

УДК 541.14; 539.233

ФЛУОРЕСЦЕНЦИЯ АГРЕГИРОВАННОГО β -КАРОТИНА В ЛЕНГМЮРОВСКИХ ПЛЕНКАХ И В КОМПЛЕКСЕ С БЕЛКОМ В РАСТВОРЕ

И. А. Наговицын, Г. К. Чудинова, В. В. Савранский, Г. Г. Комиссаров¹

Изучена флуоресценция β -каротина (β -К) в однокомпонентных ленгмюровских пленках и в комплексе с белком – бычьим сывороточным альбумином (БСА) в растворе. Максимумы флуоресценции пленок β -К расположены в области 576 и 690 нм, а максимумы флуоресценции комплекса БСА(β -К) – в области 622, 647 и 694 нм. Спектры флуоресценции комплексов хлорофилла а с БСА (максимум при 690 нм) и β -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 β -каротина и родственных ему соединений.

Ключевые слова: ленгмюровские пленки, β -каротин, флуоресценция, сывороточный альбумин.

Каротиноиды (КД) – C_{40} -соединения составляют один из наиболее важных классов природных пигментов и играют важную роль в процессе фотосинтеза. Флуоресцентные методы чрезвычайно широко применяются для исследований фотосинтеза, однако

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

флуоресценция β -каротина (β -К) и родственных ему пигментов – вопрос, не имеющий однозначного объяснения. До недавнего времени общепринятым считалось мнение об отсутствии флуоресценции у КД, а данные о ее наличии объясняли присутствием примесей [1]. Флуоресценция КД стала активно исследоваться только с появлением лазерных технологий, т.к. возможность ее регистрации лимитировалась чрезвычайно малым квантовым выходом ($\approx 10^{-4}$) [2].

Результаты исследования флуоресценции КД в растворах в замороженном состоянии и при комнатной температуре позволили определить электронную природу флуоресценции каротиноидов и ее основные фотофизические характеристики. Так, у каротиноидов с полиеновой цепью $N \geq 10$ не наблюдается $S_1 \rightarrow S_0$ флуоресценции (S_0 – основное состояние молекулы, а S_1 и S_2 – возбужденные синглетные состояния молекулы). При лазерном возбуждении время жизни S_2 синглетного состояния β -К, имеющего 11 сопряженных двойных связей, составляет 195 – 250 фс [2, 3].

Использование методов фемтосекундной и лазерной двухфотонной спектроскопии инициировало большое количество работ, посвященных исследованию физико-химических свойств КД (например, [4 – 6]), но несмотря на большой объем информации по этому вопросу, все же не существует однозначного представления о положении энергетических уровней (особенно S_1 уровня) КД и их участия в процессе миграции энергии в светособирающих пигмент-белковых комплексах [3, 7, 8].

Несмотря на то, что еще в 70-х годах была обнаружена флуоресценция КД на микропористом стекле при 77 К [9] и были исследованы оптические свойства смеси пигментов β -К и хлорофилла (ХЛ) в ленгмюровских пленках [10, 11] и в смешанных (β -К/ХЛ) пигмент-белковых комплексах [12, 13], все же следует отметить, что в литературе отсутствуют планомерные исследования флуоресценции КД в конденсированных средах. При обсуждении результатов работ [10 – 13] наблюдаемая флуоресценция была отнесена к флуоресценции хлорофилла.

Методика приготовления ленгмюровских пленок эффективно используется для исследования физико-химических и фотофизических процессов, происходящих с участием природных фотосинтетических пигментов, в первую очередь для исследования миграции энергии в фотосинтезе. Также пленки КД могут быть использованы для создания эффективных преобразователей солнечной энергии со стабильным фотооткликом и высокой эффективностью фотон-электронной конверсии (до 30%) [14].

Анализ литературы, проведенный нами, показал, что, кроме работы [15], собственная флуоресценция КД в ленгмюровских пленках не исследовалась. Целью настоящей

работы является исследование флуоресценции β -каротина в упорядоченных системах и ее сравнение с флуоресценцией хлорофилла в комплексе с БСА.

