

О. П. ОСИПОВА и И. В. ТИМОФЕЕВА

К. ВОПРОСУ О ХЛОРОФИЛЛ-БЕЛКОВОМ КОМПЛЕКСЕ

(Представлено академиком Н. А. Максимовым 17 VIII 1950)

До настоящего времени еще не установлена природа связи между хлорофиллом и белком и не найдено стехиометрического соотношения между ними.

Полученные нами ранее ⁽¹⁾ данные модельных опытов с нативными и замещенными белками являются подтверждением выдвинутого В. Н. Любименко ⁽²⁾ предположения о химической природе связи между хлорофиллом и белком.

С целью дальнейшего изучения свойств и характера связи хлорофилла с белком в живом листе в настоящей работе мы попытались выделить белковые препараты из различных частей клеток зеленого листа, изучить их состав, свойства и способность образовывать комплексные соединения с хлорофиллом. В модельных опытах мы использовали белок хлоропластов и белок цитоплазмы.

Из разрушенных хлоропластов мы попытались выделить фракцию гранул — мельчайших морфологических единиц, в которых локализуется хлорофилл и белок которых представляет большой интерес для решения вопроса о природе хлорофилл-белкового комплекса.

Однако методом дробного центрифугирования, которым мы пользовались, нам не удалось полностью отделить гранулы от кусочков стромы хлоропласта, одинаковых по величине с гранулами, и поэтому была использована фракция, содержащая, наряду с гранулами, частично и кусочки стромы хлоропласта.

Суспензия разрушенных хлоропластов из листьев свеклы, полученная ранее описанным методом ⁽³⁾, подвергалась разделению при помощи суперцентрифуги. При скорости 45 000 об/мин самые мельчайшие частицы суспензии, в том числе и гранулы, не осаждались на роторе, а выходили вместе с цитоплазменной жидкостью. После стояния в течение нескольких часов в холодильнике при +2° частицы оседали на дно сосуда. Цитоплазменная жидкость сливалась декантацией, а осевшие частицы отфильтровывались на стеклянном фильтре, промывались водой, спиртом и эфиром до полного удаления пигментов и липоидов.

Оставшаяся белковая строма, содержащая 13,55% белкового азота, 4% золы и не содержащая углеводов, использовалась нами в модельных опытах.

Из цитоплазменной жидкости, после отфильтровывания через бумажную массу, осаждался белок нагреванием на водяной бане до 70°. После этого белок подвергался диализу в течение 2 суток, затем высушивался обычным способом спиртом и эфиром. Белковый препарат, содержащий 14,66% азота и 6,9% золы, использовался в модельных опытах как белок цитоплазмы.

Избегая возможных изменений активных групп белковой молекулы, мы не применяли очистки белковых препаратов путем многократного пересаживания ввиду того, что белок хлоропластов растворяется только в щелочи, что безусловно, может вызывать нежелательные его изменения.

В белковых препаратах после кислотного гидролиза были определены некоторые аминокислоты методами, описанными А. Р. Кизель (⁴); цистин определялся по методу Фолина и Маренза в модификации Томпсет (⁵).

Данные, полученные из двух параллельных гидролизом, приведены в табл. 1.

Как видно из таблицы, аминокислотный состав белка цитоплазмы и хлоропластов неоднороден.

Повышенное содержание в хлоропластах аргинина, гистидина и цистина и пониженное содержание дикарбоновых кислот свидетельствуют о большей гидрофобности белка хлоропластов в сравнении с белком цитоплазмы.

Таблица 1
Азот аминокислот
в процентах от азота
препарата

	Белок цито- плазмы	Белок хлоро- пластов
Общий азот	100	100
Гистидин	5,89	6,64
Аргинин	8,22	16,56
Лизин	8,52	6,69
Тирозин	1,76	1,63
Дикарбоновые кислоты	15,34	11,37
Триптофан	4,34	3,46
Цистин	2,02	3,55

В связи с различным аминокислотным составом белковых препаратов, обуславливающим их реакционную способность, представляло интерес определить восстановительную способность белка путем воздействия $1/50 \text{ N K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$.

Для этого определенная навеска белка настаивалась при периодическом встряхивании с $1/50 \text{ N K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$ в 1% растворе соды в течение 5 суток при комнатной температуре. После этого невосстановленный окислитель определялся иодометрически.

