

Р. П. ТАМКИВИ

## ИССЛЕДОВАНИЕ ГОМОПЕРЕНОСА ЭНЕРГИИ С ПОМОЩЬЮ СПЕКТРАЛЬНО СЕЛЕКТИВНОЙ КИНЕТИКИ НИЗКОТЕМПЕРАТУРНОЙ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ХЛОРОФИЛЛОВ

Общепризнано, что одним из важнейших звеньев в цепи первичных процессов фотосинтеза является безызлучательный перенос энергии (ПЭ) электронного возбуждения различных форм хлорофилла. Поэтому исследования ПЭ в хлорофилловых растворах весьма необходимы для более полного понимания соответствующих процессов *in vivo*. Наше обращение к данной, довольно интенсивно изучаемой тематике (см., напр., обзор [1]) связано со следующими обстоятельствами.

Как известно, межмолекулярный ПЭ обычно исследуется тремя методами, основанными на спектроскопически наблюдаемых явлениях концентрационного 1) тушения, 2) изменения закона затухания и 3) деполяризации люминесценции. Последнее из них до сих пор было практически единственным источником сведений о гомопереносе энергии между химически идентичными молекулами. Однако сопоставление результатов измерения деполяризации с соответствующей теорией встречает известные трудности (см. [2]). Несостоятельность первых двух методов в случае гомопереноса связана с невозможностью выделения такого подмножества из одинаковых молекул, которое состояло бы преимущественно либо из доноров, либо из акцепторов энергии. Цель настоящего сообщения — продемонстрировать возможности изучения гомопереноса между молекулами хлорофилла (Хл) с помощью спектрально селективной низкотемпературной флуорометрии — т. е. с помощью модификации второго метода.

Как было неоднократно показано, спектры идентичных молекул в низкотемпературных твердых матрицах подвергаются статистическому разбросу по частотам 0—0-перехода (рис. 1). Возникающее по этой

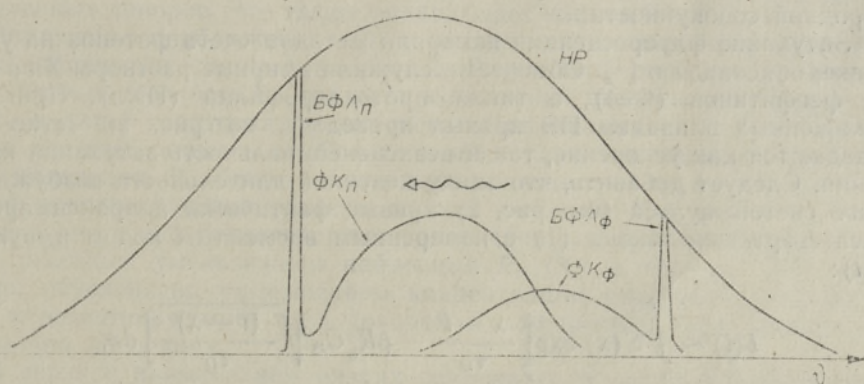


Рис. 1. Неоднородное распределение (НР) низкотемпературных однородных спектров молекул. Показаны бесфононные линии (БФЛ) и фононные крылья (ФК) спектров флуоресценции (Ф) и поглощения (П). Стрелкой указано направление ПЭ.



причине неоднородное уширение спектров Хл достигает  $\sim 300 \text{ см}^{-1}$  [3]. Нами было проведено изучение времен затухания  $\tau$  низкотемпературной флуоресценции Хл, монохроматически регистрируемой в пределах неоднородной полосы [4]. Обнаруженное концентрационное укорочение одноэкспоненциальных значений  $\tau$  на коротковолновом краю полосы мы интерпретировали как проявление ферстеровского ПЭ вдоль неоднородного спектрального распределения молекул Хл. Как видно из рис. 1, молекулы, излучающие на коротковолновом краю полосы, участвуют в ПЭ в основном как доноры. Монохроматически регистрируемые кривые затухания свечения таких молекул должны содержать наиболее доступную информацию об этом процессе.

