

# 오존 처리에 의한 소나무 목분의 화학적 성상 변화

김강재 · 엄태진<sup>†</sup>

(2011년 2월 10일 접수: 2011년 3월 7일 채택)

## Chemical Characteristics of Ozone Treated Pine Wood Meal

Kang-Jae Kim, Tae-Jin Eom<sup>†</sup>

(Received February 10, 2011: Accepted March 7, 2011)

### ABSTRACT

The pine wood meal was ozonated in acidic water. A 91.3% of lignin and 13% of polysaccharides in pine wood meal were degraded with 180 min ozonation. The phenolic hydroxyl groups of lignin in ozonated wood meals were increased with ozonation time. The vanillin content in nitrobenzene oxidation products of lignin is decreased with 10 min. ozonation and it was slightly increased with ozonation time. The sugar composition of ozonated wood meals showed that the hemicellulose was more susceptible to ozonation than cellulose. The crystallinity of ozonated wood meal was increased.

**Keywords** : ozonated pine wood, lignin content, sugar contents, nitro- benzene oxidation, phenolic-OH

### 1. 서론

목질 바이오매스의 에탄올발효를 위한 효소당화는 반드시 전처리가 필요하며 그 방법의 하나로서 오존에 의한 세포벽 리그닌의 선택적 분해가 검토되고 있다.<sup>1,2)</sup> 목질계 바이오매스의 당화를 위한 전처리 방법에 관한 총설에서는 목질 다당류의 효율적 당화를 위한 전처리의 필요성과 그 방법들에 대하여 소개하고 있다.<sup>3)</sup> 목질계 바이오매스의 전처리는 주로 탈리그닌화, 헤미셀룰로오스 제거, 결정화도 감소 및 미세공극의 증가 등을

목적으로 하고 있으며, 효과적인 전처리는 당화 수율을 향상시킬 수 있어야 하고, 탄수화물의 분해 및 손실을 최소화하며, 당화 및 발효에 영향을 주는 저해물질과 같은 부산물의 형성을 억제하는 등의 조건을 반드시 충족시켜야 하는 것으로 지적되고 있다.<sup>4)</sup>

오존은 강한 산화력(전위차 2.07V)과 모든 유기물을 CO<sub>2</sub>와 H<sub>2</sub>O로 완전 분해할 수 있는 이론적 특성에도 불구하고 실제로는 대다수의 유기물과 반응이 느리거나 혹은 어떤 유기물과는 전혀 반응을 하지 않는 경우가 흔히 있다. 반면에 오존의 분해 부산물인 O-H 라디칼은

• 경북대학교 농업생명과학대학 임산공학과(Dept. of Wood Science and Technology, College of Agriculture and Life Science, Kyungpook National University, Daegu, 702-701, Korea)

<sup>†</sup> 교신저자(corresponding author) :E-mail: tjeom@knu.ac.kr

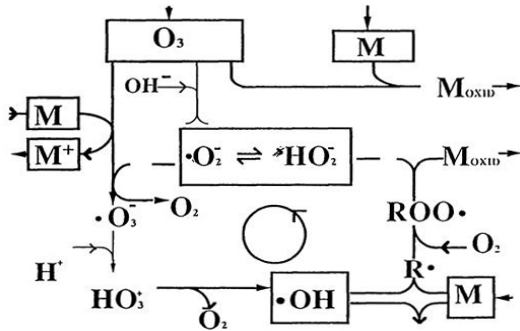


Fig. 1. Ozonation mechanism.<sup>2)</sup>

오존자체보다 높은 전위차(3.08V)를 가지며 거의 모든 유기물과 매우 빠른 속도로 골고루 반응하는 특성이 있다. 오존을 산화제로 사용할 경우 오존에 의하여 무기, 유기물이 제거될 수 있는 경로는 Fig. 1과 같이 오존분자에 의하여 직접적으로 제거될 수 있는 직접경로(direct reaction pathway)와 O-H 라디칼에 의하여 분해되는 간접경로(Indirect reaction pathway)로 구분된다.<sup>5-7)</sup> 따라서 오존을 수 처리에 응용할 경우 O-H 라디칼의 생성을 증가시킬 수 있도록 조건을 조성하는 것이 효율적이다.

