

## 전분 충전 폴리에틸렌 필름의 아밀레이스 반응에 의한 생분해도 측정

최수형 · 강경남 · †박태현 · \*신평균

성균관대학교 유전공학과, \*한국과학기술연구원 환경연구센터

### Measurement for Determining the Biodegradation of Starch-Filled Polyethylene Film by $\alpha$ -Amylase

Su Hyung Choi, Kyeong Nam Kang, Tai Hyun Park<sup>†</sup>, and Pyong Kyun Shin\*

Dept. of Genetic Eng., Sung Kyun Kwan University, Suwon 440-746, Korea

\*Environmental Research Center, Korea Institute of Science and Technology, Seoul 136-791, Korea

#### ABSTRACT

Optimal reaction condition for the starch hydrolysis by  $\alpha$ -amylase was determined and the sugar produced under the optimal condition was measured for estimating the biodegradation of starch-filled polyethylene film. Optimal ranges of temperature and pH were 70~80°C and 6.3~7.3, respectively. The 100 units of  $\alpha$ -amylase per mg starch were enough for the enzyme reaction. Reaction with polyethylene film containing 5%, 10%, 15% and 20% starch in the above condition showed that the sugar produced was proportional to the starch content in film. This relationship provides a calibration curve for determining the starch content of starch-filled polyethylene film. The average amount of hydrolyzed starch was about 40% of total starch in film. The rest of the starch is considered to be still dispersed in the film and not to be attacked by  $\alpha$ -amylase. In this experiment, we could obtain the higher biodegradability through the  $\alpha$ -amylase reaction in the above optimal condition than the reported one which had been improved by adding surfactant.

#### 서론

종래에는 썩지 않는 것이 플라스틱의 장점으로 여겨져왔으나 땅속에 매립되었을 시 분해되지 않음으로 인해 야기되는 환경문제는 날로 심각해지고 있다. 이 문제를 해결하기 위해 종래에 사용되어 왔던 고분자 수지(PP,PE,PS)와 천연고분자(전분)를 혼합시킨 생분괴성 고분자가 제조되기 시작하였다. 이

생분괴성 고분자가 토양에 매립되었을 시 전분과 같은 생분해성 물질은 미생물에 의해 분해되어 다공질을 형성하고 기반을 이루는 고분자 수지는 첨가된 자동산화제가 토양의 전이금속과 반응하면서 분해가 시작된다. 고분자 물질의 생분해도 측정방법에 대한 연구는 미국의 경우 ASTM(American Society for Testing and Materials) 규정을 중심으로 생분해도를 측정하는 방법들이 진행 되어지고 있다. 고분자 물질이 사용된 후 최종적으로 도달될 환경조건에 따라 도시 하수오니에 의한 호기적 생분해 방법(1),

† Corresponding Author

도시 하수오니에 의한 혐기적 생분해 방법(2), 특정 미생물에 의한 호기적 생분해 방법(3), 활성오니 폐수처리 시스템에 의한 호기적 생분해 방법(4), 퇴비화 조건에서의 호기적 생분해 방법(5) 등이 발표되었다. 그러나 대부분의 방법들이 많은 시간이 요구되고 과정도 복잡할 뿐 아니라 실험치의 재현성과 정량화에 있어서 불충분한 상태에 있다. 따라서 보다 짧은 시간으로 손쉽게 정확한 생분해도를 측정하는 방법이 요구되며, 이를 위해 효소에 의한 방법이 사용될 수 있다.

효소를 이용했을 때의 장점은 고농도의 효소를 사용하여 분해과정을 가속화시킬 수 있을 뿐 아니라 효소산물이 일반적으로 알려져 있으므로 미생물적 복잡한 대사과정이나 토양과 관련된 유기물질의 존재없이도 직접적으로 측정할 수 있다는 데 있다. 전분이 충전된 고분자의 경우에는 전분을 분해시키는 효소인  $\alpha$ -amylase가 생분해도 측정을 위해 효과적으로 사용될 수 있다. 그러나 일반적으로 보고되어 온, 전분과  $\alpha$ -amylase 반응의 최적조건은 가용성 전분에 대한 것으로서, 보통의 전분은 이 조건에서는 잘 용해되지 않아 낮은 분해정도를 보인다. 본 논문에서는 폴리에틸렌 필름 속에 섞여 있는 전분을  $\alpha$ -amylase가 효과적으로 분해시킬 수 있는 반응조건을 설정하고, 설정된 반응조건에서 반응시킨 후의 산물인 당을 측정함으로써 분해정도를 결정하는 데 목적이 있다.

