

(Készült a Magyar Biológiai Kutatóintézetben.)\*

## A CHLOROPLASTIS SZERKEZETÉRŐL.

(7 szövegközi ábrával.)

Irta: W. F. H. M. MOMMAERTS (Leyden — Tihany).

1. A chloroplastis alaktana.
2. Az asszimilációs festékek kémiája.
3. A chloroplastis finom szerkezete, a chlorophyll fizikai állapota.
  - a) Nagyítós vizsgálatok: polarizációs nagyítás; nagyítós fényképezés ibolyántúli sugarakkal; elektronoptikai vizsgálatok.
  - b) Az elnyelési színek vizsgálata.
  - c) A fluoreszkálás vizsgálata.
  - d) A chlorophyll állandósága.
  - e) Modellkísérletek és azok értelmezése.
4. A chloroplastisok különválasztása.
5. A különválasztott chloroplastis vegyi összetétele.
  - a) Fehérjék.
  - b) Lipoidok.
  - c) Egyéb alkotórészek.
  - d) Festékek; chlorophyll : fehérje arány.
6. Az eredmények megvitatása.

### 1. A chloroplastis alaktana.

Alak és működés két olyan megnyilvánulás, amit az élő természet minden tünetében elénk tár. Nincs is sok értelme arról vitatkozni, hogy melyik az elsődleges a kettő közül. Az a felfogás a legkielégítőbb, amelyik szerint mind a kettő egymással igen szoros kapcsolatban van és a valóságban alak és működés ugyanazon jelenségnek csak két különböző megnyilvánulása, amit csak gondolatban — s akkor sem mindig büntetlenül — lehet egymástól szétválasztani. Ha a fiziológus tárgya szerkezetének vizsgálatában ilyen meggyőződéssel merül el, gyakran két sajátságos tapasztalatra

\* A m. kir. Vallás- és Közoktatásügyi Minisztériumnak hathatós támogatását ezúton is hálásan köszönöm.

tesz szert. Az első az — amit pl. KROGH a kapilláris, vagy HUBER a szitáscső-vizsgálatoknál átéltek —, hogy a morfológia az élettan kérdéseire nem tud megfelelni, mivel meghatározott valóságos és elképzelt kényszerkérdéseket követve az alakleírásnak fontos részletterületeit elhanyagolja. A másik meglepő tény pedig az, hogy a régebbi kutatók értékes és fontos eredményeit ma már nemcsak hogy nem értékelik, de egyáltalán nem is ismerik.

Aki a chloroplastisok alaktanában elmélyülni kíván, mindkét tapasztalatot igen élénken átéli. Egyrészt a photosynthesis élettana olyan kérdéseket állít fel — mindenestre az ultramikroszkópos alaktan területére áttérjedve —, amire a cytológus nem tud megfelelni. Másrészt pedig csodálatra méltó, hogy ezen a területen a klasszikus vizsgálatok ma milyen csekély figyelemben részesülnek. Ez utóbbira igen találó példa a chloroplastisok már régen leírt granumos szerkezetének „felfedezése” 1935-ben, amiről egyébként még szó lesz.

Ismeretesen a növényi sejtfalon kívül a sejtalkotóknak van még egy másik csoportja is, aminek a homológja az állati sejtől hiányzik: a plastisok. A legfontosabb plastisfajták: a chlorophyllt hordozó chloroplastis, a carotinoidtartalmú chromoplastis és a színtelen leukoplastis. Itt különösen a chloroplastisról lesz szó, de nyomatékosan kell hangsúlyoznunk, hogy a három csoport egymástól élesen el nem különíthető. Mind a három plastisfajta elvileg keményítőképzésre és valószínűleg még egyéb biosynthesisekre is képes. Ezenkívül a különféle plastisfajták egymásba átmehetnek, ami az ontogenezisben is megvalósul, ahol a leukoplastis kezdettől fogva fellép és később a differenciálódásnál részben más plastisfajttá átalakul. Ez történik sok, először zöld és később piros termésnek érésekor (pl. paradicsom, paprika, *Solanum dulcamara*, *Lycium halimifolium*), ahol a chloroplastisok stromájukban nagymennyiségű carotinoidot képeznek. Ehhez hasonló átalakulás történik bizonyos rendellenes esetekben, vagy pedig olykor a vegetatív részek egyes fejlődési állapotában is (LIPPMAN, 1924—27, 30—37). Ugyanis igen feltűnő, hogy amíg a chloroplastisok egységesen mindig csak ugyanazon carotinoidokat (carotin és xanthophyll) tartalmaznak, addig a chromoplastisokban egyéb festékek is, gyakran mint keverékek, előfordulnak. Azonban a LIPPMAN vizsgálta vegetatív chromoplastisok érdekes kivételt képeznek, mert ezek a chromoplastisok a chlorophyll rendes carotinoid-kísérőin kívül, csaknem minden növényben kivétel nélkül még mindig ugyanazt a carotinoidot: a rhodoxanthint is tartalmaznak. LIPPMAN vizsgálataiból továbbá világosan kitűnik, hogy a chlorophyll-carotin-xanthophyll átváltozások és a stroma carotinoid képzése egymástól teljesen független folyamatok.

A stromában előforduló carotinoid felépítésének biochemiai folyamatáról általánosságban a következőt mondhatjuk (JANSSEN, 1939, 23). A bioszintézis kiindulási anyaga a glükóze, amiből nitrát-N, sulphát-S és phosphát-P beépülésével a legkülönbözőbb termékek képződhetnek. Ha a cukor átalakulásokhoz viszonyítva kevés nitrát, sulphát vagy phosphát van jelen, a bioszintézis meglehetősen egyoldalúan megy végbe és vagy egy lipid, pl.

carotinoid-degenerálódás lép fel, vagy pedig egyéb N-, S- és P-mentes vegyületek (pl. anthocyanok és egyéb glükozidák) halmozódnak fel. JANSSEN ezen általános természetű elgondolásával LIPPMAN (1924—25, 30, 31) és WENZINGER (1940, 76) eredményei teljes összhangban vannak. Utóbbiak ugyanis a növényekben cukros vagy N-mentes táplálékkal igen erős carotinoidképződést tudtak előidézni, viszont a N-hozzáadásakor ez a festékképződés abbamaradt. Számos további megfigyelés támasztja alá ezt a feltevést: Kóros festékképződés egyrészt a gyűrűzés következtében beállott assimilatum felhalmozódáskor, másrészt mechanikai sérüléskor és gombafertőzéskor, valamint fokozott photoszintéziskor. A fenti feltevéssel magyarázható, hogy a különféle növényekben a rhodoxanthin és az anthocyan együttesen lép fel. (LIPPMAN, l. c.)

A plastis mindig csak plastisból és sohasem de novo protoplasmából vagy egyéb szerkezetekből keletkezik. Megtermékenyítéskor a plastisok a zygotába belekerülnek, miáltal folytonosságuk biztosítódik. Van azonban — főleg a francia irodalomban (GUILLIERMOND és iskolája) — még egy másik felfogás is, mely szerint a plastisok mitochondriumokból keletkeznek. Ez a felfogás a fiatal leukoplastisok külalakjának téves értelmezésén és a mitochondrium fogalmának tág fogalmazásán alapul. Különösen ELFVING (1913—1935, 6—9) védelmezte a chloroplastisoknak mitochondriumból való keletkezésének feltevését. ELFVING zuzmógonidiumokon végzett vizsgálatai eredményének helyességét a lichenológusok azonban igen erősen kétségbevonták.

Térjünk most végérvényesen a chloroplastishoz. Külső alkata a magasabbrendű növényeknél meglehetősen egységes: mindig többé-kevésbé szabályszerű, lapos, ellipszoid alakú. Az algáknál azonban igen gazdag sokalakúságot találunk (SCHMITZ 66). A továbbiakban főleg a magasabbrendű növényekben található viszonyokra leszünk figyelemmel.

A finomabb szerkezetre való tekintettel meg kell jegyeznünk, hogy már régebbi szerzők is, mint von MOHL (1837, 49) vagy MIKOSCH (1879, 48) észreveszik, hogy a chloroplastis finoman szemcsézett. Arról is már régóta meg voltak győződve, hogy nem a chlorophyll a chloroplastis egyetlen alkotórésze. Már SACHS (1862, 61) különbséget tesz a chlorophyllt hordozó anyag és a chlorophyll között. A chloroplastis felépítését szivacsos szerkezetűnek képzelték el; a chlorophyll SCHMITZ (1884, 66) szerint magán a szivacsok falazatán, N. PRINGSHEIM (1881, 59) szerint viszont a szivacs üregeiben helyezkednek el. PRINGSHEIM a chlorophyllnak hordozó anyagát stromának nevezi el. Külön plastishártyának létezésére vonatkozólag a vélemények még ma is változnak. A régi kutatók közül pl. NÄGELI és SCHWENDENER (1877, 53) feltételezik egy ilyen hártya létezését, amit azonban v. MOHL (l. c.) és Arth. MEYER (1883, 47) tagadnak. A hártya létezésére vonatkozó újabb adataink (pl. KNUDSON 27) gyakran nem is nagyító vizsgálaton, hanem a chloroplastisnak a medium ozmotikus értékétől függően megfigyelhető és mérhető nagyságváltozásain alapulnak. Mivel azonban ilyen folyamatoknál nem ozmózisról, hanem duzzadásról van szó, a hártya létezésének a kérdését ilyen módon nem lehet eldönteni.

Részletes és alapvető munkát közöl Arth. MEYER (1883, 47) és főleg A. F. W. SCHIMPER (1885, 63). Mindketten kimutatják, hogy a chloroplastis egy alapanyagban levő apró, zöld szemcsékből (granumokból) áll. Az, hogy a chlorophyll kizárólagosan a granumban lokalizált, vagyis hogy az alapanyag színtelen, még nem volt teljes bizonyossággal megállapítható. Érdeemes hangsúlyoznunk, hogy már SCHIMPER is nagyon jól tudta, miként idézhetnek elő a keményítőszemek és olajcseppek is a chloroplastisban szemcséséget és ő ezt a valóságos granumoktól tudatosan meg is különböztette. Nyilván a chloroplastis granumos szerkezetét látta SCHAARSCHMIDT is (1880, 62), ő azonban ezeket a finom szemcséket a plastis osztódásakor észlelhető „szőrök” alapi részeként értelmezte. Egyébként a plastisoknak kettéosztódással való szaporodását már SCHAARSCHMIDT is kétségbevonhatatlanul bebizonyította.

Bámulatos, hogy ezeket a fontos nézeteket a későbbi években mily alaposan sikerült elpalástolni. Tudvalevő, hogy a sejttan története legnagyobb-részt a preparációs műtermékek hamis magyarázatainak változtatásából, cserélgetéseiből áll. Így a chloroplastisban is alveolusokat, fibrillumokat stb. szeretnének látni. A későbbi években pedig már mindenféle chloroplastis-szerkezetet tagadni kezdenek és mindent, ami megfigyelhető, műterméknek értelmeznek. Erre szolgál a „modern” cytologusnak mindent megmagyarázó, semmitmondó kifejezése: „Entmischung”.

Csak 1935-ben fedezik fel újra a granumos szerkezetet s egyben végérvényesen igazolják is. DOUTRELIGNE (1935, 5) néhány vízinövény, pl. *Valisneria spiralis*, *Cabomba aquatica* és moha, pl. *Mnium hornum*, vékony leveleiben, melyek minden külön előkészítés nélkül is mikroszkopizálhatók, 1935-ben kimutatja, hogy a granumos szerkezet mindenütt világosan látható. Megsérülése után a granuláris szerkezet mindenesetre jobban kifejezett, úgy-hogy a régebbi szerzők bizalmatlankodása így részben indokolt is.

