

На правах рукописи



Степаненко Илья Александрович

**МЕХАНИЗМ ДВУХФОТОННОГО ВОЗБУЖДЕНИЯ СВЕТОСОБИРАЮЩИХ
КОМПЛЕКСОВ ФОТОСИНТЕЗИРУЮЩИХ ПУРПУРНЫХ БАКТЕРИЙ**

03.01.02 – Биофизика

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата физико-математических наук

Москва – 2011

Работа выполнена на кафедре Общей физики и волновых процессов Физического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова.

Научный руководитель:

доктор физико-математических наук
Разживин Андрей Павлович

Официальные оппоненты:

доктор физико-математических наук, профессор
Пашенко Владимир Захарович

кандидат биологических наук
Шубин Владимир Вениаминович

Ведущая организация:

Институт химической физики
имени Н. Н. Семенова РАН

Защита состоится 15 декабря 2011 года в ___ часов ___ минут на заседании диссертационного совета Д 501.001.96 при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова по адресу: 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, МГУ, биологический факультет, кафедра биофизики, аудитория «Новая».

С диссертацией можно ознакомиться в библиотеке биологического факультета МГУ им. М.В. Ломоносова.

Автореферат разослан «___» ноября 2011 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук



М.Г. Страховская

1. Общая характеристика работы

1.1 Актуальность темы

Фотосинтез является глобальным процессом, посредством которого энергия солнечного света собирается, преобразуется, используется или запасается в биосфере Земли. Попадающая на Землю часть энергии Солнца является неисчерпаемым источником экологически чистой энергии. Однако доля солнечной энергии на энергетическом рынке сейчас составляет менее трех процентов. Несмотря на то, что на Землю энергия поступает бесплатно, ее преобразование с помощью солнечных батарей пока слишком затратно по технологическим причинам. Считается, что проблему можно решить, разработав более эффективные способы сбора, переработки и хранения солнечной энергии.

Решение энергетических проблем может быть связано с созданием искусственных преобразователей солнечной энергии, работающих по принципу природного фотосинтеза, эффективность сбора и преобразования энергии света на ранних стадиях которого близка к 100%. Но такие преобразователи «фотосинтетического» типа, которые могли бы превзойти или, по крайней мере, сравниться с солнечными батареями, пока не существуют. Основная причина этого состоит в том, что полное понимание работы фотосинтетического аппарата еще не достигнуто. Теоретические и экспериментальные работы по исследованию фотосинтеза имеют не только фундаментальное научное значение, но и могут сделать использование солнечной энергии экономически оправданным.

К простейшим организмам, способным осуществлять фотосинтез, относятся фотосинтезирующие пурпурные бактерии. Их фотосинтетический аппарат устроен гораздо проще, чем у высших растений и цианобактерий, и лучше подходит для исследования первичных (физических) процессов фотосинтеза. Первичные процессы протекают в двух основных структурных компонентах фотосинтетического аппарата – в реакционном центре (РЦ) и светособирающей антенне. В антенне всегда присутствует прицентровый светособирающий комплекс LH1 (или B875) с полосой поглощения в области 875-900 нм. Периферический светособирающий комплекс LH2 (или B800-850) с пиками поглощения около 800 и 850 нм обнаруживается у многих, но не у всех бактерий. Строение комплекса LH2

известно, в частности, по рентгеноструктурным данным. Это сложный пигмент-белковый комплекс содержащий два вида пигментов – молекулы бактериохлорофилла (БХл) и молекулы каротиноидов. Пути и механизмы переноса и преобразования поглощенной световой энергии в пигментной системе светособирающей антенны продолжают оставаться предметом интенсивных экспериментальных и теоретических исследований.

1.2 Цели и задачи исследования

Цель работы состояла в исследовании свойств «невидимых» для линейной спектроскопии энергетических состояний и связанных с ними процессов переноса и конверсии энергии в светособирающих комплексах фотосинтезирующих пурпурных бактерий. Для этого были поставлены следующие задачи:

1. Исследование энергетических состояний светособирающих комплексов методом флуоресцентной спектроскопии при двухфотонном возбуждении лазерными импульсами.
2. Исследование динамики переноса и конверсии энергии в светособирающих комплексах методом спектроскопии фотоиндуцированных изменений оптического поглощения с фемтосекундным временным разрешением при двухфотонном возбуждении лазерными импульсами.
3. Сравнительное исследование светособирающих комплексов, содержащих каротиноиды и не содержащих каротиноиды (с подавленным синтезом каротиноидов или из бескаротиноидных мутантов), а также комплексов из различных видов фотосинтезирующих пурпурных бактерий.

1.3 Научная новизна работы

В работе впервые прямым экспериментом опровергнуто устоявшееся предположение о существенном вкладе каротиноидов в спектр двухфотонного поглощения светособирающего комплекса LH2 фотосинтезирующих пурпурных бактерий. Впервые экспериментально обоснована гипотеза о возможности двухфотонного возбуждения наивысшего экситонного состояния ($k=0^{(+)}$)

кольцевого агрегата B850 комплекса LH2. Методом спектроскопии двухфотонного возбуждения определена энергия наивысшего экситонного состояния и оценена энергия взаимодействия молекул бактериохлорофилла в кольцевом агрегате B850. Впервые получены экспериментальные оценки сечения двухфотонного поглощения комплексов LH2, а также исследована динамика конверсии энергии возбуждения в кольцевом агрегате B850.

1.4 Практическая значимость работы

Практическая значимость работы заключается в доказанной перспективности использования фемтосекундной лазерной спектроскопии двухфотонного возбуждения для исследования компонентов фотосинтетического аппарата бактерий и высших растений. Результаты исследований, проведенных в рамках настоящей работы, проясняют механизм двухфотонного возбуждения фотосинтетических светособирающих комплексов, а также раскрывают возможности использования данного механизма для экспериментального исследования процессов переноса энергии возбуждения.

1.5 Личный вклад соискателя

Все экспериментальные результаты, изложенные в работе, получены соискателем самостоятельно. Разработана и создана измерительная часть установки для регистрации спектров возбуждения флуоресценции образцов на основе перестраиваемого параметрического усилителя и прецизионной ПЗС-матрицы. Создана установка для исследования фотоиндуцированных изменений оптического поглощения образцов с возможностью получения спектров возбуждения (поддержка автоматического сканирования по длине волны возбуждения и автоматического регулирования мощности возбуждения). Для обеих установок разработано специализированное программное обеспечение.

1.6 Апробация работы.

Основные материалы диссертационной работы докладывались и обсуждались на международной конференции “Photosynthesis Research for Sustainability” (24-30 July 2011, Baku, Azerbaijan), международной конференции

“Laser Applications in Life Sciences, LALS-2010” (9-11 June, 2010, Oulu, Finland), международной конференции “Laser applications and Technologies, ICONO/LAT 2010” (23-26 августа 2010, Казань), XIX Пушкинских чтениях по фотосинтезу и Всероссийской конференции "Фотохимия хлорофилла в модельных и природных системах", посвященных 100-летию со дня рождения В.Б.Евстигнеева (15 июня 2009 г., Пушкино), Конференции "Light Energy Conversion in Photosynthesis" и V-м Съезде Российского фотобиологического общества (12 июня 2008 г., Пушкино), на рабочей конференции Европейского научного фонда программы DYNA "Novel Methods in Exploring Carotenoid Excited State Dynamics" (21 September, 2008, Czech Republic), XIV международной научной конференции «Ломоносов» (25 ноября 2008 г., Москва).

