

§ 7.2. ХЛОРОФИЛЛ И ДРУГИЕ ПИГМЕНТЫ

Во всех фотосинтезирующих клетках, за исключением фотосинтезирующих бактерий, фигурирует хлорофилл *a* (Chl *a*). В бактериях вместо Chl *a* присутствует бактериохлорофилл

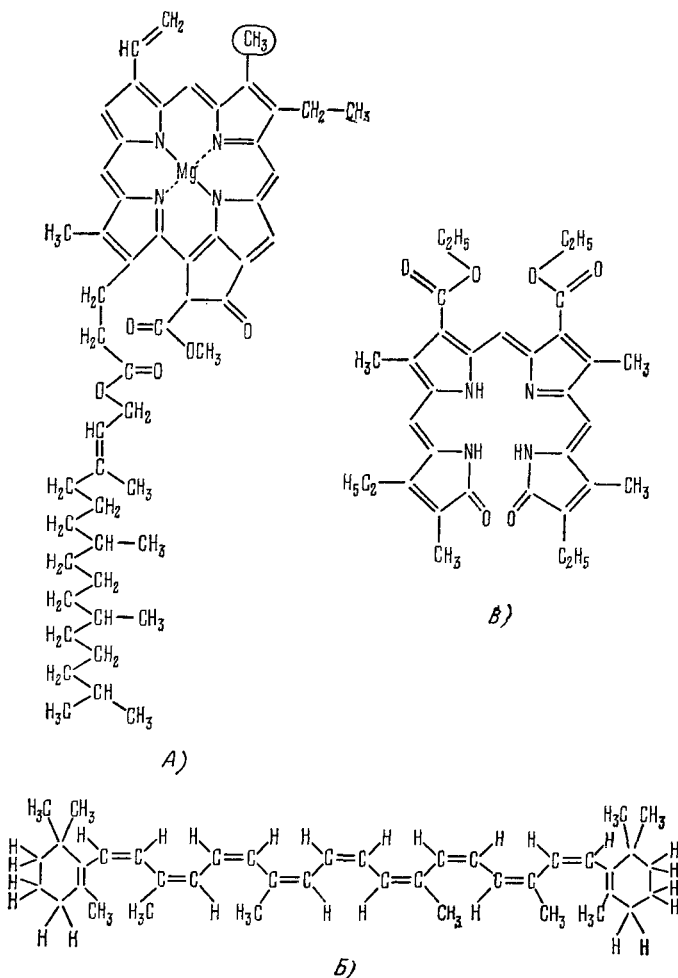


Рис. 7.3. Структурные формулы некоторых пигментов.
 А—хлорофилл *a*. В хлорофилле *b* обведенная кружком группа CH_3 заменена на $-\text{HC}=\text{O}$;
 Б— β -каротин; В—фикоэритробилин.

В Chl. Chl *a* имеет сине-зеленую окраску. Менее универсально, хотя и обычно, присутствие хлорофилла *b* (Chl *b*). В литературе

описаны и другие хлорофиллы, содержащиеся в разных типах водорослей. Строение $\text{Chl } a$ и $\text{Chl } b$ показано на рис. 7.3, А. В основе структуры находится порфириновое кольцо, ответственное за поглощение света в видимой области спектра. В центре кольца расположен атом Mg . Заметим попутно, что порфириновые циклы в комплексах с другими атомами фигурируют в ряде важнейших для биологии веществ — в геме (атом Fe), в гемоцианинах (атом Cu) и др. [12].

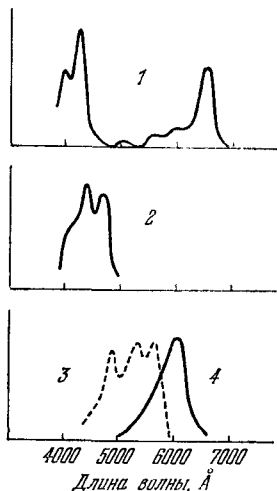
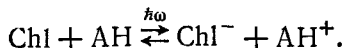


Рис. 7.4. Полосы поглощения хлорофилла a (1), каротиноида (2), фикоэритрина (3) и фикоцианина (4). По оси ординат — оптическая плотность.

На рис. 7.4 показаны полосы поглощения $\text{Chl } a$, каротиноида, фикоэритрина и фикоцианина [1].