## 재료 및 방법

### 전분의 효소( $\alpha$ -amylase) 반응

본 실험에서는 옥수수 전분(방일산업)과 *Bacillus*로부터 추출된  $\alpha$ -amylase(Sigma, A6380)가 사용되었고, 0.1M 인산 완충용액에서 전분의 효소반응이 수행되었다. 전분이 인산 완충용액상에 용해된 전분용액(1ml)을 shaking water bath에 15분간 담가 온도를 맞춘 후,  $\alpha$ -amylase가 인산 완충용액상에 용해된 효소용액(1ml)을 가하여 일정시간동안 반응시켰다. 반응 후 DNS(3,5-dinitrosalicylic acid) 시약 2ml를 첨가하여 효소반응을 종결시키고 DNS 방법(6)으로 spectrophotometer (Milton Roy, Genesys 5)에 의해 575nm에서 흡광도를 측정하여 환원당의 농도를 결정하였다. 효소의 양, 반응온도 및 pH 등을 변화시키며 반응속도를 측정하였다.

전분과  $\alpha$ -amylase 반응 산물의 glucoamylase에 의한 반응

전분을  $\alpha$ -amylase와 반응시킨 후, glucoamylase와의 반응을 위해 온도를 80°C에서 55°C로, pH를 6.7에서 4.5로 낮춘다.  $\alpha$ -amylase 반응에 의해 생성된 maltotriose와 maltose 등을 glucoamylase 용액(0.5ml)과 반응시켜, 모두 glucose로 분해한 후 glucose의 양을 glucose kit(Sigma, Procedure No. 510)를 사용하여 측정하였다.

### 전분 충전 폴리에틸렌 필름의 효소반응

전분의 함량(무게 %)이 각각 5%, 10%, 15%, 20%인 폴리에틸렌 필름(LDPE)과 *Bacillus*로부터 추출된  $\alpha$ -amylase (Sigma, A6380)가 사용되었다. 먼저 필름을 0.5cm×0.5cm의 크기로 잘게 절단하여 시험관에 10mg씩 넣은 후 0.1M 인산 완충용액(pH 6.7) 1ml를 채운다. 필름이 완충용액에 충분히 적시도록 한 후 80°C shaking water bath에 담가 온도를 맞춘다. 여기에  $\alpha$ -amylase가 인산 완충용액상에 용해된 효소용액 1ml를 첨가하여 10분간 반응시키고, DNS시약 2ml를 넣어 반응을 종결시킨 후 DNS 방법으로 환원당의 농도를 측정하였다.

## 결과 및 고찰

### 전분의 효소반응

일반적으로 알려진  $\alpha$ -amylase 효소반응의 최적조건은 가용성 전분에 대한 것이므로, 일반적인 옥수수 전분은 이 조건에서는 물에 잘 용해되지 않아 낮은 분해도를 보인다. 따라서 전분이 함유된 필름과  $\alpha$ -amylase를 반응시키기 전에 분해속도를 최대화시킬 수 있는 반응조건을 알아보았다.

전분은 낮은 온도에서는 물에 잘 녹지 않아 반응이 잘 일어나지 않고, 너무 높은 온도에서는 효소의 변성이 염려되므로, 온도가 반응속도에 미치는 영향을 살펴 보았다. 20mg/ml의 전분과 2000unit/ml의  $\alpha$ -amylase가 pH 6.7에서 15분 동안 반응한 후의 환원당의 농도는 각 온도에서 Fig. 1과 같이 나타났다. 70~80°C의 온도에서 가장 높은 반응결과를 나타냈고, 70°C는 불안정한 위치를 보이므로 80°C가 가장 적당한 반응온도로 생각된다. 전분이 함유된 필름이 폐기되었을 때, 80°C는 자연계에서 그 필름이 접할 수 있는 온도는 아니지만, 전분이 생분해성 물질이라는 것은 알려진 사실이므로 우리는 실