A következő évben jelenik meg HEITZ (18, 19) tartalmas munkája, amely terjedelmes megfigyelési és rajzanyagával rendkívül meggyőző erejű. HEITZ, aki a granumos szerkezetre már évekkel azelőtt figyelmes lett, kezdetben — miként DOUTRELIGNE is — olyan leveleket tanulmányozott, amelyek előkészítés nélkül is azonnal vizsgálhatók: mint pl. számos moha, vízi növény, Hymenophyllacea és főleg a vékonylevelű Osmundaceabeli *Todea*. Ezenkívül áteső fényben még a szárazföldi növények vastagabb leveleit is vizsgálta s végül szövetmetszeteket, mely utóbbiaknál a sejtek sértetlenségének a megállapításánál különféle kritériumokra volt figyelemmel. A granumos szerkezetet sikerült mindenütt kimutatnia. További fontos eredménye először is annak a kimutatása, hogy a granumok nem gömböcskét alkotnak, hanem korongot képeznek, amely — a chloroplastis felülnézetében — lapos oldalát fordítja felénk. Ez a tény különösen fontos a chloroplastisok fényvédelmi állásának, a SENN-féle: parastrophe-helyzetnek célszerűsége szempontjából. Másodszer a granumok nagysága sem szabálytalan, hanem mind a fajra, mind a szövetre nézve sajátlagosan jellemző. Végül HEITZnek sikerült bizo-

nyossággal megállapítania, hogy csakis a granum és sohasem az alapanyag tartalmazza a chlorophyllt. Ez utóbbit főleg az osztódó chloroplastisokban, azok szegélyének pseudopodiumaiban (a SCHAARSCHMIDT fűje „szőrökben”) sikerült kimutatnia. Ne feledjük el, hogy már MIKOSCH (1879, 48) és SCHAARSCHMIDT (1880, 62) is a kettéválási övet színtelennek írják le, amiben pedig BERTHOLD (1886, 3) annak az igazolását látja, hogy egyedül csak a granumok a zöldre festettek. A granumok kizárólagos zöldfestődöttségét HEITZ, illetve főleg METZNER (1937, 46) nagyítás fluoreszkálási vizsgálatai is megerősítik. A granumoknak keményítőszemekkel való összecserélésének a lehetősége oly módon küszöbölhető ki, hogy a leveleket elszegényítjük keményítőben, habár a kettőt egymástól gyakran könnyebben meg is lehet különböztetni, amint azt DOUTRELIGNE is kimutatja.

A következő évek néhány közleménye, amelyekkel azonban nem szükséges részletesebben foglalkoznunk, a granum-tan további igazolását és kidolgozását hozzák magukkal. GEITLER (1937, 14) egyik algánál a granumokat ugyancsak kimutatja. ROBERTS (1940, 60) az *Elodea chloroplastis granum*jainak csoportos rendeződését is észleli.

Összefoglalólag tehát azt mondhatjuk, hogy a magasabbrendű növények chloroplastisa színtelen alapanyagba beágyazott chlorophyllt tartalmazó korongból áll. Ezek a korongok a granumok, míg az alapanyag megjelölésére a stroma elnevezést használják. Mivel azonban a „stroma” szót már korábban (SACHS nyomán PRINGSHEIM) egy másik és még ma is használható értelemben alkalmazták (t. i. stroma = a chlorophyllnak a hordozó anyaga, tekintet nélkül a nagyítósan látható differenciálódásra), szerintem egy másik szakkifejezést, a „matrix”-ot kell előnyben részesítenünk, amit ilyen értelemben alkalmasan már használtak is (pl. WEIER (1936, 75). Ezek alapján tehát a chloroplastist matrix és granumok alkotják.

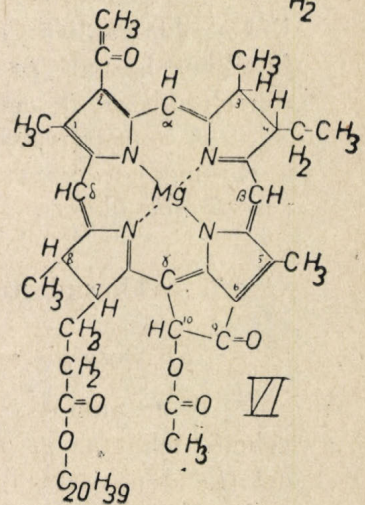
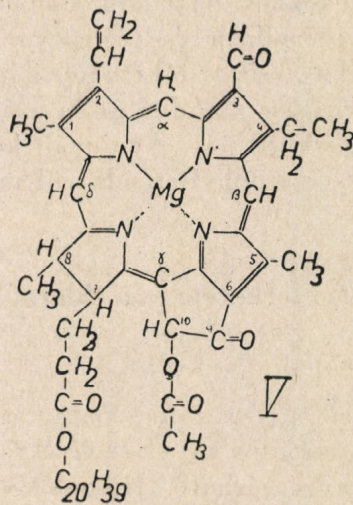
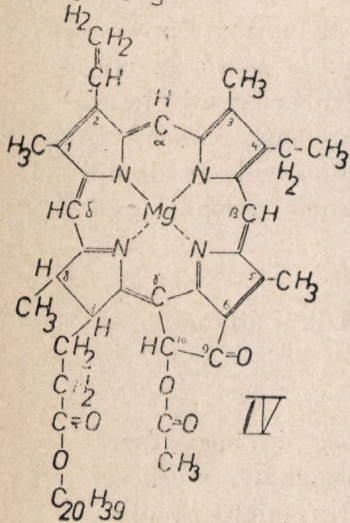
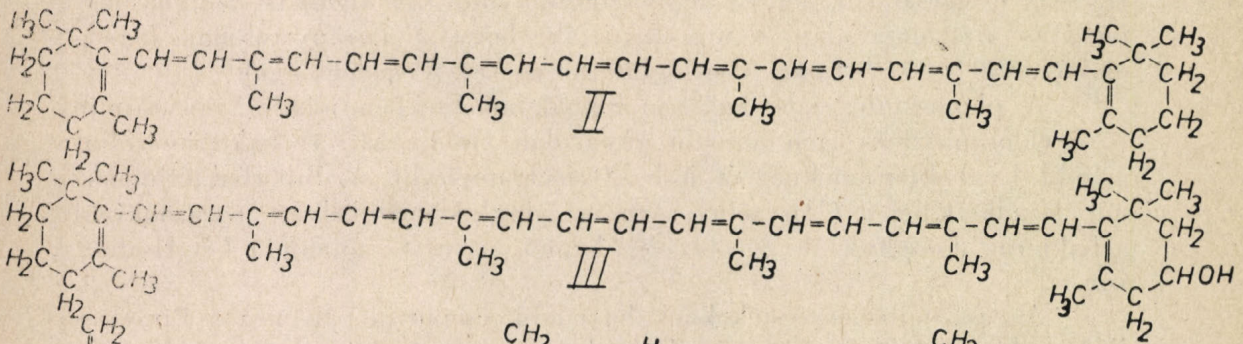
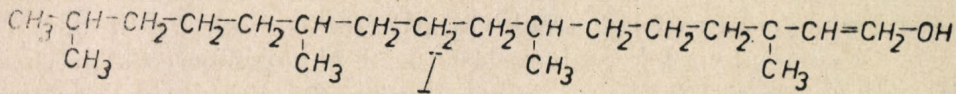
## 2. Az asszimilációs festékek kémiája.

A levélfestékek kémiai ismeretének alapját WILLSTÄTTER és STOLL vetették meg. A chlorophyllra vonatkozó ismereteink további kibővítése mindenekelőtt H. FISCHER (továbbá CONANT és STOLL), a carotinoidekéra vonatkozólag pedig KARRER és KUHN érdeme.

A magasabbrendű növényekben két carotinoidot találunk, úgy mint a carotint ( $C_{40}H_{56}$ ) és a xanthophyllt ( $C_{40}H_{54}(OH)_2$ ) és két chlorophyllt: az a- és b-chlorophyllt ( $C_{55}H_{72}O_5N_4Mg$ , ill.  $C_{55}H_{70}O_6N_4Mg$ ). Gyakran előfordul a 3 a-chlorophyll : 1 b-chlorophyll : ( $1\frac{1}{2}$ —1) carotin :  $1\frac{1}{2}$  xanthophyll molekuláris arány. Különösen a két chlorophyll 3 : 1 arányának tulajdonítottak többen különös fontosságot (újabban B. BECKING és HANSON 1937, 1, SMITH 1941, 71). SEYBOLD (1940, 69) rendszeres vizsgálatai azonban kimutatták, hogy ez az arány még hozzávetőleg sem állja meg a helyét, mert már a magasabbrendű növényeknél is találhatunk ettől eltérő arányszámokat (ahol egyben a termőhely és a festékarányszám között érdekes összefüggések álla-

píthatók meg). A különböző algáknál pedig igen eltérő arányok fordulnak elő, sőt olykor az a-komponens teljesen hiányozhatik is.

Nézzük meg már most kissé közelebbről az egyes festékek vegyi összetételét (l. 8. oldal). A xantophyll (III) és carotin (II) is láncmolekulát képeznek, amit az isoprénből  $(CH_2 = C - CH = CH_2)$  vezetünk le, a végükön pedig hatosgyűrűk helyezkednek el. A kettőskötések  $CH_3$  konjugált rendszere mint chromophor csoport szerepel, vagyis ez valósítja meg a festékmolekula színét. A chlorophyllmolekulánál megkülönböztetünk egy tetrapyrrol-magvat és a phytol-, „farkat”, mint egy hosszú oldalláncot. A phytol is, szerkezete alapján (I. képlet), isoprén származék, vagyis az isoprén a biosynthesisekben különleges szerepet tölt be.



A tetrapyrrolgyűrűt egészen röviden jellemezve (l. a 8. oldalt, ahol IV az a-chlorophyll, V a b-chlorophyll szerkezeti képlete, és a phytollánc mint  $C_{20}H_{39}$  van feltüntetve), a négy pyrrolgyűrű methinhidakkal kapcsolódik egymással. Mint jellemző oldallánccok megemlítendő 1. a vinylcsoport

a 2 helyzetben, ezt egyébként a vérhaeminben is megtaláljuk, 2. a  $C_7$  és  $C_8$  két H-atomja, ami viszont a haeminből hiányzik, 3. az isocyclosus C-gyűrű (cyclopentanon-gyűrű) a  $C_8$  és  $C_9$  között, ami a 9 és 10-es C-atomokat tartalmazza és végül 4. egy propionsavmaradék a  $C_7$ -en, ami a phytollt elészterésíti. Ha ebben az észter-kötésben a phytollt más alkoholok helyettesítik, chlorophyllidek képződnek, mint pl. az aethylchlorophyllid. A molekula középpontjában van egy Mg atom hasonlóképp a haeminekhez kötött Fe-hoz.

A chlorophyll fiziko-kémiai sajátosságai igen érdekesek. A tetrapyrrolgyűrű hydrophil, míg a phytollánc kifejezetten hydrophob. Ennek következtében a chlorophyll vízben oldhatatlan, viszont a víz felszínén egy molekula vastagságú hártvaként (monomolekuláris film) szétterül. Ilyen felszínfilmek vizsgálata alapján HANSON azt következteti, hogy a cyclopentanoncsoport a vizet megkötő központ, aminek az aktivitását a központi fekvésű fématom szabályozza és hogy azonkívül pH érzékeny is.

A chlorophyll kikristályosodását is a phytolcsoport akadályozza meg. HANSON és társai (16, 26) az aethylchlorophyllid kristályainak röntgenspektográfus vizsgálata alapján megállapítják, hogy a tetrapyrrol-mag lemezalakú  $15.40 \times 15.62 = 242 \text{ \AA}^2$ -os felülettel és  $3.87 \text{ \AA}$  vastagsággal.

A photoszintetizáló bakteriumoknál, amelyekben mindig van carotin is, a chlorophyllhoz igen hasonló anyagokat találunk: a bakterioviridint a zöld Kénbakteriumoknál és a bakteriochlorophyllt a Bíborbaktériumoknál. Mindkettőnél a  $C_2$ -n aethyl van a vinylcsoport helyett s azonkívül a bakteriochlorophyll (l. 8. old., VI. képlet)  $C_3$  és  $C_4$  atomjain két H-atom van.

Az asszimilációs festékeknek harmadik csoportja van meg a Piros- és Kékeszöldalgaokban: a phycoerythrin és phycocyan. Mind a kettő az epefestékhez hasonló prosthetikus csoporttal ellátott fehérje. Itt is megvan a tetrapyrrolrendszer, de nem gyűrűsen záródva és ép ezért fématomja sincsen.

A tetrapyrrolszerkezetekben is a konjugált kettőskötésrendszer alkotja a chromophor csoportot, a chlorophyll rendkívül mély színét viszont a gyűrűs záródás okozza.

