

복합 세포간층 Lignin의 화학적 성상

嚴 泰 振

慶北大學校 農科大學 林産工學科

Chemical characteristics of Compound middle lamella lignin

Eom, Tae Jin

Dept. of Wood Science and Technology, College of Agriculture,
Kyungpook National University

Summary

The chemical characteristics of lignin in the differentiating xylem were investigated and compared with those of mature-wood.

The compound middle lamella lignin deposited in the early stage of lignification of cell walls in the softwood(Larch) as well as the hardwood(Birch) was confirmed to be the so-called guaiacyl-type lignin and was found to have a relatively larger content of phenoxy hydroxyl group as terminal units and to be more abundant in condensed-type structures like as phenylcoumaran structures compared with mature-wood lignin.

緒 論

고등식물에 있어서의 목화(lignification)는 탄수화합물로 부터 일련의 효소 촉매 작용에 의해 생성되는 방향족amino산으로 부터 유도된다. phenylalanine등의 방향족 amino산은 효소 촉매에 의한 탈 amino화와 환원 작용으로 cinnamyl alcohol류가 되어 peroxidase/H₂O₂에 의해 free radical을 생성하고 radical 중합에 의해 3차원 망상 구조의 lignin이 세포벽 중에 퇴적하게 된다. Wordrop¹⁾은 lignin의 퇴적이 cell corner에서 시작하여 세포간층, 2차벽의 순으로 진행된다고 보고하고 있다.

복합세포간층은 세포벽 총 체적의 8%, lignin함량은 전체의 20% 정도에 지나지 않지만 복합세포간층 lignin의 화학적 성상은 고등식물 세포벽의 목화기구(lignification mechanism)에 관한 연구뿐만 아니고 고수율pulp제

조공정의 개선 등의 관점에서 관련학자들의 흥미를 모으고 있다.

Terashima등¹³⁾은 방사선 동위 원소로 표시된 lignin monomer를 고등식물 세포벽의 여러 부분에 동화시켜 세포간층에는 주로 guaiacyl형 lignin이 퇴적하는 것으로 결론지었다. 이는 goring등⁵⁾의 UV-전자현미경에 의한 연구결과와 일치하고 있다. 한편, Freudenberg등⁶⁾은 coniferyl alcohol의 효소적 탈수소중합에 있어서 효소용액중에 monomer를 일시적에 첨가한 경우(혼합법, Zulanverfahren method)는 guaiacylglycerol- β -coniferyl ether의 결합보다 phenyl coumaran이나 pinosresinol등의 축합형 구조가 많이 생성되는데 비해 효소용액중에 monomer를 서서히 적하시키는 경우(적하법, Zutropfverfahren)는 guaiacylglycerol- β -coniferyl ether의 결합형이 많이 생성되는 것을 보고하였다. 그후, Sarkanen⁹⁾는 적

하법에 의해 생성되는 polymer는 고분자의 말단에 monomer가 하나씩 중합하여 분자량이 크고 guaiacyl glycerol- β -coniferyl ether의 결합형을 많이 갖는 end-wise polymer이며 혼합법에 의해 생성되는 polymer는 비교적 저분자량이며 phenylcoumaran형과 같은 축합형 구조를 많이 갖는 bulk polymer인 것을 보고 하였다.

이상의 연구결과는 lignin의 생합성 과정에 있어서 복합세포간층 lignin은 bulk polymer의 합성과 2차벽 lignin은 end-wise polymer의 합성과정과 유사한 것을 시사하고 있다.

본 연구에서는 아직 2차벽이 생성되기 전의 분화조직으로부터 단리·정제된 lignin은 세포간층 lignin에 유래하는 것으로 판단하여 그 화학적 성상을 성숙재로부터 단리 정제한 lignin과 비교하였다.

