

송곳니구름버섯을 이용한 볏짚에서의 에탄올 생산

최유하 · 박정홍 · 이태수^{1,*}

명덕고등학교

¹인천대학교 생명과학부

Bioethanol Production from Rice straw by *Irpex consors*

Yu Ha Choi, Jeong Hong Park and Tae Soo Lee^{1,*}

Myungduk High School, Seoul 157-726, Korea

¹Division of Life Sciences, Incheon National University, Incheon 406-772, Korea

ABSTRACT: This study was initiated to evaluate ethanol production by a Korean isolate of white rot fungus *Irpex consors*. It was found that the fungus could produce ethanol by converting glucose, mannose, xylose, and cellobiose under semi-aerobic condition with yields of 0.23, 0.19, 0.21, and 0.17 g ethanol per g sugars, respectively. Furthermore, the strain produced ethanol by simultaneous saccharification and fermentation of rice straw treated with steam pressured boiling water, 3% NaOH, and 3% H₂SO₄ with maximum yields of 0.12, 0.15, and 0.19 g ethanol per g rice straw, respectively. These results suggested that *I. consors* could produce ethanol from the components of cellulose and hemicellulose including glucose, mannose, xylose, cellobiose as well as rice straw treated with steam pressured boiling water, dilute sodium hydroxide, and dilute sulfuric acid. This is the first report that *I. consors* mycelia produce ethanol from various sugars and lignocellulosic substance including rice straw.

KEYWORDS: Ethanol production, *Irpex consors*, Rice straw, White rot fungus

서론

화석연료의 사용으로 인한 지구 온난화를 해결하기 위한 국제적인 협력의 일환으로 일본의 교토회의에서 전 세계적 인 이산화탄소의 발생량을 줄이기 위한 교토의정서가 채택 되었다. 이와 같은 상황에서 화석연료의 대체재로서 바이오매스가 떠올랐으며 바이오매스를 이용해 전환이 가능한 에너지에는 바이오가스, 바이오디젤 및 바이오에탄올 등이 있는데 그 중에서 바이오에탄올이 에너지로의 전환 가능성

이 가장 높은 것으로 보고되어 있다 (Aristidou and Pentilla, 2000). 지구상에서 연간 생산되는 바이오매스는 약 1550억 톤으로 이 양은 세계의 석유 매장량과 비슷한 것으로 추정되고 있으며 이 중에서 식물이 가장 많은 부분을 차지하고 있어서 이를 에너지로 이용하기 위한 연구가 세계적으로 추진되고 있는 실정이다 (Jeffries and Jin, 2000). 따라서 바이오매스는 여러 화석 연료의 대체재로 지구온난화를 막을 수 있고 환경 친화적 에너지인 바이오에탄올의 발효 기질로 이용이 가능하다는 점에서 많은 주목을 받고 있다 (Berndes *et al*, 2003). 바이오에탄올은 식물로부터 얻어지기 때문에 재생이 가능하고 오염물질을 거의 배출하지 않아 환경 친화적인 연료이고 온실가스의 양도 줄일 수 있다는 장점이 있다. 현재 세계에 공급되는 대부분의 에탄올은 설탕과 옥수수로부터 생산되는 당분질계 혹은 전분질계 에탄올이다. 그러나 기존에 바이오에탄올의 원료로 사용된 설탕과 옥수수는 사람의 식량이나 가축의 사료로 이용되고 있기 때문에 장기적인 관점에서 원료 수급의 불안정성과 원료비의 상승이라는 문제점을 안고 있다. 또한 이들 바이오매스로부터 생산되는 에탄올은 궁극적으로 전 세계가 필요로 하는 에탄올의 수요량을 충족하기 어려워 이러한 문제점을 해결하기 위해 바이오매스 중 직접 식량으로 사용하지 않는 목질계 및 초본계의 바이오매

J. Mushrooms 2015 June, 13(2):85-91
<http://dx.doi.org/10.14480/JM.2015.13.2.85>
 Print ISSN 1738-0294, Online ISSN 2288-8853
 © The Korean Society of Mushroom Science

*Corresponding author

E-mail : tslee4827@hanmail.net

Tel : +82-32-835-4617, Fax : +82-32-835-0763

Received June 8, 2015

Revised June 19, 2015

Accepted June 25, 2015

This is an Open-Access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution Non-Commercial License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0>) which permits unrestricted non-commercial use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

스를 이용한 바이오에탄올의 생산이 대두되게 되었다 (Lee *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2014). 본 연구에서 사용한 벗짚은 비식용 바이오매스여서 식량과 경쟁이 되지 않고 매년 벼농사의 부산물로 대량 생산되기 때문에 바이오에탄올 생산을 연구하기에 매우 적합한 기질로 평가되고 있다. 또한 벗짚은 목질계의 바이오매스에 비해 리그닌 함량이 낮아 산과 알칼리 처리에 의해 리그닌 제거의 효율성이 높다는 장점도 갖고 있다. 본 실험에 사용한 송곳니구름버섯은 담자균문의 민주름버섯목, 구멍장이버섯과, 기계충버섯속에 속하는 경질 버섯으로 여름부터 가을까지 활엽수의 고목이나 그루터기에 기와모양으로 증생하는 백색부후균이다. 갓의 크기는 2~3cm로 표면은 담홍갈색으로 방사상의 가는 선과 희미한 환문이 있다. 자실층에는 치아상의 돌기가 있고 열은 황색 또는 담홍색을 띤다. 송곳니구름버섯은 식용으로 쓰이지 않고 있으나 항균 성분을 함유하고 있다. 본 연구를 위한 예비 실험결과 리그닌, 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스를 분해하는 효소를 생산하여 목재나 초본 줄기를 효율적으로 당화할 수 있을 뿐만 아니라 단당류나 이당류를 에탄올로의 전환도 가능한 것으로 밝혀져 본 연구를 수행하게 되었다 (Park and Lee, 2011).