Упорядоченными системами, которые исследуются в нашей работе, являются ленточные пленки пигментов и их комплексы с белком – бычьим сывороточным альбумином (БСА). Именно упорядоченное окружение способствует увеличению эффективности флуоресценции, что дает возможность регистрировать возбуждаемую ксеноновой лампой флуоресценцию β -К при комнатной температуре. Мы предполагаем, что образование комплексов (конъюгатов) β -К и хлорофилла *a* с БСА происходит при встраивании пигментов в гидрофобную полость БСА, которая и создает упорядоченное окружение. Подобные результаты были получены нами при исследовании флуоресценции *Yb* комплекса тетрафенилпорфирина, усиливающейся при встраивании красителя в гидрофобную полость сывороточного альбумина [16]. В настоящей работе было обнаружено, что спектры флуоресценции однокомпонентных по пигментному составу комплексов β -К и ХЛ с БСА в растворе в значительной степени перекрываются, что позволяет предположить наличие собственной флуоресценции КД в природных пигмент-белковых комплексах, замаскированной флуоресценцией ХЛ. Отметим, что исследование структуры спектров β -К в пленках и в пигмент-белковом комплексе (вычленение отдельных полос спектров поглощения и люминесценции) является самостоятельной задачей и в данной статье не рассматривается.

β -каротин и хлорофилл *a* (Fluka Chemical Corp.) использовались без дополнительной очистки. Спектры поглощения β -К соответствуют литературным данным [1]. Концентрация β -К при спектральных измерениях – 10^{-5} М. Комплексы β -каротина и хлорофилла *a* с бычьим сывороточным альбумином (БСА) (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 HITACHI-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), 490 и 520 нм (максимумы поглощения β -каротина). В последнем случае возбуждается в основном β -К, т.к. поглощение ХЛ в области 520 нм минимально. Для отсеечения рассеянного света при возбуждении светом 490 и 520 нм использовали оптические фильтры ЖС-16 и ПС-8, вырезающие область до 550 нм. Для приготовления пленок использовали установку Joyce Loebel (Великобритания). Пленки переносили на кварцевые подложки ($30 \times 10 \times 1$ мм³) методом

Ленгмюра–Шефера. Скорость сжатия монослоя во всех случаях $0.3 \text{ см}^2/\text{мин}$. Субфаза – 0.05 M раствор KCl в тридистиллированной воде (20°C). Исходные растворы ХЛ и β -К готовили в хлороформе в концентрациях 10^{-3} M , хранили при -18°C и использовали для приготовления пленок в течение не более трех дней. Детальное описание установки для приготовления пленок приведено в [17]. Подробное изложение методики приготовления ленгмюровских пленок и ее применение для физических, физико-химических и биофизических исследований приведено в обзорах [18–21].

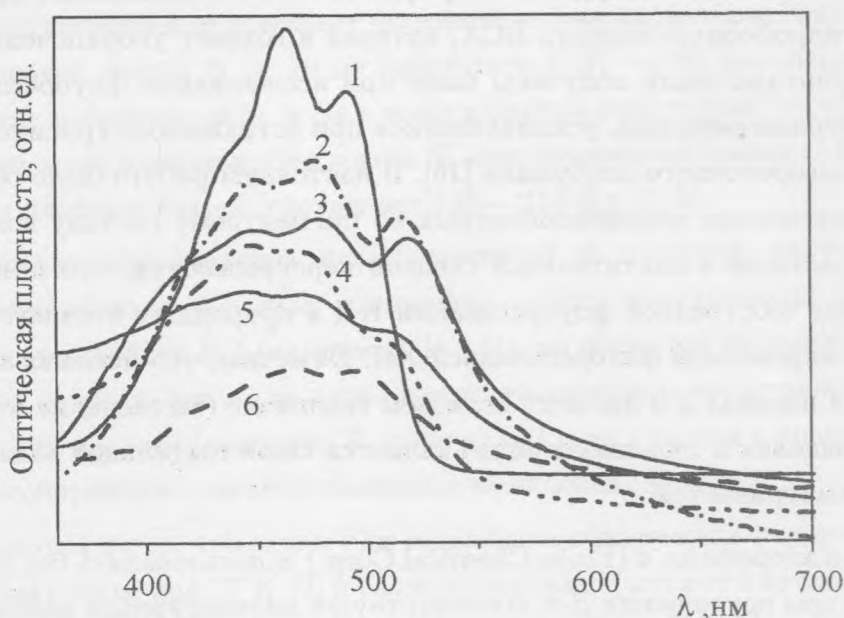


Рис. 1. Поглощение β -каротина: 1 – раствор в бензоле 10^{-5} M (сплошная линия); 2 – водный раствор БСА(β -К) 10^{-6} M (– · –); 3 – пленка β -К (3 слоя, перенесенных при поверхностном давлении (ПД) 15 мН/м) (сплошная линия); 4 – пленка, приготовленная из β -К, содержащего продукты разложения (3 слоя при ПД = 15 мН/м) (– · · –); 5 – пленка β -К через неделю хранения при -18°C (3 слоя при ПД = 15 мН/м) (сплошная линия); 6 – водный раствор БСА(β -К) 10^{-6} M через неделю хранения при $+4^\circ \text{C}$ (– –).

