

## СЕЛЕКТИВНОЕ ВОЗБУЖДЕНИЕ КАРОТИНОИДОВ СВЕТСОБИРАЮЩИХ КОМПЛЕКСОВ LH2 *Allochrochromatium vinosum* ПРИВОДИТ К ОКИСЛЕНИЮ БАКТЕРИОХЛОРОФИЛЛА

© 2022 И.Б. Клена, З.К. Махнева, А.А. Москаленко, И.И. Проскуряков\*

Институт фундаментальных проблем биологии РАН,  
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: pros@issp.serpukhov.su

Поступила в редакцию 15.06.2022

После доработки 13.07.2022

Принята к публикации 14.07.2022

Механизм процесса фотоокисления бактериохлорофилла светособирающих комплексов ряда пурпурных фототрофных бактерий при освещении в полосу поглощения каротиноидов в течение многих лет остается невыясненным. С использованием узкополосного лазерного излучения нами проведено измерение спектра действия этого процесса в спектральных диапазонах поглощения каротиноидов и бактериохлорофиллов. Показано, что фотоокисление бактериохлорофилла практически не происходит при возбуждении этих молекул, а при возбуждении каротиноидов – протекает с квантовым выходом около 0,0003. Столь низкое значение квантового выхода позволило предположить, что изучаемый процесс инициируется триплетными состояниями основных каротиноидов с длиной цепи сопряженных двойных связей  $N = 11$ . При взаимодействии с кислородом воздуха эти триплетные состояния вызывают, хотя и с низкой эффективностью, образование синглетно-возбужденного состояния кислорода, при взаимодействии с которым происходит окисление бактериохлорофилла. Триплетные состояния каротиноидов образуются в результате изученного ранее синглет-триплетного деления возбуждения. Полученные результаты указывают на необходимость пересмотра взглядов на функции каротиноидов светособирающих антенн пурпурных бактерий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА:** бактериохлорофилл, каротиноиды, фотоокисление, спектр действия, квантовый выход, триплетные состояния, синглетный кислород, светособирающие комплексы, пурпурные серные бактерии.

DOI: 10.31857/S0320972522100086, EDN: BCGGDQ

### ВВЕДЕНИЕ

По современным представлениям, две основные функции, выполняемые каротиноидами (Кар) в составе фотосинтезирующих организмов, – расширение спектрального диапазона поглощения солнечного света, используемого затем реакционными центрами, и защита от генерации химически активной формы кислорода – синглетно-возбужденного  $^1\text{O}_2^*$ , а также нейтрализация этого состояния, если синглетный кислород все же образовался. Защитная функция каротиноидов впервые экспериментально продемонстрирована в работе Griffiths et al. [1] по прекращению деления клеток и разрушению основного пигмента – бактериохлоро-

филла *a* (БХл) – в бескаротиноидных мутантах несерной бактерии *Rhodobacter sphaeroides* в присутствии воздуха. Эти эффекты отсутствовали у клеток дикого типа, содержащих каротиноиды. В сопутствующем комментарии [2] было сделано предположение, что наблюдаемые явления вызваны генерацией синглетного кислорода за счет взаимодействия кислорода воздуха с триплетными состояниями БХл ( $^3\text{БХл}$ ) и подавлением этого процесса по механизму тушения  $^3\text{БХл}$  каротиноидами. За прошедшие почти 70 лет такой взгляд на защитную функцию каротиноидов стал общепринятым [3–5].

В противоречие с этими взглядами вступают результаты многолетних исследований реакции пурпурных фототрофных бактерий на освеще-

Принятые сокращения: БХл – бактериохлорофилл *a*;  $^3\text{БХл}$  – триплетное состояние БХл; БХл850 – форма бактериохлорофилла *a* с максимумом поглощения при 850 нм; Кар – каротиноид;  $^3\text{Кар}$  – триплетное состояние каротиноида; ССК – светособирающий комплекс; LH2 – периферийные светособирающие комплексы.

\* Адресат для корреспонденции.

ние в полосу поглощения входящих в их состав каротиноидов. Наиболее ярко эти эффекты проявляются в случае серных бактерий. Так, было показано, что освещение клеток *Allochrochromatium vinosum* светом, возбуждающим Кар, приводит к более интенсивному выцветанию БХл, чем при возбуждении самого бактериохлорофилла [6]. Аналогичный эффект наблюдался при освещении изолированных светособирающих комплексов (ССК) ряда пурпурных бактерий [7]. В обоих случаях выцветает форма бактериохлорофилла с максимумом поглощения в районе 850 нм (БХл850), и фотовыцветание прекращается после удаления кислорода. В работе Махневой и соавт. [8] показано, что похожие спектральные изменения происходят в мембранах хромофоров и в изолированных периферийных светособирающих комплексах (LH2) при их окислении феррицианидом калия. При этом продукт окисления с максимумом поглощения в районе 700 нм был идентифицирован как 3-ацетил хлорофилл. В работах Махневой и соавт. [9, 10] было показано, что возбуждение внесенного в среду бенгальского розового, известного генератора  $^1\text{O}_2^*$ , вызывает в спектрах поглощения хромофоров и изолированных ССК ряда бактерий изменения, аналогичные наблюдаемым при возбуждении каротиноидов. Фотовыцветание БХл прекращалось при добавке тушителей синглетного кислорода. На основе всех перечисленных наблюдений был сделан парадоксальный вывод, что возбуждение каротиноидов ССК приводит к генерации синглетного кислорода. Затем в результате взаимодействия  $^1\text{O}_2^*$  с БХл происходит окисление БХл850 с выцветанием полосы поглощения при 850 нм и образованием 3-ацетил хлорофилла. Таким образом, каротиноиды способны нести не защитную, а деструктивную функцию.

