

ТУШЕНИЕ КИСЛОРОДОМ ТРИПЛЕТНОГО СОСТОЯНИЯ СФЕРОИДЕНА В РЕАКЦИОННЫХ ЦЕНТРАХ *C. sphaeroides* В ОБЛАСТИ ТЕМПЕРАТУР 0–45°C

© 2025 г. П.П. Нокс*, #, И.А. Ярошевич*, Е.П. Лукашев*

*Биологический факультет Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова,
Ленинские горы, 1/12, Москва, 119234, Россия

#E-mail: knox@biophys.msu.ru

Поступила в редакцию 27.11.2024 г.

После доработки 18.12.2024 г.

Принята к публикации 15.01.2025 г.

Исследовано время жизни триплетного состояния каротиноида – сфероидена (T_{Kap}) в фотосинтетическом реакционном центре пурпурных бактерий *Cereibacter (Rhodobacter) sphaeroides* в области температур от 0°C до 45°C и влияние на это время концентрации молекулярного кислорода в среде. Для образования T_{Kap} при световом возбуждении реакционного центра в препараты добавляли о-фенантролин (10^{-2} М), частично вытесняющий первичный хинонний акцептор из структуры реакционного центра. Определены энергии активации процесса тушения T_{Kap} в нормальных аэробных условиях и при частичной дегазации исследуемых препаратов.

Ключевые слова: пурпурные бактерии, реакционный центр, сфероиден, триплетное состояние, кислород.

DOI: 10.31857/S0006302925030066, **EDN:** KSPUPF

Как известно, каротиноиды (Кар) в фотосинтетическом аппарате, выполняя светособирающие и структурные функции, осуществляют также важнейшую функцию дезактивации триплетных состояний хлорофилла [1–3], которые могут появляться, в частности, в результате световой «перегрузки» фотосинтетического аппарата. Эти триплетные состояния обладают энергией, достаточной для реакции с молекулярным кислородом, приводящей к образованию реакционноспособного повреждающего агента – синглетного кислорода. Триплетное состояние большинства каротиноидов (T_{Kap}) ниже по энергии, чем у синглетного кислорода, поэтому они не обладают прооксидантной активностью [1].

Применительно к пурпурным бактериям динамика образования и распада T_{Kap} в составе фотосинтетических реакционных центров (РЦ) подробно исследовалось при низких температурах [4, 5]. В этой работе мы впервые попытались уста-

новить характер влияния концентрации O_2 на время жизни T_{Kap} в РЦ пурпурных бактерий в физиологическом диапазоне температур. Очевидно, что такая информация может быть полезной для дальнейшей детализации защитной роли каротиноидов как эффективных антиоксидантов, в том числе и для животных организмов.

Пигментные кофакторы в структуре белково-пигментного комплекса РЦ бактерий *Cereibacter (Rhodobacter) sphaeroides* организованы в две трансмембранные ветви. Фотоактивный димер бактериохлорофилла (Р) расположен вблизи периплазматической поверхности фотосинтетической мембранны. От него вдоль трансмембранный белковой L-субъединицы локализуются мономерный бактериохлорофилл L, молекулы бактериофеофитина L и первичного хинонного акцептора Q_A . Вдоль трансмембранный субъединицы M локализованы мономерный бактериохлорофилл M, бактериофеофитин M и вторичный хинонный акцептор Q_B . Также в структуре M-субъединицы вблизи БхЛМ локализована молекула специфического каротиноида. При световом возбуждении РЦ происходит перенос электрона от Р к БхЛ с характерным временем ≈ 3 пс,

Сокращения: Кар – каротиноид, T_{Kap} – триплетное состояние каротиноида, РЦ – реакционный центр, БхЛ – бактериохлорофилл, Р – фотоактивный БхЛ, БФФ – бактериофеофитин, Q_A – первичный хинонний акцептор, Q_B – вторичный хинонний акцептор.

затем к БФФЛ – за ≈ 0.9 пс, к Q_A (≈ 200 пс) и к Q_B (~ 100 мкс) [6–8].

В работе мы исследовали эффективность дезактивации каротиноидом РЦ пурпурных бактерий *C. sphaeroides*, в частности триплетного состояния фотоактивного димера бактериохлорофилла РЦ (T_P) в области температур, близких к физиологическим – от 0 до 45°C . РЦ *C. sphaeroides* содержат в качестве каротиноида сфериоиден, содержащий сопряженную цепь из 10 двойных связей, или сфероиденон, сопряженная цепь которого содержит 11 двойных связей. Последний синтезируется при росте бактерий в присутствии O_2 [9].

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пурпурные несерные бактерии *Cereibacter sphaeroides* дикого типа выращивали на жидкой культуральной среде Ормеруда [10] в анаэробных условиях в люминостате при температуре 30°C в течение 6 суток. Фотосинтетические мембранны хроматофоров выделяли из предварительно отмытых натрий-фосфатным буфером (100 мМ, pH 7.5) свежих клеток культуры. После ультразвуковой дезинтеграции неразрушенные клетки и крупные частицы отделяли центрифугированием при $40\,000$ g в течение 15 мин, хроматофоры получали центрифугированием надосадочной жидкости при $144\,000$ g в течение 120 мин. Хроматофоры инкубировали в течение 30 мин при 4°C в 0.01 М натрий-фосфатном буфере (pH 7.0), содержащем 0.5% цвиттерионного детергента лаурилдиметиламиноксида. Затем их центрифугировали при $144\,000$ g в течение 90 мин при 4°C . Фракцию РЦ, содержащуюся в надосадочной жидкости, отделяли хроматографией на колонке с оксиапатитом, как детально описано в работе [11]. Перед измерениями их разводили буфером до концентрации, соответствующей ~ 10 мкМ фотоактивного димера бактериохлорофилла.

