

# 알칼리 처리에 따른 폐골목 및 굴참나무의 효소당화 특성 비교

윤수영 · 성현아<sup>1†</sup> · 신수정<sup>†</sup>

접수일(2014년 6월 4일), 수정일(2014년 6월 12일), 채택일(2014년 6월 14일)

## Comparison of enzymatic hydrolysis characteristics of mushroom cultured waste (MCW) and Cork oak by alkali treatment

Su-Young Yoon, Hyun-A Seung<sup>1†</sup> and Soo-Jeong Shin<sup>†</sup>

Received June 4, 2014; Received in revised form June 12, 2014; Accepted June 14, 2014

### ABSTRACT

The mushroom cultured waste(MCW) from cork oak was evaluated as the raw material for bioethanol production. For enzymatic hydrolysis, cellulase cocktails (Celluclast 1.5L and Novozym 188) was used for polysaccharides to monosaccharides conversion. Compared with sound cork oak woodmeal, woodmeal from MCW showed higher cellulose to glucose conversion. To improve polysaccharides to monosaccharides conversion, pretreatment by sodium hydroxide was applied. Even though more xylan and lignin were removed in woodmeal of MCW than that of cork oak, concentration of glucose was higher from sodium hydroxide treated cork oak woodmeal (51.3 g/L) than treated MCW woodmeal (41.6 g/L).

**Keywords** : Sodium hydroxide, pretreatment, enzymatic hydrolysis, mushroom cultured waste, Cork oak

### 1. 서론

폐골목은 식용 버섯을 생산하는 과정에서 버섯 생산량의 저하로 인하여 골목이 폐기될 때 발생한다. 발생된 폐골목은 2011년도 기준으로 화목(36.8%), 유기질

비료(23.6%), 축사용 깔개(7.1%) 등으로 사용되었다. 그러나 26%에 달하는 폐골목은 특별한 용도가 없이 방치되고 있으며 효과적인 목질 바이오매스 자원의 활용을 위하여 폐골목의 용도 개발이 필요하다.<sup>1)</sup> 골목과 같은 사물의 영양원을 흡수하여 자라나는 버

• 충북대학교 목재종이과학과 (Department of Wood and Paper Science, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea)

<sup>1</sup> 충북대학교 생화학과 (Department of Biochemistry, Chungbuk National University, Chungbuk 361-763, Korea)

† 교신 저자 (corresponding author) E-mail : soojshin@cbnu.ac.kr, haseung@cbnu.ac.kr

첫 균주에는 백색부후균이나 갈색부후균이 있다. 갈색부후균은 골목 내에 주로 셀룰로오스를 분해하여 재가 갈색을 띠기에 갈색부후균이라 분류된다. 백색부후균은 리그닌을 분해할 수 있는 페록시다아제와 라카아제 및 셀룰로오스를 분해할 수 있는 셀룰라아제를 분비하여 재내 성분을 분해한다.<sup>2-4)</sup> 리그닌이 상당 부분 분해되어 재가 백색을 띠며 형성된 자실체는 주로 식용 및 약용으로 이용된다. 식용 버섯 중 하나인 표고버섯은 주로 참나무류 골목에 백색부후균인 *Lentinus edodes*를 접종하여 생산하고 있다. 일정 기간 후 버려지는 참나무류 폐골목은 백색부후균인 *L. edodes*에 의해 본래 목재구성 성분이 분해되어 있을 것으로 판단된다.<sup>5)</sup>

효소당화 기반 공정에서 목질계 바이오매스를 바이오 에탄올로 전환하기 위해서는 전처리, 효소당화, 발효 등의 공정을 거쳐야 한다. 전처리는 목질계 바이오매스를 효소 당화에 보다 유리한 구조로 전환시켜주는 공정으로서 다양한 방법을 통해서 목재 내 셀룰로오스에 대한 셀룰라아제의 접근성을 향상시킨다.<sup>6)</sup> 폐골목은 버섯재배과정에서 버섯균주의 다양한 효소에 의해서 목재 내 일부 셀룰로오스 및 리그닌의 분해가 이루어져 있는 재료로 균주에 의한 생물학적 전처리가 자연적으로 유도된 재료이다.<sup>5)</sup> 이런 원료는 바이오 에탄올 기반의 에너지 생산을 위한 원재료로써 적합하다. 생물학적 전처리에 의하여 효소 당화율이 증가하지만 산업적으로 적용 가능한 정도까지 도달하지는 못하기 때문에 추가적인 전처리 도입이 필요하다.<sup>7)</sup>

