

시금치 葉綠體의 光系の 活性에 미치는 抽出溶媒와 反應溶液의 影響

權炳奎 · 梁運貞
(慶北大學校 大學院 生物學科)

Effects of Different Extraction Media and Reaction Mixtures on Photosystem II Activity of Spinach Chloroplasts

Kwon, Byung Kyu and Un Jin Yang

(Department of Biology, Graduate School of Kyung Pook National University, Daegu)

ABSTRACT

This work deals with different extraction media and reaction mixtures on photosystem II activity of Spinach chloroplasts. The photoreduction rate of ferricyanide and DPIP by intact chloroplasts which extracted with four kinds of extraction media; S-Tris-N pH 7.2, 8.0, S-Tricine-N pH 7.2, 8.0, was measured in five kinds of reaction mixtures; S-Tris-N pH 7.2, 8.0, S-Tricine-N pH 7.2, 8.0, 0.05 M-Tris pH 7.2. The extraction medium which shows the highest photoreduction rate was S-Tris-N at pH 7.2, and S-Tricine-N at pH 8.0. As to the reaction mixture, S-Tricine-N pH 8.0 showed the highest rate. On the complex effects of extraction media and reaction mixtures, the highest photoreduction rate of Hill oxidant by intact chloroplasts was obtained by S-Tris-N pH 7.2 extraction medium and S-Tricine-N pH 8.0 reaction mixture. The second highest activity was obtained by S-Tricine-N pH 8.0 extraction medium and reaction mixture.

序 論

葉綠體는 葉綠素를 含有하는 器官子로서 綠色植物의 光合成 研究에 가장 重要한 要因이 된다. 光合成 機作의 研究는 Hill(1937)에 依하여 抽出葉綠體에 依한 酸素發生에 隨伴되는 電子受容體의 光還元이 證明되고 Arnon 등(1954)에 依하여 抽出葉綠體의 光磷酸化 作用이 確認된 후 主로 抽出葉綠體를 材料로 한 研究가 進行되어 왔다.

Emerson(1943)에 이어 Duysens 등(1954, 1962)에 의하여 pigment system I의 P₇₀₀에서 長波長光에 依하여 電子가 勵起되는 光系과 들의 光分解로 遊離된 電子가 pigment system II의 reactive photocenter에서 短波長光에 依하여 勵起되는 光系の 關係가 明確해 졌다.

이 두 光反應系中 光系 I의 電子傳達系는 어느 程度

明確히 밝혀지고 있으나 光系 II의 電子傳達系는 아직 도 未解決의 問題가 많다. 光系 II의 光反應 機作에 關한 研究는 Hill反應에 阻害의인 處理를 加한 葉綠體의 酸素 發生能을 測定하거나(Katoh, 1967; Cheniae, 1971; Yamashita, 1968) 또는 어떤 種類의 酸化劑와 電子傳達 阻害劑를 包含한 反應溶液에서의 葉綠體에 依한 光還元率을 測定하는 方法이 採用되어 왔다 (Cheniae and Martin, 1972; Katoh and San Pietro, 1968, 1972; Kimimura and Kato, 1972; Huzisige, 1972).

그러나 이러한 研究들에 있어서 抽出葉綠體의 光化學의 活性을 測定하기 爲한 抽出溶媒와 反應溶液의 組成은 研究者에 따라 多様하다. 一般의으로는 Tris, Tricine, potassium phosphate, sodium phosphate 등의 buffer에 sucrosa, sorbitol 등의 糖類와 KCl, NaCl, MgCl₂, NH₄Cl 등의 鹽類, 其他 cytochrome, EDTA,

ASC, BSA, PEG 등을添加하여 葉綠體의 抽出溶媒로 하고 그에 適切한 酸化劑(Hill oxidant)와 葉綠體 標品을 添加한 것을 反應溶液으로 하여 光化學的 活性을 測定하고 있다.

