

УДК 541.14

## ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ $\beta$ -КАРОТИНА И ХЛОРОФИЛЛА А С БЫЧЬИМ СЫВОРОТОЧНЫМ АЛЬБУМИНОМ

И. А. Наговицын, Г. К. Чудинова, В. В. Савранский, Г. Г. Комиссаров<sup>1</sup>

*Изучена флуоресценция комплексов природных фотосинтетических пигментов  $\beta$ -каротина ( $\beta$ -К), хлорофилла а (ХЛ) и их смесей в различных соотношениях с бычьим сывороточным альбумином (БСА) в водных растворах. Обнаружено увеличение интенсивности флуоресценции в комплексах смеси пигментов с БСА. Максимальное (в 4 – 6 раз) увеличение интенсивности флуоресценции по сравнению с интенсивностью флуоресценции однокомпонентных комплексов БСА( $\beta$ -К) и БСА(ХЛ) достигается при соотношении 11 – 27%  $\beta$ -К / 89 – 73% ХЛ в комплексе с БСА. Спектры флуоресценции комплексов хлорофилла а с БСА (максимум при 690 нм) и  $\beta$ -К с БСА перекрываются в значительной степени. Это дает возможность предположить, что при изучении флуоресцентных характеристик природных фотосинтетических пигмент-белковых комплексов необходимо учитывать возможность присутствия собственной флуоресценции  $\beta$ -каротина и родственных ему соединений.*

**Ключевые слова:**  $\beta$ -каротин, хлорофилл а, флуоресценция, сывороточный альбумин.

Изучение переноса энергии и взаимодействия основных пигментов фотосинтеза (хлорофилла а и  $\beta$ -каротина) при поглощении света позволяет определить критерии оптимальной организации пигментов, обеспечивающей высокую квантовую эффективность

<sup>1</sup>Институт химической физики им. Н. Н. Семенова РАН, 119991, ГСП-1, Москва, В-334, ул. Косыгина, д. 4.

преобразования световой энергии. Полученные на модельных системах результаты могут быть использованы для выяснения механизмов преобразования солнечной энергии в природных мембранных структурах, а также для создания на их основе преобразователей солнечной энергии с двумя и более слоями различных пигментов вплоть до образования гетероструктур.

Целью настоящей работы является исследование оптических свойств (флуоресценция, поглощение) основных пигментов фотосинтетического аппарата высших растений:  $\beta$ -каротина ( $\beta$ -К) и хлорофилла *a* (ХЛ) при взаимодействии их смесей различного мольного соотношения с бычьим сывороточным альбумином.

В настоящее время публикуется большое количество работ по исследованию пигмент-белковых комплексов (ПБК) природных фотосинтетических мембран. С современным состоянием исследований природных фотосинтетических структур можно ознакомиться в обзорах, посвященных исследованию структуры фотосистемы II [1 – 5] и фотосистемы I [6 – 8], переноса электрона в фотосистеме II [9] и фотосистеме I [10 – 12], переноса энергии в ПБК [13, 14].

Для исследований природных ПБК часто используются ленгмюровские пленки. Методика приготовления ленгмюровских пленок позволяет создавать адекватные модельные системы природных мембран. В одной из первых работ, посвященных исследованию ПБК в ленгмюровских пленках, были исследованы бактериальные реакционные центры и светособирающие комплексы [15]. Ряд обстоятельных работ выполнен по изучению структурной организации светособирающего комплекса II в ленгмюровских пленках [16 – 18].

В исследовании фотосинтеза можно выделить два взаимодополняющих подхода: детальное исследование процессов в природных системах и моделирование этих процессов в простых модельных системах с последующим их усложнением [19]. По нашему мнению, в последнее время с появлением новых методов исследований и общим прогрессом в понимании функционирования природных ПБК фотосинтетической мембраны недостаточно внимания уделяется моделированию процессов фотосинтеза с использованием простых модельных систем.

Основной объем работ по взаимодействию пигментов фотосинтеза с модельными белковыми системами был выполнен в 80 – 90 годы. Одной из таких систем, которая часто использовалась, является комплекс пигмент-сывороточный альбумин (см., например, [20 – 22]). Сывороточный альбумин содержит гидрофобные полости [23], в которых могут связываться неполярные соединения. Исследования физико-химических

свойств комплексов сывороточных альбуминов с хлорофиллом [24], каротиноидами [25], порфиринами и другими хромофорами [28 – 30] не потеряли своей актуальности и в настоящее время. В нашей группе порфирины и их металлокомплексы использовали для маркирования сывороточных альбуминов при создании сенсорных систем на основе ленточных пленок для флуоресцентного иммуноанализа [31, 32].

