

免疫電顯法에 의한 磨碎 리그닌의 起源에 관한 研究*1

김윤수*2 · 고홍범*3

Origin of Milled Wood Lignin : An Immunocytochemical Approaches in Combination with Transmission Electron Microscopy*1

Yoon-Soo Kim*2 · Hong-Bum Koh*3

ABSTRACT

Present work was undertaken to investigate the origin of milled wood lignin(MWL) in the wood cell wall using immunocytochemical techniques, which can provide the information on the localization of specific antigens(MWL in the present study) to be examined. Spruce MWL dissolved in DMSO and emulsified with Freund adjuvant was injected directly into the mouse spleen. The animals were boosted at two-week intervals after the initial immunization. Blood samples were purified in standard procedures. The characteristics of antibodies against MWL were tested by indirect ELISA. Visualization of MWL was carried out using conventional indirect immunogold-labelling methods on the ultrathin sections of spruce wood. Immuno-TEM observations showed that the immunogold probes were selectively attached to secondary cell walls of spruce wood. The most intense labelling was frequently observed in the S2 layer. In contrast, gold labelling in the lignin-rich regions, such as middle lamella and cell corner was not found. The immuno-TEM provides an indication that spruce MWL originates from the S2 layer.

Keywords : Spruce milled wood lignin, immunocytochemistry

1. 서론

리그닌(lignin)은 섬유소 다음으로 많은 양을 차지하고 있는 천연고분자 물질로서 木本植物의 경우 그 량은 20~30%를 차지하고 있다. 리그닌은 화학적 구조가 복잡하고 세포벽 내에서의 조성과 局在(localization)가 불

균일하며(Blend, 1996; Cote, 1977; Donaldson, 1985; Eriksson *et al.*, 1988; Fergus *et al.*, 1969; Fergus *et al.*, 1970; Hardel *et al.*, 1980; Nimz *et al.*, 1981; Sachs *et al.*, 1963; Saka *et al.*, 1963; Westermark, 1988) 또한 섬유소 및 hemicellulose와 결합하고 있기 때문에(Fergus & Wegener, 1983)

*1 접수 1995년 11월 7일 Received November 7, 1995

본 연구는 1993년 한국학술진흥재단이 지원하는 자유공모과제의 학술연구비에 의해 수행되었음.

*2 전남대학교 농과대학 College of Agriculture, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

*3 전남대학교 수의과대학 College of Veterinary Science, Chonnam National University, Kwangju 500-757, Korea

현대의 고도의 분석기법을 가지고도 화학적으로 변화되지 않는 천연상태의 리그닌(native lignin)을 單離(isolation)하지 못하고 있다. 理想的인 리그닌 單離方法은 단리과정 중 그 어떤 화학적, 물리적, 구조적 변화도 발생하지 않아야 되고 또한 단리된 리그닌이 천연리그닌의 평균상태를 대표할 수 있어야 한다(Sarkanen & Ludwig, 1971). 그러나 현존하고 있는 모든 단리방법은 리그닌 본래의 구조가 변화된 상태로 나타나거나 아니면 그 수율이 너무도 적다는 단점을 갖고 있다(Fengel & Wegener, 1983). 지금까지 개발된 리그닌 단리법 중 protolignin에 가장 근접한 것으로써 1957년 스웨덴의 Björkman(1957b)이 제안한 磨碎 리그닌(milled wood lignin : 以下 MWL로 略함)이 리그닌 연구자들에 의해 널리 사용되고 있다. 그러나 이 MWL이 목재 세포벽의 어디에서 유래하는가에 대해서는 명확히 밝혀지지 않고 있다. MWL의 출처에 관한 지금까지의 연구 결과는 연구자마다 서로 그 의견을 달리하고 있다. Björkman(1957a)은 침엽수의 MWL은 주로 중간층(compound middle lamella)에서 유래한다고 발표하였으며, 李 등(1981)은 활엽수재의 MWL 역시 마쇄 초기의 MWL은 중간층에서 유래한다고 결론짓고 있다. 반면 Whiting과 Goring(1981) 그리고 Terashima 등(1992)은 MWL이 목재 세포벽의 2차벽에서 유래한다고 보고하고 있으며 Fengel과 Maurer(1989)은 침엽수의 MWL은 주로 2차벽에서 유래하나, 활엽수의 경우 중간층에서도 부분적으로 유래하는 것으로 파악하였다.

