

진한 황산 가수분해 반응조건에서 xylose와 glucuronic acid의 반응 특성

조대행¹ · 김용환¹ · 박종문² · 심재훈² · 김병로² · 신수정^{2†}
접수일(2012년 5월 8일), 수정일(2012년 5월 31일), 채택일(2012년 6월 4일)

Characteristics of xylose and glucuronic acid at concentrated sulfuric acid hydrolysis

Dae Haeng Cho¹, Yong Hwan Kim¹, Jong-Moon Park², Jaehoon Sim², Byung-Ro Kim² and
Soo-Jeong Shin^{2†}

Received May 8, 2012; Received in revised form May 31, 2012; Accepted June 4, 2012

ABSTRACT

Formed fermentation inhibitors during acid saccharification leads to poor alcohol production based on lignocellulosic bio-alcohol production process. In this work, it is focused on the formation of fermentation inhibitors from xylan, which is influenced by reaction temperature and time of acidic saccharification of xylose and glucuronic acid. In second step of concentrated acid hydrolysis, part of xylose and glucuronic acid was converted to furfuraldehyde and formic acid by dehydration and rearrangement reactions. Furfural was formed from xylose, which was highly sensitive to reaction temperature. Formic acid was formed from both xylose and glucuronic acid, which is supposed to be the main inhibitor in biobutanol fermentation. Reaction temperature of second hydrolysis was the main variables to control the furfural and formic acid generation. Careful control of acid saccharification can reduce generation of harmful inhibitors, especially second step of concentrated sulfuric acid hydrolysis process.

Key words: xylose, glucuronic acid, furfural, formic acid, fermentation inhibitor

1. 광운대학교 화학공학과 (Department of Chemical Engineering, Kwangwoon University, Seoul, 139-701, Korea)

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

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

본 연구 내용의 일부는 2012년 4월 26-27일 한국펄프종이공학회 춘계학술대회에서 발표되었음

1. 서론

목질계 바이오매스를 당화한 후 이를 원료로 바이오알코올을 생산하는 연구는 2차 대전 이전부터 시도되었다. 이때 시도한 공정은 산을 촉매로 셀룰로오스와 헤미셀룰로오스 형태의 다당류를 가수분해 하여 단당으로 만든 후 이들 단당을 발효 원료로 하여 에탄올을 생산하는 공정이다. 산을 이용한 가수분해 방법은 산의 농도와 반응 온도에 따라서 낮은 농도의 산으로 고온에서 반응을 시키는 묽은 산 가수분해 공정과 높은 산 농도로 상대적으로 낮은 온도에서 반응을 시키는 진한 산 가수분해공정으로 나눌 수 있다. 진한 산 가수분해 공정은 묽은 산 가수분해 공정에 비하여 당 수율이 높고 발효 저해물질의 생성이 적다. 하지만 사용 하는 산의 농도가 높아 산의 회수나 처리가 문제 되고 있다.

목질계 자원의 주성분은 다당류를 구성하는 셀룰로오스, 헤미셀룰로오스와 함께 페놀성 화합물의 축합 구조인 리그닌으로 구성되어 있다. 침엽수와 활엽수에 존재하는 셀룰로오스는 성분 함량의 차이는 있지만 물리적 화학적 구조는 거의 유사하다. 하지만 헤미셀룰로오스의 구조는 확연하게 다른데, 침엽수 헤미셀룰로오스는 6탄당 계열의 글루코만난이 주성분으로 이는 글루코스와 만노스로 만들어진 선형 공축합체이다. 침엽수 헤미셀룰로오스의 부성분으로 아라비노글루쿠로노자이란이 존재한다. 자이란의 기본 골격에 아라비노스와 글루쿠론산이 옆에 곁가지로 붙어 있는 형태이다. 하지만 활엽수의 자이란은 글루쿠로노자이란이 주성분이고 글루코만난이 부성분으로 존재한다. 따라서 침엽수 헤미셀룰로오스를 가수분해하면 주로 6탄당이 생성되는데 비하여 활엽수 헤미셀룰로오스를 가수분해하면 주로 5탄당 단당이 생성된다.

