

# $^1\text{H-NMR}$ 에 의한 Xylan의 황산가수분해 과정에서 나타나는 반응 동력학 연구

조대행<sup>1</sup> · 김용환<sup>1</sup> · 김병로<sup>2</sup> · 박종문<sup>2</sup> · 성용주<sup>3</sup> · 신수정<sup>2†</sup>

(2011년 7월 29일 접수: 2011년 8월 22일 채택)

## Kinetic Study of Xylan Hydrolysis and Decomposition in Concentrated Sulfuric Acid Hydrolysis Process by $^1\text{H-NMR}$ Spectroscopy

Dae Haeng Cho<sup>1</sup>, Yong Hwan Kim<sup>1</sup>, Byung-Ro Kim<sup>2</sup>, Jong-Moon Park<sup>2</sup>, Yong Joo Sung<sup>3</sup>,  
and Soo-Jeong Shin<sup>2†</sup>

(Received July 29, 2011; Accepted August 22, 2011)

### ABSTRACT

Proton-NMR spectroscopic method was applied to kinetic study of concentrated sulfuric acid hydrolysis reaction, especially focused on 2nd step of acid hydrolysis with deferent reaction time and temperature as main variables. Commercial xylan extracted from beech wood was used as model compound. In concentrated acid hydrolysis, xylan was converted to xylose, which is unstable in 2nd hydrolysis condition, which decomposed to furfural or other reaction products. Without neutralization steps, proton-NMR spectroscopic analysis method was valid for analysis of not only monosaccharide (xylose) but also other reaction products (furfural and formic acid) in acid hydrolyzates from concentrated acid hydrolysis of xylan, which was the main advantages of this analytical method. Higher temperature and longer reaction time at 2nd step acid hydrolysis led to less xylose concentration in xylan acid hydrolyzate, especially at 120°C and 120 min, which meant hydrolyzed xylose was converted to furfural or other reaction products. Loss of xylose was not match with furfural formation, which meant part of furfural was degraded to other undetected compounds. Formation of formic acid was unexpected from acidic dehydration of pentose,

1 광운대학교 공과대학 화학 공학과 (Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul 139-701, Republic of Korea)

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

3 충남대학교 농업생명대학 환경재료 공학과 (Department of Biobased Materials, Chungnam National University, Daejun, 305-764, Republic of Korea)

† 교신저자(Corresponding author): E-mail: soojshin@chungbuk.ac.kr

which might come from the glucuronic acid at the side chain of xylan.

**Keywords:** <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, acid hydrolysis, xylan, xylose, furfural, kinetics

## 1. 서론

화석연료를 대체할 수 있는 에너지 자원에 대한 관심이 커져가면서 목질계 바이오매스를 기반으로 재생 에너지에 대한 관심이 커져가고 있다. 바이오매스를 이용한 알코올을 통한 재생에너지 생산 기술은 이미 2차 대전이전부터 상용화 공장들이 가동되었다. 하지만 석유계 자원과의 경쟁에서 밀려나면서 공장이 폐쇄되었지만 현재의 고유가, 석유 자원 고갈, 지구 온난화의 심화가 목질계 기반 재생에너지의 생산을 다시 불러 오고 있다.

목질계 바이오매스를 원료로 알코올을 제조하기 위해서는 발효 미생물이 알코올 생산에 적합한 원료물질을 만드는 공정이 필수적이다<sup>1,2)</sup>. 단당류로 전환시킨 후 알코올 발효 균주를 사용하여 알코올 제조하는 당화 발효 공정이 일반적이지만 최근에는 목질계 바이오매스를 열분해하여 액체나 기체로 전환시킨 후 이들 열분해 산물을 발효하여 알코올을 제조하는 기술도 시도되고 있다<sup>3,4,5)</sup>.

