

Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

DIPLOMOVÁ PRÁCE



Vladislav Sláma

Samoorganizace a optické vlastnosti malých molekulárních agregátů

Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Mančal, Ph.D.

Studijní program: Obecná fyzika

Studijní obor: Biofyzika a chemická fyzika

Praha 2013

Děkuji vedoucímu své práce RNDr. Tomášovi Mančalovi, Ph.D. za ochotu a pomoc při vypracovávání a sepisování diplomové práce, prof. RNDr. Petru Chvostovi, CSc. za rady ohledně statistické fyziky a RNDr. Martině Roeselové, Ph.D. za pomoc s molekulárně dynamickými simulacemi.

Dále děkuji Mgr. Michaele Matuštkové za pomoc s korekcí textu diplomové práce.

Prohlašuji, že jsem tuto diplomovou práci vypracoval samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů.

Beru na vědomí, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorského zákona v platném znění, zejména skutečnost, že Univerzita Karlova v Praze má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle § 60 odst. 1 autorského zákona.

V Praze dne 12.4.2013

podpis

Název práce: Samoorganizace a optické vlastnosti malých molekulárních agregátů

Autor: Vladislav Sláma

Katedra / Ústav: Fyzikální ústav UK

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Tomáš Mančal, Ph.D., Fyzikální ústav UK

Abstrakt: Tato práce se zabývá popisem agregace karotenoidů ve vodných roztocích. Jsou zde analyzovány hlavní interakce podílející se na agregaci a na základě tohoto je představen efektivní způsob popisu agregace karotenoidů, který vede ke značnému urychlení výpočtů. Dále jsou zde vypracovány dvě metody výpočtu pravděpodobnostní distribuce konfigurací karotenoidů v roztocích, s různými koncentracemi vody, a diskutovány jejich přednosti a nedostatky. Z těchto distribucí byly vypočteny absorpční spektra a porovnány s experimentálně naměřenými. Je také diskutován vliv vody na formování různých druhů agregátů a její vliv na tvar absorpčních spekter. Výsledky práce budou sloužit jako základ pro další přesnější metody popisu agregace, které budou zahrnovat i efekty slabších interakcí mezi karotenoidy.

Klíčová slova: Karotenoidy, Agregace, Monte-Carlo simulace

Title: Selforganization and optical properties of small molecular aggregates

Author: Vladislav Sláma

Department: Institute of Physics of Charles University

Supervisor: RNDr. Tomáš Mančal, Ph.D., Institute of Physics of Charles University

Abstract: The work deals with the description of carotenoid aggregation in water solutions. The main interactions which are involved in aggregation were analyzed and an efficient way of description of carotenoid aggregation, which leads to a speed up the computation, has been introduced. In addition, two different methods for calculation probability distribution of carotenoids configurations in solutions with variable water concentration were elaborated, and their advantages and disadvantages were discussed. Absorption spectra were calculated from these distributions, and they were compared with the experimental results. The influence of water on formation of different types of aggregates, and its impact on the shape of absorption spectra was also discussed. Results of this study will be used as a base of other, more accurate, description of carotenoids aggregation, which will include other weaker interactions between carotenoids.

Keywords: Carotenoids, Aggregation, Monte-Carlo simulation

Obsah

Úvod	3
1. Teoretický úvod	4
1.1. Základy statistické fyziky	4
1.2. Rychlostní konstanty	5
1.3. Metody Monte-Carlo	7
1.4. Monte-Carlo simulace	8
1.4.1. Metropolisův algoritmus	9
2. Karotenoidy	12
2.1. Karotenoidy	12
2.2. Funkce karotenoidů	13
2.3. Agregace	16
2.3.1 Agregace karotenoidů	17
2.4.1 Excitonový model	18
2.4.2 Výpočet absorpčních spekter	20
3. Experimentální a teoretické práce	21
3.1. Experimenty	21
3.2. Teoretické práce	23
4. Vypracování	25
4.1. Porovnání interakcí	25
4.2. Solvatační energie	27

4.3. Agregace a solvatační energie	28
4.4. Gibbsova energie agregace	30
4.5. Popis pomocí vnější plochy	30
4.6. Diskuse popisu pomocí vnější plochy	31
4.7. Výpočet entropie	33
4.8. Termodynamický přístup	39
4.9. Termodynamický přístup: Výpočet	44
4.10. Termodynamický přístup: Závislost na počtu karotenoidů	46
4.11. Termodynamický přístup: Absorpční spektra	47
4.12. Termodynamický přístup: Diskuse	53
4.13. Monte-Carlo simulace	54
4.14. Monte-Carlo simulace: Výsledky a absorpční spektra	58
4.15. Monte-Carlo simulace: Diskuse	61
Závěr	63
Seznam použité literatury	65
Seznam použitých zkratk	66
Přílohy	67

Úvod

Molekulární agregáty karotenoidů mají velice důležitou funkci v mnoha organických systémech, jako jsou například fotosyntetické systémy. V těchto systémech se karotenoidy účastní zachytávání světla a přenosu excitace do reakčních center.

Karotenoidy zde mají ale i jiné funkce, jako je například ochrana fotosyntetického aparátu před vedlejšími produkty fotosyntézy nebo strukturní (stabilizační) funkce při formování světloměrných komplexů.

Molekulární agregáty karotenoidů mají také veliký potenciál pro technická uplatnění, od vývoje umělých fotosyntetických článků po molekulární vodiče. Pochopení všech jevů relevantních pro agregaci a její popis je zásadní pro správné pochopení jejich funkce, vlastností a chování v různých systémech, a tudíž i pro jejich další využití.

V této práci bude představena efektivní metoda popisu agregace, která je založena pouze na hydrofobních interakcích karotenoidů s vodou. Na základě této metody je možné aproximovat karotenoid pouze jeho hydrofobním povrchem, čímž dochází ke značnému zjednodušení popisu. Tímto přístupem je možné, na rozdíl od molekulárně dynamických simulací, vypočítat rovnovážná rozdělení konfigurací velkého množství karotenoidů a předpovědět jak budou vypadat reálné agregáty. Tento výpočet byl proveden pomocí dvou různých metod upravených pro nový způsob popisu. Z rovnovážných rozdělení jsou na základě excitonového modelu vypočtena absorpční spektra a porovnána s experimentálně naměřenými.

1. Teoretický úvod

1.1. Základy statistické fyziky

Pro odvození vztahů v této kapitole bylo vycházeno z [1]. Statistická fyzika poskytuje propojení mezi mikroskopickými a makroskopickými veličinami. Vlastnost systému je na mikroskopické úrovni plně zadána interakčním potenciálem, z jehož znalosti můžeme pomocí metod statistické fyziky vypočítat makroskopické veličiny jako energii, teplotu či entropii. Rovnovážná statistická mechanika je založena na výpočtu partičních funkcí, které obsahují veškeré makroskopické informace. Obecný tvar partiční funkce pro klasické systémy je:

$$Z = \sum_{\text{všechny stavy}} e^{-H/k_B T}, \quad (1)$$

kde H je hamiltonián systému, T je teplota systému a k_B je Boltzmannova konstanta. Sčítání v rovnici (1) probíhá přes všechny možné stavy systému a závisí tudíž na velikosti systému a počtu stupňů volnosti pro každou částici. Pro systémy obsahující pouze malé množství interagujících částic můžeme vyjádřit partiční funkci a tím pádem i další makroskopické veličiny v exaktní podobě, ale ve většině případů, pro velké systémy nebo pro systémy s komplexním potenciálem, musí být partiční funkce vypočtena numericky. Pokud přejdeme od systému s diskrétními stavy do systému se spojitými stavy, přechází sumace ze vztahu (1) na integraci přes fázový prostor a pro partiční funkci tudíž dostáváme:

$$Z = \iint e^{-H(r_N, p_N)/k_B T} dr_N dp_N, \quad (2)$$

kde r_N resp. p_N jsou polohy resp. hybnosti všech částic systému a přesně definují mikrostav systému a $H(r_N, p_N)$ je hamiltonián systému. Celkovou energii systému můžeme rozdělit na kinetickou $T(p_N)$ a potenciální energii $V(r_N)$:

$$H(r_N, p_N) = T(p_N) + V(r_N). \quad (3)$$

Celková kinetická energie je rovna součtu kinetických energií jednotlivých částic:

$$T(p_N) = \sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2m}, \quad (4)$$

kde p_i je hybnost i -té částice a N je počet částic v systému. Pokud dosadíme vztahy (3) a (4) do rovnice (2) dostáváme:

$$\begin{aligned} Z &= \iint e^{-[T(p_N)+V(r_N)]/k_B T} dr_N dp_N = \int e^{-V(r_N)/k_B T} dr_N \cdot \int e^{-T(p_N)/k_B T} dp_N = \\ &= Z(r_N) \cdot \int e^{-\sum_{i=1}^N \frac{p_i^2}{2mk_B T}} dp_1 dp_2 \dots dp_N = Z(r_N) \cdot \prod_{i=1}^N \int e^{-\frac{p_i^2}{2mk_B T}} dp_i. \end{aligned} \quad (5)$$

Z tohoto je patrné, že pro výpočet partiční funkce stačí vypočítat partiční funkci pro polohy částic $Z(r_N) = \int e^{-V(r_N)/k_B T} dr_N$ a hybnosti se jednoduše vyintegrují. Pro systémy s diskrétními stavy pravděpodobnost p_i nalezení systému ve stavu i může být vyjádřena:

$$p_i = \frac{e^{-E_i/k_B T}}{Z}, \quad (6)$$

kde E_i je energie stavu i . Z partičních funkcí je možné vypočítat další termodynamické funkce. Volná energie F může být vypočtena pomocí vztahu:

$$F = -k_B T \ln(Z). \quad (7)$$

Další termodynamické potenciály pro různé termodynamické soubory mohou být vypočteny pomocí vztahů:

$$F = U - TS, \quad (8)$$

$$H = U + pV, \quad (9)$$

$$G = U - TS + pV, \quad (10)$$

kde U je vnitřní energie, H je entalpie, G je Gibbsova volná energie a $S = \left(\frac{\partial F}{\partial T}\right)_{V,N}$.

1.2. Rychlostní konstanty

Rychlostní konstanty mají důležité místo v chemické kinetice při určování rychlostí reakcí, ale mohou být použity i pro studium systémů, kde dochází pouze k přechodům mezi různými stavy systému.

V chemické rovnováze jsou energetické vztahy mezi jednotlivými stavy dané termodynamickými zákony nezávisle na čase. Rychlosti reakcí mohou být vyjádřeny v závislosti na počátečním nebo koncovém stavu. Rychlost reakce je definována jako změna molekul reaktantů nebo produktů za jednotku času, či z hlediska přechodů mezi stavy lze rychlost reakce definovat jako změnu pravděpodobnosti nalezení systému v počátečním nebo koncovém stavu za jednotku času [2]:

$$v = -\frac{dn_r}{dt} = \frac{dn_p}{dt}, \quad (11)$$

kde v je rychlost reakce resp. přechodu mezi stavy systému, n_r je počet molekul reaktantů resp. pravděpodobnost nalezení systému v počátečním stavu a n_p je počet molekul produktů resp. pravděpodobnost nalezení systému v koncovém stavu. Dále bude vždy používána tato analogie, jelikož pro tyto dvě veličiny platí stejné vztahy. Vztah (11) je pro porovnávání rychlostí různých reakcí značně nevhodný, jelikož rychlost reakce závisí na počtu reaktantů, z čehož vyplývá, že by podle vztahu (11) stejná reakce (probíhající s různým objemem reaktantů) probíhala různou rychlostí. Z tohoto důvodu se zavádí normalizace rychlostí reakcí [2] na objem systému. Pro konstantní objem systému V můžeme psát:

$$v = -\frac{d\left(\frac{n_r}{V}\right)}{dt} = \frac{d\left(\frac{n_p}{V}\right)}{dt} = -\frac{d[R]}{dt} = \frac{d[P]}{dt}, \quad (12)$$

kde $[R]$ a $[P]$ jsou molární koncentrace reaktantu a produktu. Pro obecnou chemickou reakci:



je rychlost úměrná $[A]^a[B]^b$. Rychlost reakce lze tudíž vyjádřit jako [2]:

$$v = k_{\rightarrow}[A]^a[B]^b, \quad (14)$$

kde k_{\rightarrow} je rychlostní konstanta, která udává závislost rychlosti na koncentraci reaktantů.

Pro určování směrů chemických reakcí a jejich energetické bilance se využívá chemická termodynamika. Pro určení směru chemických reakcí typu $aA + bB \leftrightarrow cC + dD$ se nestačí zabývat pouze energetickou bilancí, ale v průběhu reakce může docházet také ke změně entropie systému. Z tohoto důvodu se pro určení směru reakce využívá Gibbsovy volné energie, ve které je zahrnuta jak energetická, tak i entropická charakteristika reakce (10). Gibbsova volná energie je pouze funkcí teploty, tlaku a molárních množství jednotlivých složek systému. Lze tudíž psát:

$$G = G(T, p, n_1, n_2, \dots, n_N), \quad (15)$$

kde n_i je molární koncentrace i -té složky systému. Derivací volné energie podle molární koncentrace za konstantního tlaku a teploty dostaneme chemický potenciál [1]:

$$\mu_i = \left(\frac{\partial G}{\partial n_i} \right)_{p,T}. \quad (16)$$

Chemický potenciál nám udává, jak se změní energie systému se změnou molárního množství některé frakce. V průběhu reakce dochází ke změně chemických potenciálů a k termodynamické (chemické) rovnováze dochází právě tehdy, pokud je Gibbsova energie systému minimální ($dG=0$) [3], což pro chemické potenciály znamená:

$$\mu_1 dn_1 + \mu_2 dn_2 + \dots + \mu_N dn_N = 0. \quad (17)$$

Z analogie ideálního plynu můžeme pro reálné systémy chemický potenciál vyjádřit jako [3]:

$$\mu = \mu_0 + RT \ln(a), \quad (18)$$

kde a je aktivita, R je molární plynová konstanta a μ_0 je hodnota chemického potenciálu pro $a=1$. Pro Gibbsovu energii za konstantní teploty a tlaku tedy dostáváme [3]:

$$G = G_0 + nRT \ln(a). \quad (19)$$

Pro reakci typu $aA + bB \leftrightarrow cC + dD$ můžeme ze vztahu (19) vyjádřit změnu Gibbsovy energie [3] jako:

$$\Delta G = \Delta G_0 + nRT \ln K = \Delta G_0 + nRT \ln \left(\frac{[C]^c [D]^d}{[A]^a [B]^b} \right), \quad (20)$$

kde ΔG_0 je rozdíl Gibbsových energií mezi reaktanty a produkty a K je rovnovážná konstanta. Rovnováha nastává, pokud je změna Gibbsovy energie nulová. Pro rovnováhu dostáváme rovnovážnou konstantu:

$$K = e^{-\frac{\Delta G_0}{nRT}}. \quad (21)$$

Tento vztah můžeme s využitím vztahu (14) a (20) přepsat do rychlostních konstant:

$$\frac{k_{aA+bB \leftarrow cC+dD}}{k_{aA+bB \rightarrow cC+dD}} = e^{-\frac{\Delta G_0}{nRT}}. \quad (22)$$

Pokud přejdeme do formalismu pravděpodobností nalezení systému v určitém stavu, dostáváme pro přechody jedné částice mezi stavy $i \leftrightarrow j$:

$$\frac{k_{j \rightarrow i}}{k_{i \rightarrow j}} = e^{-\frac{G_i - G_j}{k_B T}}. \quad (23)$$

Pravděpodobnosti nalezení systému v jednotlivých stavech můžeme vypočítat tak, že necháme skákat jednu částici po těchto stavech s rychlostmi přechodů dané rovnicí (23) a celkovou pravděpodobnost vypočítáme z četností navštívených stavů. Z podmínky detailní rovnováhy (33) a vztahu (23) můžeme pravděpodobnosti výskytu systému ve stavech i a j vyjádřit pomocí vztahu:

$$\frac{p_j}{p_i} = \frac{k_{i \rightarrow j}}{k_{j \rightarrow i}} = e^{-\frac{G_j - G_i}{k_B T}}, \quad (24)$$

kde p_j resp. p_i je pravděpodobnost nalezení systému ve stavu j resp. ve stavu i a $k_{i \rightarrow j}$ je rychlostní konstanta přechodu systému ze stavu i do stavu j . Avšak z tohoto vztahu dostaneme pouze relativní hodnoty pravděpodobností. Pro obdržení absolutních hodnot pravděpodobností je nutné ještě přidat podmínku normalizace:

$$\sum_i p_i = 1. \quad (25)$$

Z rovnic (24) a (25) je nyní možné určit absolutní hodnotu pravděpodobností:

$$p_i = \frac{e^{-\frac{G_i - G_j}{k_B T}}}{\sum_i e^{-\frac{G_i - G_j}{k_B T}}}, \quad (26)$$

kde j je libovolný stav systému.

1.3. Metody Monte-Carlo

Metody Monte-Carlo jsou matematické metody, které využívají náhodné vzorkování pro výpočet numerických výsledků. Tyto metody byly vyvinuty pro matematické účely, například pro výpočet mnohodimenzionálních integrálů. Pro numerický výpočet je nutné provést diskretizaci integrované funkce. Pro klasické metody z numerické matematiky pro výpočet integrálů, jako jsou například lichoběžníkové pravidlo či Simpsonovo pravidlo, se tato diskretizace provádí na pevně zvolené mříži pro každou dimenzi. Pro obdržení výsledné numerické hodnoty integrálu je nutné projít všechny body této mříže. Tudíž pro výpočet n dimenzionálního integrálu, při diskretizaci na mřížce o m bodech v každé dimenzi, by bylo nutné vyčíslit a sečíst hodnoty funkce v m^n bodech. Hlavní nevýhodou těchto metod je, že pro obdržení numerické hodnoty integrálu není možné ukončit výpočet po zahrnutí pouze části z těchto bodů, jelikož bychom dostali chybnou hodnotu integrálu. Je tedy nutné, jak

již bylo zmíněno dříve, projít všechny tyto body, což je pro mnohodimenzionální integrály velice náročné na výpočetní čas. Ve statistické fyzice [1] se objevují integrály tohoto typu:

$$I = \iiint \dots \int f(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N) d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \dots d\mathbf{r}_N, \quad (27)$$

kde N je počet částic v systému a \mathbf{r}_i je polohový vektor i -té částice. Pro třírozměrný prostor dostáváme $3N$ dimenzionální integrál. Například pro 50 částic se vzorkováním 10 bodů v každé dimenzi už dostáváme 10^{50} bodů, které je potřeba projít. Je tedy na první pohled patrné, že klasické metody, zmíněné výše, zde selhávají.

Vhodnějším způsobem pro výpočet integrálů typu (27) se ukázaly být metody Monte-Carlo. Tyto metody místo pravidelné mříže používají náhodná čísla pro výběr bodu, ve kterém je vypočtena hodnota integrované funkce. Výsledný integrál I lze poté aproximovat:

$$I \approx Q_M = V \frac{1}{M} \sum_{i=1}^M f(\bar{\mathbf{r}}_i) = V \langle f \rangle, \quad (28)$$

kde $\bar{\mathbf{r}}_i$ jsou náhodně vygenerované body z $3N$ dimenzionálního prostoru, M je celkový počet bodů pro numerický výpočet integrálu a $V = \iiint \dots \int d\mathbf{r}_1 d\mathbf{r}_2 \dots d\mathbf{r}_N$ je objem integrované oblasti. Odchylku takovéto metody lze vyjádřit pomocí vztahu:

$$\sigma_{Q_M} = \sqrt{\text{Var}(Q_M)} = \frac{V \sigma_M}{\sqrt{M}}, \quad (29)$$

kde σ_{Q_M} je odchylka Q_M , $\text{Var}(Q_M)$ je variance Q_M a σ_M je odchylka výpočtu střední hodnoty integrované funkce. Ze vztahu (29) je patrné, že závislost chyby na počtu bodů je $M^{-1/2}$. Hlavní výhodou této metody je možnost ukončení výpočtu pro libovolný počet bodů, například po dosažení požadované přesnosti. Další výhodou této metody je, že chyba takto aproximované hodnoty integrálu, na rozdíl např. od lichoběžníkového pravidla, nezávisí na dimenzi integrálu. Jelikož pro numerický výpočet není možné používat skutečná náhodná čísla, využívají se různé matematické generátory pseudonáhodných čísel.

1.4. Monte-Carlo simulace

V Monte-Carlo simulacích je snaha obejít časovou závislost modelu, k jehož změně či růstu nedochází podle předem definovaného řádu (například podle Newtonových pohybových rovnic), ale dochází spíše ke stochastickému chování (vývoj systému závisí na sekvenci náhodných čísel generovaných během simulace). Typickým příkladem využití těchto metod je difúzně omezená agregace. Při difúzně omezené agregaci vykonává částice náhodnou procházku v prostoru, dokud nepotká agregační centrum, kde se přichytí.

Další z oblastí, které lze těmito metodami řešit, jsou problémy statistické mechaniky. Ve statistické mechanice se snažíme navzorkovat oblast fázového prostoru, abychom určili jisté vlastnosti modelu, ale toto vzorkování se neprovádí podél trajektorie, kterou by systém procházel při vývoji v čase. Hlavním úkolem statistické mechaniky je výpočet středních hodnot při dané teplotě pro interagující mnohačásticové systémy. Existuje množství metod na výpočet těchto vlastností systému, které se liší zejména přesností a rychlostí vzorkování fázového prostoru.

Tyto metody mají také svá omezení, která se týkají převážně výpočetní kapacity. Omezení výpočetní rychlosti a paměti nám dává omezení na studované systémy. Není vhodné studovat systémy, jejichž výpočet by vyžadoval roky výpočetního času, či systémy při jejichž výpočtu by byla potřeba několikanásobně větší paměť, než je dostupná. Problém s pamětí většinou lze vyřešit, ale na úkor rychlosti výpočtu, což je nevhodné.

Při počítačových simulacích (při využití nejrůznějších metod) dochází vždy k určité chybě, která vzniká tím, že počítač má omezený prostor na uložení čísel a tím pádem i omezenou přesnost. Při zaokrouhlování dochází k chybě, která pro určité případy může mít až fatální následky. Kromě těchto zaokrouhlovacích chyb dostáváme také vždy statistickou chybu, která souvisí s tím, že při vzorkování fázového prostoru využíváme pouze konečný počet bodů.

1.4.1. Metropolisův algoritmus

Jak již bylo zmíněno dříve, hlavním úkolem statistické fyziky je výpočet středních hodnot. Pro kanonický soubor můžeme střední hodnotu požadované veličiny A vypočítat pomocí vztahu (viz. vztah (3) a (6)):

$$\bar{A} = \frac{\int A \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) d\mathbf{p}_1 \dots d\mathbf{p}_N d\mathbf{r}_1 \dots d\mathbf{r}_N}{\int \exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right) d\mathbf{p}_1 \dots d\mathbf{p}_N d\mathbf{r}_1 \dots d\mathbf{r}_N}, \quad (30)$$

kde E je energie systému a \mathbf{r}_i a \mathbf{p}_i je poloha a hybnost i -té částice. Pokud veličina, jejíž střední hodnota je počítána, nezávisí na hybnosti, je možné odintegrovat hybnosti (viz. vztah (5)), a získáme tak pouze závislost na polohách částic:

$$\bar{A} = \frac{\int A \exp\left(-\frac{E(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)}{k_B T}\right) d\mathbf{r}_1 \dots d\mathbf{r}_N}{\int \exp\left(-\frac{E(\mathbf{r}_1, \mathbf{r}_2, \dots, \mathbf{r}_N)}{k_B T}\right) d\mathbf{r}_1 \dots d\mathbf{r}_N}. \quad (31)$$

Nejpřímochařejším způsobem výpočtu této střední hodnoty by bylo umístit každou částici do náhodně vygenerovaného místa v prostoru (tímto náhodně vybereme bod v konfiguračním prostoru) a vypočítat energii systému. Tento stav bychom poté zahrnuli do výpočtu střední hodnoty s vahou $\exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right)$. Avšak tato metoda je nepraktická pro systémy s větší hustotou, jelikož v těchto systémech je velká pravděpodobnost výběru konfigurace, kde je $\exp\left(-\frac{E}{k_B T}\right)$ velmi malé, a tudíž je tato konfigurace brána s velmi malou vahou. Proto touto metodou rovnoměrně vzorkujeme celý konfigurační prostor bez ohledu na velikost váhového faktoru, a právě z tohoto důvodu je konvergence této metody velice pomalá.

Efektivnější metodou by bylo nějakým způsobem vybírat body z konfiguračního prostoru, které mají velký váhový faktor, čímž bychom značně urychlili konvergenci při výpočtu střední hodnoty. Takovouto metodou je například Metropolisova metoda (*Metropolisův algoritmus*). V této metodě jsou nové konfigurace generovány z předchozích při využití pravděpodobností přechodu, které závisí na rozdílu energií mezi počátečním a koncovým stavem. Pro relaxační modely je časová závislost popsána mistrovskou rovnicí:

$$\frac{\partial P_n(t)}{\partial t} = -\sum_{m \neq n} [P_n(t) W_{n \rightarrow m} - P_m(t) W_{m \rightarrow n}], \quad (32)$$

kde $P_n(t)$ je pravděpodobnost nalezení systému ve stavu n v čase t a $W_{n \rightarrow m}$ je rychlostní konstanta přechodu $n \rightarrow m$. V rovnováze je časová změna pravděpodobnosti rovna nule, z čehož vyplývá, že oba členy rovnice (32) musí být sobě rovné. Výsledný výraz je znám jako detailní rovnováha:

$$P_n(t)W_{n \rightarrow m} = P_m(t)W_{m \rightarrow n}. \quad (33)$$

Pravděpodobnost výskytu klasického systému v n -tém stavu lze podle [1] vypočítat jako:

$$P_n(t) = \frac{e^{-E_n/k_B T}}{Z}, \quad (34)$$

kde Z je partiční funkce. Bohužel není tato pravděpodobnost většinou známa (nelze ji vypočítat), jelikož neznáme hodnotu partiční funkce. Tomuto problému se ale můžeme vyhnout generací Markovovského řetězce stavů. Pokud generujeme n -tý stav z m -tého stavu, relativní pravděpodobnost je poměr jednotlivých pravděpodobností, a tudíž tato relativní pravděpodobnost nezávisí na neznámé hodnotě partiční funkce. Tímto způsobem dostáváme jediné kritérium pro pravděpodobnost přijetí nového stavu, a to rozdíl energií obou stavů:

$$\Delta E = E_n - E_m. \quad (35)$$

Pro výpočet pravděpodobnosti přijetí nového stavu je možné využít libovolné rychlostní konstanty, která odpovídá podmínce detailní rovnováhy. První volba rychlostních konstant, jenž byla využita ve statistické fyzice, byla Metropolisova [4]:

$$W_{n \rightarrow m} = k_0 \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right) \quad \text{Pro } \Delta E > 0 \quad (36)$$

$$W_{n \rightarrow m} = k_0 \quad \text{Pro } \Delta E < 0 \quad (37)$$

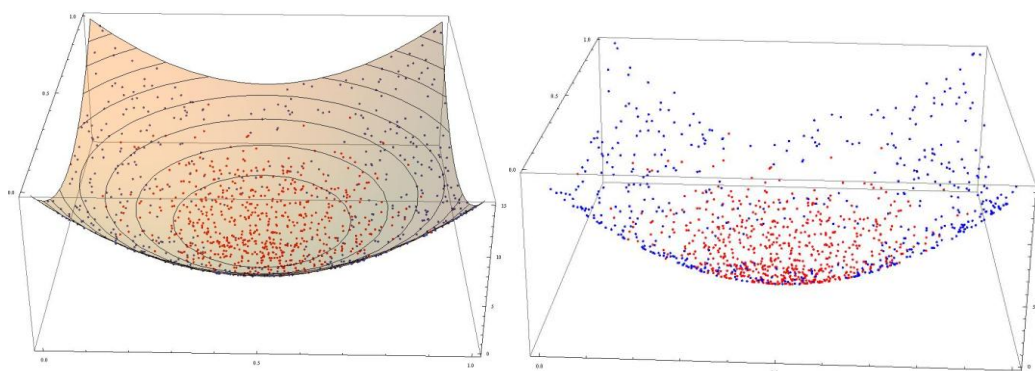
Metropolisův algoritmus [4] pro výpočet nové konfigurace vypadá takto:

1. Zvol počáteční stav
2. Zvol nový stav n
3. Vypočítej energetický rozdíl mezi počátečním stavem a novým stavem n ΔE
 - a. $\Delta E \leq 0$, nový stav je přijat a systém se posune do stavu n
 - b. $\Delta E > 0$, vygeneruje se náhodné číslo r , $0 < r < 1$
 - i. $r < \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right)$, nový stav je přijat a systém se posune do stavu n
 - ii. $r > \exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right)$, systém zůstává v počátečním stavu
4. Pokračuj znovu od 2.

Generace náhodného čísla r musí být z rovnoměrného rozdělení na intervalu (0,1) a volba nového stavu probíhá většinou pomocí náhodného posunutí částice či částic z počátečního stavu. Střední hodnoty se poté vypočítají jako aritmetické průměry hodnot vypočtených pro všechny stavy z Metropolisova algoritmu:

$$\langle A \rangle = \frac{1}{N} \sum_i A_i, \quad (38)$$

kde N je celkový počet kroků Metropolisova algoritmu a A_i jsou hodnoty požadované veličiny vypočtené pro stav systému po i -tém kroku Metropolisova algoritmu. Hodnoty A_i musí být zahrnuty do výpočtu střední hodnoty i pokud se stav systému nezmění. Jelikož nové stavy jsou vybírány s pravděpodobností $\exp(-\frac{\Delta E}{k_B T})$, nemusíme již při výpočtu střední hodnoty $\langle A \rangle$ veličiny A_i násobit váhovým faktorem. Tímto způsobem jsou nejlépe ovzorkována místa konfiguračního prostoru s nejnižší energií, a tudíž s nejvyšší vahou při výpočtu střední hodnoty. Rozdíl mezi přímou metodou Monte-Carlo a Metropolisovým algoritmem je názorně ukázán na obrázku (obr.č.1)



Obr. č.1: Porovnání vzorkování energetického povrchu pomocí náhodných čísel a Metropolisova algoritmu. Červené body byly generovány pomocí Metropolisova algoritmu a modré body byly vygenerovány náhodně z rovnoměrného rozdělení. Z Obrázku je patrné, že pomocí Metropolisova algoritmu jsou nejlépe vzorkovány oblasti s nízkou energií (oblasti s vysokým váhovým faktorem) a hůře oblasti s vysokou energií (oblasti s nízkým váhovým faktorem), což zajišťuje rychlou konvergenci při výpočtu integrálu.

2. Karotenoidy

2.1 Karotenoidy

Po chemické stránce náleží karotenoidy do skupiny tetraterpenoidů tzn., že obsahují převážně 8 isoprenových jednotek [6] (viz obr.č.2). Strukturálně mají karotenoidy formu hydrofóbního polyenového řetězce, který bývá obvykle zakončen cykly, na něž ještě může být připojen kyslík. Na obr. č.2 je zobrazen jeden z takových kyslíkatých karotenoidů.

Fotochemické vlastnosti karotenoidů jsou dány strukturou jejich nízkoenergetických excitovaných stavů. Z důvodu chemické podobnosti karotenoidů s polyeny můžeme v prvním přiblížení aproximovat karotenoidy ze spektroskopického hlediska různě dlouhými polyeny [6]. Změna délky řetězce konjugovaných vazeb má velký vliv na polohu excitovaných stavů. Většina fotochemických vlastností singletních stavů karotenoidů může být popsána jednoduchým energetickým modelem, znázorněným na obr. č.3. (kde S je použito na označení singletních stavů a A, B jsou ireducibilní reprezentace C_{2h} grupy, podle nichž se transformují dané elektronové stavy). $S_2(1^1B_u)$ stavy jsou dobře popsány pomocí HOMO-LUMO přechodů [6] polyenů různých délek. Tento stav pochází z excitace konjugovaného π -elektronového systému. Tudíž při výpočtu této hladiny bereme v potaz pouze delokalizované π -elektrony a vlnové funkce můžeme vypočítat pomocí jednoduché semi-empirické Hückelovy metody [6]. Hückelův hamiltonián má tvar:

$$\langle \phi_\mu | H^{Huckel} | \phi_\nu \rangle = H_{\mu\nu}^{Huckel} = \delta_{\mu\nu} \alpha + (S_{\mu\nu} - \delta_{\mu\nu}) \beta, \quad (39)$$

kde $S_{\mu\nu} \equiv \langle \phi_\mu | \phi_\nu \rangle$ je překryvový integrál atomových orbitalů $|\phi_\mu\rangle$ a α a β jsou parametry metody vypočtené z ionizačních potenciálů valenčních elektronů. Vyřešením vlastního problému:

$$\sum_\nu H_{\mu\nu}^{Huckel} c_{\nu i} = \varepsilon_i \sum_\nu S_{\mu\nu} c_{\nu i}, \quad (40)$$

obdržíme rozvojové koeficienty $c_{\nu i}$ molekulárních orbitalů v bázi atomových orbitalů. Při dosazení hamiltoniánu ze vztahu (39) do rovnice (40) dostáváme:

$$\alpha' \sum_\nu \delta_{\mu\nu} c_{\nu i} = \varepsilon' \sum_\nu S_{\mu\nu} c_{\nu i}, \quad (41)$$

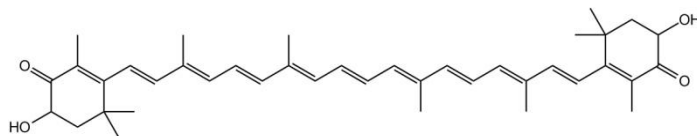
kde $\alpha' = \alpha - \beta$ a $\varepsilon' = \varepsilon - \beta$. Parametr α' je naitován tak, abychom touto metodou obdrželi správné energie HOMO-LUMO přechodu.

