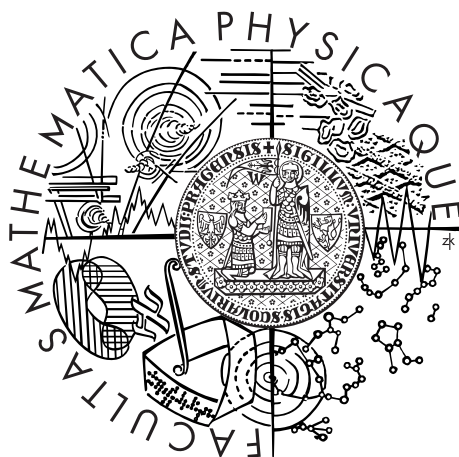


Univerzita Karlova v Praze
Matematicko-fyzikální fakulta

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE



Kateřina Andreasová

Vliv karotenoidů na stabilitu chlorofylů ve fotosyntetických komplexech

Katedra chemické fyziky a optiky

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: Obecná fyzika

Praha 2014

Chtěla bych poděkovat především vedoucímu mé bakalářské práce, doc. RNDr. Jakubu Pšenčíkovi, Ph.D., za jeho odborný dohled, vstřícnost a trpělivost. Dále tímto děkuji Mgr. Janu Alsterovi, PhD. za poskytnutí programu Globální analýza pro zpracování naměřených dat, Mgr. Petru Khoroshyy, Ph.D. za poskytnutí izolovaných thylakoidů a také Mgr. Martině Matěnové za pomoc při práci na HPLC.

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval(a) 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 dne

Podpis autora

Název práce: Vliv karotenoidů na stabilitu chlorofylů ve fotosyntetických komplexech

Autor: Kateřina Andreasová

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

Vedoucí bakalářské práce: doc. RNDr. Jakub Pšenčík, Ph.D., Katedra chemické fyziky a optiky

Abstrakt: Cílem této práce bylo porovnat efektivitu přenosu tripletní excitace chlorofylů na karotenoidy ve vzorcích s jejich různým vzájemným uspořádáním. Měli jsme k dispozici vzorky s pigmenty ve fotosyntetických komplexech v thylakoidních membránách a vzorky s pigmenty izolovanými a volně rozpuštěnými v roztoku či koncentrovanými v micelách. Využívali jsme měření časově rozlišené i stacionární absorpce. Z časově rozlišených transientních spekter vyplynulo, že jediné uspořádání pigmentů ve fotosyntetických komplexech umožňuje triplet-tripletní přenos energie z chlorofylů na karotenoidy, a tak předchází vzniku reaktivního singletního kyslíku. V roztoku a v micelách se při tomto přenosu uplatňuje srážkový mechanismus, který byl i přes srovnatelnou celkovou koncentraci pigmentů neúčinný, protože jejich lokální koncentrace byla nízká oproti té v thylakoidních membránách. Sledovali jsme také degradaci vzorků v čase. Stacionární absorpční spektra měřená v různých dnech ukázala, že pigmenty v roztoku a v micelách na světle rychle degradují, kdežto pigmenty v thylakoidních membránách se rozkládají pomaleji a membrány agregují.

Klíčová slova: Karotenoidy, chlorofyly, triplet-tripletní přenos energie.

Title: The effect of carotenoids on the stability of chlorophylls in photosynthetic complexes

Author: Kateřina Andreasová

Department: Katedra chemické fyziky a optiky

Supervisor: doc. RNDr. Jakub Pšenčík, Ph.D., Katedra chemické fyziky a optiky

Abstract: The aim of this thesis was to compare the efficiency of triplet excitation transfer from chlorophylls to carotenoids in samples with their various mutual organizations. We have used samples with pigments in photosynthetic complexes in thylakoid membranes and samples with isolated pigments dissolved in a solution or concentrated in micelles. We have measured both time-resolved and steady-state absorption. Time-resolved transient absorption measurements showed that only the organization of pigments in photosynthetic complexes enabled triplet-triplet energy transfer from chlorophylls to carotenoids, and thus prevented production of reactive singlet oxygen. In the solution and in the micelles, a collision mechanism governs this transfer. Even though the total concentration of pigments was comparable with the one in thylakoid membranes, the local concentration was too low to make this triplet-triplet energy transfer efficient. We have also studied the degradation of the samples in time. Steady-state absorption spectra measured in different days showed that pigments in the solution and in micelles exposed to sunlight degraded quickly while pigments in thylakoid membranes decomposed slower and membranes tended to cluster.

Keywords: Carotenoids, chlorophylls, triplet-triplet energy transfer

Obsah

Úvod	3
1 Teoretická část	4
1.1 Fotosyntéza	4
1.1.1 Fotosyntetický aparát	4
1.1.2 Primární fáze fotosyntézy	4
1.2 Fotosyntetická barviva	6
1.2.1 Chlorofyly	6
1.2.2 Karotenoidy	7
1.3 Singletní a tripletní stavy	7
1.3.1 Molekula kyslíku	7
1.3.2 Přejechy mezi hladinami	8
1.4 Ochranná role karotenoidů	9
1.5 Absorpční spektroskopie	10
1.5.1 Stacionární absorpční spektra	10
1.5.2 Časově rozlišená transientní spektroskopie	11
2 Použité metody a přístroje	13
2.1 Příprava vzorků	13
2.1.1 Izolace thylakoidů	13
2.1.2 Thylakoidy a extrakce pigmentů	13
2.1.3 Odstranění kyslíku pomocí enzymů	13
2.1.4 Separace chlorofylu <i>a</i>	14
2.1.5 Bublání dusíkem	14
2.1.6 Micely	14
2.2 Měření stacionárních spekter	14
2.2.1 Integrovaná koule	15
2.3 Měření časově rozlišených transientních spekter	15
2.3.1 Experimentální uspořádání	15
2.3.2 Optický parametrický oscilátor	15
2.3.3 Intenzifikovaná CCD kamera	16
2.3.4 Globální analýza	17
3 Výsledky měření a diskuze	18
3.1 Transientní časově rozlišená spektra	18
3.1.1 Pigmenty v thylakoidech	18
3.1.2 Izolované pigmenty v organických rozpouštědlech	20
3.1.3 Chlorofyl <i>a</i>	21
3.1.4 Izolované pigmenty v DM	23
3.2 Stacionární spektra	25
3.2.1 Porovnání spekter thylakoidů a izolovaných pigmentů v organických rozpouštědlech	25
3.2.2 Chlorofyl <i>a</i>	26
3.2.3 Degradace s časem	28

Závěr	34
Seznam použité literatury	35
Seznam použitých zkratek	37

Úvod

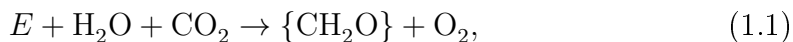
Fotosyntéza patří mezi nejvýznamnější biologické pochody na Zemi. Jde o proces, který probíhá např. v rostlinných buňkách a při němž se mění světelná energie ze Slunce na energii chemickou, která je pak buňkou dále zpracovávána. Některé fotosyntetické organismy jako vyšší rostliny získávají veškerou potřebnou energii ke svému životu ze slunečního záření, jiné využívají fotosyntézu pouze jako jeden ze zdrojů energie, a to v závislosti na tom, v jakých vnějších podmínkách se nacházejí. Jelikož je tedy fotosyntéza hlavní zdroj energie velké části organismů, je nezbytná pro život na Zemi obecně [1].

Z fyzikálního hlediska jsou důležité především primární fáze fotosyntézy, a to zachycení fotonu slunečního záření, jeho přeměna na excitační energii a přenos do reakčního centra, kde dojde k separaci náboje. Těchto procesů se účastní fotosyntetické pigmenty - chlorofyly a karotenoidy. Chlorofyly slouží právě k zachycení fotonu a následnému přenosu excitonu. Karotenoidy tuto funkci také zastávají, ale navíc mají velmi důležitou ochrannou roli, zejména jsou schopny chránit buňku před vznikem reaktivního singletního kyslíku. Ten poškozují organické molekuly v buňce a jeho přítomnost je zde tedy nežádoucí. Chlorofyly a karotenoidy jsou ve fotosyntetických membránách vázány v tzv. pigment-proteinových komplexech. Zde jsou orientovány do vhodných pozic tak, aby docházelo k účinnému přenosu excitační energie do reakčních center a zhášení tripletních stavů chlorofylů karotenoidy. Snaha o hlubší pochopení všech procesů spjatých s fotosyntézou a jejich následný výzkum jsou důležité při vývoji umělé fotosyntézy, která by mohla být v budoucnu podstatným zdrojem energie pro lidstvo [2].

1. Teoretická část

1.1 Fotosyntéza

Během fotosyntézy dochází k přeměně sluneční energie na energii chemickou. Obecně můžeme pro tento proces napsat rovnici



kde E je energie získaná z absorpce fotonů (ve formě $\text{NADPH} + \text{H}^+$ a ATP) a která se využije na tvorbu sacharidu $\{\text{CH}_2\text{O}\}$. $\text{NADPH} + \text{H}^+$ je redukovaný nikotinamidadeninindinukleotidfosfát, koenzym důležitý pro syntézu určitých organických molekul a ATP je adenosintrifosfát, molekula obsahující makroergní vazbu, v níž je uskladněno velké množství energie [3].

1.1.1 Fotosyntetický aparát

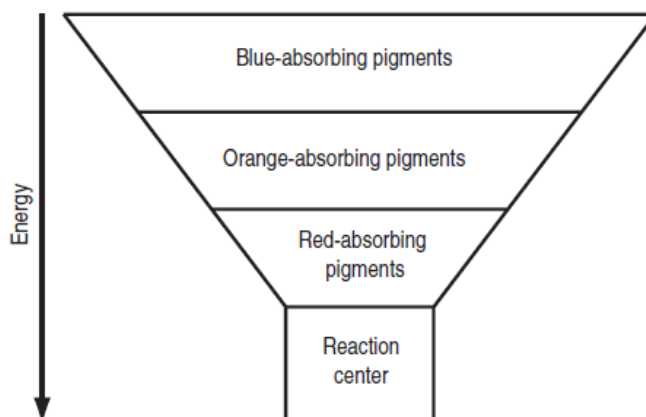
Fotosyntézu vykonává celá řada organismů. Tyto organismy jsou nazývány fotoautotrofními a patří mezi ně jak prokaryotické organismy (bakterie a sinice), tak i eukaryotické (řasy a rostliny). Eukaryotická buňka se vyznačuje mimo jiné tím, že jednotlivé funkce jsou vykonávány specializovanými organelami. Právě pro fotosyntézu jsou využívány organely s dvojitou vnější membránou, zvané chloroplasty. Tyto útvary, které zhruba odpovídají velikosti bakterie, tj. několik mikrometrů, v sobě obsahují všechny fotosyntetické pigmenty zodpovídající za primární fáze fotosyntézy. V chloroplastech neprobíhají všechny fáze fotosyntézy, některé následné procesy, jako je například syntéza sacharózy, využívají ke svému průběhu i enzymy, které jsou přítomny vně chloroplastu. Tyto procesy jsou ale spíše chemického rázu [1].

Uvnitř chloroplastů lze nalézt systém membrán zvaných thylakoidy, které můžeme rozdělit na granální a stromatální, podle toho do jaké struktury se formují. Okolní prostor se nazývá stroma. Granální thylakoidy jsou přitíštěné na sebe a tvoří tzv. grana, zatímco stromatální thylakoidy přitíštěné nejsou a vzájemně spojují jednotlivá grana. Thylakoidní membrány jsou tvořeny dvojitou vrstvou amfipatických lipidů (to jsou takové, které mají hydrofilní a hydrofóbní část). V těchto lipidech jsou zasazeny základní bílkovinné komplexy, především fotosystémy 1 a 2. Ty se skládají ze světlosběrných antén a reakčního centra, nacházejícího se zhruba uprostřed komplexu. Zde probíhají fyzikálně nejzajímavější fáze fotosyntézy [3].

1.1.2 Primární fáze fotosyntézy

Celý složitý proces fotosyntézy můžeme rozdělit na čtyři části - 1. zachycení a přenos fotonu světlosběrnou anténou, 2. separace a přenos elektronu v reakčním centru, 3. stabilizace rozdělení náboje a 4. tvorba potřebných chemických látek. První tři fáze můžeme označit za primární procesy fotosyntézy, zvané také světelná fáze. Čtvrtá fáze se označuje jako temnostní. Toto rozdělení je ovšem poněkud zavádějící, protože všechny fáze v podstatě probíhají za světla, ale jeho přítomnost je nezbytně nutná pouze k excitaci elektronů v první fázi [1].

Zachycení fotonu je uskutečněno fotosyntetickými pigmenty, nejčastěji chlorofylem *a*, ale také chlorofyly dalších typů (*b, c, d, e*), fykobiliny či karotenoidy. Foton je těmito pigmenty dále ve formě excitonu přenášen až do reakčního centra ve směru spádu excitační energie. To je umožněno díky speciálnímu uspořádání pigmentů v anténě, kdy pigmenty na okrajích antény absorbují fotony s kratší vlnovou délkou (a tedy s vyšší energií) než ty blíže k reakčnímu centru. Přebytečná energie přejde do okolí ve formě tepla. Schéma takového přenosu je na obrázku 1.1. Předpokládejme, že byl foton zachycen světlosběrnou anténou fotosys-



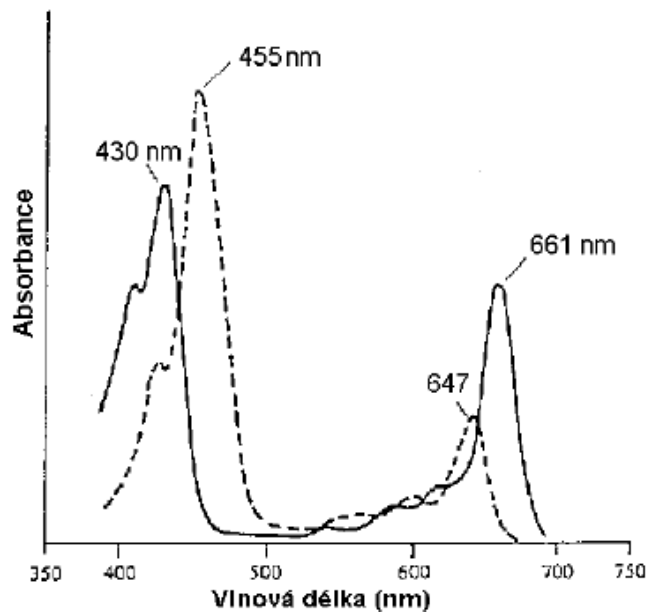
Obrázek 1.1: Uspořádání pigmentů ve světlosběrných anténách v závislosti na energiích, na kterých nejvíce absorbují, zdroj [1].

tému 2 a odtud přenesen do reakčního centra. V reakčním centru dále dochází k uvolnění elektronu z excitované molekuly chlorofylu, která je silným redukčním činidlem, na molekulu primárního akceptoru. Oxidovaný chlorofyl má ale silnou tendenci přitáhnout elektron a aby tedy nedošlo ke zpětné rekombinaci, je elektron z primárního akceptoru přenesen na vzdálenější. Zároveň je oxidovanému chlorofylu doplněn elektron rozštěpením molekuly vody a dochází k uvolnění molekuly kyslíku a protonů. Protony zůstávají v lumenu (vnitřní prostor) thylakoidu.