MWL의 출처에 관한 지금까지의 30년간의 연구 결과는 調査方法을 달리함에 따라 研究者마다 그 결과가 相異하게 나타나고 있다. 그러므로 MWL의 기원에 대한 확실한 규명이 요청된다. 따라서 본 연구는 免疫電子顯微鏡法(이하 免疫電顯法이라 略함)을 사용하여 MWL의 출처를 파악하는데 그 목적을 두었다. 면역학적 방법은 목표로 하는 특정 물질에 대해서만 선택적으로 반응하며, 그 반응의 정도가 대단히 높다는 점에서 투과형 전자현미경과 함께 사용했을 경우 MWL이 목재 세포벽의 어디에서 유래하는가를 파악할 수 있을 것으로 사료되기 때문이다. 즉 목재구성성분을 특정시약으로 염색시켜 발색시킨 후 현미경 관찰을 시도하는 조직화학적 방법 대신, 생산된 항체에 electron dense marker로서 Protein A에 conjugation된 colloidal gold를 이용 관찰하였다.

2. 재료 및 방법

2.1 재료

본 실험에 사용된 抗原(antigen)은 美國林產物研究所(USDA, FPL)에서 제공된 가문비나무(*Picea abies*)의 MWL를 사용하였다.

2.2 抗體의 생산

MWL은 非水溶性인 관계로 Freund adjuvant로는 곧 바로 현탁(emulsification)되지 않았다. 따라서 기존의 방법(Nummi *et al.*, 1986; Pettersson *et al.*, 1988)과는 달리 美國林產物研究所의 제안에 따라 MWL 1mg을 DMSO에 용해시킨 뒤 동량의 Freund complete adjuvant로 현탁시켜 mouse의 脾臟(spleen)내에 200 μ 를 면역시켰다. 1차 면역 후 Freund incomplete adjuvant로 현탁된 항원을 마우스의 腹腔내에 투여하여 보강면역(booster)을 실시하였다. 2차 면역 후 2주 간격으로 면역을 실시하였으며, 항체가 최고에 도달하였을 때, 마우스의 眼靜脈을 통해 모두 採血하였다(Barret, 1988).

2.3. 抗體의 精製 및 特性分析

채혈된 혈액은 실온에서 2시간 방치하여 응고시킨 후 3,000rpm으로 10분간 원심하여 혈청을 분리시켰다. 얻어진 혈청은 50% ammonium sulphate로 침전시킨 뒤, dialysis tube를 사용 3일간 투석하였다.

정제된 혈청은 Voller 등(1979)의 방법을 변형한 간접 ELISA법으로 특이성(specificity)을 확인하였다. 즉 항원을 0.05M carbonate bicarbonate buffer(pH 9.6)에 희석하여 ELISA microplate(Nunc, Denmark)의 한 well당 50g(1 μ /50 μ)씩 분주한 후 4 $^{\circ}$ C에서 Overnight하여 coating시켰다. 이어 0.05% Tween-20이 들어있는 PBS로 3회 세척한 뒤 비특이성 반응을 제거하기 위하여 1% bovine serum albumin(BSA)이 들어 있는 PBS buffer(blocking buffer)를 각 well당 50 μ 씩 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 30분간 반응시켰다. 이어서 blocking buffer로 희석시킨 면역혈청을 넣고 moisture chamber에서 37 $^{\circ}$ C에서 반응시킨 다음 PBS로 3회 세척한 후 blocking buffer에 1:2000으로 희석한 conjugate(horseradish peroxidase goat anti-mouse, SIGMA, USA)를 넣어 37 $^{\circ}$ C에서 1시간 반응시켰다. 반응액의 발색은 OPD용액(10ml orthophenylendiamine in citrate buffer(pH5.0)+30%

H₂O₂ 5ml)을 넣은 후 빛을 차단한 채 30분간 반응시켰다. 이어 0.5M H₂SO₄ 50ml를 사용하여 발색반응을 정지시킨 다음 ELISA 판독기(Multiscan MC, Titertek)를 이용하여 415nm에서 흡광도(optical density: OD)를 측정하였다. 면역혈청의 특이성은 면역혈청의 흡광도치가 음성대조혈청의 흡광도치의 2배 이상일 때를 양성으로 판정하였다(Voller *et al.*, 1979).

