

木材 細胞壁中の 炭水化合物 間の 結合 様式(I) *¹

—炭水化合物의 單離—

李 相 弼*² · 李 鍾 潤*²

The Types of Linkage of Carbohydrates in Wood Cell Wall (I) *¹

— The Isolation of Carbohydrates —

Sang Pill Lee*² · Jong Yoon Lee*²

Summary

This study was performed to find out the types of linkage of carbohydrates in wood cell walls.

To study the structure of linkage of carbohydrates in wood cell walls, we have attempted to find out the method holocellulose preparation and optimum condition of enzyme hydrolysis in holocellulose, and fractionate oligosaccharide with products that hydrolyzed partly by acetolysis and deacetylation in holocellulose.

We have achieved four results. These results as follow;

1. At first, we reacted in wood meal NaClO_2 1g per lignin 1g for one hour and then the same of quantity NaClO_2 for four hours.

Through these experiments, we have developed new holocellulose preparation method which had low loss of carbohydrates and high effect of the delignification.

2. The optimum condition of enzyme hydrolysis of holocellulose which had lignin was 0.005M sodium acetate buffer (pH 5.0).

We have achieved 7.2% reducing sugar through the procedure that reacted 0.01g holocellulose putting enzyme 0.03g for 72 hours. It may be supposed that 5.5% of lignin contained in holocellulose prevented enzyme contact from holocellulose and so this lignin has resulted in the low efficiency of enzyme hydrolysis.

3. We did not fractionated from oligosaccharides which were prepared by the method of acetolysis and deacetylation in holocellulose. The reason is that holocellulose having a lot of lignin prevented perfectly partial hydrolysis from the method of acetolysis and deacetylation.

4. We attempted analysis of six standard substances through HPLC apparatus having sugar pak 1 column which we have changed flow rate and the column temperature variably. These six standard substances were D-glucose, D-mannose, D-xylose, D-galactose and L-rhamnose, L-arabinose, But sugar pak 1 column was not fitted analysis of four substances because D-galactose, D-mannose, D-xylose, L-rhamnose were agreement with elution time. And so, we could not analyze four standard substances with sugar pak 1 column.

*¹. 接受 6月 8日 Received Jun 8, 1987

*². 慶北大學校 農科大學 College of Agriculture, Kyung pook National University, Daegu 635, Korea.

1. 緒 論

高等物質의 細胞壁을 構成하고 있는 主要成分으로써는 cellulose, lignin과 함께 비cellulose계 多糖類(non-cellulose polysaccharides)로 構成된 hetero-polymer인 hemicellulose가 있다.

現在까지의 研究에 의하면 cellulose는 D-glucose가 $\beta-1, 4$ -glucoside 結合을 한 직쇄상 高分子 物質이라는 것이 밝혀졌으며, hemicellulose의 化學的 構造에 관하여서는 각종 chromatography 및 器機分析 技術이 급진적으로 發達한 1960年경부터 밝혀지기 시작하였다.

Hemicellulose의 研究는 1920年代 O'Dwyer¹가 闊葉樹 xylan의 構造에 대하여 처음으로 研究하기 시작하여 1959年 Hamilton²과 그의 공동 研究者는 針葉樹와 闊葉樹의 carbohydrates에 대하여 비교 研究하였고, Aspinall³등은 유럽 너도밤 나무를 木材로 하여 直接 alkali 추출법으로 xylan의 構造를 研究하였으며, 李⁴등은 열대산 闊葉樹材 xylan에 galacturonic acid의 잔기와 arabinose 잔기가 存在하고 있음을 證明하였으며, 그의 Timell⁵, 越鳥⁶, Zinbo⁷, Havliek⁸, Nicholas⁹등에 의해 수많은 研究가 있어서 hemicellulose의 化學的 構造에 대해서는 명백히져 가고있다.

1964年 Meier는 자작나무, 가문비나무, 소나무의 木材纖維, 細胞壁中の hemicellulose 分布 狀態 研究에서 3樹種 다같이 M(중간층)+P(1차벽)에 pectin이 많고, 자작나무에서 S₂(2차벽 중층)의 내층과 S₃(2차벽내층)에 cellulose가 많으며, glucuronoxylan의 大部分은 S₁(2차벽외층) 및 S₂에 存在하였고, 자작나무 및 소나무는 각벽층의 多糖類 造成이 비슷하였으며, S₁ 및 S₂ 외층에 cellulose가 많고, glucomannan含有量은 세포벽 外側에서 內側으로 향하여 점차 증가하였으며, arabinoglucuronoxylan은 S₃에 집적되었고 2차벽에서는 사실상 arabinan은 存在하지 않고, 2차벽의 galactan은 galactoglucomannan에서 有來한 것으로 여겨진다고 하였다.¹⁰⁾

Albersheim^{11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21)}과 그의 공동 研究者들은 植物의 현탁培養細胞 즉 1차벽만으로

된 것의 研究에서 cellulose의 microfibril의 표면 에 수소結合으로 xyloglucan이 結合하고, xyloglucan은 이것이 환원성 말단기인 glucose 잔기를 통하여 galactan과 結合하며 galactan은 이것이 환원성 말단기를 통하여 rhamnagalacturonan의 rhamnose잔기와 結合하고 rhamnagalacturonan은 arabinogalactan을 통하여 단백질과 結合하고 있다는 1차 세포벽의 構造 model을 1973년에 發表하였다.

