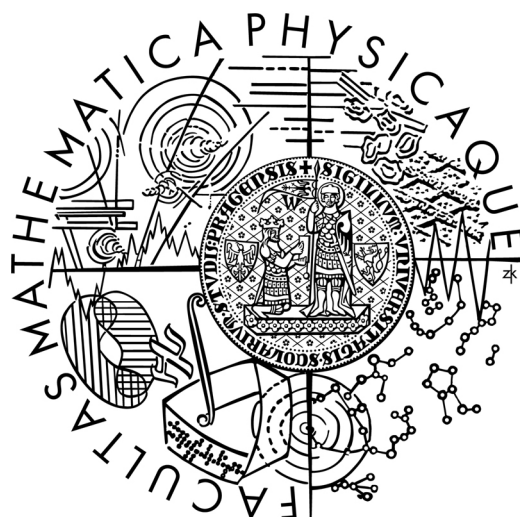


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Petr Pospíšil

Optická spektroskopie bakteriochlorofylových agregátů s azuleny

Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: Doc. RNDr. Jakub Pšenčík, Ph.D.

Studijní program: Fyzika, obecná fyzika

2008

Děkuji T. S. Balabanovi a V. L. Horhoiu (Institute for Nanotechnology, Forschungszentrum Karlsruhe) za poskytnutí derivátů azulenu.

Dále bych chtěl poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Doc. RNDr. Jakubovi Pšenčíkovi, Ph.D. za trpělivost a čas, který věnoval mé práci. Dále mu děkuji za odborné rady i mimo rámec této práce.

Prohlašuji, že jsem svou bakalářskou práci napsal samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů. Souhlasím se zapůjčováním práce.

V Praze dne 7.8. 2008

Petr Pospíšil

Obsah

1. Úvod	5
2. Metody a materiály	
2.1 Absorpční spektroskopie.....	6
2.2 Chlorofyly, bakteriochlorofyly a jejich agregáty.....	9
2.3 Azuleny a rozpouštědla.....	11
3. Výsledky.....	17
4. Závěr.....	28
5. Literatura.....	29

Název práce: *Optická spektroskopie bakteriochlorofylových agregátů s azuleny*

Autor: *Petr Pospíšil*

Katedra (ústav): *Katedra chemické fyziky a optiky*

Vedoucí bakalářské práce: *Doc. RNDr. Jakub Pšenčík, Ph.D.*

e-mail vedoucího: *psencik@karlov.mff.cuni.cz*

Abstrakt:

Bakteriochlorofyly *c*, *d* a *e* (BChl) patří mezi fotosyntetické pigmenty, které se v přírodě vyskytují ve světlosběrných anténách zelených fotosyntetických bakterií ve formě samoorganizovaných agregátů. BChl agregáty se vyznačují zajímavými optickými vlastnostmi a lze je připravit i *in vitro* ve vodných roztocích za přítomnosti některých nepolárních molekul (např. lipid nebo karotenoid). Obsahem této práce bylo studium vlivu dvou derivátů pigmentu azulenu na tvorbu BChl agregátů. Pro studium agregace byl použit BChl *c*. Jeho agregace za přítomnosti azulenů by vedla k rozšíření absorpčního oboru těchto agregátů. Nejprve byla provedena charakterizace obou azulenů pomocí absorpční spektroskopie a byly určeny jejich extinkční koeficienty. V průběhu práce bylo prokázáno, že oba azuleny indukují agregaci BChl *c*. Byly proměřeny závislosti absorpčních spekter těchto agregátů na koncentraci azulenových pigmentů. Z těchto závislostí vyplývá, že méně polární z obou azulenů vyvolává agregaci účinněji. Absorpční spektra výsledných BChl *c* agregátů s azuleny mají oproti agregátům BChl *c* bez azulenu zesílenou absorpci v blízké UV oblasti.

Klíčová slova: *Pigment, Bakteriochlorofyl, Agregát, Azulen*

Title: *Optical spectroscopy of bacteriochlorophyll aggregates with azulene*

Author: *Petr Pospíšil*

Department: *Department of Chemical Physics and Optics*

Supervisor: *Doc. RNDr. Jakub Pšenčík, Ph.D.*

Supervisor's e-mail address: *psencik@karlov.mff.cuni.cz*

Abstract:

Bacteriochlorophylls *c*, *d* and *e* (BChl) belong among photosynthetic pigments. They are found in light-harvesting complexes of green photosynthetic bacteria in the form of self-assembled aggregates. BChl aggregates exhibit interesting optical properties and it is possible to prepare them also *in vitro* in aqueous solutions, in the presence of certain non-polar molecules (e.g. lipids or carotenoids). The goal of this work was to study the influence of the two selected azulene derivatives on the aggregation of BChl. BChl *c* was used for preparation of aggregates in this work. The aggregation of BChl *c* with azulenes would lead to a broadening of a spectral region of aggregate absorption. Both azulenes were characterized by absorption spectroscopy and their extinction coefficients were determined. Further, it was shown that both pigments indeed induce aggregation of BChl *c*. Measurement of the absorption spectra in dependence on the concentration of azulenes show that the less polar of both azulenes is more efficient in inducing the BChl *c* aggregation. The absorption spectra of BChl *c* aggregates have extended absorption spectrum into near UV region compared to BChl *c* aggregates without azulenes.

Keywords: *Pigment, Bacteriochlorophyll, Aggregate, Azulene*

1. Úvod

Fotosyntéza (z řeckého *fós, fótos* – „světlo“ a *synthesis* – „shrnutí“, „skládání“) je složitý proces, který využívá s vysokou účinností energii světelného záření. Světlo je absorbováno pomocí fotosyntetických pigmentů tvořících tzv. světlosběrné antény, které světlo nejen absorbují, ale také přenášejí získanou energii z fotonů do reakčního centra, kde je využita na chemické procesy důležité pro další fáze fotosyntézy.

Světlosběrné antény jsou důležitou součástí fotosyntetického aparátu nejen rostlin ale všech fotosyntetizujících organismů. Mezi nejúčinnější světlosběrné antény patří chlorosomy, které jsou součástí zelených fotosyntetických bakterií. Chlorosomy obsahují fotosyntetické pigmenty zvané bakteriochlorofyly (dále BChl), zejména BChl *c*, *d* a *e* (podle druhu bakterie). Molekuly chlorosomálních BChl-ů vytvářejí agregáty a udávají tak do velké míry uspořádání a optické vlastnosti chlorosomů [1],[2]. BChl *c*, *d* a *e* tvoří agregáty s podobnými optickými vlastnostmi i ve vodných roztocích připravených *in vitro*, pokud jsou smíchány s vhodnou nepolární látkou (např. lipidy nebo karotenoidy). V této práci byla studována agregace BChl *c* se dvěma deriváty azulenu. Důvodem pro použití azulenu byla snaha o rozšíření absorpčního spektra agregátů. Tyto agregáty by se poté daly využít ve světlosběrných anténách sloužících k výrobě elektrického proudu za pomoci slunečního záření.

2. Metody a materiály

2.1 Absorpční spektroskopie

Při dopadu světla na vzorek se část světla odráží, část je absorbována a část prochází skrz něj. Poměr intenzity prošlého světla I a dopadajícího světla I_0 se nazývá transmitance T , která je definována jako:

$$T = \frac{I}{I_0} \quad (1)$$

V praxi je určení transmitance znesnadněno tím, že měření je ovlivněno odrazem a absorpcí na stěnách kyvety, absorpcí rozpouštědla atd. Transmitance se proto měří vzhledem k slepému vzorku, referenci. Rozdíl intenzity světla prošlého referencí, např. roztokem bez měřeného vzorku, a intenzity světla prošlého roztokem s měřeným vzorkem, je výsledná transmitance měřeného vzorku.

Další používanou veličinou je absorbance A , která je definována jako:

$$A = -\log T \quad (2)$$

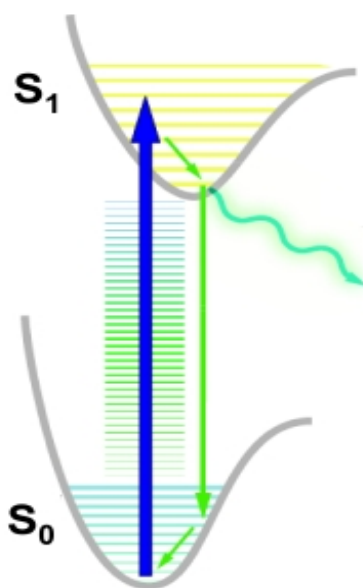
Velikost absorbance závisí na vlnové délce světla a zkoumaném vzorku. Je závislá také na délce dráhy, kterou světlo vzorkem muselo urazit. První, kdo matematicky popsal tento jev byl v 18. století Lambert. Dnes se však ukazuje, že ho patrně předběhl Bouguer [9]. Absorbance také závisí na koncentraci molekul ve vzorku. Tento jev matematicky popsal pan Beer. Vztahu, který oba zákony dává dohromady, se říká Lambertův-Beerův zákon:

$$A_\lambda = \varepsilon(\lambda) l c \quad (3)$$

kde $\varepsilon(\lambda)$ je molární extinkční koeficient, l je délka dráhy procházejícího světla a c je koncentrace, většinou uváděná v molech na liter [9].