抽出溶媒의 組成 및 그 酸度가 抽出葉綠體의 光化學的 活性에 미치는 影響에 關하여 Yamashita 등(1968)은 高濃度(0.8M)의 Tris(pH 8.0)를 抽出溶媒로 했을 때 H₂O와 光系 II 사이의 電子傳達系에 阻害作用이 나타난다고 報告하였으며, Good 등(1962, 1965)은 葉綠體 抽出溶媒의 buffer로서는 Tris보다 Tricine이 uncoupling 現象이 減小되며 특히 鹽基性 pH에서의 阻害作用이 弱화된다고 報告한 바 있다. Fry(1970)는 0.1M photassium phosphate(pH 7.5)를 buffer로 했을 때 sucrose(15bar) 또는 PEG(10%)나 PEG(10%)+EDTA(0.1M)을 添加한 溶液을 抽出溶媒로 한 葉綠體 標品의 경우 各各 32%, 77%, 100%의 光還元率을 보임을 報告하였다. 또한 Egeus(1972)는 sorbitol, KCl, Tricine(pH 7.3) 組成의 抽出溶媒에서 buffer를 phosphate(pH 7.3)로 代替하여도 光還元率의 變化가 나타나지 않음을 報告한 바 있다.

著者は 이러한 報告들을 綜合하여 가장 一般的으로 使用되고 있는 Tris¹⁾ 및 Tricine²⁾을 buffer로 하여 葉綠體 抽出溶媒 및 反應溶液이 ferricyanide와 DPIP의 光還元에 미치는 影響을 測定 比較하고 또한 抽出葉綠體의 aging에 依한 光還元率의 變化를 調査하였다.

材料 및 方法

1) 葉綠體의 抽出 및 葉綠素 定量

差動遠心分離法을 原理로 한 Inoue 등 (1973)의 方法을 改良하여 다음과 같은 方法으로 시금치 葉綠體를 抽出하였다(Diag. 1).

먼저 葉脈을 除去하여 水洗한 시금치 잎 10g을 40ml의 네 가지 STN 溶液 (S-Tris-N)³⁾ pH 7.2, 8.0 또는 S-Tricine-N⁴⁾ pH 7.2, 8.0) 중의 한가지와 混合하여 30秒間 waring blender로 homogenize하였다. 그 homogenate를 여덟겹의 가제로 한 濾過液을 1000×g로 1분간 遠心分離하여 沈澱物은 버리고 上澄液만을 2000×g로 10分間 遠心分離하였다. 얻어진 pellet을 洗滌, 精製하기 위하여 再次 5ml STN 溶液에 懸濁하여 2000×g로 10分間 遠心分離한 후 上澄液을 버리고

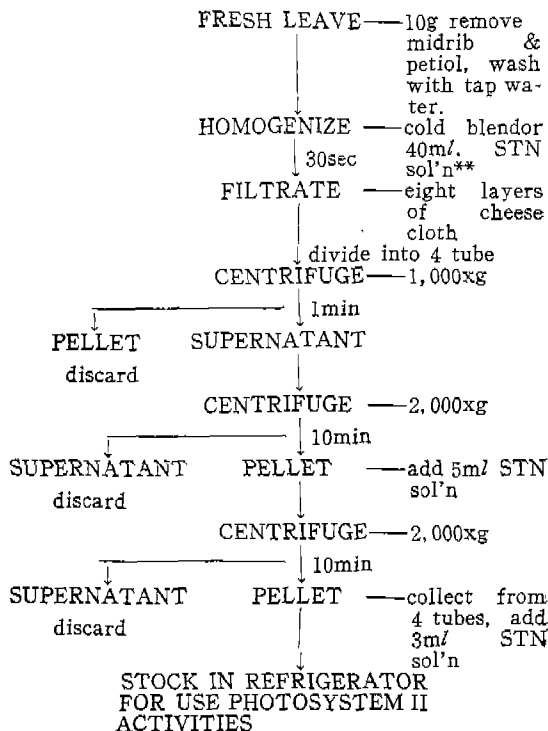


Diagram 1. Procedure for chloroplast extraction*

* All procedures were performed at 0~4°C, in dark.

** Isolation Media :

S-Tris-N(pH 7.2, 8.0).

S-Tricine-N(pH 7.2, 8.0).

pellet만을 最終的으로 3ml STN溶液에 再懸濁하여 光系 II의 活性을 測定하기 위한 葉綠體 標品으로 使用하였다. 이 葉綠體 標品을 製造하기 위한 全過程은 0~4°C의 低溫 暗條件下에서 進行되었다.

葉綠體 標品の 葉綠素 含量은 Mackinney(1941)의 比吸收係數를 基準으로 하는 Arnon(1949)의 連立方程式에 따라 定量하였으며 光還元率의 測定은 通常 標品 製造 10分后에 始作하였다.

