

**MATEMATICKO-FYZIKÁLNÍ
FAKULTA**
Univerzita Karlova

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Kateřina Charvátová

Optimalizace signálu tripletních stavů pigmentů ve fotosystému I

Katedra chemické fyziky a optiky

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

Studijní program: Fyzika

Studijní obor: FP

Praha 2022

Prohlašuji, že jsem tuto bakalářskou práci vypracoval(a) samostatně a výhradně s použitím citovaných pramenů, literatury a dalších odborných zdrojů. Tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

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 má právo na uzavření licenční smlouvy o užití této práce jako školního díla podle §60 odst. 1 autorského zákona.

V dne

Podpis autora

Děkuji mému vedoucímu doc. RNDr. Jakubu Pšenčíkovi, Ph.D. za vedení bakalářské práce, vlídný přístup a ochotné vysvětlování. Velké díky také patří Mgr. Petro Khoroshyymu Ph.D. a Mgr. Janu Alsterovi Ph.D. za poskytnutí programů na měření a zpracování spekter, dále pak Dr. rer. nat. Heiko Loksteinovi, Ph.D. za vstřícnost a přípravu vzorku.

Na závěr bych chtěla poděkovat mé rodině za velkou podporu a Bc. Štěpánu Stenclákovi za trpělivost, morální oporu a pomoc při zprovozňování L^AT_EXu.

Název práce: Optimalizace signálu tripletních stavů pigmentů ve fotosystému I

Autor: Kateřina Charvátová

Katedra: Katedra chemické fyziky a optiky

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

Abstrakt: Cílem práce je zlepšení signálu tripletních stavů pigmentů ve fotosystému I a minimalizace šumu ve výsledných datech. Pro měření byl použit vzorek extrahovaný ze sinice *Thermosynechococcus elongatus*. Z měření vyplývá, že ideální je volit ne příliš koncentrovaný vzorek (s absorbancí kolem 0,7), ze kterého například metodou bublání dusíkem odstraníme kyslík. Anaerobní podmínky zvýší dobu života tripletního stavu karotenoidů a také vzorek částečně chrání před poškozením. V závislosti na délce experimentu zvolíme maximální energii excitačního pulzu, která ještě nepůsobí významné poškození fotosystému. Pro dvouhodinové měření se nám osvědčila intenzita 1,5 až 2 mJ. Pro zachování dobrého časového rozlišení je vhodné přibližně prvních 100 ns, kdy probíhají děje ve fotosystému velmi rychle, sbírat signál pouze po krátkou dobu 2 ns. Následně je tuto dobu (gate) možné zvýšit na 10 ns a naopak snížit zesílení měřicího světla (gain) tak, aby se nezměnila velikost výsledného signálu. Tím také výrazně přispějeme ke snížení celkového šumu.

Klíčová slova: fotosystém I, optimalizace signálu, tripletní stavy, šum, gate

Title: Optimization of the signal from pigment triplet states in photosystem I

Author: Kateřina Charvátová

department: KCHFO

Supervisor: doc. RNDr. Jakub Pšenčík, Ph.D., KCHFO

Abstract: The main objective of the thesis is to improve signal-to-noise ratio for pigments' triplet states in photosystem I. The sample was purified from cyanobacterium *Thermosynechococcus elongatus*. Based on the measurements we could deduce that the sample with optimal concentration has an absorbance about 0,7. It is beneficial to remove oxygen for example by nitrogen bubbling. Anaerobic conditions help to increase the lifetime of carotenoid triplet states and to protect the sample from damage. Depending on the time of measurement we choose the maximal energy of the excitation pulse, which does not cause any significant damage to the photosystem. For the measurement, which takes about two hours, we find it is optimal to use the excitation energy from 1,5 mJ to 2 mJ. The relaxation processes in the photosystem are fast during the first 100 ns. It is, therefore, necessary to use the shortest detection time, which is in our case a gate of 2 ns. At the later delays, it is possible to increase the gate to about 10 ns and at the same time to decrease the amplification of the measurement light (gain) so the final intensity of the signal would not change. This will contribute to a significant reduction of noise for the later delays.

Keywords: photosystem I, optimalization of the signal, triplet states, noise, gate

Obsah

Úvod	3
1 Teoretický úvod	5
1.1 Chloroplasty	5
1.2 Fotosyntéza u sinic	5
1.3 Fotosyntetizující aparát v thylakoidech	6
1.3.1 Pigmenty	7
1.3.2 Antény	9
1.3.3 Fotosystém II	10
1.3.4 Cytochrom b_6f	10
1.3.5 Fotosystém I	10
1.3.6 ATP syntáza	11
1.4 Energetické hladiny	11
1.5 Časový vývoj	13
2 Použité měřicí přístroje, metody a materiály	15
2.1 Použité materiály	15
2.1.1 Vzorek fotosystému I	15
2.2 Použité přístroje a postup měření	15
2.2.1 Příprava vzorku	15
2.2.2 Foukání dusíkem	16
2.2.3 Měření absorbance v závislosti na čase od excitačního pulzu	16
2.3 Fitovací program a zpracování dat	19
2.3.1 Tranzientní spektrum	19
2.3.2 Určení dob života jednotlivých stavů	20
3 Výsledky měření	23
3.1 Různé energie excitačního pulzu	23
3.2 Různé koncentrace vzorku	29
3.3 Prodloužení gate	34
3.4 Aerobní a anaerobní podmínky	36
3.5 Měření s ideálním nastavením	42
Závěr	45
Seznam použité literatury	47
Seznam použitých zkratk	49
A Příloha	51
A.0.1 Dodatečné grafy pro různé excitační energie	51
A.0.2 Dodatečné grafy pro různé koncentrace	52

Úvod

Fotosyntéza je považována za jeden z nejdůležitějších procesů na Zemi. V průběhu evoluce si tuto schopnost osvojila řada rozličných organismů a proto můžeme i fotosyntézu pozorovat v mnoha obměnách.

Všechny tyto děje spojuje hlavní společný princip — přeměna energie fotonů na energii chemických vazeb. Nejznámějším z nich zůstává bezpochyby přeměna vzdušného oxidu uhličitého a vody na kyslík a organické uhlovodíky.

Díky prvním fotosyntetizujícím sinicím se v minulosti výrazně snížila koncentrace oxidů v ovzduší, která byla nahrazena kyslíkem a byl tak umožněn vznik života na Zemi tak, jak jej známe dnes.[1]

Studium a následné poznání principu těchto procesů otevírá nové možnosti v energetice i ekologii, ať už v podobě nových typů solárních článků nebo možnosti redukce skleníkových plynů. Z tohoto důvodu je studium procesů ve fotosyntéze nejen zajímavé, ale také velmi důležité a přínosné.

Tato práce popisuje postup při optimalizaci signálu tripletních stavů ve fotosystému I, který využívá energii dopadajícího záření k uvolnění elektronu a jeho následného přenosu na další funkční jednotky. I přes veškeré ochranné mechanismy ve fotosyntéze může být vzorek při větším ozáření poškozen. Proto musíme používat energie excitačního pulzu jen přiměřeně velké době ozáření. Navíc při studiu časového vývoje musí být měřicí světlo zanedbatelně nízké intenzity oproti excitačnímu pulzu, aby kvůli němu nedocházelo k výrazným změnám v obsazení hladin. V částech spektra, kde vzorek absorbuje, tedy dopadá do detektoru jen velmi málo světla. Z tohoto důvodu je měření velmi náchylné k šumu, což komplikuje analýzu dat a určení dob života jednotlivých excitovaných stavů. Důležité je tedy nejen dosáhnout co největšího možného signálu, který je však limitován dříve zmíněnými podmínkami, ale především snížení šumu volbou vhodných parametrů experimentu.

Cílem práce je poskytnout ucelený přehled možných nastavení experimentu a jejich vliv na kvalitu signálu či degradaci vzorku.

- V první kapitole je shrnut princip světelné fáze fotosyntézy, taktéž je tu uvedena základní struktura fotosystému I a fykobilisomů sinice *Thermosynechococcus elongatus*.
- V druhé kapitole je popsána měřicí aparatura, průběh experimentu a jednotlivé parametry, jejichž volbou můžeme měnit poměr signálu k šumu.
- Třetí kapitola se pak věnuje naměřeným datům a jejich interpretaci.

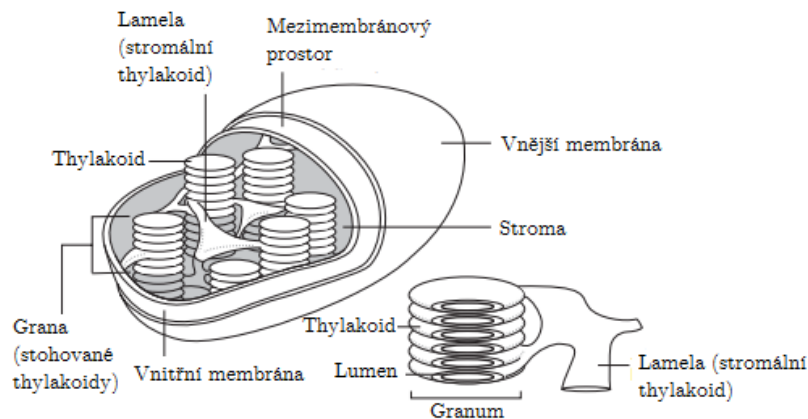
1. Teoretický úvod

1.1 Chloroplasty

Rostlinné buňky se od živočišných liší mimo jiné tím, že obsahují speciální orgány — chloroplasty — umožňující fotosyntézu.

Buňky tyto orgány, stejně jako mitochondrie, získaly původně endosymbiózou (pohlcením) fotosyntetizujících bakterií či sinic, díky čemuž mají chlorofyly dvojitou membránu. [2]

Vnitřek chloroplastu je vyplněn tekutinou (stroma). V ní se nacházejí thylakoidy, útvary jejichž membrána obsahuje fotosyntetizující jednotky. Vnitřní prostor ohraničený thylakoidní membránou nazýváme lumen. Thylakoidy lze v chloroplastech nalézt ve dvou uskupeních — granální (stohované) a stromální. [1] (Viz obrázek 1.1.)



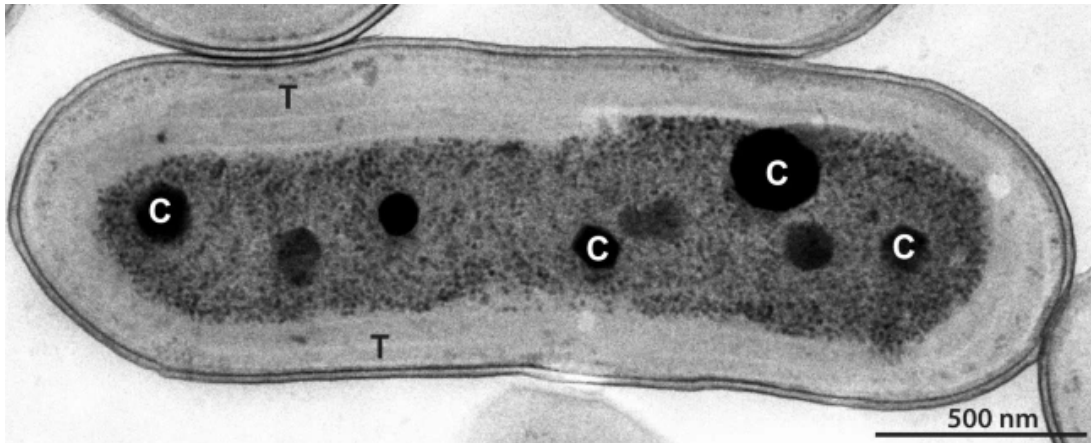
Obrázek 1.1: Struktura chloroplastu. [1]

1.2 Fotosyntéza u sinic

V této práci byl jako vzorek použit fotosystém I extrahovaný z thylakoidů sinice *Thermosynechococcus elongatus*. (Viz obrázek 1.2.) Jedná se o podlouhlý jednobuněčný organismus o velikosti kolem 2–3 μm . [3]

Budeme se tedy nyní zabývat fotosyntetickým aparátem sinic, který je velmi podobný tomu u vyšších rostlin, jelikož, jak zde bylo již dříve uvedeno, sinice jsou považovány za předchůdce dnešních chloroplastů v rostlinných buňkách. Stavba buňky sinic je tedy podobná stavbě samotného chloroplastu.

Thylakoidy zde nejsou stohované do gran, jejich membrána často vytváří podlouhlé útvary, které se nacházejí na okrajích buňky blízko buněčné membrány. [4] Většinou zde thylakoidy tvoří 2–3 vrstvy soustředných prstenců podél buněčné membrány. [3] (Viz obrázek 1.2.)



Obrázek 1.2: Elektronová mikrofotografie sinice rodu *Thermosynechococcus* s pátrnými karboxyzomy pro fixaci oxidu uhličitého (C) a thylakoidní membránou (T). [3]

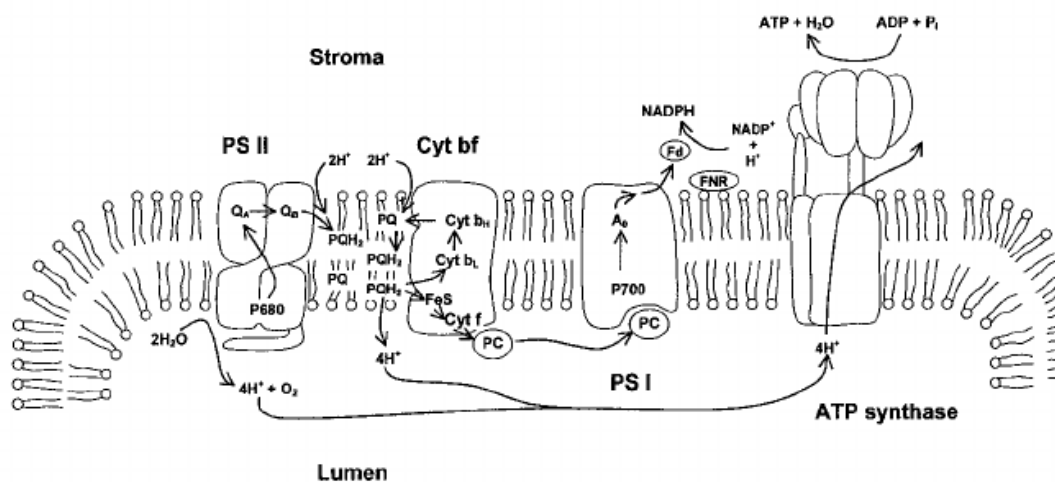
1.3 Fotosyntetizující aparát v thylakoidech

Mezi fotosyntetické komplexy, nacházející se v thylakoidní membráně, se řadí fotosystémy I a II. (Znázorněno na obr. 1.3.)

Tyto systémy využívají energii fotonů na uvolnění elektronu a vytvářejí protonový gradient, který je dále využit ATP syntázou na tvorbu ATP. Dochází zde mimo jiné též k rozštěpení vody a uvolnění vzdušného kyslíku.

Energie v podobě ATP však není příliš vhodná pro dlouhodobější uskladnění a z tohoto důvodu ji rostliny dále přetvářejí. V temnostní fázi ATP pohání tvorbu složitějších molekul (sacharidů) z oxidu uhličitého, které pak slouží jako stavební molekuly (celulóza) nebo jsou skladovány ve vakuolách jako zásobní látky (například škrob). [1]

Dále se budeme věnovat pouze světelné části fotosyntézy.



Obrázek 1.3: Schéma přenosu elektronu v thylakoidní membráně. [5]

1.3.1 Pigmenty

Základní složkou fotosystémů jsou fotosyntetické pigmenty, které zachycují fotony a jejich energii přenášejí mezi sebou až do reakčního centra. Tam se energie využívá k excitaci zvláštního páru chlorofylů a následnému uvolnění elektronu.

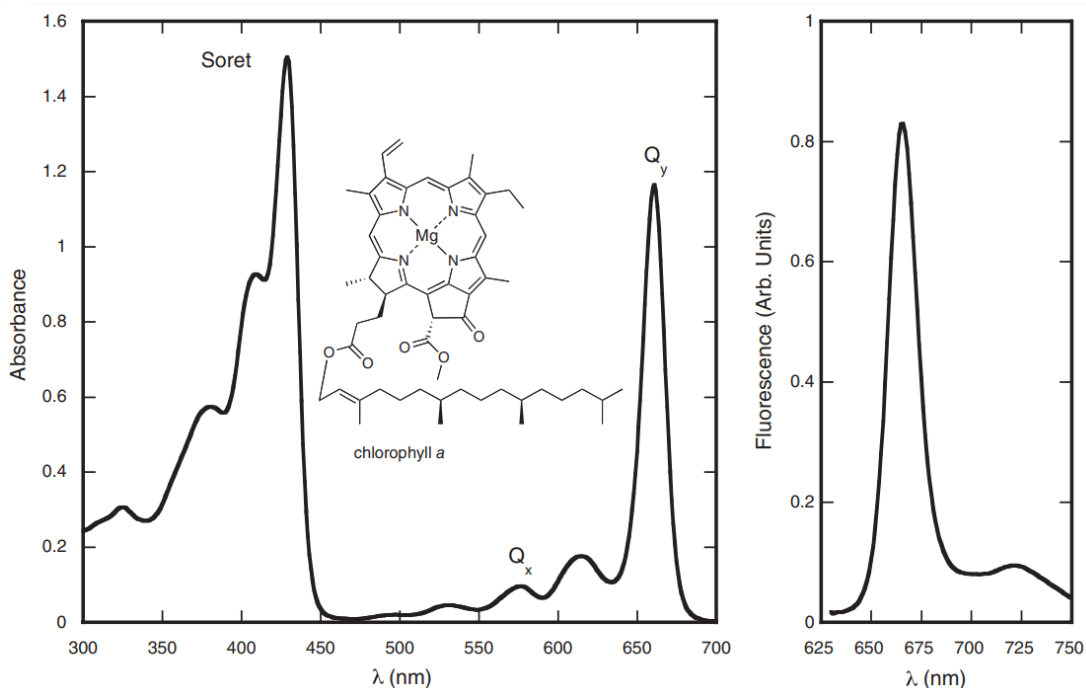
Barviva můžeme rozdělit na tetrapyroly s uzavřeným (chlorofyly a bakteri-ochlorofyly) či otevřeným tetrapyrolovým kruhem (fykobiliny) a polyisoprenoidy, kterým také říkáme karotenoidy. Dále rozlišujeme dva druhy karotenoidů, a to uhlovodíkové (karoteny) a jejich kyslíkaté deriváty (xanthofyly). [1]

Chlorofyly

Nejnámější molekulou, tvořící fotosyntetický aparát, je bezpochyby chlorofyl. U organismů nacházíme celou řadu těchto pigmentů — chlorofyl a–f. Sinice obsahují především chlorofyl a, který je také nejhojnějším ze všech chlorofylů.

Jeho molekula se skládá ze čtyř pyrolů uspořádaných do tetrapyrolového kruhu, uprostřed kterého je koordinační vazbou k dusíkům uchycen centrální kov — hořčík. Na kruh je navázáno několik substituentů, včetně dlouhého uhlovodíkového řetězce (viz obr. 1.4). Tyto substituenty se liší pro různé druhy chlorofylů.

Elektrony z konjugovaných dvojných vazeb kruhu a jeho okolí jsou delokalizované, což výrazně snižuje energetický rozdíl mezi základní a excitovanými hladinami. Díky tomu chlorofyl spolu s ostatními pigmenty absorbuje ve viditelném světle. [1]



Obrázek 1.4: Absorpční a fluorescenční spektrum a strukturní vzorec chlorofylu a. [1]

Feofytin a

Významný derivát chlorofylu a — feofytin a — má místo hořčíku na dusících navázanu dvojici vodíku. Vyskytuje se v PS II jako akceptor elektronu. [1]

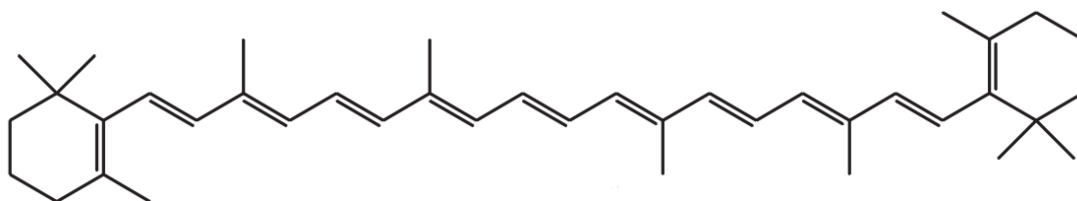
Karotenoidy

Další ze základních skupin fotosyntetických pigmentů jsou karotenoidy, které se také podílejí na zachytu fotonů. Mají ale též ochrannou funkci (podrobněji v kapitole 1.4). Jejich základní stavební jednotkou je isopren, který je spojován do delších řetězců, od čehož je odvozen i jejich druhý název — polyisoprenoidy.