강력한 산화제로서의 오존은 펄프의 표백 공정에 널리 사용되고 있으며 리그닌의 분해 능력이 우수한 기체상의 화합물이다. Nadezhda 등<sup>3)</sup>은 침엽수의 오존 탈리그닌은 목분의 함수율에 영향을 많이 받는다고 보고하였고, Hayashi 등<sup>4)</sup>은 활엽수의 경우는 오존처리에 의해 효소 당화가 촉진되지만 침엽수는 그에 미치지 않는다고 보고하였다.

전보<sup>8)</sup>에서 오존 처리에 의해 목질세포벽 중의 리그닌의 분해와 미세공극 변화가 세포벽 다당류의 효소 가수분해에 미치는 영향에 관하여 보고하였다.

본 연구에서는 오존 분해 잔존 소나무 목분의 화학적 성상을 분석하여 오존 분해에 대한 목재 성분의 선택성과 경시적으로 분해되고 남은 잔존 목분의 화학적 특성에 관하여 검토하였다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시재료

건조 소나무(*Pinus densiflora*) chip을 Willy mill로

분쇄하여 40-60 mesh의 목분을 시료로 사용하였다. 목분을 ethanol - benzene(2 : 1) 혼합 용제에 의하여 탈지하고 기건시킨 후 함수율을 측정하고 오존 처리 시료로 하였다.

### 2.2 오존처리

절건 중량 10 g에 해당하는 목분을 삼구플라스크에 넣고 60% 초산 수용액 200 ml에 침지한 후 교반을 하면서 0℃에서 300 ml/min의 속도로 오존 발생기(Model No. 2000, Jelight Co., USA)로부터 생성된 오존 가스(3.0% ozone/O<sub>2</sub>)를 주입하였다. 오존 처리된 목분은 증류수로 충분히 세척하여 대기 중에 건조시킨 후 함수율을 측정하였다. 소나무 목분에 대한 오존처리 시간은 10, 30, 60, 120, 180, 240 min으로 하였다.

### 2.3 리그닌 함량과 구성당 분석

소나무 목분 및 오존 처리된 목분을 TAPPI법에 따라 Klason lignin(Tappi T236 om-06), UV lignin(Tappi T222 om-06)을 정량 분석하였고, Alditol- acetate 법에 따라 GC(GC-14A, Shimadzu, Japan)로 각 구성당을 정량 분석하였다.<sup>9)</sup> GC 분석 조건은 다음과 같다.

- Column : 3% ECNSS-M(400 × 0.4 cm glass column)
- Detector : FID
- Column Temp. : 190℃
- Injection Temp. : 230℃
- Detection Temp. : 250℃
- Carrier gas : N<sub>2</sub>, 1.2 kgf/cm<sup>2</sup>
- Internal standard : 1% Inositol solution

### 2.4 페놀성 수산기의 측정

Periodate oxidation법<sup>10)</sup>에 따라 오존처리 소나무 목분의 페놀성 수산기 함량을 분석하였다. 즉, 오존 처리한 시료 400 mg을 칭량하여 20 ml용 밀봉 뚜껑이 달린 시험관에 넣은 후, sodium peroxidate 수용액을 주입하고 내부표준물질로 acetoneitrile 수용액을 가하여 봉입하였다. 용액을 균질 용액으로 만든 후, 가끔 교반하면서 4℃에서 냉장 보관하였다. 반응액 중에 생성된 메탄올을 GC로 분석하였다. GC 분석 조건은 다음과 같다.