2) 光系 II의 活性 測定

네 가지 溶媒로 抽出된 葉綠體 標品の 光系 II의 活性은 各 葉綠體 標品을 酸化劑(ferricyanide or DPIP)와 함께 다섯 가지 反應溶液(S-Tris-N pH 7.2, 8.0, S-Tricine-N pH 7.2, 8.0, 0.05M-Tris pH 7.2) 중의 하나에 添加한 20個의 試驗區에서 ferricyanide와 DPIP에 의한 吸光度의 減小을 Baush & Lomb Spectronic로 測定하여 葉綠體에 依한 酸化劑의 光還元率을 計算하였다.

註) 1) Tris(hydroxymethyl)-aminomethane

2) N-(Tris (hydroxymethyl)-methyl)-glycine

3) 0.4M Sucrose-0.05M Tris-0.01M NaCl

4) 0.4M Sucrose-0.05M Tricine-0.01M NaCl

測定은 長波長光을 除去하기 위하여 CuSO_4 飽和液 (10cm)을 光 filter로 두고 filter를 透過한 反應系의 入射光度 30,000lux, 溫度 $20 \pm 1^\circ\text{C}$ 로 하여, ferricyanide 光還元은 410mm에서 15分間, DPIP 光還元은 610mm에서 6分間 測定하였다.

光還元 反應溶液의 組成은 buffer의 濃度を 0.05M로 한 S-Tris-N(pH 7.2, 8.0) 또는 S-Tricine-N(pH 7.2, 8.0) 또는 Tris(pH 7.2) 溶液 3ml에, ferricyanide 反應溶液에는 葉綠體 標品 0.05ml(葉綠體 50 μg 該當量)와 0.05M potassium ferricyanide 溶液 0.05ml(ferricyanide 25 μmoles 該當量)를 添加하여 最終 液量을 3.1ml로 하였고, DPIP 反應溶液에는 葉綠體 標品 0.01ml(葉綠素 10 μg 該當量)와 0.03M DPIP 溶液 0.01ml(DPIP 0.3 μmoles 該當量)를 添加하여 最終 液量 3.02ml로 하였다. 實驗에 使用된 모든 藥品은 Merk製의 特級 試藥으로 하였다.

3) Aging Effect

抽出葉綠體 標品の 時間 經過에 따른 光系II의 活性 低下에 미치는 buffer의 影響을 調査하기 위하여 S-Tris-N pH 7.6 및 S-Tricine-N pH 7.6으로 抽出된 葉綠體에 의한 ferricyanide와 DPIP의 光還元率을 抽出溶媒와 同一한 組成의 反應溶液에서 24時間 間隔으로 4回 反復 測定하였다.

結果 및 考察

同一한 濃度에서 buffer 또는 酸度を 달리한 네 가지 溶媒로 抽出된 葉綠體 標品을 各各 다섯 가지 反應溶液에 酸化劑와 함께 添加하여 反應시킨 20個의 試驗區에서 測定한 ferricyanide의 光還元率은 Table 1과 같다.

Ferricyanide의 光還元率이 가장 높은 抽出溶媒는 S-Tris-N pH 7.2였으며, 그에 비하여 S-Tricine-N pH 8.0, S-Tricine-N pH 7.2, S-Tris-N pH 8.0이 各各 90.5%, 72.3%, 65.0%의 光還元率을 보였다. 反應溶液으로서 光還元率이 가장 높은 것은 S-Tris-N pH 8.0이며, 그에 비하여 S-Tris-N pH 8.0, 0.05M-Tris pH 7.2, S-Tris-N pH 7.2, S-Tricine-N pH 7.2가 各各 74.8%, 67.3%, 44.6%, 36.3%의 光還元率을 보였다.

Ferricyanide와 同一한 條件인 20個의 試驗區에서 測定된 DPIP의 光還元率은 Table 2와 같다.