Mezi karotenoidy se řadí i β -karoten (viz obr. 1.5), který je prekurzorem pro výrobu vitamínu A. [6]

Díky symetrii je excitace do první excitované singletní hladiny zakázána. Realizuje se tedy až absorpce světla o vlnové délce 450 nm, která odpovídá rozdílu energií mezi základní S_0 a druhou excitovanou hladinou S_2 . [7]

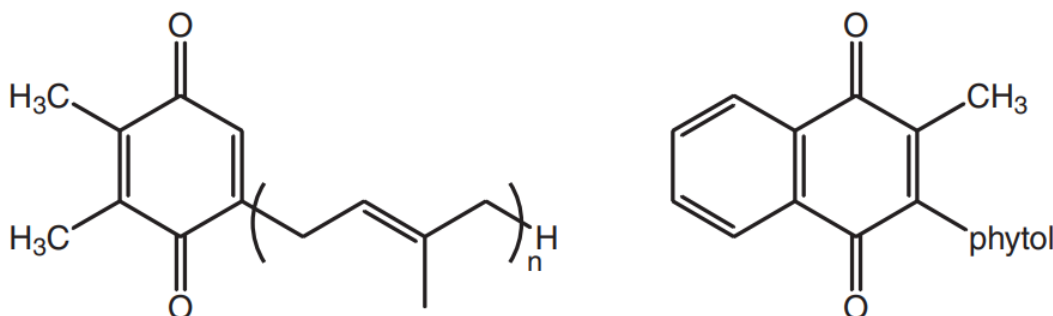
Jelikož jsou molekuly karotenoidu tvořeny dlouhým řetězcem, je třeba, na rozdíl od malých molekul, dodat velké množství energie na přechod z jedné vibrační hladiny do druhé. Z tohoto důvodu jsou rezonanční píky na absorpčním spektru karotenoidů od sebe zřetelně rozeznatelné (dobře patrné na obrázku 1.10). [7]



Obrázek 1.5: Strukturální vzorec β -karotenu. [1]

Plastochinon a fylochinon

Mezi další akceptory PS I a PS II patří popořadě fylochinon a plastochinon. [1] Jejich struktura je odvozena od chinonu — derivátu benzenu s kyslíky navázanými dvojnou vazbou na uhlících 1 a 4. (Viz obr. 1.6.) Fylochinon je znám také jako vitamín K1. [8]



Obrázek 1.6: Strukturální vzorec plastochinonu (vlevo) a fylochinonu (vpravo). [1]

1.3.2 Antény

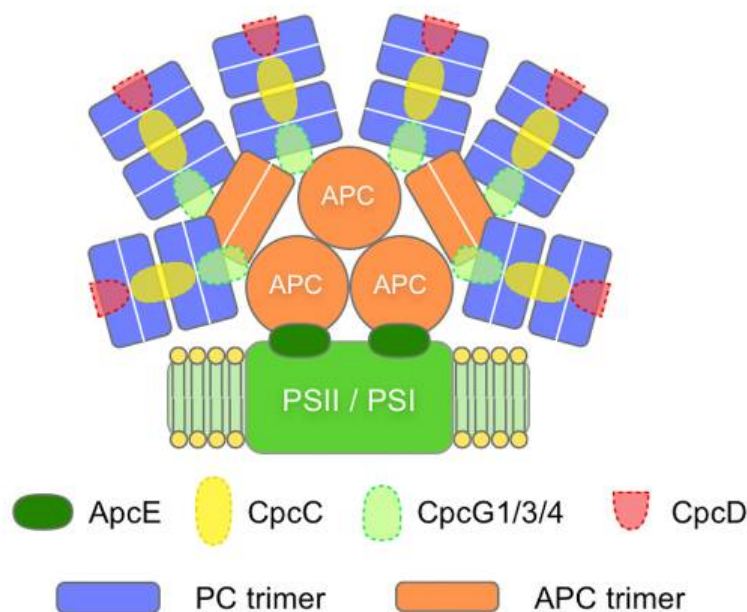
Pro zvýšení pravděpodobnosti zachycení fotonu jsou ve fotosystému k reakčnímu centru přidruženy antény, které zvětšují plochu absorbující záření. Antény sestávají z pigmentů vhodně navázaných na proteiny tak, že jejich energetické hladiny postupně klesají směrem k reakčnímu centru. Díky tomu je pomocí přenosu excitace energie dopravena až do reakčního centra, kde je dále využita.

K přenosu excitace dochází nezářivě Forsterovým rezonančním či Dexterovým výměnným mechanismem. Tento proces můžeme pozorovat v řádu pikosekund.

Excitovaný elektron může přejít zpět do základního stavu také zářivě za vyzáření fotonu o energii odpovídající rozdílu energií excitované a základní hladiny. Tento jev nazýváme fluorescence a pozorujeme ji v řádu nanosekund. Takto vyzářený foton může být opět pohlcen pigmentem, který se nachází blíže k reakčnímu centru. Pravděpodobnost tohoto jevu je však velmi malá, neboť fluorescence je všesměrová.[1]

Přímo na reakční centrum přiléhají vnitřní antény. Účinný průřez záchytu fotonu ještě více zvyšují vnější antény. Ty jsou k systému reakčního centra a vnitřní antény přichyceny dalšími komplexy. Vnější antény se v závislosti na osvětlení mohou pohybovat od PS II k PS I a regulovat tak přítok excitonů ke konkrétnímu reakčnímu centru.

Vnější antény u sinic nazýváme fykobilisomy. Typickou stavbu fykobilisomu si můžeme ukázat na námi použité sinici *Thermosynechococcus elongatus*. (Viz obr. 1.7.) Zde biliprotein fykocyantin (PC z anglického phycocyanin) tvoří šest tyčí soustředěných kolem třech jednotek alofykocyantinu (APC). [9] Na biliproteiny jsou navázány chromofory zajišťující zachycení fotonů. Systém je uspořádán tak, že okrajové části absorbují fotony s krátkou vlnovou délkou, směrem do středu fykobilisomu a k místu napojení na fotosystém se energie absorbovaného záření snižuje. Takto se nálevkovitým efektem dostane exciton až k reakčnímu centru. [9]



Obrázek 1.7: Stavba fykobilisomu sinice *Thermosynechococcus elongatus*. [9]

1.3.3 Fotosystém II

Po zachycení fotonu je kaskádou antén excitací energie přenesena do reakčního centra. Reakční centrum PS II se nachází především v granálních oblastech thylakoidů. Zde hlavní roli zastává zvláštní pár chlorofylů P680 — primární donor. Ten v excitovaném stavu snadno uvolní jeden ze svých delokalizovaných elektronů a přejde zpět do základního stavu. Elektron je pak velmi rychle, aby nedošlo k rekombinaci, přenesen na přechodný akceptor — molekulu feofytinu a putuje přes primární a sekundární akceptory až k molekule chinonu, která je jím redukována na semichinon. Po přijetí druhého elektronu se z chinonu za pomoci dvou vodíků z cytoplazmy stává chinol. Ten je následně vyměněn za chinon z membránového prostoru, kde se volně pohybují.

Kationt zvláštního páru $P680^+$ je na rozdíl od P680 velmi silným oxidačním činidlem. Z tohoto důvodu musí dojít k velmi rychlému přenosu elektronu na přechodný akceptor, aby si jej $P680^+$ nestáhl zpět. Oxidační vlastnosti $P680^+$ jsou natolik silné, že je schopen oxidovat vodu. Elektron je z vody odštěpen složitým postupem v kyslíku vyvíjejícím komplexu (zkráceně OEC z anglického oxygen evolving complex) a je přenášen přes Tyrosin Z k $P680^+$, který redukuje zpět na P680 a celý proces se opakuje.

Na úplnou přeměnu dvou molekul vody je třeba uvolnění čtyř elektronů (tedy čtyři excitace P680), do stromy thylakoidů jsou uvolněny čtyři protony a molekula kyslíku. [1]

1.3.4 Cytochrom b_6f

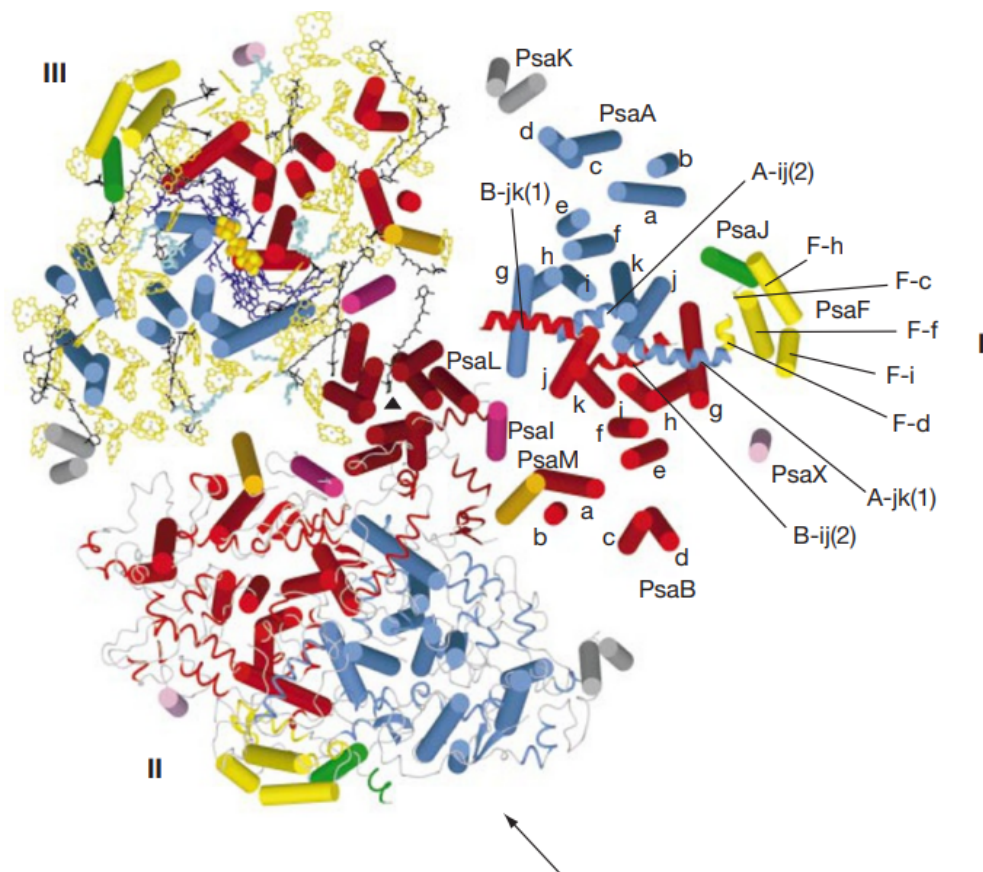
Aby reakce mohla probíhat opakovaně, musíme chinol, který v PS II vzniká po přijetí elektronu, přeměnit zpět na chinon. To nám umožňuje další funkční jednotka, cytochrom b_6f . Uvolněné protony jsou přeneseny do lumen thylakoidu a jeden z elektronů putuje na plastocyanin. [1]

1.3.5 Fotosystém I

Elektron z plastocyaninu pak dále v PS I redukuje dimer chlorofylů, nyní P700. Zvláštní pár chlorofylů opět využívá energii fotonu, která je sem donešena okolními anténami, k excitaci. V excitovaném stavu opět dochází k separaci elektronu, který z něj pak putuje na další chlorofyly a fylochinon (přechodné akceptory), a dále přes primární a sekundární akceptory, kterými jsou železo-sírová centra, až k ferredoxinu. Vzniklý kladný náboj na zvláštním páru je kompenzován elektronem z plastocyaninu. Ten se pak vrací zpět na cytochrom b_6f .

Ferredoxin:NADP⁺ oxidoreduktáza nacházející se v blízkosti PS I přijímá elektron od ferredoxinu a dochází zde k přeměně NADP⁺ na NADPH. [1]

Jelikož se v práci zabýváme právě fotosystémem I, uvedeme si jeho strukturu podrobněji. (Viz obr 1.8.) U sinic se fotosystém I vyskytuje ve formě trimeru (na rozdíl od vyšších rostlin, které mají monomer PS I). V každé jednotce PS I s vnitřní anténou se vyskytuje 12 proteinových podjednotek a velké množství kofaktorů — 96 chlorofylů, 2 fylochinony, 3 Fe₄S₄ klastry, 22 molekul karotenoidů, 4 lipidy, pravděpodobně i iont Ca²⁺ a 201 molekul vody. [10] Zmíněná struktura byla určena právě u sinice *Thermosynechococcus elongatus*.



Obrázek 1.8: Struktura PS I sinice *Thermosynechococcus elongatus*. Pohled podél membrány ze stromální strany. V každém ze tří monomerů jsou znázorněny jiné strukturní prvky. V monomeru III vidíme kompletní soubor kofaktorů s transmembránovou α -šroubovicí (pro přehlednost byly vynechány postranní chlorofylové řetězce antény PS I). Barevné rozlišení: fylochinony a chlorofyly reakčního centra jsou na obrázku modré, atomy železa a síry ve třech Fe_4S_4 klastrech jsou znázorněny žlutými a oranžovými koulemi. Anténní systém: chlorofyly jsou obarveny žlutě, karotenoidy černě a lipidy jsou tyrkysové. [10]

1.3.6 ATP syntáza

Protonový gradient je využit v takzvané ATP syntáze, kde protony přecházejí skrz protonový kanál z lumen thylakoidu na druhou stranu membrány a u toho roztáčejí rotor. Točící se γ -podjednotka cyklicky mění konformace na třech vazebných místech na β -podjednotkách, které jsou součástí statoru, kde dochází k tvorbě ATP z ADP. Na jednu celou otočku připadá výroba 3 molekul ATP.

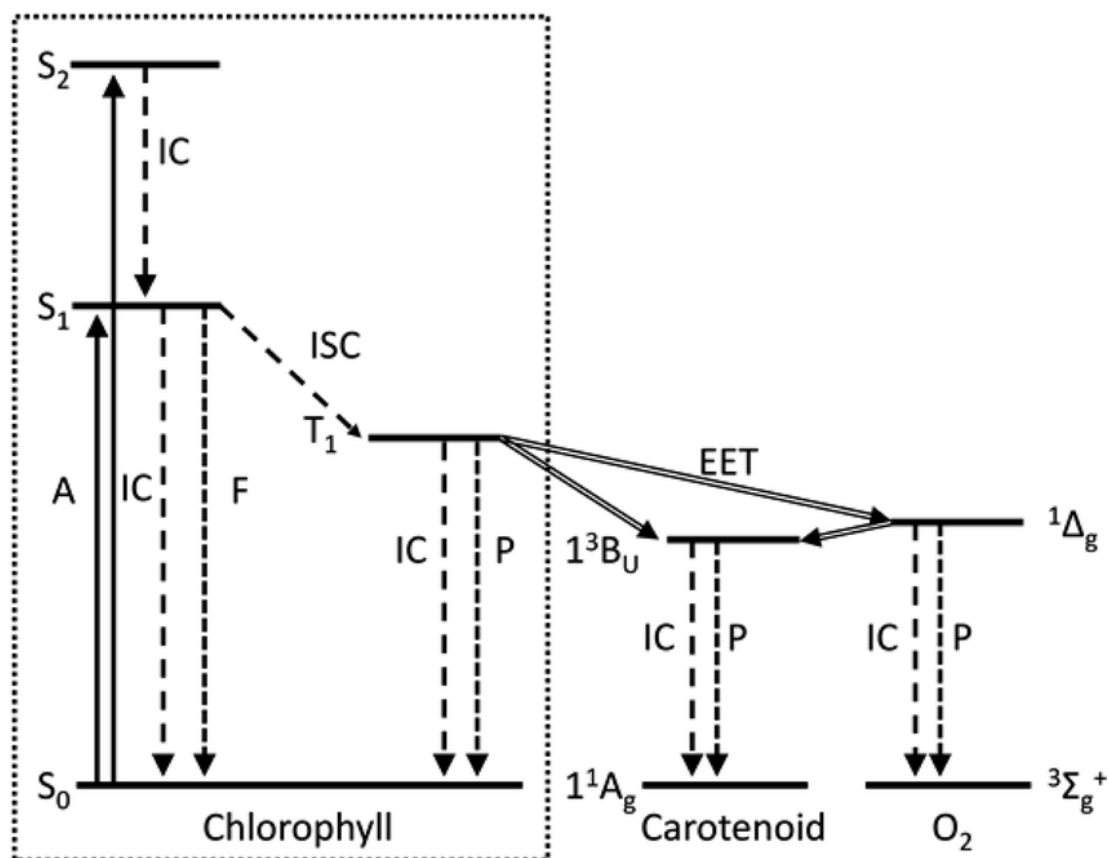
1.4 Energetické hladiny

Excitací, tedy pohlcením fotonu, se mohou elektrony dostat ze základního stavu do vyšších energetických hladin. Stav, kdy je celkové spinové číslo rovno 0, označujeme jako singletní. Naopak tripletní stavy obsahují nespárované elektrony a jejich celkové spinové číslo je 1. Základní stav je u většiny molekul singletní. [11]

Chlorofyl a absorbuje vlnové délky kolem 670 nm, což odpovídá energetickému rozdílu mezi základním stavem S_0 a prvním excitovaným stavem S_1 . Těto oblasti říkáme Q_y pás. V této oblasti pozorujeme též fluorescenci - zářivý přechod elektronu z S_1 do základního stavu. Spektrum fluorescence je posunuté k delším vlnovým délkám oproti Q_y pásu z důvodu nezářivých energetických ztrát (Stokesův posuv). [1] (Viz obr. 1.4.)

Dalšími dvěma významnými absorpčními oblastmi chlorofylu a jsou Q_x a Soretův pás, které absorbují v oblastech 570 nm respektive 436 nm a odpovídají energetickému rozdílu mezi základní hladinou S_0 a S_2 respektive S_{3-4} . (Viz obr. 1.9.) V oblasti 630 až 650 nm můžeme pozorovat příspěvky vibrační struktury obou Q-pásů. [12] (Patrné na obrázcích 1.4 a 1.10.)

Přechod mezi singletním a tripletním stavem je zakázaný, jelikož musí dojít k překlopení spinu. Hořčík umístěný v centru molekuly chlorofylu však usnadňuje zakázaný přechod ze singletní S_1 na tripletní hladinu T_1 díky spin orbitální interakci. Přechod z tripletního stavu do základního je taktéž spinově zakázaný. Rychlostní konstanta přechodu z tripletního do základního stavu je tedy velmi malá a elektron zůstává v tripletním stavu dlouhou dobu (okolo 1–20 μs [13]), čímž se zvyšuje pravděpodobnost přenosu excitace na singletní kyslík.



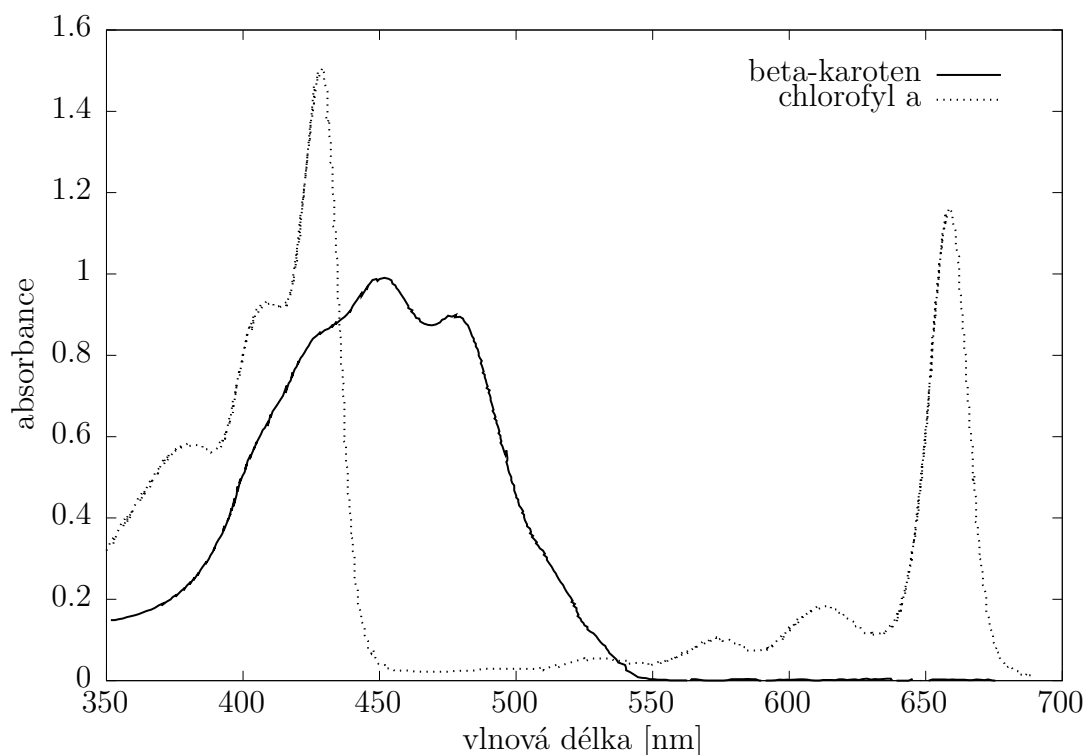
Obrázek 1.9: Zjednodušené schéma energetických hladin chlorofylů, karotenoidů a kyslíku.[14]

V aerobních podmínkách dochází často k přenosu excitační energie z tripletních stavů chlorofylů na kyslík a vytváří se tak silně reaktivní singletní kyslík, který může poškodit fotosyntetický aparát.

Ochranná role karotenoidů spočívá v jejich vhodně umístěných energetických hladinách tripletních stavů, díky čemuž účinně zháší tripletní stavy chlorofylů. Tím zamezují přenosu excitace na kyslík, tedy i vzniku singletního kyslíku a poškození systému. Přenos excitace z tripletů karotenoidů na singletní hladinu kyslíku již není možný, jelikož kyslík má příslušnou energetickou hladinu výše, než karotenoidy. [12]

Velmi častým jevem je však zhášení tripletní hladiny karotenoidů zesíleným mezisystémovým přechodem způsobeným paramagnetickým kyslíkem v základním stavu. [15] Z tohoto důvodu lze předpokládat, že v anaerobních podmínkách dojde k výraznému prodloužení doby života tripletních stavů karotenoidů. Tato skutečnost byla proměřena v kapitole 3.4.

V karotenoidech probíhá návrat do základního stavu nezářivě, fluorescence se téměř nepozoruje, protože přechod z S_1 do základního stavu je díky silné vibronické vazbě velmi rychlý. [1]



Obrázek 1.10: Absorpční spektrum karotenoidu [16] a chlorofylu.[1]

1.5 Časový vývoj

Relaxace nestabilního kvantového systému, jakým je i elektron excitovaný do vyšších energetických hladin, můžeme aproximovat exponenciálním průběhem. [17]

$$p(t) = N_0 e^{-\Gamma t}, \quad (1.1)$$

kde rychlostní konstanta Γ má rozměry s^{-1} a je rovna převrácené hodnotě doby

života excitovaného stavu. Určit ji můžeme například pomocí Fermiho zlatého pravidla.

2. Použité měřicí přístroje, metody a materiály

2.1 Použité materiály

2.1.1 Vzorek fotosystému I

K měření jsme použili fotosystém I (dále PS I) extrahovaný ze sinice *Thermosynechococcus elongatus* v polárním rozpouštědle. Vzorek jsme ředili pomocí pufru — 20mM roztoku tricinu, do kterého byl přidán 0,02% dodecyl maltoside s detergenčními vlastnostmi a kyselina pro dosažení pH 7,8. Vzorek PS I nám připravil Dr. rer. nat. Heiko Lokstein, Ph.D.

