

## 미류나무 분화조직중 세포벽다당류의 화학적 성상\*<sup>1</sup>

엄 태 진\*<sup>2</sup> · 박 윤 제\*<sup>2</sup>

### Chemical Characteristics of Cell-Wall Polysaccharides in Differentiating Xylem of *Populus deltoides* M.\*<sup>1</sup>

Tae-Jin Eom\*<sup>2</sup> · Yun-Je Park\*<sup>2</sup>

#### ABSTRACT

The chemical composition of differentiating xylem of *Populus deltoides* M. were investigated and compared with those from sapwood.

The cell wall polysaccharides were extracted sequentially from a differentiating xylem and sugar composition was analyzed with G.L.C, H.P.L.C and gel chromatography.

The pectin substance and hemicellulose are rich in the cell wall of differentiating xylem. The H<sub>2</sub>O extract polysaccharides from differentiating xylem were composed with xylose-glucose residues which seem to be xyloglucan and a pectin. The arabinogalactan and the mannan were extracted with Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> solution and also the xylan was extracted with KOH solution. Sugar composition of each fractions in gel filtration of purified H<sub>2</sub>O polysaccharide suggests that the xyloglucan can be extracted with H<sub>2</sub>O from differentiating xylem.

**Keywords** : Cell-wall polysaccharides, differentiating xylem, sugar composition, pectin, xyloglucan, gel chromatography

#### 1. 서 론

식물의 세포벽은 식물체의 외형을 결정 짓는 바탕이며, 외부의 각종 stress로부터 세포질 각 성분을 보호하고 지구의 중력에 대하여 수직으로 수간을 지

지하며 수분통도의 역할을 하는 식물의 생명력 그 자체라고 할 수 있다. 또한 이들 식물 세포벽은 인류를 위한 양식, 섬유, 에너지등의 유용한 자원이기도 하다.

한편, 고등식물의 세포벽 다당류는 식물의 성장·분화에 대하여 생리활성을 갖는다는 것(Albersheim

\*<sup>1</sup> 접수 1998년 7월 20일 Received July 20, 1998

본 연구는 1995년 경북대학교 학술진흥재단의 지원에 의해 수행되었음

\*<sup>2</sup> 경북대학교 농과대학 College of agriculture, Kyungpook National University, Taegu 1370, Korea

et al, 1984)이 알려진 이후 세포는 성장과 함께 그 구성 성분을 활발하게 대사시키면서 식물의 신장·분화를 스스로 억제·조절하고 있다는 설(Sakurai et al, 1991)이 유력해지고 있는데 예를들면, xyloglucan은 Pea 줄기에 관한 실험(Shimizu et al, 1997)등을 통해 신장생장에 주요한 영향을 미친다고 보고되었다. 그러므로 이러한 식물세포벽의 구조, 생합성 메카니즘 그리고 식물체 내에서의 다양한 기능들을 이해하는 것은 매우 중요하다고 할 수 있다.

또 식물세포의 증식 능력 즉 유전자의 복제 능력에 관해서도 식물세포벽이 결정적인 역할을 하는 것으로 알려져 있다. 세포벽 분해 효소에 의해 세포벽이 용해되어 만들어진 protoplast를 세포벽 합성 저해 물질이나 세포벽 분해효소의 존재하에서 배양하면 세포벽은 재생되지 않는다. protoplast가 세포 분열하여 calluse가 되고 calluse로부터 식물 개체기관이 분화 되기 위해서는 세포벽의 재생이 필요하다고 확인되고 있다(Sakurai et al, 1991). 세포가 분화하여 여러 가지 조직을 형성함에 동반하여 세포벽은 여러 형태로 변화하며 이때 세포벽 구성다당류의 조성 변화도 기대된다.

식물의 일차 세포벽에 관한 연구는 예전부터 많이 있어 왔지만 대부분이 배양세포를 이용한 연구였다. 이는 배양세포가 이차 세포벽을 포함하지 않은 순수한 일차 세포벽으로 주로 구성되어 있으며 실제 형성층으로부터 분화·성숙된 식물의 세포벽에 존재하는 비 셀룰로오스계 다당류의 조성과의 유사한 다당류를 함유하고 있기 때문이다. 그러나 형성층의 세포벽에 관한 연구는 극히 일부에 지나지 않는다.

