

УДК 577

ТЕМПЕРАТУРНАЯ ЗАВИСИМОСТЬ ДЛИТЕЛЬНОСТИ ФЛУОРЕСЦЕНЦИИ ТРИПТОФАНА КАК ПОКАЗАТЕЛЬ ДИНАМИКИ ЕГО МИКРООКРУЖЕНИЯ

© 2021 г. В. В. Горохов^{1,*}, Б. Н. Корватовский¹, П. П. Нокс¹,
Н. П. Гришанова¹, С. Н. Горячев¹, В. З. Пашенко¹,
член-корреспондент РАН А. Б. Рубин¹

Поступило 08.12.2020 г.
После доработки 29.01.2021 г.
Принято к публикации 05.02.2021 г.

Исследованы спектрально-кинетические характеристики флуоресценции молекулы триптофана в водном растворе и в составе белка (альбумин) в диапазоне температур от -170 до 25°C . Для объяснения наблюдаемых изменений в спектрах и длительности флуоресценции триптофана от температуры использована модель переходов между возбужденным и основным состояниями с привлечением состояния с переносом заряда, которая учитывает нелинейный характер динамики этих переходов. В данных процессах важную роль играют взаимодействие молекул триптофана с его микроокружением, а также перестройки в системе водородных связей водно-белковой матрицы, окружающей молекулу триптофана.

Ключевые слова: триптофан, флуоресценция, водородные связи, молекулярная динамика

DOI: 10.31857/S2686738921030057

Изучение влияния температуры на активность функциональных белков давно является одним из важнейших подходов для выяснения физико-химических механизмов их работы [1]. Для исследования внутримолекулярной конформационной динамики белков, тесно связанной с их функциональной активностью, в качестве природного внутреннего индикатора широко используется флуоресценция триптофановых остатков в составе белков. Источником информации о характере внутримолекулярной динамики ближайшего окружения возбужденной молекулы триптофана (Тгр), в том числе о роли водородных связей в этом окружении, являются зависимости от температуры спектров и длительности флуоресценции Тгр в воде и в составе белка [2–5]. Роль водородных связей как в структурно-динамическом устройстве белков в целом, так и в определении ими спектрально-кинетических характери-

стик внутренних триптофанилов в частности, до настоящего времени остается актуальной темой исследований [1, 5]. Кинетика затухания флуоресценции Тгр в растворе, а также в составе пептидов и белков многокомпонентна. В зависимости от типа растворителя, рН, наблюдают 2–3 компоненты кинетики флуоресценции триптофана с временами от сотен пикосекунд до ~ 10 нс. В белках также регистрируют 2–3-компонентную кинетику флуоресценции Тгр в аналогичном временном интервале [5–9].

Время жизни возбужденных электронных состояний при разных температурах во многом обусловлено процессом переноса электрона с индольного кольца возбужденной молекулы Тгр на амидные группы основного скелета молекулы либо в систему водородных связей (Н-связей), образованную между молекулами Тгр и их окружением [10]. В последнем случае перенос электрона сопровождается образованием состояния с переносом заряда (Charge Transition State, CTS) [9]. Сольватация возбужденных молекул за счет взаимодействия с ближайшим окружением может инду-

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, Москва, Россия
*e-mail: Gorokhgeron149@gmail.com

цировать сдвиги их спектров поглощения и флуоресценции в зависимости от температуры [5, 11].

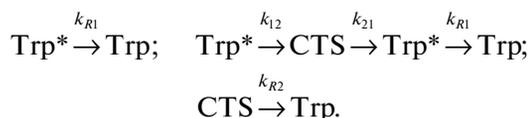
В работе [12] методом квазиупругого рассеяния нейтронов определены три основных температурных области, определяющих динамику протонов водородных связей в водно-белковой среде. В области I ($T < -150^\circ\text{C}$) происходят чисто гармонические колебания протонов около равновесных положений, в области II ($-150^\circ\text{C} \leq T < -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды характеризуется скачкообразной диффузией протонов вдоль Н-связей в пикосекундном диапазоне. В температурной области III ($T > -30^\circ\text{C}$) динамика водно-белковой среды определяется более медленными масштабными движениями крупных молекулярных фрагментов [12].