Na druhou stranu popis elektronového stavu $S(2^1A_g)$, je mnohem obtížnější a vyžaduje detailní popis korelační interakce elektronů. Vysvětlení nižší energie tohoto stavu než stavu $S_2(1^1B_u)$ vyžaduje vzít v úvahu jak interakce single excitovaných stavů, tak interakce double excitovaných stavů (D-CI) [6]. Kvantitativní shoda s experimentálními měřeními vyžaduje ještě přesnější popis. Například pro vysvětlení mírného růstu energetického rozdílu mezi hladinami $S_2(1^1B_u)$ a stavu $S(2^1A_g)$ při rostoucí délce polyenového řetězce, je nutné zahrnout do výpočtu i interakce s quadruple excitovanými stavy (Q-CI) [6]. Tyto metody se ale stávají velice náročné s rostoucím počtem π -elektronů, a tudíž se tyto přesné výpočty provádějí pouze pro krátké polyeny. Pro delší polyeny se využívá multireferenční double excitovaná konfigurační interakce (MRD-CI). Výsledky z této aproximační

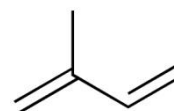
metody jsou srovnatelné s Q-CI na krátkých polyenech a umožňují rozšířit výpočet i na delší polyeny [6]. Nicméně charakteristika stavu $S(2^1A_g)$ naráží i na další problémy. Jelikož přechod $S(1^1A_g) \rightarrow S(2^1A_g)$ je symetricky zakázaný, není také možné charakterizovat tento stav běžnými spektroskopickými metodami.

Obr. č.2: Karotenoidy

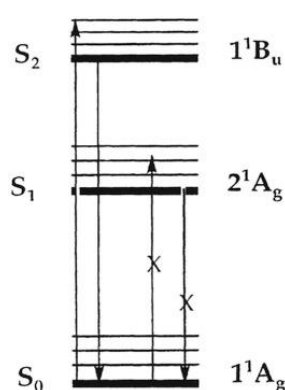
a) Molekula Astaxanthinu



b) Isoprenová jednotka



Obr. č.3: Singletní stavy a přechody karotenoidů



Uspořádání nízkoenergetických singletních stavů polyenů a karotenoidů. Označení hladin souvisí s tím, že tyto molekuly náleží do C_{2h} bodové grupy symetrií. Přeškrtnuté šipky označují zakázané elektronové přechody.

Tripletní stavy karotenoidů (polyenů) jsou hůře experimentálně měřitelné z důvodu chybějící fosforescence. Z tohoto důvodu je nutné využít speciálních metod pro zintenzivnění přechodů mezi $S_1 \rightarrow T_1$. Nejnižší ležící tripletní stav T_1 má symetrii 1^3B_u . Tento tripletní stav leží energeticky níže než nejnižší excitovaný singletní stav, pro krátké karotenoidy asi v polovině S_1 , a tyto stavy jsou velice důležité při fotoinhibici fotosyntézy a zhašení singletního kyslíku.

2.2 Funkce karotenoidů

Karotenoidy mají velmi důležitou funkci v mnoha procesech. Jelikož agregace a samoorganizace karotenoidů je velice důležitá převážně pro fotosyntetické systémy, bude kladen hlavně důraz na jejich vlastnosti spojené s fotosyntézou. Ve fotosyntéze mají karotenoidy dvě hlavní funkce a to sběr (zachytávání) světla (light harvesting) a ochrana fotosyntetického aparátu před vedlejšími procesy fotosyntézy (photoprotection nebo fotoinhibice).

Všechny fotosyntetické organismy jsou kromě reakčních center, která se účastní vlastní přeměny energie, vybaveny také světlosběrnými komplexy (anténami), které mají za úkol transportovat energii (excitaci) získanou excitací po dopadu fotonu do reakčního centra. Bez takovýchto antén, které koncentrují excitaci z několika stovek molekul do reakčního centra, by byla fotosyntéza velice pomalá. Přenos energie

v těchto anténách funguje na principu nezářivého přenosu excitační energie. Mezi tyto nezářivé přechody patří Försterův a Dexterův přenos.

Försterův přenos je založen na dipól-dipólové interakci mezi donorem a akceptorem excitace. K transferu dochází, pokud oscilace opticky vyvolané elektronové koherence donoru jsou v rezonanci s energetickým rozdílem hladin akceptoru. Pro rychlost přenosu excitace mezi donorem a akceptorem platí vztah [9]:

$$k_{D \rightarrow A} = \frac{1}{\tau_D} \left(\frac{R_0}{R_{DA}} \right)^6, \quad (42)$$

kde $k_{D \rightarrow A}$ je rychlost přenosu excitace, τ_D je doba života excitovaného stavu donoru, R_{DA} je vzdálenost donoru a akceptoru a R_0 je kritická vzdálenost, pro kterou platí [9]:

$$R_0^6 = \frac{9000 \ln(10) \theta_D \langle \kappa^2 \rangle}{128 \pi^5 n^4 N} \int_0^\infty d\bar{\nu} \frac{\sigma_{fluor}^D \varepsilon_A(\bar{\nu})}{\bar{\nu}^4}, \quad (43)$$

kde $\bar{\nu}$ je vlnčet v cm^{-1} , σ_{fluor}^D je fluorescenční spektrum donoru, $\varepsilon_A(\bar{\nu})$ je absorpční spektrum akceptoru, N je avogadrovo číslo, θ_D je kvantový výtěžek fluorescence donoru, n je index lomu rozpouštědla a $\langle \kappa^2 \rangle$ je střední hodnota vzájemné orientace dipólů.

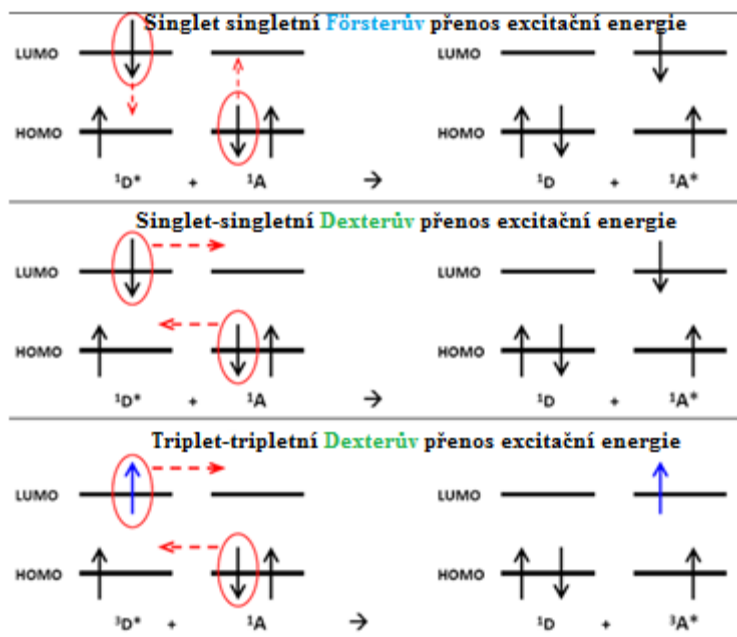
Dexterův přenos excitační energie je na rozdíl od Försterova přenosu založen na výměně elektronů mezi akceptorem a donorem. Při tomto přenosu musí být zachována multiplicita, jelikož přechody, jak zářivé tak nezářivé, mezi stavy s různou multiplicitou jsou spinově zakázané. Z tohoto důvodu může docházet pouze k singlet-singletním a triplet-tripletním přechodům.

Pro rychlost Dexterova přenosu excitace platí vztah [9]:

$$k_{D \rightarrow A} \propto e^{-\frac{2R_{DA}}{L}} \int_0^\infty d\bar{\nu} \frac{\sigma_{fluor}^D \varepsilon_A(\bar{\nu})}{\bar{\nu}^4}, \quad (44)$$

kde L je součet Van der Waalsových poloměrů donoru a akceptoru.

Na rozdíl od Försterova přenosu závisí rychlost Dexterova přenosu excitace exponenciálně na vzdálenosti, a tudíž se tento způsob přenosu excitace uplatní pouze pro malé vzdálenosti donoru od akceptoru. Dále, aby byl možný přenos elektronu mezi donorem a akceptorem, musí docházet k překryvu vlnových funkcí daných molekulárních orbitalů donoru a akceptoru. Pravděpodobnost výměny elektronu mezi donorem a akceptorem závisí exponenciálně na tomto překryvu vlnových funkcí, a odtud tudíž dostáváme exponenciální závislost rychlosti přenosu na vzájemné vzdálenosti ve vztahu (44). Princip Försterova a Dexterova přenosu je názorně vynesena na *obr. č.4*.



Obr. č.4: Dexterův a Försterův přenos excitační energie

Světlosběrné antény fungují jako energetický trychtýř, který přivádí excitaci z libovolného místa antény do reakčního centra [6]. Aby takovýto přenos mohl fungovat, musí být na různých místech antény molekuly s různými energetickými hladinami, aby bylo výhodné pro excitaci postupovat jedním směrem. Karotenoidy absorbují více záření o vyšší energii než chlorofyly, a proto by bylo optimální, aby se karotenoidy nacházeli převážně dále od reakčního centra než chlorofyly. Karotenoidy mají také fotoprotekční funkci, a tudíž se jejich výskyt není striktně omezen pouze na okraj světlosběrných antén, ale nacházejí se také v blízkosti reakčních center.

Kromě světlosběrné funkce a přenosu excitace do reakčního centra mají karotenoidy ve světlosběrných anténách také funkci stabilizační [6]. V krystalových strukturách několika světlosběrných komplexů byly nalezeny karotenoidy, které prostupují skrz lipidovou dvojvrstvu a spojují části světlosběrných komplexů na obou stranách membrány. Tato stabilizační funkce naznačuje, že se karotenoidy podílejí na formování světlosběrných komplexů. Tuto myšlenku potvrzují in vitro experimenty [6], ve kterých docházelo k formování světlosběrných komplexů bez přítomnosti různých karotenoidů. Výsledkem těchto experimentů bylo, že stabilita soustavy vnějšího světlosběrného komplexu LH2 v bakteriích je na rozdíl od vnitřního LH1 závislá na přítomnosti karotenoidů.

Další funkce karotenoidů ve fotosyntetických systémech je fotoinhibice a fotoprotekce [6]. Fotoinhibicí rozumíme omezení přenosu excitační energie z vnějších antén do reakčního centra. Tento proces je velice důležitý, jelikož pokud fotosyntetický systém pohlcuje více světla (energie), než stíhá zpracovat, vznikají nežádoucí produkty vedoucí k poškození fotosyntetického aparátu. Při tomto procesu se využívá vlastnosti karotenoidů popsané dříve, kdy při prodlužování řetězce konjugovaných vazeb (například přechod z violaxanthinu na zeaxanthin) klesá energie hladiny S_1 karotenoidů z energie nad hladinou S_1 chlorofylu (pro violaxanthinu) na energii pod hladinou S_1 chlorofylu (pro zeaxanthin) [6]. Tímto je porušen trychtýřový koncept světlosběrných antén a nedochází tudíž k přenosu excitace do reakčního centra. Ze stavu S_1 dochází k velice rychlé relaxaci, řádově ps, do základního stavu.

V průběhu fotosyntézy mohou vznikat nežádoucí toxické vedlejší produkty jako například singletní kyslík, který je velice agresivním oxidačním činidlem. Tripletní hladina karotenoidů se nachází pod hladinou singletního kyslíku [6], a díky nezářivým přechodům excitační energie dochází k přenosu excitace z kyslíku na karotenoid, kde poté dochází k nezářivému přechodu do základního stavu.

2.2 Agregace

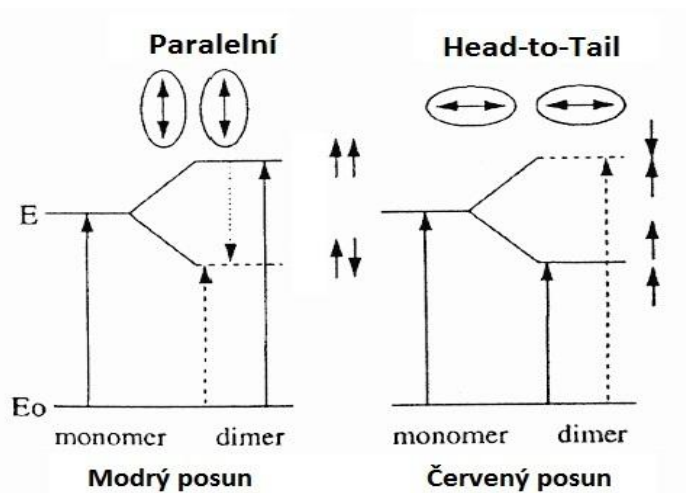
Molekulární agregáty mají velký význam v biologických systémech a mají zásadní roli pro správnou funkci živých organismů. Ze spektroskopických měření absorpčních pásů molekulárních agregátů bylo ukázáno, že během agregace dochází ke dvěma různým posunům v absorpčních spektrech, k posunu absorpčních pásů do delších vlnových délek (červený posun) a k posunu absorpčních spekter do kratších vlnových délek (modrý posun). Tyto odlišné posuny jsou způsobeny tvorbou dvou různých typů agregátů. K červenému posunu dochází při agregaci molekul do volně vázaných agregátů, kde jsou molekuly uspořádány head-to-tail, takovéto agregáty se označují jako J-agregaty. K modrému posunu dochází při agregaci molekul do pevně vázaných agregátů, kde jsou molekuly uspořádány paralelně, takovéto agregáty se označují jako H-agregaty. Typy agregátů jsou názorně zobrazeny na *obr. č.5*.

K posunům v absorpčních spektrech dochází například z důvodu dipól-dipólové interakce mezi molekulami v agregátu. Velikost dipól-dipólové interakce můžeme vyjádřit vztahem [7]:

$$V = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \left(\frac{\vec{\mu}_1 \cdot \vec{\mu}_2}{R^3} - 3 \frac{(\vec{\mu}_1 \cdot \vec{R})(\vec{\mu}_2 \cdot \vec{R})}{R^5} \right), \quad (45)$$

kde $\vec{\mu}_1$ a $\vec{\mu}_2$ jsou dipólové momenty molekul v agregátu a \vec{R} je vektor jejich vzájemných poloh. Pro paralelní agregáty je $\vec{\mu}_1 \cdot \vec{R}$ a $\vec{\mu}_2 \cdot \vec{R}$ rovno nule, a tudíž pro energii dipól-dipólové interakce dostáváme: $V = \mu_1\mu_2/R^3 4\pi\epsilon_0$. Pro takovéto paralelní agregáty dostáváme při agregaci posun excitované hladiny monomeru do vyšších energií, čímž dochází k posunu absorpčního spektra do kratších vlnových délek (modrý posun), viz *obr. č.5*. Pro agregáty typu head-to-tail dostáváme pro dipól-dipólovou interakci $V = -2\mu_1\mu_2/R^3 4\pi\epsilon_0$, a tudíž při tomto způsobu agregace dochází ke snížení excitované hladiny monomeru do nižších frekvencí, což se projeví jako posun absorpčního spektra do vyšších vlnových délek (červený posun), viz *obr. č.5*.

Na vytváření molekulárních agregátů má vliv více faktorů. Mezi tyto faktory patří tvorba vodíkových můstků mezi molekulami, dipólové interakce, Van der Waalsovy interakce a pro hydrofobní molekuly také hydrofobní efekt. Hydrofobní efekt je primárně entropického charakteru. Po vložení hydrofobní molekuly do vody jsou molekuly vody nuceny uspořádat se na povrchu, čímž je snížena celková entropie rozpouštědla. Celkový systém spěje do rovnovážného stavu s maximální entropií, a tudíž s minimální plochou vystavenou vodě, čehož je docíleno pomocí shlukování molekul do agregátů.



Obr. č.5: Posun energetických hladin při formování různých typů agregátů

2.3.1 Agregace karotenoidů

Je známo, že karotenoidy tvoří agregáty, pokud jsou rozpuštěny v hydratovaných polárních rozpouštědlech. Pak je tato agregace charakteristická dramatickou změnou jejich absorpčního spektra. Z absorpčních spekter [5] je patrné, že karotenoidy tvoří dva typy agregátů. První typ, který je spojen s velkým modrým posunem absorpčních spekter a ztrátou vibrační struktury S_2 excitovaného stavu, vytváří H-agregáty, ve kterých jsou konjugované řetězce molekul orientovány víceméně rovnoběžně a tvoří těsný agregát. Modrý posun absorpčního spektra je dán excitonovou interakcí mezi těsně uspořádanými karotenoidy. Druhý typ agregátu, který je charakterizován červeným posunem absorpčního spektra a zachováním vibračního pásu, je J-agregát, ve kterém jsou konjugované řetězce karotenoidů v konfiguraci head-to-tail [5] a díky tomu formují volné seskupení karotenoidů (karotenoidy nejsou v agregátu tak těsně u sebe jako u H-agregátu).

Karotenoidy se vyskytují také v podobě chirálních molekul. Tento jev je považován za důležitý při formování velkých soustav karotenoidů, které mají helikální strukturu [5]. K agregaci karotenoidů dochází v mnoha přírodních i umělých systémech. Karotenoidy typicky agregují v přítomnosti lipidových dvojvrstev, kde dlouhodobá organizace karotenoidů pravděpodobně ovlivňuje dynamické a fyzikální vlastnosti lipidových membrán, chrání dvojvrstvy proti peroxidaci lipidů a tím zabraňují poškození buněk [5]. Geometrická struktura a způsob organizace sousedních molekul většinou určuje, jestli bude docházet k formování agregátu typu J nebo H. V lipidových dvojvrstvách některé karotenoidy tvoří převážně H-agregáty, zatímco jiné tvoří jak H tak i J-agregáty. V umělých systémech většinou dochází k tvorbě H-agregátů při usazování (depozici) karotenoidů na površích či rozhraních. Jelikož agregáty (útvary) karotenoidů připojené na vodivý nebo polovodičový materiál by mohly být použity jako fotoaktivní jednotky v solárních článcích nebo jako molekulové vodiče, je nutné dobře porozumět a popsat všechny efekty, které ovlivňují agregaci, protože správná kontrola agregace je klíčová pro kontrolu efektivity těchto zařízení. Kromě fyzikálních využití mají také hydrosolové částice karotenoidů, obsahující nanoagregáty a mikroskopické krystalky, komerční využití jako složky pro zdravotní doplňky stravy.

Vlastnosti agregovaného karotenoidu se mohou velice lišit od těch, kdy je pouze jako monomer. Toto je důležité pro funkce karotenoidů v různých systémech, jako při absorpci a emisi záření, transferu energie, energetických ztrátách, přenosu elektronu, fotoprotekci a při mechanické stabilizaci.

2.4.1. Excitonový model

Pro odvození vztahů v této a následující kapitole bylo vycházeno z [9] a [11]. V tomto modelu se budeme zabývat pouze dvouhladinovými systémy (základní a excitovaný stav), jelikož se zajímáme hlavně o absorpční spektra (jednofotonový proces). Pro agregované karotenoidy můžeme vypočítat absorpční spektra na základě Frenkelova absorpčního modelu. Pokud dojde k vytvoření agregátů, začnou spolu molekuly karotenoidů interagovat, čímž dochází ke změně energetických hladin. Tato změna energetických hladin vede ke změně absorpčního spektra, které již nebude pouhým součtem příspěvků od monomerů. Agregát obsahující N monomerických jednotek může být popsán pomocí celkového hamiltoniánu H :

$$H = \sum_{n=1}^N H_n^{mon} + H_{int.}, \quad (46)$$

kde $H_{int.}$ je interakční hamiltonián mezi monomerickými jednotkami v agregátu a interakce s lázní a H_n^{mon} je hamiltonián jednotlivých monomerů. V agregátu dochází pouze k přenosu excitace a nedochází k překryvu vlnových funkcí, a tudíž nedochází k delokalizaci elektronů přes různé monomery. Elektronové stavy agregátu můžeme tudíž vyjádřit v bázi adiabatických elektronových stavů jednotlivých molekul. Abychom obdrželi základní stav agregátu, musí být všechny monomery v základním stavu. Pro základní stav agregátu $|G\rangle$ můžeme tudíž psát:

$$|G\rangle = \prod_{n=1}^N |g_n\rangle, \quad (47)$$

kde $|g_i\rangle$ je základní stav i -tého karotenoidu v agregátu. Excitované hladiny agregátu $|E_k\rangle$ s energií přechodu okolo energie Ω přechodu monomeru $S_0 \rightarrow S_2$ můžeme složit z excitovaného elektronového stavu jednoho monomeru a ze základních stavů ostatních monomerů. Tímto způsobem dostáváme:

$$|E_k\rangle = \prod_{n=1}^{k-1} |g_n\rangle \cdot |e_k\rangle \cdot \prod_{m=k+1}^N |g_m\rangle, \quad (48)$$

kde $|e_k\rangle$ je elektronová vlnová funkce excitovaného k -tého monomeru v agregátu. V tomto způsobu popisu předpokládáme, že změna energií excitovaných hladin $|E_k\rangle$ způsobená jejich vzájemnou interakcí (excitonový posun) je výrazně menší než energie Ω , což je ale pro agregáty složené z karotenoidů splněno.

Takto sestavené stavy jednotlivých monomerů nejsou ale vlastními stavy celkového hamiltoniánu H . Excitované vlastní stavy celkového hamiltoniánu agregátu je možné vyjádřit jako lineární kombinaci stavů $|E_k\rangle$. Celkový hamiltonián agregátu interagujícího s lázní je ale možné rozepsat do báze vlnových funkcí $|G\rangle$ a $|E_k\rangle$:

$$H_{agreg} = \sum_{n=1}^N \left[\varepsilon_g^{(n)} + T_n(P) + V_g^{(n)}(Q) \right] |G\rangle \langle G| + \sum_{k=1}^N \left\{ \sum_{n=1}^N \left[\delta_{nk} \varepsilon_e^{(k)} + (1 - \delta_{nk}) \varepsilon_g^{(n)} + T_n(P) + \delta_{nk} V_e^{(k)}(Q) (1 - \delta_{nk}) V_g^{(n)}(Q) \right] |E_k\rangle \langle E_k| \right\} + \sum_{k \neq n} J_{kn} |E_k\rangle \langle E_n| \quad (49)$$

kde velká písmena P a Q označují hybnosti a souřadnice lázně, $V_g^{(n)}$ je vibrační potenciál základního stavu n-tého monomeru, $\varepsilon_g^{(n)}$ je elektronová energie základního stavu n-tého monomeru, T_n je operátor kinetické energie a J_{kn} je coupling mezi dvěma monomerickými jednotkami (interakce mezi dvěma monomerickými jednotkami vystředovaná přes stupně volnosti lázně). Po přeuspořádání vztahu (49) dostáváme:

$$H = [T_n(P) + V_g^{(n)}(Q)] \otimes 1_S + \left(\sum_{n=1}^N \varepsilon_g^{(n)} |G\rangle\langle G| + \sum_{k=1}^N \left\{ \sum_{n=1}^N [\delta_{nk} \varepsilon_e^{(k)} + (1 - \delta_{nk}) \varepsilon_g^{(n)}] |E_k\rangle\langle E_k| \right\} + \sum_{k \neq n} J_{kn} |E_k\rangle\langle E_n| \right) + \sum_{n=1}^N [V_e^{(n)}(Q) - V_g^{(n)}(Q)] |E_n\rangle\langle E_n|, \quad (50)$$

kde první člen odpovídá hamiltoniánu lázně $H_B = T_n(P) + V_g^{(n)}(Q)$, druhý člen by mohl odpovídat hamiltoniánu agregátu a třetí člen hamiltoniánu interakce agregátu s lázní. Poslední člen odpovídá interakci monomerů v rámci agregátu. Pro hamiltonián interakce agregátu s lázní je požadována další podmínka, a to taková, že střední hodnota interakčního hamiltoniánu přes stupně volnosti lázně je nulová $tr_B\{H_{agregat-bath} W_{eq}\} = 0$, kde W_{eq} je rovnovážná matice hustoty agregátu a lázně. Tohoto docílíme zavedením energy gap operátoru

$$\Delta V_{eg}^{(n)} = V_e^{(n)} - V_g^{(n)} - tr_{bath}\{(V_e^{(n)} - V_g^{(n)}) W_{eq}\}. \quad (51)$$

Po posunutí energie základních stavů do nuly dostáváme pro celkový hamiltonián:

$$H = H_B + H_{agregat} + H_{agregat-bath} = H_B + \sum_{n=1}^N \tilde{\varepsilon}_n |E_n\rangle\langle E_n| + \sum_{k \neq n} J_{kn} |E_k\rangle\langle E_n| + \sum_{n=1}^N \Delta V_{eg}^{(n)} |E_n\rangle\langle E_n| \quad (52)$$

kde $\tilde{\varepsilon}_n = \varepsilon_e^{(n)} + tr_{bath}\{(V_e^{(n)} - V_g^{(n)}) W_{eq}\}$.

Tento vztah je možné ještě dále upravit. Diagonalizací hamiltoniánu agregátu $H_{agregat}$ obdržíme vlastní stavy agregátu jako lineární kombinaci původních stavů $|E_n\rangle$. Tyto vlastní stavy $|\alpha_n\rangle$, které diagonalizují $H_{agregat}$, s vlastními čísly $\bar{\varepsilon}_n$, se nazývají excitony. Pokud přepíšeme celkový hamiltonián do těchto stavů, dostáváme diagonální tvar hamiltoniánu agregátu $H_{agregat}$, ale přijdeme o diagonální tvar interakčního hamiltoniánu:

$$H = H_B + \sum_{n=1}^N (\bar{\varepsilon}_n + \Delta V_{nn}) |\alpha_n\rangle\langle \alpha_n| + \sum_{n=1}^N \Delta V_{mn} |\alpha_m\rangle\langle \alpha_n|. \quad (53)$$

Poslední výraz ve vztahu odpovídá přenosu energie mezi elektronovými vlastními stavy hamiltoniánu agregátu, což vede k rozšíření absorpčního spektra. Pro další výpočty spekter budeme považovat tento člen za zanedbatelný vůči rozšíření absorpčního spektra dané čistým rozfázováním, za který je odpovědný diagonální člen ΔV_{nn} a disorder daný různým složením agregátů v měřeném roztoku. Diagonální člen ΔV_{nn} dostaneme z $\Delta V_{eg}^{(n)}$ přechodem do excitonové báze:

$$\Delta V_{nn} = \sum_{k=1}^N |\langle \alpha_n | E_k \rangle|^2 \Delta V_{eg}^{(k)}. \quad (54)$$

2.4.2. Výpočet absorpčních spekter

Pro výpočet absorpčních spekter vycházíme ze vztahu (53) se zanedbáním přenosu energie mezi elektronovými vlastními stavy $|\alpha_n\rangle$. Pro spektroskopický popis je nutné k celkovému hamiltoniánu systému (agregátu) přidat interakční člen molekul s elektromagnetickým zářením. Jelikož jsou molekuly karotenoidů malé oproti vlnové délce záření, je možné pro výpočet interakčního hamiltoniánu použít dipólovou aproximaci:

$$H_{inter} = \boldsymbol{\mu} \cdot \mathbf{E}(t), \quad (55)$$

kde $\boldsymbol{\mu}$ je operátor dipólového momentu systému a $\mathbf{E}(t)$ je elektrická intenzita dopadajícího záření. Operátor dipólového momentu způsobuje přechody mezi základní hladinou a excitovanými hladinami, a tudíž může být rozepsán:

$$\boldsymbol{\mu} = \sum_n \mathbf{d}_{Gn} |G\rangle \langle \alpha_n| + \mathbf{d}_{Gn}^* |\alpha_n\rangle \langle G|, \quad (56)$$

kde \mathbf{d} je dipólový moment přechodu, který je nezávislý na rozpouštědle. Při průchodu záření látkou dochází k polarizaci látky a tudíž k absorpci. Intenzita záření prošlého látkou může být vyjádřena pomocí Beerova zákona:

$$I_{prosle} = I_0 e^{-\alpha(\omega)z}, \quad (57)$$

kde I_{prosle} je intenzita záření po průchodu vzorkem, I_0 je intenzita záření dopadajícího na vzorek, z je tloušťka vzorku a $\alpha(\omega)$ je absorpční koeficient, který je obecně závislý na frekvenci záření ω . Absorpční koeficient může být vyjádřen pomocí imaginární složky lineární susceptibility $\chi(\omega)$ [8]:

$$\alpha(\omega) = \frac{4\pi\omega}{n(\omega)c} \text{Im}\{\chi(\omega)\}, \quad (58)$$

kde $n(\omega)$ je index lomu světla ve vzorku a c je rychlost světla. Susceptibilitu můžeme dále vyjádřit pomocí odezvy prvního řádu $S^{(1)}(t)$. Po dosažení vyjádření susceptibility jako funkce odezvy prvního řádu, můžeme pro absorpční koeficient tudíž psát [8]:

$$\alpha(\omega) = \frac{4\pi\omega}{n(\omega)c} \text{Im}\left\{\int_0^\infty dt S^{(1)}(t) e^{i\omega t}\right\}. \quad (59)$$

Pro dvouhladinový systém interagující s lázní složenou z harmonických oscilátorů je možné vyjádřit funkci odezvy prvního řádu, s využitím kumulantního rozvoje, pomocí lineshape funkce $g(t)$ a energy gap korelační funkce $C(t)$:

$$S_1(t) = \frac{i}{3\hbar} |d|^2 e^{-g(t)-i\omega_{eg}t} = \frac{i}{3\hbar} |d|^2 e^{-\int_0^t d\tau \int_0^\tau d\tilde{\tau} C(\tilde{\tau}) - i\omega_{eg}t}, \quad (60)$$

kde $1/3$ pochází ze středování přes všechny možné orientace dipólových momentů, ω_{eg} je energie přechodu mezi základním a excitovaným stavem. Energy gap korelační funkce $C(t)$ má tvar:

$$C(t) = \text{tr}_B \left\{ e^{\frac{i}{\hbar} H_B t} \Delta V_{eg} e^{-\frac{i}{\hbar} H_B t} \Delta V_{eg} W_{eg} \right\}. \quad (61)$$

Absorpční koeficient pro excitonový model obdržíme modifikací vztahu (58) a (60) pro funkci odezvy pro dvouhladinový systém:

$$\alpha(\omega) = \frac{4\pi\omega}{3n(\omega)c\hbar} \langle \sum_n |d_n|^2 \text{Re} \int_0^\infty d\omega e^{-g_{nn}(t)-i(\omega_{ng}-\omega)t} \rangle_{diss.}, \quad (62)$$

kde $\langle \dots \rangle_{diss}$ značí středování přes energy gap disorder, d_n je dipólový moment přechodu na n -tý vlastní stav agregátu a $g_{nn}(t)$ je lineshape funkce odpovídající energy gap operátoru ΔV_{nn} . Středování přes energy gap disorder musí zahrnouto, jelikož karotenoidy se v reálném roztoku různě ohýbají, čímž dochází k posunu energetických hladin a tudíž ke změně přechodové frekvence.

3. Experimentální a teoretické práce

3.1 Experimenty

Pro získání informací o formování agregátů je nutné studovat vodné roztoky s vodou mísitelným rozpouštědlem, jako je například etanol nebo aceton. Při měření absorpčních spekter těchto roztoků byla zjištěna závislost mezi poměrem etanol-voda, který dává polovinu maximální agregace a nejdelší vlnovou délku λ_{max} absorpčního pásu vzniklého po agregaci. Za samouspořádávání karotenoidů mohou pravděpodobně hydrofobické interakce.

Experimentální data a interpretace byla převzata z [6] a [11]. Absorpční pás ve spektru astaxanthinu na obr. č.6 náleží $S_0 \rightarrow S_2$ přechodu. Energeticky nižší přechod $S_0 \rightarrow S_1$ je běžnými spektroskopickými metodami nedetekovatelný, jelikož první excitovaný stav S_1 náleží stejné symetrii jako základní, a tudíž je tento přechod symetricky zakázaný a pro jednofotonovou spektroskopii neviditelný.

Absorpční maximum přechodu $S_0 \rightarrow S_2$ astaxanthinu rozpuštěného v čistém acetonu bylo naměřeno pro 478nm (viz obr. 6). Při zvyšování koncentrace vody v roztoku dochází ke změně barvy vzorku a posunu maxima absorpčního pásu. Na obr. č.6 jsou zobrazena absorpční spektra tří roztoků s různými poměry voda-aceton. Pro roztok s poměrem koncentrací aceton-voda 1:9, bylo naměřeno absorpční maximum karotenoidů pro vlnovou délku 450nm, zatímco pro poměr koncentrací 3:7 byly pozorovány dva absorpční pásy s maximy pro 520nm a 562nm. V roztocích o velkých koncentracích vody dochází k modrému posunu přechodu $S_0 \rightarrow S_2$. Pro roztoky s vysokou koncentrací acetonu dochází naopak k opačnému červenému posunu absorpčních spekter. Tento posun v absorpčních spektrech ale není vidět pro roztoky s přibližně 50% koncentrací acetonu v roztoku, jelikož spektrum astaxanthinu v roztoku s koncentracemi 1:1 má skoro stejné absorpční spektrum jako astaxanthin v čistém acetonu.

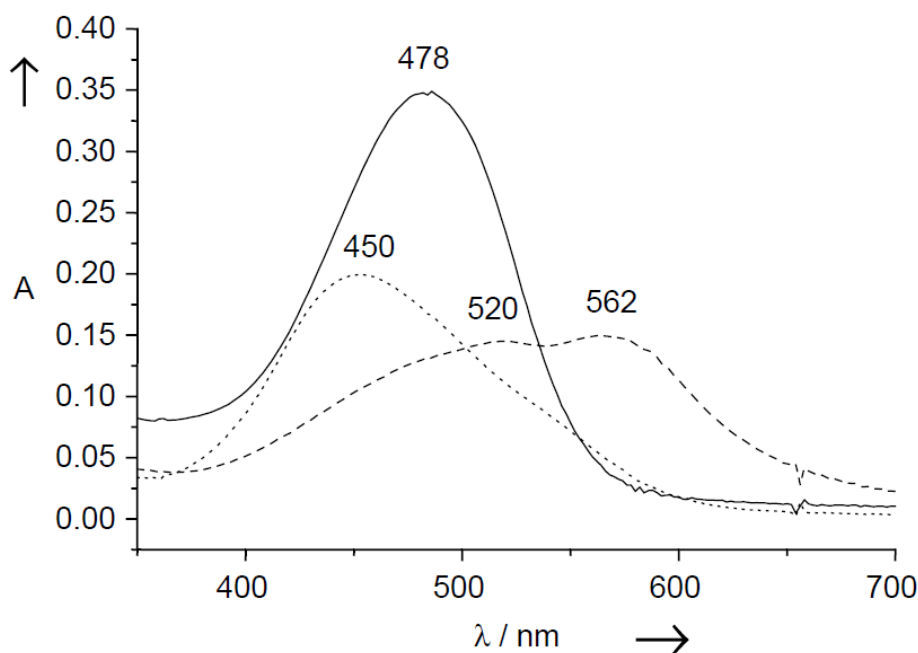
Obecně lze tedy říci, že absorpční spektra se mohou měnit v závislosti na dvou různých jevech, které jsou vyvolané působením rozpouštědla. Jedním z těchto jevů je působení rozpouštědla jako dielektrika a závisí na velikosti dielektrické konstanty a indexu lomu rozpouštědla. Tento jev se nazývá solvatochromismus. Frekvence přechodů $S_0 \rightarrow S_2$ ve spektrech karotenoidů mohou být výrazně ovlivněny volbou rozpouštědla. Na druhou stranu změna koncentrace vody v rozpouštědle vyvolá pouze malé změny indexu lomu. Tyto změny jsou příliš malé, aby způsobily tak velký posun v absorpčních spektrech, jaký byl naměřen (obr. č.6). Z tohoto důvodu, po vyloučení tohoto jevu, může být posun ve spektrech připsán formování

H-agregátů pro modrý posun spekter a dva červené posuny spekter mohou být vysvětleny formováním dvou různých typů J-agregátů.