2.4 免疫電顯法

면역전현법은 기존의 post-embedding 방법을 이용하였다(Kim *et al.*, 1991). 즉 0.5×0.5×4mm의 가문비 나무 목편을 제조하여 0.5% glutar aldehyde가 포함된 4% paraformaldehyde(in cacodylate buffer, pH 7.2)로 고정시킨 뒤 ethyl alcohol로 탈수시켜 London Resin White 수지로 50℃에서 하루동안 embedding 시켰다. Diamond knife로 80~100nm의 초박편(silver-gold색)을 제작한 뒤 300mesh nickel grid로 초박편을 채취하였다. 초박편은 10% H₂O₂로 처리한 다음 고정과정중 유도된 aldehyde를 제거하기 위해 0.1M glycine에서 incubation 시켰다. 이어 3% non-fat milk(skim milk)를 포함하고 있는 1차 항체로 4℃에서 하룻밤 동안 incubation 시킨 뒤, PBS로 jet washing한 후 15nm의 colloidal gold로 conjugate 시킨 goat-anti-mouse(GAM) IgG 또는 Protein A로 1시간 labelling 시킨 뒤 Tris buffer로 jet washing하였다. 일반 電顯방법에 사용되는 osmium tetroxide에 의한 후고정(post-fixation)은 항원성(antigenicity)의 파괴를 최소화하기 위해 생략하였다. Counter staining은 uranylacetate(2%)를 사용하여 실시한 후 JEOL 1200 투과형 전자현미경을 사용, 관찰하였다.

3. 결과 및 고찰

3.1 血清의 特異性

생산된 혈청을 간접 ELISA법으로 특이성을 조사한 결과, P/N비는 희석비율 1 : 1000까지 1.5 이상을 유지하였다(Fig 1). 특히 희석 비율 1 : 200 이내에서는 면역혈청의 흡광도가 陰性對照 혈청의 흡광도치의 2배 이상을 나타내, 陽性으로 판정되었다. 따라서 면역 전자현미경 실험은 P/N 비가 2.0 이상을 보인 희석배율에서 실시하였다. 얻어진 면역혈청의 여타 MWL에 대한 交叉反應(cross reaction)을 시험한 결과, 면역에 사용된 항원은 다른 MWL에 대해서도 높은 반응을 나타냈다(Fig 2). 즉 생산된 항체는 同一抗原(homologous antigen)

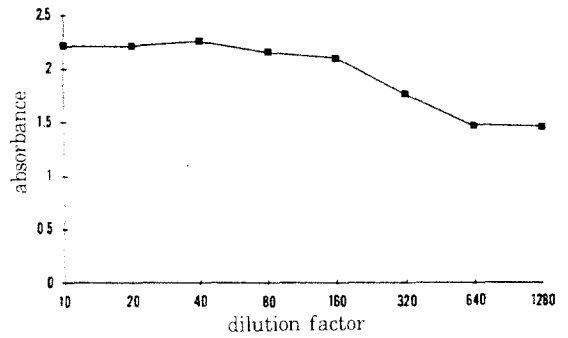


Fig. 1. P/N ratio of milled wood lignin antisera. (P : Positive serum, N : Negative serum)