Elektrony jsou dále (vázané na pohyblivý přenašeč plastochinon) dopraveny do dalšího bílkovinného komplexu, kterým je cytochrom b_6/f komplex. Zde dochází k oxidaci plastochinolu. Energie získaná uvolněním elektronu je využita na přenos dalších protonů do lumenu, čímž se postupně zvětšuje rozdíl elektrochemického potenciálu mezi oběma stranami membrány. V této fázi dochází k redukcí dalšího bílkovinného přenašeče - plastocyaninu, který dále putuje po povrchu membrány a dopravuje elektrony do reakčního centra fotosystému 1. Tento fotosystém má podobnou stavbu jako fotosystém 2. Umožňuje taktéž záchyt elektronů a jejich přenos do reakčního centra. Odsud jsou přeneseny pomocí ferredoxinu na finální akceptor - enzym ferredoxin-NADP⁺ reduktázu, kde dojde k vytvoření NADPH+H⁺ z NADP⁺.

Vzniklý rozdíl koncentrace protonů na obou stranách membrány je vyrovnáván tokem protonů skrz ATP-ázu, a umožňuje tak syntézu ATP z ADP a P_i [3].

Produkty primární fáze jsou ATP a NADPH+H⁺, které jsou dále využity v sekundární fázi k tvorbě organických sloučenin. Kyslík je odpadní produkt.



Obrázek 1.3: Absorpční spektrum chlorofylu *a* (plná čára) a *b* (přerušovaná čára) rozpuštěných v dietyléteru, zdroj [3].

1.2.2 Karotenoidy

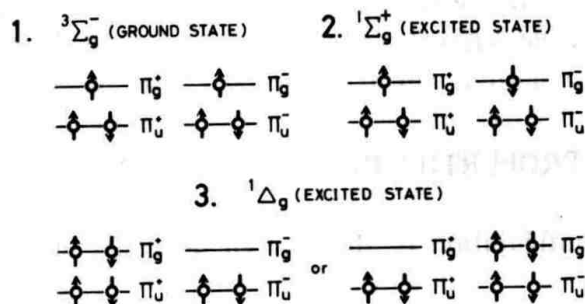
Karotenoidy se po chemické stránce řadí mezi terpenoidy. Můžeme je rozdělit do dvou základních skupin - na karoteny (uhlovodíky se 40 atomy uhlíku a 8 isoprenovými jednotkami) a na xantofyly (kyslíkaté deriváty odvozené od karotenů)[3]. V obou skupinách existuje velké množství rozličných typů karotenoidů, ale ve vyšších rostlinách je zastoupeno jen relativně malé množství z nich. Z karotenů je to β -karoten a z xantofylů lutein, neoxanthin a dále violaxantin, anteraxantin a zeaxantin, které se účastní xantofylového cyklu² [6]. V thylakoidních membránách se karoteny obvykle soustřeďují v reakčních centrech, kde plní ochrannou funkci (viz kapitola 1.4), zatímco xantofyly se vyskytují zejména v anténách fotosyntetických komplexů a podílejí se zde jednak na sběru fotonů a jednak na regulaci přenosu excitační energie [3]. V absorpčních spektrech karotenoidů jsou typické tři pásy, obvykle v rozmezí 400-500 nm [1].

1.3 Singletní a tripletní stavy

1.3.1 Molekula kyslíku

Většina molekul je v základním stavu singletní, tedy má všechny valenční elektrony spárované a celkový spin je 0. Naopak molekula kyslíku je v základním stavu tripletní, má nespárované dva valenční elektrony, celkový spin roven 1, a tedy existují jeho tři projekce -1, 0, 1 (odtud triplet). Toto uspořádání je v přírodě velmi vzácné. Na obrázku 1.4 je znázorněno elektronové obsazení molekulových

²xantofylový cyklus má ochrannou funkci - jde o sled reakcí, kterými se rostliny chrání před stresem z přílišného ozáření

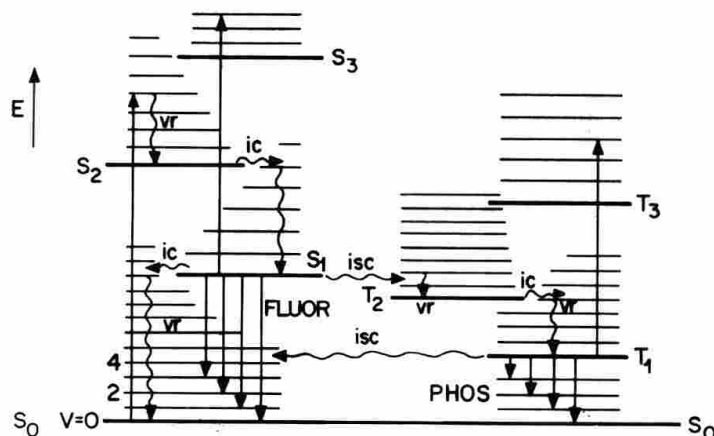


Obrázek 1.4: Obsazení molekulárních orbitalů molekuly O_2 , zdroj [7].

orbitalů molekuly kyslíku v základním stavu ${}^3\Sigma_g^-$ a v jeho dvou nejnižších excitovaných stavech ${}^1\Sigma_g^+$ a ${}^1\Delta_g$. Index 3 značí tripletní stav a index 1 singletní stav - tedy první dva excitované stavy molekuly kyslíku jsou singlety.

1.3.2 Přechody mezi hladinami

Přechody mezi energetickými hladinami elektronů v molekulách ilustruje tzv. Jablonského diagram (obrázek 1.5).



Obrázek 1.5: Jablonského diagram - schéma elektronových stavů molekul a přechodů mezi nimi, zdroj [7].

Singletní základní stav molekuly je v obrázku označen S_0 . Po excitaci přejde elektron na některou z vibračních hladin příslušejících stavům S_1, S_2, \dots . Odsud se může do základního stavu dostat řadou různých způsobů. Například nejprve dojde k vibrační relaxaci (na obrázku značeno vr), kdy elektron přejde z vyšší vibrační hladiny na tu nejnižší příslušející danému stavu S_1, S_2, \dots . Při tomto procesu elektron ztratí energii ve formě tepla. Pokud elektron ještě není v základním stavu, může nastat takzvaná vnitřní konverze (ic), kdy dojde k přechodu na vibrační hladinu jiného singletního energetického stavu o stejné energii. Následovat bude opět vibrační relaxace. Tímto způsobem může elektron přejít zpět do základního stavu S_0 , aniž by došlo k zářivému přechodu (veškerá energie získaná excitací přejde do okolí jako teplo). Další možností je, že se takto nezářivě elektron dostane

na nejnižší vibrační hladinu S_1 , odkud se do základního stavu S_0 dostane vyzářením fotonu. Tomuto jevu se pak říká fluorescence (*FLUOR*). Pokud se elektron do stavu S_1 dostane po absorpci fotonu molekulou, bude se energie fotonu vyzářeného fluorescencí lišit od energie fotonu absorbovaného o tu část, která se přemění na teplo během vibrační relaxace (dojde-li k excitaci elektronu rovnou na nejnižší vibrační hladinu, budou energie obou fotonů stejné). Vlnová délka vyzářeného fotonu je pak větší a dochází tím k posunu emisního spektra oproti absorpčnímu spektru směrem k červené oblasti světla - tzv. Stokesův posun.

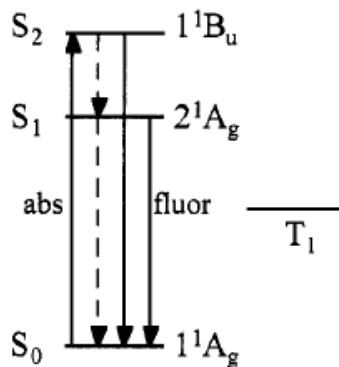
V některých případech může místo fluorescence dojít k mezisystémovému přechodu (*isc*), kdy se elektron ze singletního stavu S_1 s překlopením spinu dostane do některé z vibračních hladin tripletního stavu (na obrázku T_2). Doba života těchto stavů je dlouhá ve srovnání se singletními, protože přechod na základní singletní hladinu je spinově zakázaný (muselo by dojít k dalšímu překlopení spinu). S malou pravděpodobností k němu ale dochází (v důsledku spin-spinové a spin-orbitální interakce) a pokud je tento jev spojen s vyzářením fotonu, pak se nazývá fosforescence (*PHOS*) [7].

1.4 Ochranná role karotenoidů

K mezisystémovému přechodu dochází u molekul chlorofylu, u kterých je doba života prvního excitovaného stavu S_1 dostatečně dlouhá na to, aby k tomuto spinově zakázanému přechodu došlo. Molekula je nejprve excitována ze základního singletního stavu ^1Chl do prvního excitovaného singletního stavu $^1\text{Chl}^*$ a odsud dojde k přechodu do prvního excitovaného tripletního stavu $^3\text{Chl}^*$, který má nižší energii než $^1\text{Chl}^*$ [9].

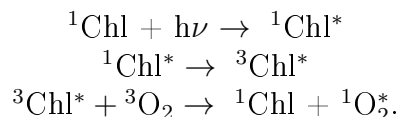
U karotenoidů k tomuto přechodu nedochází z důvodu krátké doby života stavu S_1 . Energetické hladiny karotenoidů jsou znázorněny na obrázku 1.6. Přechod ze základní hladiny S_0 na první excitovanou S_1 je ze symetrie zakázaný, a tak u karotenoidů dochází k excitaci na druhou energetickou hladinu S_2 . Symboly, které jsou na obrázku 1.6 u jednotlivých hladin napsány vpravo, označují grupu symetrie příslušného stavu [10]. Jak je vidět, hladina S_0 a S_1 mají stejnou symetrii, a tedy mezi jejich elektronovými konfiguracemi nevzniká dipólový moment, který je potřebný k tomu, aby došlo k přechodu elektronů mezi těmito dvěma stavy [11].

Energetická hladina S_2 karotenoidů je položená výše než první excitovaná hladina chlorofylů, a proto karotenoidy, které ve světlosběrných anténách pohltí foton, mohou předat svou excitační energii molekule chlorofylu. Naopak díky nízko položenému prvnímu excitovanému tripletnímu stavu karotenoidů T_1 může docházet k triplet-tripletnímu energetickému přechodu - interakce mezi jednou molekulou v základním singletním stavu (karotenoid) a druhou v prvním excitovaném tripletním stavu (např. chlorofyl), kdy první přejde do excitovaného tripletního stavu a druhá naopak do základního singletního stavu. Toto je způsob, kterým ve fotosyntetických komplexech dochází k populaci tripletních hladin karotenoidů. Zároveň je tato schopnost karotenoidů zhaset tripletní stavy chlorofylů velmi důležitá, neboť předchází vzniku singletního kyslíku, který je v takovém stavu velmi silný oxidant a jeho přítomnost v buňce je nežádoucí, protože velmi rychle napadá jak chlorofyly, tak i proteiny, nukleové kyseliny a lipidy a buňku tímto způsobem ničí [9].

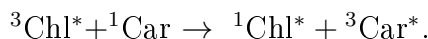


Obrázek 1.6: Schéma energetických hladin karotenoidů, zdroj [10].

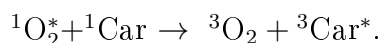
Bude-li totiž molekula $^3\text{Chl}^*$ interagovat s kyslíkem, může dojít k triplet-tripletní anihilaci (interakce mezi dvěma molekulami v tripletním stavu, kdy jedna z nich přejde do excitovaného singletního stavu a druhá do základního singletního stavu [8]). Tak dojde ke vzniku excitovaného singletního kyslíku $^1\text{O}_2$. Tyto interakce mohou být schematicky zapsány takto:



Karotenoidy tedy, jak už bylo řečeno, mohou snímat tripletní energii chlorofylů, a tak výše uvedené reakci účinně předcházet:



Zároveň mohou karotenoidy interagovat přímo se singletním kyslíkem a jeho excitaci zhášet díky tomu, že jejich tripletní energetická hladina leží pod energetickou hladinou singletního kyslíku:



U obou dvou případů nakonec dojde k nezáživému přechodu molekuly karotenoidu do základního stavu [9].

1.5 Absorpční spektroskopie

1.5.1 Stacionární absorpční spektra

Absorpce fotonu molekulou způsobuje přechody elektronů na vyšší energetické hladiny. Velikost absorpce závisí na uspořádání excitovaných hladin dané molekuly a na vlnové délce fotonu. Změříme-li množství absorbovaného světla v závislosti na jeho vlnové délce, dostaneme absorpční spektrum dané látky. Z něj je možné určit energie (vlnové délky) a pravděpodobnost přechodů, která odpovídají intenzitě absorpčních pásů. Pro popis absorpce se zavádí veličina transmitance $T(\lambda)$, která je definována jako poměr intenzity prošlého světla $I(\lambda)$ ku intenzitě dopadajícího světla $I_0(\lambda)$, a tedy popisuje množství světla absorbovaného vzorkem.

