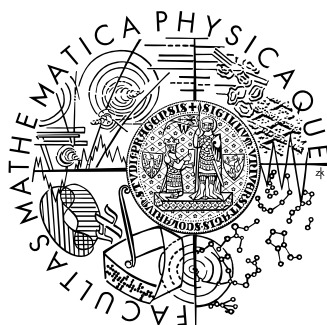


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Šárka Gregorová

Optická spektroskopie bakteriochlorofylových agregátů s deriváty indiga

Katedra chemické fyziky a optiky

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

Studijní program: Fyzika, obecná fyzika

2010

Děkuji Prof. Dr. H. Langhalsovi za poskytnutí derivátu indiga, 5,5'-di-tert-butylindiga, používaného v této práci.

Dále bych chtěla poděkovat vedoucímu své bakalářské práce Doc. RNDr. Jakubu Pšenčíkovi, Ph.D. za ochotu a trpělivost, s jakou se mi věnoval.

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

V Praze dne 24. 5. 2010

Šárka Gregorová

Obsah

1. Úvod	5
2. Teoretický úvod	6
2.1. Absorpční spektroskopie.....	6
2.1.1. Absorpce elektromagnetického záření.....	6
2.1.2. Lambertův – Beerův zákon.....	7
2.1.3. Franckův – Condonův princip, přechodový moment	8
2.1.4. Absorpční spektrometr	9
2.2. Fluorescenční spektroskopie.....	11
2.2.1. Luminiscence, Jablonského diagram.....	11
2.2.2. Vlastnosti fluorescenčního spektra.....	12
2.2.3. Stanovení účinnosti přenosu energie	14
2.2.4. Fluorescenční spektrometr.....	15
2.3. Chlorofyl.....	16
2.3.1. Fotosyntéza.....	16
2.3.2. Chlorofyly, bakteriochlorofyl <i>c</i>	18
2.3.3. Světlosběrné antény, chlorosomy, agregáty	19
2.4. Derivát indiga	20
3. Výsledky měření	23
3.1. Molární extinkční koeficient L.-indiga.....	23
3.2. Studium agregace BChl-u <i>c</i> s L.-indigem.....	24
3.2.1. Určení koncentrace zásobních roztoků BChl-u <i>c</i> a L.-indiga.....	24
3.2.2. Agregace BChl-u <i>c</i> s L.-indigem.....	26
3.3. Stárnutí vzorku L.-indiga v pufru	31
3.4. Fluorescenční spektroskopie.....	33
4. Diskuse	38
4.1. Molární extinkční koeficient L.-indiga.....	38
4.2. Stárnutí L.-indiga v pufru	38
4.3. Tvorba agregátů BChl-u <i>c</i> a L.-indiga	39
4.4. Přenos energie v agregátech	40
5. Závěr	43
Citovaná literatura	44

Seznam použitých zkratk:

A. U. – absorbance units

BChl – bakteriochlorofyl

C. P. S. – counts per second

DMF – dimethylformamid

L.-indigo – 5,5'-di-tert-butylindigo

Název práce: Optická spektroskopie bakteriochlorofylových agregátů s deriváty indiga
Autor: Šárka Gregorová
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: K absorpci světla v prvních fázích procesu fotosyntézy využívají živé organismy pigment-proteinové komplexy zvané světlosběrné antény. Zvláštním typem těchto antén jsou chlorosomy, vyskytující se u příslušníků bakteriálních kmenů Chlorobi a Chloroflexi. Chlorosomy obsahují kromě bakteriochlorofylu (BChl-*a*) desetitisíce až statisíce molekul BChl-*c*, *d* nebo *e*. Tyto pigmenty se na rozdíl od ostatních druhů chlorofylů mohou vázat mezi sebou a vytvořit tak rozsáhlé agregáty, které mají zásadní vliv na strukturu chlorosomů. Agregáty BChl-*c*, *d* nebo *e*, jež mají podobné optické vlastnosti jako agregáty v chlorosomech, lze připravit *in vitro* ve vodném prostředí za přítomnosti některých nepolárních látek. V této práci byl metodami optické spektroskopie studován vliv 5,5'-di-*tert*-butylindiga (L.-indiga) na tvorbu agregátů BChl-*c* a přenos absorbované elektromagnetické energie mezi molekulami L.-indiga a BChl-*c* v agregátech. L.-indigo absorbuje světlo na jiných vlnových délkách než BChl *c*, což by bylo v budoucnosti možné využít ke zvýšení účinnosti procesu umělé fotosyntézy. Podařilo se prokázat, že L.-indigo s BChl-*c* tvoří agregáty, které jsou stabilní nejméně tři týdny po přípravě. Přenos energie se kvůli nedostatečné citlivosti použitého fluorescenčního spektrometru nepodařilo ani prokázat, ani vyvrátit. Posledním výsledkem této práce je stanovení molárního extinkčního koeficientu L.-indiga v etanolu.

Klíčová slova: Optická spektroskopie, agregace, bakteriochlorofyl, indigo

Title: Optical spectroscopy of bacteriochlorophyll aggregates with indigo derivatives
Author: Šárka Gregorová
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: Absorption of light during the first phases of photosynthesis takes place in pigment-protein complexes called light-harvesting antennae. Chlorosomes, a special type of these antennae, are found in bacteria of two phyla, Chlorobi and Chloroflexi. Together with bacteriochlorophyll (BChl) *a*, chlorosomes contain tens of thousands to hundreds of thousands molecules of BChl *c*, *d* or *e*. These pigments are unique among other types of chlorophyll, because they can bind together and form large aggregates. Aggregates of BChl *c*, *d* or *e* with similar optical properties to those found in chlorosomes can be prepared *in vitro* in aqueous solution in presence of some non-polar substances. In this thesis, the effect of 5,5'-di-*tert*-butylindigo (L.-indigo) on the formation of aggregates of BChl *c* and energy transfer between L.-indigo and BChl *c* in aggregates has been studied by means of optical spectroscopy. L.-indigo absorbs light of different wavelengths than BChl *c*, which could increase the efficiency of future artificial photosynthesis systems. It has been proven that L.-indigo with BChl *c* form aggregates that are stable at least three weeks after the preparation. The energy transfer has not been proven nor disproven, because of insufficient photosensitivity of used fluorescence spectrometer. The last accomplishment of this thesis is the measurement of molar extinction coefficient of L.-indigo in ethanol.

Keywords: Optical spectroscopy, aggregation, bacteriochlorophyll, indigo

1. Úvod

Slunce je nejvýznamnějším zdrojem energie života na Zemi. Živé organismy energii slunečního záření získávají a zpracovávají ve složitém procesu zvaném fotosyntéza. Výsledkem fotosyntézy jsou stabilní chemické sloučeniny, které slouží jako zdroj energie pro další buněčné pochody.

Důležitou součástí fotosyntetického systému organismů jsou takzvané světloběrné antény, rozsáhlé komplexy bílkovin a fotosyntetických pigmentů, jejichž úkolem je zachytit fotony slunečního záření a energii předat reakčnímu centru fotosyntetického aparátu. Nejvýznamnějším typem pigmentů ve světloběrných anténách jsou chlorofyly. Zvláštním typem chlorofylu jsou bakteriochlorofyly (dále BChl-y) *c*, *d* a *e*, jejichž molekuly jsou schopny vázat se mezi sebou a tvořit rozsáhlé struktury zvané agregáty. BChl-y *c*, *d* a *e* se vyskytují v chlorosomech, světloběrných anténách zelených bakterií kmenů *Chlorobi* a *Chloroflexi* (Blankenship 2002). Díky schopnosti těchto typů BChl-u tvořit agregáty je struktura chlorosomů, na rozdíl od ostatních antén, v první řadě určena přímými vazbami mezi molekulami pigmentů, nikoliv proteinovou kostrou. Chlorosomy jsou jedny z nejrozsáhlejších a také nejefektivnějších typů světloběrných antén a umožňují na fotosyntéze založený život i v hloubkách okolo 100 m pod mořskou hladinou, kde je intenzita dopadajícího světla téměř milionkrát menší než na zemském povrchu (Frigaard a Bryant 2006).

BChl-y *c*, *d* a *e* *in vitro* ve vodném prostředí za přítomnosti vhodné nepolární látky spontánně tvoří agregáty, jejichž optické vlastnosti jsou podobné optickým vlastnostem agregátů v chlorosomech. Agregáty mají nejen schopnost světlo absorbovat, ale absorbovanou energii i přenášet a jejich příprava není obtížná. Obě dvě tyto vlastnosti by bylo možné využít k vytvoření umělého fotosyntetického systému, který by energii slunečního záření přeměňoval na jinou, využitelnou formu energie.

Pro zvýšení účinnosti absorpce světla takových umělých fotosyntetických systémů by bylo vhodné, aby nepolární látka, která s BChl-em vytváří agregáty, absorbovala světlo o jiných vlnových délkách než BChl a aby absorbovanou energii v agregátech přenášela na BChl.

V této práci byl studován vliv derivátu indiga, 5,5'-di-tert-butylindiga (dále je používána zkratka L.-indigo) na agregaci BChl-u *c* ve vodném prostředí. L.-indigo je nepolární látka modré barvy, světlo absorbuje zejména v ultrafialové a žluté oblasti spektra, tedy v oblastech, v nichž BChl *c* světlo příliš neabsorbuje.

Ke studiu agregace BChl-u *c* s L.-indigem byla použita absorpční spektroskopie. Spektrum agregátů totiž není pouhým součtem spekter obou jeho složek, dochází v něm k posunu absorpčního pásu Q_y BChl-u. Díky tomu je možné odlišit, zda vzorek agregáty tvoří či netvoří.

Přenos energie pohlcené L.-indigem na molekuly BChl-u *c* v agregátech byl studován pomocí fluorescenční spektroskopie. Porovnáním fluorescenčního excitačního spektra s absorpčním spektrem lze zjistit nejen to, zda k přenosu energie dochází či nedochází, ale je možné též určit účinnost tohoto přenosu.

2. Teoretický úvod

2.1. Absorpční spektroskopie

2.1.1. Absorpce elektromagnetického záření

Dopadá-li na vzorek nějaké látky elektromagnetické záření, může být jeho část vzorkem absorbována. Absorpčním spektrem rozumíme závislost absorpce elektromagnetického záření vzorkem na vlnové délce dopadajícího záření.

Absorpcí elektromagnetického záření (světla) zvýší vzorek svoji energii o energii pohlceného světla. Energie vzorku se však nemůže zvýšit libovolným způsobem, ale pouze o určité hodnoty v souladu se zákony kvantové teorie – energie částic ve vzorku je kvantována. Jsou-li vzorkem atomy, pak energie E pohlceného fotonu o frekvenci ν

$$E = h\nu, \quad (1)$$

kde h je Planckova konstanta, odpovídá energii E_{el} přechodu elektronu mezi dvěma orbitály.

Při vzniku chemické vazby v molekule se z atomových orbitalů stanou vazebné molekulové orbitály, jejichž energie je nižší než energie původních atomových orbitalů, a antivazebné molekulové orbitály, jejichž energie je vyšší. Podle typu vazby rozlišujeme σ orbitály, v nichž je největší elektronová hustota na spojnici jader, a π orbitály, kde je největší elektronová hustota mimo tuto spojnici. Orbitály označené jako n obsahují nevazebné valenční elektrony. Absorpcí fotonu může dojít k přechodu elektronu z vazebného do antivazebného orbitalu, přičemž nejvyšší energii má zpravidla přechod ze σ orbitalu do antivazebného σ^* orbitalu, nejnižší přechod z n orbitalu do antivazebného π^* orbitalu (Valeur 2002).

V molekulách, které obsahují konjugované vazby (střídání dvojných a jednoduchých vazeb), dochází k delokalizaci elektronů z π orbitalů. Čím rozsáhlejší je konjugovaný systém, tím nižší je energie přechodu $\pi \rightarrow \pi^*$ a tím se absorpční pás přechodu posouvá k delším vlnovým délkám (Valeur 2002).

Energie molekul je, na rozdíl od energie atomů, dána nejen elektronovou energií E_{el} , ale i vibrační energií molekul (E_{vib}) a jejich rotační energií (E_{rot}),

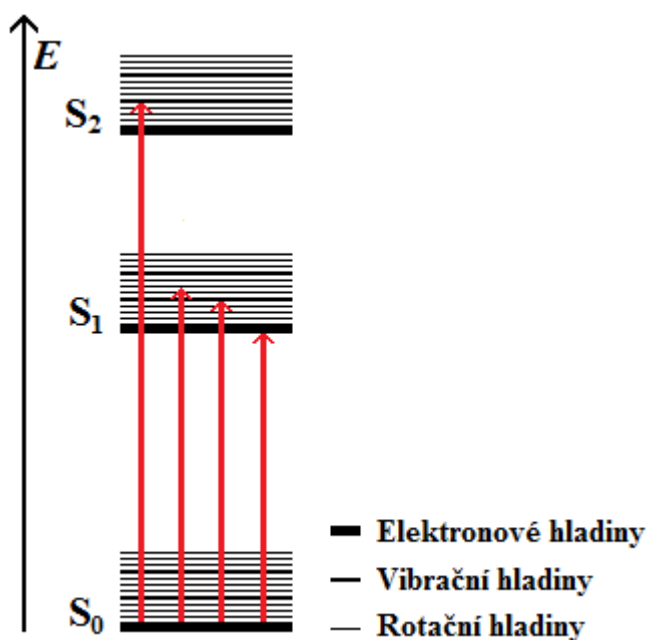
$$E = E_{el} + E_{vib} + E_{rot}, \quad (2)$$

ke každé elektronové energetické hladině náleží vibrační a rotační energetické hladiny, které odpovídají jednotlivým vibračním a rotačním modům molekuly (Owen 2000).

Absorpci fotonu a přechod molekuly do excitovaného stavu je možné schematicky znázornit na Jablonského diagramu, viz Obrázek 1. Na obrázku jsou vyznačeny základní elektronová hladina (S_0) a dvě excitované elektronové hladiny (S_1 , S_2 , hladiny jsou vyznačeny tučnou čarou). Tyto hladiny jsou dále rozštěpeny na vibrační hladiny (slabší čáry) a rotační hladiny (nejslabší čáry). Červenými šipkami je vyznačeno několik možných přechodů elektronu při absorpci fotonu.

Zatímco spektrum atomů odpovídá pouze přechodům mezi jednotlivými elektronovými hladinami, ve spektru molekul se projevuje rotační a vibrační struktura energetického spektra, pozorujeme tedy více absorpčních čar. Na absorpční spektra molekul má dále vliv interakce molekul s okolím, která posouvá hladiny energetického spektra. V roztoku má každá molekula vzorku trochu jiné okolí, absorpční spektrum pak není diskrétní – čárové, ale rozšířené – má podobu pásů.

Obrázek 1: Jablonského diagram



2.1.2. Lambertův – Beerův zákon

Mějme vzorek o rozměrech $j \times k \times l$ a molární koncentraci c , na nějž ve směru osy z dopadá světlo o intenzitě I_0 , jak je znázorněno na Obrázku 2. Počet molekul N ve vrstvě o tloušťce dz je dán vztahem

$$N = cjkN_A dz, \quad (3)$$

kde N_A je Avogadrova konstanta. Necht' má absorpce fotonu molekulou účinný průřez σ , pro úbytek intenzity světla dI ve vrstvě o tloušťce dz pak bude platit

$$dI = -\frac{\sigma cjkN_A}{jk} Idz = -\sigma cN_A Idz. \quad (4)$$

Řešením této diferenciální rovnice dostáváme pro poměr intenzity I_l světla prošlého vzorkem ku intenzitě I_0 dopadajícího světla vztah

$$\ln \frac{I_l}{I_0} = -\sigma c N_A l \quad (5)$$

kde veličina I_l/I_0 se označuje jako transmittance T . Absorbance A je definována jako

$$A = -\log \frac{I_l}{I_0} = -\log T \quad (6)$$

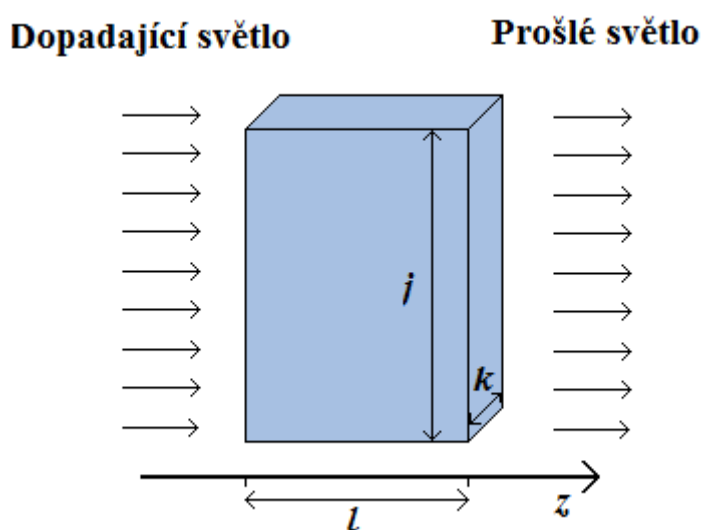
spojením vztahu (5) a (6) dostaneme Lambertův – Beerův zákon

$$A = \sigma c N_A l \log e = \varepsilon c l \quad (7)$$

podle něhož je absorbance přímo úměrná délce dráhy světla ve vzorku (Lambertův zákon) a koncentraci vzorku (Beerův zákon). Veličina ε se nazývá molární extinkční koeficient a je závislá na vlnové délce dopadajícího světla.

Lambertův – Beerův zákon platí za předpokladu, že je koncentrace vzorku dostatečně nízká – molekuly ve vrstvě dz se „nepřekrývají“.

Obrázek 2: K odvození Lambertova – Beerova zákona



2.1.3. Franckův – Condonův princip, přechodový moment

Podle Franckova – Condonova principu jsou přechody elektronů mezi jednotlivými vlastními stavy tak rychlé, že je možné zanedbat změnu v uspořádání jader molekuly a jejího okolí v průběhu těchto přechodů (Lakowicz 1986).

Vlnová funkce Ψ vibronového (tj. elektronového a vibračního) stavu molekuly může být v rámci Bornova – Oppenheimerova přiblížení rozdělena na svou elektronovou část ψ a vibrační část χ , tj.

$$\Psi = \psi\chi, \quad (8)$$

rotační část vlnové funkce byla zanedbána (Prosser 1989). Pravděpodobnost P_{12} přechodu z vibronového stavu 1 do vibronového stavu 2 je úměrná kvadrátu maticového elementu operátoru elektrického dipólového momentu M ,

$$P_{12} \approx \left| \langle \Psi_1 | M | \Psi_2 \rangle \right|^2, \quad (9)$$

kde pro M platí

$$M = \sum e\vec{r}_j, \quad (10)$$

\vec{r}_j je polohový vektor j -tého elektronu a e elementární náboj. Maticový element operátoru dipólového momentu se nazývá přechodový moment. Přechodový moment vibronových přechodů molekuly lze zakreslit jako vektor v souřadnicovém systému definovaném polohami jader atomů molekuly, přičemž největší pravděpodobnost absorpce světla odpovídá případu, kdy je vektor elektrické intenzity světla rovnoběžný s daným přechodovým momentem (Valeur 2002).