DPIP, 光還元率이 가장 높은 抽出溶媒는 ferricyanide 光還元の 境遇와 마찬가지로 S-Tris-N pH 7.2였으며 그에 비하여 S-Tricine-N pH 8.0, S-Tricine-N pH 7.2, S-Tris-N pH 8.0이 各各 85.9%, 68.5%,

Table 1. Effects of extraction media and reaction mixtures on ferricyanide photoreduction rate

Extraction media	Reaction mixtures*	Rate of photoreduction of ferricyanide(μ moles $\text{K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ /mg Chl. 15 min.)**					
		S-Tris-N pH7.2	S-Tricine-N pH8.0	S-Tricine-N pH7.2	S-Tricine-N pH8.0	0.05M-Tris pH7.2	0.05M-Tris pH7.2
S-Tris-N	pH 7.2	19.0	32.5	12.0	46.0	27.5	
	pH 8.0	14.0	19.0	11.5	25.0	19.5	
S-Tricine-N	pH 7.2	13.5	23.0	12.0	28.0	22.5	
	pH 8.0	15.5	29.5	15.0	40.0	24.0	

* The reaction mixtures for ferricyanide contained in final volume of 3.1ml : 50 μg chlorophyll, 2.5 μ moles ferricyanide, 0.05M Tris-STN or 0.05M Tricine-STN or 0.05M Tris solution.

** The activities of ferricyanide-photoreduction were assayed at 410nm, 20°C , and illumination of 30,000lux.

Table 2. Effects of extraction media and reaction mixtures on DPIP photoreduction rate

Extraction media	Reaction mixtures*	Rate of photoreduction of DPIP (μ moles DPIP/mg Chl. 6min)**					
		S-Tris-N pH7.2	S-Tricine-N pH8.0	S-Tricine-N pH7.2	S-Tricine-N pH8.0	0.05M-Tris pH7.2	0.05M-Tris pH7.2
S-Tris-N	pH 7.2	21.0	28.0	19.5	30.0	22.0	
	pH 8.0	12.5	14.0	10.5	18.0	15.5	
S-Tricine-N	pH 7.2	14.5	19.5	11.5	19.5	17.5	
	pH 8.0	18.0	24.5	13.5	26.0	21.5	

* The reaction mixtures for DPIP contained in final volume of 3.02ml : 10 μg chlorophyll, 0.3 μ moles DPIP, 0.05M Tris-STN or 0.05M Tricine-STN or 0.05M Tris solution.

** The activities of DPIP-photoreduction were assayed at 610 nm, 20°C , and illumination of 30,000 lux.

58.5%의 光還元率을 보였다.

反應溶液으로서 光還元率이 가장 높은 것은 S-Tricine-N pH 8.0이며, 그에 비하여 S-Tris-N pH 8.0, 0.05M-Tris pH 7.2, S-Tris-N pH 7.2, S-

Tricine-N pH 7.2가 각각 92.0%, 81.8%, 70.6%, 58.8%의 光還元率을 보였다.

抽出溶媒 및 反應溶液이 抽出葉綠體의 光化學的 活性에 미치는 影響은 buffer의 種類, 濃度 및 酸度の 複合의 影響으로 考察할 수 있다. Ikehara 등(1969)은 抽出溶媒 또는 preincubation 處理의 buffer로서 pH 7.8以上の Tris를 使用하였을 境遇, 高濃度(0.8M)에서는 1000lux 경도의 弱光下에서도 葉綠體의 光系 II에 依한 酸化劑의 光還元이 억제되는 photoinhibition 現象이 나타나며, 低濃度(0.1M)에서도 光의 影響은 減小하지만 酸度の 影響을 받아 葉綠體 反應의 inactivation 現象이 나타남을 報告하고, 이는 鹽基性 pH의 高濃度 Tris buffer에서 葉綠體의 lamellae 構造가 弛緩되고 그로 因하여 光이 葉綠體의 光系 構成을 傷害함에 起因한다는 假說을 提示하였다. 또한 Tomita(1971)등도 高濃度の Tris 處理로 葉綠體의 光系 II의 酸素가 除去되지는 않으나 葉綠體의 構造에 若干의 變化가 일어난다고 報告한 바 있으며, Okayama(1967)는 酸도가 더욱 높은 境遇(pH 9.2)에는 좀 더 낮은 濃度인 0.05M disodium phosphate에서도 inactivation 現象이 나타나며, 이는 葉綠體의 蛋白質 成分의 破壞에 起因한다고 推論하였다.

本 實驗에서는 暗條件下에서 buffer의 濃도가 0.05M인 S-Tris-N으로 葉綠體를 抽出한 境遇도 pH 8.0에서는 光還元의 抑制가 確認되었다. 또한 S-Tricine-N으로 抽出했을 때는 pH 7.2에서 보다 pH 8.0에서 더 높은 光還元率이 나타났으며, 이는 Good 등(1962, 1965)이 報告하는 바와 一致하는 結果로서 鹽基性 pH에서 葉綠體 構造에 미치는 Tricine의 傷害作用은 Tris보다 弱하다고 생각되었다.