1.7 Публикации.

По материалам диссертации опубликовано 11 работ, в том числе 3 статьи в рецензируемых международных и отечественных научных журналах.

1.8 Структура и объем диссертации.

Диссертация изложена на ___ страницах машинописного текста, состоит из Введения, четырех глав («Обзор литературы», «Материалы и методика измерений», «Двухфотонное возбуждение флуоресценции светособирающих комплексов LH2», «Спектроскопия фотоиндуцированных изменений оптического поглощения светособирающих комплексов LH2 при двухфотонном возбуждении»), а также Заключения. Работа проиллюстрирована ___ рисунками. Библиографический указатель содержит ___ источников.

2. Основное содержание работы

Во **введении** обоснована актуальность темы, сформулированы цели и задачи исследования, научная и практическая значимость работы.

В **первой главе** представлен обзор литературы. Приведены современные данные об устройстве фотосинтетического аппарата фотосинтезирующих пурпурных бактерий, структуре и функциях пигмент-белковых комплексов светособирающей антенны пурпурных бактерий. Подробно рассмотрены процессы

переноса энергии возбуждения в кольцевых агрегатах антенных комплексов. Приведен обзор теории двухфотонного поглощения молекул и молекулярных комплексов, а также особенности экспериментальной методики спектроскопии двухфотонного поглощения (возбуждения).

Во **второй главе** описаны использованные в работе экспериментальные методы и образцы.

Эксперименты проводились с использованием многофункционального лазерного комплекса центра коллективного пользования «Оптико-спектральные исследования» Института спектроскопии РАН.

Принципиальная схема измерительной части установки, использованной в эксперименте по возбуждению флуоресценции, приведена на рис. 1.

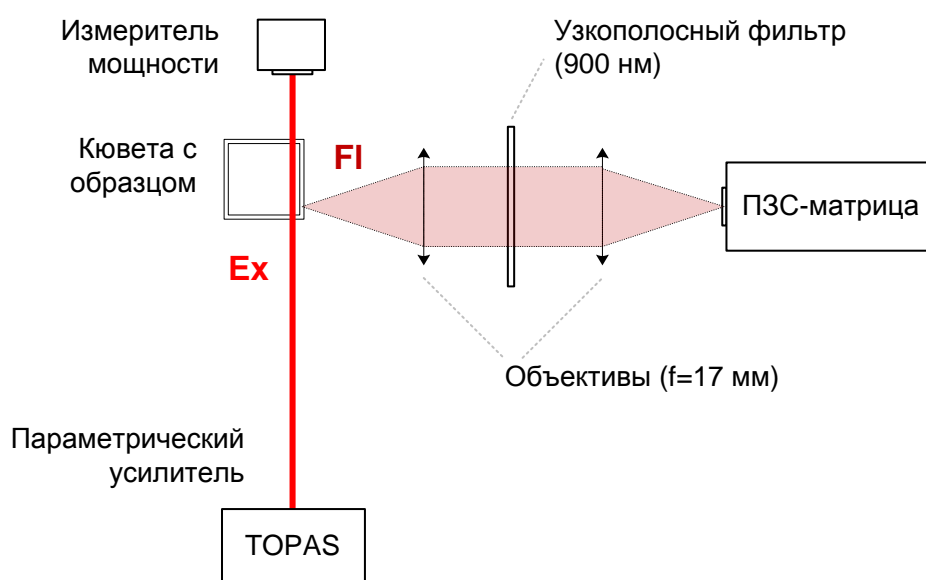


Рис. 1. Принципиальная схема измерительной части установки, использованной для регистрации спектров возбуждения флуоресценции под действием фемтосекундных импульсов.

Образец в кварцевой флуоресцентной кювете (40x10x40 мм) устанавливался на малогабаритную магнитную мешалку. Возбуждающий пучок света фокусировался на расстоянии 1 мм от боковой стенки при помощи линзы. Свет испускаемой флуоресценции собирался под углом 90^0 из пятна на глубине 1 мм и фокусировался на детектор при помощи оптического конденсора, внутри которого располагался интерференционный фильтр для отделения флуоресценции от засветки. В качестве детектора флуоресценции использовалась высокочувствительная цифровая ПЗС-камера. Для управления возбуждающим лазером, камерой и регистрации сигналов было разработано программное

приложение в среде программирования LabVIEW, специально ориентированное на задачи данного исследования.

Схема установки, использованной для исследования динамики переноса и конверсии энергии методом спектроскопии фотоиндуцированных изменений оптического поглощения приведена на рис. 2.

Импульс, выходящий из регенеративного усилителя «Spitfire Pro», попадает на светоделительную пластину, где расщепляется на две части, служащие для возбуждения и зондирования образцов. Более интенсивная часть направляется в оптический параметрический усилитель «Topas» и становится импульсом возбуждения, оставшаяся часть используется для зондирования. Импульс возбуждения проходит линию задержки и фокусируется на образце вместе с зондирующим импульсом широкополосного континуума, генерируемым на сапфировой пластинке. В качестве детектора, регистрирующего изменения мощности зондирующего импульса, используется фотодиодная линейка.

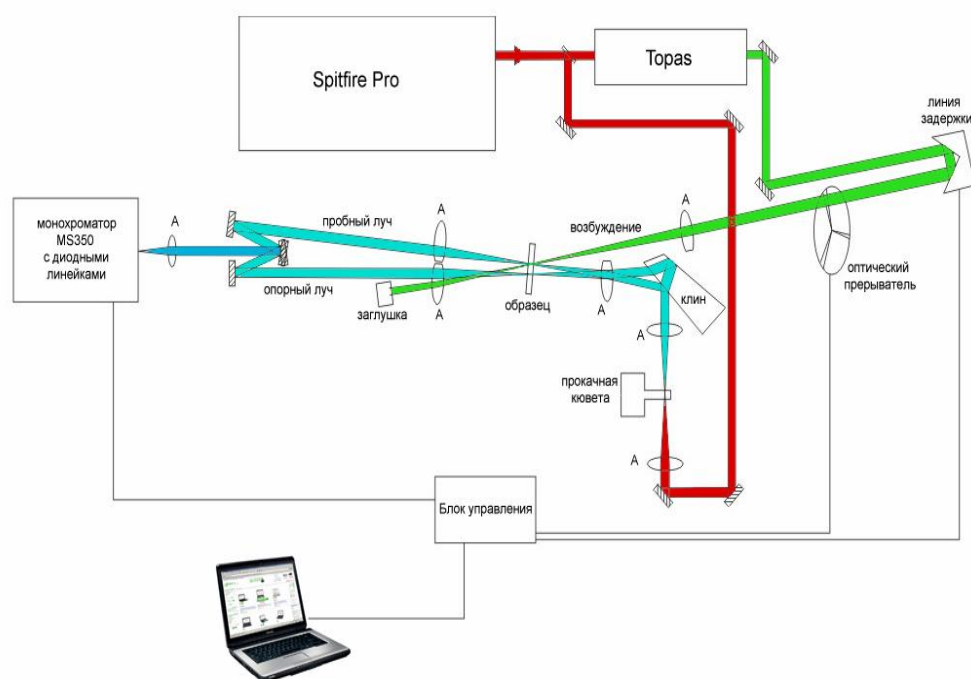


Рис. 2. Принципиальная схема установки, использованной для исследования динамики переноса и конверсии энергии методом спектроскопии фотоиндуцированных изменений оптического поглощения

Для поддержания постоянного уровня мощности в процессе измерений автором диссертационной работы была построена система автоматического

регулирования, включающая нейтральный фильтр переменной оптической плотности (0-2 опт. ед.), выполненный в виде диска, установленный на оси шагового двигателя, измеритель мощности и контроллер с программой управления, разработанной в среде LabVIEW.