Основная проблема химии и физики фотосинтеза состоит в раскрытии механизма преобразования энергии света в химическую энергию, запасаемую в синтезируемых органических соединениях. Хлорофилл — вещество, определяющее фотосинтез; энергия света, им поглощенная, используется для фотосинтеза. Очевидно, что исследования указанной проблемы целесообразно начинать с простых фотохимических реакций с участием хлорофилла. Именно это направление начали с 1948 г. развивать Красновский и его сотрудники (см. [10, 11]).

Реакция Красновского, открытая в 1948 г. [13], состоит в обратимом фотовосстановлении хлорофилла



Тем самым, световая энергия трансформируется *in vitro* в химическую при участии хлорофилла. Восстановителем, т. е. донором электрона в этих опытах служил аскорбат. Восстановленный

Таблица 7.1

Спектральные характеристики растительных пигментов

Тип пигмента	Максимумы поглощения, Å		Растения, содержащие пигмент
	в органических растворителях	в клетках	
I. Хлорофиллы			
Chl <i>a</i>	4200, 6600	4350, 6700—6800 (несколько форм)	Все фотосинтезирующие растения кроме бактерий
Chl <i>b</i>	4530, 6430	4800, 6500	Высшие растения и зеленые водоросли
Chl <i>c</i>	4450, 6250	Полоса 6450	Диатомеи и бурые водоросли
Chl <i>d</i>	4500, 6900	Полоса 7400	Некоторые красные водоросли
Бактериовиридин	Две формы: 1) 4250, 6500 2) 4320, 6600	Полосы 7500 или 7600	Зеленые бактерии
B Chl <i>a</i>	3650, 6050, 7700	Полосы 8000, 8500, 8900	Пурпурные и зеленые бактерии
B Chl <i>b</i>	3680, 5820, 7950	Полоса 10 170	Штамм пурпурных бактерий <i>Rhodospseudomonas</i>
II. Каротиноиды			
IIa. Каротины			
α-каротин	В гексане 4200, 4400, 4700		Многие листья и водоросли. Главный каротин в красных водорослях и в группе зеленых водорослей
β-каротин	В гексане 4250, 4500, 4800		Главный каротин во всех других растениях
γ-каротин	В гексане 4400, 4600, 4950		Главный каротин в зеленых серных бактериях
IIb. Каротинолы (ксантофиллы)			
Лютеол	В этаноле 4250, 4450, 4750		Главный в зеленых и красных водорослях
Виолксантол	В этаноле 4250, 4500, 4750		Второй важнейший каротинол листьев
Фукоксантол	В гексане 4250, 4500, 4750		Главный в диатомеях и бурых водорослях
Спириллоксантол	В гексане 4640, 4900, 5240		Пурпурные бактерии

Таблица 7.1 (продолжение)

Тип пигмента	Максимумы поглощения, Å		Растения, содержащие пигмент
	в органических растворителях	в клетках	
III. Фикобилины			
Фикоэритрин	В H ₂ O и <i>in vivo</i> 4900, 5460, 5760		Главные в красных водорослях
Фикоцианины	В H ₂ O и <i>in vivo</i> 6180		Главные в сине-зеленых водорослях
Аллофикоцианины	В фосфатном буфере, pH 6,5 6540		Красные и сине-зеленые водоросли

хлорофилл может быть окислен вновь. По-видимому, возбужденные светом молекулы хлорофилла восстанавливаются *in vivo* за счет воды. Таким образом, главный пигмент растительных клеток — хлорофилл — непосредственно участвует в окислительно-

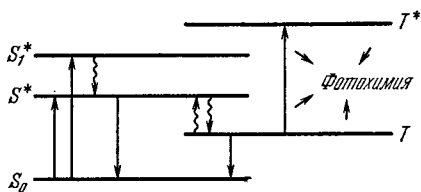
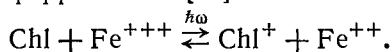


Рис. 7.5. Схема электронных уровней хлорофилла по Красновскому [11].

восстановительных реакциях при освещении. К этим реакциям относится и обратимое фотоокисление хлорофилла ферри-ионом [14]:

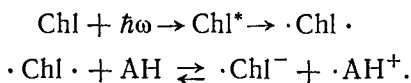


Каков же механизм реакции Красновского?