### 3. A chloroplastis finom szerkezete és a chlorophyll fizikai állapota.

#### a) Nagyítós vizsgálatok.

A granumos szerkezet mikroszkópos nagyítással még ép hogy észrevehető, tehát az egyszerű nagyítós megfigyelésektől a finomabb szerkezetnek további tisztázása nem is várható. Hasonlóképp az ultramikroszkópia is csak alig segítette elő e kérdés megoldását. Ugyanis a chloroplastis sötétalapú látómezőben homogénnek látszik, de csakis addig, amíg a sejtben sértetlen állapotban van. A chloroplastis különválasztása után ez a granumos szerkezet igen hatásosan láthatóvá válik, azonban további sajátosságot így sem igen mutat (MOMMAERTS adata in manuscripto).

Fontos felvilágosításokat nyújt azonban a polarizációs optikai vizsgálati út. A chloroplastis anizotrópiáját többen megállapították (irod. l. SCHMIDT 1937, 64). Ezek szerint a magasabbrendű növényeknek chloroplastisa felülnézetben izotróp, oldalnézetben anizotróp, mégpedig pozitív az elliptikus oldalnézet hosszirányához viszonyítottan. Ha az egész chloroplastis rotációs-tengelyének irányához viszonyítjuk, akkor a lapos chloroplastisok egytengelyű, negatív kettőtörésűek.

MENKE (1938, 39) szerint (igaz, hogy csak egyetlen anyag vizsgálata alapján) ez egy negatív „Mischkörper“-nek kettőtörése lenne, amely elfedi a pozitív saját kettőtörést. Az előbbi úgy értelmezendő, hogy a chloroplastis nyilván réteges szerkezetű. Ezt a nézetet támogatja továbbá még az a tény is, hogy MENKE és KÜSTER (1938, 45) aranykristályok beépítésével dichroitikus festődéshez jutottak, aminek a kiértékelése ugyancsak réteges szerkezetre utal. A pozitív sajátkettőtörés nincsen még tisztázva. Eddig a lipoid komponenssel hozták összefüggésbe, de felfogásom szerint a fehérjéket is figyelembe kell venni. A különféle komponensek részvétele valószínűleg additív és szubsztraktív módon adódik össze s ezt a kérdést nem is lehet egykönnyen megoldani.

MENKE először a polarizációs nagyítós megfigyeléseiből következtette a lamelláris szerkezetet, majd pedig ibolyántúli fénnel való mikrofényképezéssel közvetlenül láthatóvá is tette. Rögzített chloroplastisok keresztmetszetén is — habár itten eldurvítottak a viszonyok — látszik a lemezes szerkezet, ami azonban mégis az eredeti szerkezettel kapcsolatos.

Az elektronoptikai vizsgálatok alapján (MENKE 1941, 43, KAUSCHÉ és RUSKA 1940, 25) mindenekelőtt egy újabb formaelem válik ismeretessé: a vékony, kör alakú korongok, részben a granumoknál is jóval nagyobb mérettel. Bizonyára ezek a réteges szerkezetnek az elemei. Az elektronmikroszkópban a granumok is láthatók, optikai vastagságuk feltűnően nagy.

Mind a granum, mind a nagy korong molekuláris méretű elemi összetevőkre bontható fel, amelyek hosszúkás alkatúak és rostos fehérjemolekulákból, vagy azoknak micelláris aggregatumaiból állanak.

Elektronoptikailag egy külön plastishártyát nem lehetett észlelni. Mielőtt azonban egy ilyen hártjának a létezését véglegesen tagadnók, meg kell majd még vizsgálni, hogy vajjon mesterséges beavatkozással sem lehetne-e láthatóvá tenni (v. ö. WOLPERS (1941, 78) eredményeit az erythrocytákon).

MENKE feltételezi, hogy a lamellákban a rövid, pálcikaszerű fehérjemolekulák a felszínre merőlegesen állanak. Ezzel egyben az is megmagyarázódik, hogy miért észlelhető a rétegiránnyal párhuzamosan is a chloroplastisnak duzzadása.

#### *b) Az elnyelési színek vizsgálata.*

A chlorophyll zöld, mert a piros és kék sugarakat erősen elnyeli. A színek kék részében az elnyelési sáv igen széles, viszont a piros részé-



ben élesebb, úgyhogy ez utóbbi a sávok helyzetén alapuló mennyiségi vizsgálatokra igen alkalmas.

A chlorophyllnál a főelnyelési sávnak a helyzete in vivo és kivonatokban lényegesen eltérő. Az élő sejtben levő chlorophyll sávhelyzetére vonatkozó régebbi meghatározásokat itten mellőzhetjük, mivel ezek legtöbbje nem kielégítő pontosságú (az irodalom összefoglalását l. HUBERT-nél 1935, 21). Újabban az elnyelési maximum helyzetét HUBERT (1935, 21) meg KATZ és WASSINK (1939, 24) kb. 6800—6810 Å-ben határozták meg. Azonban NODDACK és EICHHOFF (1939, 58) meglepő módon 6680 Å-ben adják meg e maximumot. Legutóbb SEYBOLD és WEISSWEILER (1942, 70) a  $\pm 6800$  Å-os értéket erősítik meg, úgyhogy a NODDACK-féle eredmény nyilván helytelen. Hozzávetőleges értékül tehát a 6800 Å-t fogadhatjuk el. Megjegyzendő, hogy sok fajnak a zöld levele, valamint az eddigelé vizsgált egysejtű Zöldalgák (pl. *Hormidium*, *Chlorella*) között e tekintetben nincsen említésreméltó különbség.

Egyes kutatók a chloroplastiszuszpenziók és hasonló készítmények elnyelési színeképeit vizsgálják (HUBERT, KATZ és WASSINK, SMITH 1941, 71) és a vörösrészben való elnyelésnek csaknem ugyanolyan helyzetét állapítják meg, mint amilyen az érintetlen sejtben van, bár legtöbbször mégis egy kissé a rövidebb hullámhossz felé eltolódottan, pl. egészen 6710 Å-ig. Arról még lesz szó később, hogy vajjon ennek a különbségnek valami mélyebb jelentősége van-e, vagy pedig hogy ez egészen, illetve legnagyobbbrészt csak a fényszóródási viszonyok megváltozásának a következménye. Ezek a megfigyelések mindenesetre mutatják, hogy a különválasztott chloroplastisokban a chlorophyll állapota lényegesen nem változhatott meg.

Ha már most a festéket megfelelő oldószerrel kivonjuk, a fényelnyelés képe az előbbitől lényegesen különbözővé válik: az abszorpciósmaximum erősen eltolódik a színekép rövidebb hullámhossza felé s egyben a mellékmaximumoknak mind a helyzete, mind a relatív erőssége erősen megváltozik, habár ezek a mellékmaximumok a levélben az erős szóródás miatt nem kutathatók ki teljes pontossággal. Az elnyelési maximum függ továbbá az oldószer természetétől is, éspedig annál jobban megközelíti a természetes állapotban való helyzetét, mennél nagyobb a közeg töréscímex, anélkül azonban, hogy a természetes értékét teljesen elérhetné.

Nézzük már most ezen jelenségeknek fizikai jelentőségét. Az elnyelési sávok helyzete a festékmolekula aktiválási energiájára nézve ad felvilágosítást. Ha ugyanis egy meghatározott hullámhosszú (frekvenciájú) fény elnyelődik, ez azt jelenti, hogy a festékmolekulát ez a frekvencia gerjeszti. Minél nagyobb a molekula aktiválási energiája, annál magasabb az a gerjesztő frekvencia (vagyis annál rövidebb a hullámhossz), amely a molekulát gerjeszteni képes. Az elnyelési maximum eltolódása tehát az aktiválási energiának a csökkentődését jelenti. A folyadékknak a töréscímexmutatója (helyesebben a  $\frac{n^2-1}{n^2+2}$  képlet) adja meg molekulája közepes polarizálhatóságának a mértékét. Ezek szerint tehát a (részben poláris, l. HANSON 1939, 16) chloro-

phyllnak egy még polárosabb közegben az aktiválási energiája kisebb lesz; legkisebb pedig a természetes állapotában.

A sávhelyzeteknek az oldószerrel való függése a „KUNDT-féle szabály” néven ismeretes. A chlorophyllnál ezt a törvényszerűséget újabban BAAS BECKING és KONING (1934, 2), WAKKIE (1935, 74), HUBERT (1935, 21), SEYBOLD és EGGLE (1939, 68), valamint KATZ és WASSINK (1939, 24) vizsgálták. Sajnos, a különböző szerzők eredményei alig egyeznek meg egymással; még KATZ és WASSINK adatai látszanak a legmegbízhatóbbaknak. Ha az általuk megadott görbét extrapoláljuk, úgy az adódik, hogy az oldott chlorophyll saját természetes sávhelyzetét egy kb.  $n = 1.92$  törésmutatójú oldószerben érné el. Azonban ilyen közeg a biológiai rendszerekben nem fordul elő.

A bakteriochlorophyllnél, ahol a megfelelő fényelnyelés az infravörösben fekszik, a különbségek még erősebbek; ezenkívül a sejtekben a festékeknek két elnyelési sávja van, míg az oldatokban itten is csak egyet találunk.

### c) A fluoreszkálás vizsgálata.

A levelek, (pl. *Spinacia*, *Pelargonium*) Zöldalgák (pl. *Chlorella*) stb. (legalkalmasabban rövid hullámhosszú fényrel való) megvilágításakor gyengén fluoreszkálnak. Vörös fényben a fluoreszkálás sokkal kifejezettebb. Egyéb-ként a chlorophylloldatokban a fluoreszkáló fény hullámhossza rövidebb. Az elkülönített chloroplastis körülbelül úgy fluoreszkál, mint a levél.

### d) A chlorophyll állandósága.

Ha a chlorophylloldat erős fényen áll, hamarosan elbomlik, míg a levélben a chlorophyll intenzív megvilágításban is állandó, úgyszintén az izolált chloroplastisokban is.

A chlorophylloldatok megsavanyítva szintén nem állandóak, már kissé savanyú pH-nál is lehasad a molekulából a Mg-atom és phaeophytin képződik. Ezzel szemben levélben, sőt elkülönített chloroplastisokban is a chlorophyll a savanyítást igen jól tűri, így pl. a chlorophyllszuszpenzió pH 2.4 mellett is csak igen lassan változtatja meg színét.

### e) Modellkísérletek és azok értelmezése.

Az előző fejezetekben említett tények némelyike már régóta ismeretes. Ezek alapján már többször meg is kísérelték, hogy a chlorophyllnak természetes állapotára következtessenek. E feltevések röviden a következők (vonatkozó irodalmat l. HUBERT-nél, 21).

a) A chlorophyll lipidokban vagy illó olajokban van oldva és a gránulok ezen oldatoknak cseppjei lennének. A tények ezt a feltevést megcáfolják, amennyiben:

1. Az ilyen oldatokban az elnyelési és fluoreszkációs maximum helyzete a rövidebb hullámok területe felé tolódott el erősen. Igaz ugyan, hogy

ezt az ellenvetést megpróbálták bizonyos sajátságos és eddig még nem ismert olaj feltételezésével kiküszöbölni, ámde egy ilyen olaj eddigelé még nem ismeretes.

2. A chlorophylloldatok fluoreszkálása túlságosan intenzív.

3. Az ilyen oldatok rendkívül bomlékonyak, különösen fény és savak hatására.

4. Egyébként is a  $\text{CO}_2$ -asszimiláció reakciói vizes közegben játszódnak le.

b) A második feltevés szerint a chlorophyll kolloidálisan oldott. Ilyen kolloidális chlorophyll oldatokat valóban elő lehet állítani, ha pl. acetonos festékoldatot vízbe fecskendezünk és aztán az acetont elűzzük. Ez a feltevés a kolloidkémia felvirágzásakor rendkívül népszerűvé vált. Ellenvetéseink a következők:

1. Habár a fényelnyelésnek a főmaximuma egyes szerzők szerint elegendő finom diszperzitási fok mellett a természetes chlorophyllét megközelelti, mégis a színekép szerkezete egészen más, mint az élő chloroplastisnál.

2. A chlorophyll-solok nem fluoreszkálnak, és ha van is ilyen adat, az csakis téves meghatározás lehet, mégpedig bizonyára a zsíros tisztátalanságok jelenléte következtében.

