

УДК 577.355

**СИНГЛЕТ-ТРИПЛЕТНОЕ ДЕЛЕНИЕ ВОЗБУЖДЕНИЯ
КАРОТИНОИДОВ ПУРПУРНОЙ ФОТОТРОФНОЙ
БАКТЕРИИ *Thermochromatium tepidum***

И. Б. Клена, А. А. Грязнов, З. К. Махнева, И. И. Проскураков*

Представлено академиком РАН В.А. Шуваловым 27.07.2018 г.

Поступило 27.07.2018 г.

Получены свидетельства межмолекулярного характера деления возбуждения с участием двух молекул каротиноидов пурпурной фототрофной бактерии *Thermochromatium tepidum*.

Ключевые слова: синглет-триплетное деление возбуждения, каротиноиды, светособирающие комплексы, фототрофные бактерии.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524854511-514>

Преобразование солнечной энергии в химическую у пурпурных фототрофных бактерий на первичных стадиях происходит с участием пигмент-белковых комплексов периферической антенны LH2 и комплекса LH1–RC. В состав обоих комплексов входят поглощающие свет пигментные молекулы — бактериохлорофиллы (Бхл) и каротиноиды (Кар). Комплекс LH1–RC содержит прицентровую антенну LH1 и реакционный центр (РЦ), осуществляющий указанное преобразование энергии. Комплексы LH2 не содержат реакционных центров и обеспечивают поглощение света и передачу электронного возбуждения на LH1 [1]. Известно, что процессы переноса энергии и реакции фотопереноса электрона в РЦ идут с высокой скоростью и с квантовой эффективностью, близкой к единице. Каротиноиды LH1 и LH2 поглощают свет в области прозрачности бактериохлорофиллов (450–550 нм) и за время в пико- и субпикосекундном диапазоне передают энергию молекулам Бхл. Несмотря на высокую скорость, эффективность переноса энергии $^1\text{Кар}^* \rightarrow \text{Бхл}$ у некоторых пурпурных бактерий не превышает 25–30% [2]. Такое необычное поведение в значительной степени связано с процессом синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов, $^1\text{Кар}^* \rightarrow ^3\text{Кар} + ^3\text{Кар}$. Явление синглет-триплетного деления возбуждения открыто в 1965 г. в молекулярных кристаллах [3]. Интерес к этому явлению резко возрос после 2004 г., когда была выдвинута идея, что его использование может существенно повысить КПД фотопреобразователей. С тех пор синглет-

триплетное деление возбуждения активно исследуется с целью выяснения механизмов этого процесса и поиска материалов, его осуществляющих. Изучение данного явления в Кар важно как для понимания первичных процессов фотосинтеза, так и для решения прикладных задач повышения эффективности преобразователей энергии света.

Первая прямая регистрация синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов LH1 пурпурной бактерии *Rhodospirillum rubrum* была выполнена в [4] методом пикосекундной спектроскопии. В этой работе высказано предположение, что деление возбуждения протекает внутримолекулярно, с локализацией двух триплетов на половинках одной молекулы Кар. Было показано, что деление возбуждения происходит менее чем за 5 пс, что объясняет его конкуренцию с переносом энергии на Бхл. Триплетные состояния Бхл в этом процессе не образуются. Позднее методом ЭПР высокого временного разрешения нами было показано [5], что в комплексах LH2 *Allochrochromatium minutissimum* регистрируются спектры, соответствующие локализации триплетных состояний на отдельных молекулах каротиноидов, что свидетельствует о межмолекулярном механизме деления возбуждения. В недавней работе [6] методом оптического флеш-фотолиза проведено количественное сравнение выцветания полосы поглощения Кар за счёт образования триплетного состояния и появления полосы $^3\text{Кар}$ в комплексах LH1–RC и LH2 *Thermochromatium tepidum* и *Rhodobacter sphaeroides*. На основе этого анализа был сделан вывод о внутримолекулярном механизме деления возбуждения.

В целях проверки данного результата мы провели исследование комплексов LH1–RC и LH2 *Th. tepi-*

Институт фундаментальных проблем биологии
Российской Академии наук, Пушкино Московской обл.
*E-mail: pros@isspp.serpukhov.su

dum методами ЭПР-спектроскопии и модуляции квантового выхода триплетных состояний магнитным полем, чему и посвящено настоящее сообщение.

