

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
М. И. БЫСТРОВА, И. Н. МАЛЬГОШЕВА

ИЗУЧЕНИЕ МОЛЕКУЛЯРНОЙ ОРГАНИЗАЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА И ЕГО АНАЛОГОВ В ТВЕРДЫХ ПЛЕНКАХ; ИНФРАКРАСНЫЕ СПЕКТРЫ ПОГЛОЩЕНИЯ

Бактериохлорофилл в твердых пленках и коллоидных растворах образует формы, поглощающие в ближней инфракрасной области спектра (800, 850—870, 890—910 мμ) и соответствующие поглощению пигмента в клетках фотосинтезирующих бактерий (¹⁻³). Спектры люминесценции бактериохлорофилла в твердых пленках и клетках бактерий также сходны (⁴). В нашей лаборатории было установлено (⁵), что в образовании агрегированных форм бактериовиридина (720—750 мμ) принимают участие главным образом координационные связи кетогрупп молекул пигмента с центральным атомом магния, в согласии с результатами изучения агрегации хлорофилла в неполярных растворителях (^{6, 7}). И.-к. спектры бактериохлорофилла ранее изучались лишь в растворах (^{8, 9}).

С целью получения данных о молекулярной организации агрегированных форм мы исследовали структуру и.-к. спектров поглощения твердых пленок бактериохлорофилла и его безмагниевого аналога в области колебаний двойных связей молекул (1800—1600 см⁻¹) в сравнении с и.-к. спектрами твердых пленок хлорофилла а и феофитина а.

Бактериохлорофилл выделяли из культуры *Rhodospseudomonas spheroides* обычными методами с конечной хроматографической очисткой на сахарозе. Безмагниевого производные получали обработкой эфирных растворов пигментов 0,2N HCl с последующим промыванием водой и хроматографическим разделением на сахарозе. Твердые пленки для измерения и.-к. спектров получали на пластинках из NaCl испарением эфирных растворов пигментов ($\sim 10^{-3}$ M) с последующим высушиванием в вакуумном эксикаторе над пятиокисью фосфора в течение нескольких часов. Использовали серный эфир, освобожденный от перекисей и свежеперегнаный над металлическим натрием. И.-к. спектры измеряли на приборе UR-10, видимые спектры — в сфере Ульбрихта модифицированного спектрофотометра СФ-10.

Бактериохлорофилл при испарении эфира образует пленку с основными максимумами поглощения около 800 и 860 мμ (рис. 1, 1). И.-к. спектр таких пленок (рис. 2, 1) обнаруживает три основных максимума: ~ 1735 , ~ 1660 , ~ 1612 см⁻¹. Максимум ~ 1660 доминирует в спектре,

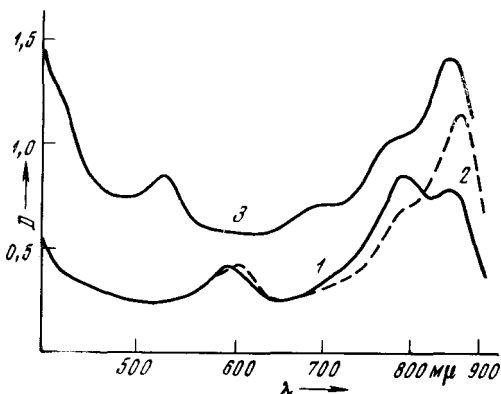


Рис. 1. Спектры поглощения твердых пленок пигментов. 1 — бактериохлорофилл; 2 — та же пленка после обработки парами насыщенного водой серного эфира в течение 20 мин. при 20°; 3 — бактериофеофитин

ему сопутствует плечо около 1640 см^{-1} , также наблюдается малоинтенсивный компонент около $1700\text{ м}\mu$.

Максимум $1735\text{--}1740\text{ см}^{-1}$ в пленке по сравнению с раствором в серном эфире (рис. 2, 2) несколько смещен в низкочастотную сторону. Этот максимум согласно данным для растворов хлорофилла и его аналогов (⁶⁻⁹), принадлежит колебаниям сложноэфирных группировок в составе пропionoвокислого остатка и карбометоксиальной группы у 7-го и 10-го атомов С.