목질계 바이오매스를 단당류로 전환시킨 후 알코올 발효를 하는 공정에서는 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스의 단당류를 단당으로 전환시키는 공정이 필수적이다. 산 촉매 가수분해 공정에 의해서 단당류로 전환시킬 수 있는 사용하는 산의 농도와 반응 온도에 따라 진한 산 가수분해 공정과 묽은 산 가수분해 공정으로 대별되며, 사용하는 산에 따라서 황산 공정과 염산 공정으로 구별된다.

효소당화 공정은 목질계 자원의 복잡한 구조 때문에 적절한 전처리 후 효과적인 효소 조합에 의하여 단당류로 전환시킬 수 있지만 전처리 비용과 효소의 비용이 상용화의 걸림돌로 작용하고 있다. 2000년대 들어 급격한 효소 비용의 절감과 효소의 역가 향상이 이런 걸림돌을 제거하여 가고 있다.

진한 산 당화 공정은 저온에서 1차 가수분해 후 희석하여 2차 가수분해를 실시하는 진한 산 가수분해 공정으로 상대적으로 낮은 온도와 더 높은 산 농도에서 반응

이 일어나면 당화 효율은 묽은 산 가수분해에 비하여 높지만<sup>6,7)</sup> 사용된 산의 중화나 처리에 비용이 많이 드는 단점이 있다. 이온 교환수지를 통한 산 회수 법에서 진보된 Simulated Moving Bed (SMB) chromatography 법이 산 회수 처리 공정이 최근에 시도 되고 있다. 이온 교환수지의 이온 교환 능력에 따라 음이온이나 양이온을 보류할 수 있고 보류한 다음 적절한 치환용매로 이온 교환수지를 재생을 하면서 보류되었던 전해질을 회수할 수 있다. SMB 공정은 크로마토그래피법중 연속적으로 크로마토그램 컬럼을 여러 종류의 펌프와 밸브로 연결하여 시료의 주입과 분리된 성분의 배출이 가능하도록 설계된 보다 복잡한 이온교환수지 크로마토그래피 공정이다. 이런 진보된 공정의 도입을 통하여 산 가수분해 공정의 난점인 산 회수가 가능해 질 수 있다<sup>8,9)</sup>.

진한 산 가수분해 공정은 묽은 산 가수분해에 비하여 2차 반응 산물이 적게 발생하지만 반응 온도와 시간에 따라 만들어지는 2차 반응 산물은 에탄올 발효나 부탄올 발효 또는 석유 화학 중간물질을 만드는 미생물 발효 과정에서 억제제로 작용할 수 있기 때문에<sup>10)</sup> 2차 반응 산물의 생성과 분해는 진한 산 가수분해 공정의 조절 요인으로 매우 중요하다. 하지만 산 가수분해 후 반응 산물 분석을 위한 중화 과정에서 불용성 염이 이들 화합물들이 흡착되어 정확한 동역학 연구가 불가능하다.

본 연구에서 수소 핵자기 공명법을 사용하여 이런 난점을 해결하고자 하였다. 2차 가수분해 조건에서 물 대신 수소 핵자기 공명 용매인 중수를 사용하여 가수분해 반응을 시킨 다음 반응 액을 여과 하여 중화 없이 핵자기 공명 분석이 가능하기 때문에 중화에 의한 반응 산물을 손실을 일으키지 않아 2차 산 가수분해 반응 조건에서의 정확한 동역학 해석을 시도하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 재료

Xylan, 황산, D-(-)-ribose와 중수(deuterium hydroxide)

는 시약등급은 Aldrich사에 구입하여 사용하였다.