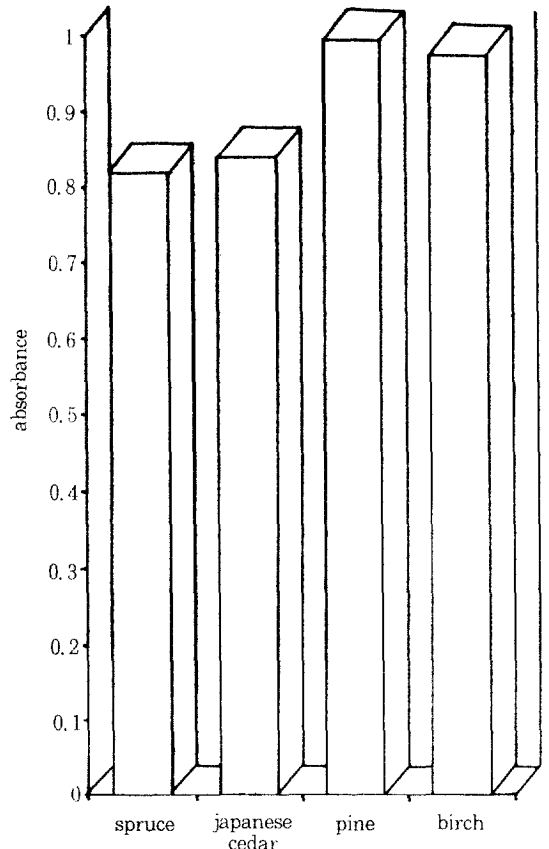


Fig. 2. Cross reaction of spruce milled wood lignin antibody against heterologous antisera.

뿐 아니라, 다른 침엽수재(리기다소나무, 삼나무)의 MWL에 대해서도 높은 교차반응을 보였으며, 활엽수재(자작나무)의 MWL에 대해서도 높은 흡광도를 나타냈다. 교차반응의 결과로부터 본 실험에 사용된 가문비나무의 마쇄리그닌은 다른 수종의 MWL과 동일한 화학구조를 공유하고 있는 것으로 생각되었다.

리그닌은 monomer형에 따라 p-hydroxyphenyl propane(H), guaiacyl propane(G), syringyl propane(S)의 3종류의 구조단위로 나누어지는 바 침엽수재의 리그닌은 주로(G)타입으로 구성돼 있으나, 활엽수재의 리그닌은(G)와 (S)타입이 공존한다(Fergus *et al.*, 1969; Fergus *et al.*, 1970; Nimz *et al.*, 1981; Saka *et al.*, 1982; Westermarck *et al.*, 1988). 본 실험에서 생산된 침엽수재의 마쇄리그닌 혈청은 활엽수재의 마쇄리그닌에 대해서도 높은 교차반응을 보임으로써 분리된 마쇄리그닌의 3차원적 입체구조는 침 활엽수재에 관계없이 유사함(Barret, 1988)을 시사하고 있다.

3.2 免疫電子顯微鏡 觀察

생산된 혈청을 사용하여 post-embedding 방법에 의한 免疫 金標識 電顯 관찰은 다음과 같은 점을 유의하였다. 첫째, 金粒子(gold particle)가 목재세포벽의 어느 부분에 labelling(標識)되는가와 둘째 리그닌 다량함유부위(lignin-rich area)에서의 金標識 여부를 유의하였다.

免疫電顯 관찰결과 金標識는 2차벽에 국한되었다(Fig. 3). 2차벽 중에서도 S2층에 주로 분포돼 있으며(Fig. 3, 4), S2층에서도 중간 또는 외층 부위에 金標識가 집중적으로 나타났다(Fig. 4, 5). 반면 리그닌 다량함유 부위



Fig. 3. Immunogold labelling of MWL antibody in the spruce wood cell wall. Gold particles were distributed throughout the secondary cell wall. In contrast little labelling in the cell corner (Cc). (Bar = 1 μ)

인 복합중간층 또는 cell corner에는 金粒子가 전혀 분포하지 않았다(Fig. 3~6). 한편 control(1차 항체의 생략처리 등) 시료는 모든 세포벽 내에서 金標識를 보이지 않았다(Fig. 7). 免疫電顯결과 마쇄리그닌항체가 2차벽 주로 S2층에서 유래하고 있음을 보여주고 있는 반면,