Комплексы LH1–RC и LH2 выделяли по методике [7] с помощью гель-электрофореза. Измерения спектров ЭПР трёхсантиметрового диапазона с высоким временным разрешением проводили, как описано в [7]. Измерения флуоресценции выполняли на установке флеш-фотолиза, состоящей из монохроматора МДР-4 (ЛОМО, СССР), фотоумножителя ФЭУ-83 и осциллографа НДО4022 (“Teledyne LeCroy”, США). Образец помещали в зазор электромагнита. Для возбуждения образцов использовали лазерную вспышку, как при измерениях ЭПР. Во всех случаях возбуждение проводили в полосу поглощения каротиноидов (470 нм). Количественный состав каротиноидов определялся хроматографически, как описано в [8].

Анализ состава каротиноидов показал, что комплексы LH1–RC содержали в основном спириллоксантин (72 мол.%, число сопряжённых двойных связей $n = 13$). Основные каротиноиды LH2 — родопин ($n = 11$), 44 мол.% и дидегидрородопин ($n = 12$), 30 мол.%. В работе [6] триплеты каротиноидов анализируются через 150 нс после возбуждающей вспышки света.

На рис. 1 приведены спектры ЭПР триплетных состояний каротиноидов комплексов LH1–RC и LH2 *Th. tepidum*, измеренные за время 150–170 нс после вспышки. Форма спектров качественно совпадает с наблюдавшимися ранее в *Al. minutissimum* [7] и описывается параметрами расщепления в нулевом поле (РНП) $|D| = 0,0225 \text{ см}^{-1}$, $|E| = 0,0022 \text{ см}^{-1}$ (LH1–RC) и $|D| = 0,0250 \text{ см}^{-1}$, $|E| = 0,0028 \text{ см}^{-1}$ (LH2). Величина РНП зависит от длины системы сопряжённых связей каротиноида [9]. Наблюдаемые в LH1–RC параметры РНП соответствуют триплетному состоянию преобладающего каротиноида спириллоксантина ($n = 13$). В случае LH2 спектр интерпретируется в предположении равного вклада каротиноидов с $n = 11$ и 12, что также достаточно хорошо согласуется с анализом каротиноидного состава. Важно отметить, что эти параметры однозначно указывают на локализацию триплетных состояний на отдельных молекулах Кар. В случае внутримолекулярного механизма деления возбуждения, т.е. при локализации триплетов на половинах молекул Кар [4, 6], могут регистрироваться спектры ЭПР, соответствующие сопряжённой системе связей с $n = 5, 6$ или 7. Согласно [9] параметр РНП $|D|$ при этом составлял бы 0,0810; 0,0650

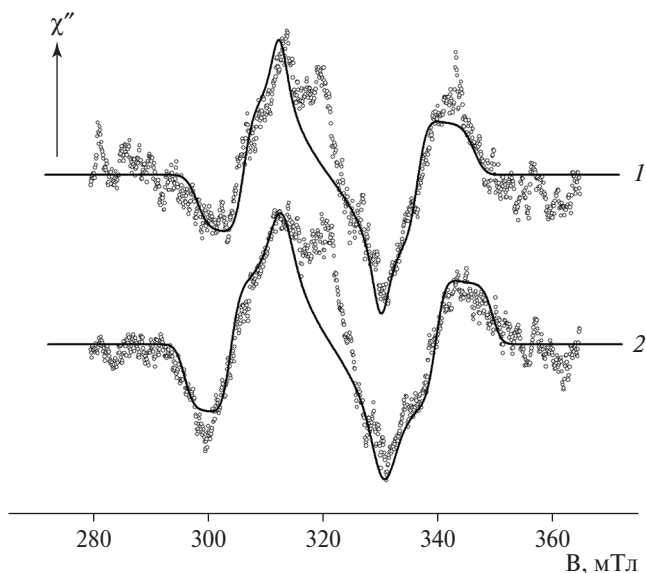


Рис. 1. Спектры ЭПР комплексов LH1–RC (1) и LH2 (2) при возбуждении в полосу поглощения каротиноидов (470 нм). $T = 200 \text{ К}$. Низкая интенсивность сигналов вызвана проведением измерений на пределе временного разрешения спектрометра ЭПР. Сплошными линиями показаны расчётные спектры ЭПР при параметрах РНП, определённых из спектров с высоким отношением сигнал/шум. Здесь и на рис. 2 поглощение образцов было выровнено при 470 нм.

и $0,0535 \text{ см}^{-1}$ соответственно. Регистрация таких триплетов с использованием ЭПР трёхсантиметрового диапазона возможна, однако в полученных нами спектрах этого не зарегистрировали. Сигналы в центральной области спектров, не описываемые моделью, принадлежат, возможно, примеси квинтетных состояний.