Закон затухания свечения доноров энергии в теории Ферстера—Галанина [5] можно записать так:

$$I_D(t) \sim \exp\left(-\frac{t}{\tau_D} - \beta R_0^3 C_A \sqrt{\frac{t}{\tau_D}}\right). \quad (1)$$

Здесь  $\tau_D$  — время жизни возбужденного состояния доноров в отсутствие ПЭ,  $C_A$  — концентрация акцепторов,  $R_0$  — т. н. критический радиус ПЭ, служивший мерой эффективности ПЭ.  $R_0$  пропорционален интегралу перекрывания спектра излучения доноров и спектра поглощения акцепторов. Коэффициент  $\beta$  в случае полностью замороженных молекул равен  $\approx 3,77 \cdot 10^{-3}$  ( $R_0$  измеряется в Å, а  $C_A$  — в моль/л) [2].

Нетрудно видеть, что основные условия применимости теории Ферстера—Галанина в исследуемой нами ситуации выполнены. Однако непосредственному использованию формулы (1) препятствует неоднородный состав акцепторов. Как показано в [6], тогда во втором члене экспоненты надо суммировать по всем сортам акцепторов ( $R_0$  и  $C_A$  зависят от природы акцептора), что в нашем случае сводится к интегралу по неоднородному распределению. Даже для весьма простых моделей это ведет к довольно сложным и трудноинтерпретируемым выражениям. \* Отметим, что поскольку последние содержат параметры как однородных, так и неоднородного спектров (см. рис. 1), такой подход может давать информацию о самом неоднородном распределении.

В данной работе мы аппроксимировали измеренные на коротковолновом спаде полосы флуоресценции кривые затухания формулой для однородного состава акцепторов, отдавая себе отчет в том, что определяемый таким образом  $R_0$  соответствует взвешенной сумме интегралов перекрывания по неоднородному распределению акцепторов. Другими словами, наш  $R_0$  представляет собой меру эффективности ПЭ от спектрально выделенных молекул ко всем возможным акцепторам из неоднородной совокупности.

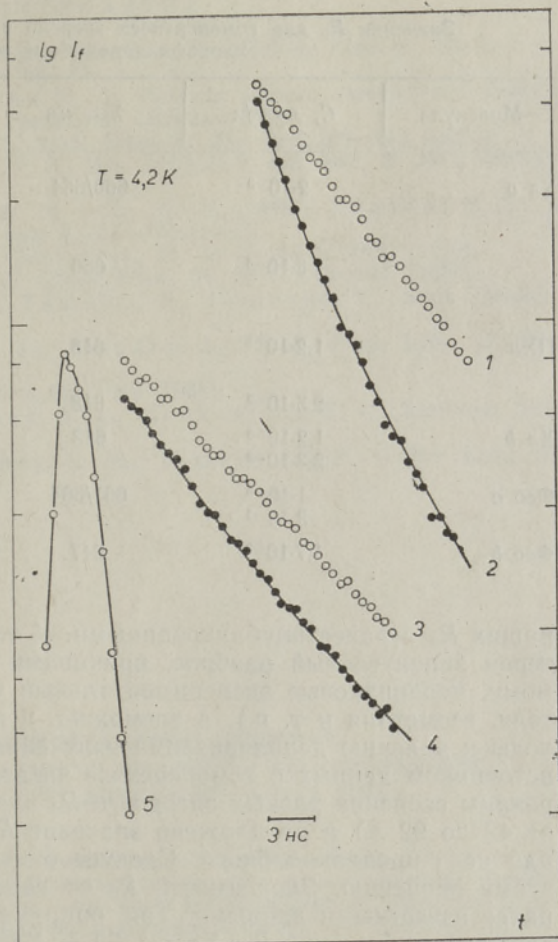
Затухание флуоресценции измеряли методом счета фотонов на установке, описанной в [4]. Объектами служили эфирные растворы Хл *a* и *b*, их феофитинов (Фео), а также протохлорофилла (ПХл). Примеры искаженных влиянием ПЭ кривых приведены на рис. 2. Четко наблюдаются как ускорение, так и неэкспоненциальность затухания излучения. Следует добавить, что ввиду конечной длительности возбуждающего светового импульса (см. рис. 2) кривые фактически аппроксимировались свертками закона (1) с измеренным временным ходом импульса  $S(t)$ :

$$I(t) \sim \int_0^t S(x) \exp\left[\frac{x-t}{\tau_D} - \beta R_0^3 C_A \sqrt{\frac{(t-x)}{\tau_D}}\right] dx, \quad (2)$$

\* Аналоги (1) в случае спектральной неоднородности выведены «из первичных принципов» для предела, когда неоднородная ширина  $\ll kT$  (см. напр., [7] и ссылки там), т. е. для случая, обратного нашему.