V několika citovaných materiálech je uvedena sinice *Synechococcus elongatus*. Jedná se o tutéž sinici, která byla později přejmenována na *Thermosynechococcus elongatus*. Pro přehlednost jsme v celém textu používali pouze její nový název *Thermosynechococcus elongatus*.

2.2 Použité přístroje a postup měření

2.2.1 Příprava vzorku

Pomocí mikropipety jsme do skleněné leštěné fluorescenční kyvety nabrali 2 ml pufru a přidali většinou 4 μ l vzorku PS I (odpovídá absorpanci 0,75), v závislosti na požadované koncentraci. Tu jsme před každým měřením kvantifikovali na základě absorpance vzorku v oblasti Q_y pásu pomocí přístroje specord 250. Námí používané vzorky měly absorpanci v rozmezí 0,4–1,2.

Absorpanci definujeme jako

$$A = -\log(T) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right), \quad (2.1)$$

kde T nazýváme transmittance a log je dekadický logaritmus. I_v je intenzita signálu po průchodu vzorkem a I_0 je intenzita světla vstupujícího do vzorku.

Tento výraz lze také přepsat s využitím molárního absorpčního koeficientu ϵ , optické délky d a molární koncentrace vzorku C , čímž získáme známý tvar Lambert-Beerova zákona [18]

$$I = I_0 e^{-A} = I_0 e^{-\epsilon C d}, \quad (2.2)$$

Absorpance závisí přímo úměrně na molární koncentraci.

Kvůli tendenci pufru pěnit, je při pipetování třeba postupovat velmi opatrně, aby nedošlo k vzniku bublin, které vedou k přípravě roztoku o nesprávné koncentraci.

Absorpanci bylo třeba změřit i po každém experimentu, aby se tím ověřilo, že vlivem velmi intenzivního záření laseru nebyl vzorek poškozen.

2.2.2 Foukání dusíkem

Pro měření za anaerobních podmínek jsme vzorek foukali dusíkem, který postupně kyslík rozpuštěný ve vzorku vytlačil. K měření koncentrace kyslíku jsme používali sondu FOXY-R NeoFox od Ocean Optics. Přístroj obsahuje fluorescenční materiál; doba života jeho excitovaného stavu silně závisí na koncentraci kyslíku v jeho okolí. [19] Přístroj je nakalibrován pomocí dvoubodové lineární kalibrace tak, že destilované vodě za pokojové teploty je přiřazena 100% koncentrace kyslíku v rozpouštědle. Doba života je při této koncentraci $2,41 \mu\text{s}$. [20]

Vzorek foukáme, dokud se doba života neustálí. U vzorku PSI použitého v tomto experimentu se doba života ustálila na $3,22 \mu\text{s}$.

Jelikož pufr obsahuje detergent, je třeba foukat pouze na hladinu, nikoliv přímo do vzorku, aby se vzorek nenapěnil. K promíchávání vzorku se běžně používá magnetická míchací tyčinka v poli rotujícího magnetu umístěného v podstavci. Ta zde však nelze použít, jelikož mícháním by se mohly od vzorku odpojit červené chlorofyly PS I.

2.2.3 Měření absorbance v závislosti na čase od excitačního pulzu

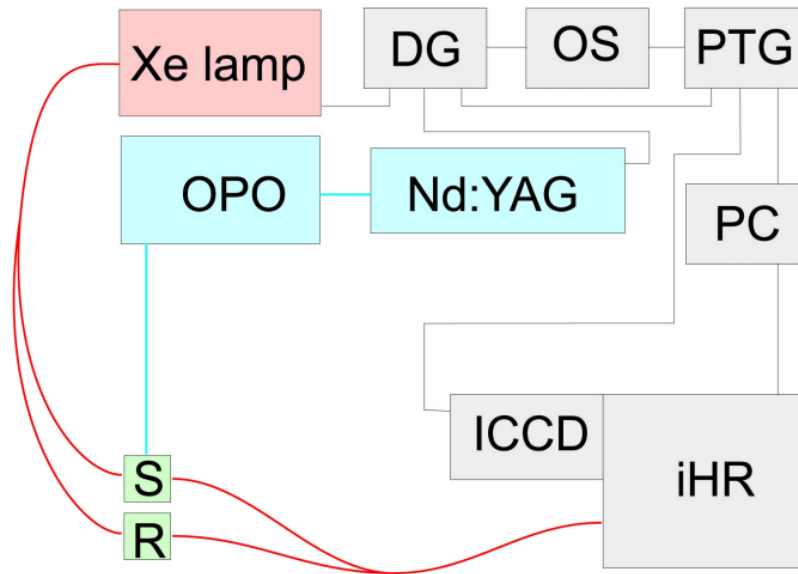
Ke studiu dějů ve fotosystému lze využít spektroskopii, konkrétně metodu excitace a sondování. Nejprve vzorek ozáříme excitačním pulzem. Dále v různých časech po excitaci měříme absorbanci vzorku pro různé vlnové délky a od výsledných spekter odčítáme spektra bez pulzu. Tak získáme časově rozlišená spektra tranzientní absorpce.

Spektra v různých časech po pulzu měříme v náhodném pořadí aby se co nejméně projeвило kolísání lampy či degradace vzorku.

Samotné měření spektra pro každé zpoždění opakujeme 500 krát a následně se data průměrují, aby se minimalizoval nežádoucí šum. Od průměru pak počítáme odchylku jednotlivých měření a určíme tak spektrum směrodatných odchylek, které je v práci používáno pro popis šumu.

Každý pixel detektoru spektrometru reaguje na signál s drobnou odchylkou. Z tohoto důvodu měříme na začátku spektrum pozadí, které se pak od spektra vzorku odčítá, čímž se tyto vady detektoru redukují. Jelikož pro každé zesílení intenzity signálu (gain) detektor reaguje odlišně, je třeba pozadí naměřit vždy znovu při každé změně nastavení. Při měření pozadí se snažíme minimalizovat množství píků způsobených kosmickým zářením, v případě průletu nežádoucí částice měření opakujeme. [21]

Aparatura (viz obr. 2.1) sestává z laditelného pulzního laserového systému s pulzy o délce přibližně 3 ns. [11] Pigmenty ve vzorku jsou excitovány pulzem z optického parametrického oscilátoru (OPO) PG 122 (EKSPLA), který je čerpán pomocí laseru (Nd:YAG) NL303 (EKSPLA). Kolmo na paprsek laseru ozařujeme vzorek pulzní lampou — xenonová výbojka XE 2000 (Avantes), jejíž svazek je rozdělen na měřicí a referenční. Oba svazky jsou ve spektrometru iHR (Horiba Jobin Yvon) převedeny na spektra, která jsou snímána pomocí zesilované CCD kamery (ICCD). [11] Přístroje jsou ovládány pomocí počítače a data se automaticky zpracovávají programem, který vytvořil Mgr. Petro Khoroshyy Ph.D.



Obrázek 2.1: Schéma aparatury pro měření tranzientních spekter s 2ns rozlišením. Nd:YAG - nanosekundový laser, OPO - optický parametrický oscilátor, Xe lamp - xenonová výbojka, ICCD - intenzifikovaná CCD kamera, iHR - zobrazovací spektrometr, DG - generátor zpoždění, OS - osciloskop, PTG - ovládací jednotka ICCD kamery, PC - počítač, S - vzorek (signál), R - vzorek (reference). [11]

V programu lze také manuálně nastavovat různé parametry měřicí aparatury jako je zesílení signálu či doba, po kterou detektor signál sbírá. Tato práce se zabývá optimalizací nastavení těchto parametrů, které budou dále představeny.

Gain a Gate

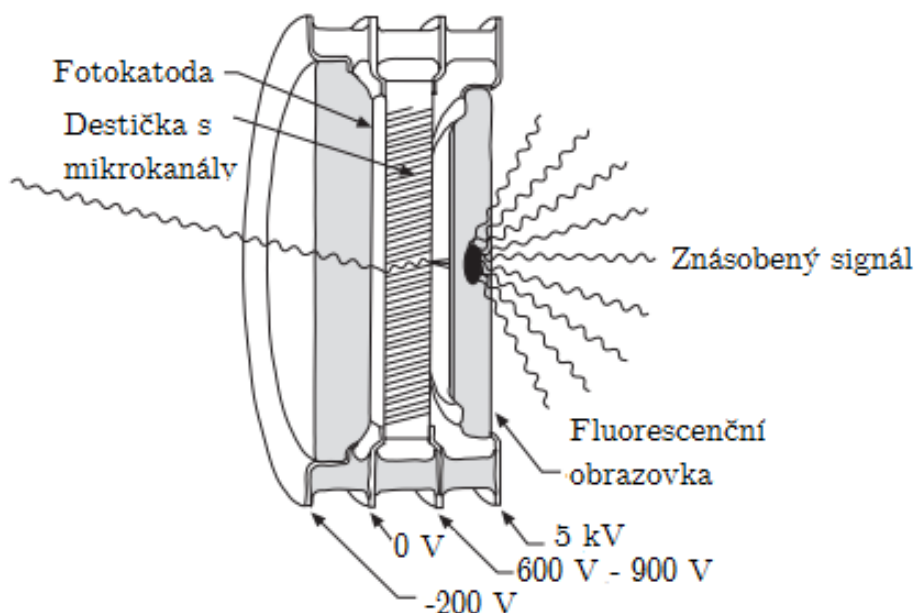
Tranzientní absorpenci měříme pomocí porovnání spektra paprsku prošlého přes vzorek a spektra referenčního paprsku (toto změříme bez pulzu a s pulzem a spektra odečteme). Měřicí paprsek musí mít velmi malou intenzitu, abychom mohli zanedbat změny populace jednotlivých energetických hladin vzorku způsobené jeho průchodem oproti změnám způsobeným excitačním pulzem. Signál tak nemůžeme zvyšovat pomocí zvyšování intenzity měřicího světla, ale lze jej zesílovat pomocí zesilovače v CCD kameře.

Zesílení světla prošlého vzorkem nastavíme vždy tak, abychom měli co největší signál. Tedy aby na část detektoru určenou pro signál dopadal paprsek o intenzitě kolem 50 000 counts/second (dále zkráceně cps), při překročení 62 000 cps se měření automaticky vypne kvůli ochraně detektoru. Z tohoto důvodu je třeba použít nižší zesílení, aby se při případném výkyvu předešlo vypnutí měření. To mnohdy trvá až 2 hodiny.

Intenzitu signálu nastavujeme v programu pomocí proměnné gain, která určuje jeho zesílení. Při běžném měření se gain pohybuje kolem 70.

Signál se zvyšuje pomocí zesilovače (viz obr. 2.2). Paprsek je po průchodu vzorkem veden optickým kabelem do spektrometru a následně rozložený na jednotlivé vlnové délky dopadá na fotokatodu detektoru. Zde dojde k vyražení elektronů, ty pak putují urychleny napětím do mikrokanálu. S každým nárazem elektronu do stěny kanálu jsou vyraženy další elektrony, které jsou dále urychlovány

rozdílem elektrického potenciálu mezi vstupem a ústím kanálu. Po vylétnutí z kanálu elektrony dopadají na fluorescenční fosforovou destičku, kde dojde k přeměně jejich kinetické energie na foton viditelného záření. [22] Produkce elektronů je korigována napětím na koncích kanálu. Se zvýšením napětí o 50 V se zvětší gain přibližně dvakrát.



Obrázek 2.2: Schéma zesilovače.

Intenzitu referenčního svazku volíme vždy tak, aby se blížila intenzitě signálu.

Velikost výsledného signálu můžeme však také ovlivnit změnou doby, po kterou detektor signál přijímá - v programu vystupuje pod názvem gate. Běžná doba zachytu signálu detektorem je 2 ns. Se zvětšením gate zvyšujeme množství detekovaných fotonů, avšak částečně přicházíme o časové rozlišení. Tento postup tedy nelze použít pro časy těsně po excitaci, neboť vývoj je v tuto dobu velmi rychlý. V pozdějších časech, od 100 ns od excitačního pulzu, jsou děje výrazně pomalejší, můžeme tedy použít delší gate (kolem 10 ns). Jelikož fotonásobič způsobuje značné výkyvy v intenzitě měřeného světla, je doporučeno signál zvětšovat pomocí gate. [21] To nám umožní snížit gain až na 0, čímž výrazně snížíme šum při zachování velikosti výsledného signálu. V těchto časech vytváří gate jen 10% chybu časového rozlišení.

Intenzita a vlnová délka excitačního pulzu

Měnit také můžeme intenzitu excitačního pulzu. S větší intenzitou se excituje více chlorofylů a získáme tak větší signál. Avšak silný excitační pulz také může vést k degradaci vzorku, z tohoto důvodu nelze intenzitu zvýšit příliš. Poškození vzorku po měření kontrolujeme pomocí spektrometru, jak bylo popsáno v sekci 1.2.1.

Zvolený laser umožňuje použití různých vlnových délek excitačního pulzu. Vlnovou délku, na které vzorek excitujeme, volíme vždy tak, aby odpovídala

oblastem s vyšší absorpcí. U vzorku PSI jsme tedy excitovali do Sorretova ($\lambda = 440$ nm) či Q_y pásu ($\lambda = 670$ nm)

Jelikož excitační pulz nelze přesně odstranit z výsledného spektra, nebylo by možné tato spektra fitovat a určovat z nich doby života jednotlivých stavů. Z tohoto důvodu excitujeme v červené oblasti o vlnové délce $\lambda = 670$ nm, kde se excitační pulz překrývá s fluorescencí, kterou se v této práci nebudeme zabývat.

Čas nula

Před začátkem experimentu je třeba změřit, v jakém čase emituje laser excitační pulz. Konkrétně čas maxima pulzu, který trvá zhruba 3 ns. Tento okamžik bereme jako čas nula, od kterého se pak odvíjí takzvaný gate delay, tedy to, v jakém čase chceme začít měřit signál na detektoru spektrometru.

Při špatném nastavení času nula bude časový průběh spekter posunutý, čímž bychom mohli přijít o spektra v prvních nanosekundách po pulzu.

2.3 Fitovací program a zpracování dat

2.3.1 Tranzientní spektrum

Pro získání tranzientního spektra je třeba změřit spektrum prošlého záření měřicího světla přes vzorek po excitaci a bez excitace. Frekvence měřicích pulzů bude tedy dvojnásobná oproti frekvenci excitačních pulzů.

Pro připomenutí ještě jednou ukážeme definice základních vztahů. Transmitanci pro určitou konkrétní vlnovou délku lze spočítat jako

$$T = \frac{I_v}{I_0}, \quad (2.3)$$

kde I_v je intenzita signálu po průchodu vzorkem a I_0 je intenzita světla vstupujícího do vzorku.

Absorbance je pak definována jako

$$A = -\log(T) = \log\left(\frac{I_0}{I}\right), \quad (2.4)$$

kde \log je dekadický logaritmus.

Transientní spektrum v konkrétním čase pak získáme tak, že pro každou vlnovou délku spočteme

$$\Delta A = A_{\text{pulz}} - A_{\text{bez}}, \quad (2.5)$$

kde A_{pulz} je absorbance vzorku, který byl ozářen excitačním pulzem a A_{bez} je absorbance vzorku, který pulzem ozářen nebyl.

Paprsek světla z lampy rozdělíme na dva - měřicí, který prostupuje vzorkem, a referenční. Jako intenzitu vstupujícího měřicího pulzu bere program intenzitu referenčního svazku, který rovnou putuje optickým kabelem do detektoru, kde se zároveň s jeho spektrem měří spektrum svazku prošlého vzorkem.

V kapitole 2.2.3 jsme psali, že intenzitu referenčního svazku volíme vždy tak, aby se blížila intenzitě signálu. Na první pohled by se mohlo zdát, že touto volbou nezískáme správné tranzientní spektrum, jelikož jsme špatně vypočetli transmittanci - intenzita vcházejícího měřicího pulzu totiž musí být výrazně větší než intenzita části svazku použitá na referenci, aby se na po prostoupení vzorkem řádově shodovali, jelikož část se ve vzorku absorbuje či rozptýlí. Nicméně vhodnými úpravami lze ukázat, že tento postup neovlivní výsledné tranzientní spektrum.

Vzorec pro tranzientní spektrum (2.5) lze pomocí vzorce (2.4) přepsat jako

$$\Delta A = A_{\text{pulz}} - A_{\text{bez}} = \log\left(\frac{I_{v, \text{ pulz}}}{I_{0, \text{ pulz}}}\right) - \log\left(\frac{I_{v, \text{ bez}}}{I_{0, \text{ bez}}}\right) \quad (2.6)$$

Tento výraz lze s využitím vlastností logaritmu rozepsat jako

$$\Delta A = \log(I_{v, \text{ pulz}}) - \log(I_{0, \text{ pulz}}) - \log(I_{v, \text{ bez}}) + \log(I_{0, \text{ bez}}) \quad (2.7)$$

Výsledný výraz získáme přeskupením jednotlivých členů:

$$\Delta A = \log\left(\frac{I_{v, \text{ pulz}}}{I_{v, \text{ bez}}}\right) - \log\left(\frac{I_{0, \text{ pulz}}}{I_{0, \text{ bez}}}\right) \quad (2.8)$$

Vidíme, že v posledním výrazu (2.8) se vyskytují dva členy, první nám dává informaci o tom, jak se změnila absorbance a druhý o tom, jak se změnila intenzita vstupujícího světla. Z toho je patrné, že když za intenzitu vstupujícího svazku dosadíme intenzitu referenčního svazku, nijak to tranzientní spektrum nezmění. Referenční svazek měříme pouze kvůli korekci případných fluktuací v jeho intenzitě. Kdyby byla měřicí lampa ideální, druhý člen by vymizel.

2.3.2 Určení dob života jednotlivých stavů

Rozpad kvantového stavu lze aproximovat exponencialou. (Viz kapitolu 1.5.) Doby života určitého stavu ve fotosyntetickém aparátu lze určit tak, že změříme časově závislá tranzientní spektra. V časové ose pak pro jednotlivé vlnové délky fitujeme časovou závislost absorbance součtem exponencial znázorňujících dohasínání jednotlivých stavů v konvoluci s gaussovou funkcí, reprezentující excitaci pulz. Exponenty pak odpovídají jednotlivým rychlostním konstantám dohasínání, tedy převráceným hodnotám dob života. Na začátku je třeba určit, kolika komponentami má program data fitovat. Tento počet by měl odrážet fyzikální podstatu pozorovaného jevu. V našem zpracování byly tedy použity tři komponenty, popisující dobu života stavů, kdy je elektron v první excitované hladině chlorofylu S_1 , průběh populace tripletu chlorofylů a následně obsazení tripletní hladiny karotenoidů.

Zpracování dat a fitování provádíme v softwaru naprogramovaném panem Mgr. Janem Alsterem Ph.D. Detailnější popis programu lze najít v jeho dizertační práci. [23] Program data zobrazí jako 2D graf s vlnovou délkou na ose x a časem na ose y. Změna absorbance je znázorněna barevným rozlišením.

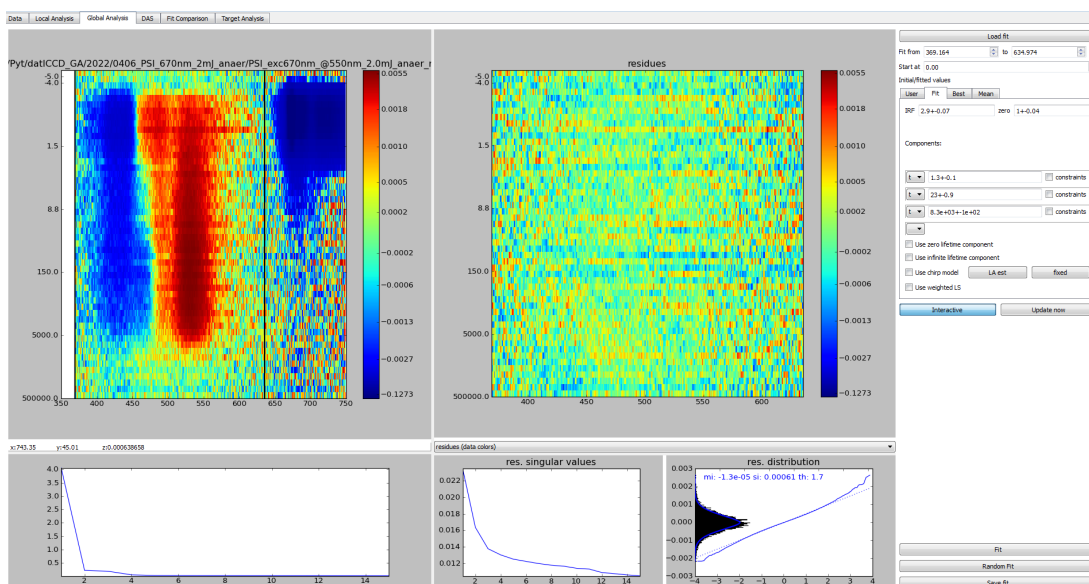
Dále vybíráme oblast, ve které budeme data zpracovávat. Jak již bylo řečeno, dohasínání fluorescence nelze fitovat stejným způsobem jako dohasínání

absorbance, vybereme za tedy pouze oblast do přibližně 635 nm (na obrázku 2.3 znázorněno černou čarou).

V náhledu fitovacího programu 2.3 lze na časově rozlišeném tranzientním spektru pozorovat dvě modré oblasti. Ty odpovídají poklesu absorpce světla odpovídající energii přechodu mezi základní hladinou S_0 a první excitovanou singletní hladinou S_1 (Q_y pás), případně pak vyššími excitovanými singletními hladinami (Soretův pás). Červená oblast pak znázorňuje nárůst absorpce světla o vlnové délce okolo 550 nm odpovídající excitaci z tripletní hladiny karotenoidů.

V okolí času nula je oblast odpovídající vlnové délce 670 nm nejtmavší, což lze vysvětlit fluorescencí a částečným pronikáním excitačního pulzu do detektoru.