Existence dvou různých typů J-agregátů může být ověřena pomocí měření fluorescence. Podle Davydovova excitonového modelu pro J-agregáty dochází k fluorescenci ze stavu o nejnižší energii. Při fluorescenci se využívá 514.5nm excitační vlnové délky, čímž dostaneme excitační energii vyšší než je energie obou přechodů J-agregátů. Pokud by spektrum náleželo pouze jednomu druhu agregátu, pak by výsledné emisní vlnové délky fluorescence byly delší než 562nm. Jelikož ale emisní vlnové délky fluorescence začínají na 543nm, náleží absorpční pásy na 520nm a 562nm dvěma různým druhům J-agregátů. Další důkaz přítomnosti agregátů v roztoku poskytuje měření Ramanova rozptylu. Ve spektrech Ramanova rozptylu karotenoidů lze rozlišit agregáty od monomerů pomocí posunu vibračních frekvencí. Například stretching vibrace C=C konjugovaného řetězce v agregátu je 1516cm^{-1} , ale pokud se vyskytuje jako monomer tak je 1546cm^{-1} .

Jelikož astaxanthin obsahuje kromě řetězce konjugovaných vazeb také OH skupiny na koncových cyklech, je pravděpodobné, že tyto skupiny se také podílejí formováním vodíkových vazeb na formování agregátů. Tento předpoklad může být potvrzen porovnáním spekter r,r-astaxanthinu a r,s-astaxanthinu rozpuštěných v roztoku vody a acetonu. Absorpční spektra obou stereoisomerů v čistém acetonu jsou nerozlišitelná, ale spektra r,s-astaxanthinu v roztoku vody a acetonu v poměru 9:1 vykazují přítomnost dvou různých druhů H-agregátů místo jednoho pro r,r-astaxanthin. V roztoku vody a acetonu v poměru 7:3 jsou ale spektra obou stereoisomerů stejná, z čehož lze usoudit, že oba stereoisomery budou tvořit stejné J-agregáty, a tudíž stabilizační vlastnosti OH skupin se projeví pouze pro velké koncentrace vody v roztoku.

Další informace o agregaci mohou být zjištěny z měření cirkulárního dichroismu (CD). Na spektrech cirkulárního dichroismu astaxanthinu v roztoku vody a acetonu v poměru 9:1 dochází ke změně znaménka na 436nm poblíž maxima absorpce H-agregátů (450nm). Jelikož pro dimery dochází ke změně znaménka pro maximum absorpce, tak se v tomto roztoku vyskytují agregáty s větším počtem než dva karotenoidy. Dále lze ze spekter CD vyčíst, že monomerní jednotky v H-agregátu nejsou (nemusí být) přesně paralelní změna znaménka ve spektru odpovídá levotočivé helikální struktuře H-agregátů. Ze spekter CD astaxanthinu v roztoku vody a acetonu v poměru 7:3, ve kterém se vyskytují dva typy J-agregátů, lze pozorovat pro agregáty s vyšší energií přechodu stejnou změnu znaménka jako pro H-agregáty. Z tohoto je tudíž patrné, že tyto J-agregáty také vykazují levotočivou helikální strukturu. Na druhou stranu ze spekter CD pro J-agregáty s nižší energií přechodu je patrné, že tyto agregáty vykazují pravotočivou helikální strukturu.



Obr. č.6: Absorpční spektra astaxanthinu v roztocích o různých koncentracích vody v roztoku. Plnou čarou je zobrazeno absorpční spektrum astaxanthinu v čistém acetonu. Čárkovaně je zobrazeno absorpční spektrum astaxanthinu v roztoku vody a acetonu v poměru 7:3 a tečkovaně v roztoku vody a acetonu v poměru 9:1

3.2 Teoretické práce

Experimentální popis efektů agregace karotenoidů, zejména astaxanthinu, dobře popisuje změny spekter způsobené agregací, ale pro porozumění principu agregace a efektů, které na ni mají vliv, je nutný i její teoretický popis. Pro popis agregace astaxanthinu byly pro interakce molekul astaxanthinu v rámci agregátu provedeny výpočty na základě Frenkelova excitonového modelu [13]. V tomto případě byl studován roztok astaxanthinu v rozpouštědle voda-DMSO (dimethylsulfoxid) v různém poměru. Výpočty spekter byly provedeny pomocí excitonového modelu, ve kterém nebyly explicitně zahrnuty vibrační módy, ale byly popsány pomocí energy gap korelační funkce. Astaxanthin byl v tomto modelu reprezentován dvěma hladinami: základní stav S_0 ($|g\rangle$) a excitovaný stav S_2 ($|e\rangle$). V tomto modelu nebylo počítáno s hladinou S_1 jelikož, jak již bylo popsáno dříve v oddíle 2.1, je přechod $S_0 \rightarrow S_1$ symetricky zakázaný. Simulace dimeru pomocí metod molekulové dynamiky ukazují, že karotenoidy ve vodě mají tendenci minimalizovat vystavení jejich hydrofobního řetězce vodě, a tudíž pro roztoky s velkou koncentrací vody je nejpravděpodobnější konfigurace paralelního dimeru. Pro takový druh agregátu dochází k modrému posunu absorpčních spekter. Jelikož pro 50-60% koncentrace vody v rozpouštědle dochází k červenému posunu, je zřejmé, že dochází k formování agregátů typu head-to-tail. Pro popis absorpčního spektra byla vypočítána spektra reprezentantů dvou různých vzájemných pozic karotenoidů v agregátu [13]. Je pravděpodobné, že spektrum roztoku nebude obsahovat pouze jeden druh agregátu o určitém počtu karotenoidů, ale spíše bude složeno z příspěvků různých druhů agregátů, které se vyskytují v roztoku s různou pravděpodobností, která závisí na koncentraci vody v roztoku. Jelikož zatím není žádný model, pomocí kterého by bylo možné vypočítat tuto distribuci pravděpodobností, byl zvolen přístup, kde fluktuace

ve strukturách agregátů byly simulovány pomocí fluktuace energie excitované hladiny karotenoidů v několika vybraných strukturách.

Pomocí předem nastíněného postupu a po zvážení dalších relevantních vlastností agregovaných karotenoidů, byla vypočítána normalizovaná spektra monomerů, dimerů, trimerů a dalších větších agregátů. Pomocí kombinace těchto agregátů bylo nafitováno absorpční spektrum astaxanthinu pro různé poměry vody a DMSO. Z tohoto přístupu dostaneme také kvantitativní náhled na poměry koncentrací různých typů agregátů v roztoku.

Tyto teoretické výpočty [13] vedou k několika zajímavým závěrům. Pro 50% koncentraci vody v rozpouštědle dochází k červenému posunu absorpčního spektra a dochází tedy k formování J-agregátů. Experimentální absorpční spektrum může být velice dobře reprezentováno složením příspěvků monomerů a dimerů o velkých koncentracích, což vytvoří charakteristický tvar spektra, a přidání malého množství větších agregátů vede k dobrému fitu experimentálních spekter. Pro vyšší frekvence je možné obdržet ještě lepší shodu s experimentálním spektrem po zahrnutí příspěvků od paralelního dimeru. Z toho vyplývá, že při malých koncentracích vody (50%) se pravděpodobně nachází v roztoku ještě značné množství monomerů a dochází k formování převážně malých agregátů typu J, avšak dochází již také k formování malých agregátů typu H (paralelních dimerů).

Pro roztoky s vysokou koncentrací vody (90%) dochází k formování H-agregátů. Absorpční spektrum může být dobře nafitováno pomocí příspěvků od monomerů, dimerů a trimerů, ve kterých jsou karotenoidy uspořádány paralelně, se zahrnutím malého příspěvku od dimerů typu head-to-tail. Můžeme tedy, obdobně jako pro malé koncentrace vody, předpokládat, že se v roztoku pravděpodobně nachází ještě monomerní karotenoidy, ale nejvýhodnější je pro karotenoidy tvořit malé agregáty, ve kterých jsou uspořádány paralelně, a to z důvodu minimalizace povrchu hydrofobního konjugovaného řetězce, který je vystaven vodě. Na druhou stranu se v roztoku pravděpodobně nachází i malé množství dimerů typu head-to-tail.

4. Vypracování

4.1 Porovnání interakcí

Formování různých druhů agregátů v roztoku v závislosti na koncentraci vody v roztoku je obecně známý fakt (viz experiment). Avšak mechanismus proč a jakým způsobem dochází pro nízké koncentrace vody k formování J-agregátů a pro velké koncentrace vody naopak k formování H-agregátů není ještě stále plně objasněn a vysvětlen. Hlavním problémem je nalezení pravděpodobnostní distribuce různých typů a velikostí agregátů v roztoku v závislosti na koncentraci vody v roztoku.

Tato práce by měla přinést (detailní) termodynamický popis agregace a fluktuací struktur agregátů, což je nezbytné pro teoretický výpočet spekter a pochopení způsobu agregace.

Abychom mohli začít popisovat agregaci karotenoidů, musíme nejdříve zjistit, jaké interakce se na agregaci podílejí. Na agregaci karotenoidů se obecně podílí čtyři hlavní interakce (*Viz obr. č.7*). Tyto interakce jsou hydrofobní interakce konjugovaných řetězců s vodou, tvorba vodíkových můstků mezi -OH skupinou a kyslíkem na konečném cyklu karotenoidů, dipól-dipólová interakce mezi kyslíky na konečných cyklech karotenoidů a disperzní síly mezi karotenoidy. Ne vždy jsou všechny tyto interakce přítomny, jelikož přítomnost některých interakcí závisí na přesném chemickém složení jednotlivých karotenoidů.

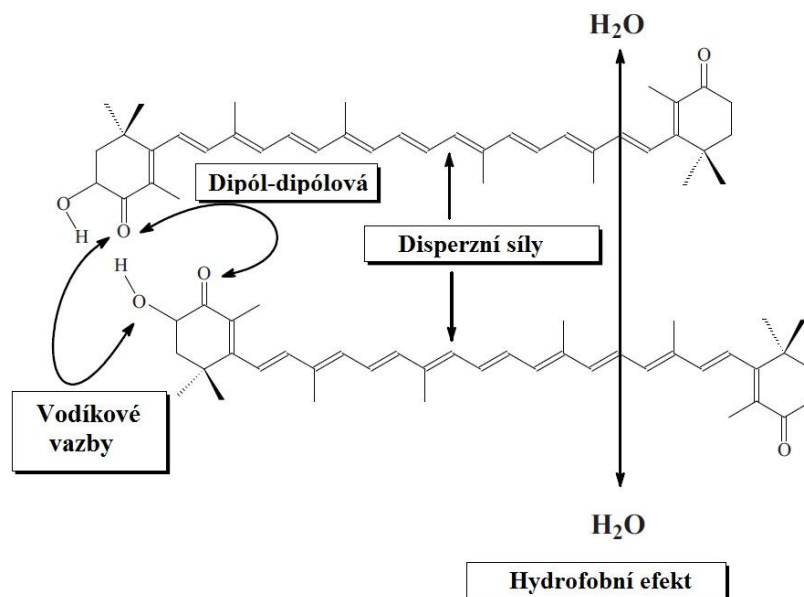
Disperzní Londonovské síly jsou velmi slabé síly Van der Waalsovského charakteru mezi molekulami, které pocházejí z interakcí mezi indukovanými multipóly v molekulách. Londonovské síly se projevují v nepolárních molekulách z důvodu korelace pohybu elektronů v molekulách. Pokud se k sobě přiblíží dvě molekuly, dochází k redistribuci jejich elektronových hustot, čímž dochází k indukování multipólů. Londonovské síly jsou vždy přitažlivé a jejich velikost roste s velikostí molekuly. Tento růst je způsoben tím, že větší molekuly mají větší polarizabilitu a tudíž dochází k větší změně v distribuci elektronových hustot. Pro velikost interakce mezi dvěma indukovanými dipóly lze odvodit vztah:

$$E_{A \leftrightarrow B} = -\frac{3}{2} \frac{I_A I_B}{I_A + I_B} \frac{\alpha_A \alpha_B}{R^6}, \quad (63)$$

kde I_A a I_B jsou ionizační potenciály molekul či atomů, α_A a α_B jsou polarizability molekul (atomů) a R je vzdálenost molekul (atomů). Londonovské síly jsou obecně slabší než vodíkové vazby a než interakce mezi permanentními dipóly, ale jelikož jsou tyto interakce přítomné pro všechny atomy a molekuly, tvoří tedy většinou hlavní část celkové interakční energie v kondenzovaných systémech.

Další interakcí je dipól-dipólová interakce mezi polárními skupinami karotenoidů. Mezi tyto skupiny patří C-OH skupina a C=O skupina. Velikost této interakce tudíž závisí na konkrétním chemickém složení karotenoidů. Pro velikost dipól dipólové interakce platí vztah (45). Velikost této interakce oproti disperzní interakci klesá se třetí mocninou vzdálenosti a tudíž se projeví i na delší vzájemné vzdálenosti karotenoidů.

Další interakcí, která také závisí na konkrétním složení, je tvorba vodíkových můstků (vazeb). K tvorbě vodíkových můstků dochází dvěma způsoby, a to buď přímo mezi skupinami -OH...O=C karotenoidů, nebo také přes molekuly vody, která se vodíkovými můstky naváže na skupinu -OH i na skupinu C=O sousedícího karotenoidu. Oba tyto způsoby přispívají ke stabilizaci struktury agregátu.



Obr. č.7: Interakce mezi karotenoidy, které by mohly mít vliv na agregaci karotenoidů ve vodných roztocích

Tyto interakce jsou silnější než disperzní i dipól-dipólové interakce (řádově jednotky kcal/mol), ale dochází k nim pouze mezi specifickými skupinami a proto jejich vliv na formování a stabilizaci agregátu nemusí být tak velký.

Posledním typem interakcí jsou hydrofobní interakce polyenového řetězce. Po vložení hydrofobní molekuly do vodného roztoku dochází k narušení dynamického systému vodíkových vazeb mezi molekulami vody, a molekuly vody jsou nuceny se uspořádat okolo povrchu hydrofobní molekuly. Takovéto uspořádání molekul vody je entropicky nevýhodné, jelikož se molekuly nemohou volně pohybovat v celém prostoru. Pokud je ve vodném roztoku více hydrofobních molekul, celkový systém se snaží maximalizovat svou entropii. K této maximalizaci dochází prostřednictvím shlukování (agregací) hydrofobních molekul. Při utvoření agregátu dochází ke snížení povrchu molekul, který je vystavený vodě, a tudíž se musí méně molekul vody uspořádat, což vede ke zvýšení entropie systému a tudíž k jeho stabilizaci.

Otázkou stále ale zůstává, které interakce mají hlavní vliv na vytváření agregátů karotenoidů, nebo jestli je nutná přítomnost všech těchto interakcí. Odpověď na tuto otázku můžeme najít v experimentálních spektroskopických měřeních a v molekulárně dynamických simulacích agregace karotenoidů. Z těchto prací můžeme vyvodit několik závěrů. Jelikož se stabilizační vlastnosti OH skupin (tvoření vodíkových můstků přímo mezi molekulami ataxanthinu nebo přes vodu [5]) projeví pouze při velkých koncentracích vody, lze tyto interakce považovat za slabé a v prvním přiblížení je zanedbat. Podobnou úvahu můžeme udělat pro disperzní i dipól-dipólovou interakci, jelikož při nepřítomnosti vody v roztoku nedochází k formování agregátů. Což naznačuje, že tyto interakce nemají hlavní roli při formování agregátů, a tudíž lze tyto interakce v prvním přiblížení zanedbat. Velikost těchto interakcí **nezávisí na přítomnosti vody** v roztoku, a tudíž kdyby tyto interakce hrály hlavní roli při formování agregátů, docházelo by k agregaci i pro roztoky bez přítomnosti vody. Tato pozorování nás přivádějí na myšlenku, že hlavní roli v agregaci karotenoidů hrají hydrofobní interakce karotenoidů. Toto je velice důležitý, ale rozumný předpoklad pro další úvahy a popis agregace. Tento

předpoklad nebude splněn pro některé speciální případy, které jsou vysvětleny a popsány dále. Bude diskutována i jejich důležitost, a také budou navrženy různé způsoby vylepšení popisu agregace, které by dobře popisovaly i tyto speciální stavy.

4.2 Solvatační energie

Pro fyzikální popis hydrofobního efektu musíme nějakým způsobem vyjádřit energii a síly s ním spojené. Pro výpočet energie spojené s hydrofobním efektem je nutné se nejdříve podívat na energii, která je spojená s vložením hydrofobní molekuly do vodného roztoku. Tato energie se nazývá solvatační energie a pro její úplný popis je vhodné využít Gibbsovy volné energie, a to ze dvou hlavních důvodů. Prvním z těchto důvodů je, že většina chemických reakcí, a tudíž i solvatace, probíhá při konstantní teplotě a tlaku, a tak i pro fyzikální popis je vhodné zvolit veličinu, která tuto vlastnost reprezentuje. Dalším důvodem pro využití Gibbsovy energie je, že v ní jsou zahrnuty jak energetická stránka solvatace, tak i entropická stránka spojená s uspořádáním molekul vody. Kolem hydrofobní molekuly dochází k uspořádání molekul vody a hydrofobní molekula se tudíž nachází v místě roztoku, kde se nenachází žádná molekula vody. Solvatační energie nám v podstatě říká, kolik energie je potřeba a jaký je entropický přírůstek pro vytvoření kavity (prázdný prostor) uvnitř roztoku, v němž se nenachází žádná molekula vody, a do které se poté vloží hydrofobní molekula. Jak již bylo vysvětleno dříve, Van der Waalovy interakce a interakce vody s hydrofilními skupinami jsou příliš slabé, aby způsobily vytvoření rozhraní molekuly a vodného roztoku, ale ovlivňují pozici tohoto rozhraní. Následující popis výpočtu solvatační energie bude pro názornost proveden pro jednoduchý příklad kulové hydrofobní molekuly (*viz. [8]*). Tento výpočet je obecný a může být rozšířen i na molekuly jiných tvarů. Obecně existují různé způsoby vytvoření kavity, které závisí na její velikosti. Malé sférické kavity s průměry menšími než 0.5nm jsou tak malé, že nedochází k narušení sítě vodíkových vazeb mezi molekulami vody, ale dochází k orientaci molekul vody okolo kavity tak, aby byla možná tvorba vodíkových vazeb. Naopak pro velké kavity s povrchem větším než 1nm² už není možná pouze reorientace molekul, ale dochází již k narušení sítě vodíkových vazeb mezi molekulami vody. Při vytvoření takovéto velké kavity v roztoku dochází ke ztrátě průměrně méně než jedné vodíkové vazby pro každou molekulu vody na povrchu kavity, čímž dochází k vytvoření rozhraní, které je podobné jako rozhraní mezi kapalinou a plynem.

Vytvoření kavity v roztoku znamená, že se v objemu kavity nenachází žádná molekula vody. Ze vztahů (7), (8) a (10) vyplývá, že změnu Gibbsovy volné energie ΔG_V související s vytvořením tohoto stavu můžeme v systému za konstantního tlaku a objemu vyjádřit jako:

$$\Delta G_V = -k_B T \ln(Z_V) + k_B T \ln(Z) = -k_B T \ln(Z_V/Z), \quad (64)$$

kde k_B je Boltzmanova konstanta, Z je partiční funkce systému bez vytvořené kavity a Z_V je partiční funkce systému s vytvořenou kavitou o objemu V . Podíl partičních funkcí Z_V/Z lze vyjádřit jako součet všech pravděpodobností stavů systému, ve kterých v objemu V neleží žádná molekula vody. Pro celkovou změnu Gibbsovy energie lze tudíž psát:

$$\Delta G_V = -k_B T \ln(P_V(0)), \quad (65)$$

kde $P_V(N)$ je pravděpodobnost nalezení N molekul vody v objemu V . Pro malé objemy je tato pravděpodobnost skoro přesně Gaussovská a tudíž pro pravděpodobnost nalezení x částic v prostoru V platí vztah:

$$P_V(x) = \frac{1}{\sqrt{2\pi\chi_V}} \exp\left(-\frac{(x-\langle N \rangle_V)^2}{2\chi_V}\right), \quad (66)$$

kde $\langle N \rangle_V = V\rho$ je střední počet molekul v objemu V čistého rozpouštědla (vody) o hustotě ρ a χ_V je fluktuace v počtu molekul. Po dosazení těchto vztahů do rovnice (65) dostáváme pro změnu Gibbsovy energie a dle [8] pro fluktuace počtu částic χ_V :

$$\Delta G_V \approx \frac{k_B T \rho^2 V^2}{2\chi_V} + k_B T \frac{\ln(2\pi\chi_V)}{2}, \quad (67)$$

$$\chi_V = \langle (\delta N)^2 \rangle_V = \rho V + \rho^2 \int_V dr \int_V d\tilde{r} [g(|r - \tilde{r}|) - 1], \quad (68)$$

kde integrace probíhá přes objem kavity a $g(r)$ je radiální distribuční funkce pro čisté rozpouštědlo. Jelikož radiální distribuční funkce $g(r)$ je 1 pro vzdálenosti delší než korelační délka rozpouštědla, z čehož vyplývá že χ_V je zhruba úměrné V .

Pokud se na problém vytvoření kavity podíváme z makroskopického pohledu, tak vytvoření kavity znamená vytvoření rozhraní podobného jako mezi kapalinou a plynem. Vytvoření takového rozhraní je spojeno s rozdílem Gibbsovy energie:

$$\Delta G_V \approx \sigma A_V, \quad (69)$$

kde σ je povrchové napětí vody a A_V je plocha kavity.

Stále ale zůstává otázkou, který z těchto dvou vztahů využít. Dle [8] je nejlepší využít kombinaci těchto dvou vztahů, která upřednostňuje proces s menší ΔG_V a tudíž ten pravděpodobnější:

$$\Delta G_V^{-1} \approx (\sigma A_V)^{-1} + \left[\frac{k_B T \rho^2 V^2}{2\chi_V} + k_B T \frac{\ln(2\pi\chi_V)}{2} \right]^{-1}. \quad (70)$$

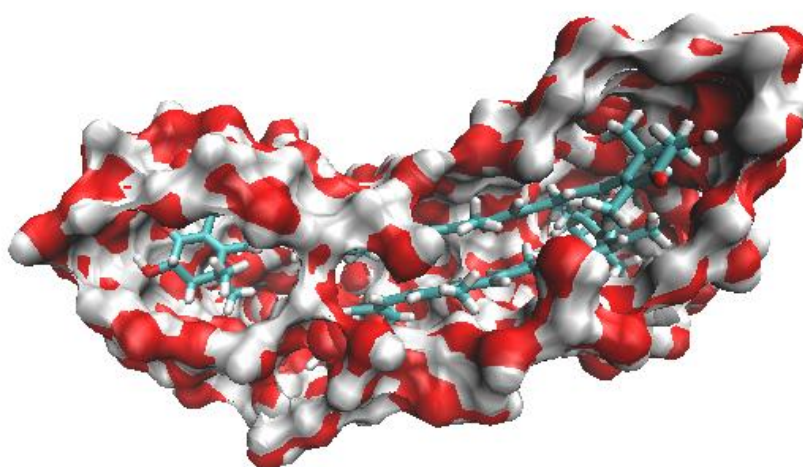
4.3 Agregace a solvatační energie

Při agregaci nejde o vytvoření kavity či solvataci molekuly, ale dochází zde k podobnému jevu. Kolem hydrofobní molekuly se ve vodě vytvoří solvatační obálka (kavita), jak již bylo vysvětleno dříve, a molekuly vody jsou nuceny se uspořádat kolem hydrofobní molekuly. Celý tento proces je spojený se změnou Gibbsovy energie ΔG_V . Celý systém se snaží maximalizovat svou entropii, a tudíž minimalizovat Gibbsovu energii ΔG_V . Při agregaci dochází ke snížení objemu i povrchu kavity jednotlivých karotenoidů prostřednictvím formování agregátů.

Při vytváření agregátů dochází k velké změně povrchu kavity (povrchu agregátu, který je vystaven vodě), jelikož některé karotenoidy jsou uzavřeny uvnitř agregátu, a nejsou tudíž v kontaktu s vodou, proto jejich povrch nepřispívá k celkovému povrchu kavity. Celkový povrch kavity tvoří tudíž pouze povrchy karotenoidů, které jsou vystaveny vodě viz *Obr.č.8* a *P.3*. Toto ale neplatí pro objem kavity. Molekuly karotenoidů se nemohou přiblížit libovolně blízko k sobě a existuje tudíž nějaká minimální vzájemná vzdálenost karotenoidů. Při přiblížení dvou karotenoidů dochází k překrytí jejich kavit, čímž dochází k vytěsnění molekul vody z oblasti mezi karotenoidy, ale karotenoidy se nemohou přiblížit úplně k sobě, a tak zůstávají

v určité vzdálenosti od sebe. Při tomto procesu se překrytím dvou kavit (solvatačních obálek) jednotlivých karotenoidů vytvoří jedna velká kavita, která bude mít menší povrch, jelikož v oblasti mezi karotenoidy se už nenachází žádná molekula vody. Na rozdíl od povrchu kavity nedochází k příliš velké změně objemu kavity. Při překrytí jednotlivých kavit dochází sice ke snížení objemu celkové kavity, ale kvůli minimální vzájemné vzdálenosti, ve které se karotenoidy mohou nacházet, je tato změna velice malá v porovnání se změnou povrchu, jelikož i malý překryv kavit vede ke značnému snížení povrchu, ale pouze k malému snížení objemu. Tento efekt je tím výraznější, čím je více karotenoidů v agregátu viz. obr. P4.

V prvním přiblížení můžeme tedy uvažovat, že při agregaci zůstává celkový objem kavity agregátu součtem objemů kavit jednotlivých karotenoidů, a dochází pouze ke změně povrchu kavity.



Obrázek.č.8: Dvě molekuly astaxanthinu a jejich solvatační obálka

Tento obrázek byl pořízen z MD simulace dvou karotenoidů ve vodě. Na obrázku jsou zobrazeny molekuly vody do 4 Å od molekul astaxanthinu. Z přední části kvůli viditelnosti kavity byly molekuly vody odstraněny. Z obrázku je patrné, že hydrofobní molekuly kolem sebe vytvoří obálku (kavitu), ve které se žádné molekuly vody nenacházejí. Při tvorbě agregátu dochází k překryvu těchto dvou kavit jednotlivých monomerů a vytvoření jedné pro celkový agregát. Náboje počáteční struktury byly pře vzaty z MD simulací M.Babaka, Department of Chemistry, Faculty of Science, Kyushu University. Pro vizualizaci byl použi VMD program.

4.2 Gibbsova energie agregace

Hlavním problémem agregace karotenoidů je určit pravděpodobnostní distribuci všech možných orientací karotenoidů a distribuci počtu karotenoidů v agregátech, tzn. určit pravděpodobnostní distribuci všech stavů systému karotenoidů. Dalším problémem je také určit jak tato distribuce pravděpodobností závisí na koncentraci vody v rozpouštědle. Jelikož není nutné počítat s vodou explicitně a stačí pouze zahrnout její silové působení, které vzniká v důsledku hydrofobní interakce (vysvětleno dále), lze vynechat molekuly vody a celkový systém definovat pouze jako systém karotenoidů. Změna systému karotenoidů ze stavu 1 do stavu 2 je charakterizována změnou Gibbsovy energie:

$$\Delta G_{1 \rightarrow 2} = \Delta G_V(A_1 \rightarrow A_2) + \Delta E - T(S_2 - S_1), \quad (71)$$

kde $\Delta G_V(A_1 \rightarrow A_2)$ odpovídá změně Gibbsovy energie související s hydrofobními interakcemi a tudíž se změnou plochy karotenoidů (válců), která je vystavená vodě, z původní plochy A_1 na A_2 . Tato změna v podstatě odpovídá zrušení původní kavity o vnější ploše A_1 a vytvoření nové kavity o ploše A_2 , která odpovídá novému stavu 2. T označuje teplotu systému, S_1 je entropie počátečního stavu 1 systému karotenoidů a S_2 je entropie koncového stavu 2. ΔE odpovídá změně energie, která je způsobena změnou velikosti dipól-dipólové interakce, disperzních sil a vodíkových vazeb. Jak již bylo odůvodněno dříve, změnu energie ΔE je možné zanedbat oproti velikostem hydrofobních interakcí $\Delta G_V(A_1 \rightarrow A_2)$. Jelikož změna Gibbsovy energie související se změnou hydrofobních interakcí závisí pouze na vnějších plochách agregátů vystavených vodě A , a pokud bychom byli schopni vyjádřit entropii S v závislosti na těchto vnějších plochách, nic by nám už nebránilo celý systém popisovat pouze pomocí vnějších ploch, které jsou vystaveny vodě.

4.4 Popis pomocí vnější plochy

Pro další popis agregace zanedbáme koncové cykly polyenového řetězce karotenoidů a jejich polární skupiny, které přispívají do celkové změny Gibbsovy energie příspěvkem ΔE , a budeme karotenoidy popisovat jako válce, jejichž osa je tvořena polyenovým řetězcem, a které reprezentují povrch karotenoidů vystavený vodě. Takovýto popis je velice výhodný, neboť každý karotenoid nemusíme popisovat pomocí souřadnic všech atomů, ale stačí nám pouze pět souřadnic na každý karotenoid, z nichž 3 označují polohu těžiště válce a dvě další, které popisují natočení válce v prostoru. Vodu také nemusíme popisovat explicitně jako jednotlivé molekuly, ale jelikož se voda podílí na agregaci převážně hydrofobním efektem, lze její působení zahrnout pouze jako sílu, která nutí karotenoidy shlukovat se do agregátů, a jejíž energetický příspěvek je možné vyjádřit jako ΔG_V .

Parametry válců byly vypočítány tak, aby válce co nejlépe reprezentovaly karotenoidy a agregáty ve vodném roztoku. Výška válce byla určena jako přibližná délka astaxanthinu i s koncovými cykly. Výsledná výška válce l byla vypočtena na:

$$l \doteq 30 \text{ \AA} \quad (72)$$

Poloměr válce byl určen tak, aby povrch válce co nejlépe reprezentoval povrch kavity vytvořené kolem monomerního karotenoidu. Z tohoto důvodu byla vypočítána radiální distribuční funkce mezi astaxanthinem a molekulami vody. Poloměr byl

určen jako vzdálenost, ve které dochází k nárustu radiální distribuční funkce viz P26. Tímto způsobem byla vypočtena hodnota poloměru válce jako:

$$r \doteq 2.2 \text{ \AA} \quad (73)$$

Každý karotenoid je tedy reprezentován jako válec s pevnými rozměry a plocha válce označuje plochu hydrofobního řetězce, který je vystaven vodě. Tyto válce se mohou překrývat, abychom reprezentovali chování karotenoidů při agregaci, tedy snižování plochy vystavené vodě. Při překryvu válců totiž dochází ke snížení vnější plochy stejně jako při agregaci. Teoreticky nejvýhodnější konfigurace (s minimem Gibbsovy energie) by byla, kdyby se všechny válce v agregátu shlukly do co největšího překryvu, což by znamenalo, že by všechny válce byly v jednom místě. Toto ale není pro karotenoidy možné, jelikož ty se nemohou přiblížit k sobě tak blízko a nemůže docházet k jejich překryvu. Z molekulárně dynamických simulací dvou astaxanthinů v čisté vodě může být vypočtena minimální vzdálenost dvou karotenoidů. Tato vzdálenost r_{min} byla vypočtena na:

$$r_{min} \doteq 3.25 \text{ \AA} \quad (74)$$

Toto aplikujeme také do zjednodušeného modelu válců. Každé dva válce se mohou překrývat, ale pouze do té míry, pokud vzdálenosti os válců, které reprezentují hydrofobní polyenové řetězce, zůstanou větší než minimální vzdálenost karotenoidů r_{min} .

4.6 Diskuse popisu pomocí vnější plochy

Popis karotenoidů jako pevných válců je velice výhodný, a to hlavně z důvodu značného urychlení výpočtu. Například pro klasické metody MD bychom na popis $20\mu M$ roztoku karotenoidů ve vodě, například v kubické buňce o rozměru 100nm s periodickými okrajovými podmínkami, měli přibližně 12 molekul karotenoidů a přibližně přes 2 miliony molekul vody. Takováto simulace by byla velice časově náročná. Pokud přihlédneme navíc k faktu, že agregace je pomalý proces (čím menší koncentrace vody, tím bude agregace pomalejší), jsou tyto metody pro popis agregace nepoužitelné, a bylo by vhodné využít nějakou lepší metodu. Z tohoto důvodu budou MD simulace používány pouze pro určování vlastností dimerů, které jsou nutné jako vstupní parametry pro navrhovaný model, a také pro testování správnosti modelu právě na těchto dimerech. Pro stejný případ při popisu pomocí válců nám stačí pro totožný popis agregace jako pomocí MD pouze 12 válců ve stejném prostoru a působení vody je aproximováno pouze hydrofobními interakcemi. Na první pohled je patrná velká efektivita nového popisu.

