

Гомогенизировать в бытовом миксере 50 г охлажденных листьев шпината в 200 см³ свежеприготовленной среды для измельчения, включая миксер на 3—5 с. Отжать полученную массу через два слоя марли и профильтровать через 8 слоев марли в пластмассовые центрифужные пробирки емкостью 50 см³. Сразу центрифугировать при 0°C так, чтобы общее время для разгона центрифуги от 0 до 4000 г и последующей остановки составило примерно 90 с. Осторожно ресуспендировать осадок с помощью стеклянной палочки и небольшого кусочка гигроскопичной ваты в 1 см³ среды для ресуспендирования (см. выше). В результате получается суспензия хлоропластов, состоящая на 50—80% из хлоропластов типа А (полных), способных к фиксации CO₂ с высокой скоростью.

3.2. Пигменты хлоропластов

Все фотосинтезирующие организмы содержат один или несколько органических пигментов, способных поглощать видимый свет, запуская тем самым фотохимические реакции фотосинтеза. Из большинства листьев эти пигменты можно экстрагировать спиртом или другими органическими растворителями. Выделить индивидуальные пигменты из спиртового экстракта можно методом хроматографии на колонке с сахарной пудрой. Впервые это сделал русский ботаник М. С. Цвет в 1906 г. В растениях и водорослях встречаются пигменты трех основных классов — *хлорофиллы*, *каротиноиды* и *фикобилины*. Хлорофиллы и каротиноиды нерастворимы в воде, а фикобилины растворимы. Каротиноиды и фикобилины называют *вспомогательными*, или *сопровождающими, пигментами*, поскольку энергия квантов света, поглощенных этими пигментами, может передаваться на хлорофилл. В табл. 3.1 приведены характеристики поглощения света этими пигментами. Пигменты фотосинтезирующих бактерий описаны в гл. 7.

Хлорофиллы придают растениям характерный зеленый цвет. Они нерастворимы в воде, но хорошо растворяются в органических растворителях. Хлорофилл *a* имеет голубовато-зеленый цвет, хлорофилл *b* — желтовато-зеленый. Хлорофилл *a* имеется у всех фотосинтези-

Таблица 3.1. Пигменты

Тип пигмента	Характерные максимумы полос поглощения в органических растворителях, нм	Распространение
<i>Хлорофиллы</i>		
Хлорофилл <i>a</i>	420, 660	Все высшие растения и водоросли
Хлорофилл <i>b</i>	435, 643	Все высшие растения и зеленые водоросли
Хлорофилл <i>c</i>	445, 625	Диатомовые и бурые водоросли
Хлорофилл <i>d</i>	450, 690	Красные водоросли
<i>Каротиноиды</i>		
β -Каротин	425, 450, 480	Высшие растения и большинство водорослей
α -Каротин	420, 440, 470	Большинство растений и некоторые водоросли
Лютеол	425, 445, 475	Зеленые водоросли, красные водоросли и высшие растения
Виолаксантол	425, 450, 475	Высшие растения
Фукоксантол	425, 450, 475	Диатомовые и бурые водоросли
<i>Фикобилины</i>		
Фикоэритрины	490, 546, 576	Красные водоросли и некоторые сине-зеленые водоросли (цианобактерии)
Фикоцианины	618	Сине-зеленые водоросли и некоторые красные водоросли
Аллофикоцианины	650	Сине-зеленые и красные водоросли

рующих организмов, способных к выделению кислорода. Хлорофилл *b* обнаружен в листьях высших растений и в зеленых водорослях, причем его содержание примерно втрое меньше содержания хлорофилла *a*. Максимумы поглощения хлорофилла *a* и хлорофилла *b* в эфире находятся при 660 и 643 нм соответственно (рис. 3.7). Максимумы поглощения в ацетоне расположены при 663 и

645 нм. Следует, однако, иметь в виду, что внимательное изучение спектральных свойств живых клеток указывает на существование множественных форм хлорофилла *a* *in vivo*. Эти формы хлорофилла *a* могут быть по-разному связаны с ламеллами и имеют разные фотохимические функции.