본 연구에서는 수목의 형성층 세포분열과 생육이 활발한 시기에 미류나무로부터 분화조직을 채취하여 분화조직 세포벽 구성 다당류의 화학적 조성분을 성숙세포벽의 그것과 비교분석하고 분화조직 세포벽 다당류중 xyloglucan의 존재를 증명하여 식물세포의 신장과 분화를 둘러싼 세포벽 다당

류의 대사에 관한 기초 정보를 얻는 것을 그 목적으로 하고 있다.

## 2. 재료 및 방법

### 2.1 공시재료

경북대학교 연습림에 식재되어 있는 활엽수종 박피가 용이한 수종인 미류나무(*P. deltoides M.*)를 형성층의 분열활동이 활발한 시기인 6월(1996년 6월 12일)에 벌채·박피하여 깨끗한 물로 세척한 후 날이 둔한 플라스틱재 칼을 이용하여 분화조직을 채취하여 93% ethanol 용액중에 침적하였다. 채취한 분화조직은 ethanol용액중에서 70℃, 3hr 처리하여 효소활성을 제거하였다. 풍건시킨 시료를 wiley mill로 분쇄한 후 질소기류하에서 methanol / chloroform(1:1)혼합용매로 2시간 교반처리하여 여과하르로서 시료중의 조지방을 제거한 후 건조시킨 시료를 phenol / acetic acid / water(2:1:1)의 혼합용매로 실온에서 2시간 처리하여 여과한 후 건조시켜 조단백질이 제거된 분화조직 시료를 제조하였다. 비교를 위하여 형성층에서 가까운 변재부의 조직을 채취하여 분쇄한 후 methanol / chloroform(1:1) 용액으로 탈지하여 성수제 시료로 하였다.

### 2.2 화학조성분석

분화조직 및 성숙제의 분말시료를 원소분석(EA1108., Carlo·Erba)하고 Klason lignin과 산가용성 lignin을 정량하였다.

시료를 3% 황산으로 가수분해한 후 alditol-acetate법에 의해 중성당을 GLC와 HPLC로 분석하였다.

중성당 분석을 위한 GLC 및 HPLC의 조건은 다음과 같다.

한편, 산성당은 개량 Blumenkrantz(1973)법에 의하여 정량하였다.

	GLC	HPLC
Apparatus	Shimadzu GC-14A	Shimadzu LC-10AT
Column	3% ECNSS-M GasChrom Q	Shim-pack CLC-NH2
Column Temp.	180℃	60℃
Carrier	N2 gas	75% Acetonitrile
Detector	FID	RI

### 2.3 분화조직 다당류의 분별추출 및 Gel chromatography

분화조직을 200ml의 H<sub>2</sub>O, 0.05M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>, 1M KOH, 4M KOH, 4M KOH : Boric acid(1 : 1) 용액으로 연속 순차추출(Fig. 1)하여 cellulose 투석막으로 투석한 후 농축·동결건조하였다.

H<sub>2</sub>O추출물과 4M KOH추출물의 정제를 위하여 약 200mg의 추출고형분을 100ml의 2N NaOH 용액에 용해시킨 후 여과하여 불용부를 제거하고 여과액을 초산으로 pH 4로 조절한 후 냉장고 중에서 하루밤 방치한 후 원심분리하여 상등액을 제거하고 침반물을 증류수, ethanol, ether로 순차세정한 후 감압

건조하였다. GLC에 의해 정제다당류의 조성당분석을 하고 약 50mg의 정제다당류를 20ml의 1N NaOH에 용해시켜 Biogel P-2가 충전된 column (100×Ø1.5cm)에 주입한 후 0.1N NaOH를 사용하여 용출하였다. 용출액 5ml 씩을 시험관에 분취한 후 각 분획으로부터 0.5ml씩을 취하여 phenol-황산법(485nm)에 의해 총 환원당량을 측정하였다. 485nm에 높은 흡광도를 보이는 분획은 0.1N 초산을 첨가하여 중화시키고 물을 첨가하여 분획의 총 액량이 10ml가 되게 하고 72% 황산용액을 첨가하여 3% 황산용액이 되게 하였다. 각분획을 autoclave에 넣고 120℃에서 한시간 동안 가수분해시키고 냉각시킨 후 포화수산화바륨용액으로 pH 5가 되게하여 생성되는 황산바륨염을 제거하였다. NaBH<sub>4</sub> 환원시킨 후 생성된 환원당을 HPLC를 이용하여 조성당 분석을 하였다.