따라서 본 연구에서는 먼저 증류수에 벗짚을 넣어 수화시킨 뒤 멸균기를 이용하여 고압과 고열로 처리하거나 또는 기존에 초본계와 목질계 바이오매스의 리그닌 제거 효과가 높았던 묽은 NaOH나 묽은 H₂SO₄ 용액을 분말화한 벗짚에 처리하여 리그닌을 제거한 후 에탄올 발효에 필요한 질소영양원과 무기물을 첨가하여 에탄올 생산용 배지를 제조한 후 효모, 송곳니구름버섯의 균사체, 또는 송곳니구름버섯 균사체와 효모를 각각 전처리한 벗짚 배지에 접종하여 생산된 에탄올의 효율성을 비교 검토하였다.

재료 및 방법

공시 균주

본 실험에 사용된 백색부후균인 송곳니구름버섯 (*Irpex consors* IUM 5384) 균사체는 인천대학교 생명과학부 “버섯균주 및 DNA은행”으로부터 분양받았다. 이 균주는 감자한천배지 [Potato Dextrose Agar (PDA; potato 200 g, dextrose 20 g, agar 15 g, 증류수 1,000 mL, pH 5.5)]가 10 mL 들어 있는 페트리 접시에 접종해 7일간 25°C의 배양기에서 배양 후 4°C에서 보존하면서 4주마다 계대 배양하여 실험에 사용하였다.

당류의 에탄올 생산배지

송곳니구름버섯 균사체가 당류를 이용해 에탄올을 생산하는 것을 규명하기 위해 단당류인 육탄당의 포도당과 만노오스 (mannose), 오탄당의 자일로오스 (xylose), 그리고 이당류인 셀로비오스 (cellobiose) 등 4종류의 환원당을 기질로 선발하여 실험에 사용하였다. 에탄올 생산배지는

Okamoto *et al.* (2011)의 방법에 따라 yeast extract 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 10 g/L, KH₂PO₄ 10 g/L, MgSO₄·7H₂O 10 g/L의 비율로 조절한 뒤 250 mL 용량의 삼각플라스크에 각각 10 mL씩 넣고 20 g/L의 비율로 포도당, 만노오스, 자일로오스, 셀로비오스 등을 각각 1 g 첨가하고 pH를 4.8로 조절하여 당류의 에탄올 생산 배지를 제조하였다.

벗짚 시료의 전처리 및 에탄올 생산배지

에탄올 생산에 사용된 벗짚은 2014년 10월 인천광역시 서구 경서동의 논에서 수확하여 수돗물로 깨끗이 세척한 뒤 55°C의 열풍 건조기에서 48시간 건조한 후 40~60 mesh 크기로 분쇄하여 실험에 사용하였다. 벗짚에서 리그닌을 제거하고 효율적인 에탄올 생산을 위하여 증류수, 묽은 가성소다 및 묽은 황산 용액을 이용해 전처리를 행하였다. 먼저 증류수 전처리는 250 mL의 삼각플라스크에 20 g/L의 비율로 1 g의 벗짚 분말을 10 mL의 증류수에 넣고 3시간 동안 25°C에서 수화 과정을 거친 후 121°C의 멸균기에서 15분간 처리 후 yeast extract 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 10 g/L, KH₂PO₄ 10 g/L, MgSO₄·7H₂O 10 g/L 등의 비율로 전처리한 벗짚 용액에 넣고 pH를 4.8로 조절한 후 멸균과정을 거쳐 에탄올 생산용 배지를 조제하였다 (Okamoto *et al.*, 2011). 알칼리와 산의 전처리 과정은 3% NaOH와 3%의 H₂SO₄ 용액 10 ml가 들어있는 250 ml의 삼각플라스크에 20 g/L의 비율로 각각 1 g의 벗짚 분말 넣은 후 121°C에서 240분간 처리하고 상온으로 식힌 후 HCl이나 NaOH를 이용하여 pH를 4.8로 조절한 후 yeast extract 10 g/L, (NH₄)₂SO₄ 2 g/L, KH₂PO₄ 10 g/L, MgSO₄·7H₂O 0.5 g/L 등의 비율로 각각 전처리한 벗짚 용액에 넣어 121°C에서 15분간 멸균하여 에탄올 생산을 위한 벗짚배지를 조제하였다 (Binod *et al.*, 2010; Okamoto *et al.*, 2010).

에탄올 생산 균주의 접종

건조한 냉장 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*) 1 g과 25°C의 배양기에서 7일 간 PDA 배지에서 배양한 송곳니구름버섯 균사체를 멸균된 7 cm 직경의 cork borer를 이용해 5개 떼어내 각각의 플라스크에 접종하고 28°C의 배양기에서 240시간 정지배양하면서 매 48시간마다 생산된 에탄올과 소모된 환원당의 양을 측정하였으며 각각의 실험은 3반복하였다.