Záporně vzatý logaritmus transmitance udává veličinu zvanou absorbance

$$A(\lambda) = -\log T(\lambda) = -\log \frac{I(\lambda)}{I_0(\lambda)}. \quad (1.2)$$

Tu lze ekvivalentně vyjádřit ve tvaru, který se nazývá Lambert-Beerův zákon

$$A(\lambda) = \epsilon(\lambda)cd, \quad (1.3)$$

kde c je koncentrace absorbující molekuly, d je tloušťka vzorku a $\epsilon(\lambda)$ je molární absorpční koeficient závisící na vlnové délce a typu molekuly [12], [5].

1.5.2 Časově rozlišená transientní spektroskopie

Informaci o dynamice excitovaných stavů získáme pomocí časově rozlišené absorpční spektroskopie. Vzorek je excitován intenzivním krátkým pulsem a následně je v různých definovaných časech (v našem případě v řádech nanosekund) měřena absorpce slabším světlem, tak aby byly excitační změny vyvolané tímto sondujícím světlem zanedbatelné vůči těm způsobeným excitačním pulsem. Transientní neboli rozdílová spektra získáme, když od spektra změřeného v určitém čase po excitaci odečteme spektrum vzorku před excitací. Obvykle se měří v dvou-paprskovém uspořádání - porovnáváme signál ze vzorku I_S se signálem z reference I_R . Tímto se sníží chyba vzniklá výkyvy v intenzitě sondovacího světla. Změna absorbance je pak

$$\begin{aligned} \Delta A(t, \lambda) &= A(t, \lambda) - A(0, \lambda) = -\log T(t, \lambda) + \log T(0, \lambda) = \\ &= -\log \frac{I_S(t, \lambda)}{I_R(t, \lambda)} + \log \frac{I_S(0, \lambda)}{I_R(0, \lambda)}, \end{aligned} \quad (1.4)$$

kde $A(t, \lambda)$ je absorpční spektrum v čase t po excitaci a $A(0, \lambda)$ před excitací, obdobně pro transmitanci T , pro signál ze vzorku I_S a signál z reference I_R . Změny signálu, která detekujeme, tedy $\Delta I(t, \lambda) = I(t, \lambda) - I(0, \lambda)$, jsou především tzv. vybělování, což znamená úbytek absorpce díky nižší populaci základní hladiny (projeví se záporným signálem), a objevení absorpce v jiných spektrálních oblastech díky excitaci z obsazených vyšších hladin (projeví se kladným signálem). Dále v transientních spektrech můžeme v krátkých časech po excitaci pozorovat fluorescenci (záporný signál, který rychle ubývá s časem)[12].

Měřením časově rozlišených transientních spekter získáme informace o absorpci vzorku v závislosti jak na vlnové délce λ , tak i na čase t . Pro konkrétní vlnové délky se můžeme zaměřit na průběh absorpce v čase - tedy na její kinetiku. V těchto datech je uložena informace o dohasínání jednotlivých excitovaných stavů. Pro dohasínání jednoho excitovaného stavu lze předpokládat exponenciální průběh

$$A(t, \lambda) = A(0, \lambda)e^{-t/\tau}, \quad (1.5)$$

kde τ je doba života příslušného stavu, tedy převrácená hodnota rychlostní konstanty dohasínání. Vezmeme-li v úvahu předpoklad stejného dohasínání na všech vlnových délkách, lze celé absorpční spektrum fitovat pomocí jedné sady rychlostních konstant. U jednotlivých exponenciál jsou pak modulovány pouze amplitudy,

tak aby správně popisovaly kinetiku na různých vlnových délkách [12], [5]. Z tohoto fitování je třeba vyřadit signál od fluorescence, protože její kinetika dohasíná exponenciálně pokud je intenzita vynesena v lineární škále [11], kdežto absorpce dohasíná exponenciálně, pokud je její intenzita vynesena ve škále logaritmické.

2. Použité metody a přístroje

2.1 Příprava vzorků

2.1.1 Izolace thylakoidů

Izolace thylakoidů z listů špenátu nebyla náplní této práce, ale již vyextrahované nám je poskytl Mgr. Petro Khoroshyy, Ph.D. Jejich příprava byla následující: nejprve se listy zbavené řapíků rozmixovaly spolu s hypotonickým pufrům (10mM Tris-HCl), získaná suspenze byla přefiltrována a odstředována 20-30 s relativní centrifugační silou 2000 g. Tekutina nad sedimentem byla dále odstředována 4 minuty při síle 4000 g a vzniklá usazenina byla rozmíchána v pufru, který obsahoval 0,35M sacharózu, 20mM Tris-HCl, 0,2% BSA (bovine serum albumin). Poté proběhla další centrifugace, a to opět 4 minuty při 4000 g. Tím došlo k izolaci chloroplastů. Aby se z nich extrahovaly thylakoidy, byl sediment opět rozředěn v hypotonickém pufru a odstředován silou 27000 g po dobu 5 minut. Nakonec byly usazené thylakoidy smíchány s pufrům, který obsahovat 15mM NaCl, 20mM Tris-HCl a 0,4M sacharózu. Všechny použité pufrы udržují pH 7,5.

Tímto postupem jsme získali vzorek, který obsahoval stromatální thylakoidy, granální thylakoidy i thylakoidní membrány. V dalším textu budeme tento vzorek pro jednoduchost často nazývat thylakoidy.

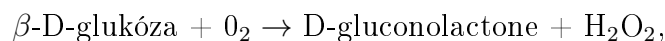
2.1.2 Thylakoidy a extrakce pigmentů

Extrahované thylakoidy jsme rozředili v pufru. V prvním případě, kdy vzorek sloužil pro měření transientní absorpce, šlo o pufr s pH 8,0, který obsahoval 0,05% DM (dodecyl maltoside) 50mM Tris-HCl, a ve druhém případě, kdy jsme vzorek využili jen na sledování jeho degradace s časem, jsme použili tricinový pufr s pH 7,5, který obsahoval 20mM tricin, 20mM KCl a 0,16% DM.

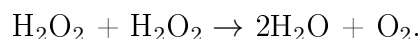
Pigmenty jsme extrahovali z thylakoidů použitím organických rozpouštědel acetonu a methanolu v poměru 7:2 (při extrakci pigmentů pro tvorbu micel) a v poměru 5:2 (v ostatních případech).

2.1.3 Odstranění kyslíku pomocí enzymů

K odstranění kyslíku ze vzorku s thylakoidy jsme používali β -D-glukózu a enzymy katalázu a glukózoxydázou. Glukózoxydázou katalyzuje následující reakci:



na kterou navazuje reakce umožněná enzymem katalázou



První reakce tedy spotřebuje dvě molekuly kyslíku na vznik dvou molekul peroxidu vodíku H_2O_2 , ze kterých v druhé reakci vznikne voda a jedna molekula kyslíku. Takto dochází k odstraňování kyslíku.

V našem případě jsme použili 20mM β -D-glukózu a enzymy v takovém množství, abychom měli zhruba 34 jednotek¹/ μ l glukózoxydázy a 850 jednotek/ μ l katalázy.

2.1.4 Separace chlorofylu *a*

Separace chlorofylu *a* byla prováděna na zařízení HPLC (high-performance liquid chromatography). Vzorek jsme připravili tak, že jsme extrahované pigmenty z thylakoidů rozpustili v methanolu a hexanu v poměru 4:1. Stejná směs se používá i jako mobilní fáze v aparatuře. Vzorek je vstříknut do této mobilní fáze a odnesen do kolony, kde na pevné fázi dochází k rozdělení molekul podle jejich polarit. Z kolony pak vytékají látky od nejpolárnější po tu nejméně polární - tedy nejprve karotenoidy xantofyly, poté chlorofyl *b* a následně chlorofyl *a* (chlorofyl *b* je polárnější než *a* díky aldehydové skupině, viz 1.2.1).

V aparatuře je přítomen detektor měřící absorpční spektra molekul, které z kolony právě vytékají. Z těchto spekter určíme, která látka vytéká v jakém čase a v příslušném programu na počítači nastavíme, aby přístroj v tomto čase separovanou látku sbíral. Tak získáme roztok s chlorofylem *a*, který je poté vysušen a uložen v mrazáku.

2.1.5 Bublání dusíkem

Pro zbavení se kyslíku v roztoku chlorofylu *a* jsme používali metodu bublání dusíkem, kdy je do vzorku zavedena jehla s dusíkem. V důsledku toho dochází ke snižování koncentrace kyslíku ve vzorku a tím k uvolňování kyslíku z roztoku.

Vzorek s chlorofylem *a* jsme připravili rozpuštěním v acetonu a methanolu (v poměru 5:2). Naplnili jsme s ním kyvetu, v jejímž hrdle byla umístěna eppendorfka s uříznutou špičkou. Naplnili jsme kyvetu včetně eppendorfky, aby po odpaření části rozpouštědla vlivem foukání dusíku byla kyveta stále plná. Tímto postupem jsme minimalizovali opětovné okysličení vzorku při uzavírání kyvety.

2.1.6 Micely

Pigmenty extrahované směsí acetonu a methanolu v poměru 7:2 jsme nejprve vysušili a poté během třepání vstříkli do tricínového pufru, který obsahoval 0,16% dodecyl maltoside (DM). Tato látka patří mezi detergenty, její molekuly mají hydrofóbní a hydrofilní část, a tedy ve vodném prostředí tvoří micely nebo liposomy [13], do kterých se shlukují pigmenty nerozpustné ve vodě.

2.2 Měření stacionárních spekter

Stacionární absorpční spektra se měří na dvouprávkovém spektrometru Specord 250 (Analytik Jena). Tento spektrometr měří jednak absorpci vzorku a jednak absorpci reference (rozpuštědlo bez vzorku, ale ve stejném typu kyvety). Výsledné spektrum vypočítá jako jejich rozdíl, čímž dojde k eliminaci chyby způsobené odrazy v kyvetě nebo rozpouštědlem v rozpouštědle.

¹Jedna jednotka umožní přeměnu jednoho μ mol látky za minutu za určitých definovaných podmínek daných použitou metodou [8].

2.2.1 Integrační koule

U rozptylujících vzorků můžeme rozptyl potlačit například tím, že vzorek dáme co nejbližší k detektoru, do kterého se tak dostane větší část rozptýleného světla. Lepší metodou je však použití integrační koule. Její dutina je vyrobena z vysoce odrazivého materiálu, tak aby odrazila převážnou část světla, které do ní dopadne. Umístíme-li vzorek do ní nebo těsně před její vstupní otvor, pak světlo, které prochází vzorkem (i to, které se v něm rozptýlí) se dostane do koule, kde se několikrát odráží a dopadá na detektor. Integrační koule tak potlačuje rozptyl ve vzorku lépe než pouhé přiblížení vzorku k detektoru. Korekce přesto není úplná, protože odrazivost vnitřku není přesně rovna jedné, a tedy se část světla při odrazech ztratí [14]. Navíc pokud je vzorek umístěn před koulí (jak tomu bylo v našem případě), je navíc ztrát způsobeno tím, že se část světla do koule nemusí vůbec dostat.

2.3 Měření časově rozlišených transientních spekter

2.3.1 Experimentální uspořádání

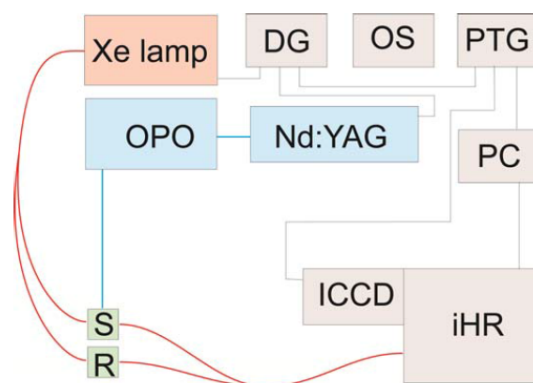
Pro měření transientní absorpce s nanosekundovým rozlišením se používá aparatura, která je schematicky znázorněna na obrázku 2.1. Skládá se z nanosekundového Nd:YAG laseru, jímž je čerpán optický parametrický oscilátor (OPO), zařízení, které umožňuje nastavovat excitační vlnovou délku laseru v poměrně širokém rozsahu (princip tohoto zařízení je popsán v následujícím odstavci 2.3.2). Vzorek (S) je tedy excitován pulsy o délce asi 3 ns na vybrané vlnové délce. Jako sondovací světlo se používá xenonová výbojka (Xe lamp). Pulsy jsou rozděleny na dva, přičemž jedním z nich ozařujeme vzorek a druhým referenci (R), a to v definovaných zpožděních po excitaci. Získaný signál ze vzorku i z reference dále putuje do zobrazovacího spektrometru (iHR), kde dojde k jeho rozložení podle vlnových délek a následné detekci na intenzifikované CCD kameře (ICCD), viz odstavec 2.3.3. Měření probíhá v takzvaném pravoúhlém uspořádání - sondovací světlo vstupuje do vzorku ve směru kolmém na excitační puls. Pro každé zpoždění pumpy a sondy se měření opakuje 500x a výsledné transientní spektrum se počítá jako průměr.

Při měření jsme všechny vzorky chladili na teplotu 4 °C a také jsme používali magnetické míchadlo. Míchání sloužilo především k tomu, aby byla pokaždé excitována jiná část vzorku a snížila se tak jeho fotodegradace. V případě thylakoidů jsme mícháním navíc zabránili jejich usazování.

Získaná data zpracováváme v programu Globální analýza (viz 2.3.4).