Po dosazení (8) do (9) a uvážíme-li, že operátor dipólového momentu závisí pouze na polohových vektorech elektronů, dostáváme

$$P_{12} \approx \left| \langle \psi_1 | M | \psi_2 \rangle \right|^2 \left| \langle \chi_1 | \chi_2 \rangle \right|^2, \quad (11)$$

kde $\left| \langle \chi_1 | \chi_2 \rangle \right|^2$, tedy překryvový integrál vlnové funkce počátečního a koncového vibračního stavu, se nazývá Franckův – Condonův faktor.

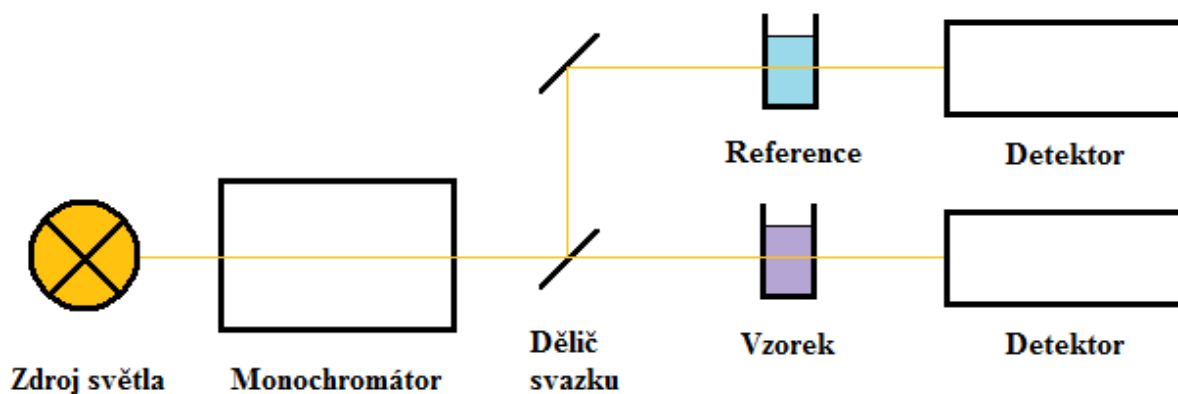
2.1.4. Absorpční spektrometr

Schéma absorpčního spektrometru je zobrazeno na Obrázku 3. Světlo se šíří ze zdroje přes monochromátor, který ze svazku vybírá světlo určité vlnové délky. Svazek světla je dále rozdělen děličem, část svazku dopadá na vzorek, část na referenční látku. Světlo prošlé vzorkem a referencí je detekováno detektory.

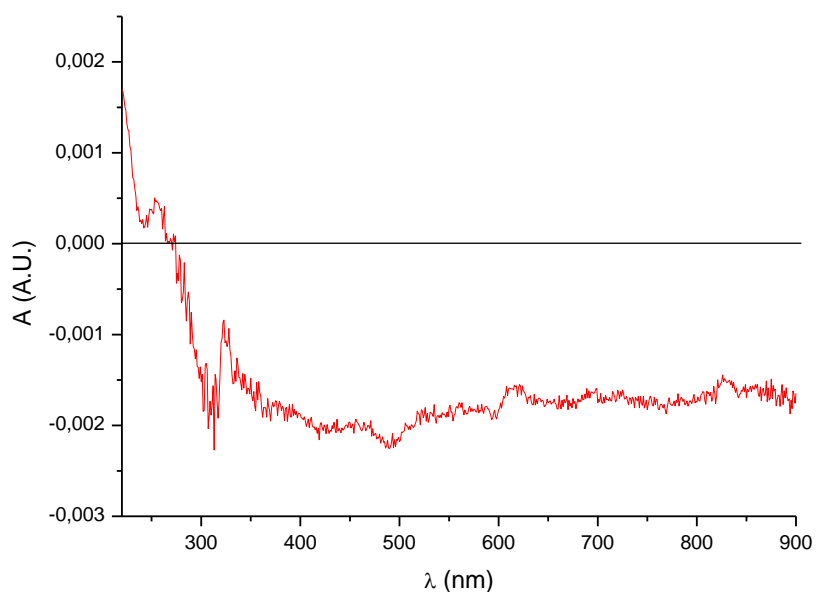
Ideální zdroj světla v absorpčním spektrometru emituje světlo se stejnou intenzitou v určitém intervalu vlnových délek, stejně tak ideální monochromátor propouští světlo se stejnou účinností pro všechny používané vlnové délky a ideální detektor detekuje se stejnou pravděpodobností světlo všech vlnových délek. Reálné součásti absorpčního spektrometru se však od ideálních bohužel liší, čímž dochází ke zkreslení naměřeného absorpčního spektra. Aby bylo toto zkreslení potlačeno, měříme kromě spektra vzorku i referenční spektrum, kterým obvykle bývá spektrum rozpouštědla v identické kyvetě. Absorbance samotného vzorku je pak rozdíl absorbance vzorku s rozpouštědlem (na Obrázku 3 označeno Vzorek) a absorbance reference. Odečtením referenčního spektra také eliminujeme další efekty, které mají vliv na zkreslení absorpčního spektra vzorku, jako je odraz světla na stěnách kyvety, rozptyl světla nebo absorpce světla stěnami kyvety a molekulami rozpouštědla.

Absorpční spektra byla v této práci měřena na spektrometru Specord 250, byly používány kyvety z křemenného skla a až na výjimky bylo měřeno v rozsahu vlnových délek 220 nm až 900 nm. Chyba určení absorpance byla stanovena jako $\pm 0,0025$ A. U., tato chyba byla určena z měření absorpčního spektra destilované vody, referencí byla identická kyveta také naplněná destilovanou vodou, viz Graf 1.

Obrázek 3: Schéma absorpčního spektrometru



Graf 1: Absorpční spektrum destilované vody



2.2. Fluorescenční spektroskopie

2.2.1. Luminiscence, Jablonského diagram

Spontánní emise fotonů při přechodu z excitovaného stavu do energeticky nižšího stavu se nazývá luminiscence. Luminiscence se dělí na dva typy – fluorescenci a fosforescenci.

Je-li elektron v orbitalu o vyšší energii párován s elektronem v orbitalu o nižší energii, tedy pokud má opačně orientovaný spin (excitovaný stav je singletní stav), pak při návratu na nižší energetickou hladinu nemusí jeho spin měnit orientaci, hovoříme o fluorescenci. Typická doba života excitovaného stavu při fluorescenci je 10 ns (Lakowicz 1986).

Není-li elektron v orbitalu o vyšší energii párován s elektronem v orbitalu o nižší energii (tripletní stav), je při přechodu na nižší energetickou hladinu v souladu s Pauliho principem nucen změnit orientaci spinu. Takové přechody jsou v kvantové teorii zakázány spinovými výběrovými pravidly, docházet k nim může pouze v důsledku spin-spinových a spin-orbitálních interakcí. Tomu odpovídají delší doby života takového excitovaného stavu, řádově mikrosekundy až sekundy (Lakowicz 1986). V tomto případě hovoříme o fosforescenci.

Látky, které vykazují fluorescenci, se nazývají fluorofory. Fluorofory zpravidla obsahují delokalizované elektrony, přítomné v systému konjugovaných vazeb. Mezi přírodní fluorofory patří například některé aminokyseliny (tryptofan, tyrosin), chinin, rhodamin, fluorescein a další látky.

Stejně jako v případě absorpční spektroskopie můžeme přechody mezi energetickými hladinami zobrazit na Jablonského diagramu, viz Obrázek 4 – podle (Lakowicz 1986). Základní elektronová hladina je označena S_0 , singletní excitované hladiny jsou označeny S_1 a S_2 , tripletní excitovaná hladina je označena T_1 . Každá elektronová hladina je rozdělena na vibrační hladiny, vyznačené tenčími čarami.

Poměr R počtu molekul v excitovaném stavu ku počtu molekul v základním stavu je dán Boltzmannovým rozdělením

$$R = \exp\left(\frac{-\Delta E}{kT}\right), \quad (12)$$

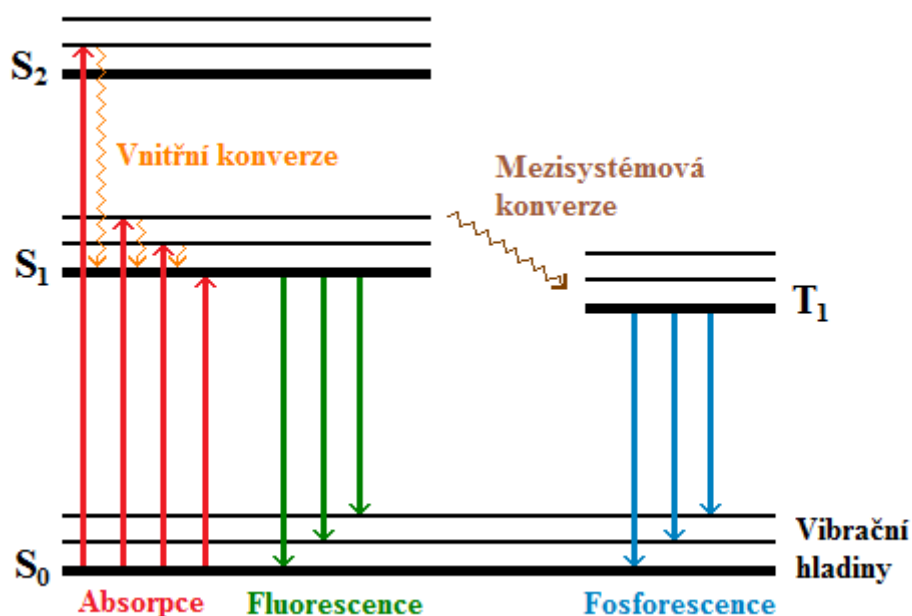
kde ΔE je energetický rozdíl mezi vyšší a základní energetickou hladinou, k je Boltzmannova konstanta a T je termodynamická teplota. Při pokojové teplotě jsou podle rovnice (12) skoro všechny molekuly v základním elektronovém stavu, neboť energetický rozdíl mezi základní a první excitovanou elektronovou hladinou je dosti velký. Většina molekul je též v základním vibračním stavu. Energetický přechod se tedy při absorpci děje nejvíce ze základní elektronové i vibrační hladiny.

Při absorpci fotonu (červené šipky) dojde k excitaci elektronu na některou z vyšších vibračních či elektronových hladin. Typická doba života na vibračních a elektronových hladinách vyšších než základní vibrační hladina první excitované elektronové hladiny je 10^{-12} s (Lakowicz 1986), poté systém vnitřní konverzí nezářivě relaxuje na první excitovanou hladinou (oranžové šipky). Z nejnižší excitované hladiny může systém dále relaxovat na nižší hladiny nezářivě, anebo emisí fotonu, fluorescencí (zelené šipky).

Další možností je tzv. mezisystémová konverze (hnědá šipka), kdy systém z prvního excitovaného singletního stavu S_1 přejde do tripletního stavu T_1 , odkud může dále

relaxovat buď nezářivě, nebo emisí fotonu, v tom případě se jedná o fosforescenci (modré šipky).

Obrázek 4: Jablonského diagram



2.2.2. Vlastnosti fluorescenčního spektra

Fluorescenční experimenty můžeme rozdělit na emisní a excitační. V případě emisního experimentu je vzorek excitován světlem o stálé vlnové délce λ_{ex} a měříme závislost intenzity světla emitovaného vzorkem na vlnové délce emitovaného světla. Při excitačním experimentu naopak měříme intenzitu emitovaného světla na stálé vlnové délce λ_{em} , ale vzorek excitujeme světlem o různých vlnových délkách, excitační spektrum je pak závislost intenzity světla emitovaného vzorkem na excitační vlnové délce.

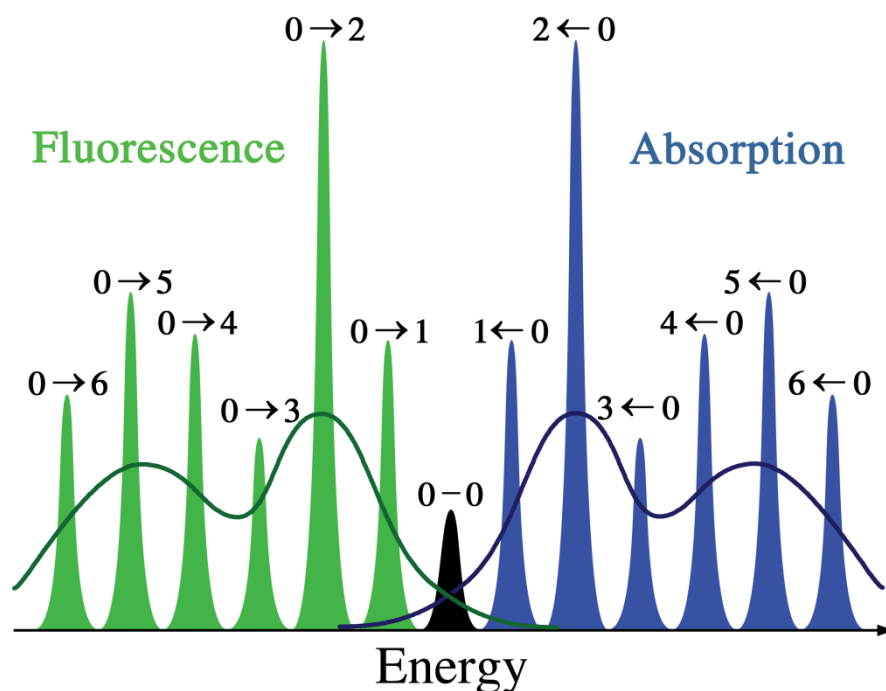
S výjimkou případu, kdy je vzorkem řídký plyn atomů, jsou fluorescenční spektra oproti absorpčním spektrům posunutá k nižším energiím, tedy k delším vlnovým délkám. Tento jev se nazývá Stokesův posuv a byl poprvé pozorován George G. Stokesem v roce 1852 (Lakowicz 1986). Stokesův posuv vzniká z několika příčin. Jednou z nich je rychlá nezářivá relaxace molekul na nejnižší vibrační stav první excitované hladiny S₁, a tedy ztráta energie. Tato relaxace je typicky o několik řádů rychlejší než fluorescence, fluorescenční přechody se tedy dějí z nejnižší vibrační hladiny S₁.

Dalším důvodem je, že se fluorescenční přechod děje nejen na základní vibrační hladinu základního elektronového stavu, ale i na vyšší vibrační hladiny základního stavu. Vliv na Stokesův posuv má i interakce mezi vzorkem a okolím.

Důsledkem rychlého nezářivého přechodu na hladinu S₁ je nezávislost emisního spektra na vlnové délce excitačního světla. Ať budeme vzorek excitovat jakýmkoliv světlem, dříve, než dojde k fluorescenci, přejde molekula do stavu S₁. Z tohoto důvodu se zpravidla excitační spektrum překrývá s absorpčním. Výjimky z tohoto pravidla existují, například azulen je schopen fluorescenčního přechodu i z hladiny S₂ (Lakowicz 1986).

Emisní spektra vykazují často zrcadlovou symetrii vůči absorpčním spektrům, viz Obrázek 5. Důvodem této symetrie je podobnost systému vibračních hladin jednotlivých elektronových hladin. Pravděpodobnost přechodu z počátečního vibronového stavu do koncového vibronového stavu je úměrná Franckovu – Condonovu faktoru (viz kapitola 2.1.3). Je-li tedy systém vibračních hladin počátečního elektronového stavu a koncového elektronového stavu podobný, jsou i vlnové funkce, které tyto stavy popisují, podobné a podobné jsou i Franckovy – Condonovy faktory přechodu tam a přechodu zpět.

Obrázek 5: Zrcadlová symetrie absorpčního a fluorescenčního spektra



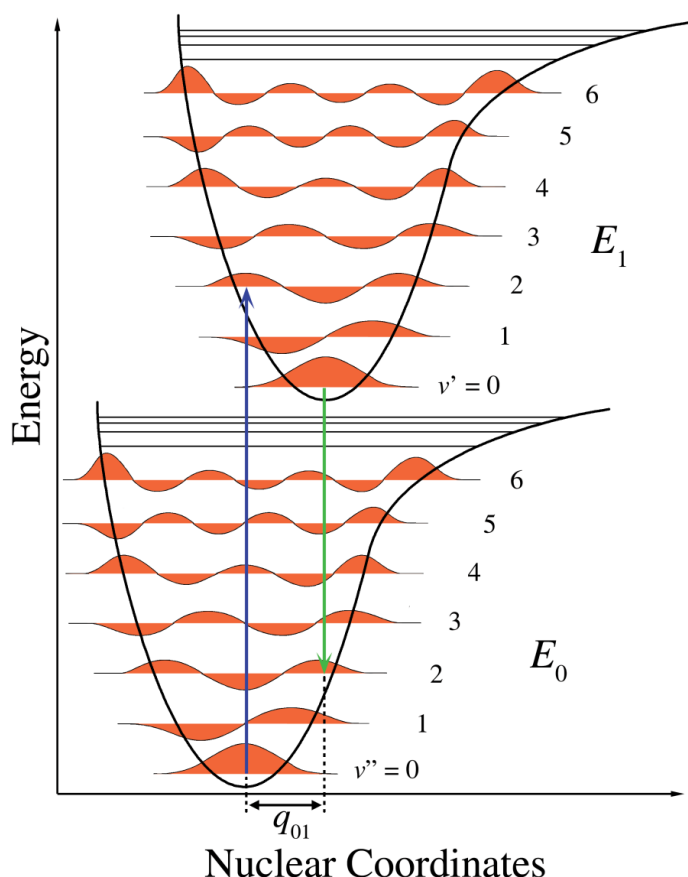
Zdroj obrázku:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/Vibration-fluor-abs.png>

Zrcadlová symetrie absorpčního a emisního spektra je znázorněna na Obrázku 5, absorpční spektrum je znázorněno modře, fluorescenční spektrum zeleně. Čísly jsou označeny vibrační hladiny, mezi nimiž dochází k přechodu. Fluorescenční spektrum je posunuto vzhledem k absorpčnímu k nižším energiím (Stokesův posuv). Na tomto obrázku se překrývá čára absorpčního a emisního spektra odpovídající přechodu mezi základními vibračními hladinami. Úzká čárová spektra pozorujeme pouze u velmi zředěných plynů, spektrum látky v roztoku má podobu pásů, ty jsou v Obrázku 5 znázorněny modrou resp. zelenou křivkou.

Franckův – Condonův princip říká, že pravděpodobnost přechodu je největší mezi stavy, jejichž překryv vibračních vlnových funkcí je maximální, viz vzorec (11) v kapitole 2.1.3. Schematicky je Franckův – Condonův znázorněn na Obrázku 6, elektronové energetické hladiny jsou označeny E_0 a E_1 , vibrační hladiny jsou označeny čísly a znázorněny průběhem vlnových funkcí. Přechod elektronu z nižší do vyšší energetické hladiny může zapříčinit změnu uspořádání molekuly, například změnu vzdálenosti jader, což je na obrázku znázorněno souřadnicí q_{01} . V obrázku je vyznačen přechod $0 \rightarrow 2$ a přechod $2 \rightarrow 0$, jejichž pravděpodobnosti jsou stejné.

Obrázek 6: Franckův – Condonův princip



Zdroj obrázku:

<http://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/1/17/Vibration-fluor-abs.png>

Ne vždy vykazuje absorpční a emisní spektrum zrcadlovou symetrii. Emisní spektrum často vykazuje méně členitou strukturu než absorpční, i když i opačné případy jsou známy (Lakowicz 1986).