К сожалению, неравновесная спиновая поляризация существенно осложняет оценку наблюдаемого числа молекул $^3\text{Кар}$ из спектров ЭПР. Существует вероятность того, что в ЭПР наблюдается небольшая доля $^3\text{Кар}$, по каким-то причинам локализованных на отдельных молекулах, в то время как основное количество триплетов не может быть зарегистрировано спектрометром в диапазоне 3 см. Такая ситуация может возникнуть при локализации двух триплетов на одной молекуле Кар и достаточно сильных (превышающих энергию кванта СВЧ спектрометра) спин-спиновых взаимодействий. Мы проверили это предположение, измерив зависимость выхода $^3\text{Кар}$, регистрируемую по изменению флуоресценции Бхл образца, от накладываемого магнитного поля. При наличии сильных взаимодействий между двумя триплетами такая зависимость отсутствует в полях, более слабых, чем эти взаимодействия [10]. Возбуждённое состояние $^1\text{Кар}^*$ (синглет-

ный уровень S_2) дезактивирует по трём каналам: перенос возбуждения на Бхл (~30% в LH2 *Th. tepidum* [11]), синглет-триплетное деление возбуждения (~30% в хроматофорах *R. rubrum* [12] и 25% в LH1 *R. rubrum* [4]). Оставшаяся часть возбуждения растрачивается в тепло. Для примерной оценки примем, что все три канала имеют одинаковую вероятность. Упрощённая теория влияния магнитного поля предсказывает, что в сильных полях вероятность синглет-триплетного деления возбуждения уменьшается на $1/3$ [10], т.е. в случае внутримолекулярного деления возбуждения в сильных полях квантовый выход $^3\text{Кар}$ упадёт до ~22%, а ~11% перераспределится между двумя оставшимися каналами, увеличив выход флуоресценции до ~38%. Таким образом, эффект магнитного поля на флуоресценцию Бхл составит ~17%. В случае межмолекулярного деления возбуждения по этому каналу растрачивается около 16% энергии, и расчёт влияния магнитного поля на флуоресценцию даёт величину ~6%.

На рис. 2 представлены результаты измерения влияния магнитного поля на выход флуоресценции. Общий вид зависимостей соответствует известным ранее для процесса синглет-триплетного деления возбуждения [10] в отсутствие сильных спин-спиновых взаимодействий. Кривые рис. 2 не выходят на насыщение в поле 170 мТл. Можно считать, что амплитуда эффекта с учётом принятых упрощений

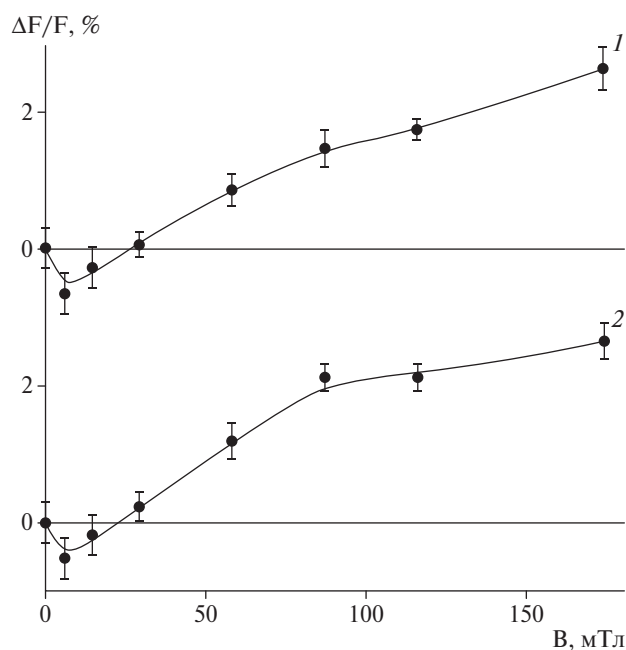


Рис. 2. Относительные изменения флуоресценции комплексов LH1–RC (1) и LH2 (2), вызванные наложением постоянного магнитного поля. $T = 200\text{ K}$, $\lambda = 885\text{ нм}$, $M \pm m$, $n = 5$.