- Column : Silicone DC QF-1(250 × 0.4 cm glass column)
- Detector : FID

Column Temp. : 160°C  
 Injection Temp. : 250°C  
 Detection Temp. : 250°C  
 Carrier gas : N<sub>2</sub>

Internal standard : acetone (3 mg/ml) solution

리그닌 중의 페놀성 수산기의 함량은 메탄올의 최대 생성량으로부터 다음 식에 의해 계산하였다.

$$\text{CH}_3\text{OH}(\text{mmol})/\text{lignin}(\text{g}) = \frac{\text{CH}_3\text{OH 피크면적} \times \text{내부표준물질}(\text{mg}) \times 1000}{\text{내부표준물질 피크면적} \times \text{lignin}(\text{mg}) \times \text{보정계수} \times 32}$$

### 2.5 알칼리 니트로벤젠 산화

오존분해 목분 30 mg을 칭량하여 2N NaOH 4 ml 및 니트로벤젠 0.24 ml와 함께, 10 ml용 오토클레이브에 봉입하였다. 160°C 진탕 oil bath에서 2시간동안 반응시켰다. 반응혼합액은 추출용매로 클로로포름을 사용하는 것만을 제외하고 나머지는 Schulz 등<sup>11)</sup>의 방법에 의거하여 실험하였다. 반응결과 생성된 방향족 알데히드는 TMS화하여 GC로 정량 분석하였다. GC 분석조건은 다음과 같다.

Column : OV 101(250 × 0.4 cm glass column)  
 Detector : FID  
 Column Temp. : 180°C  
 Injection Temp. : 230°C  
 Detection Temp. : 250°C  
 Carrier gas : He 15ml/min  
 Internal standard : Acetoguaiacone/  
 Pyridine(30 mg/10 ml)

### 2.6 잔존 리그닌의 측쇄구조

리그닌의 측쇄구조를 조사하기 위하여 Matsumoto

등<sup>12)</sup>의 방법에 의하여 monocarboxylic acid와 dicarboxylic acid의 생성농도를 측정하였다. 즉, 소량의 목분 시료를 물과 메탄올을 포함하는 초산용액(증류수 : 메탄올 : 초산 = 3 : 1 : 16) 30 ml에 현탁시키고 얼음으로 냉각시키면서 3% 오존을 포함하는 산소를 0.5 N<sub>2</sub>/min의 기체량으로 3시간 흡입시켜 오존 분해하였다. 반응종료 후 즉시 N<sub>2</sub> gas를 흡입시켜 잔류오존을 제거한 후 건고시켰다. 소량의 물로 오존분해물을 추출하여 pH 10에서 24시간 검화시킨 후 양이온 교환수지에 의해 Na 이온을 제거시키고 건고하였다. 생성물의 TMS화물을 아래와 같은 조건에서 GC로 분석하였다. Dicarboxylic acid의 피크의 면적을 monocarboxylic acid의 피크면적으로 나누고 각각의 mol 비로 환산하였다.

Column : OV 01(0.25 mm × 50 m capillary column)  
 Column temp. : 150-270°C, 4°C/min

### 2.7 결정화도 측정(XRD)

오존 처리한 시료의 결정화도는 Segal의 방법<sup>13)</sup>에 따라 동결-건조한 시료를 press기로 압착하여 시험편을 만든 후, X-선 회절분석기(D/Max, Rigaku, Japan)를 사용하여 측정하였다. 결정화도(crystallinity index, Cr I)는 다음 식으로 계산하였다.