2.3.2 Optický parametrický oscilátor

V tomto zařízení se využívá nelineárních optických jevů, tedy takových, kdy nepovažujeme polarizaci látky za lineárně závisící na elektrické intenzitě, ale rozvíjíme ji do mocninné řady a bereme v úvahu i členy vyšších řádů. Vezmeme-li v úvahu polarizaci druhého řádu, pak v látce, která nemá střed symetrie, může docházet k tzv. generaci druhé harmonické - ke vzniku vlny s dvojnásobnou

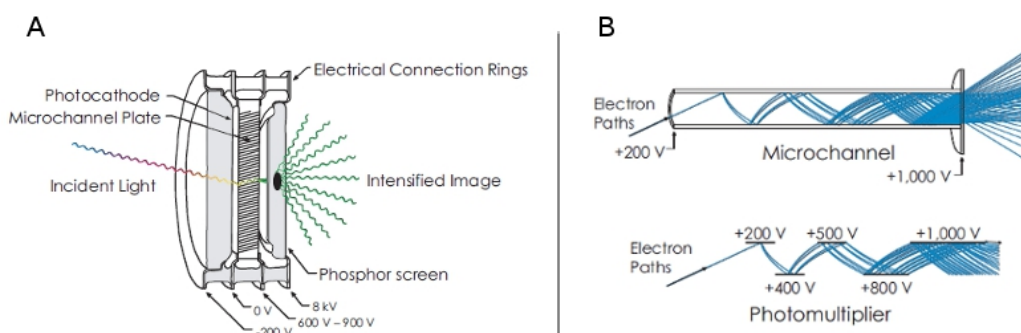


Obrázek 2.1: Aparatura pro měření časově rozlišených transientních spekter, zdroj [12].

frekvencí. Dalším nelineárním jevem spojeným s polarizací druhého řádu je generace součtové a rozdílové frekvence, kdy ze dvou vln o různých frekvencích vzniká jedna s frekvencí rovnou jejich součtu nebo rozdílu [15].

Do optického parametrického oscilátoru vstupují z nanosekundového Nd:YAG laseru pulsy o vlnové délce 1064 nm. Prochází zde systémem anizotropních krystalů, které způsobují nejprve generaci druhé harmonické s vlnovou délkou 532 nm a poté generaci třetí harmonické frekvence s vlnovou délkou 355 nm. Tyto tři svazky pak v dalším krystalu generují rozdílové frekvence třetí harmonické (signální a jalový svazek). Vhodným natáčením krystalu docílíme toho, že ze zařízení nakonec vystupují dva laserové svazky, signální a jalový, jejichž vlnovou délku budeme měnit v širokém spektrálním oboru. Pro signální svazek je to 420-710 nm a pro jalový 710-2300 nm. Takto tedy můžeme zvolit vlnovou délku, na které budeme vzorek excitovat.

2.3.3 Intenzifikovaná CCD kamera



Obrázek 2.2: Schematický náčrt intenzifikované CCD kamery (A) a mikrokanálku (B nahoře) ve srovnání s fotonásobičem (B dole), zdroj [16].

Signál je detekován pomocí intenzifikované CCD kamery. Schéma tohoto přístroje je na obrázku 2.2A. Fotony dopadají na fotokatodu, vyrazejí z ní elektrony, které jsou dále pomocí elektrického napětí urychlovány systémem mikrokanálek. V těch dochází k zesilování signálu sekundární emisí elektronů - vyražením dalších

elektronů ze stěn kanálků (schéma mikrokanálku je na obrázku 2.2B nahoře, dole je porovnání s fotonásobičem). Po průchodu tedy dojde k zesílení signálu a zároveň zůstane zachována informace o prostorovém rozložení fotonů na začátku. Elektrony dále dopadají na fosforescenční stínítko a způsobují vyzáření fotonů, které jsou nakonec detekovány CCD kamerou.

Pomocí tohoto zařízení je rovněž možno volit zpoždění a délku měřicího okna, a to přikládáním urychlovacího napětí jen na určitou dobu.

2.3.4 Globální analýza

Program Globální analýza napsal a poskytl Mgr. Jan Alster, PhD. Tento program umožňuje zpracovávat data z časově rozlišeného měření. Změřená transientní spektra jsou zde seřazena nad sebe do matice podle toho, jaké bylo zpoždění mezi excitací a sondovacím pulsem. Pomocí barevné škály je znázorněna intenzita transientní absorpce pro jednotlivé body. Data je možné fitovat pomocí zvoleného počtu dob dohasínání τ . Amplituda exponenciál s těmito dobami dohasínání je funkcí vlnové délky a odpovídá spektrům komponent příslušným těmto dohasínáním - tzv. decay associated spectra (DAS).

Počet komponent, které byly použity k fitování, jsme volili tak, aby zvýšení jejich počtu nevedlo k podstatnému snížení chyby fitu ani zlepšení struktury reziduí.

3. Výsledky měření a diskuze

3.1 Transientní časově rozlišená spektra

Pro měření časově rozlišené transientní absorpce jsme připravili několik vzorků - pigmenty v thylakoidních membránách v aerobním i anaerobním prostředí, izolované pigmenty volně v organických rozpouštědlech nebo v micelách a chlorofyl *a* v aerobním i anaerobním prostředí. Tyto vzorky sloužily k tomu, abychom porovnali efektivitu přenosu tripletní excitační energie z chlorofylů na karotenoidy v jejich různých vzájemných uspořádáních.

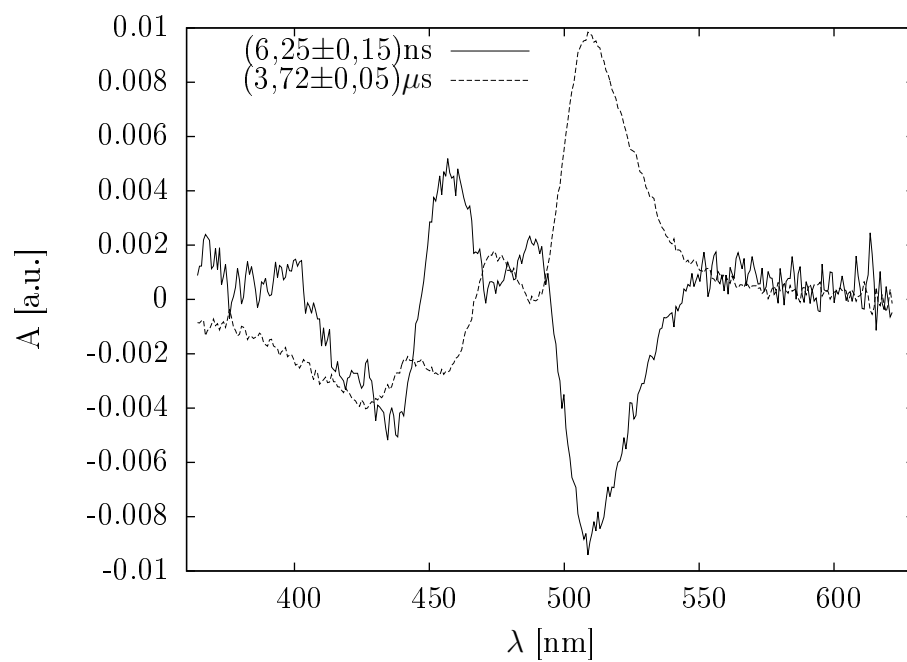
3.1.1 Pigmenty v thylakoidech

V thylakoidních membránách jsou pigmenty vázány v pigment-proteinových komplexech. Díky tomu jsou chlorofyly a karotenoidy vůči sobě natolik blízko, že mezi nimi může docházet k přenosu excitační energie Dexterovým mechanismem. Toto jsme ověřili změřením časově rozlišené transientní absorpce vzorku s pigmenty v thylakoidních membránách.

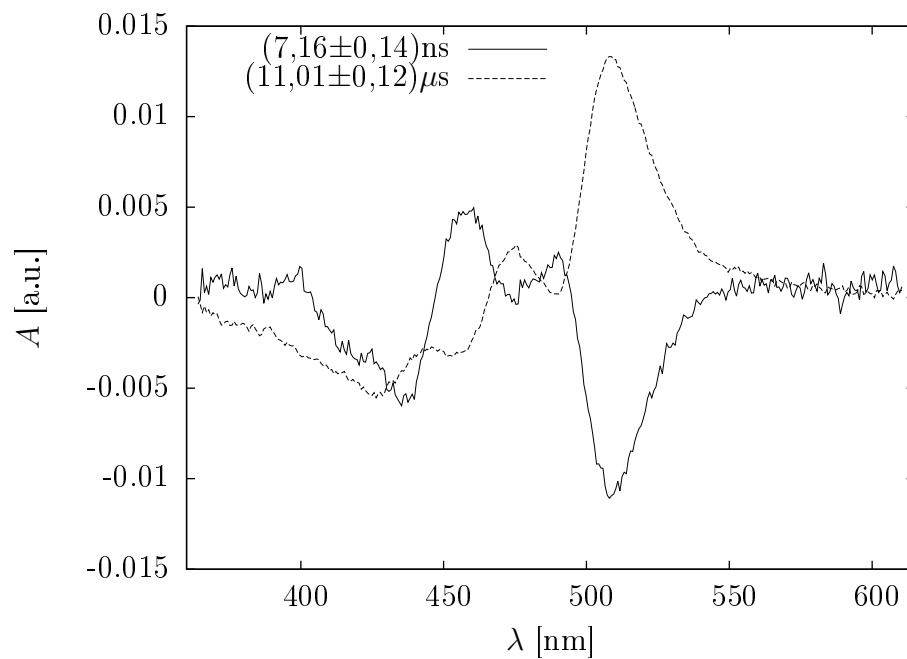
Excitační vlnová délka pro měření byla stejně jako u všech následujících měření zvolena na základě stacionárního absorpčního spektra vzorku (viz grafy v odstavci 3.2 dále). Volili jsme tu, která odpovídala maximu intenzity absorpce v červené oblasti. Pro thylakoidy to bylo 677 nm.

Naměřená data jsme zpracovávali v programu Globální analýza (viz 2.3.4). Nejprve jsme ze všech naměřených dat (v rozsahu 364-760 nm) odstranili fluorescenci, která se objevuje v krátkých časech po excitaci na vlnových délkách blízkých té excitační a jejíž průběh není v logaritmické škále exponenciální. Tuto korekci jsme provedli tak, že jsme k fitování zvolili takový interval vlnových délek, na kterých se fluorescence nevyskytovala. V tomto případě jsme vybrali jen data v rozmezí 364-622 nm. Tato data jsme fitovali dvěma exponenciálami, protože očekáváme dvě různé složky DAS, odpovídající populaci excitovaných stavů chlorofylů a karotenoidů. Doby dohasínání příslušných dvou stavů vyšly za aerobních podmínek následovně: $(6,25 \pm 0,15)$ ns a $(3,72 \pm 0,05)$ μ s. Příslušná DAS spektra jsou vynesena v grafu 3.1. Komponentu s kratší dobou života (plná křivka v grafu) přiřazujeme dohasínání excitovaných stavů chlorofylů a komponentu s delší dobou života (přerušovaná křivka) dohasínání tripletních stavů karotenoidů.

Ve spektru chlorofylů můžeme zhruba mezi 400-440 nm pozorovat záporný signál, který je podobný Soretově pásu převrácenému kolem vodorovné osy (viz obrázek 1.3). Signál je záporný, protože jde o tzv. vybělování (viz odstavec 1.5.2), kdy absorpce v Soretově pásu po excitaci poklesla z důvodu nižší populace základní hladiny, způsobené právě excitačním pulsem. V přilehlé oblasti směrem k delším vlnovým délkám vidíme kladný signál odpovídající populaci tripletních stavů chlorofylů (dle [17]). Silný záporný signál v oblasti 500-550 nm nepřisuzujeme vybělování, protože chlorofyly v této oblasti ani před excitací příliš neabsorbují. V tomto případě půjde o přenos tripletní excitační energie na karotenoidy, což potvrzuje zrcadlový signál ve spektru karotenoidů, který signalizuje, že karotenoidy tuto energii od chlorofylů převzaly. Záporný signál ve spektru karotenoidů



Obrázek 3.1: DAS spektra thylakoidů v aerobním prostředí.



Obrázek 3.2: DAS spektra thylakoidů v anaerobním prostředí.

odpovídá vybělování, kdy po excitaci klesá absorpce karotenoidů v modré oblasti, kde karotenoidy typicky absorbují.

V dalším bodě měření jsme pomocí enzymů odstranili kyslík z roztoku s thylakoidy, abychom mohli usoudit, jakou roli hraje jeho přítomnost při přenosech excitační energie.

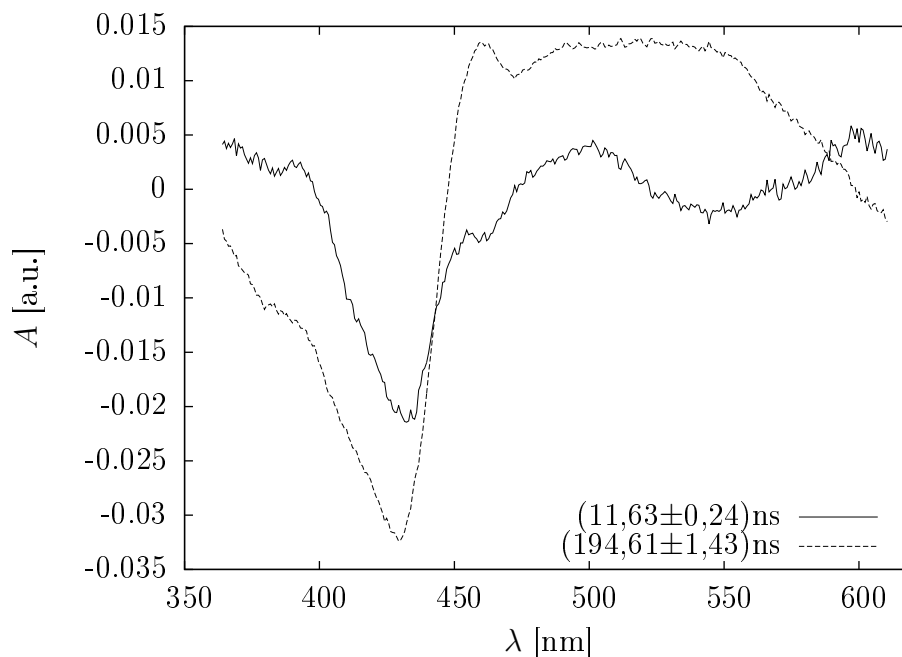
Pro toto měření jsme používali excitační vlnovou délku 677 nm stejně jako v předchozím případě, kdy jsme kyslík ze vzorku neodstraňovali. Fitovali jsme data v rozmezí 364-610 nm. Získané spektrum o dvou složkách s dobami života $(7,16 \pm 0,14) \text{ ns}$ a $(11,01 \pm 0,12) \mu\text{s}$ je zobrazeno v grafu 3.2. Porovnáme-li tento graf s grafem 3.1, můžeme si všimnout, že jsou si obě spektra velmi podobná. Tedy stejně jako v případě thylakoidů za aerobních podmínek můžeme i zde přisoudit komponentu s kratší dobou života chlorofylům a komponentu s delší dobou života karotenoidům a charakter spekter popsat stejným způsobem.