Рис. 2. Кривые затухания флуоресценции Хл *a* (1, 2), зарегистрированной при 660 нм, и ПХл (3, 4) при 618 нм. Концентрации:  $5 \cdot 10^{-6}$  (1, 3),  $2 \cdot 10^{-3}$  (2) и  $1,2 \cdot 10^{-3}$  моль/л (4). Показана форма возбуждения (5). Сплошные линии — наилучшие аппроксимации с формулой (2).



причем за  $\tau_D$  были взяты  $\tau$ , полученные на той же длине волны флуоресценции разбавленных растворов. \*\*

Вместо  $C_A$  мы везде пользовались полной концентрацией раствора  $C$ . Это оправдано, с одной стороны, выбором точки регистрации излучения (доля еще более «коротковолновых» молекул мала). С другой стороны, для большинства возможных акцепторов ПЭ определяется перекрыванием фоновых крыльев (см. рис. 1). Относительно широкие ( $\sim 100 \text{ см}^{-1}$ ) фоновые крылья спектров Хл были экспериментально наблюдаемы методом выжигания провала [9]. Проведенный нами модельный расчет (где все изображенные на рис. 1 контуры были взяты гауссовыми) показал, что в случае характерных для Хл величин параметров однородных и неоднородного спектров существенный вклад в сумму интегралов перекрывания вносят практически все молекулы, 0—0-переход которых лежит в длинноволновой стороне от спектрально выделенных доноров. Это также оправдывает наш выбор  $C_A$ .

Наилучшие приближения (2) к экспериментальным кривым показаны сплошными линиями на рис. 2. Результаты определения вышеизложенным способом  $R_0$  для ряда соединений сведены в таблицу.

Если наша трактовка причин искажения кривых затухания верна,  $R_0$  не должны зависеть от  $C$ , что и наблюдается в экспериментах на всех молекулах. В общем регистрация проводилась по возможности в самой коротковолновой области полосы свечения. Как видно из таблицы, сдвиг точки регистрации к более длинным волнам сопровождается заметным уменьшением найденных  $R_0$  (Хл *a*, Фео *a*). Это, очевидно, обусловлено уменьшением концентрации акцепторов, подходящих к регистрируемому типу доноров, и нарушением чисто донорного характера последних.

В связи с применением низких температур и новой методики следует с осторожностью относиться к сравнению численных значений

\*\* Как показано в [3], некоторая зависимость  $\tau$  даже в очень разбавленных растворах Хл от длины волны низкотемпературной флуоресценции сохраняется.



Значения  $R_0$  для гомопереноса энергии в замороженных растворах хлорофиллоподобных молекул

Молекула	$C$ , моль/л	$\lambda_{рег}$ , нм	$T$ , К	$R_0$ , Å
Хл <i>a</i>	$2 \cdot 10^{-3}$	660/664	5	64/61
			20	65/63
			50	66/63
	$5 \cdot 10^{-3}$	660	5	65
			20	65
			50	67
ПХл	$1,2 \cdot 10^{-3}$	618	5	46
			50	47
	$2,5 \cdot 10^{-3}$	618	5	46
Хл <i>b</i>	$1,2 \cdot 10^{-3}$	643	4,2	51
	$2,3 \cdot 10^{-3}$			50
Фео <i>a</i>	$1 \cdot 10^{-3}$	661/664	4,2	68/63
	$3 \cdot 10^{-3}$			67/64
Фео <i>b</i>	$1,7 \cdot 10^{-3}$	647	4,2	50

наших  $R_0$  с ранее опубликованными. К тому же для последних характерен значительный разброс, причинами которого являются, по-видимому, неодинаковые экспериментальные условия (методика, растворители, геометрия и т. п.), а возможно, и различные теоретические подходы к явлению деполяризации излучения [10], служившему основным источником данных о гомопереносе энергии. В обзоре [1] проанализированы сведения разных авторов о  $R_0$  для Хл *a* (в интервале значений от 42 до 92 Å) и предложено значение  $R_0 \approx 70$  Å в качестве наиболее для него правдоподобного. Следует отметить близость нашего  $R_0$  к этому значению. Зависимость  $R_0$  от соединения также согласуется с ранее известными данными. Так, например, в [11] при 300 К получены следующие значения  $R_0$ : Хл *a* — 50 Å, Хл *b* — 43 Å, Фео *a* — 52 Å (ср. с таблицей). Найденный нами большой  $R_0$  вновь подтверждает высокую эффективность ПЭ между молекулами Хл *a* — главного фотосинтетического пигмента.

