

CCoAOMT 유전자 발현 억제에 의한 현사시나무의 화학조성 변화*1

엄인용*2 · 김광호*2 · 이수민*3 · 이용섭*4 · 최준원*2.5†

Characterization of Chemical Composition in Poplar wood (*Populus deltoides*) by Suppression of CCoAOMT Gene Expression *1

In Yong Eom*2 · Kwang Ho Kim*2 · Soo Min Lee*3 · Yong Sub Yi*4 ·
Joon Weon Choi*2.5†

요 약

본 연구에서는 리그닌 전구물질 생합성에 관여하는 CCoAOMT (Caffeoyl-CoA-O-methyltransferase) 유전자의 발현을 분자생물학적으로 억제시킨 상태와 정상적인 상태에서 성장한 현사시나무를 대상으로 홀로셀룰로오스, 리그닌과 당당류 조성에 관한 정량 분석을 각각 실시하였다. 그리고 각각의 목질바이오매스로부터 MWL (milled wood lignin)을 추출하여 메톡실기정량, DFRC, Py-GC/MS, GPC, ¹³C NMR 분석 등 리그닌의 화학 구조적 특성을 비교하였다. 정상재와 형질전환체의 홀로셀룰로오스 함량은 각각 81.6%와 82.3%로 큰 차이는 없었지만, 리그닌 함량은 각각 21.7%와 18.3%로 형질전환체가 약 3.4% 정도 낮았다. 정상재와 형질전환체의 구성 당당류 분석결과, 글루코오스는 각각 511.0 mg/g와 584.8 mg/g, 그리고 자일로오스는 각각 217.8 mg/g와 187.5 mg/g로 나타나 CCoAOMT 발현억제는 당당류 조성에 영향을 미치는 것으로 분석되었다. 각 시료로부터 단리한 리그닌(MWL)의 메톡실기 정량에 따르면 CCoAOMT 발현을 억제한 시료에서 약 7% 정도의 메톡실기가 감소하는 것으로 나타났고, 이는 ¹³C-NMR 분석과 Py-GC/MS 분석을 통하여 확인할 수 있었

*1 접수 2009년 12월 31일, 채택 2010년 3월 8일

*2 서울대학교 농업생명과학대학 산림과학부. Dept. Forest Science, CALS, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

*3 국립산림과학원 녹색자원이용부 바이오에너지연구과. Div. Forest Bioenergy, Dept. Forest Resources Utilization, Korea Forest Research Institute, Seoul 130-712, Korea

*4 호서대학교 한방화장품과학과. Dept. Herbal Cosmetic Science, College of Natural Science, Hoseo University, Chonan 330-713, Korea

*5 서울대학교 농업생명과학연구원. Research Institute for Agriculture and Life Science, Seoul National University, Seoul 151-921, Korea

† 교신저자(corresponding author) : 최준원(e-mail: cjw@snu.ac.kr)

다. 또한 Py-GC/MS 분석에 의하면 정상재와 형질전환체 리그닌의 G/S 비율이 각각 0.59와 0.44로 나타난 점으로 미루어 CCoAOMT 발현 억제제는 리그닌 생합성 과정에서 G unit 생합성보다 S unit 생합성에 더 많은 영향을 미치는 것으로 예측할 수 있다.

ABSTRACT

In this study, chemical compositions - holocellulose, lignin and monomeric sugars - were characterized with two poplar wood cell walls, one of which was grown at normal condition (CPW) and the other was genetically modified by antisense suppression of CCoAOMT gene expression (ACPW). Milled wood lignins were isolated from CPW and ACPW and subjected to methoxyl group, DFRC, Py-GC/MS, GPC, ¹³C-NMR analysis, respectively. There were few differences in holocellulose contents in both cell walls, which were determined to 81.6% in CPW and to 82.3% in ACPW. However, lignin contents in ACPW was clearly decreased by the suppression of CCoAOMT gene expression. In CPW 21.7% of lignin contents was determined, while lignin contents in ACPW was lowered to 18.3%. The relative poor solubility of ACPW in alkali solution could be attributed to the reduction of lignin content. The glucose contents of CPW and ACPW were measured to 511.0 mg/g and 584.8 mg/g and xylose contents 217.8 mg/g and 187.5 mg/g, respectively, indicating that suppression of CCoAOMT gene expression could be also influenced to the formation of monomeric sugar compositions. In depth investigation for milled wood lignin (MWL) isolated from both samples revealed that the methoxyl contents at ACPW was decreased by 7% in comparison to that of CPW, which were indirectly evidenced by ¹³C-NMR spectra and Py-GC/MS. According to the data from Py-GC/MS S/G ratios of lignin in CPW and ACPW were determined to 0.59 and 0.44, respectively. As conclusive remark, the biosynthesis of syringyl unit could be further influenced by antisense suppression of CCoAOMT during phenylpropanoid pathway in the plant cell wall rather than that of guaiacyl unit.