На основании исследований спектров поглощения и флуоресценции хлорофилла и его аналогов можно считать, что электронные уровни хлорофилла расположены так, как показано на рис. 7.5. В темноте молекула находится на нижнем синглетном электронном уровне S_0 . Полосы поглощения Chl соответствуют переходам $S_0 \rightarrow S^*$ (в красной области) и $S_0 \rightarrow S_1^*$ (в синей области спектра). Обратный переход $S_1^* \rightarrow S^*$ — безызлучательный (показан волнистой стрелкой); флуоресценция соответствует переходу $S^* \rightarrow S_0$. С уровня S^* возможен безызлучательный переход в триплетное состояние T , являющееся метастабильным. При поглощении света в этом состоянии Chl переходит в возбужденное триплетное состояние T^* . Об образовании метастабильного триплетного состояния хлорофилла свидетельствует фосфоресценция его замороженных растворов [15]. Схема рис. 7.5 дана в упрощенном виде, на ней не указаны колебательные уровни.

Теренин рассмотрел роль триплетных состояний в фотохимии красителей (пигментов) [16]. В этих состояниях молекула находится в неустойчивой активной конфигурации, несущей большую часть поглощенной энергии светового кванта. Такие молекулы способны эффективно участвовать в химических превращениях и в процессах миграции энергии. Роль триплетных состояний определяется большой длительностью их жизни и химической ненасыщенностью вследствие наличия неспаренных электронов.

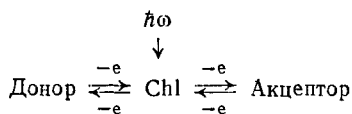
Соответственно, обратимое фотовосстановление хлорофилла можно представить схемой



Точка изображает неспаренный электрон, по-видимому, делокализованный в системе сопряженных связей порфиринового цикла. Красновский и его сотрудники доказали методом ЭПР, что при фотовосстановлении хлорофилла возникают свободные радикалы [11, 17—20].

Как уже сказано, хлорофилл подвергается и фотоокислению, в частности, кислородом при интенсивном освещении растворов Chl на воздухе. Эти явления также были детально изучены в работах Красновского и его школы [11, 21—25].

Таким образом, хлорофилл, будучи возбужден светом, может играть роль и донора, и акцептора электрона.



Сказанное относится и к ряду других порфириновых соединений — аналогов хлорофилла.

Спектр поглощения Chl *a in vivo* характеризуется сложным характером его красной полосы поглощения [26]. Это заставляет думать о наличии нескольких форм хлорофилла. Жизнь растения несомненно связана с химическими превращениями хлорофилла, биосинтез которого является важной особенностью фотосинтезирующих клеток (см. [27]). Красная полоса поглощения смещается, когда листья живого растения, выросшие в темноте, постепенно зеленеют на свету. Наличие нескольких форм хлорофилла доказывается тем, что во время постепенной его экстракции из листьев спектр поглощения меняется [28]. Различные формы, возможно, связаны с разными типами специфической агрегации молекул хлорофилла.

Энергия света, поглощенного хлорофиллом и другими пигментами, как уже сказано, может запастись, переноситься от молекулы одного пигмента к молекуле другого, мигрировать между тождественными молекулами, излучаться в актах флуоресценции и фосфоресценции и рассеиваться, превращаясь в тепло. Проблемы, связанные с этими явлениями, рассматриваются далее. Во всех случаях первичный акт фотохимического процесса состоит в поглощении света. Эффективность использования энергии световых квантов, поглощенных вспомогательными пигментами, варьирует от 20 до 100% эффективности использования энергии, поглощенной *Chl a*.

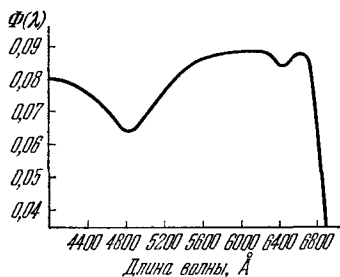


Рис. 7.6. Спектр действия (квантовый выход) фотосинтеза для хлореллы.

Если P — число молекул O_2 , продуцируемых в 1 с, I_a — число квантов, поглощаемых в 1 с, то $f(\lambda)$ означает квантовый выход фотосинтеза, обозначаемый $\Phi(\lambda)$. На рис. 7.6 показан график функции $\Phi(\lambda)$ для хлореллы [29]. Снижение квантового выхода в области 4500—5000 Å, соответствующей поглощению света каротиноидами, заставляет думать, что эти вещества являются относительно слабыми сенсibilizаторами фотосинтеза. Напротив, в области поглощения света фикобилинами такого падения $\Phi(\lambda)$ нет и, следовательно, фикобилины имеют такую же эффективность, как и *Chl a*. Из анализа спектров действия следует, что эффективность каротиноидов меняется от 20 до 50% эффективности *Chl a*, эффективность фикоэритрина — от 60 до 100%.