K absorpci světla při dopadu nebo průchodu nějakou látkou dochází díky tomu, že elektrony v atomech nebo molekulách látky přeskakují na vyšší energetické hladiny. U atomů je tento přechod přesně dán rozdílem jasně daných energetických hladin. Pouze fotony s energií odpovídající rozdílu energetických hladin mohou elektronový přeskok způsobit. Atomové spektrum se proto vyznačuje diskrétním spektrem; atomy absorbují na jednotlivých vlnových délkách dost odlišných od sebe. U molekul je situace složitější. Energetické hladiny molekul

jsou rozštěpeny. Ke každé elektronové energetické hladině náleží ještě vibrační (viz obr. 3) a rotační energetické hladiny. Molekula, podobně jako atom, absorbuje záření s energií odpovídající jednotlivým přechodům mezi různými energetickými hladinami. Molekulové spektrum je však rozšířeno, částečně díky vibrační a rotační struktuře energetických hladin. Na spojitém spektru molekul se také významně podílí okolí, které má každá molekula kolem sebe trochu jiné. V důsledku toho jsou jiné i energie přechodů u každé molekuly, a tak i světelné záření, které molekuly absorbují, bude mít různou vlnovou délku.



Obr. 1: Jablonski diagram – znázorňuje přechod elektronu ze základní energetické hladiny S_0 do první excitační hladiny S_1 . K oběma elektronovým hladinám S_0, S_1 dále náleží vibrační a rotační energetické hladiny (modré a žluté horizontální pruhy). Při absorpci fotonu (modrá šipka) elektron může přeskočit do některé z vibračních nebo rotačních hladin S_1 . Vibrační relaxací (malá zelená šipka) se dostane na určitou vibrační hladinu S_1 , ze které pak deexcituje zpátky na některou z hladin S_0 (zelená vertikální šipka). Zde může dojít opět k vibrační relaxaci.

(zdroj obrázku: <http://www.drbio.cornell.edu/MPE/mpe1.html>)

K přechodům mezi jednotlivými hladinami dochází zejména prostřednictvím interakce elektrické složky světelné vlny s elektrony v molekule. Pravděpodobnost přechodu je pravděpodobnost toho, že systém přejde z jednoho stavu do stavu jiného. Kvantově mechanický popis pravděpodobnosti přechodu je založen na poruchové teorii závislé na čase. Oscilující elektromagnetické pole působí na molekulu jako slabá porucha. Ukazuje se, že

pravděpodobnost přechodu je úměrná době t , po kterou působí porucha [7]. Je tedy možné definovat veličinu s názvem pravděpodobnost přechodu za jednotku času P , ve které vystupuje poruchový operátor H závislý na čase (část hamiltoniánu závisující na čase). Pravděpodobnost přechodu P_{12} ze stavu jedna do stavu dva je pak určena tzv. Fermiho zlatým pravidlem:

$$P_{12} = \frac{2\pi}{\hbar} |H_{12}|^2 \rho(\nu_{12}) \quad (4)$$

Tento operátor lze zapsat pomocí multipólového rozvoje, ve kterém pro zjednodušení lze vzít pouze první člen. Zjednodušení se nazývá dipólová aproximace (také přiblížení dlouhých vln). Zároveň platí:

$$H_{12} = \langle \Psi_2 | H | \Psi_1 \rangle \quad (5)$$

kde H_{12} je poruchový operátor závislý na čase [7].

Aby molekula mohla absorbovat světelné záření ve viditelném nebo blízkém UV musí obsahovat n nebo π elektrony, neboli elektrony v orbitalech n nebo π (jako n orbital se označuje volný elektronový pár). Přechody mezi těmito orbitaly pak způsobují, že molekula absorbuje světelné záření. K tomu aby mohla molekula absorbovat viditelné nebo blízké UV záření (nad 200 nm) je nutné, aby n a π elektrony byly strukturovány do konjugovaných vazeb. Konjugované vazby jsou dvojně vazby, které spolu sousedí vždy ob jednu vazbu. Obvykle čím více konjugovaných vazeb, tím molekula absorbuje dále v červené oblasti.

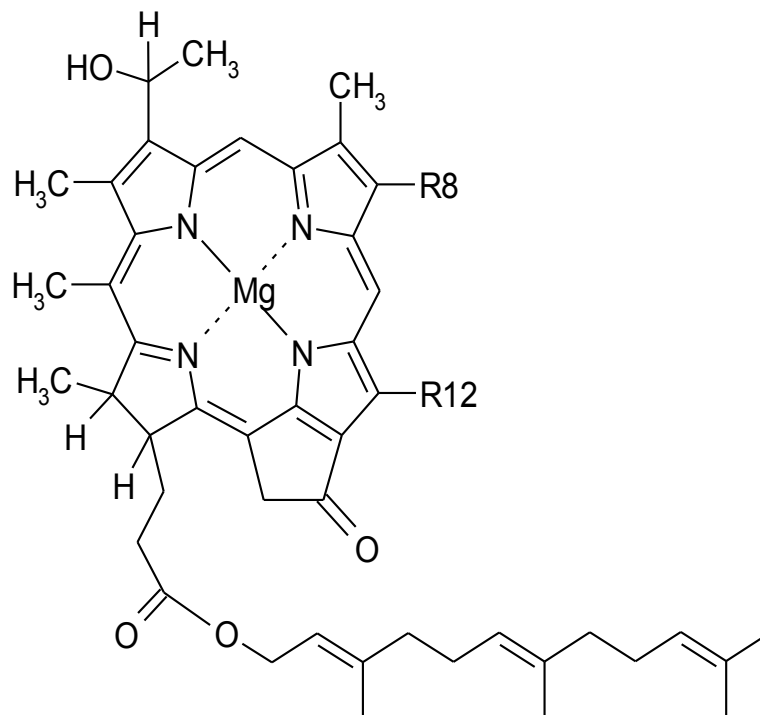
2.2 Chlorofyly, bakteriochlorofyly a jejich agregáty

Chlorofyl (dále Chl) patří k fotosyntetickým pigmentům spolu např. s karotenoidy. Najdeme ho v zelených rostlinách, sinicích a některých řasách. Chl silně absorbuje viditelné světelné záření hlavně v oblasti modré a červené části viditelného spektra. Důvod, proč se Chl jeví jako zelený, je tedy ten, že zelenou část viditelného spektra neabsorbuje.

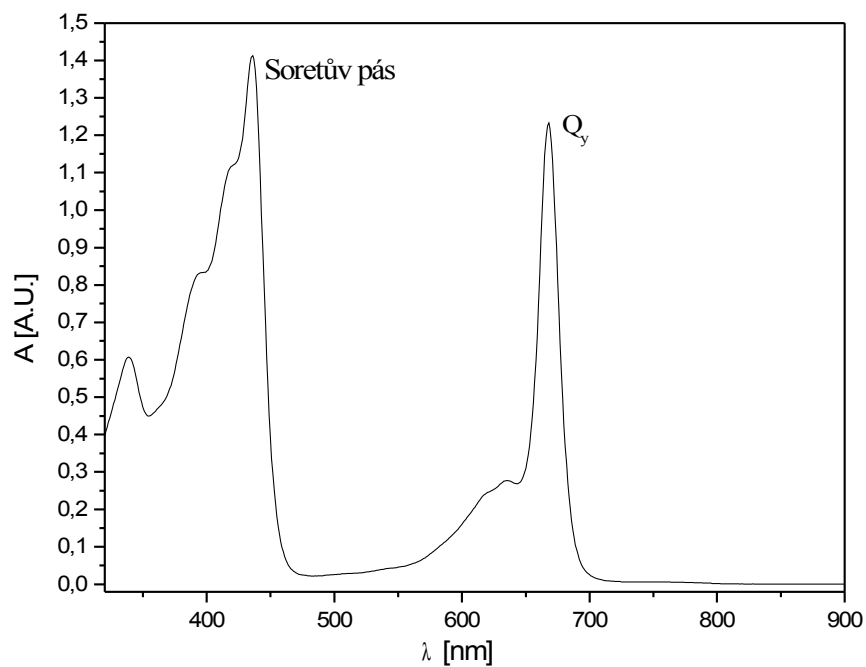
Bakteriochlorofyl (BChl), jak už sám název napovídá, je chlorofyl přítomný v bakteriích. Mezi nejdůležitější patří BChl *c* (obr. 2). Molekula BChl *c* se řadí mezi porfíny, což jsou organické cyklické sloučeniny tvořené spojením čtyř pyrrolových kruhů. Při absorpci dochází ke dvěma významným přechodům elektronů. Přechody do dvou nejnižších excitovaných hladin se označují Q_x a Q_y (obvykle červená oblast viditelného spektra). Přechody do vyšších hladin tvoří tzv. Soretův pás. Spektrum BChl *c* se Soretovým pásem v modré oblasti a červeným pásem Q_y je ukázáno v grafu 1.

Ve vodném prostředí se nepolární řetězce molekul BChl *c* snaží dostat co nejdále od molekul vody (hydrofobní efekt). Molekuly BChl *c* tak utvoří dimery. Dimery BChl *c* mají odlišné spektrum od monomerů [6]. To je dáno vzájemnými interakcemi mezi molekulami, které způsobí, že se rozštěpí excitační hladiny dimeru [5]. Absorpční spektrum se mění a pás Q_y se posouvá dále do červené oblasti spektra.

Za přítomnosti lipidů nebo detergentů, které patří mezi nepolární sloučeniny, BChl *c* vytvoří strukturu zvanou agregáty [4]. Agregáty mají pás Q_y posunut ještě dále do červené oblasti spektra oproti dimerům [6]. K tomuto posuvu dochází vlivem interakce mezi přechodovými dipólovými momenty interagujících molekul v agregátu. Přechodový dipólový moment vzniká v molekule pouze dočasně po dobu působení elektromagnetického záření. Pro popis přechodového dipólového momentu se zavádí vektorová veličina. Šipka tohoto vektoru míří ve směru, ve kterém je molekulou nejlépe absorbováno světlo.



Obr. 2: Chemický vzorec BChl c. Místa označená jako R8 a R12 značí další navázané řetězce. V případě R8 to může být ethyl, propyl nebo isobutyl. V případě R12 methyl nebo ethyl.