Параметры экспериментов по спектроскопии двухфотонного возбуждения флуоресценции и фотоиндуцированного изменения оптического поглощения приведены в табл. 1.

Характеристика	Двухфотонное возбуждение флуоресценции	Фотоиндуцированное изменение оптического поглощения
----------------	--	---

Образец

Оптическая плотность, $\lambda=850$ нм	0.3 мм ⁻¹ (поглощение 50% на 1 мм)	0.3 мм ⁻¹ (поглощение 50% на 1 мм)
Концентрация комплексов LH2	10 ¹⁵ 1/см ³	10 ¹⁵ 1/см ³

Возбуждение

Длительность импульса	70 фс	70 фс
Энергия импульса	100 нДж	300 нДж
Интенсивность возбуждения (средняя)	40 мВ/см ²	120 мВ/см ²
Импульсная интенсивность	400 МВт/см ²	1200 МВт/см ²
Фотонов в импульсе	10 ¹⁴ 1/см ²	10 ¹⁵ 1/см ²

Табл. 1. Параметры экспериментов по двухфотонному возбуждению флуоресценции и по регистрации фотоиндуцированных изменений оптического поглощения с временным разрешением светособирающих комплексов LH2.

В качестве образцов использовались препараты комплекса LH2 из клеток *Rhodobacter sphaeroides* (*Rb. sphaeroides*) дикого типа и «псевдо»-LH2 комплекса из клеток бескаротиноидного мутанта (*Rb. sphaeroides* R26), а также препараты комплекса LH2 из клеток *Allochrodatum minutissimum* (*All. minutissimum*) дикого типа с нормальным содержанием каротиноидов и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов [Makhneva, Bolshakov, Moskalenko, 2008]. Для устранения эффектов, связанных с сильным оптическим поглощением воды в области 1400 нм, препараты готовились в тяжелой воде.

В **третьей главе** приведены результаты экспериментального исследования энергетических состояний светособирающих комплексов LH2, полученные методом флуоресцентной спектроскопии при двухфотонном возбуждении.

Линейные спектры оптического поглощения комплекса LH2 из клеток *All. minutissimum* дикого типа (содержащих каротиноиды) и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов, представлены на рис. 3.

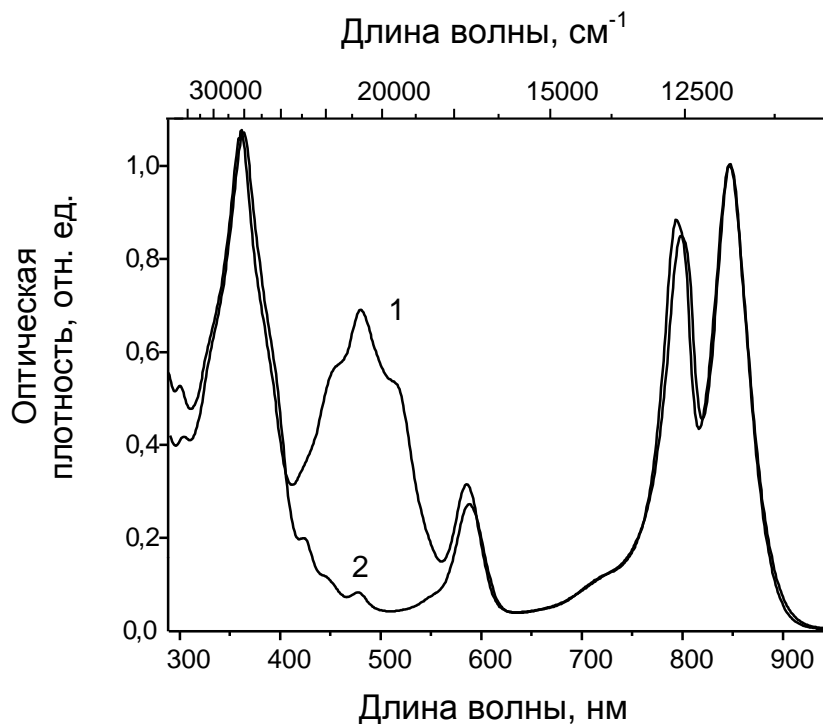


Рис. 3. Спектры оптического поглощения комплексов LH2 из клеток *All. minutissimum* дикого типа (содержащих каротиноиды) и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов (кривые 1 и 2 соответственно; нормировка в максимуме около 850 нм).

Широкая полоса поглощения в области 400–550 нм (с максимумом при 488 нм) в спектре поглощения комплекса LH2 из клеток дикого типа соответствует переходу $S_0 \rightarrow S_2$ каротиноидов (преимущественно родопина). Остальные полосы принадлежат молекулам БХл: В-переходы (максимум около 372 нм), Q_x -переход (591 нм) и Q_y -переход (максимумы около 800 и 850 нм). Q_y -переход расщепляется на два компонента. Первый из них принадлежит кольцевому агрегату молекул БХл со слабым пигмент-пигментным взаимодействием (пик при 796 нм), а второй – кольцевому агрегату В850 сильно взаимодействующих молекул БХл (848 и 846 нм, соответственно, для комплекса LH2 из клеток дикого типа и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов). Полосы с максимумами около 372 нм и 591 нм содержат вклады молекул БХл обоих кольцевых агрегатов.

Спектры оптического поглощения комплекса LH2 из клеток *Rb. sphaeroides* дикого типа (содержащих каротиноиды) и «псевдо» комплекса LH2 из клеток бескаротиноидного мутанта R26 представлены на рис. 4

