

고활성 Poly(butylene succinate-co-butylene adipate) 분해균의 선발

김말남* · 이선희 · 김완규¹ · 원항연²

상명대학교 생물학과, ¹농업과학기술원 식물병리과,
²농업과학기술원 응용미생물과

Screening of Microorganisms with High Poly (butylene succinate-co-butylene adipate)-Degrading Activity

Mal Nam Kim*, Sun Hee Lee, Wan Gyu Kim¹ and Hang Yeon Weon²

Department of Biology, Sangmyung University, Seoul 110-743, Korea

¹Plant Pathology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology,
RDA, Suwon 441-707, Korea

²Applied Microbiology Division, National Institute of Agricultural Science and Technology,
RDA, Suwon 441-707, Korea

Abstract - Microorganisms capable of degrading poly(butylene succinate-co-butylene adipate) (PBSA) were isolated from 40 soil samples such as landfill site soil, cultivating soil and activated sludge soil from 20 different sites in Korea by using the enrichment culture and the clear zone test at 37°C. Based on the 16S rDNA sequences, the isolated bacterium was identified to be *Streptomyces* sp. PBSA-1. Morphological and cultural characteristics were employed for the identification of the isolated fungi and they were proved to be *Aspergillus fumigatus* PBSA-2 and *Aspergillus fumigatus* PBSA-3. The PBSA degradation activity of the isolated microorganisms was enhanced through the serial acclimation in PBSA plate medium. The PBSA degrading microorganisms appeared to be highly active for the PBSA degradation in that 83% of PBSA was degraded by *Streptomyces* sp. PBSA-1, and 65% and 75% of PBSA was mineralized by *A. fumigatus* PBSA-2 and *A. fumigatus* PBSA-3 respectively during 40 days of the modified Sturm test.

Key words : poly(butylene succinate-co-butylene adipate), *Streptomyces* sp., *Aspergillus fumigatus*, degradation activity

서 론

플라스틱으로 대표되는 고분자 재료는 편리하고 쾌적

한 생활을 지탱하는 중요한 재료로 20세기 초부터 wrap
이나 shopping bag과 같은 포장재와 일회용품으로 많은
양이 사용되고 있다 (Nikolic *et al.* 2003; Tserki *et al.*
2006b). 플라스틱의 생산과 소비가 증가되면서 사용 후
폐기되는 폐플라스틱이 분해가 되지 않고 남아 매립지
의 부족 등 사회적 문제를 일으키고 있다. 플라스틱의

*Corresponding author: Mal Nam Kim, Tel. 02-2287-5150,
Fax. 02-2287-0070, E-mail. mnkim@smu.ac.kr

재활용 방법은 폐기된 플라스틱을 회수하기 힘들고 별도의 세척과정과 재활용하기 위한 에너지를 필요로 하므로 비경제적이다. 따라서 자연 속에서 빠르게 분해되도록 분해성을 부여하는 연구의 필요성이 대두되었으며 몇몇 생분해성 플라스틱이 개발되어 포장, 위생과 농경업에서 폐플라스틱의 문제를 부분적으로 해결하는데 기여하였다. Poly(caprolactone) (PCL) 및 poly(L-lactic acid) (PLLA) 등과 같은 생분해성 플라스틱은 외과 봉합사, 상처 드레싱, 이식과 같은 생체의학에서 널리 사용해 오고 있지만 높은 생산단가와 취약한 물성으로 인해 농경 상품으로의 응용이 제한되고 있다 (Zhao *et al.* 2005; Tserki *et al.* 2006a). 생분해성 플라스틱을 합성 범용 플라스틱의 대체 물질로써 상업화하기 위해서는 생분해성을 가지면서 생산 원가가 기존 합성 플라스틱에 비하여 크게 높지 않고 기계적 물성 또한 우수하여야 한다 (Zhao *et al.* 2005; Tserki *et al.* 2006b).