## 2.2 방법

자이란 70.0mg과 0.8ml의 72% 황산을 30℃에서 1시간 동안 일차 가수분해 반응을 시킨 후 3.2ml의 중수(D<sub>2</sub>O, deuterium oxide: 14% 황산)를 첨가하여 정해진 2차 가수분해 온도와 시간에서 반응을 시킨 후 냉각시켰다. 반응 온도와 시간을 주 변수로 2차 가수분해를 실시하였다. 2차 가수분해의 온도는 100℃, 110℃, 120℃에서 실시하였고 반응 시간은 각 온도에서 60, 75, 90, 105, 120분간 반응시킨 후 냉각시켰다. 자이란 가수분해 후 냉각시킨 시료에 30.0mg의 D(-)-ribose를 표준당으로 첨가 하며 xylose, furfural, formic acid의 농도를 측정할 때 기준으로 사용하였다. Ribose을 넣은 후 잘 저어 기준 당이 완전하게 용해된 다음 여과 하였고 여과액을 핵자기 공명 분석용 튜브에 삽입한 후 수소 핵자기 공명 분석 시료로 준비하였다.

## 2.3 분석

<sup>1</sup>H-NMR 분광분석은 Bruker 500 MHz 핵자기 공명기를 사용하여 충북대학교 공동실험실습관에 의뢰하여 분석하였다. 분석 조건은 Table 1과 같다.

# 3. 결과 및 고찰

## 3.1. 수소 핵자기 공명을 통한 단당류 조성 분석 및 산 가수분해 산물 분석

**Table 1. Analytical conditions for NMR spectroscopy**

	<sup>1</sup> H-NMR
Model	Bruker, AVACE NMR Spectrometer (500 MHz)
Solvent	D <sub>2</sub> O
Pulse	11 μsec
Delay between pulse	10 s
Acquisition time	2.73 sec
Sweep width	10 ppm
Center of spectrum	4.5 ppm
Temperature	295.6 K

수소 핵자기 공명법은 산성 조건에서 단당 분석을 하기 때문에 중화할 필요가 없고 중화과정에서 당이나 다른 반응 산물의 흡착이 없기 때문에 동역학 분석에 적합한 분석 방법에 적합하다. 단당을 구성하는 대부분의 탄소는 인접 탄소와 연결되었으면서도 수소와 수산기를 가지고 있다. 아노머성 수소 이외의 다른 탄소에 연결되어 있는 수소의 화학 이동(chemical shift)값이 비슷하기 때문에 당의 종류나 수소의 위치를 구별할 수 없는 복잡한 피크 모양과 범위를 갖는다. 하지만 아노머성 수소(anomeric hydrogen)는 각 단당별로 화학 이동값이 다르기 때문에 피크의 분리가 가능하다. 수소 핵자기 공명에서 피크 면적은 화학종의 농도에 비례하기 때문에 아노머성 수소의 피크가 명확하게 분리되고 각 피크의 면적 적분이 가능하면 이를 단당류의 조성 분석에 사용할 수 있다<sup>11)</sup>. 이런 원리를 가지고 화학 펄프에 존재하는 단당류 분석과 autohydrolysis 후 목재에 잔류하는 당 분석에 이런 수소 핵자기 공명 분석법이 응용되었다<sup>12,13)</sup>.

하지만 목재의 당분석을 위한 분석 조건에서 셀룰로오스에 비하여 자이란의 일차 가수분해(희석 전 저온 고농도 산 가수분해)와 이차 가수분해(희석 후 고온 저농도 산 가수분해) 속도가 빠르기 때문에 자이란에서 만들어진 일부의 자일로스는 furfural을 거쳐 다른 산분해 산물로 전환되기 때문에 목재의 당 분석에서 이런 자이란의 빠른 가수분해에 대한 보정이 필요하다<sup>14)</sup>.

화학 이동 값 4.0-5.5 범위에서 주로 아노머성 수소의 피크 확인 및 적분이 가능하지만 7.0 이상의 영역에서 나타나는 방향족계 화합물이나 산을 분석하며 다른 반응 산물에 대한 분석도 가능하다. 단당류는 산 가수분해 조건에서 탈수 축합반응을 걸쳐 오탄당은 furfural로 육탄당은 5-hydroxymethylfurfural(5-HMF)로 전환되며 이들 화합물들은 산 조건에서 반응성이 커서 다른 화합물로 축합 고분자화 반응이 일어난다. 육탄당에서 만들어진 5-HMF는 산성 조건에서 formic acid와 levulinic acid로 전환되기도 한다.