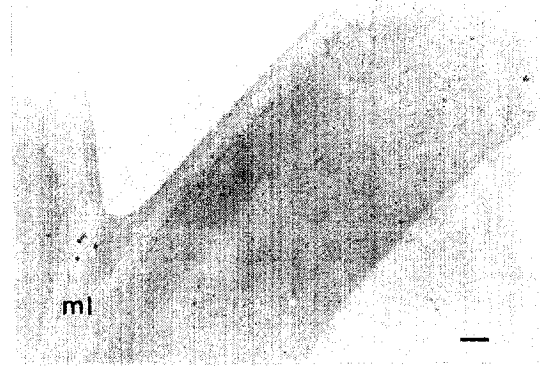


Fig. 4. Immunogold labelling of MWL antibody in the spruce wood cell wall. Distribution of gold particles were confined to the S2 layer. Note the little labelling in the meddle lamella(ml). (Bar = 500nm)

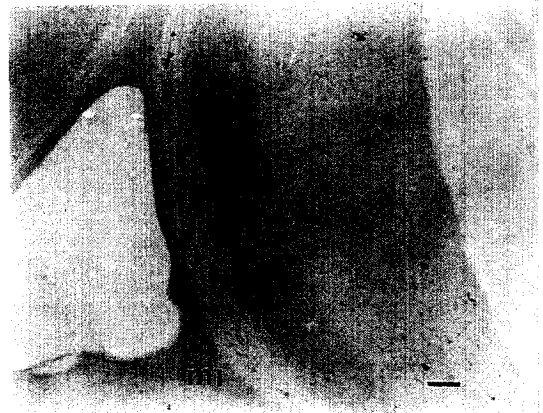


Fig. 5. Localization of MWL antibody in the spruce wood cell wall. Distribution of gold particles were confined to the S2 layer. Note the little labelling in the meddle lamella(ml) and cell corner. (Bar = 500nm)

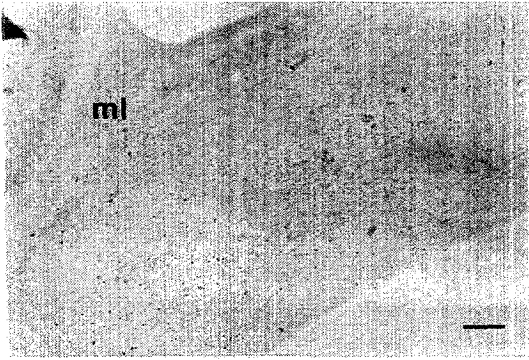


Fig. 6. Immunogold labelling of milled wood lignin-antibody in the spruce wood cell wall. Gold particles were distributed mainly in the outer part of the S2 layer. Note the little labelling in the middle lamella(ml). (Bar = 500nm)

복합중간층이나 cell corner는 마쇄리그닌의 기원처가 아님을 나타냈다.

목재 세포벽 내에서의 리그닌은 중간층과 1차벽에서 그 농도가 매우 높지만, 이들이 세포벽 전체에서 차지하는 비율이 낮아서, 가문비나무의 경우 80%의 리그닌이 2차벽에 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다(Nimz *et al.*, 1981; Pettersson *et al.*, 1988). 침엽수재의 리그닌은 앞서 논의한 것처럼 대부분 G형으로 구성돼 있으며, 리그닌의 monomer단위 사이의 결합양식은 침엽수재의 중간층은 세포벽과는 달리 축합형(condensed type)구조가 많을 뿐 아니라 methoxyl양이 적고, H형의 리그닌도 존재하고 있는 것으로 보고되고 있다(Terashima *et al.*, 1992). 지금까지의 細胞化學的 및 分析化學的 研究 결과와 본 면역금지표지 電顯 관찰로부터 침엽수재인 가문비나무의 경우, 마쇄리그닌은 S2층에 있는 비교적 축합이 덜된 구조의 결합양식을 갖는 G형의 리그닌인 것으로 추론될 수 있다. Lee 등(1981)은 MWL의 경우, 마쇄 시간에 따라 추출되는 리그닌의 종류가 달라지는 바, 마쇄 초기에는 복합중간층의 리그닌이 단리되지만, 마쇄 시간이 길어질수록 2차벽의 리그닌이 단리됨을 보고한 바 있다. 이와는 달리 마쇄리그닌의 탄수화물의 조성을 화학적 분석한 결과 Björkman(1957b)의 경우 MWL이 복합중간층에서 유래한다고 추정하였다.