Механизм генерации  $^1\text{O}_2^*$  при возбуждении каротиноидов остается неизвестным. Используемое в перечисленных выше работах широкополосное возбуждение Кар усложняет интерпретацию результатов и не позволяет провести корректную оценку квантового выхода фотоокисления БХл850. В данной работе с использованием узкополосного лазерного возбуждения мы провели оценку квантового выхода этого процесса и измерили спектр действия фотоокисления бактериохлорофилла LH2-комплексов *Alc. vinosum*.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

**Получение LH2-комплексов.** Клетки *Allochrochromatium vinosum* strain MSU (ранее

*Allochrochromatium minutissimum*) из коллекции кафедры микробиологии Биологического факультета МГУ выращивали в анаэробных условиях (фототрофно). Для получения хромофоров клетки разрушали ультразвуком (УЗДН-1, СССР) и проводили дифференциальное центрифугирование. Хромофору солибилизировали 2,0–2,5%-ным додецилмальтозидом, и светособирающие комплексы выделяли хромографией на колонке Toyopearl DEAE-650S («Toyo Soda», Япония) в градиенте концентрации NaCl. Подробное описание процедуры приведено ранее [11]. Препарат LH2-комплексов приготавливали в количестве, достаточном для проведения всех экспериментов.

**Фотоокисление LH2-комплексов** в 10 мМ Tris-HCl (pH 7,5) проводили в 1 см спектрофотометрической кювете при оптической плотности около 1 в полосе поглощения 850 нм при интенсивном перемешивании. Использовали свет импульсной лазерной системы («Solar Laser Systems», Белоруссия), состоящей из лазера накачки LQ 529В и параметрического преобразователя LP 603. Система позволяет получать импульсы длительностью 6–8 нс в диапазоне длин волн  $\lambda \geq 430$  нм с шириной полосы не более 1 нм; частота следования импульсов составляла 15 Гц. Энергия вспышки не превышала 0,15 мДж·см<sup>-2</sup> и была выбрана так, чтобы не вызывать насыщения процесса фотовыцветания БХл850 (рис. 1 в Приложении); ее регулировали с помощью нейтральных светофильтров. Среднюю мощность падающего на образец света измеряли термоэлектрической головкой 3A-P-v1-SH с устройством индикации NOVA II («Ophir», Израиль). Спектры поглощения измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV-1800 («Shimadzu», Япония). Для измерения каждой точки спектра действия фотовыцветания использовали свежую порцию ССК-комплексов. На результаты измерений при импульсном возбуждении может влиять эффект просветления образца во время вспышки. При этом образец поглощает меньше света, чем следует из его стационарного спектра поглощения. При использованных энергиях вспышки и концентрации ССК в образце возбуждалось не более 4% молекул БХл, поэтому данным эффектом мы пренебрегали. Квантовый выход фотоокисления определяли по формуле:  $\phi_{\text{ок}} = N_{\text{БХл}}/N_{\text{фот}}$ , где  $N_{\text{БХл}}$  – число молекул БХл850, окисленных в результате 10-минутного освещения образца, а  $N_{\text{фот}}$  – число поглощенных за то же время фотонов. Были также проведены измерения фотоокисления БХл850 при возбуждении добавленного красителя бенгальского розового. Краситель добавляли в количестве, дающем поглощение 1 опт. ед. в максимуме 560 нм. Процедура освеще-

ния образца была та же, что описана выше, при длительности освещения 10 мин.

**Коэффициент экстинкции БХл850.** Для определения числа молекул БХл850 в образце необходимо знать их коэффициент экстинкции  $\varepsilon_{850}$  в ССК. Поскольку литературные значения этого параметра значительно варьируют, мы провели его определение. Пигменты ЛН2-комплексов с известной оптической плотностью экстрагировали смесью ацетон/метанол = 7/2 (v/v) и определяли количество БХл в экстракте, используя коэффициент экстинкции  $\varepsilon_{770} = 76 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  [12]. При подсчете коэффициента экстинкции БХл850 в ЛН2-комплексах было учтено то обстоятельство, что ССК содержит также бактериохлорофиллы, поглощающие при 800 нм, в соотношении 1 : 2 с БХл850 [13]. Полученное значение  $\varepsilon_{850} = 197 \pm 30 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$  (среднее из 4 измерений) хорошо совпадает с величиной  $184 \pm 13 \text{ мМ}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ , приведенной в статье Clayton и Clayton [14] для БХл850 *Rhodospseudomonas sphaeroides*.

**Количественный анализ каротиноидного состава ЛН2-комплексов** проводили методом ВЭЖХ [15] на колонке Spherisorb ODS2, 5 мкм («Waters», США). Концентрацию каротиноидов рассчитывали, согласно полученным ранее коэффициентам экстинкции [16], а площадей полос поглощения в области 360–550 нм – с помощью программы LC-solution («Shimadzu»).

**Измерения ЭПР высокого временного разрешения (ВР-ЭПР)** проводили на модифицированном спектрометре РЭ1306 (СССР), как описано ранее [17] при  $T = 120 \text{ К}$  и  $\lambda_{\text{возб}} = 470$  и 850 нм. Для приготовления использовали ЛН2-комплексы с оптической плотностью около 50 в полосе 850 нм. Температуру понижали до  $T = 120 \text{ К}$  с помощью криостата ESR900 («Oxford Instruments», Англия) для предотвращения деградации образца. Образцы в качестве криопротектора содержали 66% глицерина. Для возбуждения использовали ту же лазерную систему, которая описана выше; энергия вспышки была  $\sim 1,5 \text{ мДж}$ . В спектрометре ВР-ЭПР для регистрации сигнала используется стробоскопический (бокскар) интегратор SR250 («Stanford Research Systems», США). Бокскар-интегратор регистрирует сигнал ЭПР в коротком интервале времени, синхронно с возбуждающей вспышкой света. В работе применяли интервал регистрации 0,15–1 мкс после вспышки.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На рисунке 1, линия 1 представлен спектр поглощения ЛН2-комплексов *Alc. vinosum* до

освещения. Данные о структуре ЛН2-комплексов этой бактерии пока что не получены, однако совпадение многих характеристик с изученными ССК [18, 19] позволяет с хорошей достоверностью предположить общие мотивы структурной организации пигментов. Поглощение в районе 800 нм и 850 нм – ИК-полосы по-разному пространственно организованных молекул БХл *a*. При 850 нм поглощают достаточно сильно экситонно взаимодействующие между собой бактериохлорофиллы, что вызывает значительное длинноволновое смещение полосы поглощения по сравнению с БХл *a* в растворе. Поглощение в районе 800 нм определяется слабо взаимодействующими БХл, сохраняющими в значительной степени свойства мономерных молекул [13]. Полоса при 590 нм принадлежит всем бактериохлорофиллам ССК. В районе 400–550 нм основное поглощение осуществляется каротиноидами, далее, в коротковолновой области поглощают снова БХл. На рис. 1, линия 2 приведен спектр того же образца после 10-минутного освещения лазерной вспышкой при  $\lambda = 480 \text{ нм}$ . Основные изменения сводятся к уменьшению поглощения в полосе БХл850. На врезке показан разностный спектр (2) – (1) в диапазоне 540–750 нм, на котором заметно также выцветание общей полосы БХл при 590 нм и появление полосы 3-ацетил хлорофилла – в районе 700 нм.