Спектры поглощения β -К в растворе, ленгмюровских пленках и в комплексе с бычьим сывороточным альбумином приведены на рис. 1. Из рис. 1 хорошо видно соответствие спектров поглощения β -К в двух конденсированных системах: в пленках и в комплексе с белком в растворе (спектры 3 и 2 соответственно). Максимум длинноволновой полосы, соответствующей образованию агрегатов β -К в ленгмюровских пленках, в

спектре поглощения пленок находится при 516 нм [10], а в растворе комплекса БСА(β -К) – при 518 нм (рис. 1). На основании этого можно предположить, что β -К в комплексе с БСА в растворе также находится в агрегированном состоянии.

При хранении спектры пленок изменяются, по-видимому, за счет деструкции пигментов, что выражается в общем уменьшении оптической плотности, редукции длинноволновой полосы и ее смещении в коротковолновую область (рис. 1, спектры 5, 6). Форма спектра 5 на рис. 1 соответствует форме спектра пленки, полученной из β -К, содержащего продукты разложения (рис. 1, спектр 4). Известно, что деструкция КД в присутствии кислорода воздуха приводит к образованию эпоксидов и производных β -иона [22], что, по нашему мнению, является причиной распада агрегатов β -К.

В известной степени аналогичные по структуре β -иону соединения – ионол и его производные – часто используются в качестве антиоксидантов [22]. В нашей работе предварительные исследования показали, что приготовление пленок β -К с добавлением ионола (2,6-ди-третбутил-4-метилфенола) приводило к увеличению молекулярной площади смеси β -К-ионол, т.е. снижению степени агрегации β -К, по сравнению с одноконтентными пленками. Так, содержание 10–25 % *v/v* ионола ($10^{-3}M$) в растворе для приготовления пленок приводило к увеличению молекулярной площади β -К в пленке в среднем в 1.5 раза. Молекулярная площадь – одна из основных характеристик методики приготовления лентгмюровских пленок – площадь, которую занимает молекула вещества на поверхности водной субфазы. Молекулярная площадь является показателем пространственной ориентации вещества, степени его агрегации, отражает взаимодействие веществ в пленке смесей. При приготовлении пленок из образцов β -К, содержащего продукты деструкции, его молекулярная площадь также возрастает по сравнению с пленками β -К, хранившегося в темноте без доступа воздуха. Отметим, что детальное исследование влияния продуктов распада β -К на его поведение на поверхности субфазы не являлось целью работы.

Флуоресценция пленок β -К при возбуждении 420 нм имеет интенсивный максимум в области ≈ 580 нм (рис. 2, спектр 2). Форма спектра и положение указанного максимума точно соответствует данным, полученным для $S_2 \rightarrow S_0$ флуоресценции растворов β -К в сероуглероде (CS_2) при комнатной температуре [2, 23]. Подобное совпадение данных для растворов и лентгмюровских пленок позволяет предположить, что наблюдаемая нами флуоресценция относится к собственной флуоресценции β -К, обусловленной $S_2 \rightarrow S_0$ переходом. По аналогии с работой [23] незначительный по интенсивности максимум в спектре 2 (рис. 2) в области ≈ 740 нм можно отнести к $S_1 \rightarrow S_0$ переходу.

Сопоставление спектров флуоресценции в пленках, представленных на рис. 2, показывает, что интенсивность флуоресценции при использовании образцов, содержащих продукты разложения (спектры 1, 4), снижается \approx в 10 раз по сравнению с образцами, в которых продукты деструкции отсутствуют (спектры 2, 3). Все пленки, спектры которых приведены на рис. 2, приготовлены из растворов, содержащих одинаковую навеску β -К, причем наличие примесей приводит к снижению оптической плотности растворов в области поглощения β -К в 4 раза (спектры не приводятся). Таким образом, наличие продуктов разложения является причиной снижения флуоресценции β -К в пленках.