反應溶液으로서 S-Tris-N과 S-Tricine-N이 모두 pH 8.0에서 높은 光還元率을 보여 Tris의 影響보다 酸度の 影響이 더욱 強하게 나타났다.

Tris 및 Tricine의 酸度を pH 7.6으로 統一하여 aging에 미치는 buffer의 影響을 比較한 本 實驗의 結果, 抽出葉綠體에 의한 酸化劑 光還元能의 時間 經過에 따른 變化는 Fig. 1과 같다.

Jacobi(1959)는 Tris buffer로 抽出하여 24시간이 經過한 시금치 葉綠體에서 pH 7.8과 pH 8.3으로 抽出했을 때 각각 50%, 100%의 失活이 나타남을 報告하고, 이러한 aging effect는 Tris의 化學的 分解로 因하여 葉綠體의 電子傳達系에 阻害作用을 나타내는 formaldehyde가 形成되는 데 起因한다는 假說을 提示하고 있다.

本 實驗의 結果로는 pH 7.0의 Tris 또는 Tricine으

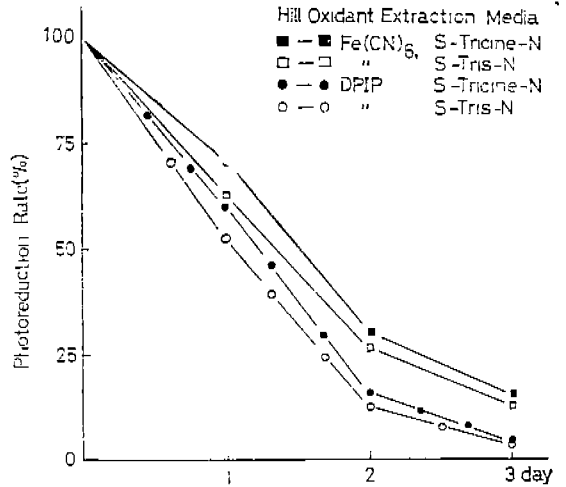


Fig. 1. Effects of aging on oxidant photoreduction.

The chloroplast preparations were extracted by S-Tris-N pH 7.6 or S-Tricine-N pH 7.6 as indicated. The reaction mixtures and experimental conditions were the same as Table 1 for ferricyanide or Table 2 for DPIP except that the acidity was adjusted to pH 7.6. The photoreduction rate was expressed as per cent of initial rate (at 0 time).

로 葉綠體를 抽出한 境遇, 抽出 24時間 經過后 약 4%의 光還元率의 失活이 나타났으며 Tricine보다 Tris에서 ferricyanide보다 DPIP에서 좀 더 強한 aging effect가 나타났다.

要 約

本 研究는 抽出葉綠體의 光化學的 活性을 測定함에 있어서 抽出溶媒와 反應溶液이 光系 II의 活性에 미치는 影響을 調査하기 위한 것이다. 光系 II의 活性은 Tris-HCl 및 Tricine-NaOH를 buffer로 하는 네 가지 STN 抽出溶媒(S-Tris-N pH 7.2, 8.0, S-Tricine-N pH 7.2, 8.0)로 抽出된 시금치 葉綠體 標品에 依한 酸化劑(ferricyanide 및 DPIP)의 光還元率을 다섯 가지 反應溶液(S-Tris-N pH 7.2, 8.0, S-Tricine-N pH 7.2, 8.0, 0.05M-Tris pH 7.2)에서 測定하여 比較하였다.

抽出葉綠體에 依한 酸化劑의 光還元率은 抽出溶媒別로는 S-Tris-N pH 7.2로 抽出된 葉綠體 標品이 가장 높았고, S-Tricine-N pH 8.0으로 抽出된 것이 다음으로 높았다. 反應溶液으로서 S-Tricine-N pH 8.0의

溶液中에서 測定된 光還元率이 가장 높았다.

抽出溶媒와 反應溶液의 複合의 影響에 의한 葉綠體 標品の 酸化劑 光還元率은 S-Tris-N pH 7.2로 抽出 하여 S-Tricine-N pH 8.0의 反應溶液에서 測定한 것이 가장 높았고 S-Tricine-N pH 8.0으로 抽出하여 S-Tricine-N pH 8.0의 反應溶液에서 測定한 것이 다음 으로 높았다.

