

5773
3-45

Э.А.ЗАХИДОВ, М.А.ЗАХИДОВА

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ
КОНТРОЛЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССОВ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ
СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ**



ТАШКЕНТ

5723
3-45

3

МИНИСТЕРСТВО ВЫСШЕГО И СРЕДНЕГО
СПЕЦИАЛЬНОГО ОБРАЗОВАНИЯ РЕСПУБЛИКИ
УЗБЕКИСТАН

Э.А.ЗАХИДОВ, М.А.ЗАХИДОВА

**ФЛУОРЕСЦЕНТНЫЕ МЕТОДЫ
КОНТРОЛЯ ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ
ПРОЦЕССОВ ПРЕОБРАЗОВАНИЯ
СОЛНЕЧНОЙ ЭНЕРГИИ**

*Министерством высшего и среднего специального образования
Республики Узбекистан рекомендовано в качестве учебного пособия для
студентов ВУЗов*



ТАШКЕНТ – 2015

УДК: 557.355.4 (075)
ББК 28.57
3-38

3-38 Захидов Э.А., Захидова М.А. Флуоресцентные методы контроля фотосинтетических процессов преобразования солнечной энергии. —Т.: «Fan va texnologiya», 2015, 96 стр.

ISBN 978-9943-983-20-5

В пособии описаны научные основы и важнейшие области применения флуоресцентных методов контроля эффективности процесса фотосинтеза. Рассмотрены электронные энергетические состояния фотосинтетических молекул, динамика их возбуждения и релаксации, которые определяют энергетические и кинетические характеристики флуоресценции. Описаны различные виды флуорометров, основанных на измерении мгновенной, замедленной или переменной флуоресценции в листьях растений и фотосинтезирующих бактериях с высокой чувствительностью, и временным разрешением для изучения процесса фотосинтеза в оптимальных условиях и при воздействии стрессов окружающей среды. Представлен список литературы, который дает подробную информацию о физических основах и современном состоянии исследований по флуоресценции фотосинтезирующих систем. Пособие рассчитано на биологов, физиков-бакалавров, магистров и старших научных сотрудников-исследователей, специализирующихся в области биофизики, биоэнергетики, фотосинтеза, а также применения лазерной физики и оптической спектроскопии.

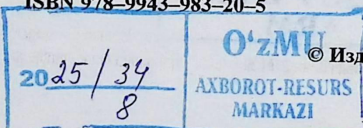
УДК: 557.355.4 (075)
ББК 28.57

Рецензенты:

С.С.Курбанов — д.ф.-м.н.;
Р.М.Абдуллаев — к.ф.-м.н.

Рекомендовано к изданию решением Учёного совета НУУЗ им.Мирзо Улугбека от 30 апреля 2014 года (протокол №9).

ISBN 978-9943-983-20-5



© Изд-во «Fan va texnologiya», 2015.

ВВЕДЕНИЕ

Флуоресценция является отражением свойств электронных состояний молекул, т.к. переход из возбужденного электронного состояния в основное вызывает излучение флуоресценции. Она дает ценную информацию об энергетике и симметрии возбужденного и основного состояний, времени жизни возбужденного состояния и ориентации дипольных моментов перехода молекул.

Флуоресценция оказалась важнейшим инструментом фотосинтетических исследований, т.к. является одной из альтернативных путей фотохимического усвоения поглощенной световой энергии [1]. Возможность рассмотрения функционирования фотосинтезирующих организмов в нативной форме без разрушения их структуры и функции составляет главное преимущество флуоресцентных методов для изучения живых систем, каковым относятся фотосинтезирующие организмы. При этом спектры флуоресценции позволяют изучить сложную энергетику их молекул-пигментов, а ее кинетика - быстрые процессы переноса возбуждения в светособирающей антенне (ССА) и зарядов в реакционном центре (РЦ) фотосинтетического аппарата.

Используя теоретические подходы, такие как, например, индуктивно-резонансный механизм переноса энергии, скорости переноса можно напрямую связать с геометрией молекул, определенной методом рентгеновской кристаллографии, а также с основными их спектроскопическими свойствами [2].

Роль трансмембранного электрического поля, образуемого при первичном разделении зарядов в РЦ можно оценить по воздействию прилагаемого внешнего электрического поля на интенсивность и кинетику релаксации флуоресценции [3]. Большинство наших знаний о первичных процессах фотосинтетического преобразования энергии получены именно из флуоресцентных измерений.

Флуоресценция хлорофилла и бактериохлорофилла, двух важнейших пигментов фотосинтеза, в целых организмах или в

препаратах фрагментов фотосинтетических мембран дают информацию об их роли в первичных процессах преобразования энергии [4]. Так как возбужденные электронные состояния существуют в промежутке между начальным поглощением фотонов и конечным состоянием разделенных зарядов, приводящим к преобразованию световой энергии в химическую, контроль параметров флуоресценции позволяет изучить динамику первичных процессов фотосинтеза.

