

양파로부터 세포벽 성분 xyloglucan의 분리 및 분자구조 규명 (Isolation of Xyloglucan from Onion and Its Structural Characterization)

최 희 돈
식품자원이용연구본부

I. 서론

Xyloglucan (이하 XG)은 모든 고등식물의 1차 세포벽에서 발견되는 hemicellulose로서 골기체에서 합성된다. XG는 cellulose microfibril의 표면에 결합하여 xyloglucan / cellulose network에 incorporation되어 대부분의 고등식물의 1차 세포벽에서 주요한 load bearing structure를 형성하여 osmotic stress로부터 식물을 보호하는 역할을 한다. 또한 XG는 α -D-Xylp 잔기가 O-6에 연결된 (1 \rightarrow 4)-linked β -D-Glcp 잔기로 구성된 cellulosic backbone을 가지며, α -D-Xylp에 galactosyl, fucosyl 잔기 등이 결합된 highly branched polysaccharide이다. 본 연구에서는 양파로부터 주요한 세포벽 성분인 xyloglucan을 분리하고 이의 분자구조를 규명하였다. 양파로부터 Alcohol Insoluble Residue (이하 AIR) 제조 후 여러 가지 효소 (α -amylase, endopolygalacturonase (이하 EPG), pectin methylesterase (이하 PME), xyloglucan endoglucanase (이하 XEG) 등)와 정제방법 (desalting, anion-exchange chromatography 등)을 사용하여 XG를 분리, 정제하였으며, 정제한 xyloglucan oligosaccharide (이하 XG oligosaccharide)

의 분자구조를 규명하기 위하여 당조성, 결합부위 및 비율, MALDI-TOF MS (Matrix-assisted laser-induced desorption/ionization time-of-flight mass spectrometry), NMR 등을 측정하였다.

II. 재료 및 방법

1. 재료

양파 (*Allium cepa* L.)를 시중에서 구입한 후 냉동상태에서 보관하면서 실험에 사용하였으며, 모든 시약은 특급시약을 사용하였다.

2. Xyloglucan Oligosaccharide의 분리 및 정제

양파를 냉동보관후 액체질소를 공급하면서 조직을 파쇄하였으며, 파쇄한 조직을 80% (v/v) EtOH (약 20 mL/g tissue)에 현탁시키고 균질기를 이용하여 더 파쇄한 후 이를 nylon mesh에 수집후 80% (v/v) EtOH과 무수 EtOH로 세척하여 AIR을 제조하였다. 세척한 AIR을 methanol:chloroform (1:1, v/v) 용액에 현탁한 후 실온에서 1시간 동안

교반, 여과하였고 acetone으로 세척 후 건조하였다. AIR을 50 mM NaOAc (pH 5, containing 0.01% (w/v) thimerosal)에 현탁 후 이에 EPG (5 units, from *Aspergillus niger* (Dr. Carl Bergmann, CCRC))와 PME (5 units, from *Aspergillus oryzae* (Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark))를 첨가한 후 24°C에서 24시간 동안 처리하였다. 여과후 잔사에 대해 위와 동일한 방법으로 효소를 처리하여 다시 여과하였으며, 잔사를 20 mM NaOAc (pH 5, containing 0.01% (w/v) thimerosal)에 현탁 후 이에 XEG (10 units, Novozymes A/S, Bagsvaerd, Denmark)를 첨가한 후 24°C에서 24시간 동안 처리하였다. 처리후 여과한 여과액을 동결건조하였으며, 동결건조물을 증류수에 용해후 3µm의 여과지로 여과하고 Sephadex G-25 수지로 충전된 컬럼을 통과시켜 탈염하였으며, 이때 XG oligosaccharide를 분리하기 위하여 hexose에 대한 anthrone 분석을 하였다 (Fig. 1). 또한 혼입될 수 있는 pectin 물질을 흡착, 제거하기 위하여 음이온 교환수지인 Q-Sepharose로 충전된 컬럼을 이용하여 탈염된 XEG 처리물을 통과시켰다.

3. XG oligosaccharides의 분획

분리한 XG oligosaccharides를 각각의 oligosaccharide로 분획하기 위하여 C18 column (Hibar Lichrosorb RP-18, 25×1.0cm)을 이용하여 용해한 XG oligosaccharides를 15% MeOH을 용매로하여 HPLC로 분리하였고 evaporative light scattering detector (Sedex 55 ELSD, SEDERE, France)로 성분을 검출하였다.

