

А. А. КРАСНОВСКИЙ, К. К. ВОЙНОВСКАЯ и Л. М. КОСОБУЦКАЯ

**ПРИРОДА ЕСТЕСТВЕННОГО СОСТОЯНИЯ  
БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА В СВЯЗИ СО СПЕКТРАЛЬНЫМИ  
СВОЙСТВАМИ ЕГО КОЛЛОИДНЫХ РАСТВОРОВ  
И ТВЕРДЫХ ПЛЕНОК**

(Представлено академиком А. Н. Терениным 29 IV 1952)

Бактериохлорофилл (ниже обозначаемый буквами БХ) в растворе обладает одним главным максимумом поглощения в близкой инфракрасной области спектра при 760—780 м $\mu$  (в зависимости от природы растворителя), тогда как в живой клетке наблюдаются принадлежащие БХ 2—3 максимума поглощения <sup>(2)</sup> при 800, 850 и иногда при 890 м $\mu$  ( $\pm 10$  м $\mu$ ). Причины этого явления до настоящего времени не были установлены. Исследования нашей лаборатории <sup>(3)</sup> позволили прийти к заключению, что положение главного максимума поглощения света хлорофилла в пластиде при 678 м определяется агрегированной коллоидной формой хлорофилла, в соответствии с исходными работами Д. И. Ивановского <sup>(4)</sup>. Исходя из работы с хлорофиллом, можно было ожидать, что положение главных максимумов поглощения БХ в клетках также определяется его агрегированным, «полимерным» состоянием.

В настоящей работе были исследованы: спектральные свойства твердых пленок БХ, бактериофеофитина и их водных коллоидных растворов на разных стадиях коагуляции, а также влияние воздействий на спектральные свойства БХ в естественном состоянии.

Твердые пленки. БХ мы получали из пурпурных бактерий с конечным хроматографическим разделением на сахаре, кратко описанным в предыдущем сообщении <sup>(1)</sup>. Пигмент снимали с сахара эфиром или иными растворителями. Промывка эфира водой, сушка прокаленным сульфатом натрия с последующим испарением и переводом в другие растворители не оказывала влияния на вид спектров поглощения пленок, так же как и присутствие избытка сахарозы.

1 мл раствора БХ испарялся под вакуумом масляного насоса в вакуумной трубке, приспособленной для установки в кюветодержателе фотоэлектрического спектрофотометра, на котором производилось измерение спектров. Оказалось, что пленки БХ, полученные из эфира, спирта и ацетона, обладали двумя четкими максимумами поглощения при 800 и 850 м $\mu$  ( $\pm 10$  м $\mu$ ). Нагревание пленок до 60° приводило к снижению максимума при 850 м $\mu$  и увеличению максимума при 800 м $\mu$  (см. рис. 1). Охлаждение приводило к возвращению исходного спектра. Растворение пленок в эфире показало практическую неизменность БХ, обладающего до и после опыта максимумом поглощения в эфирном растворе при 770 м $\mu$ .

Конденсация паров воды на пленку БХ, полученную из эфира, приводила к перемещению максимума поглощения от 850—860 до 870 м $\mu$ . В случае введения в эфирный раствор БХ малого количества (около 1 мг) мочевины последующая конденсация водяного пара на пленку иногда приводила к сдвигу максимума поглощения до 890 м; в некоторых опытах при действии воды удавалось получить в одной пленке БХ

все три максимума поглощения — при 800, 850 и 890 м $\mu$ . Однако эти опыты были плохо воспроизводимы; условия получения структуры пленки, соответствующей поглощению при 890 м $\mu$  при сохранении структур 800 и 850 м $\mu$ , требуют дальнейшего исследования.