Keywords: poplar wood, CCoAOMT (caffeoyl-CoA-O-methyltransferase), milled wood lignin, DFRC, ¹³C-NMR spectra, Py-GC/MS

1. 서 론

화학적인 측면에서 목질바이오매스의 주요 용도로는 펄프/종이 생산과 함께 최근 들어 이슈화되고 있는 바이오에탄올 생산을 들 수 있다. 이들의 공통점은 바이오매스 성분 중에서 65~80%를 차지하고 있는 셀룰로오스/헤미셀룰로오스 성분만을 필요로 하고, 25~35%의 리그닌은 제거되어야 한다는 점이다. 특히 목질계 바이오에탄올 생산 공정에서 리그닌은 자체적으로 당화 및 발효를 저해할 뿐만 아니라 화학

적·물리적 처리에 의해서 생성된 다양한 화합물들이 저해요인으로 작용될 수 있다. 또한 리그닌은 비친수성의 페닐프로판 구조가 복잡하게 결합된 비결정성의 고분자이다. 따라서 리그닌의 분해와 탈리그닌화가 쉽지 않아서 펄핑 공정에서 리그닌을 제거하는데 주로 머캅탄그룹과 같은 약취가 심하고 반응성이 강한 약품을 사용하고 있다. 그 결과 바이오매스로부터 바이오에탄올 생산을 위해 리그닌을 효과적으로 제거할 목적으로 다양한 물리화학적 전처리 공정이 시도되고 있다. 하지만 리그닌의 구조적 불명

확성과 수중에 따른 다양한 화학 결합방식 때문에 침엽수나 활엽수 등 리그닌 함량이 높은 목질바이오매스에 적합한 전처리 방법은 아직 연구 중에 있다. 최근 들어 산·염기 등 촉매에 의한 물리·화학적인 탈리그닌화 전처리에 관한 연구와 함께 분자생물학적으로 식물 세포벽에서 리그닌의 생합성 과정에 관여하는 효소의 유전자 발현 조절을 통해 리그닌 함량을 줄이거나 리그닌 고분자의 화학결합 방식을 변화시켜 리그닌을 보다 용이하게 제거하려는 연구가 진행되고 있다(Guo *et al.*, 2001; Pilate *et al.*, 2002; Boudet *et al.*, 2003). 이러한 리그닌 제거에 관련된 연구들은 목질바이오매스의 새로운 활용분야인 바이오 에탄올 변환에 요구되는 비용을 줄일 수 있을 뿐만 아니라 화학약품의 사용량을 줄일 수 있는 환경친화적 펄핑 공정개발에 기여할 것으로 기대되고, 나아가 생분해성 바이오소재로 리그닌의 용도개발이 촉진될 것으로 기대된다.

리그닌은 페닐프로판 단량체가 결합된 방향족성 비결정성 고분자로서 바이오매스의 세포벽, 특히 이차벽에 주로 분포해 있으며, 수목의 지지력을 부여하고 도관요소를 통해 비투과성의 수분 이동 통로로 작용한다. 양치식물 이상의 모든 유관속 식물의 세포 내에서 p-coumaroyl (H-unit), coniferyl (G-unit)과 sinapyl alcohol (S-unit)이라는 3종의 리그닌 단량체들이 모노리그놀 생합성 경로(phenylpropanoid pathway)에 의해 생합성된다. 이러한 hydroxycinnamyl alcohol들은 peroxidase/H₂O₂ 작용에 의해 라디칼 형태로 변환되고 이들은 서로 짝지음 반응(coupling reaction) 메커니즘에 의해 여러 가지 특징적인 단량체 간의 결합(β -O-4, β -5', 5-5', β - β' , etc.)을 통해 리그닌이라는 거대한 페놀 고분자가 식물 세포벽에 형성된다. Fig. 1에서 보듯이 CCoAOMT (caffeoyl-CoA-O-methyltransferase)는 모노리그놀 생합성 경로에서 caffeoyl CoA ester의 방향족 고리의 3번에 위치한 수산기를 메톡실기로 전이하거나, 5-hydroxyferuloyl CoA ester의 방향족 고리의 5번에 위치한 수산기를 메톡실기로 전이시키는 반응에 관여하는 효소로서 식물 세포벽에 존재하는 리그닌의 전구물질인 coniferyl alcohol과 sinapyl alcohol

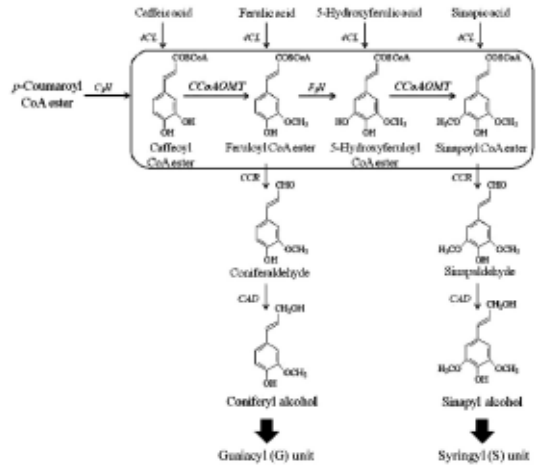


Fig. 1. The biosynthetic pathway for lignin precursors in plant cell wall (Anterola *et al.*, 2002).

