

바이오에탄올 생산을 위한 바이오매스 자원으로서는 버섯골목의 이용 가능성 평가

이재원¹⁾, 구본욱¹⁾, 최준원²⁾, 최돈하²⁾, 최인규^{*1)}

Evaluation on the utilization possibility of waste mushroom logs as biomass resource for bioethanol production

Jae-Won Lee, Bon-Wook Koo, Joon-Weon Choi, Don-Ha Choi, In-Gyu Choi

Key words : Waste mushroom logs(버섯골목), Biomass(바이오매스), Crystallinity value(결정화도), Lignin(리그닌), Hydrolysis(가수분해), Alternative energy(대체에너지)

Abstract : In order to investigate the possibility of waste mushroom logs as biomass resource, chemical and physical characteristics of normal woods and waste mushroom logs such as crystallinity value, energy consumption, total sugar yield after hydrolysis, chemical compounds and molecular weight distribution after acid hydrolysis were examined.

In the results, crystallinity of waste mushroom logs which were three year passed after the inoculation was decreased drastically from 49% to 33% during the cultivation. Lignin contents as chemical compounds of normal woods and waste mushroom logs were 21.07% and 18.78%, respectively. By the results of measurement of energy consumption, the size reduction of normal woods required a significantly higher energy than that of waste mushroom logs. In the hydrolysis, total sugar yield by enzyme and acid hydrolysis were high in waste mushroom logs(53%, 57.5%) than in normal woods(42.9%, 47.17%). According to the molecular weight distribution using GPC, low molecular weight compounds were distributed in waste mushroom logs.

Based on these results, waste mushroom logs have enough potential as material for developing alternative energy because of easily conversion to sugar by various hydrolysis methods and requirement of low energy consumption during size reduction.

1. 서론

미국, 일본 등을 비롯한 선진국에서는 미래 에너지자원으로서의 대체에너지에 대한 연구개발과 보급정책 등이 추진되고 있지만 우리나라에서는 아직 그 수준이 미흡한 실정이다. 최근 대체에너지의 새로운 자원으로서는 친환경 소재인 바이오매스에 대한 관심이 높아지고 있으며, 특히 목질 바이오매스는 에너지원으로 유용하게 이용될 수 있는 풍부한 셀룰로오스를 함유하고 있어 새로운 대체에너지 개발에 주목 받고 있는 자원이다^(1,2). 표고버섯 재배로부터 발생하는 신갈나무 버섯골목은 대부분이 자연 상태에서 폐기 또는 불용처리 되고 있어 이를 유용한 자원으로 재활용이 필요한 실정이다. 버섯골목은 버섯의 자실체 형성시 발생하는 각종 효소에 의해 셀룰로오스의 결정화도 감소가 예상된다. 뿐만 아니라 *Lentinus*

*edodes*로부터 분비되는 리그닌 분해효소에 의해 리그닌 분해가 상당부분 진행된 상태로 존재하기 때문에 리그닌으로부터 분리된 셀룰로오스로부터 글루코오스 생성에 있어서 최적 조건을 가지고 있을 것이라 생각된다. 따라서 버섯 버섯골목은 바이오 에탄올 생산을 위한 전처리 및 당화에 유리한 조건을 가지고 있는 목질 바이오매스 자원으로의 평가가 필요하다. 표고버섯 재배 종균인 *L. edodes*는 백색부후균이며 lignocellulosic

* 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부

E-mail : cingyu@snu.ac.kr

Tel : (02)880-4785 Fax : (02)873-2318

1) 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부

E-mail : lejaewon@yahoo.co.kr

Tel : (02)880-4795 Fax : (02)873-2318

2) 국립산림과학원 화학미생물과

E-mail : cdonha@foa.go.kr

Tel : (02)961-2741 Fax : (02)961-2769

biomass에 대해 다양한 효소를 분비한다⁽³⁾. *L. edodes*가 분비하는 균체 외 효소로는 리그닌 분해효소로 laccase⁽⁴⁾, manganese peroxidase⁽⁵⁾, 셀룰로오스 분해효소로 exo-β-1,3-glucanase, β-glucosidase, cellobiohydrolase, endoglucanase, 헤미셀룰로오스 분해효소로 xylanase등이 있다. 이러한 다양한 효소에 의해 목재구성 성분이 분해되어 바이오매스 변환을 위한 물리적, 화학적, 생물학적 처리가 용이한 조건을 제공할 수 있을 것이라 기대된다. 따라서 본 연구에서는 표고버섯 재배에 이용되는 신갈나무 정상재와 표고버섯 재배 후 발생하는 버섯골목의 물리, 화학성 특성으로 결정화도, 조성분석, 다양한 방법에 의한 가수분해, 가수분해 후 분자량 분포를 비교 분석함으로써 버섯골목의 바이오매스 자원으로서의 가능성을 확인하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 공시재료

