

Член-корреспондент АН СССР А. А. КРАСНОВСКИЙ,
Е. М. ПУШКИНА, Н. Н. ДРОЗДОВА

СПЕКТРАЛЬНЫЕ ЭФФЕКТЫ АГРЕГАЦИИ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА b

Бактерии *Rhodospseudomonas viridis* могут использовать инфракрасное излучение с длиной волны более 1 мкм и с этим связан особый интерес к изучению пигментного аппарата этого вида бактерий. Клетки бактерий *Rhodospseudomonas viridis*, содержащие пигмент бактериохлорофилл b, отличаются тем, что в них присутствует длинноволновая форма этого пигмента с максимумом поглощения при 1020 нм; этой области соответствует максимум спектра действия фотосинтеза (1). Максимум поглощения бактериохлорофилла b в растворе лежит при $\lambda=795$ нм, и таким образом этот пигмент является наиболее длинноволновым среди бактериальных хлорофиллов.

На рис. 1 сопоставлены спектры поглощения и флуоресценции раствора бактериохлорофилла b в серном эфире и суспензии хроматофоров бактерий *Rh. viridis*, иллюстрирующие длинноволновый сдвиг в спектре хроматофоров. Особенностью этой бактериальной культуры является то, что реакционный центр содержит более коротковолновую форму пигмента с $\lambda=985$ нм (в водной суспензии хроматофоров) или с $\lambda=960$ нм (в сухих пленках хроматофоров) по сравнению с поглощением главной массы пигмента ($\lambda=1020$ нм), а также пигмент с полосой поглощения при $\lambda=690$ нм, являющийся окисленным бактериохлорофиллом b (2, 3).

В нашей лаборатории было обнаружено, что бактериохлорофилл a образует агрегированные длинноволновые формы в твердых пленках, поглощающие в ближней и.-к. области спектра ($\lambda=800, 850-870, 890-910$ нм), которые соответствуют поглощению пигмента *in vivo* (4, 5).

Целью данной работы было исследование способности бактериохлорофилла b к образованию длинноволновых агрегированных форм.

Для выделения бактериохлорофилла b, которое проводили по описанной ранее методике (6), использовали штамм *Rh. viridis*. Бактериофеофитин b получали обработкой эфирных растворов пигмента 5% раствором HCl с последующим промыванием водой и хроматографией на сахарозе. Из-за крайней фотоллабильности пигментов все процедуры по их выделению проводили в темноте. Твердые пленки бактериохлорофилла b получали испарением в вакууме эфирных растворов пигмента в трубках Тунберга и на стеклянных пластинках. Образцы для измерения и.-к. спектров поглощения готовили на пластинках из NaCl. В работе использовали свежеперегнанный серный эфир, не содержащий перекисей; твердые пленки пигментов обрабатывали парами метанола, воды и формальдегида. Освещение растворов производили красным светом кинолампы (750 вт) через конденсор и светофильтр, пропускающий свет с длиной волны более 700 нм. Интенсивность света в большинстве опытов составляла 10^5 эрг/см²·сек. И.-к. спектры измеряли на приборе UR-10, видимые спектры — на спектрофотометрах СФ-14 (модифицированном), SP 700 и Hitachi. Измерения спектров флуоресценции были любезно проведены А. А. Красновским м.л. и Н. Н. Лебедевым на кафедре биофизики МГУ.

При испарении в вакууме растворов бактериохлорофилла b в серном эфире образуется твердая пленка пигмента, обладающая поглощением в

области 830–890 нм (рис. 2). В спектре поглощения присутствует также максимум при $\lambda=690$ нм, принадлежащий агрегированной форме хлорофиллоподобного продукта, присутствующего в незначительном количестве в исходном растворе. Существование, что этот продукт окисления препятствует агрегации бактериохлорофилла *b*, так как образование наиболее длинноволновой полосы поглощения наблюдается только в образцах, приготовленных из свежих растворов пигмента.

