

Член-корреспондент АН СССР А. А. ШЛЫК, С. А. МИХАЙЛОВА

СПЕЦИФИЧНОСТЬ ЛИПОФИЛЬНЫХ СВОЙСТВ МЕТАБОЛИЧЕСКИ ГЕТЕРОГЕННЫХ ФОРМ ХЛОРОФИЛЛОВ У ХЛОРЕЛЛЫ

Использование метода радиоактивных индикаторов при изучении метаболической гетерогенности хлорофиллов в зеленых растениях позволило выявить связь между состоянием и временем жизни молекул в составе

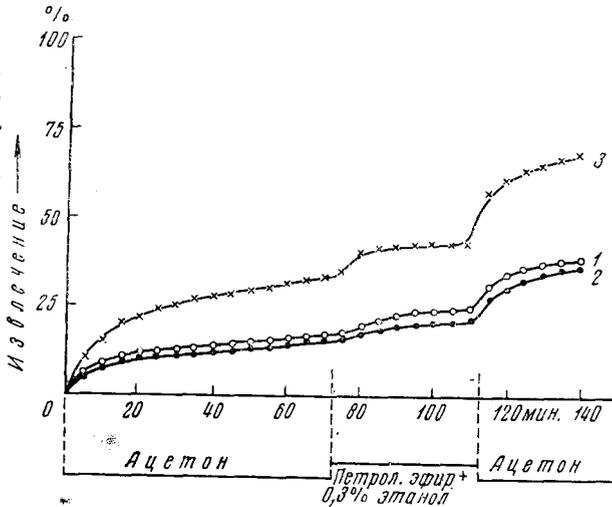


Рис. 1. Ход извлечения хлорофилла а (1), хлорофилла в (2) и каротиноидов (3) (в процентах от количества каждого пигмента) из клеток хлореллы последовательно применяемыми растворителями различной природы. Каждая точка на кривой — суммарное количество пигмента данной и предыдущих фракций

разных пигментных форм (1-6). Установлено, что вновь синтезируемые молекулы хлорофилла благодаря особенностям своего состояния отличаются повышенной лабильностью при действии самых разнообразных факторов. Они легче феофитинизируются, легче разрушаются ультразвуком и интенсивным освещением или при длительном затемнении. Эти же молекулы избирательно вовлекаются в метаболические процессы, в частности в реакцию превращения хлорофилла а в хлорофилл в (7, 8). Повышенная экстрагируемость новых молекул

малополярными растворителями обусловлена не просто слабой связью с носителем (9, 10), но особой липофильностью окружения (11), особенно четко доказываемой ниже.

Осадок синхронных клеток хлореллы переносили на предварительно увлажненный ацетоном стеклянный фильтр, заливали 15 мл 100% ацетона и тщательно перемешивали. Через 5 мин. элюат отсасывали в колбу Бунзена для количественного определения извлеченных пигментов по (12). К осадку добавляли очередную порцию растворителя, получая через 5 мин. новую вытяжку пигмента. Когда извлечение хлорофиллов заметно уменьшалось (в растворе обнаруживали только следы пигментов), дальнейшую обработку осадка проводили смесью петролейного эфира с 0,3% этанола. Получив несколько экстрактов в таком малополярном растворителе, извлечение опять продолжали 100% ацетоном до прекращения экстракции. Наконец, оставшиеся пигменты извлекали ацетоном, растирая осадок клеток хлореллы с песком и мелом.