Изменения поглощения на одиночную вспышку (532 нм, длительность 7 нс, энергия импульса 10 мДж, YAG-Nd-лазер LS-2131M (LOTIS ТИ, Беларусь) регистрировали на установке флеш-фотолиза с двойной монохроматизацией измеряющего света. С целью улучшения отношения сигнал/шум с помощью аналого-цифрового преобразователя Octopus CompuScope 8327 (GaGe, Канада) проводили накопление до 100 одиночных сигналов. Для мультиэкспоненциальной аппроксимации кинетических кривых использовали программу Origin 8.1.

Для увеличения квантового выхода T_P к препаратам РЦ, изолированным из мембран хроматофоров *C. sphaeroides*, добавляли *o*-фенантролин в концентрации 10^{-2} М.

Анаэробные условия создавали, откачивая воздух в специальной кювете форвакуумным насосом до давления в ней около 10^{-1} мм рт. ст.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

o-Фенантролин концентрации 10^{-3} М используется для замещения вторичного хинонного акцептора (Q_B , свободный убихинон-10) в структуре РЦ для блокирования прямого фотопереноса электронов от первичного акцептора (Q_A , связанный убихинон-10). При более высоких концентрациях он также способен вытеснять и Q_A из локуса его посадки в структуре РЦ [12–14]. Соответственно, в РЦ, где сохраняется Q_A в качестве акцептора электронов, при световой активации происходит разделение зарядов между Р и Q_A . В последующий темновой период происходит их рекомбинация с характерным временем ~ 0.1 с. В РЦ с вытесненным Q_A при освещении происходит фоторазделение зарядов между Р и промежуточным акцептором – бактериофеофитином (Н) активной L-ветви переносчиков электрона. Далее это состояние в результате интеркомбинационной конверсии может переходить в триплетное состояние фотоактивного Бхл с образованием T_P . Согласно работе [2], в РЦ *C. sphaeroides* дикого типа выход T_P при комнатной температуре составляет 36%. Дезактивация T_P сопровождается образованием триплетного состояния Кар [15]. Согласно работе [2], T_P переходит в $T_{\text{Кар}}$ со 100%-м выходом. Энергия возбуждения T_P передается на Кар с участием мономерного Бхл неактивной M-ветви РЦ: это необходимо, поскольку декстеровский обменно-резонансный триплет-триплетный перенос энергии может происходить только при частичном перекрытии электронных оболочек донора и акцептора, тогда как Кар слишком удален от Р для прямого электронного обмена. $T_{\text{Кар}}$ затем дезактивируется в процессе интеркомбинационной конверсии [15]. В присутствии кислорода дезактивация $T_{\text{Кар}}$ происходит быстрее, что указывает на значимое взаимодействие между ними и, вероятно, связано с усилением интеркомбинационной конверсии триплетного состояния каротиноида при взаимодействии с триплетным состоянием молекулярного кислорода. В ходе дезактивации $T_{\text{Кар}}$ синглетный кислород не образуется [1].

Спектры индуцированных лазерной вспышкой изменений поглощения суспензии РЦ *C. sphaeroides* в видимой области, регистрируемые через 0.7 мкс (1) и 1 мс (2) после вспышки, представлены на рис. 1. Регистрируемые изменения поглощения связаны с фотовыцветанием Бхл РЦ

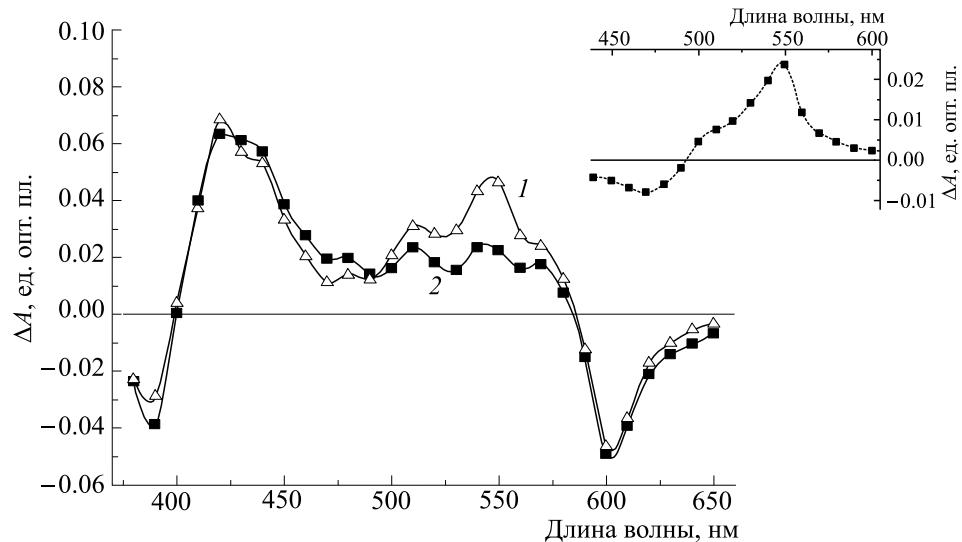


Рис. 1. Лазер-индукционные изменения спектра поглощения суспензии РЧ в присутствии 10^{-2} М ортофенантролина: 1 – изменения спектра через 0.7 мкс после вспышки, 2 – изменения через 1 мс. На врезке показан результат вычитания спектра 2 из спектра 1 в характерной для образования триплета каротиноида спектральной области 440–600 нм.

