

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

СПЕКТРАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ СОСТОЯНИЯ ХЛОРОФИЛЛА ПРИ ЕГО ОБРАЗОВАНИИ В РАСТЕНИИ И В КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРАХ ВЕЩЕСТВА ЭТИОЛИРОВАННЫХ ЛИСТЬЕВ

(Представлено академиком А. Н. Терениным 29 IV 1952)

Предыдущие работы нашей лаборатории ⁽¹⁾, посвященные исследованию природы естественного состояния хлорофилла, позволили прийти к следующим заключениям, нуждающимся в дальнейшем экспериментальном изучении: 1) хлорофилл в растении находится в различных формах агрегации и связи, равновесие между которыми зависит от стадии развития и условий внешней среды; 2) положение главного максимума поглощения света хлорофилла в пластиде при 677—678 м μ определяется агрегированной коллоидной формой хлорофилла, в соответствии с исходными работами Д. И. Ивановского ⁽²⁾; 3) фотохимически активной является мономерная, вероятно, связанная с липопротеином, форма хлорофилла.

Наши исследования ⁽³⁾ первичных фотопродуктов в коллоидных растворах вещества зеленых листьев подтвердили исследованную в работах В. И. Любименко ⁽⁴⁾ высокую фотохимическую устойчивость растворов естественной формы хлорофилла с максимумом поглощения при 677—678 м μ ; обнаруженные в нашей работе активные фотопродукты, переживающие период освещения, являются, вероятно, восстановленной формой сопряженной с хлорофиллом промежуточной системы.

Если положение главного максимума поглощения хлорофилла в листьях при 677—678 м μ определяется взаимной агрегацией его молекул, находящихся в гранулах в устойчивой, высоко концентрированной форме, то можно было ожидать, что первично образующееся из протохлорофилла белково-липоидное соединение хлорофилла будет обладать максимумом поглощения, свойственным мономерным формам хлорофилла — около 670 м μ ⁽¹⁾ и, соответственно, более высокой фотохимической активностью.

В настоящей работе изложены результаты исследования двух вопросов: 1) возможно ли фотохимическое образование хлорофилла из протохлорофилла в бесклеточных коллоидных растворах вещества этиолированных листьев*; 2) каковы спектральные свойства первично образованного естественного состояния хлорофилла и как они изменяются на начальной стадии онтогенеза.

* В предыдущих работах нашей лаборатории ⁽⁵⁾ исследовалась возможность фотохимического образования хлорофилла из химически индивидуального протохлорофилла в растворе; эту реакцию тогда нам осуществить не удалось, так как она сопряжена с ферментными реакциями (литература по вопросам образования хлорофилла см. (0,7)).

Работу мы вели с листьями фасоли, дающими стойкий коллоидный раствор «естественного», или «натурального» хлорофилла (по В. И. Любименко), обладающий тем же спектром поглощения, что и живые листья.

1. Образование хлорофилла в бесклеточных коллоидных растворах вещества этиолированных

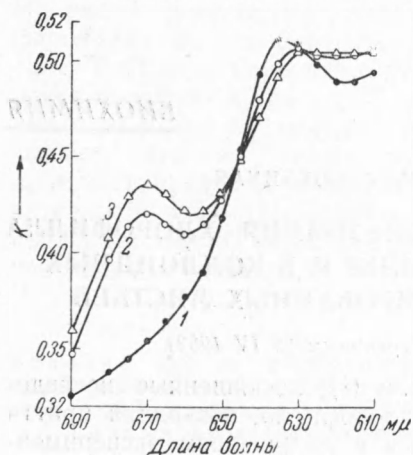


Рис. 1. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев с воздухом при слабом освещении (30 в на лампе). 1— коллоидный раствор до освещения; 2—1 мин. освещения; 3—2 мин. освещения

листьев. Фасоль сорта Триумф замачивали в водопроводной воде 2—3 суток при температуре 23—24°, затем выращивали на питательной среде Кнопа в песке в темноте при температуре 23—25°. 7—9-дневные проростки растирали в темноте с фосфатным 0,02 M буферным раствором с pH 7, содержащим 0,01 M KCl, при температуре, близкой к 0°, и затем центрифугировали при 10 000 g в течение 5 мин. После центрифугирования получали устойчивый опалесцирующий зелено-желтый раствор.