의 생합성에 관여한다.

따라서 식물 세포 내에 존재하는 CCoAOMT 유전자의 발현을 분자생물학적으로 억제시키면 세포벽 내에 존재하는 리그닌의 G 및 S unit의 조성이 변화될 것으로 예측된다. 반면, caffeoyl CoA ester 뿐만 아니라 5-hydroxyferulic acid derivatives들의 농도는 증가될 것으로 예상되고 이러한 2차 대사산물의 농도 변화는 생성되는 리그닌의 화학구조에 많은 영향을 미칠 것이라고 예상된다.

본 실험은 모노리그놀 생합성 경로에서 CCoAOMT 유전자의 발현을 억제한 6년생 현사시 목부와 정상 상태에서 성장한 6년생 현사시 목부의 화학적 특성을 비교하였으며, 각각 milled wood lignin (MWL)을 단리하여 DFRC, Py-GC/MS와 ¹³C-NMR을 통해 구조적인 차이를 분석하였다. 이러한 목질바이오매스를 이용한 유전자 발현 조작 및 이에 따른 구조 변화에 관한 연구는 향후 화석자원을 대체할 친환경 소재로서 목질바이오매스를 용도에 맞게 맞춤형 바이오 자원으로 "design"화를 가능하게 할 것으로 기대된다.

2. 재료 및 방법

2.1. 공시재료

본 실험에서 사용한 CCoAOMT 유전자는 현사시나무(*Populus deltoides*)에서 분리하였으며, 분리한 유전자의 분자생물학적 특징은 Caffeoyl-CoA를 기질로 확인하였다. 현사시나무(*Populus deltoides*)에서 분리한 CCoAOMT 유전자를 HPT (Hygromycin phosphotransferase) 저항성 유전자가 삽입된 T-DNA 벡터(pBIB-HYG)에 Antisense 방향으로 클로닝하여 형질전환을 실시하였다. 본 실험에서는 6년생 현사시나무 형질전환체 목부(Antisense CCoAOMT poplar wood ACPW)와 정상 상태에서 성장한 6년생 현사시나무 목부(Control poplar wood CPW)를 실험용 분쇄기로 분쇄하여 40 mesh 이하의 목분을 제조하였다. 각 시료의 화학조성은 에탄올과 벤젠을 혼합(v/v 1:2)한 유기용매로 추출성분을 제거한 후에 분석하였다.

2.2. 바이오매스 화학조성 분석

홀로셀룰로오스 함량(%)은 Wise 법(1946)으로 측정하였고, 리그닌 함량(%)은 72% 황산가수분해법(TAPPI method (T222 om-88))에 의거하여 정량하였다. 주요 단당류 성분과 함량은 리그닌 정량 과정에서 제조한 황산가수분해액을 60배 희석한 후에 서울대학교 농업과학공동기기센터의 Carbo Pac PA100 column (4 × 250 nm)과 ED50 pulsed amperometric detector가 장착된 고성능이온교환크로마토그래피(HPAEC, Aionex system)로 정량하였다. 바이오매스의 알칼리 용해도(%)는 1 M의 수산화나트륨용액에 약 5 g의 목분을 첨가하여 37°C에서 20시간 동안 지속적으로 교반한 후 용액을 원심 분리하여 여과된 잔사를 동결건조한 후 알칼리 용해도(%)를 계산하였다.

2.3. 바이오매스의 리그닌 분석

2.3.1. 리그닌 결합방식과 분자량 측정

현사시나무 정상재와 형질전환체에서 형성된 리그닌(milled wood lignin)은 95% aq. dioxane으로 단리한 후에 분자량 분포, β -O-4 결합빈도 및 메톡실기를 정량하였다. 메톡실 그룹의 함량은 Viebock, Schwappach (1930)에 의해 고안된 분석방법을 변형한 Sheri M. Baker (1996)법에 준거하여 측정하였다. 단리한 MWL 내 β -O-4 결합 빈도는 DFRC분석법(derivatization followed by reductive cleavage; Ralph, 1997)에 의해 리그닌 단량체로 탈고분자화시킨 후 Gas chromatography (HP 6890 series)로 정량하여 측정하였다. 자세한 분석 조건은 다음과 같다 - Column : DB-5 (0.25 mm I.D. × 60 m Agilent Technologies) Injection temp. : 220°C Oven temp. : 100~280°C, 5°C/min Post run : 8 min Detector. MWL의 분자량은 피리딘과 무수초산(v/v 1:1)으로 MWL을 아세틸화시킨 후 THF (tetrahydrofuran) 용매에 녹여 겔크로마토그래피분석(GPCmax; Viscotek)을 통해 측정하였다.

2.3.2. ^{13}C -NMR 분석

현사시나무 정상재와 형질전환체에서 형성된 리그닌 구조 내 탄소의 결합양식의 차이를 살펴보기 위하여 아세틸화된 현사시 MWL을 DMSO 용매에 녹여 서울대학교 농업과학공동기기센터의 High Resolution NMR Spectrometer (Bruker AVANCE 600, Germany)를 이용하여 분석하였다.