생분해성 지방족 폴리에스테르 중 poly(butylene succinate-co-butylene adipate) (PBSA)는 1990년대 Showa Denco사의 연구진에 의해 고안되었다 (Nikolic *et al.* 2003). PBSA는 생산단가가 비교적 낮으며 기계적 물성이 우수하여 여러 응용분야에 사용이 기대되고 있다 (Tserki *et al.* 2006a, b; Ray *et al.* 2007). PBSA의 화학적 구조는 1,4-butanediol과 succinic acid 및 adipic acid unit의 축중합으로 이루어져 있다. 주요 chain에 butylene succinate와 butylene adipate가 랜덤하게 연결되어 있으며 분자의 말단에는 -OH 혹은 -COOH group이 있다. PBSA는 에스테르전환 반응으로도 합성되어지며 조성에 따른 생분해 특성이 연구되었다 (Tserki *et al.* 2006a, b).

토양 속에 매립된 난분해성 플라스틱들은 경작물과 토양의 배수성을 떨어뜨리고 매립지에서 수막현상을 일으켜 침출수의 범람을 초래하기도 한다. 그러므로 생분해성 플라스틱을 제조하고 사용 후에 이들이 빠르게 분해되게 하기 위해서는 매립지와 경작지 토양으로부터 플라스틱의 분해에 높은 활성을 나타내는 미생물 자원 탐색 및 특성 규명이 필요하다.

PBSA를 분해하는 미생물들은 퇴비와 토양 등에서 분리되었다. 일본의 토양과 퇴비를 접종원으로 30°C와 60°C에서 7일간 액체강화배양 후에 PBSA가 포함된 고체배지에서 투명환을 형성하는 *Bacillus pumilus*와 *Bacillus stearothermophilus*이 분리되었고 (Tomita *et al.* 2000; Hayase *et al.* 2004) 일본토양에서 30°C에서 7일간 5회 액체강화배양으로 PBSA를 분해하는 *Acidovorax delafieldii* BS-3이 분리되었다 (Uchida *et al.* 2000).

본 연구에서는 경제성이 높으며 기계적 물성이 우수한 지방족 폴리에스테르인 PBSA를 유일 탄소원으로 대

사할 수 있는 미생물들을 우리나라 여러 지역의 경작지와 매립지 토양으로부터 액체강화배양과 투명환시험법을 이용하여 분리·선발하였다. 순화를 통해 PBSA 분해 활성을 증진하였고 PBSA 분해 균주를 16S rDNA 염기서열분석과 형태적, 배양적 특징으로 동정하였다. 생분해 활성은 ASTM D5209-92의 규격에 기초한 변형 Sturm test에서 CO₂ 발생량을 정량하고 SEM 촬영으로 평가하였다.

재료 및 방법

1. 토양 시료

PBSA 분해균의 분리를 위하여 2005년 2월과 5월에 우리나라 20개 지역에서 토양 특성이 다른 40개의 토양 시료를 채취하였다. 멀칭필름을 씌워서 작물을 재배하는 밭과 비닐하우스 근처의 경작토, 쓰레기 매립토, 낙엽으로 덮인 산의 부엽토 및 하수처리장의 활성오니토에서 채취한 토양 시료를 균 분리용 접종원으로 사용하였다.

2. PBSA 시료

PBSA는 (주)이래화학으로부터 공급받았다. PBSA의 수평균분자량과 중량평균분자량은 각각 60,000 g mol⁻¹ 및 130,000 g mol⁻¹이었다.

3. 배지

PBSA 분해균의 분리에는 PBSA가 유일탄소원으로 포함된 무기염액체강화배지 (PBSA-EM)를 사용하였으며, PBSA 분해균의 선발과 분해활성 측정에는 PBSA를 포함한 무기염고체배지 (PBSA-PM)를 사용하였다 (Table 1).

Table 1. Composition of culture medium for the screening of the PBSA-degrading strains

Component	Medium	
	PBSA-EM	PBSA-PM
K ₂ HPO ₄	2.0 g	2.34 g
KH ₂ PO ₄	1.0 g	1.33 g
(NH ₄) ₂ SO ₄	4.0 g	1.0 g
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0.5 g	0.2 g
NaCl	—	0.5 g
Yeast extract	0.1 g	0.6 g
Plysurf A210G	—	0.01 g
PBSA	5.0 g	1~2.0 g
D.W	1L	1L
Trace element solution*	—	1.0 mL

*: CoCl₂ 11.9 mg, CuSO₄ 15.7 mg, FeCl₃ 0.97 mg, CaCl₂ 0.78 mg, MnCl₂ 10.0 mg, distilled water g.s.p 1L

