

А. А. КРАСНОВСКИЙ и Г. П. БРИН

О ПРИРОДЕ КРИСТАЛЛИЧЕСКИХ ОБРАЗОВАНИЙ ХЛОРОФИЛЛА, ВЫПАДАЮЩИХ В СИСТЕМЕ ВОДА — ПИКОЛИН — ДИОКСАН

(Представлено академиком А. Н. Терениным 6 I 1954)

В работах нашей лаборатории было установлено, что агрегация молекул хлорофилла и его аналогов приводит к образованию состояний с разными спектрами поглощения, определяющимися, очевидно, различными типами упаковки пигмента в агрегированных структурах ^(1, 2).

Так, было показано, что бактериохлорофилл образует три типа структур ⁽²⁾ с максимумами поглощения при 890, 850 и 800 м μ (± 10 м μ). Наименее устойчивыми оказались длинноволновые максимумы; нагревание до 50—60° приводило к обратимому понижению максимумов при 890 и 850 м μ ; охлаждение возвращало их в первоначальное положение. Следует отметить, что бактериофеофитин дает лишь один тип структур с максимумом поглощения при 850 м μ .

Поиски различных структур агрегированных форм хлорофилла производились нами путем измерения спектров поглощения коллоидных растворов и твердых пленок хлорофилла на стекле, образующихся при испарении в вакууме растворов чистого хлорофилла (полученного путем хроматографического разделения) в разных условиях.

При этом оказалось, что растворы хлорофилла a и $a + b$ в спирте, ацетоне, эфире дают пленки с красным максимумом поглощения при 675—677 м μ , тогда как при испарении растворов в диоксане получаются пленки с максимумом при 690 м μ . Нагревание этих пленок до 60—70° ведет к перемещению максимума до 675—677 м μ (см. рис. 1).

Положение максимума поглощения хлорофилла в пленках из диоксана нельзя связать со специфическим взаимодействием растворителя с хлорофиллом, поскольку растворы хлорофилла в диоксане обладают максимумом поглощения при 664 м μ . Коллоидные растворы, полученные при разбавлении диоксановых растворов водой, также обладают максимумом поглощения при 690 м μ ⁽³⁾.

Таким образом, у хлорофилла наблюдаются наиболее вероятные типы структурной упаковки с поглощением при 675—678 и 690 м μ ; следует, однако, указать и на то, что свежеприготовленные коллоидные растворы, полученные при разбавлении водой растворов хлорофилла в спирте, ацетоне или пиридине, обладают максимумом поглощения при 670 м μ . Значительное поглощение хлорофилла в гранулах при 690—700 м μ открывает возможность того, что наряду с доминирующей агрегированной структурой с максимумом при 677—678 м μ в гранулах имеется и структура, соответствующая максимуму при 690 м μ .

Весьма важно было бы иметь метод выделения из хлоропластов агрегированных белковолипидных соединений хлорофилла в индивидуальной кристаллической форме. Недавно появилась работа Такашима ⁽⁴⁾ в которой сообщалось о выделении кристаллического хлорофилл-липпротеина из листьев клевера. Существенным отличием этой работы

от ранее проведенных явилось наблюдение над тем, что водный раствор α -пиколина (или пиридина) растворяет белки и пигменты пластид, и введение диоксана в этот раствор приводит к выпадению зеленых кристаллов «хлорофилл-липопротеина».

Следуя описанному методу, действительно получаются зеленые кристаллы — сферические игольчатые агрегаты, сходные с кристаллами, показанными на микрофотографии в статье ⁽⁴⁾. Однако, зная о малой прочности связи хлорофилла с белком и его склонности к образованию агрегированных состояний, мы проверили, не выделяются ли подобные кристаллы из растворов чистого хлорофилла а + b, не содержащего белков, следуя описанной ⁽⁴⁾ процедуре.

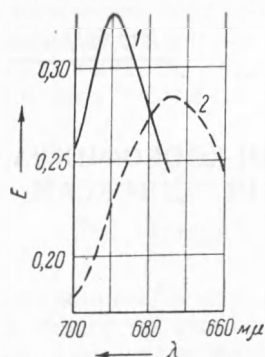


Рис. 1. Твердая пленка на стекле, полученная при испарении в вакууме раствора хлорофилла в диоксане. 1 — исходная пленка; 2 — та же пленка после нагревания до 80°

10 мг хлорофилла а + b (выделенного обычным методом из крапивы) растворяли в 10 мл α -пиколина, к раствору приливали 10 мл 0,02 М фосфатного буфера (рН 7) и через 30 мин. добавляли 5 мл диоксана. При стоянии выпадают зеленые кристаллы, сходные с кристаллами «хлорофилл-липопротеина», выделенного из листьев клевера. Этот опыт указывает на то, что полученные методом Такашима кристаллы в действительности могут быть образованиями хлорофилла, а не хлорофилл-липопротеина.