2.3.3. 분석용 열분해(Analytical Py-GC/MS) 산물 분석

열에너지에 의한 바이오매스의 분해로 인하여 생성되는 저분자 물질을 정성, 정량하여 현사시나무 정상재와 형질전환체의 구성성분과 열분해생성물을 비교해보기 위해 분석용 열분해를 실시하였다. 실험을 수행한 분석용 열분해 장치에 관한 정보는 다음과 같다.

Ball-miller로 시료를 각각 실버컵(PY1-EC80F)에

약 200~250 μg 을 주입한 후 internal standard인 Fluoranthene 10 μl (Fluoranthene 2.4 mg/MeOH 10 ml)를 첨가하였다. 그리고 실버컵 내에 잔류하고 있는 메탄올을 진공데시케이터에서 약 5시간 동안 증발시킨 후 GC/FID (Agilent technologies 7890A)에 장착된 열분해기(PY-2020iD)의 injector에 주입하였다. 시료는 475°C인 조건(interface 320°C인 조건에서 약 10초간 대기 후 열분해 시작)에서 약 10초 동안 열분해되었으며 이때 생성된 가스는 헬륨기체를 통해 GC 칼럼으로 운반(split ratio 100:1)된 후 FID와 MSD (Agilent Technologies 5975C)를 통한 열분해 생성물의 정량 및 정성 분석을 수행하였다. 분석에 이용된 칼럼과 오븐조건에 관한 정보는 다음과 같다. 분석형 열분해기의 Ultra ALLOY-5MS/HT (0.25 mm I.D. \times 30 m Ultra ALLOY[®]) 칼럼에서 분리된 열분해생성물은 DB-5MS (0.25 mm I.D. \times 30 m Agilent Technologies)칼럼이 장착된 GC로 이송되어 각 성분별로 분리된 후에 MSD (Agilent Restrictor 1: 0.55 m \times 100 μm : 450°C)와 FID (Agilent Restrictor 2: 2.13 m \times 180 μm : 450°C)에 의한 각 성분에 대한 정성, 정량적 분석을 실시하였다. 분석 시간은 총 117.5분이며, 오븐의 온도조건은 초기 50°C (0.5분)에서 2°C/min 속도로 280°C까지 상승시켰고, post run 조건은 320°C, 3분이었다.

3. 결과 및 고찰

3.1. 바이오매스 화학조성

Table 1은 현사시나무 정상재(control)와 형질전환체(transgenic poplar)의 홀로셀룰로오스, 리그닌, 알칼리 용해도 함량의 결과이다. 형질전환체와 정상재의 홀로셀룰로오스와 추출물 함량은 1% 미만의 차이를 보이고 있지만 Klason method에 준거한 리그닌 함량은 형질전환체가 정상재보다 약 3.4% 낮게 측정되었다. 이는 현사시나무 형질전환체가 성장하면서 CCoAOMT 유전자 발현의 억제에 의해 세포벽 내 목질화 과정(lignification)에서 리그닌 전구체인 G unit와 S unit의 생합성이 억제된 것으로 짐작할

Table 1. Chemical composition of Antisense CCoAOMT poplar wood (ACPW) and control poplar wood (CPW)

Sample	Holocellulose (%)	Lignin (%)	Extractives (%)	Alkali solubility (%)
ACPW	823 \pm 0.15	183 \pm 0.02	20 \pm 0.11	248
CPW	816 \pm 0.48	217 \pm 0.24	14 \pm 0.02	314

수 있다.

여기서 방향족 고리의 C₅에 위치한 하이드록실 그룹(Mw : ca. 17.0073 g/mol)의 메틸화에 의해서 메톡실 그룹(Mw : ca. 31.0339 g/mol)으로 100% 전환된다고 가정하면 1몰 당 약 14%의 질량이 증가할 것이므로 최대 14% 이내의 범위에서 리그닌 함량차이가 난다고 볼 수 있다. 따라서 추가적으로 CCoAOMT 유전자의 활성에 관한 연구가 진행되어야 리그닌 함량 차이에 관한 고찰이 정량적으로 이루어질 것으로 판단된다. 한편, 수용성리그닌 함량은 형질전환체, 정상재 각각 0.27%, 0.28%로 산에 의해 리그닌으로부터 가수분해된 저분자량 폐놀성 물질의 조성은 큰 차이가 없을 것으로 사료된다. 그리고 일반적으로 바이오매스 내 리그닌이 알칼리에 쉽게 용해되는 점을 감안하여 리그닌 함량이 높을수록 알칼리 용해도가 높을 것이라는 판단하여 측정된 알칼리 용해도 결과는 형질전환체가 정상재보다 약 6.6% 낮았다. 이 결과는 CCoAOMT 발현 억제에 의해 목질화 과정에서 리그닌의 화학구조적인 변화가 발생했다고 예상되어 리그닌에 관한 추가적인 실험을 수행하였고 이 결과에 대해서는 다음 장에서 논하기로 한다.