경기도 화성시 소재 버섯농장으로부터 표고버섯 골목으로 사용되는 신갈나무(*Quercus mongolica*) 정상재와 실제 버섯재배에 사용된 골목을 사용연수별(1-5년)로 채광받아 이를 40mesh로 분쇄하여 사용하였다.

2.2 에너지 소모율 측정

국립산림과학원에 보유하고 있는 목질 칩 제조기(칩 크기: 1×1×0.2cm)를 이용하여 정상재와 버섯골목 분쇄 시 소모되는 에너지 소모율(kWh)을 측정하였다.

2.3 화학적 조성성분 분석

정상재와 사용연수 3년 된 버섯골목에 대해 holocellulose, insoluble lignin, acid soluble lignin의 목재 구성성분 변화를 조사하였다. TAPPI Test Method에 의해 함수율(T 207 om-88), 유기용매추출(T 204 om-88), Klason lignin(T 222 om-88)을 측정하였으며 셀룰로오스는 TAPPI Useful Method 249에 따라 Wise 방법으로 측정하여 정량 분석하였다.

2.4 니트로벤젠 산화법

탈지시료 약 30mg과 2M NaOH 4ml와 nitrobenzene 250μl를 넣고 170℃에서 2시간 반응시켰다. 반응 후 내부 표준물질로 3,5-dimethoxy phenol 1.0mg을 첨가한 후 dichloromethane 20ml로 3회 추출한 후 수용성 층을 분획하여 4M HCl로 pH 1-2로 조정한 후 다시 dichloromethane 20ml로 3회 추출하였다. 이 폐놀성 리그닌 생성물은 피리딘 50μl과 N,O bis(trimethylsilyl) trifluoroacetamide (BSTFA) 50μl로 유도체화하여 DB-5 capillary column(60m×0.25mm, 0.25 μm)이 장착된 Gas chromatography (HP 6890 series)를 이용하여 분석하였다. 정량분석을 위해 Sigma사에서 구입한 p-hydroxyl-benzaldehyde, p-hydroxybenzoic acid, vanillin, vanillic acid, syringaldehyde, syringic acid와 내부표준 물질로 각 성분의 RF(response factor)를 계산하

였다.

2.5 결정화도 측정

종균인 *L. edodes* M290 배양에 따른 결정화도 변화를 확인하기 위하여 정상재와 사용연수별 골목을 60mesh로 분쇄하여 서울대학교 기초과학교육 공동기기원에서 보유하고 있는 HR-XRD(High Resolution X-ray Diffractometry, Bruker D8 DISCOVER, Germany)를 이용하여 각 시료의 강도 곡선을 얻었다. 결정화도 측정을 위한 기기 조건은 반사법으로써 40 kV, 40 mA, scanning speed = 0.75°/min을 적용하였다.

2.6 가수분해

2.6.1 산가수분해

500ml 삼각플라스크에 정상재와 버섯골목 목분을 각각 0.5g씩 첨가하고 72% H₂SO₄ 5ml를 첨가하여 1시간 상온에서 방치하였다. H₂SO₄의 농도가 3%가 되도록 증류수를 첨가하여 희석한 후 121℃에서 60분 반응시킨 후 1G4 glass filter로 여과하였다. 여과액에 대한 당수율을 Dionex사의 HPAEC (BioLC)로 측정하였다.