(около 600 нм), образованием анион-семихинонных форм акцепторов электрона (около 450 нм), с электрохромными сдвигами полос поглощения Бхф (около 400 и 540 нм) и каротиноида РЧ (500–570 нм) [16]. На врезке приведен разностный спектр: (1) – (2). Он является типичным для фотоиндуцированных изменений, связанных с триплетным состоянием сфероидена [17].

Кинетика лазер-индукционных изменений поглощения в наших препаратах РЧ *C. sphaeroides*, содержащих 10^{-2} М *o*-фенантролина, приведена на рис. 2. Результаты указывают на то, что часть РЧ в данных препаратах не содержит Q_A . Для обоснования этого предположения в дополнительном эксперименте была проведена регистрация изменений поглощения при 870 нм и 795 нм – в полосе выцветания димера Р и электрохромного сдвига полосы поглощения мономерного Бхл соответственно. Установлено, что по мере увеличения концентрации *o*-фенантролина блокирование переноса электрона к Q_B происходит уже при концентрации ингибитора 10^{-3} М, а при дальнейшем увеличении его концентрации до 10^{-2} М происходит и уменьшение амплитуды изменений абсорбции в этих полосах почти на 15%. Эти наблюдения позволяют заключить, что даже при достаточно низком содержании детергента лаурилдиметиламиноксида в препаратах (порядка 0.2%) *o*-фенантролин в концентрации 10^{-2} М вытесняет, помимо Q_B , также и часть молекул болееочно связанного с белком РЧ первичного акцептора Q_A . Именно эта часть РЧ яв-

ляется источником формирования T_{Kap} , которые релаксируют в основное состояние с характерным временем порядка 1.5 мкс. При этом в части РЧ, сохраняющих Q_A в месте его специфического связывания, темновая рекомбинация между P^+ и Q_A^- характеризуется временем около 0.1 с.

Температурные зависимости вкладов (амплитуды) микросекундного компонента дезактивации фотоиндуцированного сигнала при 550 нм (отражающего образование T_{Kap}) и миллисекундного компонента (связанного с темновой рекомбинацией P^+ и Q_A^-) приведены на врезке на рис. 2. Видно, что выход T_{Kap} сначала снижается при росте температуры от 0°C до 20°C, а затем снова увеличивается при дальнейшем росте температуры до ~40°C.

Уменьшение выхода T_{Kap} в диапазоне 0–20°C мы связываем с уменьшением образования T_P при росте температуры. Так, согласно работе [18], выход T_P в РЧ *C. sphaeroides* в диапазоне температур от -73°C до 22°C падает от 0.36 до 0.15.

Дальнейший же рост амплитуды T_{Kap} при увеличении температуры до 40°C обусловлен, видимо, дополнительным вытеснением Q_A с его места посадки в структуре РЧ *o*-фенантролином за счет действия температурного фактора. Об этом свидетельствует факт снижения амплитуды миллисекундного компонента в темновой релаксации фотоиндуцированного сигнала при 550 нм при температурах выше комнатных. При этом, согласно работам [13, 14], в таких РЧ почти в 2 раза возрас-