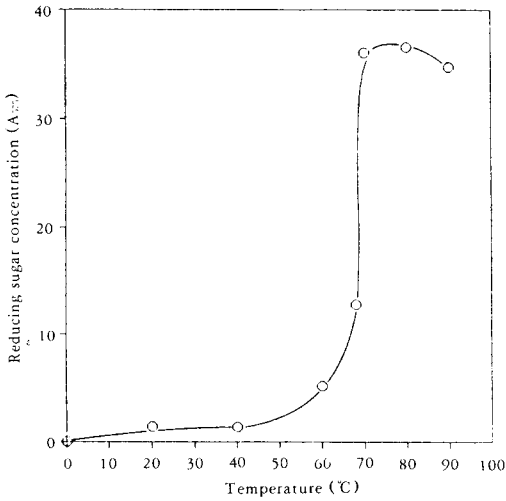


Fig. 1. Effect of temperature on  $\alpha$ -amylase reaction: 20mg/ml starch, 2000units/ml  $\alpha$ -amylase, pH 6.7, reaction time = 15min.

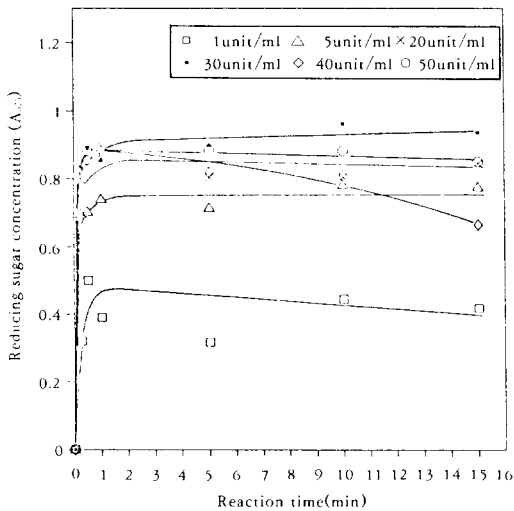


Fig. 2. Effect of  $\alpha$ -amylase concentration on conversion: 0.5mg/ml starch, 80°C, pH 6.7.

험실에서 빨리 분해시켜 분해된 정도를 측정하는 데 목적이 있으므로 80°C를 적정온도로 결정하였다. 따라서 이후의 모든 실험은 80°C에서 수행되었다.

다음으로 전분에 대한 적당한  $\alpha$ -amylase 양을 결정하기 위한 실험을 수행하였다. 전분의 주요성분인 amylose는 물속에서 시간이 지남에 따라 amylose 분자끼리 결합하여  $\alpha$ -amylase에 내성을 갖는 현상

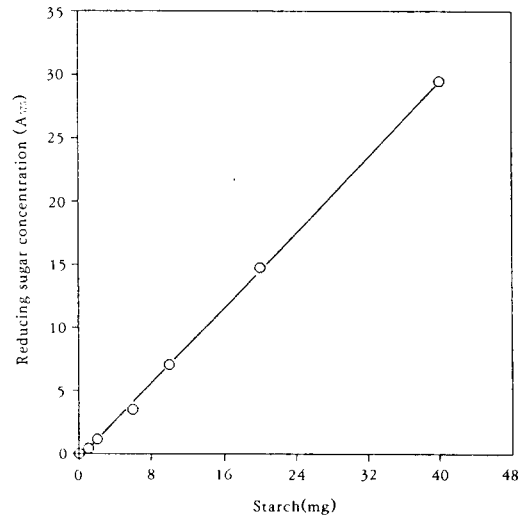


Fig. 3. Relationship between initial starch content in 2ml reaction solution(1ml starch solution + 1ml enzyme solution) and reducing sugar concentration after the reaction: 80°C, pH 6.7, reaction time = 40 min.

이 일어난다. 따라서 효소농도가 낮을수록 이와 같은 현상이 일어날 빈도가 높다. 반면에 효소농도가 높으면 amylose 서로간에 결합이 일어나기 전에 효소와 반응하므로 전환율이 높다(7). 0.5mg/ml의 전분에 대해, pH 6.7, 온도 80°C 조건하에서 효소량을 변화시키며 실험한 결과는 Fig. 2에서 보인 바와 같다. 0.5mg/ml의 전분에 대한 효소량은 20~50unit정도면 충분하다는 것을 알 수 있다. 따라서 전분과 효소의 비가 1mg:100units이면 적당하다고 할 수 있다. 여기서 unit은  $\alpha$ -amylase 구입처인 Sigma사에서 정의한 unit이다. 그렇다면 과연 전분과 효소의 비가 1:100이면 효소량이 충분한가를 알아보기 위해 이 비율을 유지하며 기질과 효소의 농도를 증가시켜가며 실험해 본 결과 Fig. 3에서 보인 바와 같이 비례적으로 증가하였고, 이는 전분(mg/ml):효소(unit/ml)의 비가 1:100이 유지되면 기질에 대한 효소량은 충분하다는 것을 의미한다.