$$\text{Crystallinity}(\%) = \frac{I_1 - I_2}{I_2} \times 100$$

I<sub>1</sub> : Intensity near 2θ = 22.8°

I<sub>2</sub> : Intensity near 2θ = 18°

## 3. 결과 및 고찰

### 3.1 오존 처리 목분의 화학 조성

Table 1은 소나무 목분의 오존 처리에 의한 화학조성

**Table 1. The yield of residue and composition of ozonated pine wood meals(%)**

O <sub>3</sub> treatment time (min.)	0	10	30	60	120	180	240
Yield	100	90.4	81.0	70.8	65.2	63.3	58.0
Klason lignin	27.1	18.4	10.6	6.3	3.3	2.8	-
UV lignin	0.7	0.9	1.2	1.2	1.2	1.1	-
Total lignin	27.8	19.8	11.8	7.5	4.5	3.9	-
Lignin content based on wood meal	27.8	17.9	9.5	5.3	2.9	2.4	-
Polysaccharide content based on wood meal	72.2	72.5	71.5	65.5	62.3	60.9	-

변화를 측정한 결과이다. 오존분해 10분 만에 소나무 목분 리그닌의 약 35%가 분해되고 시간이 경과 함에 따라 분해속도는 감소하지만 180분 동안 처리하면 전체 리그닌의 약 91.3%가 분해하였다. 이때의 다당류는 전체의 약 85%가 남아 있었다. 이는 본 실험의 방법에 의한 산성 수용액 중에서 오존에 의한 리그닌의 분해 선택성이 매우 높다는 것을 의미한다. 목재 세포벽에 있어서 리그닌의 주된 역할 중 하나는 세포벽의 형태와 구조적 견고함을 유지하는 것이므로, 세포벽 다당류와 리그닌의 밀접한 관계는 효소의 접근과 셀룰로오스의 팽윤을 어렵게 한다. 따라서 산화제로서 오존이 목재 세포벽의 리그닌과 보다 용이하게 반응하여 리그닌을 우선적으로 제거함으로써 다당류의 효소 가수분해가 촉진되는 것으로 생각한다. 그러나 본 연구의 실험조건으로 소나무 목분을 180분간 처리하였을 때 리그닌의 약 90%가 제거되었음에도 불구하고 목분의 효소가수분해는 60% 정도 밖에 되지 않는 것<sup>14)</sup>은 간단하게 설명하기 어렵다. 소량의 잔존리그닌이 효소가수분해에 미치는 영향과 함께 순수한 소나무 다당류의 효소가수분해에 대한 저항성에 관하여서도 보다 상세히 검토할 필요가 있다고 생각한다. 결과적으로 소나무의 효소가수분해효율을 높이기 위해서는 짧은 오존처리에 의해 리그닌을 효율적으로 제거하고 그 외의 방법과 병행하는 전처리가 보다 경제적이고 효과적인 방법이 될 수 있을 것으로 사료된다.

3.2 구성당 분석

Fig. 2는 소나무 목분의 오존분해 후 잔존하는 중성 단당류의 조성을 절대량으로 환산하여 나타낸 그림이다. 소나무 목분의 오존분해 초기에는 특히 galactose와 함께 arabinose가 급격히 감소하였으며 시간이 길어짐에 따라 xylose도 순차적으로 감소하였다. 그러나 mannose와 glucose는 반응 초기에 약간 감소하였으나 변화가 거의 없음을 알 수 있다. 반응 초기에 약간 감소

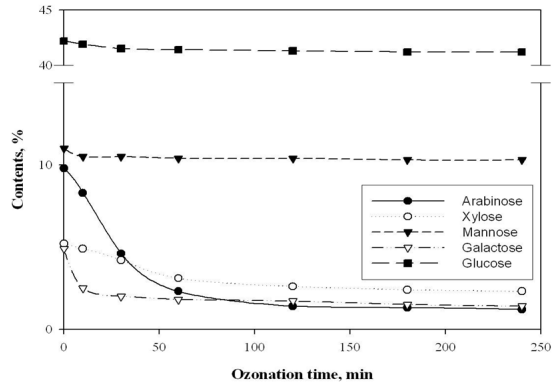


Fig. 2. The relative content of neutral sugar in ozonated pine wood meals.