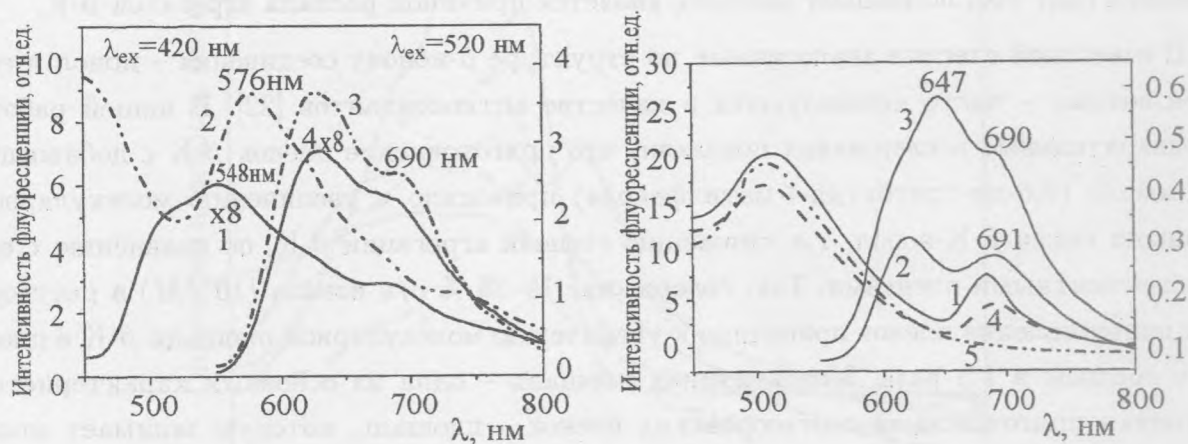


Рис. 2. Флуоресценция пленок β -каротина. 1, 2 – $\lambda_{ex} = 420$ нм; 3, 4 – $\lambda_{ex} = 520$ нм. 1, 4 – пленки, приготовленные из β -К, содержащего продукты разложения; 2, 3 – спектры пленок сразу после приготовления.

Рис. 3. Флуоресценция 10^{-6} М раствора β -каротина (1, 2, 3) и хлорофилла а (4) в комплексе с бычьим сывороточным альбумином (БСА). 1 – $\lambda_{ex} = 420$ нм; 2 – $\lambda_{ex} = 490$ нм; 3 – $\lambda_{ex} = 520$ нм; 4 – $\lambda_{ex} = 420$ нм; 5 – фоновая флуоресценция – флуоресценция раствора немаркированного БСА 10^{-6} М, $\lambda_{ex} = 420$ нм.

При возбуждении светом 420 нм спектр флуоресценции комплекса β -К-белок имеет максимумы при 513 и 684 нм; комплекс ХЛ-белок – 507 и 690 нм (рис. 3). Коротковолновый максимум (≈ 500 нм) можно объяснить светорассеянием раствора альбумина. При возбуждении в полосу поглощения β -каротина хорошо разрешается полоса с максимумом в области ≈ 690 нм (рис. 3), а также четко выражены максимумы при 622 и 647 нм ($\lambda_{ex} = 490$ и 520 нм соответственно). Наблюдаемая в пленках флуоресценция β -К в области 580 нм, в случае белкового раствора, видимо, маскируется фоновой флуорес-

ценцией белка (рис. 3, спектр 5). В спектре флуоресценции раствора БСА без пигментов (рис. 3, спектр 5) отсутствует длинноволновый максимум (≈ 690 нм), таким образом, полоса флуоресценции с максимумом 684 нм (спектр 1, рис. 3) и 690 нм (спектр 4, рис. 3) принадлежит β -К и ХЛ, сорбированным на БСА, соответственно.

Отметим, что спектры флуоресценции белковых комплексов БСА(β -К) и БСА(ХЛ) перекрываются в значительной степени (рис. 3, спектры 1, 4). Таким образом, логично предположить, что флуоресценция каротиноидов присутствует также и в природных пигмент-белковых комплексах, но маскируется флуоресценцией ХЛ, что может быть важно для биофизических исследований фотосинтеза. До сих пор собственная флуоресценция КД исследовалась в простых модельных системах и ее наличие не учитывали при интерпретации флуоресцентных характеристик *in vivo*. Вопрос о правомерности сравнения предложенной нами модельной системы и природных пигмент-белковых комплексов фотосинтетических мембран дискуссионный и требует дальнейшего исследования.