2.6.2 효소가수분해

효소는 *T. reesei*의 배양액을 농축한 산업용 효소 Celluclast 1.5L(Novo Co., Denmark)와 β-glucosidase를 강화한 Novozym 188(Novo Co., Denmark)을 사용하였다. 효소가수분해는 250ml 삼각플라스크에 50mM sodium acetate buffer(pH 5.0) 50ml를 첨가하고 정상재와 버섯골목 목분을 각각 1g씩 첨가하였다. Celluclast 1.5L 74 EGU/ml, Novozym 188 250 CBU/ml를 첨가한 후 50℃에서 150rpm으로 48시간 반응시켰다. 반응액 2ml를 원심분리하여 상등액만 취한 후 HPAEC(BioLC)를 이용하여 arabinose, galactose, glucose, xylose, mannose의 5종류의 단당류 수율을 측정하였고 이들의 합을 total sugar amount로 하였다.

2.7 GPC를 이용한 분자량 분포 측정

산가수분해 후 수용성 부분의 분자량 분포는 PolymerLab Aquagel-OH30×2컬럼이 장착된 Waters 1515기종의 Gel Permeation Chromatography를 이용하여 측정하였다. 용출용매로는 water(pH3)를 사용하였고, 시료 주입량은 100μl이며, 표준시료로는 Polyethylene glycol을 사용하였다. Waters 2410 Differential Diffractometer 검출기로 35℃에서 분자량 분포를 측정하였다. 데이터는 millennium 3.05.01을 사용하여 분석하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 에너지 소모율 비교

정상재와 버섯골목을 칩 크기 1×1×0.2cm로 분쇄하는데 소모되는 에너지양을 비교한 결과 Table 1과 같다. 정상재에서는 145kWh/ton, 버섯골목에서는 70kWh/ton으로 정상재보다 버섯골목 분쇄시에 정상재의 1/2에 해당하는 적은양의 에너지가 소모되었다.

3.2 화학적 조성성분 분석

정상재와 버섯골목의 셀룰로오스 함량은 각각

Table 1 Energy consumption during size reduction with chipper

Materials	Final size(cm)	Energy consumption (kWh/ton)
Normal woods	1×1×0.2	145
Waste mushroom logs	1×1×0.2	70

75.39%, 70.13%였으며 리그닌함량은 각각 21.07%, 18.78%였다(Table 2). 정상재의 셀룰로오스와 리그닌 함량을 기준으로 셀룰로오스 함량은 상대적으로 증가하였고 리그닌의 함량은 감소하였다. 뿐만 아니라 산 가용성 리그닌 함량이 정상재보다 버섯골목에서 많은 것으로 보아 버섯골목은 리그닌이 분해된 상태로 존재하여 정상재와 다른 구조의 리그닌 또는 분해되기 쉬운 구조의 리그닌을 함유하고 있기 때문에 이러한 결과를 유도한 것으로 생각된다. 이것은 *L. edodes* M290으로부터 분비되는 리그닌 분해효소인 laccase, manganese peroxidase에 의해 리그닌이 분해된다는 기존의 보고와 일치하였다. 버섯재배기간 동안 중균인 *L. edodes* M290에 의해 리그닌이 어느 정도 분해되었다는 것으로 판단된다. 따라서 버섯골목은 평균에 의해 리그닌이 어느 정도 분해된 상태이므로 리그닌을 제거하기 위한 전처리 단계를 완화 또는 생략할 수 있는 장점을 가진 것으로 판단된다.

따라서 전처리 없이 또는 완화된 전처리 방법으로 당화를 수행할 수 있어 대체에너지로서 바이오에탄올 생산을 위해 버섯골목은 적절한 바이오매스가 될 것이라 사료된다.

2.3.1 니트로벤젠 산화법

니트로벤젠 산화법은 리그닌 주요 결합양식인 β-O-4 결합을 분해하여 6종류의 페놀 단량체들을 생성한다. 이러한 단량체의 정량적인 결과로 리그닌 내의 β-O-4 결합 빈도와 리그닌의 H/G/S 조성 비율을 계산할 수 있다. 따라서 정상재와 중균인 *L. edodes* M290에 의한 버섯골목의 리그닌 화학적 성분 변화를 살펴본 결과는 Table 3과 같다. 정상재(38.12mg/g)와 비교하여 버섯골목(35.82mg/g)의 NBO (nitrobenzene oxidation) 생성물 수율은 감소하였다. S-타입 유도체(S+SA)와 G-타입 유도체(V+VA)의 생성량은 정상재와 버섯골목에서 모두 증가하였다.

