

전분 함유 폴리에틸렌 필름의 α -amylase에 의한 생분해도 측정

최수형, 강경남, 박태현
성균관대학교 유전공학과

Measurement for Determining the Biodegradation of Starch-Filled Polyethylene Film by α -Amylase

Su Hyung Choi, Kyeong Nam Kang and Tai Hyun Park
Dept. of Genetic Eng. Sung Kyun Kwan University

1. 서론

생분해성 천연 고분자인 전분을 혼합하여 만든 생분괴성 고분자 수지는 미생 물로부터 생산되는 생체합성 고분자나 유기합성에 의한 생분해성 고분자보다 제조방법이 간편하며 기존의 가공장치를 활용할 수 있다는 장점이 있다.

이러한 생분해도 측정방법에 대한 연구는 곰팡이의 생장 특성과 생장 후 필름의 물리적 상태를 살펴보는 방법(1)과 ASTM (American Society for Testing and Materials) 규정(2-6)을 중심으로 생분해도를 측정하는 방법들이 연구되어지고 있다. 그러나 대부분의 방법들이 많은 시간이 요구되고 과정도 복잡할 뿐 아니라 실험치의 재생성과 정량화에 불충분한 상태에 있다. 이에 대해 보다 짧은 시간내에 손쉽게 정확한 생분해도를 정량화하는 방법으로 특이한 효소를 사용하여 실험실 내에서 측정하는 방법이 개발되어지고 있다. 효소를 이용했을 때의 장점은 고농도의 효소를 사용하여 분해과정을 가속화시킬 수 있을 뿐 아니라 효소산물이 일반적으로 알려져 있음으로 인하여 미생물적 복잡한 대사과정이나 토양과 관련된 유기물질의 존재없이도 직접적으로 측정할 수 있다는 데 있다. 그러나 전분을 함유한 필름과 효소를 반응시킨 결과 전분의 분해량이 기대값에 미치지 못했고, 매우 느린 속도이거나 제한된 범위에서만 분해되었다.

본 실험에서는 α -amylase에 의한 전분의 낮은 분해도를 증가시킬 수 있는 반응조건을 고안해 념과 동시에, 위의 조건으로 전분 함량이 각각 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%인 필름과 α -amylase를 반응시켜 생분해도를 측정하고, 그 분해도 양상을 통해서 그들의 전분 함량과 분해도 사이의 관계를 보고자 하는데 목적이 있다.

2. 실험

전분의 효소반응

본 실험에선 방일산업에서 생산한 옥수수 전분과 *Bacillus subtilis*로 부터 추출한 α -amylase (Sigma)를 이용하였다. 먼저 0.1M 인산완충용액 (pH 6.7)을 만들고 전분과 효소를 각각 이 완충용액에 녹인다. 전분용액 (1mL)을 shaking water bath (80°C)에 15분간 담가두어 온도를 맞추어 준 후 효소용액 (1mL)을 가하여 정해진 시간동안 반응시킨다. 일정시간 후 시료를 취하여 DNS 2mL과 반응시켜 효소반응을 종결시키고 DNS방법으로 환원당을 측정하였다. (적정 pH, 적정온도 결정실험은 위의 방법으로 하되 pH와 반응온도만을 변화시켜 실험하였다.)

α -amylase와 glucoamylase로 반응시킨 후 전분이 glucose로 변환 양 측정

전분 효소 반응 후 DNS 시약을 첨가하지 않고 온도를 80°C에서 55°C로, pH를 6.7에서 4.5로 낮추고 glucoamylase (0.5mL)와 반응시켜 전분을 모두 glucose로 분해한 후 glucose의 양을 glucose kit (Sigma)로 측정한다.

필름과 효소반응

본 실험에선 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%전분을 포함한 필름과 α -amylase (Sigma)를 사용하였다. 먼저 필름을 0.5cm x 0.5cm의 크기로 잘게 절단하여 시험관에 10mg씩 넣은 후 인산완충용액 (pH 6.7) 1mL을 채운다. 필름이 완충용액에 충분히 적시도록 한 후 80°C shaking water bath 에 담가두어 온도를 맞춘다. 여기에 효소용액 1mL 을 첨가하여 10분 동안 반응시키고 여기에 DNS시약 2mL을 넣어 반응을 종결시킨다. 이 시료를 DNS 방법으로 환원당을 측정한다.

3. 결과 및 토론

전분의 효소반응

α -amylase 효소반응의 표준조건에서는 전분이 충분히 용해되지 않아 낮은 분해도를 보인다. 따라서 고분자 필름과 α -amylase를 반응시키기 전에 분해도를 최대화하기 위한 반응조건을 알아보았다.