4. 구성당 분석 (Monosaccharide composition)

정제한 XG oligosaccharide의 당조성을 분석하기 위하여 XG oligosaccharide를 2 M trifluoroacetic

acid (TFA)로 121°C에서 1.5시간 가수분해하고 alditol acetate 유도체로 전환시킨 후 GC로 분석하였다. GC 분석은 SP-2380 capillary column (0.2 µm film, 0.25 mm i.d. × 30 m, Supelco)이 장착된 Hewlett-Packard model 5890 series II를 이용하고 최적온도조건 [60°C(1min), 60°C→220°C (30°C/min), 220°C(12min), 220°C→50°C(8°C/min), 50°C(15min)]에서 실시하였다. 구성당의 mole%는 peak의 면적비와 각 구성당의 alditol acetate 유도체의 분자량으로부터 계산하였다.

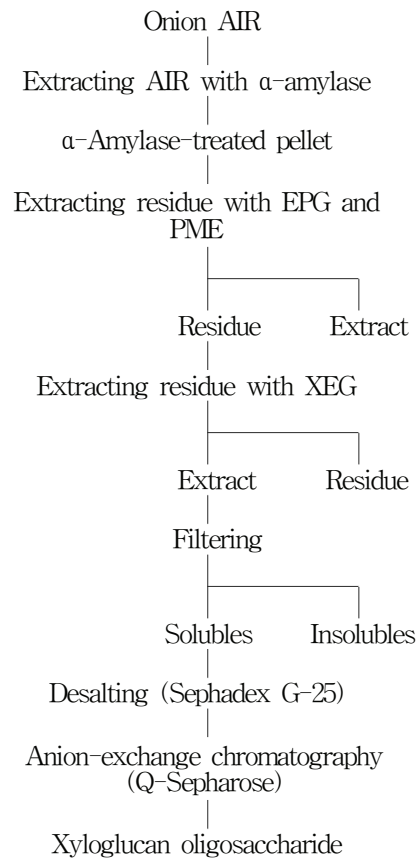


Fig. 1. Flow chart for isolation and identification of xyloglucan oligosaccharide from onion AIR

5. 결합위치 및 비율 (Glycosyl linkage)

XG oligosaccharides 및 각 oligosaccharide를 구성하고 있는 당의 결합위치 및 비율을 결정하기 위한 methylation은 Hakomori 방법에 따라 실시하였다. 각 시료는 methylation 이전에 0.2 M NaOH로 실온에서 2시간 처리하여 deesterification 하고 반응 중 β -elimination이 일어나지 않도록 methylation은 한차례만 실시하였다. 그러나 완전히 polyalkoxide로 전환되도록 필요한 경우 methylsulphonyl carbanion을 수차례 첨가하였다. Methyl화된 당은 Sep-Pak C18 cartridge로 회수하였고 1 M TFA로 100°C에서 2시간 가수분해 후 환원 및 acetylation 과정을 거쳐 partially methylated alditol acetate로 전환하여 GC 및 GC/MS로 분석하였다. GC 분석은 SP-2380 capillary column (0.2 μ m film, 0.25 mm i.d. \times 30 m, Supelco)이 장착된 Hewlett-Packard model 5890 series II를 이용하고 최적온도조건 [60°C(1min), 60°C \rightarrow 180°C(30°C/min), 180°C \rightarrow 250°C(1.5°C/min), 250°C(5min)]에서 splitless injection mode로 분석하였으며, 한편 GC/MS 5970 mass selective detector를 이용하여 최적온도조건[60°C(1min), 60°C \rightarrow 150°C(30°C/min), 150°C \rightarrow 250°C(1.5°C/min)]에서 분석하였다. 각 peak는 MS에 의한 fragmentation 분석과 GC의 relative retention time을 조합하여 동정하였으며, 각 화합물의 mole%는 peak 면적과 응답계수로부터 산출하였다.

6. MALDI-TOF MS

정제된 XG oligosaccharide 일정량을 90% MeOH에 용해한 시료 2 μ L를 matrix solution 2 μ L (10mg/mL 2,5-dihydroxybenzoic acid in TFA:

CH₃CN=1.75:0.75, v/v)와 혼합하고 이중 2 μ L를 취하여 stainless steel sample slide에 loading 후 건조시키고 측정하였다. MALDI-TOF MS는 337 nm에서 작동하는 nitrogen laser와 single stage reflector가 장착된 Voyager-DE RP Biospectrometry Workstation (PerSeptive Biosystem Inc., Framingham, MA, USA)으로 측정, 기록하였다.