Абсолютное значение максимального квантового выхода характеризует число квантов, необходимых для выделения одной молекулы O_2 . Пользуясь методом дифференциальной манометрии, Эмерсон и Чалмерс [30] определяли порознь выделение O_2 и поглощение CO_2 при фотосинтезе. Это было осуществлено также другими методами. Количественные данные показывают, что число квантов, поглощаемых при выделении одной молекулы кислорода, равно 8 (см. [1]). Отсюда следует, что для переноса каждого атома водорода от H_2O к CO_2 нужно два кванта;

По-видимому, одна из функций вспомогательных пигментов состоит в снабжении хлорофилла *a* поглощенной энергией.

Количественное исследование фотохимического процесса требует прежде всего изучения спектра действия света, т. е. зависимости скорости продукции кислорода P от числа поглощенных квантов I_a и длины волны λ . Спектром действия называется функция

$$P/I_a = f(\lambda). \quad (7.2)$$

Если P — число молекул O_2 , продуцируемых в 1 с, I_a — число кван-

По другим данным число квантов, приходящихся на молекулу O_2 варьирует от 8 до 12.

Характерной особенностью кривых $\Phi(\lambda)$ является резкое падение квантового выхода в длинноволновой, красной, области спектра («красное падение»). Оно наблюдается вблизи 6800 Å в зеленых водорослях и вблизи 6500 Å — в красных. Сходный эффект обнаруживается в спектре действия реакции Хилла [1]. Как мы увидим, объяснение красного падения не тривиально. $Chl a$ поглощает свет в этой области. Соответственно возникает вопрос, отвечает ли красная полоса поглощения $Chl a$ одному или нескольким электронным переходам. Если справедливо второе, то одни переходы могут быть эффективными, другие — неэффективными при фотосинтезе.

В работах лабораторий Красновского (см. [11, 31]) и Ливингстона [32] было показано, что хлорофилл частично агрегирует в неполярных растворителях, вероятно, образуя димеры. Применение современных методов исследования — электронографии [33], инфракрасной спектроскопии и спектроскопии ЯМР к изучению агрегации пигментов позволило обосновать представление о том, что в димере образуется координационная связь карбонильной группы одной молекулы Chl с центральным атомом Mg другой молекулы [34]. Агрегированные формы $Chl a$ и других пигментов получены в модельных системах — в концентрированных растворах, монослоях и пленках [35]. В модельных системах наблюдаются спектры поглощения и люминесценции, сходные с таковыми *in vivo*. Установлено, что обратимые окислительно-восстановительные фотореакции свойственны как мономерным, так и агрегированным формам (см. [11]).

Как уже указывалось, в растениях наблюдается ряд «спектральных форм» хлорофилла, в частности, $Chl a$. Среди них имеются и агрегированные. В работах Литвина и сотрудников [35, 36] установлено, что в различных фотосинтезирующих организмах фигурирует один и тот же набор форм хлорофилла. Число таких форм велико, для $Chl a$ оно более 10.

Допустим, что длинноволновая часть полосы поглощения принадлежит димерам, Chl_2 , в которых происходит более быстрая конверсия энергии электронного возбуждения в колебательную энергию. В этом случае димер Chl_2 малоэффективен в фотосинтезе, и красное падение объясняется. Другое объяснение состоит в том, что $Chl a$ *in vivo* фигурирует в нескольких формах, различающихся положением полос поглощения, а также фотохимической эффективностью и выходом флуоресценции. Действительно, как показано на рис. 7.6, красная полоса $Chl a$ состоит из двух компонентов примерно равной интенсивности, 6700 и 6800 Å. Имеются указания на наличие третьего слабого компонента у 6950 Å.

Ряд дополнительных фактов подсказывает, однако, что красное падение требует более сложного объяснения. Здесь очень важен эффект Эмерсона, состоящий в том, что свет, неэффективный в далекой красной области, становится полностью эффективным при одновременном освещении более коротковолновым излучением, например при комбинированном воздействии светом с λ 7000 и 6500 Å [37]. Эффект Эмерсона показан на рис. 7.7. Действие двойного облучения неаддитивно, выделение O_2 существенно больше суммарного эффекта при освещении двумя типами излучения, примененными порознь. Количественно эффект Эмерсона характеризуется величиной

$$\varepsilon = \frac{\Delta O_2 \text{ (комбинированное — } \Delta O_2 \text{ (коротковолновое освещении) освещении)}}{\Delta O_2 \text{ (длинноволновое освещении)}}, \quad (7.3)$$

где ΔO_2 — скорость выделения кислорода. Спектр действия эффекта, т. е. зависимость ε от длины волны добавочного коротковолнового света, показывает, что ε особенно велико, когда большая часть этого света поглощается одним из вспомогательных пигментов — Chl *b* в зеленых водорослях, Chl *c* или фикоксантолом в диатомеях и фикобилином в красных и сине-зеленых водорослях. Отсюда следует, что для полной эффективности фотосинтеза нужно поглощение одного кванта хлорофиллом *a* и другого — одним из вспомогательных пигментов. Красное падение происходит в области, в которой свет поглощается только Chl *a*.