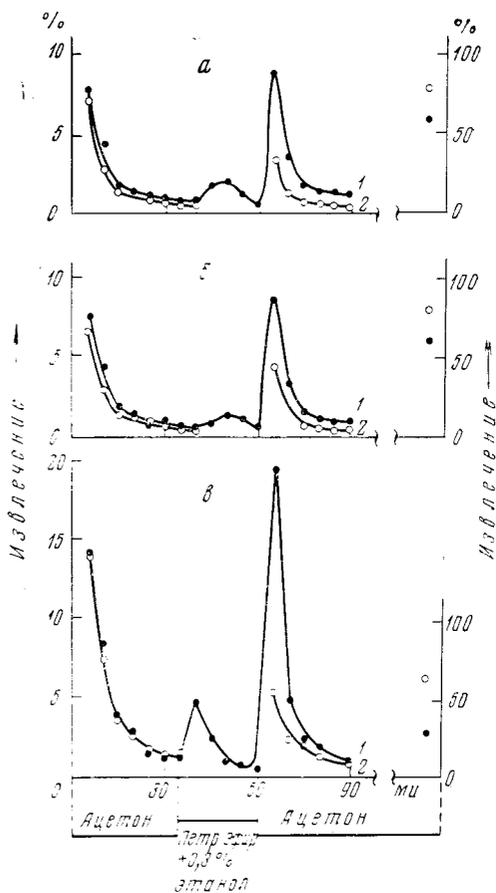
Обработывая таким образом нерастертые клетки хлореллы 100% ацетоном, можно извлечь некоторую долю пигментного фонда: около 20% хлорофилла а, 17% хлорофилла в и около 40% каротиноидов (рис. 1). Основное количество пигментов извлекается в течение первых 15-20 мин., после чего экстракция замедляется. Кривая извлечения имеет

вначале более крутой подъем, а затем довольно пологий участок, на протяжении которого в каждую последующую фракцию поступает не более 0,1—1% хлорофиллов. Важно, что ни увеличение времени обработки клеток хлореллы 100% ацетоном, ни увеличение объема применяемого растворителя, ни частая смена его порций принципиально не изменяют процентного содержания извлекаемых этим растворителем пигментов.

При переходе же от ацетона к малополярному растворителю (смеси петролейного эфира с 0,3% этанола) происходит возобновление экстракции пигментов. При этом извлекается до 8% хлорофилла а, 5% хлорофилла б и около 20% каротиноидов, которые также поступают преимущественно в первые порции растворителя. Если снова обработать оставшийся осадок хлореллы 100% ацетоном, наблюдается значительное увеличение извлекаемости всех пигментов, особенно каротиноидов (до 30%). В некоторых случаях количество пигментов, экстрагируемых при повторной обработке проб ацетоном, даже превышает то, которое поддавалось извлечению при первоначальной обработке осадка клеток этим же растворителем. Описанная картина особенно наглядно проявилась в серии опытов, обобщенных на рис. 2, где по ординате отложено не суммарное количество извлекаемого пигмента, а его содержание в каждом отдельном элюате.

Увеличение скорости экстракции при переходе от ацетона к петролейному эфиру при таких условиях эксперимента указывает на присутствие в пластиде некоторой доли хлорофилла, находящейся в специфическом липофильном окружении и потому извлекаемой только неполярным растворителем. Подобными компонентами липопротеинового комплекса, обладающими большим сродством к неполярным растворителям, могут быть фосфатидилглицеролы, легче экстрагируемые гексаном⁽¹³⁾, или моногалактозилдиглицериды, которые обнаруживаются вместе со «слабосвязанными формами хлорофилла» и основной массой β-каротина в петролейно-эфирной фракции⁽⁶⁾ и также во фракции, извлекаемой смесью петролейного эфира с 0,5% этанола⁽¹⁴⁾. Удаление подобных липидов и сопряженных форм пигментов ведет, очевидно, к пространственному разобщению структурных

Рис. 2. Сопоставление количества пигментов (в процентах от содержания каждого пигмента в пробе), извлекаемых 100% ацетоном до и после действия смеси петролейного эфира с 0,3% этанола (1) или 30-минутной экспозиции осадка на воздухе (2). а — хлорофилл а, б — хлорофилл б, в — каротиноиды



компонентов мембраны и способствует дальнейшему освобождению прикрываемых ими «ацетоновых» форм, что и проявляется в новом усилении экстракции при возвращении к обработке ацетоном.