7. ¹H-NMR

XG oligosaccharide 용액(in 600 μ L of 99.96% enriched D₂O)을 5 mm NMR tube로 옮긴 후 Varian Inova 600 NMR spectrometer를 이용하여 298K에서 측정하였다. 이때 acetone을 기준물질 (δ 2.225)로 하여 chemical shift를 측정하였다.

III. 결과

1. Xyloglucan oligosaccharide의 정제

양과로부터 AIR을 제조한 후 EPG와 PME 등의 pectin 분해 효소와 xyloglucan 분해효소인 XEG를 처리하여 XEG 가용성 물질을 제조한 후 총 가용성 성분과 hexose, uronic acid 등의 함량을 측정된 결과는 Table 1과 같다. 총가용성 성분 3.7%, hexose 2.1%, uronic acid 1.0%를 나타내어 제조한 XEG 가용성 물질에 상당히 많은 양의 pectin 물질, 즉 rhamnogalacturonan이 포함되어 있는 것으로 판단된다. 분리한 XEG 가용성 물질을 탈염시키기 위해 Sephadex G-25로 충전된 컬럼을 통과시키면서 분획을 제조하여 anthrone 시험을 한 결과는 Fig. 2와 같다. 분획 40~55의 main peak와 분획 56~75의 minor peak로 구분되었으며 이들의 구성당을 분석한 결과 main peak

의 경우 다량의 galacturonic acid가 함유된 것으로 보아 이 분획이 rhamnogalacturonan I (이하 RG I)인 것으로 판단되었고, minor peak의 경우 많은 양의 glucose와 xylose로 구성되어 이 분획이 xyloglucan oligosaccharide임을 알 수 있었다. Minor peak 분획에 미량이나마 혼입되어 있을 것으로 추정되는 저분자의 RG I을 제거하기 위해 음이온 교환수지인 Q-Sepharose를 이용하여 분리한 XG oligosaccharide를 통과시켜 정제하였다.

Table 1. Total solid, hexose and uronic acid content of XEG extract from onion

Total solid (%)	Hexose (%)	Uronic acid (%)
3.67	2.09	1.02

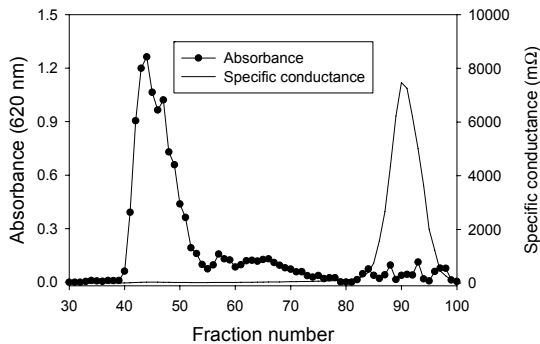


Fig 2. Changes in absorbance at 620 nm and specific conductance of fractions of XEG extract from onion on Sephadex G-25 column

2. Xyloglucan oligosaccharide의 결합위치, 비율 및 MALDI-TOF MS

분리한 XG oligosaccharide의 구성당을 분석한

결과 Table 2에서 보는 바와 같이 fucose 11.9%, xylose 25.2%, galactose 9.1%, glucose 53.8%의 당 조성을 나타내어 xylose와 glucose를 주요 구성당으로 하고 이에 fucose와 galactose가 연결된 xyloglucan임을 알 수 있었다. 그리고 이를 methylation하고 가수분해한 후 환원시키고 acetylation하여 부분적으로 methyl화된 alditol acetate (partially methylated alditol acetate (PMAAs))를 제조하였으며, 이를 GC 및 GC/MS로 구성당의 결합위치 및 비율을 조사한 결과는 Table 3과 같다. Fucose는 T-fucp의 형태로 7.4 mole%, xylose는 T-xylp, 2-xylp의 형태로 각각 15.0, 10.3 mole%, galactose는 T-galp, 2-galp의 형태로 각각 5.4, 7.7 mole%, glucose는 4-glcp, 6-glcp, 4,6-glcp의 형태로 각각 8.3, 12.7, 33.2 mole%의 비율로 구성되었다. XG oligosaccharide의 MALDI-TOF MS를 조사한 결과 Fig. 3에서 보는 바와 같이 peak의 mass fragment 값으로부터 XXG, XLG, XXXG, XXLG, XLXG, XXFG, XLLG, XLFG 등의 8가지 oligosaccharide를 확인하였으며 분리한 XG oligosaccharide가 5탄당~10탄당으로 구성됨을 알 수 있었다. 또한 분리한 XG oligosaccharide를 HPLC를 통해 분리, 분획하고 MALDI-TOF MS로 확인하여 각각의 oligosaccharide 분획을 얻었다.