IV. 材料 및 方法

II-1. 시료 조제

수목의 부피성장이 가장 왕성한 6월에 약 30년 생의 자작나무와 낙엽송을 벌채하여 박피한 후 분화조직(DX)을 채취하였다. 조직중의 효소작용을 정지시키기 위해 ethanol중에 침적시켜 70°C에서 10분간 열처리 하였다. 분화조직으로부터 추출성분을 제거하기 위해 ethanol-benzen(1:2)용액으로 추출하여 건조시킨 후 willy mill에 의해 미분쇄화시켰다. 일반적으로 분화중인 조직은 많은 단백질을 포함하고 있으므로 이의 제거를 위해 단백질을 분해효소인 pronase(Boehringer, mannheim Gmbb)을 이용하여 다음과 같은 조건에 의해 탈단백시켰다.⁴⁾

; DX 10 g + pronase 1 g / 300ml sodium acetate buffer (pH7.5)
48hr with shaking agitation

pronase처리 분화조직은 원소분석에 의해 탈단백정도를 측정하였다. 조직중의 lignin은 klason lignin에 의해 정량하였다. 동시에 분화조직의 목화(lignification) 정도를 phloro-

gulcinol-HCL용액에 의한 정색반응¹⁾으로 관찰하였다.

II-2. Milled wood lignin(MWL)의 조제

침·활엽수의 분화조직 및 성숙재 목분을 오산화인(P_2O_5) 존재하에 진공건조에 의해 건조시켰다. 건조된 목분을 건조 toluene중에 현탁시켜 ball mill에 의해서 80시간 분쇄시켰다. 미분화된 목분을 건조시킨후 dioxane : water (9:1) 용액에 의해 초음파를 쏘이면서 추출하였다. Dioxane : water(9:1)에 의해 용출된 MWL은 Bjorkman법²⁾에 의해 정제하였다.

II-3. 원소분석 및 관능기 정량

단리·정제된 MWL은 원소분석을 통하여 원소조성을 분석하였다. MWL중의 비공역 페놀성 수산기를 $\Delta\epsilon$ 法²⁾에 의하여, methoxyl group을 hydro iodoc acid법³⁾에 의하여 정량하였다.

II-4. Alkaline nitrobenzene 산화분해

MWL 20mg을 10ml용 autoclave에 넣고 4ml의 2N NaOH와 0.2ml의 nitrobenzen을 첨가한 후 160°C에서 2시간 반응시켰다. 반응생성물은 Schultz등¹¹⁾의 방법에 의해 크로로포름을 추출하여 얻어진 방향족aldehyde를 trimethylsilyl에 의해 TMS화 시켜 gas-liquid chromatography(GLC)에 의해 분석하였다.

GLS분석 조건은 다음과 같다.

column	: ov-101,
air	: 1 l / min
column temperature	: 180°C,
detector	: FID
carrier gas	: He 15ml/min
H ₂	: 0.8atm
Internal standard	: Acetoguaiacone

II-5. arylglycerol- β -arylether(β -0-4)구조와 phenylcoumaran(β -5)구조의 정량

약 20mg의 MWL을 물과 methanol을 포함하는 초산용액(H₂O: methanol: acetic acid = 3:1:16)30ml에 현탁시키고 얼음으로 냉각시

키면서 3% 오존을 포함하는 산소를 0.5N₂/min의 기체량으로 3시간 흡입시켜 오존분해하였다. 반응종료 후 즉시 N₂ gas를 흡입시켜 잔류오존을 제거한 후 건고시켰다. 소량의 물로 오존분해물을 추출하여 pH10에서 24시간 검화 시킨 후 양이온교환수지에 의해 Na이온을 제거시키고 건고하였다. 생성물의 TMS화물을 GLC에 의해 분석했다.

GLC조건; column: ov-101
capillary column(0.25mm×50m)
column temperature: 150-270°C,
4°C/min

lignin 오존분해 산물의 chromatography의 한 예를 그림 1에 표시하였다.

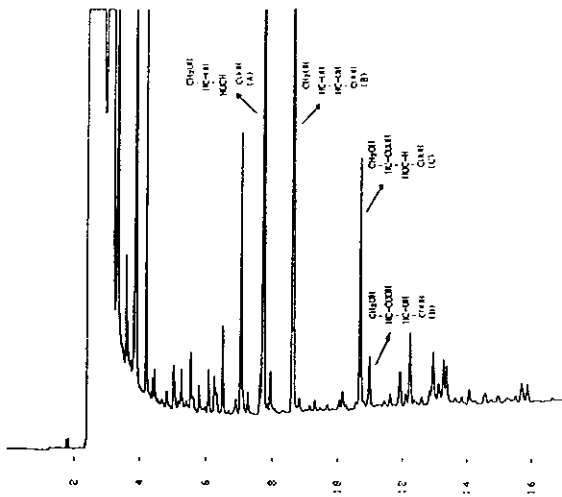


Fig. 1. Gas chromatogram of ozonation products.