4. PBSA 분해균의 분리과 순화

Teeraphatpornchai *et al.* (2003)와 Hayase *et al.* (2004)의 방법을 변형하여 실험하였다. 멸균증류수 100 mL와 토양시료 10 g으로 토양상층액을 준비하고 유일탄소원으로 0.5% PBSA를 포함한 PBSA-EM배지에 토양상층액을 접종하였다. 7일간 27°C, 37°C 및 58°C에서 진탕배양 후 PBSA-EM 새 배지에 균 배양액을 재접종하고 수 회 반복배양하였다. 이 배양액을 PBSA-PM배지에 도달하고 20일간 동일온도에서 배양하여 투명환을 형성하는 콜로니를 선별하여 순수분리하고 PBSA-PM 배지에서 순화시켜 분해균을 선발하였다.

5. 선발균의 분류동정

1) 16S rDNA 염기서열분석에 의한 세균의 동정

PBSA 분해 세균의 16S rDNA 염기서열은 CLUSTAL W program을 사용하여 선택된 속들의 관계를 정렬하고 MEGA version 3.1을 이용하여 Saitou and Nei (1987)의 neighbor-joining 방법으로 계통수를 작성하였다. 유연관계의 안정성은 1,000회 샘플링에 기초된 neighbor-joining 방법의 bootstrap을 수행하여 평가하였다.

2) 형태적, 배양적 특성에 의한 진균의 동정

PBSA 분해 진균을 7일간 슬라이드배양한 후 lactophenol blue solution (Sigma)로 염색하여 광학현미경으로 촬영하고 균의 형태적 특징을 관찰하였다. Kim *et al.* (2000)의 방법에 따라 Czapek Yeast Extract Agar, Czapek Agar 및 Malt Extract Agar에서 4°C, 25°C 및 40°C로 배양하였다. 포자현탁액을 배지에 접종하고 배양 후 균의 형태, 색깔 및 직경 크기 등의 형태적, 배양적 특징으로 동정하였다.

6. 분해활성 측정

변형 Sturm test (ASTM D5209-92)를 이용하여 반응배지 100 mL, 균 접종량 1.0×10^7 cells mL⁻¹, PBSA 농도 0.01%, 37±0.5°C에서 40일간 PBSA 분해활성을 측정하여 생분해도를 계산하였다.

결과 및 고찰

1. PBSA 분해균의 분리

우리나라 20개 지역에서 특성이 다른 토양 시료 40개를 대상으로 강화배양과 투명환시험법을 실시하여 PBSA 분해력을 가진 미생물 3주를 분리하여 그 결과를 Table

Table 2. Isolation of the PBSA-degrading strains by using the clear zone test

Sampling site (Sampling soil)	Isolation temperature	Isolated strain	Clear zone diameter
Hwasung-si, Gyeonggi-do (Landfill)	37°C	PBSA-1	4.3 mm
Hwasung-si, Gyeonggi-do (Landfill)	37°C	PBSA-2	Not applicable
Sangju-si, Gyeongsangbuk-do (Cultivating soil)	37°C	PBSA-3	Not applicable

2에 제시하였다. 분리된 균의 형태적 특징을 관찰한 결과 PBSA-1은 방선균으로, PBSA-2와 PBSA-3은 곰팡이로 확인되었다. PBSA-1의 경우 투명환의 경계가 뚜렷하여 투명환 직경을 측정할 수 있었으나 PBSA-2와 PBSA-3의 경우에는 투명환의 경계가 모호하여 투명환 직경을 정확하게 측정할 수 없었다.

PBSA-1, PBSA-2 및 PBSA-3은 모두 27°C와 58°C에서는 분리되지 않고 37°C에서만 분리되어 중온균으로 판명되었다. 곰팡이의 경우 일반적으로 27°C에서 잘 성장한다고 알려져 있으나 PBSA-2와 PBSA-3의 경우에는 37°C에서 가장 빠른 성장을 보여 PBSA를 포함한 배지에서 경계가 불분명한 투명환을 형성하였다.