화학적 처리에 의하여 목질계 바이오매스의 복잡한 3차원 구조를 파괴시키면 다당류를 분해할 수 있는 효소들이 효과적으로 접근할 수 있고 이로 인하여 효소에 의해 다당류를 단당류로 전환시킬 수 있다. 이런 전처리 공정은 헤미셀룰로오스를 제거하는 공정,<sup>8)</sup> 리그닌을 제거하는 공정,<sup>9)</sup> 셀룰로오스의 결정구조<sup>10-11)</sup>를 파괴시키는 공정으로 크게 구분된다.

일반적인 염기처리는 리그닌을 가수분해하여 저분자량의 수용성 물질로 전환시킬 수 있으며 이런 특성을 알칼리 화학 펄프 제조 공정에 적용되고 있다. 알칼리 반응조건에서는 리그닌의 가수분해 반응뿐만 아니라 다당류의 필링반응(peeling reaction)이나 임의절단반응도 일어난다.<sup>12)</sup> 필링 반응이 일어나지 않는 온도에서는 염기의 농도에 따라 헤미셀룰로오스 성분의 용출이 가능하며 필링반응이 일어나는 100℃ 이상에서

는 다당류가 단당류가 아닌 유기산으로 전환된다. 이러한 유기산의 생성된 만큼 당 손실이 발생하는 단점이 있다.

하지만 저온 강 염기 방법은 필링 반응이 일어나지 않는 온도에서 일부 리그닌 및 탄수화물을 용출시키는 반응으로써 유기산 생성에 의한 당 손실이 적고 분해되지 않은 자이란 등의 물질을 활용할 수 있다. 따라서 본 실험에서는 폐골목과 굴참나무에 저온 강 알칼리 처리를 실시하였으며 알칼리 처리가 효소 당화에 어떠한 영향을 끼치는지 알아보았다. 또한 폐골목 자체의 버섯균주에 의한 생물학적 처리에 의한 효소 당화 특성도 분석하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시재료

정상재 굴참나무를 가지고 표고버섯 재배한 후 버려지는 폐골목을 수거하여 기건 시킨 후 분쇄기(IKA사의 MF10B)를 이용하여 입자 크기 2.0 mm 이하로 분쇄 후 사용하였다. 충북 제천시 한수면 송계리의 충북대학교 학술림에서 굴참나무를 벌목하여 비교 재료로 목분을 제조하였다. 가성소다는 93% 순도의 제품(Showa, Japan)을 사용하였다. 효소로는 Celluclast 1.5L과 Novozym 188 (Novozyme, Denmark)을 사용하였다.

### 2.2 실험방법

#### 2.2.1 알칼리 처리

전건 기준 폐골목 및 굴참 목분을 수산화나트륨 용액(18%, w/v)를 1:6(w/v)의 비율로 혼합한 후 90℃, 4시간 동안 처리를 실시하였다. 반응이 끝난 후 글라스 필터로 여과 후 약 pH 7.0에 이를 때 까지 증류수를 이용하여 세척하여 건조하여 보관하였다.

#### 2.2.2 효소당화

삼각플라스크 (250 mL)에 목분 12.0 g (전건기준)과 버퍼용액 138.0 mL (50 mM, pH 4.8)을 넣고 진탕배양기에서 50℃, 150 rpm 조건으로 효소당화를 실시하였다. 효소는 Celluclast 1.5L을 기질 1.0g 당 30 FPU를 사용하였고 Novozym 188을 Celluclast 첨가량의 1/3 수준으로 사용하였다. 효소당화 과정 중 2, 4, 6, 8, 12,

24, 48 시간에서 2.0 mL의 샘플을 채취해서 냉장보관 후 40 µm의 친수성 syringe filter로 여과 후 당화액을 분석하였다.