Известно влияние низкомолекулярных соединений на тип молекулярной организации агрегированных пигментных структур (^{7, 8}). Пары воды, метанола и ацетальдегида (в присутствии серного эфира) — вызывают длинноволновый сдвиг агрегированных форм бактериохлорофилла *a* от 860 нм до 910–920 нм. В наших опытах обработку твердых пленок бактериохлорофилла *b* парами различных веществ проводили без доступа воздуха в темноте. В отличие от бактериохлорофилла *a*, пары воды и водного раствора формальдегида (40%) не способствуют длинноволновой агрегации бактериохлорофилла *b*, и вызывают некоторое падение максимума поглощения $\lambda=890$ нм; обработка пленок парами метанола приводит к снижению интенсивности длинноволновой полосы поглощения.

Эффект длинноволнового смещения поглощения агрегированных структур бактериохлорофилла *b* удалось наблюдать только под действием паров водного раствора аммиака (25%) на твердые пленки пигмента, которые при этом обнаруживали появление в спектре поглощения формы с $\lambda=910$ нм (рис. 2). Понижение температуры до -196° приводит к значительному возрастанию интенсивности этого длинноволнового максимума, в меньшей степени сказываясь на интенсивности коротковолновых полос поглощения. Можно предполагать, что в полученных твердых пленках бактериохлорофилла *b* присутствуют и более длинноволновые формы пигмента, которые не удалось наблюдать при данной технике измерения. Действительно, измерения низкотемпературных спектров люминесценции показали, что твердые пленки с главным максимумом поглощения $\lambda=910$ нм обнаруживают длинноволновый максимум флуоресценции при

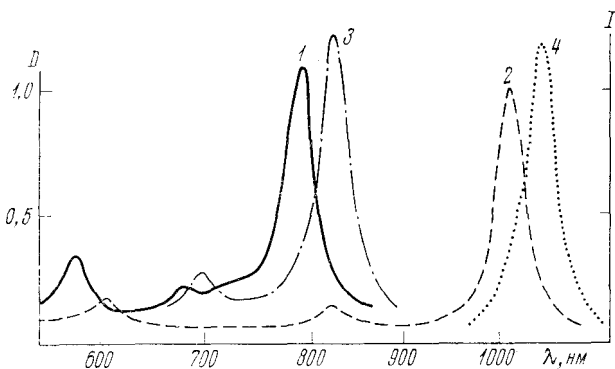


Рис. 1. Спектры поглощения (20°) раствора бактериохлорофилла *b* в серном эфире (1), суспензии хроматофоров *Rh. viridis* в фосфатном буфере pH 7,0 (2) и спектры флуоресценции (-196°), раствора бактериохлорофилла *b* в серном эфире (3), и суспензии хроматофоров в фосфатном буфере pH 7,0 (4)

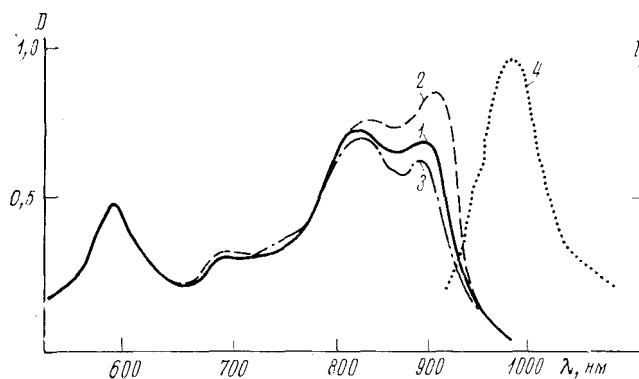


Рис. 2. Спектры поглощения (1, 2, 3) и флуоресценции (4) твердых пленок бактериохлорофилла *b* (-196°). 1 — исходная, 2 — после обработки парами водного раствора аммиака (25%), 3 — после обработки парами метанола, 4 — флуоресценция пленки 2

$\lambda=970-975$ нм, что связано, очевидно, с миграцией энергии возбуждения с более коротковолновых на длинноволновую форму пигмента, максимум поглощения которой не удастся измерить в явной форме.