Labovitch와 Ray²²⁾는 insoluble wall xyloglucan을 IAA(indole acetic acid)로써 soluble 形態로 轉換시켜 단리하여 wall xyloglucan molecules가 세포벽의 伸張에 主要한 역할을 하고 있음을 알았으며, Kato와 Matsuda²³⁾는 soluble xyloglucan과 wall xyloglucan의 分子量이 각각 약 20,000, 160,000이라고 하였으며, Shibuya와 Iwasaki²⁴⁾는 Rice Endosperm을 材料로 하여 cell wall 研究에서 hydroxy proline-containing glycoproteins이 cellulose microfibrils에 강하게 結合하고 있음을 發見하였다.

또한 Kato등은 immature Barley plants의 cell wall polysaccharides에서 β -D-glucan과 xyloglucan을 각각 단리하여 β -D-glucan은 (1 \rightarrow 3), (1 \rightarrow 4)-linked D-glucopyranosyl 잔기로 이루어졌으며, 分子量은 약 1.8×10^5 으로 추정하였고, xyloglucan의 構造는 glucose잔기가 $\beta-1, 4$ 결합한 직쇄상의 구조에서 glucose잔기 5개당 2개의 xylose잔기가 $\alpha-1, 6$ 結合으로 glucose에 分枝를 이루고 있다고 하였다.^{25, 26, 27)}

Hoffman등은 가문비나무 가도관의 2차벽에 있어서 hemicellulose의 농도는 S₁의 外側이 가장 높고 S₁과 S₂의 경계, S₂와 3차벽의 경계 순으로 되어 있다고 하였다.²⁸⁾

최근에는 Lomax²⁹⁾등은 植物의 細胞壁에 있어서 alkali 불안정 物質에 관한 研究등이 있다.

Albersheim이하 서술한 研究結果는 大部分 부유배양 植物體 즉 細胞壁이 아직도 lignin化 되지 않은 상태에서 研究한 結果이다.

그래서 植物의 세포벽이 完全히 lignin化된 高等植物에서 細胞壁內에 存在하는 炭水化合物間的 相互 結合樣式이 어떠한가에 대해서는 최근에 많은 主目を 받고 있다.

특히 細胞壁內에 存在하는 炭水化合物의 손상을 최대한 억제하면서 細胞壁內에서 炭水化合物과 相互結合을 하고 있는 lignin을 除去하는 方法이 研究課題가 되어왔다.

從來의 아염소산법에 의한 方法은 操作이 容易하고 大量의 木粉을 脫 lignin할 수 있어 염소-매탄올아민법이나 과초산법³⁰⁾과 함께 holocellulose의 調製에 利用되어 왔다.

그러나 脫 lignin 처리한 처리액중에는 lignin의 산화분해 生成物과 함께 상당한 양의 糖質部分이 大部分 多糖의 形態로 용출된다는 것이 指摘되었다.³¹⁾

本 研究에서는 미류나무(*Populus deltoides*) 장령목을 선발하여 木材의 세포벽內 炭水化合物의 손실을 최대한 抑制시키면서 脫 lignin 할 수 있는 새로운 holocellulose 調製法을 開發하고, holocellulose의 효소분해에 대한 최적조건과 分析으로 植物 細胞壁內에 存在하는 炭水化合物의 造成 및 炭水化合物의 結合 樣式을 규명하여 植物 細胞壁에 대한 보다 正確한 理解를 위한 基礎資料를 提供하고자 한다.

2. 材料 및 方法

2.1 試料調製

慶北大學校 校內에 植生하고 있는 미류나무

Table 1. The different stage of chlorite delignification for sapwood meal of *Populus deltoides*

No	Regant* (g)	Time** (hr)	Regant	Time	Regant	Time	Regant	Time	Regant	Time	Regant	Time
1	2	1	2	1	2	2						
2	2	1	2	2	2	2						
3	3	1	3	2								
4	3	1	3	1	3	1						
5	3	1	3	2	2	1						
6	3	1	3	1	3	1	3	1				
7	3	1	3	2	3	2						
8	3	1	3	2	3	2	3	2				
9	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1	3	1
10	3	1	3	4								

*Regant: NaClO₂, **Time: Reaction time.