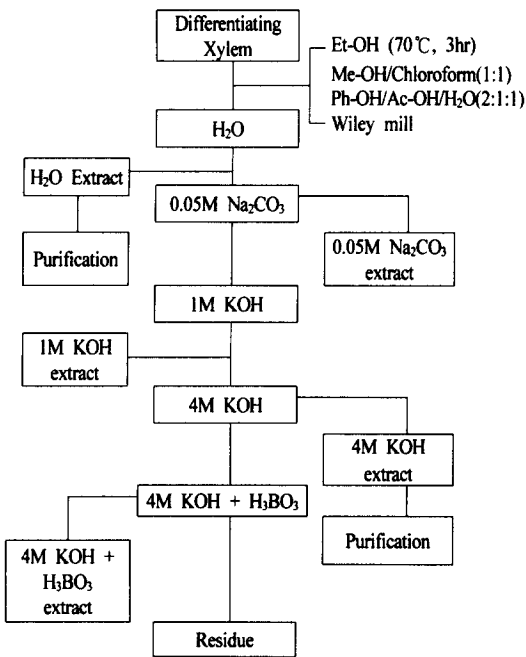


Fig 1. Scheme of extraction of Differentiating Xylem

### 3. 결과 및 고찰

#### 3.1 미류나무 분화조직 및 성숙재의 화학조성

성숙재에 비하여 세포분열후 세포질의 대사가 활발한 세포에는 많은 양의 단백질이 포함되어 있다 (Eom et al., 1987). 이는 일반적으로 섬유상의 구조단백질과 구상의 효소단백질이며 효소단백질은 구조단백질에 비하여 제거가 용이하다. 이들 단백질은 세포벽 다당류의 추출 및 화학 조성분석에 지장을 주게 되므로 제거하여야 한다.

Table 1에 분쇄된 시료로부터 Ph-OH/Ac-OH/H<sub>2</sub>O(2:1:1)의 혼합 용매로 단백질을 제거한 분화조직과 성숙재의 원소분석과 lignin정량결과를 나타내었다.

분화조직의 경우 성숙재에 비해 탄소 함량이 다소 낮고 산소를 많이 함유하고 있는 것을 볼 때 분화조

Table 1. Composition of element and lignin content of DX and Sapwood(%)

	Carbon	Hydrogen	Oxygen	Nitrogen	lignin		
					Total	Klason lignin	UV-lignin <sup>*1</sup>
DX <sup>*2</sup>	41.3	6.3	50.8	0.7	5.7	1.0	4.7
Sapwood	46.6	6.9	46.5	0.0	23.8	20.1	3.7

\*1 : Acid soluble lignin(205nm)

\*2 : Differentiating Xylem

직은 pectin과 같은 산성다당류를 많이 포함하고 있는 것으로 생각할 수 있고, 질소를 0.7% 함유하고 있어 용매추출에 제거되지 않은 단백질이 일부 포함되어 있는 것으로 생각되며 이는 세포벽 다당류와 화학결합 혹은 매우 밀접한 상태로 존재하기 때문으로 생각된다.

분화조직중의 lignin 함량은 5.7%로서 특히 산가용성 lignin의 함량이 높다. 식물 세포벽중의 단백질은 lignin에 높은 친화력을 보이고 황산에 의한 lignin의 정량에 있어서 lignin과 함께 거동하는 것(Eom 등, 1987)에 미루어 볼 때 분화조직 lignin중의 상당부분은 단백질에 기인하는 것이라고 할 수 있다. 따라서 실제 분화조직 중의 lignin은 보다 낮은 것으로 아직 2차벽의 목화는 진행되지 않은 시료임을 시사하고 있다.

또 폐쇄 혼합용제에 의해 탈단백시킨 분화조직중의 질소 함량은 0.7%로서 이는 단백질로 환산 할 때 약 4.5%에 해당하는 것으로서 다당류의 추출에는 그다지 영향을 미치지 않을 것으로 판단된다.

### 3.2 분화조직 및 분별추출다당류의 당조성 분석

Table 2는 분화조직과 성숙재의 당조성을 분석한 결과이다.

