

## 시금치(*Spinacia oleracea* L.) 엽록체의 광합성 전자전달 활성화에 미치는 *iso*-Butanol의 영향

朴 康 殷 · 鄭 華 淑  
(慶北大學校 師範大學 生物教育科)

### Effects of *iso*-Butanol on Photosynthetic Electron Transport Activity in Isolated Spinach Chloroplasts

Park, Kang Eun and Hwa Sook Chung  
(Department of Biology, Kyungpook National University, Taegu)

#### ABSTRACT

The effect of *iso*-butanol on the electron transport rate of PS I and PS II was investigated in isolated spinach chloroplasts.

In photosystem I, the rate of electron transport increased in the presence of 1 to 4% of *iso*-butanol but decreased in 5 to 9% of *iso*-butanol. But in photosystem II, the rate of electron transport decreased when treated with 0.2 to 1% of *iso*-butanol. The inhibitory effect of isomers of butanol on PS II electron transport rate increased in the order of 2-butanol, tert-butanol, *iso*-butanol and 1-butanol. This means that PS II activity was affected according to the arrangement of carbon atoms in butanol. The inhibitory effect of *iso*-butanol reduced when DPC was added in the solution. This means that *iso*-butanol affects PS II reduction side of thylakoid membrane primarily. The inhibitory effect of *iso*-butanol was reduced when  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  or BSA were added in the solution. PS II activity was restored when 1% *iso*-butanol treated chloroplast solution was diluted to twenty-fold or when  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  or BSA was added to the diluted solution. However, the SDS-PAGE banding pattern of thylakoid membrane proteins was similar even in 2% *iso*-butanol treated chloroplasts and the control ones. Only in 5% *iso*-butanol treated chloroplasts these bands were very weak.

These observations suggest that low concentrations of *iso*-butanol releases manganese and calcium ions from chloroplasts and inhibits the electron transport system. This inhibitory effect can be reversible in low concentrations but in high concentrations the inhibitory effect of *iso*-butanol become irreversible.

#### 서 론

알코올은 R기와 작용기 OH기가 있는 유기화합물로 식물 배양에 필수적인 비수용성 물질을 녹이는 용매로 사용되므로(Linus *et al.*, 1980) 식물의 색소(Lichtenthaler, 1974)와 토마토 줄기의 호흡율 그리고 물질대사(Ryehner *et al.*, 1979)에 미치는 영향에 관한 연구가 있었다. 알코올이 식물에 미치는 영향은 탄소수와 OH기의 위치 그리고 식물의 종류나 상태에 따라 감수성이 다르며 아주 낮은 농도의

알코올은 종자휴면을 타파하며(Adkins *et al.*, 1984) 균근 형성에 유익하게 작용하나(Allermann and Sortkjer, 1973), 일정농도 이상으로 증가될 경우 조직배양세포의 분열을 억제시킨다(Perata and Alioi, 1991). 식물조직에 알코올을 처리했을 때 sterols(Grunwald, 1968)과 물(Glinka and Reinhold, 1972)의 막투과를 증가시킨다고 보고된 바 있다. 일정농도 이상의 low aliphatic alcohol은 미토콘드리아의 호흡과 인산화를 강하게 억제하며 억제영향은 알코올의 chain 길이에 따라 증가하며(Thore and Baltscheffsky,

1965), 또한 시금치 엽록체의 광인산화를 억제한다고 알려져 있다(Baltschiffsky H., 1963). 식물 노화에 미치는 영향은 알코올의 탄소수에 비례하며 chain에 가지가 있거나 second OH group은 그 영향이 감소한다고 알려져 있다(Sattler and Thimann, 1980). 부리한 엽록체에 fatty alcohol을 처리하였을 때 엽록체 막구조의 변형을 초래하여 광인산화의 활성이 저해된다고 보고된 바 있다(Konishi *et al.*, 1972).

이와 같이 알코올류가 식물체에 미치는 억제 영향에 대해 많은 문헌이 발표되었으나 엽록체 틸라코이드 막의 광계 II에서  $Ca^{2+}$ 와  $Mn^{2+}$  이온의 기능과 연관된 광계 활성화에 알코올류가 미치는 기작에 대한 보고는 없었다. 따라서 본 연구에서는 위에서 보고된 여러 종류의 알코올 중 그 구조가 비교적 간단한 butanol의 4가지 isomer로서 알코올을 구성하는 R기와 OH기 중 식물의 광계 II 활성화에 영향을 준 것은 알코올의 R기라는 것을 밝히고자 하였으며, 또한 butanol의 4가지 이성체 중 일반적으로 생물실험에 많이 사용하는 *iso*-butanol이 시금치에서 부리한 엽록체의 PS I, PS II 활성 및 Ca, Mn, bovine serum albumin(BSA)의 보조작용과 활성회복 및 엽록소 단백질 복합체에 미치는 영향을 조사하여 광계 활성화에 미치는 기작을 밝히고자 한다.