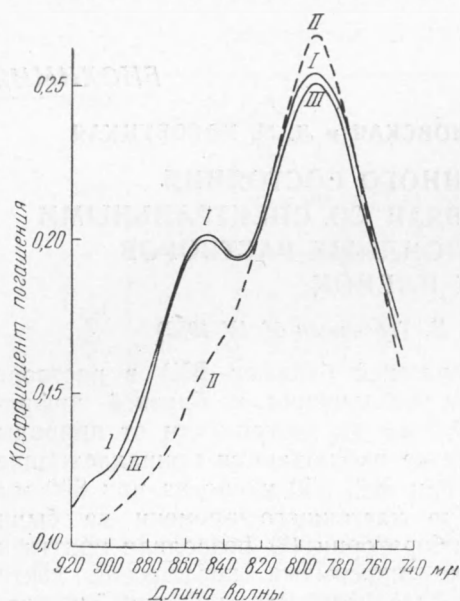


Рис. 1. Спектр поглощения твердой пленки БХ. I — пленка, полученная испарением эфирного раствора БХ; II — нагрета 5 мин. до 60°; III — охлаждена до 5° 45 мин. Все измерения при 20°

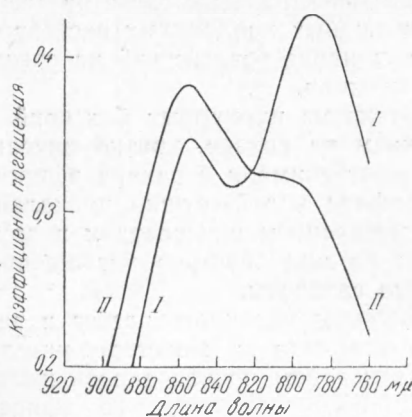


Рис. 2. Спектр поглощения коллоидного раствора БХ. I — к 1 мл раствора БХ в метаноле добавлено 8 мл воды; II — добавлено 0,5 мл 10% раствора MgCl<sub>2</sub> (коагуляция)

Органические соединения, вводимые в малом количестве (около 1 мг) в эфир перед испарением, либо не оказывали заметного влияния на положение максимумов поглощения пленок (сахар, пальмитиновая кислота, гликокол, дрожжевая нуклеиновая кислота, сера и др.), либо оказывали дезагрегирующее действие, приводя к устранению максимума при 850 м $\mu$  (липиды, имидазол, цетиловый спирт) при сохранении максимума 790 м. ( $\pm 10$  м $\mu$ ).

Весьма существенно, что пленки «сырого» БХ, полученного извлечения из бактерий метанолом с последующим переводом пигментов в эфир, обладали лишь одним максимумом поглощения при 780—790 м $\mu$ , что обязано наличию в бактериях извлекаемых метанолом липоидных соединений\*.

Пленки бактериофеофитина обладали одним максимумом при 850 м $\mu$  ( $\pm 5$  м $\mu$ ), не изменяющимся при нагревании до 100°.

Коллоидные растворы БХ были получены двумя способами: 1) прямым растворением адсорбированного на сахаре БХ в воде с последующей коагуляцией MgCl<sub>2</sub>; 2) разбавлением водой растворов БХ в спирте, ацетоне, диоксане, пиридине с последующей коагуляцией MgCl<sub>2</sub>. Обычно к 1 мл раствора БХ добавляли 8 мл дистиллированной воды и затем 0,5 мл 10% водного раствора MgCl<sub>2</sub>. Свежеприготовленные коллоидные растворы обычно обладали двумя максимумами поглощения при 800 и 850 м $\mu$  ( $\pm 10$  м $\mu$ ). Однако наблюдались некоторые различия вида спектра в зависимости от природы исходных растворителей.

Так, в случае сильного дезагрегирующего действия растворителя, например пиридина<sup>(5)</sup>, не удается наблюдать максимума при 850 м $\mu$ .

\* Катц и Вассинк<sup>(2)</sup> не смогли обнаружить описанных в нашей работе спектральных свойств пленок, так как ставили опыты с «сырым», неочищенным хроматографически бактериохлорофиллом; Рабинович, основываясь на этих опытах, развивает в своей книге<sup>(3)</sup> представление, что положение полос поглощения БХ в бактериях определяется взаимодействием пигмента с другими составными частями клетки, а не агрегацией его молекул; в свете результатов нашей работы эти выводы не являются убедительными.

В процессе коагуляции коллоидных растворов при действии хлористого магния наблюдалось перемещение доминирующего поглощения в длинноволновую область спектра; введение  $MgCl_2$  сразу приводит к явному усилению светорассеяния.