Формула молекулы хлорофилла *a* — $C_{55}H_{72}N_4O_5Mg$, формула хлорофилла *b* — $C_{55}H_{70}N_4O_6Mg$. Структурную формулу хлорофилла определил в 1940 г. Фишер (Fischer) в Германии в опытах с последовательным разрушением молекулы пигмента. В 1960 г. Вудворд (Woodward) в Гарварде выполнил полный синтез молекулы хлорофилла и подтвердил правильность структурной формулы, установленной Фишером. Молекула хлорофилла (рис. 3.8) состоит из порфириновой «головки» и фитольного «хвоста». Полярное (растворимое в воде) порфириновое ядро образовано тетрапиррольным кольцом с расположенным в центре атомом магния. По мнению специалистов по электронной микроскопии, хлорофилл в клетке уложен между белковым и липидным

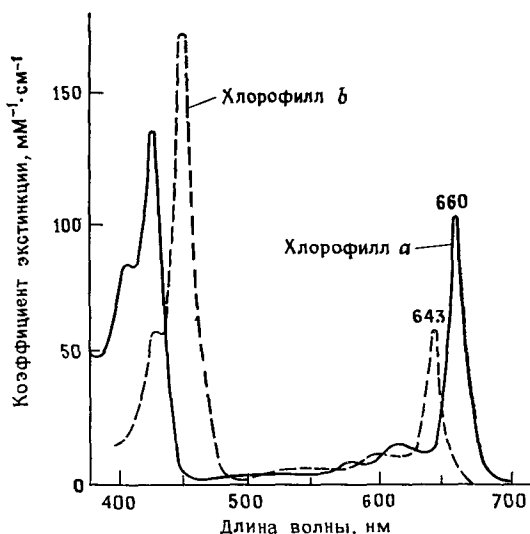


Рис. 3.7. Спектры поглощения хлорофиллов в эфире. [Zscheile, Comar, Bot. Gaz., 102, 463 (1964).]

слоями в ламеллах хлоропластов, причем порфириновая часть молекулы связана с белком, а жирорастворимая фитольная цепь погружена в липидный слой.

Оптические спектры поглощения хлорофилла *a* и хлорофилла *b* пересекаются при 652 нм. Раствор хлорофилла в концентрации 1 мг/мл имеет оптическую плотность 34,5 ед при 652 нм. Арнон разработал метод, позволяющий определять содержание хлорофилла в суспензии хлоропластов, исходя из поглощения при 652 нм. Для этого нужно взять 0,1 мл суспензии хлоропластов, разбавить ее 80%-ным ацетоном до объема 20 мл, перемешать и отфильтровать. Далее следует измерить оптическую плотность профильтрованного раствора при 652 нм в спектрофотометре, пользуясь кюветами с длиной оптического пути 1 см и используя 80%-ный ацетон в качестве контрольного образца. Умножив полученную величину на 5,8, получаем концентрацию хлорофилла

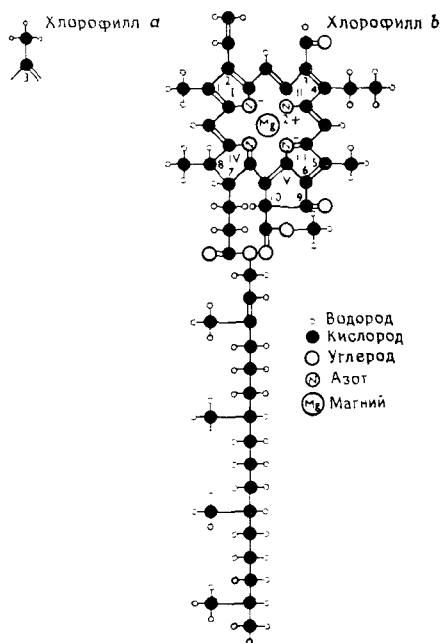


Рис. 3.8. Структурные формулы хлорофиллов *a* и *b* (Heath, 1969).

в исходной суспензии хлоропластов, выраженную в миллиграммах на 1 мл.