Такое заключение было проверено опытами, в которых «разобщающее» действие петролейного эфира было заменено другим фактором — длительным стоянием пробы на воздухе. Можно было допустить, что и при этом возникнут подобные нарушения структурной организации пластиды, которые приведут к аналогичному результату, а именно к экстракции при дальнейшей обработке ацетоном такого же количества пигмента, которое экстрагируется после действия петролейного эфира (и даже большего: с добавлением пигмента, оставшегося в этом случае не извлеченным петролейным эфиром). Равные осадки нерастертых клеток хлореллы подвергали многократной обработке 100% ацетоном, свежие порции которого меняли через 5 мин. Затем осадок одной пробы обрабатывали смесью петролейного эфира с 0,3% этанола и снова ацетоном. Вторая же проба после начальной обработки 100% ацетоном находилась во время действия петролейного эфира на первую пробу на воздухе без контакта с растворителем. Из рис. 2, каждая точка которого представляет среднюю величину 8 опытов, видно, что начальная экстракция пигментов обеих проб 100% ацетоном происходила почти одинаково, свидетельствуя о хорошей воспроизводимости данных. При этом соответственно в первой и второй пробах было извлечено 19 и 15% хлорофилла а, 18 и 15% хлорофилла в и 34 и 33% каротиноидов. Петролейный экстракт первой пробы содержал 6,3% хлорофилла а, 4,1% хлорофилла в и 8,5% каротиноидов. Однако дальнейшая обработка ацетоном обнаружила намного большее извлечение пигмента в пробе, подвергавшейся действию петролейного эфира, по сравнению с извлечением после 30—35-минутного пребывания второй пробы на воздухе. Мы предполагаем, что это связано с существованием в хлоропластах особого пигментного фонда, липофильные свойства которого определяются специфическим окружением веществами, избирательно растворимыми малополярными растворителями, и который как бы прикрывает, вместе с ними, часть «ацетоновой» формы, находящейся в иных участках структуры, чем та, которая доступна извлечению ацетоном вначале.

Дополнительным свидетельством специфичности поведения метаболитически различающихся пигментных фондов по отношению к действию растворителей явилось изучение содержания радиоактивного углерода во фракциях пигментов, последовательно извлекаемых разными растворителями из кратковременно ассимилировавших $C^{14}O_2$ клеток хлореллы. Поскольку количества пигментов, извлекаемого за 5 мин. каждой отдельной порцией растворителя, недостаточно для получения нужных количеств радиохимически чистого хлорофилла (очистка по (4)), отдельные элюаты объединяли в последовательные группы (пробы) для совместного определения усредненной по группе удельной активности (табл. 1).

Обобщая результаты серии опытов, значения удельных активностей нормировали делением удельной активности каждого хлорофилла данной пробы на удельную активность того же хлорофилла в первой пробе начального ацетонового раствора. В этой пробе удельная радиоактивность хлорофиллов а и в оказалась самой низкой. В последующих порциях ацетона удельная активность пигментов несколько повышается. Существенно увеличивается содержание C^{14} в молекулах хлорофиллов а и в, извлекаемых смесью петролейного эфира с 0,3% этанола. Относительное содержание радиоактивного углерода у хлорофилла в в этой фракции оказалось самым высоким по сравнению со всеми остальными фракциями. Удельная активность хлорофилла а в трех случаях из четырех была самой высокой в последней ацетоновой пробе, а в четвертом максимум наблюдался также в петролейном эфире. Удельная активность пигментов ацетоновой фракции, выделенной после действия петролейного эфира, оказалась несколько большей, чем у пигментов, извлекаемых первыми порциями ацетона, но существенно меньшей, чем удельная активность пигментов петролейно-эфирной фракции. Это подтверждает наше заключение о том, что свойства дискретно различающихся фондов каждого из хлорофиллов определяются

надмолекулярной организацией структурных элементов хлоропласта и специфичностью окружения отдельных хлорофильных фондов.

Очевидно, вновь синтезируемые молекулы хлорофилла формируются избирательно в тех участках мембраны, где сосредоточены вещества липофильного характера, доступные действию таких растворителей, как петролейный эфир (или серный эфир⁽¹⁵⁾). Именно их пигментный фонд отличается повышенной лабильностью и