Program graficky znázorňuje chybu fitu ve všech vlnových délkách a časech, taktéž pomocí barevně rozlišeného 2D grafu. V případě, že by vzniklý obrazec nebyl náhodný a vykazoval by strukturu, můžeme usuzovat, že daný fit neodpovídá naměřeným datům.



Obrázek 2.3: Náhled fitovacího programu.

3. Výsledky měření

3.1 Různé energie excitačního pulzu

Pro ověření předpokladu, že s rostoucí energií excitačního pulzu bude narůstat signál, jsme změřili tranzientní spektrum pro 4 různé energie excitačního pulzu ($0,50 \pm 0,05$) mJ, ($1,0 \pm 0,1$) mJ, ($1,5 \pm 0,1$) mJ a ($2,0 \pm 0,2$) mJ v pěti různých časech: -5 ns, 1 ns, 10 ns, 100 ns, 1000 ns. Použitý vzorek měl absorbanci $0,8$ a byl měřen v aerobních podmínkách za neprodloužené 2 ns gate.

Spektra v časech -5 ns a 1 ns jsme změřili pro kontrolu správného určení času nula. Kdyby se čas nula posunul, jeho část by mohla být patrná na spektru v -5 ns, jelikož pulz trvá 3 ns, nebo naopak by byl pík v 1 ns méně patrný.

Časový průběh tranzientního spektra (v grafu 3.1) ukazuje, že v -5 ns ještě nedošlo k excitaci. Spektrum z měření bez pulzu a s pulzem (kdy ale k pulzu ještě nedošlo) je téměř stejné, liší se jen v rámci šumu, který je na spektru patrný.

V 1 ns můžeme pozorovat pík v oblasti 670 nm, tedy v oblasti fluorescence prvního excitovaného stavu. Do oblasti fluorescence zasahuje také část excitačního pulzu, který se na vzorku částečně rozptýlil a dostal se tak i do detektoru a tvoří značnou část signálu v této oblasti. Z tohoto důvodu graf v 1 ns výrazně převyšuje křivky pro ostatní časy; aby bylo spektrum v 1 ns zaznamenáno celé, vynesli jsme jej také samostatně do grafu 3.2.

Tento jev nelze odstranit korekcemi, jelikož excitační pulz i jeho rozptýlení nelze snadno matematicky popsat. Z tohoto důvodu excitujeme v oblasti fluorescence (670 nm), kterou se v této práci nezabýváme a nelze ji námi zvoleným způsobem fitovat, neboť jsme data zlogaritmovali.

V oblasti Soretova pásu je pro časy po excitačním pulzu patrné vybělení, tedy pokles absorbance způsobený tím, že elektrony v základním stavu byly excitovány na první excitovanou hladinu. V základním stavu je tedy méně elektronů, což se projeví nižší absorpcí v této části spektra.

Naopak v zelené části spektra, kde rostliny za normálních podmínek neabsorbují, pozorujeme nárůst absorbance způsobený zvýšením počtu elektronů na první tripletní hladině karotenoidů, které lze následně excitovat na druhou nebo vyšší tripletní hladinu právě světlem o energii odpovídající vlnové délce 550 nm.

V grafu 3.4 vidíme srovnání tranzientních spekter pro různé intenzity excitačního pulzu v čase 1000 ns. Jelikož průběhy spekter pro všechny z časů 10 ns, 100 ns a 1000 ns byly velmi podobné, byl uveden pouze ukázkový graf v 1000 ns. Grafy pro 10 ns a 100 ns jsou v příloze (A.1, A.2).

Ve všech časech s rostoucí intenzitou excitačního pulzu roste intenzita signálu, což je v souladu s předpokladem, jelikož s větším počtem dopadajících fotonů se excituje více elektronů a změna absorbance bude větší. Při zvýšení energie excitačního pulzu z $0,5$ mJ na 2 mJ se zvětší signál v oblasti tripletu karotenoidů (v čase 1000 ns) z $0,0025$ na $0,0065$, tedy téměř třikrát. Vidíme, že závislost není lineární, u větších energií způsobí stejně velká změna energie menší změnu v signálu než u malých energií. Důvodem může být to, že změnu pozorujeme především u

tripletního stavu karotenoidů, kam se přenáší energie z tripletů chlorofylu a celá závislost je poměrně složitá (více v kapitole 3.2).

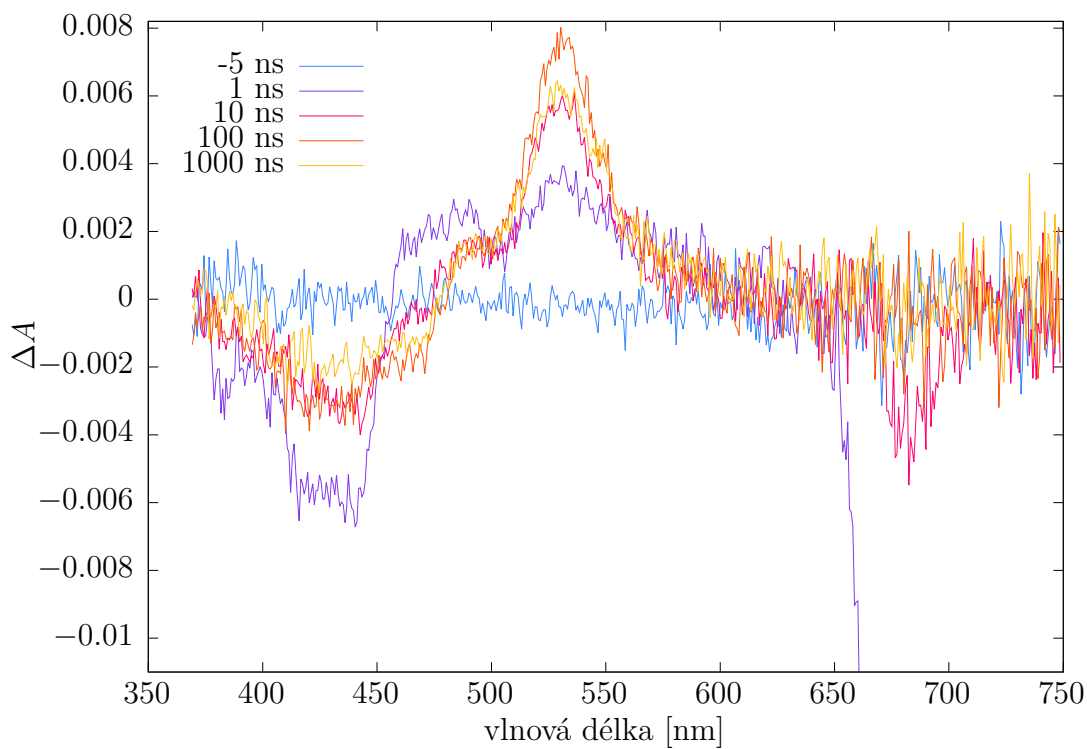
Z grafu 3.5 je patrné, že směrodatná odchylka, tedy šum signálu, nezávisí na energii excitačního pulzu, což jsme předpokládali, neboť energii měníme filtrem a ne nastavením laseru. Světlo tedy vykazuje stejnou stabilitu pro všechny použité energie, což odpovídá nejistotám určení energie získaných odečtením z měřicího přístroje (chyba je vždy 10%).

Průběh grafů směrodatných odchylek je velmi proměnný v okolí času nula, kdy je v oblasti 670 nm velká chyba v důsledku průniku části excitačního pulzu do detektoru. V pozdějších časech se však směrodatná odchylka takřka nemění (viz graf 3.3), vyneseno tedy bylo pouze spektrum směrodatných odchylek pro čas 1000 ns.

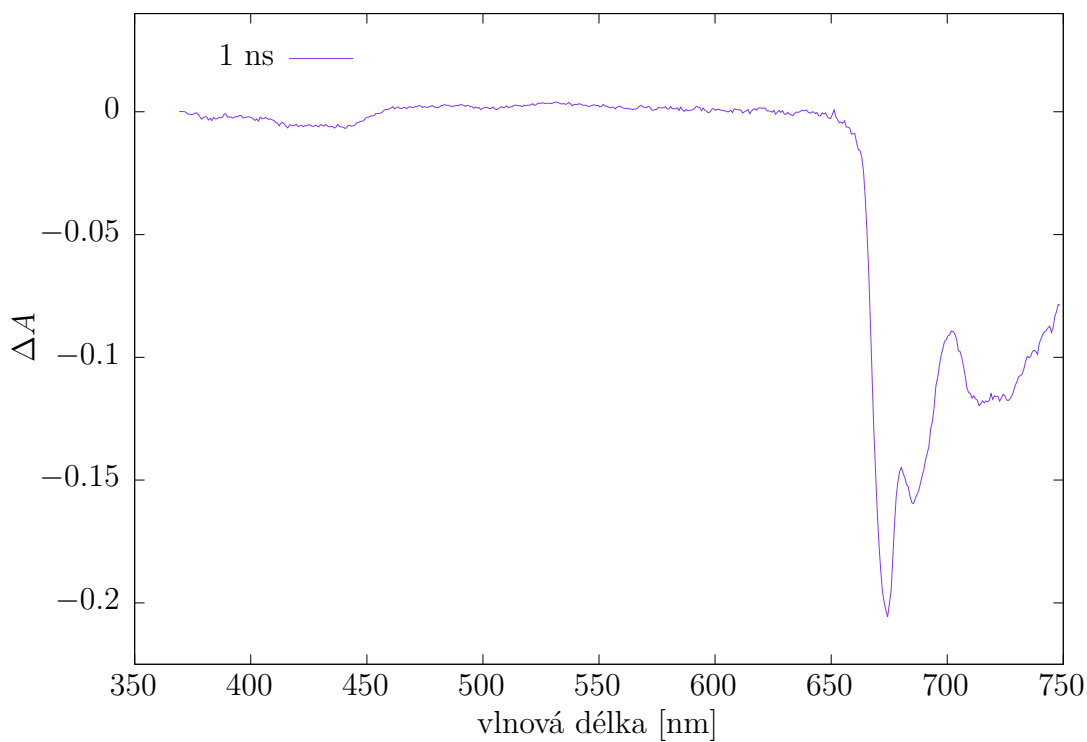
Výrazný nárůst hodnoty směrodatné odchylky ve vyšších vlnových délkách je způsoben poklesem intenzity měřicí lampy v této oblasti spektra. (3.6) Pík v oblasti 670 nm lze vysvětlit tím, že se překrývá s Q_y pásem, kde je velmi vysoká absorpce, do detektoru tedy přichází pouze světlo o velmi nízké intenzitě a náhodné výkyvy jsou tak více patrné.

Z naměřených dat tedy vyplývá, že je výhodnější volit vyšší energii excitačního pulzu, neboť tím zvýšíme signál a šum zůstane stejně velký, zvětšíme tedy poměr signálu k šumu, což byl náš cíl. Nevýhodou zde však zůstává vyšší expozice vzorku zářením, které jej může poškodit. Při těchto energiích však degradace vzorku není příliš vysoká. Před měřením měl vzorek absorbanci 0,879 a po všech měřeních vykazoval absorbanci 0,8108; absorpance se tedy snížila pouze o necelých 10% a především není selektivní. Všechny části spektra klesly přibližně o stejnou hodnotu, z čehož vyplývá, že nedochází ke změnám pigmentů vzorku, které by mohly vzorek znehodnotit. (Viz graf 3.7.)

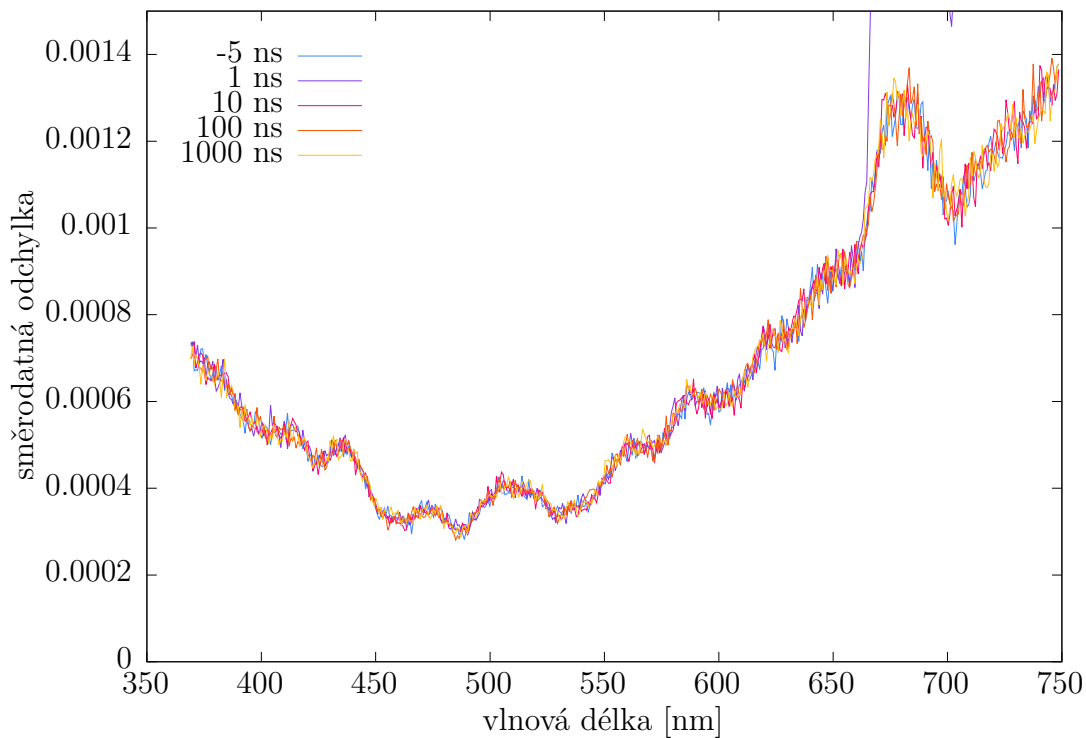
Další možností je použití pulzů o energiích až 10 mJ, při takto velkém ozařování vzorku je třeba snížit dobu ozařování a tedy zvolit poměrově menší počet spekter, ze kterých se pak zpracovávají výsledná data.



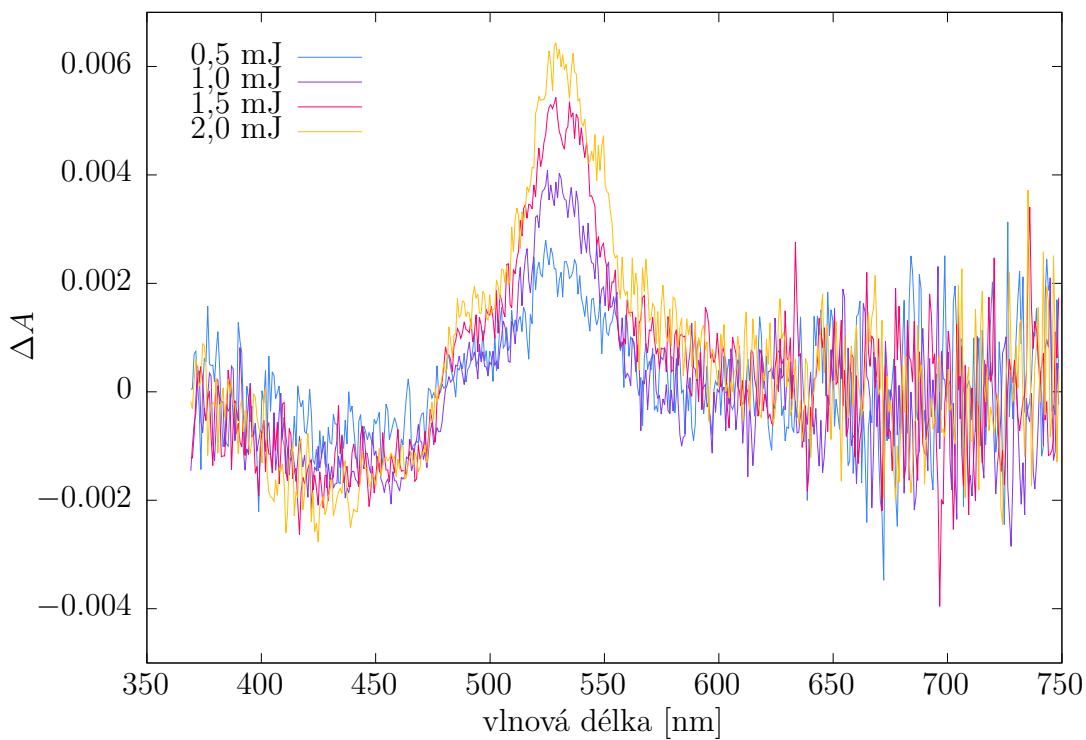
Obrázek 3.1: Transientní spektra PS I pro různé časy po excitačním pulzu.



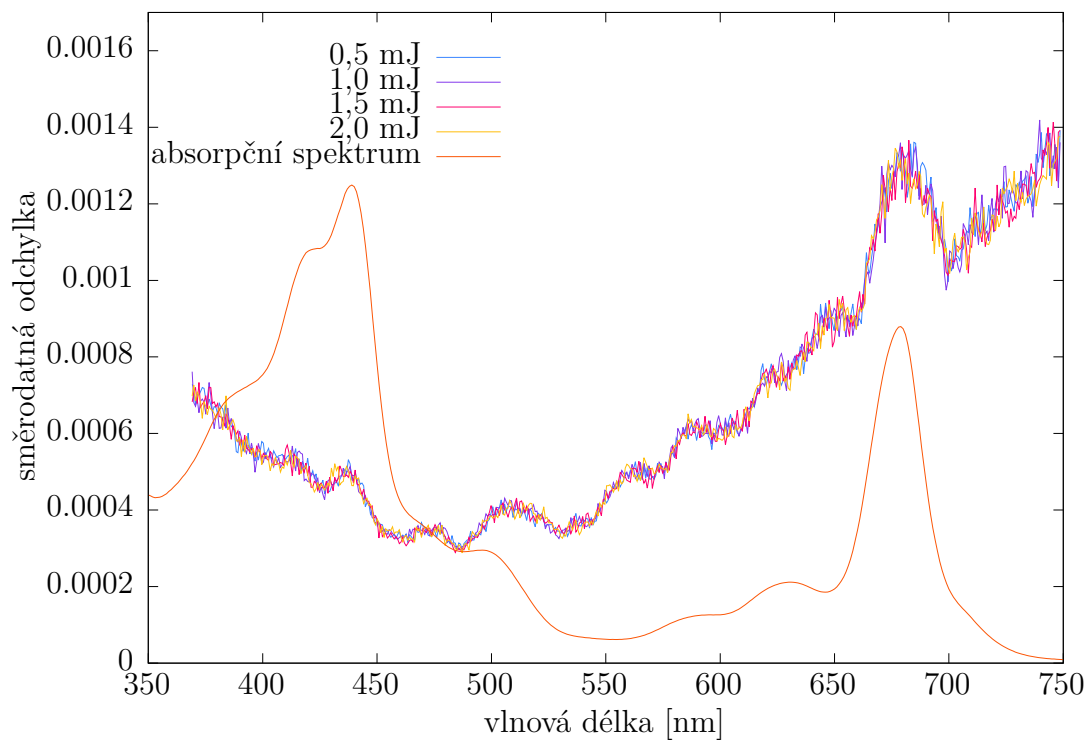
Obrázek 3.2: Transientní spektrum PS I v čase 1 ns.



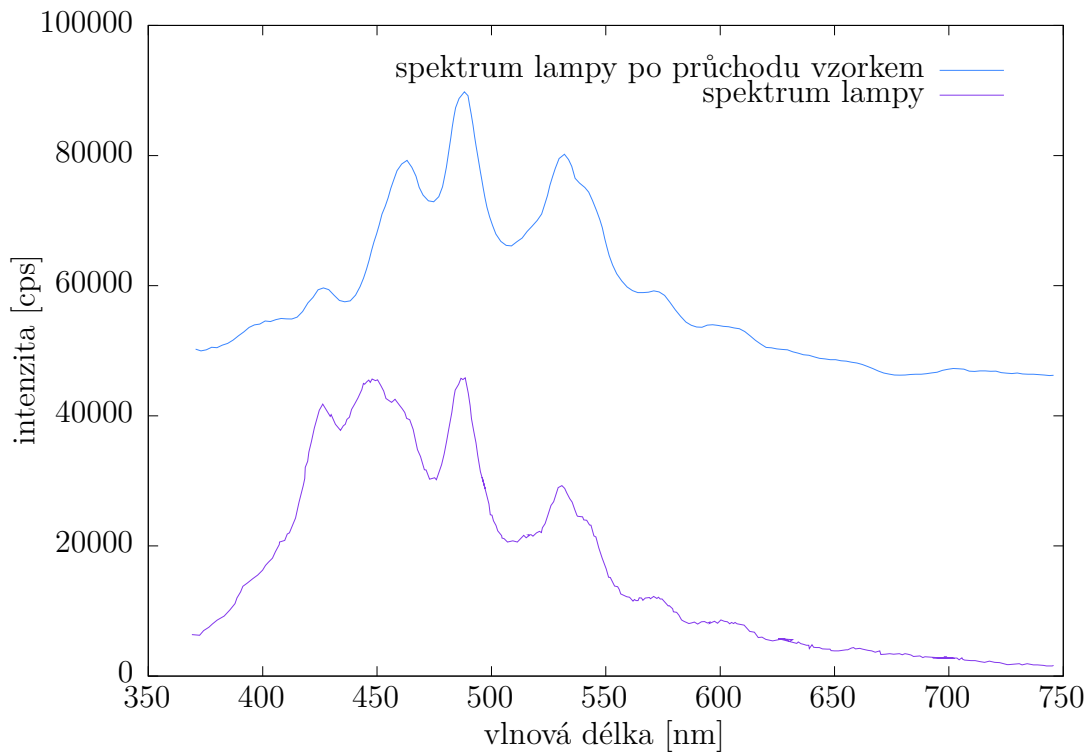
Obrázek 3.3: Směrodatné odchytky transientních spekter PS I pro různé časy po excitačním pulzu.