достаточно хорошо согласуется с предположением о межмолекулярном механизме деления возбуждения. В любом случае вклад слабо взаимодействующих между собой триплетных состояний достаточно большой, чтобы повлиять на результаты [6]. Следует особо отметить качественное совпадение результатов для LH1–RC и LH2 комплексов (рис. 2, кривые 1 и 2). В работе [6] утверждается, что эти комплексы существенно различаются по вкладам мономолекулярного механизма деления возбуждения, что должно приводить к разным магнитным эффектам в этих препаратах.

Таким образом, полученные нами результаты противоречат выводам, сделанным в работе [6], о внутримолекулярном механизме синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов *Th. tepidum*. Причины такого расхождения сложно проанализировать, поскольку в работе [6] не приведено достаточно подробного описания условий эксперимента для проведения подобного анализа. Вывод о межмолекулярном механизме деления возбуждения подтверждается также данными работы [13]. Межмолекулярный механизм имеет важное преимущество перед мономолекулярным с точки зрения использования явления деления возбуждения для создания фотопреобразователей солнечной энергии, поскольку при этом понижается вероятность потерь энергии за счёт триплет-триплетной аннигиляции.

В заключение отметим, что биологический смысл потерь энергии при делении возбуждения каротиноидов остаётся до конца невыясненным. Возможно, этот процесс является частью механизма защиты бактерий от высокой интенсивности света.

Источник финансирования. Работа поддержана грантом РНФ в рамках темы АААА-А17–117030110140–5.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Hashimoto H., Sugai Y., Uragami C., Gardiner A.T., Cogdell R.J. // J. Photochem. Photobiol. C. 2015. V. 25. P. 46–70.
2. Frank H.A., Cogdell R.J. The Photochemistry and Function of Carotenoids in Photosynthesis. In: Carotenoids in Photosynthesis. B.: Springer-Science, 1993. Ch. 8. P. 252–326.
3. Smith M.B., Michl J. // Chem. Rev. 2010. V. 110. P. 6891–6936.
4. Gradinaru C.C., Kennis J.T.M., Papagiannakis E., van Stokkum I.H.M., Cogdell R.J., Fleming G.R., Niederman R.A., van Grondelle R. // Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 2001. V. 98. P. 2364–2369.
5. Клемина И.Б., Махнева З.К., Москаленко А.А., Прокураков И.И. // ДАН. 2011. Т. 441. № 6. С. 833–836.

6. Yu J., Fu L.-M., Yu L.-J., Shi Y., Wang P., Wang-Otomo Z.-Y., Zhang J.-P. // J. Amer. Chem. Soc. 2017. V. 139. P. 15984–15993.
7. Кленина И.Б., Махнева З.К., Москаленко А.А., Кузьмин А.Н., Проскуряков И.И. // Биофизика. 2013. Т. 58. № 1. С. 54–63.
8. Ashikhmin A., Makhneva Z., Moskalenko A. // Photosynth. Res. 2014. V. 119. P. 291–303.
9. Angerhofer A., Bornhauser F., Gall A., Cogdell R.J. // Chem. Phys. 1995. V. 194. P. 259–274.
10. Swenberg C.E., Geacintov N.E. Exciton Interactions in Organic Solids. In: Organic Molecular Photophysics. L.: Wiley, 1973. V. 1. P. 489–564.
11. Niedzwiedzki D.M., Kobayashi M., Blankenship R.E. // Photosynth. Res. 2011. V. 107. P. 177–186.
12. Rademaker H., Hoff A.J., van Grondelle R., Duysens L.N.M. // Biochim. et Biophys. Acta. 1980. V. 592. P. 240–257.
13. Кленина И.Б., Махнева З.К., Москаленко А.А., Гудков Н.Д., Большаков М.А., Павлова Е.А., Проскуряков И.И. // Биохимия. 2014. Т. 79. № 3. С. 310–317.

SINGLET-TRIPLET FISSION OF CAROTENOID EXCITATION IN THE PURPLE PHOTOTROPHIC BACTERIA *Thermochromatium tepidum*

I. B. Klenina, A. A. Gryaznov, Z. K. Makhneva, I. I. Proskuryakov

*Institute of Basic Biological Problems of the Russian Academy of Sciences, Pushchino,
Moscow Region, Russian Federation*

Presented by Academician of the RAS V.A. Shuvalov July 27, 2018

Received July 27, 2018

Confirmation of intermolecular mechanism of excitation fission involving two carotenoid molecules in the purple phototrophic bacteria *Thermochromatium tepidum* is obtained.

Keywords: singlet-triplet excitation fission, carotenoids, light-harvesting complexes, phototrophic bacteria.