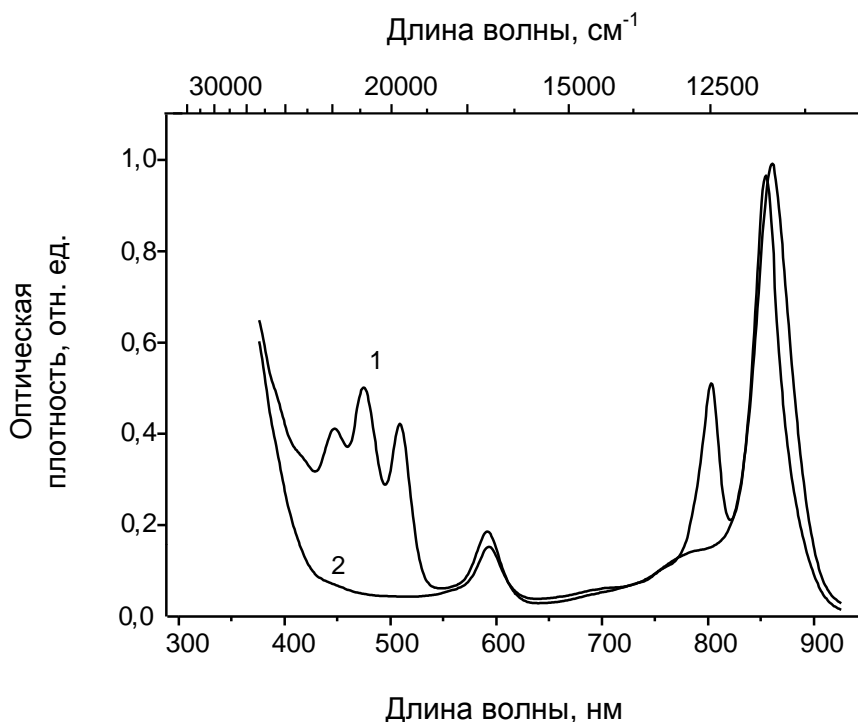


Рис. 4. Спектры оптического поглощения комплекса LH2 из клеток *Rb. sphaeroides* дикого типа (содержащих каротиноиды) и «псевдо» комплекса LH2 из клеток бескаротиноидного мутанта R-26 (кривые 1 и 2 соответственно; нормировка в максимуме около 850 нм).

Препараты комплексов LH2, содержащих каротиноиды, и препараты бескаротиноидных комплексов удобны для выяснения роли каротиноидов в фотосинтетическом аппарате путем параллельных измерений на этих препаратах.

Для комплексов LH2, полученных из клеток *All. minutissimum* было показано, что присутствие каротиноидов (родопина) не влияет ни на спектральные характеристики БХл спектральных форм В800 и В850, ни на кинетические кривые дезактивации возбуждений в полосе В800 в фемто- и пикосекундном временном диапазоне [Theiss и др., 2008]. То же справедливо относительно полосы В850 комплекса LH2 и «псевдо»комплекса LH2 из *Rb. sphaeroides*.

При возбуждении какого-либо состояния комплекса LH2, энергия в конечном итоге переносится на молекулы БХл кольцевого агрегата В850. К примеру, эффективность переноса энергии возбуждения от каротиноидов (родопина) на БХл спектральной формы В850 составляет ~20% у комплексов LH2 из *All. minutissimum* и ~100% у комплексов LH2 из *Rb. sphaeroides*. Время жизни

возбуждений в длинноволновой полосе В850 изолированных комплексов составляет сотни пикосекунд, благодаря чему для этих полос наблюдается сильная флуоресценция, которую удобно использовать в качестве «индикатора» возбуждения комплекса.

На рис. 5 показаны зависимости регистрируемого сигнала интенсивности флуоресценции для комплексов LH2 из клеток дикого типа и из клеток с подавленным синтезом каротиноидов от мощности фемтосекундных импульсов возбуждения с длиной волны 1350 нм (675 нм), снятые в пределах трех порядков изменения мощности импульсов. Полученные данные хорошо аппроксимируются квадратичной зависимостью, вклад постоянного фона и линейного члена незначителен. Отсюда можно сделать вывод, что регистрируемый сигнал является результатом только двухфотонного возбуждения.

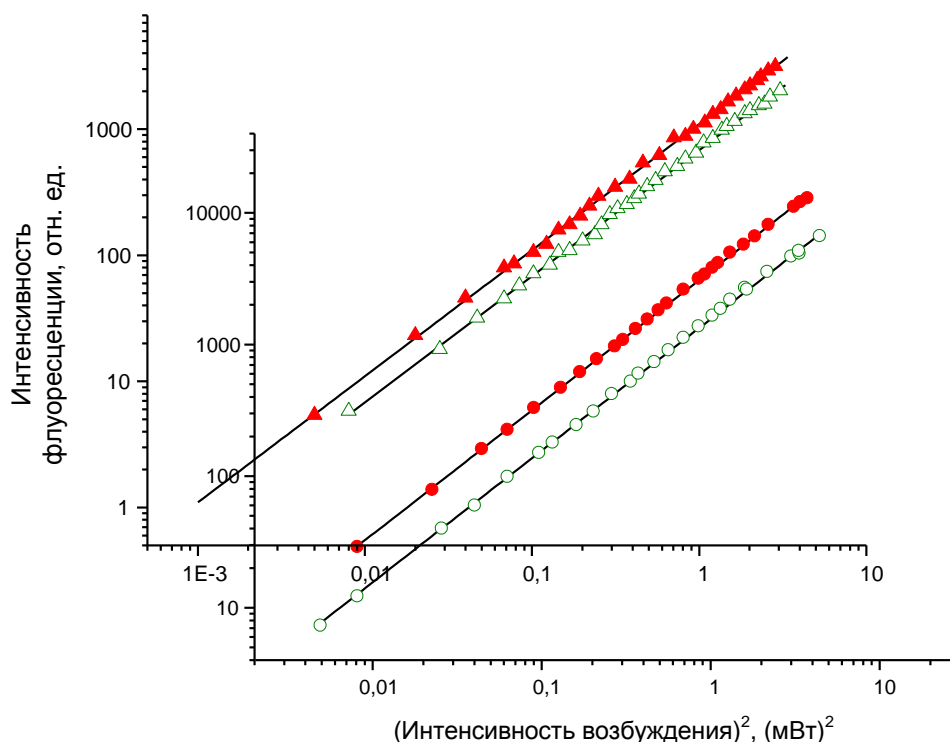


Рис. 5. Зависимости интенсивности регистрируемого сигнала флуоресценции для комплексов LH2 из клеток содержащих каротиноиды (заполненные символы) и из клеток без каротиноидов (открытые символы) от мощности фемтосекундных импульсов с длиной волны 1350 нм (треугольники - *All. minutissimum*, кружки - *Rb. sphaeroides*)

Для регистрации зависимости интенсивности флуоресценции от длины волны возбуждающего излучения (спектра двухфотонного возбуждения флуоресценции) мощность возбуждающих импульсов поддерживалась на постоянном уровне. Полученные зависимости интенсивности флуоресценции

содержащих каротиноиды и бескаротиноидных комплексов LH2 при двухфотонном возбуждении в спектральной области 1200-1500 нм показаны на рис. 6. Они имеют вид широкой полосы с максимумом около 1340 нм (670 нм, ширина на полувысоте ~120 нм). Кривые для содержащих каротиноиды и бескаротиноидных образцов совпадают в пределах погрешности измерений.