(*Populus deltoides*) 장령목을 選定한 후 이를 채취 즉시 에탄올에 4일간 침적시킨 후 건조하여 변재 부위를 채취한 후 chip으로 만들고, 이를 Willey's mill로 분쇄한 80mesh이상의 木粉을 試料로 했다.

2.2 木材의 組成分 分析

木材의 組成分 分析에는 TAPPI 표준법 및 JIS 표준법을 中心으로 하는 一般的인 分析法³²⁾에 의해 다음과 같이 냉수추출, 온수추출, alkali 추출, 유기용제추출, klason-lignin 정량, 회분 分析을 하였다.

2.3 木材의 構成糖 分析

木材의 構成糖 分析은 酸 加水分解로 얻어진 單糖類를 간편하고 精確한 alditol-acetate法으로^{33, 34, 35, 36)} g.l.c 分析하였다.

G.L.C column 충전제는 3% ECNSS-M on gas Chrom Q.(100~120 mesh), column 온도는 200°C, 주입구의 온도는 220°C, 검출온도는 250°C, Carrier gas는 N₂ 45ml/min, 검출은 FID(Flame Ionization Detector)로 하였으며, column은 2.25m의 stainless column을 사용하였다.

2.4 Holocellulose의 調製方法

Asahina탈지 장치에 의해 에탄올-벤젠(1:2v/v) 혼합용제로 탈지한 목분 10g을 증류수 320ml, 빙초산 1ml와 Table 1.과 같은 조건으로 75°C에서 반응시킨후 반응 생성물을 여과하고, 냉수, 아세톤으로 순차적인 세정을 하여 holocellulose를 조제하였다.

그리고 조제된 각각의 試料는 Klason-lignin을 定量하였다.

2.5 Holocellulose의 酵素分解

Lignin이 상당량 포함되어 있는 holocellulose를 分解하기 위한 最適條件을 찾기 위하여 첫째, 반응에 사용되는 적절한 buffer를 찾기 위해 0.02M McIlvaine buffer(pH5.8)과 0.2M sodium acetate buffer(pH 5.0) 및 0.1M sodium phosphate buffer(pH6.9)를 利用하여 반응시간에 따른 結果를 검토하였고 둘째, 적절한 buffer에 대한 물농도를 변화시켜 생성된 加水分解物을 Somogi-Nelson法³⁹⁾에 의해 환원당을 定量하여 비교 검토하였다. 酵素의 加水分解는 다음과 같이 하였다.

Holocellulose 0.01g을 50ml용 삼각flask에 넣은후 일정량의 酵素를 녹인 buffer를 20ml 가한 후 2~3방울의 톨루엔을 떨어뜨려 밀봉한 후 40°C의 왕복 진탕식 항온수조에 넣고 80회/min로 일정시간 반응 후 100°C의 끓는 물속에서 15分間 酵素를 非活性化 처리하고 냉각 원심분리한 후 상등액 일부를 채취하여 환원당을 定量하였다.

2.6 Holocellulose로부터 Oligosaccharides 調製^{40, 41)}

2.6.1 Acetolysis 및 Deacetylation

Holocellulose 18g을 70ml galacial acetic acid, 70ml acetic anhydride, 7.5ml con. sulfuric acid 혼합용액에 1시간에 걸쳐 서서히 교반하면서 녹인다.

이 때 반응온도는 50°C를 유지시킨다.

Holocellulose를 다 넣은 후로부터 50°C에서 2시간 동안 반응시킨후 반응생성물을 1ℓ의 얼음물 속에 강하게 교반하면서 부어넣으면 acetyl 化한 oligosaccharides가 침전된다.

침전이 형성되면 과잉의 酸을 中和하기 위해 中和指示藥 congo-red를 소량 넣고 탄산나트륨으로 中和를 시킨다.

그런후 이것을 실온에서 하루밤 방치해둔후 침전물을 여과하고, 가성소오다상의 dry oven內에서 감압 건조하였다.

건조된 crude acetate 25g을 무수 메탄올 150ml에 용해시켜 여과하고 다시 75ml 무수 메탄올에 용해시켜 여과한다.

이때 不溶性 物質을 버리고 溶液을 40ml로 농축한후, 200ml의 증류수에 부어넣고 옹고를 위하여 10% sodium chloride 30ml를 가하여 냉장고 속에 하루밤 방치한 후, 원심분리하여 침전물을 오산화인 위의 dry oven內에서 감압 건조시켰다.

건조된 oligosaccharide acetate 混合物를 무수 메탄올 50ml에 溶解시켜 소량의 不溶性 物質을 원심분리 제거한다.

원심분리한 溶液을 0.7g의 sodium을 녹인 50ml 메탄올에 부어넣고 뚜껑을 한후, 反應液을 흔들며 주면서 2시간 동안 반응시킨다.