지금까지 PBSA의 분해균으로 보고된 균은 일본토양을 집중원으로 30°C에서 분리된 *Amycolatopsis* sp. HT-32 및 *Amycolatopsis* sp. K104-1가 있고 (Pranamuda *et al.* 1997; Nakamura *et al.* 2001) 곰팡이로서는 중국 퇴비를 집중원으로 30°C에서 분리된 *Aspergillus versicolor*가 있다 (Zhao *et al.* 2005).

2. 선발균의 분류동정

방선균 PBSA-1은 16S rDNA 염기서열분석으로 동정하였고 곰팡이인 PBSA-2와 PBSA-3은 형태적, 배양적 특징에 의하여 동정하였다. 그 결과 경기도 화성군 매립토에서 분리된 PBSA-1은 *Streptomyces* sp.로 동정되었다 (Fig. 1).

토양 방선균은 복잡한 형태 분화와 더불어 산업적으로 유용한 항생물질, 생리활성물질, 효소 및 색소와 같은 2차대사산물을 생산한다. *Amycolatopsis* sp. HT-32 및 *Amycolatopsis* sp. K104-1은 일본토양에서 PLLA를 분해하는 방선균으로 분리, 동정되었고 방선균 공시균주 중 PLLA 및 PCL과 같은 여러 생분해성 플라스틱을 분해하는 균으로는 *Amycolatopsis* spp.와 *Saccharothrix* spp. 이 보고된 바 있다 (Pranamuda *et al.* 1997; Nakamura *et al.*

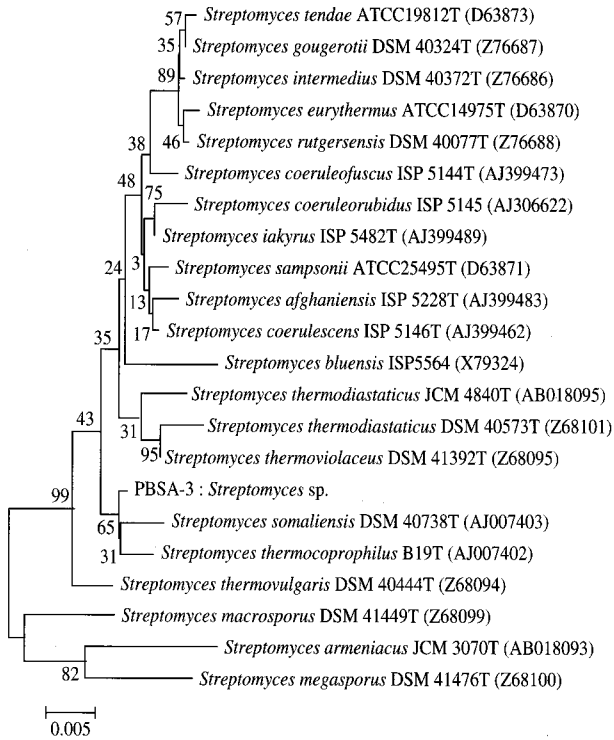


Fig. 1. Phylogenetic tree of PBSA-1 based on the 16S rDNA sequence analysis.

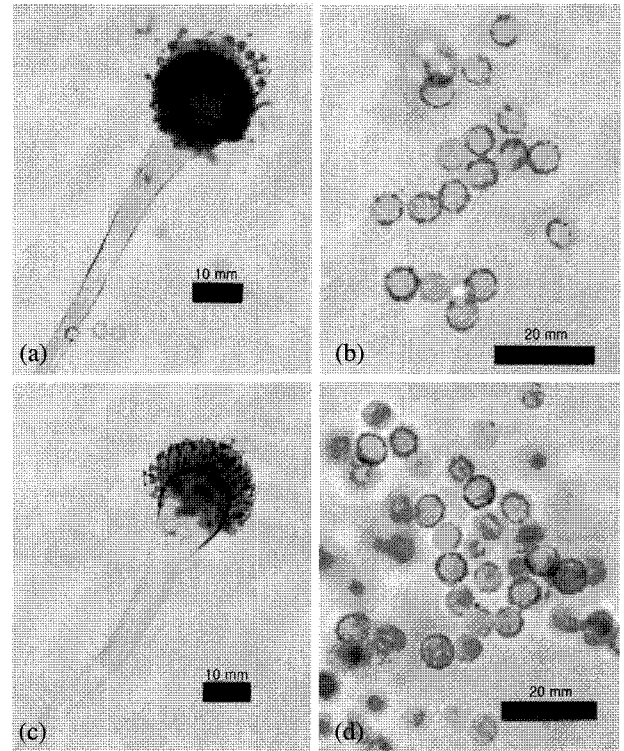


Fig. 2. Morphology of *Aspergillus fumigatus* PBSA-2 conidiophore (a) with conidia (b) and *Aspergillus fumigatus* PBSA-3 conidiophore (c) with conidia (d).

al. 2001; Tokiwa and Jarerat 2003).