진한 산 가수분해 공정은 72%의 황산으로 목재 내 존재하는 다당류를 올리고당 형태로 분해하는 1차 가수분해 단계와 올리고당을 단당으로 분해하는 2차 가수분해 단계의 2단계로 이루어져 있다. 2차 가수분해 반응의 조건에 따라서 단당으로 전환된 이후 추가적인 반응에 의하여 당의 분해 반응이 일어난다. 포도당과 같은 6탄당은 산성 조건에서 5-hydroxymethylfurfuraldehyde (5-HMF) 구조로 탈수 재배열을 한 다음 levulinic acid와 개미산으로 분해된다.^{1,2,3)} 자일로스와 같은 5탄당은

산성조건에서 furfuraldehyde구조로 탈수 재배열을 하는데 산성조건에서 불안정한 구조이다.^{3,4,5)}

이상적인 진한 산 가수분해 공정은 2차 가수분해 조건에서 다당류가 전부 단당류로 전환되고 더 이상 반응을 하지 않는 것 이지만 2차 반응조건에서 단당류는 안정적이지 못하다. 따라서 2차 가수분해 반응의 동역학적 해석을 통하여 최적의 2차 가수분해 반응조건을 찾는 것이 높은 당 수율을 얻기 위하여 필수적이다. 또한 단당류가 반응하여 생성되는 furfuraldehyde, 5-HMF나 개미산은 이후 당화액의 발효 공정에 저해 물질로 작용할 수도 있기 때문에 발생량을 적절하게 조절해야만 한다.^{6,7)}

일반적으로 개미산은 6탄당의 탈수 재배열에 의하여 생성된 5-HMF가 산성 조건에서 개미산과 levulinic acid로 절단 반응과 재배열 반응에 의하여 생성되는 것으로 알려져 왔다. 하지만 본 연구진의 선행 연구에서는 자이란의 진한 산 가수분해 과정에서도 개미산과 furfural이 생성되는 것으로 밝혀졌다.⁸⁾ 따라서 본 연구에서는 활엽수 자이란을 구성하고 있는 자일로스와 글루쿠론산의 2차 가수분해 조건에서의 안정성과 반응산물 분석을 통하여 목질계 바이오매스 자원의 2차 가수분해 최적 조건 탐구 및 개미산 발생 경로를 추적하고자 하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

D-자일로스, D-ribose와 D-글루쿠론산 시약은 Sigma-Aldrich사의 시약 등급을 사용하였다.

2.2 실험 방법

2차 가수분해는 D-자일로스나 D-글루쿠론산 70.0 mg 에 72% 황산 0.8 ml와 중수 (D₂O) 3.2 ml를 첨가한 후 100, 110, 120℃에서 75분, 90분, 105분, 120분간 반응시킨 후 냉각 시키고 여기에 표준물질로 30 mg의 D-ribose를 첨가하여 완전하게 녹인 후 여과하여 당 분석에 사용하였다.

2.3 분석

산 가수분해에 의한 단당류의 조성 분석은 1H-NMR

기기를 사용하여 분석하였다.⁹⁾ 분석은 충북대학교 공동실험실습관에서 Bruker사의 500MHz ¹H-NMR 기기를 사용하였으며 특징적인 피크를 측정하고 Bruker사의 Topspin 프로그램으로 각 피크 면적을 적분하여 정량적인 분석에 사용하였다. 분석 조건은 전보의 분석 조건과 같다.⁸⁾