에탄올과 잔류당의 측정

에탄올 발효과정에 생성된 에탄올과 소모된 당류의 분석은 발효 시작 후 매 48시간 마다 피펫을 이용해 배양액 1 mL을 꺼낸 후 원심분리기에서 15,000 g로 5분간 원심분리 후 상등액을 취하여 0.22 µL의 Millipore filter로 거른 후 에탄올과 환원당의 분석에 사용하였다. 에탄올과 당의 분석에는 HPLC (Agilent 1200 system; Agilent, Technologies, USA)를 사용하였다. 분석에 사용된 Column은 Shodex

KS-801 column (8.0 mm×300 mm; Showa Denko Co., Ltd., Tokyo, Japan)이었고 검출 Detector는 Agilent 1200 Series refractive index detector (Agilent Technologies, USA)였으며 시료는 20 μL를 사용하였다. 이동상은 3차 증류수를 사용하였고 80°C에서 유속 0.6 mL/min으로 운전하였다. 벚짚을 증류수, 알칼리 및 산으로 처리해 생성된 환원당의 정량은 DNS법을 이용해 분석하였다 (Marsden *et al*, 1982)으며 모든 실험은 3반복하였다.

통계처리

실험은 3회 이상 반복실험을 통하여 얻은 각각의 결과를 mean±S.D로 나타내었다. 각 시료에 대한 통계적 유의 검정은 대조군과 비교하여 Student's t-test 후, $p < 0.05$ 수준에서 통계적으로 유의성 있는 결과로 표시하였다.

결과 및 고찰

송곳니구름버섯을 이용한 단당류와 이당류에서의 에탄올 생산

Glucose를 이용한 에탄올 생산

준비된 에탄올 생산 배지에 육탄당인 glucose 20 g을 첨가하고 송곳니구름버섯의 균사체를 접종하여 반호기성 조건에서 28°C로 정치 배양하여 매 48시간 마다 생성된 에탄올의 양을 분석한 결과 배양 192시간 후 총 4.56 g의 에탄올이 생산되었다. 이는 1 g의 glucose가 0.23 g의 에탄올로 전환된 것으로 배지에 첨가된 glucose도 이 배양 기간 중 모두 송곳니구름버섯의 균사체에 의해 사용된 것으로 나타났다 (Fig. 1A). 이때 생산된 0.23 g의 에탄올은 glucose 1g을 100%의 에탄올로 전환했을 때 이론적인 에탄올 생성량인 0.51 g의 약 45.10%로 환산되었다. Liang

et al (2013)은 *Hohenbuehelia* sp. ZW-16의 균사체를 이용하여 산소가 제한된 조건에서 20 g의 glucose를 기질로 사용해 에탄올의 발효를 진행한 결과 배양 192시간 후 생산된 에탄올의 양은 0.195 g에 달해 본 실험에서 송곳니구름버섯이 생산한 에탄올 0.23 g에 비해서 적게 생산된 것으로 나타났다. 그러나 Okamoto *et al* (2012)이 반호기성 조건에서 갈색부후균인 잣버섯을 이용해 수행한 glucose의 에탄올 발효 실험에서는 96시간 배양 후 최종적으로 생산된 에탄올은 0.38 g/g으로 분석되어 잣버섯 균사체의 glucose의 에탄올 전환 능력은 송곳니구름버섯에 비해 약 39.47% 높은 것으로 나타났다.

만노오스를 이용한 에탄올 생산

육탄당인 만노오스 (mannose) 20 g을 에탄올 발효배지에 첨가하고 송곳니구름버섯의 균사체를 접종하여 반호기성 조건에서 28°C로 정치 배양하여 생성된 에탄올의 양을 분석한 결과 192시간 경과 후 총 3.77 g의 에탄올이 생산되었다. 이 양은 송곳니구름버섯이 1 g의 mannose를 소비해 약 0.19 g의 에탄올을 생산한 것으로 환산되며 이때 배지에 함유되었던 mannose는 모두 이용된 것으로 나타났다 (Fig. 1B). 또한 배양기간 중 생산된 0.19 g의 에탄올은 1 g의 glucose를 100%의 에탄올로 전환했을 때 이론적인 최대 에탄올 생산량 0.51 g의 약 36.96%로 나타났다. Kamei *et al* (2012)은 *Phlebia* sp. MG-60의 균사체를 이용하여 산소가 제한된 조건에서 20 g의 만노오스를 기질로 이용해 에탄올을 생산한 결과 144시간 배양 후 생산된 에탄올의 양은 0.41 g에 달해 본 실험에서 송곳니구름버섯이 생산한 0.19 g에 비해 2배 이상으로 많이 생산되었으며 Okamoto *et al* (2010)이 반호기성 조건에서 백색부후균인 *Peniophora cinerea*와 *Trametes suaveolens*의 균사체를 각각 20 g의 만노오스가 함유된 에탄올 발효 용액에 96시간 배양 후 최종적으로 생산된 에탄올의 양은 각각 0.45 g과 0.30 g으로 측정되어 송곳니구름버섯이 만노오스를 에탄올로 전환하는 효율성은 *Peniophora cinerea*와 *Trametes suaveolens*에 비해 낮았다.