В водном растворе Тгр в температурной области III формируется стабильный цвиттерионный комплекс Н-связей молекулы Тгр с водным окружением [13]. В белке вокруг образовавшегося цвиттерионного комплекса формируется водная оболочка с частично упорядоченными Н-связями за счет их взаимодействия с полярными группами пептидных связей Тгр [12, 13]. В электронно-возбужденном состоянии молекулы Тгр может происходить дополнительное упорядочивание Н-связей за счет увеличения их жесткости [13]. В результате в достаточно упорядоченной системе Н-связей может образоваться квазизона проводимости, в которой электрон, находящийся на индольном кольце возбужденной молекулы Тгр, локализуется и затем может перейти на N—H группы пептидных связей с образованием CTS [13]. Данный эффект возможен при достаточно низких температурах, причем скорость переноса электрона от индольного кольца Тгр* в систему водородных связей должна увеличиваться при понижении температуры. При высоких температурах за счет тепловых колебаний молекул квазизона проводимости разрушается, а перенос электрона с индольных колец на амидные группы будет проходить по термоактивационному механизму. В температурной области II возможно также дополнительное упорядочивание Н-связей аналогично структурному фазовому переходу в сегнетоэлектрических кристаллах с Н-связями типа сегнетовой соли [14]. Этот процесс может происходить при таких низких температурах, когда взаимодействие диполей Н-связей молекул воды достаточно велико для их взаимного упорядочивания, но энергия теплового движения еще слишком мала, чтобы вызвать их разупорядочивание. В результате этого происходит диффузионный перескок протонов по Н-связям [12], что приводит к образованию суммарного дипольного момента в окрестности Тгр*, электрическое поле которого вызывает эффект дополнительной сольватации возбужденной молекулы Тгр. В результате за счет кулоновского взаимодействия Тгр* с ди-

полями Н-связей происходит сильный красный сдвиг спектра флуоресценции в водном растворе.

Ранее мы исследовали температурную зависимость флуоресценции триптофана в разных растворителях и рассмотрели возможность использования состояния с переносом заряда для описания процессов дезактивации возбужденного состояния молекулы Тгр [9]. В настоящей работе разработана адекватная физическая модель переходов молекулы Тгр между возбужденным и основным состояниями с привлечением состояния с переносом заряда. Именно включение CTS в процесс дезактивации приводит к возникновению нелинейной динамики этих переходов. Для подтверждения модели были детально изучены температурные зависимости многокомпонентного свечения молекул Тгр в водном растворе и в составе белка (бычий сывороточный альбумин), также приготовленного в водном растворе. При этом особый акцент сделан на выяснение роли динамики водородных связей ближайшего окружения триптофана, а также на изучение особенностей спектральных и кинетических характеристик его флуоресценции в широком диапазоне изменений температуры.

Согласно схеме электронных переходов в молекуле Тгр, показанной на рис. 1, кинетика затухания флуоресценции Тгр имеет двухкомпонентный характер.



Дезактивация возбужденного состояния триптофана происходит по двум каналам — с испусканием флуоресценции (k_{f1}) и безызлучательной ре-

лаксацией (k_{r1}) в основное состояние $\text{S}^* \xrightarrow{k_{R1}} \text{S}_0$, ($k_{R1} = k_{f1} + k_{r1}$), а также с переходом в промежуточное состояние (состояние с переносом заряда, CTS) $\text{Тгр}^* \rightarrow \text{Тгр}^+\text{R}^-$ со скоростью k_{12} , рекомбинирующего затем со скоростью k_{21} обратно в S^* со-

стояние: $\text{S}^* \xrightarrow{k_{12}} \text{CTS} \xrightarrow{k_{21}} \text{S}^* \xrightarrow{k_{R1}} \text{S}_0$. Согласно [13], помимо обратного перехода в S^* состояние распад CTS также может происходить с испусканием флуоресценции и безызлучательной релаксацией

в основное состояние ($\text{CTS} \xrightarrow{k_{R2}} \text{S}_0$) ($k_{R2} = k_{f2} + k_{r2}$). Двухкомпонентное свечение Тгр* характеризуется двумя спектральными формами S1 и S2, присутствующими в разложении спектра флуоресценции с различными временами жизни (рис. 2). Мы предполагаем, что форма S1 в спектре флуоресценции Тгр соответствует излучательному переходу S^* состояния в основное состояние, тогда