본 연구에서는 자이란에서 자일로오스로 전환 뿐만 아니라 furfural, formic acid로 전환 과정도 추적하여 자이란의 산 가수분해 메커니즘을 보다 정확하게 이해하고자 하였으며 이때 furfural이나 formic acid는 일반적으로 butanol발효의 저해 물질 후보이기 때문에 이런 저해 물질을 적게 발생시키는 2차 가수분해 조건의 탐

색도 또 다른 목표이다.

수소 핵자기 공명법은 수소 피크의 적분 값으로 상대적으로 농도를 비교하기 때문에 자이란 반응 산물은 산 반응 조건에서 여러 가지 산물로 전환되기 때문에 표준을 정할 수 없어서 2차 산 가수분해 반응 후 냉각 시킨 시료에 D(-)-Ribose를 표준 당으로 첨가 하여 첨가된 ribose의 농도와 xylose, furfural의 농도를 비교하여 반응 동역학을 계산하였다. 본 연구에서 β-xylose의 적분 값을 1.0으로 기준으로 하고 다른 피크들의 상대적인 적분 값을 측정하여 당이나 furfural, formic acid의 농도 계산에 사용하였다.

Fig. 1과 Fig. 2는 anomeric 수소 영역에서 단당 피크 (Fig. 1) 과 방향족 수소 영역 및 개미산 피크 영역 (Fig. 2)를 보여 주고 있다. 그림 1에서 xylose 피크와 ribose 피크가 확연하게 분리 되어 이를 근거로 ribose와 xylose의 상대적인 농도 측정이 가능하다. Fig. 2에서는 산 당화 과정에서 발생한 furfural과 formic acid에 대한 피크 적분으로 Fig. 1과 함께 상대적인 농도를 측정하면 당화액 내의 xylose, furfural, formic acid의 정량

분석이 가능하다.

### 3.2 반응조건에 따른 자일로스의 농도 변화

자이란은 자이란을 추출한 원료 물질에 따라 다른 구조를 갖는다. 일반적으로 침엽수 자이란은 자일로스를 주 사슬로 구성되어 있지만 옆 가지로 아라비노스와 glucuronic acid를 갖고 있어서 arabinoglucuronoxylan 이라고 불리고 활엽수 자이란은 침엽수와 달리 아라비노스가 옆 가지로 붙어 있지 않고 자이란 주 사슬에 glucuronic acid가 붙어 있어 glucuronoxylan이라고 불린다<sup>1)</sup>. 본 연구에 사용한 자이란은 너도밤나무 (활엽수)에서 추출한 자이란을 Aldrich사에서 구입하여 사용하였다.

Fig. 3은 3가지 다른 온도조건에서 2차 가수분해 반응 시간에 따른 xylose의 농도를 보여주고 있다. 120℃와 110℃에서 시간이 지남에 따라 자일로스의 농도가 급격하게 감소하고 있다. 이런 조건의 산농도, 반응 온도에서 자일로스가 안정적이지 못하기 때문에 탈수 반응에 의하여 xylose에서 furfural로 전환이 시작되어