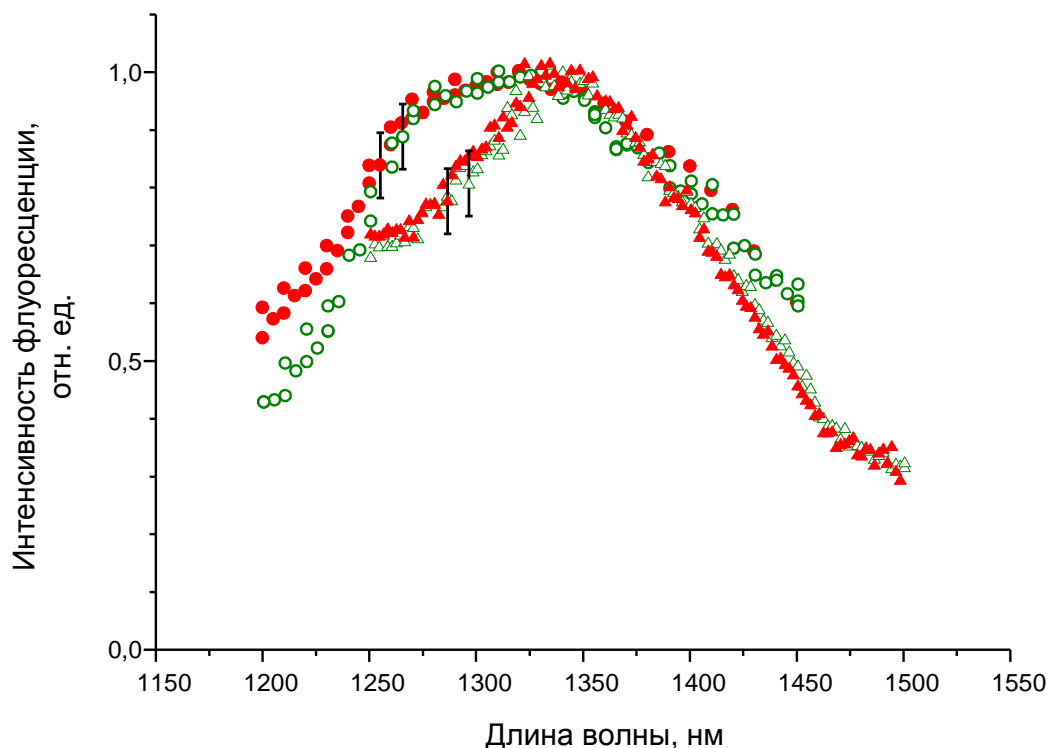


Рис. 6. Зависимость интенсивности флуоресценции от длины волны двухфотонного возбуждения для комплексов LH2 из клеток содержащих каротиноиды (заполненные символы) и из клеток без каротиноидов (открытые символы) (треугольники - *All. minutissimum*, кружки - *Rb. sphaeroides*).

Можно сделать вывод, что широкая полоса с максимумом около 1350 нм не соответствует оптически запрещенному переходу $S_0 \rightarrow S_1$ каротиноидов (родопина), как предполагалось ранее в ряде работ [Krueger и др., 1999; Walla и др., 2000]. Возможно, полоса $S_0 \rightarrow S_1$ родопина и располагается где-либо в данной спектральной области, но в этом случае ее сечение поглощения более чем в 20 раз меньше, чем у наблюдаемой широкой полосы с максимумом около 1350 нм.

Поскольку каротиноиды исключаются из рассмотрения в качестве причины появления широкой полосы поглощения с максимумом около 1350 нм в спектре двухфотонного возбуждения комплексов LH2, то остается предположить, что эта полоса связана с молекулами БХл комплексов.

В четвертой главе приведены результаты экспериментального исследования динамики конверсии энергии возбуждения светособирающих

комплексов LH2, полученные методом спектроскопии фотоиндуцированных изменений оптического поглощения с временным разрешением при двухфотонном возбуждении.

На рис. 7 представлена спектрально-кинетическая картина, отражающая динамику конверсии энергии в комплексе LH2 из клеток *Rb. sphaeroides* дикого типа при двухфотонном возбуждении фемтосекундными импульсами с длиной волны 1350 нм. Синий цвет соответствует уменьшению оптического поглощения («выцветанию»), а красный – увеличению поглощения.

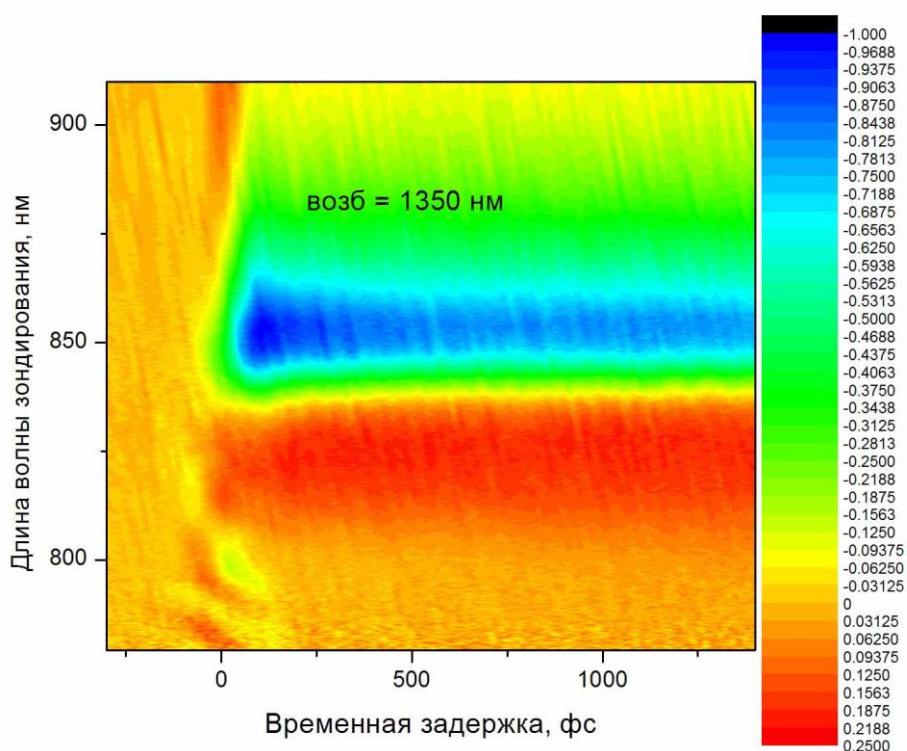


Рис. 7. Спектрально-кинетическая картина фотоиндуцированных изменений оптического поглощения комплекса LH2 из *Rb. sphaeroides* под действием возбуждающих фемтосекундных импульсов с длиной волны 1350 нм. По оси X показана временная задержка зондирующего импульса фемтосекундного континуума относительно возбуждающего импульса, а по оси Y – длина волны зондирования. Величина изменений оптического поглощения показана на картине цветом согласно шкале соответствия справа

Важным результатом является полное отсутствие выцветания полосы 800 нм при двухфотонном возбуждении на длине волны 1350 нм. Хотя при прямом возбуждении молекул БХл кольцевого агрегата В800, а также при их возбуждении в следствие переноса и конверсии энергии, регистрируется короткоживущее выцветание этой полосы (с временем жизни $\tau \sim 0,8-0,9$ пс) с последующим быстрым переносом энергии возбуждения на молекулы БХл кольцевого агрегата

В850. Таким образом, двухфотонное возбуждение комплекса LH2 вызывает избирательное возбуждение молекул БХл кольцевого агрегата В850.

Мгновенные разностные кинетики и спектры фотоиндуцированного поглощения при двухфотонном возбуждении приведены на рис. 8 и 9 соответственно.