Navíc si povšimneme, že doba života excitovaných stavů chlorofylů se po odstranění kyslíku prodloužila jen asi o 15%, kdežto doba života excitovaných stavů karotenoidů se prodloužila skoro o 200%. Odstranění kyslíku ze vzorku tedy mělo větší dopad na karotenoidy než na chlorofyly. Z toho můžeme usoudit, že z chlorofylů dochází k přenosu excitační energie převážně na karotenoidy - odstraněním kyslíku se doba života chlorofylů příliš nezmění, protože přenos na kyslík a vznik singletního kyslíku nastává pouze v minimu případů. Naopak u karotenoidů funguje tripletní kyslík jako zhasič tripletní excitace, jeho odstraněním se tedy doba života tripletních excitovaných karotenoidů značně prodlouží.

3.1.2 Izolované pigmenty v organických rozpouštědlech

V předchozím odstavci jsme pozorovali, že v thylakoidních membránách funguje přenos tripletní excitace z chlorofylů na karotenoidy, stejně jako zhasení tripletní excitace karotenoidů kyslíkem. Abychom zjistili, jak důležité je uspořádání pigmentů v thylakoidních membránách při prvně zmíněném procesu, připravili jsme pro další měření vzorek, kde byly pigmenty z thylakoidních membrán izolované. Přitom jsme dbali na to, aby koncentrace pigmentů byla podobná (to jsme ověřili srovnáním velikosti absorpce dvou hlavních maxim ve stacionárních absorpčních spektrech těchto dvou vzorků, viz graf 3.7 v odstavci 3.2 dále).

Měření transientní absorpce tohoto vzorku probíhalo obdobně jako v předchozím případě, pouze s tím rozdílem, že nyní jsme excitovali na vlnové délce 663 nm. Při zpracovávání jsme opět odstranili fluorescenci a fitovali jsme data v oblasti 364-610 nm. Pro fit jsme použili dvě komponenty a doby dohasínání vyšly $(11,63 \pm 0,24) \text{ ns}$ a $(194,61 \pm 1,43) \text{ ns}$. Spektra příslušející těmto dohasínáním jsou v grafu 3.3. Vidíme, že v tomto případě na rozdíl od předchozích dvou experimentů k žádnému přenosu excitace z tripletních stavů chlorofylů na karotenoidy nedochází. Spektra obou složek mají podobný charakter a je u nich patrné zejména vybělování v oblasti Soretova pásu, proto přísluší nejspíše pouze chlorofylům. Ve spektru s delší dobou života je patrná také populace tripletních stavů - kladný signál kolem 460 nm [17]. Delší dobu života tedy můžeme přisoudit dohasínání tripletních stavů chlorofylů, zatímco kratší dobu života dohasínání jejich singletních stavů.



Obrázek 3.3: DAS spektra izolovaných pigmentů v organických rozpouštědlech.

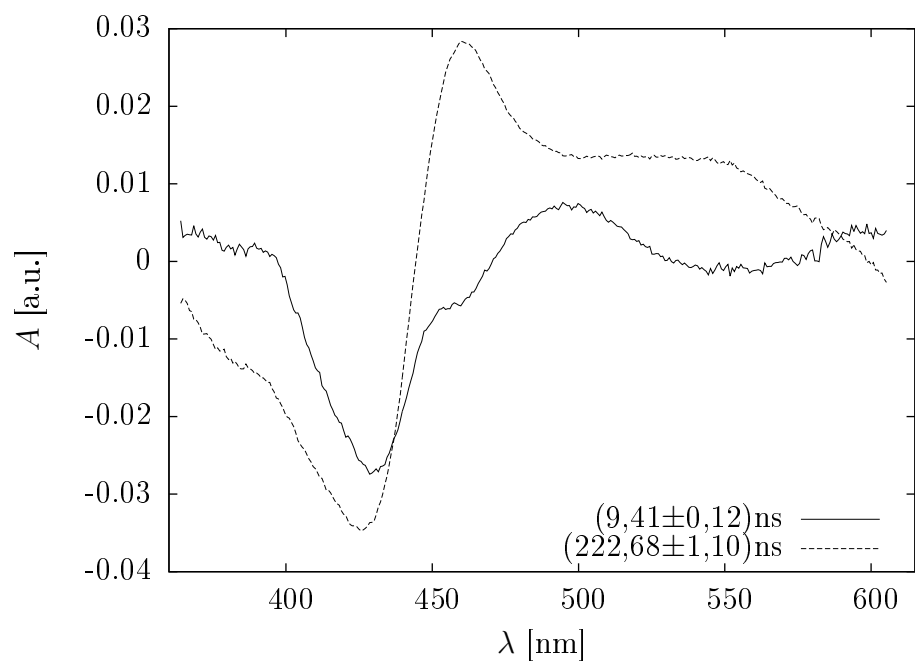
3.1.3 Chlorofyl *a*

Pro ověření výsledku z předchozího odstavce, tedy toho, že nedochází ke zhášení tripletních stavů chlorofylů karotenoidy, pokud se tyto molekuly vyskytují v roztoku volně, jsme provedli další experiment pouze s izolovaným chlorofylem *a*. Porovnáním doby života excitovaných stavů pigmentů s dobami života excitovaných stavů chlorofylu *a* (který je v pigmentech nejvíce zastoupen, jak jsme zjistili při práci na HPLC) za aerobních a anaerobních podmínek můžeme ukázat, zda je tripletní excitace chlorofylů ve vzorku s pigmenty zhášena pouze kyslíkem jako u chlorofylu *a*.

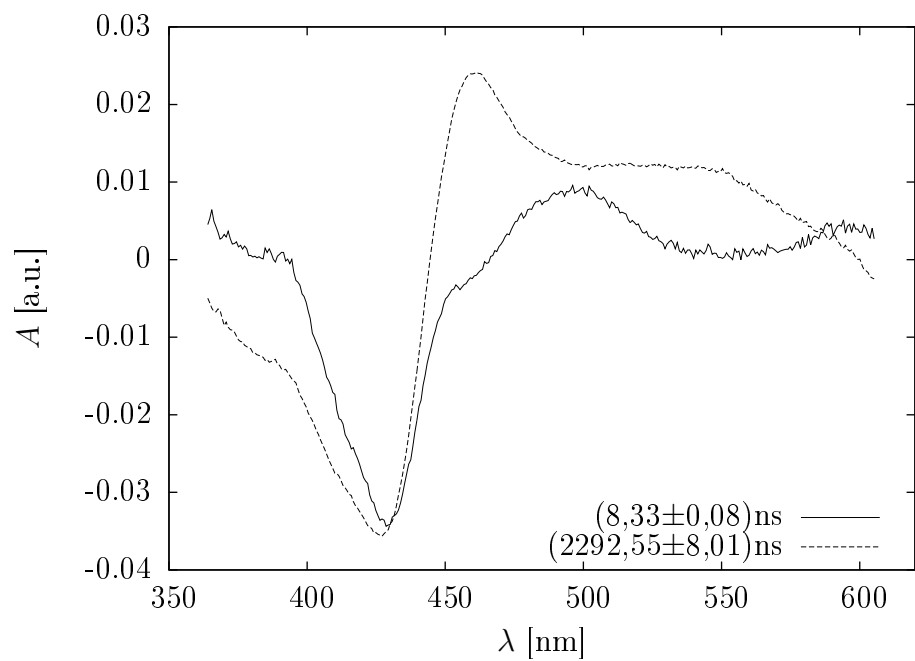
Anaerobní podmínky jsme připravili metodou probublávání dusíkem, viz odstavec 2.1.5. Bubláni jsme prováděli 40 minut a ukončili jsme ho i přesto, že nedošlo k odpaření celého objemu z eppendorfky a o část roztoku jsme tak při zavírání kyvety přišli. K tomuto postupu jsme se uchýlili z toho důvodu, že aceton se odpařuje rychleji než methanol a čím déle bychom roztok probublávali, tím více by se změnil poměr aceton:methanol. Jelikož absorpce závisí i na použitém rozpouštědle, mohla by pak spektra mít lehce odlišný charakter a nebylo by tolik oprávněné srovnávání s roztokem s pigmenty, kde byl stálý poměr aceton:methanol udržen.

Vzorky s chlorofylem *a* jsme excitovali na stejné vlnové délce jako pigmenty - tedy 663 nm. Fitovali jsme v oblasti 364-605 nm opět pomocí dvou složek. Získali jsme tak doby života $(9,41 \pm 0,12)$ ns a $(222,68 \pm 1,10)$ ns za přítomnosti kyslíku a $(8,33 \pm 0,08)$ ns a $(2292,55 \pm 8,01)$ ns bez kyslíku. Příslušná spektra jsou vynesena v grafech 3.4 a 3.5.

Srovnáním těchto dvou grafů s grafem 3.3 vidíme, že tvary spekter příslušející komponentám s kratšími a delšími dobami života jsou si podobné. To potvrzuje, že chlorofyl *a* je hlavní složkou pigmentů. Také z toho vyplývá, že i zde můžeme krátce žijící složku přisoudit dohasínání singletních stavů a tu delší dohasínání



Obrázek 3.4: DAS spektra chlorofylu *a* v organických rozpouštědlech za aerobních podmínek.



Obrázek 3.5: DAS spektra chlorofylu *a* v organických rozpouštědlech za anaerobních podmínek.

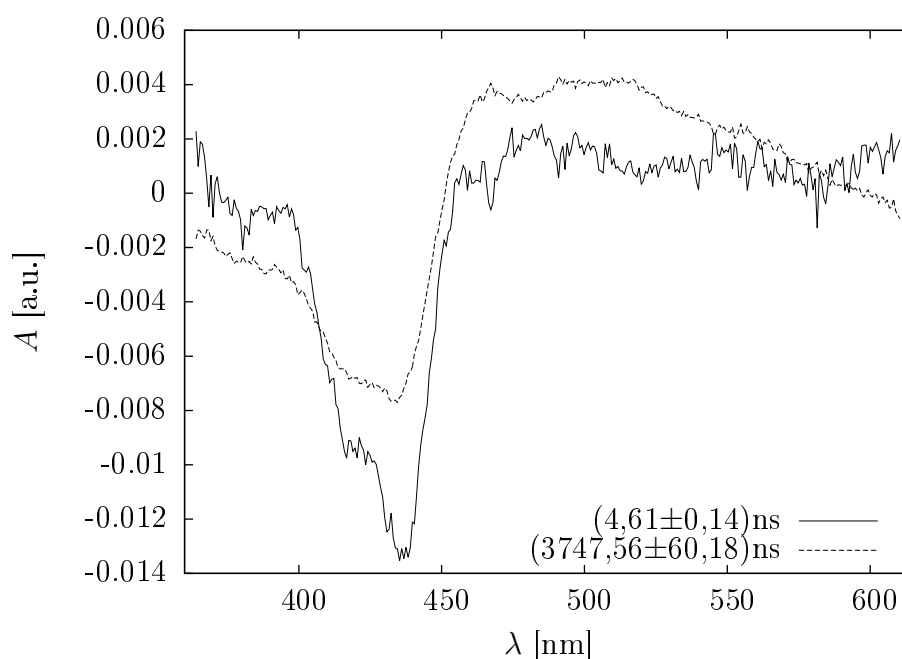
tripletních stavů. Navíc charakter DAS spektra komponenty s kratší dobou života odpovídá transientnímu spektru singletních stavů chlorofylu *a* uvedenému v [18].

Porovnáme-li dále doby života excitovaných stavů chlorofylu *a* za aerobních a anaerobních podmínek, můžeme pozorovat zhruba desetinásobné prodloužení doby života tripletních stavů a navíc zde vidíme, že kratší doba dohasínání (pro singletní stavy) se po odstranění kyslíku příliš nezmění. Přítomnost kyslíku tedy ovlivňuje zejména tripletní excitované stavy chlorofylu *a*, z čehož usuzujeme, že tyto stavy jsou zhaseny právě kyslíkem. Porovnáme-li námi změřenou dobu života excitovaného tripletního chlorofylu *a* za anaerobních podmínek s vlastní dobou života těchto tripletních stavů udanou v [17] - $(413 \pm 5) \mu s$, vidíme, že se nám metodou bublání dusíkem podařilo odstranit kyslík jen částečně.

Nejdůležitějším pozorováním je skutečnost, že doby života u chlorofylu *a* za přítomnosti kyslíku řádově odpovídají dobám života u pigmentů. Z toho můžeme soudit, že v roztoku s pigmenty, kde je přítomen jak kyslík, tak i karotenoidy, dochází k zhasení tripletních chlorofylů pouze kyslíkem a zhasení karotenoidy není účinné.

3.1.4 Izolované pigmenty v DM

Pigmenty soustředěné v micelách jsou si navzájem blíže, než když jsou volně v rozpouštědle. Toto prostředí je více podobné uspořádání v thylakoidních membránách (vyšší lokální koncentrace pigmentů a méně organických rozpouštědel). Pro ověření toho, že za přítomnosti detergentu DM budou v micelách přítomny chlorofyly i karotenoidy, jsme připravili kontrolní vzorek, ve kterém byly pigmenty jen ve vodě. Z porovnání stacionárních absorpčních spekter těchto dvou vzorků (viz následující odstavec 3.2) vyplynulo, že ve vodě se většina pigmentů vysráží, zatímco ve vodném prostředí za přítomnosti DM zůstávají rozpuštěné, tedy se musí koncentrovat v micelách.



Obrázek 3.6: DAS spektra pigmentů v DM.