Раствор освещали в вакуумной трубке особой формы, позволяющей ее установку в кюветодержателе фотоэлектрического спектрофотометра Бекмана, на котором производились измерения спектра поглощения. Опыты проводились в присутствии воздуха и при его эвакуации масляным вакуумным насосом при энергичном взбалтывании в течение 7 мин. В начале эвакуации происходило сильное вспенивание. В качестве источника света была применена кинолампа 120 в мощностью 500 вт с конденсором (без светофильтра), работавшая при разном режиме напряжения тока, т. е. при разной интенсивности света. Мы проводили опыты при 30 в (около 1500 люкс) и при 90 в (> 40 000 люкс). Результаты опытов показаны на рис. 1, 2, 3.

Спектр поглощения исходного коллоидного раствора вещества этиолированных листьев фасоли обладает явным максимумом поглощения протохлорофилла при 635 мμ и не обладает максимумом в области поглощения хлорофилла. Освещение такого раствора во всех случаях приводит к появлению явного максимума поглощения при 670 мμ, сопровождающемуся падением максимума поглощения протохлорофилла.

В опытах при интенсивности света 1500 люкс большая часть хлорофилла с максимумом поглощения при 670 мμ образуется в пределах первой минуты освещения. При 90 в образование большей части хлорофилла происходит в пределах первых 15 сек. В присутствии воздуха при малой интенсив-

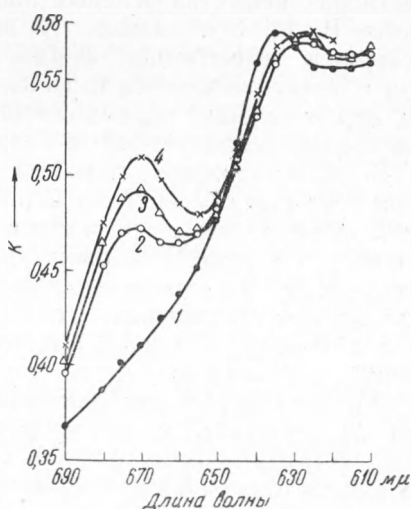


Рис. 2. Образование хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев без воздуха при слабом освещении. 1— коллоидный раствор до освещения; 2—1 мин. освещения; 3—2 мин. освещения; 4—3 мин. освещения

ности света образованный хлорофилл в пределах 6-минутного освещения не изменяется. При большой интенсивности света (90 в) в присутствии воздуха уже после первых 15 сек. происходит разрушение образованного хлорофилла и протохлорофилла. В опытах с эвакуацией воздуха изменение образованного хлорофилла происходит весьма медленно.

Из сопоставления опытов в присутствии и в отсутствие воздуха при слабом освещении можно прийти к тому заключению, что эвакуация приводит к некоторому увеличению количества образовавшегося хлорофилла. Это можно объяснить относительным значением двух противоположно направленных процессов: фотохимического образования хлорофилла и его фотохимического изменения в присутствии кислорода; при сильном освещении скорость второго процесса превосходит скорость первого.

После того как максимум поглощения хлорофилла (в опытах со слабым освещением) переставал заметно повышаться, к водному коллоидному раствору приливали ацетон до его концентрации 60%; затем прибавляли эфир и разбавлением водой пигменты переводили в эфирный слой. Спектр поглощения эфирного раствора пигментов обнаруживает максимумы поглощения хлорофилла а (при 662 ± 1 м μ) и протохлорофилла (625 ± 1 м μ), который в условиях наших опытов не весь превращается в хлорофилл.

2. Изменение спектральных свойств естественного состояния хлорофилла в процессе онтогенеза.