## 재료 및 방법

**재료 및 처리.** 시금치(*Spinacia oleracea* L.)를 시장에서 구입하여 싱싱한 어린 잎을 골라 식물 재료로 사용하였으며 시금치에서 추출한 엽록체에 *iso*-butanol을 상온에서 10분간 처리하였다.

**엽록체 추출.** 엽록체 추출은 Obokata(1987)의 방법을 변형하여 시금치의 어린 잎을 냉각한 증류수로 세척한 뒤에 STN buffer(pH 8.0, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl) 140 ml와 1 M ascorbate-Na 1.4 ml를 넣어서 냉각시킨 blender에 20초간 마쇄한 후 2점의 가아제로 여과하였다. 이 여과액을 300×g에서 1분간 원심분리하여 침전물을 버리고 상등액을 다시 600×g에서 10분간 원심분리한 후 침전물에 STN buffer(pH 7.8, 0.4 M sucrose, 0.05 M Tris, 0.01 M NaCl) 40 ml를 분주하여 원탁한 후 1,000×g에서 10분간 원심분리하였다. 침전된 엽록체를 STN buffer(pH 7.8)로 원탁시켜 이것을 엽록체 추출 재료로 사용하였으며, 모든 추출과정은 0-4℃에서 행하였다.

**광합성의 활성 측정.** 광합성의 광계 II와 광계 I의 전자전달활성은 Clark형의 산소전극을 이용하여 25℃에서 각각 산소 발생량이나 소모량을 측정하였으며 광계 I의 전자전달 활성은 50 mM Hepes buffer (pH 7.8, 20 mM NaCl)와 2 mM methyl-viologen, 2 mM  $NaN_3$ , 1  $\mu$ M 3-(3,4-

dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea(DCMU), 0.1 mM 2,6-dichlorophenol-indophenol(DCIP), 5 mM ascorbate-Na, 2 mM  $NH_4Cl$ , 25  $\mu$ g/ml 엽록소가 포함된 반응액으로 산소 소모량을 측정하였다(Fu and Gibbs, 1988). 광계 II의 전자전달 활성은 50 mM Hepes buffer(pH 7.8, 2 mM NaCl)와 0.5 mM p-phenylenediamine, 2 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0.05% BSA, 2 mM  $NH_4Cl$ , 50  $\mu$ g/ml의 엽록소가 포함된 반응액으로 산소의 발생량을 측정하였으며, Whole chain(PS I+II) 전자전달 활성은 50 mM Hepes buffer(pH 7.8, 2 mM NaCl)와 2 mM  $K_3[Fe(CN)_6]$ , 0.05% BSA, 2 mM  $NH_4Cl$ , 50  $\mu$ g/ml의 엽록소가 포함된 반응액으로 산소의 발생량을 측정하였다(Critchley, 1981). 또한 DCIP 광환원율에 의한 광계 II의 활성측정은 50 mM Hepes buffer(pH 7.8, 20 mM NaCl)와 30  $\mu$ M DCIP, 20  $\mu$ g/ml의 엽록소가 포함된 반응액으로 25℃에서 측정하였다(Terashima, 1989). 이때 엽록소 함량은 Arnon(1949)의 방법에 따라 80% acetone으로 652 nm에서 전체 엽록소 함량을 측정하였다. 광계 II 전자 공여체인 diphenylcarbazide(DPC)는 Vernon과 Show(1969)가 사용한 방법을 이용하였으며 반응액의 최종 농도는 0.15 mM이 되도록 하였다.