В данной работе мы сравнили квантовые выходы фотовыцветания БХл850 при возбуждении в полосы поглощения каротиноидов и бактериохлорофиллов. Результаты измерений представлены на рис. 2, из которого видно, что возбуждение Кар значительно более эффективно. Возбуждение БХл в полосы поглощения при 590 нм и в диапазоне 800–870 нм вызывает фотоокисление бактериохлорофилла лишь на уровне погрешности измерения. Квантовый выход процесса чрезвычайно низок даже при возбуждении Кар ( $\phi_{\text{ок}}$  составляет  $\sim 0,25 \times 10^{-3}$ ). Для сравнения мы определили квантовый выход фотоокисления БХл при возбуждении добавленного к ЛН2-комплексам красителя бенгальского розового, известного сенсбилизатора  $^1\text{O}_2^*$  (квантовый выход синглетного кислорода в воде – 0,76 [20]). В этом случае также получено низкое значение квантового выхода фотоокисления –  $\phi_{\text{ок}} = 0,27 \times 10^{-3}$  (рис. 2 в Приложении).

На рис. 3 приведены результаты измерения спектров ВР-ЭПР комплексов ЛН2 *Alc. vinosum* при возбуждении каротиноидов ( $\lambda_{\text{возб}} = 470 \text{ нм}$ ) (рис. 3, линия 1) и бактериохлорофиллов (рис. 3, линия 3). Возбуждение в полосу поглощения Кар приводит к заселению

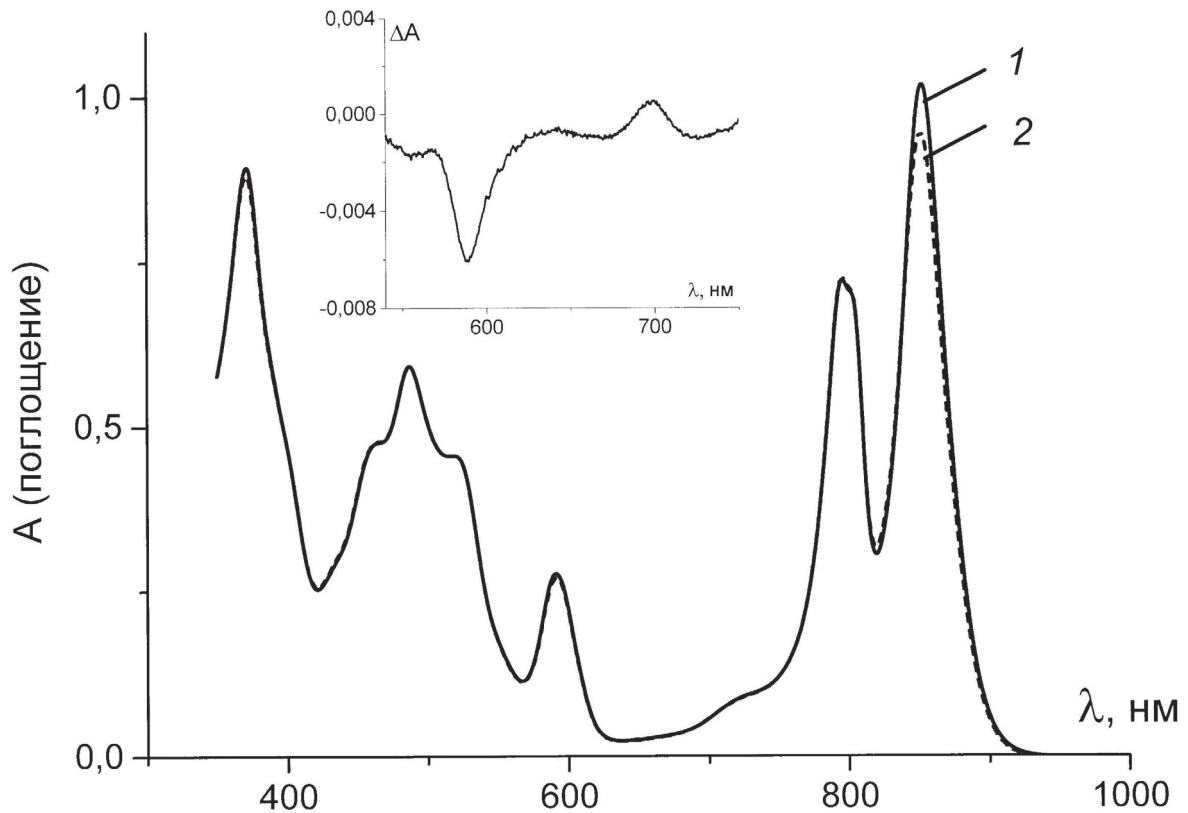


Рис. 1. Спектр поглощения светособирающих LH2-комплексов *Alc. vinosum* до освещения (1) и после 10-минутного освещения вспышками лазера при  $\lambda = 480$  нм (2). На врезке – дифференциальный спектр (2) – (1)