3. 결과 및 고찰

3.1 2차 가수분해 조건에서 자일로스와 글루쿠론산의 분해기작

자이란은 목질계 자원의 종류에 따라 그 구조가 다른데, 침엽수는 아라비노스가 결가지로 존재하는 아라비노글루쿠로노자이란으로 존재하지만 대부분의 활엽수에서는 아라비노스가 결가지로 존재하지 않는 글루쿠로노자이란으로 존재한다. 활엽수 자이란을 산 가수분해 하면 D-자일로스와 4-O-methyl-D-glucuronic acid가 생성된다. 이들 두 가지 주 단당의 산성조건에서의 안정성은 2차 가수분해 최적 조건 탐구에서 매우 중요하다. 자이란 사슬에서 결가지로 존재하는 4-O-methyl-glucuronic acid는 자일로스의 2번 탄소에 알파 결합으로 존재하고 있으면 산 가수분해에 대한 저항성을 갖고 있다.¹⁰⁾

하지만 자이란은 산 가수분해에 대한 반응성이 셀룰로오스 보다 크기 때문에 산 가수분해 조건에서 셀룰로오스보다 먼저 단당류로 전환된다. 자이란의 산 가수분

해 실험에서 2차 가수분해의 온도와 시간에 따른 자일로스의 생성 정도와 생성된 자일로스의 분해에 관하여 이전 연구에서 보고하였다.⁸⁾ 자이란의 분해 과정에서 furfuraldehyde와 개미산이 생성되는데 높은 온도에서 오랜 시간 2차 가수분해를 실시할 경우 그 생성량이 증가하였다.

일반적으로 산 가수분해 반응에서 개미산의 생성은 글루코스가 탈수 재배열에 의하여 5-HMF가 생성된 후 이 화합물이 개미산과 levulinic acid로 절단 된다.¹⁾ 개미산은 *Clostridium acetobutylicum*에 의한 butanol 생산을 저해하기 때문에¹¹⁾ 개미산 생성량을 최소화 하는 조건으로 산 가수분해 당화 공정을 최적화해야 한다.

3.2 2차 가수분해 조건에서 자일로스와 글루쿠론산의 분해 정도

본 연구에서는 활엽수 자이란을 구성하고 있는 자일로스와 글루쿠론산을 표준물질로 사용하여 2차 가수분해에서 과정에서 furfuraldehyde와 개미산을 생성시키는 원인 물질을 탐구 하였다. 본 실험에 사용한 공시 재료는 단당이기 때문에 다당류에서 단당류로 전환시키는 1차 가수분해 조건은 생략 하였다. 산 가수분해에 의한 자일로스와 글루쿠론산의 잔류 정도는 산 가수분해 후 D-ribose를 표준물질로 사용하여 상대적 농도를 비교하여 측정하였다 (Fig 1). 수소 핵자기 공명 분석 결과 자이란 구성 단당과 표준물질 ribose 사이에서 아노머성 수소 피크의 분리가 명확하게 되어 이들 피크 면적의 적분 값으로 자일로스와 글루쿠론산의 잔류량을 정

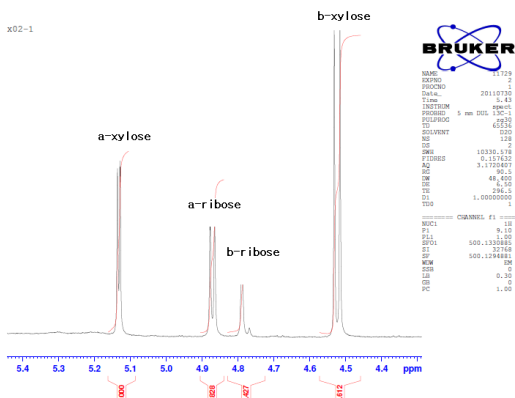


Fig 1. Anomeric hydrogen peak of D-xylose and D-ribose in ¹H-NMR spectrum.

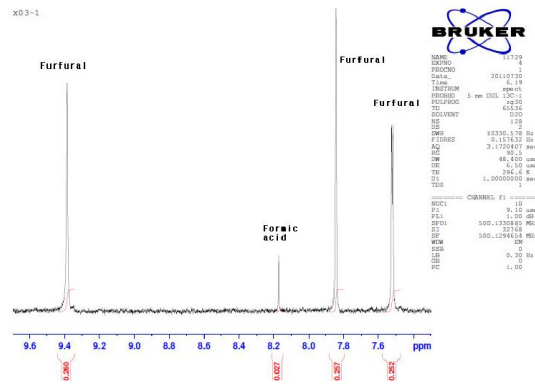


Fig 2. Furfural and formic acid peaks of D-xylose acidic reaction products in ¹H-NMR spectrum.