**틸라코이드 막 단백질의 추출 및 SDS-PAGE(sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis).** 틸라코이드 막 단백질의 추출은 Mayfield and Huff(1986)의 방법을 변형하여 부리한 엽록체에 30분간 1%, 2% 그리고 5%의 *iso*-butanol 처리 후 가용성 단백질을 2회 원심분리하여 제거한 후 이 침전물에 0.0625 M Tris buffer[pH 6.8, 10%(v/v) glycerol, 5%(v/v)  $\beta$ -Mercaptoethanol, 2.3% SDS 포함] 0.5 ml를 첨가하여 원탁시킨 후 이 시료 0.1 ml를 취하여 80% acetone과 혼합한 것을 Arnon(1949)의 방법에 따라 엽록소 함량을 정량하고 원탁한 남은 시료의 엽록소 함량의 10배가 되게 SDS를 첨가하고(SDS : Chlorophyll = 10 : 1) 10분간 가용화시킨 후 4℃, 4,000×g에서 10분간 원심분리한 상등액을 엽록소-단백질 복합체 추출액으로 사용하였다.

Gel은 Laemmli(1970)의 방법을 변형하여 12% separating gel과 5% stacking gel을 이용하였으며 전기영동은 10 mA로 암조건에서 12시간 한 후 0.2% Coomassie Brilliant Blue R-250으로 상온에서 24시간 염색하여 gel이 투명하게 될 때까지 탈색한 후 셀로판지에 봉하여 암소에서 건조 보관하였다.

## 결 과

**광계 II 활성에 미치는 butanol의 영향.** 탄소수는 같으나 OH기의 위치가 다른 1-butanol, sec-butanol, tert-butanol, *iso*-butanol이 광계 II의 전자전달 활성을 50% 억제

Table 3. Effects of dilution and  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  and BSA on the DCIP photoreduction activity of chloroplast treated with 1% *iso*-butanol

| Treatment<br>( <i>iso</i> -Butanol) | Addition                                       | Dilution | DCIP photoreduction<br>( $\mu\text{mole} \cdot \text{Chl}^{-1} \cdot \text{mg} \cdot \text{hr}^{-1}$ ) |
|-------------------------------------|--|----------|--|
| Control                             | —  | —        | 120(100%)  |
| 1%                                  | —  | —        | 30( 25%)   |
| 1%                                  | —  | 20 fold  | 94( 78%)   |
| 1%                                  | 0.1 $\mu\text{M}$ $Mn^{2+}$                    | 20 fold  | 114( 95%)  |
| 1%                                  | 1.0 mM $Ca^{2+}$                               | 20 fold  | 113( 93%)  |
| 1%                                  | 1.0 mM $Ca^{2+}$ , 0.1 $\mu\text{M}$ $Mn^{2+}$ | 20 fold  | 117( 98%)  |
| 1%                                  | 0.5% BSA                                       | 20 fold  | 156(130%)  |

$Mn^{2+}$ :  $Mn(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$ ,  $Ca^{2+}$ :  $Ca(\text{CH}_3\text{COO})_2 \cdot \text{H}_2\text{O}$ .

하였을 때 광계 II의 활성이 90%로 되어 상승효과를 보였다. 또한 엽록체 틸라코이드막을 안정화시키는 BSA를 0.5% 되도록 첨가했을 때 광계 II 활성은 103%로 보호되었다(Table 2).

*iso*-Butanol의 영향이 가역적인지를 알아보기 위해 1%의 *iso*-butanol을 25°C 에서 10분간 처리한 뒤 50 mM HEPES buffer(pH 7.8, 2 mM NaCl)로 20배 희석했을 때 광계 II 활성은 78%로 회복되었다(Table 3). 이때 칼슘과 망간을 첨가했을 때 각각 93%와 95%로 회복되었으며, 칼슘과 망간을 함께 첨가했을 때 98%로 회복되어 각각 따로 첨가했을 때 보다 많이 회복되었으며, BSA를 첨가했을 때는 130%로 증가되었다(Table 3). 데이터에는 나타나 있지 않지만, 고농도(5%)의 *iso*-butanol을 25°C 에서 10분간 처리한 후 50 mM HEPES buffer(pH 7.8, 2 mM NaCl)로 100배 희석해도 광계 I과 광계 II 활성은 회복되지 않았다.