2.2.3. Stanovení účinnosti přenosu energie

Obsahuje-li náš vzorek dvě různé složky, je možné, že jedna z těchto složek předává absorbovanou energii složce druhé. Absorbují-li tyto složky světlo o různých vlnových délkách, je možné porovnáním absorpčního a excitačního spektra vzorku zjistit účinnost přenosu energie mezi složkami vzorku.

Excitujeme-li vzorek světlem o vlnové délce λ_{ex1} , na níž absorbuje pouze složka 1 vzorku, a detekujeme-li světlo emitované vzorkem, které má vlnovou délku λ_{em2} odpovídající emisi složky 2 vzorku, nikoliv složky 1, pak je zřejmé, že ve vzorku došlo k přenosu energie ze složky 1 na složku 2.

Kvantitativně je možné účinnost přenosu energie získat porovnáním závislosti $1 - T$ – transmittance, tj. $1 - T$, na vlnové délce, se závislostí intenzity emitovaného světla na excitační vlnové délce. Veličina $1 - T$ odpovídá poměru intenzity absorbovaného světla ku intenzitě dopadajícího světla, nabývá hodnot od nuly do jedné. Naproti tomu excitační spektrum je měřeno v jednotkách počtu detekovaných fotonů za sekundu – counts per second, C. P. S., před porovnáváním je tedy třeba jedno ze spekter normovat, a to

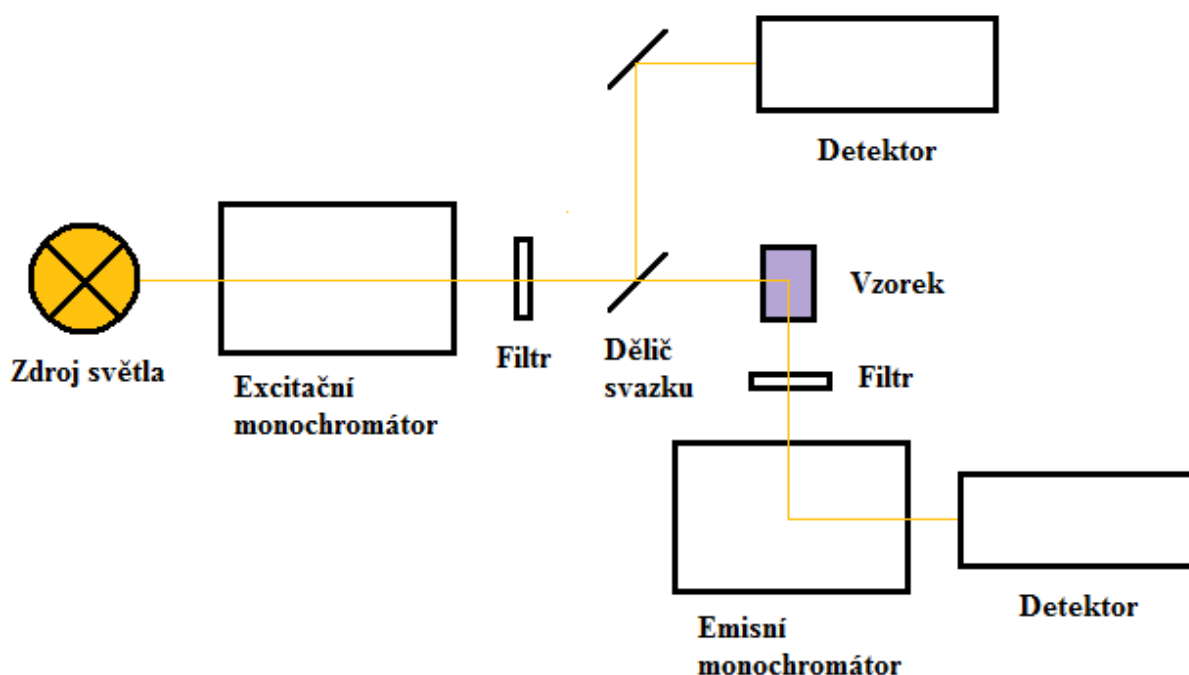
nejčastěji na absorpční pás přechodu z hladiny S_0 na hladinu S_1 předpokládaného akceptoru excitační energie, v našem případě složky 2 vzorku. Je tedy nutné proměřit obě spektra včetně tohoto pásu.

Excitujeme-li vzorek světlem o takových vlnových délkách, na kterých absorbuje pouze složka 1 a měříme-li excitační světlo na emisní vlnové délce, na které neemituje světlo složka 1, ale složka 2, pak bude výsledné excitační spektrum nulové v případě, že k přenosu energie od složky 1 ke složce 2 nedochází, a bude stejné jako normované absorpční $1 - T$ spektrum, pokud je účinnost přenosu energie 100%. Poměr výšky pásu složky 1 v excitačním spektru ku výšce pásu této složky v $1 - T$ spektru po normování dává účinnost přenosu energie od složky 1 ke složce 2 vzorku (Blankenship 2002).

2.2.4. Fluorescenční spektrometr

Schéma spektrofluorimetru je zobrazeno na Obrázku 7. Světlo se šíří ze zdroje, kterým bývá xenonová výbojka, do excitačního monochromátoru, který ze svazku vybírá vlnovou délku, jíž se vzorek excituje. Svazek je dále rozdělen děličem, část dopadá na vzorek, který je umístěn ve vzorkové komoře, část slouží jako reference a dopadá na detektor, kterým bývá fotodioda. Fotony emitované vzorkem dopadají přes emisní monochromátor na detektor. Před a za vzorkem mohou být umístěny optické filtry, které propouští pouze světlo určitých vlnových délek. Detekovaný signál z obou detektorů se zpracovává počítačově.

Obrázek 7: Schéma spektrofluorimetru



Na rozdíl od absorpčního spektrometru (kapitola 2.1.4) není možné provést korekci na neideální chování lampy, monochromátorů a detektoru použitím referenčního vzorku. Při korekci excitačního spektra je třeba korigovat zejména chování zdroje světla a excitačního monochromátoru (Lakowicz 2006), naopak detektor není třeba korigovat, neboť při měření detekujeme světlo o jediné vlnové délce. Ke korekci excitačního spektra lze použít látku,

jejíž emisní spektrum je nezávislé na excitační vlnové délce, jako čítač fotonů. Excitační spektrum takové látky je pak úměrné intenzitě zdroje světla na jednotlivých vlnových délkách. Nejpoužívanější takovou látkou je rhodamin B (Lakowicz 2006).

Chceme-li získat korigované emisní spektrum, je nutné stanovit odezvu emisního monochromátoru a detektoru na světlo o různých vlnových délkách. Korekci lze provést pomocí lampy, jejíž spektrum známe (Lakowicz 2006).

Fluorescenční spektra uvedená v této práci byla měřena na spektrofluorimetru FluoroMax-4. K měření byly použity fluorescenční kyvety z křemenného skla. K měření emisních spekter byly použity korekční soubory náležející ke spektrofluorimetru, excitační spektra byla měřena bez korekce, neboť korekční soubory v požadovaném intervalu vlnových délek nebyly k dispozici.

2.3. Chlorofyl

2.3.1. Fotosyntéza

Fotosyntéza, z řeckého *φῶτο* – světlo a *σύνθεσις* – skládání, je proces, jímž živé organismy získávají energii ze slunečního záření a přeměňují ji na energii chemickou, která pohání jejich životní funkce. Slunce je téměř výhradním zdrojem energie života na Zemi. Fotosyntetizující organismy dovedou tuto energii získávat a využívat přímo, ostatní (s výjimkou chemoautotrofů) pak využívají jako zdroj energie produkty jiných organismů.

Spektrum slunečního záření je zobrazeno na Obrázku 8, žlutou barvou je vyznačeno spektrum slunečního záření před vstupem do atmosféry, červenou barvou spektrum slunečního záření na zemském povrchu. Šedou křivkou je vyznačeno záření absolutně černého tělesa o teplotě 5250 °C. K fotosyntéze je využíváno viditelné světlo a blízké infračervené záření o vlnové délce do 1000 nm, světlo těchto vlnových délek tvoří 62% z celkového množství světla dopadajícího na zemský povrch (Blankenship 2002).

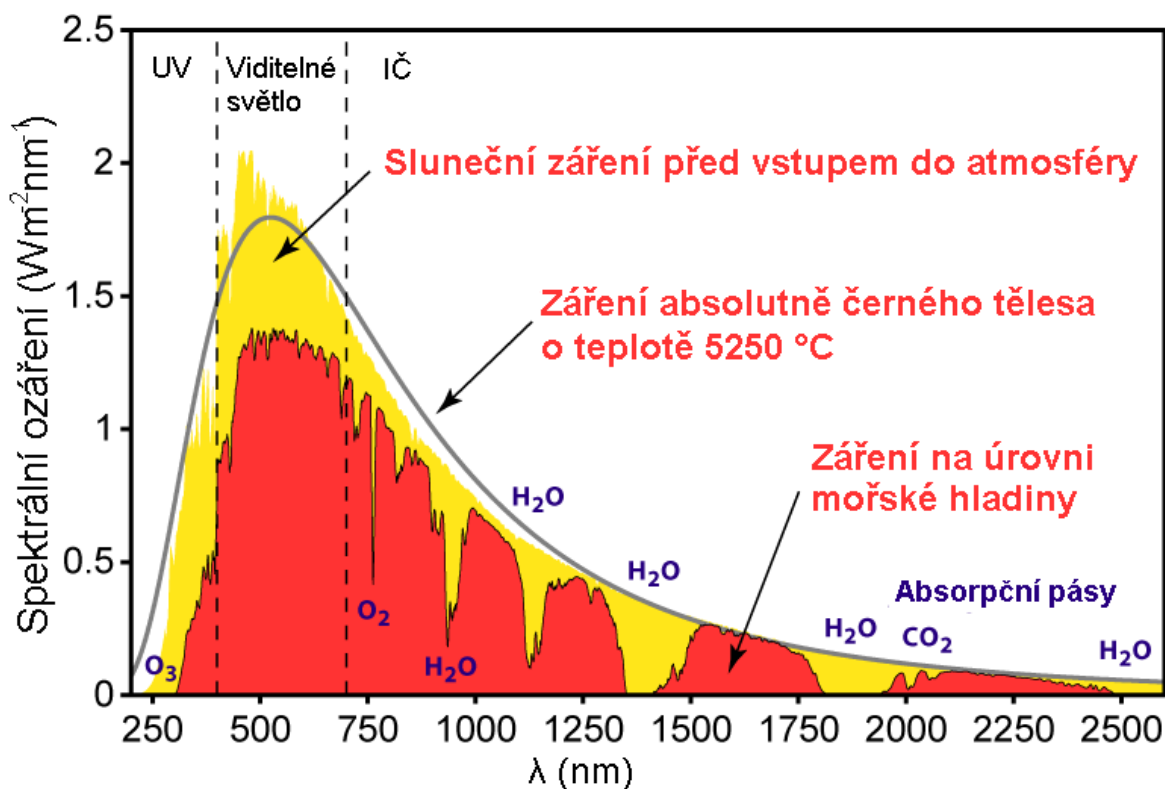
Organismy, které získávají sluneční energii fotosyntézou založenou na barvivech na bázi chlorofylu, se vyskytují ve dvou ze tří domén taxonomického systému, v doméně Bacteria a Eukarya. V doméně Archea se vyskytují fotosyntetické organismy, ale jejich fotosyntetický aparát je založen na rodopsinu, nikoliv na chlorofylu (Blankenship 2002).

Fotosyntetizující bakterie jsou součástí šesti kmenů, a to Firmicutes, Proteobacteria, Chlorobi (zelené sírné bakterie), Chloroflexi (zelené nesírné bakterie), Cyanobacteria (sinice) (Bryant a Frigaard 2006), posledním kmenem jsou Acidobacteria, fotosyntetizující příslušníci tohoto kmene byli objeveni teprve nedávno (Bryant 2007). V doméně Eukarya jsou fotosyntetizující organismy součástí říše rostlin (Blankenship 2002).

Fotosyntéza bakterií se odehrává v membránových útvarech vychlípených z buněčné stěny, fotosyntéza eukaryot se odehrává v tylakoidech – membránových útvarech nacházejících se ve specializovaných organelách zvaných chloroplasty. Chloroplasty se vyvinuly ze samostatných buněk, organely eukaryotních buněk se z nich staly v procesu endosymbiózy (Sagan 1967).

Proces fotosyntézy se dělí na světelnou a temnostní fázi. Při světelné fázi dochází k absorpci světla a přeměně světelné energie na chemickou, při temnostní fázi se tato energie spotřebovává na výrobu stabilních chemických produktů, využitelných v dalších buněčných procesech.

Obrázek 8: Spektrální ozáření slunečního světla



Zdroj obrázku:

http://physweb.bgu.ac.il/COURSES/Astronomy1/Graphics/solar_spectrum.png,

obrázek byl upraven.

Světelná fáze fotosyntézy se dále dělí na tři fáze. V první fázi je světlo absorbováno jedním z pigmentů fotosyntetické antény. Díky absorpci se pigment excituje a dojde k přeuspořádání náboje na pigmentu. Excitace se dále přenáší mezi pigmenty antény, dokud nedojde k přenosu excitace na reakční centrum. V další fázi dojde v reakčním centru k přeměně energie excitace na chemickou energii. Reakční centrum je složitý komplex proteinů a pigmentů a obsahuje i speciální dimer (dvojici) pigmentů, které slouží jako donor elektronu do elektronové kaskády.

Třetí fáze fotosyntézy probíhá buď cyklickým nebo necyklickým způsobem. V obou případech dojde k předávání elektronu mezi molekulami a energie při tom uvolněná slouží k vytvoření pH gradientu mezi prostory oddělenými membránou. Tento gradient se využívá jako pohon pro tvorbu ATP. Při necyklickém procesu se navíc redukuje NADP^+ na NADPH. Odpadním, avšak pro dnešní život zcela zásadním produktem necyklické formy fotosyntézy je kyslík.

Temnostní fáze fotosyntézy se již neodehrává v membránových útvech, ale ve stromatu chloroplastů, respektive v cytoplasmě prokaryotních organismů. V temnostní fázi jsou produkovány stabilní chemické sloučeniny, které slouží jako zdroj energie pro ostatní buněčné procesy.

2.3.2. Chlorofyly, bakteriochlorofyl *c*

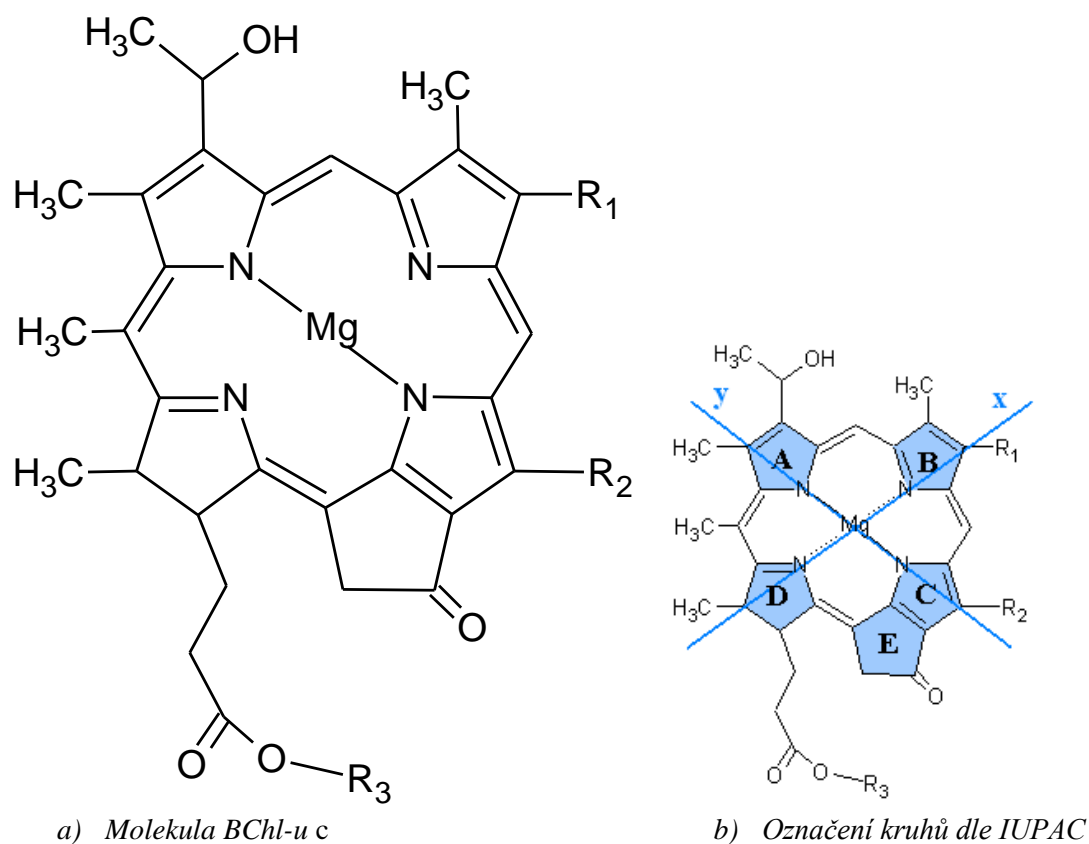
Molekula chlorofylu je planární molekula o straně délky přibližně 1 nm (Blankenship 2002), obsahující tetrapyrrolový kruh s atomem hořčíku uprostřed, což ji řadí mezi porfyriny. Existuje několik typů chlorofylů a bakteriochlorofylů, které se od sebe liší chemickými substituenty na porfyrinovém kruhu, základní struktura je však pro všechny typy chlorofylů a bakteriochlorofylů stejná. Molekula chlorofylu bez atomu hořčíku se nazývá feofytin.

V této práci jsem k měření používala bakteriochlorofyl *c* (dále BChl *c*). BChl *c* se vyskytuje v zelených sírných a nesírných bakteriích spolu s BChl-em *a* a dalšími fotosyntetickými pigmenty, zejména karotenoidy. Zajímavostí je, že zelené sírné a nesírné bakterie jsou poměrně vzdáleně příbuzné skupiny bakterií (Blankenship 2002).

Molekula BChl-u *c* je znázorněna na Obrázku 9. Jednotlivé pyrrolové kruhy jsou podle názvosloví IUPAC značeny písmeny A až D, viz Obrázek 9b, kruh označený písmenem E se nazývá isocyklický (Blankenship 2002). Přímka procházející dusíkovými atomy v kruzích A a C se označuje jako osa *y*, osa *x* je pak přímka spojující atomy dusíku v kruzích B a D. Porfyrinový kruh obsahuje systém konjugovaných vazeb, jejichž π elektrony jsou delokalizovány téměř přes celou molekulu chlorofylu (Blankenship 2002).

BChl *c* se vyskytuje jako směs příbuzných molekul. Substituentem označeným v Obrázku 9 jako R_1 může být etyl, propyl nebo butyl, substituentem R_2 metyl nebo etyl, substituent R_3 je stearyl, farnesyl nebo jiná nepolární sloučenina (Blankenship 2002).