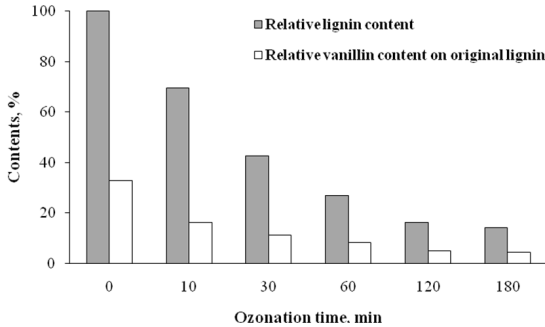
된 glucose는 침엽수의 대표적 헤미셀룰로오스인 glucomannan으로부터 유래하는 것으로 생각되며 오존에 의한 셀룰로오스의 분해는 무시해도 되는 수준인 것을 알 수 있다. 즉, Table 1의 원래의 목분중 리그닌을 제외한 다당류 72.2% 중에서 오존에 의해 제거되는 15.6%(목분 대비)의 대부분은 arabinose와 galactose 및 xylose로 구성된 헤미셀룰로오스 유래의 다당류임을 알 수 있다. 이와 같은 결과는 Hayashi 등<sup>4)</sup>의 삼나무 목분을 이용한 실험 결과 보고와도 일치하고 있다.

3.3 페놀성 수산기 및 알칼리 니트로벤젠 산화

Table 2에 오존분해 잔존 리그닌의 페놀성 수산기 및 알칼리 니트로벤젠 산화 분해 생성물을 분석한 결과를 나타내었다. 흥미롭게도 오존분해 목분의 리그닌 중 페놀성 수산기는 오존처리시간에 따라 약간씩 증가되었다. 이는 오존분해 후 잔존하는 리그닌 중 free 페놀성 말단이 상대적으로 많아진다는 것을 의미한다. 또 오존분해시간이 길어짐에 따라 탈리그닌율은 급속히 증가하지만 리그닌의 니트로벤젠 산화분해물(vanillin)은 감소하였다가 다시 증가하는 결과를 나타냈다. 그러나 소나무 목분의 리그닌을 100으로 하여 오존 분해 후 잔존 리

Table 2. The contents of phenolic-OH and products of nitrobenzene oxidation in pine

O <sub>3</sub> treatment time (min.)	0	10	30	60	120	180
Rate of delignification (%)	0	30.5	57.5	73.0	83.8	85.9
Phenolic-OH (mmol/gL)	0.68	0.76	0.84	1.23	1.29	1.30
Vanillin (mol%/L)	32.9	23.7	26.5	31.1	31.4	31.2
Vanillin on original lignin of wood meal (%)	32.9	16.4	11.2	8.4	5.1	4.4



**Fig. 3. The rate of delignification and nitrobenzene oxidation products in ozonated pine wood meals.**

그닌의 상대비율을 보정하여 보면 Fig. 3과 같이 리그닌의 감소와 함께 바닐린의 절대량도 감소하는 것을 알 수 있다. 그러므로 10분간 오존 처리된 목분 리그닌의 바닐린 수율이 낮아지는 것은 상대적으로 end-wise형 리그닌이 풍부한 이차벽 리그닌이 보다 우선적으로 분해되어 일시적으로 축합형 리그닌의 농도가 높아지기 때문으로 생각된다. 잔존 리그닌의 니트로벤젠 산화 분해물인 vanillin 수율과 대비하여 생각해 보면, 분해 초기 페놀성 수산기의 양이 증가하는 것은 축합형 리그닌의 상대적인 증가에 기인하지만 오존처리시간이 60분 이상의 잔사에 있어서 소량의 리그닌으로부터 검출된 페놀성 수산기는 리그닌의 페놀성 수산기라기보다는 일부 추출성분이나 분해 생성물에서 기원한 것으로 추측된다.