Было обнаружено, что 100 мг сухого и беззольного препарата исследуемых белков восстанавливают различное количество $1/50 \text{ N K}_3\text{Fe}(\text{CN})_6$: белок хлоропластов — 9,29 мл; белок цитоплазмы — 6,40 мл.

Белок хлоропластов, как и следовало ожидать, обладает большей восстановительной способностью, чем белок цитоплазмы, что, очевидно, можно поставить в связь со специфичностью функций, выполняемых хлоропластами.

В связи с ранее опубликованными данными М. П. Знаменской и О. П. Осиповой (⁶), установивших, что восстановление белковых препаратов водородом *in statu nascendi* приводит к повышению их способности связывать хлорофилл, представляло интерес исследовать в этом отношении свойства белков хлоропластов и цитоплазмы.

Определение способности связывать хлорофилл проводилось следующим способом: навеска белка в 20—30 мг смачивалась несколькими каплями спирта, затем прибавлялось 2,5 мл воды и 0,5 мл спиртового раствора хлорофилла (a + b) и все тщательно встряхивалось. Позеленевший белок отфильтровывался и на фильтре промывался слабым (15%) спиртом.

Связавшийся с белком хлорофилл извлекался прибавлением на фильтр крепкого спирта до тех пор, пока стекавшая жидкость не становилась бесцветной. Содержание хлорофилла в растворе определялось спектрофотометрически.

Полученные данные (см. табл. 2) показали, что белок хлоропластов, обладающий большей восстановительной способностью, чем белок цитоплазмы, значительно интенсивнее связывает хлорофилл.

Представляло также интерес установить способность белка связывать хлорофилл после его окисления $K_3Fe(CN)_6$. При этом оказалось, что в окисленном белке значительно снижается способность связывать хлорофилл.

Следует также отметить, что белки хлоропластов и цитоплазмы после их окисления присоединяют одинаковое количество хлорофилла.

На основании этого можно думать, что хлорофилл связывается с белком не только группами, обуславливающими восстановительную способность белка, но и группами иного характера.

Неодинаковая способность связывать хлорофилл белками, выделенными из различных участков клетки, свидетельствует как об их специфичности, так и неоднородности химических групп, участвующих в образовании комплекса хлорофилл—белок.

Тот факт, что белок в зависимости от степени его восстановленности присоединяет различное количество хлорофилла, как это было показано еще в модельных опытах с запасными белками ⁽⁶⁾, возможно, и объясняет непостоянство соотношения хлорофилла и белка, наблюдаемое у растений в различные периоды их жизнедеятельности.

Не исключена возможность, что белок хлоропластов в период жизнедеятельности растения претерпевает определенные структурные изменения окислительно-восстановительного порядка, отражающиеся на его способности связывать хлорофилл.

Большая способность восстановленного белка связывать хлорофилл свидетельствует об участии каких-то групп, обуславливающих его восстановительные свойства, в образовании хлорофилл-белкового комплекса.

Это подтверждается и тем, что белок, связанный с хлорофиллом, теряет в значительной мере способность вступать в реакцию с окислителями: 100 мг белка, связанного с хлорофиллом, восстанавливают только 0,1—0,2 мл 1/50 $N K_3Fe(CN)_6$.

Этот факт свидетельствует о том, что в комплексе хлорофилл—белок блокированы группы, участвующие в восстановлении.

Выяснение вопроса о роли определенных групп молекулы хлорофилла в образовании комплекса и о характере связи является предметом наших дальнейших исследований.

Авторы выражают глубокую благодарность М. П. Знаменской за ценные советы при выполнении данной работы.

Институт физиологии растений
им. К. А. Тимирязева
Академии наук СССР

Поступило
17 VIII 1950

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ О. П. Осипова, ДАН, 57, 371 (1947). ² В. Н. Любименко, Изв. Росс. Акад. Наук, 129 (1923). ³ О. П. Осипова и И. В. Тимофеева, ДАН, 67, 105 (1949). ⁴ А. Р. Кизель, Практическое руководство по биохимии растений, 1934. ⁵ S. L. Tompset, Biochem. Journ., 25, 2014 (1931). ⁶ М. П. Знаменская и О. П. Осипова, ДАН, 57, 705 (1947).