이때 형성된 유리 oligosaccharides의 침전물을 여과하고 메탄올로 세척한후 오산화인 위의 dry oven內에서 감압건조 하였다.

이때 건조된 생성물은 붉은색을 띤 짙은 황색이다.

2.6.2 Oligosaccharides의 分離 및 分析

2.6.2.1 Oligosaccharides의 分離⁴⁰⁾

2×70cm의 유리 column을 사용하여 충전제로써 charcoal 35g과 celite 35g을 무수메탄올에 1% stearic acid를 녹인 320ml의 溶液에 1시간반 동안 침적시킨후 여과하고 다시 50% 에탄올 320ml에 침적시킨후, 여과하고 최종적으로 10% 에탄올 200ml에 침적시킨후 column에 충전시켰다.

column을 증류수 1ℓ에 세척하고 加水分解物 1g을 column에 주입한후 염과 D-glucose를 除去하기 위하여 증류수 1ℓ로 세척하였다.

그런후 60% 에탄올(v/v) 1ℓ를 column 위에서 gradient elution하여 fraction collector를 사용하여 eluate를 받아모았다.

이때 분취량은 시험관을 이용하여 약 3ml씩 900ml를 분취 하였다.

그리고 각 시험관의 용액을 orcinol sulfuric acid로 비색계를 이용하여 흡광도를 구했다.

2.6.2.2 G.L.C 분석

Charcoal-Celite column에 의해分離된 oligo-saccharides를 酸加水分解한後, alditol-acetate 유도체로 하여 g.l.c로 분석하였다.

분석條件은 一般木粉의 構成糖 分析條件과 같다.

2.7 H.P.L.C 분석

試料는 標準物質 L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose를 각각 hpic용 물에 녹여 5% 溶液으로 만든 후 分析하였다.

分析條件은 Table 2와 같다.

Table 2. Analysis conditions of HPLC

Model	Column	Solvent	Detector	Flow rate (ml/min)	Column temp. (°C)
					60
				0.2	70
					80
Waters 441	Sugar Pak-1	Water	RI 16x		90
					60
				0.3	70
					80
					90
					60
				0.4	70
					80
					90
					60
				0.5	70
					80
					90

3. 結果 및 考察

3.1 木材의 組成分 分析

現在 利用되고 있는 木材 成分法은 1917年 미국의 Shorger氏의 木材 分析法을 基本으로 하며, 그의 많은 分析法이 있으나 本 實驗에서는 TAP-PI 표준법 및 JIS 표준법을 中心으로 하는 一般的인 分析法에 의해 分析하였다.

미류나무 變재부위의 化學的 組成分 分析結果는 Table 3과 같다.

Table 3. Composition of *Populus deltoides*(%)

Cold Water extract	Hot Water extract	1% NaOH extract	Organic solvent extract	Ash	Klason Lignin
2.8	4.4	27.2	9.0	0.7	24.0

3.2 木材의 構成糖 分析

木材의 構成糖 分析은 酸加水分解로 얻어진 單糖류가 水酸基를 가지고 있어 不活性이기 때문에 g.l.c 分析을 위하여서는 揮發性 誘導體로 만들어야 한다.

이 方法에는 Methylation³⁷⁾, TMS化³⁸⁾, 아세틸化法³⁹⁾ 등이 있으나 간편하고 精確한 alditol-acetate法으로써 g.l.c 分析하였다.^{33, 34, 35, 36)}

Table 4는 미류나무 變재의 糖分析한 結果이다.

Table 4. Sugar composition of Wood

Species	Components(%)					
	Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.
<i>Populus deltoides</i>	4.3	29.4	3.5	1.4	63.0	T*

T* : Trace, below 1%

糖分析에서 arabinose 잔기 및 galactose 잔기는 arabino-galactan에서, xylose 잔기는 4-O-methyl glucuronoxylan에서 有來되었다고 생각되며, 剝離수재 hemicellulose에는 galactoglucomannan이 存在하지 않기 때문에 mannose잔기는 glucomannan에서 有來된 것이다.

Glucose 잔기의 大部分은 cellulose에서 有來되며, 그중의 極히 일부는 glucomannan에서 有

來된 것이다.

Rhamnose는 흔적량을 보이는데 志水⁴²⁾ 등은 xylan에서 一部 有來한다고 하지만 pectin의 構成分으로 생각된다.

3.3 Holocellulose의 調製方法的 開發

一般的으로 holocellulose의 調製에는 아염소산염법이 많이 이용되는데 이는 아염소산염법이 大量의 木粉을 脫 lignin시킬 수 있으며, 조작이 간편하기 때문이다.