분화조직은 성숙재에 비하여 매우 많은 산성당(35.6%)을 함유하고 있다. 이것은 분화조직 중에는 pectin질과 같은 산성다당류를 많이 함유하고 있는 것을 나타내고 있으며 이는 원소분석결과와도 일치하고 있다. 펙틴질은 세포간층에 존재하며 lignin과 함께 세포와 세포를 접착시키는 기능을 하는 것으로 알려지고 있으며 펙틴질의 구성 산성당은 주로 galacturonic acid인 것으로 알려지고 있다(Simson 등, 1978B, Edashige 등, 1995).

또, 분화조직은 성숙재에 비해 glucose의 함량이 낮은 것으로 보아 분화조직 중에는 cellulose 이외에 hemicellulose 유래의 다당을 많이 함유하고 있다는 것을 알 수 있다.

분화조직 중의 glucose가 모두 cellulose로 부터 유래된 것이라고는 말하기 힘들며 xylose의 함량이 많은 사실과 함께 미루어 볼 때 xyloglucan의 존재를 예상할 수 있다. 그외 arabinose와 mannose도 성숙재에 비해 많이 포함하고 있다.

분화조직으로부터 순차적으로 추출단리된 다당류의 당조성분석결과는 Table 3에 나타내었다.

분화조직으로 부터 H<sub>2</sub>O에 의해 추출된 부분은 주로 glucose와 xylose로 구성되며 21.7%의 산성당을 함유하고 있어 상당량의 pectin 유래의 다당류가

Table 2. Sugar composition of DX and Sapwood (%)

	Total Neutral Sugar	Relative Neutral Sugar Component					Acidic Sugar
		Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	
DX	50.9	12.7	24.7	2.7	6.0	53.9	35.6
Sapwood	63.4	3.6	22.9	3.2	2.8	67.5	2.3

Table 3. Sugar composition of extracted polysaccharide (%)

Extract	Yield	Relative Neutral Sugar Component					Acidic Sugar
		Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	
H <sub>2</sub> O	7.0	8.4	23.2	4.1	t	64.3	21.7
Na <sub>2</sub> CO <sub>3</sub>	18.6	21.7	26.5	20.8	22.1	8.9	43.6
1M KOH	6.9	23.7	61.1	6.3	7.9	1.0	3.4
4M KOH	7.3	9.9	65.7	1.7	10.7	12.0	1.8
4M KOH + H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	8.6	20.9	8.8	1.9	68.3	t	0.9
Residue	40.6	5.2	5.4	5.1	t	84.3	t

t : trace

H<sub>2</sub>O에 용출된 것으로 판단된다. H<sub>2</sub>O추출물은 세포벽중에 화학 결합하지 않은 혹은 강고히 부착되지 않은 성분으로 생각되며 H<sub>2</sub>O추출물의 구성당이 xylose와 glucose인 것은 cellulose와 수소결합하지 않은 xyloglucan 혹은 glucan이 존재함을 시사하고 있다. 이러한 결과는 Simson등(1978A)이 *Populus tremuloides*의 형성층 다당류를 분석한 결과 형성층으로 부터의 H<sub>2</sub>O 용해물중에 형성층 시료에 대해 약 3% 정도의 xyloglucan이 포함되어 있다고 지적한 사실과 일치하고 있다. 또 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>에 의해 용출된 다당류의 산성당 함량이 높은 것은 세포벽 중의 pectin이 주로 용출되었기 때문이며 기타 arabinose, xylose, mannose 및 galactose로 구성된 다당류가 용출된 것으로 생각된다. 1M KOH 추출물과 4M KOH 추출물은 xylan을 주로하고 기타 소량의 다른 다당류가 포함되어 있다.

또 4M KOH와 Boric acid 혼합 용매에 추출된 다당류는 주로 arabinose와 galactose로 구성된 arabinogalactan인 것으로 추정된다.

여러 종류의 용매에 의해 순차적으로 추출되고 남은 잔사는 출발 분화조직 시료에 대해 약 40%로서 84%의 glucose를 포함하고 있는 것으로 주로 세포벽 cellulose인 것을 알 수 있다.