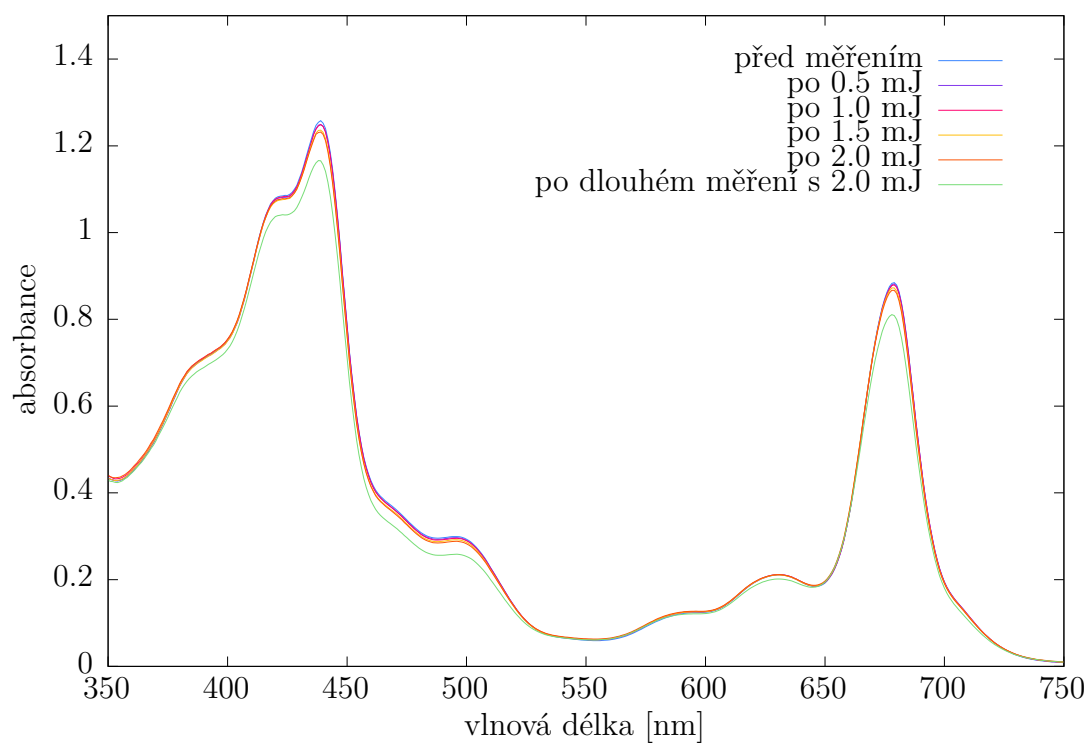
Obrázek 3.4: Transientní spektra PS I v čase 1000 ns pro různé energie excitačního pulzu.



Obrázek 3.5: Směrodatná odchyłka pro transientní spektra PS I v čase 1000 ns pro různé energie excitačního pulzu.



Obrázek 3.6: Spektrum lampy po průchodu vzorkem PS I a aparaturou (horní křivka, posunutá v ose y o 50 000 cps) a spektrum lampy po průchodu aparaturou (dolní křivka).



Obrázek 3.7: Změna absorbance vzorku po měřeních s různou energií excitačního pulzu.

3.2 Různé koncentrace vzorku

Tranzientní spektra jsme také změřili pro tři různé koncentrace vzorku v aerobních podmínkách a to s absorbancemi 0,4, 0,75 a 1,2.

Při měření jsme použili neprodlouženou gate (2 ns) a excitační pulz o intenzitě $(1,0 \pm 0,1)$ mJ pro dvě různé vlnové délky 440 nm a 670 nm.

Měřením se ukázalo, že koncentrace, na rozdíl od intenzity excitačního pulzu, pro pulz o vlnové délce 440 nm příliš neovlivňuje hodnotu výsledného signálu a v rámci chyby se spektra pro jednotlivé koncentrace shodují (viz ukázkový graf v 500 ns 3.8). Ostatní grafy byly opět velmi podobné.

Na koncentraci však naopak velmi závisí šum. Základní tvar křivky směrodatné odchylky lze opět vysvětlit průběhem intenzity měřicí lampy. (Viz obr. 3.6.) Odchytky pro různé koncentrace jsou nejvíce patrné v oblastech Q_y a Soretova pásu, kde vzorek nejvíce absorbuje (viz ukázkový graf 3.9 v 500 ns), kde je pro srovnání vyneseno i přeškálované absorpční spektrum PS I. Grafy spekter v časech 10 ns a 100 ns jsou uvedeny v příloze (A.3, resp. A.4). S vyšší koncentrací vzorku se absorbuje více záření a tím méně jej projde do detektoru. Z tohoto důvodu se do detektoru dostane jen velmi málo fotonů o příslušné energii a v těchto oblastech pozorujeme značný šum.

Z Lambert-Beerova zákona (2.2) však vyplývá, že absorbance závisí na koncentraci. Z tohoto důvodu by měl být signál pro vyšší koncentrace vyšší, neboť bude větší změna v absorbanci. Tento jev však u měření s vlnovou délkou excitačního pulzu 440 nm nebyl pozorován, na rozdíl od měření s vlnovou délkou 670 nm excitačního pulzu. Jedním z možných vysvětlení je kompenzace nárůstu signálu zvýšením rozptylu. S vyšším počtem molekul přibývá i možných rozptylových jader. Jelikož modré světlo je rozptylováno více než světlo o delších vlnových délkách, podporuje toto vysvětlení i měření při 670 nm (3.10), kdy je nárůst signálu patrný.

Je také velmi důležité na celý systém nahlížet z dynamického pohledu. Měření absorbance vzorku pro různé koncentrace na přístroji specord 250 totiž splňuje předpoklad, že s vyšší koncentrací se zvyšuje absorbance. Tento jev platí pro statická spektra vždy, což nám dokonce umožňuje na základě měření absorbance stanovit koncentraci. V průběhu celého experimentu jsme také takto koncentraci vzorků nepřímo popisovali.

Na rozdíl od statických spekter, při měření časově rozlišeného tranzientního spektra se v důsledku počátečního vysokoenergetického pulzu spektrum výrazně mění, podle toho, jak jsou obsazeny jednotlivé hladiny. Pás v oblasti 550 nm, kde pozorujeme změny nejvíce, se ve statických spektrech nevyskytuje. Odpovídá totiž přechodu z první tripletní hladiny karotenoidů na jednu z jejich vyšších excitovaných tripletních hladin (tento jev dosud nebyl velmi prozkoumán a neznáme tedy přesné energie jednotlivých hladin). Sem se ale excitace běžně nepřenáší, jelikož přechod ze singletní na tripletní hladinu je zakázaný. K těmto jevům dochází díky přenosu excitace z tripletního stavu chlorofylu. [24] Absorpce tedy v tomto případě závisí na koncentraci velmi komplikovaně.

S přibývajícím množstvím fotosystémů ve vzorku (tedy s nárůstem koncentrace) klesá pravděpodobnost, že jeden fotosystém pohltí více fotonů. Tudíž bude

ve fotosystému čekat více pigmentů v základním stavu připravených přenést excitaci blíže k reakčnímu centru. Jelikož přechod ze singletní na tripletní hladinu je zakázaný, trvá tento přechod dlouhou dobu. Aby s dostatečnou pravděpodobností došlo k přechodu, je třeba, aby pigment zůstal v excitovaném stavu co nejdéle. Doba setrvání v excitovaném stavu se však výrazně snižuje s množstvím dalších pigmentů v okolí, které jsou v základním stavu a tudíž jsou připraveny sejmout excitaci z vedlejších pigmentů. Tento jev jde tedy přímo proti jevu, kdy dochází k nárůstu signálu vlivem zvýšení počtu pigmentů ve vzorku.

Stejně měření jsme provedli pro excitační pulz o vlnové délce 670 nm a intenzitě $(1,0 \pm 0,1)$ mJ. K měření jsme připravili vzorky o koncentracích co nejpodobnějších použitým vzorkům u předchozího měření a to s absorbancemi 0,37, 0,7 a 1,2. Opět jsme měřili za standardních aerobních podmínek a neprodloužené gate.

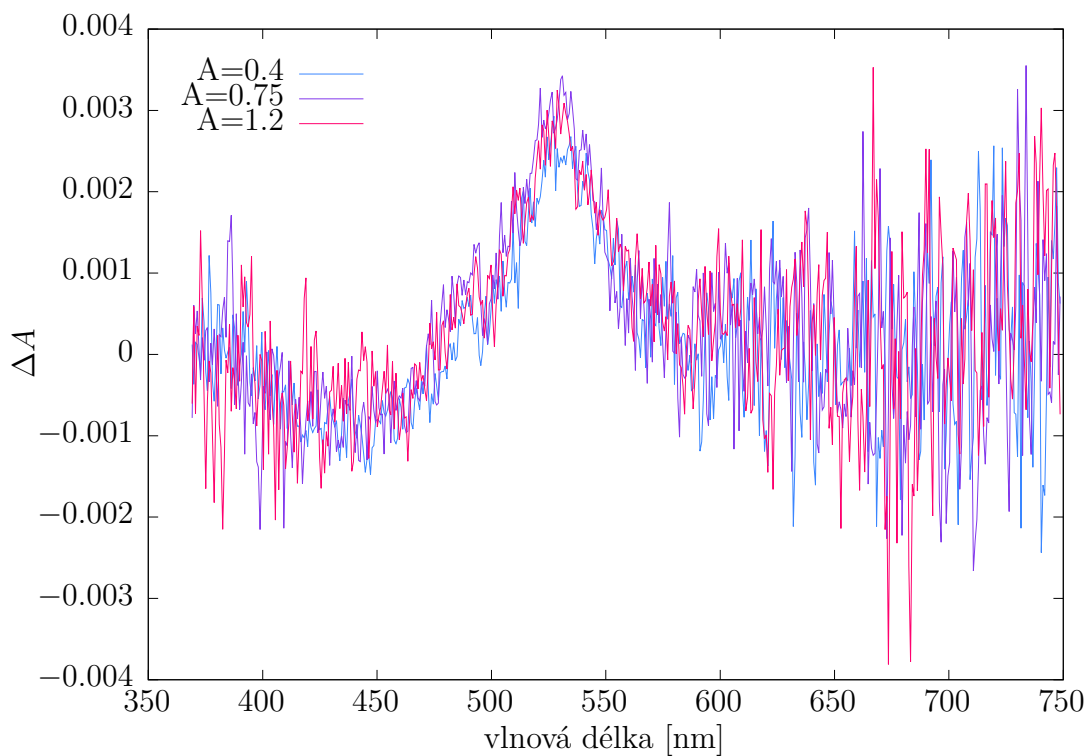
Naměřená data nyní více odpovídají původnímu předpokladu, na všech grafech pro časy 10 ns, 100 ns a 500 ns je patrný vyšší signál pro vzorky o větších koncentracích (viz ukázkový graf pro 500 ns 3.10). Grafy spekter v časech 10 ns a 100 ns jsou uvedeny v příloze, pro ukázkou, že zmíněný rozdíl pro různé koncentrace nebyl způsoben pouze náhodnou chybou měření v jednom čase (A.5, resp. A.6).

Nárůst však není dvojnásobný, při dvojnásobné koncentraci, jak bychom mohli očekávat a jak by vyplývalo z Lambert-Beerova zákona (2.2), jelikož — jak bylo již zmíněno výše — závislost signálu na koncentraci je výrazně složitější, jelikož koncentrace karotenoidů v tripletním stavu neodpovídá přímo koncentraci PS I ve vzorku.

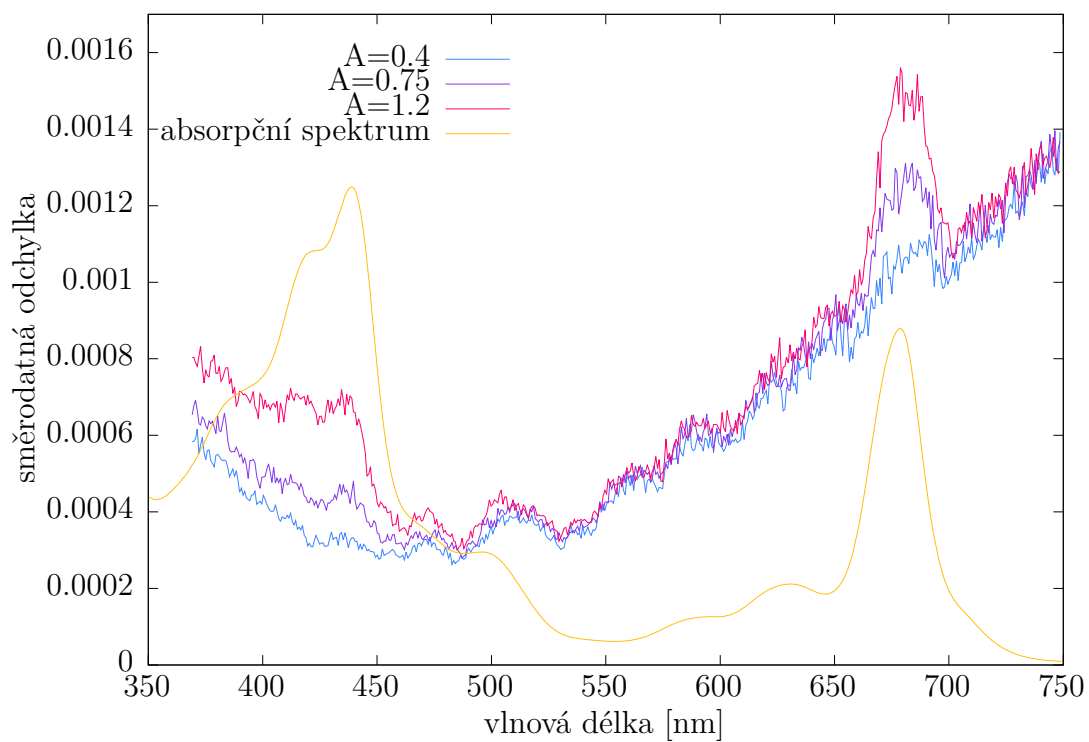
Spektrum směrodatných odchylek je schodné se spektrem pro excitaci na 440 nm, opět dochází v oblastech absorpčních pásů k nárůstu chyby, která je vyšší pro vzorky s vyšší koncentrací (viz ukázkové spektrum 3.11). Ty více absorbují a tudíž projde do detektoru méně světla.

S větší koncentrací tedy narůstá signál ale také narůstá šum. Pro určení ideální koncentrace nyní budeme zkoumat, pro který vzorek vychází co nejlepší (tedy co největší) poměr signálu k šumu. Jelikož v místě největšího signálu, v oblasti 550 nm se šum pro jednotlivé koncentrace téměř nelišil, zaznamenáváme také rozdíl poměru signálu k šumu pro různé koncentrace, tak jako tomu bylo u spektra tranzientní absorpce. V jiných částech spektra je rozdíl minimální (viz vybraný graf (3.12) v čase 500 ns). Stejný poměr jsme vynesly i pro spektrum s excitační vlnovou délkou 440 nm (viz 3.13), kde však (jako tomu bylo u tranzientního spektra) nevidíme žádnou závislost na koncentraci.

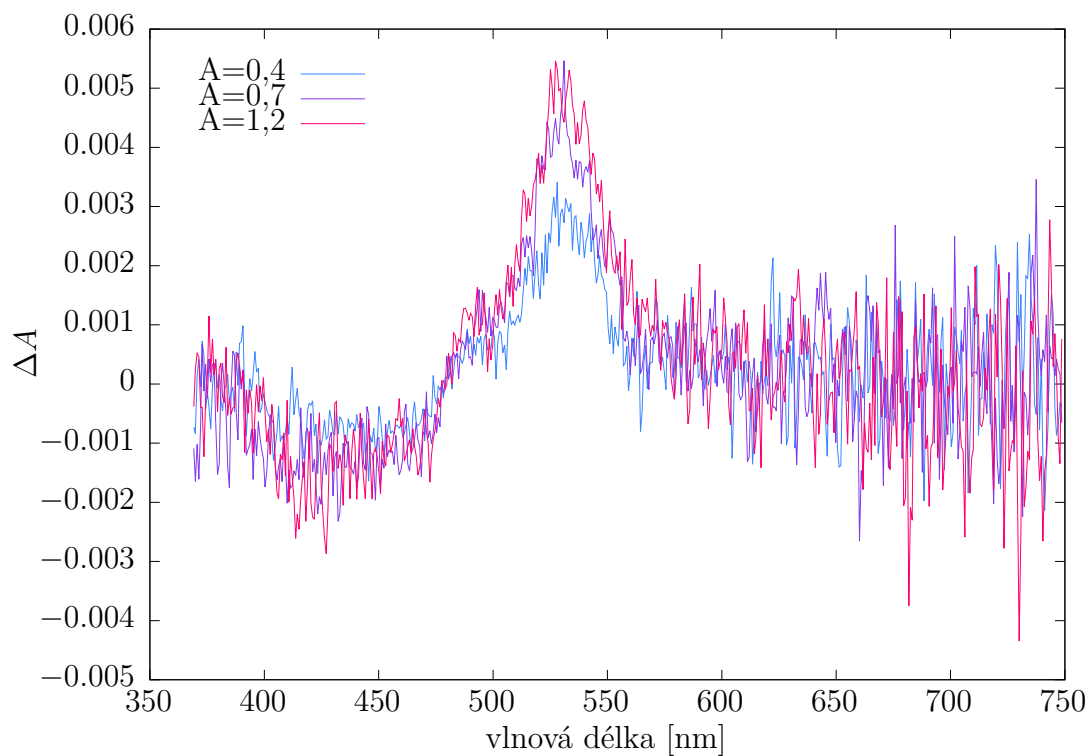
Z tohoto jsme došli k závěru, že vyšší koncentrace jsou pro měření lepší. Musíme se však ujistit, že koncentrace není příliš vysoká a do detektoru i v částech s vysokou absorpcí dopadá dostatek světla. Pro vzorek s absorbancí 1,2 byl v místech Sorretova a Q_y pásu signál na detektoru alespoň 1000 cps, což je ještě dostačující.



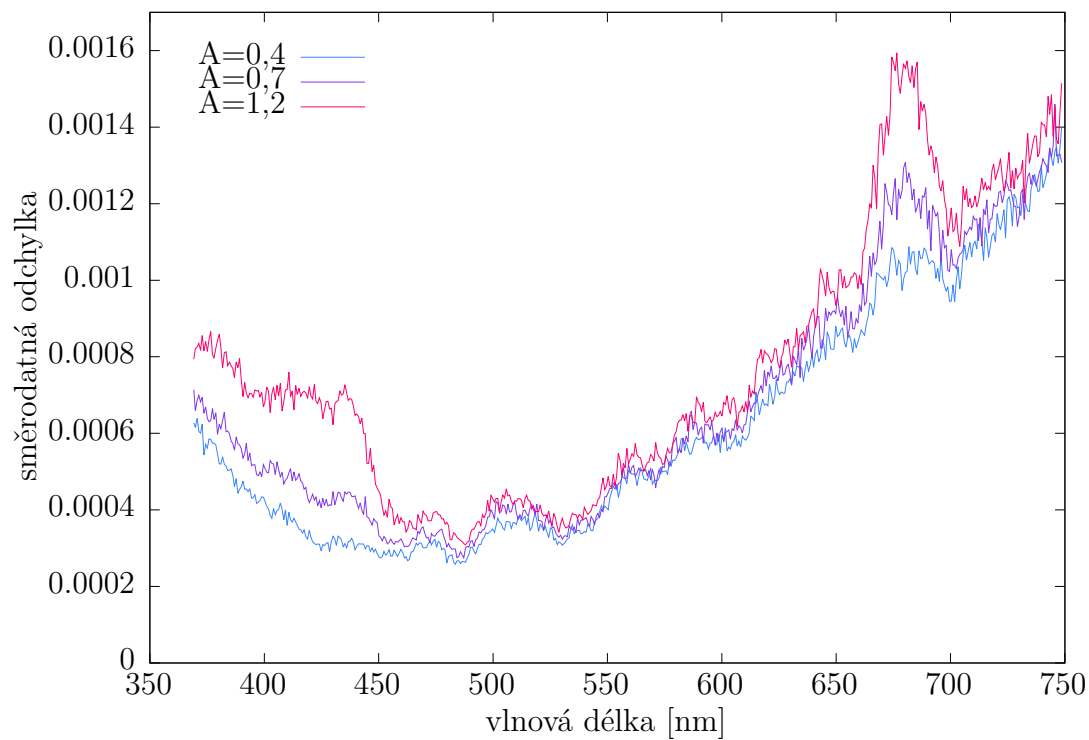
Obrázek 3.8: Transientní spektra PS I v čase 500 ns pro různé koncentrace vzorku a vlnovou délkou excitačního pulzu 440 nm.



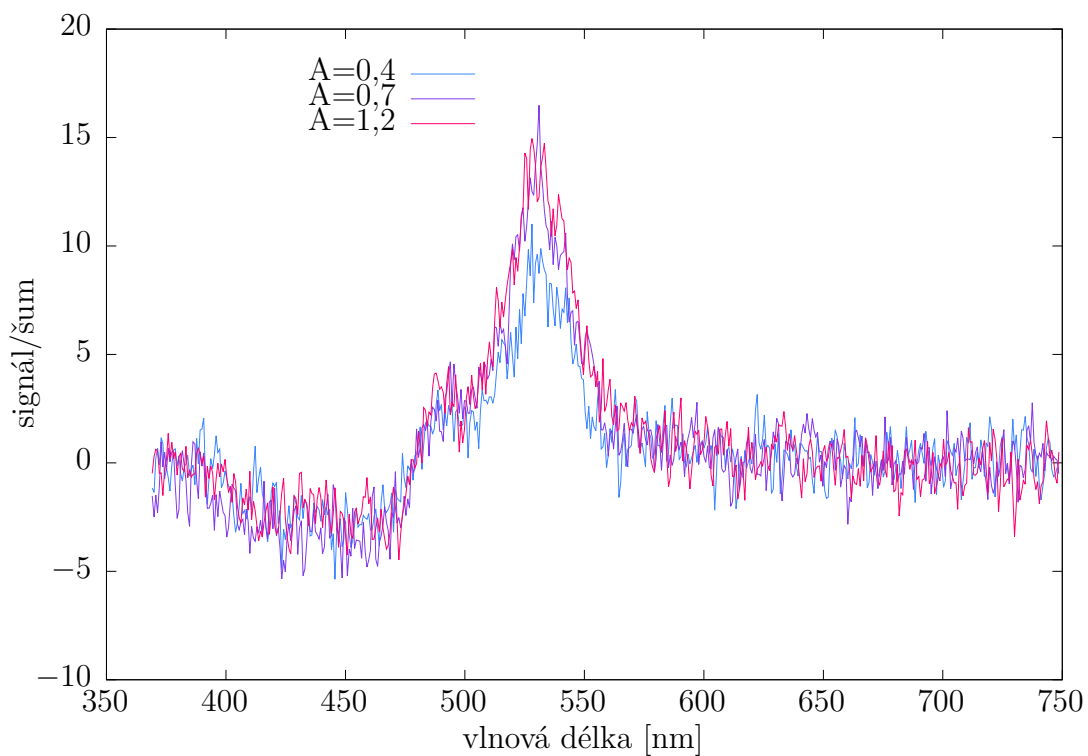
Obrázek 3.9: Směrodatná odchylka transientního spektra PS I v čase 500 ns pro různé koncentrace vzorku a vlnovou délkou excitačního pulzu 440 nm.