II - 6. MWL의 gel permeation chromatography(GPC)

MWL의 분자량 분포를 측정하기 위해 waters ALC/GPC 244 system(column: μ -styragel 100000, 10000, 1000, 500, 100, eluent: chloroform)에 의해서 GPC 분석을 하였다.

표준물질로서 polystyrenes(\overline{MW} : 47500, 35000, 15000, 9000, 4000, 2000, 1050)을 사용하였다.

III. 결과 및 고찰

III - 1. 분화조직의 정색반응 및 탈단백질

침·활엽수 모두 형성층으로부터 20-25개의 새로운 세포가 분화되어 있으며 그중 초기에 형성된 세포는 이차벽의 형성이 시작되고 있는 단계였다. 정색반응에 의해 목섬유 혹은 가도관 사이의 복합세포간층 및 활엽수 도관 주위는 lignin 퇴적이 진행되고 있지만 목섬유 및 가도관의 2차벽에는 아직 lignin이 퇴적되지 않았다.

Takabe 등¹²⁾이 2차벽 lignin은 S₃층의 형성기가 되어야 2차벽의측으로부터 퇴적하기 시작한다고 보고하고 있으므로 본 실험의 분화조직중에 포함되는 lignin은 세포간층 lignin이라고 판단할 수 있다.

Table 1. Change of nitrogen content in DXs with pronase treatment(%)

Pronase treatment	Brich DX	Larch DX
Original xylem	2.50	2.20
1st treated	1.06	0.10
2nd treated	0.95	0.05
3th treated	0.32	0.01

분화조직중의 lignin의 성상을 검토하기 위해서는 조직중의 단백질을 제거하는 것은 매우 중요한 일이다. 표1에서 보는바와 같이 자작나무 분화조직의 경우 수차에 걸친 pronase 처리에 의해서도 잔존하는 질소는 주로 세포벽에 결합하고 있는 단백질로 생각되며 Whitmore¹⁶⁾는 coniferyl alcohol의 탈수소중합에 있어서 단백질이 dehydrogeated polymer에 결합하는 것을 밝히고 있어 단백질의 일부가

lignin과 밀접한 상태로 존재하고 있음을 시사하고 있다.

한편, 낙엽송의 경우는 1회의 pronase처리에 의해 단백질의 대부분이 제거되었다. 이것은 분화조직에 있어서의 단백질의 존재양식에 차이가 있음을 보여주는 것으로 침엽수보다는 활엽수에 있어서 세포벽 결합단백질이

보다 많이 존재하는 것으로 생각되어진다.

III-2. MWL의 원소조성 및 관능기 분석

분화조직 및 성숙재로 부터 단리한 MWL의 수율과 화학 분석결과를 표 2에 표시하였다.

Table 2. Analytical compositions of milled wood lignin(MWL)

MWL	Yield* of MWL(%)	Elementary analysis (%)				OCH ₃ (%)	ph-OH (%)
		C	H	O	N		
Birch DX	1.3	60.1	5.9	30.6	3.4	8.0	1.4
Birch mature wood	12.3	58.0	6.1	35.7	0.1	20.6	0.4
Larch DX	21.6	59.7	6.0	3.4	0.3	10.2	1.9
Larch mature wood	13.4	60.8	5.8	33.3	0.1	12.9	1.4

*; Based on klason lignin

자작나무의 경우 분화조직으로 부터 MWL의 수율이 1.8%로서 성숙재의 12.3%에 비해 현저하게 낮았다. 이것은 분화조직의 세포벽이 극히 얇고 부드러기 때문에 ball mill에 의한 마쇄효과가 충분치 않았거나 분화조직중의 lignin은 탄수화합물과 매우 밀접한 상태로 존재하고 있기 때문에 생각되어진다.

또, methoxyl기의 함량이 성숙재에 비해 매우 낮은 것은 활엽수재 세포간층 lignin은 주로 guaiacyl-unit로 구성되고 있음을 나타내고 있다. 한편, 매우 특이하게 낙엽송의 경우 분화조직으로 부터의 MWL 수율이 성숙재의 수율보다 훨씬 높았다.