### 3.3 추출다당류의 정제 및 Gel chromatography

추출 다당류들 중 xyloglucan을 포함하고 있을 것으로 예상되는 H<sub>2</sub>O 추출물과 4M KOH 추출물을 정제하여 당조성을 분석한 결과 H<sub>2</sub>O 추출물은 glucose와 xylose의 mol비가 3.9 : 1로서 xyloglucan임을 시사하고 있으며, 4M KOH 추출물은 1 : 14.2

로서 주로 xylan으로 구성되어 있음을 추측할 수 있다. 정제 여과물의 당분석 결과 H<sub>2</sub>O 추출물의 경우 주로 glucose를 보이고 있으며 이는 H<sub>2</sub>O 추출물이 다량의 glucan과 xyloglucan 으로 구성되어 있음을 시사하는 것으로 추측된다. 정제 H<sub>2</sub>O 추출물의 Biogel P-2에 의한 용출곡선(Fig. 2)을 보면 고분자 영역의 큰 용출곡선과 저분자 영역에서의 peak를 보이고 있으며, 분획 6, 7, 8, 9의 조성당 분석결과 (Table 4) glucose와 xylose의 mol비가 각 1 : 3.9, 1 : 3.6, 1 : 4.2, 1 : 3.8로서 거의 같음을 알 수 있다. 만약, 정제 H<sub>2</sub>O 추출다당류가 glucan과 xylan의 혼합물인 경우는 Biogel P-2에 의한 gel 용출에 있어서 두 개 혹은 그 이상의 용출 곡선을 보일 것이며 두 다당류의 분자량이 비슷하여 하나의 곡선으로 용출되더라도 각 용출 분획중의 당조성은 서로 많은 차이를 나타내게 된다. 따라서 Table 4의 분획 6, 7, 8, 9에서 glucose와 xylose의 mol비가 거의 유사하고 다른 종류의 단당이 검출되지 않는다는 것은 정제 다당류가 xyloglucan임을 강력히 시사하고 있는 것이다.

Table 4. Molar ratio of xylose & glucose of each fraction in Fig. 2

Fraction Number	xylose	glucose
6	1	3.9
7	1	3.6
8	1	4.2
9	1	3.8

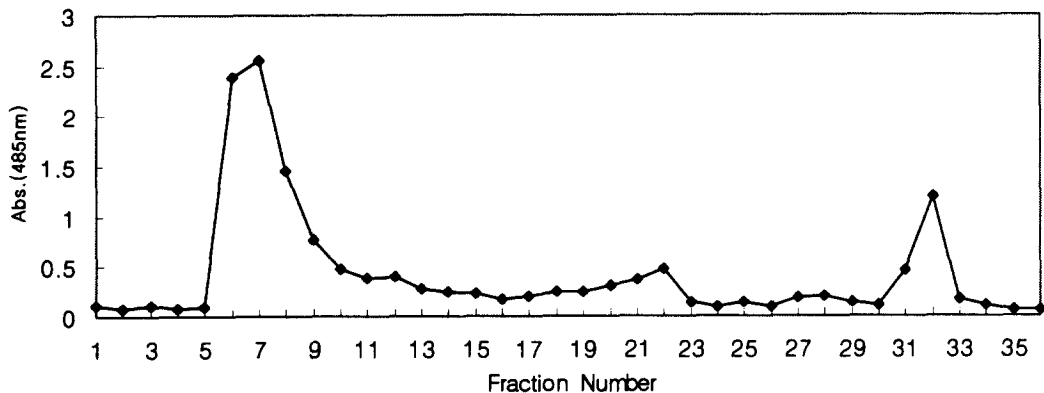


Fig 2. Gel chromatography of purified H<sub>2</sub>O extracted polysaccharide with Biogel P-2

Table 5. Monomer content of each fraction in gel chromatogram of purified 4M KOH extracted polysaccharide.