자일로오스를 이용한 에탄올 생산

목재와 초본을 구성하는 물질 중 가장 비중이 큰 세 개의 성분에 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스, 리그닌이 있다. 리그닌은 페놀류 등으로 구성되어 있어서 분해를 하더라도 에너지원으로 사용하기가 불가능하다. 그러나 셀룰로오스는 포도당 분자만으로 구성되어 있어서 가수분해 후 생성된 포도당을 효모 (*Saccharomyces cerevisiae*)를 이용해 산업용 에탄올로 전환시키는 가능하다. 헤미셀룰로오스는 육탄당에 속하는 포도당, mannose, 갈락토오스 등과 오탄당의 자일로오스 (xylose)와 아라비노오스로 구성되어 있어서 포도당의 에탄올 발효에 이용되는 효모를 이용해 헤미셀룰로오스의 모든 구성성분을 에탄올로 전환하는

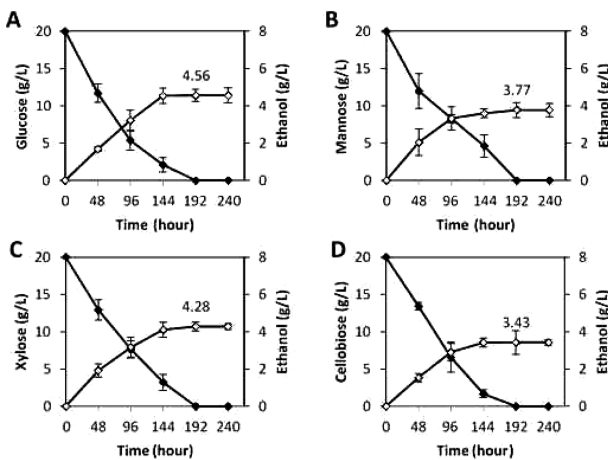


Fig. 1. Ethanol production by *Irpex consors* using 20 g glucose (A), mannose (B), xylose (C) and cellobiose (D). Symbols represent sugars (filled diamonds), ethanol (open diamonds). Error bars indicate standard deviations of the means from three independent experiments.

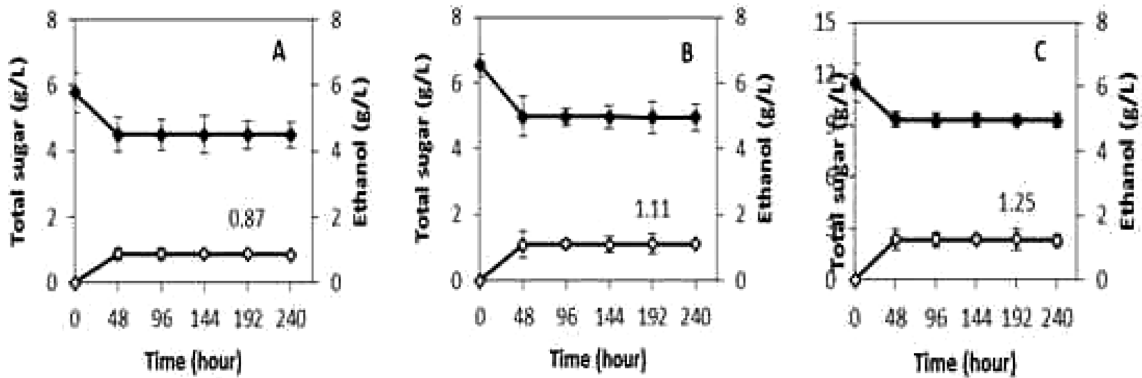


Fig. 2. Ethanol production by *Saccharomyces cerevisiae* using 3 different hydrolysates of 20 g rice straw. Distilled water (A), 3% NaOH (B) and 3% H₂SO₄(C). Symbols represent reducing sugars (filled diamonds) and ethanol (open diamonds). Error bars indicate standard deviations of the means from three independent experiments.

것은 불가능하다. 따라서 헤미셀룰로오스 성분 중 큰 비중을 차지하고 있는 자일로오스를 기질로 이용해 에탄올을 생산하기 위해서 *Pichia stipitis*, *Candida shehatae* 등의 효모가 새로 분리되어 이용되고 있다 (Nigam, 2001; Tanimura *et al*, 2012). 또한 자일로오스를 효율적으로 에탄올로 전환하기 위해서는 발효 초기에는 산소가 필요하나 발효가 시작되면 반호기적 조건이 필요한 것으로 보고되어 있다 (Karimi *et al*, 2006). 본 실험에서 오타당인 xylose 20 g을 발효배지에 첨가하고 살균 후 송곳니구름버섯의 균사체를 접종하여 산소가 제한된 조건에서 28°C로 정지 배양하여 192시간 후 생성된 에탄올의 양을 HPLC로 분석한 결과 20 g의 xylose에서 4.28 g의 에탄올이 생산되었으며 이 수치는 1 g의 xylose에서 0.21 g의 에탄올이 생산된 것과 동일하고 발효를 위해 배지에 첨가된 20 g의 xylose도 발효 기간 동안 모두 사용된 것으로 나타났다 (Fig. 1C). 또한 이때 생산된 0.21 g의 에탄올은 1 g의 xylose를 100%의 에탄올로 전환했을 때 이론적인 에탄올 생성량인 0.51 g의 41.18%에 해당되는 것으로 나타났다. Liang *et al* (2013)은 백색부후균인 *Hohenbuehelia* sp. ZW-16의 균사체를 이용하여 산소가 제한된 조건에서 20 g의 xylose를 기질로 사용해 에탄올 생산 실험을 수행한 결과 192시간 배양 후 생성된 에탄올의 양은 1.5 g에 달해 본 송곳니구름버섯의 에탄올 생산량 4.28 g의 약 35.05%를 나타내 xylose를 에탄올로 전환하는 효율성이 본 실험의 송곳니구름버섯에 비해 낮았다. 이에 비해 Okamoto *et al* (2012)이 반호기성 조건에서 갈색부후균인 잣버섯을 이용해 수행한 에탄올 생산 실험에서는 96시간 발효 후 최종적으로 생성된 에탄올의 양은 0.33 g/g으로 나타나 자일로오스의 에탄올 전환 효율성이 본 실험의 송곳니구름버섯에 비해 약 36.36% 높게 나타났다.