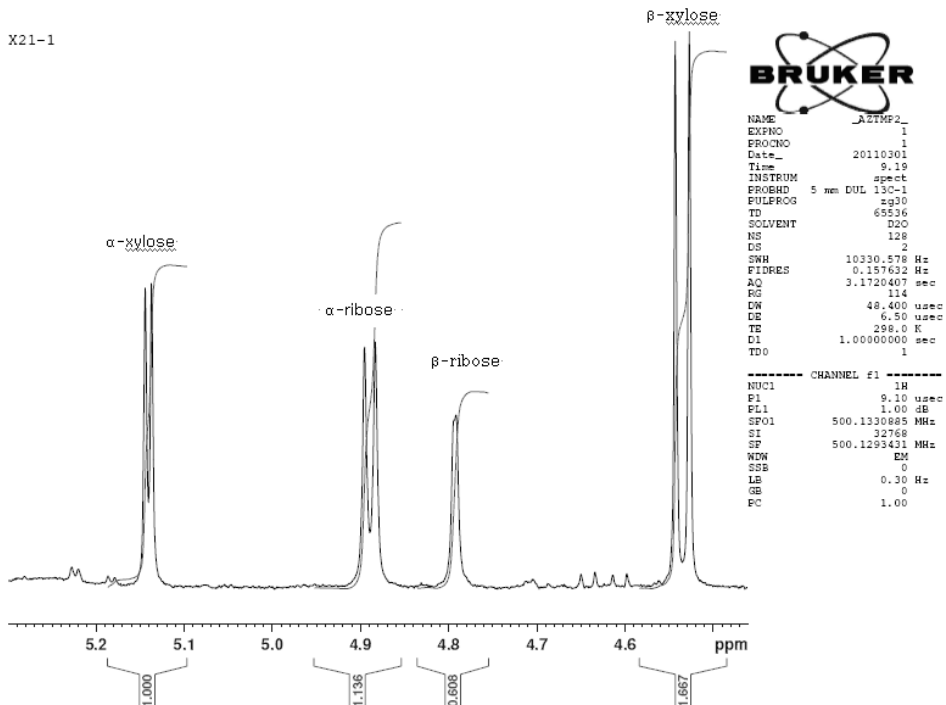


Fig 1. NMR spectrum of anomeric hydrogen peak in 60 min and 120 °C hydrolyzed in 2 step hydrolysis of xylan.

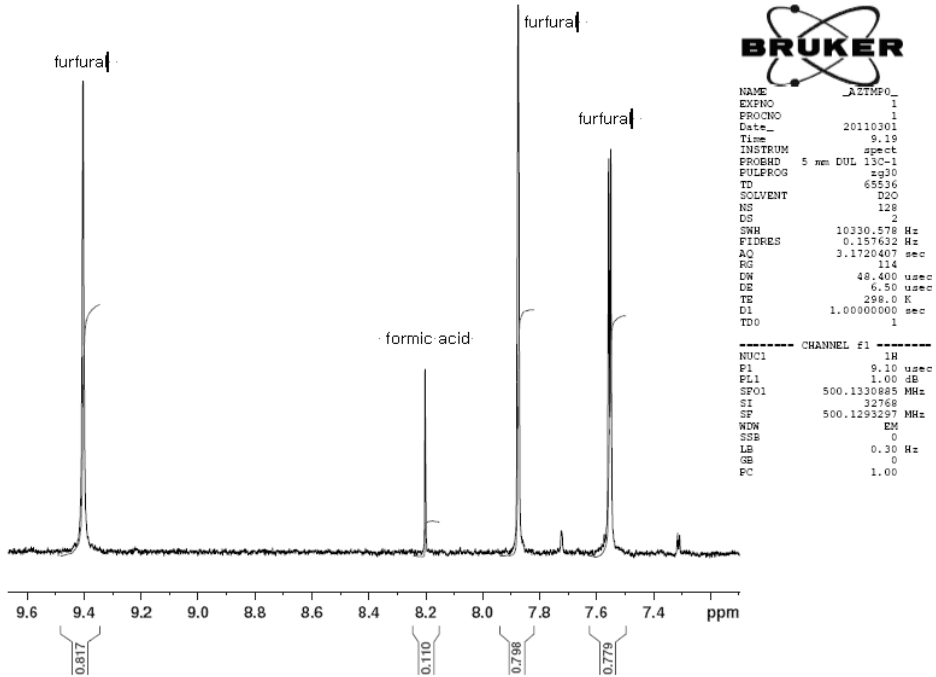


Fig 2. NMR spectrum of aromatic hydrogen peaks and formic acid peak in 60 min and 120 °C hydrolyzed in 2 step hydrolysis of xylan.