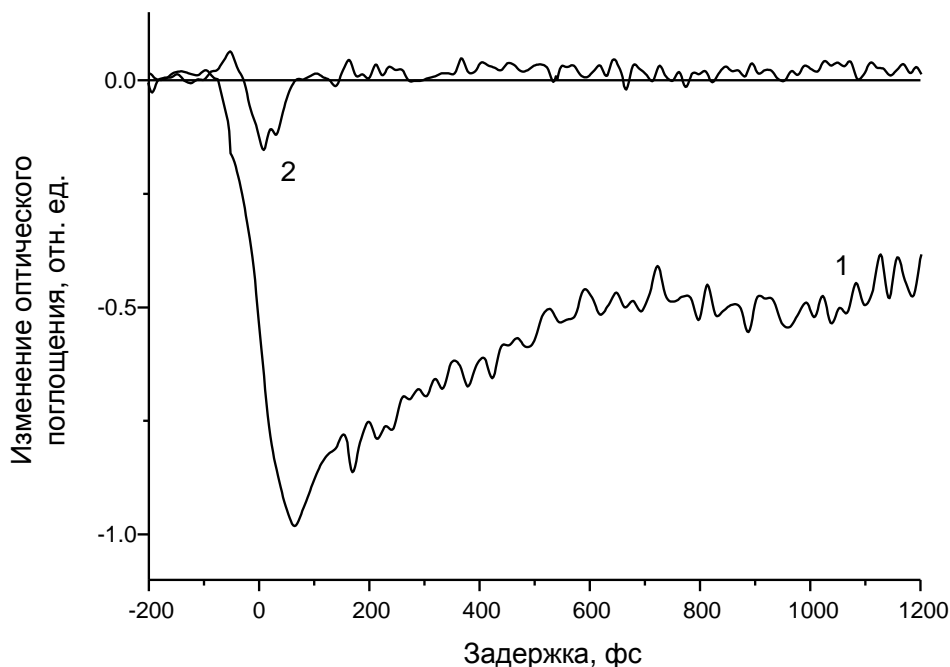


Рис. 8. Кинетики фотоиндуцированного изменения оптического поглощения при 850 нм (кривая 1) и 800 нм (кривая 2) при двухфотонном возбуждении в 1350 нм комплекса LH2 из *Rb. sphaeroides*.

Выцветание полосы 850 нм формируется в течении ~ 100 фс после возбуждения, то есть энергия возбуждения поступает на нижние экситонные уровни $k=\pm 1^{(-)}$ и $k=0^{(-)}$ кольцевого агрегата В850 менее чем за 100 фс. После быстрого формирования, полоса выцветания уменьшается в масштабе сотен пикосекунд, что соответствует долгому времени жизни этих экситонных состояний.

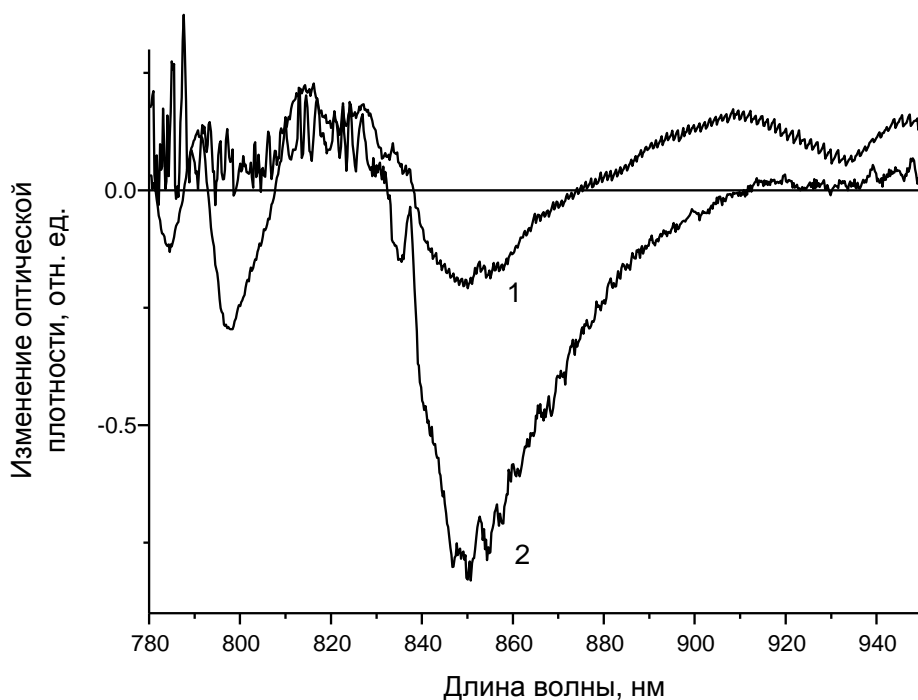


Рис. 9. Разностные спектры фотоиндуцированного оптического поглощения при задержке 30 фс (кривая 1) и 100 фс (кривая 2) между возбуждающим и зондирующим импульсами при двухфотонном возбуждении в 1350 нм комплекса LH2 из *Rb. sphaeroides*.

На разностном спектре 1 (рис. 9), снятом при задержке 30 фс, наблюдается усиление поглощения в области выше 880 нм, которое на разностном спектре 2, снятом при задержке 100 фс, уступает место выцветанию, соответствующему вынужденному излучению экситонных уровней $k=\pm 1^{(-)}$ и $k=0^{(-)}$. Также на спектре наблюдается небольшой спектральный сдвиг полосы выцветания по сравнению со спектром 1. После окончательного формирования полосы выцветания в течении ~ 100 фс изменений формы разностных спектров не наблюдается. Перечисленные особенности спектрально-кинетической картины соответствуют типичным процессам конверсии энергии в кольцевом агрегате B850 после прямого возбуждения [Visser и др., 1995]. Таким образом, наблюдаемые эффекты являются результатом прямого двухфотонного возбуждения молекул БХл кольцевого агрегата B850.

В симметричном кольцевом агрегате, каковым является агрегат B850, для двухфотонного перехода оказываются разрешенными только высшие экситонные состояния $k=0^{(+)}$ и $k=\pm 2^{(+)}$ [Abe, 2001]. Значения энергий состояний $k=0^{(+)}$ и $k=\pm 2^{(+)}$ на данный момент оценены лишь опосредованными экспериментальными методами и методами математического моделирования. По различным данным, энергия состояния $k=0^{(+)}$ находится в диапазоне 12800-15000 см^{-1} . Спектральное

положение полученной полосы двухфотонного возбуждения указывает на то, что она соответствует наивысшему состоянию $k=0^{(+)}$, обладающему энергией 14800 см^{-1} и спектральной шириной $\sim 3200 \text{ см}^{-1}$.

Знание точного положения состояния $k=0^{(+)}$ позволяет достоверно определить энергию взаимодействия молекул БХл в агрегате – важнейшего параметра, характеризующего физические свойства кольцевого агрегата В850. Энергию взаимодействия молекул БХл можно оценить как четверть спектральной ширины множества экситонных состояний агрегата, т.е. как четверть разности энергий состояний $k=0^{(+)}$ и $k=0^{(-)}$: $V_d = 780 \text{ см}^{-1}$. В существующих экспериментальных и теоретических работах даются расходящиеся оценки энергии взаимодействия: от 200 см^{-1} до 800 см^{-1} . [Timpmann и др., 2004].