Provedli jsme měření transientní absorpce vzorku s pigmenty v micelách, abychom zjistili, zda v takovémto vzorku bude docházet k přenosu tripletní energie z chlorofylů na karotenoidy. Excitační vlnová délka byla 671 nm a naměřená data jsme pak fitovali v oblasti 364-610 nm. Výsledná DAS spektra pro fit se dvěma komponentami s dobami života $(4,61 \pm 0,14)$ ns a $(3747,56 \pm 60,18)$ ns je v grafu 3.6. Můžeme si všimnout, že tato DAS spektra se podobají spektrům pigmentů nebo chlorofylu *a*. Od spekter thylakoidních membrán se výrazně odlišují, nevidíme zde komponentu příslušející tripletním stavům karotenoidů a nepozorujeme žádný přenos energie. Uspořádání pigmentů v micelách tedy není dostačující, k zhášení tripletních chlorofylů karotenoidy nedochází. Dále si můžeme povšimnout, že kratší doba života je v tomto případě v jednotkách nanosekund, stejně jako tomu bylo u volných pigmentů a u chlorofylu *a*. Různé vzájemné uspořádání pigmentů tedy dohasínání singletních excitovaných stavů chlorofylu příliš neovlivňuje. Delší doba života, která přísluší dohasínání tripletní excitace, je zde v řádech mikrosekund, což je srovnatelné s chlorofylem *a* za anaerobních podmínek. Z toho usuzujeme, že do micel se mnoho kyslíku nedostalo, jeho koncentrace zde byla podobná jako ve vzorku s chlorofylem *a* po bublání dusíkem.

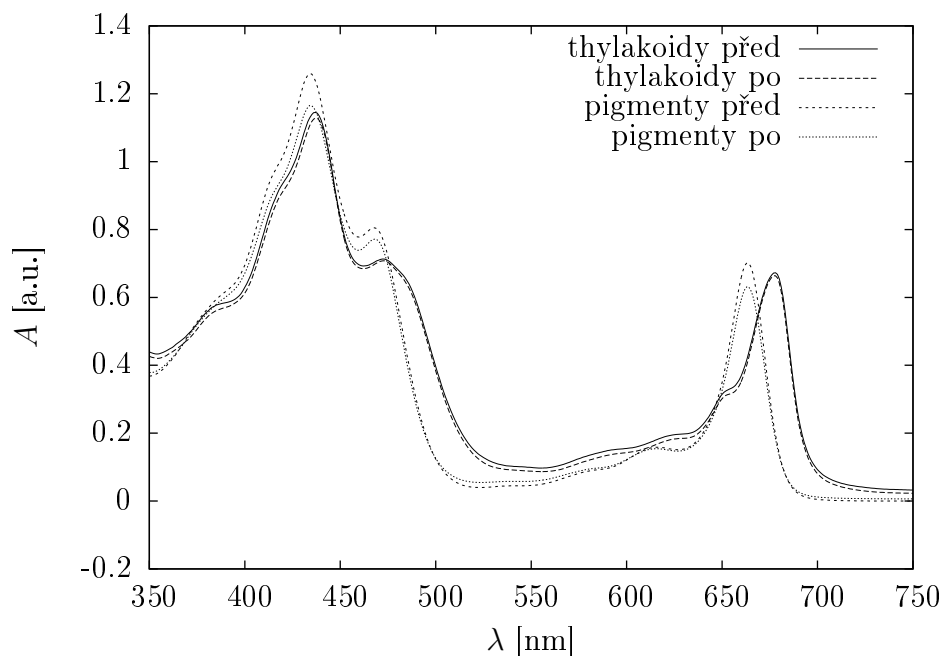
3.2 Stacionární spektra

U všech vzorků, které byly použity pro časově rozlišené měření absorpce, jsme měřili stacionární absorpční spektra před tímto měřením a po něm, což nám umožnilo pozorovat, jak na vzorek působí opakovaná excitace laserem. Pro získání doplňujících informací jsme navíc sledovali degradaci vzorků s časem.

Všechna stacionární spektra jsme měřili na spektrometru Specord 250 (Analytik Jena), viz kapitola 2.2. Vzorky jsme měli umístěny v kyvetách, které propouštějí záření přibližně od vlnové délky 350 nm.

3.2.1 Porovnání spekter thylakoidů a izolovaných pigmentů v organických rozpouštědlech

V grafu 3.7 jsou vynesena stacionární absorpční spektra thylakoidů a pigmentů v roztoku s organickými rozpouštědly, a to jak před měřením časově rozlišené absorpce, tak i po něm. Vidíme zde, že u thylakoidů jsou obě spektra prakticky totožná, zatímco u spekter pigmentů je obzvláště v oblasti absorpce chlorofylu pozorovatelný pokles intenzity po provedení transientních měření. Z toho soudíme, že opakovaným ozařováním laserem během měření časově rozlišené transientní absorpce došlo zejména k částečné degradaci chlorofylů. Thylakoidy tomuto vlivu nepodlehly zřejmě v důsledku efektivní ochrany chlorofylů karotenoidy. Zároveň si v tomto grafu můžeme všimnout, že spektrum thylakoidů je podle očekávání (viz odstavec 1.2.1) širší a posunuté do červené oblasti vzhledem ke spektru pigmentů.

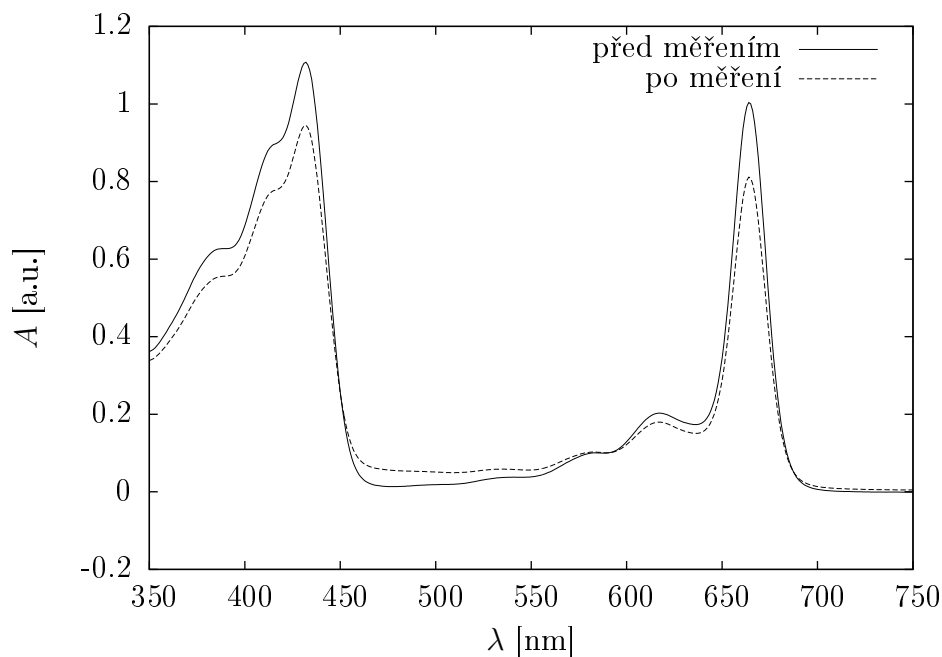


Obrázek 3.7: Absorpční spektra thylakoidů a pigmentů v roztoku před a po měření časově rozlišené transientní absorpce.

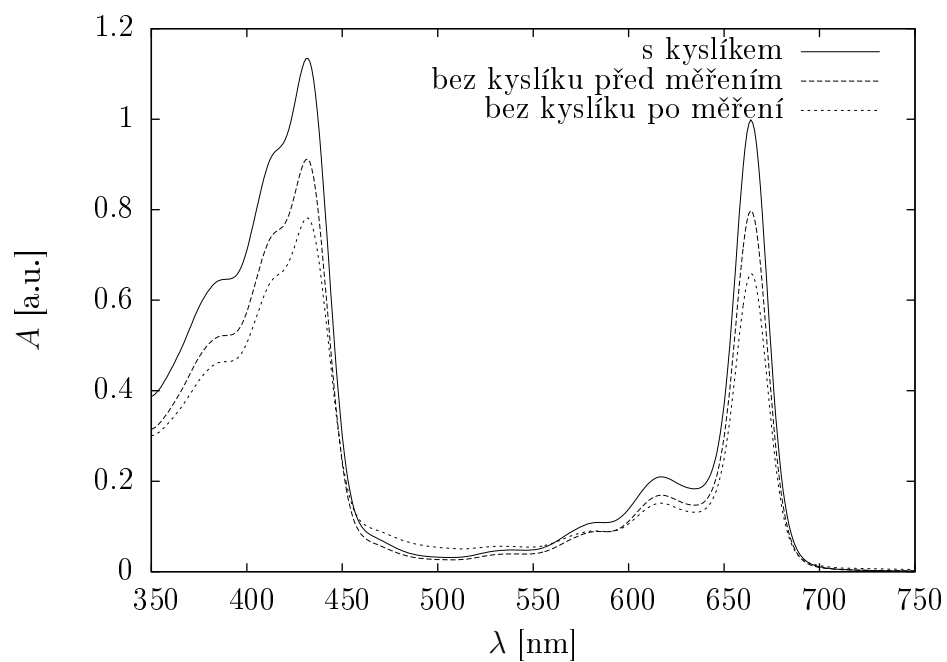
3.2.2 Chlorofyl *a*

Stacionární absorpční spektrum jsme dále měřili u vzorku s chlorofylem *a*, opět před měřením transientní absorpce i po něm. Výsledná spektra jsou vynesena v grafu 3.8. Můžeme pozorovat viditelný pokles absorbance v oblasti obou maxim, který stejně jako v předchozím případě u vzorku s pigmenty signalizuje, že ve vzorku je po ozařování laserem méně absorbujících molekul chlorofylu *a* - ozařováním došlo k jejich částečnému rozkladu.

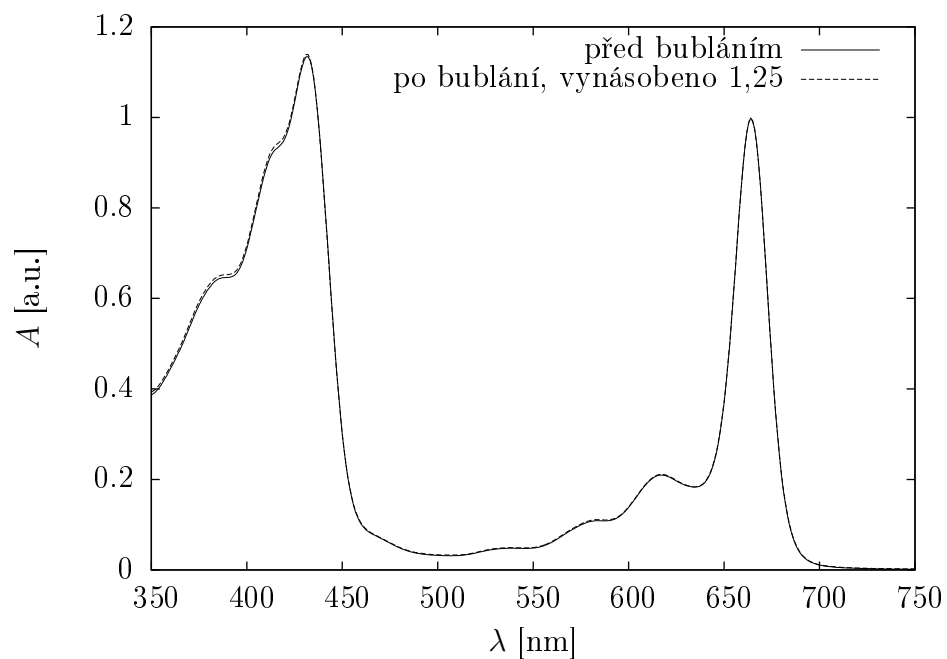
Dále jsme pro měření použili vzorek s chlorofylem *a* v anaerobních podmínkách, kterých jsme docílili bubláním dusíkem. Absorpční spektra jsme změřili před bubláním, po něm a poté ještě po měření transientní absorpce, viz graf 3.9. Zde si můžeme všimnout, že charakter spektra před odstraňováním kyslíku a po něm zůstal stejný. Ještě lépe je to patrné v grafu 3.10, kde je spektrum po bublání vynásobeno konstantou a zcela se kryje se spektrem změřeným před bubláním. Úbytek absorbance pozorovatelný v grafu 3.9 je dán tím, že jsme po bublání o část chlorofylu *a* přišli (viz odstavec 3.1.3), a tedy jsme měli roztok zředěnější.



Obrázek 3.8: Absorpční spektra chlorofylu *a* před a po měření časově rozlišené transientní absorpce.



Obrázek 3.9: Absorpční spektra chlorofylu *a* před a po bubláním dusíkem a po měření časově rozlišené transientní absorpce.



Obrázek 3.10: Srovnání absorpčních spekter chlorofylu *a* před bubláním dusíkem a po něm.

3.2.3 Degradace s časem

Pro získání doplňujících informací o stabilitě různých vzorků jsme také sledovali jejich degradaci v čase. Připravené vzorky s thylakoidy a pigmenty z předchozího měření (předchozí odstavec) jsme nechali na přímém slunečním světle a po několik dní jsme měřili jejich stacionární absorpční spektra, abychom mohli pozorovat, jak se budou oba vzorky vyvíjet a zda bude patrné, že uspořádání pigmentů v thylakoidních membránách je stabilnější než když jsou z membrán izolovány.