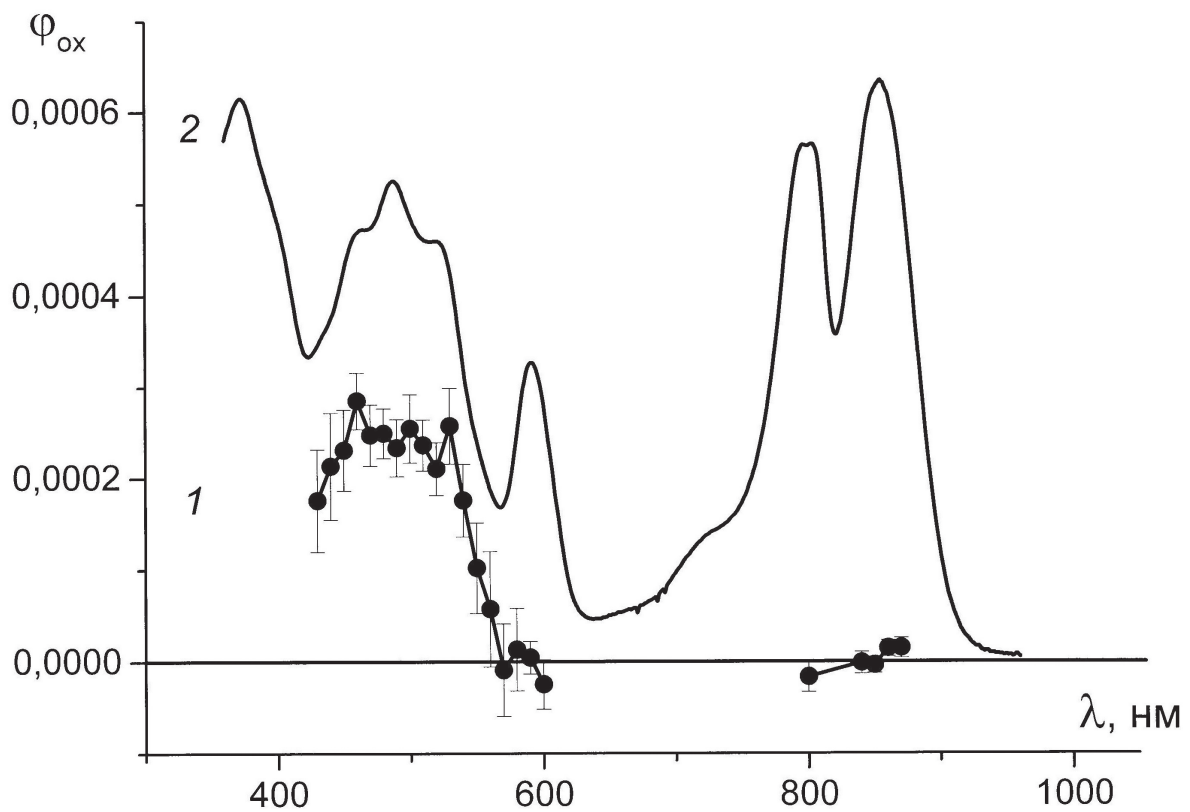
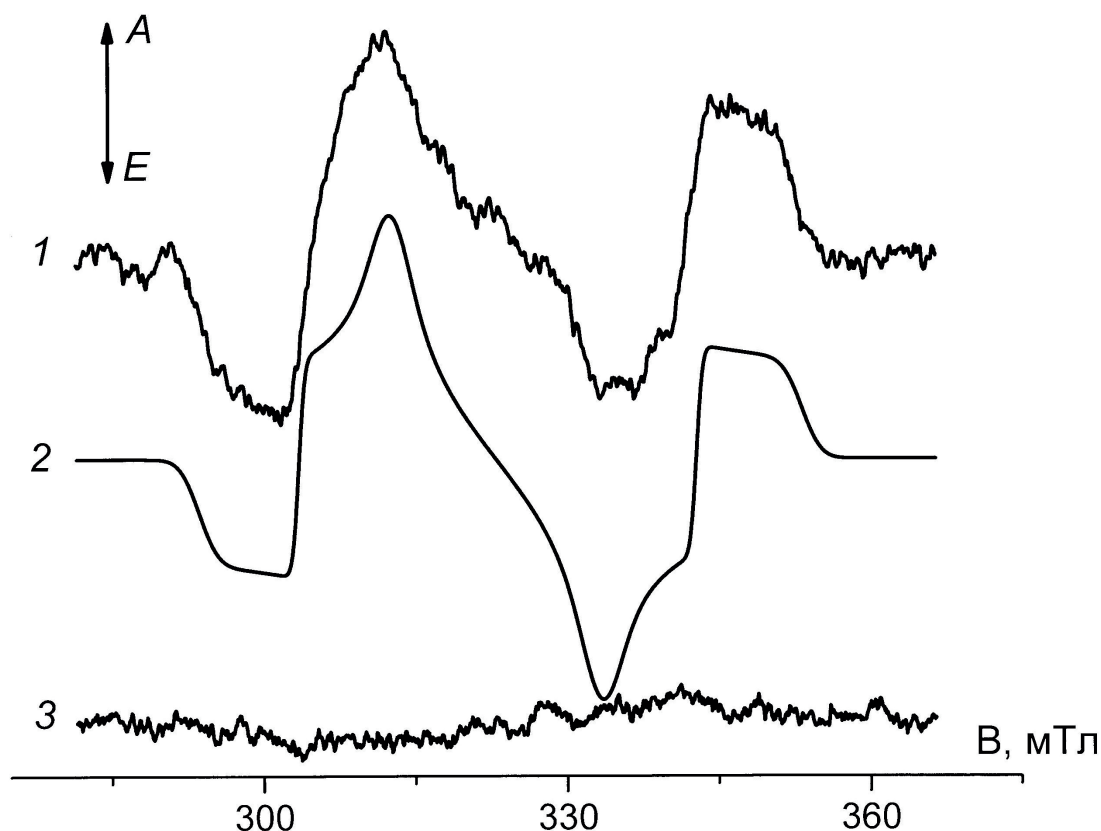


Рис. 2. Спектр действия (спектральная зависимость квантового выхода) фотоокисления БХл850 (1). Спектр (1 – Т) LH2-комплексов *Alc. vinosum* до освещения (2), Т – пропускание света. Погрешности измерений спектра действия (1) рассчитаны исходя из погрешностей измерения оптической плотности образца и энергии лазерной вспышки