Нами были проведены исследования фотовольтаических характеристик пленок смеси ХЛ/ $\beta$ -К и было показано увеличение фотопотенциала пленок при содержании  $\beta$ -К 80 – 90% по сравнению с однокомпонентными пленками [33, 34]. Было проведено исследование переноса энергии между  $\beta$ -К и ХЛ, при этом была обнаружена собственная флуоресценция  $\beta$ -К в ленточных пленках [33, 35]. В качестве первого шага усложнения модельной системы и доведения ее до соответствия с ПБК фотосинтетического аппарата логично было бы исследовать взаимодействие  $\beta$ -К и ХЛ с участием белка. Для этой цели был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА). Результаты кратко представлены в работах [35, 36]. Результаты исследования трехкомпонентной модельной системы БСА( $\beta$ -К/ХЛ) методами флуоресцентной и абсорбционной спектроскопии представлены в данной статье.

$\beta$ -каротин и хлорофилл *a* (Fluka Chemical Corp.) использовали без дополнительной очистки. Спектры поглощения  $\beta$ -К и ХЛ соответствуют литературным данным [37]. Исходные растворы ХЛ и  $\beta$ -К готовили в хлороформе в концентрациях  $10^{-3}$  М, хранили при  $-18^\circ\text{C}$ . Комплексы  $\beta$ -каротина и хлорофилла *a* с бычьим сывороточным альбумином (Sigma) готовили перемешиванием при комнатной температуре водного раствора БСА ( $10^{-6}$  М) и раствора пигмента в хлороформе ( $10^{-5}$  М) до испарения последнего; выдерживали сутки при  $+4^\circ\text{C}$ , отфильтровывали. Спектры поглощения регистрировали на спектрофотометре НТАСНІ-330, спектры флуоресценции – на спектрофлуориметре SHIMADZU RF-5001 (размеры щелей возбуждения/регистрации составляли 10/10 нм). Возбуждение флуоресценции проводили светом с длиной волны 420 нм (полоса Core хлорофилла) и 490 нм (максимум поглощения  $\beta$ -каротина). В последнем случае возбуждается в основном  $\beta$ -К, т.к. поглощение ХЛ в области 490 нм незначительно. Для отсекающего рассеянного света при возбуждении светом 490 нм использовали оптические фильтры ЖС-16 и ПС-8, вырезающие область до 550 нм. Для приготовления рисунков и расчета интегральной интенсивности флуоресценции (площади под кривой спектра флуоресценции) использовали программу Microcal Origin v. 5.0.

На рис. 1 приведены спектры поглощения комплексов бычьего сывороточного альбумина (БСА) с  $\beta$ -каротином ( $\beta$ -К) и хлорофиллом *a* (ХЛ). Максимумы полос поглоще-

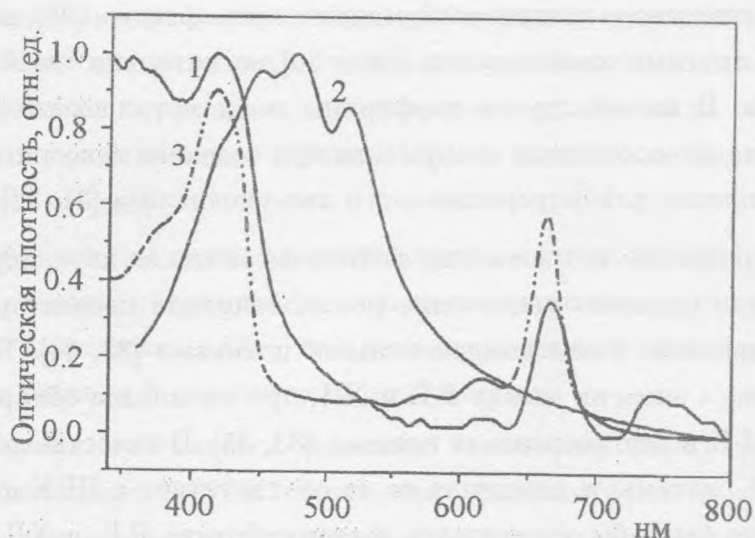


Рис. 1. Приведенные к единице спектры поглощения комплексов БСА(ХЛ) – 1, БСА( $\beta$ -К) – 2 и спектр поглощения хлорофилла а (ХЛ) в растворе хлороформа ( $10^{-5}$  М) – 3. Спектр ХЛ в растворе хлороформа в целях наглядности приведен к величине 0.9.