그러나 Fergus 등(1969, 1970)은 침엽수재의 MWL의 최종수율이 복합중간층 전체의 최종수율보다 많다는 사실로부터 MWL에는 木材細胞壁에서 유래하는 리그닌

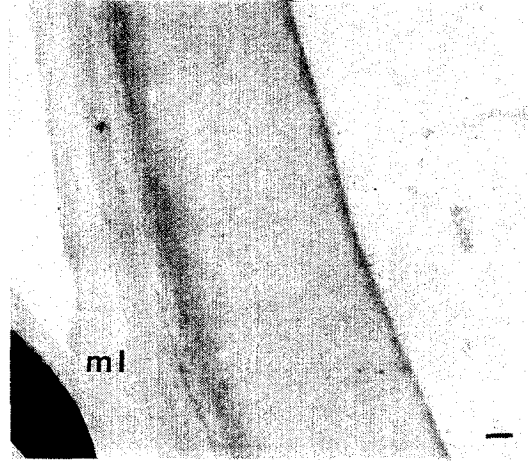


Fig. 7. Immunogold labelling of milled wood lignin-antibody in the control. Note the little labelling in the wood cell wall nor in the middle lamella(ml). (Bar = 500nm)

이 어느 정도는 들어있는 것으로 생각하였으며 이에 따라 Goring 등(1981)의 UV현미경법에 의한 관찰결과는 Björkman의 보고와는 달리 MWL이 2차벽에서 기원하는 것으로 보고하였다. 최근 Fengel과 Maurer(1989)는 주사형 전자현미경 관찰을 통해, Terashima그룹(1992)은 autoradiography법을 통해 MWL이 2차벽에서 기원하고 있음을 보고한 바 있다. 본 연구는 앞서 열거한 Goring, Fengel 및 Terashima 등의 결과와 일치한다. 다만 본 연구는 지금까지의 방법론과는 달리 특정성분에 대해서만 선택적으로 반응하는 면역세포화학적 방법으로 마쇄리그닌의 기원을 최초로 고찰했다는 점에서 차이가 있다. 즉 항체가 갖는 항원에 대한 특이성을 최대한 이용함으로써, 기존의 조직화학적 방법보다 그 특이성이 훨씬 높아 준분자상태(submolecular level)수준에서의 관찰도 가능한 면역세포화학적 기법을 사용했다는 점이다.

이와 같은 실험방법의 장점에도 불구하고 본 실험에 사용된 혈청이 단클론(monoclonal)항체가 아니고 polyclone 항체이기 때문에 免疫金標識方法의 결과에 대한 해석에 있어 신중을 기해야 한다. 따라서 이에 대한 비교 연구가 앞으로 수행되어야 할 것으로 사료된다. 또한 침엽수재의 MWL역시 2차벽에서 유래하는지의 여부를 규명할 연구가 시도해야 할 것으로 생각된다.

사 사

본 연구의 수행에 귀중한 시료를 제공해주신 黃炳浩(강원대), 文星筆(전북대), 嚴泰珍(경북대) 교수 및 USDA Forest Products Laboratory, New Zealand Forest Research Institute 제위께 심심한 감사를 드린다. 아울러 TEM 관찰에 협조하여준 전남대학교 의과대학 해부학교실 제위께도 감사드린다.