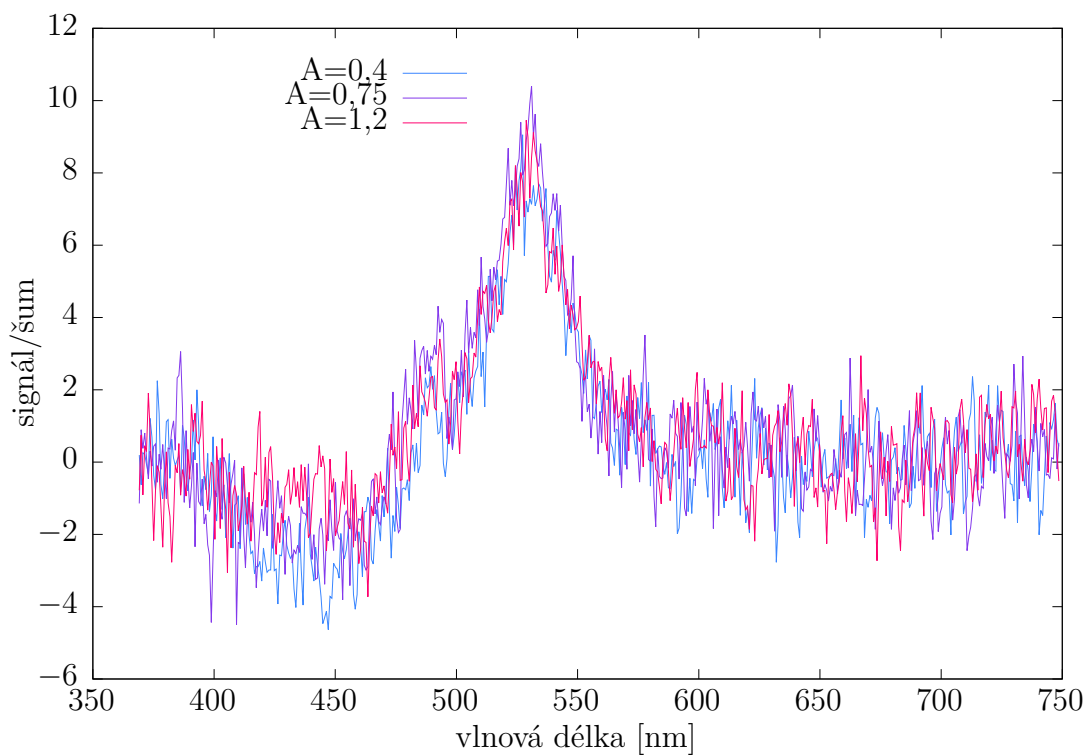
Obrázek 3.10: Transientní spektrum PS I v čase 500 ns pro různé koncentrace s vlnovou délkou excitačního pulzu 670 nm.



Obrázek 3.11: Směrodatná odchylka transientního spektra PS I v čase 500 ns pro různé koncentrace s vlnovou délkou excitačního pulzu 670 nm.



Obrázek 3.12: Podíl signálu k šumu transientního spektra PS I v čase 500 ns pro různé koncentrace s vlnovou délkou excitačního pulzu 670 nm.



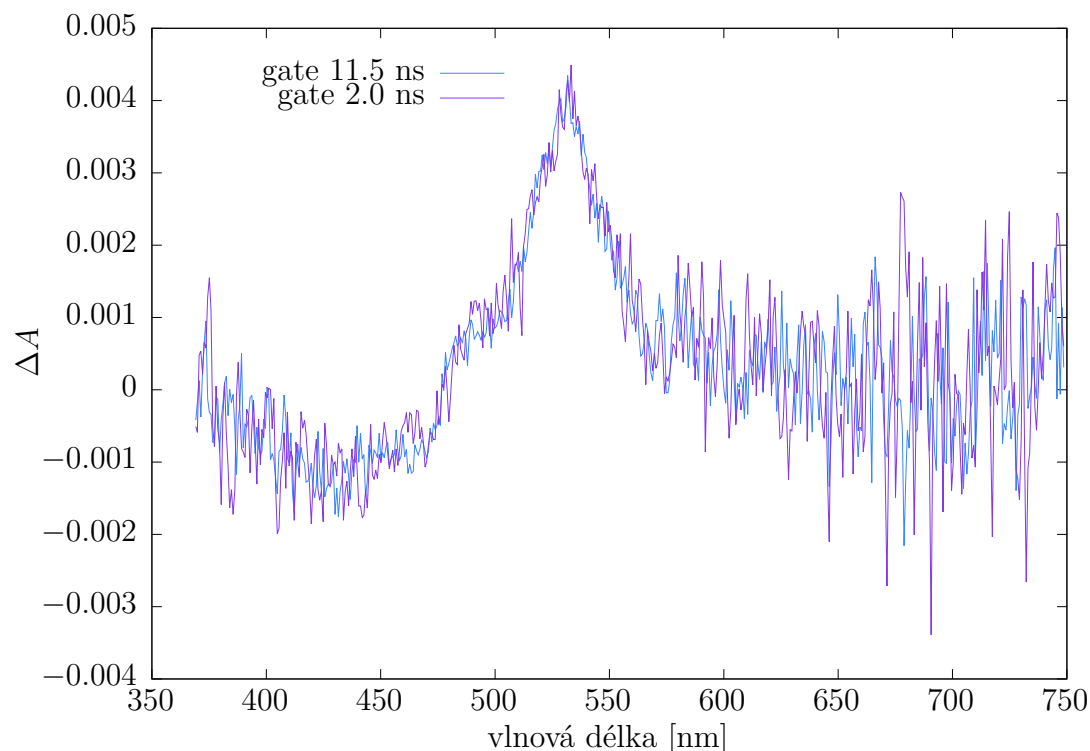
Obrázek 3.13: Podíl signálu k šumu transientního spektra PS I v čase 500 ns pro různé koncentrace s vlnovou délkou excitačního pulzu 440 nm.

3.3 Prodloužení gate

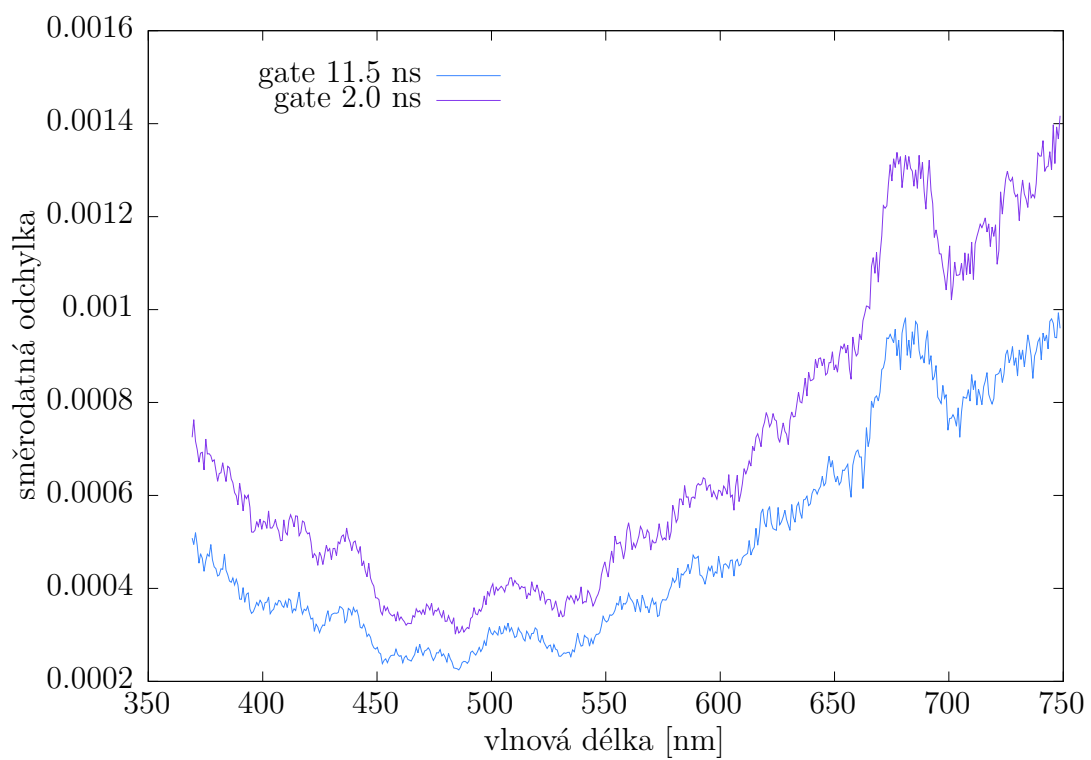
V pozdějších časech po excitačním pulzu není vývoj systému PS I a tudíž ani jeho tranzientního spektra příliš rychlý a lze signál na detektoru sbírat delší dobu. Intenzitu signálu jsme nastavili pomocí gain na přibližně stejnou hodnotu 50 000 cps. Při měření s prodlouženou gate jsme použili gate 11,5 ns, abychom dosáhli zmíněné intenzity signálu při nulovém zesílení (gain 0). Pro gate 2 ns byl signál zvýšen na potřebnou hodnotu zvýšením gain na 80. Měření bylo provedeno pro pozdější časy 100 ns, 500 ns a 2000 ns, neboť tam již není vývoj systému tak rychlý a můžeme signál sbírat po delší dobu bez větší ztráty rozlišení časového průběhu. I v takto pozdních časech byl signál dostatečný.

Na grafu 3.14 je patrné, že velikost tranzientního signálu nezávisí na velikosti gate. Rozdíl v obou měřeních je pouze ve zpracování měřicího svazku v CCD kaměře, kdy v prvním případě je zesílen v zesilovači a v druhém je naopak sbírán po delší dobu. Průběh spektra signálu tedy nemůže být odlišný (z tohoto důvodu neuvádíme spektra v dalších časech a to ani u směrodatných odchylek, které nejsou v pozdějších časech časově závislé, jak již bylo zmíněno výše).

Zvýšením gate jsme dosáhli výrazného snížení šumu, jak je patrné v grafu 3.15. To je v souladu s předpokladem a také s poznámkou v manuálu ke kaměře. [21]



Obrázek 3.14: Transientní spektrum PS I v čase 500 ns pro různé hodnoty gate.



Obrázek 3.15: Směrodatná odchylka transientního spektra PS I v čase 500 ns pro různé hodnoty gate.

3.4 Aerobní a anaerobní podmínky

Tripletní kyslík zháší excitaci všech pigmentů včetně tripletních stavů karotenoidů. V anaerobních podmínkách se tak prodlouží jejich doby života. (Viz kapitulu 1.4.)

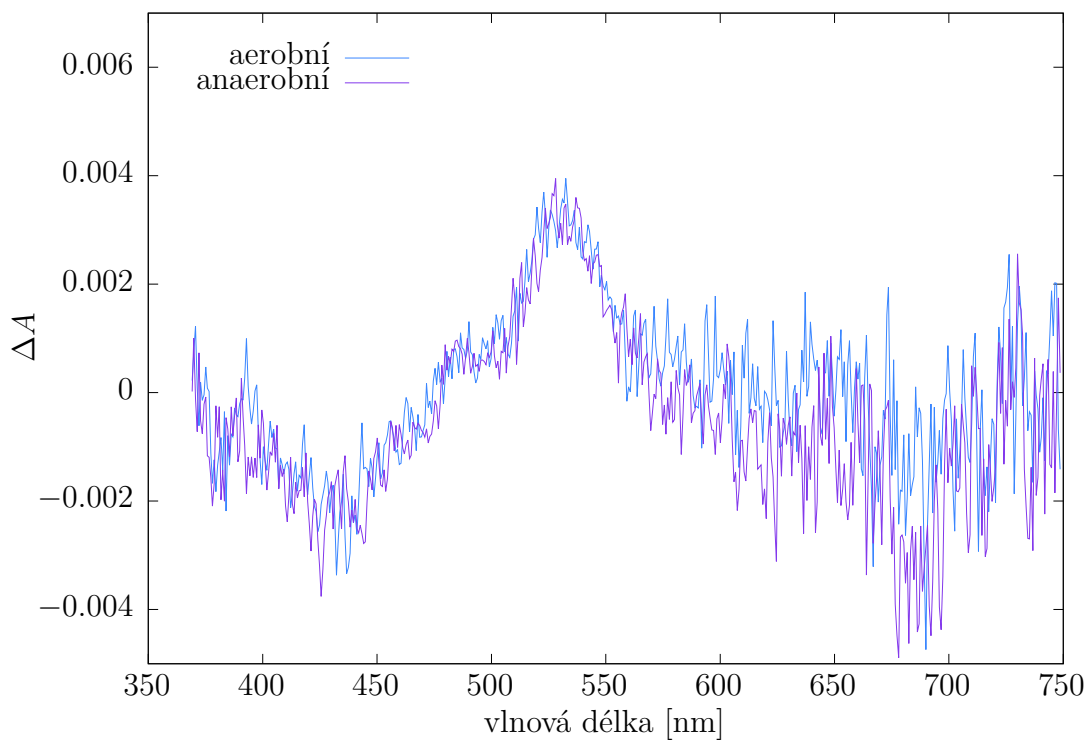
Pro určení dob života je třeba provést dlouhé měření, ze kterého získáme velké množství tranzientních spekter pro různé časové zpoždění po pulzu. V kratších časech je vývoj rychlejší a je třeba postupovat po malých časových úsecích. V pozdějších časech mohou mít od sebe spektra větší časové rozestupy.

Pro toto měření jsme použili vzorek o absorbanci 0,8. Pro anaerobní podmínky jsme připravili vzorek s větším objemem a o nižší koncentraci ($A=0,6$), jelikož v průběhu bublání se odpaří část pufu. Výsledný vzorek měl absorbanci 0,9. Excitovali jsme pulzem o energii $(1,2 \pm 0,1)$ mJ a vlnové délce $\lambda = 670$ nm.

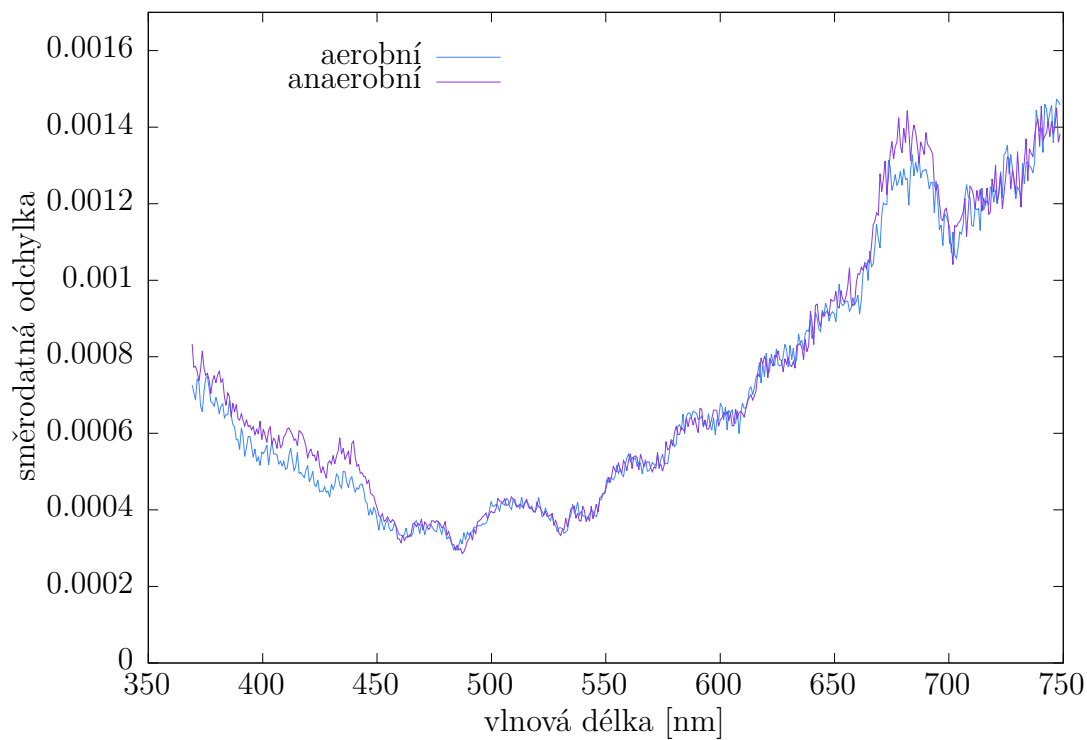
Zpracováním dat ve fitovacím programu jsme určili dobu života tripletního stavu T_1 karotenoidu při aerobních podmínkách jako $\tau_{\text{aer.}} = 4 \mu\text{s}$. Po odstranění kyslíku foukáním se doba života zdvojnásobila na $\tau_{\text{anaer.}} = 8 \mu\text{s}$.

V kratších časech (13 ns v grafu 3.16) je signál u obou vzorků srovnatelný, jelikož přenos excitace mezi tripletní hladinou chlorofylů a karotenoidů se projevuje až v pozdějších časech (z důvodu malé rychlostní konstanty mezisystémového přechodu ze singletní na tripletní hladinu chlorofylu). Tedy i zhášení excitace tripletní hladinou kyslíku se projeví až později. Později již můžeme pozorovat, že v oblasti 550 nm je signál vzorku v anaerobních podmínkách výrazně větší (viz grafy 3.18 v čase 100 ns, 3.20 v 780 ns, 3.24 v 5000 ns a především v čase 1180 ns graf 3.22).

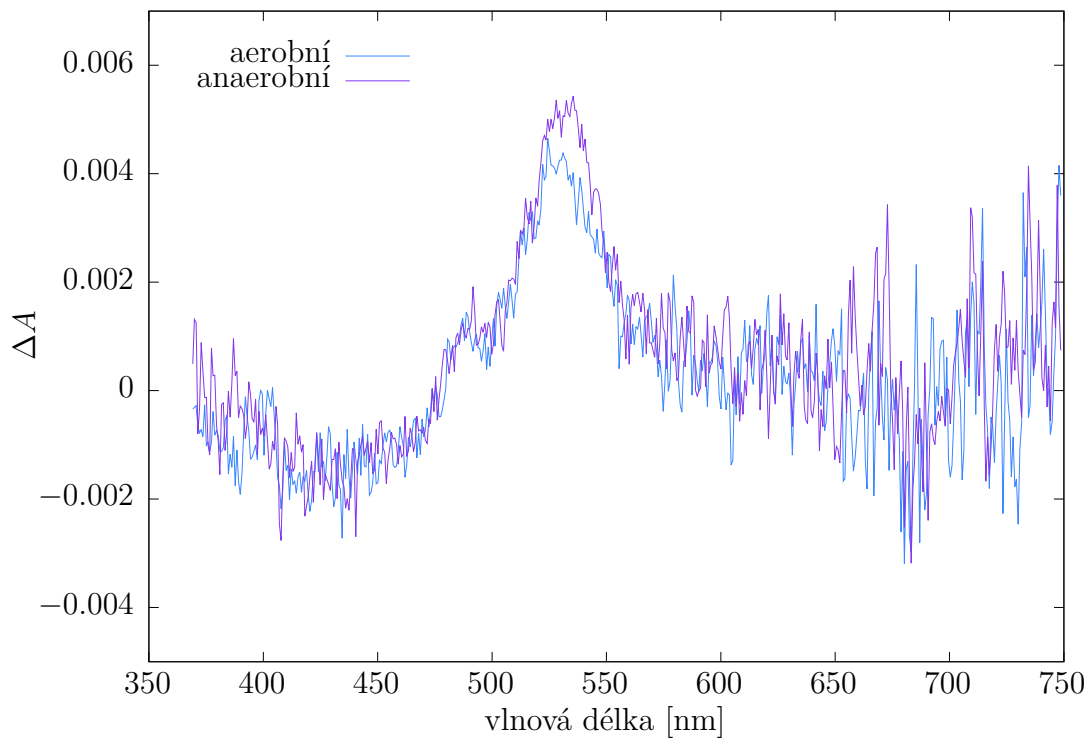
Spektrum směrodatných odchylek (3.17, 3.19, 3.21, 3.23 a 3.25) se v aerobním a anaerobním případě příliš neliší. Drobné odchylky můžeme pozorovat v oblasti Sorretova a Q_y pásu způsobené mírně odlišnou koncentrací obou vzorků.