более активным участием в метаболизме зеленого растения. Другая часть молекул находится в иных условиях. Такая картина хорошо соответствует развиваемым в нашей лаборатории представлениям о существовании особых структурных элементов пластиды, в которых локализованы центры биосинтеза новых молекул^(4, 5, 15). Поскольку при фрагментировании хлоропластов высших растений такие центры оказались сосредоточены во фракции легких фрагментов⁽³⁾, происходящих из межгранных ламелл^(16, 17), можно полагать, что именно в последних прежде всего локализируются вновь возникающие молекулы хлорофиллов. Не исключено, что в дальнейшем подтвердится и мысль о своеобразии их функционального поведения как результате появления в еще не закончивших формировании участках мембраны⁽¹⁷⁾. Пока известно лишь, что в этих же участках локализованы новые молекулы каротиноидов⁽¹⁸⁾. Вместе с тем, центры биосинтеза обнаружены и при фракционировании хлоропластов хлореллы^(5, 19), мембранная система которых не имеет выраженного деления на гранулярные и ламеллярные участки. С другой стороны, для выяснения локализации центров биосинтеза и в хлоропластах высших растений важно раздельное изучение микрфильных свойств таких участков.

Лаборатория биофизики и изотопов
Академии наук БССР
Минск

Поступило
3 VII 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Шлык, И. В. Прудникова, Весті АН БССР, сер. біял. навук, № 4, 129 (1961). ² А. А. Шлык, Г. Н. Николаева, ДАН, 143, 460 (1962). ³ А. А. Shlyk, G. N. Nikolayeva, In: La photosynthèse, Paris, 1963, p. 301. ⁴ А. А. Шлык, Метаболизм хлорофилла в зеленом растении, Минск, 1965. ⁵ А. А. Shlyk, I. V. Prudnikova et al., In: Progress in Photosynthesis Research, 2, Tübingen, 1969, p. 572. ⁶ M.-E. Deroche-Laborie, C. Costes, Ferron, Ann. Physiol. vég., 6, 187 (1964). ⁷ А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин, Биофизика, 6, 424 (1961); 7, 281 (1962). ⁸ А. А. Shlyk, Ann. Rev. Plant Physiol., 22, 169 (1971). ⁹ Т. Н. Годнев, О. П. Осипова, Изв. АН БССР, 1, 17 (1948). ¹⁰ Т. Н. Годнев, Н. К. Акулович, Бюлл. Инст. биол. АН БССР, 4, 51 (1960). ¹¹ А. А. Шлык, С. А. Михайлова, ДАН, 177, 236 (1967). ¹² G. Holm, Act. Agr. Scand., 4, 3, 457 (1954). ¹³ T. H. Ji, J. I. Nees, A. A. Benson, Biochim. et biophys. acta, 150, 676 (1968). ¹⁴ C. Costes, R. Basier, II Intern. Congr. Photosynthesis Research, Abstracts, Milano, 1971, p. 102. ¹⁵ А. А. Шлык, Л. И. Фрадкин и др., ДАН, 167, № 3, 706 (1966). ¹⁶ G. Jacobi, H. Lehmann, In: Progress in Photosynthesis Research, 1, Tübingen, 1969, p. 159. ¹⁷ P. V. Sane, R. V. Park, Biochim. et biophys. acta, 253, 208 (1971). ¹⁸ А. А. Шлык, Н. И. Ахрамович, ДАН, 194, 448 (1970); 200, 473 (1971). ¹⁹ А. А. Шлык, Р. А. Чканикова и др., Весті АН БССР, сер. біял. навук, № 5, 30 (1971).

Таблица 1

Средние нормированные значения удельных активностей хлорофиллов а и в, извлекаемых из клеток хлореллы растворителями разной природы. Удельная активность первой пробы принята за единицу для каждого пигмента

№ пробы	Растворитель	Хлорофилл а	Хлорофилл в
1	100% ацетон	1,00	1,00
2	То же	1,24 ± 0,07	1,07 ± 0,04
3	» »	1,33 ± 0,20	1,29 ± 0,09
4	Петролейный эфир — 0,3% этанола	1,56 ± 0,21	2,20 ± 0,32
5	100% ацетон	1,52 ± 0,16	1,64 ± 0,43
6	То же	1,58 ± 0,16	1,55 ± 0,27
7	» »	1,60 ± 0,19	1,79 ± 0,10

Примечание. Пробы №№ 1—3 получены при фракционном экстрагировании нестертых клеток, проба № 7 — после растирания.