일본토양에서 분리한 PBSA를 포함한 지방족 폴리에스테르 분해 세균은 Table 3에 수록한 바와 같이 *Bacillus* 속이었다. 이에 비하여 본 연구에서 우리나라 토양으로부터 분리한 PBSA 분해 방선균은 *Streptomyces*속이었다.

PBSA-2와 PBSA-3의 형태적, 배양적 특징을 조사한 결과 이들은 모두 Fig. 2와 Table 4에 제시한 바와 같이 *Aspergillus fumigatus*로 동정되었다.

*Aspergillus*속은 자연계에 널리 분포하며 일부 종은 아플로톡신과 같은 독소를 생성하지만 효소, 식품 또는 다른 유용물질의 생산에 이용되고 있다(Paul and Clark 1996). *A. fumigatus*는 전 세계에 널리 분포하며 amylase, lipase 및 phosphatase를 생산한다고 보고 되어있다(Paul and Clark 1996). Kim et al. (2000)은 우리나라 서울 근교

의 경작토로부터 지방족 폴리에스테르인 Sky-Green®을 분해하는 *A. fumigatus*를 분리한 바 있다.

3. PBSA 분해활성 측정

ASTM D5209-92에 기초하여 0.01% PBSA film을 유일 탄소원으로 하여 각 PBSA 분해균을 대상으로 37°C에서 변형 Sturm test를 40일간 실시하였다. Fig. 3에 의하면 PBSA의 분해에 가장 높은 활성을 보인 균은 방선균 *Streptomyces* sp. PBSA-1로서 40일 동안 83%의 PBSA를 무기질화시켰다. 이에 비하여 곰팡이인 *A. fumigatus* PBSA-2와 *A. fumigatus* PBSA-3의 경우에는 각각 65% 및 75%의 PBSA가 무기질화되었다.

Table 3. Aliphatic polyester degrading strains reported in the literatures

Bioplastic*	Strain	Soil sample	Reference
PBSA	<i>Bacillus pumilus</i>	Japan soil	Hayase et al. 2004
PLLA, PBS, PBSA	<i>Paenibacillus amyloticus</i>	Japan soil	Teeraphatpornchai et al. 2003
PBSA	<i>Bacillus strearothermophilus</i>	Japan soil	Tomita et al. 2000
PBS	<i>Bacillus smithii</i>	Japan soil	Pranamuda et al. 1995
PLLA	<i>Geobacillus thermocatenulatus</i>	Japan soil	Kosuke et al. 2004

*PBSA: poly(butylene succinate-co-butylene adipate), PBS: poly(butylene succinate), PLLA: poly(L-lactic acid)

Table 4. Morphological and cultural characteristics of *Aspergillus fumigatus* PBSA-2 and *Aspergillus fumigatus* PBSA-3

Characteristics	Strain PBSA-2	Strain PBSA-3
Colony morphology on CYA* at 25°C		
Color	greyish green	greyish green
Reverse	pale	pale
Size	70 mm	70 mm
on CZA* at 25°C		
Color	bulish green	bulish green
Reverse	pale	pale
Size	70 mm	70 mm
on MEA* at 25°C		
Color	greyish green	greyish green
Reverse	pale	pale
Size	70 mm	70 mm
Growth on CYA, MEA at 4°C	no growth	no growth
Growth on CYA, MEA at 40°C	growth 70 mm	growth 70 mm
Conidia		
shape	globose, echinulate	globose, echinulate
size	2~3 µm	2~3 µm
Conidial head	columner, uniseriate	columner, uniseriate
Stripes	4.5~7.5 µm	4.5~7.5 µm
Vesicles		
shape	sparulate	sparulate
size	7.5~22.5 µm	7.5~22.5 µm

CYA*: Czapek Yeast Extract Agar, CZA*: Czapek Agar, MEA*: Malt Extract Agar

일본토양으로부터 분리된 Table 3의 PBSA 분해 세균 *Bacillus pumilus*는 PBSA film이 0.1% 포함된 배지 내에서 30°C, 14일 동안 PBSA를 분해한 결과 PBSA가 100% 분해되었다(Tomita *et al.* 2000). Hayase *et al.*은 *Bacillus stearothermophilus*의 경우 0.5% PBSA film이 60°C에서 20일 동안 80% 분해된다고 보고한 바 있다.