Так же как и твердые пленки, коллоидные растворы «сырого» БХ обладали лишь одним максимумом поглощения при  $790 \pm \pm 10$  м $\mu$ . Нагревание коллоидных растворов приводит к ускорению коагуляции.

Влияние воздействий на БХ в естественном состоянии. Пурпурные бактерии\* центрифугировали, промывали водой, растирали в ступке с порошком карборунда в фосфатном буфере рН 6,5 и снова центрифугировали. Полученная стойкая суспензия обладала теми же тремя максимумами поглощения, что и исходная ненарушенная культура.

1. Нагревание суспензии до  $50-80^\circ$  приводит к постепенному перемещению поглощения к 800 м $\mu$ ; дальнейшее нагревание до  $100^\circ$  приводит к перемещению максимума поглощения до 770 м $\mu$  ( $\pm 10$  м $\mu$ ), вероятно, соответствующему полной дезагрегации и растворению БХ в липоидной фазе (см. также (2)).

2. Действие кислоты приводит к «спаданию» максимумов поглощения 800 и 890 м $\mu$  при повышении 850 м $\mu$ , что объясняется образованием из БХ бактериофеофитина, обладающего в агрегированной форме поглощением при 850 м $\mu$ . Существенно, что нагревание обработанных кислотой бактерий уже не приводит к перемещению поглощения в соответствии с поведением бактериофеофитина в твердых пленках.

3. Действие растворителей — метанола, ацетона, пиридина, дioxана — приводит к постепенному нарушению всех трех максимумов поглощения бактериальной суспензии с появлением, при достаточно большой концентрации

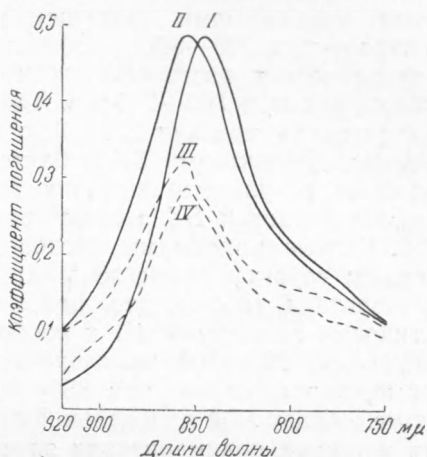


Рис. 3. Спектр поглощения твердой пленки и коллоидного раствора бактериофеофитина. I — к 1 мл раствора в спирте добавлено 8 мл воды; II — добавлено 0,5 мл. 10% раствора  $MgCl_2$ ; III — пленка, полученная испарением эфирного раствора; IV — нагрета 5 мин. до  $100^\circ$

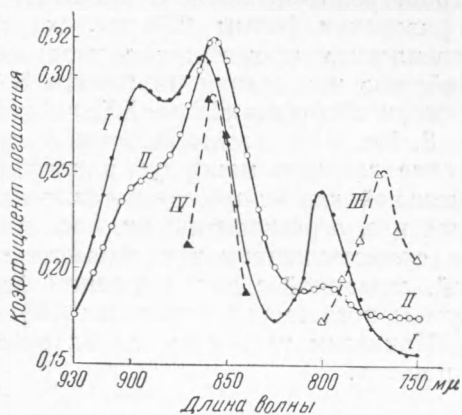


Рис. 4. Спектр поглощения коллоидного раствора вещества пурпурных бактерий. I — исходный спектр поглощения, подобный спектру ненарушенных бактериальных клеток (1 мл + 4 мл воды); II — к 1 мл раствора прибавлено 4 мл нормального раствора шавелевой кислоты; III — суспензия I нагрета до  $100^\circ$  15 мин., IV — суспензия II нагрета до  $100^\circ$  15 мин. Спектры III и IV по концентрации вещества не соответствуют спектрам I и II

\* Исходная культура была нам предоставлена Институтом микробиологии АН СССР (Л. К. Осницкая); определение, проведенное Е. Кондратьевой на кафедре микробиологии МГУ им. Ломоносова, показало, что эти бактерии принадлежат роду *Rhodospseudomonas* (Athiorodaceae).

растворителя в воде (больше 50%), спектров поглощения с одним главным максимумом, характерных для истинных растворов БХ. Наиболее активно было действие пиридина.