Goring등¹⁵⁾은 spruce재에 있어서 MWL은 주로 가도관 2차벽 lignin으로 부터 유래한다고 하였으나 본결과에 의하면 세포간층 lignin이 ball mill에 의해 보다 단리되기 용이한 것으로 MWL은 주로 복합세포간층 유래인것을 시사하고 있다. 침·활엽수 모두 분화조직 MWL중의 methoxyl group은 성숙재 MWL보다 낮은 것으로 어느것이나 guaiacyl형 lignin이며 phenol성 수산기함량이 성숙재보다 높게 나타났다.

III-3. Nitrobenzene산화 분해

분화조직 및 성숙재 MWL의 nitrobenzene 산화 분해결과를 표3에 표시하였다.

Table 3. Nitrobenzene oxidation products from MWLs of differentiating xylems and mature woods.

Oxidation product	Birch wood		Larch wood	
	DX	M.W	DX	M.W
<i>p</i> -hydroxybenzaldehyde(%)	0.7	—	0.5	0.3
Vanilline(%)	1.6	9.2	29.0	36.9
Syringaldehyde(%)	2.2	34.5	t	0.5
Yield(%)	4.5	43.7	29.5	37.7
S/V molar ratio	1.2	3.1	—	—

활엽수의 경우 분화조직 MWL의 aldehyde 수율이 성숙재 MWL의 1/10에 지나지 않는 것과 s/v비가 낮은 것은 목화초기에 축적하는 lignin, 즉 복합세포간층 lignin이 guaiacyl unit로 구성되는 축합도가 높은 lignin인 것을 나타내고 있다. 단 분화조직 lignin중에는 소량이지만 *p*-hydroxyl unit가 포함되어 있었다.

침엽수의 경우, *p*-hydroxybenzaldehyde의 수율은 분화조직과 성숙재 MWL사이에 명료

한 차이는 보이지 않지만 vanilline의 수율이 분화조직 MWL에 있어서 성숙재의 그것보다 8% 정도 낮은 사실은 활엽수와 마찬가지로 침엽수의 경우도 복합세포간층 lignin의 축합도가 매우 높은 것을 시사하고 있다.

III-4. β -O-4결합형과 phenylcoumaran구조의 비교

lignin의 생합성되는 과정에서 mono lignol의 공급상태, peroxidase의 활성등에 따라 피상lignin(bulk polymer) 및 쇄상lignin(end wise polymer)가 생성되는 것으로 알려져 있다.¹⁰⁾

쇄상lignin의 경우는 mono lignol사이에 β -O-4결합형이 추가 되고 피상 lignin의 경우는 phenyl coumaran구조 및 β - β 형 결합을 보다 많이 포함하는 것이 특징이다.⁷⁾ lignin을 오존에 의해 산화분해시키면 β -O-4형 구조로부터는 theronic acid(Fig. 1의 화합물A) 및 erithronic acid(Fig. 1의 화합물B)와 같은 mono carboxylic acid가 생성되고 phenyl coumaran구조로부터는 이성질체 dicarboxylic acid(Fig. 1의 화합물 C와 D)가 생성되므로 화합물(A+B)와 화합물(C+D)의 생성비에 의해 lignin중의 β -O-4결합형 및 phenyl coumaran구조의 量比를 비교하는 것이 가능하다.

표 4에 분화조직 MWL 및 성숙재 MWL의 오존분해산물의 분석결과를 나타내었다.

Table 4. Relative contents of dicarboxylic acids (C+D)* / monocarboxylic acid(A+B)*

Species	DX	Mature wood
Birch	0.25	0.10
Larch	0.20	0.12

*; compound A,B,C,D shows in Fig. 1.

분화조직 MWL이 성숙재 MWL보다 높은 (C+D)/(A+B)비를 보이는 것은 분화조직 MWL이 phenylcoumaran과 같은 축합형구조를 보다 많이 갖는 축합형 lignin임을 나타내고 있다.

III-5. MWL의 분자량 분포

GPC에 의한 MWL의 분자량 분포곡선을 그림 2에 나타내었다.