Fraction Number	xylose(%)	glucose(%)
14	98 <	t
15	98 <	t
16	98 <	t
24	t	98 <

t : trace

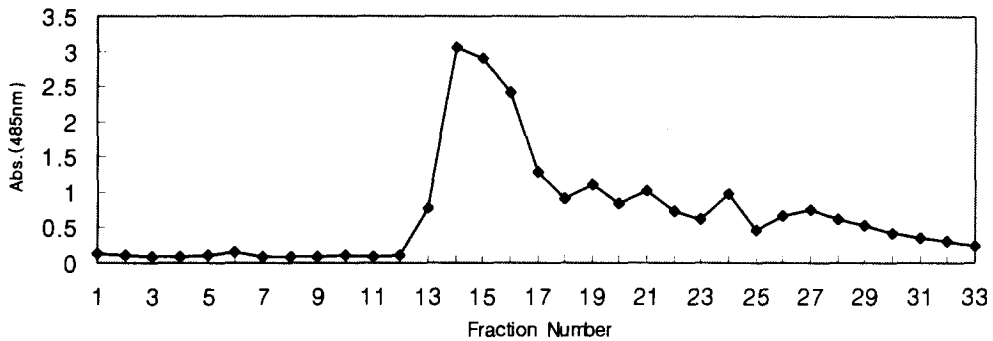


Fig 3. Gel chromatography of purified 4M KOH extracted polysaccharide with Biogel P-2

일반적으로 활엽수의 xyloglucan은 cellulose에 수소결합에 의해 강고히 결합되어 있는 것(Albersheim 등, 1984)으로 알려져 있는 사실에 미루어 볼 때 이상의 실험결과는 매우 예외적인 것으로 종래의 연구 결과들은 주로 배양세포에 의한 연구 결과이며 또 배양세포로부터의 H<sub>2</sub>O 추출 다당류에 대한 연구사례가 없음에 미루어 볼 때 보다 상세한 연구검토가 필요하다고 생각된다.

한편, 4M KOH에 의해 추출된 다당류중에 12% 정도의 glucose가 포함되어 있어 이는 xyloglucan 유래의 것일 가능성이 있다. 정제 4M KOH는 상술한바와 같이 glucose와 xylose의 mol비가 1 : 14.2인 점으로 미루어 xyloglucan과 xylan의 혼합물로 예상하였으나 Biogel P-2에 의한 용출 분획(Fig. 3)의 조성당 분석 결과(Table 5) 보다 고분자 영역의 xylan과 glucan의 혼합물로 생각된다.

#### 4. 결 론

미류나무 분화조직의 화학조성을 분석하여 변재의

화학조성과 비교하고 분화조직으로부터 순차 추출된 다당류의 화학조성을 분석하였다.

분화조직은 성숙재에 비해 pectin과 hemicellulose 유래의 다당류를 많이 포함하고 있으며, H<sub>2</sub>O 추출 분획중에는 pectin과 xyloglucan으로 추정되는 다당류와 Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 용액에는 주로 pectin과 arabinogalactan 과 mannan이 용출되고 KOH 용액에는 xylan이 용해되었다.

H<sub>2</sub>O 추출 다당류를 정제하고 겔여과시켜 얻어진 분획의 조성당 분석 결과 H<sub>2</sub>O 추출 다당류중에는 xyloglucan이 존재하고 있음이 추정 가능하였다.

#### 참 고 문 헌

- Albersheim, P., Darvill, A. G., Lau, K. R., McNeil, J. M., Sharp, M., York, J. K., (1984) Structure, function and biosynthesis of plant cell walls, *American Society of Plant Physiologists USA*, P. 19-51
- Blumenkrantz, N., Gustav A.-H., (1973) New

- method for quantitative determination of uronic acid, *Analytical Biochemistry*, 54, 484-489
3. Edashige, Y. Ishii, T. Hiroi, T. Fujii, T., (1995) Structural analysis of polysaccharides of primary walls from xylem differentiating zones of *cryptomeria japonica* D. Don. *Holzforshung*, 49, 197-202
  4. Eom, T-J., Meshitsuka, G., Nakano, Z., (1987) Chemical characteristics of lignin in the differentiating xylem of a hardwood, *Mokuzai gakkaiishi*, 33(7), 576-581
  5. Shimizu, Y., Hayashi, T., Kawada, T., Sakuno, T., (1997) Promotion of pea stem elongation by the fragments of plant cell wall polysaccharides. *Mokuzai Gakkaishi* 43 (2), 121-127
  6. Sakurai, N., Yamamoto, R., Katou, Y., (1991) 植物細胞壁と多糖類. 培風館, 東京, pp 32-47
  7. Simson, B. and Timell, T., (1978A) Polysaccharides in cambial tissues of *Populus tremuloides* and *Tilia americana*, *Cellulose Chem. Technol.* 12, 39-50
  8. Simson, B., Timmel, T., (1978B) Polysaccharides in cambial tissues of *Populus tremuloides* and *Tilia americana* IV, *Cellulose Chem. Technol.*, 12, 79-84