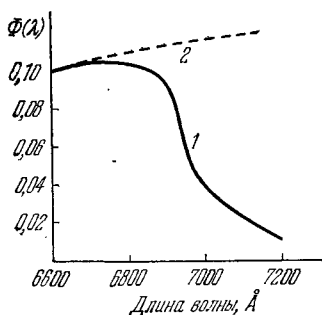


Рис. 7.7. Эффект Эмерсона в хлорелле.

1 — график $\Phi(\lambda)$ при длинноволновом освещении, 2 — график $\Phi(\lambda)$ при добавочном коротковолновом освещении.

В красных водорослях падение квантового выхода происходит при сравнительно малой длине волны 6500 Å. Это наглядно объясняется предполагаемым поглощением двух квантов. Красные водоросли не содержат Chl *b* и область поглощения Chl *a* простирается в них примерно до 6500 Å, при более длинных волнах становится заметным поглощение света фикоцианином.

Однако предложенная интерпретация не свободна от неясностей. Фикобилин сенсibilизирует флуоресценцию Chl *a* в красных водорослях. Иными словами, кванты, поглощаемые вспомогательными пигментами, переносятся на Chl *a*. Перенос является количественным. Остается непонятным, каким образом те же кванты могут нести иную фотохимическую функцию.

Более детальное исследование эффекта Эмерсона показало, что наряду с максимумами $\epsilon(\lambda)$, соответствующими вспомогательным пигментам, в полосе поглощения $\text{Chl } a$ имеется максимум при 6800 Å (рис. 7.8) [38]. Этот результат показал, что эффект Эмерсона определяется поглощением одного кванта одной формой хлорофилла a и второго кванта — другой его формой. Максимумы на кривой спектра действия связаны не с поглощением вспомогательных пигментов, но с резонансным переносом энергии возбуждения с этих пигментов на активную форму $\text{Chl } a$.

Из изложенных фактов следует гипотеза о двух фотохимических системах, действующих в фотосинтезе — ФС I и ФС II [1, 39]. Система II флуоресцирует сильно, система I — слабо. В зеленых растениях ФС II содержит хлорофилл a с максимумами поглощения 6700 и 6800 Å, но не 6950 Å. ФС I содержит все эти три формы $\text{Chl } a$. Кванты, поглощенные $\text{Chl } a$ 6700 и $\text{Chl } a$ 6800, переносятся в ФС I на $\text{Chl } a$ 6950 и энергия их диссипирует, чем и объясняется низкий выход флуоресценции. Появление пика при 6700 Å на кривой $\epsilon(\lambda)$ объясняется тем, что ФС II содержит большую долю $\text{Chl } a$ 6700, чем ФС I .

Если две фотохимические системы сенсibiliзируют две последовательные фотохимические реакции, то они должны действовать с одинаковой скоростью. Свет поглощается одновременно в обеих системах, но в неодинаковой степени. При $\lambda > 6500$ Å в красных водорослях и при $\lambda > 6800$ Å в зеленых водорослях система I получает избыточную, а система II недостаточную энергию, чем и объясняется красное падение. Нарушается баланс, необходимый для совместной работы двух систем. Баланс этот улучшается при одновременном освещении более коротковолновым светом [1].

§ 7.3. ДВЕ ФОТОХИМИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ

Если световые реакции, сенсibiliзированные двумя фотохимическими системами, происходят последовательно, то можно определить спектр поглощения каждой системы, измерив спектры действия фотосинтеза при сильном, но не насыщающем воздействии светом, поглощаемым другой системой. Скорость общей реакции в этом случае определяется лимитирующим

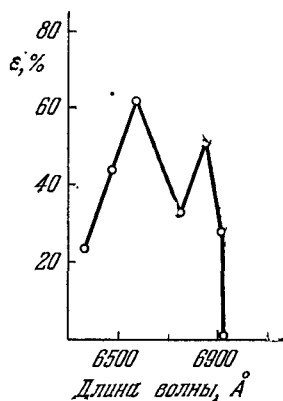


Рис. 7.8. Спектр действия эффекта Эмерсона для хлореллы.