Table 2에서 보듯이 총 당당류의 함량은 형질전환체가 정상재에 비해 4% 더 높았다. 형질전환체는 셀룰로오스의 주요 성분인 글루코오스의 성분이 정상재보다 약 7% 정도 높은 반면에 헤미셀룰로오스의 주요 성분인 자일로스의 함량은 약 3% 정도 낮았다. 홀로셀룰로오스 측정 결과와 당당류 분석결과를 비교해 보면 홀로셀룰로오스 측정결과에 따른 형질전환체와 정상재의 함량 차이는 약 0.7%이지만 당당류 분석 결과는 약 4%로 비교적 큰 차이를 보여주고 있

Table 2. Determination of monomeric sugars in the cell wall of ACPW and CPW

Sample	Glucose	Xylose	Galactose	Total sugars	
	(mg/g)			(mg/g)	(wt %)
ACPW	584.8 ± 59.0	187.5 ± 10.9	14.7 ± 1.6	786.9 ± 68.3	78.7 ± 6.8
CPW	511.0 ± 39.9	217.8 ± 12.5	18.2 ± 1.1	746.9 ± 51.4	74.7 ± 5.1

다. 이 결과는 헤미셀룰로오스와 리그닌이 서로 결합되어 있다는 점을 고려해보면 두 고분자간 상호작용에 의해 바이오매스의 화학조성의 차이가 발생한다고 예상해 볼 수 있다. 또한 목재를 구성하고 있는 헤미셀룰로오스와 리그닌 복합체의 결합양식과 바이오매스 복합체 내 홀로셀룰로오스와 리그닌 분포양식의 변화로 인한 산 가수분해 차이에 기인된다고 판단된다.

3.2. 리그닌 추출 및 구조분석

현사시나무 정상재와 형질전환체에서 생성된 리그닌의 화학적 구조를 비교하기 위해 milled wood lignin (MWL)을 각각 단리 하였고 Table 3에 각 MWL의 화학 분석 결과를 제시하였다. 형질전환체-MWL에 존재하는 메톡실 그룹의 함량은 정상재-MWL보다 약 1.2% 정도 낮게 측정되었다. 메톡실 그룹의 함량 측정은 리그닌의 방향족성 고리에 위치한 메톡실 그룹이 hydriodic acid (HI)와 S_N2 반응에 의해 생성된 methyl iodide (CH₃I)의 정량을 통해 이루어진다.

따라서 위 측정결과는 모노리그놀 형성과정에서 C₅에 부착된 수산기의 메틸화에 관여하는 CCoAOMT의 발현이 억제되었기 때문에 형질전환체-MWL에서 메톡실기 함량이 정상재보다 낮게 측정되었으리라 판단된다. 정상재-MWL의 메톡실 그룹의 함량을 100%로 간주하면, 형질전환체-MWL의 메톡실 그룹의 함량은 93.3%로 측정되어 CCoAOMT 발현 억제에 의해 약 6.7%의 G unit 및 S unit 이 감소된 것으로 판단된다(Table 3).

DFRC 분석에 의한 guaiacyl과 syringyl unit의 함량을 살펴보면 정상재에 단리한 리그닌이 약 14 μmol/g, 34 μmol/g으로 형질전환체의 guaiacyl unit

과 syringyl unit보다 더 높았다. 여기서 리그닌의 주요 결합양식인 β-O-4 결합을 선택적으로 분해하는 DFRC 분석의 특징과 리그닌 내 syringyl unit은 주로 β-O-4, β-β', β-5 결합을 이루고 있다는 점을 고려해 볼 때 형질전환체-MWL 내 syringyl unit의 감소에 의해서 β-O-4 결합의 감소를 초래하여 정상재-MWL에 비해 리그닌의 함량이 더 낮게 측정된 것이라고 추측해 볼 수 있다. 한편, DFRC법에 의해서 형질전환체-MWL과 정상재-MWL에서 G/S비율이 동일하게 측정된 결과에 대해서는 활엽수 내 리그닌 단량체들의 결합양식 중 β-1, β-β'의 빈도가 침엽수보다 높다는 점(Erickson *et al.*, 1973)을 감안한다면 CCoAOMT 발현 억제에 의해 리그닌 단량체의 결합양식의 변화에 대한 가능성을 배제할 수 없다. 따라서 모노리그놀 생합성 경로에서 생성된 syringyl unit가 짝지음 반응에 의한 리그닌 고분자화에 참여하게 되는 시점과 방식, 또는 CCoAOMT 유전자와 상호작용을 하는 다른 효소(e.g., CAD)의 활성화 여부에 관한 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다(Lewis *et al.*, 2002). GPC 분석에 의한 형질전환체-MWL와 정상재-MWL의 평균 분자량은 각각 10,893과 9,781로 측정되었고 리그닌의 생합성 경로에서 syringyl unit이 생성되는 과정이 차단되었기 때문에 메톡실 그룹의 함량이 낮아져 분자량은 형질전환체-MWL에서 약 10% 정도 낮은 결과가 나온 것으로 예측된다. 다분산도 값은 형질전환체-MWL (2.11)이 정상재-MWL (2.47)보다 낮기 때문에 중합도는 더 높을 것으로 예측된다.