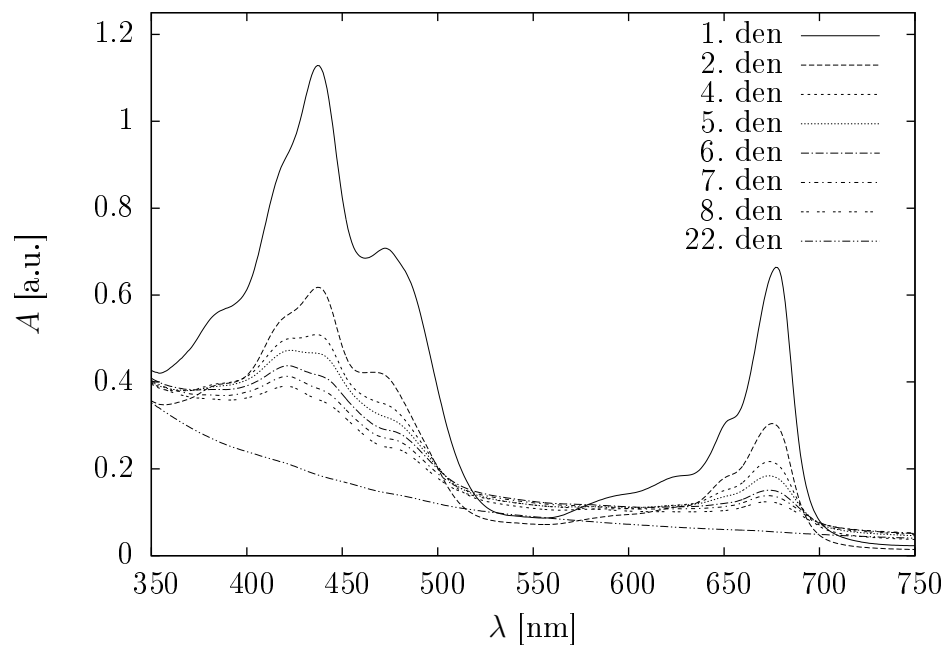
Výsledky pro thylakoidy jsou v grafu 3.11 a pro rozpuštěné pigmenty v grafu 3.12. Vidíme, že za těchto světelných podmínek degradovaly oba vzorky velmi rychle. Přesto lze pozorovat, že rozklad thylakoidních membrán byl pozvolnější a tvar spektra ve druhém dni byl více podobný spektru z prvního dne než v případě pigmentů. Také si můžeme povšimnout, že do spekter thylakoidů se ve značné míře promítnul rozptyl světla na nich. Je to patrné z klesající tendence spektra směrem od kratších k delším vlnovým délkám, což je ve shodě s Rayleighovým rozptylem, který je nepřímo úměrný λ^4 [15]. U pigmentů, které jsou oproti thylakoidním membránám malé, se rozptyl tolik neuplatňuje.

Jelikož oba vzorky na přímém světle degradovaly rychle, provedli jsme ještě další pozorování s novými vzorky (navíc jsme měli k dispozici i vzorek s chlorofylem *a* a vzorek s pigmenty v micelách), které jsme umístili z dosahu přímého slunečního světla. Intenzitu světla jsme však ani v jednom z těchto případů nemonitorovali a tato pozorování tak mají spíše informativní charakter.

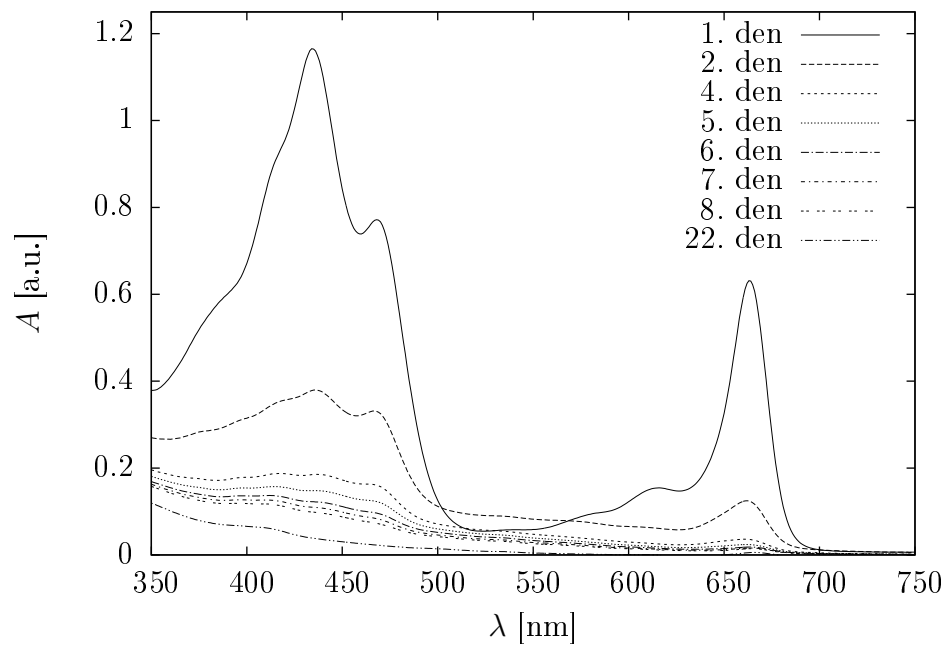
V grafu 3.13 jsou vynesena spektra thylakoidů v různých dnech od přípravy. Můžeme si všimnout, že v prvních třech dnech došlo k malé změně v intenzitách absorpce, zatímco kvalitativně se spektrum příliš neměnilo. V dalších dnech již došlo k výrazným změnám i v kvalitě spektra. Směrem ke kratším vlnovým délkám absorbance stoupala, zatímco u delších vlnových délek zůstávala menší než u předchozích dnů, což opět signalizuje, že ve vzorku dochází k rozptylu světla. Popsaná závislost byla s časem výraznější, z čehož usuzujeme, že thylakoidy ve vzorku nebyly po celou dobu rozptýleny volně, ale shlukovaly se dohromady a tvořily agregáty. K potlačení rozptylu jsme nejprve provedli měření s kyvetou umístěnou blíže detektoru a poté jsme využili integrační kouli (viz odstavec 2.2.1). Původní spektrum a spektrum s popsány korekcemi jsou srovnány v grafu 3.14. Ukázalo se, že použití integrační koule je lepší metoda pro korekci rozptylu, což je ve shodě s očekáváním. Proto jsme ve výše zmíněném grafu 3.13 (v 7. a 12. dni) vynesli právě spektrum získané z měření s integrační koulí. To, že jsme tak silný rozptyl nepozorovali u prvního vzorku s thylakoidy (vystaveného přímému slunečnímu světle), je nejspíše způsobeno tím, že v jeho případě došlo k usazení thylakoidů, případně celých agregátů. U nového vzorku jsme kyvetu před měřením vždy protřepali, abychom usazené thylakoidy rozptýlili do celého objemu.

Absorpční spektra pigmentů jsou v grafu 3.15. Vidíme, že na rozdíl od vzorku vystavenému přímému slunečnímu světle tyto degradovaly pomaleji. Nezanedbatelný podíl na jejich větší stabilitě má kromě jiných světelných podmínek také to, že tyto pigmenty nebyly vystaveny ozařování laserem, protože na nich nebyla měřena transientní absorpce, jak tomu bylo u prvního vzorku.

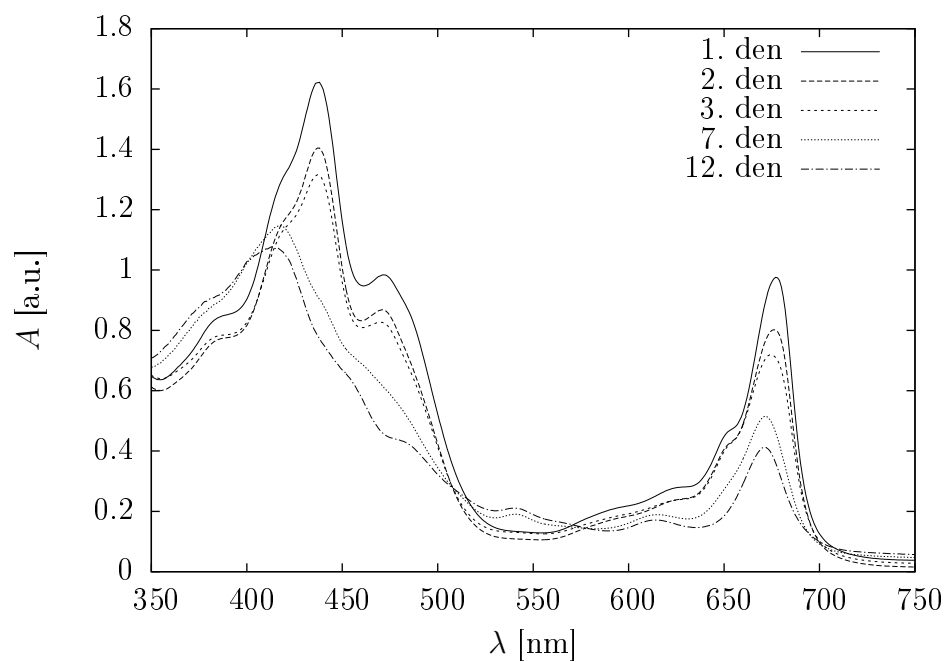
Změnu absorbance pigmentů spojujeme převážně s jejich rozkladem v důsledku nefunkčního mechanismu zhášení tripletních stavů chlorofylů, což vede ke generaci singletního kyslíku, narozdíl od thylakoidních membrán, kde je degradace pomalejší.



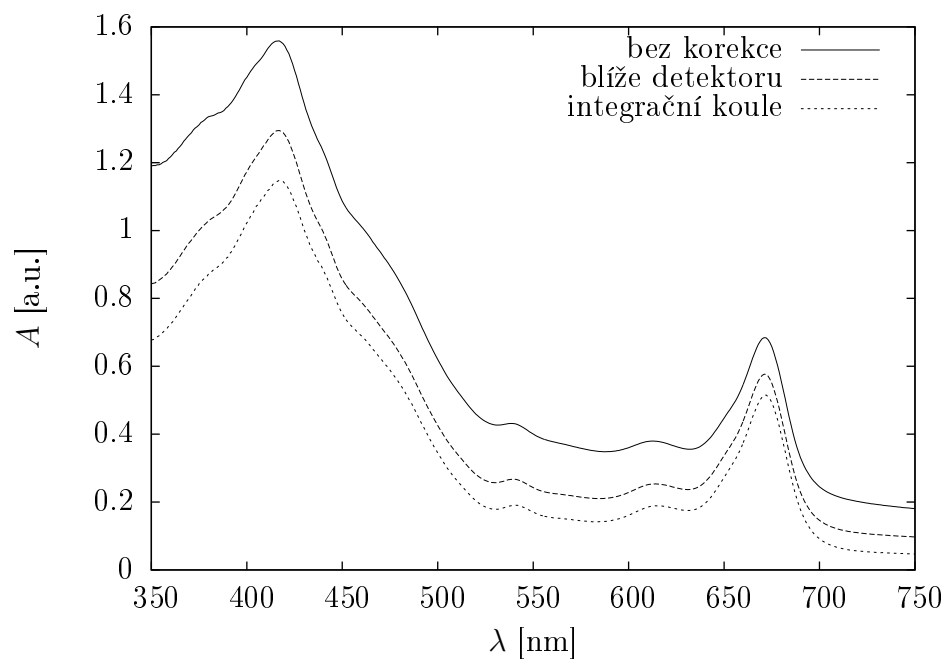
Obrázek 3.11: Absorpční spektra thylakoidů v různých dnech od přípravy umístěných na přímém světle.



Obrázek 3.12: Absorpční spektra pigmentů v různých dnech od přípravy umístěných na přímém světle.



Obrázek 3.13: Absorpční spektra thylakoidů v různých dnech od přípravy umístěných mimo přímé světlo.

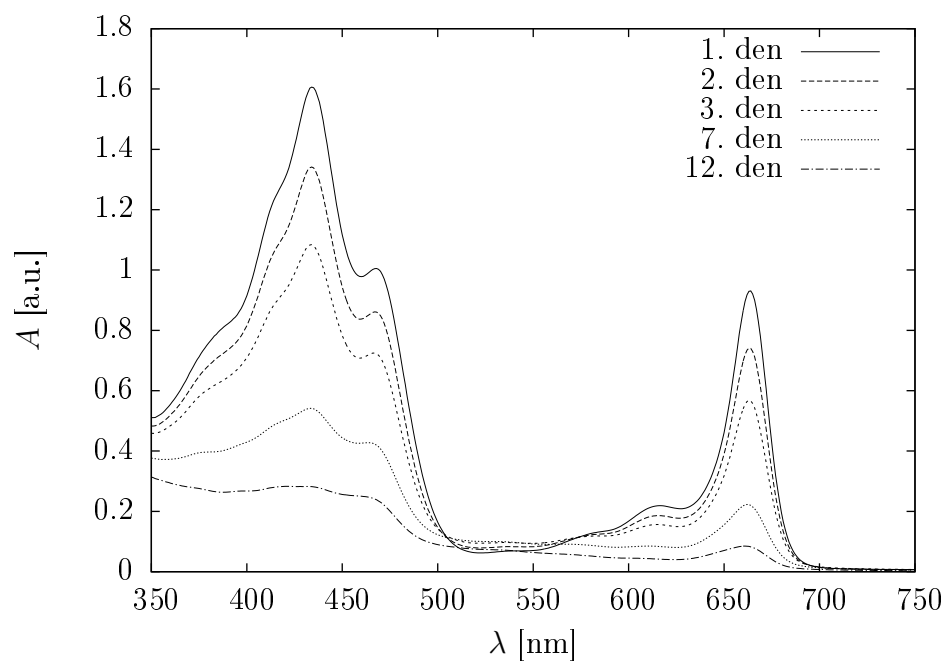


Obrázek 3.14: Absorpční spektra thylakoidů bez korekce na rozptyl, se vzorkem umístěným blíže detektoru a s využitím integrační koule.