Table 2 Determination of lignin and holocellulose contents in normal woods and waste mushroom wood logs

Cultivation time (yr)	Insoluble lignin	Soluble lignin	Holo-cellulose
0	0.7	21.81	75.19
3	1.6	18.1	67.5

리그닌의 S/G 비율에서 정상재는 3.50, 버섯골

목에서는 1.79로 정상재보다 적은 값을 나타냈다. S/G 비율을 분석한 결과 중균인 *L. edodes* M290은 Guaiacyl(G)-리그닌보다 Syringyl(S)-리그닌을 선택적으로 분해하는 것으로 나타났다. 따라서 S-리그닌의 대부분을 차지하고 있는 활엽수에서 S-리그닌이 선택적으로 분해된 결과 버섯골목은 *L. edodes* M290에 의해 상당량의 리그닌이 분해되어 있음을 확인 할 수 있다.

Table 3 Yield of nitrobenzene oxidation products from lignin

Cultivation time (yr)	Nitrobenzene oxidation(mg/g)			
	Guaiacyl type		Syringyl type	
	VN	VA	SD	SA
0	8.20	0.50	19.86	10.57
3	30.09	0.56	49.60	5.27

Cultivation time (yr)	Total (mg/g)	S/G
0	39.12	3.50
3	85.82	1.79

* VN: vanillin, VA: vanillic acid
 ** SD: syringaldehyde, SA: syringic acid
 *** S/G: (SD+SA)/(VN+VA)

3.3 결정화도

정상재와 표고재배로 사용된 골목의 결정화도를 HR-XRD로 비교한 결과 *L. edodes* M290을 접종한 후 1년 동안 결정화도가 큰 폭으로 감소하였고 그 후 버섯 재배기간 동안에는 큰 변화가 없음을 회절강도 곡선을 통해 확인하였다(Fig. 1). 회절강도 곡선으로 부터 얻은 값을 segal법을 이용하여 결정화도 변화를 살펴본 결과 정상재의 결정화도는 약 49%로 나타났고 균 접종 후 1년이 지난 골목은 31%로 나타났으며 사용연수의 증가에 따라 결정화도는 27~33%의 값을 보였다. 부후초기에 나타난 급격한 결정화도 감소는 *L. edodes* M290가 셀룰로오스의 결정성 영역을 공격하는 cellobiohydrolase와 결정화도가 낮은 부분과 비결정영역을 공격하는 endoglucanase를 동시에 분비하여 결정화도의 감소에 상승효과를 나타낸 것으로 판단된다.

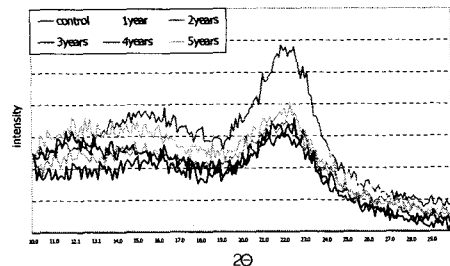


Fig. 1. Crystallinity of waste mushroom logs determined by HR-XRD on various cultivation periods.

3.4 가수분해

정상재와 버섯골목을 산가수분해와 효소가수분해 한 후 당 수율을 측정한 결과는 Table 4와 같다. 산가수분해와 효소가수분해에서 정상재에서 보다 버섯골목에서 높은 당 수율을 나타냈다.

이러한 결과는 버섯골목이 정상재보다 쉽게 당으로 전환할 수 있는 조건을 가지고 있음을 나타낸 것이며 종균인 *L. edodes* M290에 의해 분비되는 효소가 당화 저해를 일으키는 리그닌과 헤미셀룰로오스의 상당량을 분해시켰기 때문이라고 판단된다.

3.5 분자량 분포 분석

정상재와 버섯골목의 산가수분해 후 수용성 부분에서의 평균분자량과 다분산도(polydispersity)를 분석한 결과 정상재에서 중량평균분자량은 1389g/mol이고 버섯골목의 중량평균분자량은 1255g/mol였다(Fig. 2). 중량평균분자량은 큰 차이를 보이지 않았다.