셀로비오스에서의 에탄올 생산

셀로비오스는 셀룰로오스가 백색부후균이나 갈색부후

균이 생산하는 endo-1,4-β-D-glucanase 효소에 의해 분해될 때 생성되는데 포도당 2분자가 β-1,4 결합을 이루고 있는 이당류이나 기존의 효모 (*S. cerevisiae*)에 의해 에탄올로 전환이 불가능한 환원당이다. 따라서 셀로비오스를 기질로 이용해 에탄올을 생산하기 위해서는 셀로비오스의 에탄올 발효가 가능한 새로운 효모나 백색부후균을 선발하여 이용하는 것이 필요하게 되었다. 이에 본 실험에서는 에탄올 생산 기본배지에 20 g의 셀로비오스를 첨가한 후 송곳니구름버섯의 균사체를 접종해 배양 192시간 후 3.43 g의 에탄올이 생산되었다 (Fig. D). 이 결과는 1 g의 셀로비오스를 에탄올로 전환할 경우 0.17 g이 생산되는 수치로 Okamoto *et al* (2010)이 20 g의 셀로비오스를 송곳니구름버섯의 균사체를 이용해 생산한 0.31 g의 에탄올에 비해서 낮게 나타났다. 이 결과는 송곳니구름버섯의 셀로비오스 에탄올 전환율이 포도당, 만노오스 및 자일로오스 등의 당류를 에탄올로 전환하는 효율성에 비해서 낮았다. 또한 송곳니구름버섯의 균사체는 목재나 벚짚의 주요 세포벽 구성성분인 셀룰로오스의 분해 과정에서 생산되는 셀로비오스를 에탄올로 전환하는 것으로 나타나 벚짚에 송곳니구름버섯의 균사체를 접종하고 배양해 에탄올을 생산하는 것이 가능하다고 판단되었다.

**효모를 이용한 벚짚에서의 에탄올 생산
열수 전처리**

벚짚 분말을 열수로 전 처리한 후 생성된 환원당의 양은 5.78 g이었으며 이 용액에 효모 (*S. cerevisiae*)를 접종하여 에탄올 발효를 진행한 결과 발효 192시간 후 생성된 에탄올의 양은 0.86 g이었고, 이때 잔류된 환원당의 양은 4.5 g으로 나타나 발효과정에서 소모된 환원당은 1.28 g으로 매우 적었다. 이러한 결과가 나타난 것은 벚짚의 열수 처리로 생성된 대부분의 환원당은 효모가 에탄올로 전환하기가 불가능한 자일로오스, 만노오스, 셀로비오스 등의 당류이었고 에탄올로 전환이 가능한 포도당의 양이 적었

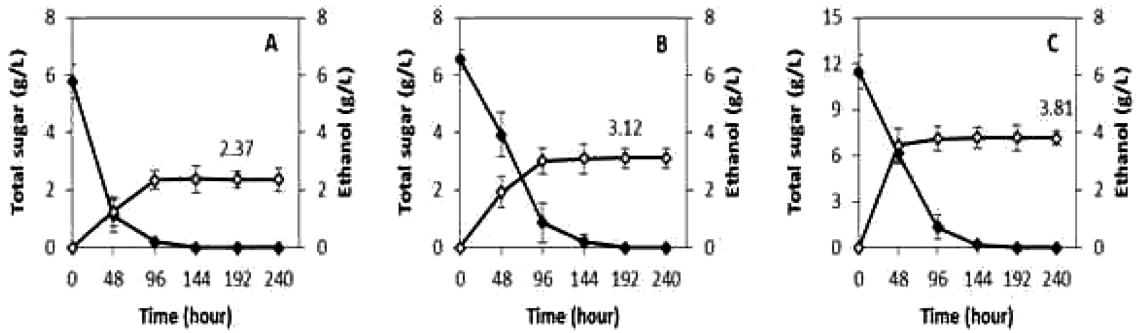


Fig. 3. Ethanol production by co-fermentation of *Saccharomyce cerevisiae* and *Irpex consors* using 3 different hydrolysates of 20 g rice straw. Distilled water (A), 3% NaOH (B) and 3% H₂SO₄(C). Symbols represent reducing sugar (filled diamonds) and ethanol (open diamonds). Error bars indicate standard deviations of the means from three independent experiments.

던 것으로 사료되었다. 따라서 효모만을 이용해 볏짚을 열수로 전 처리한 용액을 에탄올로 전환하는 것은 효율성이 매우 낮은 것으로 나타났다 (Fig. 2A).

NaOH 전처리

볶짚 분말을 NaOH로 전 처리한 후 생성된 환원당의 양은 6.55 g이었으며 이 용액에 효모를 접종해 발효를 진행한 결과 발효 192시간 후 생산된 에탄올의 양은 1.11 g이었다. 이때 잔류된 환원당의 양은 4.96 g으로 측정되어 발효과정에서 소모된 환원당은 1.59 g으로 나타나 NaOH의 전 처리에 의해 생성된 환원당이 발효과정에서 매우 적게 사용된 것으로 나타났다. 이러한 결과는 NaOH 전 처리에 의해 생성된 당의 대부분이 효모가 에탄올로 전환하기가 불가능한 오탄당의 자일로오스나 아라비노오스, 육탄당의 만노오스, 그리고 이당류인 셀로비오스 등에 원인이 있다고 사료되어 NaOH로 전 처리한 볏짚을 효모만을 이용해 에탄올로 전환하는 것은 실용성이 낮다고 판단되었다 (Fig. 2B).