Fig. 4는 반응에 미치는 pH의 영향을 보여주고, pH 6.3~7.3 사이에서 가장 높은 분해도를 나타냈다. 위의 조건들로 행한 전분의 효소반응에서 평균적으로 maltose로 분해된다고 가정시 기대되는 환원당보다 약 30% 적은 값으로 나타내었다. 이것은 전

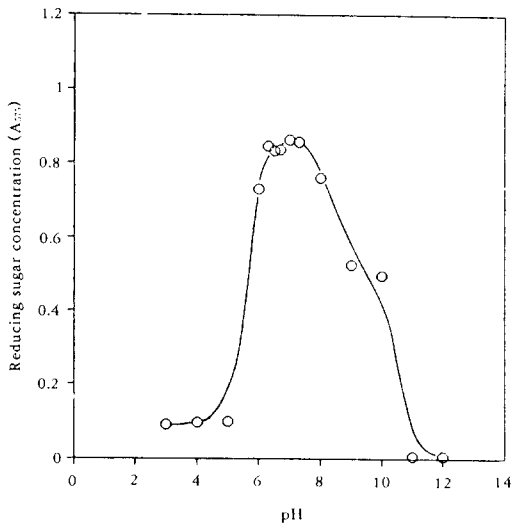


Fig. 4. Effect of pH on  $\alpha$ -amylase reaction: 0.5 mg/ml starch, 50 units/ml  $\alpha$ -amylase, 80°C, reaction time = 15 min.

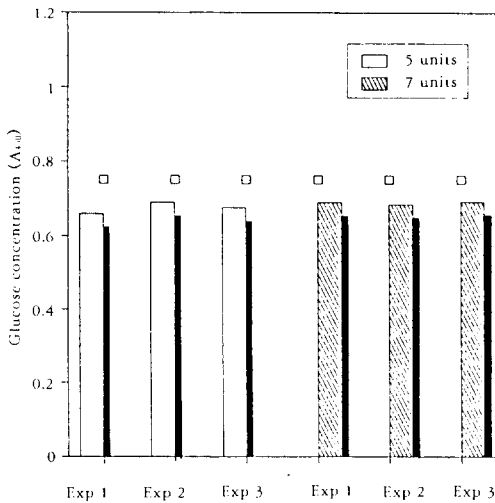


Fig. 5. Glucose concentration in glucoamylase reaction: (···□···) expected glucose concentration when the starch is completely converted to glucose.

분이  $\alpha$ -amylase에 의해 빠르게 dextrin으로 분해되고 곧이어 maltose와 maltotriose로 더 분해되지만, 그 이상으로 분해되어 glucose와 maltose로 되는 반응은 매우 늦게 일어나는데 본 실험에서는 주로 빠른 반응만이 진행되어서 그 반응산물인 maltotriose

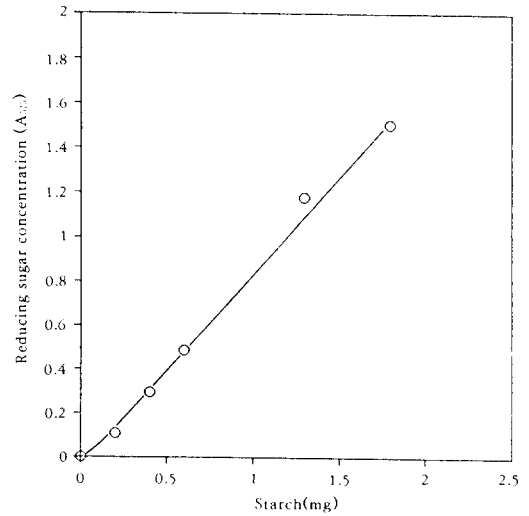


Fig. 6. Calibration curve of initial starch content in 2ml reaction solution (1ml starch solution + 1ml enzyme solution) and reducing sugar concentration after the reaction: 80°C, pH 6.7, reaction time = 15 min.

나 maltose가 낮은 반응산물인 glucose나 maltose보다 많은 양을 차지하고 있기 때문으로 생각된다 (7).