그러나 아염소산염법에 의해 脫 lignin시 산화 lignin과 함께 糖의 一部分이 加溶性의 多糖으로 溶出된다.⁴⁴⁾

특히 越鳥 등은⁴³⁻⁴⁶⁾ 아염소산염법에 의해 脫 lignin을 시킬 때 galactose와 arabinose의 손실이 특히 많다는 것은 이들이 lignin과 깊은 관련이 있지 않을까 하였으며, 脫 lignin 처리의 초기 단계에서는 galactose나 arabinose의 잔기를 가진 多糖類가 많이 용출되고 그 다음으로 glucomannan이며 xylan은 脫 lignin이 꽤 진행된 단계에서 溶出되기 시작한다고 하였다.

아염소산염법에 의해 脫 lignin 처리를 할 때 관여하는 인자로서, 첫째 시료목분의 크기, 둘째 반응시간, 셋째 처리회수, 넷째 처리온도, 다섯째 반응시약량 그리고 반응용매의 pH에 있다고 하였다.⁴³⁾

本 實驗에서는 細胞壁內에 存在하는 炭水化合物

의 손상을 최대한 억제시키면서 lignin을 많이 제거시키기 위하여 Table 1에서와 같은 여러가지 조건에서 아염소산염법에 의해 holocellulose에 대한 lignin含量과 構成糖 分析의 結果를 Table 5에 나타내었다.

脫 lignin 정도에 있어서는 No.8,9,10이 좋았으며 holocellulose의 수율에 있어서는 No.1,2의 방법이 좋았다.

試料 No.8,9,10을 비교하여 볼 때 No.8은 반응시약 NaClO₂가 12g 들어갔으며, 반응시간은 7시간이 소요되었고, No.9는 NaClO₂가 18g, 반응시간은 6시간, 그리고 시료 No.10은 NaClO₂가 6g 사용되었고, 반응시간은 5시간이 소요되었다.

또한 holocellulose의 수율에서는 No.10이 No.8,9에 비해 조금 높았다.

이와같이 반응시간이 짧고, 脫 lignin에 사용된 NaClO₂의 양이 제일 적으며, 本 實驗의 主目的인 脫 lignin시 炭水化合物의 손실을 최대한 억제하면서 lignin을 많이 제거할 수 있는 것에 부합하는 No.10의 방법이 holocellulose의 調製法에 가장 적합하다고 생각되어 本 實驗에서는 이 방법으로 holocellulose를 調製하였다.

3.4 Holocellulose의 酵素分解

植物 細胞壁內에 存在하는 炭水化合物의 構造를 分析하기 위한 한 方法으로써 生物學의 方法인 酵素를 利用하여 상당량의 lignin이 含有되어

Table 5. Lignin contents and sugar composition of holocellulose

No	Klason-lignin (%)	Yield of holocellulose (%)	Composition(%)					
			Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.
1	11.0	85.2	5.6	32.2	3.9	2.1	55.8	T*
2	10.2	84.3	3.1	31.0	3.4	1.6	58.7	T
3	9.0	81.2	5.2	30.5	4.3	T	59.3	T
4	8.0	80.4	5.0	30.1	4.0	T	60.0	T
5	8.0	80.3	4.8	30.3	4.2	T	60.1	T
6	7.3	79.1	4.1	28.3	4.8	T	63.0	T
7	6.7	79.5	3.6	27.4	2.4	T	65.0	T
8	5.1	78.7	1.7	25.6	3.0	T	69.2	T
9	4.8	77.2	4.0	26.2	4.9	T	64.6	T
10	5.5	79.3	2.3	26.1	3.2	T	67.0	T

T*:Trace, below 1%

있는 holocellulose를 加水分解 하기 위한 最適條件을 찾기 위하여 buffer의 種類를 바꾸고, 그리고 buffer의 농도를 변화시켜 실험한 結果를 Table 6, 7에 表示하였다.

Table 6. The effect of three types buffer sol. in relation to incubation time on enzyme hydrolysis

Reaction time(hr.)	48	60	72
Buffer sol.			
0.02M			
McIlvaine buffer (pH 5.8)	-	-	1.8
0.2M			
Sodium acetate buffer (pH 5.0)	-	-	2.4
0.1M			
Sodium phosphate buffer (pH 6.9)	-	-	1.2

Table 7. The effect of buffer con. in relation to incubation time on enzyme hydrolysis

Buffer con.	Reaction time (hr)			
	72	84	96	108
0.05M				
Sodium acetate buffer (pH 5.0)	7.2	7.2	7.2	7.2
0.1M				
Sodium acetate buffer (pH 5.0)	2.7	2.7	2.7	2.8
0.2M				
Sodium acetate buffer (pH 5.0)	2.4	2.5	2.4	2.4

위의 結果에서 sodium acetate buffer가 다른 두 buffer에 비해 더 좋은 效果를 나타내었으며, buffer의 농도에 있어서는 0.05M일 때가 分解效果를 가장 높게 나타내었다.

그리고 반응시간에 있어서는 최초반응시간에서 72시간까지는 分解에 있어서 차이가 났지만 72시간 이후에는 변화가 없었다.