Мы провели сравнительное исследование кристаллов, полученных описанным методом, в присутствии белков и при отделении их от хлорофилла. Кристаллы были получены из свежих листьев клевера или фасоли следующим образом ⁽⁴⁾. Листья растирались на холоду с 0,02 М фосфатным буфером (рН 7) с кварцевым песком. Суспензию отжимали через полотно и центрифугировали 20 мин. при 2500 об/мин. После этого к суспензии добавляли равный объем α -пиколина и смесь сутки диализовали против 50% пиколина. Содержимое целлофанового мешочка центрифугировали для отделения осадка. Следует отметить, что, несмотря на наличие флуоресценции, свидетельствующей о дезагрегации хлорофилла, последний не диализуется через целлофан. Микроскопическое наблюдение показало наличие эмульсии зеленых капель, взвешенных в маточном растворе. К раствору добавляли диоксан до его содержания 20% в смеси. При стоянии смеси в холодильнике при +5° образовались кристаллы. Кристаллы эти представлены на рис. 2 (на вклейке к стр. 517); наряду с кристаллами видны неокрашенные бесформенные скопления, вероятно, белковые частицы.

Для того чтобы сравнить вид зеленых кристаллов, полученных в присутствии белков и без них, суспензия была разделена на три равные части, и после центрифугирования каждый осадок обрабатывался отдельно. Первая часть осадка растворена в 50% растворе α -пиколина в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7); к раствору после центрифугирования добавлено до 20% диоксана, т. е. проведена перекристаллизация по описанному методу ⁽⁴⁾. Вторая часть осадка растворена в 100% α -пиколине с целью извлечения хлорофилла; после центрифугирования к раствору добавлен равный объем того же буфера и до 20% диоксана (при центрифугировании наблюдается значительно больший осадок, чем в первом случае). Третья часть осадка обрабатывалась ацетоном, при этом образовался раствор хлорофилла в ацетоне и белковый осадок, который отделялся центрифугированием. Ацетон испаряли под вакуумом и хлорофилл растворяли в 50% растворе α -пиколина в 0,01 М фосфатном буфере (рН 7). К раствору добавляли 20% диоксана. После суток стояния в холодильнике при +5° во всех трех порциях выпали кристал-

лы хлорофилла сходной формы (см. рис. 2), независимо от того, содержал исходный раствор белок или нет.

Дальнейшей проверкой того, что кристаллы имеют небелковую природу, были опыты по установлению постоянства состава осадков, образованных при многократной перекристаллизации. Первичный осадок, полученный вышеописанным методом, растворяли в 50% α -пиколине и осаждали диоксаном, после выпадения вторичные кристаллы растворяли и снова осаждали. Эту процедуру повторяли три раза. Порции осадков высушивали в вакууме, брали навески, извлекали хлорофилл эфиром и определяли количество хлорофилла спектрофотометрически.

Количество хлорофилла, полученного в осадках, мы сравнивали с количеством хлорофилла в препаратах твердого хлорофилла $a + b$ и выражали эту величину в процентах. После первой кристаллизации осадок содержал 16% хлорофилла, после второй кристаллизации количество хлорофилла возросло до 38%. После третьей кристаллизации количество хлорофилла доходило до 80%.

Осадки после первой и второй кристаллизации промывались большим количеством воды (при этом сохранялась кристаллическая форма осадков). Хлорофилл определяли в промытых и непромытых водой осадках. Оказалось, что промывка, удаляя сопутствующие белки, приводит к получению более богатых хлорофиллом осадков.

Для суждения об идентичности кристаллов, полученных из хлорофилла $a + b$ и из листьев клевера, были сделаны микрофотографии кристаллов и сняты спектры поглощения твердых кристаллов и их растворов в 50% пиколине.

Микроскопическое исследование показывает одинаковую форму кристаллов, полученных разными способами, с белками и без белков.