### 2.2.3 분석

#### 2.2.3.1 화학조성 분석

목재의 화학적 조성 분석을 위하여 아세톤 추출물 함량 측정(TAPPI 280 pm-99), 끓는 물 추출물 함량 측정(TAPPI 207 om-93), 산 불용성 및 가용성 리그닌 분석(TAPPI 222 om-88 and TAPPI Useful Method UM 250)을 실시하였다.

#### 2.2.3.2 당 조성 분석 (1H-NMR)

폐골목과 굴참나무 목분의 당조성과 알칼리 처리 전 & 후의 다당류 성분의 변화를 확인하기 위하여 <sup>1</sup>H-NMR 분석을 하였다. 황산 72%를 이용해 30°C, 1시간 동안 1차 가수분해 후 중수(D2O)를 넣어 희석한 뒤 100°C, 1시간 동안 2차 가수분해 실시하였다. 반응이 끝난 후 여과액을 모아Bruker AVACE NMR spectrometer (500MHz) 기기를 이용하여 분석하였다. NMR 스펙트럼 상에서 아노머성 수소 피크를 적분하여 탄수화물을 정량 분석하였다.

#### 2.2.3.3 효소당화 분석 (HPLC)

효소당화 후 전환된 단당류의 농도 측정을 위하여 HPLC (high performance liquid chromatograph) (Shimadzu, Japan)를 이용하여 채취된 샘플의 당 농도 및 당화율을 분석하였다. 컬럼과 굴절률 검출기로 각각 Aminex HPX-87H (300 mm x 7.8 mm, Bio-Rad)와 RID-10A(Shimadzu, Japan)을 사용하였다. 이동상으로는 50 mM 황산을 사용하였으며 온도 60°C, 유속 0.6 mL/min 조건으로 분석하였다.

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 화학 조성 분석

폐골목과 굴참의 화학조성 분석에서는 폐골목은 버섯 재배이전의 굴참나무와 비교하여 끓는물 추출물 함량은 높았지만 리그닌, 다당류 함량은 낮았다(Table 1). 끓는물 추출물 함량의 경우, 폐골목(6.8%)이 굴참

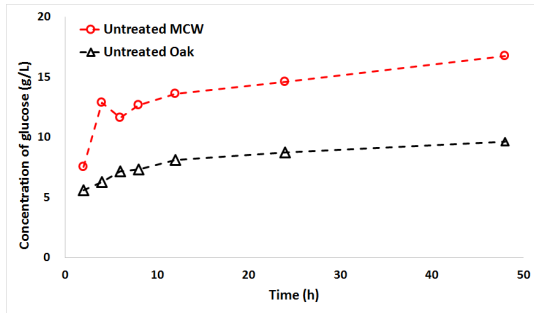
**Table 1. The chemical composition of mushroom cultured waste and cork oak**

Substance	Content (%)	
	Cork oak	Mushroom cultured waste
Acetone extractives	0.6	0.7
Hot-water extractives	1.3	6.8
Lignin		
Acid insoluble	20.4	17.4
Acid soluble	2.7	2.8
Polysaccharides		
Glucan	52.7	50.3
Xylan	16.0	17.2
Galactan	3.7	2.3
Mannan	1.5	1.6
Arabinan	1.2	0.9

(1.3%)보다 높았으며 이것은 백색부후균에 의해 목재 일부 성분이 분해되어 친수성 추출물의 함량이 높았기 때문이다. 목재 주성분의 효소에 의한 분해로 끓는물 추출물 함량이 높아진 반면 주성분(리그닌과 다당류)의 상대적 함량은 감소하였다. 굴참나무 목분의 리그닌의 함량은 23.1%인데 비하여 폐골목의 리그닌 함량은 20.2%로 감소하였고 이런 경향은 다당류에서도 유사한 경향을 보였다. 굴참나무 목분의 다당류의 함량은 75.1%였지만 폐골목 목분은 72.3%로 감소하였다. 백색부후균은 라카아제, 페록시다아제와 같은 리그닌 분해효소와 다당류를 분해 할 수 있는 다당류 분해 복합효소를 가지고 있어 탄수화물과 리그닌의 분해 속도가 유사하였다.