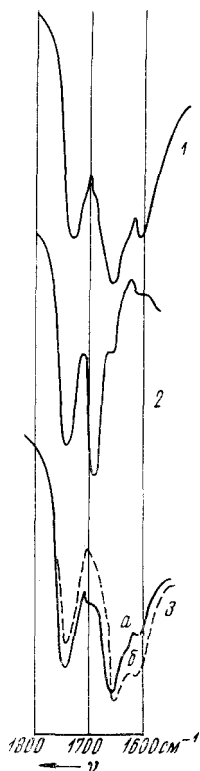


Рис. 2

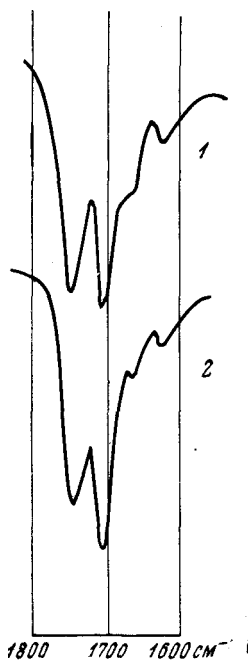


Рис. 3

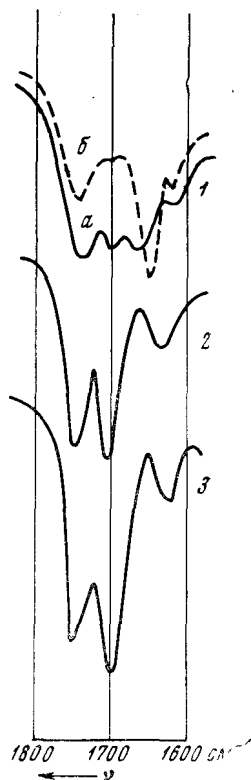


Рис. 4

Рис. 2. И.-к. спектры поглощения бактериохлорофилла. 1 — твердая пленка; 2 — раствор в серном эфире, $0,5 \cdot 10^{-2}\text{ M}$; 3 — твердая пленка; исходная (а) и после обработки парами насыщенного водой серного эфира в течение 20 мин. при 20° (б)

Рис. 3. И.-к. спектры поглощения бактериофеофитина. 1 — раствор в серном эфире, $0,3 \cdot 10^{-2}\text{ M}$; 2 — твердая пленка

Рис. 4. И.-к. спектры поглощения пигментов. 1 — твердая пленка хлорофилла а: исходная (а) и после обработки парами метанола при 20° в течение 45 мин. (б); 2 — раствор феофитина а в серном эфире, $0,3 \cdot 10^{-2}\text{ M}$; 3 — твердая пленка феофитина а

Максимум $\sim 1700\text{ см}^{-1}$ характерен для вибрации свободных кетогрупп у 9-го атома С (⁶⁻⁹). Этот максимум доминирует в спектре эфирного раствора (рис. 2, 2) и едва заметен у пленок бактериохлорофилла. Это свидетельствует о том, что в твердых пленках подавляющая часть кетогрупп молекул оказывается связанной.

Максимум 1660 см^{-1} может быть результатом взаимодействия кетогрупп с магнием у образующихся в твердых пленках высокоагрегированных форм бактериохлорофилла. Подобный максимум ранее наблюдался у безводных пленок и препаратов кристаллического хлорофилла а (^{7, 10-12}), а также у высококонцентрированных растворов пигмента в сухих алифа-

тических растворителях (⁷, ¹³). У твердых пленок бактериохлорофилла максимум $\sim 1660\text{ см}^{-1}$, по-видимому, охватывает также поглощение свободных ацетильных групп у 2-го атома С. Из работы (⁹) известно, что в алифатических углеводородах ацетильные группы бактериохлорофилла практически не принимают участия в агрегации. В пленках при образовании высокоагрегированных форм часть ацетильных групп, по-видимому, может участвовать в межмолекулярном взаимодействии, образуя координационные связи с атомом магния. В эфирном растворе (рис. 2, 2) максимум $\sim 1665\text{ см}^{-1}$ проявляется только за счет вибраций свободных ацетильных групп (⁸, ⁹), поэтому значительно менее интенсивен, чем в пленках.