Измерение спектров поглощения твердых кристаллов (зажатых между двумя стеклянными пластинками) и растворов в 50% пиколине показывает подобие, независимо от содержания белка в осадке (см. рис. 3 и 4). Отчетливо видны различия агрегированных форм хлорофилла a и b . Спектры поглощения раствора кристаллов в пиколине и пиридине также подобны.

В предыдущих работах нашей лаборатории⁽⁵⁾ было показано большое сродство хлорофилла к органическим основаниям; можно было думать, что эти кристаллы принадлежат

молекулярному соединению хлорофилла с α -пиколином. С целью проверки этой возможности мы промывали кристаллы водой до полного исчезновения α -пиколина в промывных водах (контролировали отсутствие α -пиколина в воде по исчезновению его максимума поглощения при

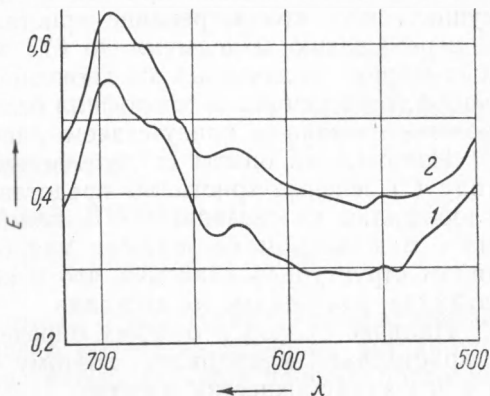


Рис. 3. Спектры поглощения кристаллов хлорофилла: 1 — из листьев клевера; 2 — из чистого хлорофилла $a + b$

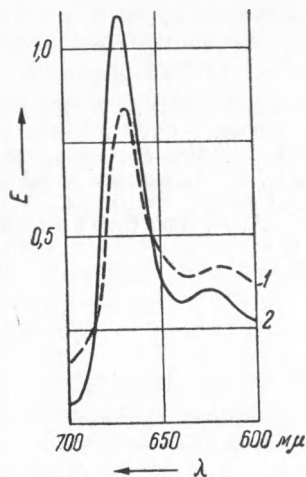


Рис. 4. Спектры поглощения растворов кристаллов хлорофилла в 50% пиридине. 1 — раствор первичных кристаллов, содержащий белок; 2 — раствор после ацетоновой обработки, не содержащий белка

262 м μ); при этом кристаллическая структура осадка сохранялась. Промытые осадки растворяли в эфире и промывали эфирный раствор водой. В воде не удалось обнаружить α -пикоплина. Таким образом, промытые осадки, повидимому, не содержат связанного основания.

Чрезвычайно характерным для этих осадков является положение максимума поглощения при 690 м μ и отсутствие флуоресценции. Весьма существенно, что нагревание кристаллов хлорофилла до 80° приводит к перемещению максимума до 675 м μ (рис. 4), так же как и у твердых пленок, полученных из диоксана. Наблюдавшееся нами ⁽¹⁾ появление флуоресценции в хлорофилл-белковых осадках при нагревании, вероятно, связано с присутствием липоидов.

Изложенные опыты свидетельствуют о том, что выделенные по методу ⁽⁴⁾ зеленые кристаллы представляют собой агрегированные формы хлорофилла, не связанного с белком. Полученная кристаллическая форма с максимумом поглощения при 690 м μ , очевидно, обладает тем же типом структурной упаковки, что и коллоидные растворы и пленки хлорофилла, полученные из диоксана.

Наличие белков в осадках определяется их совместным осаждением с кристаллами хлорофилла, поэтому состав первичного осадка ⁽⁴⁾ близок к составу вещества пластид.

Установление молекулярной структуры различных агрегированных форм хлорофилла, его аналогов и производных является задачей дальнейших исследований.

В проведении ряда опытов принимала участие М. А. Боруздина. Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за обсуждение работы.

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

Поступило
2 IX 1953

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **63**, № 2, 163 (1948); А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **91**, № 2, 343 (1953). ² А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, **85**, № 2, 389 (1952); А. А. Красновский, Л. М. Кособуцкая, К. К. Войновская, ДАН, **92**, № 6 (1953). ³ Л. М. Кособуцкая, А. А. Красновский, Биохимия, № 3, 340 (1953). ⁴ S. Takashima, Nature, **169**, 182 (1952). ⁵ А. А. Красновский, Г. П. Брин, ДАН, **89**, № 3, 527 (1953).