3. A chlorophyll-solok fényérzékenyek és nem savállóak.

c) Egyes kutatók szerint a chlorophyll a chloroplastisban szilárd alakban, apró szemcsékben fordulna elő. De az ilyen feltevés esetében ugyanolyan nehézségek merülnek fel, mint amilyeneket a kolloidális feltevésnél látunk. Különbösen élettanilag sem fogadható ez el, mivel az ilyen szemcse belsőjében a chlorophyll főtömege mindig inaktív állapotban fordulna elő, sőt még a fény sem tudna hozzá behatolni (az első 75 molekula máris felére csökkentené le a fény erősségét, l. alább).

d) A chlorophyll egymolekulavastagságú rétegben van a chloroplastisban adszorbeálva. Ezt a hipotézist különösen az utóbbi években karolták fel, talán LANGMUIR és másoknak a monomolekuláris zsírsavfilmekkel végzett megigéző vizsgálatainak a hatása alatt.

Az ilyen chlorophyll-filmeknek a sajátságait nemrég a Leydeni iskola vizsgálta. HANSON a chlorophyllmolekula különféle sajátságai tekintetében igen érdekes eredményeket ért el.

HANSON, MEEUSE, MOMMAERTS és BAAS BECKING (1938, 17), valamint NICOLAI és WEURMAN (1938, 55) további vizsgálatai alapján a mesterségesen előállított chlorophyll molekularéteget szilárd chlorophyllnak kell tekintennünk, vagyis ezek szerint ez a természetes viszonyok magyarázatánál nem is jöhet számításba.

Az adszorbeált chlorophyllfilmek ugyanis nem fluoreszkálnak. Igaz ugyan, hogy annakidején NOACK (1927, 56) fluoreszkáló chlorophylladszorbatokról írt, de SEYBOLD (1940, 69) újabb vizsgálatai alapján ezt valószínűleg lipid szennyeződésnek kell betudnunk.

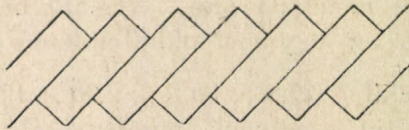
Közben HANSON, MEEUSE, MOMMAERTS és BAAS BECKING említett munkájukban még a következő, említésreméltó eredményekre jutottak.

Az egymolekula vastagságú chlorophyllhártyát egy kis térfogatú chlorophylloldatnak a víz felszínére való kifúásával állították elő. Ha most ezen a felszínrétegen keresztül egy egymolekula vastag Ba-stearát réteggel fedett üveglapot a vízbe merítünk, az üvegnek mind a két oldalát egy monomolekuláris chlorophyllréteg vonja be. Az üveglemezt óvatosan kiemelve, újabb monomolekuláris chlorophyllfilm rakódik le és így tovább. Ilyen eljárással multimolekuláris chlorophyllréteget lehet előállítani s annak a fényelnyelését mérni. 78 molekulavastagságú réteg a vörös fény 50 %-át elnyeli; ugyanilyen fényabszorpciót mutat egy 1 cm-es rétegvastagságú acetonos oldat is, ha 0.04 mg chlorophyll van egy  $\text{cm}^3$ -ében. Mivel a chlorophyll molekulásúlya 930, az ilyen oldat egy  $\text{cm}^3$ -ében  $\frac{4 \times 10^{-5}}{930} \times 6.03 \times 10^{23} = 25.8 \times 10^{15}$  chlorophyll molekula van. Amennyiben itten a molekulák egyenletes elosztódásúak, az egy  $\text{cm}^3$  oldalfelületére merőlegesen beeső fénysugár az egy  $\text{cm}^3$ -en belül  $\sqrt{(25.8 \times 10^{15})} = 2.96 \times 10^6$  olyan folyadék egységterületen hatol keresztül, amelynek mindegyikében egy-egy chlorophyllmolekula van. Ez a tér minden irányában statisztikailag a chlorophyllmolekulák között 338 Å-ös távolságot jelent és így, a fényirányára merőlegesen, minden molekularészére  $(338\text{Å})^2 = 1.42 \times 10^4 \text{Å}^2$  felszín áll rendelkezésére.

Végezzük el a következő eszmefuttatást: rendezzünk el chlorophyllmolekulákat egy monomolekuláris rétegben a küvetta elülső oldalánál úgy, hogy a molekulák egymás mellett helyezkedjenek el. Ha egy molekulának a felszíne  $x \text{Å}^2$ , akkor egy-egy molekulának a fentebb kiszámítottan rendelkezésére álló felszínében  $\frac{11.42 \times 10^4}{x}$  molekula van. Ha mostan egy második, majd egy harmadik és í. t. hasonló réteget állítunk fel, mindaddig, míg az oldatnak összes molekuláját el nem rendeztük, akkor végeredményben  $\frac{2.96 \times 10^6 \times x}{11.42 \times 10^4}$  ilyen rétegünk lesz, melyek a vörös fénynek ugyancsak 50 %-át nyelik el s így a kísérleti úton előállított multifilmekkel összehasonlíthatók. Közben megfontolandó, hogy HANSON szerint a chlorophyll hártában a molekulák tetőcserépszerűen fedik egymást, mivelhogy a röntgenografikusan mért chlorophyllmolekula-felszín nagyobb, mint amilyen felszín a vízterületén kiterjesztett chlorophyllhártyák méréséből adódik. Legyen ez a borítási-tényező (Überlagerungsfaktor)  $a$ -val egyenlő. Ha a fentebbi eszmefuttatásunkban a rétegek hasonlóképp — egymást borítva — lennének felépítve, akkor egy, a rétegeken keresztülhaladó fénysugár útjában  $\frac{2.96 \times 10^6 \times x}{11.42 \times 10^4 \times a}$  molekulát érintene, illetve a kísérletileg előállított multifilmekben 78 a molekulát. Mivel mind a két esetben az abszorpció 50 %-os, 78  $a = \frac{2.96 \times 10^6 \times x}{11.42 \times 10^4 \times a}$  vagy  $x = 29.7 a^2 \text{Å}^2$ . Röntgenspektográfiai adatok alapján  $x = 120 \text{Å}$ , tehát  $a = 2$ . Egy monomolekuláris chlorophyllrétegnek tehát vázlatosan olyan a szerkezete, mint aminőt az 1. ábrán láthatunk.

Multifilmekben több réteg van egymáson; az aethylchlorophyllid kristályokban is hasonló szerkezet van, úgyhogy ezek alapján a chlorophyll-filmeket szilárd chlorophyllnak kell tekintenünk.

Mikrofényméréssel meg lehetett állapítani, hogy egy chlorophyllgranum a vörös fénynek szintén kb. 50 %-át nyeli el. Az előbbieken már láttuk, hogy a granumnak is réteges szerkezete van és hogy a chlorophyll ebben van lokalizálva. De ottan a chlorophyllmolekulák valószínűleg laposan fekszenek, vagyis nem  $\pm 78$ , hanem  $\pm 150$  réteget kell felvennünk a fényelnyelés megmagyarázására. Mivel egy chlorophyllmolekula vastagsága a röntgenanalízis alapján 4 Å, ezek a rétegek összesen 600 Å-öt (0.06  $\mu$ ) tesznek ki, azaz a granumnak kb.  $\frac{1}{10}$ -ét. Tehát a granumok chlorophylltartalma nagyságrendileg 10 % kell legyen.



1. ábra: A chlorophyllmolekuláknak tetőeserépszerű fedelékes elrendeződése az egymolekulavastagságú chlorophyllhártyában.

e) A chlorophyllnak az élő chloroplastisban való állapotára vonatkozó utolsó feltevés szerint a chlorophyll egy fehérjével asszociálódik, illetve vegyileg kötődik.

Ez a felfogás az utóbbi években rendkívül kedvelté vált, mivel az oxydoreduktív enzyimeknél is hasonló viszonyok vannak. Különösen STOLL (1939, 1941, 72, 73) utal a haemoglobin, cytochrom, flavoprotein stb. analógiájára, habár ezt érvül mégsem lehet felhasználnunk, mivelhogy a photosynthesis analógia nélkül álló folyamat. Kétségtelen azonban, hogy a chlorophyllnak fehérjéhez kötött állapotáról való felfogás élettani szempontból rendkívül csábító.

WILLSTÄTTER és STOLL (1918, 77), valamint NOACK (1927, 56)-nak van egy fontos megfigyelése, ami quantitativ utánvizsgálás esetében (ilyen vizsgálataim folyamatban vannak), a chlorophyllnak a fehérjéhez kötött állapotát fogja igazolni és ami már most is fontos utalást nyújt. A levélben ugyanis a chlorophyll gyengén fluoreszkál. A levél erős felmelegítés után elveszti fluoreszkáló képességét, viszont további hevítésre igen intenzíven tér vissza a fluoreszkálása, de egyben az elnyelési maximum a rövidebb hullámok felé eltolódik, és a levélnek a színe is észrevehetően más. Hasonló kísérletek chloroplastis- és granumszuspenziókkal is végbevihetők. Igen lényeges dolog, hogy e jelenségnek hőmérsékleti hányadosa rendkívül magas, akárcsak a fehérje denaturálódásnál. Ezek alapján igen valószínű, hogy ha a fehérjét denaturáljuk, eltűnik a fluoreszkálás, miközben a chlorophyll

a fehérjefelületén adszorbeáltan helyezkedik el. További hevítésre a chlorophyll feloldódik a felszabadult lipidokban és így a fluoreszkálás erősbödöttén tér vissza, miközben az elnyelési sáv a megfelelő helyzetét veszi fel.

A következő fejezetben látjuk, hogy az elkülönített chloroplastis vegyi elemzése egy chlorophyll-fehérje vegyület feltételezését mennyiben igazolja.

#### 4. A chloroplastisok elkülönítése (izolálása).

Ha egy kis levéldarabkát (pl. *Nicotiana*-ból) vízcseppben túvel szét-darabolunk, mikroszkóposan láthatjuk, hogy egyes sejtek megsérülnek és chloroplastisuk a vízbe jut. Általában szét-daraboláskor egyben a granumos szerkezet is sokkal világosabb lesz s főleg sötétalapon igen hatásos. Sok chloroplastis teljesen tönkremegy s granumjaik a vízben szuszpendáltan találhatók meg.

Alapjábanvéve ugyanez történik, amikor nagyobb tömeg levelet mozsárban dörzsölünk el. A sötétzöld folyadék különféle sejtalkotókat, ú. m. sejt-faltöredéket, sejtmagvat, chloroplastist és annak töredékét, chlorophyll granumokat, keményítőszeret, mitochondriumot és kristályt tartalmaz. Ilyen levélkivonatokat vizsgáltak NOACK és LUBIMENKO, de tekintet nélkül a pontosabb alaktani viszonyokra. Frakcionált centrifugálással azonban e levélkivonatokból a chloroplastisok gyakorlatilag teljesen tiszta alakban különválaszthatók.

Tiszta chloroplastiskészítmény előállításakor egyik legelső feladat az alkalmas szuszpenziós-folyadék megválasztása. Ennél elsősorban az ozmotikus viszonyokra kell figyelemmel lenni. Ugyanis a kifejlett növényi sejtben a sejt-üreg, aránylag nagy tért foglalva el, egy meghatározott ozmotikus értékű oldatot (ú. n. sejt-nedvet) tartalmaz. A cytoplazmának a hidraturája a sejt-nedv ozmotikus értékével megegyezik s ehhez hasonlóan a chlorophyll hidraturája is a cytoplazmáéval, vagyis közvetve a sejt-nedvével áll egyensúlyban. Arra lehetne tehát gondolnunk, hogy szuszpendáló folyadékul talán egy, a sejt-nedvvel izotonikus, mondjuk, cukoroldatot válasszunk.

Annak eldöntésére, hogy a chloroplastisok víztartalmukat illetőleg valóban a közegük hidraturájával állanak egyensúlyban, a következő meghatározást végeztem. Ugyanazon *dohány*-levél-készítmény különválasztott chloroplastisait különböző töménységű, elektrolytmentes cukoroldatokban szuszpendálva, azok átmérőjét okulármikrométerrel megmértem. Az eredmény a következő:

$$(M = \frac{\sum l}{n}, m = \sqrt{\frac{\sum (l-M)^2}{n^2}}, l = \text{legnagyobb átmérő})$$

n = a megmért chloroplastisok száma = 50

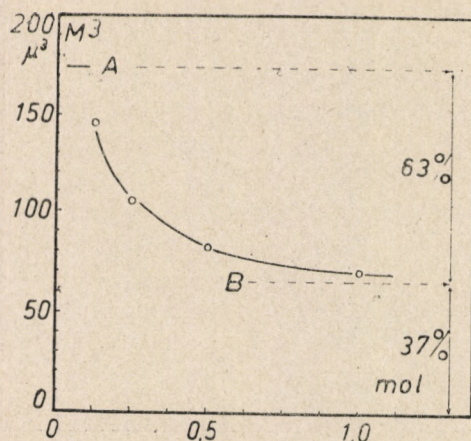
saccharose	M	m
$\frac{\text{mol}}{8}$	5.27 $\mu$	0.21 $\mu$
$\frac{\text{mol}}{4}$	4.74 $\mu$	0.11 $\mu$
$\frac{\text{mol}}{2}$	4.36 $\mu$	0.10 $\mu$
$\frac{\text{mol}}{1}$	4.15 $\mu$	0.08 $\mu$
a sejtben :	5.58 $\mu$	0.10 $\mu$

Méréseim tehát azt mutatják, hogy a chloroplastis átmérőjét valóban a közeg ozmotikus értéke határozza meg.