Table 2. Monosaccharide composition of xyloglucan oligosaccharides isolated from onion

Monosaccharide	Mole%
Fuc	9.9
Xyl	25.2
Gal	11.1
Glc	53.8

Table 3. Glycosyl linkage composition of xyloglucan oligosaccharides isolated from onion

Component		Linkage	Mole%
Fuc	T-Fucp	1,5-di-O-acetyl-1-deuterio-6-deoxy-2,3,4-tri-O-methyl-L-galactitol	7.4
Xyl	T-Xylp	1,5-di-O-acetyl-1-deuterio-2,3,4-tri-O-methyl-D-xylitol	15.0
	2-Xylp	1,2,5-tri-O-acetyl-1-deuterio-3,4-di-O-methyl-D-xylitol	10.3
Gal	T-Galp	1,5-di-O-acetyl-1-deuterio-2,3,4,6-tetra-O-methyl-D-galactitol	5.4
	2-Galp	1,2,5-tri-O-acetyl-1-deuterio-3,4,6-tri-O-methyl-D-galactitol	7.7
Glc	4-Glcp	1,4,5-tri-O-acetyl-1-deuterio-2,3,6-tri-O-methyl-D-glucitol	8.3
	6-Glcp	1,5,6-tri-O-acetyl-1-deuterio-2,3,4-tri-O-methyl-D-glucitol	12.7
	4,6-Glcp	1,4,5,6-tetra-O-acetyl-1-deuterio-2,3-di-O-methyl-D-glucitol	33.2

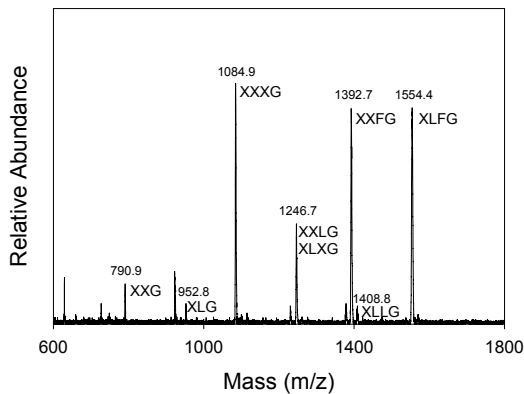


Fig 3. MALDI-TOF spectra of xyloglucan oligosaccharides isolated from onion

3. Xyloglucan oligosaccharide 분획의 구조

양과로부터 효소적으로 분리한 XG oligosaccharides 를 구성하는 각각의 oligosaccharide로 분리하기 위하여 HPLC를 이용하여 각 oligosaccharide의 분획물을 얻었으며, 얻어진 분획물에 대해 MALDI-TOF MS로 각각의 oligosaccharide를 확인하여 각 분획

물이 순수한 oligosaccharide임을 알 수 있었다. 회수한 각 oligosaccharide에 대해 구성당 분석을 한 결과는 Table 4, 결합위치 및 비율을 분석한 결과는 Table 5, 그리고 이들 oligosaccharide의 NMR 분석시 anomer proton에 대한 chemical shift 결과는 Table 6와 같다. 이들 결과를 종합적으로 분석한 결과 각 oligosaccharide의 구조는 Fig. 4와 같다.

Table 4. Monosaccharide composition of xyloglucan oligosaccharides isolated from onion

Oligosaccharide	Monosaccharide (mole%)			
	Fucose	Xylose	Galactose	Glucose
XXG	0.2	36.3	0.3	63.2
XLG	0.3	32.2	19.9	47.6
XXXG	0.6	33.6	1.3	64.5
XXLG+XLXG	1.4	25.1	17.7	55.8
XXFG	8.3	26.2	14.9	50.6
XLLG	2.2	28.5	18.1	51.2
XLFG	7.7	25.0	17.9	49.4

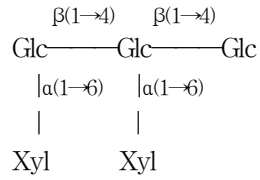
Table 5. Glycosyl linkage composition of xyloglucan oligosaccharides isolated from onion (Mole%)