Aproximací karotenoidu jako pevného válce místo nějakého flexibilního povrchu neuděláme příliš velkou chybu, jelikož hydrofobní část karotenoidu je tvořena polyenovým řetězcem konjugovaných vazeb, který vykazuje díky delokalizaci elektronů velkou stabilitu, a nedochází tudíž moc často k jeho změnám. Dále by bylo asi lepší popisovat povrch karotenoidů vystavený vodě pomocí elipsoidu místo válce, a to z důvodu plošné struktury polyenového řetězce. Voda má tendenci se organizovat na povrchu molekuly, tudíž kolem nějaké určité vzdálenosti od atomů polyenového řetězce. Pokud k tomuto faktu přidáme plošný tvar polyenového řetězce, dostáváme pro povrch karotenoidu tvar elipsoidu. Hlavním důvodem pro využití válcového povrchu byla jeho jednoduchost. Při použití válce se stejnou

plochou jako je plocha elipsoidu dostaneme také přibližně stejné hodnoty ΔG_V při agregaci, jelikož přesnější elipsoid se moc neliší tvarem od válce. Využití válcových ploch ale může poskytovat horší výsledky při určení struktur agregátu. Z MD simulací vyplývá, že například dva karotenoidy v čisté vodě mají tendenci agregovat tak, že jejich řetězce jsou orientovány v paralelních rovinách viz. *obr. P3*. Popis plochy pomocí elipsoidu by tuto konfiguraci zvýhodňoval, jelikož by při takovém způsobu překryvu došlo k většímu snížení celkové vnější plochy než při jiných způsobech překryvu. Naopak při popisu pomocí válcové plochy jsou překryvy válců pro všechna natočení polyenových řetězců stejná a nedochází tudíž k zvýhodnění paralelní orientace. V této práci nám jde ale hlavně o zavedení a ověření správnosti popisu, pro což je charakteristika karotenoidů jako válců dostatečná. Také pro výpočet absorpčních spekter není toto natočení řetězců důležité (viz *sekce 2.4.1 a 2.4.2*) a všechna natočení by měla vykazovat stejné absorpční spektrum. Pro obdržení přesnějších výsledků, které odpovídají experimentům, by bylo ale vhodné tento model postupně vylepšovat, například zmíněnou aproximací plochy jako elipsoidu. Ačkoliv se popis karotenoidů jako válců pomocí vnější plochy jeví velice jednoduchý, největším problémem těchto metod je výpočet vnější plochy, a to hlavně při vícenásobných překryvech. viz. *obr.č. P5*. Tento problém je způsoben tím, že není žádný analytický vztah na výpočet plochy překryvu při dané konfiguraci válců. Pro překryv dvou válců lze pro všechny možné způsoby překryvu válců vypočítat analytické vztahy na výpočet plochy překryvu, a tudíž i vnější plochy. Při simulaci výpočtu by se vždy vybral ten vztah, který by odpovídal dané vzájemné konfiguraci dvou válců. Toto ovšem není možné pro překryv tří válců, jelikož celková vnitřní plocha není součtem vnitřních ploch dvojic. Z tohoto důvodu je nutné zavést nějaký jiný způsob výpočtu plochy. Jedním ze způsobů by mohlo být zanedbání těchto vícenásobných překryvů. Při využití tohoto způsobu ale dostáváme chybu, která je závislá na poloměru válců r a na minimální vzdálenosti os válců r_{min} . Čím větší bude poloměr válců a čím menší bude jejich minimální vzdálenost r_{min} , tím bude chyba způsobená zanedbáním těchto vícenásobných překryvů větší. Tento model popisu je cílený na více druhů karotenoidů a podobných molekul a tudíž i na velké rozpětí parametrů r a r_{min} , a právě z tohoto důvodu byl zvolen jiný způsob výpočtu plochy. Plocha překryvu je počítána metodou Monte-Carlo. Při výpočtu plochy se povrch každého válce vyplní náhodně body a poté se v rámci jednoho agregátu procházejí všechny tyto body, jestli nějaký bod z povrchu jednoho válce neleží v jiném válci. Celková vnější plocha agregátu $A_{vnější}$ se poté určí jako:

$$A_{vnější} = \left(1 - \frac{N_{vnitřní}}{N_{celk.}}\right) \sum A_1, \quad (75)$$

kde sčítání probíhá přes všechny válce (karotenoidy) v agregátu, A_1 je celková plocha jednoho válce, $N_{vnitřní}$ je počet bodů, které leží uvnitř nějakého válce (vnitřní body) a $N_{celk.}$ je celkový počet bodů použitých na ovzorkování celého agregátu. Z tohoto způsobu výpočtu je ihned patrné, že jsou zde zahrnuty správně i vícenásobné překryvy, jelikož každý vnitřní bod je započítán pouze jednou, nehledě na to uvnitř kolika válců se nachází. Při tomto způsobu výpočtu plochy byl vždy použit pevný počet bodů, kterými se vyplnil povrch jednoho válce. Tento způsob byl zvolen pro obdržení stejné přesnosti při výpočtu vnějších ploch malých i velkých agregátů. Chyba tohoto výpočtu tudíž nezávisí na velikosti agregátů, ale pouze na počtu použitých bodů.

Pro tento způsob popisu je nutné zanedbání členu ΔE z rovnice (71), jak již bylo popsáno dříve, jelikož z fyzikální podstaty těchto interakcí, je není možné vyjádřit v závislosti na povrchu karotenoidů. Tímto zanedbáním neuděláme zásadní chybu při výpočtu celkové ΔG spojené s přechodem mezi různými stavy systému, neboť velikost ΔE bude vždy zanedbatelná vůči velikosti hydrofobního příspěvku vody ΔG_V (viz. porovnání interakcí při agregaci karotenoidů, sekce 4.2) a také vůči velikosti entropického příspěvku $T\Delta S$. Při agregaci karotenoidů dochází ke zmenšení vnější plochy, a tudíž ke snížení ΔG_V . Při agregaci dochází k omezování volného pohybu karotenoidů, což má za následek pokles entropie systému. Jelikož jsou ale příspěvky ΔG_V a $T\Delta S$ v rovnici (71) pro celkovou změnu Gibbsovy energie s opačnými znaménky, může v některých speciálních případech docházet k přesnému vyrušení entropického příspěvku systému karotenoidů s hydrofobním příspěvkem vody. Právě v těchto případech selhává popis pouze pomocí vnějších ploch agregátu. Pro další popis budeme předpokládat, že k těmto případům dochází ale velice málo, jelikož při přechodu systému mezi dvěma stavy je entropický i hydrofobní příspěvek tak velký, že stačí i menší rozdíl mezi těmito hodnotami, aby byla velikost ΔE zanedbatelná.

Pro správné a přesné vysvětlení agregace karotenoidů by bylo vhodné tyto speciální případy dále prozkoumat, například pomocí MD či jiných metod, jelikož tyto případy nám mohou poskytnout mnoho informací o vzájemné interakci karotenoidů v agregátech.

Zanedbáním ΔE se dopustíme jiné a podstatnější chyby, než chyby při výpočtu změny Gibbsovy energie. Tímto zanedbáním vynecháváme interakce koncových cyklů karotenoidů a jejich polárních skupin. Z experimentálních měření (skce 3.1) vyplývá, že právě interakce mezi těmito skupinami mají zásadní vliv na možné formování agregátů helikálního typu a mají vliv také na směr točení těchto helikálních agregátů. Dále vodíkové můsky přes molekuly vody se také podílejí na stabilizaci agregátů při velkých koncentracích vody a mohou mít vliv i na tvar výsledného agregátu. Jak jsem již zmínil, tato metoda poskytuje pouze návod na možný popis agregace, a pro zahrnutí efektů tohoto typu by byly nutné nějaké další sofistikovanější metody.

Posledním a asi i největším problémem této metody je výpočet entropického příspěvku systému karotenoidů. Tomuto problému a jeho možným řešením je věnována kapitola 4.7.

4.7 Výpočet entropie

Pro popis agregace karotenoidů je kromě výpočtu plochy nutný také výpočet celkové entropie systému karotenoidů. Při formování agregátu dochází k omezení pohybu karotenoidů, a tím dochází ke snížení entropie systému. Toto je způsobeno tím, že aby karotenoidy tvořily agregát, musí docházet k překryvu jejich vnějších ploch (kavit) a tudíž se nemohou nacházet ve všech možných konfiguracích, jako když jsou volné a agregát netvoří. Entropii systému můžeme vypočítat pomocí vztahu [1]:

$$S = k_B \ln(\Omega), \quad (76)$$

kde k_B je Boltzmanova konstanta, T je teplota a Ω je pro diskrétní systémy počet všech konfigurací, jakými lze složit daný stav systému (multiplicitu). V případě spojitých systémů Ω reprezentuje objem konfiguračního prostoru, který náleží danému stavu systému. Pro spojitě i diskrétní systémy bude Ω dále označováno

pouze jako multiplicita. Jelikož celá agregace je popisována v kanonickém NVT souboru, je nutné do výpočtu multiplicity systému Ω zahrnout kromě multiplicity systému karotenoidů $\Omega_{kar.}$ také multiplicitu lázně Ω_{lazne} . Pro celkovou multiplicitu můžeme tudíž psát [1]:

$$\Omega = \Omega_{lazne} \cdot \Omega_{kar.} \quad (77)$$

Pro celkovou entropii poté dostáváme:

$$S = k_B \ln(\Omega_{lazne}) + k_B \ln(\Omega_{kar.}). \quad (78)$$

Pro výpočet pravděpodobností různých stavů systému není potřeba znát absolutní hodnotu celkové entropie, ale pouze rozdíl entropií mezi těmito stavy (71). V kanonickém souboru využíváme dále předpokladu, že lázeň, která udržuje konstantní teplotu systému, je nekonečná, a tudíž při změně stavu systému dojde k výměně tepla mezi systémem a lázní, ale multiplicita lázně zůstává nezměněná. Za tohoto předpokladu stačí pro výpočet změny entropie systému, mezi dvěma stavy, znát pouze podíl multiplicit systémů karotenoidů:

$$\Delta S = k_B \ln \left(\frac{\Omega_{kar.}^2}{\Omega_{kar.}^1} \right), \quad (79)$$

kde $\Omega_{kar.}^1$ resp. $\Omega_{kar.}^2$ je multiplicita počátečního resp. koncového stavu systému karotenoidů.

Pro popis agregace je tedy nutné určit podíl multiplicit systémů karotenoidů při změně počtu karotenoidů v agregátech. Tento výpočet je nejlepší demonstrovat na jednoduchém případě dvou karotenoidů (které jsou reprezentovány jako válce) v kubickém prostoru o délce hrany x . Pro tento případ jsou možné pouze dva stavy systému. V prvním stavu jsou karotenoidy volné a netvoří agregát, nedochází k překryvu povrchů válců. Ve druhém stavu karotenoidy tvoří dimer, který je reprezentován překryvem ploch válců. Rozdíl multiplicit mezi těmito dvěma stavy byl vypočten pomocí náhodného vkládání válců do prostoru a zaznamenávání počtu případů, kdy došlo k překryvu válců. Celkový podíl multiplicit volných karotenoidů Ω_{2mon} ku multiplicitě dimerů Ω_{dimer} může být pro danou velikost prostoru vypočten jako:

$$\frac{\Omega_{2mon}}{\Omega_{dimer}} = \frac{N - N_{překryv.}}{N_{překryv.}}, \quad (80)$$

kde $N_{překryv.}$ je počet případů, kdy došlo k překryvu ploch válců z celkového počtu N náhodných vložených válců do prostoru. Tento výpočet byl proveden pro různé velikosti kubického prostoru. Abychom vždy dostali stejnou relativní odchylku při výpočtu podílu multiplicit, byl výpočet pomocí náhodného vkládání vždy ukončen po dosažení počtu 10000 překryvů válců. Při vkládání válců do prostoru byly využity periodické okrajové podmínky, abychom eliminovali efekty stěn kubického prostoru. Jelikož pravděpodobnost překryvu válců v prostoru o objemu V bude závislá na podílu objemů válců a objemu prostoru, a objem válců je konstantní, lze očekávat lineární závislost podílu multiplicit $\Omega_{2mon}/\Omega_{dimer}$ na objemu prostoru. Tento předpoklad byl ověřen výpočtem podílu multiplicit pro různé objemy prostoru a provedením lineární regrese (graf P7). Z koeficientů lineární regrese (Tabulka P6)

lze také určit podíl multiplicit na jednotku objemu prostoru. Tento normovaný podíl byl poté využit v dalších výpočtech, a to z důvodu možnosti výpočtu pro systémy v různě velkém prostoru.

Teoreticky by bylo možné stejným způsobem pokračovat a vypočítat podíly multiplicit pro libovolný počet karotenoidů v prostoru. Tento způsob by byl ale velice časově náročný, jelikož pravděpodobnost překryvu všech válců v prostoru klesá s počtem válců (neboť se musí rozšířit celý prostor, kam karotenoidy vkládáme, aby nedošlo k vytvoření agregátu přes celý prostor skrz periodické okrajové podmínky). Výpočet podílů multiplicit mezi stavy, kde je například 8 karotenoidů v prostoru volných, a kdy jsou všechny v agregátu, by tudíž trval velice dlouho. Z výpočetních důvodů je tedy nutné zvolit nějaký jiný alternativní způsob výpočtu multiplicit pro agregáty s různým počtem karotenoidů.

Nejvýhodnějším způsobem by bylo vyjádření multiplicit agregátů s různým počtem karotenoidů v závislosti na již vypočtených multiplicitách pro dva karotenoidy Ω_{dimer} a Ω_{2mon} . Absolutní hodnoty těchto multiplicit sice neznáme, ale dále bude ukázáno, že pro výpočty pravděpodobností jednotlivých stavů dostaneme vždy pouze podíl těchto multiplicit. Dále bude pro multiplicity agregátu s různým počtem karotenoidů používáno značení Ω_n , kde n označuje počet karotenoidů v agregátu. Dále P_2 bude označovat počet všech možných konfigurací (resp. objem konfiguračního prostoru), ve kterých se může nacházet jeden válec v dimeru při pevné pozici druhého válce. Při této definici P_2 můžeme multiplicitu dimeru Ω_{dimer} vypočítat jako:

$$\Omega_{dimer} = \Omega_2 = \Omega_1 \cdot P_2, \quad (81)$$

Tento vztah nám říká, že máme Ω_1 možností jak umístit do prostoru 1. válec (karotenoid), a poté máme pouze P_2 možností jak umístit do prostoru 2. válec tak, aby měl překryv s prvním válcem (aby karotenoidy tvořily dimer). Podobnou myšlenku můžeme aplikovat i na agregát o 3 karotenoidech. Počet všech konfigurací, ve kterých se mohou nacházet 3 válce, tak aby tvořily trimer, lze vypočítat stejným způsobem jako u dimeru. Na umístění prvního válce do prostoru máme opět Ω_1 možností a P_2 možností na umístění druhého válce tak, aby měl překryv s prvním válcem. Při umístění třetího válce je situace obdobná jako pro umístění druhého válce, pouze si můžeme vybrat, se kterým z těch dvou prvních válců bude mít překryv, a tudíž počet všech konfigurací třetího válce je $2 \cdot P_2$. Ne všechny tyto konfigurace jsou ale možné. V této konstrukci agregátu na sebe válce sice napojujeme tak, aby jejich osy nebyly blíže než minimální vzdálenost r_{min} a nedocházelo tak k překryvům karotenoidů, ale vlastnost zde není nijak ošetřena pro válce, které na sebe přímo napojeny nejsou. To znamená, že pokud máme v prostoru dimer a chtěli bychom sestavit trimer připojením dalšího válce na 1. válec dimeru, tak tento nově napojený válec a 2. válec dimeru nemusí nutně splňovat podmínku minimální vzdálenosti. Z tohoto důvodu je nutné z výpočtu multiplicity agregátu o třech karotenoidech tyto stavy, které nespĺňují podmínku minimální vzdálenosti, vyloučit. Pro multiplicitu Ω_3 tudíž dostáváme:

$$\Omega_3 = \Omega_1 \cdot P_2 \cdot 2P_2 - dP_3 \cdot 2\Omega_1 P_2^2, \quad (82)$$

kde $\Omega_1 \cdot P_2 \cdot 2P_2$ je počet všech možných konfigurací tří válců, tak aby tvořily trimer (agregát) a $dP_3 \cdot 2\Omega_1 P_2^2$ je počet konfigurací ze všech možných, které nespĺňují podmínku blízkosti válců. Člen dP_3 má tudíž podobu pravděpodobnosti, že náhodně

vygenerovaná konfigurace výše popsaným způsobem pro tři válce nebude splňovat podmínku minimální vzdálenosti válců pro všechny dvojice válců. Pravděpodobnost dP_3 lze tudíž vypočítat jako počet konfigurací kdy není splněna podmínka blízkosti válců ku počtu všech možných konfigurací, válců, které tvoří trimer. Naprosto stejný postup můžeme provést i pro agregát o 4 karotenoidech. Při napojování 4. válce na agregát o třech válcích už máme 3 možnosti, na který válec ten čtvrtý napojíme. Pro multiplicitu agregátu o čtyřech karotenoidech tudíž dostáváme:

$$\Omega_4 = 3 \cdot 2\Omega_1 P_2^3 (1 - dP_4). \quad (83)$$

Takto můžeme pokračovat pro agregáty o libovolném počtu karotenoidů. Pro multiplicitu agregátu o n karotenoidech dostáváme:

$$\Omega_n = (n - 1)! \Omega_1 P_2^{n-1} (1 - dP_n). \quad (84)$$

Tímto přepisem jsme pouze vyjádřili multiplicity Ω_n pomocí Ω_1 , P_2 a dP_n . Dalším a nejdůležitějším krokem v odvození multiplicit je odhad pravděpodobností dP_n .

Pro výpočet pravděpodobnosti dP_n je zaveden způsob, který se podobá rozdělení interakcí pouze do dvoučásticových příspěvků. Agregát budeme vytvářet vždy tak, že přidáme 1 válec ke stávajícím. Například agregát o dvou válcích vytvoříme napojením druhého válce na první, který už je umístěn v prostoru. Agregát o třech karotenoidech vytvoříme napojením třetího válce na jeden ze dvou již přítomných válců a takto pokračujeme, dokud nevytvoříme agregát o požadované velikosti. Počet konfigurací agregátu o třech válcích, které nesplňují podmínku minimální vzdálenosti, dále jen **zakázané konfigurace**, lze rozepsat jako:

$$dP_3 2\Omega_1 P_2^2 = \Omega_1 P_2 \cdot 2P_2 \cdot dP, \quad (85)$$

kde $dP_3 2\Omega_1 P_2^2$ je počet zakázaných konfigurací tří válců, $\Omega_1 P_2$ je počet konfigurací dvou válců, které splňují podmínku vzdálenosti válců, dále jen počet **povolených konfigurací**. Dále je ve vztahu (85) člen $2P_2$, kde 2 odpovídá dvěma možnostem napojení třetího válce na dimer, a P_2 odpovídá počtu všech konfigurací třetího válce, takových, aby měl překryv s válcem, na který se napojuje. Člen dP označuje pravděpodobnost, že náhodná konfigurace nově napojeného válce na první válec nebude splňovat podmínku blízkosti válců se třetím válcem. Tento člen v podstatě ukazuje, jak moc si brání dvojice karotenoidů ve „volném pohybu“. Lepší představu o významu dP je možné si vytvořit po přenásobení P_2 , jelikož $P_2 dP$ udává počet všech zakázaných konfigurací, které mohou vzniknout po napojení třetího válce na jeden ze dvou válců dimeru. Z těchto úvah vyplývá, že vztah (85) je možné interpretovat takto: Počet zakázaných konfigurací tří válců tvořících agregát je roven počtu povolených konfigurací dvou karotenoidů tvořících agregát vynásobenému počtem zakázaných konfigurací třetího válce. Obdobným způsobem lze pokračovat i pro větší agregáty. Například pro agregát o čtyřech válcích je už situace trochu komplikovanější. Zakázanou konfiguraci agregátu o čtyřech válcích lze vytvořit z povolené konfigurace tří válců a napojením čtvrtého válce do zakázané konfigurace, nebo ze zakázané konfigurace tří válců a napojením čtvrtého válce do libovolné konfigurace:

$$dP_4 3! \Omega_1 P_2^3 = \Omega_3 \cdot \alpha 6P_2 dP + dP_3 2\Omega_1 P_2^2 \cdot 3P_2. \quad (86)$$

Na levé straně rovnice je počet zakázaných konfigurací agregátu o čtyřech válcích. První člen pravé strany rovnice náleží situaci, kdy je agregát o třech válcích v povolené konfiguraci (Ω_3 konfigurací) a čtvrtý válec se napojí do zakázané konfigurace ($\alpha 6P_2 dP$ konfigurací). Druhý člen pravé strany rovnice odpovídá situaci, kdy je agregát o třech válcích v zakázané konfiguraci ($dP_3 2\Omega_1 P_2^2$ konfigurací, viz. vztah (85)) a čtvrtý válec se může na původní tři napojit libovolně ($3P_2$ konfigurací). V prvním členu rovnice (86) se vyskytuje 6, která odpovídá za 6 různých možných napojení čtvrtého válce do zakázané konfigurace. Tyto možnosti jsou: napojení čtvrtého válce na první a porušení podmínky vzdálenosti s druhým válcem, napojení čtvrtého válce na první a porušení podmínky vzdálenosti se třetím válcem, napojení čtvrtého válce na druhý a porušení podmínky vzdálenosti s prvním válcem, atd. Člen dP určuje, jak moc si tyto dvojice válců brání ve „volném pohybu“ a má stejnou velikost jako ve vztahu (85). Koeficient α udává počet relevantních dvojic. Jelikož statisticky nejpravděpodobnější je tvorba agregátů s malou plochou dotyku, malé plochy dotyku lze získat velkým množstvím různých konfigurací, a v těchto agregátech nejsou válce moc blízko u sebe a tudíž při napojení dalšího válce lze očekávat vytvoření zakázané konfigurace pouze se dvěma nejbližšími válci viz P_8 . Toto platí pro všechny až na krajní válce agregátu. Z takovéto jednoduché úvahy lze koeficient α odhadnout jako:

$$\alpha(n) = \frac{2}{n-1}, \quad (87)$$

kde n je počet válců (karotenoidů) v agregátu. Správnost této jednoduché geometrické úvahy bude ověřena dále na přesném výpočtu několika hodnot dP_n , kde bude také navržen možný způsob přesnějšího určení závislosti α na počtu válců v agregátu. Pro hledanou pravděpodobnost dP_4 tudíž dostáváme ze vztahu (86) a (82):

$$dP_4 = 2(1 - dP_3)\alpha(4)dP + dP_3 = 2(1 - dP)\alpha(4)dP + dP. \quad (88)$$

Stejným způsobem pokračujeme při výpočtu dP_n pro větší agregáty. Obecně lze pravděpodobnost dP_n nalezení agregátu o n válcích v zakázané konfiguraci určit pomocí následujícího rekurentního vztahu:

$$dP_n = (n - 2)(1 - dP_{n-1})\alpha(n)dP + dP_{n-1}, \quad (89)$$

$$\text{kde: } dP_3 = dP.$$

S využitím těchto úvah je možné vypočítat všechny pravděpodobnosti dP_n pouze ze znalosti dP_3 a lze tudíž vyjádřit všechny multiplicity pouze v závislosti na Ω_1 , P_2 a dP_3 .

Výpočet hodnoty dP_3 je možné provést metodou Monte-Carlo, kdy umístíme do prostoru nejdříve první válec, poté je do prostoru umístěn druhý válec, tak by docházelo k překryvu ploch s prvním válcem, ale jinak je poloha a orientace tohoto válce náhodná. Dále se vygeneruje na jaký z již přítomných válců se napojí třetí válec. Napojení třetího válce probíhá stejným způsobem jako napojení druhého. Tato výstavba agregátu o třech válcích se provádí stále dokola a zaznamenává se počet zakázaných konfigurací. Pravděpodobnost zakázané konfigurace je poté jednoduše určena jako počet zakázaných konfigurací ku počtu všech testovaných konfigurací.

Tento způsob výpočtu pravděpodobností zakázaných konfigurací lze použít i pro agregáty s vyšším počtem karotenoidů. Toto je ale možné pouze pro agregáty do určité velikosti, neboť abychom obdrželi hodnoty dP_n se stejnou přesností pro všechny, i pro velké agregáty je nutné navyšovat počet testovaných konfigurací.

Výpočet těchto hodnot byl proveden pro agregáty do velikosti 9 válců (karotenoidů). Výpočet probíhal vždy podle výše popsaného postupu jako pro agregát o třech válcích a byl vždy ukončen po dosažení 250000 povolených konfigurací. Tento postup byl vybrán z jednoduchého důvodu, pro obdržení stále větší přesnosti výpočtu dP_n . Kdybychom vždy vygenerovali například pouze 10000 různých konfigurací, pro velké agregáty bychom tím pádem mohli obdržet například $dP_n=1$ což je zcela jistě špatně. Pravděpodobnosti nalezení náhodné konfigurace agregátu o n válcích se blíží jedné s rostoucím n , ale nikdy se jedné nerovnájí, a je tudíž nutné zvyšovat přesnost výpočtu s rostoucím počtem válců v agregátu pro obdržení relevantních výsledků. Dalším důvodem pro výpočet tak velkého množství konfigurací, bylo přiřazení možných konfigurací válců (karotenoidů) k dané vnější ploše agregátu. Toto přiřazení bude dále potřeba při jednom způsobu výpočtu pravděpodobnostní distribuce konfigurací karotenoidů v roztoku.

Důvod, proč nebyl výpočet proveden i pro větší agregáty je výpočetní náročnost. Pro agregáty s velikostí nad 9 karotenoidů se dostáváme řádově do dnů, pro agregáty nad dvanáct už to jsou desítky dnů a nad 15 se dostáváme už na stovky dnů (viz. P9).

Toto je hlavní důvod pro využití výše uvedeného odhadu výpočtu pravděpodobností dP_n . Porovnání tohoto odhadu, při použití $\alpha(n)$ ze vztahu (87), s vypočtenými hodnotami pomocí metody Monte-Carlo je vyneseno v grafu P10 a v tabulce P9. Je zde jasně patrné, že odhad dobře reprezentuje vypočtené hodnoty pro tyto malé agregáty, a tudíž lze předpokládat, že bude dobře předpovídat hodnoty pravděpodobností i pro větší agregáty. Nemáme ale žádnou jistotu, že tento odhad bude stejně dobrý i pro několikanásobně větší agregáty.

Pro přesnější odhad pravděpodobnosti dP_n je zásadní odhad parametru $\alpha(n)$, jehož závislost na počtu karotenoidů v agregátu by bylo lepší určit, z proložení vypočtených hodnot funkcí, která je podobná funkci ve vztahu (87), místo z geometrického odhadu, jelikož i tato jednoduchá závislost už velice dobře odpovídá naměřeným hodnotám. Možný tvar závislosti alfa na proložení naměřených hodnot by mohl být například:

$$\alpha(n) = \frac{a}{n \cdot b - c}, \quad (90)$$

kde a, b, c jsou parametry, které budeme fitovat.

4.8 Termodynamický přístup

Aproximací karotenoidů jako válců a popisu agregace pouze pomocí vnějších ploch agregátů jsme přišli o možnost využití MD simulací pro studium agregace, jelikož na evoluci systému v čase bychom už nemohli použít Newtonovy rovnice, ale musela by být vytvořena nějaká jiná složitější evoluční rovnice.

Jedním z přístupů jak vypočítat požadovanou pravděpodobnostní distribuci pro rozdělení agregátů v roztoku a pravděpodobnostní rozdělení orientací karotenoidů v rámci agregátu pro různé koncentrace vody v roztoku, je využití metod statistické fyziky. Karotenoidy se mohou v roztoku pohybovat libovolně a spojitě, tudíž máme spojitý konfigurační prostor. To znamená, že existuje nekonečně mnoho možných různých konfigurací, ve kterých se systém karotenoidů může nacházet. Prvním nutným krokem pro numerický výpočet je diskretizace těchto možných stavů, a právě pro tyto diskretizované stavy je poté počítána pravděpodobnostní distribuce. Celkový stav systému je jednoznačně určen všemi pozicemi karotenoidů (v našem případě válců) a jejich natočením v prostoru. V tomto případě ale dostáváme obrovské množství různých konfigurací, pro které by se musela počítat pravděpodobnost. Jelikož agregace může být popsána pouze pomocí vnější plochy, byl zde zvolen jiný přístup. Stav systému je tedy určen počty karotenoidů v jednotlivých agregátech (nutné pro výpočet entropického příspěvku) a vnějšími plochami jednotlivých agregátů. Tímto způsobem dostáváme velikou redukci dimenze problému (počtu konfigurací) a stále máme všechny potřebné parametry pro výpočet změny Gibbsovy energie ΔG při přechodu mezi dvěma různými stavy systému. Jelikož počty karotenoidů v agregátech mohou být pouze celá čísla, nemusí se zde diskretizace provádět, a tudíž jediná diskretizace probíhá ve vnějších plochách agregátů. Pro výpočet spekter karotenoidů je ale nutné znát přesné polohy karotenoidů v rámci agregátu, které nám tato metoda explicitně nedává. Toto ale není zásadní problém, jelikož dále je navržen způsob výpočtu poloh karotenoidů (dále již válců) v agregátu. Výpočet poloh samozřejmě není jednoznačný, existuje více možných orientací které dávají stejnou plochu, ale ze spektroskopického hlediska nám toto nevádí, jelikož všechny tyto konfigurace mají stejnou pravděpodobnost výskytu v reálném roztoku a pro výpočet spektra stačí náhodně vybrat některé z těchto konfigurací a jejich příspěvky sečíst.

Při výpočtu pravděpodobností jednotlivých stavů systému karotenoidů budeme vycházet ze vztahu (24) s dosazením za ΔG ze vztahu (71), čímž dostáváme pro přechod systému ze stavu i do stavu j :

$$\frac{p_j}{p_i} = e^{-\frac{G_V(A_j) - G_V(A_i) - T(S_j - S_i)}{k_B T}}, \quad (91)$$

kde p_i a p_j je pravděpodobnost, že se systém nachází ve stavu i resp. j , A_j a A_i je vnější plocha válců ve stavu j resp. ve stavu i a S_i a S_j jsou entropie systému válců ve stavu i resp. j . Tento vztah můžeme dále upravit s využitím poznatků z kapitoly (sekce) 4.7 a vztahu (79):

$$\frac{p_j}{p_i} = e^{-\frac{G_V(A_j) - G_V(A_i)}{k_B T}} \left(\frac{\Omega_{\text{kar.}}^j}{\Omega_{\text{kar.}}^i} \right), \quad (92)$$

kde Ω_{kar}^i je multiplicita systému válců ve stavu i , tzn. počet všech možných konfigurací, jakými lze docílit danou vnější plochu A_i při daném počtu válců v agregátu, Ω_{kar}^j je multiplicita systému válců ve stavu j . Jak vypočítat multiplicitu pro stavy o různém počtu karotenoidů v agregátu bylo vysvětleno v sekci 4.7, ale stále zůstává otázkou jak vypočítat multiplicitu, která je spojena s vnější plochou agregátu o určitém počtu válců. Tuto multiplicitu musíme přidat ještě k multiplicitě agregátu, jelikož každá plocha může být vytvořena různým počtem konfigurací. Tím při změně vnější plochy agregátu a zachování počtu válců, nedochází ke změně multiplicity agregátu, přesto dochází ke změně celkové multiplicity. Tato změna je způsobena právě změnou multiplicity v závislosti na vnější ploše agregátu válců.

Pro výpočet multiplicit jednotlivých ploch agregátu je vhodné začít s výpočtem pravděpodobností jednotlivých ploch. Dále bude poté ukázáno, že si vystačíme pouze s těmito pravděpodobnostmi a není potřeba počítat absolutní hodnotu multiplicity. Obdobný předpoklad byl využit již při výpočtu multiplicity agregátu. Touto pravděpodobností se rozumí pravděpodobnost nálezu dané vnější plochy při vytvoření náhodného agregátu o určitém počtu válců (karotenoidů). Tato pravděpodobnost bude dále označována jako $\rho_n(A)$, kde n značí počet karotenoidů v agregátu a A značí vnější plochu agregátu, jejíž pravděpodobnost počítáme. Různé pravděpodobnosti jedné plochy pro agregáty o různých počtech válců jsou zavedeny z prostého důvodu. Pro agregát o malém počtu válců jedna daná plocha například znamená, že dochází k malému překryvu válců, zatímco pro větší agregát ta samá plocha znamená, že všechny válce mají mezi sebou velký překryv ploch. Oba tyto stavy jsou samozřejmě charakterizovány jiným počtem možných konfigurací a tudíž i jinou pravděpodobností. Samotný výpočet pravděpodobností je proveden přímo z definice pravděpodobnosti metodou Monte-Carlo. Při tomto výpočtu tudíž postupujeme stejným způsobem jako při výpočtu multiplicit agregátu o různých počtech válců. Náhodná konfigurace agregátu o daném počtu válců je vždy vytvořena tímto způsobem: Do prostoru se umístí první válec, druhý válec se dále umístí náhodně, ale tak, aby docházelo k překryvu ploch s prvním válcem, a zároveň tak, aby byla splněna podmínka minimální vzdálenosti válců, třetí válec se napojí stejným způsobem na jeden, z již přítomných dvou válců. Tímto způsobem probíhá výstavba až do požadované velikosti agregátu. Při vytvoření konfigurace, kde by pro všechny dvojice nebyla splněna podmínka minimální vzdálenosti válců, bude tato konfigurace vyřazena a bude vytvořen nový agregát. U takovýchto povolených konfigurací byla zaznamenána poloha a orientace všech válců v agregátu a jejich plochy. Záznam poloh všech válců je velice důležitý z hlediska výpočtu absorpčních spekter. Tento výpočet ploch byl proveden pro agregáty do velikosti 10 karotenoidů a výpočet byl ukončen po dosažení 250000 povolených konfigurací válců. Takto velký počet byl zvolen z důvodu potřeby přesného výpočtu pravděpodobností všech možných vnějších ploch agregátů.

Z takto vypočtených ploch byl pro všechny počty válců v agregátu vytvořen histogram, který byl poté nanormován na součet roven jedné, čímž jsme obdrželi pravděpodobnosti jednotlivých ploch. Histogram pro dva válce v agregátu je zobrazen na *grafu č. 9* a pro ostatní velikosti na *grafech P11-P18*. Všechny histogramy vykazují podobné rysy.