Obrázek 9: Bakteriochlorofyl *c*

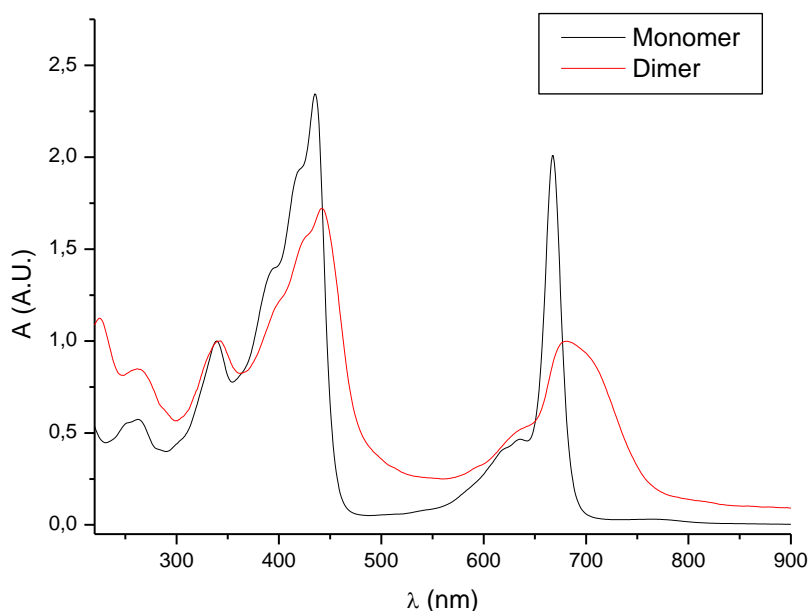


Absorpční spektrum BChl-*c* tvoří dva hlavní pásy, které oba odpovídají přechodům z orbitalu π do antivazebného orbitalu π^* . Absorpční pás v modré a blízké ultrafialové části spektra se nazývá Soretův pás podle švýcarského chemika Jacques-Louise Soreta, tento pás tvoří několik elektronových přechodů a k nim přidružených vibračních přechodů. Pás v červené oblasti spektra se nazývá Q_y , odpovídá přechodu, jehož přechodový moment má směr osy y . Na rozdíl od jiných chlorofylů není v absorpčním spektru BChl-*c* vidět pás Q_x , odpovídající přechodu s přechodovým momentem rovnoběžným s osou x . V zelené oblasti spektra BChl *c* neabsorbuje, což mu, jako i ostatním chlorofylům, dává zelenou barvu.

BChl *c* je rozpustný v nepolárních rozpouštědlech (dietyleter, etanol). Ve vodě tvoří BChl *c* dimery, jejichž absorpční spektrum se od spektra monomeru liší posunem pásu Q_y směrem do červené až infračervené oblasti, za tento posun je zodpovědná interakce mezi dvěma molekulami BChl-*c* dimeru (Alster a další 2008). Absorpční spektrum BChl-*c*, který jsem používala k měření, je znázorněno v Grafu 2, spektrum je normováno na pás u 340 nm.

Smíchá-li se před vstříknutím do vody BChl *c* s vhodnou nepolární látkou, tvoří BChl *c* agregáty, podobné těm, které se vyskytují v chlorosomech zelených fotosyntetických bakterií (viz dále). Pás Q_y agregátů se posouvá k delším vlnovým délkám, jako hranici pro odlišení dimerů a agregátů v této práci uvažují hodnotu 715 nm, což je největší vlnová délka, kterou může nabývat maximum pásu Q_y dimeru BChl-*c* ve vodě (Alster a další 2008). K agregaci BChl-*c* dochází například s karotenoidy (Klinger a další 2004) nebo s azulenem (Pospíšil 2008).

Graf 2: Absorpční spektrum BChl-*c* v etanolu (monomer) a ve vodě (dimer)



2.3.3. Světlosběrné antény, chlorosomy, agregáty

Největší množství fotosyntetických pigmentů se ve fotosyntetickém aparátu organismů nachází ve světlosběrných anténách. Absorbuje-li některá molekula pigmentu

světelnou energii, může ji za vhodných podmínek předat dalším pigmentům a absorbovaná energie pak putuje po světlosběrné anténě do reakčního centra, antény tedy oproti samotným pigmentům zvyšují efektivitu využití reakčního centra (Blankenship 2002). Pigmenty umístěné na anténě dále od reakčního centra často absorbují světlo o kratších vlnových délkách. Při přenosu excitace směrem do reakčního centra se část energie ztrácí ve formě tepla, díky těmto ztrátám je však přenos excitační energie nasměrován k reakčnímu centru a nikoliv opačným, případně náhodným směrem (Blankenship 2002).

Ve většině typů světlosběrných antén jsou pigmenty vázány na proteinovou strukturu, výjimku tvoří světlosběrné antény zelených bakterií zvané chlorosomy, v nichž má rozhodující úlohu pro strukturu antény vazba mezi jednotlivými molekulami pigmentu (Blankenship 2002). Chlorosomy obsahují BChl *c*, *d* nebo *e* (většinou pouze jeden z uvedených typů), BChl *a*, karotenoidy a další pigmenty. Chlorosomy jsou největší dosud známé anténové struktury, obsahují desítky i stovky tisíc molekul BChl a umožňují tak fotosyntetický život i v podmínkách o nízké intenzitě dopadajícího světla (Frigaard a Bryant 2006).

BChl *c*, *d* a *e* tvoří spolu s vhodnou nepolární látkou ve vodném prostředí *in vitro* agregáty podobné těm v chlorosomech, což dává naději na využití těchto agregátů v procesu umělé fotosyntézy, tedy získávání elektrické energie ze světla. BChl-y *c*, *d* a *e* jsou schopny tvořit agregáty díky své vhodné chemické struktuře. Na rozdíl od ostatních typů chlorofylů mají na kruhu A navázán substituent obsahující hydroxylovou skupinu a naopak postrádají karboxylovou skupinu na kruhu E (viz Obrázek 9). Hydroxylová skupina umožňuje vazbu na hořčíkový atom druhé molekuly BChl, tyto dvě molekuly pak tvoří dimer. Agregáty jsou tvořeny mnoha dimery BChl-u (Frigaard a Bryant 2006). Díky absenci karboxylové skupiny mohou molekuly BChl-u v agregátu tvořit vodíkové můstky mezi hydroxylovou skupinou na kruhu A jedné molekuly a ketokyslíkem na kruhu E druhé molekuly (Blankenship 2002). Struktura agregátů není dosud zcela známa, navrženy byly tzv. rod model (Nozawa a další 1994), v němž dimery BChl-u tvoří pruty, lamelární model (Pšenčík a další 2004), v němž dimery BChl-u tvoří vrstvy a válcový model, v němž agregáty tvoří mnohovrstevnaté cylindrické struktury (Ganapathy a další 2009).

2.4. Derivát indiga

Indigo je látka modré barvy, již od starověku využívaná k barvení textilií, a to nejprve v Indii, odkud se jeho používání rozšířilo i do dalších částí světa. Samotný název indiga je odvozen od řeckého slova *ινδικόν*, indický. Molekula indiga je znázorněna na Obrázku 10.

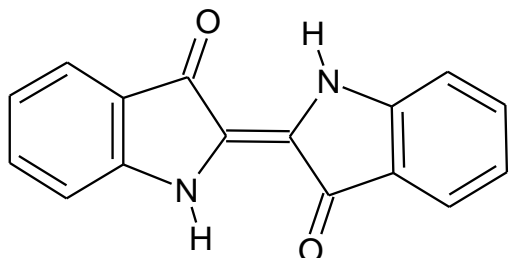
Použitým pigmentem byl derivát indiga, 5,5'-di-tert-butylindigo (dále L.-indigo), jehož struktura je znázorněna na Obrázku 11 a prostorové uspořádání je znázorněno na Obrázku 12. L.-indigo syntetizoval prof. Dr. H. Langhals z Ludwig-Maximilians-Universität München, syntéza je popsána v (Langhals 2007).

L.-indigo není rozpustné ve vodě – absorpční spektrum nasyceného roztoku L.-indiga ve vodě bylo proměřeno po jednom dni od přípravy, viz Graf 3, z grafu je patrné, že absorpční spektrum až na výjimky nepřekročilo hranici absorbance 0,0025 A. U., kterou v této práci uvažují jako chybu měření.

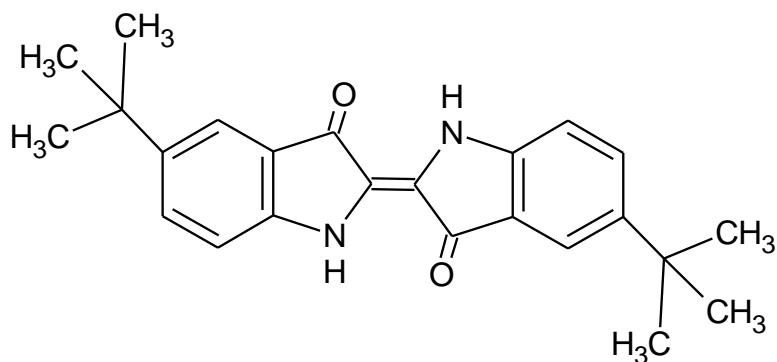
L.-indigo je rozpustné v etanolu. Absorpční spektra L.-indiga rozpuštěného v etanolu a malého množství L.-indiga rozpuštěného v etanolu, které bylo vstříknuto do pufru (Tris-HCl o koncentraci 50 mmol·l⁻¹, pH = 8) jsou znázorněna v Grafu 4.

Z grafu je patrné, že L.-indigo absorbuje světlo zejména v ultrafialové oblasti a v oblasti okolo 600 nm, tedy v oblastech, kde BChl *c* absorbuje málo. V případě, že by L.-indigo předávalo energii absorbovaného světla BChl-u *c* v agregátech, zvýšila by se účinnost, s jakou agregáty získávají energii ze světla.

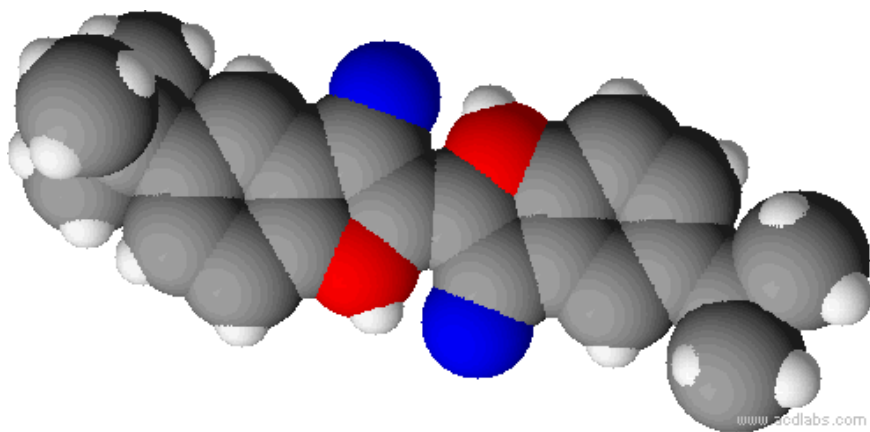
Obrázek 10: Indigo



Obrázek 11: L.-indigo

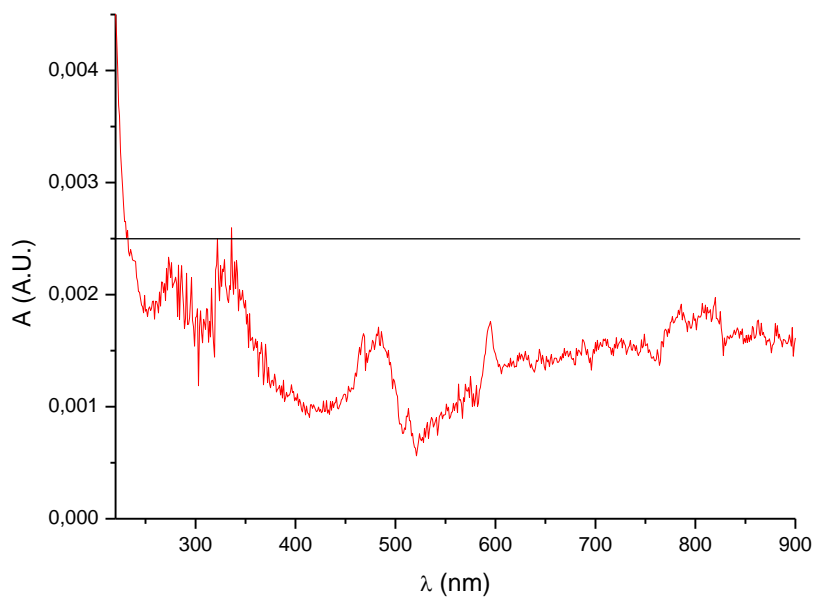


Obrázek 12: L.-indigo

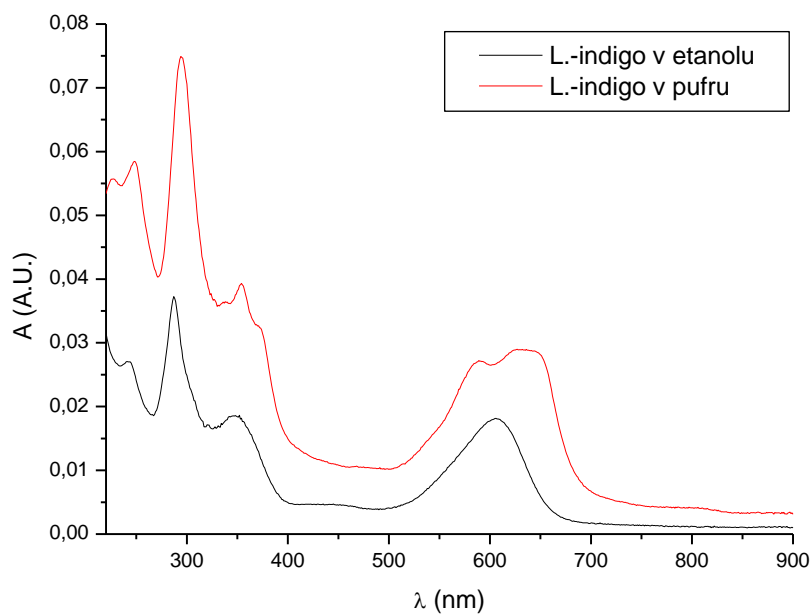


Obrázek byl vytvořen v programu ChemSketch

Graf 3: Absorpční spektrum L.-indiga ve vodě



Graf 4: Absorpční spektrum L.-indiga v etanolu a malého množství roztoku L.-indiga v etanolu, vstříknutého do pufru (označeno L.-indigo v pufru)



3. Výsledky měření

3.1. Molární extinkční koeficient L.-indiga

Ke stanovení koncentrace roztoku L.-indiga v etanolu z naměřeného absorpčního spektra je třeba znát molární extinkční koeficient L.-indiga v etanolu, jak plyne z Lambertova – Beerova zákona (7).

Molární extinkční koeficient indiga rozpuštěného v dimethylformamidu (DMF) pro vlnovou délku $\lambda = 610$ nm je podle (O'Connor a další 1997) $15\,900\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, podle (Royo a další 2005) $16\,230\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, podle (de Melo a další) $22\,140\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$. Molární extinkční koeficient L.-indiga rozpuštěného v etanolu se však od těchto hodnot může lišit nejen díky rozdílům v chemické struktuře L.-indiga a indiga (viz Obrázek 10 a Obrázek 11), ale také použitím odlišného rozpouštědla. Proto bylo před přípravou vzorků pro studium agregace BChl a L.-indiga nutné určit molární extinkční koeficient L.-indiga v etanolu.

Bylo rozpuštěno $(0,9 \pm 0,1)$ mg L.-indiga v $(50,0 \pm 0,5)$ ml etanolu. Molární koncentrace c L.-indiga v etanolu je dána vztahem

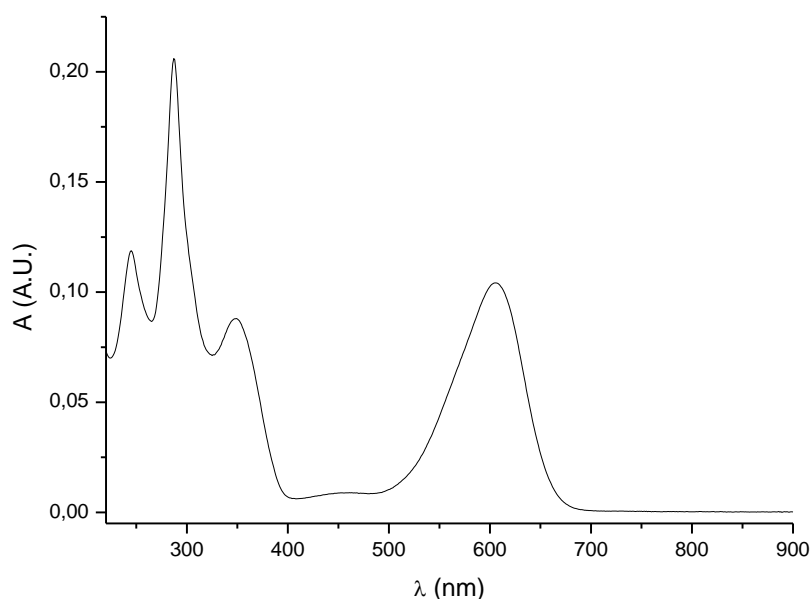
$$c = \frac{n}{V} = \frac{m}{MV}, \quad (13)$$

kde n je látkové množství rozpuštěného L.-indiga, V objem etanolu, m hmotnost rozpuštěného L.-indiga a M jeho molární hmotnost, $M = 374\text{ g}\cdot\text{mol}^{-1}$. Podle (13) je tedy molární koncentrace L.-indiga v etanolu $c = (48,1 \pm 5,4)\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$, chyba byla určena přenesením chyb určení hmotnosti a objemu.

Absorpční spektrum L.-indiga bylo proměřeno v kyvetě o tloušťce $l = 1$ mm po jednom dni od přípravy, před měřením byl doplněn odpařený etanol. Referencí byla kyveta s etanolem. Absorpční spektrum je znázorněno v Grafu 5.

Maximum pásu okolo 600 nm je na vlnové délce $\lambda_{max} = 605$ nm, maximální absorbance $A_{max} = (0,1042 \pm 0,0025)$ A. U., podle (7) je tedy molární extinkční koeficient L.-indiga $\varepsilon_i = (21\,700 \pm 2\,500)\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, chyba je určena přenesením chyby koncentrace L.-indiga a chyby absorbance. Naměřená hodnota molárního extinkčního koeficientu L.-indiga se tedy s hodnotou molárního extinkčního koeficientu indiga v DMF uvedenou v (O'Connor a další 1997) a (Royo a další 2005) neshoduje ani v rámci chyby, s hodnotou uvedenou v (de Melo a další 2004) se v rámci chyby shoduje.