Каротиноиды — это желтые или оранжевые пигменты, найденные во всех фотосинтезирующих клетках. В зеленых листьях каротиноиды обычно незаметны из-за наличия в листьях хлорофилла, но осенью, когда хлорофилл разрушается, именно желтые каротиноиды придают листьям характерную осеннюю окраску. В молекулах каротиноидов имеется система сопряженных двойных связей, характерная для полиенов. По своему строению каротиноиды обычно являются либо углеводородами (каротины), либо окисленными углеводородами, т. е. кислородсодержащими (каротинолы или ксантофиллы). Они образуют 40-звенную углеродную цепь, построенную из изопреновых субъединиц (рис. 3.9). Спектры поглощения каротиноидов характеризуются наличием трех полос в области от 400 до 550 нм. В лемеллах хлоропласта каротиноиды расположены в непосредственной близости от хлорофилла. Поглощенная каротиноидами энергия может передаваться хлорофиллу *a* и использоваться для фотосинтеза. Кроме того, каротиноиды могут защищать молекулы хлорофилла от чрезмерного фотоокисления на слишком ярком свете.

Сине-зеленые водоросли и красные морские водоросли содержат группу пигментов, называемых *фикобилинами* (рис. 3.10). Фикобилины представляют собой тетрапиррольные структуры, похожие на хлорофилл *a*, но с линейным расположением пиррольных колец. Кроме того, они не имеют боковой фитольной цепи и не содержат магния. Хромофоры фикобилинов ковалентно связаны с полипептидами и образуют водорастворимые фикобилипротеиды. Известны три класса фикобилинов — *фикоэритрины*, *фикоцианины* и *аллофикоцианины*. Красные фикоэритрины найдены во всех красных водорослях (см. табл. 3.1). Они поглощают свет в середине видимой области спектра. Эта особенность позволяет красным водорослям, живущим глубоко под поверхностью моря, осуществлять фотосинтез, пользуясь слабым голубовато-зеленым светом, прошедшим сквозь толщу воды. Чем глубже обитают красные водоросли, тем больше они содержат фикоэритрина по сравнению с хлорофиллом. Голубые пигменты фикоцианины и аллофико-

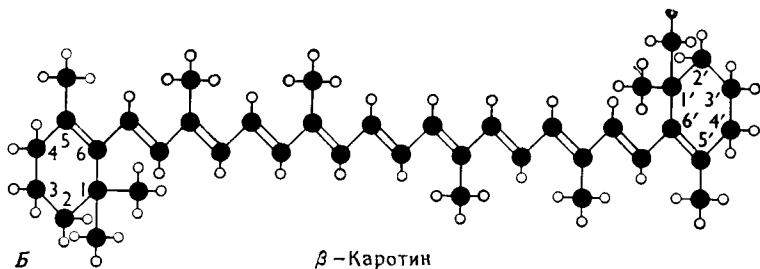
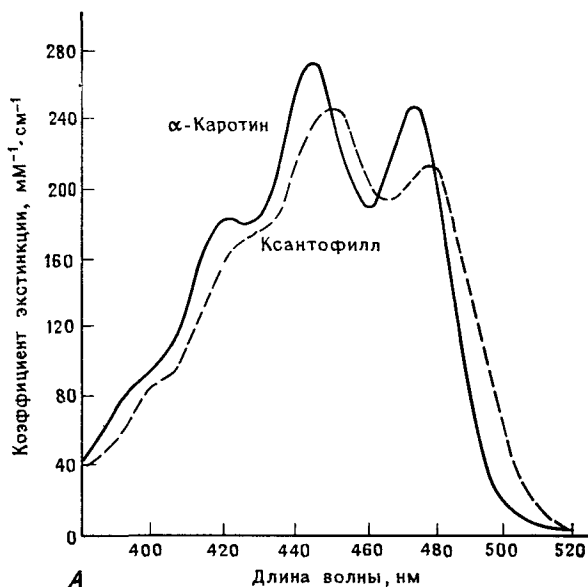
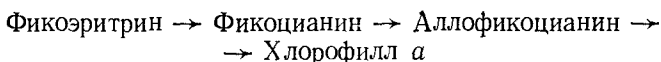


Рис 3.9. А. Спектры поглощения α -каротина и ксантофилла [Zscheile et al., *Plant Physiol.*, 17, 331 (1942).] Б. Структура β -каротина (Heath, 1969).