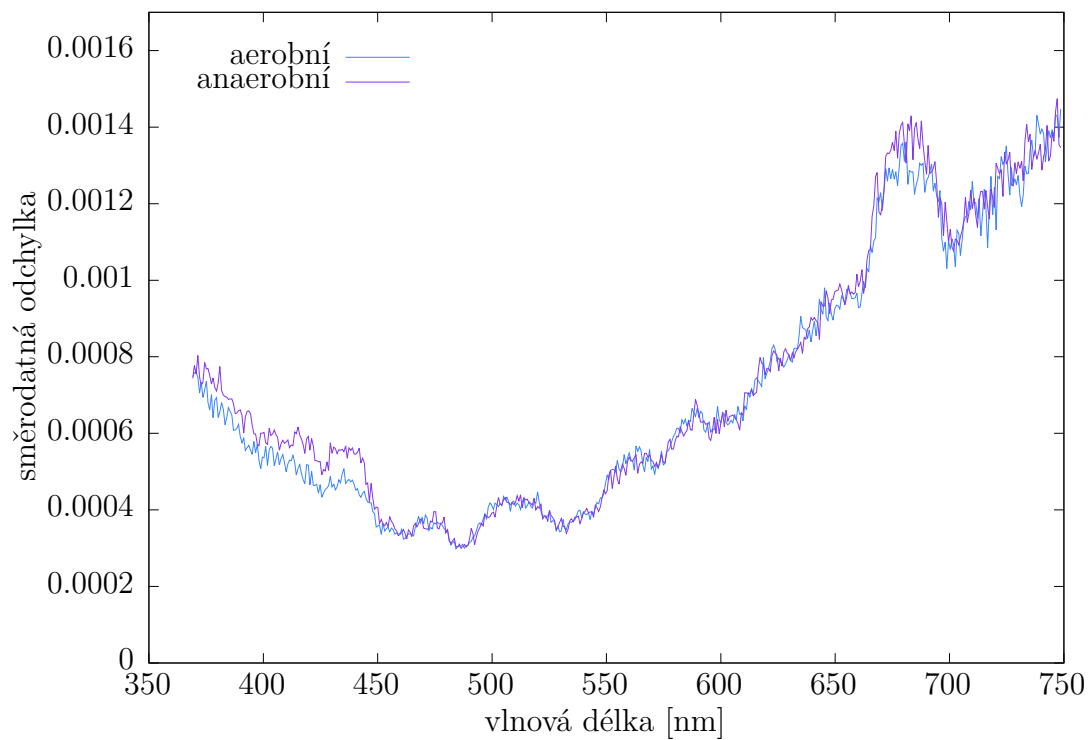
Obrázek 3.16: Transientní spektra PS I v čase 13 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



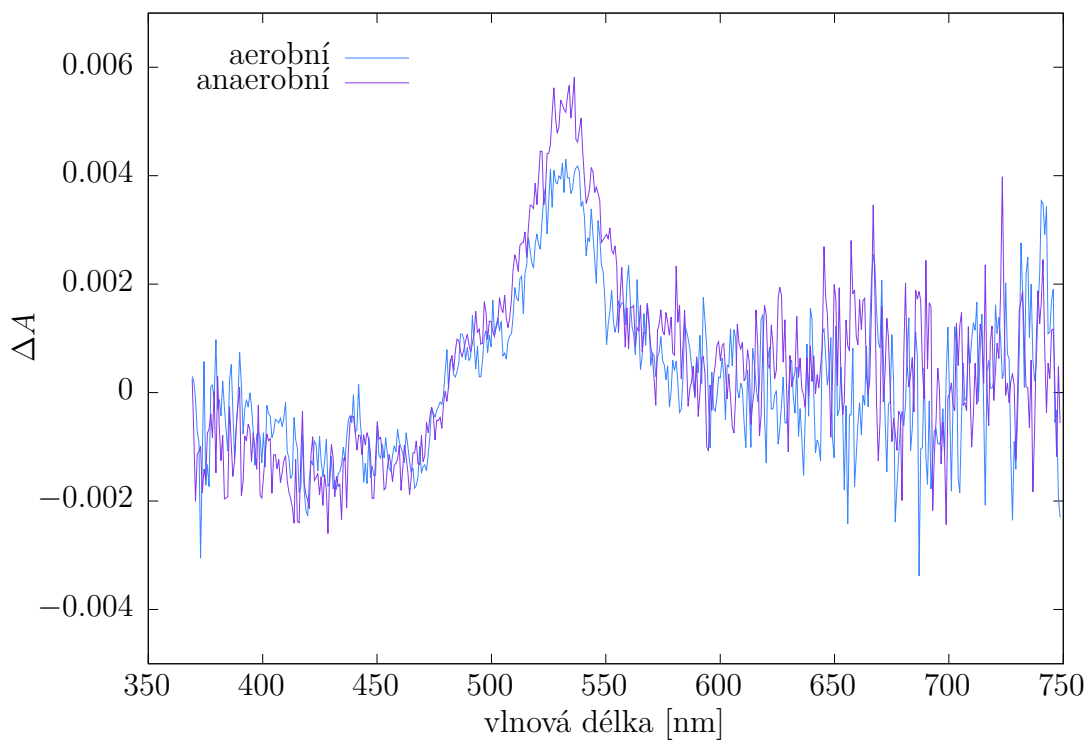
Obrázek 3.17: Směrodatná odchylka pro transientní spektra PS I v čase 13 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



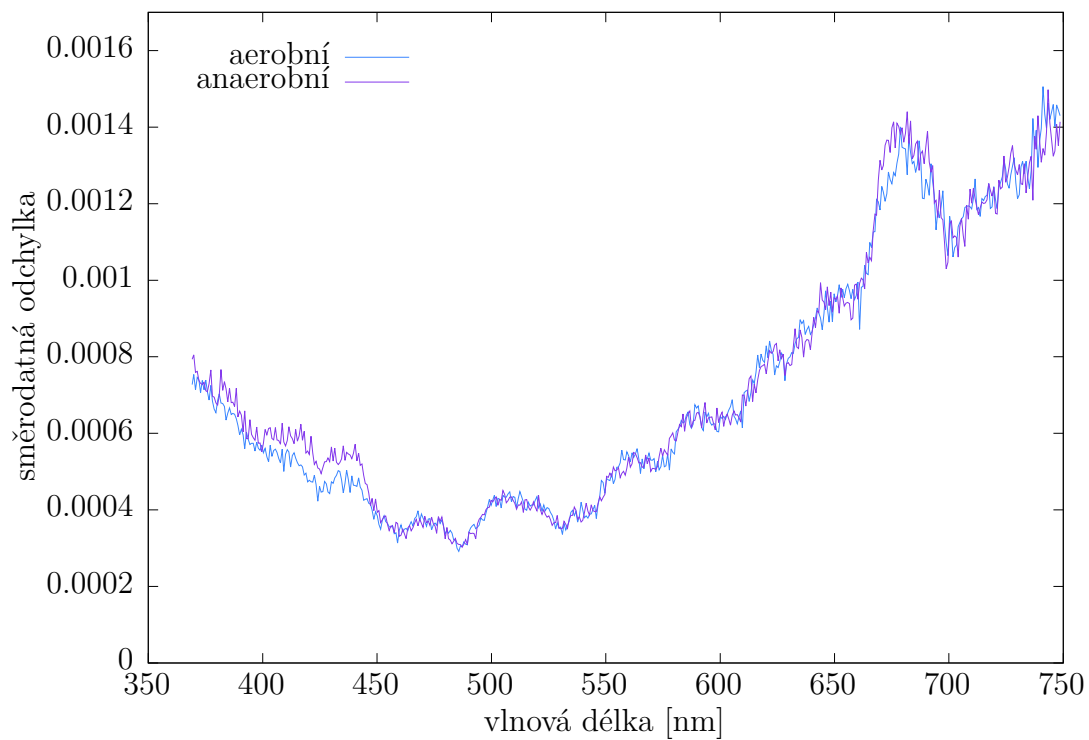
Obrázek 3.18: Transientní spektra PS I v čase 100 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



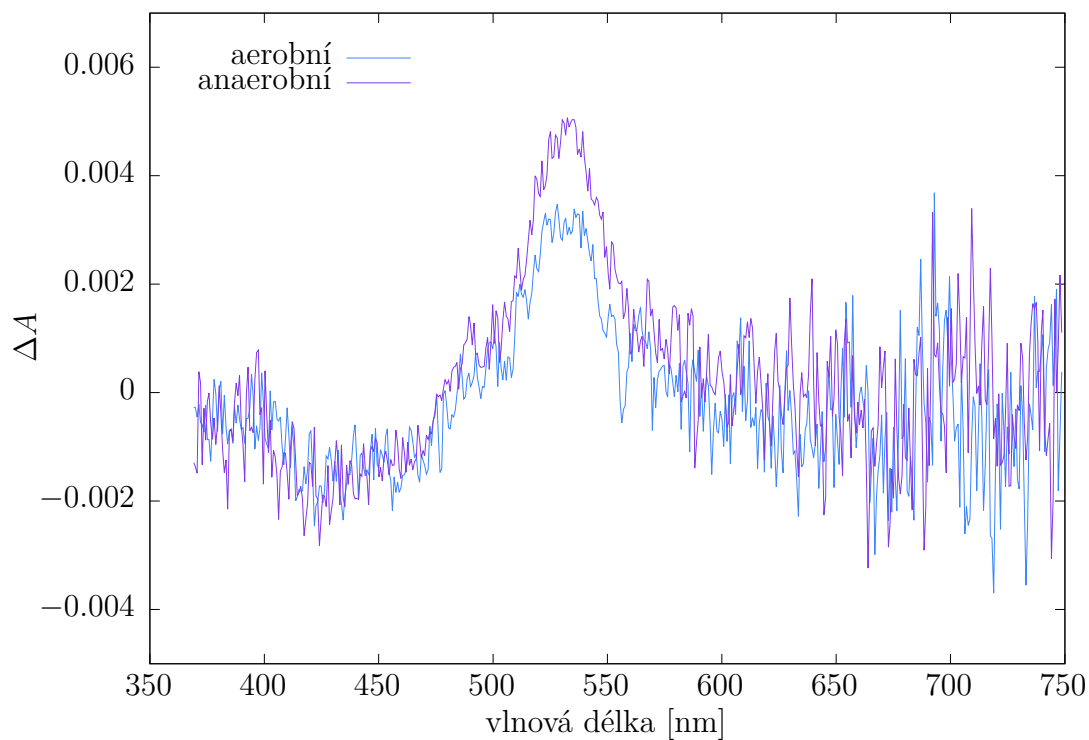
Obrázek 3.19: Směrodatná odchylka pro transientní spektra PS I v čase 100 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



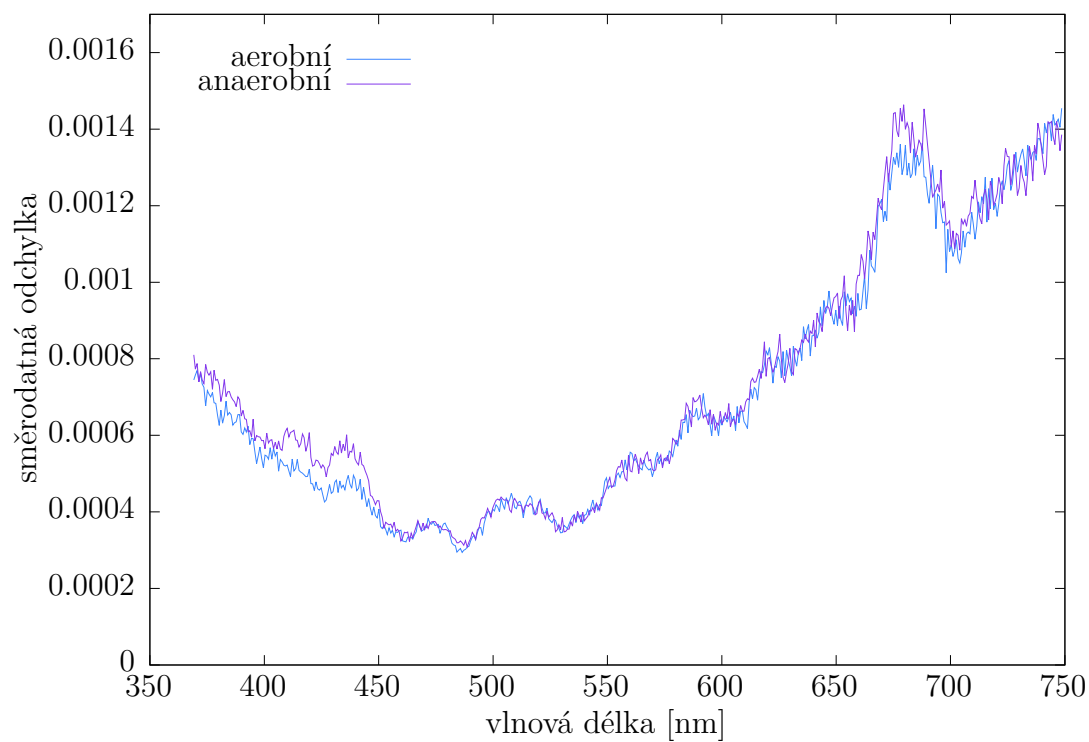
Obrázek 3.20: Transientní spektra PS I v čase 780 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



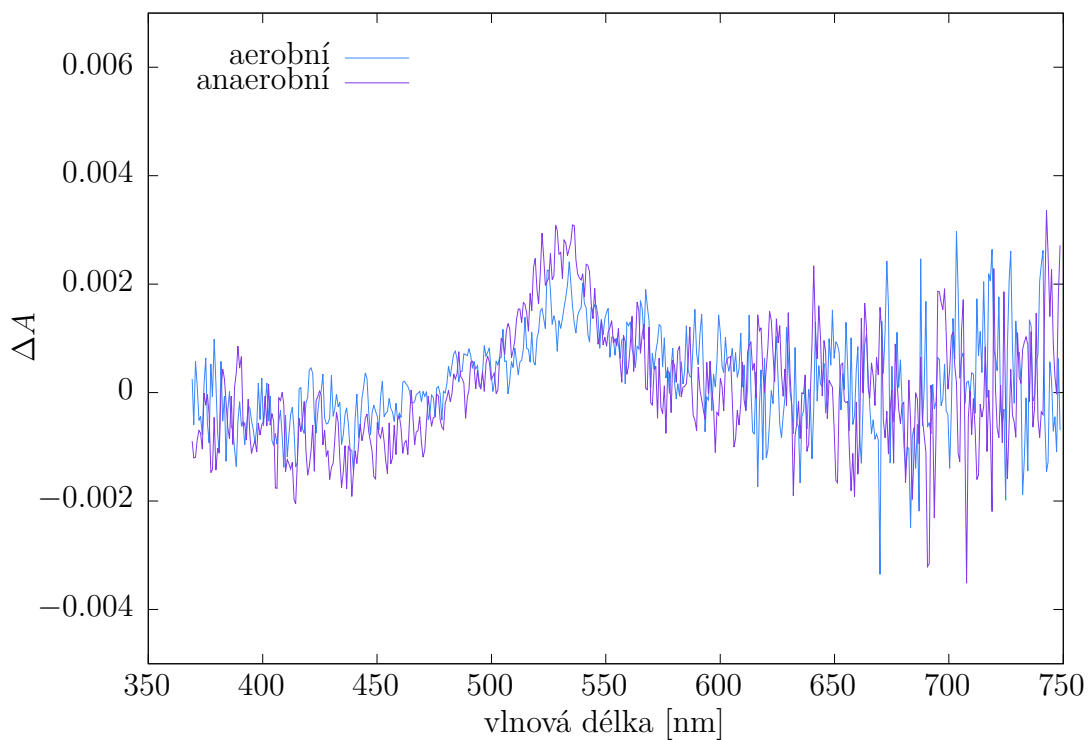
Obrázek 3.21: Směrodatná odchylka pro transientní spektra PS I v čase 780 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



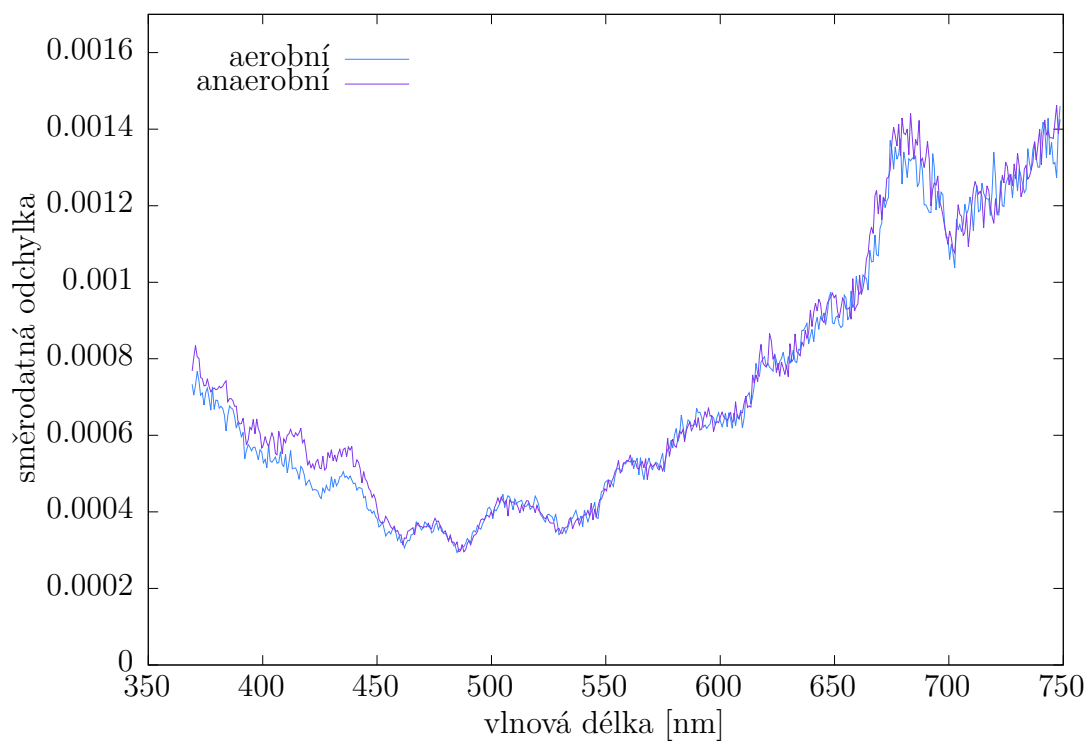
Obrázek 3.22: Transientní spektra PS I v čase 1180 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



Obrázek 3.23: Směrodatná odchylka pro transientní spektra PS I v čase 1180 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



Obrázek 3.24: Transientní spektra PS I v čase 5000 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



Obrázek 3.25: Směrodatná odchylna pro transientní spektra PS I v čase 5000 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.

3.5 Měření s ideálním nastavením

Na závěr jsme změřili časově závislé spektrum PS I, při kterém jsme použili nastavení, které bylo v předchozích měřeních vyhodnoceno jako ideální.

Pro měření jsme připravili vzorek s absorbcí 0,6, po bublání dosáhl absorpce 0,75.

Anaerobní podmínky zlepšují poměr signálu k šumu, protože se výrazně mění (prodlužuje) doba života tripletního stavu karotenoidů. Navíc, v případě, že chceme zjistit vlastní doby života, musíme vzorek studovat v anaerobním prostředí. Pro srovnání zde uvádíme také měření v aerobních podmínkách, kde jsou ale ostatní parametry nastaveny tak, aby byl dosažen co nejlepší poměr signálu k šumu.

K měření byl použit vzorek s absorbcí 0,95, ta se výrazně liší od absorpce vzorku v aerobních podmínkách. Původním záměrem bylo připravit oba vzorky s absorbcí kolem 0,9, jelikož jak vyplývá z kapitoly 3.2, s větší koncentrací roste poměr signálu k šumu v oblasti absorpce tripletů karotenoidu. Na základě předchozích poznatků, že při bublání dusíkem se vypaří velké množství rozpouštědla, byl jeden ze vzorků připraven s výrazně menší koncentrací (absorbance 0,6), aby po bublání dosáhl absorpce kolem 0,9. Nicméně dosud se nám nepodařilo předpovědět, kolik rozpouštědla se vypaří za dobu, co vzorek bubláme. Odpařilo se výrazně méně rozpouštědla, než jsme na základě předchozích měření očekávali. Výsledný vzorek byl tak stále velmi zředěn a měl absorpci 0,75. Jednoduchým řešením je nejprve připravit vzorek v anaerobních podmínkách a naměřené koncentraci uzpůsobit ředěním druhého vzorku. Tento postup jsme však nemohli provést z časových důvodů.

Excitovali jsme pulzem o energii $(2,0 \pm 0,2)$ mJ a vlnové délce 670 nm. Do času 100 ns jsme měli gate 2 ns, poté jsme ji automaticky programem přepnuli na 12 ns.

Program ovládající aparaturu v průběhu měření neumožňuje změnu pozadí. Jak pro spektra v časech do 100 ns, kde byla použita nezkrácená gate 2 ns, tak pro pozdější časy s gate 12 ns, se od spekter odečítalo stejné pozadí. Jak již bylo uvedeno dříve, s různým nastavením gain se spektrum pozadí mírně liší. [21]

Jinou možností by bylo změřit nejprve kratší časy, pak změnit gate a gain, přeměřit pozadí a naměřit spektra v pozdějších časech. Zde bychom ale přišli o možnost měřit spektra v náhodném pořadí. Měření by tedy mohlo být zatíženo chybou způsobenou tím, že vzorek by byl při druhé části měření exponován delší dobu a tudíž by se mohlo projevit jeho částečné poškození.