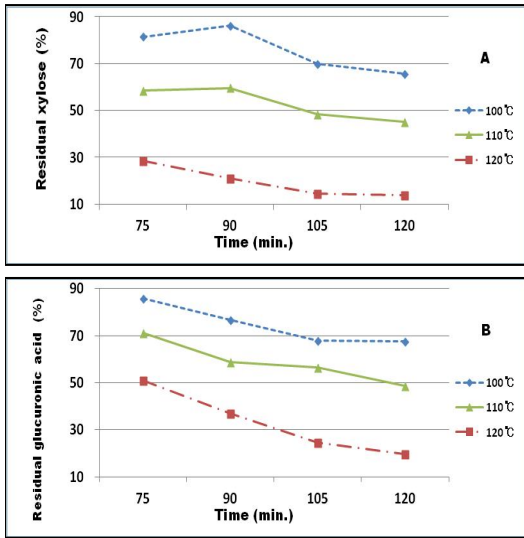


Fig 3. Residual xylose (A) and glucuronic acid (B) after exposed on second acid hydrolysis conditions at concentrated acid hydrolysis process.

량 분석 하였다. 이때 생겨난 furfuraldehyde와 개미산 피크를 적분하여 이들 산물의 생성량도 정량 분석 하였다 (Fig 2).

2차 가수분해 조건에서 자일로스와 글루쿠론산의 안정화를 비교하였다. 반응 온도가 높을수록 또한 반응 시간이 길수록 두 물질의 잔존량이 현저히 감소하였는데 그 정도는 자일로스와 글루쿠론산에서 모두 뚜렷하게 나타났다 (Fig. 3).

3.3 2차 가수분해 조건에서 자일로스와 글루쿠론산의 분해산물 분석

자일로는 산성 조건에서 탈수재배열하여 furfuraldehyde로 전환된다.^{12, 13} 2차 가수분해 조건에서 자일로의 상당 부분이 furfuraldehyde로 전환되었는데 고온에서 이런 현상이 더욱 뚜렷하게 관찰되었다. 하지만 글루쿠론산에서는 2차 가수분해 조건을 달리하여도 자일로스와 비교하여 단당의 탈수 재배열에 의한 aldehyde화 합물의 생성은 상대적으로 매우 적었다 (Fig 4). 반면에 강력한 butanol발효 저해물질인 개미산은 자일로스와 글루쿠론산 모두에서 발생하였다. 일반적으로 6탄당이 산 가수분해 조건에서 탈수 재배열에 의하여 5-HMF가 생성되고 산성 조건에서 지속적인 반응에 의하여 개

미산과 levulinic acid로 전환된다고 알려져 있다. 그러나 본 연구에서는 자이랄을 구성하고 있는 자일로스와 글루쿠론산 모두에서 2차 가수분해 과정 중 개미산이 생성될 수 있음을 확인하였다 (Fig 5).

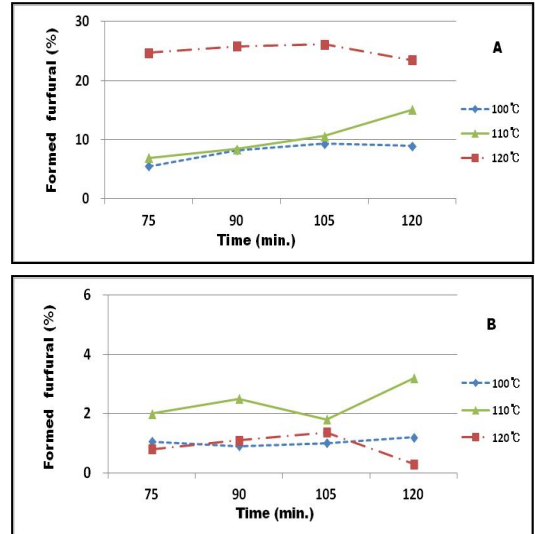


Fig 4. Formation of furfural from xylose (A) and glucuronic acid (B) during second acid hydrolysis at concentrated acid hydrolysis process.