Erdekes kvantitatív eredményekhez jutunk a chloroplastisok térfogatainak az összehasonlításakor. A térfogat kifejezhető, mint  $K \cdot M^3$ , ahol K egy a chloroplastis alakjától függő tényező. Amikor mérésorozatoknak az eredményeit egymással hasonlítjuk össze, a K-t figyelmen kívül lehet hagyni az esetben, ha a vízfelvétel vagy leadás nem anizodiametrikusan megy végbe. Fentebb láttuk, hogy a chloroplastisok lemezes rendszerek (réteges testek) és ép ezért a priori gyanítható, hogy a duzzadási folyamatok anizodiametrikusan mennek végbe, mégpedig oly módon, hogy a lencseszerű chloroplastisnak a vastagsága változik meg a legerősebben. Ezt azonban, sajnos, közvetlenül nem lehet megmérni. Már a sejtben levő chloroplastisról sem tudhatjuk, hogy azt valóban pontosan oldalnézetben látjuk-e. Az izolált chloroplastisoknál pedig éppenséggel teljes lehetetlenség a pontos mérés, mivel ezek a keskenyoldalnézetükben csak alkalmilag láthatók az esetben, ha a chloroplastisok a BROWN-féle mozgás, vagy a konvekciós áramlások következtében a helyzetüket állandóan változtatják. Mindazonáltal számos mérésorozaton szerzett tapasztalataim alapján mégsem állíthatom, hogy a duzzadás nagymértékben anizotróp lenne. Hogy ez a réteges szerkezettel miként egyeztethető össze, azt előzőleg már láttuk. Ilyen megfontolás után tehát az  $M^3$ -értékek összehasonlítása első megközelítésre nézve helyes.

A közeg ozmotikus értékétől függő térfogatok összehasonlításának eredményeit a 2. ábra tünteti fel. Ebből kiolvasható, hogy a közeg ozmotikus értékének a végtelen felé való nagyobbodásával a chloroplastis térfogata egy kb.  $M^3 = 65 \mu^3 (\pm 7.5\%)$ -os határértékhez közeledik. Ezt a határértéket kell a micelláris-térfogatnak tekintenünk s ez megfelel a chloroplastis in vivo térfogata 37 %-ának. Ebből viszont arra következtetünk, hogy in vivo a chloroplastis térfogatának 60–65 %-át duzzadási víz teszi ki. A valóságos víztartalom még ennél is kissé nagyobb lesz, mert ezenfelül még szilárdan kötött

(részben intermicelláris) víz is van benne. Nagyságrendileg a teljes víztartalom kb. 75 %-ra becsülhető. Ez a szám természetesen csak előzetes eredménynek tekintendő; de mivel a chloroplastis víztartalmára vonatkozólag mindeddig semmiféle adatunk nincsen, nem egészen értéktelen adat.



2. ábra: Elkülönített [izolált] chloroplastisoknak a közeg ozmotikus értékétől függő térfogata.

A: Chloroplastis térfogat a sejtben.

B: Micelláris térfogat.

A-B: Szabad víz.

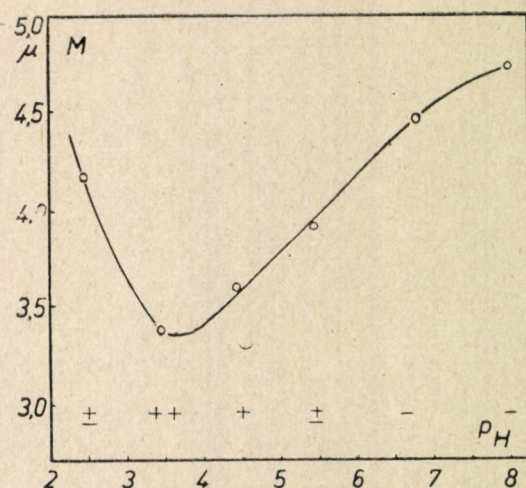
A mérések még egy másik olyan eredményhez is elvezettek, ami szintén az átmérőknek közvetlen mérése alapján magyarázható meg. Ebben a kísérletben a kinyomott sejtnedv ozmotikus értékét a BARGER-féle kapillaris módszerrel meghatározva az 0.20 mol saccharoseval volt egyenlő. Ugyanilyen töménységű, sőt sokkal hígabb oldatokban azonban a chloroplastis lényegesen kisebb, mint a sejtben! Mielőtt ennek az „összehúzódásnak“ az értelmezését megkísérelnők, előbb még egyéb, az izolált chloroplastis nagyságát meghatározó tényezőről lesz szó.

Mint fontos duzzadást szabályozó tényező először is a pH jön tekintetbe. Evégből egy paradicsomlevéllel végzett kísérletsorozatban a chloroplastisok nagyságát kb. pH mellett 4–6 óra elteltével megmértem. A kísérletnél a McILVAINE-féle foszfát-citrát puffert alkalmaztam háromszoros hígításban, de a SÖRENSEN-féle foszfát-puffer is (pH 4.6–8.3 között) hasonló eredményeket adott. A chloroplastis nagysága mellett a kicsapódásra is figyelemmel voltam, hogy az izoölektromos pont (I. E. P.) hozzávetőleges helyzetére vonatkozólag némi tájékozódást nyerjek (A 3. ábrában a kicsapódást: + illetve: – jelzi).

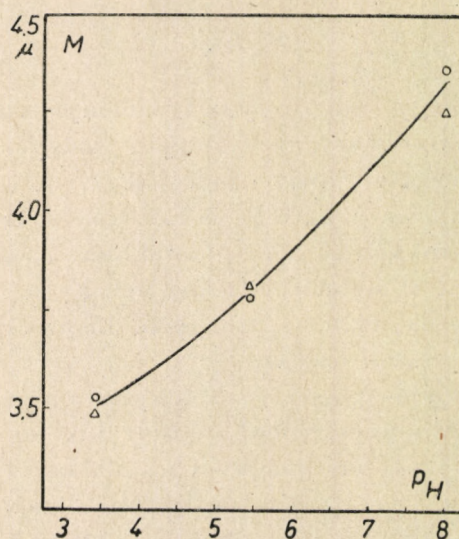
A 3. ábra szerint az I. E. P.-nál kifejezett duzzadási minimum van s ettől jobbra és balra fokozódó duzzadás. (Az erősen savanyú szuszpenziók a phaeophytinképződés következtében fokozatosan gyengén elbarnultak).



Miben nyilatkozik meg a pH és az ozmotikus érték egyesített befolyása? Ennek eldöntésére kettős pH-sorozatban mértem a paradicsom izolált chloroplastisainak az átmérőjét. Az egyik sorozat cukormentes, míg a másokban viszont a saccharose végkoncentrációja 0.33 mol volt. Az eredmé-



3. ábra: Elkülönített chloroplastisok mérése különben pH-értékek mellett, a kicsapódás +-szal jelölve.

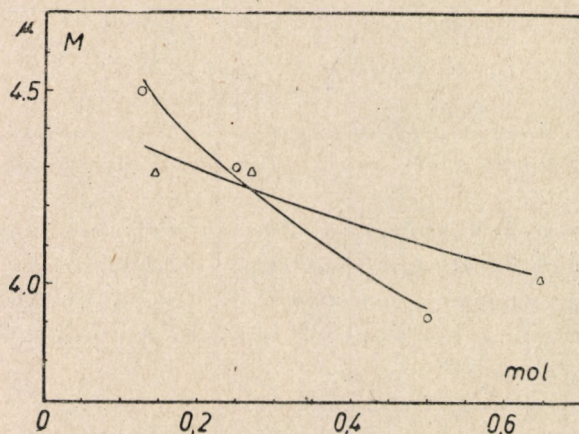


4. ábra: Elkülönített chloroplastisok mérése különböző pH-értékek mellett.  
○ Cukor nélkül.  
△ Cukorral.

nyeket feltüntető 4. ábráról leolvasható, hogy mindkét kísérleti sorozatomban, azonos pH mellett a chloroplastisméretük identikusak. (a pH 8-nál észlelt kis különbség statisztikailag nem igazolt.  $D = 0.9\text{mD}$ ). Ebből arra

lehet következtetnünk, hogy duzzadátszabályozó ionok jelenlétében a közeg ozmotikus értékének a befolyása háttérbe szorul. Ezt megerősíti a következő „experimentum crucis“ is, amelyben a különböző cukorkoncentrációk befolyását puffersó hozzáadásával és anélkül hasonlítottam össze:

Ha puffersó jelenlétében az ozmotikus értéknek még bármiféle befolyása van, úgy ezt mindenekelőtt az alkalikus közegben kellene észlelnünk, ahol a duzzadás erős mértékű. Evégett a méréseket egyrészt különböző koncentrációjú elektrolytmentes cukoroldatokban, másrészt cukrot tartalmazó pufferoldatokban (McILVAINE-féle puffer, 1 : 4 hígítás, pH 8.0) végeztem. Természetesen egyben a pufferoldatnak az ozmotikus nyomását is figyelembe kellett vennem, amely: pH 8.0-nál gyakorlatilag a  $\frac{\text{mol}}{20}$   $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  oldatával egyenlő. Az  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$ -nek v.t HOFF-féle faktora (l. LANDOLT-BORNSTEIN 29.) alapján a pufferoldatom egy 0.14 mol.-os cukoroldattal volt aequivalens.



5. ábra: Elszigetelt chloroplastisok mérése különböző ozmotikus értékek mellett.

○ Puffersó nélkül.

△ McILVAINE-féle pH 8.0-as pufferoldatban.

Az 5. ábrában feltüntetett eredmények igazolják a már előre sejtett nézetemet, vagyis hogy az elektrolyt hatás az ozmotikusét messze felülmulja. Sőt még a 0.64 és 0.14 mol.-os pufferolt rendszerekben történt chloroplastis mérések közötti különbségnek az átlagos hibája sem eléggé igazolt ( $D = 1.7 m_D$ ).

A chloroplastisnak legkisebb térfogata az I. E. P.-nál valamivel kisebb, mint ami a „cukorgörbe“ extrapolálása alapján adódik; ugyanis elektrolyt hozzáadásakor a szilárdan kötött víz mennyisége is csökken.

A fentebbi eredmények megvitatásánál nem hangsúlyoztuk mindig eléggé, hogy az elkülönített chloroplastisoknak a nagysága minden esetben kisebb, mint in situ. Ez a jelenség még egyszerűbben tanulmányozható, ha a leveleket minden puffersó, cukor és víz hozzáadása nélkül dörzsöljük szét

és a chloroplastisokat ilyen izotonikus sejtfoliadékban vizsgáljuk. Ilyen méréseket főleg *dohánylevél* készítményekben végeztem. Ekkor azonban még egy újabb, a viszonyokat bonyolódottabbá tevő lehetőségre is figyelemmel kell lennünk, ami az előbbi kísérleteknél nem volt fontos: arra t. i., hogy a palisszáda- és szivacsparenchymasejtek, illetve chloroplastisai kö-



6. ábra: Dohánylevél (*Nicotiana tabacum*) kiválasztott részleteinek megjelölése a chloroplastisok in situ méréséhez.

zött van-e különbség. Ezen kérdés tisztázása céljából méréssorozataimhoz a levél öt részletéből (6. ábra) készítettem kézi metszeteket és az ép palisszáda-, ill. szivacsparenchyma sejtekben 50–50 chloroplastist mértem meg ( $n = 50$ ). Eredményeimet következő táblázatba állítottam össze:

A) A különböző szövetek összehasonlítása

	palisszáda-parenchyma		szivacsparenchyma		különbség	
	M	m	M	m	D	$m_D$
I.	5.8 $\mu$	0.13 $\mu$	5.8 $\mu$	0.09 $\mu$	0.0	0.16
II.	5.7 $\mu$	0.14 $\mu$	5.8 $\mu$	0.09 $\mu$	0.1	0.17
III.	5.9 $\mu$	0.07 $\mu$	6.0 $\mu$	0.07 $\mu$	0.1	0.03
IV. ( $n = 30$ )	5.9 $\mu$	0.17 $\mu$	6.0 $\mu$	0.16 $\mu$	0.1	0.23
V.	6.0 $\mu$	0.09 $\mu$	5.9 $\mu$	0.11 $\mu$	0.1	0.14
Összesen:	5.9 $\mu$	0.05 $\mu$	5.9 $\mu$	0.04 $\mu$	0.0	0.06

B) A *Nicotiana* különböző részeinek összehasonlítása.