그래서 위의 結果에서 最適인 0.05M sodium

acetate buffer를 利用하여 holocellulose 0.01g에 0.03g의 효소를 녹인 20ml의 효소용액을 가하여 72시간 반응시켰을 때 7.2%의 환원당이 생성되었다.

壁谷⁴⁷⁾은 cellulose계 폐기물의 有效利用에 관한 研究에서 holocellulose의 효소분해에서 48시간 반응으로 holocellulose가 거의 大部分 加水分解 된다고 하였지만 이들은 holocellulose중에 lignin이 0.7%로 거의 없는 상태에서 加水分解 하였기 때문에 짧은 시간에 holocellulose가 거의 大部分 加水分解 되었다.

本 실험에서 효소분해로 구한 환원당의 값이 낮은 것은 cellulose에 lignin과 hemicellulose가 立體的으로 강하게 結合하고 있기 때문에 효소분자가 cellulose分子에 接觸하는데 많은 방해를 받아 holocellulose가 完全히 分解될 수 없었다.

그러므로 holocellulose를 효소로써 分解性을 높이기 위하여서는 化學적 방법으로나, 物理的인 方法으로써 효소가 氣質의 表面에 接觸할 수 있는 表面적을 넓게 해 주어야 하며, 특히 lignin은 ligno-cellulosic의 形態로 cellulose에 강하게 結合하고 있기 때문에 lignin을 除去하는 操作이 必要하다.

3.5 Oligosaccharides의 分離 및 分析

Miller등은 순수 cellulose를 利用한 발연염산 (fuming hydrochloric acid) 및 acetolysis 와 deacetylation에 의해 部分 加水分解物을 charcoal-celite column으로써 중합도가 2~7까지의 oligosaccharides를 分離할 수 있었다고 보고 하였다.⁴⁰⁾

그렇지만 本 실험에서는 소량의 4개의 物質을 얻었다.

이것을 酸 加水分解 한 후 alditol-acetate法에 의해 g.l.c 分析한 Chromatogram을 Fig. 1에 나타내었다.

Column을 통하여 얻은 4개의 物質을 g.l.c 分析하였을 때 소량의 glucose와 mannose가 1:1의 比率로 나타났다.

이것으로 미루어 볼 때 상당량의 lignin이 存在

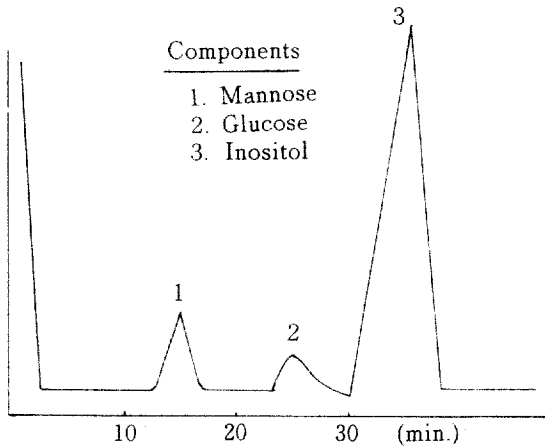


Fig. 1. Gas-liquid chromatogram of sugars in eluted fractions from Charcoal-Celite column.

Column: 3% ECNSS-M on Gas-Chrom Q.
Condition: 200°C, 45ml/min. (N₂), FID.

하는 시료를 acetolysis 및 deacetylation에 의한 부분 酸 加水分解에서는 完全한 부분 酸 加水分解가 일어나지 않았다는 것이다.

그래서 본 실험에서는 holocellulose로부터 acetolysis 및 deacetylation에 의해 charcoal-celite column으로써 oligosaccharides의 分離할 수 없었다.

3.6 H.P.L.C 分析

糖 分析시 試料의 前處理가 復雜할 뿐만 아니라 試料 調製시 시간이 많이 소요되는 alditol-acetate法에 의한 g.l.c 分析보다도 試料의 調製가 간편하고, 分析時間이 짧으며, 分析能力이 뛰어난 h.p.l.c를 利用하여 木材의 糖 分析을 行하기 위하여 먼저 標準物質을 使用하여 실험하였다. Sugar pak 1 coumm을 使用하여 sample로써 標準物質 L-rhamnose, L-arabinose, D-xylose, D-mannose, D-galactose, D-glucose를 利用하여 column 온도와 유속을 변화시켜 가면서 실험한 結果를 Table 8에 나타내었다.