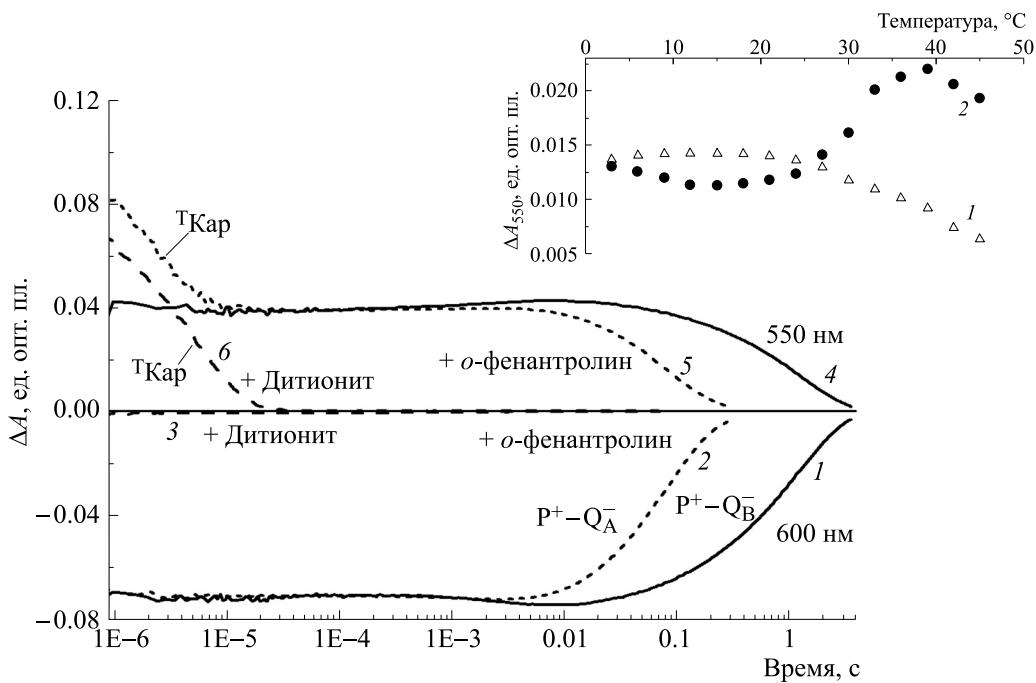


Рис. 2. Кинетика лазер-индукционных изменений поглощения при $\lambda_{\text{пер}} = 600$ нм в полосе Q_x перехода димера Р (отрицательные изменения) и при $\lambda_{\text{пер}} = 550$ нм в полосе превращений каротиноидов (положительные изменения). Сплошные линии – кинетические кривые для РЦ с обоими хинонными акцепторами Q_A и Q_B ; линии в виде точек – РЦ в присутствии 10^{-2} М *o*-фенантролина, когда перенос электрона от Q_A на вторичный акцептор Q_B блокирован; пунктирные линии – РЦ с восстановленными в темноте акцепторами Q_A и Q_B при добавлении 10^{-2} М дитионита натрия, РЦ ресуспендированы в 50 мМ трис-буфере, pH 7.8. Измерения проведены при комнатной температуре. На врезке: температурная зависимость амплитуды миллисекундной фазы каротиноидных изменений при 550 нм, отражающих разделение зарядов $P^+ - Q_A^-$ (1), и микросекундной фазы, отражающей образование T_{Kar} (2).

тает время жизни состояния с разделенными зарядами между Р и Н (поскольку отсутствует влияние отрицательного заряда фотовосстановленного Q_A на положение энергетического уровня $P^+ - H^-$). Вместе с тем, согласно работам [13–15], выход T_{Kar} в РЦ *C. sphaeroides* линейно растет при увеличении времени жизни состояния $P^+ - H^-$.

Факт дополнительного вытеснения Q_A из его локуса в структуре РЦ *o*-фенантролином при росте температуры подтверждается высушиванием суспензии РЦ, содержащей 10^{-2} М *o*-фенантролина. В такой воздушно-сухой пленке РЦ вклад микросекундного компонента в фотоиндуцированный сигнал при 550 нм, отражающего образование T_{Kar} , увеличивается при комнатной температуре по сравнению с суспензией РЦ почти в 3 раза (результаты не приводятся).

При дальнейшем нагревании суспензии РЦ при температурах выше 37°C наблюдается, как видно на рис. 2, уже падение вклада T_{Kar} наряду с дальнейшим снижением амплитуды миллисекундного компонента темновой релаксации фотоиндуцированного сигнала. Это является

результатом деградации фотосинтетического аппарата, о чем свидетельствует характерное изменение спектра поглощения препаратов РЦ, нагреваемых до температур выше 40°C – происходит уменьшение экстинкции в области поглощения димера и мономера Бхл при 870 нм и 800 нм и увеличение экстинкции в области поглощения Бфф при 760 нм.

На рис. 3 показана температурная зависимость времени жизни T_{Kar} в координатах Аррениуса для образцов с различным содержанием кислорода в среде.

В обычных аэробных условиях регистрируемое время жизни T_{Kar} в исследуемом температурном диапазоне составляет: ~2.6 мкс при 3°C, постепенно сокращается до ~1.3 мкс при 25°C и при дальнейшем росте температуры изменяется мало. Мы связываем эту зависимость с влиянием растворенного O_2 на время дезактивации T_{Kar} . Подтверждением служит тот факт, что при добавлении к суспензии РЦ 10^{-2} М дитионита натрия регистрируемое время жизни T_{Kar} практически не меняется во всем исследованном диапазоне