Využitím histogramu jsme také rovnou provedli nutnou diskretizaci vnějších ploch agregátů. Pro výpočet pravděpodobností jednotlivých stavů je ale nutná multiplicita dané plochy. Multiplicita označuje počet všech konfigurací, kterými lze obdržet danou vnější plochu, a tento počet konfigurací může být také vypočten jako pravděpodobnost nalezení dané plochy v náhodné konfiguraci agregátu vynásobené

počtem všech možných konfigurací agregátu. Pro celkovou multiplicitu systému válců, které tvoří agregát o n karotenoidech s vnější plochou A , můžeme tudíž psát:

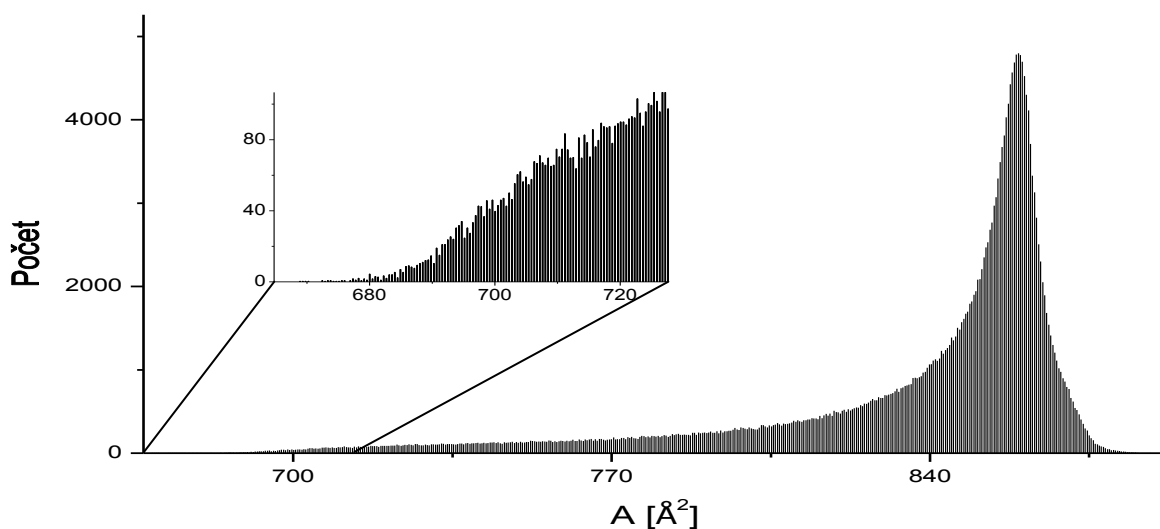
$$\Omega_{\text{kar.}} = \rho_n(A)\Omega_n, \quad (93)$$

kde Ω_n je multiplicita agregátu o n válcích, která může být vypočítána například pomocí odhadu v sekci 4.7.

Pro výpočet pravděpodobností je také nutné zvolit správný model pro výpočet $G_V(A_j) - G_V(A_i)$. Pro další výpočty byl zvolen model jednoduchý makroskopický model:

$$G_V(A_j) - G_V(A_i) = \alpha \cdot (A_j - A_i), \quad (94)$$

kde změna koeficientu α reprezentuje změnu koncentrace vody. Malé α znamená malou koncentraci vody a tudíž malou výhodnost malých vnějších ploch agregátu. Velké α znamená velkou koncentraci vody v roztoku a tudíž velkou výhodnost malých vnějších ploch agregátu.



Graf č.9 : Histogram vnějších ploch A pro dimer.

Na histogramech agregátů všech velikostí je vždy maximum pro velké vnější plochy, jelikož tyto plochy mohou být vytvořeny největším počtem různých konfigurací. Tento histogram byl vypočítán pro 250000 náhodných konfigurací dimerů. Pro výpočet plochy byla použita metoda Monte-Carlo s 1000 body na povrchu každého válce.

Pro demonstraci efektů vody je dobré podívat se na jednoduchý případ dimeru, pro který bude vypočtena závislost pravděpodobnosti jednotlivých ploch na koncentraci vody, reprezentované parametrem α . Pro názornost bude vynechána možnost rozpadu dimeru na dva monomery či spojení s dalším monomerem a vytvoření většího agregátu. Pro výpočet pravděpodobností vyjdeme ze vztahu (92), který za pomoci vztahů (93) a (94) můžeme upravit na:

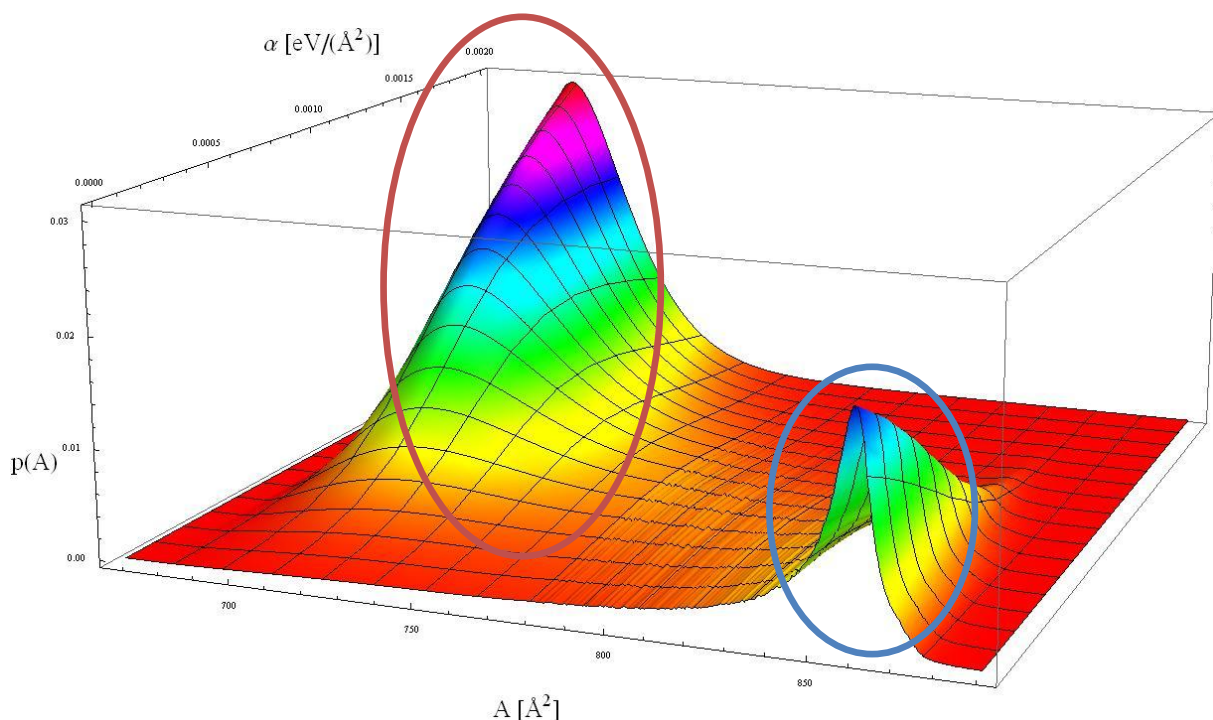
$$\frac{p_j}{p_i} = e^{-\frac{\alpha(A_j - A_i)}{k_B T}} \frac{\rho_2(A_j)\Omega_2}{\rho_2(A_i)\Omega_2} \quad (95)$$

kde p_i a p_j označuje pravděpodobnost nalezení dimeru s vnější plochou, která leží v intervalu $(A_i - dA; A_i)$ resp. $(A_j - dA; A_j)$ v roztoku s koncentrací vody danou parametrem α . Hodnota dA je dána jemností vzorkování při vytváření histogramu z vypočtených vnějších ploch agregátů. Ze vztahu (95) je jasné vidět, že celková multiplicita agregátů se projeví pouze při změně počtu válců v agregátu a v tomto případě na této multiplicitě výsledné pravděpodobnosti jednotlivých ploch nezávisí. Pravděpodobnostní distribuci různých ploch dimeru obdržíme z podmínky normalizace pravděpodobností způsobem naznačeným v rovnicích (25) a (26) a z výpočtu pravděpodobností pro každou hodnotu parametru α zvlášť. Na *grafu č. 10* je vynesena pravděpodobnostní distribuce vnějších ploch dimeru v závislosti na koncentraci vody (parametru α).

Ze vztahu (95) je patrné „soupeření“ dvou vlivů. Jedním z těchto vlivů je entropický člen vztahu (95) $\frac{\rho_2(A_j)}{\rho_2(A_i)}$, který upřednostňuje stavy s velkou vnější plochou, jelikož tyto stavy jsou tvořeny největším počtem různých konfigurací (viz. *graf č.9*). Dalším

vlivem je hydrofobní interakce s vodou, člen $e^{-\frac{\alpha(A_j - A_i)}{k_B T}}$. Tato interakce naopak zvýhodňuje malé vnější plochy. Tímto si můžeme vysvětlit tvar *grafu č. 10*, pro nízké koncentrace vody v roztoku jsou hydrofobní interakce velice slabé, proto v rovnici pro výpočet pravděpodobností převáží entropický člen, a tudíž je pravděpodobnější výskyt velkých vnějších ploch. Při zvyšování koncentrace vody v roztoku dochází ke stále většímu zvýhodňování menších vnějších ploch, ale entropický člen zůstává nezměněný. Pro velké koncentrace vody v roztoku totiž dochází k převážení hydrofobních interakcí nad entropickým členem, a tudíž jsou pravděpodobnější menší vnější plochy.

Toto „soupeření“ dvou interakcí by mohlo vysvětlovat tvorbu dvou různých typů agregátů. Pro nízké koncentrace vody budou pravděpodobnější velké vnější plochy, které jsou charakteristické pro J-agregáty. Naopak pro velké koncentrace jsou pravděpodobnější malé vnější plochy, které jsou charakteristické pro H-agregáty.



Graf č.10 : Závislost pravděpodobnostní distribuce vnějších ploch dimeru na parametru α .

$P(A)$ označuje pravděpodobnost nalezení dimeru s vnější plochou A při koncentraci vody v rozpouštědle určené pomocí parametru α . Pro malé koncentrace vody v roztoku, malé α , převažuje entropický člen rovnice (95) (na grafu znázorněno modrým oválem). Pro velké koncentrace vody v roztoku, velká α , převažují hydrofobní interakce (na grafu znázorněno červeným oválem). Nulové hodnoty parametru α znamenají nepřítomnost vody v roztoku. Histogram ploch, ze kterého byla vypočítána pravděpodobnost ploch a sestaven tento graf, byl vypočítán pro 250000 náhodných konfigurací dimerů. Pro výpočet plochy byla použita metoda Monte-Carlo s 1000 body na povrchu každého válce. Teplota byla nastavena na 293K

Pro obecný výpočet s rozpadem a tvorbou agregátů je nejprve nutné definovat stav systému. P systém obsahující N karotenoidů je stav systému pro tuto metodu přesně určen uspořádanou $2N$ -ticí čísel:

$$(A_1, A_2, \dots, A_N, n_1, n_2, \dots, n_N)$$

kde: $\sum_i n_i = N$

kde A_i označuje vnější plochu i -tého agregátu a n_i je počet válců (karotenoidů) v i -tém agregátu. Pro speciální případy jako $n_j = 0$ pro plochu také platí $A_j = 0$. Pokud se v roztoku nachází například 6 válců, které tvoří jeden agregát o třech karotenoidech a plochou A_1 a jeden agregát o dvou karotenoidech s plochou A_1 a jeden válec je neagregovaný, tak je daný stav reprezentován jako:

$$(A_1, A_2, A, 0, 0, 0, 3, 2, 1, 0, 0, 0)$$

kde A je plocha jednoho válce. Pro pravděpodobnosti stavů i a j dostáváme:

$$\frac{p_j}{p_i} = e^{-\frac{\alpha(\sum_{k=1,N} A_k^j - \sum_k A_k^i)}{k_B T}} \frac{\prod_{k=N+1,2N} \rho_{n_k^j} (A_k^j)^{\Omega_{n_k^j}}}{\prod_{k=N+1,2N} \rho_{n_k^i} (A_k^i)^{\Omega_{n_k^i}}} \quad (96)$$

kde spodní indexy označují pozici údaje v uspořádané 2N-tici která určuje stav systému a horní indexy označují stav systému.

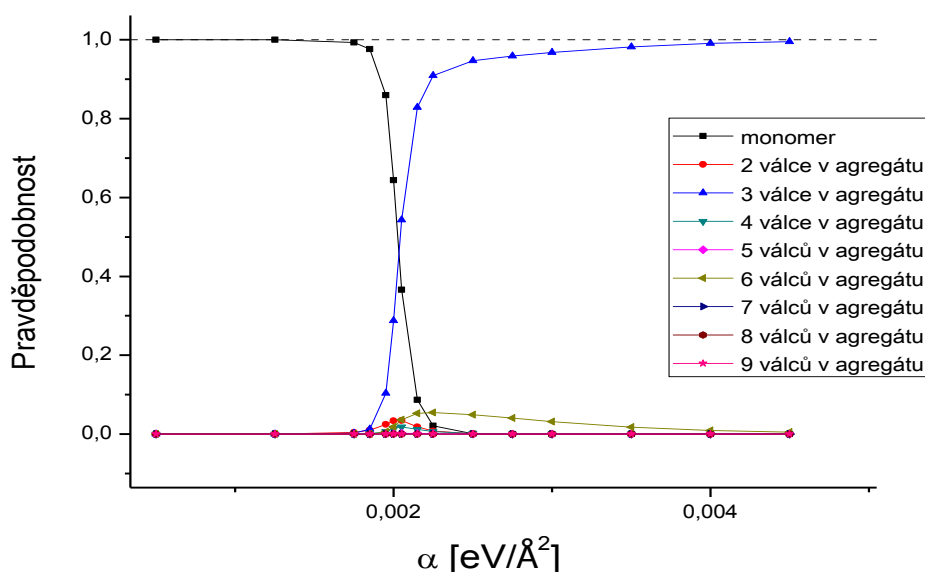
Jelikož vztah (96) nám nedává jednoznačné určení pravděpodobností, je vhodné provést celý výpočet s pravděpodobností jednoho stavu systému např. $p_i = 1$ a pravděpodobnosti všech ostatních stavů j vypočítat v pro přechody ze stavu i . Pro obdržení správných pravděpodobností je pouze nutné takto vypočtené pravděpodobnosti přenásobit faktorem $1/\sum_i p_i$ čímž je získána správná normalizace. Pro tento výpočet se nejvíce hodí využít stavu $(A, A, \dots, A, 1, 1, \dots, 1)$, kde A je plocha jednoho válce. Tento stav je výhodný, jelikož vypočtená multiplicita tohoto stavu je zatížena nejmenší chybou, protože se zde nemusí používat žádný odhad na výpočet multiplicity agregátu. Také velikost vnějších ploch je určena přesně, protože tato plocha je rovna ploše jednoho válce. Výpočet vnějších ploch agregátu, a tudíž všech ostatních stavů, je zatížen chybou, jelikož neexistuje analytický vztah pro její výpočet, a tudíž se pro výpočet používají diskrétní metody Monte-Carlo.

Tímto způsobem lze vypočítat pravděpodobnosti všech možných stavů systému, pro který známe pravděpodobnostní rozdělení ploch ρ_n , a pro všechny možné velikosti agregátů n , které se mohou vyskytovat.

4.9 Termodynamický přístup: Výpočet

Pomocí výše popsané metody byly vypočteny pravděpodobnosti všech různých možných stavů systému 9 karotenoidů (válců) v kubickém prostoru o hraně 80nm, čímž dostáváme přibližně 29 μ M koncentraci karotenoidů. Počet válců byl zvolen maximální možný s ohledem na výpočetní omezení. Při použitím vzorkování vnějších ploch dostáváme pro 9 válců přes 10^9 různých stavů systému, ale pro 10 válců přes 10^{11} různých stavů, což už převyšovalo kapacitu paměti použitého výpočetního stroje.

Výpočet pravděpodobností probíhal pro různé hodnoty parametru α od $\alpha = 0 \text{ eV}/\text{Å}^2$, což značí nepřítomnost vody v roztoku, po $\alpha = 4.54 \cdot 10^{-3} \text{ eV}/\text{Å}^2$, které odpovídá rozpouštědlu, tvořenému pouze čistou vodou. Tato maximální hodnota α byla vypočtena z hodnoty povrchového napětí čisté vody při 20°C. Škálování parametru α nemusí být lineární s koncentrací vody v rozpouštědle. Na to jak přesně se mění parametr α s koncentrací vody, mohou poskytnout odpověď například MD simulace dvou karotenoidů v rozpouštědlech s různou koncentrací vody. Přesnější výpočty, tzn. menší kroky v parametru α , byly provedeny pro oblast, kde dochází ke změně formování různých typů agregátů (viz *graf P20 a P21*), a to z důvodu přesnějšího popisu tohoto jevu. Pro všechny možné počty válců v agregátech byly vypočítány pravděpodobnosti výskytu v závislosti na parametru α . Tyto pravděpodobnosti byly obdrženy pouze jako součet pravděpodobností všech možných stavů systému válců, které tvoří agregáty o daných počtech válců. Závislost těchto pravděpodobností na parametru α je vynesena v *grafu č. 11* a vypočtené pravděpodobnosti jsou vyneseny v *tabulce P19*.



Graf č. 11. Závislost pravděpodobností nalezení agregátu dané velikosti v roztoku na koncentraci vody reprezentované parametrem α . Z grafu je jasně patné, že pro malé koncentrace vody v rozpouštědle je nejpravděpodobnější výskyt monomerů v roztoku a pro velké koncentrace je nejpravděpodobnější výskyt trimerů.

Z těchto vypočtených pravděpodobností vyplývá, že při malých koncentracích vody v roztoku pro α do $1.95 \cdot 10^{-3} \text{ eV}/\text{Å}^2$, se karotenoidy vyskytují v roztoku téměř výhradně jako monomery a nevytvářejí agregáty. Pro hodnoty α nad $2.15 \cdot 10^{-3} \text{ eV}/\text{Å}^2$ dochází převážně ke tvorbě agregátu o třech válcích. Celkový výskyt karotenoidů v roztoku lze převážně vyjádřit pomocí monomerů a agregátů o třech karotenoidech viz. graf P21. Ke tvorbě velkého množství agregátů různých velikostí dochází pouze v úzké oblasti okolo $\alpha = 2 \cdot 10^{-3} \text{ eV}/\text{Å}^2$ viz graf č. P20.

Z těchto pravděpodobností a z porovnání s grafem č.10 vyplývá, že k tvorbě agregátu dochází až pro velké hodnoty parametru α a tudíž dochází pouze k formování agregátů o malé vnější ploše. Tento stav by mohl odpovídat formování H-agregátů. Pravděpodobnosti tvorby agregátů pro malé hodnoty α , například $5 \cdot 10^{-4} \text{ eV}/\text{Å}^2$, jsou velice malé, a tudíž při porovnání s grafem č.10 je patrné, že by nemělo docházet k formování agregátů s malou vnější plochou, které by mohly odpovídat J-agregátům. Při porovnání těchto výsledků s [13] vyplývá, že pravděpodobnost výskytu agregátů s velkou vnější plochou by měla být vyšší, než pravděpodobnost vypočtená touto metodou.

Tato chyba by mohla být způsobena dvěma faktory. Prvním tímto faktorem je volba velikosti parametru α . Jak již bylo řečeno, tento parametr se nemusí lineárně škálovat s koncentrací vody, a tudíž například při zvýšení velikosti hydrofobní interakce karotenoidů s vodou (zvýšení velikosti α) při dané koncentraci vody v rozpouštědle, by došlo ke zvýšení pravděpodobnosti formování agregátů. Toto zvýšení parametru α bude mít ale za následek také zvýšení pravděpodobnosti formování agregátů s malou vnější plochou a tudíž pravděpodobnost nalezení agregátů s velkou vnější plochou při dané koncentraci vody v rozpouštědle zůstane nezměněna. Volba velikosti α tudíž nemá efekt na pravděpodobnosti formování agregátů s malou nebo

velkou vnější plochou, ale ovlivňuje pouze, při jaké koncentraci vody začne docházet k agregaci. Dalším faktorem, který by mohl ovlivňovat pravděpodobnosti nalezení agregátů s malou nebo velkou vnější plochou, je entropický člen $\Omega_{\text{kar.}}^j / \Omega_{\text{kar.}}^i$ v rovnici (92). Pokud je malá pravděpodobnost setkání dvou válců (karotenoidů) v prostoru, je tudíž i malá pravděpodobnost tvorby agregátů. Toto má za následek tvorbu agregátů pouze při větších hodnotách α , a tudíž dochází pouze k formování agregátů s malou vnější plochou, viz. *graf č.10*. Na druhou stranu, pokud pravděpodobnost setkání válců v prostoru bude vysoká, bude docházet ke tvorbě agregátů i při nižších hodnotách parametru α , a tudíž bude docházet ke tvorbě jak agregátů o velké vnější ploše tak i o malé vnější ploše.

Změnou pravděpodobnosti setkání dvou válců (karotenoidů) v prostoru, například navýšením jejich poloměrů, dochází k navýšení pravděpodobností formování agregátů o velkých vnějších plochách (J-agregátů). Právě změnou této pravděpodobnosti bychom mohli obdržet výsledky srovnatelné s výsledky v [13].

V této metodě se využívalo předpokladu, že se karotenoidy pohybují v roztoku volně a nezávisle. Pokud se dva karotenoidy přiblíží k sobě natolik, aby došlo k průniku solvatačních obálek, tedy k vytlačení vody z prostoru mezi nimi, dochází k tvorbě agregátu a pohyb těchto karotenoidů už není nezávislý. Z důvodu malých pravděpodobností nalezení agregátu v roztoku charakterizovaném malými hodnotami α se jeví tento předpoklad jako špatný. Při vložení hydrofobní molekuly do vodného roztoku dochází k uspořádání vody na povrchu této molekuly, tedy k uspořádání tzv. první solvatační vrstvy. Toto uspořádání první solvatační vrstvy ale může ovlivnit i další blízké molekuly vody a při vložení hydrofobní molekuly do vody může tudíž dojít k ovlivnění více solvatačních vrstev. Pokud dojde k překryvu těchto vzdálenějších, ale ovlivněných solvatačních vrstev dvou karotenoidů, přestávají se tyto karotenoidy pohybovat v prostoru nezávisle a bude pro ně z hlediska Gibbsovy energie výhodnější pohyb k sobě a tvorba agregátu. Tento předpoklad by mohl být ověřen pomocí MD simulací výpočtem profilu volné energie při oddalování dvou karotenoidů. Pokud by docházelo ke změnám Gibbsovy energie i při větších vzdálenostech karotenoidů, tak by muselo docházet k interakci karotenoidů i přes více molekul vody.

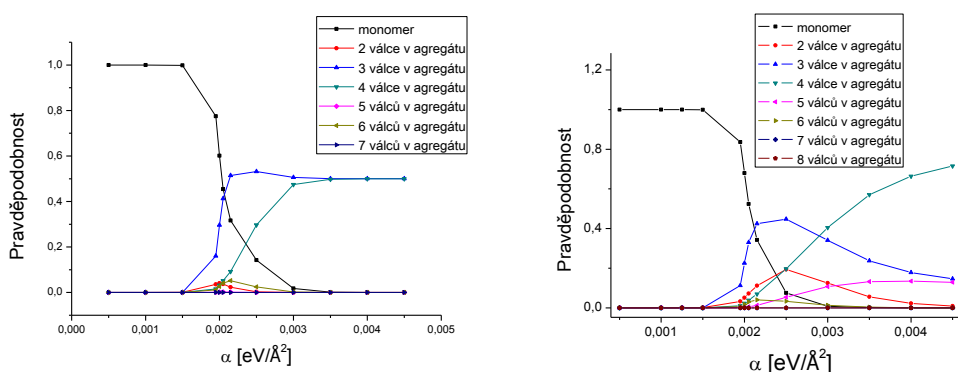
Za interakci karotenoidů na delší vzdálenosti by mohly být zodpovědné i jiné interakce kromě organizace vody okolo hydrofobní části molekuly karotenoidu, jako například interakce polárních skupin karotenoidů. Jelikož jsou ale karotenoidy nenabitě molekuly a jejich vzájemná interakce je malá, lze předpokládat, že za větší pravděpodobnost setkání dvou karotenoidů v roztoku může z hlavní části organizace vody i ve vzdálenějších solvatačních vrstvách karotenoidů .

Tato interakce karotenoidů i přes větší vrstvu vody by mohla být v modelu reprezentována například navýšením poloměrů válců, nebo navýšením pravděpodobnosti setkání dvou válců v prostoru $\Omega_{2\text{mon}} / \Omega_{\text{dimer}}$.

4.10 Termodynamický přístup: Závislost na počtu karotenoidů

Jelikož při výpočtu je možné využít pouze agregáty do určitého maximálního počtu karotenoidů, dostáváme omezené množství různých konfigurací. Z tohoto důvodu mohou vypočtené pravděpodobnosti formování agregátů různých velikostí záviset na tomto maximálním počtu karotenoidů při výpočtu. Pokud bychom prováděli výpočet s velkým množstvím karotenoidů, bylo by možné tuto závislost vyloučit. Jelikož ale mohl být proveden výpočet pouze pro maximální počet devíti karotenoidů, vypočtené pravděpodobnosti a tudíž i výsledná spektra budou záviset na tomto počtu

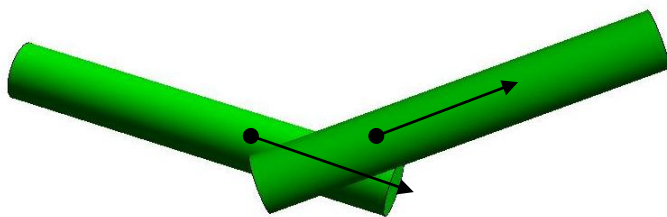
karotenoidů. Pro zjištění, jak závisí vypočtené pravděpodobnosti jednotlivých velikostí agregátů a jejich spektra na maximálním počtu karotenoidů v agregátu, byla vypočtena závislost pravděpodobností různých velikostí agregátů pro 7 a 8 karotenoidů v prostoru na parametru α a výsledky byly porovnány s hodnotami vypočtenými pro 9 karotenoidů v prostoru. Prostor byl vždy zmenšen tak, aby byla koncentrace karotenoidů v prostoru stále stejná. Vypočtené pravděpodobnosti jsou vyneseny v tabulkách P22 a P23 a zaneseny v grafu č. 12. Z těchto grafů je patrné, že pravděpodobnosti různých velikostí agregátů jsou závislé na počtu karotenoidů v prostoru. Při změně počtu karotenoidů dochází k razantní změně závislosti pravděpodobností agregátů na parametru α pro agregáty o 3 a 4 karotenoidech (válcích). Naopak závislost pravděpodobnosti nalezení monomeru v roztoku na parametru α je pro všechny případy velice podobná. Pokles pravděpodobnosti nastává vždy okolo $\alpha = 2 \cdot 10^{-3} \text{ eV}/\text{Å}^2$, ale s rostoucím počtem karotenoidů v prostoru je tento pokles s α rychlejší.



Graf č.12: Závislost pravděpodobností nalezení agregátu dané velikosti v roztoku na koncentraci vody reprezentované parametrem α pro 7 a 8 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 735.7Å resp. 770 Å.

4.11 Termodynamický přístup: Absorpční spektra

Pro výpočet absorpčních spekter je nejdůležitější správný výpočet vzájemné interakce karotenoidů v agregátu. Nejlepší způsob tohoto výpočtu by byl pomocí metod kvantové chemie vypočítat velikost interakce pro každou generovanou konfiguraci karotenoidů. Tímto způsobem bychom obdrželi velice přesné hodnoty interakční energie, ale z důvodu značné časové náročnosti, je nutné zvolit jiný přístup. Nejjednodušším způsobem by bylo počítat interakční energii v dipól-dipólovém přiblížení jako interakci dipólů, které jsou orientovány podél polyenového řetězce, pomocí vztahu (45). Karotenoidy ale nelze aproximovat pomocí bodových dipólů, jelikož jejich velikost není zanedbatelná vůči vzájemné vzdálenosti. V [13] je představen přesnější výpočet vzájemné interakce karotenoidů, ale tento výpočet je také velice časově náročný a nehodí se tedy pro výpočet velkého množství konfigurací. Karotenoidy se chovají jako dipóly, ale k nejsilnější interakci dochází v místech, která jsou si vzájemně nejbližší, a tudíž nemůžeme dipóly umístit vždy do středů karotenoidů viz. obr. č.12.



Obrázek č.12: Selhání dipól-dipólové aproximace

Pro tuto pozici karotenoidů vzájemná interakce spíše odpovídá interakci dvou bodových dipólů v dipól-dipólovém přiblížení, které jsou posunuty ze středů karotenoidů, označeny šipkami, než interakce dipólů umístěných ve středech válců.

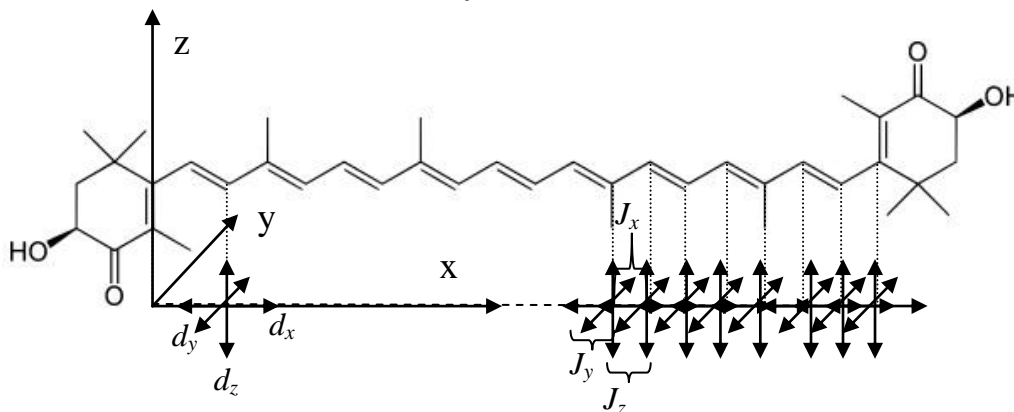
Lze tudíž předpokládat, že by bylo možné popsat interakce karotenoidů pomocí dipólových momentů, jejichž poloha bude záviset na aktuální konfiguraci karotenoidů. Z tohoto důvodu není výpočet interakce dvou karotenoidů v dipól-dipólovém přiblížení, jako interakce dvou dipólů umístěných ve středech karotenoidů, vhodný. Pro výpočet interakční energie ale můžeme vyjít z aproximace karotenoidu polyenovým řetězcem, a na každém atomu se nachází volný elektron, který je chycen u jádra a který se chová jako oscilátor, který může být reprezentován bodovým dipólem. Pro jednoduchost si tento řetízek můžeme tedy představit jako lineární řetízek bodových dipólů (oscilátorů). Interakce oscilátorů popisujeme pomocí efektivního excitonového modelu, pro který bereme v potaz pouze interakce oscilátoru s nejbližším sousedem (viz. obr. č. 13). Velikost interakce sousedních dipólů (oscilátorů) může být vypočtena klasicky pomocí vztahu (45). Pokud umístíme osu x ve směru řetízku dipólů dostaneme ze vztahu (45) interakce mezi dvěma oscilátory pro jednotlivé složky dipólových momentů:

$$J_x = -3 \frac{d_x^1 d_x^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}^3}, \quad (97)$$

$$J_y = \frac{d_y^1 d_y^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}^3}, \quad (98)$$

$$J_z = \frac{d_z^1 d_z^2}{4\pi\epsilon_0 r_{12}^3}, \quad (99)$$

kde r_{12} je vzdálenost dvou sousedících oscilátorů d_j^i označuje velikost dipólového momentu i -tého oscilátoru ve směru j .



Obrázek. č.13: Aproximace karotenoidu pomocí bodových dipólů

Interakce mezi různými složkami dipólů budou nulové, jelikož jsou na sebe kolmé. Tyto interakce vedou k rozštěpení energetických hladin jednotlivých oscilátorů. Celkový dipól řetězku můžeme napsat jako lineární kombinaci dipólů na jednotlivých atomech jako:

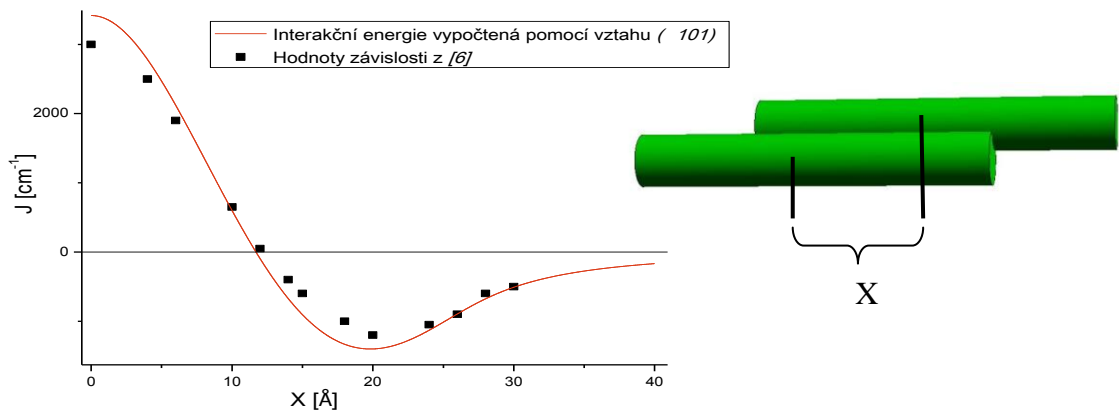
$$\vec{d} = \sum_{n=1}^N c_n \vec{d}_n \quad (100)$$

kde \vec{d}_n je dipól n-tého oscilátoru a c_n jsou rozvojové koeficienty, \vec{d} je celkový dipól a N je celkový počet bodových dipólů v řetězku, který je roven počtu uhlíků v řetězci konjugovaných vazeb v karotenoidu. Rozvojové koeficienty c_n obdržíme diagonalizací interakčního hamiltoniánu jednotlivých oscilátorů, jako rozvojové koeficienty náležející hladině s nejnižší excitovanou energií a tudíž s nejvyšší oscilátorovou silou. Tento stav ztotožňujeme s S2 stavem. Pokud se zajímáme o interakci dvou karotenoidů, myšlenka je naprosto stejná. Pro každý karotenoid jsou vypočteny rozvojové koeficienty jednotlivých bodových dipólů a interakce mezi dvěma karotenoidy je vypočtena klasicky jako vzájemná interakce mezi všemi bodovými dipóly. Pro interakční energii J mezi dvěma karotenoidy můžeme tudíž psát:

$$J = \frac{1}{4\pi\epsilon_0} \sum_{m,n} c_m^1 c_n^2 \left(\frac{\vec{d}_m^1 \cdot \vec{d}_n^2}{r_{mn}^3} - 3 \frac{(\vec{d}_m^1 \cdot \vec{r}_{mn})(\vec{d}_n^2 \cdot \vec{r}_{mn})}{r_{mn}^5} \right) \quad (101)$$

kde horní indexy značí karotenoidy a dolní indexy číslovají bodové dipóly, c_i^j je rozvojový koeficient i-tého dipólu j-tého karotenoidu a \vec{d}_i^j jsou dipólové momenty bodových dipólů ležících na jednotlivých atomech.