**Рис. 3.** Спектр ВР-ЭПР LH2-комплексов *Alc. vinosum*, измеренный в период 0,15–1 мкс при  $\lambda_{\text{возб}} = 470$  нм (1). Спектр ЭПР триплетного состояния, рассчитанный для параметров расщепления в нулевом поле каротиноида родопина ( $N = 11$ ),  $|D| = 0,0279 \text{ см}^{-1}$ ,  $|E| = 0,0029 \text{ см}^{-1}$  и  $T_0$  спиновой поляризации (2). Спектр ВР-ЭПР LH2-комплексов *Alc. vinosum*, измеренный в период 0,15–1 мкс при  $\lambda_{\text{возб}} = 850$  нм (3). Все измерения проведены при  $T = 120$  К. Стрелки в левом верхнем углу указывают направление поглощения (А) и излучения (Е) мощности СВЧ

триплетного состояния каротиноида с характерной картиной спиновой поляризации и параметрами расщепления в нулевом поле, соответствующими родопину ( $|D| = 0,0279 \text{ см}^{-1}$ ,  $|E| = 0,0029 \text{ см}^{-1}$ , [21]) (рис. 3, линия 2). Расчет спектра ЭПР проведен в предположении селективной заселенности  $T_0$  спинового подуровня триплета [22, 23]. Несоответствие экспериментального (1) и расчетного спектра (2) сводится в основном к различию амплитуд центральных пиков. Это различие вызвано быстрой анизотропной спин-решеточной релаксацией и подробно рассмотрено ранее [17]. Спектр при возбуждении бактериохлорофиллов (рис. 3, линия 3) слишком слабый для проведения подробного анализа, однако можно сделать предположение, что он принадлежит  $^3\text{БХл}$ , которые заселены за счет спин-орбитальной связи [22, 23].

Каротиноидный состав (таблица) того же препарата LH2-комплексов согласуется с результатами ЭПР. Преобладающим каротиноидом является родопин. Важно отметить, что каротиноиды с короткой системой сопряженных двойных связей не обнаружены.

Каротиноидный состав LH2-комплексов *Alc. vinosum*

Каротиноид	Мол %	N
Родопин	89,8	11
Ликопин	3,5	11
Ангидрородовибрин	3,2	12
Дидегидрородопин	2,4	12
Спириллоксантин	1,1	13

Примечание. Мол % – молярный процент каротиноида; N – число сопряженных двойных связей каротиноида.

### ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В задачи настоящей работы входило изучение спектральной зависимости процесса фотоокисления БХл850 при возбуждении каротиноидов ССК, оценка квантового выхода этого процесса и использование полученной информации для выработки представлений о возможном механизме данного необычно-

го явления. Результаты работ Махневой и соавт. [9, 10] указывают на механизм с участием синглетно-возбужденного кислорода. В подтверждение этого вывода можно также привести наблюдение, что фотоокисление БХл850 сопровождается поглощением кислорода [10]. Фотофизическая генерация  $^1\text{O}_2^*$  происходит по схеме  $^3\text{O}_2 + ^3\text{D} \rightarrow ^1\text{O}_2^* + ^1\text{D}$  и требует участия триплетного состояния сенсibilизатора D, имеющего достаточную энергию. В растворе такими эффективными сенсibilизаторами являются хлорофиллы и бактериохлорофиллы [24]. Из рис. 2 видно, однако, что эффект фотоокисления БХл850 характеризуется высокой спектральной селективностью и происходит практически только при возбуждении каротиноидов. Отсюда представляется неизбежным парадоксальный вывод, что триплетным сенсibilизатором являются сами молекулы каротиноидов.

Известно, что фотофизические свойства Кар существенно зависят от числа сопряженных двойных связей ( $N$ ) этих молекул [4, 25–27]. Энергия их синглетных возбужденных уровней и триплетных уровней повышается при уменьшении  $N$ . При определенных значениях  $N$  энергии триплетного состояния Кар становятся достаточно для заселения состояния  $^1\text{O}_2^*$ . В работах Foote et al. [28, 29] оценка относительных энергий  $^3\text{Кар}$  и синглетного кислорода проведена путем изучения зависимости константы скорости тушения каротиноидами синглетно-возбужденного состояния  $\text{O}_2$  от значения  $N$ . Оказалось, что при  $N \leq 10$  происходит экспоненциальное падение константы скорости тушения синглетного кислорода каротиноидами. Это означает, что уровень триплетного состояния таких каротиноидов оказывается выше уровня  $^1\text{O}_2^*$ , и обратный процесс возбуждения кислорода в синглетное состояние при взаимодействии с  $^3\text{Кар}$  становится энергетически возможным. При  $N \geq 11$  тушение синглетного кислорода идет практически с диффузионной константой скорости.

Анализ каротиноидного состава LH2-комплексов показывает (таблица), что каротиноиды с короткой системой сопряженных двойных связей ( $N \leq 10$ ) в этих комплексах не детектируются. Этот факт привел к выработке представления, что в ССК образование  $^1\text{O}_2^*$  при взаимодействии с  $^3\text{Кар}$  невозможно. Полученное в данной работе низкое значение квантового выхода фотоокисления БХл позволяет предположить, что такой процесс генерации  $^1\text{O}_2^*$  идет при возбуждении каротиноидов, хотя и с низкой эффективностью.

Триплетные состояния Кар при этом образуются в процессе синглет-триплетного деления возбуждения:  $^1\text{Кар}^* + \text{Кар} \rightarrow ^3\text{Кар} + ^3\text{Кар}$ . Этот процесс разрешен по спину и достаточно хорошо известен в области исследования фотофизики органических соединений [30, 31]. Ранее он был описан в случае ССК *Alc. vinosum* в работах Клевиной и соавт. [17, 32]. Форма спектра ЭПР, приведенная на рис. 3, линия 1, подтверждает функционирование этого механизма при заселении наблюдаемых триплетных состояний. Заселение  $^3\text{Кар}$  в результате деления возбуждения происходит чрезвычайно быстро, в пико- и субпикосекундном временном диапазоне [33]. Квантовый выход триплетов каротиноидов ССК *Alc. vinosum* не определялся. Для другой пурпурной бактерии (*Rhodospirillum rubrum*) для квантового выхода была получена достаточно высокая оценка (0,32) [34].