본 연구에서 분리된 방선균 *Streptomyces* sp. PBSA-1은 유도기 없이 초기부터 빠르게 PBSA를 분해하는 거동을 보이며 83%의 높은 분해 활성을 나타내었다. Nikolic *et al.* (2003)은 *Candida cylindracea*의 효소 esterase로 PBSA를 분해시켰을 때 생분해도 곡선이 S자 형태를 보여 분해과정에 유도기가 있음을 보고하였다. Kim *et al.* (2000)은 Sky-Green®을 분해하는 곰팡이를 우리나라 토양으로부터 분리하였으며, 이 곰팡이는 변형 Sturm test에서 45~65%의 Sky-Green®을 무기질화시켰는데 1~10일까지 분해활성이 거의 나타나지 않는 유도기가 관찰되었다고 보고하였다. Sky-Green®은 PBSA와 같이 succinic acid, adipic acid, butane diol 및 ethylene glycol로

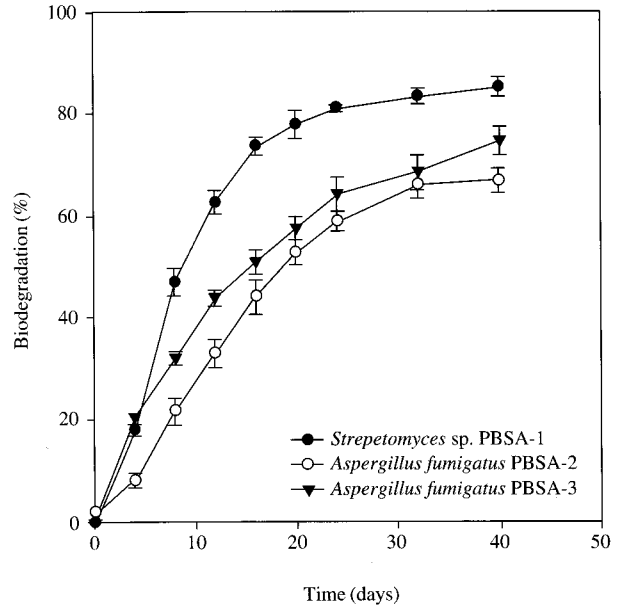


Fig. 3. The modified Sturm test results for PBSA biodegradation by using *Streptomyces* sp. PBSA-1, *A. fumigatus* PBSA-2 and *A. fumigatus* PBSA-3.

합성된 지방족 폴리에스테르이다. 이에 비하여 본 연구에서 분리한 곰팡이는 분해활성의 유도기 없이 PBSA를 빠르게 분해하였으며 40일 동안 PBSA를 65%와 75% 각각 분해하는 것으로 나타나 이 균주의 분해활성은 매우 높다고 평가할 수 있다.

적 요

우리나라 20개 지역의 경작토, 쓰레기 매립토, 부엽토 및 활성오니토에서 채취한 40개 토양 시료로부터 poly (butylene succinate-co-butylene adipate) (PBSA)를 분해하는 미생물을 37°C에서 강화배양과 투명환시험법을 이용하여 PBSA를 분해하는 균주를 선발하였다. 선발한 세균은 16S rDNA 염기서열분석으로 동정한 결과 *Streptomyces* sp. PBSA-1로 밝혀졌으며 진균은 형태적, 배양적 특징을 통하여 *Aspergillus fumigatus* PBSA-2와 *Aspergillus fumigatus* PBSA-3으로 동정되었다. 변형 Sturm test를 이용하여 선발균의 PBSA 분해활성을 측정된 결과 37°C에서 40일 동안 *Streptomyces* sp. PBSA-1은 PBSA를 83% 분해하였으며, *A. fumigatus* PBSA-2와 *A. fumigatus* PBSA-3은 PBSA를 각각 65% 및 75% 분해하는 것으로 나타나 이 균주들은 PBSA의 분해에 대하여 매우 높은 활성을 가지는 것으로 평가되었다.