Graf 5: K určení molárního extinkčního koeficientu L.-indiga v etanolu



3.2. Studium agregace BChl-u *c* s L.-indigem

3.2.1. Určení koncentrace zásobních roztoků BChl-u *c* a L.-indiga

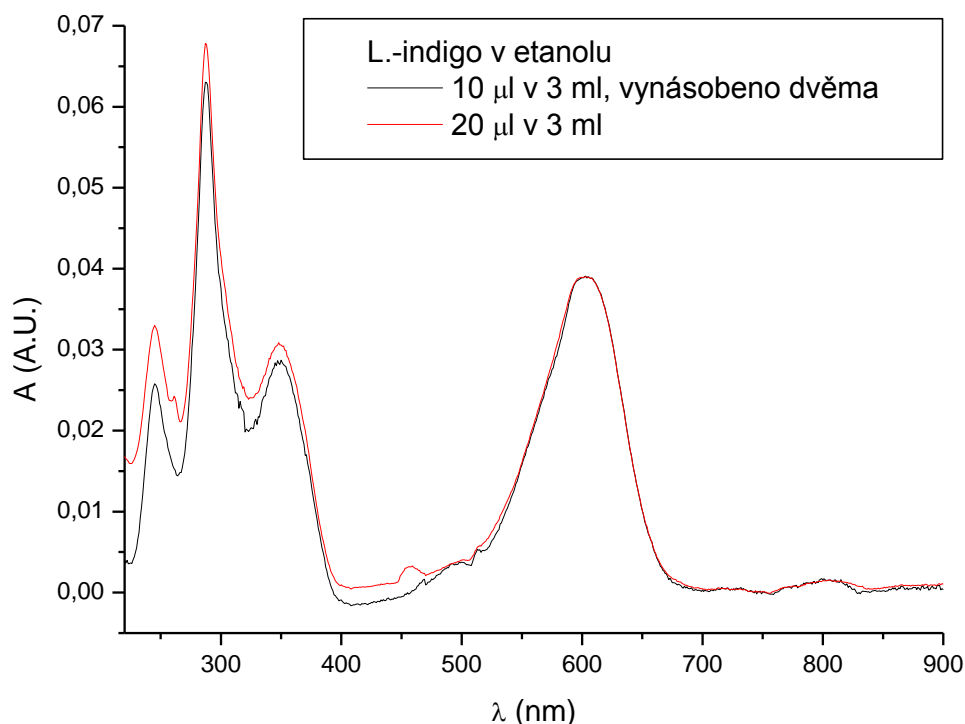
Před přípravou vzorků BChl-u *c* a L.-indiga ke studiu vzniku agregátů bylo třeba nejprve připravit zásobní roztoky obou látek o známé koncentraci.

Byl připraven nasycený roztok L.-indiga v etanolu, k určení koncentrace pomocí absorpčního měření byl však tento roztok příliš opticky hustý, proto bylo 10 μl nasyceného roztoku L.-indiga smícháno s 3 ml etanolu a bylo změřeno absorpční spektrum. Pro kontrolu bylo smícháno 20 μl nasyceného roztoku L.-indiga s 3 ml etanolu a opět bylo změřeno absorpční spektrum. Jako reference byl v obou případech použit etanol. Absorpční spektra jsou znázorněna v Grafu 6, spektrum o nižší koncentraci bylo vynásobeno dvěma.

V oblasti pásu u 605 nm odpovídá absorpční spektrum 10 μl nasyceného roztoku L.-indiga v 3 ml etanolu po vynásobení dvěma absorpčnímu spektru L.-indiga v etanolu o přibližně dvojnásobné koncentraci, jak je parné z Grafu 6, což je v souladu s očekáváním (viz vzorec (7)). Rozdíly ve spektrech u nižších vlnových délek mohou být způsobeny použitím fluorescenční kyvety v jednom z měření.

Absorbance 20 μl nasyceného roztoku L.-indiga v 3 ml etanolu na vlnové délce $\lambda = 605 \text{ nm}$ je rovna $(0,0389 \pm 0,0025) \text{ A.U.}$, k měření byla použita kyveta délky $l = 1 \text{ cm}$. Podle (7) je tedy koncentrace c_i nasyceného roztoku L.-indiga v etanolu rovna $(0,27 \pm 0,04) \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, v chybě je uvažována chyba určení molárního extinkčního koeficientu L.-indiga a chyba určení absorbance.

Graf 6: K určení koncentrace zásobního roztoku L.-indiga

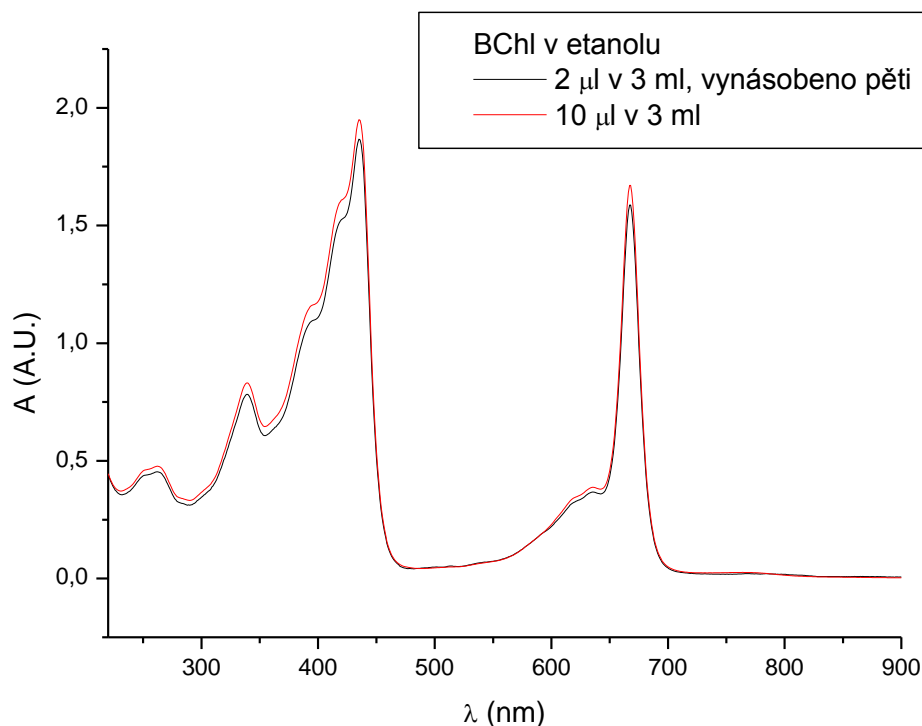


Stejným způsobem byla stanovena koncentrace BChl-u *c* v zásobním roztoku. BChl *c* byl rozpuštěn v etanolu, 10 μl z tohoto zásobního roztoku bylo smícháno s 3 ml etanolu a bylo proměřeno absorpční spektrum. Pro kontrolu byly smíchány 2 μl zásobního roztoku BChl-u *c* s 3 ml etanolu a opět bylo proměřeno absorpční spektrum. Referencí byla v obou případech kyveta s etanolem. Absorpční spektra jsou znázorněna v Grafu 7, spektrum méně koncentrovaného vzorku bylo vynásobeno pětkrát. Absorbance méně koncentrovaného vzorku vůči koncentrovanějšímu je o něco nižší, než by odpovídalo očekávání, to však může být způsobeno chybou určení objemu rozpuštěného vzorku.

Molární extinkční koeficient ϵ_b maxima pásu Q_y BChl-u *c* v metanolu je $69\,700\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Namsaraev 2009), v acetonu $75\,400\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Klinger a další 2004), v dietyléteru $73\,000\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$ (Umetsu a další 1999). Molární extinkční koeficient BChl-u *c* v etanolu pro vlnovou délku $\lambda = 667\text{ nm}$, na níž má maximum pás Q_y , jsem uvažovala jako průměr těchto tří hodnot, tedy $(72\,700 \pm 1300)\text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, chyba je směrodatná odchylka aritmetického průměru.

Byla použita kyveta o tloušťce $l = 1\text{ cm}$. K určení koncentrace bylo použito spektrum koncentrovanějšího vzorku, neboť je zatíženo menší relativní chybou v určení objemu vzorku. Absorbance pro vlnovou délku $\lambda = 667\text{ nm}$ je $(1,67 \pm 0,09)\text{ A. U.}$, chybu jsem volila jako rozdíl absorbance koncentrovanějšího vzorku a absorbance méně koncentrovaného vzorku po vynásobení pěti. Koncentrace zásobního roztoku je tedy podle (7) $c_b = (6,9 \pm 0,2)\text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, v chybě je uvažena chyba určení absorbance a molárního extinkčního koeficientu BChl-u *c*.

Graf 7: K určení koncentrace zásobního roztoku BChl-u c



Ze zásobních roztoků L.-indiga v etanolu a BChl-u c v etanolu bylo připraveno pět různých vzorků, lišících se objemem zásobního roztoku L.-indiga, a tedy i poměrem koncentrací obou látek. Objem zásobního roztoku BChl-u c a L.-indiga a přibližný poměr koncentrací obou látek ve vzorcích je zaznamenán v Tabulce 1.

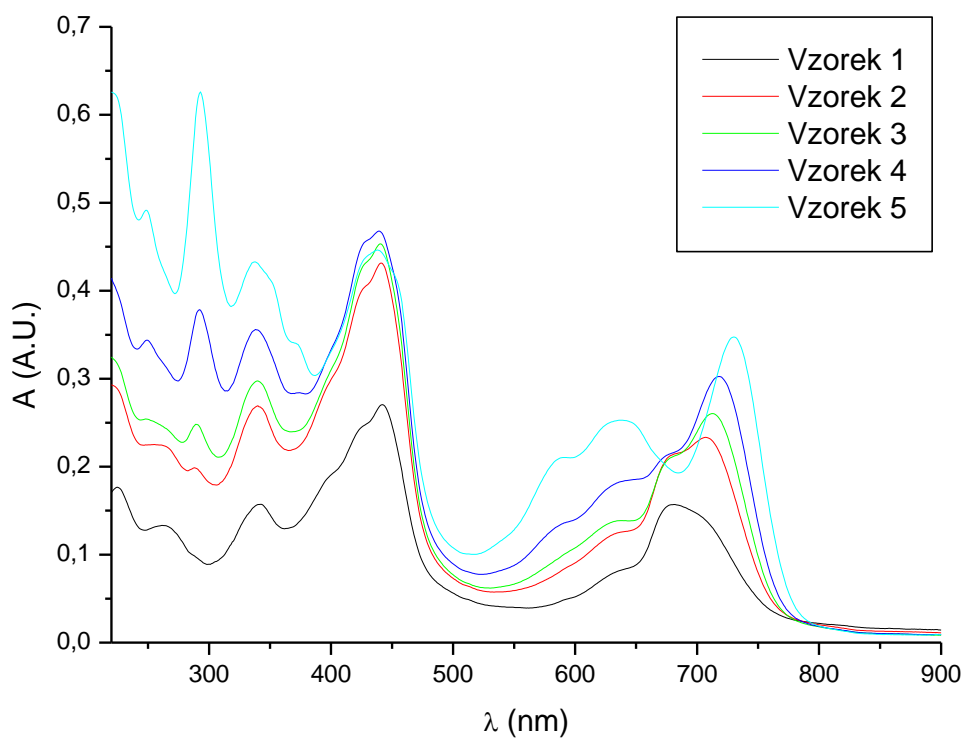
Tabulka 1: Objem roztoku BChl-u c a L.-indiga a poměr jejich koncentrací

Vzorek	BChl c	L.-indigo	$c_b:c_i$
1	5 μl	0 μl	1:0
2	5 μl	25 μl	1:0,20
3	5 μl	50 μl	1:0,39
4	5 μl	100 μl	1:0,78
5	5 μl	200 μl	1:1,57

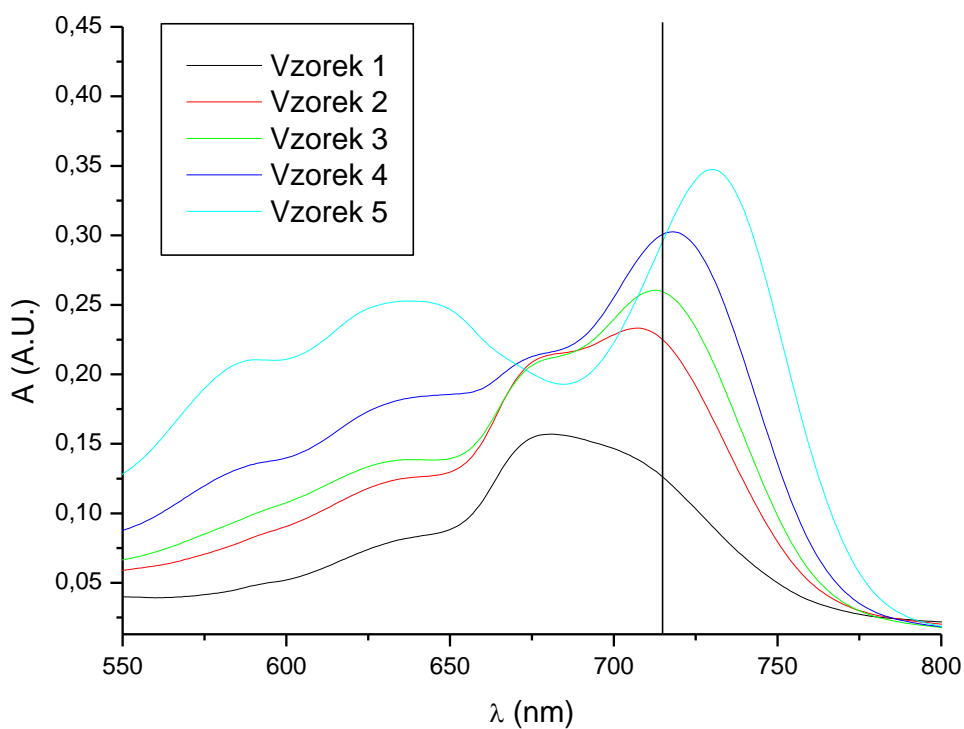
3.2.2. Agregace BChl-u c s L.-indigem

Vzorky, jejichž příprava byla popsána v kapitole 3.2.1, byly za současného míchání vstříknuty do 3 ml pufru (Tris-HCl o koncentraci $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, pH = 8). Ihned po přípravě byla proměřena jejich absorpční spektra, jako reference byla pro všechna měření použita kyveta s pufrům. Absorpční spektra vzorků jsou znázorněna v Grafu 8. Absorpční spektra v oblasti 550 až 800 nm jsou znázorněna v Grafu 9, v tomto grafu je vyznačena vlnová délka $\lambda = 715 \text{ nm}$, která je v této práci uvažována jako hranice agregace.

Graf 8: Absorpční spektrum vzorků, ihned po přípravě



Graf 9: Absorpční spektrum vzorků, ihned po přípravě, výřez



Z grafů je patrné, že maximum pásu Q_y se s rostoucí koncentrací L.-indiga ve vzorcích (viz Tabulku 1 na straně 26) posouvá k delším vlnovým délkám, maxima tohoto pásu pro jednotlivé vzorky jsou uvedena v Tabulce 2 na straně 30, kde λ_{Q_y} je vlnová délka maxima pásu Q_y a A_{Q_y} je absorbance na vlnové délce λ_{Q_y} . Ve spektrech také v souladu s očekáváním narůstá s rostoucí koncentrací L.-indiga intenzita pásů okolo 636 nm a v blízké UV oblasti, které odpovídají absorpčnímu spektru L.-indiga v pufru (viz Graf 4 na straně 22).

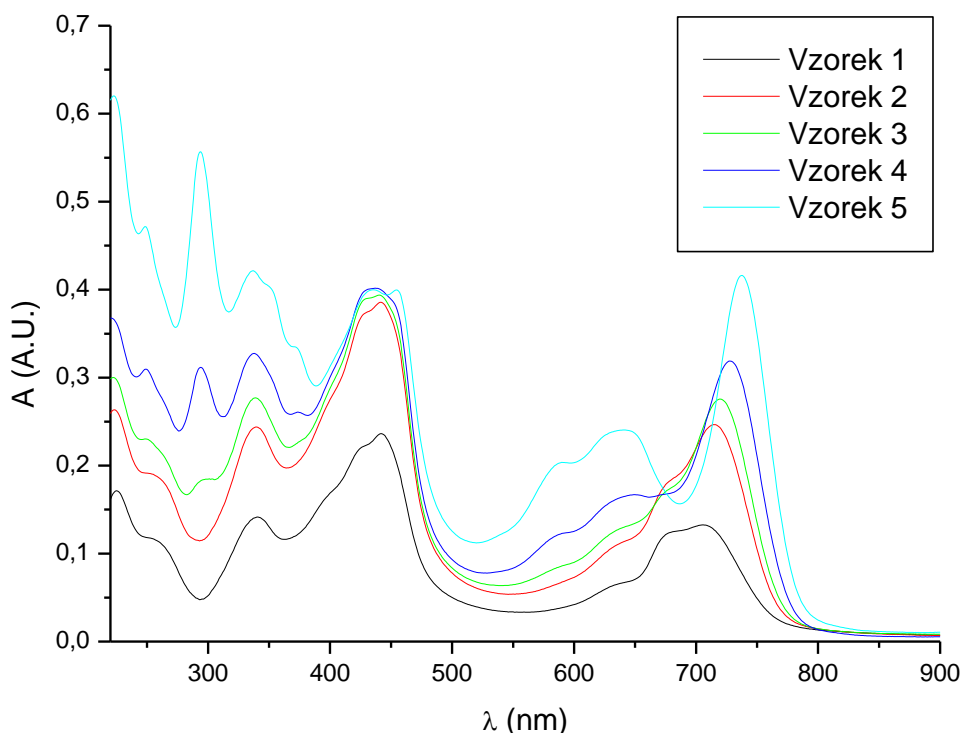
Po měření byly vzorky ponechány v temném prostředí a při pokojové teplotě. Absorpční spektra vzorků byla znovu proměřena po dvou dnech od přípravy, viz Graf 10. Absorpční spektrum pro vlnové délky 550 nm až 800 nm je zobrazeno v Grafu 11.

Maxima pásu Q_y všech vzorků se posunula směrem k delším vlnovým délkám oproti měření hned po přípravě vzorků, jsou uvedena v Tabulce 2 na straně 30. Také maximální absorbance tohoto pásu se zvýšila ve všech vzorcích s výjimkou vzorku 1.

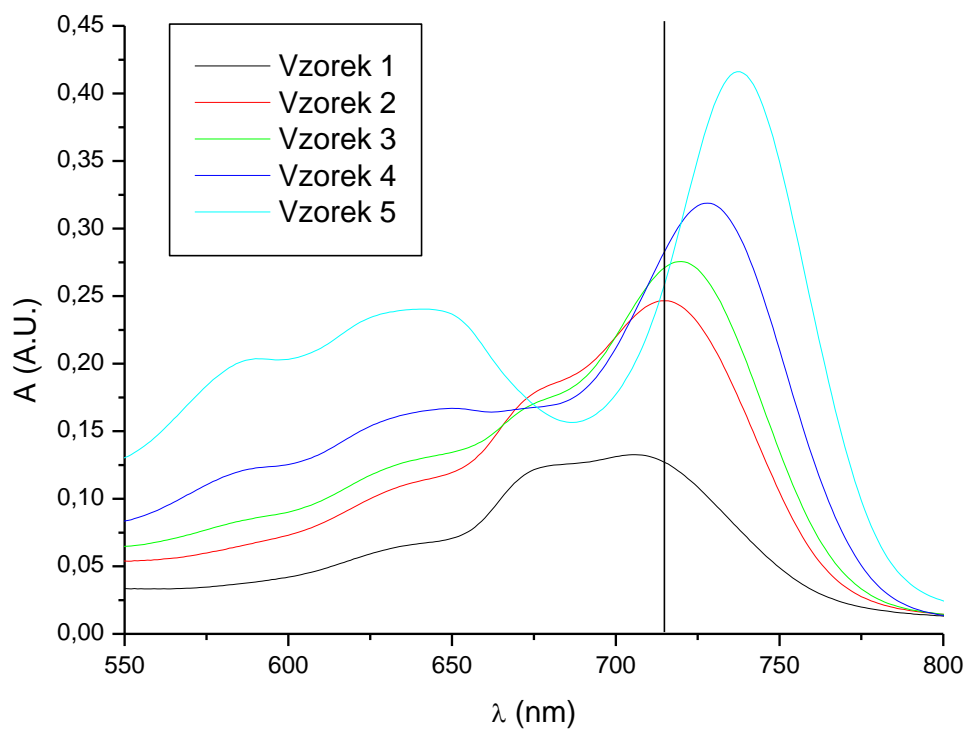
Vzorky byly uskladněny v temném prostředí za pokojové teploty po dobu dalších 19 dní a po této době, tj. po třech týdnech od přípravy, byla znovu změřena absorpční spektra, která jsou zobrazena v Grafu 12, oblast 550 nm až 800 nm je zobrazena v Grafu 13. Pás Q_y se opět posunul do červena a všechny vzorky s výjimkou prvního již mají maximum tohoto pásu za hranicí 715 nm, viz Tabulku 2. Absorbance maxima pásu Q_y se u všech vzorků snížila.