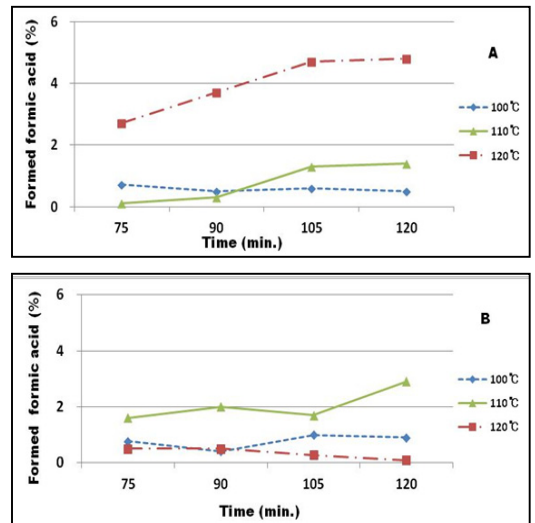


Fig 5. Formation of formic acid from xylose (A) and glucuronic acid (B) during second acid hydrolysis at concentrated acid hydrolysis process.

3.4 2차 가수분해 조건에서 자일로스와 글루쿠론산의 안정화 및 발효 저해 물질 억제 당화 조건

자일로스와 글루쿠론산의 2차 산 가수분해 조건에서 자일로는 상대적으로 높은 aldehyde 중간물질과 개미산으로 전환되었지만 글루쿠론산에서는 aldehyde 농도가 매우 낮고 개미산도 낮은 것으로 보아 다른 반응 경로를 통하여 분해되는 것으로 생각된다.

반응 온도가 100℃일 경우 잔류 자일로스와 반응하여 furfural이나 개미산으로 전환된 비율과 비교하여 대부분이 반응계에 액상으로 존재하지만 반응 온도가 높아짐에 따라 반응물의 축합에 의하여 만들어진 분석 불가능한 고체상 물질의 존재로 전체적인 물질 수지 계산에서 사라진 물질이 생겨난다. 일반적으로 산성 조건에서 aldehyde계열의 물질끼리 축합하여 고분자 물질을 만드는데^{14,15)} 바이오매스에서 생성 되는 이런 물질을 통칭하여 humin 이라고 부른다. 본 실험에서도 산성 조건에서 humin이 생성되어 자일로스나 글루쿠론산이 분해되더라도 furfural이나 개미산의 농도 증가가 급격하게 일어나지 않은 것으로 판단된다. 발효 저해 후보 물질인 furfural계열과 개미산의 생성을 최소화하고 단당 성분의 분해를 막기 위해서는 2차 가수분해의 온도를 상대적으로 낮은 온도에서 실시하는 것이 바람직하다고 판단된다.

4. 결론

활엽수 자이랑을 구성하고 있는 자일로스와 글루쿠론산의 진한 산 가수분해 시 2차 가수분해 조건에서의 안정성과 다른 산물로의 전환에 대하여 분석하였다. 1H-NMR 분석 기법으로 두 가지 단당류의 잔류량과 aldehyde계나 개미산으로의 전환을 정량적으로 분석하였다. 글루쿠론산보다 자일로스에 의하여 대부분의 단당 기반 aldehyde화합물들이 생성되었다. 6탄당의 산 가수분해 조건에서 5-HMF에 의하여 개미산이 생성된다고 알려져 있지만 글루쿠론산과 자일로스에서도 2차 가수분해 조건에서 개미산이 생성될 수 있음을 확인하였다. 발효 저해물질인 aldehyde계열과 개미산의 생성을 억제하기 위하여 2차 가수분해 온도를 낮은 조건

에서 실시하는 것이 바람직하다.