참 고 문 헌

- Hayase N, H Yano, E Kudoh, C Tsutsumi, K Ushio, Y MiYahara, S Tanaka and K Nakagawa. 2004. Isolation and characterization of poly(butylene succinate-co-butylene adipate)-degrading microorganism. *J. Biosci. Bioeng.* 97:131-133.
- Kim MN, AR Lee, JS Yoon and IJ Chin. 2000. Biodegradation of poly(3-hydroxybutyrate), Sky-Green and Mater-Bi by fungi isolated from soils. *Euro. Polym. J.* 36:1677-1685.
- Kosuke T, N Tomohiro, K Yumi and M Naoko. 2004. Degradation of poly(L-lactic acid) by a newly isolated thermophile. *Polym. Degrad. Stab.* 84:433-438.
- Nakamura K, T Tomita, N Abe and Y Kamio. 2001. Purification and characterization of an extracellular poly(L-lactic acid) depolymerase from a soil isolation, *Amycolatopsis* sp. strain K104-1. *Appl. Environ. Microb.* 67:354-353.
- Nikolic MS, D Poleti and J Djonlagic. 2003. Synthesis and characterization of biodegradable poly(butylene succinate-co-butylene fumarate)s. *Polym. Degrad. Stab.* 74:263-270.
- Paul EA and FE Clark. 1996. *Soil microbiology and biochemistry* (2nd). Academic Press. 10-40.
- Pranamuda H, Y Tokiwa and H Tanaka. 1995. Microbial degradation of an aliphatic polyester with a high melting point poly(Tetramethylene Succinate). *Appl. Environ. Microb.* 1828-1832.
- Pranamuda H, Y Tokiwa and H Tanaka. 1997. Polylactide degradation by an *Amycolatopsis* sp. *Appl. Environ. Microb.* 63:1637-1640.
- Ray SS, J Bandyopadhyay and M Bousmina. 2007. Thermal and thermomechanical properties of poly[(butylene succinate)-co-adipate] nanocomposite. *Polym. Degrad. Stab.* 92:802-812.
- Saitou N and M Nei. 1987. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees. *Molecul. Biol. Evol.* 4: 406-425.
- Teeraphatpornchai T, TN Kambe, YS Akutsu, M Nakayama, N Nomura, T Nakahara and H Uchiama. 2003. Isolation and characterization of a bacterium that degrades various polyester-based biodegradable plastics. *Biotechnol. Lett.* 25:23-28.
- Tokiwa Y and A Jarerat. 2003. Microbial degradation of aliphatic polyesters. *Macromol. Sym.* 201:283-289.
- Tomita K, Y Kuroki, N Hayashi and Y Komukai. 2000. Isolation of a thermophile degrading poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *J. Biosci. Bioeng.* 90:350-352.
- Tserki V, P Matzinos, E Pavalidou and C Panayiotou. 2006a. Biodegradable aliphatic polyester. Part II. synthesis and characterization of chain extended poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polym. Degrad. Stab.* 91:377-384.
- Tserki V, P Matzinos, E Pavalidou, D Vachliotic and C Panayiotou. 2006b. Biodegradable aliphatic polyester. Part I. Properites and biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate). *Polym. Degrad. Stab.* 91:367-376.
- Uchida H, TN Kambe, YS Akutsu, N Nomura, Y Tokiwa and T Nakahara. 2000. Properties of a bacterium which degrades solid poly(tetramethylene succinate-co-adipate), a biodegradable plastic. *FEMS Microbiol. Lett.* 189:25-29.
- Zhao JH, XQ Wang, J Zeng, G Yang, FH Shin and Q Yan. 2005. Biodegradation of poly(butylene succinate-co-butylene adipate) by *Aspergillus versicolor*. *Polym. Degrad. Stab.* 90:173-179.

Manuscript Received: June 25, 2007
 Revision Accepted: July 19, 2007
 Responsible Editor: Seung Bum Kim