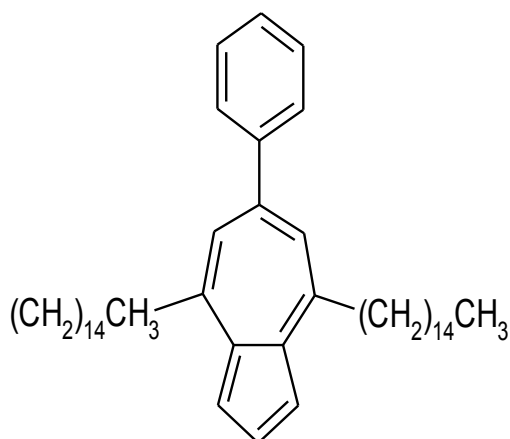


Graf 1: Absorpční spektrum BChl c v ethanolu

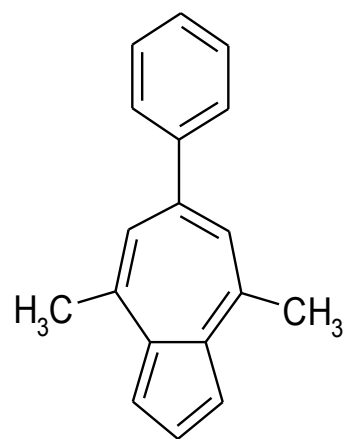
2.3 Azuleny a rozpouštědla

Oba pigmenty, jak azulen 1 (obr. 3), tak azulen 2 (obr. 4), jsou celkem dobře rozpustné v nepolárních rozpouštědlech jako je aceton nebo hexan. V rozpouštědlech jako je etanol nebo isopropylalkohol jsou téměř nerozpustná. Oba azuleny byly rozpouštěny v acetonu. Aceton je nepolární rozpouštědlo, ale stále se dobře mísí i s pufrem, ve kterém byly následně připravovány i agregáty. Pro proměření absorpčního spektra acetonu, bylo potřeba jej výrazně zředit pufrem, aby bylo možné vidět absorpční pás i s jeho maximem (graf 2).

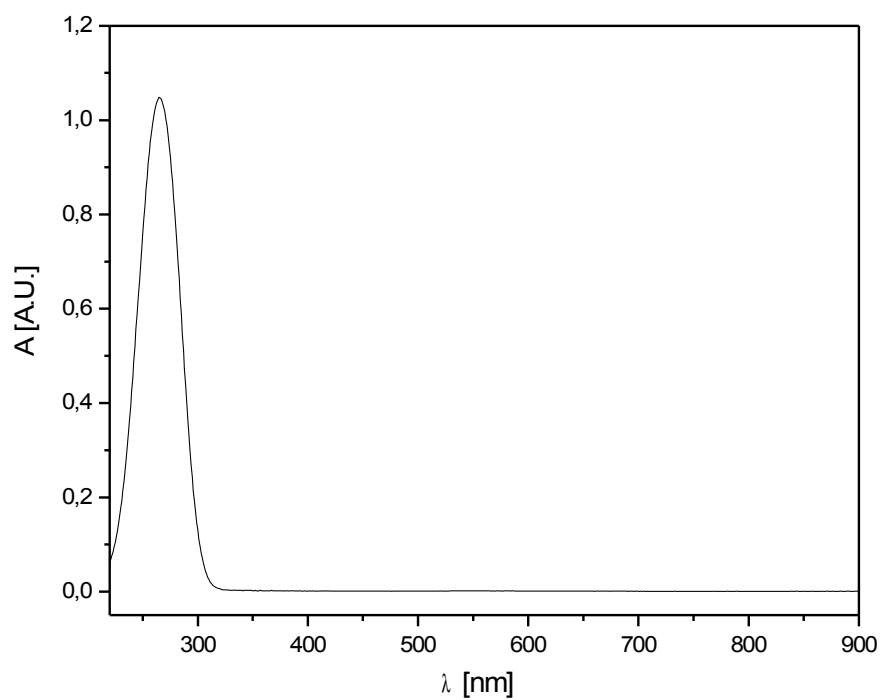
Protože aceton intenzivně absorbuje v blízké UV-oblasti spektra, bylo potřeba jiného rozpouštědla na proměření absorpčního spektra azulenů. Vhodným rozpouštědlem byl hexan, který absorbuje v proměřované oblasti jen velmi slabě (graf 3). Hexan se však nehodí pro přípravu agregátů, protože se nemísí s pufrem.



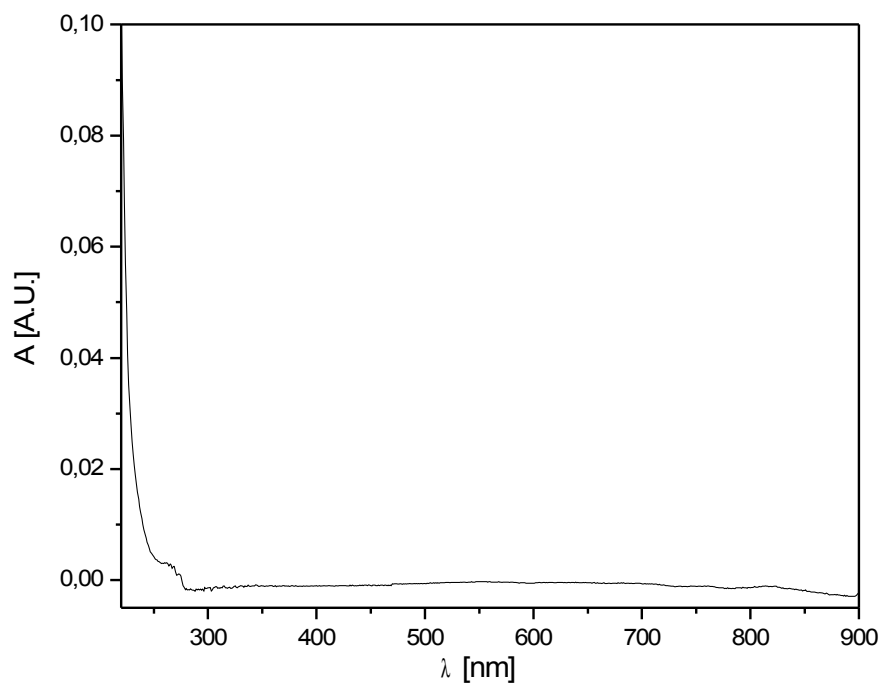
Obr. 3: Azulen STB-VH-084-01 (dále azulen 1)



Obr. 4: Azulen STB-VH-022-02 (dále azulen 2)



Graf 2: Absorpční spektrum acetonu. Aceton byl zředěn v pufru v poměru 1:20 (15 μ l acetonu ve 300 μ l pufru), jako reference byl použit pufr.

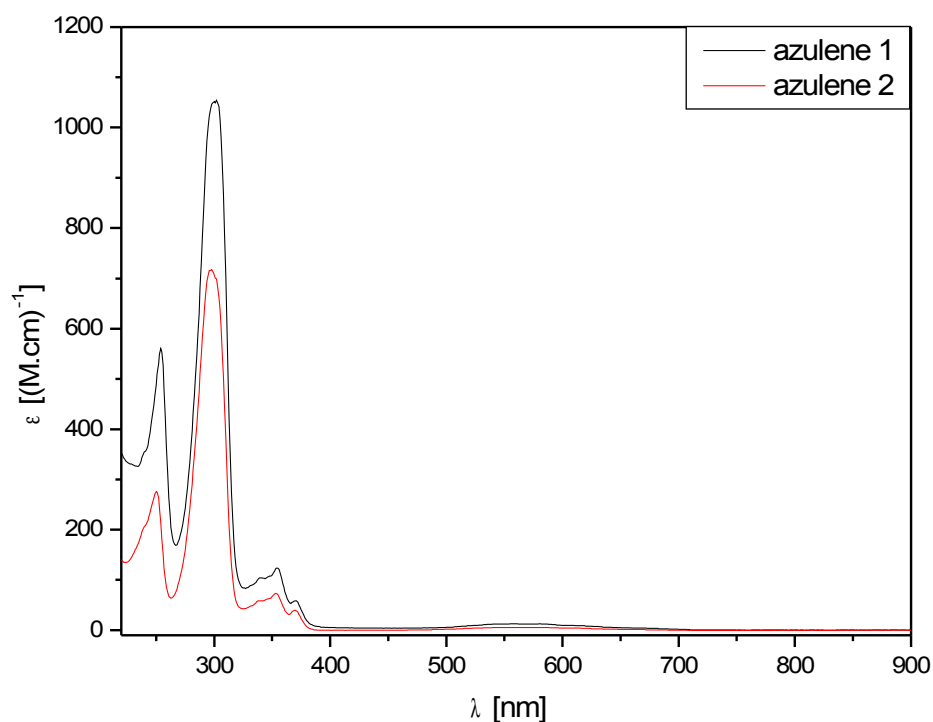


Graf 3: Absorpční spektrum hexanu. Pro měření bylo použito 300 μ l hexanu v 3000 μ l metanolu. Jako reference bylo použito 300 μ l destilované vody v 3000 μ l metanolu.

Rozpouštění azulenu 1 bylo obtížnější než rozpouštění azulenu 2, neboť azulen 1 je více nepolární. Vyšší nepolárnost azulenu 1 vůči azulenu 2 je dána chemickým složením molekuly azulenu 1, který má navázány ještě dva dlouhé nepolární nasycené uhlovodíkové řetězce k aromatické části molekuly (aromatická část je stejná pro oba azuleny – viz obr. 1 a 2). Tyto řetězce způsobují vyšší nepolárnost.