Table 3. Determination of methoxyl groups and β -O-4 linkages in the milled wood lignin isolated from CPW and ACPW

Sample	Methoxyl group in MWL (%)	DFRC analysis ($\mu\text{mol/g}$ sample)			
		G unit	S unit	G + S unit	G/S
ACPW-MWL	16.1 \pm 0.65	298.0 \pm 3.56	761.0 \pm 8.85	1059.0 \pm 12.41	0.4
CPW-MWL	17.3 \pm 0.12	312.2 \pm 2.24	795.2 \pm 5.86	1107.4 \pm 8.10	0.4

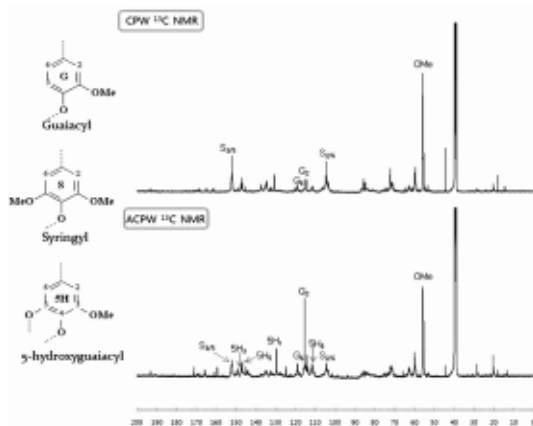
Fig. 2. ^{13}C -NMR spectra of milled wood lignins isolated from control poplar wood (CPW) and Antisense CCoAOMT poplar wood (ACPW).

Fig. 2는 형질전환체-MWL과 정상재-MWL의 ^{13}C -NMR 스펙트럼의 결과이다. 스펙트럼의 각 탄소에 해당되는 peak를 정량하지 않았지만 CCoAOMT 형질 억제에의 결과로 syringyl unit은 감소되는 반면 5-hydroxyguaiacyl의 유도체가 증가되었다는 것을 두 스펙트럼의 비교를 통해 확인할 수 있다. 형질전환체의 ^{13}C -NMR 스펙트럼을 살펴보면 syringyl unit은 2/6번 탄소(signal in 105 ppm)와 3/5번 탄소(signal in 154 ppm) peak의 면적은 정상재의 ^{13}C -NMR 스펙트럼에 비해 크게 감소되었음을 알 수 있었으며, 정상재에서 잘 나타나지 않던 5H (5-hydroxyguaiacyl)의 peak가 형질전환체의 스펙트럼에 잘 나타나 있는 것을 확인할 수 있다(Marita *et al.*, 2003; Ralph *et al.*, 2001).

Fig. 3과 Table 4는 현사시나무 정상재와 형질전환

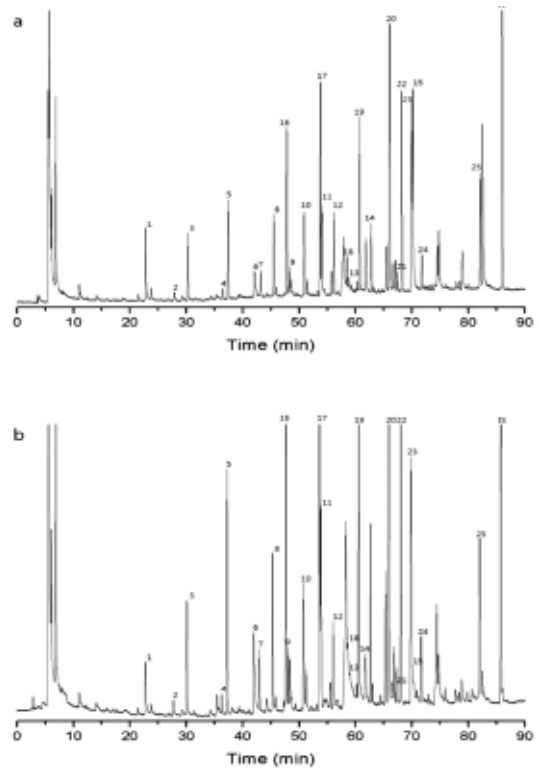


Fig. 3. Pyrograms of milled wood lignins isolated from control poplar wood (CPW; a) and Antisense CCoAOMT poplar wood (ACPW; b).

체의 분석용 열분해(Analytical Py-GC/MS)에 의한 크로마토그램과 열분해 산물에 대한 분석결과를 각각 나타내었다. 정상재와 형질전환체 모두 총 25종의 페놀성 단량체가 검출되었으며 Internal standard를 이용하여 각 peak의 면적을 정량하였다. 그리고 H, G, S type으로 페놀성 모노머를 분류하였고

Table 4. Monomeric phenolics released from analytical pyrolysis of poplar milled wood lignin