### 3.2 알칼리 처리하지 않은 폐골목 및 굴참의 효소당화비교

알칼리 처리 전 폐골목과 굴참나무 목분의 효소당화 특성을 비교하였다. 효소당화 과정에서 시료를 채취하여 다당류에서 단당류로의 전환을 측정하였다(Fig. 1). 효소당화 48시간에서의 당 농도는 폐골목(16.8 g/L)이 굴참(9.6 g/L) 보다 175.0% 높게 나타났다. 폐골목의 다당에서 단당으로 더 많이 전환되었음을 의미한다. 표고버섯 재배 종균(*L. edodes*)에 의하여 목재 성분의 분해되면서 생겨난 공극으로 인해 셀룰라아제의 접근이 용이해졌기에 폐골목의 효소당화가 증가하였다.<sup>13)</sup> 기질 농도 8%의 폐골목 및 굴참나무의 셀룰로오스를



**Fig 1. Glucose concentration of mushroom cultured waste (MCW) and cork oak during enzymatic hydrolysis.**

기준으로 이론적 최대 당 농도를 계산하였다. 단당 전환율은 폐골목이 41.8%이고 굴참나무가 22.7%로 이를 향상시키기 위해서는 추가적인 전처리 공정이 필요하다.

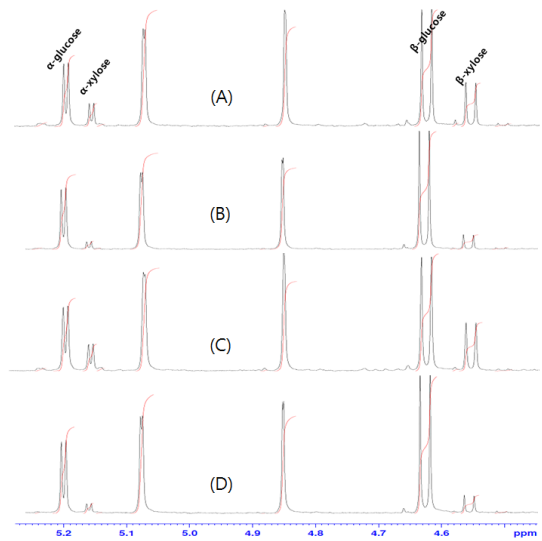
**3.3 알칼리 처리 (sodium hydroxide 18%, w/v)**

폐골목 및 굴참의 효소 당화를 향상시키기 위해서 염기처리를 실시하였다. 전처리는 셀룰라아제가 효과적으로 접근하여 셀룰로오스를 당화시킬 수 있도록 하는 처리이다. 본 연구에서는 18.0% 알칼리 처리로 목분 내 존재하는 일부 리그닌 및 자이란을 용출시키고자 하였다(Fig. 2, Table 2). Fig. 2에서 알칼리 처리 전후 당 조성 변화를 비교하였다. NMR 스펙트럼에서 아노머성 피크의 면적이 당의 농도에 비례하며 xylose 피크 (화학 이동값 α-xylose (4.56 ppm), β-xylose (5.18 ppm))가 처리전과 비교하여 처리 후 xylose 피크의 대부분이 감소하였다. 이는 알칼리 처리 후 폐골목 및 굴참의 자이란이 상당량 제거되었음을 의미한다.

염기처리 전에 질량을 100%로 두고 처리 후 잔류 물질

의 질량을 표시하였다. 굴참(66.5%)이 폐골목(51.7%) 보다 염기처리 후 남은 질량이 큰 것으로 나타났는데 이는 처리 과정에서 폐골목 성분이 더 많이 제거된 것을 의미한다(Table 2).