I.	5.8 $\mu$	0.08 $\mu$	Legnagyobb különbség IV—I.: D = 0.2 $\mu$ , $m_D$ = 0.13 $\mu$ D = 1.5 $m_D$
II.	5.8 $\mu$	0.09 $\mu$	
III.	5.9 $\mu$	0.04 $\mu$	
IV. ( $n = 30$ )	6.0 $\mu$	0.11 $\mu$	
V.	5.9 $\mu$	0.07 $\mu$	

A táblázat adataiból kitűnik, hogy sem a palisszáda- és szivacsparenchyma, sem a levél különböző részei között a chloroplastisok nagyságát illetőleg nincsen különbség. Természetesen ezt mégsem szabad általánosítanunk, mert még a *dohány* is más fejlődési állapotában, vagy más körülmények között másként viselkedhetik.

Az eredeti helyén, in situ és a „saját sejtnedvében“ kipréselt chloroplastis nagyságok összehasonlításának az eredménye a következő:

levélben  $M = 5.9 \mu$ ,  $m = 0.03 \mu$

kipréselten  $M = 5.0 \mu$ ,  $m = 0.09 \mu$

különbség  $D = 0.9 \mu$ ,  $m_D = 0.10 \mu$ ,  $D = 9m_D$ .

Ezek szerint tehát a sejtszerkezet-megsérülésekor a chloroplastisok — statisztikailag kétségtelenül igazolhatóan — megkisebbednek és ezt többszörösen sikerült is megállapítanom és megerősítenem.

Látjuk, hogy a chloroplastis a sejtből való elkülönítésekor átmérőjében csökken s ez eddigi tapasztalataink szerint kvantitatíve a közeg természetétől függ, de a duzzadást fokozó mediumoknál is mindig fellép. Igaz ugyan, hogy erősen duzzasztó közegben [mint pl. KCNS-oldatban vagy erősen lúgos közegben] természetes nagyságot megközelítő chloroplastis átmérőt észlelhetünk, még sincsen arra nézve biztosítékunk, hogy az itten beálló zsugorodást egy rendellenes duzzadás csak „tünetileg gyógyítaná“. A zsugorodással párhuzamosan izoláláskor, sőt már a selejtszerkezet megsérülésekor is a chloroplastis szemcsézettsége eldurvul és a photoszintetizáló képessége elvész (l. alább részletesen). Nem lehetetlen, hogy mind a három folyamat egymással szoros összefüggésben van, pl. mind a hármat a finomabb szerkezet szétroncsolódása is előidézheti.

A zsugorodás végleges magyarázatát ugyan további vizsgálatok nélkül nem lehet megadnunk, de azért két lehetőségre máris gondolhatunk. Az egyik az, hogy a chloroplastis a sejtsejt sérülés „ingerére“ zsugorodással reagál (a chloroplastisok mozgására vonatkozó irodalmat l. KÜSTER-nél, 1935, 28). A másik lehetőség szerint a megsérült sejtben a chloroplastistól azelőtt térbelileg távolabb elhelyezkedett alkotórészek, mint pl. nehézfémek, a vakuolum nedvének alacsony pH-ja, a chloroplastis egyes vagy összes szerkezeti elemének a denaturálódását okozzák, miáltal duzzadási képessége lecsökken. Ez utóbbi lehetőség, melynek kísérleti igazolása előkészületben van, egyben az asszimilációs-képesség elvesztését is megmagyarázná.

A zsugorodás ismertetésével kapcsolatosan még a következőre is figyelemmel kell lenniünk. Az érintetlen sejtben alkalmas physiológiai feltételek mellett egyes chloroplastisok az osztódáshoz előkészülve, megnyúlnak. Ez a gyakorisági görbében részaránytalanságot eredményez, mivelhogy mindig a nagyobbik átmérőt határoztuk meg. A plastismegnyúlás kezdeti állapotai zsugorodáskor valószínűleg visszafejlődnek. Két kísérletben a PEARSON-féle képlet alapján  $S = \frac{M-D}{\sigma}$   $S =$  ferdeségi együttható,  $M =$  számtani középér-

ték,  $D =$  sűrűségi középérték,  $\sigma =$  közepes eltérés] a következő ferdeséget kaptuk:

chloroplastisok in situ	chloroplastisok kivonatban
$S = + 0.23$	$S = + 0.03$
$S = + 0.25$	$S = 0.00$

A tények tehát a fentebbi gondolatmenetükkel összhangban vannak, bár a végső következtetések levonása előtt még további igazolásra és kidolgozásra van szükség.

A zsugorodás jelenségének megmagyarázásától teljesen függetlenül mégis arra következtethetünk, hogy meghatározott közegben levő chloroplastisok átmérőjének az élő sejtben levő chloroplastisok átmérőjével való összehasonlítása az izoláláskor alkalmazandó közeg alkalmasságát nem döntheti el. Ennek a megítéléséhez ma még hiányzik a kritérium.

A chloroplastisok elkülönítésére eddig kidolgozott eljárások ismertetésére áttérve, ezeket a chloroplastisoknak vegyi elemzésekhez való tisztán-előállítására szempontjából vesszük szemügyre. Ezeknél elvileg feltételezzük, hogy a szükségtelen vegyszerek hozzáadása mellőzve van.

NEISH (1939, 54) a *Trifolium* leveleket vízzel dörzsöli szét és a chloroplastisanyagot  $\text{CaCl}_2$ -dal csapja ki. Ez az eljárás okvetlenül mellőzendő, mivel a chloroplastis anyaggal együtt az oldott plasmatis és vakuoláris fehérjék is kicsapódnak és így sohasem kaphatunk egységes anyagot. A chloroplastisok elválasztásánál frakcionált centrifugálásra vagyunk utalva.

MENKE (1939, 38) folyadék hozzáadása nélkül dörzsöli szét a leveleket. A chloroplastist a szétnyomkodott nedvből centrifugálással választja le, majd pedig a további tisztító centrifugáláskor  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -ben szuszpendálja. Saját kísérleteim szerint ez az eljárás előnyös, mivel a szuszpendáló folyadék pH-ja igen közel esik az I. E. P.-hoz úgy, hogy egyrészt a további centrifugálás megkönnyített, másrészt a csaknem töltés-nélküli chloroplastisoknak csekély a vonzódása az egyéb részecskékhez. Igaz ugyan, hogy a  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  pH-jánál az oldott kivonat-fehérjék is kicsapódnak, de ép ezért foszfátot csak akkor alkalmazzuk, amikor a chloroplastisok már leváltak. Legfeljebb még arra lehetne gondolnunk, hogy az első átmosást közömbös pufferoldattal végezzük el. A  $\text{KH}_2\text{PO}_4$ -nek a kisajtott nedvhez való hozzáadása azonban okvetlenül elkerülendő, mert ekkor erős fehérjekicsapódás lép fel.

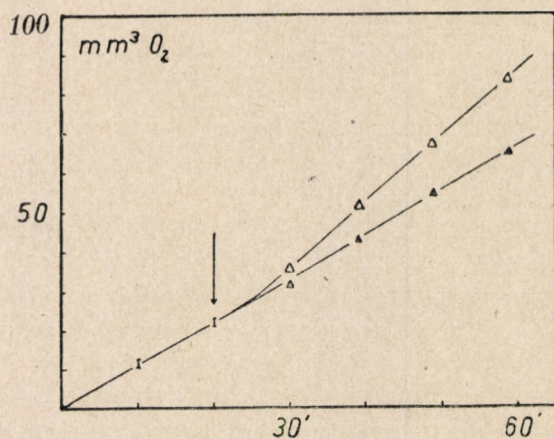
Említettük már, hogy szétdörzsöléskor a vakuolum alkotói a chloroplastist megtámadják. Arra lehetne gondolni, hogy e hatás csökkentődik, ha a szétdörzsölés előtt a kivonattérfogatát valamilyen folyadék hozzáadásával erősen megnöveljük. Erre a célra a desztillált víz nem jöhet tekintetbe, mivel benne a chloroplastisok sajátságos rendellenes duzzadást szenvednek: a matrix buborékká felhólyagosodik és a granumok ennek a falában helyezkednek el. Habár a chloroplastisnak az érzékenysége nem minden növénynél egyforma, a desztillált víznek az alkalmazása általánosság-

ban mégsem ajánlható. GRANICK cukoroldatot használ, de — szerintem — megfelel a gyengén lúgos pufferoldat is (savanyúban, t. i. az oldott fehérjék kicsapódnak!). Eddigi tapasztalataim szerint azonban ezen „kivonathígítási módszernek” semmi lényegesebb előnye nincsen, úgy, hogy jelenleg a MENKE-féle eljárás teljesen kielégítőnek mondható. Cukros pufferoldat alkalmazásának nincsen semmi értelme, mivel — miként már láttuk — puffersó jelenlétében a cukornak már nincsen további hatása.

Az előzőkben csak a chloroplastisoknak tisztán való különválasztására voltunk tekintettel, de bizonyos, hogy MENKE eljárásakor a fehérjék is denaturálódnak, ugyanis SMITH a chloroplastisok gyenge megsavanyításakor az oldékonyságban erős megváltozást észlelt. De egyébként is gyanítható, hogy gyenge denaturálódás még óvatosabb módszereknél is bekövetkezik; ugyanis SMITH, de saját vizsgálataim alapján is a levélben meghagyott és az elkülönített chloroplastis elnyelési színeképei között mindig észrevehető egy kis különbség.

Az elkülönítéskor bekövetkező szerkezetszéttroncsolódás fontos következménye, hogy az asszimilációs képesség megszűnik. Ez a következtetés a következő anyagcsereméréseken alapul:

Izolált chloroplastisoknak gázanyagcseréjét manometrikusan mérve az adódik, hogy ezeknek sötétben olyan lélekezésük van, amely cukorhozzá-



7. ábra: Chloroplastis-szuszenzió oxigén felvétele.  
 + Sötétben.  
 Δ 20 perc mulva, megvilágítás kb. 8000 luxszal.

adására kissé fokozódik. Viszont megvilágításkor nincsen oxygen-képződés, sőt ellenkezőleg: az oxygen-elhasználás fokozódott, ami photooxydálódásra enged következtetni (7. ábra). A régebbi irodalomban gyakran olvasható (pl. ENGELMANN), hogy a szétdörzsölt levelek megvilágításkor oxygént szabadítanak fel, ami az ENGELMANN-féle baktériummódszerrel, vagy a BEYERINCK-féle világítóbaktériumos módszerrel ki is mutatható. Ezen jelenség quan-

titatív mérését HILL (1937, 20) és sajátmagam (még nem közölt adataim in mscr. 1941-ből) izomhaemoglobinon végeztük el. A közönséges haemoglobinhoz hasonlóan  $O_2$  megkötéskor ennek elnyelési színe is megváltozik, még pedig sokkal érzékenyebben. HILL a chloroplastis  $O_2$  termelését izomhaemoglobinoldatban spektrumkomparátorral mérté. Magam az oxy-izomhaemoglobin elnyelési maximumának megfelelő 5820 Å-ös fényelnyelés növekedését hasonló rendszerben mértem. Csekély oxigénképződést valóban lehetett észlelni, de ez nem photosynthetikus, hanem már oxydoredukációs-jelenség, aminek az ismeretése tárgyunkhoz nem tartozik szorosan.