SDS-PAGE에 의한 틸라코이드 막 단백질의 변화. *iso*-Butanol이 틸라코이드 막 단백질에 어떤 변화를 일으켜서 광계 I, II 활성에 영향을 준 것인지를 알아보기 위해 광계 II 활성이 25%를 나타내는 1%의 *iso*-butanol과 이보다 높은 농도인 2%의 *iso*-butanol 그리고 광계 I 활성이 83%로 감소한 5%의 *iso*-butanol을 시금치에서 추출한 엽록체에 30분간 처리한 후 SDS-PAGE한 polypeptide band의 변화 pattern을 조사하였다(Fig. 3). 틸라코이드 막 단백질 band의 분자량 농정은 Chua(1980)의 연구를 참고로 하였다. 1%의 *iso*-butanol 처리구에서는 대조구와 유사한 band pattern을 나타내었으며 2%의 *iso*-butanol 처리구에서는 52 Kd 부근에서 미세한 band의 소실이 있으며 5%의 *iso*-butanol 처리구에서는 전체적으로 많은 band가 소실되어 1%의 *iso*-butanol이 광계 II 활성에 미치는 영향은 틸라코이드 막 단백질의 구조적 변화에 기인하며 고농도(5%)의 *iso*-butanol이 광계 I 활성에 미치는 영향은 틸라코이드 막 단백질의 소실에 기인함을 알 수 있다(Fig. 3).

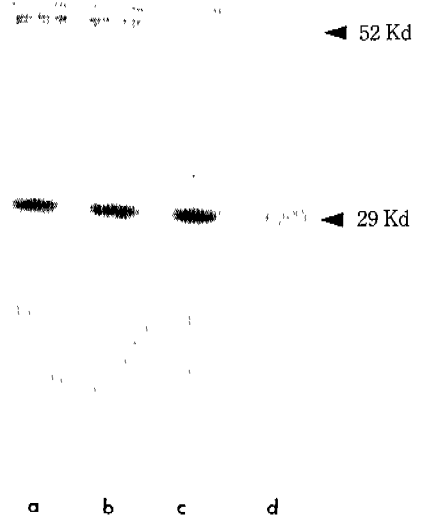


Fig. 3. Polypeptide bands of the spinach thylakoid membrane protein was separated by SDS-PAGE from *iso*-butanol treated chloroplasts in the dark for 30 min. a, control; b, 1% *iso*-butanol; c, 2% *iso*-butanol; d, 5% *iso*-butanol.

## 고찰

Butanol의 4가지 이성체에서 OH 기를 중심으로 탄소의 배열이 직선상일 때 광계 II 활성의 저하는 높았으며 저해가 강한 순서는 1-butanol, *iso*-butanol, tert-butanol, sec-butanol이다(Table 1). 이것은 Satler와 Thimann(1980)이 보고한 알코올의 OH기를 중심으로 탄소가 직선상일 때 식물의 protease와 chlorophyllase 합성을 저해하여 식물노화를 지연시킨다고 한 것과 관련이 있다. 이것으로 보아 알코

Table 1. Concentrations of each butanol needed for 50% inhibition of PS II activity

| isomers of butanol      | Concentration(%) |
|-------------------------|------------------|
| 1-Butanol(C-C-C-C-OH)   | 0.6              |
| sec-Butanol(C-C-C-C-OH) | 1.0              |
| t-Butanol(C-C-C-C-OH)   | 0.9              |
| iso-Butanol(C-C-C-C-OH) | 0.8              |

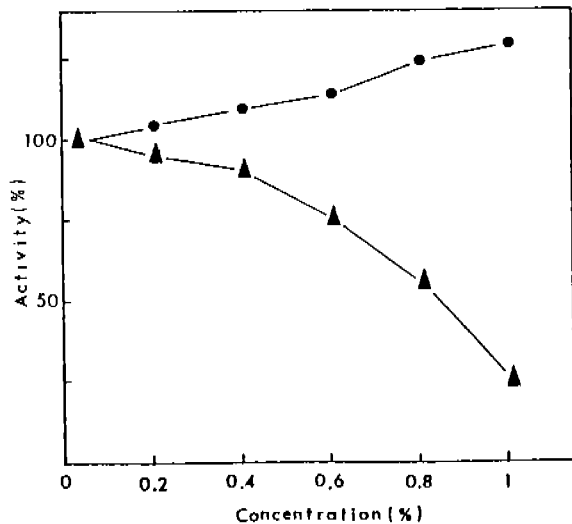


Fig. 1. Effects of *iso*-butanol on PS II (▲), PS I (●) and PS I + PS II (▲) electron transport activity in isolated spinach chloroplasts.

시키는 각각의 농도는 0.6, 1.0, 0.9, 그리고 0.8%로 OH기를 중심으로 한 탄소의 배열이 일직선형인 1-butanol이 가장 저농도에서 억제하였다(Table 1).