Учитывая низкий квантовый выход фотоокисления БХл850 (рис. 2), нельзя полностью исключить возможность участия в этом процессе небольшой примеси Кар с  $N \leq 10$ , присутствующих в количестве ниже порога детектирования. Необходимо, однако, отметить, что в этом случае следует ожидать влияния таких каротиноидов на измеренный спектр действия (рис. 2, линия 1). В работе Niedzwiedzki et al. [27] приведены данные о спектрах поглощения каротиноидов с различным числом двойных связей ( $N$ ) в ацетоне. При изменении  $N$  от 9 до 13 положение пика поглощения Кар смещается на 60 нм – от 470 до 530 нм. Похожее изменение можно ожидать и для каротиноидов в составе ССК. Это привело бы к заметному отклонению спектра действия от спектра 1 – Т, определяемому основными каротиноидами LH2-комплексов. Поскольку такое отклонение не наблюдается, участие Кар с короткой системой сопряженных двойных связей в генерации  $^1\text{O}_2^*$  представляется маловероятным.

Возбуждение в длинноволновые полосы поглощения бактериохлорофиллов при 800 и 850 нм не вызывает практически никакого фотоокисления БХл850 (рис. 2). Это связано, с одной стороны, с эффективным тушением триплетов бактериохлорофилла каротиноидами. С другой стороны, квантовый выход  $^3\text{БХл}$  в светособирающих комплексах вообще невысокий. Так, в работе Monger et al. [35] этот квантовый выход определен как 0,02, причем появление одной триплетной молекулы БХл вызывает резкое тушение возбуждения ССК. Низкая амплитуда сигнала ЭПР при возбуждении БХл (рис. 3, линия 3) согласуется с этими данными.

При возбуждении добавленного к ССК бенгальского розового, известного эффективного генератора синглетного кислорода, квантовый выход окисления БХл850 также оказался низким (рис. 2 в Приложении). Частично это связано с тем обстоятельством, что, в отличие от возбуждения каротиноидов, входящих в состав ССК, возбуждение бенгальского розового приводит к генерации  $^1\text{O}_2^*$  во всем объеме растворителя. При этом, учитывая короткое время жизни синглетного кислорода (2 мкс в воде [36]), вероятность контакта и реакции с бактериохлорофиллом ССК будет заметно понижена. Снижение квантового выхода фотоокисления бактериохлорофиллов может быть также связано с тушением  $^1\text{O}_2^*$  самими бактериохлорофиллами, как отмечено в статье Krasnovsky [24].

Необходимо отметить, что полученные значения квантовых выходов фотоокисления БХл850 являются приблизительными. Зависимость уменьшения поглощения экситонно-связанных пигментов БХл850 от числа окисленных молекул БХл может иметь достаточно сложный характер и в данной работе не исследовалась. Такой расчет проведен в работе Leiger et al. [37] в случае серной пурпурной бактерии *Ectothiorhodospira haloalkaliphila*. Основываясь на результатах этой работы, можно оценить, что в условиях наших экспериментов фотоокисление претерпевает приблизительно одна молекула БХл в LH2-комплексе. Учет экситонного взаимодействия БХл в любом случае не вызовет принципиальных изменений в оценке квантового выхода.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные данные еще раз заставляют задуматься о роли каротиноидов ССК пурпурных бактерий. Рассмотрим эту проблему на примере каротиноидов *Alc. vinosum*. Принято считать, что к основным функциям Кар относятся: 1) поглощение света и передача энергии на молекулы БХл; 2) защита биологических структур от активных форм кислорода, в частности, предотвращение генерации  $^1\text{O}_2^*$  путем тушения триплетов БХл; 3) возможная роль в стабилизации структуры ССК, в состав которых они входят. В случае ССК *Alc. vinosum* эффективность передачи поглощенной Кар энергии на БХл невысокая: около 0,36 [18]. Низкое значение этого параметра не в последнюю очередь связа-

но с быстрым и достаточно эффективным синглет-триплетным делением возбуждения [34]. Вторая функция – тушение  $^3\text{БХл}$  – также не представляется жизненно важной вследствие низкого квантового выхода триплетов бактериохлорофилла в экситонно-связанных кольцевых структурах [35]. С этим выводом согласуются результаты работ Торопыгиной и соавт. [7] и Махневой и соавт. [9, 10], в которых показано, что фотовыцветание БХл850 слабо зависит от присутствия каротиноидов в ССК. К тому же *Alc. vinosum* обитают в анаэробных условиях, хотя нельзя исключить их периодическое попадание в аэробные условия. Таким образом, на первый план выходит третья, структурная функция молекул каротиноидов в светособирающих комплексах. Подтверждение этого вывода требует дальнейших исследований.

Биологический смысл синглет-триплетного деления возбуждения каротиноидов ССК остается непонятным. Этот процесс существенно понижает эффективность переноса энергии на бактериохлорофиллы. В настоящее время единственным объяснением этой функции Кар может быть рассеяние избытка энергии в условиях высокой интенсивности света. В анаэробных условиях заселение  $^3\text{Кар}$  не будет приводить к деструктивным последствиям.

**Вклад авторов.** И.И. Проскуряков, А.А. Москаленко – концепция и руководство работой; З.К. Махнева, И.Б. Кленина, И.И. Проскуряков – проведение экспериментов; А.А. Москаленко – обсуждение результатов исследования; И.И. Проскуряков, И.Б. Кленина – написание текста; З.К. Махнева, А.А. Москаленко – редактирование текста статьи.

**Финансирование.** Работа выполнена в рамках проекта № 121040200027-1 Минобрнауки.

**Благодарности.** Авторы благодарят М.А. Большакова за приготовление LH2-комплексов *Allochrochromatium vinosum* и В.В. Терентьева за предоставленную возможность измерений на спектрофотометре Shimadzu.