Azulen 1 má molární hmotnost $M_{a1} = 625,08 \text{ g.mol}^{-1}$, což je více než azulen 2, který má molární hmotnost $M_{a2} = 232,33 \text{ g.mol}^{-1}$. Absorpční spektra azulenu 1 a 2 se od sebe nepatrně liší. V grafu 4 je vidět, že azulen 1 resp. 2 absorbuje v blízké UV oblasti měřeného spektra, kde má dva výrazné pásy. První pás má maximum na 254 nm resp. 250 nm, druhý pás na 302 nm resp. 298 nm.

Studium agregace BChl *c* s oběma azuleny ukáže, která molekula azulenu indukuje více tvorbu agregátů.



Graf 4: Extinkční koeficient azulenu 1 a 2 v hexanu.

Pro přípravu agregátů bylo vhodné oba azuleny rozpustit při co největší koncentraci v acetonu. Většinou bylo potřeba jednoho dne nebo vydatného protřepávání za použití zařízení Vortex, aby se azulen rozpustil. Azulen 1 byl připraven ve třech různých koncentracích. Azulen 2 byl snadněji rozpustitelný a byl připraven ve dvou koncentracích. Příprava více než jedné koncentrace azulenů je vhodná zejména pro ověření reprodukovatelnosti experimentů s BChl agregáty.

Všechny koncentrace c jsou uvedeny v tabulkách 1 a 2. Chybu objemu V jsem stanovil na 0,1 ml, protože aceton nešel příliš dobře nasát pipetou a velmi rychle odkapával. Dostupné pipety nebyly vhodné pro odměřování organických rozpouštědel. Pro určení hmotnosti m pigmentů azulenů byly použity váhy Keru. Absolutní chybu vážení σ_m a relativní chybu η jsem stanovil vyšší než uvádí manuál k vahám. Obě jsou uvedené v tabulce 1 a 2.

Pro charakterizaci azulenu 1 resp. 2 byl určen extinkční koeficient podle (3) na vlnové délce $\lambda_1 \approx 566$ nm resp. $\lambda_2 \approx 561$ nm.

Celkovou chybu extinkčního koeficientu σ_ε jsem stanovil podle [3] jako součet relativních chyb jednotlivých veličin ve vzorci (3). V tabulkách jsou rovněž uvedeny veličiny potřebné k dosazení do vzorce (3) jako je absorbance A pro azulen 1 resp. azulen 2 na dané vlnové délce λ_1 resp. λ_2 .

Tabulka 1: Azulen 1

V [ml]	m [mg]	σ_m [mg]	η [%]	c [M]	λ_1 [nm]	A [A.U.]	ε_{a1} [(M.cm) ⁻¹]	σ_ε [(M.cm) ⁻¹]
1,5	0,8	0,12	15	0,000853	566	0,05851	686	171
1,5	0,95	0,12	13	0,001013	566	0,05098	503	114
1,5	1,25	0,12	10	0,0002	568	0,15155	758	149

Tabulka 2: Azulen 2

V [ml]	m [mg]	σ_m [mg]	η [%]	c [M]	λ_2 [nm]	A [A.U.]	ε_{a2} [(M.cm) ⁻¹]	σ_ε [(M.cm) ⁻¹]
1,5	1,6	0,12	8	0,004591	561	0,23199	505	88
1,5	0,8	0,12	15	0,002296	561	0,13712	597	149

Z hodnot z tabulky 1 je určen extinkční koeficient pro azulen 1:

$$\epsilon_{a1} = (617 \pm 80) (\text{M.cm})^{-1} \text{ na vlnové délce } \lambda_1 \approx 566 \text{ nm}$$

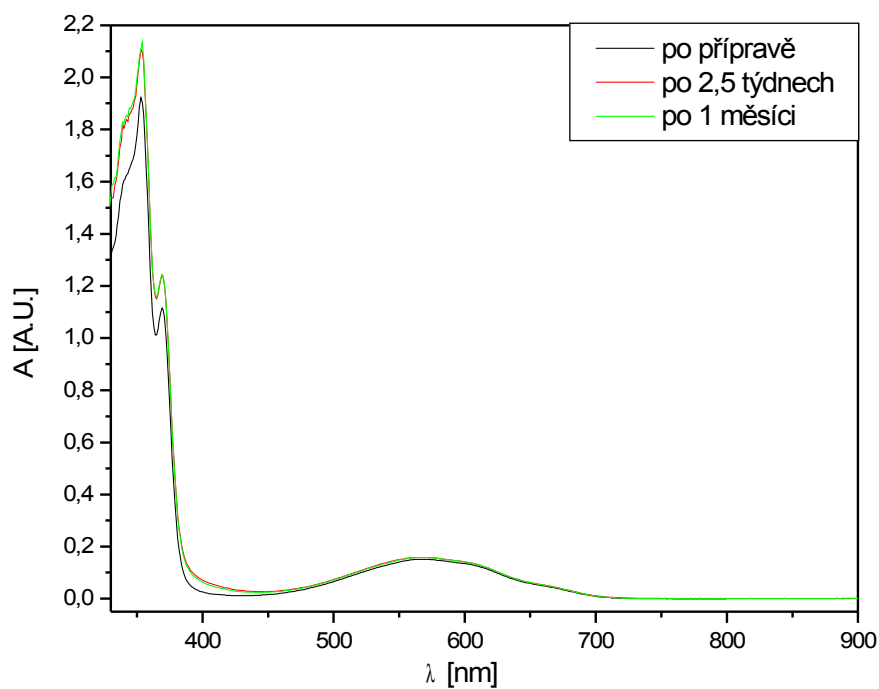
Z hodnot z tabulky 2 je určen extinkční koeficient pro azulen 2:

$$\epsilon_{a2} = (529 \pm 76) (\text{M.cm})^{-1} \text{ na vlnové délce } \lambda_2 \approx 561 \text{ nm}$$

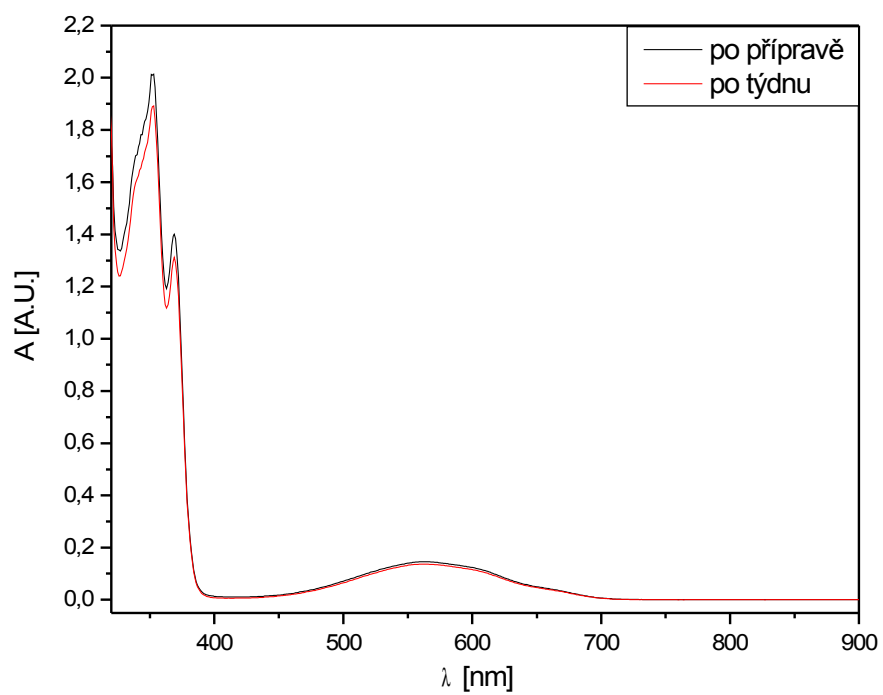
Výsledné extinkční koeficienty jsou určeny pomocí váženého průměru, stejně tak i chyba [3].

V této práci byly použity kyvety o šířce $l = 1 \text{ mm}$. Všechna absorpční spektra byla měřena na spektrometru Specord 250 (Analytic Jena) v rozmezí 220 – 900 nm.

Azuleny, na rozdíl od BChl- \bar{u} , nepodléhají rychle degradaci, neboli azulen 1 resp. 2 rozpuštěný v acetonu má stále téměř stejnou charakteristiku absorpčního spektra (viz. graf 5 resp. 6). Mění se pouze hodnoty absorbance, protože aceton se na vzduchu rychle odpařuje. Absorpční spektra v grafech 5 a 6 jsou znázorněna až od 330 nm, protože na nižších vlnových délkách se projevila velká absorpce acetonu a spektrum na těchto vlnových délkách je nepoužitelné.



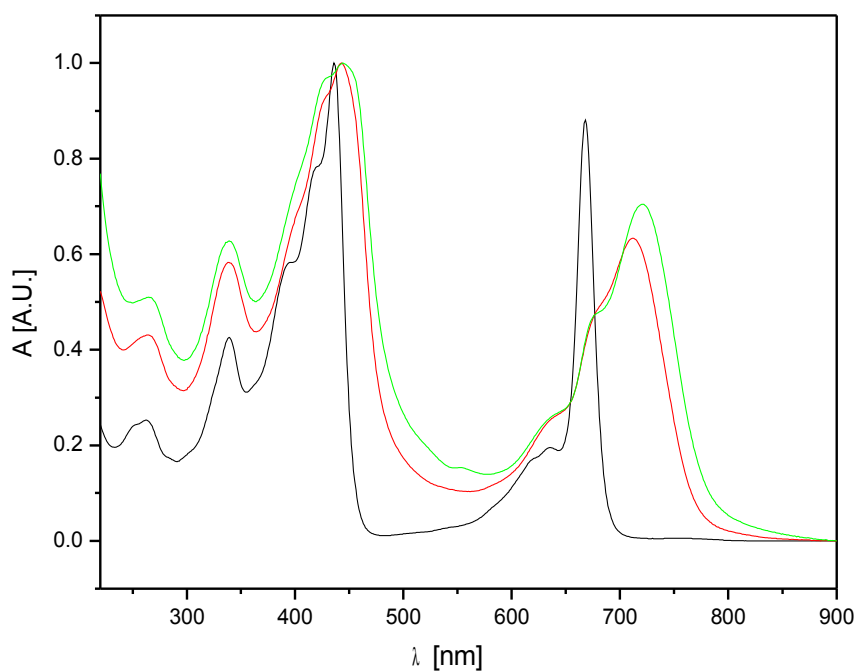
Graf 5: Časový vývoj azulenu 1 v acetonu.