Glycosyl residue	Linkage	Oligosaccharide						
		XXG	XLG	XXXG	XXLG+ XLXG	XXFG	XLLG	XLFG
Fucose	T-	-	-	-	0.3	9.6	3.2	6.8
Xylose	T-	32.2	15.3	28.1	14.9	11.6	5.4	4.5
	2-	1.3	12.1	1.7	10.0	9.1	22.4	13.6
Galactose	T-	-	16.7	0.2	12.8	2.3	15.6	9.9
	2-	-	1.5	-	-	9.8	3.7	9.4
Glucose	4-	20.6	18.4	17.9	13.7	14.8	11.9	13.1
	6-	25.4	16.1	16.5	16.7	16.7	11.0	10.6
	4,6-	20.5	20.9	35.6	31.6	28.9	26.8	32.1

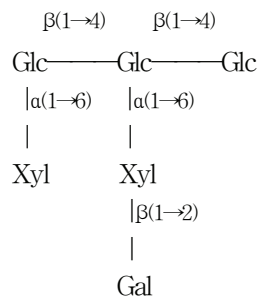
Table 6. ¹H NMR chemical shifts of anomeric protons of xyloglucan oligosaccharides isolated from onion

Oligo-saccharide	Residue	Linkage	Chemical shift(δ)	Oligo-saccharide	Residue	Linkage	Chemical shift(δ)
XXG	α -D-Xyl ^b	T-	4.941	XXFG	α -L-Fuc ^a	T-	5.257
	α -D-Xyl ^a	T-	4.955		β -D-Gal ^a	2-	4.621
	β -D-Glc ^b	6-	4.567		α -D-Xyl ^c	T-	4.941
	β -D-Glc ^a	4,6-	4.634		α -D-Xyl ^b	T-	4.952
	D-Glcol	4-	3.749		α -D-Xyl ^a	2-	5.132
XLG	β -D-Gal ^a	T-	4.556		β -D-Glc ^c	6-	4.546
	α -D-Xyl ^b	T-	4.941		β -D-Glc ^b	4,6-	4.539
	α -D-Xyl ^a	T-	5.170		β -D-Glc ^a	4,6-	4.621
	β -D-Glc ^b	6-	4.542		D-Glcol	4-	3.671
	β -D-Glc ^a	4,6-	4.621		XLLG	β -D-Gal ^b	T-
	D-Glcol	4-	3.781	β -D-Gal ^a		T-	4.559
XXXG	α -D-Xyl ^c	T-	4.939	α -D-Xyl ^c		T-	4.943
	α -D-Xyl ^b	T-	4.957	α -D-Xyl ^b		2-	5.175
	α -D-Xyl ^a	T-	4.952	α -D-Xyl ^a	2-	5.161	
	β -D-Glc ^c	6-	4.548	β -D-Glc ^c	6-	4.535	
	β -D-Glc ^b	4,6-	4.586	β -D-Glc ^b	4,6-	4.545	
	β -D-Glc ^a	4,6-	4.631	β -D-Glc ^a	4,6-	4.635	
XXLG	D-Glcol	4-	3.744	D-Glcol	4-	3.783	
	β -D-Gal ^a	T-	4.554	XLFG	α -L-Fuc ^a	T-	5.258
	α -D-Xyl ^c	T-	4.940		β -D-Gal ^b	T-	4.552
	α -D-Xyl ^b	T-	4.956		β -D-Gal ^a	2-	4.621
	α -D-Xyl ^a	T-	5.163		α -D-Xyl ^c	T-	4.942
	β -D-Glc ^c	6-	4.547		α -D-Xyl ^b	2-	5.172
	β -D-Glc ^b	4,6-	4.560		α -D-Xyl ^a	2-	5.127
	β -D-Glc ^a	4,6-	4.620		β -D-Glc ^c	6-	4.533
D-Glcol	4-	3.744	β -D-Glc ^b		4,6-	4.525	
				β -D-Glc ^a	4,6-	4.630	
				D-Glcol	4-	3.756	