**3.4 잔존 리그닌의 축쇄구조**

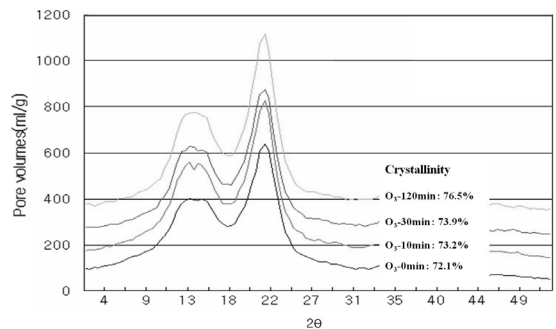
목재세포벽중의 리그닌은 과상리그닌(bulk lignin)과 쇠상리그닌(end-wise lignin)으로 구성되는 것으로 알려져 있다.<sup>15)</sup> 쇠상리그닌의 경우 monomer의 결합 양식이 β-O-4 형이 주가 되고 과상리그닌의 경우 β-5 결합이 주가 되는 특징이 있다.<sup>10)</sup>

Matsumoto 등<sup>12)</sup>과 Eom 등<sup>16)</sup>은 오존분해결과 생성되는 carboxylic acid의 종류에 의해 리그닌 monomer의 결합 단위에 있어서 β-O-4 형과 β-5형의 구조를 정

량하였다. 즉, β-O-4 형으로 부터는 monocarboxylic acid인 theronic acid와 erithronic acid가 생성되고 β-5 형으로부터는 dicarboxylic acid가 생성되므로 monocarboxylic acid와 dicarboxylic acid의 mol 비율 비교함으로써 β-O-4 형과 β-5형의 구조의 존재량을 비교할 수 있다. Table 3에 오존분해 잔사 목분을 matsmoto 등<sup>16)</sup>의 방법에 의해 분해한 후 생성된 dicarboxylic acid와 monocarboxylic acid의 mol 비율을 나타내었다. 10분간 오존분해에 의해 분해되고 남은 리그닌에 있어서 상기의 mol 비는 약간 증가하였다가 다시 감소한 후 점차적으로 증가하는 결과를 보이고 있다. 이는 목분 중의 리그닌의 형태적인 분포, 즉 목재의 분쇄에 의해 축합형 구조가 많은 세포간층 리그닌 보다 이차벽 리그닌의 노출에 의해 오존 분자의 접근이 용이해진 결과 2차벽 중의 β-O-4 구조가 풍부한 리그닌이 보다 많이 공격을 받았기 때문으로 생각되며 이는 전술한 페놀성 수산기와 니트로벤젠의 분해생성물의 분석 결과와 일치하고 있다. 오존 분해 시간이 길어짐에 따라 monocarboxylic acid에 대한 dicarboxylic acid의 조성비가 높아지는 것은 결과적으로 오존에 의한 리그닌의 분해는 그 정도는 미미하지만 축합형 리그닌보다 는 비축합형 리그닌에 우선하고 있음을 추정할 수 있다.

**3.5 오존분해 목분의 결정화도**

Fig. 4는 오존 처리 시간에 따른 소나무 목분의 X-선



**Fig. 4. The crystallinity of ozonated pine wood meals.**

**Table 3. Relative contents of dicarboxylic acids and monocarboxylic acids**

O <sub>3</sub> treatment time(min.)	0	10	30	60	120	180	240
dicarboxylic acid/monocarboxylic acid	0.12	0.15	0.10	0.13	0.16	0.20	0.23

회절 그래프와 결정화도를 나타낸 것이다. 오존 처리에 따라 목분의 결정화도는 증가하였다. 이는 주로 비결정성 물질인 리그닌과 헤미셀룰로오스의 제거로 인하여 상대적으로 셀룰로오스의 비율이 증가하기 때문으로 생각된다. 본 결과를 통하여 산성 수용액 중에서 목재를 오존으로 처리하는 것은 목재 세포벽 리그닌의 분해 선택성을 높이고 다당류의 효소가수분해를 용이하게 하는 전처리 방법이 될 수 있다고 생각한다.