No.	RT	Pyrolytic products	Poplar MWL (%)	
			CPW	ACPW
1	22.79	Phenol	100	0.34
2	27.84	2-Methylphenol (OCresol)	0.12	0.09
Sum			1.12	0.43
3	30.26	2-Methoxyphenol (Guaiacol)	0.78	0.51
4	36.48	2-Methoxy-5-methylphenol (Isocresol)	0.18	0.12
5	37.43	2-Methoxy-4-methylphenol (Homocresol)	1.61	1.51
6	42.10	3-Methoxy-1,2-benzenediol (3-Methoxycatechol)	0.45	0.74
7	43.18	4-Ethyl-2-methoxyphenol (Ethyl guaiacol)	0.28	0.28
8	45.50	2-Methoxy-4-vinylphenol (Vinyl guaiacol)	0.90	0.70
9	48.26	2-Methoxy-4-(2-propenyl)-phenol (Eugenol)	0.27	0.26
10	50.89	2-Hydroxy-3-methoxy-benzaldehyde (Vanillin)	1.65	1.02
11	54.03	2-Methoxy-4-(1-propenyl)phenol (Isoeugenol)	1.06	0.81
12	56.17	1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)ethanon (Acetoguaiacone)	0.97	0.45
13	58.73	1-(4-Hydroxy-3-methoxyphenyl)-2-propanone (Guaiacyl acetone)	0.20	0.40
14	61.86	3-Hydroxy-1-(4-hydroxy-3-methoxyphenyl)-1-propanone	0.73	0.38
15	70.17	4-(3-Hydroxy-1-propenyl)-2-methoxy-phenol (Coniferyl alcohol)	3.15	0.12
Sum			12.23	7.30
16	47.81	2,6-Dimethoxyphenol (Syringol)	1.89	1.41
17	53.77	3,5-Dimethoxy-4-hydroxytoluene (4-Methyl syringol)	3.40	3.67
18	58.45	4-Ethyl-2,6-dimethoxyphenol (4-Ethyl syringol)	0.43	1.79
19	60.72	3,5-Dimethoxy-4-hydroxystyrene (4-Vinyl syringol)	1.92	1.61
20	66.03	4-Hydroxy-3,5-dimethoxy-benzaldehyde (Syringaldehyde)	4.83	3.41
21	67.46	1-(3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenyl)propyne	0.20	0.14
22	68.20	2,6-Dimethoxy-4-(2-propenyl)-phenol (Methoxyeugenol)	3.09	2.04
23	69.93	1-(4-Hydroxy-3,5-dimethoxyphenyl)-ethanon (Acetosyringone)	2.71	1.56
24	71.78	3,5-Dimethoxy-4-hydroxyphenylacetic acid (Homosyringic acid)	0.22	0.18
25	82.13	3,5-Dimethoxy-4-hydroxycinnamaldehyde (Sinapyl aldehyde)	1.92	0.85
Sum			20.61	16.66
Total concentration			33.96	24.39
G/S ratio			0.59	0.44

이 결과를 근거로 하여 G/S 비를 계산하였다. DFRC 법에 의한 G/S 비는 형질전환체, 정상재 모두 0.4이 었으나 분석용 열분해 산물의 정량을 통해 산출된 G/S 비는 형질전환체, 정상재 각각 0.44, 0.59로 정 상재의 비가 DFRC 법에 의해 산출된 결과보다 더

높았다. 이는 리그닌으로부터 분해된 G, S type의 정 량적 분석이 가능한 실험방법들 중 특정하게 더 정확 한 결과를 나타내는 실험방법이 아직 존재하고 있지 않기 때문에 실험 결과를 해석하는데 있어 한계점이 라 볼 수 있다(Aldwin *et al.*, 2002). 하지만 이 결과

를 통해 리그닌의 주요 결합양식인 β -O-4 결합을 선택적으로 분해하는 것으로 알려진 DFRC 분석결과로 확인할 수 없었던 정상재와 형질전환체의 S type과 G type의 비율의 변화를 분석용 열분해를 통해 확인할 수 있었으며, CCoAOMT 형질 억제에 의한 syringyl 그룹의 감소로 인하여 리그닌 단량체들의 결합양식이 변화될 수 있다고 판단된다. 한편, ^{13}C NMR 분석을 통해 형질전환체의 특징적인 화합물인 5-hydroxyguaiacyl에 해당하는 3-methoxycatechol의 함량은 0.74%로 정상재의 0.45%보다 높았으며, 정량된 리그닌의 총량이 정상재 33.9%, 형질전환체 24.4%인 점을 감안한다면, 형질전환체에서 생성된 3-methoxycatechol의 함량이 상대적으로 더 증가했음을 추정해 볼 수 있다. 그 이외에도 정상재에 비해 형질전환체의 syringyl group 함량이 20.6%에서 16.7%, guaiacyl group의 함량이 12.2%에서 7.3%로 감소하였음을 확인할 수 있었고, 특히 coniferyl alcohol의 함량이 3.2%에서 0.12%로 크게 감소하였다. Coniferyl alcohol의 감소에 관한 정확한 원인을 열분해 생성물을 통해 설명할 수 없지만, CCoAOMT 활성 억제에 의해 caffeic acid의 ferulic acid로의 전이가 원활하게 이루어지지 않아 결국 coniferyl alcohol의 함량이 감소하였다고 잠정적으로 추측해 볼 수 있다.