Результаты опытов приводят к следующим выводам.

1. Твердые пленки и водные коллоидные растворы БХ обладают двумя максимумами поглощения в близкой инфракрасной области спектра — при 790—800 м $\mu$  и при 850—890 м $\mu$ , тогда как растворы БХ в органических растворителях имеют в этой области один максимум поглощения при 760—780 м $\mu$ . Таким образом, взаимная агрегация, «полимеризация» молекул БХ приводит к появлению спектров поглощения, сходных со спектрами БХ в бактериальной клетке; наблюдаются также подобные результаты внешних воздействий на спектральные свойства твердых пленок и БХ в естественном состоянии.

2. Разные максимумы поглощения соответствуют разным типам агрегации; вероятно участие в структуре коллоидной частицы молекул растворителя (воды), что, например, известно для «полимеров» полиметиновых красителей<sup>(6)</sup> и вообще характерно для гидрозолей. Поглощение при 790—800 м $\mu$  следует приписать наименее агрегированной форме, а поглощение при 850—890 м $\mu$  — более высоко агрегированной форме, образуемой при дальнейшей коагуляции. Вряд ли здесь происходит истинная полимеризация за счет валентных связей; более вероятно сцепление молекул пигмента за счет координационных и водородных связей между боковыми группами или посредством «мостиков» из молекул растворителя (воды). Возможность связывания через «мостик» молекул воды по центральным атомам магния молекул пигмента иллюстрируется предыдущими работами нашей лаборатории<sup>(7)</sup>.

В пленках и коллоидных растворах мы не наблюдали наименее агрегированной формы феофитина, при образовании которой, вероятно, играет роль сцепление через центральный атом магния, тогда как при образовании формы 850 м $\mu$ , сходной для бактериофеофитина и БХ, «сцепление» происходит с участием иных групп молекулы пигмента. Действие нагревания на пленки БХ свидетельствует о меньшей устойчивости состояния 850 м $\mu$  БХ, переходящего в форму 800 м $\mu$ .

3. Из всего вышеизложенного можно сделать тот вывод, что положение главных максимумов поглощения бактериохлорофилла в бактериальной клетке определяется, так же как и в случае хлорофилла в пластиде, агрегированными, «полимерными» формами пигмента, вероятно, существующими в равновесии с фотохимически активной, мономерной, связанной с липопротеином формой пигмента, обладающей максимумом поглощения в области 760—780 м $\mu$ .

Приносим глубокую благодарность акад. А. Н. Теренину за советы и помощь.

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

Поступило  
11 IV 1952

#### ЦИТИРОВАННАЯ ЛИТЕРАТУРА

- <sup>1</sup> А. А. Красновский и К. К. Войновская, ДАН, 81, 879 (1951)  
<sup>2</sup> E. Katz u. E. C. Wassink, *Enzymologia*, 7, 97 (1939); E. C. Wassink, E. Katz u. R. Dörrenstein *ibid.*, 7, 113 (1939). <sup>3</sup> А. А. Красновский, Докт. диссерт., Ин-т биохимии им. А. Н. Баха АН СССР, 1948; доп. к сборн. Проблемы биохимии, 1948; Ежегодн. Усп. биол. хим., 1, 473 (1950); А. А. Красновский и Г. П. Брин, ДАН, 63, 163 (1948); А. А. Красновский и Л. М. Кособуцкая, ДАН, 85, № 1 (1952). <sup>4</sup> Д. И. Ивановский, Протоколы засед. Об-ва естествоисп. при Варшавск. ун-те, 1909; О физическом состоянии хлорофилла в живых листьях, Варшава, 1913. <sup>5</sup> А. А. Красновский, Г. П. Брин и К. К. Войновская, ДАН, 69, 393 (1949). <sup>6</sup> А. Н. Теренин, Фотохимия красителей, изд. АН СССР, 1947. <sup>7</sup> В. Б. Евстигнеев, В. А. Гаврилова и А. А. Красновский, ДАН, 70, 261 (1950). <sup>8</sup> E. J. Rabinowitch, *Photosynthesis*, 2, part 1, 1951, p. 651, 704.