Была снята и температурная зависимость  $R_0$  для Хл *a* и ПХл. Как видно из таблицы, повышение температуры ведет к некоторому его росту. Такой, находящийся на пределе ошибок измерений рост может быть связан с увеличением эффективности ПЭ за счет включения актов ПЭ с участием матричных фононов. Альтернативным объяснением может служить температурный сдвиг неоднородной полосы, влияющий на  $R_0$  аналогично сдвигу длины волны регистрации излучения. Учет последней возможности при постановке эксперимента, в принципе, позволяет исследовать и участие колебаний в процессах ПЭ.

Итак, можно заключить, что развитый в данной работе подход открывает возможность как наблюдать, так и количественно исследовать ПЭ в системах с большим неоднородным уширением, в том числе и в замороженных растворах хлорофиллоподобных молекул. Уместно упомянуть еще о применении его к детектированию ПЭ для Хл *in vivo* [12], хотя количественная трактовка в этом случае остается пока предметом будущих исследований.

Автор благодарен Р. А. Авармаа за постоянный интерес к данной работе и ценные замечания, а также С. А. Куузик и В. И. Нымм за очистку и приготовление образцов.



## ЛИТЕРАТУРА

1. Кнох, R. S., In: Primary Molecular Events in Photobiology, Elsevier, Amsterdam—London—New York, 1973, p. 45—77.
2. Агранович В. М., Галанин М. Д., Перенос энергии электронного возбуждения в конденсированных средах, М., «Наука», 1978.
3. Avarmaa, R., Rebane, K., Stud. Biophys., **48**, № 3, 209—218 (1975).
4. Тамкиви Р. П., Авармаа Р. А., Изв. АН СССР, сер. физ., **42**, № 3, 568—572 (1978).
5. Förster, T., Ann. Phys., **2**, № 1—2, 55—75 (1948); Галанин М. Д., Ж. эксперим. и теор. физ., **28**, вып. 4, 485—495 (1955).
6. Blumen, A., Manz, J., J. Chem. Phys., **71**, № 11, 4694—4702 (1979).
7. Klafter, J., Silbey, R., J. Chem. Phys., **72**, № 2, 843—848 (1980).
8. Avarmaa, R., Soovik, T., Tamkivi, R., Tõnissoo, V., Stud. Biophys., **65**, № 3, 213—218 (1977).
9. Avarmaa, R., Mauring, K., Suisalu, A., Chem. Phys. Lett., **77**, № 1, 88—92 (1981).
10. Кнох, R. S., Physica, **39**, № 2—3, 361—368 (1968).
11. Gurinovitch, G. P., Losev, A. P., Zenkevitch, E. I., Spectrosc. Lett., **11**, № 7, 493—511 (1978).
12. Avarmaa, R. A., Kochubey, S. M., Tamkivi, R. P., FEBS Lett., **102**, № 1, 139—142 (1979).

*Институт физики  
Академии наук Эстонской ССР*

R. P. TAMKIVI

### ENERGIA HOMOÜLEKANDE UURIMINE KLOROFÜLLIDE MADALATEMPERATUURILISE FLUORESTSENTSII SPEKTRAALSELT SELEKTIIVSE KINEETIKA ABIL

Elektronergastuse energia kiirguseta homoülekanne klorofüllisarnaste molekulide vahel on jälgitav madalatemperatuurilise fluorestsentsi kineetika monokromaatilise registreerimise teel. Registreerimislaonepikkuse sobiv valik mittehomoogeenselt laienenud kiirgusriba piires võimaldab otsest võrdlust Förster-Galanini teooriaga. On määratud rea ühendite kriitilised ülekanteraadiused ning hinnatud kõnealuse lähenemisviisi iseärasusi ja perspektiive.

R. P. TAMKIVI

### INVESTIGATION OF THE ENERGY HOMOTRANSFER VIA THE SPECTRALLY SELECTIVE KINETICS OF LOW-TEMPERATURE FLUORESCENCE OF CHLOROPHYLLS

The homotransfer of electronic excitation energy between chlorophyll-like molecules is observable due to monochromatic registration of the kinetics of the low-temperature fluorescence. A suitable choice of the registration wavelength within the limits of inhomogeneously broadened emission band enables to realize a direct comparison with Förster-Galanin theory. The critical transfer radii for a number of compounds are determined. Features and perspectives of the approach are discussed.