참 고 문 헌

1. Adler, E. 1977. Lignin chemistry - past, present and future. *Wood Sci. & Tech.* 11 : 169~218
2. Barret, J.T. 1988. Textbook of Immunology. C.V. Mosby Co. St. Louise : 437
3. Björkman, A. 1957a. Studies on finely divided wood Part 5. effect of milling. *Svensk Papperstidn.* 60 : 329~335
4. Bjorkaman, A. 1957 b. Studies on finely divided wood. Part 1. Extraction of lignin with neutral solvents. *Svensk Papperstidn.* 59 : 477~485
5. Bland, D.E. 1996. Colorimetric and chemical identification of lignin in different parts of *Eucalyptus botryoides* and their relation to lignification. *Holzforschung* 20 : 12~16
6. Cote, W.A. 1977. Wood ultrastructure in relation to chemical composition. In Structure, Biosynthesis and Degradation of Wood. Loewus, F.A. and Rueneckles, V. (eds.). Plenum Press. New York : 1~44
7. Donaldson, L.A. 1985. Critical assessment of interference microscopy as a technique for measuring lignin distribution in cell walls. *N.Z. J. Forest Sci.* 15 : 349~360
8. Eriksson, I., O. Lidbrandt, and U. Westermark. 1988. Lignin distribution in birch (*Betula verrucosa*) as determined by mercurization with SEM- and TEM-EXDA. *Wood Sci. & Tech.* 22 : 251~257
9. Fengel, D. and A. Maurer. 1989. Electron microscopic studies on the origin of milled wood lignin. 5th. Intern. Symp. Wood Pulping Chem., Raleigh. Proc. I. : 655~658
10. Fengel, D. and G. Wegener. 1983. Wood Chemistry, Ultrastructure, Reactions. Walter De Gruyter. Berlin : 566
11. Fergus, B.J., A.R. Procter, A.N. Scott, and D. A. I. Goring. 1969. The distribution of lignin in spruce wood as determined by ultraviolet microscopy. *Wood Sci. & Tech.* 3 : 117~138
12. Fergus, B.J., and D. A. I. Goring. 1970a. The location of guaiacyl and syringyl lignins in birch xylem tissue. *Holzforschung* 24 : 113~117
13. Hardell, H.L., G.J. Leary, M. Stoll, and U. Westermark. 1980. Variation in lignin structure in defined morphological parts of spruce. *Svensk Papperstidn.* 83 : 44~49
14. Kim, Y.S., B. Goodell, and J. Jellison. 1991. Immuno-electron microscopic localization of extracellular metabolites in spruce wood decayed by brown rot fungus *Postia placenta*. *Holzforschung* 45 : 389~393
15. Lee, Z.Z., G. Mechituka, N.S. Cho and J. Nakano. 1981. Characteristics of milled wood lignins isolated with different milling times. *Mokuzai Gakkaishi* 27 : 671~677
16. Nimz, M., D. Robert, O. Faix, and M. Nembr. 1981. Carbon-13NMR spectra of lignins. 8. Structural differences between lignins of hardwoods, softwoods, grasses and compression wood. *Holzforschung* 35 : 16~26
17. Nummi, M., M-L. Niku-Paavola, and V. Raunio. 1986. Immunoelectrophoretic characterization of lignin. 3rd. Intern. Conf. Biotechnology in Pulp and Paper Industry. Stockholm. Proc. : 16~19
18. Pettersson, B., J-J. Yang, K-E Eriksson, and M-L. Niku-Paavola. 1988. Characterization of pulp fiber surfaces by lignin specific enzymes. *Nordic Pulp Paper Res. J.* 3 : 152~155
19. Sachs, I.B., I.T. Clark, and J.C. Pew. 1963. Investigation of lignin distribution in

- the cell wall of certain woods. *J. Polymer Sci. Pt. C. 2* : 203~212
20. Saka, S., P. Whiting, K. Fukazawa, and D. A. I. Goring. 1982. Comparative studies on lignin distribution by UV microscopy and bromination combined with EDXA. *Wood Sci. & Tech.* 16 : 269~277
21. Sarkanen, K.V. and C.H. Ludwig. 1971. Lignin. Occurencs, Formation, Structure and Reaction. John Wiley & Sons. New York
22. Terashima, N., K. Fukushima, and T. Imai. 1992. Morphological origin of milled wood lignin studied by radiotracer method. *Holzforschung* 46 : 271~275
23. Voller, A., D.E. Bidwell, and A. Barlett. 1979. The enzyme linked immunosorbent assay. Dynatech Lab. Inc. : 23~34
24. Westermark, U., O. Lidtbrandt, and I. Eriksson. 1988. Lignin distribution in spruce(*Pices abies*) determined by mercurization with SEM-EDXA techniques. *Wood Sci. & Tech.* 22 : 243~250
25. Whiting, P. and D. A. I. Goring. 1981. The morphological origin of milled wood lignin. *Svensk Papperastin.* 84 : R 120~122