## 5. Az elkülönített chloroplastis vegyi összetétele.

### a) Fehérjék.

Chloroplastisokban a fehérjék jelenlétét (részben kétes értékű) mikrokémiai módszerekkel már régen kimutatták. Az utóbbi években igen részletesen foglalkoztak az izolált chloroplastisok vegyi összetételének elemzésével, de az eredmények véglegesnek még mindig nem tekinthetők.

MENKE (1938, 38) szerint az elkülönített chloroplastis szárazsúlyának 37.7%-át fehérje alkotja. Az összfehérjéknek kb. 80%-a a szokásos fehérjeoldószerekben oldhatatlan, de gyengén lúgos 50%-os alkoholban oldódik. A másik frakció lúgos pufferoldatban oldódik s valószínűleg nukleoproteid. Előzetes aminosavelemzések eddig semmiféle lényeges eredményt nem adtak.

### b) Lipoïdok.

A chloroplastisnál — szerkezet szempontjából — a lipoïdoknak valószínűleg nagy jelentőségük van. Hogy a chloroplastisban lipoïd előfordul, már WEBER és MENKE azon megfigyeléséből is kitűnik, hogy a chloroplastisokból a jellemző myelinalakok előállíthatók és ami valószínűleg phytosterolból áll. (FREY—WYSSLING (1937, 1938, 11, 12). Vegyi elemzéssel (MENKE 1942, 44) zsírsavak, glyceridák, phosphatidák, sterolok, szénhidrátok és viaszszerű anyagok jelenlétét lehetett kimutatni. Mennyiségileg legfontosabb alkotója neutrális zsír; viszont lecithin csak igen csekély mennyiségben fordul elő benne.

### c) Egyéb alkotórészek.

A chloroplastisban különféle cukrok vannak, részben mint a proteidok alkotórészei, részben a photosynthesis részletfolyamataival kapcsolatban. Keményítő változó mennyiségben fordul elő.

A szervetlen alkotók közül megemlítendő a kálium (jelentőségteljes a photosynthesisben), a foszfor (teljesen vagy részben kötött állapotban, mint nukleoproteid) és végül a vas (részben szerves kötődésben), amiről még szó esik.

d) *Festékek, chlorophyll : fehérje-arány.*

Az asszimilációs festékek kémiájáról már volt szó s arról is, hogy ezek a festékek a chloroplastisok granumjaiban vannak lokalizálva.

Azzal a kérdéssel kapcsolatosan, hogy egy stöchiometrikus chlorophyll-fehérje vegyület létezik-e, fontos a chlorophyll és fehérje tömegviszonyának az ismerete.

A priori az a látszat, mintha ez a kérdés az elkülönített chloroplastisgranumban lenne legjobban tanulmányozható, mivelhogy ez azonos a tiszta asszimilációsszerkezettel, a matrix egyéb alkotórészeinek minden belekeveredése nélkül. Ilyen megfontolás alapján kezdtem el 1937-ben a granumkészítmények vizsgálatát. (MOMMAERTS 1938, 50.)

A granumok előállítása, miként a chloroplastisoké is, levélkivonatnak, vagy pedig présnedvnek az elkészítésével kezdődik. Miután a durvább alkotók és a chloroplastisok centrifugálással leváltak, további centrifugálásakor a granum kezd leülepedni. Ismételt frakcionált centrifugálásokkal a készítmény tisztítható. Az ilyen módon előállított granumkészítményekben eleinte nagy szabályossággal kaptam a  $\frac{5.5}{100}$  chlorophyll-protein arányt (rövidítése:  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Prot.}}$ ; l. c. 1938).

A kísérletek folytatásakor azonban kiderült (G. BOT 1940, 4), hogy ez az eredmény nem helyes, mégpedig két zavaró körülmény közrejátszása miatt:

először is a fehérjemeghatározás nem volt célszerű. A fehérjemeghatározáshoz a granumokat lipoidoldószerekkel kimerítően extraháltam és a maradékot szárítás után mint „proteint” gravimetrikusan határoztam meg. Azonban ez a maradék egyéb, ismeretlen anyagokat is tartalmazott, úgyhogy a valóságos fehérjetartalom ennél is kisebb.

Másodszor e granumkészítmények tisztátalanok voltak. MENKE (1940, 42) ugyanis az ilyen készítményekben kisebb chlorophylltartalmat talált, mint az izolált, teljes chloroplastisokban, holott ép az ellenkezőjét várhattuk volna. Nyilvánvalóan az elkülönített granumokhoz a tisztátalanságok erősen adszorbeálódtak. Igaz ugyan, hogy a későbbi készítményeim tisztábbak voltak ( $\frac{\text{Chl.}}{\text{Prot.}} = \frac{16}{100}$ , nem közölt adat), de szabályszerűséget itten sem találtam.

Habár elvileg egyáltalán nem lehetetlen elegendő mértékben tiszta granumkészítményt előállítani, mindmáig mégis hiányzik az ezúton elérhető és teljesen megbízható tényvalóság.

Egyelőre csak MENKÉ-nek (1940, 42) chloroplastis elemzési adatai a megbízhatók. Ezek szerint az egész chloroplastisnál a  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Prot.}}$  arány:  $\frac{17.2}{100}$ . SMITH (1941, 71) levélkivonatból kiindulva, meghatározott alaktanilag egységes frakciók leválasztása nélkül állítja elő a chlorophyllproteidot; ezt  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Prot.}} = \frac{16.1}{100}$ -ig sikerült tisztítani, ami az én legjobb eredményeimmel teljesen meg



is egyezik. (A stöchiometrikus viszonyok kérdéséről a legutolsó fejezetben lesz szó.)

Eközben némileg eltérő eredményhez jutott STOLL (1939, 1941, 72, 73). Amíg a MENKE, SMITH és saját zöldkészítményeim vízben teljesen oldhatatlanok, addig STOLL a fehérjekémia szokásos módszereivel tisztítva egy vízben oldódó zöld proteidkészítményt állított elő. Magában véve nem nagyon valószínű, hogy egy komplex, amely oly sok lipoidot tartalmaz, vízbenoldhatóvá váljék. Mivel STOLL „oldataiban” detergálás után is még mindig  $5 \cdot 10^6$  részecskesúlyú egységeket talál és egy helyen készítményeinek ultramikroszkóposan megállapítható inhomogenitását is felemlíti, arra gondolhatunk, hogy itten mégis csak szuszpenzióról van szó, ha ugyan a diszpergált részecskék apróbbak is, mint az előző vizsgálatoknál voltak. A STOLL-féle munkamenet és az egyéb eljárások között mindenesetre az a különbség, hogy STOLL az elkülönítést fémkizárással és pontosan meghatározott savanyúsági határok között végzi, mert különben gyenge denaturálódás lépne fel.

A STOLL-féle készítménynek a vegyi összetétele is eltérő. Egyrészt az alacsony festék- és lipoidtartalomtól más proteidek hozzákeveredésére kell következtetnünk, másrészt hiányzik a vas és a histidin. Általánosságban az a benyomásunk, hogy ezek a készítmények előállításuk következtében rendkívül tisztátalanok, és hogy, talán magából a chloroplastis stromából is, le választódtak bizonyos anyagok.

## 6. Az eredmények megvitatása.

A 3. fejezet végén valószínűnek látszott, hogy a chlorophyll a chloroplastisban egy fehérjéhez kapcsolódik. Bizonyos biokatalizátoroknál, mint pl. peroxydasé, katalase, cytochrom, flavoproteid, továbbá a haemoglobin és myoglobinnál a (több esetben a chlorophyllal rokon!) festékmolekula szintén egy fehérjéhez van kapcsolva. Néha mindenegyben ilyen fehérje egységhez ( $\pm 17.000$  molekulasúly) egy-egy prosthetikus csoport tartozik.

Első méréseim alapján arra következtettem, hogy a chlorophyllnál is hasonló viszonyok vannak (a  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Prot.}}$  aránya pontosan a várakozásnak megfelelő volt). Azonban — miként már mondtam — a  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Prot.}}$  arány a valóságban sokkal magasabb, az egész chloroplastisra nézve:  $\frac{17.2}{100}$ . Ez az arányszám azonban a stöchiometrikus viszonyok tekintetében még semmi közvetlen következtetésre nem használható fel. Ismeretes azonban, hogy a chloroplastis-fehérjének 20 %-a nukleoproteid s ez valószínűleg nem a granumban, hanem a matrixban fordul elő. Ha az ezenkívül fennmaradó fehérjét tekintjük a chlorophyll hordozójaként, akkor az arány  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Prot.}} : \frac{100}{80} \times \frac{17.2}{100} = \frac{21.5}{100}$  lesz. Ez az arány pontosan az, ami várható az esetben, ha egy fehérje egységhez négy chlorophyllmolekula tartozik. Mindazonáltal ezt a számítást nem is

annyira végső következtetésnek, mint sokkal inkább csak munkafeltevésnek szabad tekintenünk.

Mit mondhatunk még a photosynthetizáló szerkezet felépítéséről?

HUBERT és FREY-WISLING a chloroplastis felépítésének molekulaalak-tani elképzelését egy vázlatban adták meg. A rajzukon fehérjelemezeket vesznek fel és a tetrapyrrolmagvak ezeknek a határain vannak laposan adszorbeálódva. A chlorophyll phytollánca a fehérjelamellától elfordítottan rendeződik el, és carotinnal meg lecithinnel asszociálódott. Ez a vázlat azonban, kétségtelenül nagy heurisztikus értéke ellenére is, mégsem fogadható el, mivel az ennél oly fontos lecithinek a valóságban említésre méltó mennyiségben nem fordulnak elő. Továbbá az egész csak munkafeltevésül szolgál és ép ezért sok is benne a fantázia. Ép ezért teljesen helytelen, hogy ezt a vázlatot a tankönyvek mindjobban átveszik (pl. HUBER). A chlorophyllnak a fehérjéhez való kapcsolata (a stöchiometrikus viszonyokat figyelmen kívül hagyva ma már csaknem bizonyos valóság; de minden, ami ezen felül van, teljesen bizonytalan.

Végezetül álljon még itten egy kis számítás, ami ugyan mindenekelőtt csak munkahipotézisként használható, mégis alkalmas arra, hogy a chloroplastis finomszerkezete és a photosynthesis mechnizmusa közötti összefüggéssel kapcsolatosan némi távlatokat megmutasson.

EMERSON és ARNOLD (1933, 10) szerint a photosynthetikus rendszerben kb. 2500 chlorophyllmolekulából álló egységek vannak. GAFFRON és WOHL (1936, 13) más úton ugyannerre az eredményre jutottak, habár számításuk alapján a molekula szám az algáknál csak 1000, sőt a magasabbrendű növényeknél gyakran alig pár száz. Ezen egységek természetére vonatkozó pontosabb elképzelésünk ma még hiányzik.

STOLL az *Aspidistra* chlorophyll-fehérje készítményénél cholátos detergálás után  $5 \times 10^9$  részecskesúlyt kapott. A készítményben 8 % a festék és 6 % a chlorophyll, tehát egy  $5 \times 10^9$  részecskesúlyú egységre — nyilván mint a photosynthetikus rendszer egy szerkezeti egységére — a kb. 950-es chlorophyll molekulaszám mellett  $\frac{1}{100} \times 5 \cdot 10^9 \times \frac{1}{950} = 350$  molekula chlorophyll esik. Nagyságrendileg ez egyben azonos a chlorophyll-egység molekulaszámával. Most vegyük még számításba a vas-tartalmat is. Korábbi elemzéseim (1938, 37) szerint a photosynthetikus rendszerben kötött Fe van és pedig 20 chlorophyll-molekulára 1 atom Fe esik. Újabban NOACK és LIEBICH (1941, 57) pontosabb eredményt közöltek és szerint a tiszta chloroplastisban 0.05 % Fe található. Mivel a chloroplastis chlorophylltartalma 7.7% (MENKE), a chlorophyll : vas arány  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Fe}} = \text{kb. } 9$ , ennek a vasnak 60%-a kötött, és így az eredmények analíziseimmel jól megegyeznek. NOACK szerint a kötött vas  $\frac{1}{6}$ -a „fermentvas“ (cytochrom stb.) s ha ezt haeminvasnak (Haem. Fe) nevezük, akkor a  $\frac{\text{Chl.}}{\text{Haem. Fe}} = \text{kb. } 90$ . Ezek szerint tehát a fentebb említett chloro-

phyllegységben pontosan négy haeminvas-atom van, ami a photosynthesis négy redukciós fokozatával és a négykvantum-mechanizmussal kiválóan összeegyeztethető!