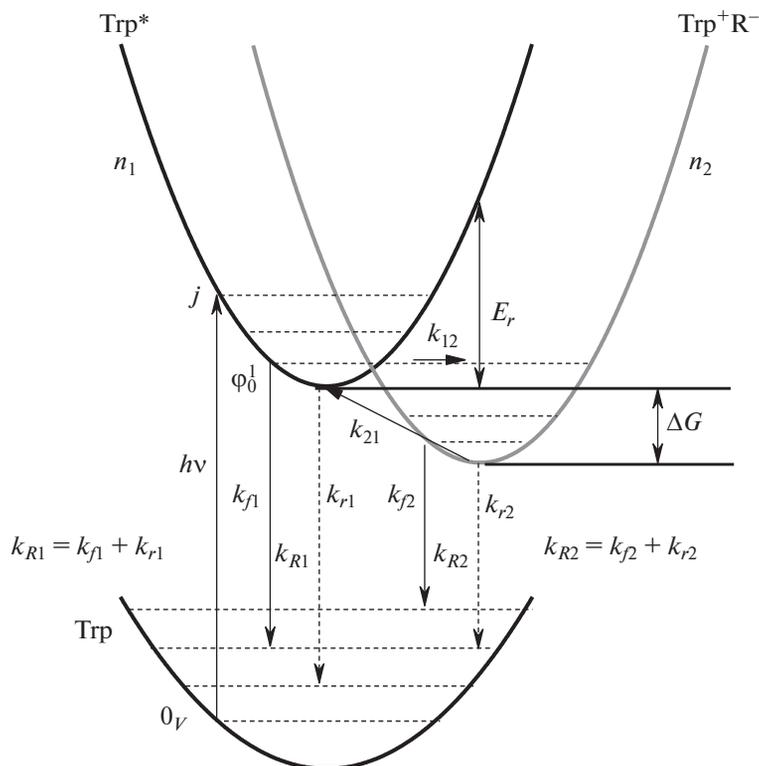


Рис. 1. Модельная схема кинетических переходов в триптофане. n_1, n_2 – населенности возбужденного состояния молекул Tgr и состояния с переносом заряда, Tgr^+R^- – состояние с переносом заряда (CTS), где R может обозначать как систему водородных связей в окружении молекулы Tgr , так и амидные группы с электрон-акцепторными свойствами, связанные с Tgr , k_{R1} – константа скорости затухания возбужденного состояния Tgr , включающая флуоресценцию (k_{F1}) и безызлучательную релаксацию (k_{r1}): $Tgr^* \rightarrow S_0$, ($k_{R1} = k_{F1} + k_{r1}$), k_{12} – скорость перехода Tgr^* в состояние CTS; k_{21} – скорость рекомбинации CTS $\rightarrow Tgr^*$, k_{R2} – скорость затухания CTS за счет флуоресценции и безызлучательной релаксации (CTS $\rightarrow S_0$, $k_{R2} = k_{F2} + k_{r2}$); ΔG – разность уровней свободной энергии состояний Tgr^* и CTS, E_r – энергия реорганизации образования CTS. Горизонтальными штрихованными линиями показаны некоторые колебательные уровни основного и возбужденных состояний Tgr .

как компонента S2 соответствует излучательному переходу CTS в основное состояние. Из рис. 2 видно, что форма S2 спектра флуоресценции уширена по сравнению с S1, что может быть связано с увеличенной скоростью дезактивации CTS за счет большей скорости безызлучательной релаксации k_{r2} . Спектр поглощения Tgr в водном растворе, рис. 2, имеет длинное широкое крыло в красной области. Как показано в [16], возникновение свечения в красной области спектра может быть связано с прямым переходом возбужденной молекулы триптофана в CTS.

Мы детально исследовали кинетику затухания флуоресценции Tgr в воде и в составе альбумина в водном растворе в диапазоне температур от -170 до $25^\circ C$. Кинетику затухания флуоресценции измеряли с помощью установки с коррелированным по времени и длине волны счетом еди-

ничных фотонов PML-16 (Becker and Hickl, Германия). Установка снабжена 16-канальным мультианодным фотоумножителем Hamamatsu R5900, содержащим 16 отдельных выходных анодных элементов и общую катодную и диодную систему. Сигнал флуоресценции проходит через полихроматор, снабженный дифракционной решеткой 600 штрихов/мм, обеспечивающей спектральную полосу измерительной системы 200 нм с разрешением 12.5 нм/канал. Это позволяет регистрировать трехмерную картину флуоресценции, отражающую изменения длительности (τ), спектра (λ) и интенсивности (I) свечения. Флуоресценцию образца возбуждали при 280 нм с помощью пикосекундного полупроводникового диода EPLED 280 (“Edinburg Photonics”, Шотландия), длительность импульса составляла 870 пс, спектральная ширина – 10 нм, частота следова-