Graf 6: Časový vývoj azulenu 2 v acetonu.

3. Výsledky

Ve vodném prostředí BChl *c* (dále jen BChl) vytváří dimery. Absorpční spektrum dimerů BChl je odlišné od monomerů. V grafu 7 je srovnání absorpčních spekter BChl rozpuštěného v etanolu s dimery v pufru. Pro odlišení dimerů od agregátů byla v této práci používána hranice 715 nm pro maximum pásu Q_y . U BChl v etanolu je maximum pásu Q_y na 668 nm, kdežto u dimeru na 712 nm. V grafu je také zachycen časový vývoj dimerů v pufru. Po dvou hodinách po přípravě se maximum pásu Q_y posunulo na 721 nm. To znamená, že v roztoku byly patrně přítomny nějaké nečistoty, např. lipidy, které indukovaly agregaci.



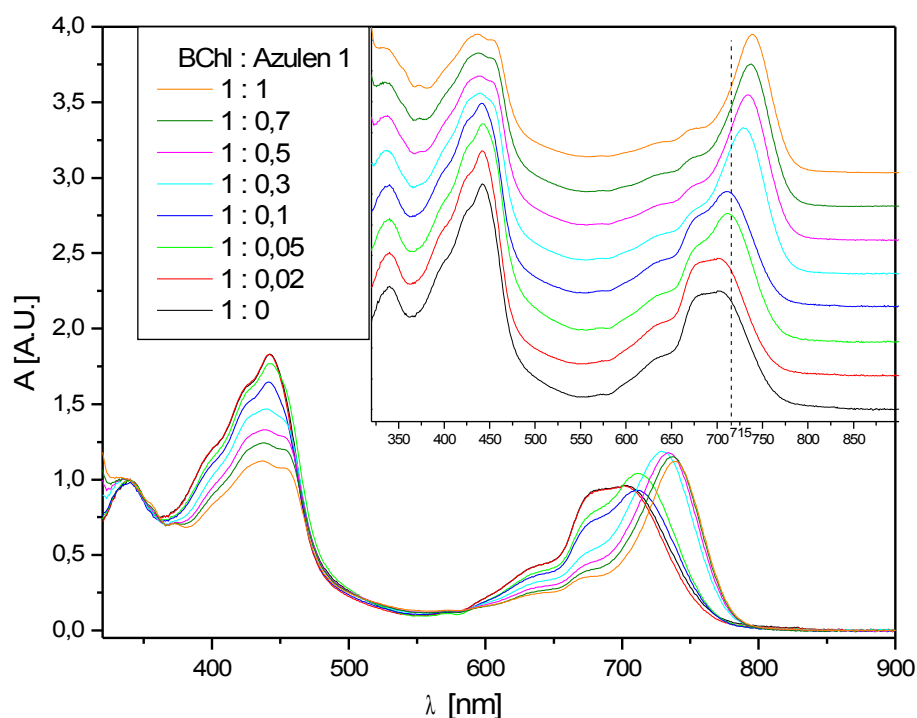
Graf 7: BChl *c* – srovnání absorpčních spekter monomeru a dimeru. Monomer – černá čára, dimer – červená čára, dimer 2 hodiny po přípravě – zelená čára. Spektra jsou normována na absorpční maxima.

Pro vyšetření závislosti vlivu azulenových pigmentů na tvorbu agregátů je potřeba znát jednotlivé poměry BChl s azulenem 1 a 2 v proměřovaném roztoku. Pro přípravu agregátů byl použit zmražený a vysušený BChl. Ten bylo potřeba nejdříve rozpustit v organickém rozpouštědle. Jako rozpouštědla bylo použito etanolu. Zásobní roztok BChl v etanolu byl většinou příliš hustý, pro měření absorpčních spekter jej bylo potřeba zředit. Rozumná hranice optické hustoty pro použitelná spektra byla $A \approx 2$ (v A.U.).

BChl se rozpustí v etanolu a určí se jeho koncentrace c za pomoci vztahu (3), ve kterém pro danou vlnovou délku (zde určeno pro maximum pásu Q_y) známe hodnotu absorbance A , šířku kyvety l a extinkční koeficient ϵ . Pro BChl je $\epsilon = 70\,000 \text{ (M.cm)}^{-1}$ (v metanolu) [8].

Pro zvolené stechiometrické poměry azulenu a BChl v pufru se určí přesné objemy rozpuštěných pigmentů. Oba pigmenty byly po smíchání v požadovaném poměru vstříknuty do 2 ml pufru. Tento roztok pak byl vstříknut do kyvety a proměřen. Všechna spektra jsou normována podle pásu s maximem kolem 340 nm v blízké UV oblasti spektra. Ze zkušenosti plyne, že tento pás je agregací minimálně ovlivněn. Zvyšováním poměru azulenu v roztoku BChl v pufru se postupně začínají tvořit agregáty. To se projevuje posouváním pásu Q_y , přes hranici 715 nm a dále do červené oblasti spektra (graf 8).

BChl začíná tvořit agregáty s azulenem 1 po přípravě již od poměru 1 : 0,3 (BChl : azulen 1). Maximum pásu Q_y je na 729 nm. Poměry 1 : 0,05 resp. 1 : 0,1 mají maxima Q_y na 711 nm resp. 710 nm. Tyto poměry jsou téměř na hranici minimální koncentrace azulenu pro tvorbu agregátů. Maximum pásu Q_y poměru 1 : 0,1 by mělo mít větší vlnovou délku než pás Q_y poměru 1 : 0,05. To však nenastalo. Tento jev může být způsoben rychlostí s jakou byly vzorky po přípravě změřeny, protože k největším změnám ve vzorku dochází ihned po přípravě. S rostoucím poměrem azulenu v roztoku již posun pásu Q_y není tak výrazný. Největší posun nastal mezi pásy poměrů 1 : 0,3 a 1 : 0,5 a to o 5 nm. Dále se maxima pásu liší pouze o 2 až 3 nm. Pás Q_y pro poměr 1 : 1 je na 739 nm.

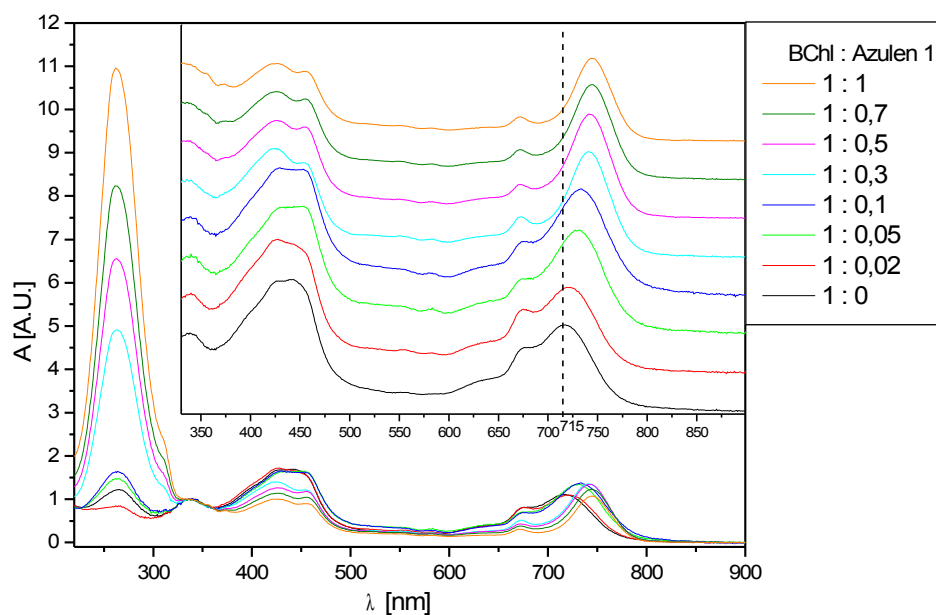


Graf 8: BChl agregáty s azulenem 1 po přípravě. Ve výřezu grafu je vyznačena hranice agregace (715 nm).