В пособии описаны основные характеристики, экспериментальные методы и приборные средства изучения флуоресценции хлорофилла и бактериохлорофилла, важнейших функциональных пигментов фотосинтезирующих организмов. Показана возможность контроля скорости и эффективности различных этапов фотосинтеза с помощью характеристик флуоресценции хлорофилла, в том числе при воздействии на фотосинтезирующие организмы различных внутренних и внешних стресс-факторов.

I. ОБРАЗОВАНИЕ И РЕЛАКСАЦИЯ ВОЗБУЖДЕННЫХ ЭЛЕКТРОННЫХ СОСТОЯНИЙ МОЛЕКУЛ В ФОТОСИНТЕТИЧЕСКИХ СИСТЕМАХ

Рассмотрим последовательность событий, включающей в себя возникновение электронного возбуждения и его релаксацию. Начнем с перечисления «собственных» свойств электронных возбужденных состояний одной, изолированной молекулы такого пигмента, как хлорофилл или бактериохлорофилл. Затем рассмотрим последствия сбора их в хромофоры в пигмент-белковых комплексах фотосинтетических мембран. Происходящая при этом делокализация возбуждения имеет ключевое значение для функционирования ССА в режиме сбора света. Затем рассмотрим роль РЦ как фотохимической ловушки, отбирающей энергию возбуждения для преобразования в химическую энергию. Временные масштабы событий в этой последовательности процессов могут составить несколько фемтосекунд (для перевода молекулы из основного в возбужденное состояние), пикосекунды (для захвата возбуждения РЦ), от пикосекунд до наносекунд (для разделения и переноса зарядов в РЦ в различных стадиях), а их обратный ход, приводящий к замедленной флуоресценции, может характеризоваться нано- микро- или миллисекундами.

Молекула, излучающая флуоресценцию, может возбуждаться путем прямого поглощения фотона, переноса возбуждения из других молекул-пигментов, или же за счет возврата возбуждения из центра его захвата. В каждом из этих случаев флуоресценция имеет свои характерные зависимости от времени, длины волны, степени деполяризации, и т.п. Во многих случаях каждую стадию данного комплексного физического процесса можно отслеживать, используя измерения с временным разрешением. Но стационарные измерения, которые, по существу, являются усреднением зависящих от времени характеристик, также дают полезную информацию для исследования и интерпретации релаксации возбужденного состояния.

Поглощение электромагнитного излучения молекулой можно точно описать, используя квантовую механику. Подробное описание этих вопросов можно найти в ряде монографий (см., например, ставшие классическими, монографии А.С.Давыдова или Дж.Р.Лакович [5,6].

Для больших хромофорных молекул типа фотосинтетических пигментов в белковом окружении, ход процесса является достаточно сложным и не может описываться точно. Но, при этом, весь процесс полезно разделить на ряд стадий, которые можно рассмотреть отдельно.

Такой подход, схематически показанный на рис. 1, основывается на следующих понятиях и допущениях:

- *Спектр поглощения* молекулы отражает энергетическую зависимость вероятности достижения частично возбужденного электронного состояния. Энергия поглощаемого фотона соответствует разности энергий начального и конечного состояний молекулы, а дипольный момент перехода описывает кванто-механическую связь между основным и возбужденным состояниями.

- *Возбужденные электронные состояния* фотосинтетических пигментов относятся делокализованным π -электронам, связанным с сопряженными или ароматическими связями в хлорофиллах и других молекулах тетрапиррольной группы, а также в каротиноидах [7].

- *Неоднородное уширение* полосы поглощения вызывается огромным количеством микросостояний, присутствующих в начальном термическом распределении конфигураций основного состояния молекул и с таким же огромным разнообразием конфигураций возбужденного состояния.

- *Релаксация ядерной конфигурации* в возбужденном электронном состоянии является последствием изменения в распределении заряда из-за перевода электрона из орбиты основного состояния в орбиту возбужденного состояния. Эта релаксация обуславливается обменом энергией между внутренними модами движения хромофора, а также взаимным обменом с другими молекулами окружения, особенно с белковой матрицей и другими близлежащими хромофорами.

- *Термическое равновесное состояние* устанавливается, когда конфигурация состояний достигнет распределения, соответ-

вующего температуре окружения. Типично, это происходит за несколько пикосекунд после поглощения фотона и за исключением молекул каротиноида, имеющих очень короткое время возбужденного состояния, завершается до начала флуоресценции [8]. Когда значительная часть флуоресценции происходит до термализации возбужденного состояния, это можно регистрировать путем сравнения спектров поглощения/возбуждения флуоресценции со спектром излучения флуоресценции.

Возможные пути диссипации возбужденного электронного состояния следующие:

- Флуоресценция – излучательная релаксация возбужденного состояния S_1 обратно в основное состояние, O . Вероятность данного процесса определяется квантомеханическими принципами, которые связаны с поглощением излучения из основного состояния. Спектр флуоресценции типично сдвинут в красную сторону (стоксов сдвиг) относительно спектра поглощения, т.к. возбужденное электронное состояние молекулы имеет измененную (из-за релаксации) ядерную конфигурацию. Это приводит к более низкой энергии возбужденного состояния, согласно *принципу Франка-Кондона*.