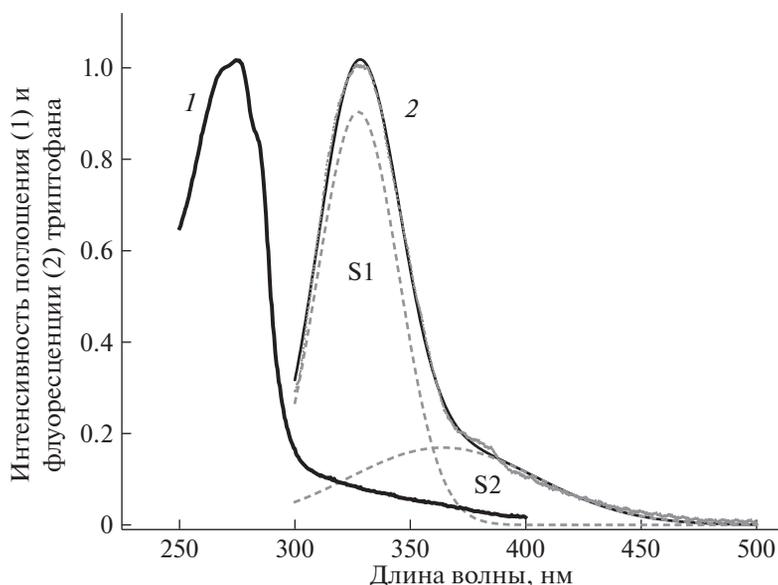


Рис. 2. Спектры поглощения (1) и флуоресценции (2) триптофана в водном растворе при комнатной температуре. Приведено разложение спектра флуоресценции Тгр на две гауссовы компоненты (формы) S1 и S2.

ния импульсов – 10 МГц, время накопления сигнала – 30 с. Таким образом, регистрируя трехмерное (t, λ, I) изображение свечения триптофанилов, мы могли измерять кинетики затухания флуоресценции для любого спектрального канала в области 286–423 нм. Кроме того, система регистрации позволяла воспроизвести спектры флуоресценции образца в любой момент времени после его возбуждения импульсом света. Образец при измерениях находился в охлаждаемой жидким азотом кювете, температуру которой контролировали с помощью термодпары. Время охлаждения до -180°C составляло ~ 10 мин, скорость последующего нагревания – 5–7 град/мин.

Аппроксимацию кинетических кривых суммой экспонент, свернутых с аппаратной функцией системы регистрации, проводили с учетом того, что дезактивация Тгр* протекает с образованием промежуточного состояния с переносом заряда Тгр⁺R⁻ (CTS). Составив и решив систему дифференциальных уравнений, описывающих переходы в молекуле Тгр (рис. 1), мы получили выражения для населенностей n_1 и n_2 , констант скоростей затухания компонент k_1, k_2 и, соответственно, длительности τ_1 и τ_2 двух компонент разложения в кинетике затухания флуоресценции. Эти выражения имеют вид:

$$n_1(t) = a_1 e^{-k_1 t} + a_2 e^{-k_2 t}; \quad n_2(t) = b_1 e^{-k_1 t} + b_2 e^{-k_2 t};$$

$$\begin{cases} k_1 = \frac{1}{2}(g_1 + g_2 + \sqrt{(g_1 - g_2)^2 + 4k_{12}k_{21}}) \\ k_2 = \frac{1}{2}(g_1 + g_2 - \sqrt{(g_1 - g_2)^2 + 4k_{12}k_{21}}) \end{cases} \quad (1)$$

$$\tau_1 = 1/k_1, \quad \tau_2 = 1/k_2;$$

где $g_1 = k_{R_1} + k_{12}; g_2 = k_{21} + k_{R_2}$.

Для a_1, a_2, b_1, b_2 выражения имеют следующий вид:

$$\begin{aligned} a_1 &= \frac{k_1 - g_2}{k_1 - k_2}; & a_2 &= \frac{g_2 - k_2}{k_1 - k_2}; \\ b_1 &= \frac{-k_{12}}{k_1 - k_2}; & b_2 &= \frac{k_{12}}{k_1 - k_2}. \end{aligned}$$

Из данных выражений следует, что $a_1 + a_2 = 1; b_2 = -b_1$.

Обозначения параметров в уравнении (1) указаны в подписи к рис. 1.

Согласно уравнениям (1), если в некоторой области температур значение $\tau_1 = 1/k_1$ уменьшается за счет увеличения в (1) подкоренного выражения, то значение τ_2 в этой же области будет увеличиваться. Это должно приводить к антибатному характеру температурных зависимостей длительности короткой и длинной компонент кинетики флуоресценции Тгр в водном растворе в данной температурной области.