ния ХЛ в комплексе с белком практически не сдвинуты относительно положения полос поглощения ХЛ в растворе хлороформа (рис. 1, спектры 1, 3). Появление максимума поглощения в области 740 нм в спектре БСА(ХЛ) (рис. 1, спектр 1) может быть объяснено светорассеянием ассоциатами ХЛ, которое уменьшается при уменьшении количества ХЛ [38].

При образовании комплекса  $\beta$ -К с БСА в спектре поглощения образуется длинноволновый максимум в области 518 нм (рис. 1, спектр 2). При исследовании однокомпонентных ленгмюровских пленок  $\beta$ -К мы наблюдали образование аналогичного максимума (при 516 нм) [35]. Наличие такого максимума объясняется образованием агрегатов  $\beta$ -К в ленгмюровских пленках [39]. На основании этого мы полагаем, что  $\beta$ -К образует агрегаты при встраивании в гидрофобные полости БСА.

Оптические свойства смеси ХЛ и  $\beta$ -К были исследованы в ленгмюровских пленках [39, 40] и в смешанных ( $\beta$ -К/ХЛ) пигмент-белковых комплексах [41, 42], но при обсуждении результатов работ [39 – 42] наблюдаемая флуоресценция была отнесена к флуоресценции хлорофилла. Как нами было показано ранее [35], спектры флуоресценции однокомпонентных по пигментному составу комплексов  $\beta$ -К и ХЛ с БСА в растворе в значительной степени перекрываются, что не исключает наличия собственной флуорес-

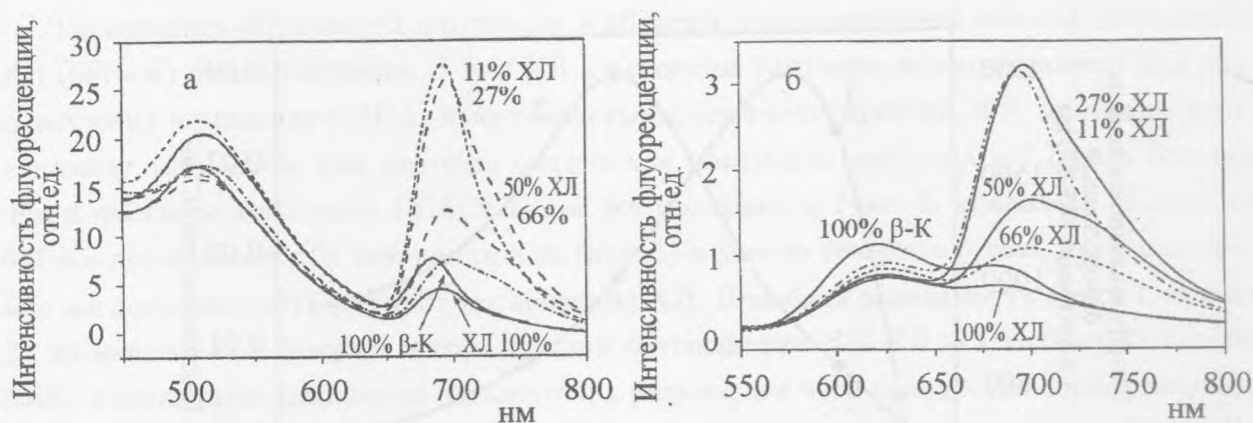


Рис. 2. Спектры флуоресценции комплексов  $\beta$ -каротина ( $\beta$ -К), хлорофилла *a* (ХЛ) и их смесей с бычьим сывороточным альбумином (БСА). а -  $\lambda_{ex} = 420$  нм; б -  $\lambda_{ex} = 490$  нм.

ценции каротиноидов в природных пигмент-белковых комплексах (рис. 2). Наблюдаемая флуоресценция не является собственной флуоресценцией БСА [35].