Parametry modelu byly nastaveny tak, aby co nejlépe odpovídaly reálnému karotenoidu. Počet bodových dipólů odpovídá počtu atomů řetězce konjugovaných vazeb a tudíž $N=20$. Vzdálenost dvou dipólů byla nastavena jako kolmá vzdálenost dvou sousedních atomů řetězce konjugovaných vazeb $r=1.3\text{\AA}$. Velikost bodových dipólů byla zvolena tak aby celková velikost dipólu karotenoidu byla rovna vypočtené hodnotě [13] $d=28.6D$. Jednotlivé bodové dipóly mají tudíž velikost $d_n=6.95D$.



Na obrázku č.14 (vlevo) je vyneseno porovnání interakční energie vypočtené pomocí vztahu (101) červeně, a hodnot interakčních energií z [13], černé body, pro vzájemné posouvání dvou paralelních karotenoidů (vpravo). Z těchto závislostí je patrné, že navrhovaný klasický vztah (101) pro výpočet interakční energie dobře aproximuje hodnoty vypočtené pomocí kvantově mechanických výpočtů.

Tento vztah umožňuje rychlé a zároveň relativně přesné výpočty interakčních energií a tudíž se hodí pro výpočet absorpčních spekter velkých agregátů a velkého množství konfigurací.

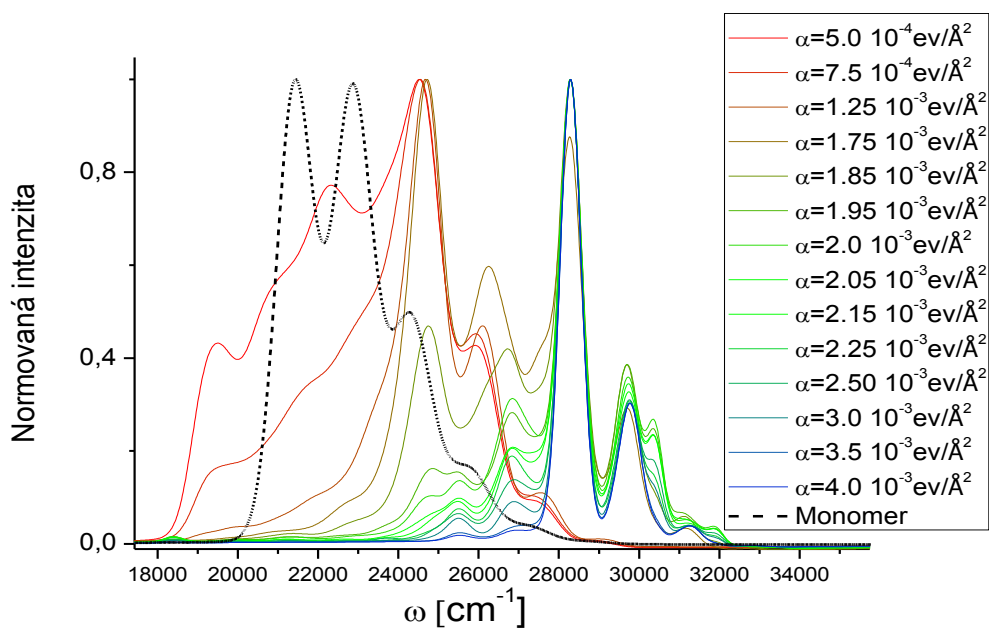
S využitím vztahu (101) pro interakční energii byla vypočtena absorpční spektra v závislosti na parametru α , který reprezentuje koncentraci vody. Absorpční spektra byla vypočtena bez příspěvků od monomerů, jelikož jak již bylo napsáno dříve v sekci 4.9, nebyl přesně zvolen poloměr válce reprezentujícího vodní obálku karotenoidu. Z tohoto důvodu vychází pravděpodobnost výskytu monomerů v roztoku o malých koncentracích vody příliš velká, a při započtení monomerů bychom tedy obdrželi pouze příspěvek od monomerů a nebyl by patrný posun maxim absorpčních spekter.

Pro výpočet spekter byly využity tyto parametry: dva vibrační módy o frekvencích $\omega_{vib.}^1=1520\text{cm}^{-1}$ a $\omega_{vib.}^2=1150\text{cm}^{-1}$, reorganizační energie vibrací $\lambda_{vib.}^1=1220\text{cm}^{-1}$ a $\lambda_{vib.}^2=250\text{cm}^{-1}$, damping time vibrací $\tau_{vib.}^{1,2}=1\text{ps}$, frekvence přechodu $\omega_{eg}=20000\text{cm}^{-1}$, reorganizační energie rozpouštědla $\lambda_{vib.}^1=550\text{cm}^{-1}$ a jeho korelační doba $\tau_c=100\text{ps}$.

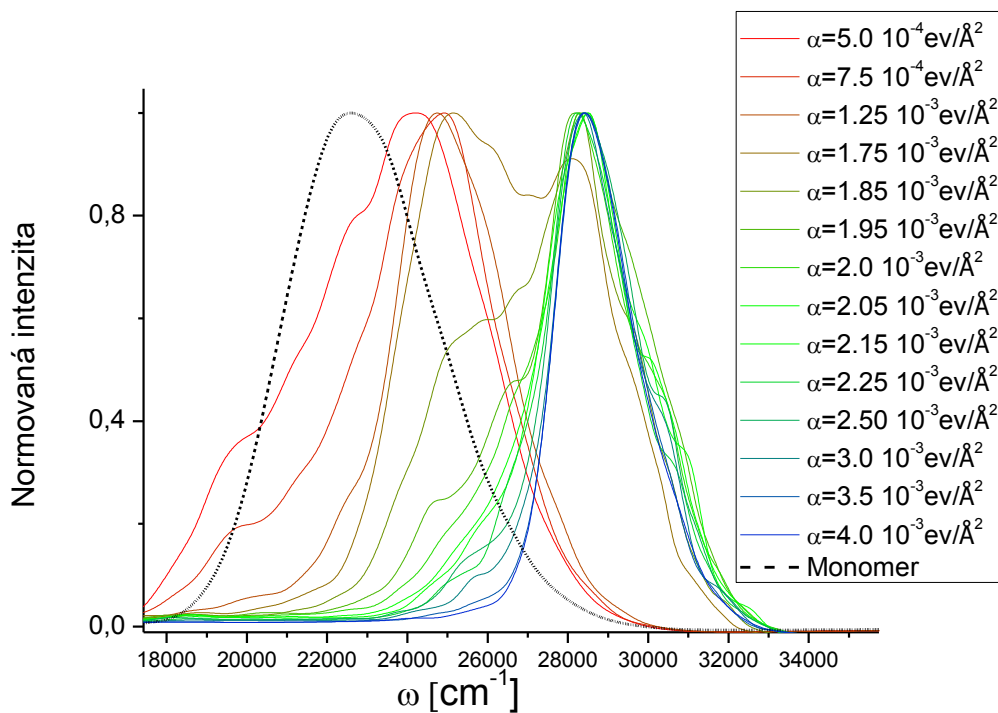
Z vypočtených spekter (graf č.15) je patrný posun absorpčních maxim do vyšších frekvencí a zúžení absorpčních spekter s rostoucí koncentrací vody v roztoku (velké hodnoty α). Pro nízké koncentrace vody v roztoku (nízké hodnoty parametru α) je patrné rozšíření spektra a roztažení i do nižších frekvencí. Toto je v souladu s experimentálními měřeními, které jsou popsány v sekci 3.1 a v [7]. Posun absorpčního maxima do nižších frekvencí ale není tak velký jaký byl naměřen v experimentu a vypočten v [13]. Například pro rozpouštědlo s poměrem voda-DMSO 1:1 by mělo být absorpční maximum okolo 1700cm^{-1} , ale tak velký posun z této metody nedostáváme. Pro ověření jestli za tento jev nemohou například špatně zvolené poloměry válců a tudíž špatně vypočtená pravděpodobnost setkání dvou válců v prostoru, nebo jiné parametry metody, byly vygenerovány náhodné konfigurace agregátů o dvou, třech a čtyřech a devíti válcích pro $\alpha = 0$ (graf č.16). Tímto odstraníme vliv vody a její tendenci na minimalizaci vnější plochy agregátů, a tudíž i preferenci pevně vázaných agregátů, a výsledné konfigurace budou reprezentanty konfigurací s největší vnější plochou, kterou lze touto metodou dosáhnout a tudíž i s největším možným posunem absorpčních spekter do nižších frekvencí. Z naměřených spekter je patrné, že i při úplném odstranění vlivu vody, která „nutí“ karotenoidy tvořit těsné agregáty, nedostáváme dostatečný frekvenční posun absorpčních spekter. Navrhovaná metoda tudíž selhává v popisu tvorby volně vázaných J-agregátů, což by mohlo naznačovat, že za vznik těchto agregátů nejsou zodpovědné pouze hydrofobní interakce, ale i například interakce polárních skupin koncových cyklů karotenoidů.

Tato myšlenka byla ověřena výpočtem absorpčních spekter pro řetízky, které odpovídají napojení karotenoidů přes koncové cykly (viz. graf č.17). Z absorpčních spekter je patrné, že pro tyto konfigurace dochází k většímu posunu absorpčních maxim do nižších frekvencí, než při náhodné konfiguraci. Z grafu č.17 je také možné usuzovat, že zde existuje jistá preference úhlů mezi dvěma napojenými karoteny, jelikož pro náhodný úhel nedojde k posunutí absorpčních maxim do nižších frekvencí. Pozice absorpčního minima také záleží na velikosti posunutí karotenoidů v lineárním řetízku (graf č.18). Tyto spektrální závislosti ukazují na nutnost zahrnutí dalších interakcí do modelu, abychom byli schopni správně popsat tvorbu volně vázaných J-agregátů.

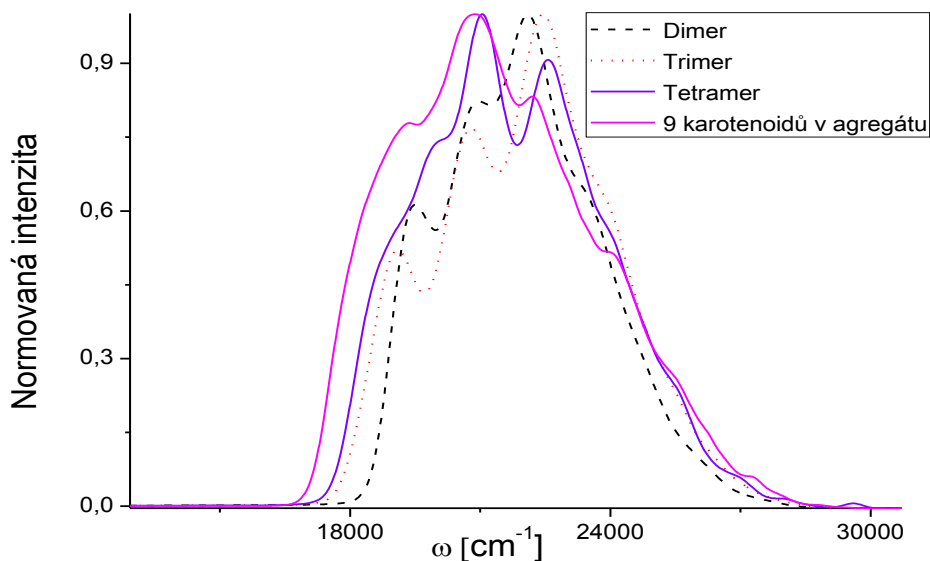
A)



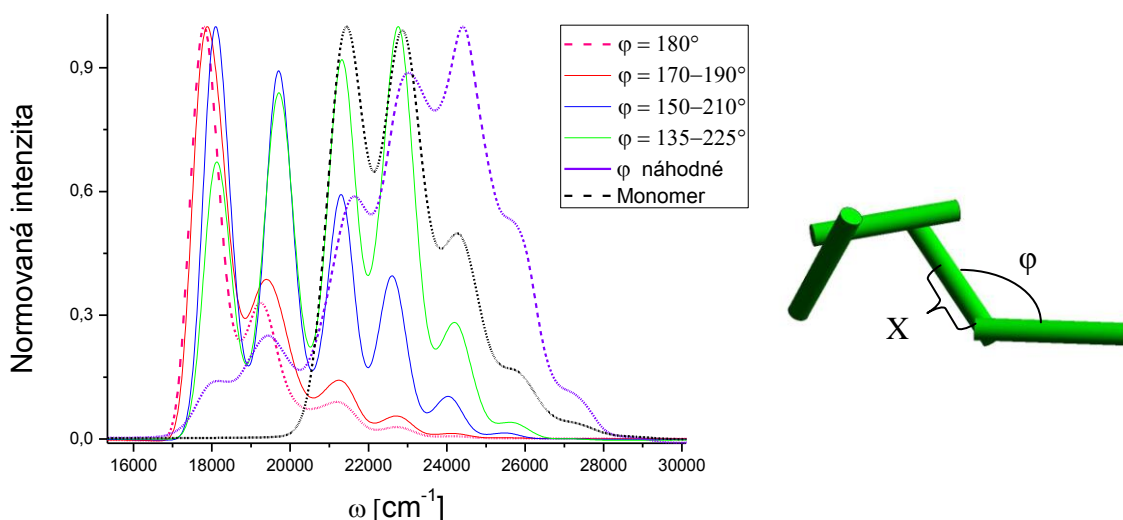
B)



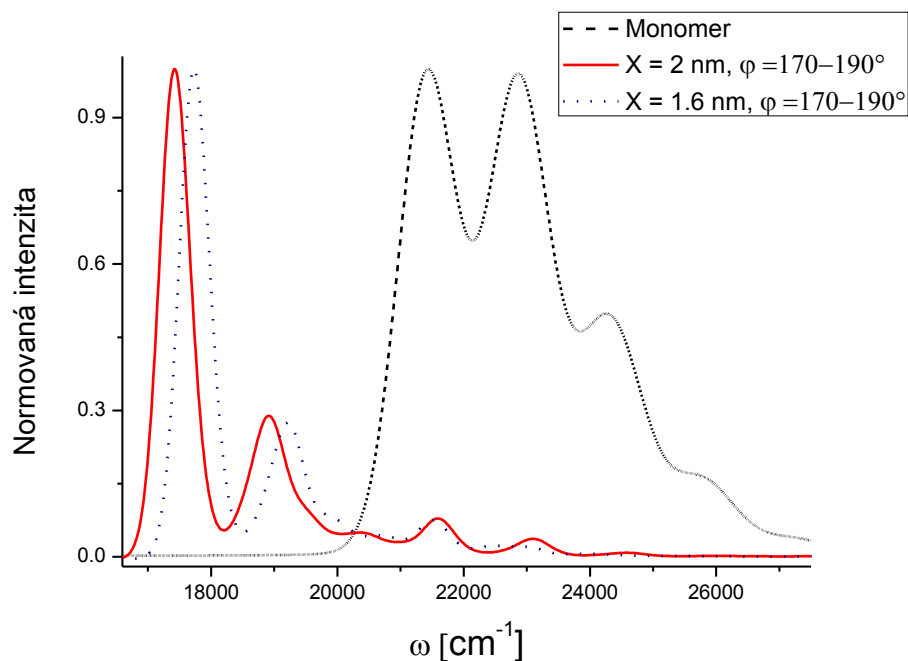
Graf č. 15: Závislost absorpčních spekter na parametru α bez A) a s neurčitostí v přechodových frekvencích generovanou Gaussovským rozdělením s variancí 1200cm^{-1} B). Absorpční spektra byla vypočtena pro každou hodnotu parametru α z 1000 různých konfigurací vygenerovaných na základě vypočtené pravděpodobnostní distribuce viz tabulka P19. Z naměřených spekter je patrné, že navrhovaná metoda dobře popisuje formování H-agregátů, ale nepopisuje formování J-agregátů, jelikož dochází pouze k posunu absorpčního maxima spektra do vyšších frekvencí.



Graf č. 16: Toto spektrum bylo vypočteno vždy z 1000 náhodných konfigurací. Tato spektra by odpovídala konfiguracím, které by se teoreticky nacházely v roztoku při nulových koncentracích vody. Tyto konfigurace mají největší volnost ve vzájemném organizaci karotenoidů v agregátu, jelikož při „vypnutí“ interakce s vodou není žádná tendence k preferenci nějakého specifického uspořádání. Právě tyto konfigurace by měly poskytovat největší teoretický posun absorpčních spekter do nižších frekvencí pro navrhovanou metodu. Z vypočtených absorpčních spekter je patrné, že ani pro tyto konfigurace nedostáváme dostatečný posun maxim absorpčních spekter, který by dobře vysvětlil velký posun absorpčního maxima karotenoidů v roztoku voda-DMSO 1:1.



Graf č. 17: Absorpční spektrum „lineárního“ tetrameru. Vlevo je vynesena závislost absorpčního spektra na úhlu mezi napojenými monomery pro lineární tetramer. Ze spekter je patrný větší posun absorpčního maxima pro lineární tetramer, s karotenoidy s rozmezím úhlů 150°-210°, do nižších frekvencí než u náhodných konfigurací grafu 16. Vzdálenost X karotenoidů byla vyjma náhodně konfigurace volena náhodně v rozmezí 10-30Å. Spektra byly vypočteny z 200 různých konfigurací. Vpravo je vynesena příklad lineárního tetrameru.



Graf č. 18: Závislost absorpčního spektra lineárního tetrameru na vzájemném posunutí karotenoidů.

4.12 Termodynamický přístup: Diskuse

Velkou výhodou této metody je přímočaré obdržení pravděpodobností všech možných stavů, pro různé koncentrace vody v roztoku, s velice dobrou přesností, která by například pro ty málo pravděpodobné stavy byla jiným způsobem nedosažitelná. Nutností je „předprojít“ všechny možné konfigurace, při nulové koncentraci vody, pro výpočet pravděpodobností jednotlivých ploch pro všechny možné velikosti agregátů. Další výhodou této metody je „libovolně“ přesné vzorkování ploch. Pokud se například zajímáme hlavně o možné tvary dimerů, je lze pro výpočet pravděpodobností jednotlivých ploch dimerů použít jemné vzorkování při vytváření histogramu a pro větší agregáty nechat toto vzorkování hrubší.

Tato metoda je použitelná pouze pro malá množství karotenoidů, a tudíž také pro malé maximální velikosti agregátů. Toto je dáno exponenciální závislostí počtů možných stavů. Například pro 8 karotenoidů je jedna z možných konfigurací tvořena 4 agregáty po dvou karotenoidech. Pokud pro agregát o dvou karotenoidech použijeme vzorkování 100 různých velikostí vnějších ploch, tak pro takovou konfiguraci dostáváme 100^4 možných stavů systému, které se musí projít při výpočtu pravděpodobnosti. Pro 10 karotenoidů pro konfiguraci pěti agregátů o dvou karotenoidech dostáváme při stejném vzorkování $100^5 = 10^{10}$ možných stavů systému. Takové množství pravděpodobností je potřeba někde uložit a při využití ještě většího počtu karotenoidů už je toto z hlediska výpočetních omezení přinejmenším nevhodné. Právě tyto konfigurace, které obsahují velký počet agregátů malé velikosti, nám udávají limitu výpočtu.

Další omezení je v nutnosti výpočtu pravděpodobností jednotlivých vnějších ploch ρ_n pro velké agregáty. Pro tento výpočet je nutné sestavit histogram z velkého množství vypočtených vnějších ploch pro náhodné konfigurace, ale tento výpočet se stává stále náročnějším při navyšování velikosti agregátu viz *sekce 4.7* a tabulka P9.

Toto omezení se ale netýká výpočtu multiplicit celkových agregátů Ω_n , jelikož pro výpočet těchto multiplicit můžeme použít odhadu (viz sekce 4.7).

Další nevýhodou metody je závislost pravděpodobností jednotlivých konfigurací na celkovém počtu karotenoidů, a to právě z důvodu omezené maximální velikosti agregátu. Například při výpočtu se sedmi, osmi a devíti karotenoidy vycházejí pro velká α nejpravděpodobnější různé velikosti agregátů viz *graf č. 10 a 11*. Na druhou stranu pravděpodobnost nalezení monomeru v roztoku je u všech počtů karotenoidů přibližně stejná. Vylepšení výpočtů by mohlo přinést rozšíření výpočtu na větší počet karotenoidů v prostoru při aplikaci dalších algoritmů na optimalizaci výpočtu.

Ze spektroskopického hlediska je ale potřeba znát pravděpodobnosti jednotlivých pozic karotenoidů v agregátu, jelikož z vnější plochy se spektra vypočítat nedají. Tento problém je ale vyřešen tím, že při procházení různých konfigurací agregátů, kvůli sestavení histogramu vnějších ploch, byly zaznamenány přesné pozice a orientace karotenoidů v agregátu a této konfiguraci byla přiřazena celková vnější plocha. Pro výpočet spekter nám tudíž stačí znalost pravděpodobností ploch a pro tyto plochy bude poté vypočítáno spektrum pro náhodně vybranou konfiguraci, která náleží dané ploše. Vypočtená absorpční spektra vykazují správná posunutí pro velké koncentrace vody v roztoku, reprezentované parametrem α , které souhlasí s experimentálními měřeními [7]. Pro nízké koncentrace vody ale nedochází k posunu absorpčních maxim do nižších frekvencí. Metoda, která je založena pouze na hydrofobních interakcích zde selhává a neumožňuje tudíž popis tvorby J-agregátů. Vypočtené spektrální závislosti ukazují na nutnost preference tvorby řetízků, ve kterých jsou karotenoidy vůči sobě hodně posunuty a jsou vůči sobě orientovány pod určitými úhly, což by odpovídalo například interakcím karotenoidů přes koncové cykly. Popis J-agregátů tudíž není možný pouze pomocí hydrofobních interakcí a na vznik těchto agregátů musí tudíž mít hlavní vliv jiné interakce. Potvrzení této myšlenky tvorby agregátů přes koncové cykly karotenoidů by mohly dále potvrdit MD simulace dvou nebo tří karotenoidů v roztoku s malou koncentrací vody.

4.13 Monte-Carlo simulace

Dalším možným způsobem výpočtu pravděpodobnostní distribuce různých konfigurací karotenoidů v roztoku jsou Monte-Carlo simulace. V této metodě se využívá optimalizovaného vzorkování konfiguračního prostoru pomocí upravené Metropolisovy metody. Tato metoda je také založena na popisu pomocí vnějších ploch vystavených vodě, ale na rozdíl od termodynamického přístupu (*sekce 4.7*) nepočítáme pravděpodobnosti jednotlivých vnějších ploch agregátů, ale počítají se rovnou pravděpodobnosti jednotlivých konfigurací. Tento způsob je výhodný ze dvou důvodů. Hlavním důvodem je, že oproti předchozí metodě zde není nutné předvzorkovat všechny možné konfigurace, čímž se při každém výpočtu omezujeme pouze na tyto konfigurace, a je tedy možné dosáhnout v každém výpočtu opravdu libovolné konfigurace. S tím souvisí také možnost simulace velkého množství karotenoidů. Další výhodou této metody je jednoduchý výpočet absorpčních spekter, pro který jsou nutné přesné pozice a orientace karotenoidů v agregátu, jež obdržíme přímo ze vzorkování konfiguračního prostoru, a nemusí se tedy provádět žádný přepočít jako u termodynamického přístupu (*sekce 4.7*).

Metropolisův algoritmus se využívá z důvodu urychlení konvergence výpočtů pravděpodobností různých stavů, jelikož v této metodě jsou zvýhodněny stavy s malou energií a tudíž s velkou pravděpodobností. Díky tomuto dostáváme, i při použití relativně malého množství vzorkovacích bodů konfiguračního prostoru,

slušnou přesnost při výpočtu nejpravděpodobnějších konfigurací. Při využití přímého vzorkování, pouze náhodný výběr konfigurace, by bylo nutné pro obdržení stejných přesností při výpočtu pravděpodobností nejpravděpodobnějších konfigurací použít mnohonásobně více bodů. Z tohoto důvodu jsou přímé metody nevhodné pro výpočty s větším počtem karotenoidů.

Pro tuto metodu ale není vhodné využít klasický Metropolisův algoritmus, jelikož celá agregace je popisována v NVT souboru a jednotlivé stavy systému nemají stejnou multiplicitu. Je tedy nutné tento algoritmus nějakým způsobem upravit, aby byl použitelný pro studovaný problém agregace. Tato úprava spočívá pouze ve změně podmínky na přijetí nové konfigurace. Pro výpočet této nové podmínky vycházíme ze vztahu (24) pro výpočet pravděpodobností stavů systému s různými multiplicitami. Pro rychlosti přechodu mezi stavem systému i a j dostáváme:

$$k_{n \rightarrow m} = k_0 \exp\left(-\frac{\Delta G}{k_B T}\right) \quad \text{Pro } \Delta G > 0 \quad (102)$$

$$k_{n \rightarrow m} = k_0 \quad \text{Pro } \Delta G < 0 \quad (103)$$

Pokud tato vyjádření porovnáme se vztahy (36) a (37) z odvození Metropolisovy metody dostáváme pro podmínku přijetí nové konfigurace místo $\exp\left(-\frac{\Delta E}{k_B T}\right)$ podmínku $\exp\left(-\frac{\Delta G}{k_B T}\right)$, kde ΔG označuje změnu Gibbsovy energie při přechodu mezi stavy i a j . Pro výpočet změny Gibbsovy energie je možné využít vztah (71) a po dosažení vyjádření entropie ze vztahu (79) tak podmínka přijetí změny konfigurace ze stavu i do stavu j může být vyjádřena jako:

$$e^{-\frac{\Delta G_V}{k_B T}} \left(\frac{\Omega_{\text{kar.}}^j}{\Omega_{\text{kar.}}^i} \right) \quad (104)$$

kde $\Omega_{\text{kar.}}^i$ a $\Omega_{\text{kar.}}^j$ jsou multiplicity systému karotenoidů (válců) pro původní stav i resp. pro nový stav j a ΔG_V označuje změnu Gibbsovy energie spojenou s hydrofobními interakcemi karotenoidů s vodou při přechodu z původního stavu i do nového stavu j . Tuto změnu Gibbsovy energie je možné dále vyjádřit s použitím vztahu (94), čímž obdržíme konečný tvar podmínky pro přijetí nové konfigurace:

$$e^{-\frac{\alpha(A_j - A_i)}{k_B T}} \left(\frac{\Omega_{\text{kar.}}^j}{\Omega_{\text{kar.}}^i} \right) \quad (105)$$

kde A_i a A_j je vnější plocha systému válců v počátečním stavu i resp. v koncovém stavu j . Z tohoto tvaru podmínky pro přijetí nové konfigurace je patrné, že se multiplicity uplatní pouze při rozpadech nebo tvorbě agregátů (při přechodu systému mezi stavy s různým počtem válců (karotenoidů) v agregátu). Například při přechodu ze stavu, kde je agregát tvořen 5 válci s vnější plochou A_1 do stavu, kde se agregát rozpadne na jeden agregát o 2 válcích a vnější ploše A_2 a jeden o 3 válcích a vnější ploše A_3 , dostáváme podmínku přijetí:

$$e^{-\frac{\alpha(A_2 + A_3 - A_1)}{k_B T}} \left(\frac{\Omega_3 \Omega_2}{\Omega_5} \right) \quad (106)$$

Celková Monte-Carlo simulace probíhá jednoduchým způsobem. Před začátkem simulace jsou do kubického prostoru s periodickými okrajovými podmínkami, kvůli odstranění efektů na stěnách prostoru, vloženy válce reprezentující karotenoidy. Toto vložení probíhá náhodně, nebo do předem definované libovolné konfigurace. Za tuto konfiguraci by bylo nejvhodnější vybrat nějaký předpoklad optimálního rozložení karotenoidů při dané koncentraci vody, určené pomocí parametru α . Při výběru takovéto konfigurace totiž dochází k urychlení konvergence při výpočtu pravděpodobností jednotlivých konfigurací. Simulace začíná posunutím válců v prostoru. Toto posunutí probíhá pro volné válce, což jsou ty které netvoří agregát, vygenerováním nové náhodné polohy a orientace. Při posunu válců, které tvoří agregát, je situace obdobná, vždy se vygeneruje náhodná poloha jednoho válce z agregátu a všechny válce se s tím prvním posunou, tak aby nedošlo ke změně tvaru agregátu. Tímto způsobem zůstávají všechny vzájemné polohy válců uvnitř jednoho agregátu zachovány. Takto se postupuje, jelikož při změně tvaru agregátu dochází ke změně Gibbsovy energie a ke změně entropie, a tudíž bychom museli aplikovat Metropolisovu podmínku na přijetí či nepřijetí této nové konfigurace. Z tohoto důvodu byl zde zvolen přístup oddělení těchto dvou procesů, nejdříve dojde k posunutí válců a agregátů v prostoru a poté dochází k jejich přeskládání či rozpadu. Po posuvu válců v prostoru dochází k napojování válců, tvorbě agregátů, a kontrole podmínky minimální vzdálenosti válců. Pokud některé dva válce mají průnik ploch, dochází k jejich napojení, nebo připojení do stávajícího agregátu, a nadále s těmito válci bude zacházeno jako s agregáty. K tomuto napojování dochází bez použití podmínky přijetí nové konfigurace (105), jelikož entropický člen v tomto vztahu je zahrnut už ve způsobu napojování. Aby došlo k napojení, musí dojít k průniku dvou válců. K tomuto jevu dochází s určitou pravděpodobností a entropický člen ve vztahu (105), reprezentuje právě tuto pravděpodobnost. Pokud vybíráme v každém kroku náhodně nové pozice a orientace válců, tak v podstatě simulujeme výpočet této pravděpodobnosti a tudíž dochází k překryvu povrchů válců právě s pravděpodobností, která je dána entropickým členem (105), čímž dochází k jeho implicitnímu zahrnutí při napojování. V podmínce přijetí nové konfigurace také vystupuje člen závislý na ploše. Při napojení dochází k překryvu ploch, a tudíž celková vnější plocha tohoto nového útvaru je menší než součet původních vnějších ploch. Při tomto procesu dochází ke snížení Gibbsovy energie, a tudíž je tato nová konfigurace vždy přijata.

Jelikož je velice těžké, ne-li nemožné, určit obecnou analytickou podmínku na průniky ploch dvou válců, byl pro napojování využit obdobný způsob jako pro výpočet vnějších ploch u termodynamického přístupu (sekce 4.7). Po posunutí válců v prostoru se jejich povrch náhodně vyplnil body. Vždy bylo použito stejné množství bodů na povrch každého válce. Poté se pro každý takovýto bod ověřovala podmínka, jestli leží uvnitř nějakého jiného válce. Pokud některý z bodů jednoho válce leží uvnitř jiného válce, dojde k jejich napojení a tvorbě agregátu. Při tomto procesu dochází také k ověřování podmínky minimální vzdálenosti každé dvojice válců. Pokud nějaká dvojice válců nesplňuje tuto podmínku, dochází k novému posunutí válců v prostoru a opakování předchozího postupu.

Jelikož by tato metoda, která vyžaduje projití všech bodů a všech kombinací válců byla velice neefektivní pro velký počet válců v prostoru, či pro velký počet bodů na povrchu, je nutné nějakým způsobem omezit množství počítaných kombinací. Před výpočtem průniku ploch výše popsaným způsobem dochází nejdříve k ověření dvou analytických podmínek. K napojení válců může docházet pouze pro válce, které nejsou moc daleko od sebe tak, aby mohlo docházet k průniku povrchů. Toto

reprezentuje první podmínka, která říká, že napojení může probíhat pouze mezi dvojicemi karotenoidů, jejichž vzdálenost středů je menší než $2\sqrt{\left(\frac{l}{2}\right)^2 + r^2}$ kde l je výška válce a r je poloměr jeho podstavy. Druhou podmínkou je maximální vzdálenost os válců. K průniku povrchů může docházet, pouze pokud je tato vzdálenost menší než průměr postavy válce. Pouze pro dvojice válců, které splňují tyto podmínky, dochází k testování průniku povrchů pomocí náhodných bodů.

Dalším krokem simulace je rozpojování (rozpad) agregátů. Teoreticky nejlepší způsob, jak odpojovat agregáty, by bylo najít karotenoidy nebo skupiny karotenoidů, které mají malou plochu dotyku se zbytkem agregátu, jelikož odpojení těchto válců by bylo pravděpodobnější než odpojení těch s velkou plochou dotyku (energetické hledisko). Tento způsob by ale vyžadoval znalost, jak jsou na sebe karotenoidy napojeny, a výpočet pravděpodobností všech různých možných odpojení. Poté by se vygenerovalo náhodné číslo s rovnoměrným rozdělením na intervalu (0,1) a ze znalosti pravděpodobností všech možných odpojení by se zvolil způsob, jakým se agregát rozpadne, či zůstane v celku. Tento způsob je ale velice náročný pro velké agregáty, a proto byl zvolen jiný přístup.