В рамках простой экситонной модели для кольцевого агрегата В850 комплекса LH2 сечение двухфотонного поглощения высших экситонных состояний оценивается как $\beta_{\text{теор}} \sim 0,5 \cdot 10^{-28} \text{ см}^4/\text{Вт}$. При расчете экситонной модели энергия наивысшего экситонного состояния $k=0^{(+)}$ полагалась равной 14800 см^{-1} . В условиях эксперимента выцветание полосы 850 нм составляло $0,5 \cdot 10^{-3}$ опт. ед., то есть возбуждался 1 из 1000 комплексов LH2. Это позволяет оценить экспериментальное сечение двухфотонного поглощения с точностью до одного порядка: $\beta_{\text{эксп}} \sim 10^{-27} \text{ см}^4/\text{Вт}$ или $\sim 10^4 \text{ GM}$. Близость теоретических и экспериментальных оценок говорит в пользу предложенной гипотезы.

Спектр двухфотонного возбуждения, снятый посредством сканирования длины волны возбуждения в диапазоне $1200\text{-}1500 \text{ нм}$ и измерений остаточного выцветания полосы 850 нм при задержке 10 пс , показан на рис. 10 (треугольники).

Данный спектр совпадает с полученным ранее спектром двухфотонного возбуждения флуоресценции (рис. 6) в пределах погрешности измерений. Для сравнения на той же установке был снят спектр возбуждения в диапазоне $600\text{-}750 \text{ нм}$, соответствующем однофотонному возбуждению исследуемой спектральной области (рис. 10, кружки). Как и на линейном спектре оптического поглощения, на спектре «однофотонного возбуждения» отсутствуют выраженные полосы, тем не менее, возбуждение остается ненулевым во всем исследуемом диапазоне.

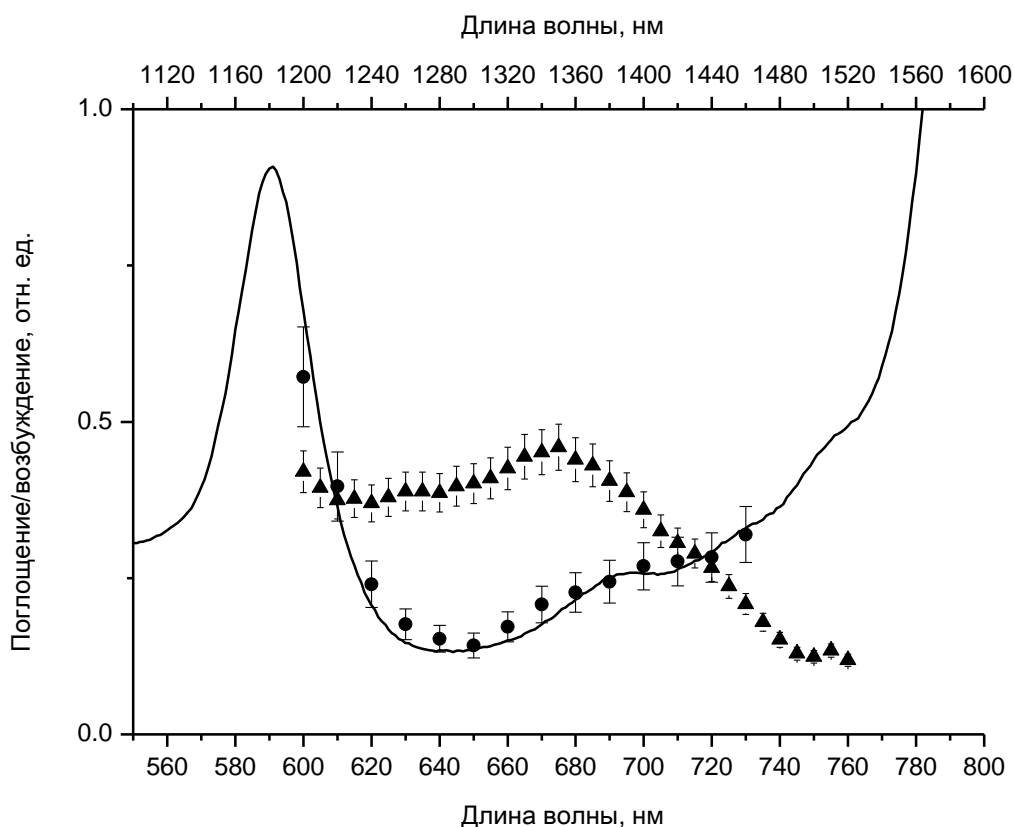


Рис. 10. Линейный спектр оптического поглощения (линия), спектр однофотонного (кружки) и двухфотонного возбуждения (треугольники) комплекса LH2 из *Rb sphaeroides*. Для спектра двухфотонного возбуждения длины волн указаны на верхней шкале.

Спектрально-кинетическая картина конверсии энергии в кольцевом агрегате при однофотонном возбуждении в 675 нм точно совпадает с получаемой при двухфотонном возбуждении на длине волны 1350 нм. Это указывает на то, что, как и за двухфотонное возбуждение в 1350 нм, так и за однофотонное возбуждение в 675 нм отвечает наивысшее экситонное состояние $k=0^{(+)}$. Теоретическая оценка сечения однофотонного поглощения состояния $k=0^{(+)}$ в рамках экситонной модели составляет $\sigma_{\text{теор}} \sim 0,5 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$, экспериментальная оценка составляет $\sigma_{\text{эксп}} \sim 10^{-16} \text{ см}^2$. Близость теоретических и экспериментальных оценок говорит в пользу предложенной гипотезы.

Выводы:

1. Показано, что под действием лазерных импульсов с длиной волны в области 1200-1500 нм происходит возбуждение кольцевых агрегатов молекул бактериохлорофилла-В850 светособирающих комплексов LH2. Полоса поглощения имеет максимум в 1350 нм (2 x 675 нм), ширину на полувысоте – 150 нм (2 x 75 нм). Получена квадратичная зависимость интенсивности флуоресценции комплексов от мощности возбуждающих импульсов, что указывает на двухфотонную природу возбуждения.
2. Посредством сравнительных измерений на содержащих каротиноиды и бескаротиноидных образцах светособирающих комплексов показано, что каротиноиды не дают вклада в двухфотонное возбуждение в области 1200-1500 нм.
3. Предложена гипотеза, согласно которой за двухфотонное возбуждение отвечает наивысшее экситонное состояние агрегата В850. Определена энергия данного состояния ($14800 \pm 200 \text{ см}^{-1}$). В рамках данной гипотезы и простой экситонной модели агрегата молекул бактериохлорофилла оценена энергия взаимодействия молекул БХл в димере агрегата В850 ($780 \pm 30 \text{ см}^{-1}$).
4. Получены экспериментальные и теоретические оценки сечения двухфотонного поглощения ($\beta_{\text{эксп}} \sim 10^{-27} \text{ см}^4/\text{Вт}$ и $\beta_{\text{теор}} \sim 0,5 \cdot 10^{-28} \text{ см}^4/\text{Вт}$ соответственно) и сечения однофотонного поглощения ($\sigma_{\text{эксп}} \sim 10^{-16} \text{ см}^2$ и $\sigma_{\text{теор}} \sim 0,5 \cdot 10^{-16} \text{ см}^2$ соответственно) наивысшего экситонного состояния. Сходство теоретических и экспериментальных оценок говорит в пользу предложенной гипотезы.
5. Исследована динамика конверсии энергии в комплексе LH2 при двухфотонном (1350 нм) и однофотонном (675 нм) возбуждении. Быстрая конверсия энергии ($< 100 \text{ фс}$) после двухфотонного и однофотонного возбуждения указывает на прямое возбуждение кольцевого агрегата В850, что говорит в пользу предложенной гипотезы.
6. Разработана и создана экспериментальная приставка для измерения спектров возбуждения флуоресценции образцов на основе перестраиваемого параметрического усилителя и прецизионной ПЗС-матрицы. Усовершенствована установка для исследования фотоиндуцированных

изменений оптического поглощения образцов – появилась возможность регистрации спектров возбуждения (автоматического сканирования по длине волны возбуждения).

