

전분이 함유된 폴리에틸렌 필름의 곰팡이에 의한 생분해 특성

김재현·박태현·*신동명·*이성호·**한귀영

성균관대학교 유전공학과
*현대석유화학주식회사
**성균관대학교 화학공학과

Biodegradable Characteristics of Starch-filled Polyethylene Film by Fungi

Jai-Hyun Kim, Tai-Hyun Park, *Dong-Myung Shin,
*Sung-Ho Lee and **Gui-Young Han

Department of Genetic Eng., Sung Kyun Kwan University, Seoul 110-745, Korea
*Hyundai Petrochemical Co., Ltd., 679 Taejuk-Ri Taesan-Eup, Seosan-Gun, Chungnam, Korea
**Department of Chem. Eng., Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

ABSTRACT

The biodegradable characteristics of starch-filled polyethylene film by fungi were investigated. *Aspergillus niger* showed the highest cell growth among five species of fungi used in the experiment. Higher starch content gave the higher growth rate of *A. niger*; however, the kind of film or cutting direction did not give any effects on the cell growth. The use of vinyl trimethoxysilane for the stronger binding of starch and polyethylene did not inhibit the cell growth. When the starch content was higher than 10 %, the elongation of the film decreased significantly after the growth of microorganism in the case of transverse direction samples.

서론

기존의 플라스틱들이 우리의 일상 생활과 밀접한 관련을 맺으면서 그 사용량이 점차 증가하고 있다. 농촌의 비닐하우스용으로 쓰이기도 하고, 시장이나 백화점 등에서 물건을 담아주는 데에도 쓰이며, 음식이나 음료수의 용기로 사용되기도 한다. 오늘날 점점 환경오염에 대한 관심이 커지면서 이들을 사용하고 난 후의 처리가 심각한 문제로 대두되고 있다. 이 문제를 해결하기 위하여 분해성 고분자라는 새로운 연구 분야가 대두되었다. 분해성 고분자에는 크

게 광분해성 고분자와 생분해성 고분자 2가지로 나눌 수 있다. 광분해성 고분자는 자외선에 의해 분해가 되는 고분자로서 매립시에는 빛이 차단됨으로 인해 분해될 수 없는 한계점을 가지고 있다. 생분해성 고분자는 기존에 사용되어왔던 고분자들과 비슷한 물성 및 기능을 가지면서 토양이나 바다의 미생물에 의해 분해될 경우 환경오염을 줄일 수 있다는 큰 장점을 지닌 고분자이다.

이들 중에서도 종래의 고분자수지에 생분해성 천연 고분자인 전분을 혼합하여 만들어진 생분괴성 고분자수지는 미생물로부터 생산되는 생체 합성 고분

자나 유기합성에 의한 생분해성 고분자보다 제조 방법이 간편하고 기존의 가공 장치를 활용할 수 있다는 장점이 있다(1). 생분해성 고분자의 토양 매립시 전분과 같은 생분해성 물질은 미생물에 의해 분해되어 다공질을 형성하고, matrix를 이루는 고분자 수지는 첨가된 자동 산화제와 토양의 전이금속이 반응하면서 분해가 시작된다.

고분자 물질의 생분해도 측정방법에 관한 연구는 표준화된 방법으로서의 정착을 위해 미국, 일본 등에서 활발히 진행되고 있다. 미국에서는 ASTM(American Society for Testing and Materials) 규격을 중심으로 생분해도 측정방법이 발표되어지고 있다. 과거에는 썩지 않는 것이 플라스틱의 장점이어서 미생물에 대한 내성을 측정하는 방법들(2, 3)이 제정되었으나, 현재에 이르러는 이 방법들이 역으로 플라스틱이 미생물에 의하여 얼마나 잘 분해되는 가에 이용되어 지고 있다. 사용되어진 후 버려진 고분자 물질이 최종적으로 도달하게 될 환경조건에 따른 자기 다른 생분해도 측정방법들이 최근 들어 ASTM 규정으로 발표되었다. 도시 하수오니에 의한 호기적 생분해 방법(4), 도시 하수오니에 의한 혐기적 생분해 방법(5), 특정 미생물에 의한 호기적 생분해 방법(6), 활성오니 폐수처리 시스템에 의한 호기적 생분해 방법(7), 퇴비화 조건에서의 호기적 생분해 방법(8) 등이 발표되었고 매립조건, 담수조건, 해수조건 등에서의 생분해도 측정방법도 곧 발표될 예정으로 있다(9).