Posun pásu Q_y vzorku 1, který neobsahuje L.-indigo, je již zcela nepatrný (1 nm), vlnová délka $\lambda_{Q_y} = 707$ nm.

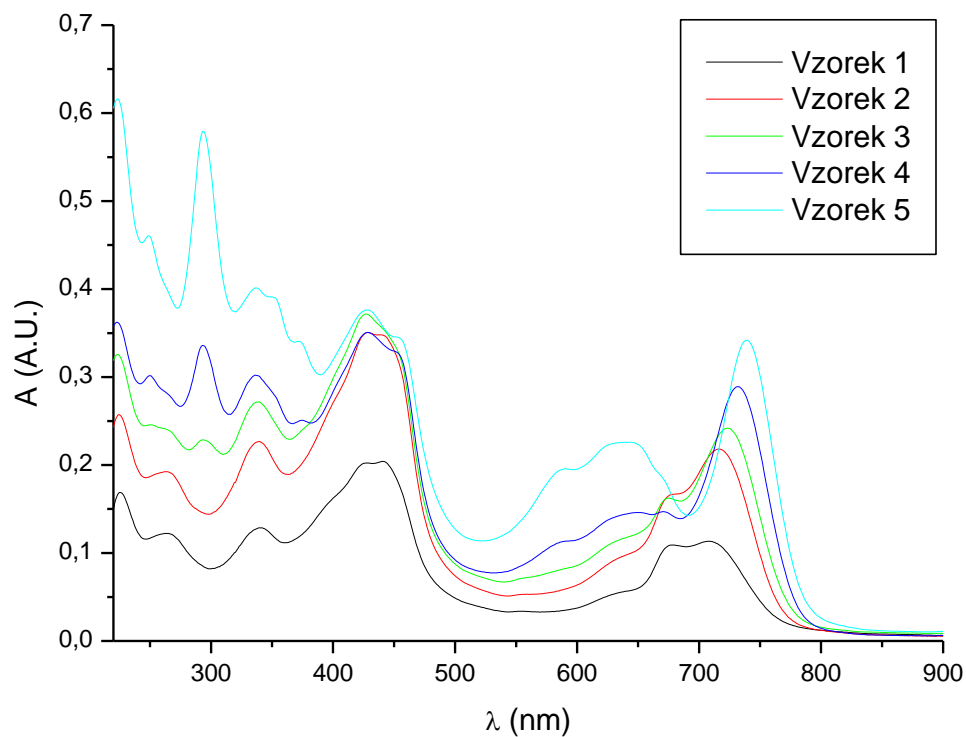
Graf 10: Absorpční spektrum vzorků, po dvou dnech od přípravy



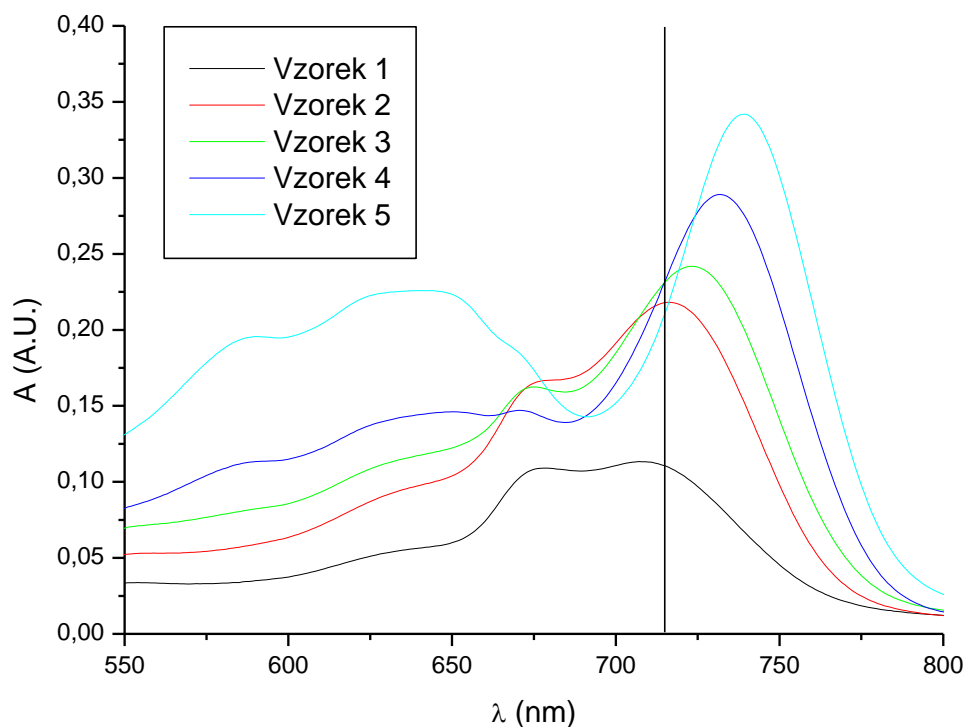
Graf 11: Absorpční spektrum vzorků, po dvou dnech od přípravy, výřez



Graf 12: Absorpční spektrum vzorků, po třech týdnech od přípravy



Graf 13: Absorpční spektrum vzorků, tři týdny od přípravy, výřez

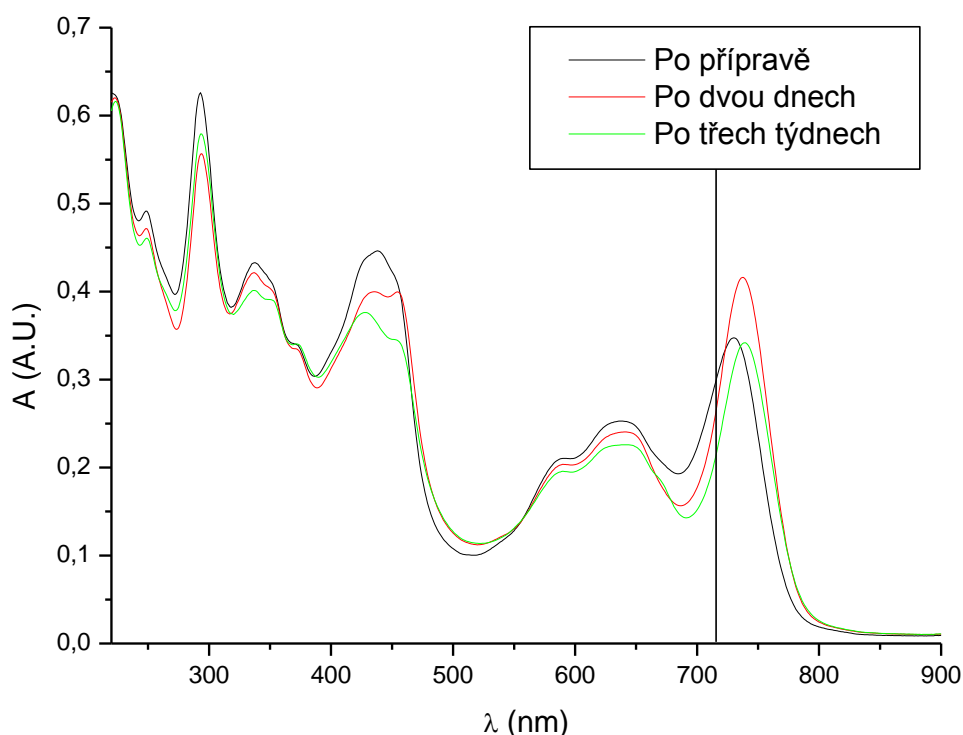


Tabulka 2: Maxima pásu Q_y pro jednotlivé vzorky

Vzorek	$c_b:c_i$	Ihned po přípravě		Po dvou dnech		Po třech týdnech	
		λ_{Q_y} (nm)	A_{Q_y} (A.U.)	λ_{Q_y} (nm)	A_{Q_y} (A.U.)	λ_{Q_y} (nm)	A_{Q_y} (A.U.)
1	1:0	681	0,15700	706	0,13263	707	0,11336
2	1:0,20	707	0,23327	715	0,24653	716	0,21811
3	1:0,39	713	0,26042	720	0,27563	723	0,24185
4	1:0,78	718	0,30258	728	0,31882	732	0,28908
5	1:1,57	730	0,34743	738	0,41607	739	0,34188

Absorpční spektra vzorku 5 ihned po přípravě, po dvou dnech od přípravy a po třech týdnech od přípravy jsou znázorněna v Grafu 14, v grafu je vyznačena vlnová délka 715 nm. Ve spektrech dochází k mírnému poklesu absorpčních pásů L.-indiga, pokles pásu u 630 nm je částečně způsoben posunem pásu Q_y BChl-u c do červena.

Graf 14: Absorpční spektrum vzorku 5 po přípravě, po dvou dnech od přípravy a po třech týdnech od přípravy



3.3. Stárnutí vzorku L.-indiga v pufru

Byl připraven roztok L.-indiga v etanolu, 30 μl tohoto roztoku bylo vstříknuto do 3 ml pufru a bylo proměřeno absorpční spektrum tohoto vzorku. Poté byl vzorek ponechán v temnu o pokojové teplotě a po 24 dnech od přípravy bylo znovu proměřeno absorpční spektrum. Referencí byla v obou případech kyveta s pufrem. Obě spektra jsou zobrazena v Grafu 15.

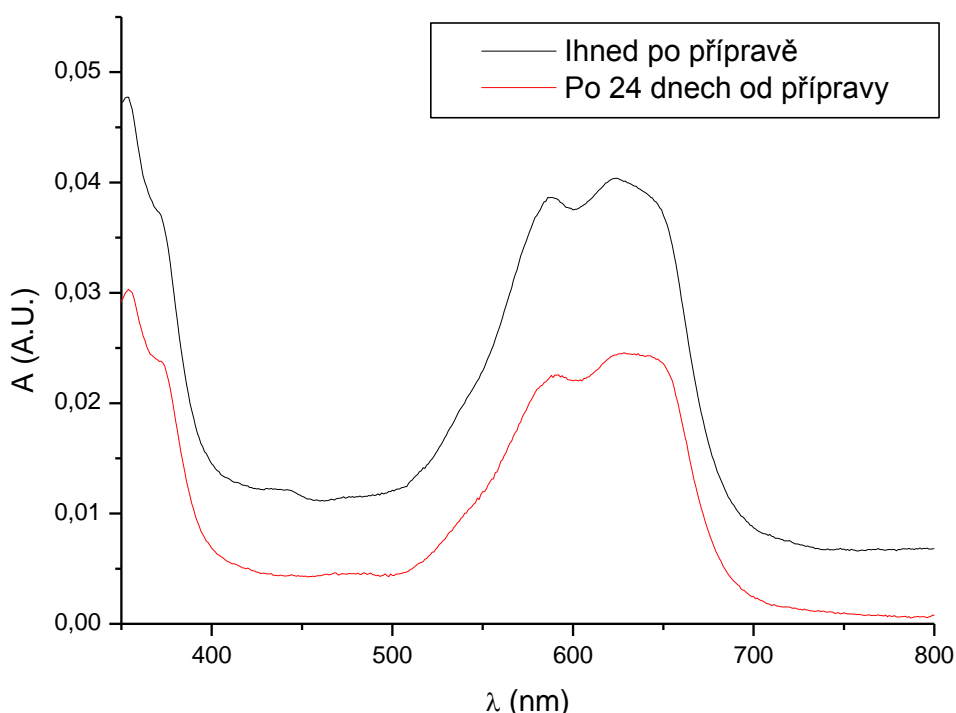
Koncentrace tohoto vzorku v etanolu je podle Lambertova – Beerova zákona (7) přibližně $0,2 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, ke stanovení koncentrace byla použita hodnota absorbance vzorku v pufru ihned po přípravě na vlnové délce 605 nm, $A = 0,0378 \text{ A. U.}$, a extinkčního koeficientu L.-indiga v etanolu, $\varepsilon_i = 21\,700 \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$, který byl určen v kapitole 3.1.

Maxima pásu okolo 600 nm se posunula v průběhu stárnutí o 4 nm k červenému konci spektra, z 588 nm na 592 nm a z 624 nm na 628 nm. Hodnoty absorbance na těchto vlnových délkách vzorku ihned po přípravě a po 24 dnech od přípravy jsou zaznamenány v Tabulce 3. V tabulce jsou dále uvedeny hodnoty absorbance na vlnové délce 605 nm.

Byl připraven nasycený roztok L.-indiga v etanolu, 200 μl tohoto roztoku bylo vstříknuto do 3 ml pufru a bylo změřeno absorpční spektrum tohoto vzorku. Poté byl vzorek ponechán v temnu o pokojové teplotě, po čtyřech dnech a po šesti dnech po přípravě bylo znovu proměřeno absorpční spektrum. Referencí absorpčních měření byla kyveta s pufrem. Všechna spektra jsou zobrazena v Grafu 16.

Absorbance L.-indiga se v průběhu stárnutí výrazně snížila. Maxima pásu okolo 600 nm jsou ve spektru vzorku ihned po přípravě na vlnových délkách 591 nm a 631 nm, v později měřených spektrech se již na vlnové délce 591 nm výraznější absorpční maximum nevyskytuje a celkové maximum pásu se posunulo na vlnovou délku 651 nm. Hodnoty absorbance na vlnových délkách 591 nm, 631 nm a 651 nm a na vlnové délce 605 nm vzorku ihned po přípravě, po čtyřech dnech od přípravy a po šesti dnech od přípravy jsou zaznamenány v Tabulce 4.

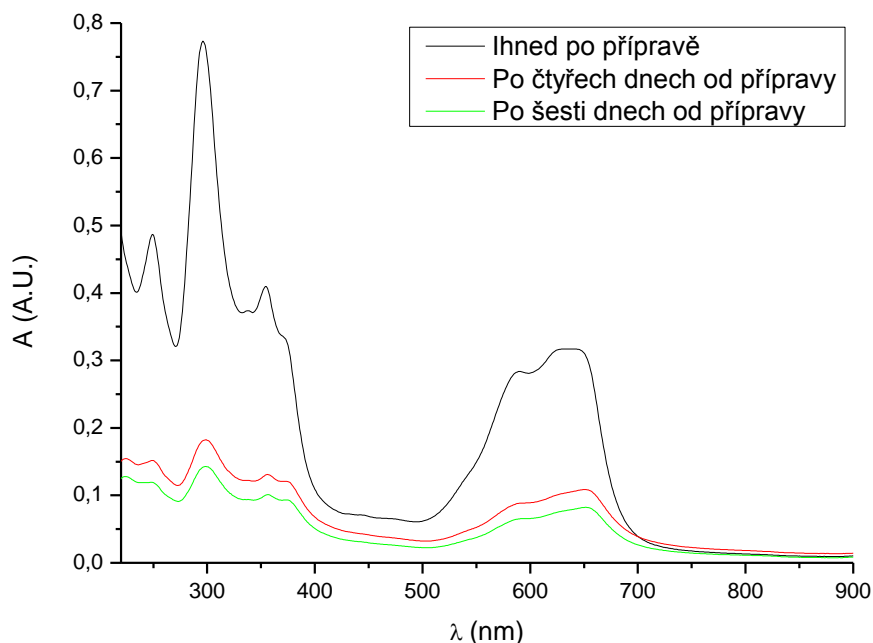
Graf 15: Absorpční spektrum L.-indiga v pufru ihned po přípravě a po 24 dnech od přípravy



Tabulka 3: Absorbance roztoku L.-indiga v etanolu vstříknutého do pufru ihned po přípravě a po 24 dnech od přípravy

	$\lambda = 588 \text{ nm}$ A (A. U.)	$\lambda = 592 \text{ nm}$ A (A. U.)	$\lambda = 605 \text{ nm}$ A (A. U.)	$\lambda = 624 \text{ nm}$ A (A. U.)	$\lambda = 628 \text{ nm}$ A (A. U.)
Ihned po přípravě	0,0386	0,0384	0,0378	0,0404	0,0401
24 dní po přípravě	0,0225	0,0226	0,0220	0,0244	0,0246

Graf 16: Absorpční spektrum L.-indiga v pufru ihned po přípravě, po čtyřech dnech od přípravy a po šesti dnech od přípravy



Tabulka 4: Absorbance roztoku L.-indiga v etanolu vstříknutého do pufru ihned po přípravě, 4 dny po přípravě a 6 dní po přípravě

	$\lambda = 591 \text{ nm}$ A (A. U.)	$\lambda = 605 \text{ nm}$ A (A. U.)	$\lambda = 631 \text{ nm}$ A (A. U.)	$\lambda = 651 \text{ nm}$ A (A. U.)
Ihned po přípravě	0,2825	0,2845	0,3171	0,3088
4 dny po přípravě	0,0885	0,0902	0,1029	0,1088
6 dnů po přípravě	0,0653	0,0666	0,0769	0,0822

3.4. Fluorescenční spektroskopie

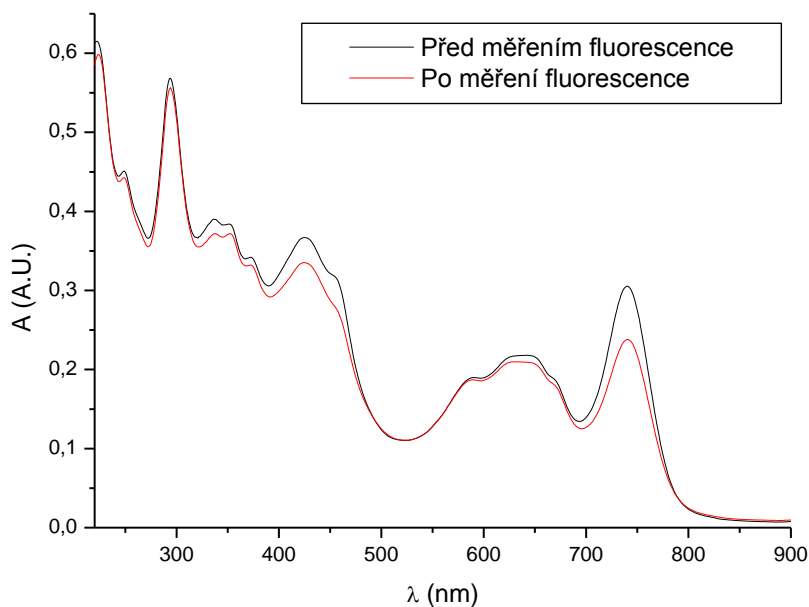
L.-indigo absorbuje světlo na jiných vlnových délkách než BChl *c*, porovnáním excitačního a absorpčního spektra vzorku L.-indiga a BChl-u *c* lze tedy zjistit účinnost přenosu energie absorbované L.-indigem na BChl *c* ve vzorku, viz kapitulu 2.2.3.