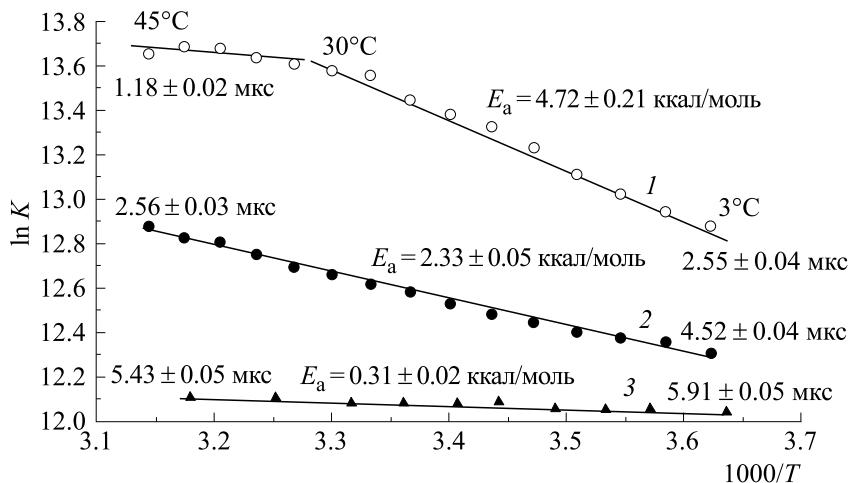


Рис. 3. Температурная зависимость константы скорости микросекундной фазы изменений поглощения при 550 нм в РЦ в координатах Аррениуса: 1 – в присутствии 10^{-2} М α -фенантролина в обычных аэробных условиях; 2 – в анаэробных условиях после откачки воздуха форвакуумным насосом; 3 – в РЦ, к которым вместо α -фенантролина был добавлен дитионит натрия в концентрации 10^{-2} М. Также показаны характерные времена для крайних значений температурного интервала и рассчитанные энергии активации со стандартными отклонениями по трем независимым измерениям.

температур, составляя 5.9 мкс при 3°C и 5.4 мкс при 45°C. Известно, что дитионит эффективно взаимодействует с O_2 , быстро восстанавливая растворенный O_2 до бисульфата и/или бисульфита [19].

Следует отметить, что сам механизм влияния O_2 на время дезактивации T_{Kap} остается предметом изучения [14], хотя высказано предположение, что ускорение дезактивации T_{Kap} в присутствии O_2 может быть связано с усилением интеркомбинационной конверсии T_{Kap} [1]. Регистрируемая же нами зависимость очевидно отражает температурную зависимость диффузии O_2 к локусу Kap в структуре РЦ. Уменьшение времени жизни T_{Kap} в присутствии O_2 наблюдалось и применительно к светособирающим фотосинтетическим комплексам [1, 20, 21]. Отмечается также, что O_2 не влияет на процесс образования T_{Kap} ввиду большой разницы во времени активации (десятки нс) и их дезактивации (микросекунды) этих триплетных состояний [2, 20].

Рассчитанная энергия активации E_a для регистрируемого времени жизни T_{Kap} в диапазоне температур 0–30°C (рис. 3) равна 4.7 ккал/моль. Такая E_a сравнима с энергией перестройки водородных связей в системах с водородными связями [22]. Возможно, это является косвенным свидетельством в пользу высказанного выше предположения о зависимости времени жизни T_{Kap} от диффузии молекулярного O_2 в структуре РЦ. Молекулярный кислород, проникающий в структуру белковой молекулы, мигрирует относительно быстро в водной фазе. Свободная диффузия O_2 в воде имеет энергию активации 3.0 ккал/моль [23]. Скорость-лимитирующим барьером для проникновения O_2 в белок является сольватный слой водно-белковой поверхности – для его преодоления уже требуется энергия 6.5 ккал/моль. Повышение же температуры увеличивает растворимость O_2 в белке [23].

Наблюдаемый излом в температурной зависимости E_a на рис. 3 при $\sim 30^\circ\text{C}$ мы связываем с изменением характера структурного взаимодействия между связанный молекулой каротиноида и белком [24]. Ранее в этом температурном диапазоне мы наблюдали резкие изменения характера температурного хода времени τ темновой рекомбинации фоторазделенных зарядов $P^+Q_A^- \rightarrow PQ_A$: τ растет при увеличении температуры от криогенной до $\approx 30^\circ\text{C}$, а затем, наоборот, уменьшается при дальнейшем нагревании [25]. Эти изменения сопоставлялись с температурной зависимостью тока термодеполяризации в препаратах РЦ в том же температурном диапазоне. Для измерения тока термодеполяризации (электретный эффект) образец замораживается во внешнем электрическом поле. Затем поле отключается и регистрируется ток при последующем нагревании образца, обусловленный током смещения при релаксации «замороженных» в электрическом поле диполей в структуре препарата. Температурная кривая тока термодеполяризации тоже имела немонотонный колоколообразный характер. Для объяснения на-

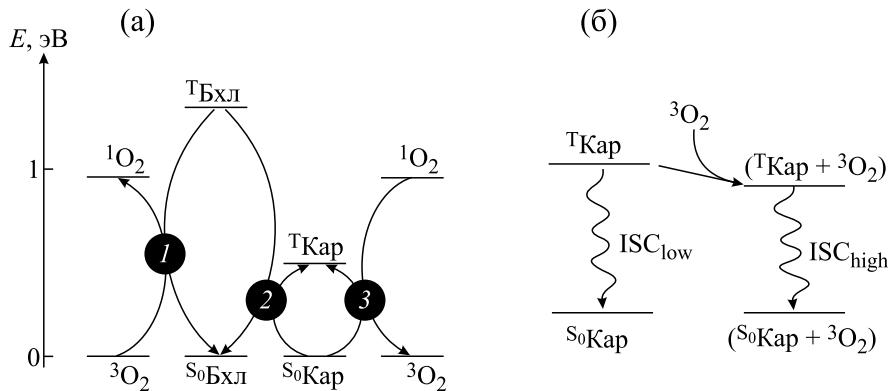


Рис. 4. Схема миграции энергии электронного возбуждения между молекулами бактериохлорофилла (Бхл), каротиноида (Кар) и кислорода (O_2). (а) – Каналы миграции энергии с участием спинового катализа [27]: 1 – дезактивация триплетного состояния бактериохлорофилла $T_{\text{Бхл}}$ с образованием синглетного кислорода (1O_2), 2 – дезактивация $T_{\text{Бхл}}$ с образованием триплетного каротиноида ($T_{\text{Кар}}$), 3 – дезактивация 1O_2 с образованием $^3\text{Кар}$. (б) – Гипотетическая схема дезактивации триплетного состояния каротиноида $T_{\text{Кар}}$ с образованием основного синглетного состояния по механизму интеркомбинационной конверсии (ISC – intersystem crossing).