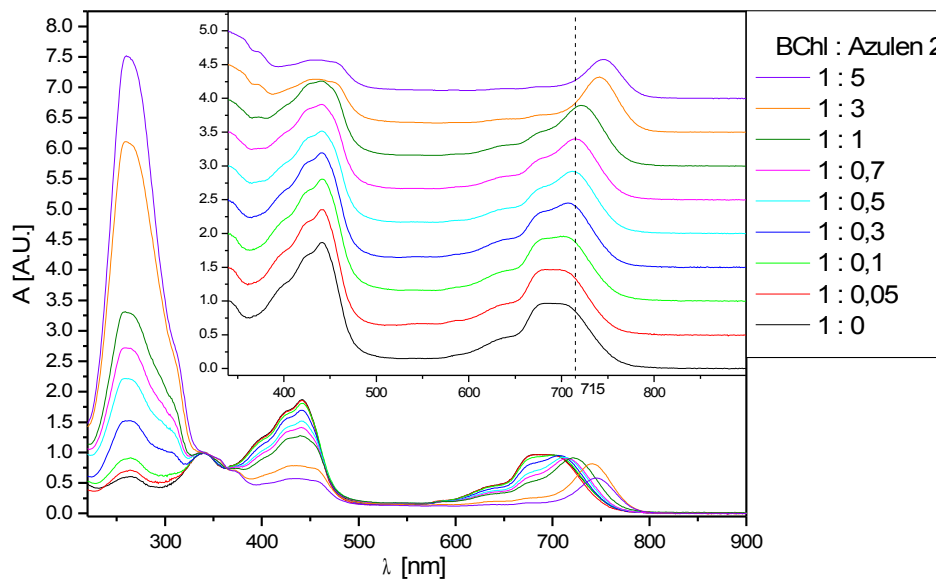
BChl agregáty se nejvíce vyvíjejí prvních několik hodin po přípravě. Po týdnu se dá považovat jejich stav za ustálený. Během této doby se pásy Q_y většiny poměrů posunuly za hranici 715 nm. V grafu 9 je tento posun patrný. Pás Q_y pro poměr 1 : 0, kde by neměl být žádný obsah pigmentu, se posunul na 716 nm. To možná nasvědčuje opět přítomnosti nějaké nečistoty, mastnoty, např. lipidu. Pás Q_y poměru 1 : 0,02 se posunul na 720 nm. Při tomto poměru už tedy azulen 1 indukuje agregaci. Pás Q_y poměru 1 : 0,05 resp. poměru 1 : 0,1 se posunul na 728 nm resp. na 734 nm. U roztoků s vyšším poměrem azulenu než je 1 : 0,1 se rozdíl mezi pásy Q_y výrazně zmenšily. Pás Q_y pro poměr 1 : 1 se posunul na 744 nm.

BChl tvoří agregáty s azulenem 2 po přípravě při vyšších poměrech než s azulenem 1 po přípravě. Z grafu 10 je možné odečíst, že k agregaci BChl s azulenem 2 dochází až při koncentraci 1 : 0,7. Maximum pásu Q_y tohoto poměru je na 715 nm. To lze zároveň považovat za minimální koncentraci azulenu pro tvorbu agregátů. Poměr 1 : 0,5 se agregaci také velmi blíží; Q_y je na 714 nm. Mezi poměrem 1 : 1 a poměrem 1 : 3 dochází k velkému posunu pásu Q_y . Pás Q_y poměru 1 : 3 je na 741 nm a pás Q_y poměru 1 : 5 je na 745 nm.

Průběh pásů poměrů od 1 : 0 do 1 : 0,1 je stejný jako u dimerů. Maxima těchto pásů jsou před hranicí 715 nm (pás poměru 1 : 0,1 je na 704 nm), tedy žádné agregáty se neutvořili.



Graf 9: BChl agregáty s azulenem 1 o týden později. Ve výřezu grafu je vyznačena hranice agregace (715 nm).

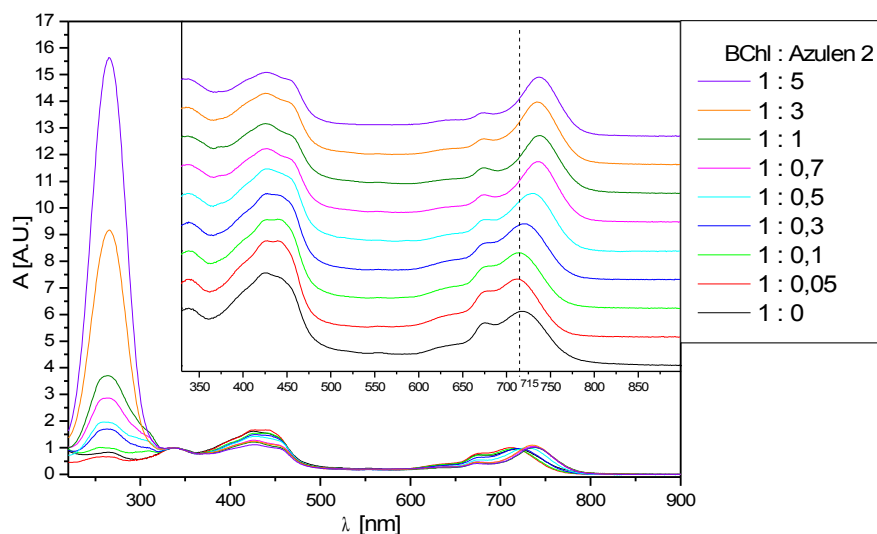


Graf 10: BChl agregáty s azulenem 2 po přípravě. Ve výřezu grafu je vyznačena hranice agregace (715 nm).

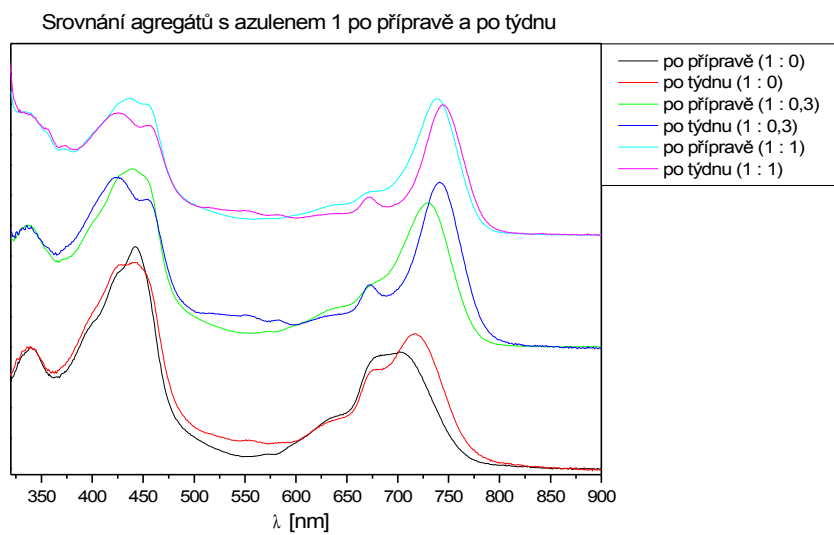
Graf 11 znázorňuje absorpční spektra BChl agregátů s azulenem 2 po týdnu. Z výřezu grafu lze opět vyčíst, že roztok BChl s azulenem o koncentraci 1 : 0 agregoval. Pás Q_y je na 717 nm. To opět nasvědčuje přítomnosti nějaké nečistoty. Pás Q_y poměru 1 : 0,05 je totiž na 714 nm stejně jako pás pro poměr 1 : 0,1. Ostatní pásy jsou za hranicí 715 nm, tedy ve vzorcích se vytvořily agregáty.

Grafická srovnání pro některé poměry BChl s azulenem 1 resp. 2 po přípravě a po týdnu jsou znázorněna v grafu 12 resp. 13. U všech spekter BChl agregátů s azulenem 1 proměřovaných po týdnu (graf 12) se pásy Q_y posunuly dále do červené oblasti. Pro poměr 1 : 0 nastal posun Q_y ze 701 nm na 716 nm. Pro poměr 1 : 0,3 je posun Q_y z 729 nm na 741 nm a pro maximální poměr azulenu 1 v BChl agregátech 1 : 1 je posun Q_y z 739 nm na 744 nm.

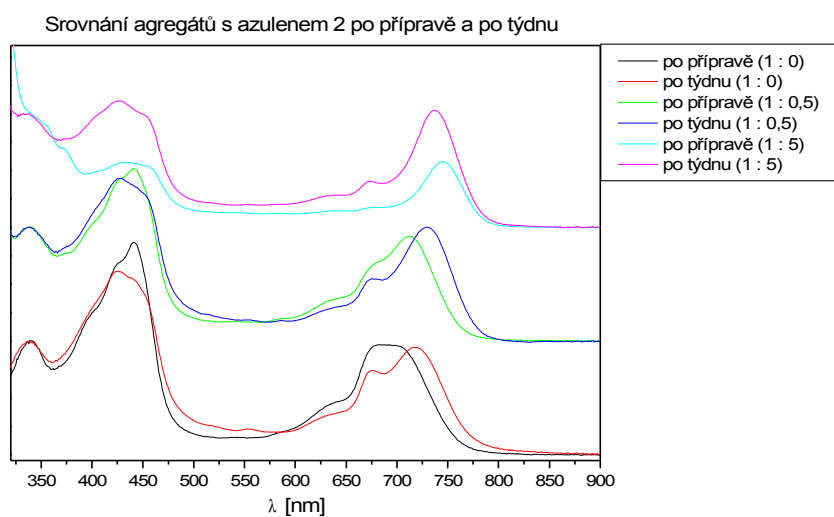
U spekter pro BChl agregáty s azulenem 2 (graf 13) nastal po týdnu posun pásu Q_y . Pro poměr 1 : 0 se Q_y posunul z 684 nm na 717 nm. Pro poměr 1 : 0,5 se Q_y posunul z 711 nm na 729 nm. Pouze posun Q_y pro poměr 1 : 5 byl směrem ke kratším vlnovým délkám a to ze 745 nm na 737 nm.



Graf 11: BChl agregáty s azulenem 2 po týdnu. Ve výřezu grafu je vyznačena hranice agregace (715 nm).