Table 8에서와 같이 6개의 표준물질을 각각 5%로 하여 최초로 column 온도를 90°C, 유속을 0.5ml/min, detector는 RI 16x 로 하였으며, 압력은 750 psi로 하여 分析하였을 때 D-xylose, D-mannose, L-rhamnose, D-galactose는 elution time이 11분대에서 일치하였으며, L-arabinose는

Table 8. Relation between flow rate column temperature in sugar analysis by HPLC

Flow Rate (ml/min)	Column Temp. (°C)	Elution Time(min.)					
		Ara.	Xyl.	Man.	Gal.	Glu.	Rham.
0.2	90	29	27	27	27	25	27
0.3	90	23	21	21	21	19	21
0.4	90	16	14	14	14	13	14
0.5	90	12	11	11	11	10	11

* Elution Time: Approximate elution time in minutes.

12분대에, D-glucose는 10분대로 가장 빠르게 나왔다.

그래서 elution time이 일치하는 4개의 物質을 分離할 수 있는 조건을 찾기 위하여 먼저 유속을 0.5ml/min.에서 0.2ml/min.까지 차례로 변화시키면서 시도하여 보았지만, 유속을 낮출수록 전체적인 elution time만 늦어질 뿐 xylose와 monnose, rhamnose, galactose의 peak를 분리할 수는 없었다.

그리고 column 온도 변화에 의한 결과는 온도가 낮을수록 xylose, mannose, galactose, rhamnose의 peak는 分離되지 않고 분리능력이 현저하게 떨어졌으며, elution time에는 약간의 변화가 있었다.

이와같이 Sugar Pak 1 column을 利用하여 木材속에 存在하는 中성당의 分析을 위한 標準物質을 이용한 예비 실험에서 xylose, mannose, galactose, rhamnose는 分離할 수 없었다.

Fig.2.는 6개의 標準物質을 혼합하여 분리한 예이다.

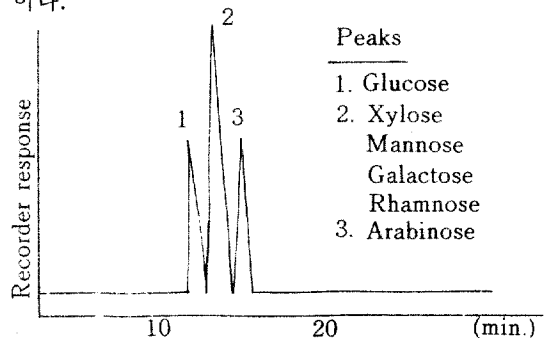


Fig. 2. The separation of sugar on a Sugar Pak 1 column. Column temp.:90°C, Mobile phase:water, Detectors:RI 16x, Flow rate:0.5ml/min.

4. 結 論

木材의 細胞壁中에 存在하는 炭水化合物 間의 結合樣式을 糾明하기 위해, 새로운 holocellulose의 調製法의 開發과 holocellulose의 酵素分解를 위한 最適條件, 그리고 holocellulose의 acetolysis 및 deacetylation에 의한 部分 加水分解로 얻어진 oligosaccharides의 分離 및 分析을 하여 다음과 같은 結果를 얻었다.

1. 시료목분에 존재하는 lignin 1g당 아염소산 나트륨 1g을 넣어 1시간 반응시킨후 다시 동량의 시약을 넣고 4시간 반응하였을때 脫 lignin 效果가 좋고 炭水化合物의 손실이 적은 새로운 holocellulose 調製法을 開發하였다.

2. Lignin이 存在하는 holocellulose의 酵素分解 最適條件은 0.05M Sodium acetate beffer(pH 5.0)였으며, holocellulose 0.01g에 효소 0.03g을 넣어 72시간 반응하였을때 7.2%의 환원당이 생성되었다.

이와같이 분해율이 낮은것은 5.5%의 lignin이 함유되어 효소의 접촉을 방해한 것으로 추측된다.

3. Holocellulose의 acetolysis 및 deacetylation에 의한 部分 加水分解로써 調製된 oligosaccharides의 分離시도는 holocellulose에 lignin이 상당량 존재하여 완전한 部分 加水分解가 되지 않아 성공하지 못하였다.

4. HPLC를 利用하여 목재의 糖 分析을 하기 위하여 D-glucose, D-mannose, D-xylose, D-galactose, L-arabinose, L-rhamnose의 6개 標準物質을 利用한 sugar pak 1 column에서 유속과 coluran 온도를 변화시키면서 분리를 시도하였지만 D-xylose, D-mannose, D-galactose, L-rhamnose의 elution time이 일치하여 分離할 수 없었으므로 sugar pak 1 column은 D-xylose, D-mannose, D-galactose, L-rhamnose의 分析에는 부적합하다.

參 考 文 獻

1. O'Dwyer, M.H. 1923. Biochem. J.,

17:501-509.

2. Hamilton, J.K. and Thompson, N.S. 1959. Tappi, 42(9):752-760.

3. Aspinall, G.O., Hirst, E.L. and Mahomed, R.S. 1954. J. Chem. Soc., pp.1734-1738.

4. 李鍾潤 1977, 동경대학원 박사논문.