блюдаемых температурных зависимостей было высказано предположение о структурных изменениях в белке РЦ в ходе его нагревания по типу фазового перехода в системе водородных связей водно-белкового окружения пигментных кофакторов в РЦ [25].

В анаэробных условиях время жизни триплетного состояния каротиноида заметно увеличивалось, подтверждая тем самым участие растворенного кислорода в процессе тушения этого возбужденного состояния. При этом зависимость константы скорости тушения в этих условиях ограниченного содержания кислорода в суспензии РЦ демонстрирует меньшую зависимость от температуры с энергией активации в два раза ниже (2.3 ккал/моль), чем в нормальных аэробных условиях (рис. 3). Экстраполируя эту зависимость к нулевой концентрации кислорода, можно сделать заключение, что чем меньше концентрация O_2 , тем больше время жизни триплета и меньше его зависимость от температуры. Такие условия, в частности, создаются в присутствии дитионита, когда время жизни $T_{\text{Кар}}$ составляет около 5.5 мкс, а E_a всего 0.3 ккал/моль.

На рис. 3 обращает также на себя внимание, что в условиях откачивания O_2 из кюветы не наблюдается характерного излома на зависимости $\ln K$ от температуры вблизи 30°C. Такое поведение температурной зависимости E_a , а также уменьшение ее значения возможно связано с частичным удалением растворенных в исследуемом образце молекул N_2 . Хотя растворимость N_2 в воде в 2 раза меньше, чем у O_2 , но, учитывая существенно большее парциальное давление N_2 в воздухе, его содержание в воде в конечном итоге в 2 раза пре-

вышает таковое для O_2 [26]. В условиях нормального атмосферного давления растворенный N_2 видимо частично препятствует процессу проникновения O_2 вглубь РЦ через его граничную поверхность. Это обусловливает и более высокую E_a для регистрируемой энергии активации тушения триплета Кар молекулярным O_2 , и наличие излома на зависимости $\ln K$ от температуры вблизи 30°C, когда тепловая подвижность уже обеспечивает достаточно быстрое проникновение O_2 к локусу Кар. При частичной дегазации удаление избытка N_2 , вероятно, облегчает проникновение O_2 через граничную поверхность РЦ, но вместе с тем снижение содержания O_2 в окружающем РЦ водном растворе приводит к менее эффективному взаимодействию O_2 с $T_{\text{Кар}}$ за время жизни последнего. В результате зависимость времени жизни $T_{\text{Кар}}$ от диффузии O_2 сохраняется во всем исследованном диапазоне температур.

В заключение можно представить следующую схему тушения триплетных состояний бактериохлорофилла при световом возбуждении РЦ (рис. 4): миграция энергии между молекулами Бхл, Кар и O_2 происходит в рамках процесса спинового обмена (спинового катализа) при сохранении полного спина системы взаимодействующих молекул [27]. Дезактивация триплетного состояния $T_{\text{Бхл}}$ и переход в основное синглетное состояние $S_0_{\text{Бхл}}$ происходит с изменением спина одного электрона, этот процесс запрещен строгим квантовым запретом и должен быть скомпенсирован противоположным изменением в сопряженной системе. В рассмотренном случае в роли сопряженных систем выступают молекулярный

кислород, который перейдет из основного триплетного ${}^3\text{O}_2$ в синглетное состояние ${}^1\text{O}_2$ (рис. 4а, 1), или каротиноид, который в сопряженном процессе перейдет из основного синглетного ${}^1\text{S}_0\text{Kar}$ в триплетное состояние ${}^3\text{T}\text{Kar}$ (рис. 4а, 2). В свою очередь, синглетное состояние кислорода ${}^1\text{O}_2$ может бытьdezактивировано сопряженно с процессом перехода каротиноида из основного синглетного ${}^1\text{S}_0\text{Kar}$ в триплетное состояние ${}^3\text{T}\text{Kar}$ (рис. 4а, 3). Направление процесса миграции энергии определяется взаимным расположением соответствующих энергетических уровней, которые выстроены в ряд $E({}^3\text{Bchl}) > E({}^1\text{O}_2) > E({}^3\text{T}\text{Kar})$, что определяет возможность каротиноида тушить как триплетное состояние хлорофилла, так и синглетный кислород, а также общую тенденцию системы к образованию наиболее энергетически выгодного триплетного состояния каротиноида ${}^3\text{T}\text{Kar}$. Процесс dezактивации триплетного состояния каротиноида ${}^3\text{T}\text{Kar}$ и возврат его в основное синглетное состояние ${}^1\text{S}_0\text{Kar}$ носит характер интеркомбинационной конверсии (Intersystem Crossing, ISC), что определяет низкую скорость этого процесса. Анализируя результаты об ускорении процесса dezактивации ${}^3\text{T}\text{Kar}$ в присутствии молекулярного кислорода и соотнося их с нашими представлениями об устройстве энергетических уровней в исследованных системах, мы считаем, что причиной может быть ускорение процесса интеркомбинационной конверсии в присутствии парамагнитной частицы триплетного кислорода ${}^3\text{O}_2$ в столкновительном комплексе с ${}^3\text{T}\text{Kar}$ (рис. 4б). Несмотря на то что механизм подобного эффекта пока не совсем ясен, гипотеза об ускорении интеркомбинационной конверсии в присутствии парамагнитной частицы высказывалась экспериментаторами [28, 29].