參 考 文 獻

Arnon, D. I. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* 24 : 1-15.

_____, M. B. Allen, and F. R. Whatley. 1954. Photosynthesis by isolated chloroplasts. *Nature* 174 : 394.

Cheniae, G. M. and I. F. Martin. 1971. Effects of hydroxylamine on photosystem II. I. Factors affecting the decays of O₂ evolution. *Plant Physiol.* 47 : 568-575.

_____, and _____. 1972. Effects of hydroxylamine on photosystem II. II. Photoreversal of the NH₂OH destruction of O₂ evolution. *Plant Physiol.* 50 : 87-94.

Duysens, L. N. M. and J. Amesz. 1962. Function and identification of two photochemical systems in photosynthesis. *Biochem. Biophys. Acta.* 64 : 243-260.

Emerson, R. and C. M. Lewis. 1943. The dependence of quantum yield of *Chlorilla* photosynthesis on wavelength of light. *Am. J. Bot.* 30 : 165.

Egneus, H. 1972. Oxygen evolution and oxygen uptake by isolated chloroplasts of wheat irradiated with monochromatic light without the addition of an oxidant. *Physiol. Plant.* 6 : 81-91.

Fry, K. E. 1970. Some factors affecting the Hill reaction activity in cotton chloroplasts. *Plant Physiol.* 45 : 465-469.

Good, N. E. 1962. Uncoupling of Hill reaction from photophosphorylation by amines. *Arch. Biochem. Biophys.* 96 : 653.

_____, G. D. Winget, and S. Izawa. 1965. The Stoichiometry of photophosphorylation. *Biochem. Biophys. Res. Comm.* 21 : 438.

Hill, R. 1937. Oxygen evolved by isolated chloroplasts. *Nature* 139 : 881-882.

_____, and R. Scarisbrick. 1940. The reduction of ferric oxalate by isolated chloroplasts. *Proc. Roy. Soc. London, B* 129 : 238-255.

Huzisige, H. and Y. Yamamoto. 1972. Analysis of photosystem using particle II preparation. I. Experimental evidence supporting the idea of the involvement of two light reactions in photosystem II of green plant photosynthesis. *Plant & Cell Physiol.* 13 : 477-491.

Ikehara, N. and K. Sugahara. 1969. Inactivation of the Hill reaction in spinach chloroplasts by pre-treatment of tris buffer in the light. *Bot. Mag. Tokyo* 82 : 271-277.

Inoue, Y., T. Okawa, T. Kawai, and K. Shibata. 1973. Analysis of rice mutants by low temperature-derivative spectrophotometry in relation to pigment compositions and photochemical activities. *Physiol. Plant.* 23 : 390-395.

Jacobi G. 1959. Ueber den Zusammenhang von Glykolsaeure und lichtabhaengeriger Phosphorylierung. *Planta* 53 : 402-411.

Katoh, S., and A. San Pietro. 1967. Ascorbate-supported NADP photoreduction by heated *Euglena* chloroplasts. *Arch. Biochem. Biophys.* 122 : 144-152.

_____, and _____. 1968. Photoreduction of chloroplasts: NADP photoreduction by *Euglena* chloroplasts. In: Comparative Biochemistry and Biophysics of Photosynthesis, p.140-160, University Park press.

_____. 1972. Inhibitors of electron transport associated with photosystem II in chloroplasts. *Plant & Cell Physiol.* 13 : 273-286.

Kimimura, M. and S. Katoh. 1972. On the functional site of manganese in photosynthetic electron transport system. *Ibid.* 13 : 237-296.

Mackinney, G. 1941. Absorption of light by chlorophyll solutions. *Jour. Biol. Chem.* 140 : 315-322.

Okayama, S. 1967. *Plant & Cell Physiol.* 8 : 47.

Tomita, G., T. Yamashita, and J. Tsuji. 1971. Reactivation of the Hill reaction of tris-washed chloroplasts. *Ibid.* 12 : 117-126.

Yamashita, T. and W. M. Butler. 1968. Photoreduction and photophosphorylation with tris-washed chloroplasts. *Plant Physiol.* 43 : 1978-1986.

_____, and T. Horio. 1968. Non-cyclic photophosphorylation by spinach grana treated with 0.8M tris-buffer. *Plant & Cell Physiol.* 9 : 268-284.

(1976. 9. 13 접수)