цианины встречаются в сине-зеленых водорослях, живущих в поверхностных слоях воды в озерах и на суше. Энергия, поглощенная фикобилинами (вспомогательными, или сопровождающими, пигментами), передается хлорофиллу и используется в фотохимических реакциях. Методами пикосекундной спектроскопии (1 пикосекунд-

да = 1 пс = 10^{-12} с) показано, что перенос энергии в красной водоросли *Porphyridium cruentum* происходит в последовательности



Таким образом, в ходе эволюции водоросли и высшие растения научились синтезировать различные пигменты для того, чтобы с наибольшей эффективностью улавливать имеющийся солнечный свет и осуществлять фотосинтез. Относительное содержание разных пигментов зависит от биологического вида, условий обитания, времени года и ряда других факторов.

Помимо пигментов ламеллы хлоропластов содержат многие белки, липиды, хиноны, ионы металлов. Роль некоторых из них в процессе фотосинтеза была выяснена с помощью метода дифференциальной спектрофотометрии (см. гл. 4). Обнаруженные в хлоропластах два цитохрома — цитохром *b₆* и цитохром *f* — участвуют в фотосинтетическом транспорте электронов. В хлоропластах обнаружены также синий медьсодержащий белок *пластоцианин*, *ферредоксин* — белок, содержащий негемовое железо, и флавопротеид *ферредоксин* — $NADP^+$ редукта-

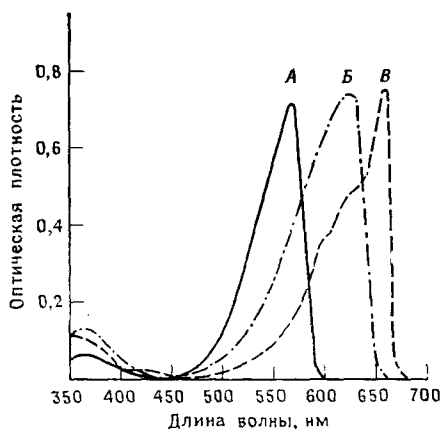


Рис. 3.10. Спектры поглощения фикобилипротеидов в видимой области. А — фикоэритрин; Б — аллофикоцианин; В — фикоцианин. (Bennet A., Bogorad L., *Biochemistry*, 10, 3625, 1971.)

за. Считается, что пластохинон участвует в ранних стадиях переноса электрона от возбужденных молекул хлорофилла. Цинк, железо, магний и марганец — вот некоторые из ионов металлов, обнаруженных в ламеллах хлоропластов.

3.3. Фотосинтетическая единица

Молекулы хлорофилла объединяются в функциональные комплексы. Фотосинтетической единицей называют такой комплекс пигментов и других молекул, в котором реакционный центр связан процессами переноса энергии возбуждения с антенной, состоящей из светособирающих пигментов (рис. 3.11). В соответствии с этим представлением любой квант энергии, поглощенный одной из примерно 250 молекул хлорофилла, передается на реакционный центр. Реакционный центр содержит специальную пару молекул хлорофилла *a*. Попав на реакционный центр, энергия кванта света запускает процесс переноса электрона. Идея о существовании фотосинтетической единицы возникла на основе следующих наблюдений:

1. Для фотосинтетического восстановления 1 молекулы CO_2 и выделения 1 молекулы O_2 необходимо, чтобы молекулы хлорофилла поглотили примерно 8 квантов света. Если бы каждая молекула хлорофилла в растении была способна к фотохимическим реакциям, то под действием достаточно мощной вспышки света произошло бы выделение примерно 1 молекулы O_2 на каждые 8 имеющихся молекул хлорофилла. Однако опыты Эмерсона и Арнольда со вспышками света (гл. 2) показали, что в суспензии клеток *Chlorella* наибольший выход кислоро-

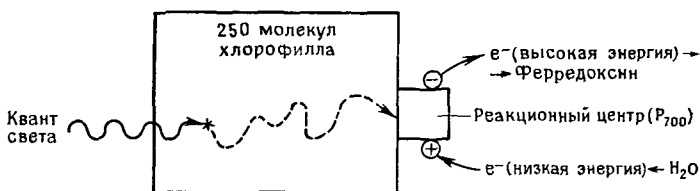


Рис. 3.11. Схема фотосинтетической единицы. Каждый квант света взаимодействует с ансамблем, состоящим из 250 молекул хлорофилла и содержащим один реакционный центр P_{700} .