또한 염기처리 전 후의 폐골목 및 굴참 목분의 화학 조성과 당 조성 분석을 통해서 정량적으로 어느 성분이 용출되었는지를 확인 할 수 있었다. 리그닌의 경우 불가용성 리그닌 및 가용성 리그닌 모두 감소하였다. 총 리그닌 함량은 폐골목은 염기처리 전 22.0%에서 처리



**Fig. 2. <sup>1</sup>H-NMR spectra of anomeric hydrogen peaks in acid hydrolyzate from mushroom cultured waste and cork wood before and after sodium hydroxide treatment.**

- (A): Untreated cork oak
- (B): 18% NaOH treated cork oak
- (C): Untreated mushroom cultured waste
- (D): 18% NaOH treated mushroom cultured waste

**Table 2. The changes of chemical composition of mushroom cultured waste and cork oak by sodium hydroxide treatment**

	Before	After	Lignin		Polysaccharides				
			AI SL	ASL	Glucan	Xylan	Galactan	Manan	Arabinan
Untreated MCW	100	-	18.9	3.1	54.3	18.5	2.5	1.8	0.9
Treated MCW		51.7	13.0	1.1	33.2	3.5	0.5	0	0.4
Untreated Oak	100	-	20.8	2.8	53.7	16.3	3.7	1.5	1.2
Treated Oak		66.5	15.7	1.7	43.4	4.3	0.7	0.4	0.4

AI SL: acid insoluble lignin

ASL: acid soluble lignin

후 14.1%로 36.0% 감소하였고 굴참의 경우 23.6%에서 17.4%로 26.0% 감소하였다(Table 2). 염기에 의해 저분자량의 리그닌의 용출이 이루어졌고 이런 현상이 폐골목이 더 뚜렷한 이유는 백색부후균에 의한 리그닌의 일부가 분해되었기 때문이다. 다당류의 경우 셀룰로오스, 자이란, 갈락탄, 만난, 아라비난 모두 염기처리 후 일부분이 제거되었다. 자이란은 폐골목에서 81%가 굴참목분에서 74%가 알칼리 처리 과정에서 제거되었다(Table 2).

### 3.4 염기처리된 폐골목 및 굴참의 효소당화

알칼리 처리(18%)된 폐골목 및 굴참의 효소당화를 실시하였다. 염기처리 하지 않은 시료와 비교하여 염기처리 후 효소 당화가 증가하였으며 48시간 효소당화 후 단당의 농도는 굴참목분(51.3 g/L)이 폐골목(41.6 g/L) 보다 높았다(Fig 3). 염기처리에 의해 목재 내 존재하는 리그닌 및 자이란을 제거됨으로 셀룰라아제에 의한 효소당화가 증가하였기 때문이다. 하지만 폐골목의 경우 백색부후균에 의한 생물학적 처리 효과와 더불어 2차적인 염기처리로 인해 효소 당화율이 높은 것으로 예상하였지만 오히려 염기처리된 굴참보다 효소에 의한 단당 생성이 더 낮았다(Fig 3). 알칼리 처리에 의하여 폐골목 내에 존재하던 셀룰로오스의 39.0% 제거되었지만 굴참 목분에서는 19.0%만이 제거되었다(Table 2). 알칼리 처리에 의한 리그닌 및 자이란의 제거로 전처리 효과를 기대하였지만, 일부의 셀룰로오스 성분도 용출되었다. 백색부후균에 부분적인 분해가 진행된 폐골목에서는 염기에 의해 더 많은 양의 셀룰로오스가 용출되었다. 이로 인해 상대적으로 효소가 당화하기 쉬운 저

분자량의 셀룰로오스가 용출되어서 염기처리 후에 남은 폐골목은 당화가 어려운 고분자량의 셀룰로오스가 남은 것으로 생각된다.

## 4. 결론

폐골목에 버섯 재배 기간 동안 백색 부후균에 의해 생물학적 처리가 진행되었으며 이로 인해 폐골목의 효소 당화가 굴참 보다 용이하였다. 당화율을 향상시키기 위해 알칼리 처리를 실시 한 결과 폐골목과 굴참 모두 당화율이 증가하였다. 알칼리 처리에 의한 일부 리그닌 및 자이란 제거되었기 때문이다. 알칼리 처리 후 굴참의 효소당화 전환율이 폐골목 보다 높았다. 이는 백색부후균에 의한 목재 성분의 분해로 알칼리 처리에 의해 효소 당화하기 쉬운 셀룰로오스가 상대적으로 더 많이 제거되었기 때문으로 생각된다.