<sup>15,16,17)</sup> 시간이 지남에 따라 xylose 농도가 감소하고 있다.

### 3.3 반응 조건에 따른 furfural의 농도 변화

Fig. 3에서 다른 온도 조건에서 시간에 따른 자일로스의 농도를 표시한 것이고 Fig. 4는 다른 온도조건에서

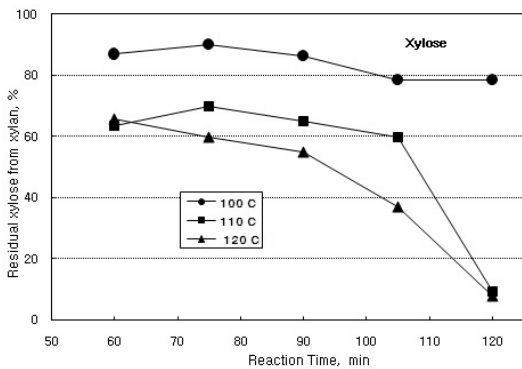


Fig. 3. Xylose concentration after 2 step acid hydrolysis of xylan.

서 furfural의 생성 농도를 표시한 것이다. 주목할 만한 사실은 자일로스의 분해가 급격하게 일어나는 조건에서 furfural의 농도가 증가 하지만 자일로스의 소멸 농도와는 일치 하지 않는다는 점이다. 이것은 이미 생성된 furfural의 일부가 산 촉매 조건에서 다른 화합물로 전환되었다는 것을 의미한다. 고온 장시간 반응에서 이런 현상이 더욱 뚜렷하게 관찰되었다. 자일로스의 수율

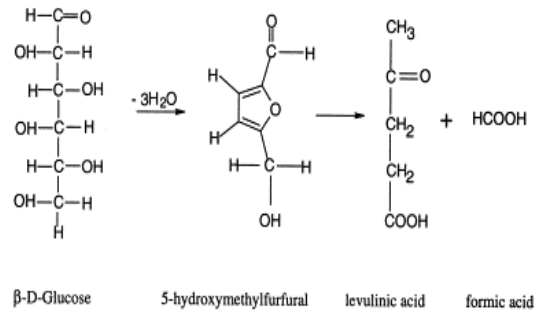


Fig. 4. Reaction mechanism from hexose via 5-hydroxymethylfurfural to formic acid and levulinic acid (Ulbricht et al. 1984)

은 높게 얻기 위해서는 2차 가수분해 온도는 100℃에서 실시하여 자일로스의 분해를 막아야 한다.

### 3.4 반응 조건에 따른 formic acid의 농도 변화

일반적으로 단당의 산 촉매 탈수 축합 반응에서 6탄당은 5-hydroxymethylfurfural이 만들어 진 후 가수분해 반응에 의하여 formic acid와 levulinic acid로 분해가 된다<sup>18,19,20</sup>. 5탄당은 furfural이 만들어진 후 산 촉매 조건에 축합 반응에 의하여 고분자 물질로 전환된다. 활엽수 자이란을 산 가수분해 산물에서 formic acid의 검출은 특이한 일이다. 자이란의 주쇄가 5탄당인 자일로스로 구성되어 있기 때문에 formic acid가 만들어지지 않는다. 하지만 사슬 옆 가지에 붙어 있는 glucuronic acid의 산 가수분해에 의하여 formic acid가 만들어졌을 것으로 추정된다.