ФИНАНСИРОВАНИЕ РАБОТЫ

Исследование выполнено в рамках Государственного задания МГУ имени М.В. Ломоносова (проект № 121032500058-7), а также при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-14-00104).

КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

СОБЛЮДЕНИЕ ЭТИЧЕСКИХ СТАНДАРТОВ

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Peterman E. J. G., Dukker F. M., van Grondelle R., and van Amerongen H. Chlorophyll a and carotenoid triplet states in light-harvesting complex II of higher plants. *Bioophys. J.*, **69**, 2670 (1995). DOI: 10.1016/S0006-3495(95)80138-4
- Mandal S., Carey A.-M., Locsin J., Gao B.-R., Williams J.-A. C., Allen J. P., Lin S., and Woodbury N. W. Mechanism of triplet energy transfer in photosynthetic bacterial reaction centers. *J. Phys. Chem. B*, **121**, 6499–6510 (2017). DOI: 10.1021/acs.jpcb.7b03373
- Sipka G. and Maroti P. Photoprotection in intact cells of photosynthetic bacteria: quenching of bacteriochlorophyll fluorescence by carotenoid triplets. *Photosynth. Res.*, **136**, 17 (2018). DOI: 10.1007/s11120-017-0434-3
- Laible P. D., Morris Z. S., Thurnauer M. C., Schiffer M., and Hanson D. K. Inter- and intraspecific variation in excited-state triplet energy transfer rates in reaction centers of photosynthetic bacteria. *Photochem. Photobiol.*, **78** (2), 114 (2003). DOI: 10.1562/0031-8655(2003)078<0114:iaivie>2.0.co;2
- Marchanka A., Paddock M., Lubitz W., and van Gastel M. Low-temperature pulsed EPR study at 34 GHz of the triplet states of the primary electron donor P865 and the carotenoid in native and mutant bacterial reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Biochemistry*, **46**, 14782 (2007). DOI: 10.1021/bi701593r
- Kirmaier C., Holten D., and Parson W. W. Temperature and detection-wavelength dependence of the picosecond electron transfer kinetics measured in *Rhodopseudomonas sphaeroides* reaction centers—resolution of new spectral and kinetic components in the primary charge-separation process. *Biochim. Biophys. Acta*, **810**, 33 (1985). DOI: 10.1016/0005-2728(85)90204-X
- Holzapfel W., Finkele U., Kaiser W., Oesterhelt D., Scheer H., Stilz H. U., and Zinth W. Observation of a bacteriochlorophyll anion radical during the primary charge separation in a reaction center. *Chem. Phys. Lett.*, **160**, 1 (1989). DOI: 10.1016/0009-2614(89)87543-8
- Holzwarth A. R. and Muller M. G. Energetics and kinetics of radical pairs in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides*. A femtosecond transient absorption study. *Biochemistry*, **35**, 11820 (1996). DOI: 10.1021/bi9607012
- Šlouf V., Chábera P., Olsen J. D., Martin E. C., Qiak P., Huntec C. N., and Polívka T. Photoprotection in a purple phototrophic bacterium mediated by oxygen-dependent alteration of carotenoid excited-state properties. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **109**, 8570 (2012). DOI: 10.1073/pnas.1201413109
- Пименова М. Н., Гречушкина Н. Н., Азова Л. Г., Семенова Е. В. и Мыльникова С. И. *Руководство к практическим занятиям по микробиологии* (Изд-во МГУ, М., 1983).
- Захарова Н. И. и Чурбанова И. Ю. Методы получения реакционных центров фотосинтезирующих пурпурных бактерий. *Биохимия*, **65**, 181 (2000).