## 사 사

이 논문은 2011년도 충북대학교 학술연구지원사업의 연구비 지원에 의하여 연구되었음.

## Literature cited

1. Korea statistical information service, The study of forestry management state: the way of dealing mushroom cultured waste, 2013, "http://kosis.kr/statHtml/statHtml.do?orgId=136&tblId=DT\_13622\_A1077&conn\_path=12" (accessed June 10, 2014)
2. Kang, C.-H., Studies on the production of roughage from waste logs in cultivation oak mushroom (*Lentinus edodes*) by chemical treatment, J. Kor. For. En. 13(1):20-28 (1993).
3. Wi, H., Koh, D.-S., Eun, J.S., Kang, J.-H. and Jeong, I.S., Studies on wood degradation by white-rot fungi, J. Kor. For. En. 13(1): 7-19(1993).
4. Kim, Y.-H., You, C.-H., Sung, J.-M. and Kong, W.-S., Enzymatic activities related mycelial browning of *Lentinus edodes* (Berkelery) Sing., J. Mushroom Sci. Prod. 5(3):91-97(2007).
5. Lee, J.-W., Koo, B.-W., Chi, J.-W., Choi, D.-H. and

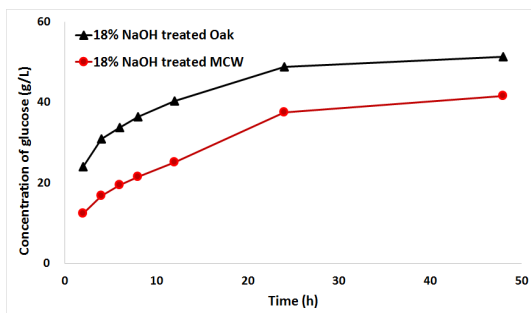


Fig. 3. Glucose concentration of sodium hydroxide treated mushroom cultured waste (MCW) and cork oak during enzymatic hydrolysis.

- Choi, I.-G., Evaluation of waste mushroom logs as a potential biomass resource for the production of bioethanol, *Bioresour. Technol.* 99: 2736-2741(2008).
6. Hatakka, A.I., Pretreatment of wheat straw by white-rot fungi for enzymatic saccharification of cellulose, *Eur. J. Appl. Microbiol. Biotechnol.* 18: 350-357(1983).
7. Alvira, P., Tomas-Pejo, E., Ballesteros, M. and Negro, M.J., Pretreatment technologies for an efficient bioethanol production process based on enzymatic hydrolysis: a review, *Bioresour. Technol.* 101: 4851-4861 (2010).
8. Diaz, M.J, Cara, C., Ruiz, E., Romero I., Moya, M. and Castro, E., Hydrothermal pre-treatment of rapeseed straw, *Bioresour. Technol* 101: 2428-2435(2010).
9. Kim, K.-J. and Eom, T.-J., Enzymatic hydrolysis and micro-structure of ozone treated wood meal, *J. Korea TAPPI* 42(3): 67-73(2010).
10. Andersen, Natalija., Johansen, K.S., Michelsen, M., Stenby, E.H., Krogh, K.B.R.M. and Olsson, L., Hydrolysis of cellulose using mono-component enzymes shows synergy during hydrolysis of phosphoric acid swelled cellulose (PASC), but competition on Avicel, *Enzyme Microb. Tech.* 42: 362-370 (2008).
11. Lee, W.-S., Jung, W.G. and Sung, Y.J., Improvement in dissolution of cellulose with ionic liquid by the electron beam treatment, *J. Korea TAPPI* 45(2): 56-65(2013).
12. Kim, M.-S., Shin, S.-J. and Park, J.-M., Yellow poplar (*Liriodendron tulipifera* L.) grown in Korea versus Eucalyptus globules as a raw material for kraft pulping, *J. Korea TAPPI* 45(4): 16-20(2013).
13. Wang, F.-Q., Xie, H., Wang, E.-T., Du, F.-G. and Song, A.-D., Biological pretreatment of corn stover with lignolytic enzyme for high efficient enzymatic hydrolysis, *Bioresour. Technol.* 144: 572-578 (2013).