На рис. 2а приведены спектры флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 420$  нм) однокомпонентных пигмент-белковых комплексов и комплексов смеси пигментов с БСА. При возбуждении светом 420 нм спектр флуоресценции комплекса  $\beta$ -К-белок имеет максимумы при 513 и 684 нм; комплекс ХЛ-белок 507 и 690 нм. Коротковолновый максимум ( $\approx 500$  нм) можно объяснить светорассеянием раствора альбумина. Максимумы флуоресценции комплексов БСА с 11, 27, 50, 66% ХЛ располагаются при 694, 696, 696, 699 нм соответственно. Отметим, что интенсивность флуоресценции однокомпонентных пигмент-белковых комплексов существенно ниже, чем белковых комплексов смеси пигментов, причем максимальное увеличение интенсивности наблюдается при избытке  $\beta$ -К (11 и 27% ХЛ). В спектрах флуоресценции комплексов, содержащих 50 и 66% ХЛ, образуется плечо в области  $\approx 730$  нм. Отметим, что исследование структуры спектров  $\beta$ -К в пленках и в пигмент-белковом комплексе (вычленение отдельных полос спектров поглощения и люминесценции) является самостоятельной задачей и в данной статье не рассматривается.

При возбуждении флуоресценции светом с длиной волны 490 нм картина принципиально не изменяется (рис. 2б). В этом случае можно ожидать, что возбуждается в основном  $\beta$ -К, т.к. поглощение ХЛ максимально в более коротковолновой области полосы Core, т.е. 390 - 460 нм (рис. 1). Максимальная интенсивность флуоресценции наблюдается при избытке  $\beta$ -К (11, 27% ХЛ). Максимумы флуоресценции комплексов БСА( $\beta$ -К), БСА с 11, 27, 50, 66% ХЛ и комплексов БСА(ХЛ) располагаются при 680, 694, 697, 701, 700, 682 нм соответственно.

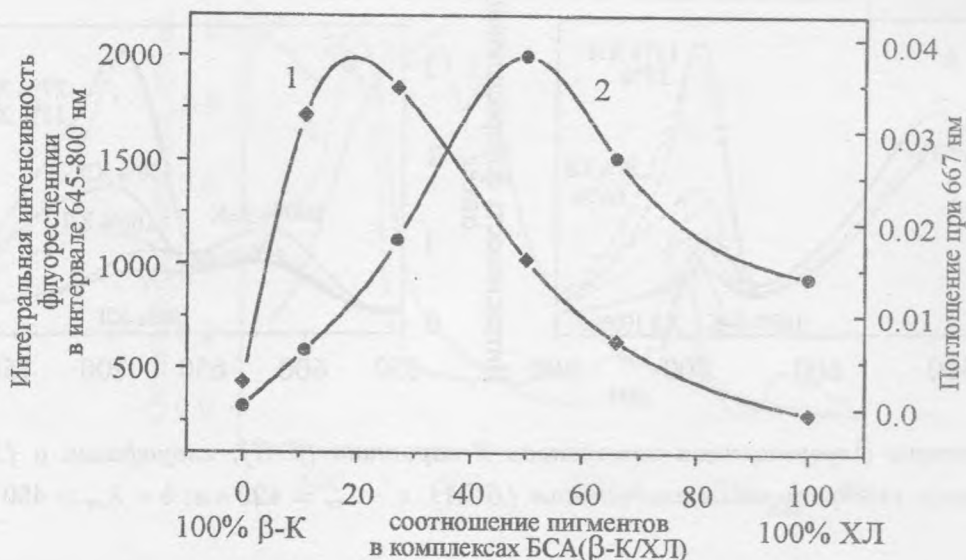


Рис. 3. Зависимость интегральной интенсивности флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 420$  нм) (1) и поглощения при 667 нм (2) от мольного соотношения хлорофилла *a* и  $\beta$ -каротина в комплексе с бычьим сывороточным альбумином.

На рис. 3 представлены зависимости интегральной интенсивности флуоресценции ( $\lambda_{ex} = 420$  нм) комплексов БСА(ХЛ/ $\beta$ -К) и оптической плотности в области длинноволновой полосы поглощения ХЛ (для комплексов БСА(ХЛ) 667 нм, см. рис. 1) в зависимости от мольного соотношения пигментов в комплексе с БСА. Интенсивность флуоресценции при содержании 27% ХЛ/73%  $\beta$ -К в комплексе с БСА возрастает в 4 раза по сравнению с флуоресценцией БСА( $\beta$ -К) и в 6 раз по сравнению с флуоресценцией БСА(ХЛ) (рис. 3, кривая 1).