국내에서도 국가 출연 연구기관 및 기업체 등에서 매립 방법, 하수 종말 처리장의 오니에 의한 생분해 방법, 특정 미생물 사용 방법, 효소에 의한 방법 등을 중심으로 생분해도 측정방법에 관한 연구가 수행 중에 있으나 아직 초기단계에 있다. 본 논문에서는 전분이 함유된 폴리에틸렌 필름의 생분해도 측정방법 확립을 위한 기초 연구로서, ASTM에서 제시된 방법 중 곰팡이에 의한 내성 결정 방법(2)을 이용하여 전분을 포함한 폴리에틸렌 필름상에서 곰팡이의 생장 특성과 생장 후 필름의 물리적 성질 변화를 살펴 보았다.

재료 및 방법

균주

종래의 합성고분자 물질의 곰팡이에 대한 내성을 측정하기 위해 사용되어온 5종류의 곰팡이를 사용하였고(2), 이들은 *Aspergillus niger*(ATCC 9642),

Penicillium funiculosum(ATCC 9644), *Chaetomium globosum*(ATCC 6205), *Gliocladium virens*(ATCC 9645), *Aureobasidium pullulans*(ATCC 9348) 등이다.

배지

실험에 사용된 한천 플레이트는 Harrold's M40Y, mineral salts agar, potato dextrose agar, nutrient-salts agar 등이고 그 조성은 Table 1에 보인 바와 같다. 배지 제조는 ATCC 카탈로그의 배지 제조 방법(10) 및 ASTM 방법(2)에 의거하였다. Harrold's M40Y는 *P. funiculosum* 배양을 위하여, mineral salts agar는 *C. globosum* 배양을 위하여, potato dextrose agar는 *A. niger*, *G. virens*와 *A. pullulans* 배양을 위하여 각각 사용되었다. 각 균주들은 포자 현탁액의 제조를 위하여 각각의 플레이트상에서 배양된다. 플레이트상에서 stock은 3~10°C에서 약 4개월 정도 보관할 수 있다. nutrient-salts agar는 탄소원이 들어 있지 않은 배지로서 각 균주의 포자 현탁액을 얻은 후 필름에서의 생장을 관찰하기 위하여 사용되었다.

포자 현탁액 제조

각 균주들은 stock으로부터 각각의 플레이트에 접종하여 28~30°C에서 7~20일 동안 배양한다. 배양된 subculture에 10ml의 증류수를 첨가하고 백금 선으로 곰팡이가 자란 표면을 부드럽게 긁고, 증류수 45ml과 10~15개의 유리구슬(지름 5mm)이 들어 있는 125ml 삼각플라스크에 포자 용액을 옮

Table 1. Composition of agar plate(g/ℓ).

1. Harrold's M40Y		3. Potato Dextrose Agar	
Malt Extract	20	Diced Potatoes	300
Yeast Extract	20	Glucose	20
Sucrose	400	Agar	15
Agar	20	4. Nutrient-Salts Agar	
2. Mineral Salts Agar		KH ₂ PO ₄	0.7
NaNO ₃	2.0	K ₂ HPO ₄	0.7
MgSO ₄	0.5	MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.7
KCl	0.5	NH ₄ NO ₃	1.0
Fe(SO ₄) ₃ · H ₂ O	0.01	NaCl	0.005
KH ₂ PO ₄	0.14	FeSO ₄ · 7H ₂ O	0.002
K ₂ HPO ₄	1.2	ZnSO ₄ · 7H ₂ O	0.002
Agar	15.0	MnSO ₄ · 7H ₂ O	0.001
Yeast Extract	0.02	Agar	15.0

긴 후 세계 흔들어 준다. 여과 후의 용액을 원심분리하여 상등액은 버리고 50ml의 증류수에 다시 현탁시키고 원심분리한다. 이와 같은 방법으로 포자를 3번 씻어 낸다. 씻어진 포자는 nutrient-salts 용액으로 희석하여 포자의 수가 $1,000,000 \pm 200,000$ 포자/ml 되도록 한다. 포자의 수는 헤모사이토크미터를 사용하여 현미경하에서 측정하였다. 이와 같은 방법으로 각각의 포자 현탁액을 만들고, 혼합 포자 현탁액은 각 현탁액을 같은 부피로 섞어서 제조한다.

각 포자 현탁액의 생존율을 측정하기 위하여, 멸균된 여과지(25mm×25mm) 3개를 각 플레이트 위에 놓고, 분무기로 전 표면이 포자 현탁액으로 젖을 정도로 충분히 뿌려준다. 28~30°C, 상대습도 85% 이상의 조건에서 14일간 배양한 후 충분한 생장이 관찰되면, 생존성 있는 포자 현탁액으로 사용되어질 수 있다.