12. Okamura M. Y., Isaacson R. A., and Feher G. Primary acceptor in bacterial photosynthesis: Obligatory role of ubiquinone in photoactive reaction centre of *Rhodopseudomonas sphaeroides*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **72**, 3491 (1975). DOI: 10.1073/pnas.72.9.3491
13. Gibasiewicz K. and Pajzderska M. Primary radical pair P^+H^- lifetime in *Rhodobacter sphaeroides* with blocked electron transfer to Q_A . Effect of *o*-phenanthroline. *J. Phys. Chem. B.*, **112**, 1858 (2008). DOI: 10.1021/jp075184j
14. Gibasiewicz K., Pajzderska M., Ziółek M., Karolczak J., and Dobek A. Internal electrostatic control of the primary charge separation and recombination in reaction centers from *Rhodobacter sphaeroides* revealed by femtosecond transient absorption. *J. Phys. Chem. B.*, **113**, 11023 (2009). DOI: 10.1021/jp811234q
15. Białek R., Burdzinski G., Jones M. R., and Gibasiewicz K. Bacteriopheophytin triplet state in *Rhodobacter sphaeroides* reaction centers. *Photosynth. Res.*, **129**, 205 (2016). DOI: 10.1007/s11120-016-0290-6
16. Окамура М. И., Фехер Г. и Нельсон Н. Реакционные центры. В кн. *Фотосинтез* (Мир, М., 1987), т. 1, сс. 316–402.
17. Frank H. A., Chadwick B. W., Taremi S., Kolaczkowski S., and Bowman M. K. Singlet and triplet absorption spectra of carotenoids bound in the reaction centers of *Rhodopseudomonas sphaeroides* R26. *FEBS Lett.*, **203**, 157 (1986). DOI: 10.1016/0014-5793(86)80734-7
18. Paschenko V. Z., Gorokhov V. V., Grishanova N. P., Goryacheva E. A., Korvatovsky B. N., Knox P. P., Zakharchova N. I., and Rubin A. B. The influence of structural-dynamic organization of RC from purple bacterium *Rhodobacter sphaeroides* on picosecond stages of photoinduced reactions. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 361 (1998). DOI: 10.1016/s0005-2728(98)00012-7
19. Tao Z., Goodisman J., and Souid A.-K. Oxygen measurement via phosphorescence: reaction of sodium dithionite with dissolved oxygen. *J. Phys. Chem. A*, **112**, 1511 (2008). DOI: 10.1021/jp710176z
20. Schödel R., Irrgang K.-D., Voigt J., and Renger G. Rate of carotenoid triplet formation in solubilized light-harvesting complex II (LHCII) from spinach. *Biophys. J.*, **75**, 3143 (1998). DOI: 10.1016/S0006-3495(98)77756-2
21. Siefermann-Harms D. and Angerhofer A. Evidence for an O_2 -barrier in the light-harvesting chlorophyll-a/b-protein complex LHC II. *Photosynth. Res.*, **55**, 83 (1998). DOI: 10.1023/A:1005951307673
22. Sheu S.-Y., Yang D.-Y., Selzle H. L., and Schlag E. W. Energetics of hydrogen bonds in peptides. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 12683 (2003). DOI: 10.1073/pnas.2133366100
23. Carrero J., Jameson D. M., and Gratton E. Oxygen penetration and diffusion into myoglobin revealed by quenching of zincprotoporphyrin IX fluorescence. *Biophys. Chem.*, **54**, 143 (1995). DOI: 10.1016/0301-4622(94)00133-5
24. Roszak A. W., McKendrick K., Gardiner A. T., Mitchell I. A., Isaacs N. W., Cogdell R. J., Hashimoto H., and Frank H. A. Protein regulation of carotenoid binding: gatekeeper and locking amino acid residues in reaction centers of *Rhodobacter sphaeroides*. *Structure*, **12**, 765 (2004). DOI: 10.1016/j.str.2004.02.037
25. Горохов В. В., Гришанова Н. П., Нокс П. П., Пащенко В. З. и Ренгер Г. Возможное влияние структурного фазового перехода в реакционных центрах *Rhodobacter sphaeroides* на скорость темнового восстановления фотоокисленного бактериохлорофилла от первичного хиона. *Биофизика*, **48**, 453 (2003).
26. Справочник химика 21. Химия и химическая технология. URL: www.Chem21.info.
27. Yaroshevich I. A., Krasilnikov P. M., and Rubin A. B. Functional interpretation of the role of cyclic carotenoids in photosynthetic antennas via quantum chemical calculations. *Comput. Theor. Chem.*, **1070**, 27 (2015). DOI: 10.1016/j.comptc.2015.07.016
28. Ho J., Kish E., Méndez-Hernández D. D., Wong-Carter K., Pillai S., Kodis G., Niklas J., Poluektov O. G., Gust D., Moore T. A., Moore A. L., Batista V. S., and Robert B. Triplet–triplet energy transfer in artificial and natural photosynthetic antennas. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114** (28), E5513–E5521 (2017). DOI: 10.1073/pnas.1614857114
29. Laisk A., Peterson R. B., and Oja V. Excitation transfer and quenching in photosystem II, enlightened by carotenoid triplet state in leaves. *Photosynth. Res.*, **160**, 31 (2024). DOI: 10.1007/s11120-024-01086-6

Quenching with Oxygen of the Triplet State of Spheroiden in the Reaction Centers of *C. sphaeroides* in the Temperature Range 0–45°C

P.P. Knox*, I.A. Yaroshevich*, and E.P. Lukashev*

*Department of Biology, Lomonosov Moscow State University, Leninskie Gory 1/12, Moscow, 119234 Russia

The efficiency of quenching with dissolved oxygen of the triplet state of the carotenoid spheroiden (^TCar) in the photosynthetic reaction center of purple bacteria *Cereibacter (Rhodobacter) sphaeroides* in the temperature range from 0°C to +45°C was investigated. For the possibility of ^TCar formation during light excitation of the reaction center, *o*-phenanthroline (10^{-2} M) was added to the preparations, partially displacing the primary quinone acceptor from the structure of reaction center. The activation energies of the process of ^TCar quenching under normal aerobic conditions and with partial degassing of the studied samples were determined.

Keywords: purple bacteria, reaction center, spheroiden, triplet state, oxygen