전분과 효소반응은 1분안에 반응이 진행되었다. 이는 α -amylase의 반응은 rapid 반응과 slow 반응으로 나누어지는데, 처음 rapid반응동안 maltotriose나

dextrin으로 분해되어 지고, 이는 다시 glucose와 maltose로 분해되는데 후자반응은 매우 느린 속도로 일어나기 때문이다.(8)

0.5mg/mL의 전분일 경우, pH 6.7, 온도 80°C 조건하에서 효소양 30~50 unit정도에서 충분한 양이 되었으며, 그 이상의 효소양의 증가로 인한 분해된 전분 증가는 없었다.

기질과 효소의 양을 일정한 비 (1:100)로 유지하고 그 양을 증가시켜가며 실험해 본 결과 비례적으로 증가하므로 전분 (mg/mL) : α -amylase (unit/mL)의 비가 1:100 이면 그 기질이 효소에 포화된다고 말할 수 있다. 전분은 낮은 온도에서 물에 잘 녹지 않아 반응이 잘 일어나지 않고, 너무 높은 온도에서는 효소의 변성이 염려되므로 적당한 온도를 알아보았다. 그 실험 결과 80°C에서 반응시키는 것이 가장 적당한 것으로 나타났다. 최적반응 pH인 6.7(8)에 대한 민감도를 측정해보았으며 pH 6~7에선 별다른 변화가 없었다.

위의 조건들로 행한 전분 효소반응에서 평균 maltose로 분해된다고 가정시 기대되는 환원당보다 적은 값을 나타내었다. 본 실험에서는 전분과 α -amylase의 두단계 반응 중 주로 rapid반응만이 진행되어서 그 반응산물인 maltotriose나 dextrin이 slow 반응산물인 glucose나 maltose보다 많은 양을 차지하고 있기 때문으로 여겨진다.(8) 그러나 이들 반응산물을 다시 glucoamylase와 반응시켜 최종적으로 만들어지는 glucose의 양을 측정하면 원래의 전분양에 근접함을 알 수 있고 glucoamylase없이 α -amylase만으로도 전분의 양을 측정할 수 있었다.

필름과 α -amylase와의 반응

필름도 전분과 비슷한 양상으로 반응시간 5분안에 반응이 완결되었다. 위의 조건에서 전분함량이 각각 5%, 7.5%, 10%, 15%, 20%인 필름을 α -amylase와 반응시켜 분해도를 측정하였다. 필름에 함유된 전분의 모든 양이 분해되지 않고 약 53.6%만 분해되었고, 그 결과는 <표1>에 요약되어 있다. 이는 효소가 저농도의 전분함유 필름일 경우, α -amylase가 필름내부에 박힌 전분은 공격하지 못하고 표면에 박힌 전분만을 공격할 수 있기 때문으로 여겨진다.(9) 이 분해도 값은 계면활성제로 분해도를 높인 실험값(7)보다 높은 측정값을 보였다.

각 필름의 분해도 측정결과 필름의 전분함유량이 증가할수록 분해되어 나오는 환원당의 양도 선형적으로 증가하므로 필름 내에 함유된 미지의 전분양을 정량화하는데 있어서 표준자료의 역할을 할 것으로 기대된다.

반응 후에 필름 속에 잔존하는 46.4%의 전분은 FTIR(9)을 이용하여 확인할 수 있을 것으로 여겨지며 이를 확인하는 방법들이 계속 연구되어질 계획이다.

<표1> 반응시키는 필름의 양이 10mg/2mL이 되도록 농도별로 취하여 α-amylase와 반응시킨 후 DNS 방법으로 A₅₇₅값을 측정하고, standard curve와 비교하여 전분함량을 결정하였다.

Film의 종류	starch기대치(mg/2mL)	실제관측치(mg/2mL)	분해되어나온양(%)
5%starch 함유	0.5	0.3	60%
7.5%starch함유	0.75	0.434	58%
10%starch함유	1.0	0.48	48%
15%starch함유	1.5	0.75	50%
20%starch함유	2.0	1.04	52%
			평균 53.6%

4. 참고문헌

- 1.김재현, 박태현, 신동명, 이성호, 한귀영(1994), 한국생물공학회지, 9, pp.412-417
- 2.ASTM(1991),ASTM Standard Test Method D5209-91
- 3.ASTM(1991),ASTM Standard Test Method D5210-91
- 4.ASTM(1992),ASTM Standard Test Method D5247-92
- 5.ASTM(1992),ASTM Standard Test Method D5271-92
- 6.ASTM(1992),ASTM Standard Test Method D5338-92
- 7.P.Allenza, J.schollmeyer and R.P.Rohrnach(1990),
Corn Utilization Conference III Proceeding, pp.1-4
- 8.T.M.Aminabhavi, R.H.Balundgi,and P.E.Cassidy(1990),
Polym.-Plast.Technol.Eng.,29,235.
- 9.S.M.GOHEEN and R.P.WOOL(1990)
Department of materials science and engineering university