Максимум $\sim 1640\text{ см}^{-1}$ может принадлежать кетогруппам, связанным с магнием через посредство молекул воды ($\text{кетоС}=\text{О}\dots\text{НО}(\text{Н})\dots\text{Mg}$). Связанная вода всегда есть в получаемых обычными способами препаратах пигментов (¹⁴, ¹⁵), и нельзя исключить ее возможное участие в агрегации бактериохлорофилла в твердых пленках. Известно (⁹, ¹⁵), что при обработке водой растворов хлорофилла а в алифатических углеводородах происходит образование высокоагрегированных, кристаллических структур со стехиометрией взаимодействия пигмент — вода 1:1, при этом в и.-к. спектре появляется максимум $\sim 1640\text{ см}^{-1}$. У твердых пленок бактериохлорофилла максимум $\sim 1640\text{ см}^{-1}$ обнаруживается без введения воды извне в структуру агрегированных форм. Следует указать на то, что растворы бактериохлорофилла в CCl_4 (⁸, ⁹) и сухих углеводородах с небольшой концентрацией пигмента (⁹) также обнаруживают максимум около 1640 см^{-1} , который приписан колебанию связей $\text{кетоС}=\text{О}\dots\text{Mg}$ у агрегатов низкого порядка (тримеры, гексамеры (¹³)). Такая интерпретация максимума $\sim 1640\text{ см}^{-1}$ в твердых пленках менее вероятна, так как в пленках мы имеем дело с образованием высокоагрегированных структур.

Максимум $\sim 1612\text{ см}^{-1}$ в пленках по сравнению с эфирным раствором несколько смещен в низкочастотную сторону, сильно увеличен по интенсивности, почти равен максимуму сложноэфирных группировок. Возможно, что этот максимум определяется не только колебаниями связей $\text{С}=\text{С}$ и $\text{С}=\text{N}$ молекулярного скелета (⁶⁻⁹), но и вибрацией ацетильных групп I пиррольного кольца, координационно связанных с магнием.

Выдерживание пленок в парах насыщенного водой серного эфира при комнатной температуре в течение 20—30 мин. приводит к увеличению степени межмолекулярного взаимодействия, что проявляется в уменьшении максимума $\sim 800\text{ м}\mu$ в спектре поглощения и одновременном возрастании длинноволнового максимума, который смещается до $\sim 875\text{ м}\mu$ (рис. 1, 2). В и.-к. спектре область свободных кетогрупп ($\sim 1700\text{ см}^{-1}$) при этом уменьшается, все «агрегационные» максимумы увеличиваются по интенсивности, и основной максимум ($\sim 1660\text{ см}^{-1}$) обнаруживает сдвиг в низкочастотную область (до $\sim 1650\text{ см}^{-1}$) (рис. 2, 3). Это приводит к предположению, что при образовании высокоагрегированных, квазикристаллических, структур бактериохлорофилла могут принимать участие все отмеченные типы межмолекулярных связей.

Бактериофеофитин так же, как и бактериохлорофилл, образует пленку с длинноволновым максимумом поглощения около $865\text{ м}\mu$ (рис. 1, 3). Однако в и.-к. спектре пленок максимум свободных кетогрупп ($\sim 1705\text{ см}^{-1}$) доминирует, и весь спектр близок по структуре к спектру растворов бактериофеофитина в полярных растворителях (рис. 3, 1, 2). Это свидетельствует о том, что у безмагниевого аналога бактериохлорофилла кетогруппы, а также, по-видимому, и другие карбонильные группировки молекул не принимают участия в межмолекулярном взаимодействии и в создании форм с длинноволновым поглощением. Возможно, образование длинноволновых агрегированных форм бактериофеофитина обусловлено сильным $\pi-\pi$ -взаимодействием хромофорных систем, развивающимся в результате близкого контакта между молекулами.

Хлорофилл а при испарении эфира образует пленку с основным максимумом поглощения около 675 мμ. И.-к. спектр таких пленок, в согласии с данными (¹⁰⁻¹²), обнаруживает максимумы около 1735, 1695, 1660, 1610 см⁻¹ (рис. 4, 1). «Агрегационный» максимум ~1660 см⁻¹, обязанный взаимодействию кетогрупп с магнием, соизмерим с максимумом свободных кетогрупп (~1700 см⁻¹).