필름의 제조 및 전분의 표면처리

Master batch(M/B)의 기본수지는 LDPE 혹은 LLDPE를 사용하였으며, 전분 농도는 30%로 하였다. M/B 제조는 Roll mill을 이용하였다. 필름의 기본 수지는 M/B의 기본 수지와 같게 하였고, M/B와 필름 기본 수지의 혼합은 Henschel mixer를 사용하여 dry mixing 방법으로 하였다. 전분 충전 농도가 7, 10, 15, 20% 되게 혼합하여 필름으로 압출하였다. 전분과 수지의 결합력을 강화시키기 위하여, vinyl trimethoxysilane(Shin Etsu, KBM 1003)을 메탄올과 물이 9:1의 부피비로 섞인 용매에 녹여 전분을 표면 처리하였다. 45°C로 유지되는 항온조에서 위의 용매에 0.5% (무게%/전분)에 해당하는 vinyl trimethoxysilane을 넣고 10분간 교반한 후, 전분을 첨가하고 15분간 반응시켰다. 반응이 끝난 slurry는 여과 후, 110°C 이상에서 18시간 이상 건조하여 분말로 분쇄한 후 desiccator에 보관 사용하였다.

필름상에서의 곰팡이 생장

고분자 필름은 폴리에틸렌으로 LDPE(Low-Density Polyethylene)와 LLDPE(Linear Low-Density Polyethylene)가 사용되었다. Nutrient-salts agar 플레이트 표면에 필름시료를 놓고, 플레이트 전체가 충분히 젖을 정도로 포자 현탁액을 분무기로 뿌려준다. 28~30°C, 상대습도 85% 이상의 조건에서 배양하며 매주 생장을 기록하여 최소한 21일 이상 계속한다. 세포 생장은 전혀 안 자란 경우, 전체 필름 면적의 10% 미만, 10~30%, 30~60%, 60

% 이상 자란 경우 등으로 나뉘며, 각각 0, 1, 2, 3, 4로 등급을 표시하였다. Nutrient-salts agar는 탄소원이 없는 배지로서 고분자 필름이 유일한 탄소원을 제공한다. 따라서 필름상에서의 세포 생장은 필름이 생분해됨을 의미한다.

필름의 물리적 성질 분석

곰팡이가 자란 필름은 물로 잘 씻은 후 염화수은 수용액(1g/ℓ)에 5분 동안 넣어둔 후 물로 씻고 실온에서 밤새 건조시킨 후 물리적 성질을 측정한다. 필름의 물리적 성질은 Universal Testing Machine (INSTRON)을 사용하여 필름의 두께, yield점과 break점에서의 tensile strength와 elongation 등을 측정하였다.

결과 및 고찰

Chaetomium globosum 균주는 ASTM에서 제시된 배양 조건으로 수차에 걸쳐 배양을 시도하였으나 subculture시 생장이 좋지 않아 원하는 농도만큼의 포자 현탁액을 얻을 수 없었다. 다른 4종류의 포자 현탁액을 사용하여 실험한 결과, *Penicillium funiculosum*과 *Gliocladium virens* 두 균주의 포자 현탁액은 필름 위에서 전혀 자라지 않았고, *Aureobasidium pullulans* 균주 포자 현탁액의 경우는 Table 2에 보인 바와 같이 일부 필름에서는 자라고 일부 필름에서는 자라지 않았다. 각 표에 나타난 sample

Table 2. Growth of *A. pullulans* on the surface of LDPE film.

Sample number	Starch concentration	Incubation Time(days)				
		6	13	18	25	32
1	7%	0	0	0	0	0
2		0	0	0	0	0
3		1	1	1	1	1
4		1	1	1	1	1
1	10%	0	0	0	0	0
2		0	0	0	0	0
3		1	1	1	1	1
4		1	1	1	1	1
1	15%	0	0	1	1	1
2		1	1	1	1	1

Table 5. Physical property change of LDPE film after the culture of *A. niger*.