4. 결 론

본 연구를 통해 리그닌 생합성 경로에서 방향족 고리의 3번과 5번 탄소에 위치한 하이드록실 그룹을 메톡실그룹으로의 전이 반응에 관여하는 효소인 CCoAOMT 유전자의 발현이 억제되었을 때 G, S type 모노머의 함량이 감소됨과 동시에 현사시나무 목부의 리그닌 함량이 감소됨을 확인하였다. 현사시나무의 정상재와 CCoAOMT 형질전환체 목부의 화학조성과 MWL의 결합구조 및 H, G, S type의 모노머의 함량에 관한 분석을 실시한 결과 CCoAOMT 유전자의 발현이 억제되었을 때 현사시나무의 리그닌 함량이 21.7%에서 18.3%로 감소되었음을 확인할 수 있었고, 분석용 열분해기를 통해 G, S type 모노머 함량이 12.2%에서 7.3%, 20.6%에서 16.7%로 각각

감소하였다. 위 결과를 바탕으로 CCoAOMT 활성 억제는 리그닌 함량을 감소시키기 때문에 목질계 바이오매스의 활용을 위한 전처리 단계인 탈리그닌화 과정의 비용을 절감할 수 있을 것이라 기대된다. 하지만 유전자의 형질억제에 따른 효소의 활성여부가 리그닌의 생성과 식물 생장에 관한 주요 요소이기 때문에 분자생물학적 관점에서 추가적인 연구가 필요하다고 판단된다.

사 사

본 연구는 한국연구재단의 신진교수연구지원사업(KRF-2008-331-F00027)의 지원에 의하여 이루어진 것입니다.

참 고 문 헌

1. Anterola, A. M. and N. G. Lewis. 2002. Trends in lignin modification: a comprehensive analysis of the effects of genetic manipulations/mutations on lignification and vascular integrity. *Phytochemistry* 61: 221~294.
2. Baker, S. M. 1996. Rapid methoxyl analysis of lignins using gas chromatography. *Holzforchung* 50: 573~574.
3. Boudet, A. M., S. Kajita, J. Grima-Pettenati, and D. Goffner. 2003. Lignins and lignocelluloses: a better control of synthesis for new and improved uses. *Trends Plant Sci.* 8: 576~581.
4. Erickson, M., S. Larsson, and G. E. Miksche. 1973. Gaschromatographische analyse von lignoxydationsprodukten. VIII. Zur struktur des lignins der fichte. *Acta chemica scandinavica* 27: 903~914.
5. Faix, O., D. Meier, and I. Fortmann. 1990. Thermal degradation products of wood. *Holz als Roh-Werkstoff* 48: 351~354.
6. Guo, D., F. Chen, J. Wheeler, J. Winder, S. Selman, M. Peterson, and R. A. Dixon. 2001. Improvement of in-rumen digestibility of alfalfa forage by genetic manipulation of lignin O-methyltransferases. *Transgenic Res.* 10: 457~464.
7. Lu, F. and J. Ralph. 1997. Derivatization followed

- by reductive cleavage (DFRC method), a new method for lignin analysis. Protocol for analysis of DFRC monomers. *J. Agric. Food Chem* 45: 2590~2592.
8. Marita, J. M., J. Ralph, R. D. Hatfield, D. Guo, F. Chen, and R. A. Dixon. 2003. Structural and compositional modifications in lignin of transgenic alfalfa down-regulated in caffeic acid 3-O-methyltransferase and caffeoyl coenzyme A 3-O-methyltransferase. *Phytochemistry* 62: 53~65.
 9. Marita, J. M., J. Ralph, C. Lapierre, L. Jouanin, and W. Boerjan. 2001. NMR characterization of lignins from transgenic poplars with suppressed caffeic acid O-methyltransferase activity. *J. Chem. Soc., Perkin Trans 1*: 2939~2945.
 10. Pilate, G., E. Guiney, K. Holt, M. Petit-Conil, C. Lapierre, J. C. Leple, B. Pollet, I. Mila, E. A. Webster, H. G. Marstorp, D. W. Hopkins, L. Jouanin, W. Boerjan, W. Schuch, D. Cornu, and C. Halpin. 2002. Field and pulping performances of transgenic trees with altered lignification. *Nature Biotechnology* 20: 607~612.
 11. Ralph, J., C. Lapierre, J. M. Marita, H. Kinm, F. Lu, R. D. Hatfield, S. Ralph, and C. Chapple. 2001. Elucidation of new structures in lignins of CAD- and COMT-deficient plants by NMR. *Phytochemistry* 57: 993~1003.
 12. Ralph, J. and R. D. Hatfield. 1991. Pyrolysis-GC-MS characterization of forage materials. *J. Agric. Food Chem* 39: 1426~1437.
 13. Sluiter, A., B. Hames, R. Ruiz, C. Scarlata, J. Sluiter, D. Templeton, and D. Crocker. 2008. Determination of structural carbohydrates and lignin in biomass. Golden, CO, USA: National Renewable Energy Laboratory.
 14. Wise, L. E., M. Murphy, and A. A. D'Addico. 1946. Chlorite holocellulose, its fraction bearing on summative wood analysis and on the hemicelluloses. *Paper trade journal* 122: 35~43.