Из соответствия спектров поглощения (рис. 1, спектры 2, 3) и флуоресценции (рис. 2, 3) β -К в пленках и на белке в растворе следует, что свойства агрегатов β -К, в первую очередь, определяются его молекулярной структурой, а не взаимодействием с белком. Соответствие спектров флуоресценции β -К в пленках (рис. 2, спектр 2) с литературными данными для разбавленных растворов [2, 23] позволяет предположить, что наблюдаемую флуоресценцию можно отнести к собственной флуоресценции β -К. Проведенные исследования не позволяют сделать однозначного вывода о влиянии агрегации на природу флуоресценции β -К. Уменьшение степени агрегации β -К выражается в редукции полосы поглощения агрегата при хранении, что обусловлено образованием продуктов деструкции (рис. 1). В то же время форма спектров флуоресценции не претерпевает качественных изменений, однако наблюдается сдвиг максимума флуоресценции в коротковолновую область на 28 нм (рис. 2, спектры 1, 2).

Итак, в работе впервые исследована флуоресценция β -каротина в пленках Ленгмюра-Шефера и в комплексе с бычьим сывороточным альбумином в растворе. При сравнении спектров флуоресценции водных растворов БСА(β -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.

Авторы благодарят д.х.н. О.Т. Касаикину за предоставленный β -каротин.

Работа поддержана грантами ведущих научных школ N 00-15-97404 и N НШ-1788.2003.2.

ЛИТЕРАТУРА

- [1] Бенсассон Р., Лэнд Э., Траскот Т. Флэш-фотолиз и импульсный радиолиз. Применение в биохимии и медицинской химии. М., Мир, 1987, с. 398.
- [2] Бондарев С. Л. Журнал прикладной спектроскопии, **64**, N 1, 5 (1997).
- [3] Young A. J., Frank H. A. J. Photochem. Photobiol. B: Biol., **36**, 3 (1996).
- [4] Walla P. J., Linden P. A. Hsu C.-P., Scholes G. D., Fleming G. R. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **97**, N 20, 10808 (2000).
- [5] Gradinaru C. C., Kennis J. T. M., Paragiannakis E., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **98**, N 5, 2364 (2001).
- [6] Faller P., Pascal A., Rutherford A. W. Biochemistry, **40**, 6431 (2001).
- [7] Polivka T., Herek J. L., Zigmantas D., et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA, **96**, 4914 (1999).
- [8] Josue J. S., Frank H. A. J. Phys. Chem. A., **106**, 4815 (2002).
- [9] Лялин Г. Н., Кобышев Г. И., Теренин А. Н. ДАН СССР, **150**, N 2, 407 (1963).
- [10] Литвин Ф. Ф., Гуляев Б. А., Синешечков В. А. ДАН СССР, **162**, N 5, 1184 (1965).
- [11] Sineshchikov V. A., Litvin F. F. and Das M. Photochem. Photobiol., **15**, 187 (1972).
- [12] Гиллер Ю. Е. Биофизика, **13**, N 6, 1006 (1968).
- [13] Гиллер Ю. Е., Красичкова Г. В., Сапожников Д. И. Биофизика, **15**, N 1, 38 (1970).
- [14] Gao F. G., Bard A. J., Kispert L. D. J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry, **130**, 49 (2000).
- [15] Ray K., Misra T. N. J. Photochem. Photobiol. A: Chem., **107**, 201 (1997).
- [16] Наговицын И. А., Чудинова Г. К. ДАН, **382**, N 2, 267 (2002).
- [17] Наговицын И. А., Чудинова Г. К., Румянцева В. Д. и др. Биофизика, **47**, N 4, 625 (2002).

- [18] Б л и н о в Л. М. Успехи химии, **52**, N 8, 1263 (1983).
- [19] "Micelles, membranes, microemulsions, and monolayers" W.M. Gelbart, A. Ben-Shaul, D. Roux, eds. Springer-Verlag New-York, Inc., 1994.
- [20] V i n c e t t P. S., R o b e r t s G. G. Thin Solid Films, **68**, 135 (1980).
- [21] S c h w a r t z D. K. Surface Science Reports, **27**, 241 (1997).
- [22] Химическая энциклопедия, т. 2, под ред. И.Л. Кнунянца. М., Советская энциклопедия, 1990, с. 671.
- [23] Б о н д а р е в С. Л., К н ю к ш т о В. Н. Оптика и спектроскопия, **74**, N 4, 591 (1994).

Институт общей физики
им. А.М. Прохорова РАН

Поступила в редакцию 13 октября 2003 г.