광계 I 활성과 광계 II 활성에 *iso*-butanol이 미치는 영향. 시금치에서 추출한 엽록체에 *iso*-butanol을 10분간 처리하였을 때 광계 II의 전자전달 활성은 처리농도가 증가됨에 따라 감소하다가 1%의 *iso*-butanol 처리농도에서 25%로 감소되었지만 이와 반대로 광계 I 전자전달 활성은 1%의 *iso*-butanol 처리농도에서 130%로 활성이 증가하였으며 PS I + PS II(Whole chain) 전자전달 활성은 광계 II 활성과

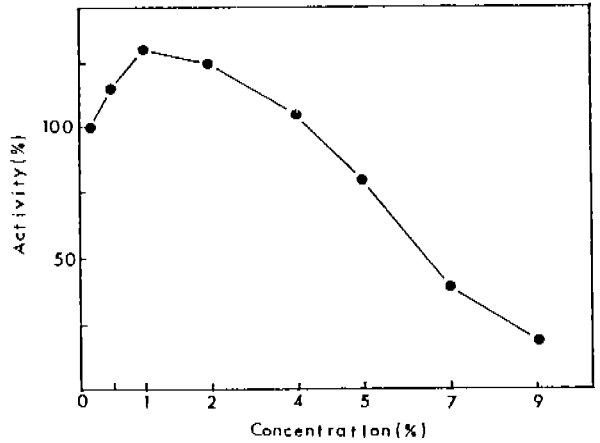


Fig. 2. Effects of *iso*-butanol on PS I electron transport activity in isolated spinach chloroplasts.

Table 2. Effects of DPC, Mn<sup>2+</sup>, Ca<sup>2+</sup> and BSA on the DCIP photoreduction activity of chloroplast treated with 0.8% *iso*-butanol

| Treatment ( <i>iso</i> -Butanol) | Addition                | DCIP photoreduction (μmol·Chl <sup>-1</sup> ·mg hr <sup>-1</sup> ) |
|----------------------------------|-------------------------|--|
| Control                          | —                       | 120(100%)  |
| —                                | 0.15 mM DPC             | 156(130%)  |
| 0.8%                             | 0.15 mM DPC             | 112( 93%)  |
| 0.8%                             | —                       | 66( 55%)   |
| 0.8%                             | 0.1 μM Mn <sup>2+</sup> | 99( 83%)   |
| 0.8%                             | 1.0 mM Ca <sup>2+</sup> | 95( 79%)   |
| 0.8%                             | 1.0 mM Ca <sup>2+</sup> | 108( 90%)  |
| 0.8%                             | 0.1 μM Mn <sup>2+</sup> | —  |
| 0.8%                             | 0.5% BSA                | 123(103%)  |

Mn<sup>2+</sup>: Mn(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·4H<sub>2</sub>O, Ca<sup>2+</sup>: Ca(CH<sub>3</sub>COO)<sub>2</sub>·H<sub>2</sub>O.

아주 유사한 것으로 보아 *iso*-butanol은 1차적으로 광계 II 활성을 억제하였다(Fig. 1).

*iso*-Butanol이 광계 I 활성에 미치는 영향은 저농도(1-4%)에서는 광계 I의 전자전달율이 오히려 증가되고 고농도(5-9%)에서는 감소되었다(Fig. 2).

암조전에서 0.8% *iso*-butanol로 엽록체를 처리하였을 때 광계 II 활성은 55%로 나타났다. 0.8% *iso*-butanol 처리된 엽록체 반응액에 광계 II 인공 전자공여체인 DPC를 0.15 mM이 되도록 첨가하여 DCIP 환원율을 측정하였을 때 93%로 활성이 회복되었다. *iso*-butanol이 광계 II의 칼슘과 망간에 미치는 영향을 알아보기 위해 0.8% *iso*-butanol 처리한 엽록체 반응액에 망간 0.1 μM과 칼슘 1 mM이 되도록 첨가하였을 때 광계 II 활성은 각각 83%와 79%로 보호되었으며, 칼슘 1 mM과 망간 0.1 μM이 되도록 함께 첨가