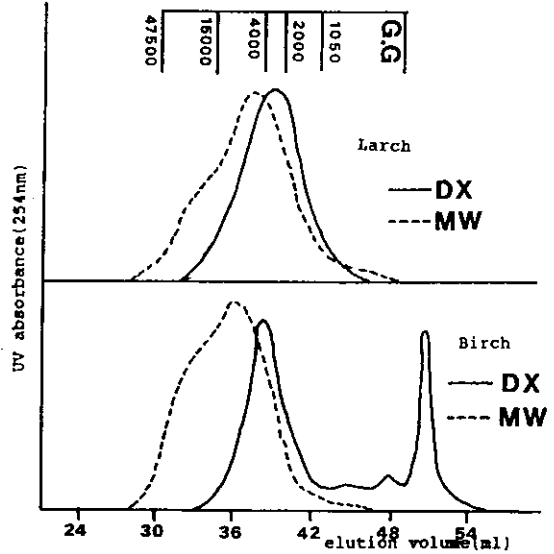


Fig. 2. G.P.C curves of MWLs.

분화조직의 MWL(main peak; \overline{MW} 6000)이 성숙재 MWL에 비해 저분자영역에 분포하고 있다. 이와 같은 결과는 세포간층에 있어서의 목화가 2차벽의 목화에 비해 mono lignol의 농도가 높은 상태에서 진행하므로 말단기로서의 phenol성 수산기를 많이 갖는 저분자량의 lignin이 퇴적하는 것을 나타내고 있다.

IV. 摘 要

세포간층 lignin은 2차벽 lignin(end-wise-polymer)에 비해 축합도가 높으며 guaiacyl type의 phenol성 수산기등 말단기를 많이 갖는 2차벽 lignin보다 저분자량의 bulk polymer

형 lignin이다.

引 用 文 獻

1. Aler, E., K.J. Bjorkquist and S. Haggroth. 1948. Zur kenntnis der carbonylagrouppen in lignin. Acta Chem. Scand. 2;93-102.
2. Aulin, E.G. 1958. spectrographic contributions to lignin chemistry. Svensk papperstidn. 61; 187-193.
3. Bjokman, A and B. Person. 1957. Studies on finely divided wood. Svensk Papperstidn. 60; 158-165.
4. Eom.T.J., G.Meshitsuka and J. Nakano. 1987. Chemical charateristic of lignin in differentiating xylem of brich wood. Mokuzai Gakkaishi 33(7);576-581.
5. Fergus, B.G. and D.A.I. Goring. 1970. The location of guaiacyl and syringyl lignins in brich xylem tissue. Holzforschung. 24;118-124.
6. Freudenberg, K. 1965. The process of lingnin formation. Science. 148;595-597.
7. Lai, Y.Z. and K. Sarkanen. 1975. Species variation in lingnins. Cellulose Chem. Technol. 9;239-246.
8. Kato, K., J. Nakano and N. Migita. 1967. Studies on tobacco lignin. Agricultural and Biological Chemistry. 31; 1010-1015.
9. Sarkanen, K.V. 1972. Lignins. pp.151-153, Willy Interscience. New York.
10. Sarkanen, K.V. 1972. Lignins. pp160-164. Willy Interscience. New York.
11. Schultz, T.Y. and M.C. Templeton. 1986. Proposed mechanism for the nitrobenzene oxidation of lignin, Holzforschung. 40;93-97.
12. Takabe, S. and Y. Hukasawa. 1986. Lignification of tracheides in tension wood. 27th lignin sympo. kyoto. pp.1-4.
13. Terashma, N., K.Fukushima and S. Tsuchiya. 1986. Heterogeneity in formation of lignin VII. An autoradiographic study on the formation of guaiacyl and syringyl lignin inn poplar. J. wood chem Technol. 6(4);495-504.
14. Wardrop, A.B. 1967. Lignification of the plant cell wall. Appl. Polymer Symp. 28; 1014-1063.
15. Whiting, P. and D.A.I.Goring. 1982. Chemical charaterization of tissue fraction from the middle lamella and secondary wall of black spruce tracheids. Wood Sci. Technol. 16;261-267.
16. Whitmore. F.W. 1978. Binding of ferulic acid to cell walls by peroxidase of *pinus elliotii*. Plant Science Letters. 13; 241-245.