Ход экспериментальной температурной зависимости длительности τ_1 и τ_2 для двух компонент

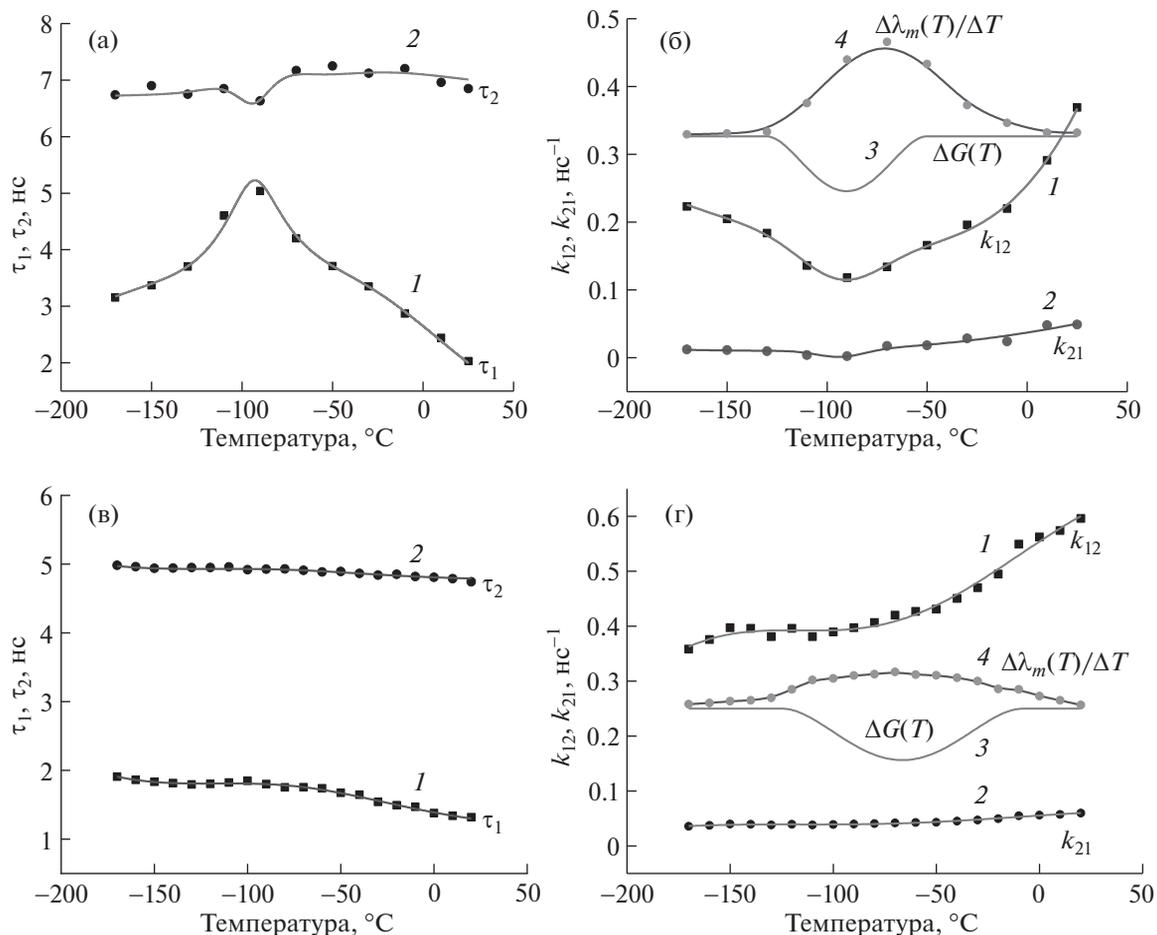


Рис. 3. (а) – температурная зависимость τ_1 быстрого (1) и τ_2 медленного (2) компонентов кинетики затухания флуоресценции триптофана в водном растворе; (б) температурная зависимость констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ (1) и k_{21} обратного перехода $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ в возбужденное состояние триптофана (2); (3) – температурная зависимость $\Delta G(T)$ для триптофана в водном растворе; (4) – температурная зависимость скорости сольватационного сдвига $\Delta\lambda_m(T)/\Delta T$ спектра флуоресценции триптофана в водном растворе; (в) – температурная зависимость τ_1 быстрого (1) и τ_2 медленного (2) компонентов кинетики затухания флуоресценции триптофана в составе альбумина; (г) – температурная зависимость констант скорости k_{12} образования состояния с переносом заряда $\text{Trp}^* \rightarrow \text{Trp}^+\text{R}^-$ (1) и k_{21} обратного перехода $\text{Trp}^+\text{R}^- \rightarrow \text{Trp}^*$ в возбужденное состояние триптофана в составе альбумина (2). (3) – температурная зависимость $\Delta G(T)$ для триптофана в составе альбумина; (4) – температурная зависимость скорости сольватационного сдвига спектра флуоресценции $\Delta\lambda_m(T)/\Delta T$ триптофана в альбумине. Сплошные линии на (а), (б), (в), (г) получены в результате аппроксимации температурных зависимостей времен затухания τ_1 , τ_2 и констант скорости k_{12} , k_{21} .

в кинетике флуоресценции Trp в водном растворе показан на рис. 3а. Видно, что температурные зависимости времен затухания короткой и длинной компонент флуоресценции τ_1 и τ_2 имеют немонотонный характер: в частности, в области температуры около -90°C наблюдается максимум τ_1 и минимум τ_2 . Из рис. 3б видно, что температурная зависимость константы скорости перехода k_{12} в области $T < -125^\circ\text{C}$ носит безактивационный характер: с увеличением температуры k_{12} уменьшается пропорционально величине $1/\sqrt{T_K}$, где T_K –

абсолютная температура. Для Trp в водной среде образование квазилоны проводимости системы Н-связей может происходить уже при температуре $T < -125^\circ\text{C}$, что приводит к безактивационному переносу электрона на амидные группы по системе Н-связей. Наоборот, при $T > -90^\circ\text{C}$ с ростом температуры происходит термоактивационное увеличение константы скорости k_{12} . Адекватная аппроксимация экспериментальной температурной зависимости k_{12} во всей исследованной области температур обеспечивается при условии