H₂SO₄ 전처리

볶짚 분말을 H₂SO₄로 전처리한 후 생성된 환원당의 양은 11.47 g으로 앞의 열수처리에 의해 생성된 5.78 g 보다 약 2배 이상 많이 생산되었다. 이 가수분해 용액에 효모를 접종해 에탄올 발효를 진행한 결과 발효 192시간 후 생산된 에탄올의 양은 1.25 g이었다. 이때 잔류된 환원당의 양은 9.29 g으로 나타나 분말화한 볏짚을 H₂SO₄로 처리해 초기에 생성된 환원당에 비해 매우 적은 2.18 g만 이용되었다. 이러한 결과는 H₂SO₄로 볏짚을 황산으로 처리해 생성된 대부분의 환원당은 효모가 에탄올로 전환시키기 어려운 당류였고 효모가 에탄올 발효에 이용이 가능한 당인 포도당은 매우 적은 양이 생성되었기 때문으로 사료되었다. 따라서 3%의 H₂SO₄로 처리한 볏짚을 에탄올로 전환시키기 위해 효모 한 종류만을 사용해 발효를 진행하는 것은 실질적으로는 불가능한 공정으로 판단되었다 (Fig. 2C).

효모와 송곳니구름버섯을 이용한 볏짚에서의 에탄올 생산 열수 전처리

분말화한 볏짚을 열수로 전 처리한 후 생성된 용액에 효모와 송곳니구름버섯의 균사체를 동시에 접종해 발효를 진행한 결과 발효 192시간 후 생산된 에탄올의 양은 2.38 g이었다. 이때 볏짚의 열수 처리에 의해 초기에 생성된 환원당은 모두 소모된 것으로 나타났다 (Fig. 3A). 이렇게 볏짚을 열수로 전 처리한 용액에 효모와 송곳니구름버섯 균사체를 동시에 접종한 실험군의 에탄올 생산량은 앞의 실험 (Fig. 1)에서 효모만을 접종해 생산한 에탄올의 양에 비해 약 2.77배 높게 나타났다. 이렇게 효모와 송곳니구름버섯의 균사체를 동시에 접종한 실험군의 에탄올 생산량이 높게 나타난 것은 송곳니구름버섯의 균사체는 효모와 달리 포도당, 만노오스, 자일로오스 및 셀로비오스 등 대부분의 볏짚 구성성분을 에탄올로 전환시킬 수 있어서 에탄올의 함량이 높아진 것으로 사료되었다.

NaOH 전처리

볶짚 분말을 3%의 NaOH 용액으로 전 처리 후 생성된 용액에 효모와 송곳니구름버섯의 균사체를 동시에 접종해 발효를 진행한 결과 발효 192시간 후 생산된 에탄올의 양은 3.12 g이었다. 이때 배양액에 잔류된 환원당은 분석되지 않아 에탄올 생산 과정에서 효모와 송곳니구름버섯에 의해 모두 소비된 것으로 나타났다 (Fig. 3B). 따라서 NaOH로 전 처리한 볏짚에서 생성된 에탄올의 양은 열수 처리에 비해 약 0.74 g 많이 생산된 것으로 나타나 효모와 송곳니구름버섯의 균사체를 3% NaOH로 전 처리한 볏짚 용액에 접종해 발효하는 방법이 열수만을 이용해 볏짚을 전 처리한 방법에 비해 에탄올의 생산 효율성이 높게 나타나는 것으로 사료된다.

H₂SO₄ 전처리

볶짚 분말을 3%의 H₂SO₄를 이용해 전처리한 후 효모와 송곳니구름버섯의 균사체를 동시에 접종해 발효를 진

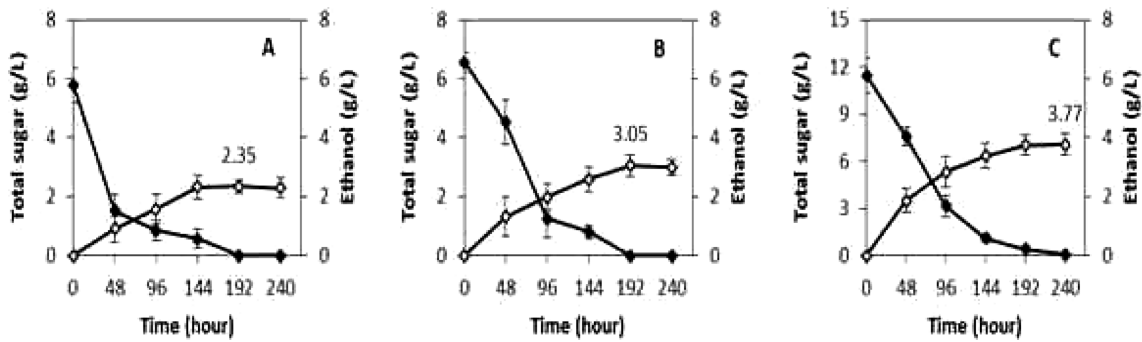


Fig 4. Ethanol production by *Irpex consors* using 3 different hydrolysates of 20 g rice straw. Distilled water (A), 3% NaOH (B) and 3% H₂SO₄ (C). Symbols represent reducing sugar (filled diamonds) and ethanol (open diamonds). Error bars indicate standard deviations of the means from three independent experiments.