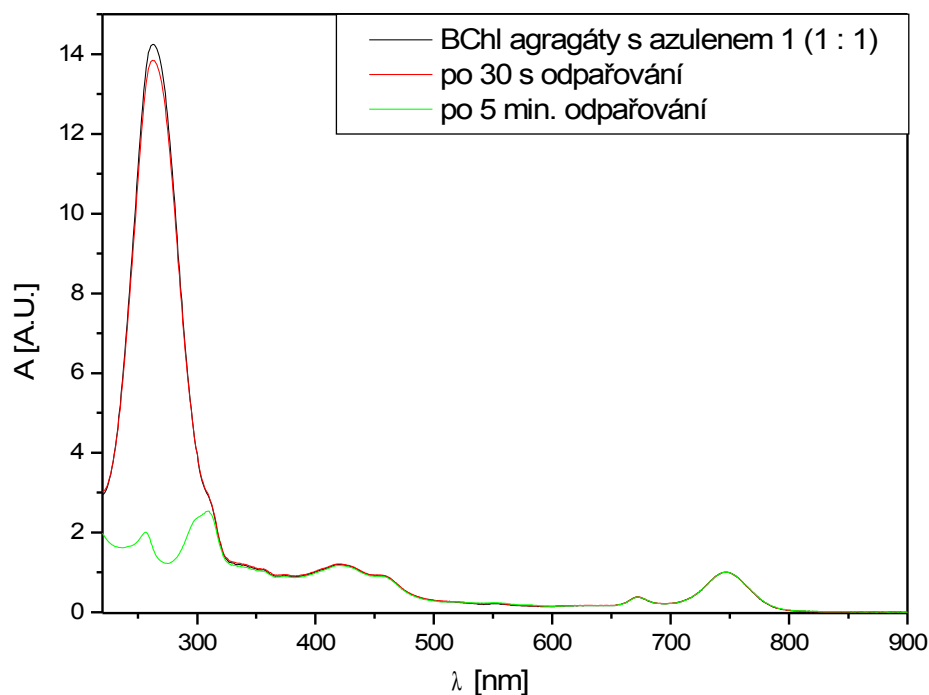


Graf 12: Srovnání časového vývoje pro některé poměry BChl s azulem 1.



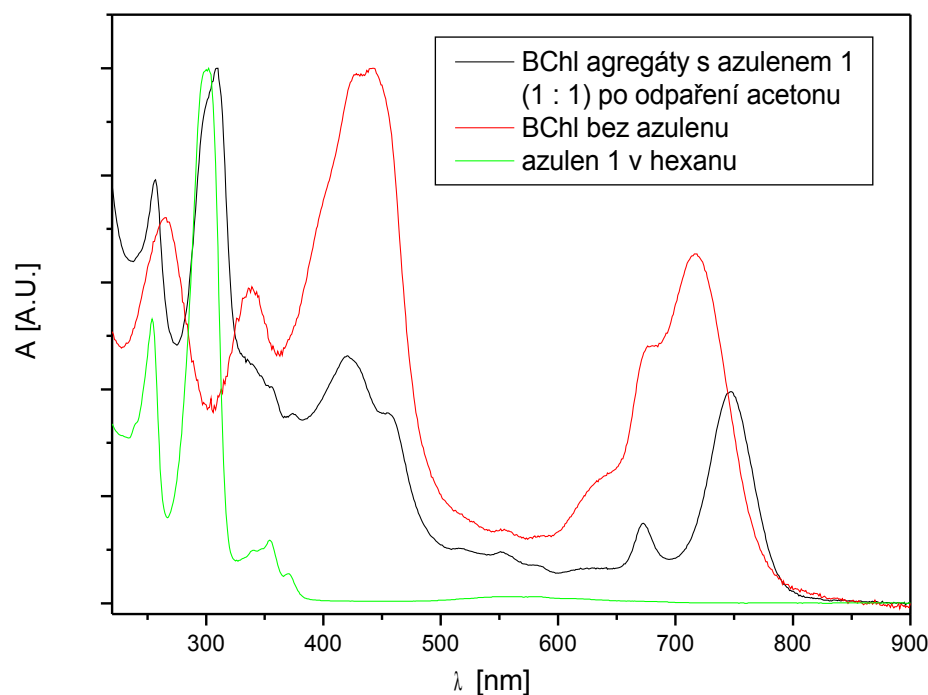
Graf 13: Srovnání časového vývoje pro některé poměry BChl s azulem 2.

Azuleny stejně jako BChl neabsorbují v zelené části viditelného spektra. K určení skutečného spektra agregátů je potřeba nejprve odpařit zbytkový aceton. Získané spektrum pak dokazuje, že se podařilo připravit agregáty se zvýšenou absorpcí v blízké UV oblasti, kde samotné agregáty neabsorbují (graf 14). Odpařování probíhalo po celkovou dobu cca 5 minut za pomoci dusíku.



Graf 14: Odpařování acetonu z BChl agregátů s azulenem 1 v poměru 1 : 1. Spektra byla normována na maximum pásu Q_y na vlnové délce 746 nm.

V grafu 15 je zobrazeno srovnání absorpčního spektra azulenu, BChl agregátů s azulenem 1 v poměru 1 : 1 zbavených acetonu a spektrum BChl v etanolu. Spektrum agregátu s azulenem 1 má zesílenou absorpci v oblasti blízkého UV na rozdíl od samotného BChl.

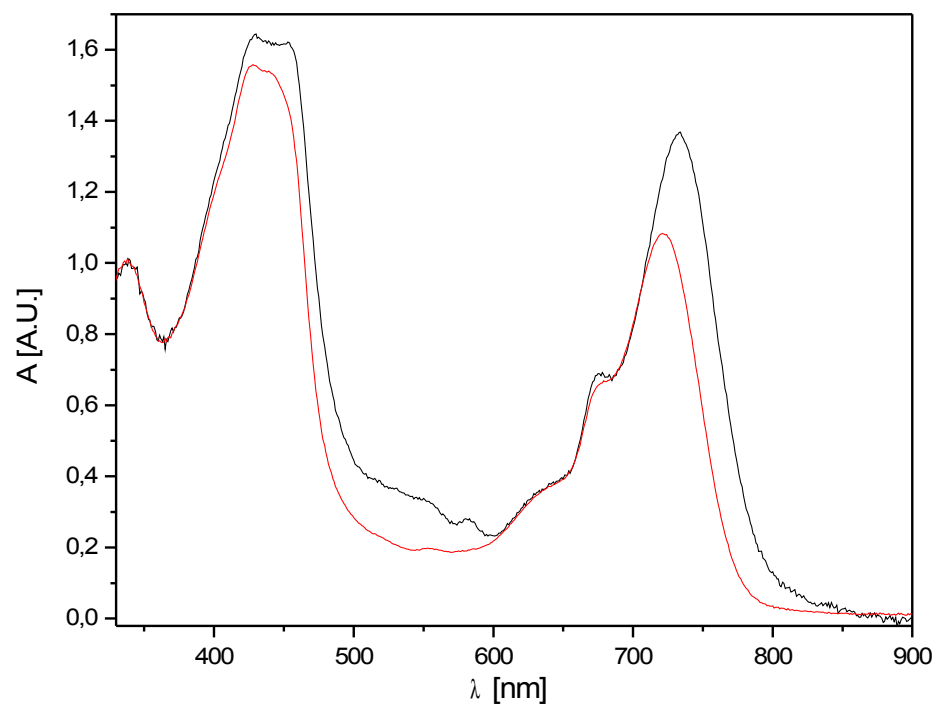


Graf 15: Srovnání azulenu 1 rozpuštěného v hexanu, BChl agregátů s azulenem 1 v poměru 1 : 1 a BChl dimerů v pufru. Spektra byla normována na maxima.

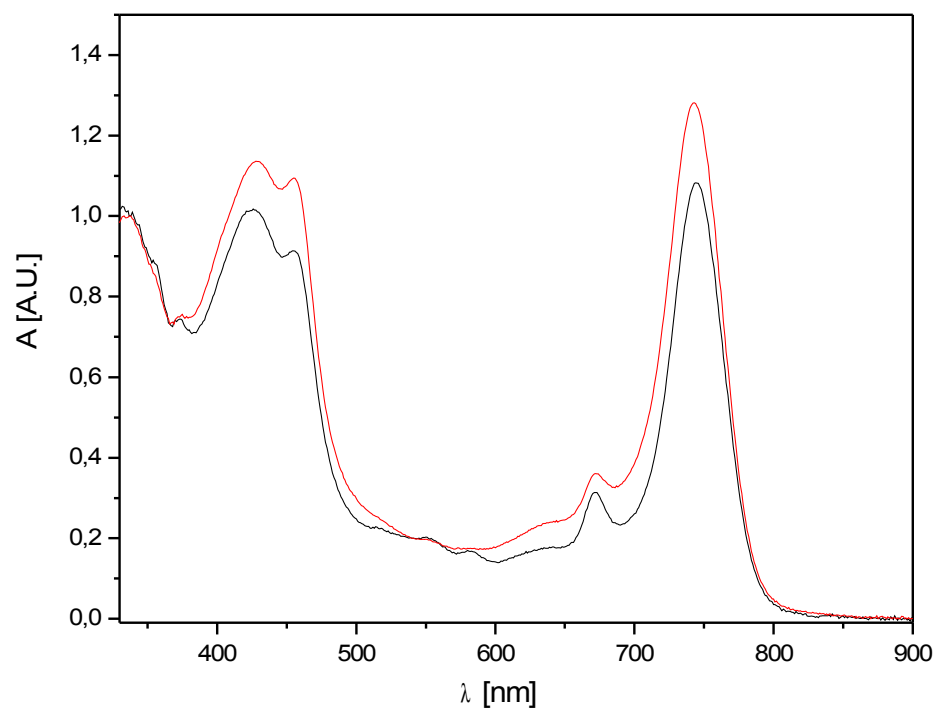
Pro kontrolu reprodukovatelnosti výsledků byly namíchány stejné poměry BChl s azulenem za pomoci jiné koncentrace výchozího zásobního roztoku BChl a jiné výchozí koncentrace azulenu. Měření byla ověřena vždy pro dva poměry BChl s azulenem 1 resp. 2. Jejich spektra po týdnu od přípravy se téměř shodují (grafy 16 – 19).