그러나 이들 반응산물을 다시 glucoamylase와 반응시켜 최종적으로 만들어지는 glucose의 양을 측정하면 Fig. 5에 보인 바와 같이 전분이 glucose로 완전 분해되었을 경우에 기대되는 포도당 농도에 근접함을 알 수 있다. Fig. 5는 첨가된 glucoamylase량이 5unit과 7unit인 각 경우에 세번씩의 반복실험 결과를 보여 준다.  $\alpha$ -amylase에 의한 반응에서 전분으로부터 생성된 환원당의 농도는 Fig. 3에서와 같이 반응전 전분의 농도와 재현성있는 선형관계를 보여주고, 이 반응에서 생성된 산물은 glucoamylase에 의해 거의 모두 완전분해되어 glucose로 되는 것이 확인되었으므로,  $\alpha$ -amylase에 의한 반응만으로도 전분농도의 측정이 가능하다. 전분이 함유된 필름 내의 전분량 측정에 사용될 수 있는 저농도 범위의 전분과  $\alpha$ -amylase반응에 대한 calibration curve는 Fig. 6에 보인 바와 같다.

필름과  $\alpha$ -amylase와의 반응

위의 조건을 바탕으로 전분이 함유된 폴리에틸렌

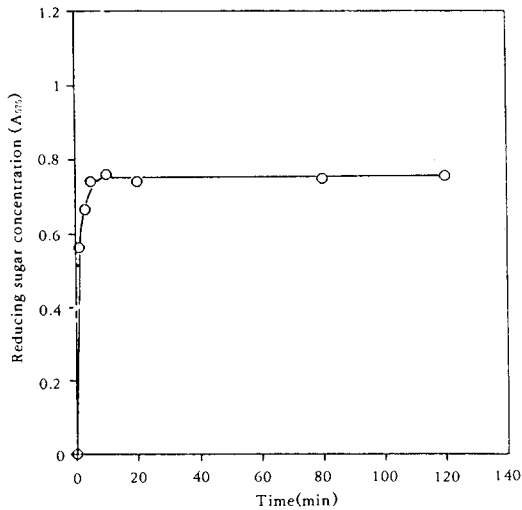


Fig. 7.  $\alpha$ -amylase reaction with starch-filled polyethylene film: 10mg film(20% starch) and 200units  $\alpha$ -amylase in 2ml reaction solution, 80°C, pH 6.7.

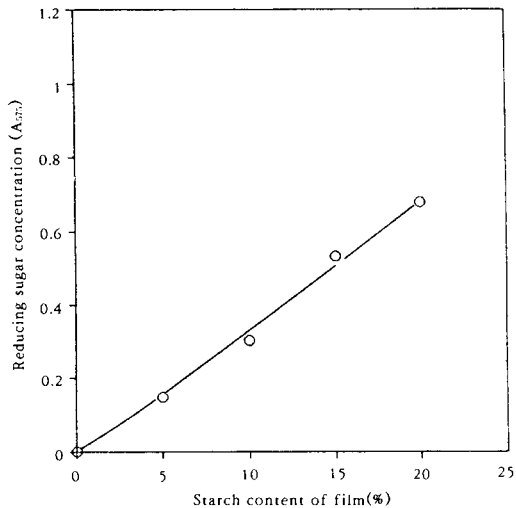


Fig. 8. Relationship between starch content of film and reducing sugar concentration after the reaction: 10mg film in 2ml reaction solution, 80°C, pH 6.7.

필름과  $\alpha$ -amylase를 반응시켰다. Fig. 7에 나타난 바와 같이 필름내의 전분도 용액상의 전분과 비슷한 양상으로 반응시간 5분안에 반응이 다 완료됨을 알

Table 1. Biodegradation of starch in film by  $\alpha$ -amylase.

Starch content	Expected value of starch (mg/2ml)	Measured value of hydrolyzed starch(mg/2ml)	Biodegradation
5%	0.5	0.18	36.7%
10%	1.0	0.37	36.5%
15%	1.5	0.63	41.7%
20%	2.0	0.80	39.9%
			Average 38.7%

수 있다. 무게비에 의한 전분 함량이 각각 5%, 10%, 15%, 20%인 폴리에틸렌 필름이  $\alpha$ -amylase와 반응하여 생성된 환원당의 농도는 Fig. 8에 보인 바와 같다. 각 반응에서 전분과 효소의 비는 1mg:100unit이 되도록 효소를 첨가하였다. 필름 내의 전분함유량이 증가할수록 분해되어 나오는 환원당의 양도 대응하여 증가하므로 필름 내에 함유된 미지의 전분량을 정량화하는 데 있어서 표준자료의 역할을 할 것으로 기대된다.