#### 4. 결론

1. 오존처리에 의해 목분 중 리그닌의 91%, 다당류의 15%가 제거되었다.
2. 잔존 리그닌 중의 페놀성 수산기는 오존처리 시간이 길어짐에 따라 약간씩 증가되었다.
3. 잔존 리그닌 중의 vanillin 수율은 약간 감소하였으며 오존분해시간이 길어짐에 따라 서서히 증가하였다.
4. 오존 분해에 의해 arabinose, galactose, xylose를 포함하는 헤미셀룰로오스 유래의 다당류가 주로 분해되었다.
5. 오존처리에 의해 잔존 목분의 결정화도 증가하였다.

#### 인용문헌

1. Coughlan, Michael P., Enzymic hydrolysis of cellulose: an overview, *Bioresource Technology*, 39(2), 107-115(1991).
2. R.S. Bes, G. Gas, J. Molinier, P. Vidal, J. Mathieu, J.C. Mora, Enhancement of poplar cellulose susceptibility to cellulase enzyme hydrolysis by ozonation, *Science & Engineering*, 11(2), 217-226(1989).
3. A. M. Nadezhda, A.A. Stanislav, G.B. Natal'ya, V.L. Valery, Delignification of softwood by ozonation, *Pure Appl. Chem.*, 81(11), 2081-2091(2009).
4. Noriko Hayashi, Kazumasa Shimizu, Shuji Hosoya, Pretreatment of ozone for increasing the enzymatic susceptibility of autohydrolyzed softwoods, *Mokuzai Gakkaishi*, 35(6), 521-529 (1989).
5. C. Nebel, *Encyclopedia of Chemical Technology*, Third Edition, Wiley, NY, 683-713(1978).
6. Carola Olkkonen, Henrik Tylli, Ingegerd Forsskahl, Agneta Fuhrmann, Tiina Hausalo, Tarja Tamminen, Bo Hortling, Jan. Janson, Degradation of model compounds for cellulose and lignocellulosic pulp during ozonation in aqueous solution, *Holzforschung*, 54(4), 397-406, (2000).
7. J.S. Gratzl, J. Nakano, R.P. Singh, Chemistry of delignification with oxygen, ozone and peroxide, TAPPI Symposium Committee, 121-150(1980).
8. K. J. Kim, T. J. Eom, Enzymatic hydrolysis and micro-structure of ozone treated wood meal, *KTAPPI*, 42(3), 67-73(2010).
9. 임태진, 박윤제, 미루나무 분화조직 중 세포벽다당류의 화학적 성상, *목재공학*, 26(3), 26-32(1998).
10. Y. Z. Lai, X. P. Guo, W. Situ, Estimation of phenolic hydroxyl groups in wood by a periodate oxidation method, *Journal of wood chemistry and technology*, 10(3), 365-377(1990).
11. T. P. Schultz, M. C. Templeton, Proposed mechanism for the nitrobenzene oxidation of lignin, *Holzforschung*, 40(2), 93-97(1986).
12. Y. Matsumoto, A. Ishizu, J. Nakano, Studies on chemical structure of lignin by ozonation, *Holzforschung*, 40, 81-85(1986).
13. L. Segal, J.J. Creely, A.E. Martin Jr., C.M. Conrad, An empirical method for estimating the degree of crystallinity of native cellulose using the X-ray diffractometer, *Text. Res. J.*, 786-794(1959).
14. Hans E. Grethlein, The effect of pore size distribution on the rate of enzymatic hydrolysis of cellulosic substrates, *Biotechnology February*(1985).
15. K. V. Sarkanen, *Lignins*, Willy Interscience, NY, 160-164(1972).
16. T. J. Eom, G. Meshitsuka, A. Ishizu, Side chain structures of lignin in the differentiating zylem, *Mokuzai Gakkaishi*, 35(9), 820-825(1989).