행한 결과 192시간 경과 후 생산된 에탄올의 양은 3.83 g이었다. 이때 배지에 잔류된 환원당은 없는 것으로 나타나 효모와 송곳니구름버섯 균사체에 의해 모두 이용된 것으로 나타났다 (Fig. 3C). 따라서 본 실험에서 3%의 황산으로 전처리한 볏짚에 효모와 송곳니구름버섯의 균사체를 동시 접종하여 생산된 에탄올의 양은 열수로 전처리한 방법에 비해 37.86%, NaOH로 전처리한 방법에 비해 18.64% 높았다. 볏짚을 H₂SO₄로 전처리한 실험군의 에탄올 생산량이 NaOH로 열수로 전처리한 방법에 비해 크게 높았던 것은 볏짚에 함유된 리그닌, 셀룰로오스나 헤미셀룰로오스 등의 구성성분이 H₂SO₄의 전처리에 의해 잘 분해되면서 이를 효모와 송곳니구름버섯의 균사체가 에탄올을 생산하는데 효율적으로 이용했기 때문으로 사료되었다 (Roberto *et al.*, 2003).

송곳니구름버섯을 이용한 볏짚에서의 에탄올 생산

열수 전처리

열수로 볏짚 분말을 전처리한 후 송곳니구름버섯의 균사체를 접종해 발효를 진행한 결과 발효 192시간 후 생산된 에탄올의 양은 2.35 g이었다. 이 과정에 열수 처리에 의해 초기에 생성되었던 환원당은 모두 소모된 것으로 나타났다 (Fig 4A). 이렇게 볏짚의 열수 전 처리 용액에 송곳니구름버섯 균사체만을 접종해 생산된 에탄올 양은 열수로 전처리한 볏짚 용액에 효모와 송곳니구름버섯의 균사체를 동시 접종해 생산된 에탄올의 양 2.38 g과 거의 동일하게 나타났다. 따라서 송곳니구름버섯의 균사체가 열수로 전처리된 볏짚 용액을 이용해 얻어진 에탄올 생산 효율성은 열수로 전처리한 볏짚 용액에 효모와 송곳니구름버섯의 균사체 등 2종의 균을 동시 접종해 얻어진 에탄올 생산 효율성에 비해 떨어지지 않는 것으로 나타나 열수로 볏짚을 처리하여 얻어진 용액의 에탄올 발효에는 송곳니구름버섯 균사체만 사용해도 가능한 것으로 나타났다.

NaOH 전처리

볶짚 분말을 3%의 NaOH로 전처리한 후 송곳니구름버섯의 균사체를 접종하고 28°C에서 배양하면서 48시간 간격으로 생산된 에탄올의 양을 측정하고 192시간 후 3.05 g의 에탄올이 생산되었으며 송곳니구름버섯의 균사체 접종 직전의 발효액내의 생성된 환원당은 에탄올 생산 과정에서 모두 소모된 것으로 나타났다 (Fig. 4B). 일반적으로 목재와 볏짚과 같은 초분류를 묽은 농도의 NaOH로 처리하면 볏짚과 목재를 구성하는 주요성분인 리그닌, 셀룰로오스 및 헤미셀룰로오스 중 대부분의 리그닌만 분해되고 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스는 분해되지 않고 남아 효소나 미생물의 처리에 의해 쉽게 분해될 수 있는 상태로 되는 것으로 보고되어 있다 (Kumar and Wyman, 2009). 본 실험에서 NaOH로 전처리한 볏짚에 송곳니구름버섯 균사체를 접종하여 생산된 에탄올의 양이 열수로 전처리한 볏짚에서 생산된 2.35 g의 에탄올에 비해 약 0.7 g 정도 많게 나타났다 이러한 결과는 송곳니구름버섯의 균사체가 NaOH로 처리한 볏짚을 분해해 에탄올로 전환할 수 있어서 NaOH로 처리한 볏짚에서의 에탄올 생산성이 높았던 것으로 판단된다.

H₂SO₄ 전처리

볶짚 분말을 3%의 H₂SO₄를 이용해 전처리한 후 송곳니구름버섯의 균사체를 접종해 발효를 진행한 결과 192시간 경과 후 생산된 에탄올의 양은 3.75 g이었다. 이 수치는 1 g의 볏짚이 송곳니구름버섯에 의해 약 0.19 g의 에탄올로 전환된 것을 보여주는 것이며 또한 에탄올 생산 초기에 배지에 함유되었던 환원당은 송곳니구름버섯에 의해 모두 이용된 것으로 분석되었다 (Fig. 4C). 따라서 본 실험에서 송곳니구름버섯의 균사체만을 접종하여 생산된 에탄올의 양은 효모와 송곳니구름버섯을 동시 접종하여 생산된 에탄올 양 3.83 g에 비해 거의 동등한 수치를 나타냈는데 이는 송곳니구름버섯의 균사체가 볏짚을 NaOH나 H₂SO₄를 처리하여 얻어진 가수 분해물을 이용해 에탄올

을 생산하는 효율성이 매우 유사하다는 것을 나타낸 결과로 사료되었다. 따라서 볏짚을 NaOH나 H₂SO₄를 처리해 에탄올을 생산할 때에는 효모와 송곳니구름버섯을 동시 접종하지 않고 송곳니구름버섯의 균사체만 이용해도 에탄올을 생산하는 데에는 큰 문제가 없다고 판단되었으나 에탄올로 전환되는 효율성이 낮기 때문에 앞으로 이 문제점 개선하기 위한 많은 연구가 필요한 것으로 사료된다.