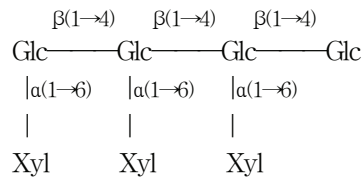
<XXG>



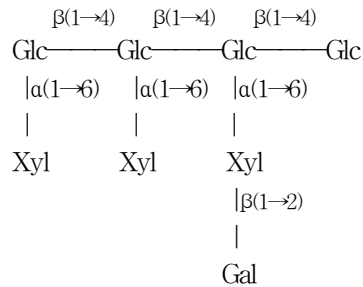
<XLG>



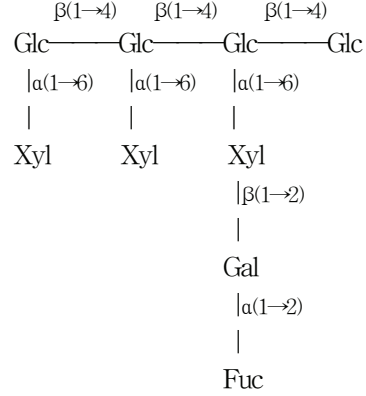
<XXXG>



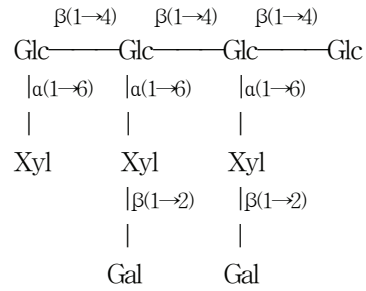
<XXLG>



<XXFG>



<XLLG>



<XLLG>

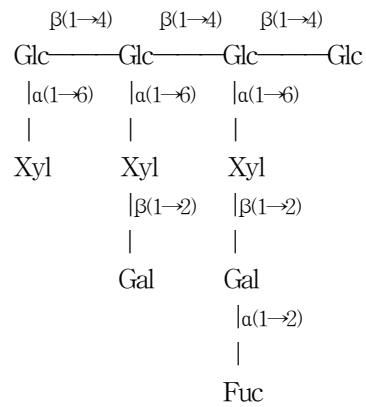


Fig 4. Proposed structures of xyloligucan oligosaccharides isolated from onion

IV. 참고문헌

1. Structural analysis of xyloglucans in the primary cell walls of plants in the subclass *Asteridae*. *Carbohydrate Research*, Vol. 340, 2005, p. 1826-1840, M. Hoffman, Z. Jia, M. J. Peña, M. Cash, A. Harper, A.R. Blackburn II, A. Darvill and W.S. York
2. Characterization of cell wall polysaccharides from the medicinal plant *Panax notoginseng*. *Phytochemistry*, Vol. 66, 2005, p. 1067-1076, Y. Zhu, F. Pettolino, S.-L. Mau and A. Bacic
3. A novel xyloglucan from seeds of *Azelia africana* Se. Pers.-extraction, characterization, and conformational properties. *Carbohydrate Research*, Vol. 340, 2005, p. 997-1005, Y. Ren, D.R. Picout, P.R. Ellis, S.B. Ross-Murphy and J.S.G. Reid
4. Structural characterisation of hemicellulosic polysaccharides from *Benincasa hispida* using specific enzyme hydrolysis, ion exchange chromatography and MALDI-TOF mass spectroscopy. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 59, 2005, p. 231-238. S. Mazumder, P. Lerouge, C. Loutelier-Bourhis, A. Driouich and B. Ray
5. Cell wall xyloglucan incorporation by xyloglucan endotransglucosylase/hydrolase in pine hypocotyls. *Plant Science*, Vol. 166, 2004, p. 1269-1274, E.P. Lorences
6. Polysaccharides from grape berry cell walls. Part II. Structural characterization of the xyloglucan polysaccharides. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 53, 2003, p. 253-261, T. Doco, P. Williams, M. Pauly, M.A. O'Neill and P. Pellerin
7. Structure of the xyloglucan produced by suspension-cultured tomato cells. *Carbohydrate Research*, Vol. 338, 2003, p. 1197-1208, Z. Jia, Q. Qin, A.G. Darvill and W.S. York
8. Structural characterisation of xyloglucan and xylans present in olive fruit (*Olea europaea* cv *koroneiki*). *Carbohydrate Polymers*, Vol. 44, 2001, p. 51-62, E. Vierhuis, H. A. Schols, G. Beldman and A.G.J. Voragen
9. Isolation and characterisation of cell wall material from olive fruit (*Olea europaea* cv *koroneiki*) at different ripening stages. *Carbohydrate Polymers*, Vol. 43, 2000, p. 11-21, E. Vierhuis, H.A. Schols, G. Beldman and A.G.J. Voragen