Byla měřena fluorescenční spektra vzorku 5, který obsahuje ze všech vzorků nejvíce L.-indiga, a 30 μl roztoku L.-indiga v etanolu v 3 ml pufru. Před fluorescenčním měřením bylo proměřeno absorpční spektrum obou látek, znovu bylo proměřeno po dokončení fluorescenčních měření, viz Graf 17 a Graf 18.

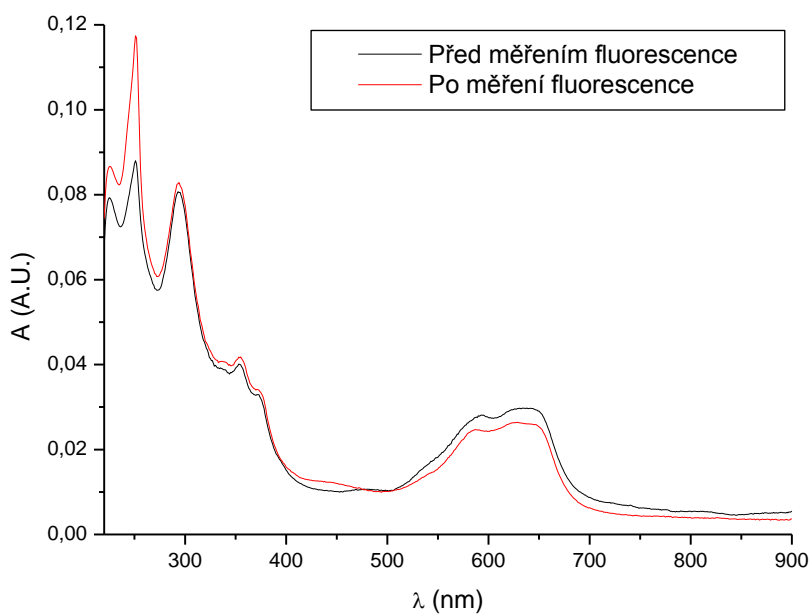
Z Grafu 17 je patrné, že fluorescenční měření má vliv na pás Q_y i Soretův pás spektra BChl-u *c*, jejichž absorbance se po fluorescenčním měření snížila, naopak pásy L.-indiga

nejsou příliš ovlivněny. Absorpční spektrum samotného L.-indiga před a po měření fluorescence (Graf 18) se neshodují, absorpance pásu mezi 580 nm až 650 nm klesá, naopak absorpance pásů u 230 nm a 250 nm se zvyšuje.

Graf 17: Absorpční spektrum vzorku 5 před a po měření fluorescence



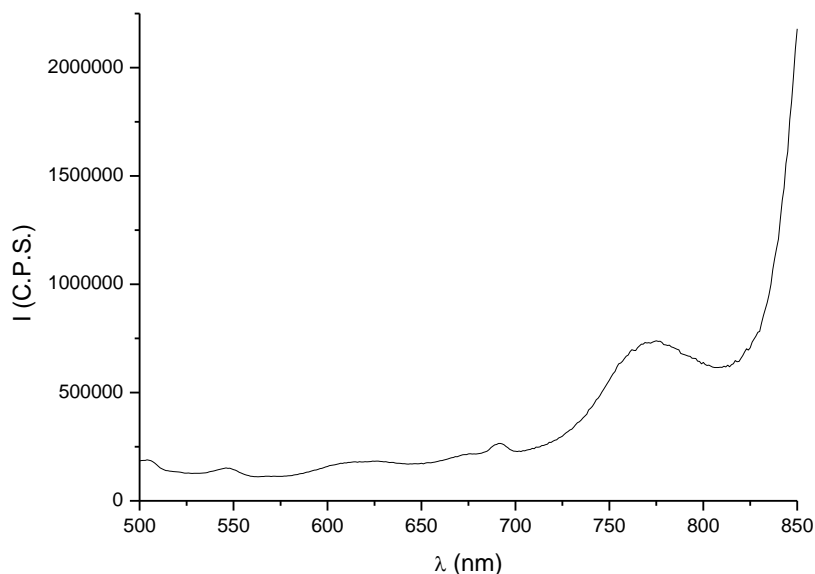
Graf 18: Absorpční spektrum L.-indiga před a po měření fluorescence



Bylo proměřeno emisní spektrum vzorku 5, viz Graf 19. Excitační vlnová délka λ_{ex} byla 460 nm, šířka excitačních i emisních štěrbin byla 5 nm. Veličinou na svislé ose

spektra je intenzita emitovaného světla I v jednotkách detekovaných fotonů za sekundu (counts per second – C.P.S.). Citlivost detektorů použitého fluorescenčního spektrometru se pro delší vlnové délky snižuje. Proto bylo nutné provést korekci naměřených emisních spekter, použit byl korekční soubor náležející ke spektrometru. Tato korekce však zřejmě pro velké vlnové délky není spolehlivá, neboť ve všech měřených emisních spektrech strmě roste intenzita světla po korekci pro vlnové délky nad přibližně 825 nm.

Graf 19: Emisní spektrum vzorku 5, $\lambda_{ex} = 460$ nm



Na vlnové délce 460 nm L.-indigo téměř neabsorbuje světlo (viz Graf 18), v emisním spektru vzorku 5 pozorujeme pouze pás, jehož maximum je na vlnové délce 775 nm. Tento pás odpovídá emisnímu spektru BChl-u *c* (Alster a další 2008).

Byla proměřena závislost intenzity emitovaného světla vzorku 5 na excitační vlnové délce v rozsahu excitačních vlnových délek 405 nm až 775 nm, emisní vlnová délka λ_{em} byla zvolena 790 nm, šířka excitačních i emisních štěrbin spektrofluorimetru byla nastavena na 5 nm. Excitační spektrum vzniklo vydělením spektra naměřeného na vzorkovém detektoru a spektra naměřeného na referenčním detektoru (viz Obrázek 7 v kapitole 2.2.4), tato spektra nebyla korigována, neboť dostupné korekční soubory neobsahovaly potřebný interval vlnových délek.

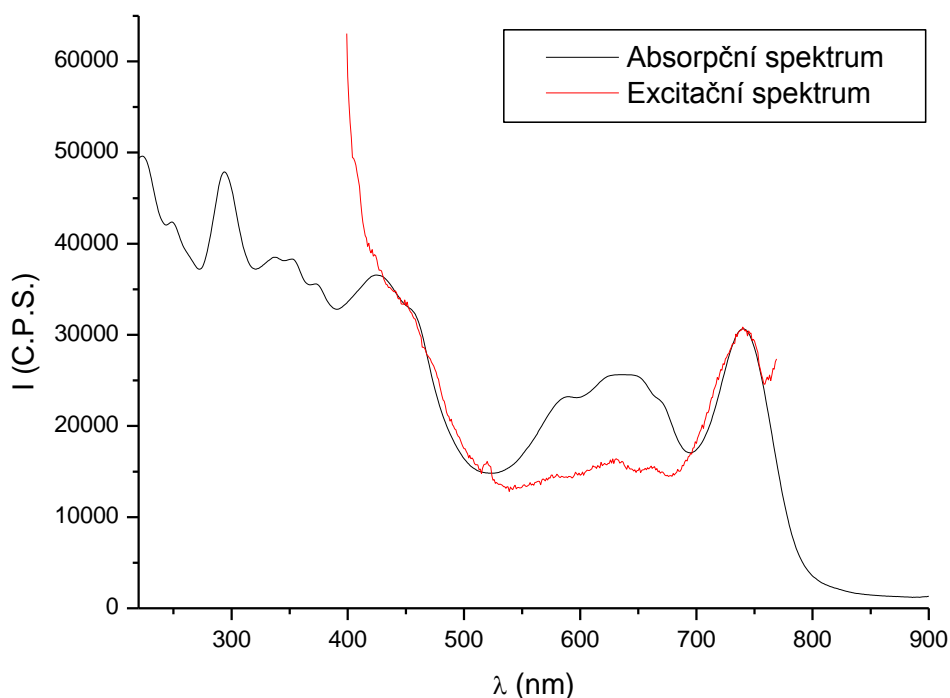
Absorpční spektra vzorku 5 před a po měření fluorescence byla sečtena a vydělena dvěma, tak vzniklo průměrné absorpční spektrum. Závislost absorbance na vlnové délce byla převedena na závislost $1 - T$ na vlnové délce podle vztahu

$$1 - T = 1 - 10^{-A}, \quad (14)$$

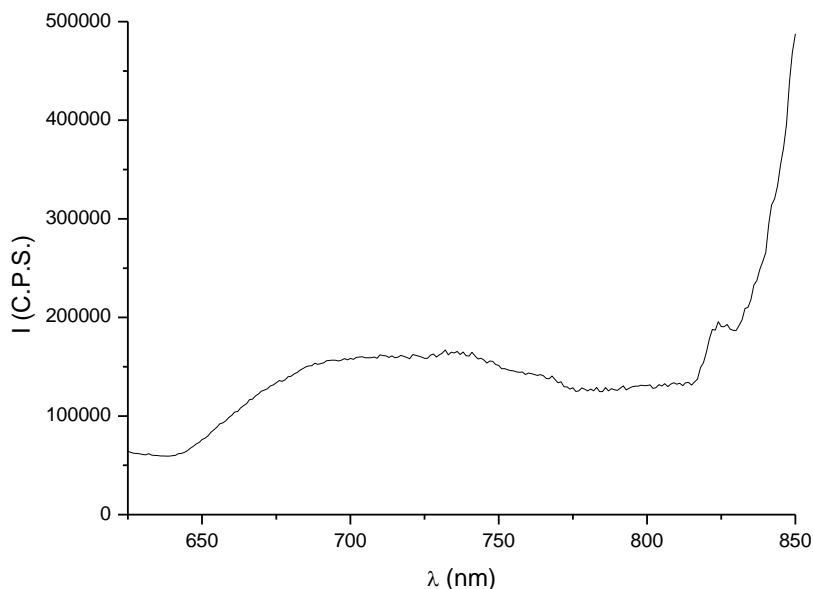
výsledné spektrum bylo vynásobeno koeficientem 65941 tak, aby průměrná hodnota tří bodů okolo maxima pásu u 740 nm byla stejná jako průměrná hodnota tří bodů okolo maxima pásu u 734 nm v excitačním spektru. Excitační spektrum bylo posunuto o 6 nm směrem k vyšším vlnovým délkám, obě spektra jsou zobrazena v Grafu 20.

Bylo změřeno emisní spektrum roztoku L.-indiga v etanolu v pufru pro excitační vlnovou délku $\lambda_{ex} = 590$ nm, šířka excitačních štěrbin byla 10 nm, šířka emisních štěrbin 5 nm, spektrum je znázorněno v Grafu 21.

Graf 20: Absorpční a excitační spektrum vzorku 5, $\lambda_{em} = 790$ nm. Absorpční spektrum je průměr z absorpčního spektra před a po měření fluorescence, excitační spektrum bylo posunuto o 6 nm k delším vlnovým délkám.



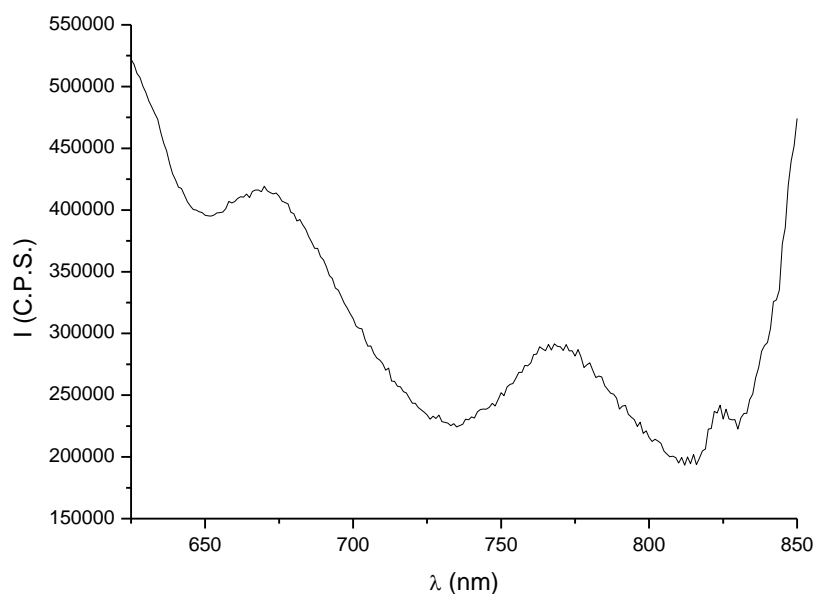
Graf 21: Emisní spektrum L.-indiga, $\lambda_{ex} = 590$ nm



Podle Grafu 21 se zdá, že L.-indigo na vlnové délce 790 nm emituje světlo, nelze však rozhodnout, zda je tento graf spolehlivý a zda se zde již neprojevuje nárůst intenzity ve spektru s korekcí pro dlouhé vlnové délky.

Bylo změřeno emisní spektrum vzorku 5 při excitační vlnové délce $\lambda_{ex} = 590$ nm, šířka excitačních i emisních štěrbin byla 5 nm, spektrum je zobrazeno v Grafu 22. Ve spektru opět pozorujeme nárůst intenzity pro vlnovou délku vyšší než přibližně 825 nm, za který je zřejmě zodpovědný nedostatečný korekční soubor. Maximum pásu mezi 750 nm a 800 nm je na vlnové délce 768 nm, tento pás odpovídá emisi BChl-u c. Za předpokladu, že na vlnové délce 590 nm BChl c ve vzorku 5 neabsorbuje, znamená výskyt pásu BChl-u c v Grafu 22, že se energie absorbovaná L.-indigem ve vzorku 5 přenáší na BChl c.

Graf 22: Emisní spektrum vzorku 5, $\lambda_{ex} = 590$ nm



4. Diskuse

4.1. Molární extinkční koeficient L.-indiga

Při určování molárního extinkčního koeficientu L.-indiga v etanolu byla největším zdrojem chyby nepřesnost v určení hmotnosti naváženého L.-indiga. Ta byla odhadnuta jako $\pm 0,1$ mg, tedy přibližně 11 %. V této chybě se projevuje nepřesnost samotných vah, navážená hodnota se pohybovala přibližně v intervalu $\pm 0,04$ mg od hodnoty 0,9 mg. Další nepřesnosti mohou vznikat při manipulaci s naváženým vzorkem, proto byla chyba určení hmotnosti stanovena vyšší, než odpovídá chybě samotného vážení. L.-indigo bylo rozpouštěno v etanolu v odměrné baňce, chybu určení objemu uvažuji jako 1%. Relativní chyba určení molárního extinkčního koeficientu L.-indiga je pak přibližně 12%, projeví se i chyba určení absorbance.

Naměřená hodnota molárního extinkčního koeficientu L.-indiga v etanolu se v rámci chyby shoduje s hodnotou molárního extinkčního koeficientu indiga v DMF uvedenou v (de Melo a další 2004). Neshoduje se s dalšími dvěma prameny, (O'Connor a další 1997) a (Royo a další 2005). Odchytky od hodnoty molárního extinkčního koeficientu indiga v DMF bylo možné očekávat díky poněkud odlišné chemické struktuře L.-indiga a indiga a použití různých rozpouštědel.

4.2. Stárnutí L.-indiga v pufru

Studium stárnutí L.-indiga nepatří mezi hlavní cíle této práce. Stárne-li však malé množství samotného L.-indiga rozpuštěného v etanolu v pufru jinak, než je-li součástí vzorku i BChl *c*, jedná se o doklad interakce mezi molekulami BChl-u *c* a L.-indiga ve vzorku, který může podpořit tezi o vzniku agregátů BChl-u *c*.

Bylo studováno stárnutí 30 μ l roztoku L.-indiga v etanolu v 3 ml pufru po dobu 24 dní a stárnutí 200 μ l nasyceného roztoku L.-indiga v etanolu v 3 ml pufru po dobu 6 dní, koncentrace L.-indiga v pufru v prvním případě přibližně odpovídá koncentraci L.-indiga ve vzorku 2, ve druhém případě pak koncentraci L.-indiga ve vzorku 5.

V absorpčních spektrech v průběhu stárnutí je patrný pokles pásů L.-indiga, v roztoku tedy zřejmě dochází ke srážení L.-indiga. U méně koncentrovaného vzorku se na vlnové délce 605 nm absorbance za 24 dní snížila přibližně o 42%, u koncentrovanějšího vzorku se na téže vlnové délce absorbance za šest dní snížila přibližně o 77%. Rychlost srážení L.-indiga zřejmě tedy závisí na jeho počáteční koncentraci.

V absorpčním spektru také dochází ke změnám tvaru pásů. Je-li L.-indigo rozpuštěno v etanolu, má absorpční pás okolo 600 nm pouze jedno maximum, a to na vlnové délce 605 nm, viz Graf 4 v kapitole 2.4. Je-li malé množství roztoku L.-indiga v etanolu vstříknuto do pufru, změní pás okolo 600 nm tvar. Podle tvaru tohoto pásu je možné předpokládat, že je tento pás tvořen třemi absorpčními přechody, jejichž maxima leží přibližně na vlnových délkách 590 nm, 630 nm a 650 nm. V průběhu stárnutí pak dochází ke změně ve vzájemných poměrech těchto pásů, pásy u delších vlnových délek se relativně zvyšují. To je patrné zejména u koncentrovanějšího vzorku, viz Graf 16 v kapitole 3.3, ale

tento proces probíhá i u méně koncentrovaného vzorku. Rozštěpení absorpčního pásu na tři a změny v jejich vzájemných poměrech v průběhu stárnutí mohou ukazovat na to, že nepolární L.-indigo se v polárním rozpouštědle – vodě (která je hlavní složkou pufru) vyskytuje ve třech různých formách a zastoupení těchto forem se v průběhu stárnutí mění. Může docházet k nějaké formě agregace L.-indiga v pufru. K potvrzení těchto domněnek by však bylo třeba dalších měření.

4.3. Tvorba agregátů BChl-u c a L.-indiga

Měřením absorpčních spekter vzorků BChl-u c a L.-indiga v pufru byl prokázán vznik agregátů. Maximum pásu Q_y BChl-u c se v absorpčních spektrech konzistentně se vzrůstající koncentrací L.-indiga posouvá dále do infračervené oblasti, viz grafy v kapitole 3.2.2 a Tabulku 2. Při měření ihned po přípravě odpovídají spektru agregátů pouze vzorky 4 a 5 (maximum pásu Q_y na 718 nm resp. 730 nm), po dvou dnech od přípravy se nad hranici agregace posouvá i maximum pásu Q_y vzorku 3 (720 nm), maximum pásu Q_y vzorku 2 je na hranici agregace, tj. na 715 nm.

Za dalších devatenáct dní již došlo pouze k drobným posunům maxima pásu Q_y směrem do infračervené oblasti spektra, tyto změny byly menší než změny, které se udály za první dva dny vývoje. Dá se tedy předpokládat, že pokud by nedošlo k degradaci vzorků, absorpční pásy by se již dále příliš neposouvaly.