4. Список публикаций по теме диссертации

1. Stepanenko I., Kompanetz V., Makhneva Z., Chekalin S., Moskalenko A., Razjivin A. Two-Photon Excitation Spectroscopy of Carotenoid-Containing and Carotenoid-Depleted LH2 Complexes from Purple Bacteria // *The Journal of Physical Chemistry B*. 2009. № 113. С. 11720–11723.
2. Степаненко И.А., Компанец В.О., Чекалин С.В., Махнева З.К., Москаленко А.А., Пищальников Р.Ю., Разживин А.П. Спектр двухфотонного возбуждения флуоресценции комплекса В800-850 из *Allochrochromatium minutissimum* в области 1200–1500 (600–750) нм не связан с каротиноидами // *Биологические мембраны*. 2008. № 26. С. 180–187.
3. Разживин А.П. и др. Динамика возбуждений в прочно связанных ассоциатах комплексов В800-850 и В800-830 из фотосинтезирующей пурпурной бактерии *Thiorhodospira sibirica* // *Биологические мембраны: Журнал мембранной и клеточной биологии*. 2007. № 24. С. 457–464.
4. Stepanenko I., Kompanets V., Makhneva Z., Chekalin S., Moskalenko A., Razjivin A. The Nature of Broad Band in the Two-Photon Excitation Spectra of Light-Harvesting Complexes from Purple Bacteria // *International Conference "Photosynthesis Research for Sustainability"*, Baku, Azerbaijan. 2011.
5. Razjivin A.P., Stepanenko I.A., Pishchalnikov R.Y. Light-Harvesting Antenna of Photosynthetic Purple Bacteria: The Mechanism of Two-Photon Excitation // *The XII International Conference on Laser Applications in Life Sciences*, Oulu, Finland. 2010.
6. Stepanenko I., Kompanetz V., Chekalin S., Moskalenko A., Razjivin A. Two-photon fluorescence excitation of bacterial LH2 complexes: the contribution of "dark" carotenoid states // *Conference "Light Energy Conversion in Photosynthesis"*, V Съезд Российского фотобиологического общества, тезисы докладов. 2008a. С. 62.
7. Stepanenko I., Kompanetz V., Chekalin S., Moskalenko A., Razjivin A. Two-photon excitation of LH2 complexes isolated from carotenoid-containing and carotenoid-depleted cells of *Allochrochromatium Minitissium* // *ESF DYNA Programme Workshop "Novel Methods in Exploring Carotenoid Excited State Dynamics"*. 2008b.
8. Stepanenko I.A., Kompanets V.O., Chekalin S.V., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A., Razjivin A.P. Photosynthetic light-harvesting complexes: fluorescent and absorption spectroscopy under two-photon (1200-1500 nm) and one-photon (600-750 nm) excitation by laser femtosecond pulses // *ICONO/LAT 2010*, Kazan. 2010.
9. Stepanenko I.A., Kompanets V.O., Chekalin S.V., Makhneva Z.K., Moskalenko A.A., Razjivin A.P. Photosynthetic light-harvesting complexes: fluorescent and absorption spectroscopy under two-photon (1200-1500 nm) and one-photon (600-750 nm) excitation by laser femtosecond pulses // *International Conference on Lasers, Applications, and Technologies 2010: Laser Technologies for Environmental Monitoring and Ecological Applications; Biophotonics and Laser Biomedicine*

Optical Sensors in Biological, Chemical, and Engineering Technologies (Proc. SPIE, 2011) (принято к печати). 2011.

10. Разживин А.П., Степаненко И.А., Пищальников Р.Ю., Компанец В.О., Чекалин С.В., Махнева З.К., Москаленко А.А. Двухфотонное возбуждение экситонносвязанных ассоциатов молекул бактериохлорофилла в фотосинтетических светособирающих комплексах // Тезисы докладов. XIX Пушкинские чтения по фотосинтезу и Всероссийская конференция "Фотохимия хлорофилла в модельных и природных системах", посвященные 100-летию со дня рождения В.Б.Евстигнеева. 2009. С. 53-54.
11. Степаненко И.А. Перенос энергии возбуждения между молекулами бактериохлорофилла и каротиноидами периферического светособирающего комплекса LH2 фотосинтезирующих пурпурных бактерий // Тезисы докладов XIV международной научной конференции «Ломоносов», секция «Биоинженерия и информатика». 2007.

4. Список цитируемой литературы

Abe S. Two-photon probe of forbidden exciton states in symmetric aggregates of asymmetric molecules // Chem. Phys. 2001. № 264. С. 355-363.

Krueger B.P., Yom J., Walla P.J., Fleming G.R. Observation of the S1 state of spheroidene in LH2 by two-photon fluorescence excitation // Chemical Physics Letters. 1999. № 310. С. 57-64.

Makhneva Z., Bolshakov M., Moskalenko A. Heterogeneity of carotenoid content and composition in LH2 of the purple sulphur bacterium *Allochrochromatium minutissimum* grown under carotenoid-biosynthesis inhibition // Photosynthesis research. 2008. № 98. С. 633-641.

Theiss C., Leupold D., Moskalenko A.A., Razjivin A.P., Eichler H., Lokstein H. Femtosecond spectroscopy of native and carotenoid-less purple-bacterial LH2 clarifies functions of carotenoids // Biophys. J. 2008. № 94. С. 4808-4811.

Timpmann K., Trinkunas G., Olsen J.D., Neil Hunter C., Freiberg A. Bandwidth of excitons in LH2 bacterial antenna chromoproteins // Chemical Physics Letters. 2004. № 398. С. 384-388.

Visser H.M., Somsen O.J., Van Mourik F., Lin S., Van Stokkum I.H., Van Grondelle R. Direct observation of sub-picosecond equilibration of excitation energy in the light-harvesting antenna of *Rhodospirillum rubrum* // Biophysical journal. 1995. № 69. С. 1083-1099.

Walla P.J., Linden P.A., Hsu C., Scholes G.D., Fleming G.R. Femtosecond dynamics of the forbidden carotenoid S1 state in light-harvesting complexes of purple bacteria observed after two-photon excitation // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. № 97. С. 10808-10813.