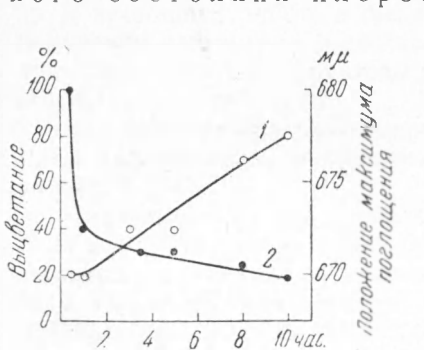


Рис. 4.1.—изменение максимума поглощения естественного состояния хлорофилла при его образовании в этиолированных листьях; 2— фотохимическое окисление образованного хлорофилла кислородом воздуха. Точность измерения положения максимума ± 1 м μ

точного коллоидного раствора вещества этиолированных листьев. По мере дальнейшего синтеза происходит накопление хлорофилла со сдви-

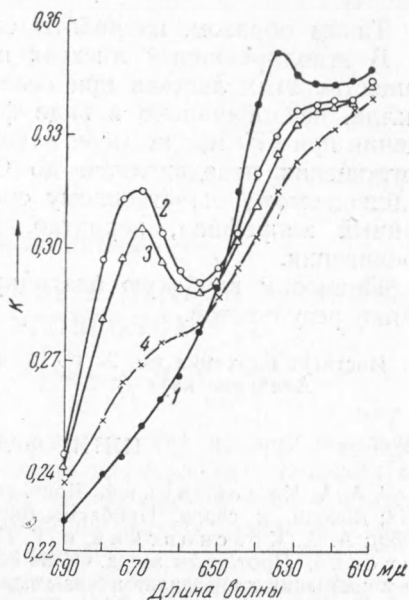


Рис. 3. Образование и разрушение хлорофилла в коллоидном растворе вещества этиолированных листьев с воздухом при сильном освещении (90 в на лампе). 1— исходный коллоидный раствор; 2— 15 сек. освещения; 3— 30 сек. освещения; 4— через 2,5 мин. освещения

Этиолированные 7—9-дневные проростки фасоли освещали на расстоянии 50 см от набора 10 люминесцентных ламп дневного света (15 вт) при 22°. Через разные промежутки времени отбирали несколько проростков, готовили из них коллоидный раствор обычным способом (см. выше) и измеряли спектр поглощения раствора; затем 5 мл раствора освещали на воздухе через красный светофильтр RG-2 в фокусе конденсора кинолампы 500 вт (120 в) в течение 6 мин. при температуре 20° с тем, чтобы испытать устойчивость образованного хлорофилла к фотоокислению.

Из опытов следует, что первично образуется состояние хлорофилла с максимумом поглощения при 670 м μ , так же как и при освещении бесклеточного коллоидного раствора вещества этиолированных листьев. По мере дальнейшего синтеза происходит накопление хлорофилла со сдви-

гом максимума поглощения в длинноволновую сторону; через несколько часов достигается «обычный» максимум поглощения при 678 м μ . По мере накопления и агрегации хлорофилла увеличивается его фотохимическая устойчивость по отношению к окислению кислородом (см. рис. 4).

Таким образом, из работы следует заключение:

В этиолированных листьях и коллоидных бесклеточных растворах вещества этих листьев при освещении происходит образование хлорофилла, первоначально в виде формы, обладающей максимумом поглощения при 670 м μ ; по мере накопления хлорофилла в листьях максимум поглощения передвигается до 677—678 м μ , что соответствует обычно наблюдаемому естественному состоянию хлорофилла. Первично образованный хлорофилл, вероятно, находится в форме белково-липидного соединения.

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение результатов.

Институт биохимии им. А. Н. Баха
Академии наук СССР

Поступило
25 IV 1952

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

¹ А. А. Красновский, Докт. диссерт., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948; Дополн. к сборн. Проблемы биохимии, 1948; Ежегодн. Усп. биол. хим., 1, 473 (1950); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 63, 163 (1948). ² Д. И. Ивановский, Протоколы засед. Об-ва естествоисп. при Варшавск. ун-те, 1909; О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава, 1913. ³ А. А. Красновский и Л. М. Кособуцкая, ДАН, 82, 761 (1951). ⁴ В. И. Любименко, Изв. Росийск. Акад. наук, 129 (1923); Фотосинтез и хемосинтез в растительном мире, 1935. ⁵ А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, 66, 663 (1949). ⁶ Е. Р. Гюббенет, Растение и хлорофилл, изд. АН СССР, 1951. ⁷ Т. Н. Годнев, УИ Тимирязевское чтение, изд. АН СССР, 1947.