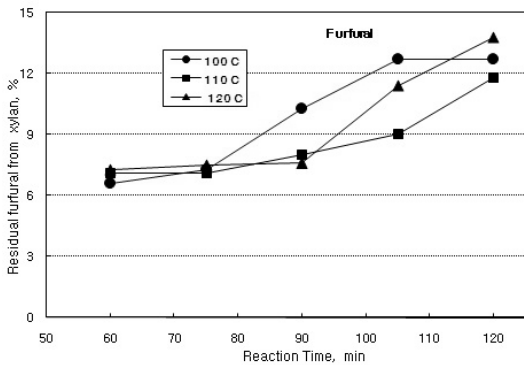


Fig 5. Furfural concentration after 2 step acid hydrolysis of xylan.

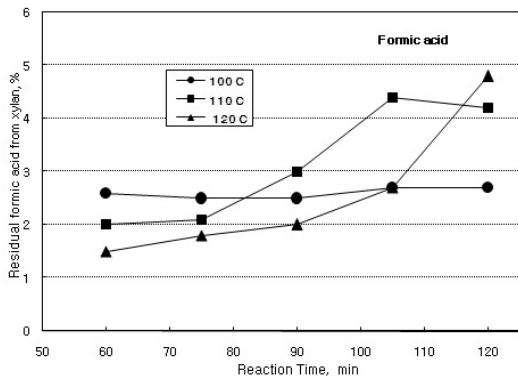


Fig 6. Formic acid concentration after 2 step acid hydrolysis of xylan.

Fig. 5은 다른 온도와 반응 시간 조건에서 formic acid의 농도를 표시한 그림이다. 2차 가수분해 온도가 100℃인 경우 반응시간이 경과함에도 formic acid의 농도가 일정한 수준이었지만 110℃나 120℃의 경우 반응시간이 경과함에 따라 formic acid의 농도가 증가함을 보여주고 있다. 따라서 formic acid의 생성을 최소화하기 위하여 2차 가수분해의 온도를 100℃가 적합하다고 판단된다.

## 4. 결론

수소 핵자기 공명법을 사용하여 진한 산 가수분해 공정의 2차 가수분해에서 단당류의 생성과 2차 반응 산물의 전환에 관한 동역학 연구를 실시 하였다. 수소 핵자기 공명법은 당화액의 중화를 필요로 하지 않기 때문에 이런 목적에 적합한 분석법으로 추천한다. 자이란의 진한 황산 가수분해 결과 2차 가수분해의 온도와 시간에 의하여 자일로스의 수율이 급격하게 변하는 것을 확인하였다. 고온과 긴 2차 가수분해 시간에서 자일로스의 수율감소가 급격하게 나타났다. 자일로스의 수율 감소와 furfural의 농도 사이에 상관관계가 없는 것으로 보아 만들어진 furfural이 다른 물질로 반응하였음을 추정할수 있었다. 높은 자일로스 수율과 furfural이나 formic acid의 농도를 낮추기 위하여 2차 가수분해의 온도는 110℃나 120℃보다는 100℃에서 실시하는 것이 보다 나은 것으로 생각된다.

## 사 사

본 연구는 지식경제부 기술혁신사업 중 에너지·자원 기술개발 사업의 지원에 의한 “비식용 바이오매스를 이용한 바이오부탄올 생산기술 개발” 과제의 일부로 수행되었으며 이에 감사드립니다.

## 인용문헌

1. 민두식, 조남석, 목재당화학, 선진문화사, 1990
2. Wenzl, H. F.J., The chemical technology of Wood, Academic Press, 1970, New York
3. Saxena, J. and Tanner, R.S., Effect of trace metals on