올의 OH기가 광합성 활성에 영향을 준 것보다 주로 소수성인 R기가 틸라코이드 막에 침투하여 영향을 준 것을 알 수 있다. 본 실험에서는 butanol의 4가지 이성체 중 일반적으로 생물실험에 많이 사용하는 *iso*-butanol이 시금치 엽록체 틸라코이드 막의 전자전달 활성에 미치는 영향을 조사하였다. 10분간 *iso*-butanol 처리한 시금치 엽록체의 광계 II 활성은 농도가 증가함에 따라 감소하고, 광계 I 활성은 1% 처리농도까지는 증가하며 PS I + PS II(Whole chain) 활성이 광계 II 활성과 유사한 것으로(Fig. 1) 보아 알콜이 1 차적으로 광계 II 전자전달 부위를 저해한 것으로 보인다. Konishi 등(1972)은 fatty alcohol을 엽록체에 처리할 경우 저농도에서는 광계 II 활성을 억제시키며 고농도가 되면 저농도에서 증가한 광계 I 활성이 감소한다는 보고를 한 바 있는데 본 실험의 *iso*-butanol 처리한 결과와 일치하였다. 저농도에서 광계 I 활성의 증가와 고농도에서 광계 I 활성이 감소한 (Fig. 2) 이유는 알코올의 소수성 부분이 틸라코이드 막에 침투하여 틸라코이드 막구조를 변형시켰기 때문인 것으로 생각된다. Golbeck 등(1980)은 저농도의 불포화 지방산을 처리한 엽록체의 경우 광계 I 활성이 증가하는데 이것은 인공전자공여체인 DCIP 가 plastocyanin과의 반응성을 촉진하도록 막의 구조를 변형시켰기 때문이라고 보고한 것과 관련이 있는 것으로 생각된다. 대조구에 광계 II 전자공여체인 DPC를 첨가했을 때 대조구에 비해 광계 II 활성이 30% 증가한데 비해 0.8% *iso*-butanol 처리구에 DPC를 첨가했을 때는 0.8% *iso*-butanol 처리구 보다 70%나 증가하였다. 이것으로 보아 *iso*-butanol의 1차적인 억제 부위는 광계 II의 산화 부위라는 것을 알 수 있다. 일반적으로 망간과 칼슘의 보호작용을 알아보기 위해 사용하는 망간과 칼슘의 농도는 각각 1  $\mu$ M과 10 mM이 되도록 사용하나(Golbeck, 1980) 본 실험에서는 이보다 10배 희석하여 사용하였다(Table 2). 데이터에는 나타나 있지 않지만 이것은 1  $\mu$ M의 망간과 10 mM의 칼슘에서는  $Mn(CH_3COO)_2 \cdot 4H_2O$ 과  $Ca(CH_3COO)_2 \cdot H_2O$ 의  $CH_3COO^-$ 기와 butanol이 상승작용하여 오히려 광계 II 활성을 억제시켰기 때문이다. 0.8% *iso*-butanol 처리시 Mn과  $Ca^{2+}$  이온을 첨가할 때 광계 II 활성이 각각 58%와 54% 보호되었는데(Table 2), Ghanotakis 등(1987)은 광계 II에서 물 분해 반응이 일어나기 위해서는 광계 II에 관계된 단백질 이외에도  $Mn^{2+}$ ,  $Ca^{2+}$  그리고  $Cl^-$  그리고 이온이 필요하다고 보고하였다. 그러므로 *iso*-butanol 처리시 외부에서 망간과 칼슘을 첨가하였을 때 광계 II 활성이 각각 58%와 54% 보호되며 망간과 칼슘을 각각 따로 첨가했을 때 보다 함께 첨가했을 때 활성이 65% 나 보호되는 것으로 보아 *iso*-butanol은 광계 II 반응중심의 Mn과 Ca에 영향을 미치는 것으로 생각된다. 본 실험에 사용한 반응액인 Hepes buffer에 20 mM의 NaCl이 포함되어 있으므로  $Cl^-$  이온에

의한 영향은 배제하였다. 고농도(5-7%)의 *iso*-butanol 처리한 엽록체를 20배 희석했을 때 PS I 활성은 회복되지 않았지만 1% *iso*-butanol 처리한 엽록체를 20배 희석하였을 때 광계 II 활성이 54% 회복되었으며 이때 망간, 칼슘 그리고 BSA 첨가시 68%, 70% 및 105% 회복되었다(Table 3). 이것으로 보아 *iso*-butanol은 고농도에서는 비가역적인 억제작용을 하고 저농도에서는 가역적인 억제작용을 하며 또한 칼슘과 망간이온의 작용을 억제하며, 틸라코이드 막을 안정화시키는 BSA에 의해 광계 II 활성이 완전히 회복됨을 알 수 있다. 1%의 *iso*-butanol 처리한 엽록체의 광계 II 활성이 25%로 소실된데 비해 1% *iso*-butanol 처리한 엽록체의 band pattern은 대조구와 유사하며 2% *iso*-butanol 처리구의 band pattern은 52 Kd 부근에서 미세한 차이 밖에 없는 것으로(Fig. 3) 보아 1% 이하의 저농도에서는 틸라코이드 막단백질 소실보다는 광계 II 표재성 단백질의 기능에 영향을 주어  $Mn^{2+}$ 과  $Ca^{2+}$  이온의 친화력을 저하시키는 것으로 생각된다.