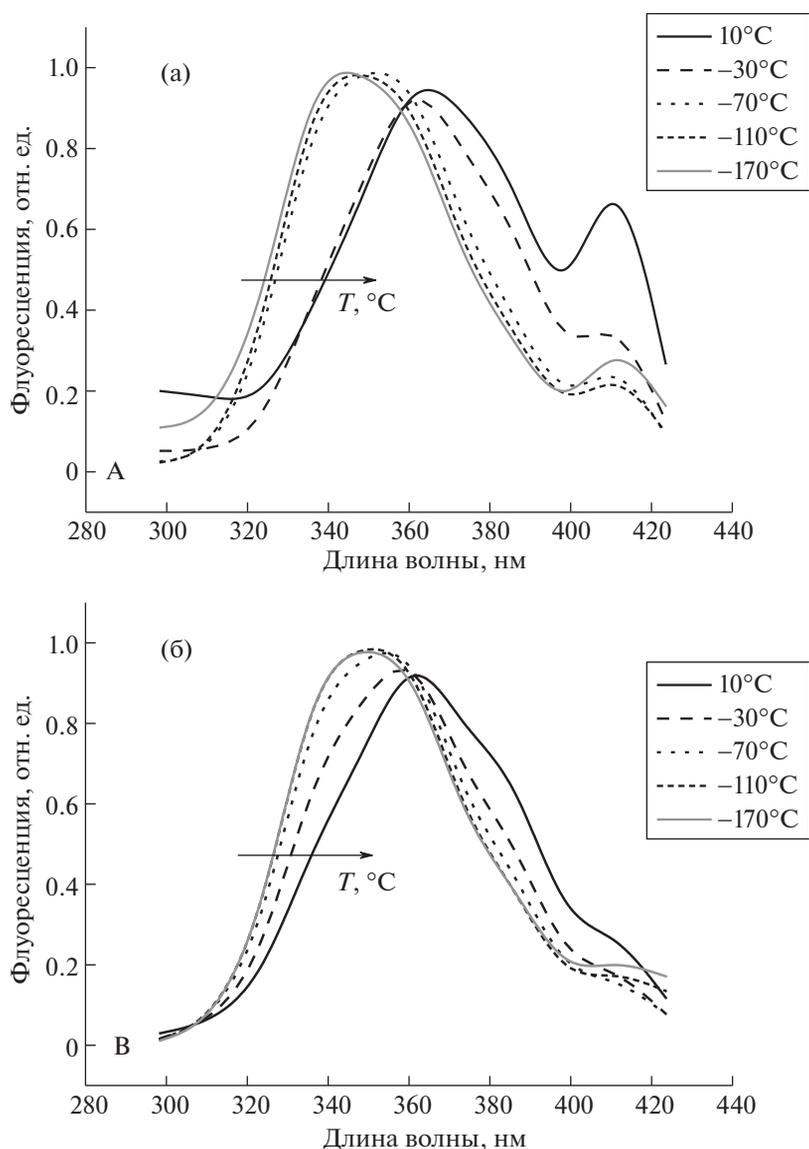


Рис. 4. Спектры флуоресценции триптофана в водном растворе (а) и в составе альбумина (б), полученные при импульсном лазерном возбуждении при температуре от -170 до 20°C . Стрелкой показано направление сольватационного сдвига спектров от низкой температуры (-170°C) до комнатной (20°C).

зависимости свободной энергии перехода ΔG от температуры в области $-125^\circ\text{C} \dots -50^\circ\text{C}$ (рис. 3б).

В области температур $T > -125^\circ\text{C}$ реализуется другой, термоактивационный механизм переноса электрона в сетку Н-связей, когда происходит размораживание и перестройка упорядоченных Н-связей. В результате взаимодействия электрического поля возникающего дипольного момента системы элементарных ячеек Н-связей с электрическим полем возбужденной молекулы Тгр происходит ее дополнительная сольватация.

Этот эффект приводит к уменьшению свободной энергии перехода $\Delta G(T)$ в данной области температур (рис. 3, кривая 3) и одновременно к

соответствующему сдвигу максимума флуоресценции Тгр в длинноволновую область (рис. 3б, кривая 4). Как видно из рис. 3б, 3г, в температурных областях $-125^\circ\text{C} < T < -50^\circ\text{C}$ для раствора Тгр в воде и в области температур $-25^\circ\text{C} < T < -10^\circ\text{C}$ для триптофана в альбумине, также растворенного в воде, происходит некоторое уменьшение константы скорости k_{12} переноса электрона. Для Тгр в растворе возникает минимум значения k_{12} (-90°C) (рис. 3б, кривая 1), максимум величины τ_1 (-93°C) (рис. 3а, кривая 1), а также минимум значения τ_2 (-93°C) (рис. 3а, кривая 2) в ходе температурных зависимостей величин этих параметров. Одновременно наблюдается антибатное по-

ведение температурных зависимостей значений τ_1 и τ_2 для Тгр в водном растворе (рис. 3а). Для альбумина в воде минимум параметра k_{12} и соответствующий максимум τ_1 не наблюдаются из-за меньшей величины дополнительного сольватационного сдвига $\Delta G(T)$ (рис. 3г, кривая 4). Как для Тгр в воде при $T > -50^\circ\text{C}$, так и в водном растворе альбумина при $T > -10^\circ\text{C}$ за счет тепловых флуктуаций происходит частичное разупорядочивание системы водородных связей, что приводит к исчезновению эффекта уменьшения ΔG (рис. 3б, 3г, кривые 3). При этом согласно термоактивационному механизму переноса электрона скорость переноса электрона k_{12} в этой области увеличивается с ростом температуры (рис. 3б, 3г, кривые 1).

Температурная зависимость константы скорости k_{21} (рис. 3б, 3г, кривые 2) хорошо аппроксимируется соотношением Аррениуса: $k_{21} = k_{12} \exp(-\Delta G/k_B T_K)$, где k_B – постоянная Больцмана, T_K – абсолютная температура.

Максимальное уменьшение величины $\Delta G(T)$ в диапазонах температур от -125 до -50°C для Тгр в воде (рис. 3б) и от -125 до -10°C для водного раствора альбумина (рис. 3г) происходит за счет кулоновского взаимодействия диполей Н-связей с возбужденным состоянием Тгр. Оно достигает максимального значения около 60 см^{-1} для триптофана в водном растворе и около 25 см^{-1} для альбумина (рис. 3б, 3г).

Для водного раствора триптофана в составе альбумина в температурной области $T < -100^\circ\text{C}$ безактивационный перенос электрона не наблюдается (рис. 3в, 3г). Причиной этому служит недостаточное упорядочивание системы Н-связей при замораживании. Как следствие, не происходит образования квазипроводящей зоны между индольным кольцом и амидными группами. Соответственно, наблюдаемый эффект сольватации возбужденного состояния в альбумине в два раза более слабый. Этот вывод прямо подтверждается тем, что “красный” сдвиг спектров флуоресценции в исследованной температурной области примерно в два раза меньше, чем для триптофана в воде (рис. 4а и 4б, рис. 3б и 3г, кривые 4). Мы считаем, что обнаруженное различие в спектрах флуоресценции объясняется большим расстоянием системы Н-связей от молекулы Тгр, фиксированной в белковой структуре по сравнению с молекулой Тгр в водном растворе. На возможность такого эффекта указывалось, например, в [5].