Tento přístup spočívá v náhodném rozpadu agregátu na dva, a u těchto dvou nově vzniklých agregátů dojde rovnou k přeuspořádání válců uvnitř agregátu. Díky tomuto přeuspořádání válců po rozpadu není nutné znát, jak přesně byly karotenoidy v původním agregátu poskládány. Pravděpodobnost přijetí této nové konfigurace může být vypočtena pomocí vztahu (106). Tímto způsobem popisu rozpadu agregátů se nedopustíme žádné chyby, jelikož v této metodě vzorkujeme konfigurační prostor, a původní i nová konfigurace se v tomto prostoru nacházejí. Výsledný rozpad agregátů tudíž probíhá takto:

1. Vygenerování náhodného počtu válců, které se odpojí z původního agregátu
2. Výstavba nového agregátu
 - a. na jeden válec ponechaný v původní poloze se náhodně napojí druhý tak, aby docházelo k překryvu povrchů těchto válců a byla splněna podmínka minimální vzdálenosti válců
 - b. na jeden z těchto dvou válců se napojí další stejným způsobem jako ten druhý
 - c. takto se pokračuje, dokud není vytvořen agregát o požadovaném počtu válců
3. Stejným způsobem se vytvoří druhý agregát ze zbylých válců
4. Pro přijetí této nové konfigurace se využije upraveného Metropolisova algoritmu (105)

Pro případy s velkou koncentrací vody v roztoku je výhodnější odpojovat pouze po jednom válci z agregátu, jelikož takto dostaneme větší pravděpodobnost přijetí této nové konfigurace.

Agregáty, pro které nedošlo k rozpadu, jsou ještě přeskládány. Při tomto přeskládání dojde k vytvoření náhodného agregátu o stejném počtu válců. Pro přijetí takto vygenerovaného nového stavu je opět využit upravený Metropolisův algoritmus (105). Po otestování rozpadů a přeskládání agregátů dochází opět k náhodnému posunutí karotenoidů a agregátů v prostoru a výše popsany proces se opakuje do obdržení požadovaného počtu kroků (bodů fázového prostoru). Po každém kroku dochází k zápisu všech pozic a orientací válců v prostoru. Pro výpočet absorpčních

spekter poté stačí pouze náhodně vybrat potřebný počet těchto stavů a z pozic a orientací karotenoidů jsou vypočítána spektra.

4.14 Monte-Carlo simulace: Výsledky a absorpční spektra

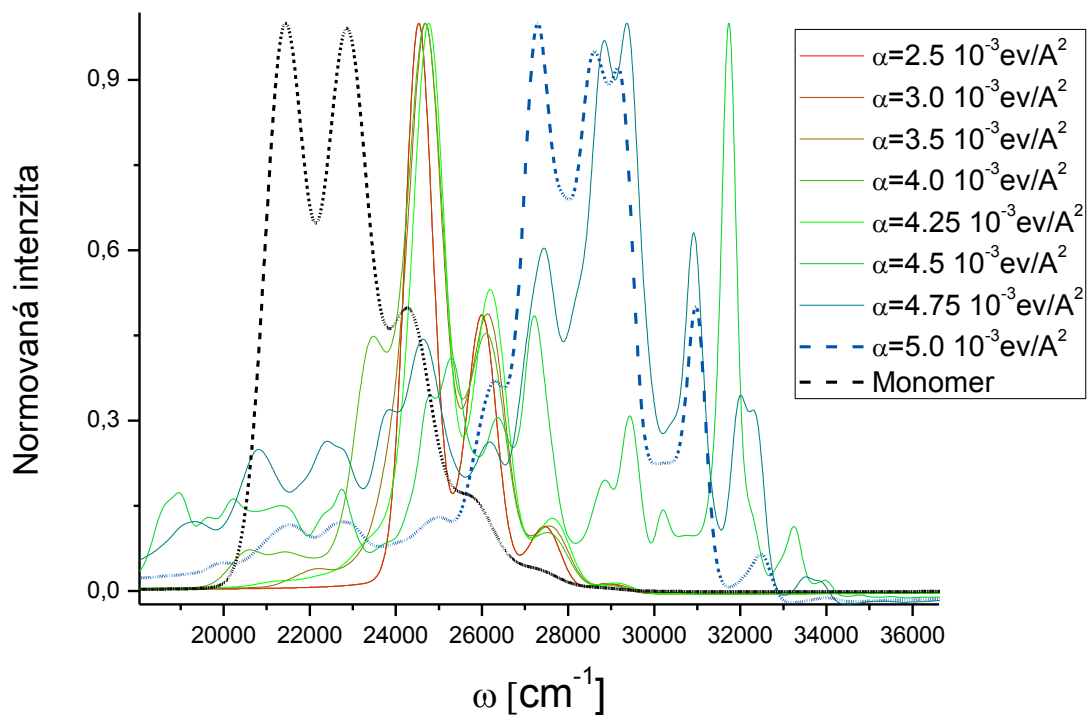
Způsobem popsaným v sekci 4.13 byla provedena Monte-Carlo simulace 20 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 100nm, čímž dostáváme 32.21 μ M koncentraci karotenoidů v roztoku, s periodickými okrajovými podmínkami. Periodické okrajové podmínky byly zvoleny z důvodu eliminace efektů omezeného prostoru. Simulace byla provedena v kanonickém NVT souboru při teplotě 293K. Byly provedeny simulace s dvěma počátečními podmínkami, a to s náhodným rozmístěním karotenoidů v prostoru a s počátečním agregátem o dvanácti válcích a zbytek válců byl umístěn náhodně, z důvodu otestování nezávislosti výsledků na počátečních podmínkách. Tyto simulace byly poté analyzovány a byly vypočteny pravděpodobnosti nalezení jednotlivých velikostí agregátů v prostoru v závislosti na parametru α který reprezentuje koncentraci vody v roztoku. Pro všechny analýzy bylo vyřazeno prvních 400000 konfigurací, jelikož tyto počáteční konfigurace nevypovídají o rovnovážných vlastnostech systému. Vypočtené hodnoty pravděpodobností jsou vyneseny v *tabulce P24*.

Dále byly provedeny Monte-Carlo simulace se zvýšenou pravděpodobností setkání karotenoidů, abychom zjistily, jak se systém bude přibližně chovat při navýšení poloměru válců při zahrnutí interakce karotenoidů přes více vrstev molekul vody. Při tomto výpočtu byl zmenšen objem prostoru, ve kterém se karotenoidy nacházely, faktorem 15.625 čímž jsme efektivně získali větší karotenoidy. Stejným faktorem byl přeškálován i poměr $\frac{\Omega_{2mon}}{\Omega_{dimer}}$ aby nedošlo ke změně pravděpodobnosti odpojování karotenoidů z agregátu. Vypočtené pravděpodobnosti nalezení agregátů v roztoku v závislosti na parametru α jsou vyneseny v *tabulce P25*.

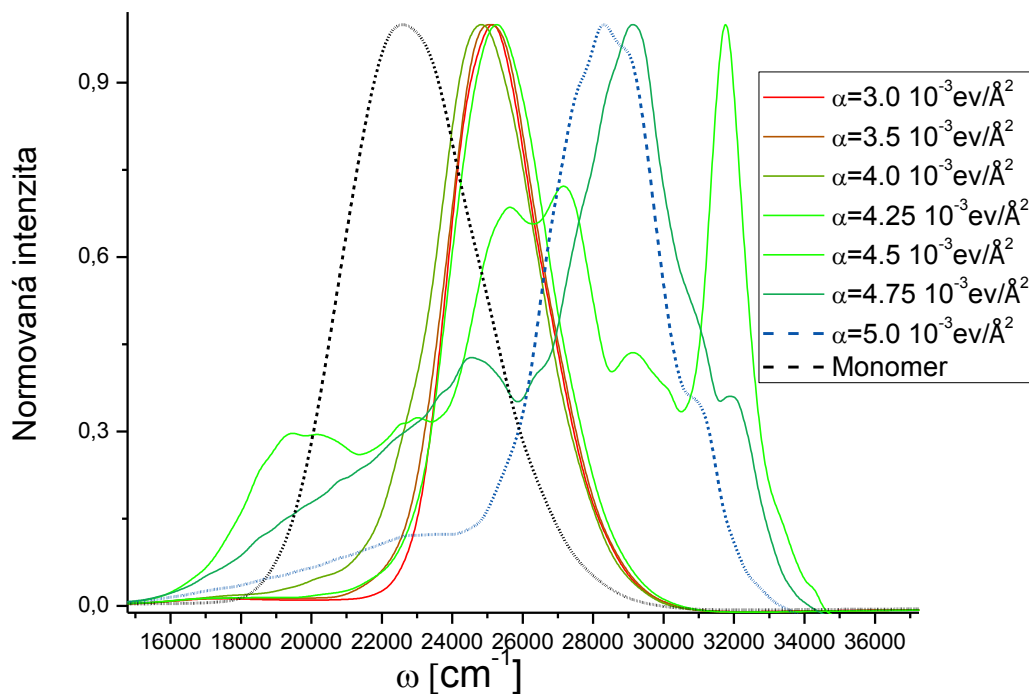
Pro oba tyto případy byla vypočtena absorpční spektra. Tato spektra byla vypočtena opět bez monomerního příspěvku, ze stejného důvodu jako v termodynamickém případě, kvůli nepřesné parametrizaci poloměru válce, který reprezentuje karotenoid, což vede k nadhodnocení příspěvků monomerů. Vypočtená spektra jsou vynesena v *grafech 19 a 20*. Absorpční spektra nedávají správný posun pro malé koncentrace vody v rozpouštědle ze stejného důvodu jako v termodynamickém přístupu, viz. kapitola 4.11. Na rozdíl od termodynamické metody ale dostáváme ve spektru také příspěvky od větších agregátů (viz. *tabulka P24*).

Pro případ menšího prostoru je také patrný správný posun absorpčních spekter (*graf č.20*), ale je zajímavé, že pro nižší koncentrace vody je spektrum tvořeno pouze příspěvky od dimerů a pro velké koncentrace dojde najednou k tvorbě velkých agregátů (*modré čárkované spektrum na grafu č. 20*). Vybrané konfigurace, které tvoří tyto velké agregáty, jsou vyneseny na *obrázku č. 21*

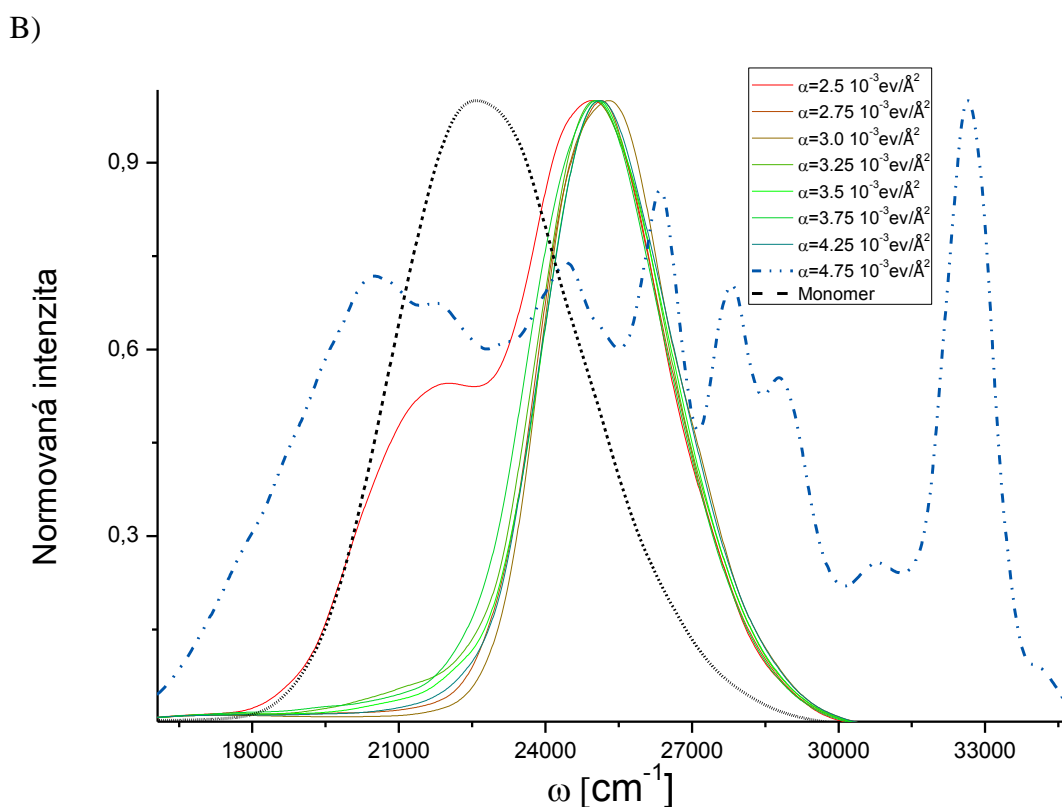
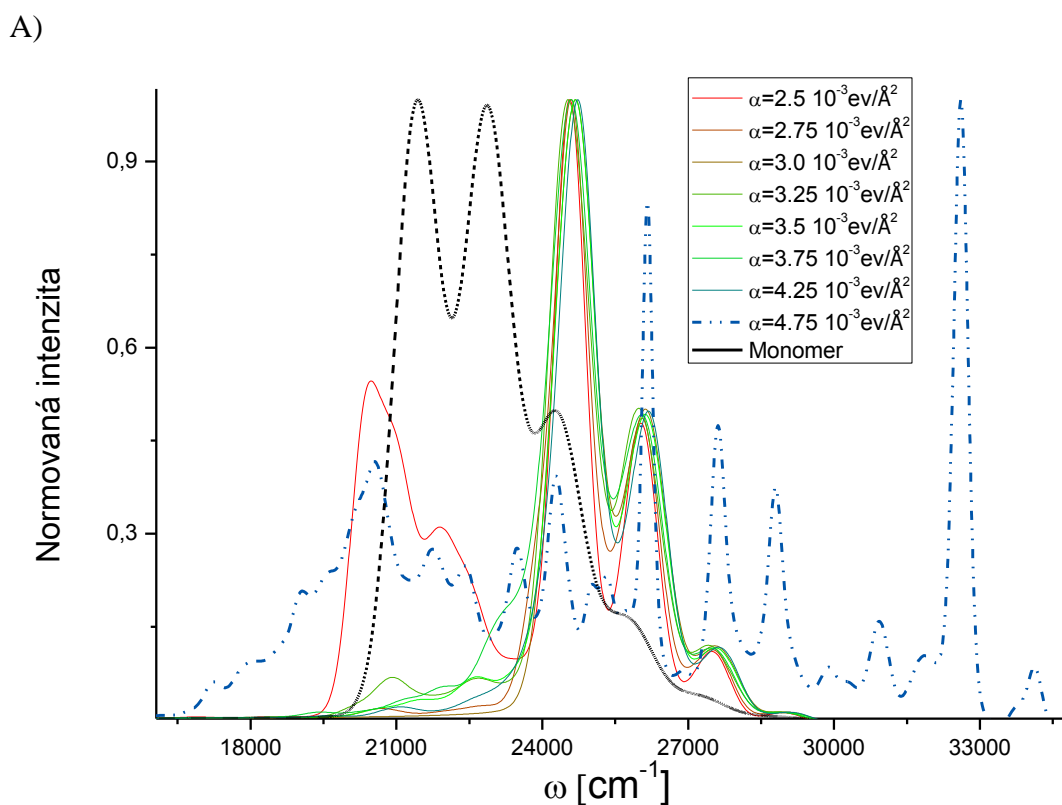
A)



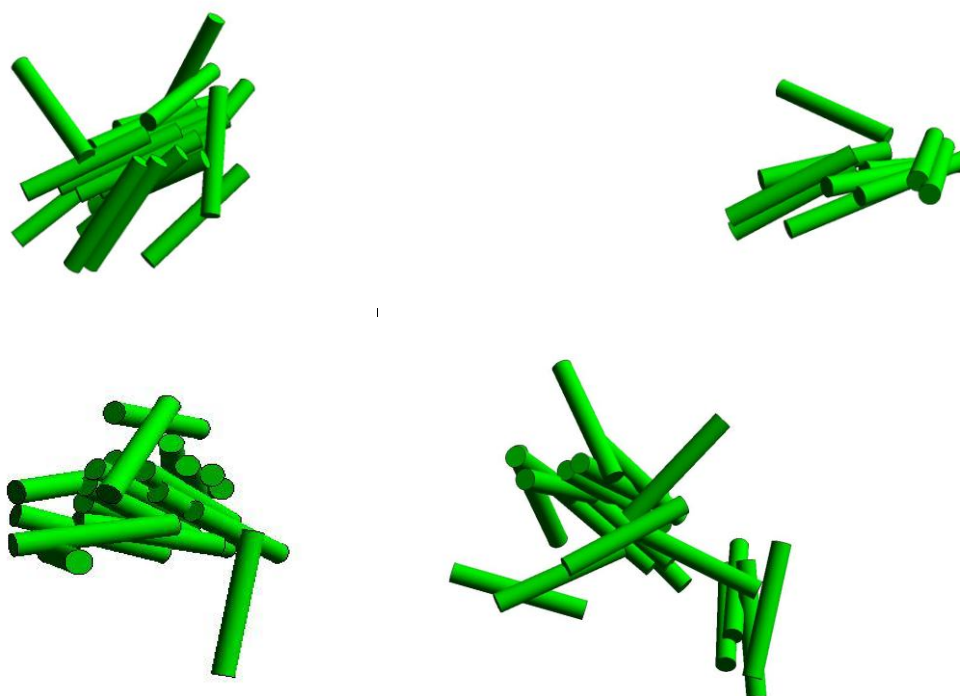
B)



Graf č.19: Absorpční spektra vypočtená bez A) a s neurčitostí v přechodových frekvencích generovanou Gaussovským rozdělením s variancí 1200cm^{-1} B) pomocí Monte-Carlo simulace s $2 \cdot 10^6$ kroky pro 20 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 100nm pro různé hodnoty parametru α



Graf č.20: Absorpční spektra vypočtená bez A) a s neurčitostí v přechodových frekvencích generovanou Gaussovským rozdělením s variancí 1200cm^{-1} B) pomocí Monte-Carlo simulace s $2 \cdot 10^6$ kroky pro 20 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 40nm s přeškálovanou pravděpodobností odpojení karotenoidů z agregátu.



Obrázek č.21: Konfigurace, které tvoří velké agregáty vybrané z Monte-Carlo simulace 20 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 40nm pro $\alpha = 4.75 \cdot 10^{-3}$

4.15 Monte-Carlo simulace: Diskuse

Navrhovaná metoda je velice výhodná z hlediska rychlého výpočtu s velkými počty karotenoidů v prostoru. Pomocí výpočtů s větším počtem karotenoidů můžeme eliminovat efekty spojené s maximální velikostí agregátu, které byly hlavním problémem termodynamického (statistického) přístupu. Na rozdíl od termodynamického přístupu tato metoda vyžaduje pro obdržení přesných pravděpodobností, vygenerování velkého množství konfigurací což je časově náročnější než přímý výpočet.

Možnou nevýhodou této metody je malá pravděpodobnost vygenerování konfigurace s malou vnější plochou pro agregáty o velkých počtech karotenoidů. V MD simulaci jsou karotenoidy „taženy“ po spádu Gibbsovy energie do optimální konfigurace karotenoidy si „sami najdou“ správné uspořádání. Toto ale neplatí pro tento příklad Monte-Carlo simulace, jelikož zde musí být konfigurace nejdříve náhodně vygenerována. Vygenerování konfigurace, kde jsou například všechny karotenoidy v agregátu uspořádány paralelně je s rostoucím počtem karotenoidů stále méně pravděpodobná. Více pravděpodobné jsou konfigurace, ve kterých jsou pouze části agregátu uspořádané těsně u sebe, ale navzájem tyto části mají malý překryv viz. obr. č.21. Tyto konfigurace poté mohou vyjít z Monte-carlo simulace jako nejpravděpodobnější, i když reálná konfigurace by mohla vypadat úplně jinak. Možnou úpravou simulace by bylo přeorientovávat karotenoidy v agregátu pouze o nějaké malé posunutí a natočení, čímž bychom se po několika krocích dostali i do konfigurací které jsou při náhodném přeskládání karotenoidů v agregátu téměř nedosažitelné. Tento způsob se využívá při klasických Monte-Carlo simulacích a přináší zpřesnění celé simulace. Touto cestou jsem se již od začátku nevydal, jelikož

jsem zatím nebyl schopen přijít na nějaký efektivní algoritmus, který by tímto způsobem posouval karotenoidy v rámci velkého agregátu, a tudíž jediný způsob byl generování konfigurací náhodně. Tento způsob generování nových konfigurací, by mohl mít vliv pouze na agregáty s velkým počtem karotenoidů, jelikož pro malé agregáty je stále pravděpodobné vygenerování konfigurace s malou vnější plochou. Na všech spektrech je patný posun absorpčního maxima do vyšších frekvencí pro velké koncentrace vody v roztoku (velké hodnoty parametru α) což je v souladu s experimentálními měřeními [7]. Na žádných spektrech ale není posun absorpčního maxima do nižších frekvencí při nižších koncentracích. Jak bylo popsáno v sekci 4.11, důvodem tohoto jevu je, že k této agregaci nedochází z důvodu hydrofobních interakcí karotenoidů s vodou, jak jsem původně předpokládal, a tento model tudíž nedokáže tento typ agregace popsat.

Závěr

V této práci jsme diskutovali hlavní interakce podílející se na agregaci karotenoidů ve vodných roztocích a na základě tohoto jsme vybudovali zjednodušenou metodu popisu karotenoidů pouze pomocí hydrofobních interakcí. Implementace této metody pro výpočet rovnovážné distribuce pravděpodobností konfigurací karotenoidů v roztocích s různou koncentrací vody byla provedena značným upravením a přizpůsobením dvou různých přístupů, které se běžně využívají pro výpočty pravděpodobnostních distribucí. Z tohoto důvodu jsme vymysleli novou metodu pro odhad entropického příspěvku od systému karotenoidů a ověřili její platnost pro malé počty karotenoidů v agregátu. Dále jsme sestavili programy pro výpočet rovnovážných pravděpodobnostních distribucí konfigurací karotenoidů a pro Monte-carlo simulace systému karotenoidů v roztocích s různou koncentrací vody v kanonickém NVT souboru. Na základě těchto metod a simulací byly zjištěny nové poznatky o způsobu agregace a o interakcích, které se na ní podílejí. Pro výpočet interakcí mezi karotenoidy v rámci agregátu bylo využito klasického přiblížení, které je až v překvapivé shodě s výpočty pomocí metod kvantové chemie.

Z navrženého modelu vychází, že při velkých koncentracích vody v roztoku dochází k tvorbě velkých agregátů, což je v souladu s [6] a [11]. Představený model, který simuluje agregaci na základě hydrofobních interakcí, dobře popisuje agregace karotenoidů při vysokých koncentracích vody v roztoku. Navržené metody dobře popisují frekvenční posun absorpčních spekter karotenoidů při těchto koncentracích vody i jejich základní rysy. Na druhou stranu metoda nedokáže vysvětlit velký posun absorpčních maxim spekter do nižších frekvencí pro malé koncentrace vody v rozpouštědle. Dále jsme ukázali, že ani změnou parametrů modelu není možné docílit tak velkých frekvenčních posunů v absorpčních spektrech, jaké byly pozorovány v experimentech. Na základě tohoto můžeme usuzovat, že hydrofobní efekt není hlavní interakcí, která způsobuje agregaci karotenoidů při malých koncentracích vody v rozpouštědle. Z tohoto důvodu je možné využít metodu pouze pro popis vzniku H-agregátů. Otestovaný model lineárních řetízků karotenoidů podporuje myšlenku, že by důležitou interakcí pro tvorbu slabě vázaných J-agregátů mohly být právě interakce koncových cyklů karotenoidů. Tuto domněnku je ale potřeba potvrdit například MD simulací několika karotenoidů v roztoku s nízkou koncentrací vody.

Možných vylepšení představených metod může být dosaženo například přesnějším určením parametrů modelu jako poloměrů válců, či přesnějším výpočtem multiplicit pro různé velikosti agregátů. Dále by bylo vhodné ověřit pomocí MD simulací vztah pro výpočet Gibbsovy energie a přiřadit hodnotám parametru α přesné koncentrace vody. Dalším asi největším vylepšením výpočtu by bylo zahrnutí dalších interakcí mezi karotenoidy, hlavně interakce s koncovými cykly, které se zdají být zodpovědné za formování J-agregátů. Dalším možným zrychlením výpočtu by bylo počítat vnější plochu pomocí vyplnění plochy trojúhelníky, jejichž plocha se poté sečte. Tento způsob výpočtu by měl poskytovat vyšší rychlost a přesnost určení vnější plochy. Kromě samotných Monte-Carlo simulací by bylo vhodné otestovat další alternativy výpočtu rovnovážných pravděpodobnostních distribucí různých konfigurací karotenoidů a výsledky porovnat se zde navrženou metodou. Mezi alternativy patří například coarse-grained MD, kde je využito aproximace celé skupiny atomů jedním atomem, čímž dojde ke značnému snížení dimenze problému

a tudíž i k urychlení výpočtu. Další alternativou je například využití implicitního solventu při MD simulacích, kde dochází k nahrazení molekul vody efektivním potenciálem.

Seznam použité literatury

- [1] Herbert B. Callen, Thermodynamics and an Introduction to Thermostatistics, 1985
- [2] Santosh K. Upadhyay, Kinetics and reaction dynamics, 2006, Springer
- [3] W.J. Moore, Fyzikální chemie, Praha, SNTL 1981
- [4] Ivo Nezbeda, Jiří Kolafa, Miroslav Kotrla. Úvod do počítačových simulací: metody Monte Carlo a molekulární dynamiky. 1998. Karolinum.
- [5] G. Britton, S. Liaaen-Jensen, H. Pfander. Carotenoids. Volume 4: Natural Functions. 2008
- [6] H.A. Frank, A.J. Young, G. Britton, R.J. Cogdell. The Photochemistry of Carotenoids. 2004
- [7] Kvasnica J.: Teorie elektromagnetického pole, 1985, Academia, Praha
- [8] David Chandler. Interfaces and Driving Force of Hydrophobic Assembly. Nature 437. 2005. 640-647
- [9] Volkhard May, Oliver Kühn. Charge and Energy Transfer Dynamics in Molecular Systems, 2011, Third, Revised and Enlarged Edition
- [10] M. Mohseni, Y. Omar, G.S. Engel and M.B. Plenio (Eds.), Quantum Effects in Biology, Cambridge University Press, 2013
- [11] Ch. Köpsel, H. Möltgen, H. Schuch, H. Auweter, Structure investigations on assembled astaxanthin molecules, Journal of Molecular Structure 750 (2005) 109-115
- [13] J. Olšina, M. Durčan, B. Minofar, T. Polívka, T. Mančal. Absorption Spectra of Astaxanthin Aggregates. arXiv:1208.4958

Seznam použitých zkratk

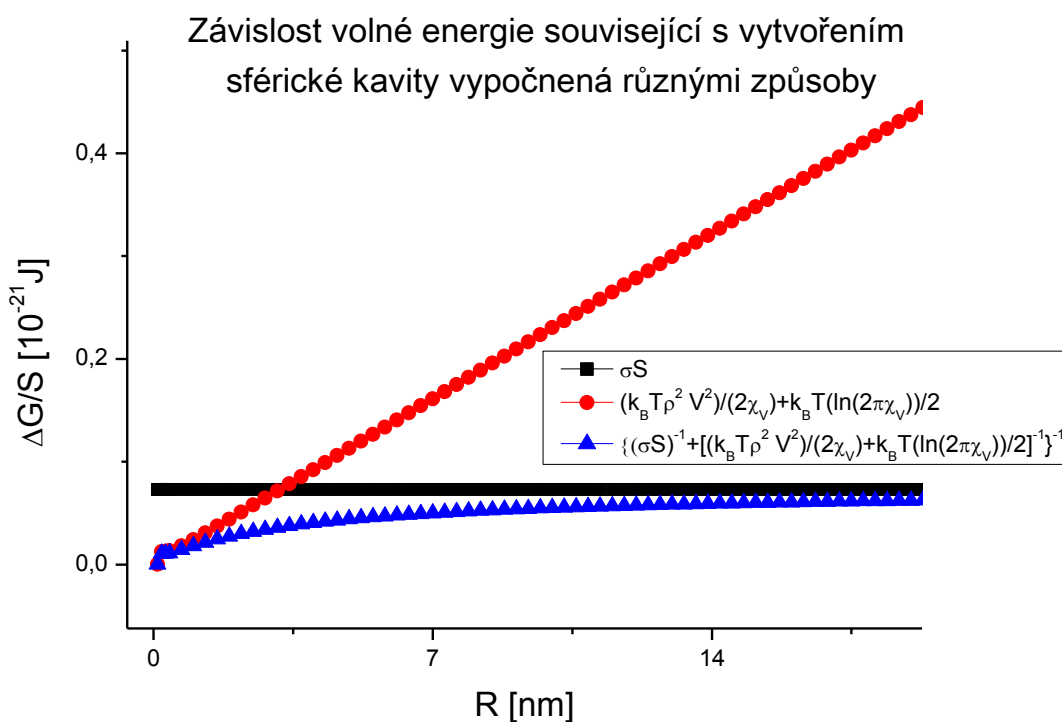
MD - Molekulární dynamika

Přílohy

P1: Tabulka charakterů bodové grupy C_{2h}

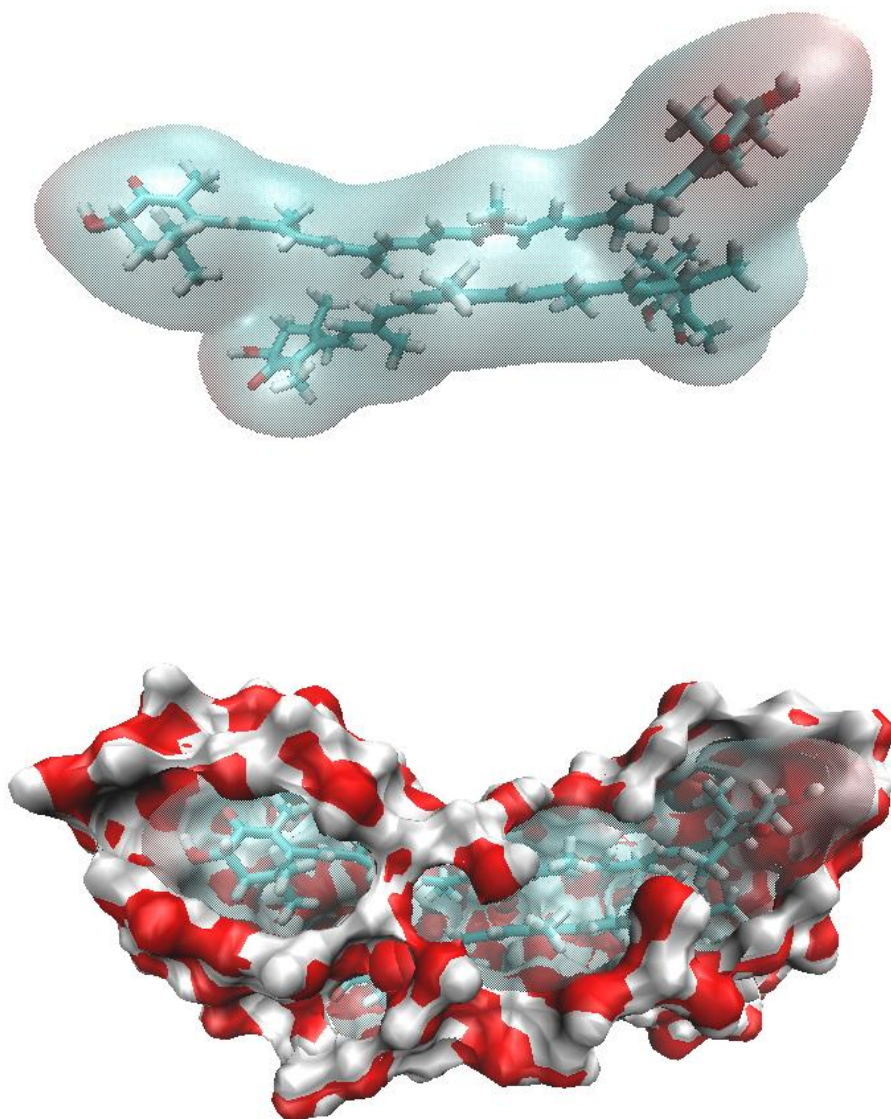
C_{2h}	E	C_2	σ_h	i	$h=4$	
A_g	1	1	1	1	R_z	x^2, y^2, z^2, xy
A_u	1	1	-1	-1	z	
B_g	1	-1	-1	1	R_x, R_y	xz, xz
B_u	1	-1	1	-1	x, y	

P2: Porovnání různých přístupů k výpočtu solvatační energie

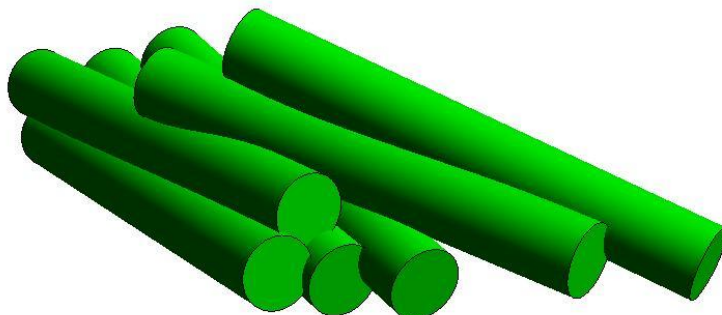


Na grafu P2 je vynesena změna volné energie související s vytvořením sférické kavity normované na plochu kavity, v závislosti na poloměru kavity. Tato závislost byla vypočtena pomocí tří různých vztahů (68), (69) a (70), přičemž by se měla uplatnit pro daný poloměr ta závislost, která dává nejnižší změnu Gibbsovy energie

P3: Repräsentace povrchu agregátu astaxanthinu a jeho solvatační obálky

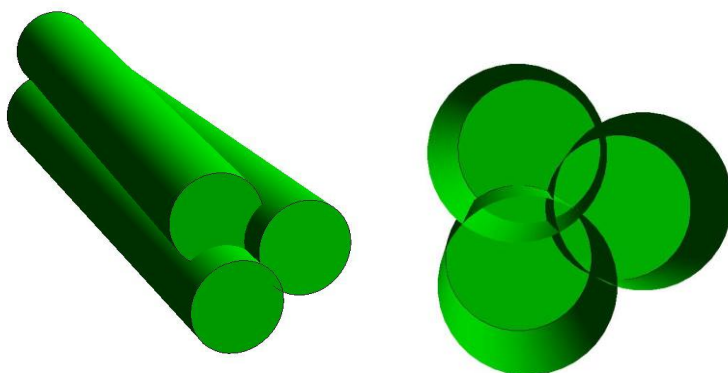


P4: Příklad agregátu o 6 válcích (karotenoidech)



Na obr. P4 je znázorněn příklad agregátu o 6 karotenoidech. Je zde jasně patrné, že vnější plocha agregátu je výrazně menší než součet vnějších ploch monomerů.