적 요

본 연구는 한국에서 분리한 송곳니구름버섯 (*Irpex consors*) 균사체의 에탄올 생산 가능성을 탐색하기 위해 수행되었다. 송곳니구름버섯의 균사체를 당이 함유된 배지에 접종하여 에탄올 생산량을 측정하였다. 포도당, 만노오스, 자일로스 등 단당류와 셀로비오스 등의 이당류가 각각 1 g 함유된 발효배지에 송곳니구름버섯의 균사체를 접종하고 배양한 결과 각각의 이들 당류에서 0.23, 0.19, 0.21, 0.17 g의 에탄올이 생산되었다. 또한 볏짚을 열수, 3% 가성소다, 3% 황산용액으로 각각 전 처리한 후 송곳니구름버섯의 균사체를 접종하고 배양한 결과 1 g의 볏짚은 각각 0.12, 0.15, 0.19 g의 에탄올로 전환되었다. 본 실험을 통해 송곳니구름버섯의 균사체는 여러 종류의 환원당을 이용해 에탄올을 생산할 수 있는 것은 물론 열수, 가성소다 및 황산으로 전 처리한 볏짚을 에탄올로 전환하는 것도 가능한 것으로 나타났다. 따라서 송곳니구름버섯 균사체의 에탄올 생산 수율을 본 실험의 결과 보다 높일 수 있다면 당류뿐 만 아니라 볏짚을 비롯한 리그닌셀룰로오스의 바이오매스를 이용해 바이오에탄올을 효율적으로 생산해 우리나라 에너지 수요를 자급하는데 큰 기여를 할 수 있을 것으로 사료된다.

감사의 글

본 연구는 2014년 명덕고등학교 R&E 프로그램 지원에 의해 수행되었으며 이에 감사드립니다.

References

- Aristidou A, Penttila M. 2000. Metabolic engineering applications to renewable resource utilization. *Curr Opin Biotechnol.* 11:187-198.
- Berndes G, Hoogwijk M, van den Broek R. 2003. The contribution of biomass in the future global energy supply: a review of 17 studies. *Biomass Bioenergy* 25(1): 1-28.
- Binod P, Sindhu R, Singhania R, Vikram S, Devi L, Nagalakshmi S, Kurien N, Sukumaran RK, Pandey A. 2010. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresour Technol.* 101(13):4767-4774.
- Jeffries TW, Jin YS. 2000. Ethanol and thermotolerance in the bioconversion of xylose by yeasts. *Adv Appl Microbiol.* 47:221-268.
- Kamei I, Hirota Y, Mori T, Hirai H, Meguro S, Kondo R. 2012. Direct ethanol production from cellulosic materials by the hypersaline-tolerant white-rot fungus *Phlebia* sp. MG-60. *Bioresour Technol.* 112:137-142.
- Karimi K, Emtiazi G, Taherzadeh MJ. 2006. Production of ethanol and mycelial biomass from rice straw hemicellulose hydrolyzate by *Mucor indicus*. *Process Biochem.* 41:653-658.
- Kumar R, Wyman CE. 2009. Effects of cellulase and xylanase enzymes on the deconstruction of solids from pretreatment of poplar by leading technologies. *Biotechnol Prog.* 25:302-314.
- Lee SB, Jung SK, Lee JD. 2010. Production of rice straw based cellulosic ethanol using acidic saccharification. *Appl Chem Eng.* 21(3):349-352.
- Liang X, Hua D, Wang Z, Zhang J, Zhao Y, Xu H, Li Y, Gao M, Zhang X. 2013. Production of bioethanol using lignocellulosic hydrolysate by the white rot fungus *Hohenbuehelia* sp. ZW-16. *Ann Microbiol.* 2013. 63:719-723.
- Marsden WL, Gray PP, Nippard GJ, Quinlan MR. 1982. Evaluation of the DNS method for analyzing lignocellulosic hydrolysates. *J Chem Tech Biotechnol.* 32:1016-1022.
- Nigam JN. 2001. Ethanol production from wheat straw hemicellulose hydrolysate by *Pichia stipitis*. *J Biotechnol.* 87:17-27.
- Okamoto K, Imashiro K, Akizawa Y, Onimura A, Yoneda M, Nitta Y, Maekawa N, Yanase H. 2010. Production of ethanol by the white-rot basidiomycetes *Peniophora cinerea* and *Trametes suaveolens*. *Biotechnol Lett.* 32:909-913.
- Okamoto K, Nitta Y, Maekawa N, Yanase H. 2011. Direct ethanol production from starch, wheat bran and rice straw by the white rot fungus *Trametes hirsuta*. *Enzyme Microb Technol.* 48:273-277.
- Okamoto K, Kanawaku R, Matsumoto M, Yanase H. 2012. Efficient xylose fermentation by the brown rot fungus *Neolentinus lepideus*. *Enzyme Microb Technol.* 50(2):96-100.
- Okamoto K, Uchii A, Kanawaku R, Yanase H. 2014. Bioconversion of xylose, hexoses and biomass to ethanol by a new isolate of the white rot basidiomycete *Trametes versicolor*. *SpringerPlus* 3:121.
- Park WH, Lee JH. 2011. New wild fungi in Korea. Kyohak Publishing Co., Seoul Korea.
- Roberto IC, Mussatto SI, Rodrigues RCLB. 2003. Dilute-acid hydrolysis for optimization of xylose recovery from rice straw in a semi-pilot reactor. *Ind Crops Prod* 7:171-176.
- Tanimura A, Nakamura T, Watanabe I, Ogawa J, Shima J. 2012. Isolation of a novel strain of *Candida shehatae* for ethanol production at elevated temperature *SpringerPlus.* 1:127.