Pro azulen 1 v poměru s BChl 1 : 0,1 vyšla poměrně rozdílná hodnota. Pro azulen 1 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu je maximum pásu Q_y na 734 nm. Pro koncentraci 0,95 mg v 1,5 ml acetonu je maximum Q_y na 721 nm. Rozdíl ve vlnových délkách maxim pásu Q_y může být ten, že tento poměr BChl s azulenem je citlivý na velmi malé změny v tomto poměru.

Pro azulen 1 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu v poměru 1 : 1 je pás Q_y na 743 nm a pro azulen 0,95 mg v 1,5 ml acetonu je na 744 nm. Grafy 16 – 17 jsou normovány na 337 nm.



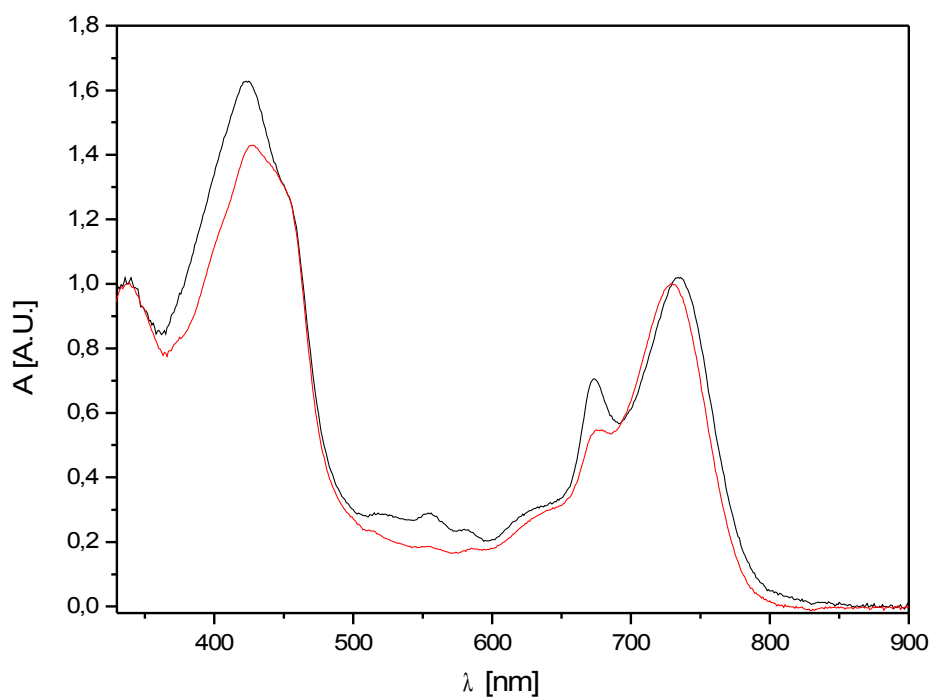
Graf 16: Srovnání BChl agregátů s azulenem 1 pro poměr 1 : 0,1. BChl s azulenem 1 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu – černá čára. BChl s azulenem 1 v koncentraci 0,95 mg v 1,5 ml acetonu – červená čára.



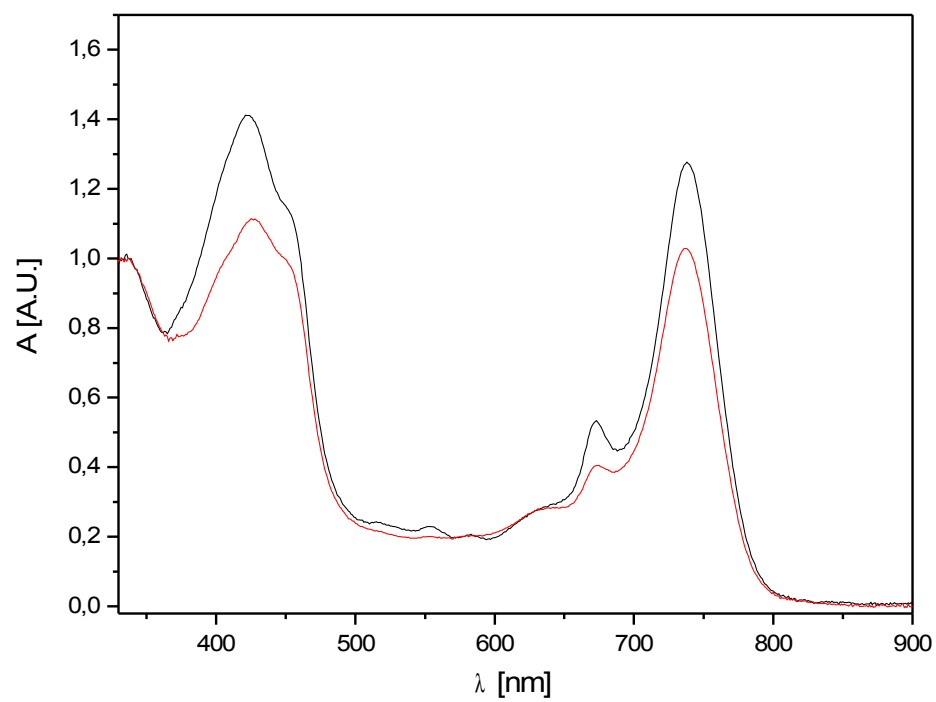
Graf 17: Srovnání BChl agregátů s různě koncentrovaným azulenem 1 pro poměr 1 : 1. BChl s azulenem 1 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu – černá čára. BChl s azulenem 1 v koncentraci 0,95 mg v 1,5 ml acetonu – červená čára.

Pro azulen 2 ve dvou různých koncentracích 1 : 0,5 resp. 1 : 5 vyšla maxima pásu Q_y velmi podobně. Pro azulen 2 v koncentraci 1,6 mg v 1,5 ml acetonu v poměru 1 : 0,5 je pás Q_y na 734 nm. Pro azulen 2 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu je pás Q_y na 729 nm.

Pás Q_y pro poměr 1 : 5 pro azulen 2 v koncentraci 1,6 mg v 1,5 ml acetonu je na 738 nm. Pás Q_y pro azulen 2 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu je na 737 nm. Grafy 18 – 19 jsou normovány na 337 nm.



Graf 18: Srovnání BChl agregátů s různě koncentrovaným azulenem 2 pro poměr 1 : 0,5. BChl s azulenem 2 v koncentraci 1,6 mg v 1,5 ml acetonu – černá čára. BChl s azulenem 2 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu – červená čára.



Graf 19: Srovnání BChl agregátů s různě koncentrovaným azulenem 2 pro poměr 1 : 5. BChl s azulenem 2 v koncentraci 1,6 mg v 1,5 ml acetonu – černá čára. BChl s azulenem 2 v koncentraci 0,8 mg v 1,5 ml acetonu – červená čára.

4 . Závěr

V průběhu práce byly určeny extinkční koeficienty pro azulen 1:

$$\epsilon_{a1} = (617 \pm 80) (\text{M.cm})^{-1} \text{ na vlnové délce } \lambda_1 \approx 566 \text{ nm}$$

a pro azulen 2:

$$\epsilon_{a2} = (529 \pm 76) (\text{M.cm})^{-1} \text{ na vlnové délce } \lambda_2 \approx 561 \text{ nm}$$

Extinkční koeficienty jsou v rámci chyby téměř stejné.

Výsledkem této práce je zjištění, že BChl *c* tvoří agregáty za určitých poměrů azulenu 1 a 2. Pro azulen 1 je to poměr 1 : 0,02 (BChl *c* : azulen 1). Pro azulen 2 je tento poměr o něco vyšší. Poměr, kdy azulen 2 začíná indukovat agregaci je 1 : 0,3 (BChl *c* : azulen 2). Agregáty se tvoří při nižších koncentracích azulenu 1 než v přítomnosti azulenu 2. Důvod je ten, že azulen 1 je více nepolární než azulen 2, neboli hydrofobní efekt azulenu 1 je větší a azulen 1 má tendenci více indukovat agregaci BChl *c*.

Podařilo se připravit agregáty se zvýšenou absorpcí v blízké UV oblasti, kde samotné agregáty neabsorbují. Byla prokázána opakovatelnost naměřených závislostí (grafy 16 – 19).

5. Literatura

- [1] Balaban TS, Tamiaki H, Holtzwarth AR (2005): Chlorins programmed for self assembly, *Top Curr Chem* 258:1-138
- [2] Blankenship RE, Matsuura K (2003): Antenna complexes from green photosynthetic bacteria, In: Green BR, Parson WW (eds) *Light harvesting antennas*. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, pp 195–217
- [3] English J.: Zpracování výsledků fyzikálních měření (<http://physics.mff.cuni.cz/kfnt/czech/menu/studium/upf/upf.htm>)
- [4] Hirota M, Moriyama T, Shimada K, Miller M, Olson JM and Matsuura K (1992): High degree of organization of bacteriochlorophyll *c* in chlorosome-like aggregates spontaneously assembled in aqueous solution. *Biochim Biophys Acta* 1099: 271–274
- [5] Klinger Pavel (2003): Optická spektroskopie umělé fotosyntetické antény na bázi bakteriochlorofylových agregátů, Matematicko-fyzikální fakulta, Praha
- [6] Klinger P, Arellano JB, Vacha FE, Hala J, Psencik J (2004): Effect of carotenoids and monogalactosyl diglyceride on bacteriochlorophyll *c* aggregates in aqueous buffer: Implication for the self-assembly of chlorosomes, *Photochem Photobiol* 80: 572-578
- [7] Nepraš M., Titz M. (1983): *Základy teorie elektronových spekter*, SNTL, Praha
- [8] Stanier, R.Y. and J. H. C. Smith (1960): The chlorophylls of green bacteria. *Biochim Biophys Acta* 41, 478-484
- [9] Tony Owen (1996): *Fundamentals of UV-visible spectroscopy*, Hewlett-Packard Company, Germany