P5: Agregát o 3 válcích



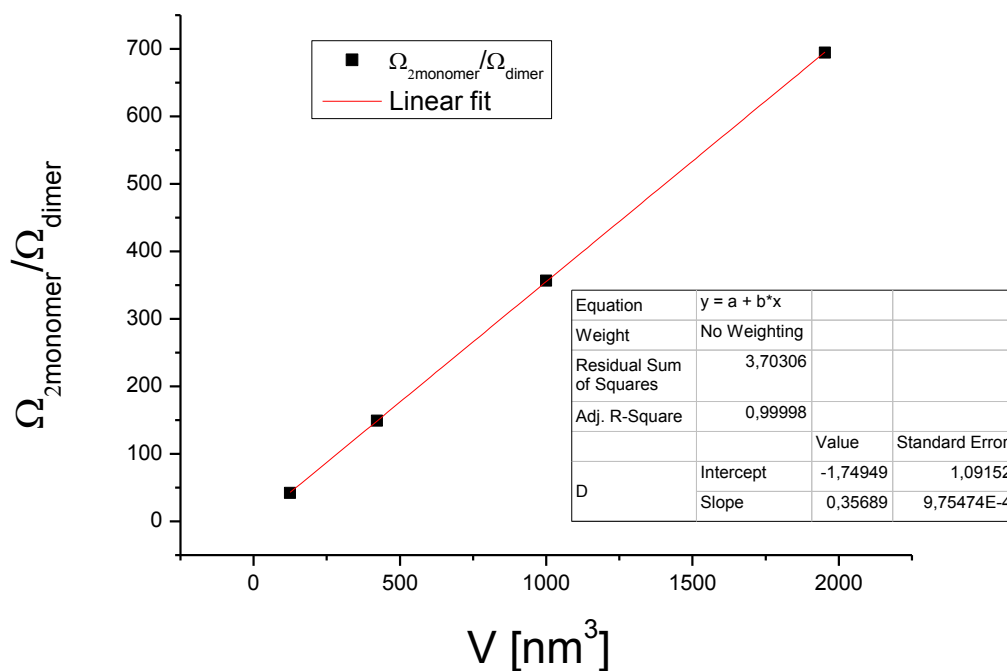
Na obr. P5 je znázorněn agregát o 3 válcích a jeho průřez. Je zde vidět že i pro tyto malé agregáty dochází k vícenásobným překryvům povrchů a tudíž celková vnější plocha se nedá spočítat pomocí příspěvků překryvů všech dvojic válců.

Tabulka P6

$V [\text{\AA}^3]$	$\Omega_{2\text{mon}}/\Omega_{\text{dimer}}$
125000	41.9079
421875	149.0312
1000000	356.6221
1953125	694.5592

V Tabulce P6 jsou vypočtené hodnoty podílů multiplicit $\Omega_{2\text{mon}}/\Omega_{\text{dimer}}$ na objemu prostoru V .

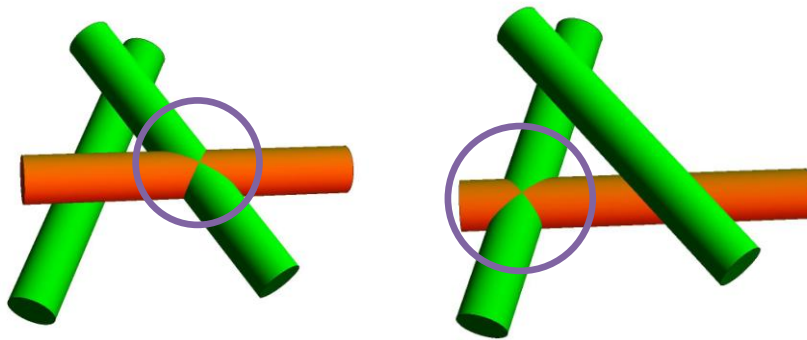
P7: Graf závislosti podílů multiplicit $\Omega_{2\text{mon}}/\Omega_{\text{dimer}}$ na objemu prostoru



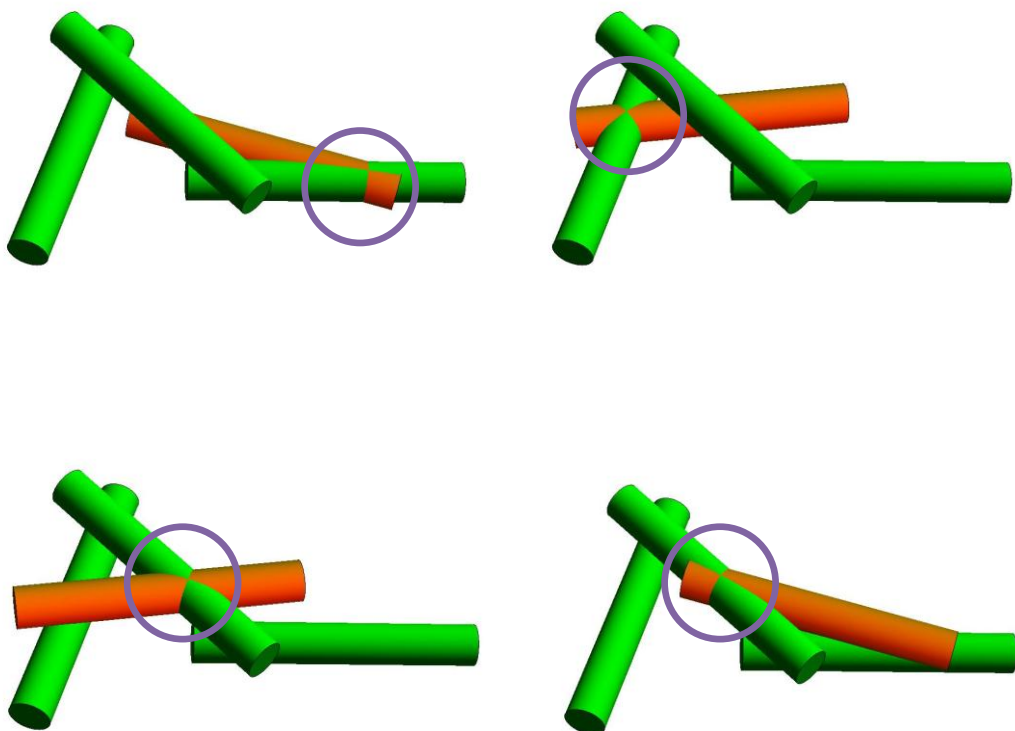
Na grafu P7 je vynesena závislost podílů multiplicit $\Omega_{2\text{mon}}/\Omega_{\text{dimer}}$ na objemu prostoru V . Červeně je vynesena lineární fit vypočtených hodnot. Z odchylky lineárního fitu je patrné, že podíl multiplicit $\Omega_{2\text{mon}}/\Omega_{\text{dimer}}$ je lineárně závislý na objemu prostoru.

P8: Odhad parametru $\alpha(n)$.

A)



B)



Příklady relevantních zakázaných dvojic, které se zahrnují do výpočtu entropie agregátu o třech karotenoidech A) a o čtyřech karotenoidech B). Vždy je zahrnuto pouze bránění v pohybu nově napojeného válce (oranžový), od již přítomných (zeleně) nejbližších sousedů válce na který se ten nový napojuje. Pro případ čtyř

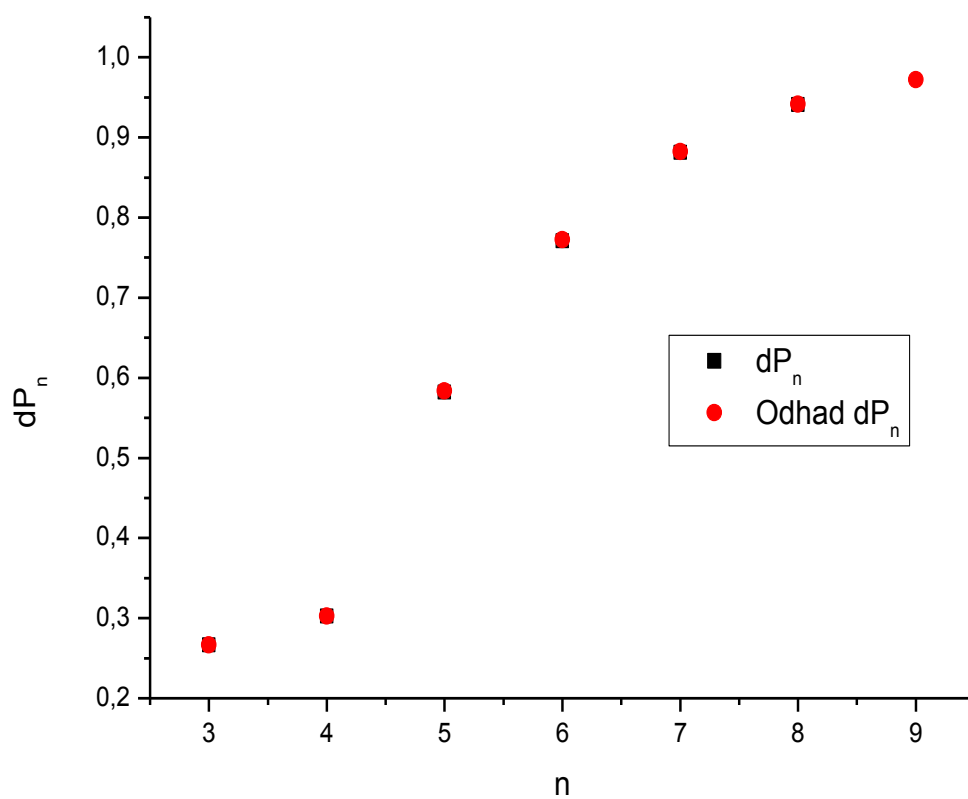
karotenoidů B) se do výpočtu celkové multiplicity tedy zahrnují pouze čtyři z šesti možných způsobů obdržení zakázané konfigurace.

Tabulka P9

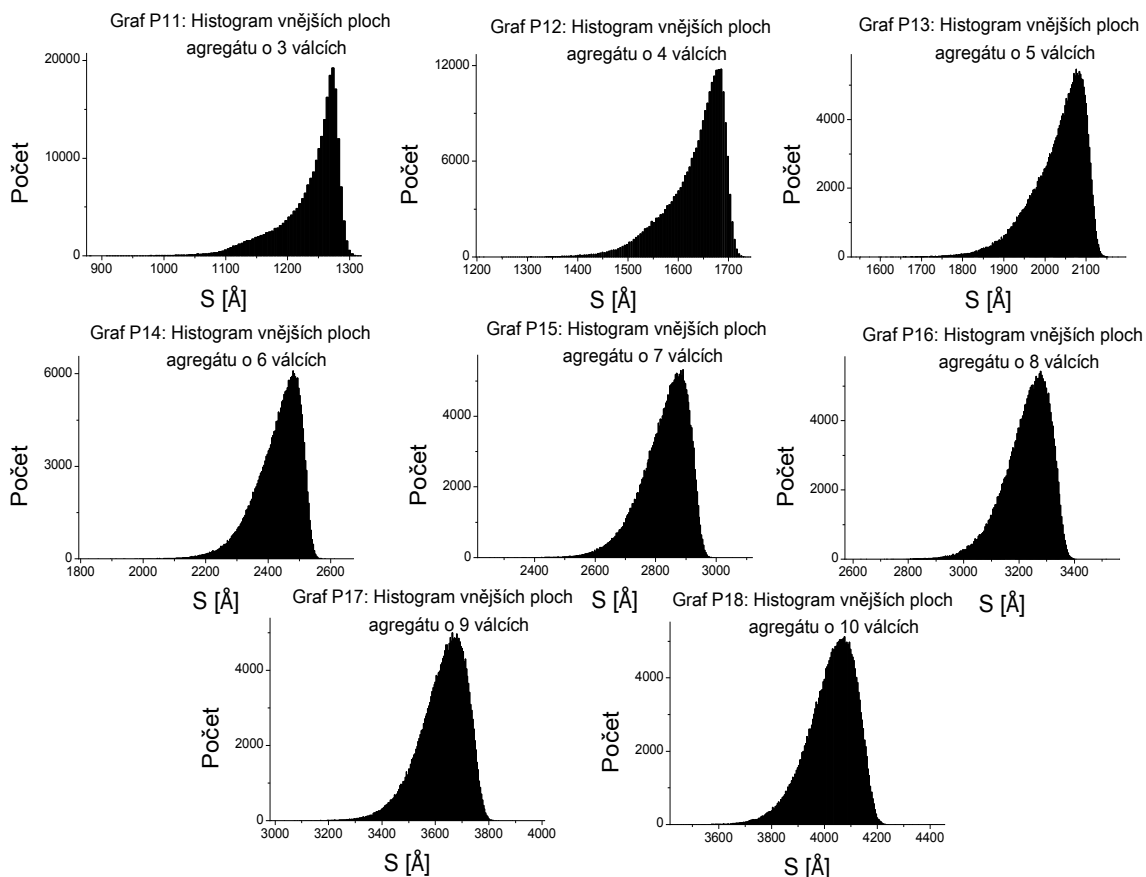
Počet karotenoidů v agregátu	dP_n vypočtené z Monte-Carlo simulace	dP_n odhadnuté pomocí vztahu (89)	$\alpha(n)$ vypočtené z přesné hodnoty dP_n	$\alpha(n)$ odhadnuté ze vztahu (87)	Odhadovaný čas výpočtu [dny]
3	0.30234	0.30234	1.00000	1.00000	0.028
4	0.58197	0.58359	0.66283	0.66667	0.047
5	0.77100	0.77244	0.49853	0.50000	0.086
6	0.88135	0.88252	0.39844	0.40000	0.166
7	0.94092	0.94172	0.33214	0.33333	0.335
8	0.97169	0.97193	0.28704	0.28571	0.696
9		0.98678		0.25000	1.477
10		0.99389		0.22222	3.194
11		0.99721		0.20000	7.007
12		0.99875		0.18182	15.562
13		0.99944		0.16667	34.916
14		0.99975		0.15385	79.027
15		0.99989		0.14286	180.221
16		0.99995		0.13333	413.708

V tabulce P9 je vyneseno porovnání vypočtených a odhadnutých hodnot pomocí vztahu (89). Všechny hodnoty byly vypočteny pro 250000 náhodných povolených konfigurací agregátu o daném počtu válců. Z těchto hodnot je patrné, že odhad velice dobře reprezentuje vypočtené hodnoty. Dále jsou připojeny odhady časů výpočtů těchto hodnot při výpočtu na jednom jádru.

Graf P10



Na grafu P10 je vyneseno porovnání vypočtených a odhadnutých hodnot dP_n . Z tohoto grafu je patrné, že odhadnuté hodnoty dobře reprezentují vypočtené a lze tedy použít vztah (89) pro výpočet dP_n .



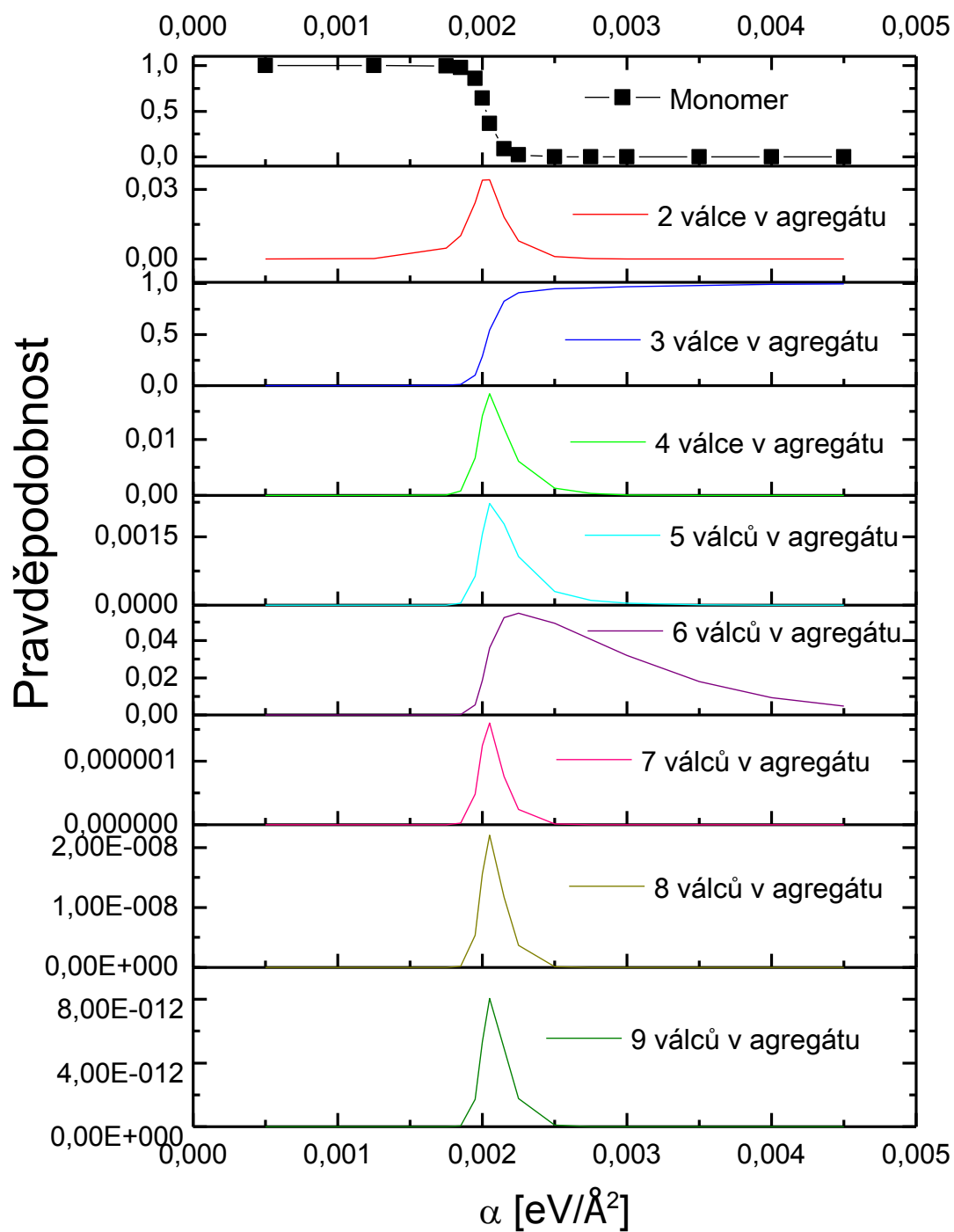
Na grafech P11-P18 jsou vyneseny histogramy vnějších ploch agregátů o různých počtech válců. Na všech histogramech je patrné, že nejpravděpodobnější jsou velké vnější plochy, jelikož tyto plochy mohou být tvořeny největším počtem různých konfigurací. Všechny tyto histogramy byly vypočítány pro 250000 náhodných povolených konfigurací agregátů. Pro výpočet plochy byla použita metoda Monte-Carlo s 1000 body na povrchu každého válce.

Tabulka P19

α [eV/Å ²]	monomer	2 válce v agregátu	3 válce v agregátu	4 válce v agregátu	5 válců v agregátu	6 válců v agregátu	7 válců v agregátu	8 válců v agregátu	9 válců v agregátu
0.0005	1.000E+00	2.513E-06	7.474E-11	2.855E-15	1.299E-19	8.379E-24	4.173E-28	2.385E-32	1.634E-36
0.00125	9.999E-01	1.472E-04	6.402E-07	1.509E-09	4.705E-12	2.471E-13	1.625E-17	1.665E-20	2.099E-24
0.00175	9.932E-01	4.661E-03	2.077E-03	7.989E-05	3.154E-06	6.755E-06	6.924E-10	4.261E-12	1.031E-15
0.00185	9.764E-01	1.011E-02	1.246E-02	7.560E-04	4.762E-05	2.091E-04	2.216E-08	1.871E-10	5.192E-14
0.00195	8.594E-01	2.431E-02	1.034E-01	6.694E-03	6.298E-04	5.489E-03	4.818E-07	5.372E-09	1.710E-12
0.002	6.439E-01	3.389E-02	2.877E-01	1.426E-02	1.555E-03	1.866E-02	1.247E-06	1.562E-08	5.324E-12
0.00205	3.661E-01	3.414E-02	5.431E-01	1.818E-02	2.225E-03	3.625E-02	1.598E-06	2.204E-08	8.049E-12
0.00215	8.703E-02	1.808E-02	8.287E-01	1.203E-02	1.780E-03	5.239E-02	7.604E-07	1.175E-08	4.927E-12
0.00225	2.091E-02	7.826E-03	9.093E-01	6.119E-03	1.063E-03	5.473E-02	2.399E-07	3.660E-09	1.762E-12
0.0025	9.546E-04	1.105E-03	9.470E-01	1.268E-03	3.019E-04	4.934E-02	1.484E-08	1.325E-10	9.022E-14
0.00275	7.639E-05	2.191E-04	9.586E-01	3.326E-04	1.090E-04	4.071E-02	1.128E-09	4.128E-12	3.975E-15
0.003	7.738E-06	5.219E-05	9.678E-01	9.912E-05	4.430E-05	3.199E-02	8.711E-11	1.190E-13	1.621E-16
0.0035	1.011E-07	3.349E-06	9.820E-01	1.096E-05	7.527E-06	1.798E-02	4.796E-13	8.517E-17	2.323E-19
0.004	1.456E-09	2.164E-07	9.906E-01	1.423E-06	1.205E-06	9.385E-03	2.462E-15	5.428E-20	2.966E-22
0.0045	2.138E-11	1.396E-08	9.953E-01	1.993E-07	1.853E-07	4.715E-03	1.231E-17	3.259E-23	3.568E-25

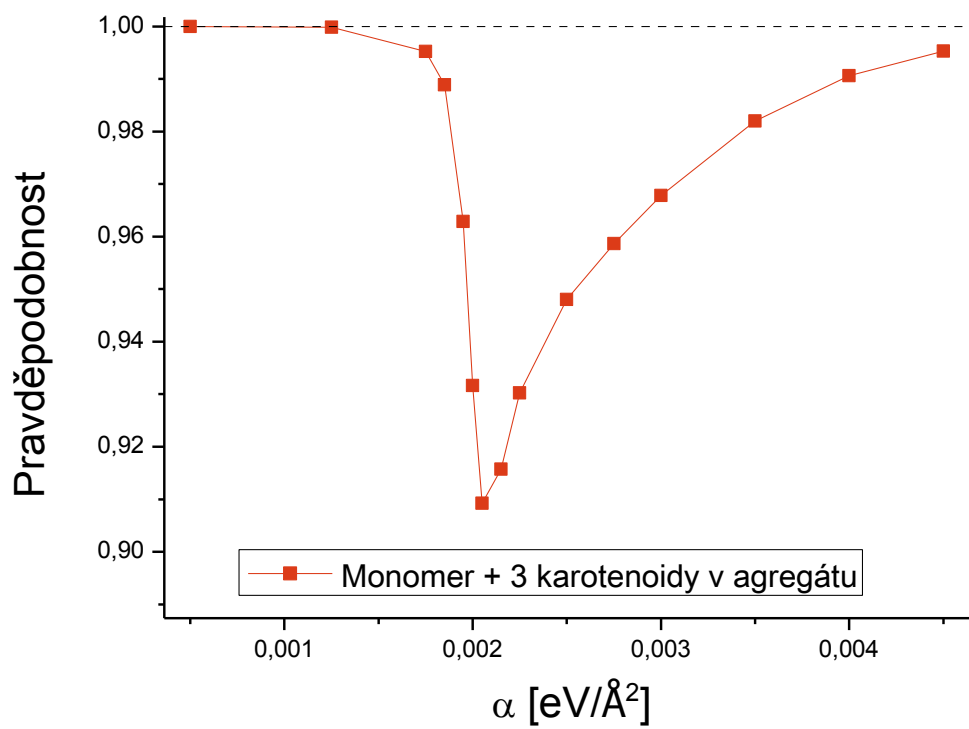
V tabulce P19 jsou zaneseny vypočtené hodnoty pravděpodobností nalezení agregátů daných velikostí v roztoku o koncentraci vody dané parametrem α pro devět karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 80nm.

Graf P20



Na grafu P20 jsou vyneseny pravděpodobnosti nalezení agregátů o různých velikostech v roztoku v závislosti na koncentraci vody dané parametrem α pro devět karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 80nm.

Graf P21



Tabulka P22

α [eV/Å ²]	monomer	2 válce v agregátu	3 válce v agregátu	4 válce v agregátu	5 válců v agregátu	6 válců v agregátu	7 válců v agregátu	8 válců v agregátu
0.0005	0.999997	3.17E-06	1.06E-10	4.53E-15	2.31E-19	1.67E-23	9.34E-28	5.99E-32
0.001	0.999961	3.86E-05	2.43E-08	1.48E-11	1.25E-14	9.94E-17	6.25E-21	2.72E-24
0.00125	0.999813	0.000186	9.06E-07	2.39E-09	8.37E-12	4.93E-13	3.63E-17	4.18E-20
0.0015	0.998956	0.000997	4.63E-05	5.1E-07	6.61E-09	2.55E-09	2.31E-13	6.74E-16
0.00195	0.835926	0.032808	0.112935	0.010307	0.001064	0.00696	8.46E-07	1.23E-08
0.002	0.679361	0.051332	0.225375	0.023096	0.002766	0.018068	2.17E-06	3.77E-08
0.00205	0.523819	0.071927	0.330127	0.038827	0.005282	0.030015	3.49E-06	7.21E-08
0.00215	0.342188	0.111634	0.424082	0.069774	0.011938	0.04038	4.05E-06	1.19E-07
0.0025	0.075621	0.193742	0.447393	0.196993	0.053152	0.0331	7.92E-07	7.79E-08
0.003	0.008122	0.125533	0.340789	0.40494	0.107637	0.012979	1.46E-08	7.99E-09
0.0035	0.000946	0.055633	0.237586	0.570602	0.131948	0.003286	1.51E-10	4.55E-10
0.004	9.81E-05	0.022284	0.178127	0.663946	0.13485	0.000695	1.25E-12	2.06E-11
0.0045	9.57E-06	0.008815	0.146446	0.715506	0.129085	0.000139	9.46E-15	8.49E-13

V tabulce P22 jsou zaneseny vypočtené hodnoty pravděpodobností nalezení agregátů daných velikostí v roztoku o koncentraci vody dané parametrem α pro 8 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 80nm.

Tabulka P23

α [eV/Å ²]	monomer	2 válce v agregátu	3 válce v agregátu	4 válce v agregátu	5 válců v agregátu	6 válců v agregátu	7 válců v agregátu
0.0005	0.999996	4.15E-06	1.59E-10	7.8E-15	4.57E-19	3.79E-23	2.42E-27
0.001	0.999949	5.06E-05	3.65E-08	2.56E-11	2.46E-14	2.25E-16	1.62E-20
0.0015	0.998621	0.001309	6.97E-05	8.79E-07	1.31E-08	5.71E-09	5.99E-13
0.00195	0.774863	0.035837	0.160748	0.015739	0.001194	0.011618	1.92E-06
0.002	0.601514	0.040792	0.296437	0.032357	0.002063	0.026831	4.67E-06
0.00205	0.454447	0.03722	0.412784	0.051692	0.002439	0.041409	7.6E-06
0.00215	0.316618	0.022998	0.514361	0.092074	0.001959	0.051978	1.06E-05
0.0025	0.142607	0.003231	0.532026	0.296801	0.00049	0.024838	7.42E-06
0.003	0.017659	0.000119	0.505678	0.474444	4.12E-05	0.002057	1.06E-06
0.0035	0.001535	4.07E-06	0.50061	0.497746	2.39E-06	0.000103	9.2E-08
0.004	0.000134	1.72E-07	0.500059	0.499802	1.34E-07	4.75E-06	7.31E-09
0.0045	1.19E-05	8.52E-09	0.500006	0.499982	7.63E-09	2.14E-07	5.67E-10

V tabulce P23 jsou zaneseny vypočtené hodnoty pravděpodobností nalezení agregátů daných velikostí v roztoku o koncentraci vody dané parametrem α pro 7 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 80nm.

Tabulka P24

$\alpha \cdot 10^{-3}$ [ev/Å ²]	2.0	2.5	3.0	3.5	4.0	4.25	4.5	4.75	5.0
Počet karotenoidů v agregátu	Pravděpodobnosti nalezení agregátů v roztoku								
1	1.000E+00	1.000E+00	1.000E+00	9.998E-01	1.000E+00	9.995E-01	9.731E-01	9.614E-01	9.692E-01
2	0.000E+00	3.750E-07	3.750E-07	1.707E-04	8.031E-06	4.731E-04	7.945E-03	9.070E-03	9.429E-04
3	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.875E-07	1.875E-07	2.110E-05	3.203E-03	3.755E-03	1.036E-02
4	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	3.439E-07	2.763E-03	1.061E-02	1.068E-02
5	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.260E-03	2.082E-03	6.142E-03
6	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	8.664E-04	2.045E-03	2.179E-03
7	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	7.374E-04	6.412E-04	5.115E-04
8	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.690E-04	3.439E-03	0.000E+00
9	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.251E-03	3.145E-03	0.000E+00
10	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	3.243E-04	1.989E-03	0.000E+00
11	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	2.790E-04	1.465E-03	0.000E+00
12	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	5.299E-04	2.389E-04	0.000E+00
13	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.328E-03	1.004E-04	0.000E+00
14	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	3.362E-03	4.209E-05	0.000E+00
15	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	2.883E-03	0.000E+00	0.000E+00
16	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.232E-05	0.000E+00	0.000E+00
17	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00
18	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00
19	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00
20	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00

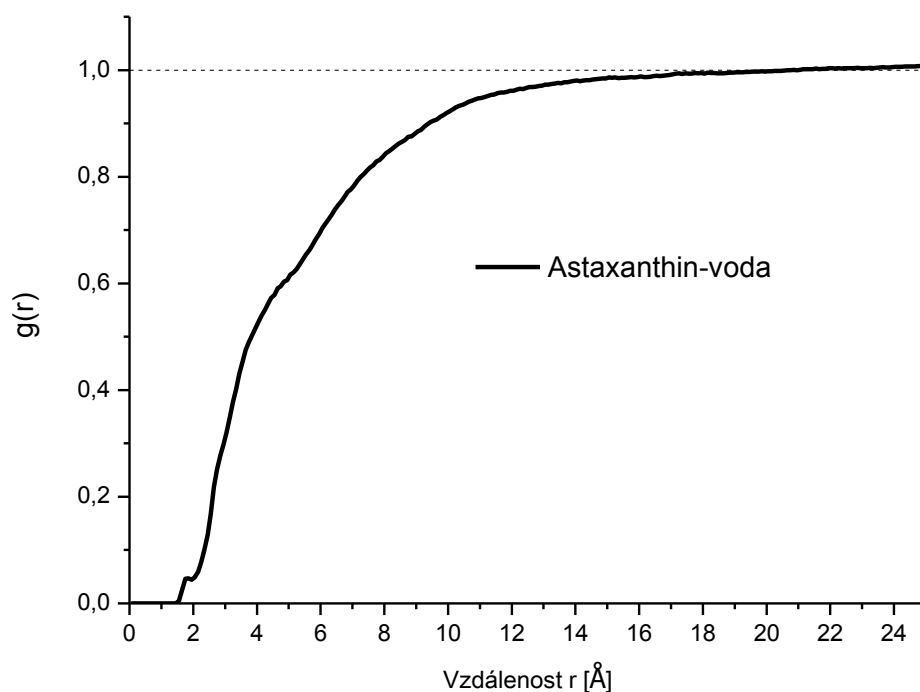
V tabulce P24 jsou zaneseny vypočtené hodnoty pravděpodobností nalezení agregátů daných velikostí v roztoku o koncentraci vody dané parametrem α pro 20 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 100nm. Tyto pravděpodobnosti byly vypočteny Monte-carlo simulací s počtem $2 \cdot 10^6$ kroků.

Tabulka P25

$\alpha \cdot 10^{-3}$ [ev/Å ²]	2.5	2.75	3.0	3.25	3.5	3.75	4.0	4.25	4.5	4.75
Počet karotenoidů v agregátu	Pravděpodobnosti nalezení agregátů v roztoku									
1	1.000E+00	1.000E+00	9.999E-01	1.000E+00	9.999E-01	9.972E-01	9.968E-01	9.980E-01	9.885E-01	9.144E-01
2	5.556E-07	3.950E-05	8.840E-05	2.850E-05	1.354E-04	1.323E-03	2.754E-03	2.017E-03	7.426E-03	9.556E-03
3	0.000E+00	2.778E-07	0.000E+00	0.000E+00	3.000E-06	6.514E-04	3.876E-04	2.555E-05	1.705E-03	4.301E-03
4	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	5.448E-04	2.041E-05	0.000E+00	1.472E-03	2.527E-03
5	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.923E-04	0.000E+00	0.000E+00	4.707E-04	1.758E-03
6	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	6.334E-05	0.000E+00	0.000E+00	1.986E-04	1.572E-03
7	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.106E-05	0.000E+00	0.000E+00	1.374E-04	1.916E-03
8	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	5.958E-05	1.356E-03
9	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	2.938E-05	7.432E-04
10	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	9.911E-04
11	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.236E-03
12	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.164E-03
13	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	9.706E-04
14	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	8.551E-04
15	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.450E-03
16	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.380E-03
17	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	1.573E-03
18	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	2.646E-03
19	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	7.151E-03
20	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	0.000E+00	4.249E-02

V tabulce P25 jsou zaneseny vypočtené hodnoty pravděpodobností nalezení agregátů daných velikostí v roztoku o koncentraci vody dané parametrem α pro 20 karotenoidů v kubickém prostoru o hraně 40nm s přeškálovanou pravděpodobností odpojení. Tyto pravděpodobnosti byly vypočteny Monte-carlo simulací s počtem 10^6 kroků.

Graf P26



Na grafu P26 je vynesena radiální distribuční funkce mezi astaxanthinem a vodu vypočtená z MD simulací astaxanthinu v čisté vodě v NpT souboru. Simulace probíhala za atmosférického tlaku při teplotě 300K s krokem 2fs. Pro výpočet elektrostatických interakcí byla použita Ewaldova sumace a pro van der Waalsovy interakce byl zvolen cut-off 8Å.