Обработка пленок парами метанола (в течение 30—45 мин. при 20°) приводит к появлению в спектре поглощения отчетливого максимума при ~740 мμ (²). В и.-к. спектре (рис. 4, 1) при этом максимум свободных кетогрупп почти полностью исчезает, и появляется новый отчетливый максимум около 1645 см⁻¹. Этот максимум может принадлежать кетогруппам, связанным водородными связями с метиловым спиртом, координационно взаимодействующим также с центральным атомом магния другой молекулы пигмента по схеме: кето-С = О ...НО(СН₃) Mg.

Данная интерпретация основана на работах (^{9, 11, 12, 15}), в которых при обработке водой твердых пленок или растворов хлорофилла в углеводородах наблюдалось образование в и.-к. спектре максимума около 1640 см⁻¹, приписанного взаимодействию кетогрупп с водой, координационно связанной с атомом магния. В наших опытах метанол, как и вода, играл роль «посредника» между компонентами молекулярных соединений.

Феофитин а образует твердую пленку с главным максимумом поглощения около 700 мμ. Однако в и.-к. спектре, как и у бактериофеофитина, не обнаруживается «агрегационных» максимумов; доминирует максимум свободных кетогрупп (около 1700 см⁻¹), и весь спектр практически идентичен спектру эфирного раствора пигмента (рис. 4, 2, 3). Максимумы ~1745 и ~1625 см⁻¹ принадлежат соответственно карбонильным группам в составе сложноэфирных связей и связям С=С и С=N молекулярного скелета (⁶⁻⁸).

Отсутствие указанных координационных связей у агрегатов феофитина приводит к выводу об участии в агрегации иного типа межмолекулярного взаимодействия, развивающегося за счет сближения облаков π-электронов при непосредственном контакте хромофорных частей молекул.

Таким образом, исследование структуры и.-к. спектров поглощения твердых пленок бактериохлорофилла и хлорофилла позволило показать участие в межмолекулярном взаимодействии кетогрупп, вероятно связанных с центральным атомом магния за счет координационных связей или через посредство молекул воды или спирта. У бактериофеофитина и феофитина а в твердых пленках не наблюдается образования связей этого типа, и следует предположить, что при агрегации безмагниевого пигмента происходит непосредственное взаимодействие между облаками π-электронов сопряженных по кругу систем двойных связей молекул.

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

Поступило
10 II 1972

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, 389 (1952). ² А. А. Красновский, М. И. Быстрова, ДАН, 174, 480 (1967).
- ³ М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, 1, 362 (1967).
- ⁴ А. А. Красновский, Ю. Е. Ерохин, Хун-Юй-Цюнь, ДАН, 143, 456 (1962).
- ⁵ А. А. Красновский, М. И. Быстрова, И. Н. Мальгошева, ДАН, 189, 885 (1969).
- ⁶ J. J. Katz, G. L. Closs et al., J. Am. Chem. Soc., 85, 3801 (1963).
- ⁷ A. F. H. Anderson, M. Calvin, Arch. Biochem. and Biophys., 107, 251 (1964).
- ⁸ A. S. Holt, E. E. Jacobs, Plant Physiol., 30, 553 (1955). ⁹ K. Ballschmiter, J. J. Katz, J. Am. Chem. Soc., 91, 2661 (1969).
- ¹⁰ А. В. Карякин, В. М. Кутюрин, А. К. Чибисов, ДАН, 140, 1321 (1961). ¹¹ В. Е. Холмогоров, А. Н. Сидоров, А. Н. Теренин, ДАН, 147, 954 (1962).
- ¹² K. Ballschmiter, J. J. Katz, Nature, 200, 1231 (1968).
- ¹³ K. Ballschmiter, K. Truesdell, J. J. Katz, Biochim. et biophys. acta, 184, 604 (1969).
- ¹⁴ В. М. Кутюрин, В. П. Князев, ДАН, 149, 456 (1963).
- ¹⁵ K. Ballschmiter, T. M. Cotton et al., Biochim. et biophys. acta, 180, 347 (1969).