Starch concentration	Fungus Culture	Machine Direction				Transverse Direction			
		Thickness (μm)	Tensile Strength at Yield (Kg/cm^2)	Tensile Strength at Break (Kg/cm^2)	Elongation at Break (%)	Thickness (μm)	Tensile Strength at Yield (Kg/cm^2)	Tensile Strength at Break (Kg/cm^2)	Elongation at Break (%)
7%	before	65	151	151	200	65	93	124	480
	after	62	160	160	250	60	99	129	475
10%	before	51	153	153	125	49	83	119	480
	after	45	162	162	130	45	90	90	100
15%	before	59	138	138	100	61	73	87	390
	after	54	149	149	100	57	79	79	160

력을 강화시키기 위하여 앞에서 기술한 바와 같이 0.1~1.0% 농도의 vinyl trimethoxysilane에 의해 처리된 전분은 fungi의 생장에 있어서 처리되지 않은 전분과 유사하게 나타남을 알 수 있다. 시료 필름의 제조시 압출되는 방향을 긴변으로 갖게 제조된 시료(machine direction)와 압출 방향의 수직 방향을 긴변으로 갖게 제조된 시료(transverse direction)에서의 세포 생장을 비교 관찰하였으나 별다른 차이점을 발견하지 못하였다.

필름상에서 곰팡이를 배양한 후 6주 후에 필름의 물성을 측정하였다. *A. pullulans*가 배양된 경우는 세포 생장이 좋지 않음으로 인해서 필름의 물성 변화가 거의 나타나지 않았다. 등급 1~2 정도의 생장을 보였던 *A. niger*를 배양한 후의 물성 변화는 Table 5에 보인 바와 같다. 모든 경우에 있어서 배양 후 필름 두께가 감소하였다. 필름 시료가 machine direction인 경우에는 그밖의 물성 변화는 나타나지 않았다. Transverse direction인 경우에는 yield point와 break point에서의 tensile strength의 변화는 보이지 않았으나, 전분 함량이 10%와 15%인 경우에 elongation에 있어서 커다란 감소를 나타내었다. 이상에서 보듯이 필름 내의 전분이 *A. niger*에 의하여 분해된 후 나타나는 특이한 물성 변화는 transverse direction의 elongation이 60~80% 정도 감소한 것이다.

생분해도가 높은 고분자 물질을 제조하기 위해서는 고분자의 물성을 저해시키지 않는 동시에 보다 높은 농도의 전분을 함유함이 바람직하므로 전분과 기존 고분자 물질과의 compatibility를 높이기 위하여 전분을 변형시키는 연구가 수행되어져야 한다. 이때 중요한 것은 변형된 전분이 미생물에 의한 분해도가 감소되지 않도록 생분해도에 대한 영향이 고

려되어야 하는 점이다. 전분을 함유한 고분자의 생분해도 측정을 위한 보다 정량적인 방법의 개발을 위해 전분의 분해에 관련하는 α -amylase, amyloglucosidase 등의 효소를 이용하는 방법에 대한 연구가 수행되고 있다. 미생물을 이용한 방법과 효소를 이용한 방법은 상호 보완적으로 사용되어질 수 있을 것으로 생각된다.

요 약

7~20% 전분이 함유된 폴리에틸렌 필름의 곰팡이에 의한 생분해 특성을 관찰하였다. 실험에 사용된 5종의 곰팡이 중에서 *Aspergillus niger*의 생장이 가장 좋았다. *A. niger*의 생장은 전분 함유율이 높을수록 좋았고, 전분 농도와 세포가 필름을 덮은 면적의 %가 유사하게 나타났다. 필름의 종류(LDPE, LLDPE)와 시료 필름의 절단 방향에는 영향을 받지 않았다. 폴리에틸렌 수지와 전분의 결합력을 강화시키기 위한 0.1~1.0%(무게%/전분) vinyl trimethoxysilane의 사용은 미생물의 생장을 방해하지 않았다. 전분 함량이 10% 이상의 경우에 필름의 elongation은 transverse direction의 경우 미생물 성장후에 60~80%의 감소를 보였다.

감 사

본 연구는 현대석유화학주식회사의 연구비 지원에 의하여 수행되었으며 이에 감사드립니다.

참고문헌

1. T. M. Aminabhavi, R. H. Balundgi and P. E.

- Cassidy(1990), *Polym.-Plast. Technol. Eng.*, 29, 235.
2. ASTM(1989), ASTM Standard Practice G21-70.
 3. ASTM(1989), ASTM Standard Practice G22-76.
 4. ASTM(1991), ASTM Standard Test Method D5209-91.
 5. ASTM(1991), ASTM Standard Test Method D5210-91.
 6. ASTM(1992), ASTM Standard Test Method D5247-92.
 7. ASTM(1992), ASTM Standard Test Method D5271-92.
 8. ASTM(1992), ASTM Standard Test Method D5338-92.
 9. G. Swift(1992), *FEMS Microbiology Reviews*, **103**, 339.
 10. S. C. Jong and M. J. Gantt(1987), *ATCC Catalogue of Fungi/Yeasts*, 17th ed., p. 414, ATCC, Maryland.