**Конфликт интересов.** Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

**Соблюдение этических норм.** Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

**Дополнительные материалы.** Приложение к статье опубликовано на сайте журнала «Биохимия» (<https://biochemistrymoscow.com>).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Griffiths, M., Sistrom, W. R., Cohen-Bazire, G., and Stanier, R. Y. (1955) Function of carotenoids in photosynthesis, *Nature*, **176**, 1211-1214, doi: 10.1038/1761211a0.
2. Calvin, M. (1955) *Nature*, **176**, 1215, doi: 10.1038/1761215a0.
3. Krinsky, N. I. (1979) Carotenoid protection against oxidation, *Pure Appl. Chem.*, **51**, 649-660, doi: 10.1351/pac197951030649.
4. Frank, H. A., and Cogdell, R. J. (1993) The photochemistry and function of carotenoids in photosynthesis, Chapt. 8, in *Carotenoids in Photosynthesis* (Young, A. J. and Britton, G., eds) Springer, Dordrecht, pp. 252-326, doi: 10.1007/978-94-011-2124-8\_8.
5. Telfer A., Pascal, A., and Gall, A. (2008) Carotenoids in Photosynthesis, Chapt. 10, in *Carotenoids, Vol. 4: Natural Functions* (Britton, G., Liaaen-Jensen, S., and Pfander, H., eds) Birkhäuser Verlag, Basel, pp. 265-308, doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0\_14.
6. Махнева З. К., Ерохин Ю. Е., Москаленко А. А. (2007) Фотосенсибилизированное каротиноидами окисление димеров бактериохлорофилла светособирающих комплексов В800-850 в клетках *Allochro-matium minutissimum*, *Докл. Акад. Наук*, **416**, 408-411.
7. Торопыгина О. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2003) Кластерам бактериохлорофилла не требуются каротиноиды для защиты от фотоокисления в светособирающих комплексах фотосинтезирующих бактериях, *Докл. Акад. Наук*, **391**, 828-831.
8. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2016) Образование 3-ацетил-хлорофилла в светособирающих комплексах пурпурных бактерий при химическом окислении, *Биохимия*, **81**, 282-294.
9. Махнева З. К., Ашихмин А. А., Большаков М. А., Москаленко А. А. (2019) Защита БХл850 от действия синглетного кислорода в мембранах серной фотосинтезирующей бактерии *Allochro-matium vinosum* с помощью тушителей, *Микробиология*, **88**, 91-99, doi: 10.1134/S0026365619010129.
10. Makhneva, Z. K., Bolshakov, M. A., and Moskalenko, A. A. (2021) Carotenoids do not protect bacteriochlorophylls in isolated light-harvesting LH2 complexes of photosynthetic bacteria from destructive interactions with singlet oxygen, *Molecules*, **26**, 5120, doi: 10.3390/molecules26175120.
11. Большаков М. А., Ашихмин А. А., Махнева З. К., Москаленко А. А. (2016) Влияние интенсивности освещения и ингибирования биосинтеза каротиноидов на сборку периферийных светособирающих комплексов пурпурной серной бактерии *Allochro-matium vinosum* ATCC 17899, *Микробиология*, **85**, 403-414, doi: 10.7868/S0026365616040029.
12. Clayton, R. K. (1966) Spectroscopic analysis of bacteriochlorophylls *in vitro* and *in vivo*, *Photochem. Photobiol.*, **5**, 669-677, doi: 10.1111/j.1751-1097.1966.tb05813.x.
13. Cogdell, R. J., Gall, A., and Köhler, J. (2006) The architecture and function of the light harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to *in vivo* membranes, *Quart. Rev. Biophys.*, **39**, 227-324, doi: 10.1017/S0033583506004434.
14. Clayton, R. K., and Clayton, B. J. (1981) B850 pigment-protein complex of *Rhodospseudomonas sphaeroides*: extinction coefficients, circular dichroism, and the reversible binding of bacteriochlorophyll, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **78**, 5583-5587, doi: 10.1073/pnas.78.9.5583.
15. Ashikhmin, A., Makhneva, Z., and Moskalenko, A. (2014) The LH2 complexes are assembled in the cells of purple sulfur bacterium *Ectothiorhodospira haloalkaliphila* with inhibition of carotenoid biosynthesis, *Photosynth. Res.*, **119**, 291-303, doi: 10.1007/s11120-013-9947-6.
16. Gall, A., Henry, S., Takaichi, S., Robert, B., and Cogdell, R. J. (2005) Preferential incorporation of coloured-carotenoids occurs in the LH2 complexes from non-sulphur purple bacteria under carotenoid-limiting conditions, *Photosynth. Res.*, **86**, 25-35, doi: 10.1007/s11120-005-3481-0.
17. Кленаина И. Б., Махнева З. К., Москаленко А. А., Кузьмин А. Н., Проскураков И. И. (2013) Синглет-триплетное деление возбуждения в светособирающих комплексах пурпурных фотосинтезирующих бактерий и в изолированных каротиноидах, *Биофизика*, **58**, 54-63.
18. Niedzwiedzki, D. M., Bina, D., Picken, N., Honkanen, S., Blankenship, R. E., et al. (2012) Spectroscopic studies of two spectral variants of light-harvesting complex 2 (LH2) from the photosynthetic purple sulfur bacterium *Allochro-matium vinosum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **1817**, 1576-1587, doi: 10.1016/j.bbabi.2012.05.009.
19. Löhner, A., Carey, A. M., Hacking, K., Picken, N., Kelly, S., et al. (2015) The origin of the split B800 absorption peak in the LH2 complexes from *Allochro-matium vinosum*, *Photosynth. Res.*, **123**, 23-31, doi: 10.1007/s11120-014-0036-2.
20. Kochevar, I. E., and Redmond, R. W. (2000) Photosensitized production of singlet oxygen, *Methods Enzymol.*, **319**, 20-28, doi: 10.1016/s0076-6879(00)19004-4.
21. Frank, H. A., Chadwick, B. W., Oh, J. J., Gust, D., Moore, T. A., et al. (1987) Triplet-triplet energy transfer in B800-850 light-harvesting complexes of photosynthetic bacteria and synthetic carotenoporphyrin molecules investigated by electron spin resonance, *Biochim. Biophys. Acta*, **892**, 253-263, doi: 10.1016/0005-2728(87)90229-5.
22. Budil, D. E., and Thurnauer, M. C. (1991) The chlorophyll triplet state as a probe of structure and function in photosynthesis, *Biochim. Biophys. Acta*, **1057**, 1-41, doi: 10.1016/S0005-2728(05)80081-7.