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. Girisuta, B., Janssen, L.P.B.M. and Heeres, H.J., Kinetic study on the acid-catalyzed hydrolysis of cellulose to levulinic acid, *Ind. Eng. Chem. Res.* 46:1696-1708(2007).
2. Runge, T. and Zhang, C., Two-stage acid-catalyzed conversion of carbohydrate into levulinic acid, *Ind. Eng. Chem. Res.* 51:3265-3270(2012).
3. Chheda, J.N., Roman-Leshkov, Y. and Dumesic, J., Production of 5-hydroxymethylfurfural and furfural by dehydration of biomass-derived mono- and poly-saccharides, *Green Chem.* 9: 342-350 (2007).
4. Lima, S., Pillinger, M. and Valente, A.A., Dehydration of D-xylose into furfural catalyzed by solid acid derived from the layered zeolite Nu-6(1), *Catal. Commun.* 9: 2144-2148 (2008).
5. Dias, A.S., Pillinger, M., and Valente, A., Dehydration of xylose into furfural over micro-mesoporous sulfonic acid catalysts, *J. Catal.* 229: 414-423 (2005).
6. Almeida, J.R.M., Bertilsson, M., Gorwa-Grauslund, M.F., Gorsich, S. and Liden, G., Metabolic effects of furfuraldehyde and impacts on biotechnological processes, *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 82: 625-638 (2009).
7. Shin, S.-J., Park, J.-M., Cho, D.-H., Kim, Y.-H., and Cho, N.-S., Acid Hydrolysis Characteristics of Yellow Poplar for High Concentration of Monosaccharides production, *Journal of the Korean Wood Science and Technology* 37(6): 578-584 (2009).
8. Cho, D. H., Kim, Y.H., Kim, B.-R., Park, J.-M., Sung, Y. J., and Shin, S.-J., Kinetic Study of Xylan Hydrolysis and Decomposition in Concentrated Sulfuric Acid Hydrolysis Process by 1H-NMR

- Spectroscopy, J. Korea TAPPI 43(3): 52-58 (2011).
9. Shin, S.-J. and Cho, N.-S., Conversion factors for carbohydrate analysis by hydrolysis and ¹H-NMR spectroscopy, Cellulose 15: 255-260 (2008).
 10. Roy, N. and Timell, T.E., The acid hydrolysis of glycosides :IX. Hydrolysis of two aldotriouronic acids derived from a (4-O-methylglucuro)xylan, Carbohydrate Research 6:482-487 (1968).
 11. Cho, D. H., Shin, S.-J. and Kim, Y.H., Effects of Acetic and Formic Acid on ABE Production by *Clostridium acetobutylicum* and *Clostridium beijerinckii*, Biotechnology and Bioprocess Engineering 17: 270-275 (2012).
 12. Yang, Y., Hu, C.-W., and Abu-Omar, M. M., Synthesis of furfural from xylose, xylan, and biomass using AlCl₃ · 6H₂O in biphasic media via xylose isomerization to xylulose, ChemSusChem 5(2): 405-410 (2012).
 13. Weingarten, R., Cho, J., Conner, W.M. and Huber, G.W., Kinetics of furfural production by dehydration of xylose in a biphasic reactor with microwave heating, Green Chem. 12: 1423-1429 (2010).
 14. Patil, S.K.P and Lund, C.R.F, Formation and growth of humins via aldol addition and condensation during acid-catalyzed conversion of 5-hydroxymethylfurfural, Energy & Fuels 25: 4745-4755 (2011).
 15. Dee, S.J. and Bell, A.T, A study of the acid-catalyzed hydrolysis of cellulose dissolved in ionic liquids and the factors influencing the dehydration of glucose and the formation of humins, ChemSusChem 4(8): 1166-1173 (2011).