Чрезвычайная лабильность и склонность к фотоокислению мономерных форм бактериохлорофилла *b* описана нами ранее (6). Агрегированные формы пигмента также обнаруживают способность необратимо окисляться на воздухе. При хранении твердых пленок без

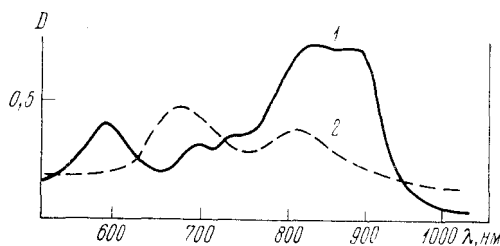


Рис. 3

Рис. 3. Фотохимическое окисление твердой пленки бактериохлорофилла *b* кислородом воздуха при 20°. 1 — исходная пленка, 2 — после освещения (45 мин.)

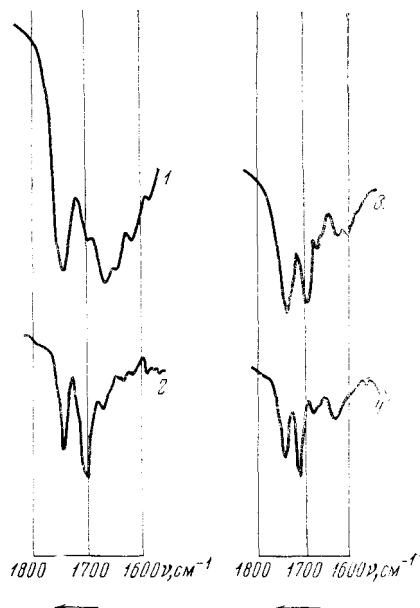


Рис. 4

Рис. 4. Инфракрасные спектры поглощения: твердой пленки бактериохлорофилла *b* (1), раствора бактериохлорофилла *b* в серном эфире, 10^{-2} *M* (2), твердой пленки бактериофеофитина *b* (3), растворе бактериофеофитина *b* в серном эфире, $\sim 10^{-2}$ *M* (4)

доступа кислорода в темноте длинноволновые формы с $\lambda=830-890$ нм сохраняются в спектре поглощения без изменения. Освещение твердых пленок в вакууме также не вызывало спектральных изменений. Фотоокисление агрегированных форм бактериохлорофилла *b* наблюдали лишь при длительном освещении образцов (до 45 мин.) на воздухе при 20° (рис. 3). При этом первые минуты освещения вызвали исчезновение длинноволновой формы с $\lambda=890$ нм, а последующее действие света приводило к падению поглощения в области $\lambda=830$ нм. Одновременно с уменьшением длинноволнового поглощения увеличивалась интенсивность полосы поглощения агрегированной формы хлорофиллоподобного продукта ($\lambda=690$ нм). Фотоокисление бактериохлорофилла *b* в органических растворителях на воздухе происходило за 25–30 сек. освещения с образованием этого же продукта необратимого окисления наряду с продуктами обратимого окисления. Таким образом, агрегированные формы бактериохлорофилла *b* в твердых пленках, как и других бактериальных хлорофиллов проявляют значительную устойчивость к фотоокислению на воздухе, в то время как скорость фотоокисления мономерных форм исследуемого пигмента значительно превышает скорость фотоокисления бактериохлорофилла *a* (6).

Бактериохлорофилл *b* в хроматофорах чрезвычайно устойчив к действию света. Так, освещение суспензии хроматофоров *Rh. viridis* в фосфатном буфере, рН 7,0, интенсивным «белым» конденсированным светом лампы накаливания (до 60 мин.) приводило лишь к незначительным спектральным изменениям. В то же время, обратимые окислительно-восстановительные светоиндуцированные изменения бактериохлорофилла *b* в составе хроматофоров описаны в литературе (3) и обусловлены превращениями пигмента реакционного центра.

При сравнении скоростей необратимого фотоокисления кислородом

воздуха бактериохлорофилла *b* в различных состояниях — в растворах, в пленках и в хроматофорах — получаются следующие величины. Изменение оптической плотности в 1 мин.: 2,25 для бактериохлорофилла *b* в спирте ($\lambda=795$ нм), $1,2 \cdot 10^{-2}$ для пленки бактериохлорофилла *b* ($\lambda=910$ нм), $5 \cdot 10^{-4}$ для хроматофоров в фосфатном буфере ($\lambda=1020$ нм).