23. Angerhofer, A. (1991) Chlorophyll triplets and radical pairs, Chapt. 4.8, in *Chlorophylls* (Scheer, H., ed.) CRC Press, Boca Raton, pp. 945-991.
24. Krasnovsky, A. A., Jr. (1994) Singlet molecular oxygen and primary mechanisms of photo-oxidative damage of chloroplasts. Studies based on detection of oxygen and pigment phosphorescence, *Proc. R. Soc. Edinburgh*, **102B**, 219-235, doi: 10.1017/S0269727000014147.
25. Christensen, R. L. (1999) The electronic states of carotenoids, Chapt. 8, in *The Photochemistry of Carotenoids, Advances in Photosynthesis, vol. 10* (Frank, H. A., Young, A. J., Britton, G., and Cogdell, R. J., eds) Kluwer Acad. Publ., N.Y., pp. 137-159.
26. Angerhofer, F., Bornhäuser, F., Gall, A., and Cogdell, R. J. (1995) Optical and optically detected magnetic resonance investigation on purple photosynthetic bacterial antenna complexes, *Chem. Phys.*, **194**, 259-274, doi: 10.1016/0301-0104(95)00022-G.
27. Niedzwiedzki, D., Kosciulecki, J. F., Cong, H., Sullivan, J. O., Gibson, G. N., et al. (2007) Ultrafast dynamics and excited state spectra of open-chain carotenoids at room and low temperatures, *J. Phys. Chem. B*, **111**, 5984-5998, doi: 10.1021/jp070500f.
28. Foote, C. S., Chang, Y. C., and Denny, R. W. (1970) Chemistry of singlet oxygen. X. Carotenoid quenching parallels biological protection, *J. Am. Chem. Soc.*, **92**, 5216-5218, doi: 10.1021/ja00720a036.
29. Foote, C. S. (1979) Quenching of singlet oxygen, Chapt. 5, in *Singlet Oxygen. Organic Chemistry, vol. 40* (Wasserman, H. H., and Murray, R. W., eds) Academic Press, N.Y., pp. 139-171.
30. Smith, M. B., and Michl, J. (2010) Singlet fission, *Chem. Rev.*, **110**, 6891-6936, doi: 10.1021/cr1002613.
31. Smith, M. B., and Michl, J. (2013) Recent advances in singlet fission, *Annu. Rev. Phys. Chem.*, **64**, 361-386, doi: 10.1146/annurev-physchem-040412-110130.
32. Кленина И. Б., Махнева З. К., Москаленко А. А., Гудков Н. Д., Большаков М. А., и др. (2014), Синглет-триплетное деление возбуждения каротиноидов светособирающих комплексов LH2 пурпурных фототрофных бактерий, *Биохимия*, **79**, 310-317.
33. Gradinaru, C. C., Kennis, J. T. M., Papagiannakis, E., van Stokkum, I. H. M., Cogdell, R. J., et al. (2001) An unusual pathway of excitation energy deactivation in carotenoids: Singlet-to-triplet conversion on an ultrafast timescale in a photosynthetic antenna, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 2364-2369, doi: 10.1073/pnas.051501298.
34. Rademaker, H., Hoff, A. J., van Grondelle, R., and Duysens, L. N. M. (1980) Carotenoid triplet yields in normal and deuterated *Rhodospirillum rubrum*, *Biochim. Biophys. Acta*, **592**, 240-257, doi: 10.1016/0005-2728(80)90185-1.
35. Monger, T. G., Cogdell, R. J., and Parson, W. W. (1976) Triplet states of bacteriochlorophyll and carotenoids in chromatophores of photosynthetic bacteria, *Biochim. Biophys. Acta*, **449**, 136-153, doi: 10.1016/0005-2728(76)90013-X.
36. Kearns, D. R. (1979) Solvent and solvent isotope effects on the lifetime of singlet oxygen, Chapt. 4, in *Singlet Oxygen. Organic Chemistry, vol. 40* (Wasserman, H. H., Murray, R. W., eds) Academic Press, N.Y., pp. 115-137.
37. Leiger, K., Linnanto, J. M., Rätsep, M., Timpmann, K., Ashikhmin, A. A., et al. (2019) Controlling photosynthetic excitons by selective pigment photooxidation, *J. Phys. Chem. B*, **123**, 29-38, doi: 10.1021/acs.jpcc.8b08083.

## SELECTIVE EXCITATION OF CAROTENOIDS OF THE *Allochrodatum vinosum* LIGHT-HARVESTING LH2 COMPLEXES LEADS TO THE OXIDATION OF BACTERIOCHLOROPHYLL

I. B. Klenina, Z. K. Makhneva, A. A. Moskalenko, and I. I. Proskuryakov\*

*Institute of Basic Biological Problems, Russian Academy of Sciences,  
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: pros@issp.serpukhov.su*

The mechanism of bacteriochlorophyll photooxidation in light-harvesting complexes of a number of purple photosynthetic bacteria when the complexes are excited into the carotenoid absorption bands remains unclear for many years. Here, using narrow-band laser illumination we measured the action spectrum of this process for the spectral ranges of carotenoid and bacteriochlorophyll. It is shown that bacteriochlorophyll excitation results in almost no photooxidation of these molecules, while at carotenoid excitation it proceeds with a quantum yield of about 0.0003. The low value of the yield enabled an assumption that the studied process is initiated by the triplet states of the main carotenoids of the complexes with the number of conjugated double-bond chain length of  $N = 11$ . Interacting with oxygen, these states promote formation, though with low efficiency, of the singlet-excited oxygen, which oxidizes bacteriochlorophylls. The carotenoid triplet states are populated in the process of the earlier studied singlet-triplet fission. The obtained results point at the necessity of reconsidering the functions of carotenoids in the light-harvesting complexes of purple bacteria.

*Keywords:* bacteriochlorophyll *a*, carotenoids, photooxidation, action spectrum, quantum yield, triplet states, singlet oxygen, light-harvesting complexes, purple sulfur bacteria