전분이 함유된 폴리에틸렌 필름의  $\alpha$ -amylase 반응결과인 Fig. 8과 환원당 농도와 전분농도간의 calibration curve인 Fig. 6으로부터 각 필름 내에서  $\alpha$ -amylase에 의해 분해되어 나온 전분량을 구할 수 있고 그 결과는 Table 1에 보인 바와 같다. 필름 내에 충전된 전분의 모든 양이 분해되지 못하고 평균적으로 38.7%만이 분해되었다. 전분의 충전농도가 높은 경우에 충전분에 대한 분해된 전분의 비도 높은 경향을 나타내었다. 이는 전분함유농도가 낮은 필름일 경우, 전분분말이 필름 내부에 분산되어 위치하게 되어 효소가 공격하지 못하고 표면의 전분과 연결상을 형성하는 부분만을 분해하기 때문으로 생각된다(8). Allenza 등(9)은 전분 충전 폴리에틸렌 필름을 45°C에서  $\alpha$ -amylase와 반응시켜 15%의 분해도를 얻었고 계면활성제를 첨가하였을 경우 23%의 분해도를 얻었다. 본 연구에서는 온도를 높임으로써 이보다 높은 값의 최종 분해도를 얻을 수 있었다. 반응 후에 필름속에 잔존하는 전분의 양은 Fourier transform infrared spectrophotometer(FTIR)에 의한 방법(8)이나 decalin으로 폴리에틸렌 필름을 녹여내고(10) 확인할 수 있을 것으로 생각된다. 이상에서 논의한 바와 같은 효소에 의한 방법은 필름상의 미생물 생장을 관찰하는 방법(11)보다 신속하고 정량적인 결과를 제시하여줄 수 있다.

## 요 약

전분이 충전된 폴리에틸렌 필름의 생분해도를 측정하기 위해,  $\alpha$ -amylase가 효과적으로 전분을 분해시킬 수 있는 반응조건을 설정하고 설정된 반응조건에서 반응시킨 후 산물인 당을 측정하여 분해정도를 결정하였다. 효과적인 반응온도는 80°C 이고, pH는 6.3~7.3 사이가 적당하였다. 효소반응에 적당한  $\alpha$ -amylase량은 1 mg 전분당 100unit이었다. 이와 같은 반응조건하에서, 전분의 무게함유량이 각각 5%, 10%, 15%, 20%인 폴리에틸렌 필름을  $\alpha$ -amylase와 반응시킨 결과 전분이 함유된 비율과 생성된 환원당간에 대응의 관계를 보였다. 따라서 필름 내에 함유된 생분해가 가능한 전분량을 정량화하는데 calibration 역할을 할 것으로 기대된다. 이 때 분해되어진 전분의 양은 충전된 전체 전분량의 약 40%에 해당하는 값으로 나타났으며, 나머지는 필름 내부에 분산되어 있어  $\alpha$ -amylase의 공격을 받지 못하기 때문으로 생각된다. 본 실험을 통해 최적화된 반응조건하에서 분해시킴으로써, 계면활성제를 첨가하여 분해도를 높인 기존의 데이터보다 더 높은 분해도를 얻을 수 있었다.

## 참고문헌

1. ASTM(1991), ASTM Standard Test Method D5209-91
2. ASTM(1991), ASTM Standard Test Method D5210-91
3. ASTM(1992), ASTM Standard Test Method D5247-92
4. ASTM(1992), ASTM Standard Test Method D5271-92
5. ASTM(1992), ASTM Standard Test Method D5338-92
6. G. L. Miller(1959), Analytical Chemistry, **31**, 426
7. P. Bernfeld(1951), Advances in enzymology (F. F. Notd, ed.), Vol **12**, 379, Interscience Publishers, New York.
8. S. M. Goheen and R. P. Wool(1990), J. Applied Polymer Science, **42**, 2691.
9. P. Allenza, J. schollmeyer and R. P. Rohrnach(1990), Corn Utilization Conference III Proceedings, p.1, National Corn Growers Association.
10. A. R. Fratzke, W. Sung, R. L. Evangelista and Z. L. Nikoiov(1991), Analytical Letters, **24**, 847.
11. 김 재현, 박 태현, 신 동명, 이 성호, 한 귀영 (1994), 한국생물공학회지, **9**, 412.

1. ASTM(1991), ASTM Standard Test Method