Как уже упоминалось, нами было обнаружено увеличение фотопотенциала ленточных пленок смеси  $\beta$ -К и ХЛ по сравнению с фотопотенциалом однокомпонентных пленок пигментов при прочих равных условиях приготовления пленок и проведения измерений [33, 34]. Увеличение значений фотопотенциала наблюдали именно при избытке  $\beta$ -К (при содержании 10 – 20% ХЛ), подобно тому как в настоящей работе при избытке  $\beta$ -К увеличивается интенсивность флуоресценции смеси пигментов в комплексе с БСА. Можно предположить, что в этом случае происходит образование комплексов с синергетическим взаимодействием пигментов, что приводит к сенсibilизации флуоресценции комплексов и к увеличению эффективности фотон-электронной конверсии в процессе фотовольтаических измерений.

Зависимость оптической плотности в области длинноволновой полосы поглощения ХЛ (667 нм) от соотношения  $\beta$ -К и ХЛ в исходном растворе, использованном для приготовления комплекса с БСА, имеет максимум, соответствующий 50% мольному соотношению пигментов, при котором оптическая плотность раствора в 2.7 раза больше, чем в растворе комплекса БСА(ХЛ) той же молярности (рис. 3, кривая 2). В области 667 нм поглощение  $\beta$ -К незначительно (рис. 1) и можно говорить о том, что наблюдаемое поглощение соответствует поглощению ХЛ. Подобная зависимость (рис. 3, кривая 2), на наш взгляд, говорит о том, что при соотношении  $\beta$ -К:ХЛ  $\approx$  1:1 образуются наиболее компактные комплексы пигментов, в результате чего количество сорбированного ХЛ на белке возрастает по сравнению с однокомпонентными комплексами БСА(ХЛ). Спектрально этому факту соответствует образование плеч ( $\approx$  730 нм) в спектрах флуоресценции пигмент-белковых комплексов (рис. 2, 50%, 66% ХЛ).

Итак, в работе исследованы в водных растворах оптические свойства (флуоресценция, поглощение)  $\beta$ -каротина и хлорофилла *a* в комплексе с бычьим сывороточным альбумином. При сравнении спектров флуоресценции водных растворов БСА( $\beta$ -каротин) и БСА(хлорофилл *a*) установлено, что спектры в обоих случаях значительно перекрываются, положение максимумов полос флуоресценции различаются на несколько нанометров. Такое совпадение позволяет предположить наличие собственной флуоресценции каротиноидов в природных пигмент-белковых фотосинтетических структурах, которая маскируется флуоресценцией хлорофилла. До сих пор собственная флуоресценция каротиноидов исследовалась в простых модельных системах и ее наличие не учитывали при интерпретации флуоресцентных характеристик *in vivo*. Показано значительное увеличение (в 4 – 6 раз) интенсивности флуоресценции комплексов смеси  $\beta$ -каротина и хлорофилла *a* с бычьим сывороточным альбумином по сравнению с однокомпонентными пигмент-белковыми комплексами. Показано, что количество хлорофилла *a* в растворе его комплекса с бычьим сывороточным альбумином максимально при мольном соотношении ХЛ- $\beta$ -каротином = 1:1 в исходном растворе.

Авторы благодарят д.х.н. О. Т. Касаикину за предоставленный  $\beta$ -каротин.

Работа поддержана грантом РФФИ N 0403-32890а и грантом ведущих научных школ НШ 1221.2003.3.

#### ЛИТЕРАТУРА

- [1] V u m b a L. and V á c h a F. Photosynth. Res., **77**, 1 (2003).
- [2] Т е т е н ь к и н В. Л. Биохимия, **68**, N 6, 810 (2003).