이에 따라서 *iso*-butanol이 시금치 엽록체의 틸라코이드 막에 미치는 기작은 *iso*-butanol의 R기가 틸라코이드 막에 침투하여 저농도에서는 가역적으로 막구조를 변형하여 광계 II 물분해계의  $Mn^{2+}$ 과  $Ca^{2+}$  이온에 영향을 주어 광계 II 활성이 억제되고 광계 I 활성은 증가되지만, 고농도에서는 비가역적으로 틸라코이드 막의 전자전달능을 억제하는 것으로 사료된다.

## 적 요

*iso*-Butanol이 엽록체의 광합성 전자전달 활성에 미치는 영향을 연구하기 위하여 암조건하에서 시금치의 엽록체에 *iso*-butanol을 처리한 후 대조구와 비교하여 광계 II 활성과 광계 I 활성을 조사하였으며, 또한 *iso*-butanol이 틸라코이드 막 단백질에 미치는 영향을 알아보기 위해 전기영동으로 틸라코이드 막단백질의 변화를 조사하였다.

광계 I 활성은 *iso*-butanol이 저농도(1-4%)일 때는 증가하였으나 고농도(5-9%)에서는 감소되었다. 광계 II 활성은 *iso*-butanol의 농도가 0.6, 0.8, 1%에서는 각각 75%, 55% 및 25%로 활성이 감소하였다. Butanol 중에서 탄소수는 같으나 OH 기의 위치가 다른 1-butanol, sec-butanol, tert-butanol, *iso*-butanol이 광계 II의 전자전달계에 미치는 영향을 비교해 본 결과 OH 기를 중심으로 탄소의 배열이 직선상 일 때 저해효과가 크다는 것을 알 수 있었다. *iso*-butanol이 1차적으로 광계 II에 미치는 억제 부위는 0.8% *iso*-butanol 처리구에 DPC 첨가했을 때 DCIP 환원율이 93%로 증가하는 것으로 보아 광계 II의 산화 부위를 알 수 있다. 0.8% *iso*-butanol 처리구에 외부에서 망간과 칼슘을 첨가하였을 때 광계 II 활성이 각각 83%와 79%로

보존된 것으로 보아 광계 II 활성 억제제는 망간의 소실과 관계 있는 것으로 생각된다. 또한 1% *iso*-butanol 처리한 엽록체를 20배 희석하였을 때 활성이 78%로 회복되었다. *iso*-Butanol은 1% 이하의 저농도에서 광계 II 활성을 감소시키는데 비해 1% *iso*-butanol 처리구의 틸라코이드 막 단백질의 SDS-PAGE에 의한 band pattern은 대조구와 유사하며 2% 처리구에서는 52 Kd 부근에서 미세한 band pattern의 차이가 있으며 5%의 *iso*-butanol 처리구의 틸라코이드 막단백질 band는 전체적으로 많이 소실되었다.

이것으로 보아 *iso*-butanol은 가역적으로 광계 II의 산화부위에 관여하는 단백질에 영향을 주어  $Ca^{2+}$ 와  $Mn^{2+}$  이온의 친화력을 저하시켜 광계 II 활성을 억제시키고 또한 알코올의 R-group이 틸라코이드 막에 침투하여 막구조를 변형시키므로 광계 I 활성이 증가하며 고농도(5-9%)에서는 비가역적으로 막구조를 변경하여 광계 I 활성이 감소한 것으로 사료된다.