5. Timell, T.E. 1965. Carbohydrate Chem., 20:409-483.

6. 越鳥哲夫, Timell, T.E. 1966. 木材誌 12(4):166-172.

7. Zinbo, M., Timell, T.E. 1965. Svensk papperstidn, 68(19):647-662.

8. Havliek, J. and Samuelson, O. 1972. Carbohydr. Rec., 22:307-316.

9. Nicholas, C. Carpita. 1983. Plant Physiology, 72:515-521.

10. 李鍾潤外 3명. 1981. 목재화학, 선진문화사, pp. 258.

11. K.W. Talmadge, K. Keegstra, P. Albersheim. 1973. Plant Physiology, 51:158-173.

12. W.D. Bauer, K.W. Talmadge, K. Keegstra, P. Albersheim. 1973. Plant Physiol., 51:174-187.

13. K. Keegstra, K.W. Talmadge, W.D. Bauer, P. Albersheim. 1973. Plant Physiol., 51:188-196.

14. B.M. Wilder and P. Albersheim. 1973. Plant Physiol., 51:889-893.

15. B.S. Valent, P. Albersheim. 1974. Plant Physiol., 54:105-108.

16. D. Burke, P. Kaufman, M. Mcneil, P. Albersheim. 1974. Plant Physiol., 54:109-115.

17. M. Mcneil, P. Albersheim. 1975. Plant Physiol., 55:64-68.

18. A.G. Darvill, M. Mcneil, P. Albersheim. 1978. Plant Physiol., 62:418-422.

19. L. Weinstein and P. Albersheim. 1979. Plant Physiol., 63:425-432.

20. M. Mcneil, A.G. Darvill, P. Albersheim. 1980. Plant Physiol., 66:1128-1134.

21. J.E. Darvill, M. Mcneil, G. Darvill, P. Albersheim. 1980. Plant Physiol., 66:1135-

- 1139.
22. J.M. Lavobitch and P.M. Ray. 1974. *Plant Physiol.*, 54:499-502.
23. Y. Kato and K. Matsuda. 1981. *Agric. Biol. Chem.*, 42(12):1-8.
24. N. Shibuya and T. Iwasaki. 1978. *Agric. Biol. Chem.*, 42(12):2259-2266.
25. Y. Kato, K. Iki and K. Matsuda. 1981. *Agric. Biol. Chem.*, 45(12):2737-2744.
26. Y. Kato, K. Iki, K. Matsuda. 1981. *Agric. Biol. Chem.*, 45(12):2745-2753.
27. Y. Kato, R. Shibuya, S. Takeyama, S. Ito, K. Matsuda. 1981. *Carbohydr. Res.*, 109:233-248.
28. 李鍾潤外 3名. 1981. 목재화학, 선진문화사, pp. 251.
29. J.A. Lomax, A.H. Gordon and A. Chesson. 1983. *Carbohydr. Res.*, 122:11-22.
30. 右田伸彦, 米澤保正, 近藤民雄. 1968. 木材化學 下, 共立出版, pp. 6.
31. Browning, 1967. B.I.: *Methods of wood chemistry(2)*, John Wiley and Sons, New York, p. 394.
32. 李鍾潤 外 3名. 1981. 목재화학, 선진문화사, pp. 369-371.
33. L.G. Bochart, C.V. Piper. 1970. *Tappi*, 53(2):257-260.
34. L.G. Bochart, D.B. Easty. 1983. *Tappi*, 65(4):127-128.
35. K.L. McDonald, A.C. Grady. 1983. *Tappi*, 66(2):100-101.
36. T. Vidal and J.F. Colompaster. 1984. *Tappi*, 70(9):132.
37. H.G. John. 1972. Gas liquid chromatography of methylated sugars, *Methods in Carbohydrate Chem.* (6), Academic press, New York, pp. 25-41.
38. F. Loewus and R.H. Shabi. 1972. Gas-liquid chromatography of trimethylsilyl ethers of cyclitols, *Methods in Carbohydrate Chem.* (6), Academic press, New York, pp. 14-19.
39. Michael Somogy. 1952. *J. Biol. Chem.*, 195:19-23.
40. G.L. Miller, J. Dean and R. Blum. 1960. *Archives of Biochem. and Biophysics*, 91:21-26.
41. 志水一允, 石原光朗, 石原遠夫. 1976. 木材誌, 22:618.
43. E. Maekawa and T. Koshijima. 1978. 材料, (28)310:665-670.
44. E. Maekawa, T. Koshijima. 1983. 木材學會誌, 29(10):702-707.
45. E. Maekawa, T. Koshijima. 1980. 木材學會誌, 26(9):614-623.
46. E. Maekawa, T. Koshijima. 1980. 木材學會誌, 26(9):624-627.
47. H. Kabeya, J. Hosokawa, T. Kubo, L. Akamatsu. 1984. 木材學會誌, 30(3):222-229.