С целью выяснения молекулярной организации агрегированных форм мы исследовали структуру и.к. спектров поглощения твердых пленок бактериохлорофилла *b* и его безмагниевого производного в области $\nu=1800-1600$ см^{-1} в сравнении с и.к. спектрами твердых пленок бактериохлорофилла *a* и его феофитина, которые изучались в нашей лаборатории (⁵). Твердая пленка бактериохлорофилла *b* с максимумами поглощения в области $\lambda=830-890$ нм обнаруживает четыре полосы в области колебаний двойных связей: $\nu \sim 1745$; 1665, плечо при $\nu=1650$ и ~ 1615 см^{-1} (рис. 4), что близко к положению максимумов в твердой пленке бактериохлорофилла *a* (⁶). На основании интерпретации данных по и.к. спектрам хлорофилла *a* (⁹) можно предположить, что максимум $\nu=1745$ см^{-1} проявляется за счет вибраций сложнэфирных группировок в составе пропiono-кислого остатка и карбометоксильной группы у 7 и 10 атомов углерода, а доминирующий в спектре пленок бактериохлорофилла *b* максимум $\nu=1665$ см^{-1} характерен для агрегированных форм, являясь результатом координационного взаимодействия карбонильного кислорода кетогруппы у 9 атома углерода циклопентанового кольца с центральным атомом Mg (¹⁰). Максимум $\nu=1665$ см^{-1} может принадлежать кетогруппам, связанным с Mg через посредство молекул воды, так как связанная вода всегда присутствует в препаратах пигментов. Полоса при $\nu=1615$ см^{-1} принадлежит колебаниям связей C=C и C=N молекулярного скелета. В и.к. спектре раствора бактериохлорофилла *b* доминирует максимум $\nu=1700$ см^{-1} , характерный для вибрации свободных кетогрупп у 9 атома углерода. Этот максимум в пленке пигмента практически незаметен, свидетельствуя о том, что в твердых пленках кетогруппы, принадлежащие 9 атому углерода, оказываются связанными. В то же время, «агрегационный» максимум $\nu=1665$ см^{-1} незначителен в растворах бактериохлорофилла *b*. Бактериофеофитин *b* образует пленку с длинноволновым максимумом поглощения около 830–840 нм. И.к. спектры твердой пленки бактериофеофитина *b* обнаруживают основной максимум свободной кетогруппы циклопентанового кольца ($\nu \sim 1700$ см^{-1}), а общий вид спектра близок по структуре к спектру бактериофеофитина *b* в полярных растворителях (рис. 4). Совокупность данных по и.к. спектроскопии бактериохлорофилла *b* позволяет предположить участие в межмолекулярном взаимодействии кетогрупп, связанных с центральным атомом магния за счет координационных связей.

Итак, бактериохлорофилл *b* в твердых пленках достигает максимума поглощения при $\lambda=910$ нм и максимума флуоресценции при $\lambda=975$ нм. Этот тип молекулярной упаковки отличается от состояния главной массы пигмента в клетках бактерий и более близок к спектральным свойствам активного центра.

Приносим глубокую благодарность Е. Н. Кондратьевой и В. Э. Успенской за предоставление исходной культуры *Rhodospseudomonas viridis*.

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

Поступило
19 VIII 1974

ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- ¹ P. Giesbrecht, G. Drews, Arch. Mikrobiol., v. 54, 297 (1966). ² A. Holt, R. K. Clayton, Photochem. Photobiol., v. 4, 829 (1965). ³ J. Thornber, J. Olson, Photochem. Photobiol., v. 14, 329 (1971). ⁴ А. А. Красновский, К. К. Войновская, Л. М. Кособуцкая, ДАН, т. 85, 389 (1952). ⁵ А. А. Красновский, М. И. Быстрова, И. Н. Мальгошева, ДАН, т. 204, 1473 (1972). ⁶ Е. М. Бокучава, Н. Н. Дроздова, А. А. Красновский, Биохимия, т. 39, 188 (1974). ⁷ М. И. Быстрова, А. А. Красновский, Молекулярная биология, т. 1, 362 (1967). ⁸ А. А. Красновский, М. И. Быстрова, ДАН, т. 174, 480 (1967). ⁹ J. J. Katz, G. L. Closs et al., J. Am. Chem. Soc., v. 85, 3804 (1963). ¹⁰ K. Ballschmiter, J. J. Katz, J. Am. Chem. Soc., v. 91, 2661 (1969).