 감소가 나타났으며, PHB 필름의 경우 배양 30 일만에 약 87 %의 중량감소가 나타났다. 곰팡이에 의한 생분해성 검토 결과와 마찬가지로 PHB가 PHB/HV보다 분해되는 속도가 늦었다. Kunioka 등(1989)은 일본 Yokohama의 각지로부터 토양을 수집하여 pot-test에 의하여 PHA의 생분해도를 조사한 결과 P(3HB/

4HV) > PHB ≈ P(3HB/3HV)의 순서로 생분해도가 감소하였다고 보고하였으며, Margaert 등(1989)은 다양한 토양 즉, complex microbial environment에서 PHB의 생분해 속도는 PHB/HV보다 느렸다고 보고하였다. 본 실험의 결과는 Kunioka 등의 보고와는 다소 상반되었으나 Margaert 등의 보고와는 일치하였다. 이러한 현상은 토양내의 다양한 미생물로부터 생산되는 다양한 depolymerase들의 기질 특이성이 상당히 다르기 때문인 것으로 판단된다. 즉 *Alcaligenes faecalis*와 *Comamonas* sp.는 PHB를 기질로 하는 depolymerase (Tanio et al., 1982)를, *Pseudomonas lemoignei*는 PHB와 PHV를 기질로 하는 두 종류의 depolymerase (Muller와 Jendrossek, 1993)를 생산하는 것으로 알려져 있다. 따라서 다양한 미생물이 공존하는 토양 매물 실험에 의해서는 각 연구자들에 따라 PHA 생분해 속도의 차이가 나는 것으로 추정된다. Holland 등(1987)은 PHA의 crystallinity에 반비례하여 생분해 속도가 증가한다고 보고하였다. 본 공시균들로부터 생산된 PHB와 PHB/HV의 crystallinity는 각각 69.13°C, 65.13°C 이었으므로(손홍주, 1995), 본 실험결과 나타난 PHB와 PHB/HV 생분해 속도의 차이는 Holland 등의 결과로서도 설명이 가능하였다. 참고적으로 PHB의 혐기성 가수 분해, 호기성 가수 분해, 토양(25°C), 해수(15°C)에서 중량이 100 % 감소되는데 소요되는 기간은 각각 2/1, 5, 7, 10, 50 주이었다(Muller와 Jendrossek, 1993).

앞으로 PHA를 탄소원으로 이용할 수 있는 미생물을 직접 실험용기로부터 분리한 후, PHA depolymerase나 esterase 등과 같이 PHA 분해에 관련된 효소를 정제하는 것이 선결과제로 사료된다. 즉 이 정제효소에 의해 PHA의 생분해성을 검토할 수 있다면, 보다 정량성과 재현성이 우수한 생분해성 평가방법이

확립되리라 판단된다.

#### 4. 요약

본 연구에서는 아직까지 분해성 플라스틱의 생분해성을 평가할 수 있는 확립된 방법이 없다는 것에 착안하여, 분해성 플라스틱중 PHB 필름의 생분해 특성을 곰팡이와 토양에 의하여 조사함으로써 생분해성 평가방법을 위한 기초자료를 제공하는 것을 목적으로 하였다. *Actinobacillus* sp. EL-9로부터 생산된 PHB를 ASTM 법으로 생분해성을 검토한 결과, 배양시간이 경과함에 따라 PHB 표면상에서 *A. niger*의 생육이 왕성해졌다. 이것은 *A. niger*에 의하여 PHB가 탄소원으로 이용되어 분해되었음을 의미한다. 토양 매몰시험의 변법인 pot-test 결과, PHB 필름은 30℃, 상대습도 80%의 조건에서 배양 30일만에 총중량의 약 87%가 감소되었다. 이것은 PHB 필름이 토양 미생물에 의하여 분해되었음을 나타낸다. PHB는 PHB/HV보다 분해속도가 늦었다.

#### 참고 문헌

- 서인선, 이명천, 김병홍, 신평균, 1994, 호기적 조건에서 플라스틱의 생분해에 영향을 미치는 도시 하수오니의 성질, 한국산업미생물학회, 22(4), 436-442.
- 손홍주, 1995, 부산대학교 박사학위 논문.
- 손홍주, 민관필, 이상준, 1995, *Pseudomonas* sp. HJ에 의한 poly(hydroxybutyric-co-hydroxyvaleric) acid의 생산, 한국생물공학회지, 10(4), 349-357.
- 유영태, 허정립, 1991, 생체 분해성 의료용 고분자의 합성 및 분해, 고분자과학과 기술, 2(5), 341-354.
- 이용현, 1991, 생분해성 고분자의 연구개발 동향, 고분자과학과 기술, 2(5), 319-329.
- ASTM, 1989, ASTM Standard Practice G 21-70.
- Doi, Y., Y. Kanesawa, M. Kunioka, and T. Saito, 1990, Biodegradation of microbial copol-esters : poly(3-hydroxybutyrate-co-3-hydroxyvalerate) and poly(3-hydroxybutyrate-co-4-hydroxybutyrate), *Macromolecules*, 23, 26-31.
- Holland, S.J., A.M. Jolly, M. Yasin, and B. J. Tighe, 1987, Polymers for biodegradable medical device, *Biomaterials*, 8, 289-295.
- 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(4), 412-417.
- Kunioka, M., Y. Kawaguchi, and Y. Doi, 1989, Production of biodegradable copolyesters of 3-hydroxybutyrate and 4-hydroxybutyrate by *Alcaligenes eutrophus*, *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, 30, 569-573.
- Mergaert, J., A. Webb, C. Anderson, A. Wouters, 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.
- Muller, B., and D. Jendrossek, 1993, Purification and properties of a poly(3-hydroxyvalerate) depolymerase from *Pseudomonas lemoignei*, *Proceedings of International Symposium on Bacterial Polyhydroxyalkanoates*, Göttingen, Germany.
- Potts, J.E., 1984, "Plastics, environmentally degradable", *Encyclopedia of Chemical Technology*, Wiley-Interscience, New York, Supplement Vol. 1., pp. 626-668.
- Tanio, T., T. Fukui, T. Saito, K. Tomita, T. Kaiho, and S. Masamune, 1982, An extracellular poly(3-hydroxybutyrate) depolymerase from *Alcaligenes faecalis*, *Eur. J. Biochem.*, 124, 71-77.
- Young, M.M., 1985, *Comprehensive Biotechnology Vol. 2*, Pergamon Press.