- Внутренняя конверсия (ВК) – безызлучательный переход в более низкое энергетическое состояние. В этом случае энергия возбужденного состояния дезактивируется термическим путем при релаксации с отдачей энергии в окружающую среду.

- Синглет-триплетный переход (СТ) – конверсия между синглетным и триплетным состояниями с изменением мультиплетности электронного спина, формально запрещенная квантовой механикой. Но, в сложных молекулах такой переход возможен и может быть каналом распада синглетных возбужденных состояний.

- Перенос возбуждения – миграция возбуждения от донорной молекулы к акцепторной. Происходит в процессе индуктивного резонанса в соответствии с теорией Фёрстера [9]. Механизм индуктивного резонанса может вызвать перенос возбуждения между молекулами одного или разного типов. Вероятность и скорость переноса в соответствии с теорией Фёрстера зависят от спектра перекрытия энергий, обратной величины шестой степени расстояния и относительной ориентации донорной и акцепторной молекул, а также собственного времени жизни флуоресценции донора.

- Тушение - любой процесс, который уменьшает время жизни возбужденного состояния в системе по сравнению с «уединенной» молекулой. Захват возбуждения РЦ, приводящий к разделению зарядов, является примером фотохимического тушения. Другие виды тушения могут быть связаны с дополнительными молекулами-тушителями, Q , имеющих парамагнитную природу, тяжелыми атомами/ионами, акцепторами переноса возбуждения или агрегатами пигментов. Эти всевозможные виды тушения конкурируют с флуоресценцией, как релаксационным процессом: они снижают выход флуоресценции, но, вместе с тем, появляется возможность контролировать процесс тушения по флуоресцентному сигналу [10].

- Поляризация является следствием векторной природы поглощения и излучения света. Дипольные моменты перехода, связанные с этими процессами, характеризуются как величиной (связанной с «силой осциллятора» перехода), так и направлением относительно осей молекул. Для молекулы с фиксированной ориентацией в пространстве, вероятность того, что она поглотит свет, зависит от направления распространения падающего света и относительной ориентации вектора осциллирующего электрического поля света. Последующее излучение из возбужденного состояния поляризовано так, что оно зависит от вектора момента перехода и от угла между направлениями наблюдения и возбуждения. Деполаризация флуоресценции может вызываться внутримолекулярной релаксацией из высоких электронных состояний, вращением молекулы в течение времени жизни возбужденного состояния или же переносом возбуждения на молекулу с другой ориентацией, которая затем излучает флуоресценцию [11].

- Время жизни флуоресценции определяется, в первую очередь, собственным временем жизни возбужденного состояния молекулы, которое может уменьшаться конкурирующими процессами. Собственное время жизни (10 - 20 нсек для большинства хлорофиллов) определяется дипольным моментом перехода спонтанного излучения, A (коэффициент Эйнштейна). Для молекул, с известными конфигурациями основного и возбужденного состояний, собственное время жизни можно рассчитать из абсорбционных характеристик молекул [12].

- *Выход флуоресценции* пропорционален населенности возбужденного состояния, которая вызывает флуоресценцию. Т.к. выход флуоресценции уменьшается конкурирующими процессами релаксации возбужденного состояния, уменьшение выхода флуоресценции напрямую связано с уменьшением времени жизни флуоресценции. Процессы диссипации энергии возбужденного состояния хлорофилла в фотосинтезирующих системах приводят к уменьшению выхода флуоресценции, что является одним из методов контроля (мониторинга) интенсивности фотосинтеза [13].

- *Релаксация флуоресценции* простых молекул в растворах с низкой концентрацией при слабой освещенности имеет кинетику первого порядка по концентрации возбужденного состояния. Это приводит к простому, одноэкспоненциальному спаду. Отклонения от такой простой кинетики могут вызываться неоднородной населенностью возбужденных состояний и свидетельствуют о наличии различного окружения молекул с высокими значениями концентрации возбужденных состояний в местах, вызывающих аннигиляцию возбуждения, что значительно истощает населенность основного состояния при высокоинтенсивном импульсном возбуждении или же в долгоживущих тушителях (центры в триплетном состоянии, окисленные или восстановленные РЦ и т.п.). В фотосинтетических мембранах или пигментных комплексах спад флуоресценции никогда не бывает одноэкспоненциальной. Фактически, именно эта сложность часто дает возможность глубже взглянуть на природу процессов переноса возбуждения и захвата в фотосинтезе [14].

- *Фосфоресценция* является излучением, связанным с релаксацией из наинизшего возбужденного энергетического уровня (как обычно триплетного) в основное состояние. Спектр фосфоресценции молекулы отличается от ее флуоресценции. Фосфоресценция часто имеет более длинные волны, чем флуоресценция и более длительное время релаксации (от миллисекунд до секунд) т.к. она включает в себя процессы, запрещенные согласно квантовой механике. Хотя имеются сообщения о наблюдении фосфоресценции хлорофилла [15], она не играет важной роли в исследовании фотосинтеза.