Table 4 Total sugar yield of lignocellulosic biomass by Bio-LC analysis after acid and enzyme hydrolysis

	Total sugar yield(%)	
	Acid hydrolysis	Enzymatic hydrolysis
Normal woods	41.17	42.9
Waste mushroom logs	57.56	53.0

따라서 버섯골목에서 중량평균분자량이 약간 낮은 것으로 보아 산가수분해에 의한 분해산물의 분자량이 낮아서 정상재에서 보다 많은 가수분해가 이루어져 있음을 확인할 수 있다.

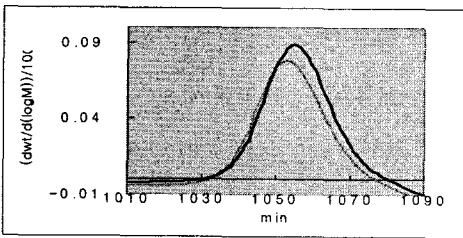


Fig. 2. Gel permeation chromatogram of normal woods and waste mushroom logs(blue line: waste mushroom logs, pink line: normal woods).

4. 결론

버섯재배 후 발생하는 버섯골목을 대체에너지 개발을 위한 새로운 바이오매스 자원으로서의 가능성을 구명하기 위해 바이오매스 분쇄 시 소모되는 에너지 소모율, 사용연수에 따른 결정화도, 목재의 화학 조성 변화, 다양한 가수분해에 의한 당 수율, 산가수분해 후 분자량분포 분석을 실시하였

다.

물리적인 특성인 결정화도는 골목의 사용 연수가 증가함에 따라 감소함을 나타냈고 목재 분쇄 시 발생하는 에너지소모율 또한 정상재에서 보다 3년 사용한 버섯골목에서 적은 에너지 소모율을 나타냈다.

화학적 특성을 비교한 결과 당화에 저해를 주는 물질인 리그닌 함량은 정상재에서 보다 버섯골목에서 낮았으며 리그닌 성분변화를 살펴본 결과 종균인 *L. edodes* M290에 의해 환엽수 주요 리그닌인 S-리그닌이 분해되어 있음을 확인할 수 있었다.

또한 효소가수분해와 산가수분해를 이용하여 당 수율을 측정한 결과 버섯골목이 정상재에서 보다 높은 당 수율을 나타냈다. 산가수분해 후 수용성 부분에 대한 분자량 분포 또한 버섯골목에서 낮은 분자량의 분해산물이 분포해 있음을 확인할 수 있었다.

이러한 결과로 버섯골목은 정상재보다 리그닌 함량이 적고, 셀룰로오스 결정성 영역의 결정화도 감소로 다양한 가수분해에 의해 분해되기 쉬운 상태이므로 전처리 방법을 단축시키거나 완화된 조건으로 더 나아가서는 전처리 과정 없이 다양한 방법에 의한 직접 당화가 가능할 것이라 생각된다. 따라서 버섯골목은 친환경 대체에너지 자원으로서의 가능성이 높은 바이오매스의 사용이 가능할 것이다.

후 기

본 연구는 BK21(임산공학 연구인력 양성사업 팀), 국립산림과학원, 산업자원부 에너지관리공단의 연구비 지원의 일환으로 수행되었습니다.

References

- Cheung SW, Anderson BC. Laboratory investigation of ethanol production from municipal primary wastewater solids. *Bioresource Technology*. 1997;59:81-96
- Lee WY, Park SD, Yeo SD. Hydrolysis of cellulose under subcritical and supercritical water using continuous flow system. *Hwahak Konghak*. 2001;39(2): 257-263
- Hong SW, Shin KS, Yoon Y, Lee WK. Extracellular wood-degradative enzymes from *Lentinus edodes* JA01. *Kor. J. Mycol*. 1986;14(3):189-194.
- Makkar RS, Tsuneda A, Tokuyasu K, Mori Y. *Lentinula edodes* produces a multicomponent protein complex containing manganese (II)-dependent peroxidase, laccase and β -glucosidase. *FEMS Lett*. 2001;200:175-179.
- Buswell JA, Cai Y, Chang S. Effect of nutrient nitrogen and manganese on manganese peroxidase and laccase production by *Lentinula (Lentinus) edodes*. *FEMS Lett*. 1995;128:81-88.