Таким образом, полученные результаты подтверждают существенное влияние состояния водородных связей на микроконформационную динамику белка, тестируемую с помощью флуоресцентных характеристик (форма и положение спектра, длительность свечения) молекулы трип-

тофана. Необходимая информация о механизмах протекающих при этом процессов может быть получена путем сравнительного анализа температурных зависимостей параметров флуоресценции триптофана в воде и в нативном белке. Все эти результаты имеют принципиальное значение для физической интерпретации получаемых в эксперименте данных о зависимости функциональной активности белка от деталей его структурно-динамического состояния.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Rubin A.B.* // Fundamentals of biophysics. 1st ed, Wiley-Scrivener; 2014.
2. *Dashnau J.L., Zelent B., Vanderkooi J.M.* // Biophys. Chem. 2005. V. 114. P. 71–83.
3. *Schlamadinger D.E., Gable J.E., Kim J.E.* // J. Phys. Chem. B. 2009. V. 113. P. 14769–14778.
4. *Reshetnyak Y.K., Burstein E.A.* // Biophys. J. 2001. V. 81. P. 1710–1734.
5. *Lakowicz J.R.* // Principles of fluorescence spectroscopy. 3rd ed., Springer. New York. 2006.
6. *Szabo A.G., Rayner D.M.* // J. Am. Chem. Soc. 1980. V. 102. P. 554–563.
7. *Adams P.D., Chen Y., Ma K. et al.* // J. Am. Chem. Soc. 2002. V. 124. P. 9278–9286.
8. *Ross J.A., Jameson D.M.* // Photochem. Photobiol. Sci. 2008. V. 7. P. 1301–1312.
9. *Knox P.P., Gorokhov V.V., Korvatovsky B.N. et al.* // J. Photochem. Photobiol. A: Chemistry. 2020. V. 393. P. 112435.
10. *Han K.L., Zhao G.J.* Hydrogen Bonding and Transfer in the Excited State. John Wiley & Sons Ltd. Chichester. UK. 2011.
11. *Knox P.P., Lukashev E.P., Gorokhov V.V. et al.* // J. Photochem. Photobiol. B: Biology. 2018. V. 189. P. 145–151.
12. *Doster W., Settles M.* // Biochim. et Biophys. Acta. 2005. V. 1749. P. 173–186.
13. *Liu H., Zhang H., Jin B.* // Spectrochim. Acta Part A: Molecular and Biomolecular Spectroscopy. 2013. V. 106. P. 54–59.
14. *Blinc R., Zeks B.* // Soft Modes in Ferroelectrics and Antiferroelectrics. American Elsevier Publishing Company. Inc. New York. 1974.
15. *Vandewal K.* // Annu. Rev. Phys. Chem. 2016. V. 67. P. 113–146.
16. *Renger Th.* // Phys. Rev. Lett. 2004. V. 93. P. 188101–188104.

TEMPERATURE DEPENDENCE OF TRYPTOPHAN FLUORESCENCE LIFETIME AS AN INDICATOR OF ITS MICROENVIRONMENT DYNAMICS

V. V. Gorokhov^{a,#}, B. N. Korvatovsky^a, P. P. Knox^a, N. P. Grishanova^a, S. N. Goryachev^a,
V. Z. Pashchenko^a, and Corresponding Member of the RAS A. B. Rubin^a

^a Lomonosov Moscow state University, Moscow, Russia

[#]e-mail: Gorokhgiceron149@gmail.com

The spectral-kinetic characteristics of the fluorescence of the tryptophan molecule in an aqueous solution and in the albumin were studied in the temperature range from -170°C to 25°C . To explain the observed changes in the spectra and the tryptophan fluorescence lifetime with temperature, a model of transitions between the excited and ground states involving a charge-transfer state was used, which takes into account the nonlinear nature of the dynamics of these transitions. In these processes, an important role plays the interaction of tryptophan molecules with its microenvironment, as well as rearrangements in the system of hydrogen bonds of the water-protein matrix surrounding the tryptophan molecule.

Keywords: tryptophan, fluorescence, hydrogen bonds, molecular dynamics