- [3] Barber J., Nield J., Morris E. P., et al. *Physiol. Plantarum*, **100**, 817 (1997).
- [4] Barber J., Morris E. P., and Büchel C. *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 239 (2000).
- [5] Bricker T. M. and Frankel L. K. *Photosynth. Res.*, **72**, 131 (2002).
- [6] Fromme P., Jordan P., and Krauß N. *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 5 (2001).
- [7] Scheller H. V., Jensen P. E., Haldrup A., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 41 (2001).
- [8] Evans M. C. W. and Bredenkamp G. *Physiol. Plantarum*, **79**, 415 (1990).
- [9] Giardi M. T., Cona A., and Geiken B. *Bioelectrochem. Bioenerg.*, **38**, 67 (1995).
- [10] Brettel K. *Biochim. Biophys. Acta*, **1318**, 322 (1997).
- [11] Hope A. B. *Biochim. Biophys. Acta*, **1456**, 5 (2000).
- [12] Brettel K. and Leibl W. *Biochim. Biophys. Acta*, **1507**, 100 (2001).
- [13] Melkozernov A. N. *Photosynth. Res.*, **70**, 129 (2001).
- [14] Renger T., May V., and Kühn O. *Phys. Reports*, **343**, 137 (2001).
- [15] Heckl W. M., Lösche M., and Möhwald H. *Thin Solid Films*, **133**, 73 (1985).
- [16] Kern P., Gruszecki W. I., Matula M., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **1373**, N2, 289 (1998).
- [17] Gruszecki W. I., Grudzinski W., Banaszek-Glos A., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **1412**, N2, 173 (1999).
- [18] Grudzinski W., Matula M., Sielewiesiuk J. et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **1503**, N3, 291 (2001).
- [19] Энергетические ресурсы сквозь призму фотохимии и катализа, под ред. М. Гретцеля, М., Мир, 1986.
- [20] Семичаевский В. Д. *Биофизика*, **17**, N 3, 530 (1972).
- [21] Зенькевич Э. И., Кочубеев Г. А., Салохиддинов К. И. *Журнал прикладной спектроскопии*, **29**, N 4, 639 (1978).
- [22] Shibata H., Ochiai H., Kawashima T., et al. *Biochim. Biophys. Acta*, **852**, N 2 – 3, 175 (1986).
- [23] Уайт А., Хендлер Ф., Смит Э., и др. *Основы биохимии*, **3**, М., Мир, 1981.



- [24] Chibisov A. K., Slavnova T. D., and Gerner H. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **72**, 11 (2003).
- [25] Zsila F., Simonyi M., and Lockwood S. F. Bioorg. Med. Chem. Lett., **13**, 4093 (2003).
- [26] Sowell J., Agrew-Heard K. A., Mason J. C., et al. J. Chromatogr., B, **755**, 91 (2001).
- [27] Borissevitch I. E., Tominaga T. T., and Schmitt C. C. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **114**, 201 (1998).
- [28] Harvey M. D., Bablekis V., Banks P. R., and Skinner C. D. J. Chromatogr., B, **754**, 345 (2001).
- [29] Borissevitch I. E., Tominaga T. T., Isamoto H., and Tabak M. J. Luminescence, **69**, 65 (1996).
- [30] Borissevitch I. E., Tominaga T. T., Isamoto H., and Tabak M. Anal. Chim. Acta, **343**, 281 (1997).
- [31] Наговицын И. А., Чудинова Г. К. ДАН, **382**, N 2, 267 (2002).
- [32] Чудинова Г. К., Наговицын И. А., Карпов Р. Е., Савранский В. В. Квантовая электроника, **33**, N 9, 765 (2003).
- [33] Наговицын И. А., Чудинова Г. К., Комиссаров Г. Г. ДАН, **382**, N 1, 115 (2002).
- [34] Наговицын И. А., Чудинова Г. К., Савранский В. В., Комиссаров Г. Г. Биофизика, **49**, N 4, 646 (2004).
- [35] Наговицын И. А., Чудинова Г. К., Савранский В. В., Комиссаров Г. Г. Краткие сообщения по физике ФИАН, N 11, 19 (2003).
- [36] Наговицын И. А., Чудинова Г. К., Комиссаров Г. Г. Девятая научная конференция ИХФ РАН, ноябрь, 2003 г.
- [37] Бенсассон Р., Лэнд Э., Траскот Т. "Флэш-фотолиз и импульсный радиолиз. Применение в биохимии и медицинской химии", М., Мир, 1987.
- [38] Семичаевский В. Д. Молекулярная биология, **9**, N 3, 351 (1975).
- [39] Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Синешников В. А. ДАН СССР, **162**, N 5, 1184 (1965).
- [40] Sineshnikov V. A., Litvin F. F., and Das M. Photochem. Photobiol., **15**, 187 (1972).
- [41] Гиллер Ю. Е. Биофизика, **13**, N 6, 1006 (1968).

- [42] Гиллер Ю. Е., Красичкова Г. В., Сапожников Д. И. Биофизика, 15, N 1, 38 (1970).

ЦЕНИ Института общей физики  
им. А. М. Прохорова РАН

Поступила в редакцию 13 мая 2004 г.