O 1 nm nad hranici agregace se posunulo i maximum pásu Q_y vzorku 2, agregáty tedy vznikají již při poměru koncentrace c_b BChl-u c a c_i L.-indiga $c_b:c_i = 5:1$, což je nejnižší molární poměr použitý v této práci. Tento molární poměr je zřejmě blízký nejnižšímu nutnému molárnímu poměru pro vznik agregátů.

V průběhu prvních dvou dnů po přípravě vzorků se absorbance pásu Q_y vzorků zvyšovala, s výjimkou vzorku 1, tedy vzorku samotného BChl-u c v pufru, kde změny odpovídají spíše změně poměru absorbance dvou pásů u přibližně 680 nm a 706 nm, tvořících pás Q_y . Ve spektru ihned po přípravě je výraznější pás u 680 nm, po dvou dnech od přípravy je výraznější pás u 706 nm, dochází tak k výraznému posunu maxima pásu Q_y , tvořeného těmito dvěma pásy. Takovýto vývoj je pro spektra BChl-u c v pufru a bez příměsi nepolárních nečistot typický. Po třech týdnech od přípravy se maximum pásu Q_y vzorku 1 posunulo na 707 nm, BChl c tedy zůstal ve formě dimerů. Znamená to také, že se v průběhu měření do vzorku nedostala žádná nepolární nečistota, která by vyvolala agregaci a posun pásu Q_y na hranici 715 nm.

Po třech týdnech od přípravy došlo k opětovnému snížení absorbance pásu Q_y . Absorbance ostatních oblastí spektra se v průběhu stárnutí průběžně snižovala, zdá se tedy, že se část agregátů ve vzorcích sráží.

Dalším důkaz toho, že je ve vzorcích L.-indigo zabudované do agregátů, poskytuje studium stárnutí malého množství roztoku L.-indiga v etanolu rozpuštěného v pufru. Absorbance na vlnové délce 605 nm vzorků Bchl-u c a L.-indiga se po třech týdnech od přípravy snížila u vzorku 2 o 13%, u vzorku 3 o 21%, u vzorku 4 o 18% a u vzorku 5 pouze o 4%, za část tohoto snížení je přitom zodpovědný posun pásu Q_y BChl-u c dále do infračervené oblasti. Absorbance 30 μ l roztoku L.-indiga v etanolu v 3 ml pufru se po 24 dnech na vlnové délce 605 nm snížila přibližně o 42%, koncentrace L.-indiga v tomto vzorku přitom přibližně odpovídá koncentraci L.-indiga ve vzorku 2. Absorbance 200 μ l roztoku L.-indiga v etanolu v 3 ml pufru se již po 6 dnech stárnutí na vlnové délce 605 nm snížila přibližně o 77%, koncentrace L.-indiga v tomto vzorku odpovídá koncentraci

L.-indiga ve vzorku 5. Snížení absorpce L.-indiga ve vzorcích, které obsahují BChl *c* je tedy výrazně nižší než ve vzorcích, které BChl *c* neobsahují. Zatímco samotné L.-indigo v pufru se v průběhu stárnutí poměrně hodně sráží, ve vzorcích 2 až 5 je L.-indigo zabudované do agregátů a příliš se nesráží.

Posun pásu Q_y BChl-u *c* a rozdílná rychlost srážení L.-indiga ve vzorcích s BChl-em *c* a bez BChl-u *c* dokazují, že indigo vyvolává tvorbu agregátů BChl-u *c*.

4.4. Přenos energie v agregátech

Pro měření excitačního spektra byla zvolena emisní vlnová délka $\lambda_{em} = 790$ nm. Pro porovnání absorpčního a excitačního spektra k určování účinnosti přenosu energie absorbované L.-indigem na BChl *c* v agregátech je nutné, aby součástí naměřeného excitačního spektra bylo maximum pásu Q_y BChl-u *c* u 740 nm, na který provádíme normování. Při měření excitačního spektra jsme pak shora omezeni vlnovými délkami blízkými 790 nm, kdy detektor detekuje nikoliv fluorescenci, ale přímo excitační světlo, zdola jsme omezeni vlnovými délkami blízkými 395 nm, tedy o poloviční vlnové délce než je λ_{em} , které emisní monochromátor také propouští do detektoru. Excitační spektrum bylo měřeno pro vlnové délky 405 nm až 775 nm, viz Graf 20, pro vlnové délky blízké 405 nm resp. 775 nm se ve spektru projevuje nárůst intenzity, který odpovídá detekci excitačního světla.

Součástí použitého intervalu vlnových délek je i oblast absorpce L.-indiga mezi přibližně 500 nm a 700 nm, viz Graf 18, naopak agregáty BChl *c* v této oblasti vlnových délek vykazují nízkou absorpci světla (Klinger a další 2004).

BChl *c* v agregátech na vlnové délce 790 nm emituje světlo, jak bylo zjištěno měřením emisního spektra vzorku 5 při excitační vlnové délce $\lambda_{ex} = 460$ nm, na níž L.-indigo světlo téměř neabsorbuje. Emisní spektrum je zobrazeno v Grafu 19.

Průměr absorpčního spektra vzorku 5 před a po měření fluorescence byl převeden na závislost $1 - T$ na vlnové délce a normován na maximum pásu Q_y v excitačním spektru. Toto maximum bylo oproti maximu absorpčního spektra posunuto o 6 nm k modrému konci spektra, tento posun byl pravděpodobně způsoben rozdílem v kalibraci absorpčního a fluorescenčního spektrometru. Pro určení účinnosti přenosu energie bylo excitační spektrum o 6 nm posunuto k delším vlnovým délkám.

Maximum pásu absorpčního spektra mezi přibližně 550 nm a 700 nm je na vlnové délce $\lambda = 637$ nm. Poměr posunutého excitačního spektra ku normovanému absorpčnímu spektru na této vlnové délce je přibližně roven 0,63. Na vlnové délce $\lambda = 605$ nm je poměr posunutého excitačního spektra ku normovanému absorpčnímu spektru přibližně roven 0,64. V případě, že L.-indigo na vlnové délce 790 nm světlo neemituje, znamená to, že L.-indigo v agregátech předává energii BChl-u *c* s účinností mezi 60% a 70%.

Bylo naměřeno emisní spektrum 30 μ l roztoku L.-indiga v etanolu vstříknutého do 3 ml pufru, excitační vlnová délka byla $\lambda_{ex} = 590$ nm, šířka excitačních štěrbin byla 10 nm, šířka emisních štěrbin 5 nm, spektrum je znázorněno v Grafu 21.

Všechna naměřená emisní spektra byla opravena pomocí korekčního souboru příslušného k použitému spektrometru, neboť citlivost detektoru se pro vlnové délky nad přibližně 680 nm výrazně snižuje. Korekční soubor však zřejmě není zcela spolehlivý, neboť pro vlnové délky nad 825 nm ve všech naměřených emisních spektrech, nezávisle na použité excitační vlnové délce a vzorku, intenzita detekovaného světla po korekci prudce narůstá.

Podle Grafu 21 L.-indigo na vlnové délce 790 nm světlo emituje, nelze však s určitostí říci, zda se již zde neprojevuje nedokonalost korekčního souboru a jak významná je tedy tato emise.

Na vlnové délce $\lambda = 590$ nm je absorbance vzorku 5 $A_{v,5,590} = 0,1885$ A. U., absorbance L.-indiga v pufru používaného pro fluorescenční měření je $A_{i,590} = 0,0263$ A. U., viz Graf 17 a Graf 18, obě uvedené hodnoty jsou průměr absorbance před a po měření fluorescence. Koncentrace vzorku je podle Lambertova – Beerova zákona (7) přímo úměrná absorbanci. Za předpokladu, že BChl *c* ve vzorku 5 na vlnové délce 590 nm neabsorbuje, je tedy koncentrace L.-indiga ve vzorku 5 přibližně sedmkrát vyšší než koncentrace ve vzorku samotného L.-indiga v pufru.

Předpokládejme, že BChl *c* ve vzorku 5 na vlnové délce 590 nm absorbuje světlo stejně jako vzorek 1 po třech týdnech od přípravy – absorbance vzorku 1 na vlnové délce 590 nm je $A_{v,1,590} = 0,0384$ A. U., viz Graf 12. Pokud tuto hodnotu odečteme od absorbance $A_{v,5,590}$, dostaneme přibližně šestkrát vyšší koncentraci L.-indiga ve vzorku 5 než ve vzorku samotného L.-indiga v pufru. Samotné L.-indigo při excitaci na vlnové délce 590 nm a emisní vlnové délce 790 nm emituje světlo o intenzitě $I_{i,790} = 126\,000$ C. P. S., vzorek 5 při stejné excitační a emisní vlnové délce emituje světlo o intenzitě $I_{v,5,790} = 14\,000$ C. P. S., viz Graf 20 a Graf 21. Při měření emisního spektra L.-indiga byly však použity dvakrát širší excitační štěrbinové než při měření excitačního spektra vzorku 5. Vydělíme-li intenzitu $I_{i,790}$ čtyřikrát, čímž opravíme použití dvakrát širších štěrbin v případě měření L.-indiga, je stále tato intenzita přibližně dvakrát vyšší než intenzita $I_{v,5,790}$. Podle našich měření tedy šest- až sedmkrát méně koncentrovaný vzorek emituje světlo o dvakrát vyšší intenzitě, což je ve sporu s Lambertovým – Beerovým zákonem. Nutně tedy docházíme k závěru, že je emisní spektrum L.-indiga (Graf 21) nebo excitační spektrum vzorku 5 (Graf 20) zkresleno, případně že jsou zkreslena obě dvě spektra.

Nelze rozhodnout, nakolik L.-indigo emituje světlo o vlnové délce 790 nm, a tedy ani nelze z excitačního spektra určit, zda se energie absorbovaná L.-indigem přenáší na BChl *c*, či nikoliv.

Bylo naměřeno emisní spektrum vzorku 5, vzorek byl excitován světlem o vlnové délce $\lambda_{ex} = 590$ nm, šířka excitační i emisní štěrbinové byla 5 nm, viz Graf 22. V tomto spektru pozorujeme pás, který byl v emisním spektru v Grafu 19 identifikován jako pás BChl-u *c*. V případě, že BChl *c* v agregátech světlo o vlnové délce 590 nm neabsorbuje, jedná se o důkaz přenosu energie z L.-indiga na BChl *c*.

Průměr absorbance vzorku 5 před a po měření fluorescence na vlnové délce 460 nm je $A_{v,5,460} = 0,2848$ A. U., intenzita emitovaného světla na 775 nm při excitaci světlem o vlnové délce 460 nm je $I_{v,5,775} = 739\,000$ C. P. S. Za předpokladu, že na vlnové délce 590 nm BChl *c* ve vzorku 5 absorbuje stejně jako ve vzorku 1 po třech týdnech od přípravy, tj. $A_{v,1,590} = 0,0384$ A. U., a za předpokladu, že intenzita emitovaného světla je přímo úměrná absorbanci, by intenzita emitovaného světla na 775 nm při excitaci na vlnové délce 590 nm měla být přibližně 100 000 C. P. S., naměřená intenzita je přibližně 300 000 C. P. S., tedy třikrát vyšší. To opět znamená, že se energie absorbovaná L.-indigem přenáší na BChl *c*.

Je ovšem otázkou, nakolik je hodnota intenzity v Grafu 22 ovlivněna zvyšováním naměřené intenzity po korekci u velkých vlnových délek, nakolik je tedy spolehlivá. Znovu bohužel musíme konstatovat, že přenos energie mezi L.-indigem a BChl-em *c* nebyl ani prokázán ani vyvrácen.

Pásky BChl *c* v absorpčním spektru vzorku 5 v průběhu fluorescenčního měření poklesly, viz Graf 17. Naopak absorpční pásy L.-indiga ve vzorku 5 v průběhu fluorescence nepoklesly příliš výrazně. Je tedy možné, že intenzivní světlo, kterému byl vzorek v průběhu fluorescenčních měření vystaven, má vliv na rozpad agregátů, uvolněné

L.-indigo zůstává rozpuštěné, uvolněný BChl *c* se však sráží, v absorpčním spektru ho tedy dále nepozorujeme.

Absorpční spektrum L.-indiga před fluorescenčním měřením se také neshoduje se spektrem po fluorescenčním měření, absorbance pásu okolo 600 nm klesá, naopak absorbance pásů v ultrafialové oblasti roste. Tato změna odpovídá vysrážení části L.-indiga v pufru, čímž se zvyšuje rozptyl světla ve vzorku. Intenzita rozptýleného světla klesá s vlnovou délkou λ úměrně $1/\lambda^4$.

5. Závěr

Měřením absorpčního spektra roztoku 5,5'-di-tert-butylandiga (L.-indiga) v etanolu o známé koncentraci byl určen molární extinkční koeficient ε_i L.-indiga pro vlnovou délku $\lambda = 605$ nm, $\varepsilon_i = (21\,700 \pm 2\,500) \text{ l}\cdot\text{mol}^{-1}\text{cm}^{-1}$.

Podařilo se prokázat, že bakteriochlorofyl *c* (BChl *c*) s L.-indigem ve vodném prostředí vytváří agregáty. Dokladem jsou změny v absorpčním spektru směsi BChl-u *c* a L.-indiga v pufru oproti spektru samotného BChl-u *c* v pufru. Pás Q_y BChl *c* se posouvá s rostoucí koncentrací L.-indiga ve vzorku a s postupujícím časem k delším vlnovým délkám.

Agregáty vznikají již při poměru koncentrace c_b BChl-u *c* a c_i L.-indiga $c_b:c_i = 5:1$, což je nejnižší molární poměr použitý v této práci. Tento molární poměr je zřejmě blízký nejnižšímu nutnému molárnímu poměru pro vznik agregátů, neboť maximum pásu Q_y po třech týdnech od přípravy vzorků překročilo pouze o 1 nm hranici 715 nm, používanou v této práci pro odlišení agregátů a dimerů BChl-u *c*.

Dalším dokladem vzniku agregátů BChl-u *c* a L.-indiga je fakt, že zatímco se po třech týdnech od přípravy vzorků absorpční pásy L.-indiga v agregátech snížily jen málo, absorpční pásy 30 μl roztoku L.-indiga v etanolu v 3 ml pufru se po řádově stejné době (24 dnech) snížily přibližně o 42%, koncentrace L.-indiga v tomto vzorku je přitom stejná jako koncentrace L.-indiga ve vzorku 2. Absorpční pásy 200 μl nasyceného roztoku L.-indiga v etanolu v 3 ml pufru se již po šesti dnech snížily přibližně o 77%, koncentrace L.-indiga v tomto vzorku je stejná jako koncentrace L.-indiga ve vzorku 5.

Měřením fluorescenčních spekter se nepodařilo ani prokázat ani vyvrátit přenos energie mezi L.-indigem a BChl-em *c* v agregátech. Důvodem neúspěchu je nízká citlivost detektorů na světlo o dlouhých vlnových délkách a nepřesné korekční soubory. Ke stanovení účinnosti přenosu energie z L.-indiga na BChl *c* v agregátech by bylo třeba provést přesnější měření.

Citovaná literatura

- Alster Jan, Župčanová Anita, Vácha František, Pšenčík Jakub (2008): Effect of quinones on formation and properties of bacteriochlorophyll c aggregates. *Photosynthesis Research* **95**, 183-189.
- Blankenship R. E. (2002): Molecular Mechanisms of Photosynthesis. Blackwell Science, Oxford.
- Bryant Donald A. et al. (2007): Candidatus Chloracidobacterium thermophilum: An Aerobic Phototrophic Acidobacterium. *Science* **317**, 523-526.
- Bryant Donald A., Frigaard Niels-Ulrik (2006): Prokaryotic photosynthesis and phototrophy illuminated. *TRENDS in Microbiology* **14**, 488-496.
- de Melo J. Seixas, Moura A. P., Melo M. J. (2004): Photophysical and Spectroscopic Studies of Indigo Derivatives in Their Keto and Leuco Forms. *Journal of Physical Chemistry* **108**, 6975-6981.
- Frigaard Niels-Ulrik, Bryant Donald A. (2006): Chlorosomes: Antenna Organelles in Photosynthetic Green Bacteria. *Microbiology Monographs* **2**.
- Ganapathy S., Oostergetel G. T., Wawrzyniak P. K., Reus M., Gomez Maqueo Chew A., Buda F., Boekema E. J., Bryant D. A., Holzwarth A. R., de Groot H. J. (2009): Alternating syn-anti bacteriochlorophylls form concentric helical nanotubes in chlorosomes. *The Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 8525-8530.
- Klinger Pavel, Arellano Juan B., Vácha František, Hála Jan, Pšenčík Jakub (2004): Effect of Carotenoids and Monogalactosyl Diglyceride on Bacteriochlorophyll c Aggregates in Aqueous Buffer: Implications for the Self-assembly of Chlorosomes. *Photochemistry and Photobiology* **80**, 572-578.
- Lakowicz Joseph R. (2006): Principles of Fluorescence Spectroscopy. Springer US.
- Lakowicz Joseph R. (1986): Principles of Fluorescence Spectroscopy. Plenum Press, New York.
- Langhals Heinz (2007): Brightly Shining Nano Particles: Lipophilic Perylene Bisimides in Aqueous Phase. *Supplementary Material (ESI) for New Journal of Chemistry*.
- Namsaraev Z. B. (2009): Application of Extinction Coefficients for Quantification of Chlorophylls and Bacteriochlorophylls. *Microbiology* **78**, 794-797.
- Nozawa T., Ohtomo K., Suzuki M., Nakagawa H., Shikama Y., Konami H., Wang Z.-Y. (1994): Structures of chlorosomes and aggregates BChl c in *Chlorobium tepidum* from solid state high resolution CP/MAS ¹³C NMR. *Photosynthesis Research* **41**, 211-223.
- O'Connor Kevin E., Dobson Alan D. W., Hartmans Sybe (1997): Indigo formation by microorganisms expressing styrene. *Applied and environmental microbiology* **63**, 4287-4291.
- Owen Tony (2000): Fundamentals of modern UV-visible spectroscopy. Agilent Technologies, Germany.
- Pospíšil Petr (2008): Optická spektroskopie bakteriochlorofylových agregátů s azulenem. MFF UK, Praha, bakalářská práce.
- Prosser Václav (1989): Experimentální metody biofyziky. Academia, Praha.
- Pšenčík Jakub, Ikonen T. P., Laurinmäki P., Merkel M. C., Butcher S. J., Serimaa R. E., Tuma R. (2004): Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting complexes of green photosynthetic bacteria. *Biophysical Journal* **87**, 1165-1172.

- Royo Jose Luis, Moreno-Ruiz Emilia, Cebolla Angel, Santero, Eduardo (2005): Stable long-term indigo production by overexpression of dioxygenase genes using a chromosomal integrated cascade expression circuit. *Journal of Biotechnology* **116**, 113–124.
- Sagan Lynn (1967): On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* **14**, 225-274.
- Umetsu Mitsuo, Wang Zheng-Yu, Kobayashi Masayuki, Nozawa Tsunenori (1999): Interaction of photosynthetic pigments with various organic solvents. Magnetic circular dichroism approach and application to chlorosomes. *Biochimica et Biophysica Acta* **1410**, 19-31.
- Valeur Bernard (2002): *Molecular Fluorescence: Principles and Applications*. Wiley-VCH, Weinheim.