## 참 고 문 헌

- Adkins, S.W., J.M. Naylor and G.M. Simpson. 1984. The physiological basis of seed dormancy in *Avena fatua*. V. Action of ethanol and other organic compounds. *Physiol. Plant.* **62**: 18-24.
- Allermann, K. and O. Sortkjer. 1973. Rhizomorph formation in fungi II. The effect of 12 different alcohols on growth and rhizomorph formation in *Armillaria mellea* and *Clitocybe geotropa*. *Physiol. Plant.* **28**: 51-55.
- Arnon, D. 1949. Copper enzymes in isolated chloroplasts. Polyphenoloxidase in *Beta vulgaris*. *Plant Physiol.* **24**: 1-15.
- Baltscheffsky, H. 1963. Inhibition of photophosphorylation in isolated spinach chloroplasts by lower aliphatic straight-chain alcohols. *Acta Chemica Scandinavica.* **17**: 308-312.
- Chua, N.H. 1980. Electrophoretic analysis of chloroplast proteins. *Methods Enzymol.* **69**: 434-446.
- Critchley, C. 1981. Studies on the mechanism of photoinhibition in higher plants. I. Effects of high light intensity on chloroplast activities in cucumber adapted to low light. *Plant Physiol.* **67**: 1161-1165.
- Fu, C.F. and M. Gibbs. 1988. Effects of temperature pretreatment in the dark on photosynthesis of the intact spinach chloroplast. *Plant Physiol.* **88**: 207-212.
- Ghanotakis, D.F., D.M. Demetriou and C.F. Yocum. 1987. Isolation and characterization of an oxygen-evolving photosystem II reaction center core preparation and a 28 KDa Chl-a-binding protein. *Biochim. Biophys. Acta.* **891**: 15-21.
- Glinka, Z. and L. Reinhold. 1972. Induced changes in permeability of plant cell membranes to water. *Plant Physiol.* **49**: 602-606.
- Golbeck, J.H., Martin, I.F. and C.F. Fowler. 1980. Mechanism of linolenic acid induced inhibition of photosynthetic electron transport. *Plant Physiol.* **65**: 707-713.
- Grunwald, C. 1968. Effect of sterols on the permeability of alcohol treated red beet tissue. *Plant Physiol.* **43**: 484-488.
- Konishi, K., N. Yaginuma and K. Shibata. 1972. Carotenoids and fatty alcohols as non-ionic hydrophobic inhibitors of photochemical activities of chloroplasts. *Plant Cell Physiol.* **13**: 531-547.
- Laemmli, U.K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**: 680-685.
- Lichtenthaler, H.K. 1974. Die Hemmung der lichtinduzierten chlorophyll-, carotinoid-, und anthocyaninsynthese durch äthanol. *Physiol. Plant.* **30**: 260-264.
- Linus, H.W., V.D. Plas and M.J. Wagner. 1980. Influence of ethanol on alternative oxidase in mitochondria from callus-forming potato tubers. *Physiol. Plant.* **49**: 121-126.
- Mayfield, S.P. and A. Huff. 1986. Accumulation of chlorophyll, chloroplastic proteins, and thylakoid membranes during reversion of chromoplasts to chloroplasts in *Citrus sinensis* epicarp. *Plant Physiol.* **81**: 30-35.
- Obokata, J. 1987. Synthesis and assembly of the polypeptides of photosystem I and II in isolated etiochloroplasts of wheat. *Plant Physiol.* **84**: 535-540.
- Perata, P. and A. Alipi. 1991. Ethanol-induced injuries to carrot cells. The role of acetaldehyde. *Plant Physiol.* **95**: 748-752.
- Ryehter, A., H.W. Janes, C.K. Chin and C. Frenkel. 1979. Effect of ethanol, acetaldehyde, acetic acid, and ethylene on changes in respiration and respiratory metabolites in Potato tubers. *Plant Physiol.* **64**: 108-111.
- Satler, S.O. and K.V. Thimann. 1980. The influence of aliphatic alcohols on leaf senescence. *Plant Physiol.* **66**: 395-399.
- Terashima, I., L.K. Huang and C.B. Osmond. 1989. Effects of leaf chilling on thylakoid functions, measured at room temperature, in *Cucumis sativus* L. and *Oryza sativa* L. *Plant Cell Physiol.* **30**: 840-850.
- Thore, A. and H. Baltscheffsky. 1965. Inhibitory effects of lower aliphatic alcohols on electron transport phosphorylation systems, 1. Straightchain, primary alcohols. *Acta Chemica Scandinavica.* **19**: 1591-1599.
- Vernon, L.P. and E.R. Show. 1969. Photoreduction of 2,6-dichlorophenolindophenol by diphenylcarbazide. A photosystem II reaction catalyzed by tris-washed chloroplasts and subchloroplast fragment. *Plant Physiol.* **44**: 1645-1649.