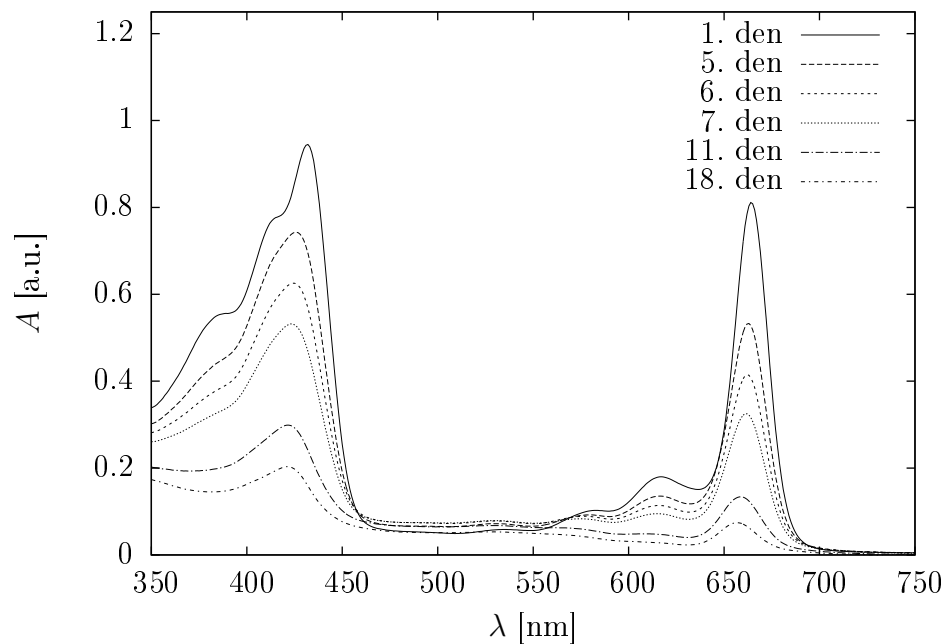
Jako další vzorek pro sledování vývoje v čase sloužil vzorek s chlorofylem *a*. Výsledná spektra jsou zobrazena v grafu 3.16. Charakter poklesu absorpance s časem je zde obdobný jako u roztoku s pigmenty, což opět nasvědčuje tomu, že stejně jako u chlorofylu *a* ani u pigmentů nedochází k přenosu tripletní energie z chlorofylů na karotenoidy, a tím k předcházení vzniku singletního kyslíku, který pigmenty ničí, jak bylo prokázáno v hlavní části této práce (kapitola 3.1).

Nakonec uvádíme absorpční spektrum pigmentů v micelách (graf 3.17) a ve vodě (graf 3.18). V prvním z grafů si můžeme všimnout, že zatímco v den přípravy bylo spektrum podobné thylakoidům či pigmentům, ve dni šestém je podobné spíše spektru karotenoidů - charakteristická tři maxima v oblasti zhruba 400-500 nm. Z toho usuzujeme, že ani uspořádání v micelách nebylo dostatečně stabilní a došlo k rozkladu chlorofylů. Karotenoidům, které jsou stabilnější, se v pufru dařilo lépe než v organických rozpouštědlech, a proto můžeme v tomto případě pozorovat jejich silnou absorpci, narozdíl od vzorků s pigmenty, kde jejich charakteristické spektrum nebylo tak dobře patrné.

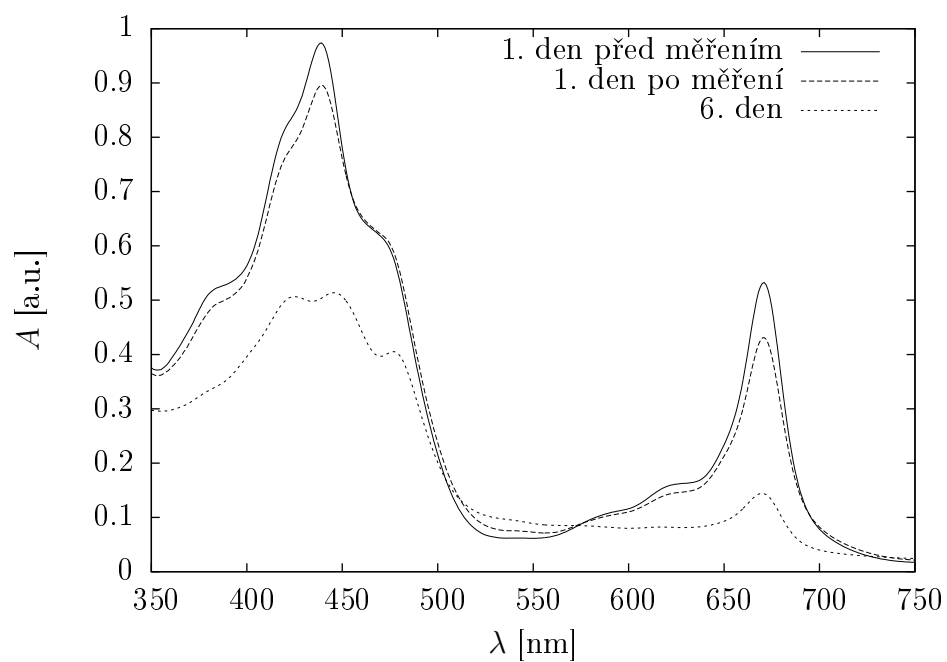
Srovnáním grafů 3.17 a 3.18 vidíme, že absorpční spektra pigmentů ve vodném prostředí s DM a pouze v čisté vodě jsou odlišná. Zatímco chlorofyly se mohly v obou případech z velké části rozložit, signál od karotenoidů v DM je ve spektru i po několika dnech patrný. U pigmentů ve vodě absorpci karotenoidů nepozorujeme, z čehož vyplývá, že ve vzorku nejsou tyto pigmenty rozpuštěny, ale došlo k jejich vysrážení. Ve vodném roztoku se tedy budou jak chlorofyly, tak i karotenoidy koncentrovat do micel.



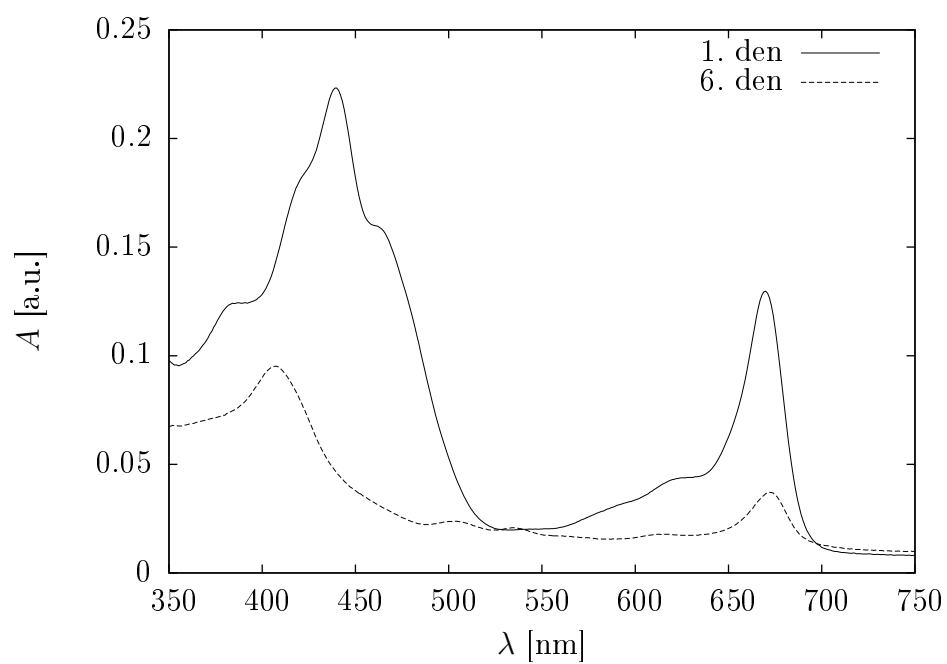
Obrázek 3.15: Absorpční spektra pigmentů v různých dnech od přípravy umístěných mimo přímé světlo.



Obrázek 3.16: Absorpční spektra chlorofylu *a* v různých dnech od přípravy umístěných mimo přímé světlo.



Obrázek 3.17: Absorpční spektra pigmentů v DM umístěných mimo přímé světlo v prvním a šestém dni.



Obrázek 3.18: Absorpční spektra pigmentů ve vodě umístěných mimo přímé světlo v prvním a šestém dni.

Závěr

V této práci bylo naším cílem především porovnat efektivitu ochranné role karotenoidů v různých případech. K tomuto účelu jsme připravili vzorek s thylakoidy, izolovanými pigmenty, izolovaným chlorofylem *a* a pigmenty v micelách. Používali jsme metodu měření časově rozlišené transienční absorpce s nanosekundovým rozlišením, ze které jsme získali doby dohasínání jednotlivých stavů a příslušná DAS spektra.

Zjistili jsme, že pokud byly pigmenty uspořádány v thylakoidních membránách, tak karotenoidy zhášely tripletní excitaci chlorofylů velice účinně. Charakteristická doba přenosu energie byla 6-7 ns. Dále se porovnáním doby života karotenoidů v thylakoidních membránách za aerobního a anaerobního prostředí ukázalo, že karotenoidy se tripletní excitace zbavují kromě jiných kanálů také interakcí s kyslíkem.

U izolovaných pigmentů se žádné zhášení tripletních stavů chlorofylů karotenoidy neuskutečňovalo, docházelo zde pouze ke zhášení kyslíkem, což jsme ověřili na vzorku chlorofylu *a* změřením doby dohasínání jeho tripletního excitovaného stavu v přítomnosti kyslíku a po jeho částečném odstranění metodou bublání dusíkem.

Přenos tripletní excitace na karotenoidy se neprojevil ani u vzorku, kde byly pigmenty shromážděny v micelách.

V průběhu všech těchto měření jsme využívali i stacionární měření absorpce. To sloužilo především k tomu, abychom vhodně zvolili excitační vlnovou délku pro transienční měření a abychom zaznamenali degradaci vzorku při tomto měření. Nakonec jsme sledovali i změnu absorpčních spekter vzorků v čase. Pozorovali jsme, že zatímco izolované pigmenty (volné i v micelách) se s časem rychle rozkládaly, pigmenty v thylakoidních membránách byly relativně stabilnější a thylakoidy agregovaly.

Z provedených experimentů vyplývá, že k efektivnímu zhášení tripletní excitace chlorofylů pomocí karotenoidů dochází pouze pokud jsou tyto molekuly vzájemně velmi blízko, tak jako tomu je v thylakoidních membránách. U chlorofylů a karotenoidů volně v roztoku a v micelách může k triplet-tripletnímu přenosu energie docházet srážkovým mechanismem, který byl ale při použitých koncentracích pigmentů neúčinný. Celková koncentrace pigmentů byla ve všech vzorcích srovnatelná, ale lokální koncentrace pigmentů v proteinových komplexech v thylakoidních membránách byla mnohem vyšší.

Seznam použité literatury

- [1] BLANKENSHIP, R.E. *Molecular Mechanisms of Photosynthesis*. 1. vydání. Oxford: Blackwell Science Ltd, 2002. ISBN 0-632-04321-0.
- [2] PŠENČÍK, J. Proč je důležité studovat fotosyntézu?. [online]. [cit. 2014-02-27]. Dostupné z: <http://kchf-45.karlov.mff.cuni.cz/jakub/uvod.htm>
- [3] ŠETLÍK, I., HÁLA, J. *Biofyzika fotosyntézy*. Přípraveno k tisku.
- [4] MIKULČÁK, Jiří. *Matematické, fyzikální a chemické tabulky pro střední školy*. 4. vydání. Praha: Prometheus, 2007. ISBN 978-807-1963-455.
- [5] SCHLODDER, Eberhard. Introduction to optical methods in photosynthesis. *Photosynth Res* 2009, s. 93-104.
- [6] DEMMIG-ADAMS, Barbara, GILMORE, Adam M., ADAMS, William W. III. In vivo functions of carotenoids in higher plants. *The FASEB Journal* 1996, roč. 10, s. 403-412.
- [7] GROSSWEINER, Leonard I. Singlet oxygen: Generation and properties. [online]. [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: <http://www.photobiology.com/educational/len2/singox.html>.
- [8] IUPAC. Compendium of Chemical Terminology - the Gold Book. [online]. [cit. 2014-03-13]. Dostupné z: <http://goldbook.iupac.org/index.html>
- [9] CODGELL, Richard J. Molecular Mechanisms of Photosynthesis. *Pure & Appl. Chem.* 1985, roč. 57, č. 5, s. 723-728.
- [10] FRANK, Harry A., Veeradej CHYNWAT, Ruel Z. B. DESAMERO, Roya FARHOOSH, Joy ERICKSON a James BAUTISTA. On the photophysics and photochemical properties of carotenoids and their role as light-harvesting pigments in photosynthesis. *Pure & Appl. Chem.* 1997, roč. 69, č. 10, s. 2117-2124.
- [11] NOOMNARM, Ulai, CLEGG, Robert M. Fluorescence lifetimes: fundamentals and interpretations. *Photosynth Res* 2009, s. 181-194.
- [12] Návod k úloze Optická spektroskopie s nanosekundovým rozlišením, Praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky. Univerzita Karlova v Praze. Matematicko-fyzikální fakulta.
- [13] LAMBERT, Olivier, LEBY, Daniel, RANCK, Jean-Luc, LEBLANC, Gerard. A New "Gel-like" Phase in Dodecyl Maltoside-Lipid Mixtures: Implication of Solubilization and Reconstitution Studies. *Biophysical Journal* 1998, s. 918-930.
- [14] MCCLUNEY, Ross *Introduction to Radiometry and Photometry*. Boston: Artech House, 1994. ISBN 0-89006-678-7.
- [15] MALÝ, Petr *Optika*. 1. vydání. Praha: Karolinum, 2008. ISBN 978-80-246-1342-0.

- [16] PRINCETON INSTRUMENTS. Introduction to Image Intensifiers for Scientific Imaging. [online]. [cit. 2014-04-03]. Dostupné z: <http://www.princetoninstruments.com/cms/index.php/library/38-application-a-tech-notes-sorted-by-product/spectroscopy-cameras/pi-max-iccd/93-introduction-to-image-intensifiers-for-scientific-imaging>
- [17] NIEDZWIEDZKI, Dariusz M., BLANKENSHIP, Robert E. Singlet and triplet excited state properties of natural chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Photosynth Res* 2010, s. 227-238.
- [18] SHI, Ying, SHIU, Y. J., SU, Charlene, LIN, S. H., HAN, Ke-li Transient Absorption of the Chlorophyll a in Ethanol. *Chinese Journal of Chemical Physics* 2006, roč. 19, č. 1.

Seznam použitých zkratek

NADPH+H ⁺	redukovaný nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ATP	adenosintrifosfát
NADP ⁺	nikotinamidadenindinukleotidfosfát
ADP	adenosindifosfát
P _i	fosfátový iont
BSA	hovězí sérový albumin (bovine serum albumin)
DM	dodecyl maltoside
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie (high-performance liquid chromatography)
DAS	decay associated spectra