A mondottak alapján tehát azt a feltevést állíthatjuk fel, hogy az asszimilációs egység egy olyan szerkezeti egység: *amely egynehány száz (illetve ezer) chlorophyllmolekulából és négy oxydoredukáló ferment-csoportból áll és egy molekula CO<sub>2</sub>-ot képes redukálni.*

A chloroplastisok szerkezetére vonatkozó vizsgálataimat a *leydeni* Egyetemi Növénytani Intézetben Professzor BAAS BECKING vezetése alatt 1937-ben kezdtem el és megszakításokkal 1940-ig folytattam. A további kutatásokat 1941—42-ben a *szege*di Egyetem Orvosi Vegytani Intézetében, 1942-től kezdve pedig a *tihanyi* Magyar Biológiai Kutatóintézetben végeztem. Ószinte köszönetet mondok Dr. GYÖRFFY ISTVÁN egyetemi tanár úrnak, a Kolozsvári Egyetem Általános Növénytani Intézete igazgatójának, hogy kéziratomban bemutatásakor figyelmemet több irodalmi adatra felhívta, azokat magánkönyvtárából rendelkezésemre bocsátotta és hogy ezt a dolgot doktori értekezésésként elfogadta.

A magyar kézirat elkészítéséért hálás köszönetet mondok GYÖRFFY BARNA (Tihany) barátomnak, akinek munkája sokkal több volt, mint egyszerű fordítás.

(Aus dem Ungarischen Biologischen Forschungsinstitut.)

## DIE STRUKTUR DER CHLOROPLASTEN.

Von. W. F. H. M. MOMMAERTS (Leyden — Tihany).

### *Zusammenfassung.*

Verfasser gibt eine Übersicht der Literatur betreffs der Chloroplastenfeinstruktur, mit besonderer Berücksichtigung eigener, noch unveröffentlichten Arbeiten. Letztere beziehen sich auf Beobachtungen an isolierten Chloroplasten.

Es wird gezeigt daß bei der Isolierung der Chloroplasten eine Änderung eintritt, die Verlust des Vermögens zur photosynthetischen Kohlen-säureassimilation zufolge hat. Bei Beleuchtung isolierter Chloroplasten wird in den ersten Minuten eine geringe Sauerstoffmenge gebildet, nach dieser Periode aber ergibt sich unter Einfluß des Lichtes nur eine Erhöhung des Sauerstoffverbrauches.

An isolierten Chloroplasten ausgeführte Messungen ergaben, daß bei der Isolierung eine Volumenkontraktion stattfindet, die, wie der Verlust des assimilatorischen Vermögens, als Andeutung einer Strukturänderung aufzu-

fassen ist. Die Größe der isolierten Chloroplasten wird von den chemischen Eigenschaften des Isolationsmediums erheblich beeinflusst. Beim I. E. P. der Chloroplasten tritt ein ausgesprochenes Quellungsminimum auf. In Abwesenheit von Elektrolyten hängt die Chloroplastengröße vom osmotischen Wert des Mediums ab; ist aber die Ionenstärke genügend hoch (meistens wurde mit mol/15 Phosphatpuffer gearbeitet) so können keine statistisch gesicherte Einflüsse von Änderungen des osmotischen Wertes beobachtet werden. Die Quellungsänderungen können nur in Aufsicht auf den ellipsoidischen Chloroplasten gemessen werden; Abschätzung der Änderungen des Querdurchmessers gab nicht den Eindruck, daß die Quellung in erheblichen Maße anisotrop ist. Mit dem allgemein angenommenen Schichtenbau der Chloroplasten ist dies keineswegs in Widerspruch, weil die Schichten selbst in der Richtung ihrer größten Ausdehnung quellbar sein können, besonders wenn sie, wie MENKE annimmt, aus kurzen, senkrecht zu den Lamellen orientierten Eiweißstäbchen aufgebaut sind.

In der historischen Übersicht wird darauf hingewiesen, daß schon 1880, also vor SCHIMPER, in einer ungarischen Arbeit von SCHAARSCHMIDT die Granastruktur der Chloroplasten und die Farblosigkeit der Matrix bei der Teilung beschrieben wurde.

In den zusammenfassenden Betrachtungen wird der Standpunkt vertreten, daß detaillierte Vorstellungen über die Feinstruktur der Chloroplasten noch verfrüht sind. Sogar manche experimentelle Tatsachen sind ungenügend gesichert. Nur soviel scheint sicher zu sein, daß in den Chloroplasten eine Schichtenstruktur vorherrscht (wobei das Verhältnis der Grana zu diesem Schichtenbau noch unklar ist), und daß das Chlorophyll sich in einem eiweißgebundenen Zustand befindet. Welche stöchiometrische Verhältnisse dabei vorliegen, ist noch unbekannt. Eine vom Verfasser früher geäußerte Meinung, nach welcher ein Chlorophyllmolekül mit einer SVEDBERG'schen Proteineinheit verbunden ist, hat sich als unrichtig herausgestellt.

#### FIGURENERKLÄRUNG.

Fig. 1: Schema der Molekülpackung in einem Chlorophyllfilm.

Fig. 2: Volum isolierter Chloroplasten in Abhängigkeit des osmotischen Wertes.

A: Chloroplastenvolum in der Zelle.

B: Mizellarvolum.

A—B: Freies Wasser.

Fig. 3: Abmessungen isolierter Chloroplasten bei verschiedenem pH; mit + ist Flockung angedeutet.

Fig. 4: Abmessungen isolierter Chloroplasten bei verschiedenem pH.

○ Ohne Zucker.

△ Mit Zucker.

Fig. 5: Abmessungen isolierter Chloroplasten bei verschiedenen osmotischen Werten

○ Ohne Puffersalze.

△ In McILVAINE Pufferlösung, pH 8,0.

Fig. 6: Auswahl der Blatteile (*Nicotiana tabacum*) zur Chloroplastenmessung in situ.

Fig. 7: Sauerstoffaufnahme einer Chloroplastensuspension.

Im Dunkeln.

△ Nach 20 Minuten mit etwa 8000 Lux beleuchtet.

#### IRODALOM — LITERATUR

(Proc. = Proceedings of the „Koninklijke Nederlandsche Academie van Wetenschappen,“ Amsterdam.)

1. L. G. M. BAAS BECKING & E. A. HANSON. Proc. **40** 752 (1957).
2. — & H. KONING. Proc. **37** 674 (1954).
3. G. BERTHOLD. Studien über Protoplasma-mechanik. 1886.
4. G. BOT. Diss. Leiden 1959 (Délafrikai).
5. J. DOUTRELIGNE (Soeur Christiane) Proc. **38** 886 (1957).
6. F. ELFVING. Acta Soc. Sc. Fenn. **54** nr. 2 (1915).
7. — Ibid., Nova Ser. B **1**, nr. 1 (1951).
8. — Ber. bot. Ges. **52** 208 (1954).
9. — Rev. Bryol. Lichenol. **8** 220 (1955).
10. E. A. EMERSON & A. ARNOLD. J. gen. Physiol. **16** 191 (1955).
11. A. FREY-WYSSLING. Protopl. **29** 279 (1957).
12. — Submikroskopische Morphologie des Protoplasmas und seiner Derivate. 1958.
15. H. GAFFRON & K. WOHL. Naturwiss. **24** 81, 104 (1936).
14. L. GEITLER. Planta **26** 465 (1957).
15. S. GRANICK. Am. J. Bot. **25** 558 (1958).
16. E. A. HANSON. Rec. Trav. Bot. Néerl. **36** 1 (1959).
17. —, A. D. J. MEEUSE, W. F. H. M. MOMMAERTS & L. G. M. BAAS BECKING. Chron. Bot. **4** 104 (1958).
18. E. HEITZ. Ber. bot. Ges. **54** 562 (1956).
19. — Planta **26** 154 (1956).
20. R. HILL. Nature **159** 881 (1957).
21. B. HUBERT. Rec. Trav. Bot. Néerl. **32** 525 (1955).
22. O. L. INMAN. Symp. Quant. Biol. **3** 184 (1955).
25. L. W. JANSSEN. Protopl. **33** 410 (1959).
24. E. KATZ & E. C. WASSINK. Enzymol. **7** 97 (1959).
25. G. A. KAUSCHE & H. RUSKA. Naturwiss. **28** 505 (1940).
26. J. A. A. KETELAAR & E. A. HANSON. Nature **140** 196 (1957).
27. L. KNUDSON. Am. J. Bot. **23** 694 (1936).
28. E. KÜSTER. Die Pflanzenzelle. 1955.
29. LANDOLT — BORNSTEIN. Physikalisch-chemische Tabellen.
30. TH. LIPPMAN. Sitzungsber. Naturf. Ges. Tartu (Dorpat) **30** 59 (1924).
31. — Schriften Naturf. Ges. Tartu nr. 24 (1925).
32. — Acta Inst. et Horti Bot. Tartuensis **1** nr 1—3 (1926).
35. — C. R. Acad. Sc. **182** 867 (1926).
34. — C. R. Acad. Sc. **182** 1040 (1926).
36. — Ber. bot. Ges. **44** 645 (1927).
37. — Acta Inst. et Horti Bot. Tartuensis **1** nr. 4 (1927).
38. W. MENKE. Z. physiol. Chem. **257** 45 (1958).
39. — Koll. Z. **85** 256 (1958).
40. — Naturwiss. **27** 29 (1959).
41. — Naturwiss. **28** 158 (1940).

42. — Z. physiol. Chem. **263** 100 (1940).
43. — Protopl. **35** 115 (1941).
44. — & E. JACOBS. Z. physiol. Chem. **272** 227 (1942).
45. — & H. J. KÜSTER. Protopl. **30** 283 (1938).
46. P. METZNER. Ber. bot. Ges. **55** 16 (1937).
47. ARTH. MEYER. Das Chlorophyllkorn. 1883.
48. C. MIKOSCH. Österr. bot. Z. 1887.
49. H. v. MOHL. cit. Heitz (15).
50. W. F. H. M. MOMMAERTS. Proc. **41** 896 (1938).
51. — Proc. **43** 1044 (1940).
52. — (előkészületben).
53. C. NÄGELI & S. SCHWENDERER. Das Mikroskop. 1877.
54. A. CH. NEISH. Biochem. J. **33** 295 (1939).
55. M. F. E. NICOLAI & C. WEURMAN. Proc. **41** 914 (1938).
56. K. NOACK. Biochem. Z. **183** 135 (1927).
57. — & H. LIEBICH. Naturwiss. **29** 302 (1941).
58. W. NODDACK & H. J. EICHHOF. Z. physik. Chem. A **185** 241 (1939).
59. N. PRINGSHEIM. Jb. wiss. Bot. **12** 1 (1881).
60. E. A. ROBERTS. Bull. Torrey Bot. Club. **67** 535 (1940).
61. J. SACHS. cit. Heitz (15).
62. I. SCHAARSCHMIDT. Magyar Növénytani Lapok **4** 33 (1880).
63. A. F. W. SCHIMPER. Jb. wiss. Bot. **16** 1 (1885).
64. W. J. SCHMIDT. Die Doppelbrechung von Karyoplasma, Protoplasma und Metaplasma. 1937.
65. W. SENN. Die Gestalt- und Lageveränderungen der Pflanzenchromatophoren. 1906.
66. F. SCHMITZ. Jb. wiss. Bot. **15** (1884).
67. A. SEYBOLD & K. EGLE. Planta **26** 491 (1937).
68. — Sitzungsber. Akad. Heidelberg. **1939** 1.
69. — Bot. Arch. **41**. 578 (1940).
70. — & A. WEISSWELER. Bot. Arch. **43** 252 (1942).
71. E. L. SMITH. J. gen. Physiol. **24** 565 (1941).
72. A. STOLL & E. WIEDEMANN. X<sup>o</sup> Congr. Intern. Chim. **5** 206 (1939).
73. —, — & A. RÜEGGER. Verh. Schweiz. Naturf. Ges. **1941** 115.
74. J. G. WAKKIE. Diss. Leiden 1935. (Hollandul.)
75. E. WEIER. Am. J. Bot. **23** 645 (1936).
76. F. WENZINGER. Diss. Genève 1940.
77. R. WILLSTÄTTER & A. STOLL. Untersuchungen über die Assimilation der Kohlensäure 1918.
78. C. WOLPERS. Naturwiss. **29** 416 (1941).