- ethanol production from synthesis gas by the ethanologenic acetogen, *Clostridium ragsdalei*, J. Ind. Microbiol. Biotechnol. 38(4): 513-521 (2010).
4. Wilkins, M.R. and Atiyeh, H.K., Microbial production of ethanol from carbon monoxide, Curr. Opin. Biotechnol. 22(3): 326-330 (2011).
  5. Datar RP, Shenkman RM, Cateni BG, Huhnke RL and Lewis RS, Fermentation of biomass-generated producer gas to ethanol. Biotechnol Bioeng 86:587 - 594 (2004).
  6. Cho, D. H., Shin, S.-J., Bae, Y., Park, C. and Kim, Y. H., Ethanol production from acid hydrolysates based on the construction and demolition wood waste using by *Pichia stipitis*, Bioresour. Technol. 102(6): 4439-4443 (2011).
  7. Cho, D. H., Shin, S.-J., Bae, Y., Park, C. and Kim, Y. H., Enhanced ethanol production from deacetylated yellow poplar acid hydrolysate by *Pichia stipitis*, Bioresour. Technol. 101(13): 4947-4951 (2010).
  8. Wooley, R., Ma, Z. and Wang, N.-H. L., A nine-zone simulating moving bed for the recovery of glucose and xylose from biomass hydrolyzate, Ind. Eng. Chem. Res. 37(9): 3699-3709 (1998).
  9. Xie, Y., Chin, C. Y., Phelps, D. S. C., Lee, C.-H., Lee, K. B., Mun, S. and Wang, N.-H. L., A five-zone simulated moving bed for the isolation of six sugars from biomass hydrolyzate, Ind. Eng. Chem. Res. 44(26): 9904-9920(2005)
  10. Sanchez, B. and Bautista, J., Effects of furfural and 5-hydroxymethylfurfural on the fermentation of *Saccharomyces cerevisiae* and biomass production from *Candida guilliermondii*. Enzyme Microb. Technol. 10: 315 - 318(1988).
  11. Kiemle, D.J., Stipanovic, A.J., Mayo, K.E., 2004. Proton NMR methods in the compositional characterization of polysaccharides. In: Gatenholm, P., Tenkanen, M (Eds.), ACS Symposium Series 864, Washington, DC, pp. 122 - 139.
  12. Y. Çöpür, D. Kiemle, A. Stipanovic, J. Koskinen and H. Makkonen, <sup>1</sup>H NMR spectroscopic determination of carbohydrates and yield in pine and maple pulps, Paperi ja Puu 85(3): 158 - 162 (2003).
  13. Mittal, A, Scott, G.M., Amidon, T.E., Kiemle, D.J. and Stipanovic, A.J., Quantitative analysis of sugars in wood hydrolysates with <sup>1</sup>H-NMR during the autohydrolysis of hardwood, Bioresour. Technol. 100: 6398-6406 (2009).
  14. Shin, S.-J. and Cho, N.-S., Conversion factors for carbohydrate analysis by hydrolysis and <sup>1</sup>H-NMR spectroscopy, Cellulose 15,255-260(2008).
  15. D.F. Root, J.F. Saeman, J.F. Harris and W.K. Neill, Kinetics of the acid-catalyzed conversion of xylose to furfural, Forest Prods. J. 9: 158 - 165 (1959).
  16. Maloney, M.T., Chapman, T.W. and Baker, A.J., Dilute acid hydrolysis of paper birch: Kinetics studies of xylan and acetyl group hydrolysis, Biotechnol. Bioeng. 27(3):355-361 (1985).
  17. 신수정, 박종문, 조대행, 김용환, 조남석, 백합나무를 이용한 고농도 단당류 생산을 위한 산 가수분해 특성 연구, 목재공학 37(6): 578-584 (2009).
  18. Zhao, H., Holladay, J.E., Brown, H. and Zhang, Z.C., Metal chloride in ionic liquid solvents convert sugars to 5-hydroxymethylfurfural, Science, 316(5831): 1597-1600 (2007)
  19. Rose, I.C., Epstein, N. and Watkinson, A.P., Acid-catalyzed 2-furaldehyde (furfural) decomposition kinetics, Ind. Eng. Chem. Res. 39(3):843-845 (2000).
  20. Ulbricht, R.J., Northup, S.J. and Thomas, J.A., A review of 5-hydroxymethylfurfural (HMF) in parenteral solutions. Fund. Appl. Toxicol. 4: 843 - 853 (1984).