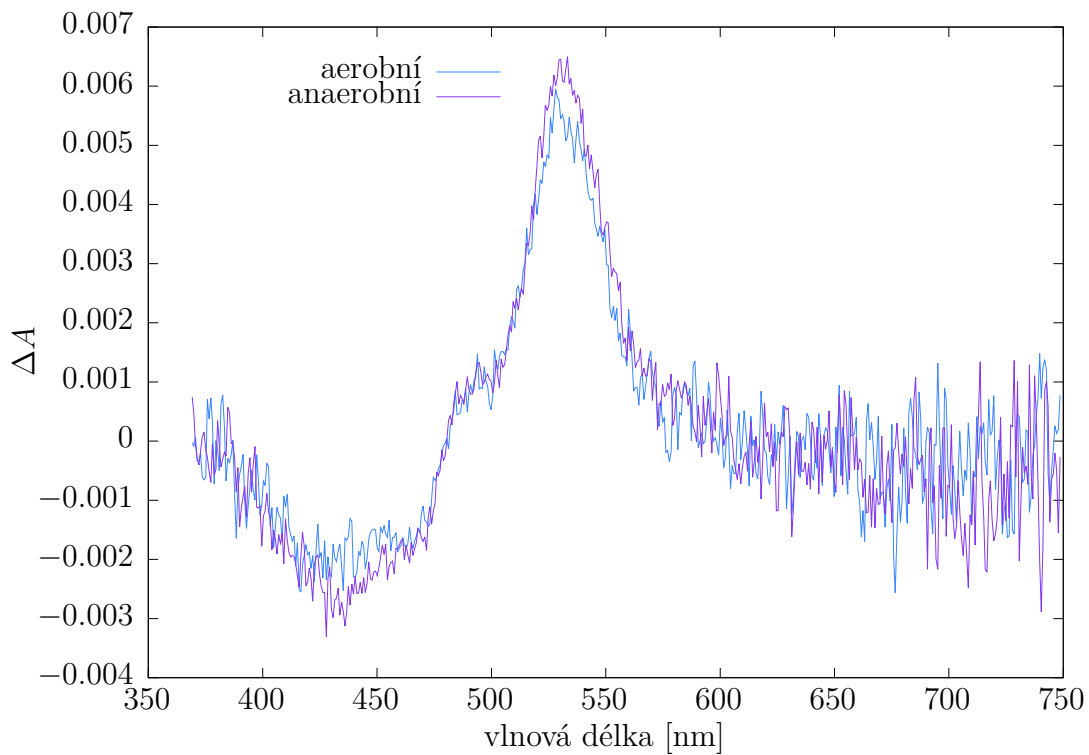
Spektrum pozadí pro nastavení gain 0 a gate 12 ns respektive gain 77 a gate 2 ns se liší pouze o cca 2 cps, což je velmi zanedbatelný rozdíl oproti spektrům ze samotného experimentu, které mají maximální intenzitu kolem 50 000 cps.

Z tohoto důvodu jsme se rozhodli využít první postup, změřit všechny časy v rámci jednoho měření s jedním pozadím.

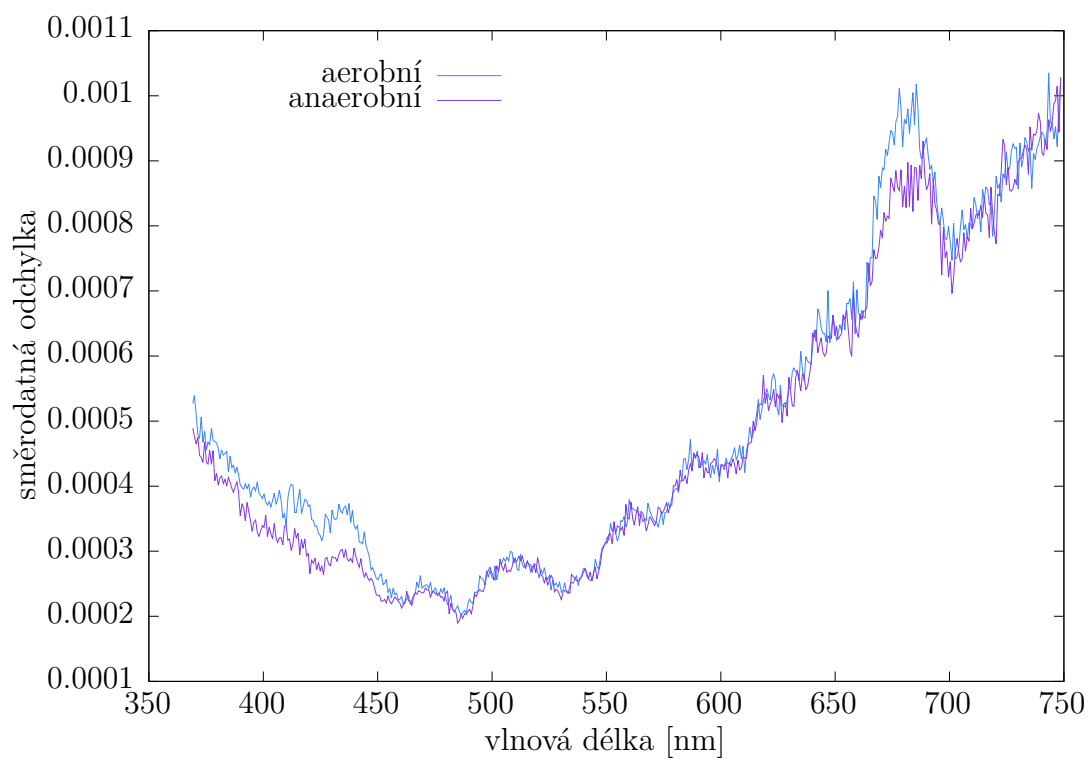
Na grafu vidíme, že v čase 1180 ns dosahuje směrodatná odchylka maximálně hodnoty 0,001, přičemž je trochu vyšší pro aerobní měření z důvodu větší koncentrace vzorku. V jiných měřeních (např. 3.23 s neprodlouženou gate odchylky dosahují až 0,0014, což je o 50% více.

Volbou velké excitační energie jsme pak dosáhli velkého signálu v oblasti 550 nm, kde pozorujeme absorpci tripletního stavu karotenoidů. (Viz graf 3.26.)

Největšího rozdílu v podílu signál/šum ve všech částech spektra docílíme právě prodloužením gate v pozdějších časech. V kratších časech lze pak největšího zlepšení dosáhnout použitím co největší energie excitačního pulzu (pro všechny časy stejné).



Obrázek 3.26: Transientní spektrum PS I v čase 1180 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.



Obrázek 3.27: Směrodatná odchylka transientního spektra PS I v čase 1180 ns pro aerobní a anaerobní podmínky.

Závěr

Hlavním cílem práce byla optimalizace poměru signálu k šumu tranzientních spekter fotosystému I pomocí změn nastavení měřicí aparatury a vlastností použitého vzorku.

Zvětšení signálu bylo dosaženo především zvětšením energie excitačního pulzu až na 2 mJ, kdy ale stále nedochází k většímu poškození vzorku. Po dvouhodinovém měření klesla absorbance vzorku o 10% a navíc nikoliv selektivně, což považujeme za přípustnou degradaci. Při zvýšení energie excitačního pulzu z 0,5 mJ na 2 mJ se zvětšil signál v oblasti tripletu karotenoidů (v čase 1000 ns) z 0,0025 na 0,0065, tedy téměř třikrát.

Jelikož jsme energii pulzu korigovali filtry, nikoliv nastavením samotného laseru, bylo kolísání stejné pro všechny použité energie a tudíž směrodatná odchylka nezávisela na velikosti excitační energie.

Koncentrace vzorku ovlivňovala signál při excitaci s vlnovou délkou 670 nm, u excitace s kratší vlnovou délkou 440 nm jsme rozdílů nepozorovali. V oblasti 550 nm, kde leží pás absorpce tripletního stavu karotenoidů, byl s rostoucí koncentrací vzorku patrný nárůst signálu. Závislost však nebyla lineární, jelikož souvislost mezi počtem karotenoidů v tripletním stavu a koncentrací fotosystému I ve vzorku je složitější. Absence rozdílu signálu pro různé koncentrace při excitaci pulzem o vlnové délce 440 nm byla pravděpodobně způsobena zvýšenou rozptýleností vzorku, která kompenzovala předpokládaný nárůst signálu, zvýšeného v důsledku větší koncentrace vzorku.

Z poměru signálu k šumu vyplývá, že v případě části spektra okolo 550 nm (absorpce tripletního stavu karotenoidů), je výhodnější používat více koncentrované vzorky (absorbance kolem 1,0).

Jednoznačně největšího zlepšení šumu, tedy snížení směrodatné odchylky, jsme dosáhli snížením zesílení signálu (gain) a prodloužením gate — doby po kterou CCD kamera zaznamenává signál. Při změně parametrů z gain 80 a gate 2 ns na gain 0 a gate 11,5 ns klesla směrodatná odchylka o 0,0004 pro vlnovou délku 750 nm z 0,0014 na 0,0010, téměř stejný pokles byl zaznamenán po celé délce spektra.

Nevýhodou tohoto postupu je částečná ztráta časového rozlišení, z tohoto důvodu přepínáme na delší gate až v pozdějších časech (od 100 ns), kdy jsou procesy pomalejší a tudíž vliv prodloužení gate na určení dob života zanedbatelný. Zároveň je v těchto časech transientní signál výrazně slabší než v krátkých časech a proto zlepšení poměru signálu k šumu výrazně přispívá k celkovému zvýšení kvality naměřených dat.

Dále jsme chtěli zjistit vliv přítomnosti kyslíku. V pozdějších časech jsme pozorovali výrazný rozdíl ve velikosti signálu v aerobních a anaerobních podmínkách způsobený tím, že kyslík zhaší tripletní stavy karotenoidů. V aerobních podmínkách tedy docházelo k poklesu signálu v oblasti 550 nm, kde tripletty karotenoidů absorbují. Pomocí časově rozlišené tranzientní absorpce se nám také podařilo určit, že doba života tripletního stavu karotenoidů se zvýšila z $\tau_{\text{aer.}} = 4 \mu\text{s}$ při aerobních na $\tau_{\text{anaer.}} = 8 \mu\text{s}$ při anaerobních podmínkách.

Důležitou výhodou anaerobních podmínek je pak vyšší odolnost PS I, neboť nedochází k tvorbě singletního kyslíku a tedy případnému poškození.

Výsledkem práce je tedy nalezení podmínek, při nichž můžeme dosáhnout až třikrát většího signálu a až 1,4x menší směrodatné odchylky měření.

Na práci by šlo dále navázat detailním zpracováním časového průběhu a určením rychlostních konstant při použití optimálního nastavení zlepšujícího výsledný signál. Dalším z budoucích cílů by mohla být optimalizace použití vyšších excitačních energií než doposud v kombinaci se snížením počtu měřených spekter tak, aby nedošlo k přílišné degradaci vzorku a porovnání kvality signálu s dosavadními měřeními.

Seznam použité literatury

- [1] Robert E Blankenship. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. John Wiley & Sons, 2014.
- [2] Geoffrey Ian McFadden. Primary and secondary endosymbiosis and the origin of plastids. *Journal of Phycology*, 37(6):951–959, 2001.
- [3] Jingjie Yu, Michelle Liberton, Paul F Cliften, Richard D Head, Jon M Jacobs, Richard D Smith, David W Koppenaar, Jerry J Brand, and Himadri B Pakrasi. *Synechococcus elongatus* utex 2973, a fast growing cyanobacterial chassis for biosynthesis using light and co2. *Scientific reports*, 5(1):1–10, 2015.
- [4] Allison ML Van De Meene, Martin F Hohmann-Marriott, Wim FJ Vermaas, and Robert W Roberson. The three-dimensional structure of the cyanobacterium *synechocystis* sp. pcc 6803. *Archives of Microbiology*, 184(5):259–270, 2006.
- [5] WS Chow. Photosynthesis: from natural towards artificial. *Journal of biological physics*, 29(4):447–459, 2003.
- [6] F. Rebeille and R. Douce. *Biosynthesis of Vitamins in Plants Part A: Vitamins A, B1, B2, B3, B5*. ISSN. Elsevier Science, 2011.
- [7] Nan Gong, Zuowei Li, Chenglin Sun, and Zhiwei Men. External field effect on electronic and vibrational properties of carotenoids. *Progress in Carotenoid Research*, 2018.
- [8] Fabrice Rébeillé, Roland Douce, et al. Biosynthesis of vitamins in plants-part b. *Advances in Botanical Research*, 59, 2011.
- [9] Anton Puzorjov, Katherine E Dunn, and Alistair J McCormick. Production of thermostable phycocyanin in a mesophilic cyanobacterium. *Metabolic engineering communications*, 13:e00175, 2021.
- [10] Patrick Jordan, Petra Fromme, Horst Tobias Witt, Olaf Klukas, Wolfram Saenger, and Norbert Krauß. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem i at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411(6840):909–917, 2001.
- [11] Jakub Pšenčík. Studijní text k úloze optická spektroskopie s nanosekundovým rozlišením, praktikum z experimentálních metod biofyziky a chemické fyziky.
- [12] Ivo S Vinklerek, Till LV Bornemann, Heiko Lokstein, Eckhard Hofmann, Jan Alster, and Jakub Psencik. Temperature dependence of chlorophyll triplet quenching in two photosynthetic light-harvesting complexes from higher plants and dinoflagellates. *The Journal of Physical Chemistry B*, 122(38):8834–8845, 2018.

- [13] Daisuke Kosumi, Tomoya Nishiguchi, Yutaka Amao, RJ Cogdell, and Hideki Hashimoto. Singlet and triplet excited states dynamics of photosynthetic pigment chlorophyll a investigated by sub-nanosecond pump-probe spectroscopy. *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*, 358:374–378, 2018.
- [14] Daniel A Hartzler, Dariusz M Niedzwiedzki, Donald A Bryant, Robert E Blankenship, Yulia Pushkar, and Sergei Savikhin. Triplet excited state energies and phosphorescence spectra of (bacterio) chlorophylls. *The Journal of Physical Chemistry B*, 118(26):7221–7232, 2014.
- [15] David R Kearns. Physical and chemical properties of singlet molecular oxygen. *Chemical Reviews*, 71(4):395–427, 1971.
- [16] Arjen Amelink, Dominic J Robinson, and Henricus JCM Sterenborg. Confidence intervals on fit parameters derived from optical reflectance spectroscopy measurements. *Journal of biomedical optics*, 13(5):054044, 2008.
- [17] Charis Anastopoulos. Decays of unstable quantum systems. *International Journal of Theoretical Physics*, 58(3):890–930, 2019.
- [18] Petr Malý. *Optika*. Karolinum, 2008.
- [19] Ocean Optics, Inc. *NeoFox Phase Fluorometer, Installation and Operation Manual*.
- [20] Petra Vahalová. Vliv kyslíku na dobu života tripletních stavů karotenoidů ve fotosyntetických komplexech. 2013.
- [21] Roper Scientific, Inc. *PI-MAX Camera, User Manual*.
- [22] Roper Scientific, Inc. *Programmable Timing Generator, User Manual*.
- [23] Jan Alster. Study of light-harvesting antennae based on bacteriochlorophyll aggregates. 2011.
- [24] Jakub Psencik, Daniel Hey, Bernhard Grimm, and Heiko Lokstein. Photoprotection of photosynthetic pigments in plant one-helix protein 1/2 heterodimers. *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 11(21):9387–9392, 2020.

Seznam použitých zkratek

PS I...fotosystém I

PS II...fotosystém II

P680...zvláštní pár chlorofylů v reakčním centru fotosystému II

P700...zvláštní pár chlorofylů v reakčním centru fotosystému I

OEC...kyslík vyvíjející komplex (oxygen evolving system)

PC...fykocianin

APC...alofykocyanin

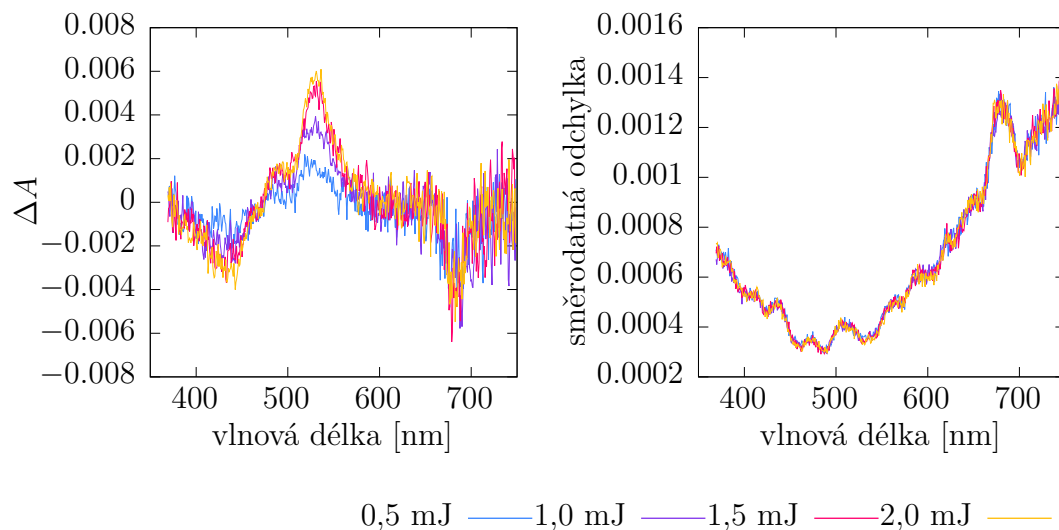
ATP...adenosintrifosfát

NADPH...nikotinamidadeninukleotidfosfát

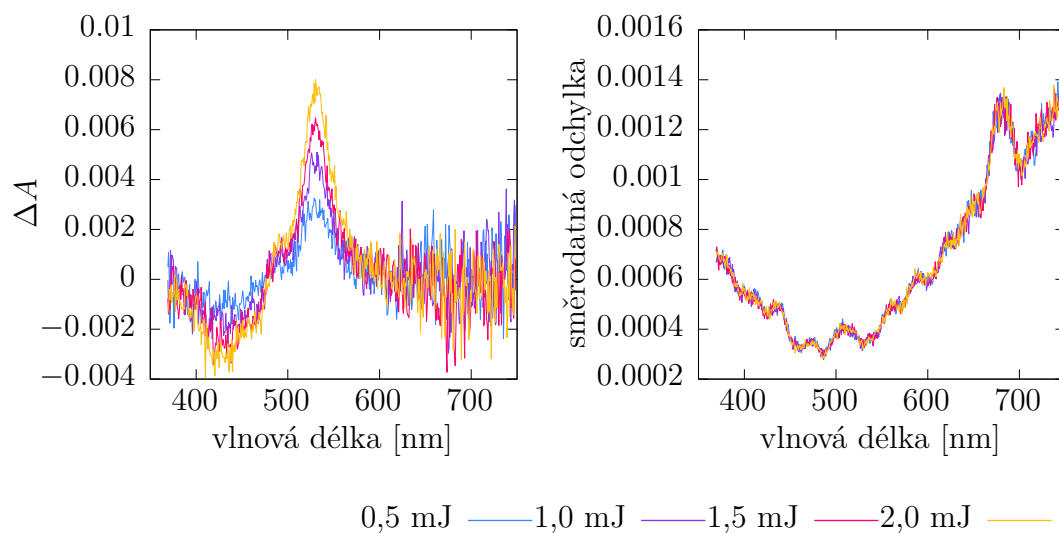
cps...counts per second (používané jako jednotka intenzity signálu)

A. Příloha

A.0.1 Dodatečné grafy pro různé excitační energie

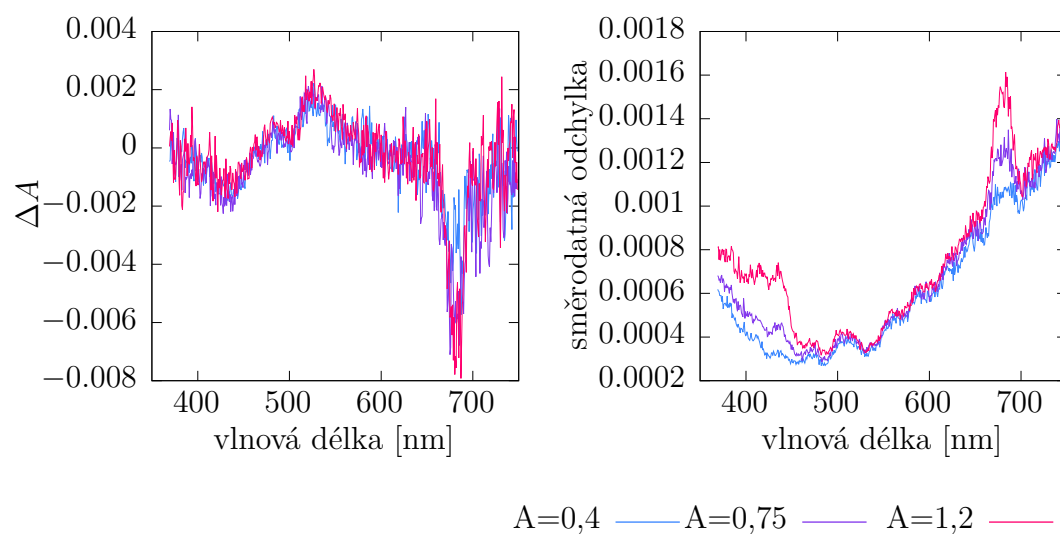


Obrázek A.1: Transientní spektrum PS I s odchylkami v čase 10 ns pro různé energie excitačního pulzu.

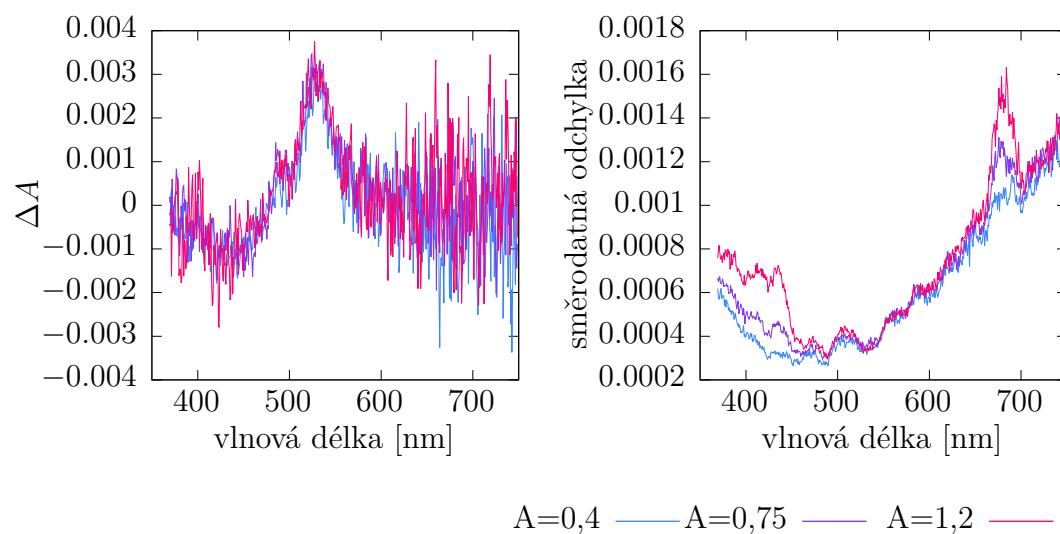


Obrázek A.2: Transientní spektrum PS I s odchylkami v čase 100 ns pro různé energie excitačního pulzu.

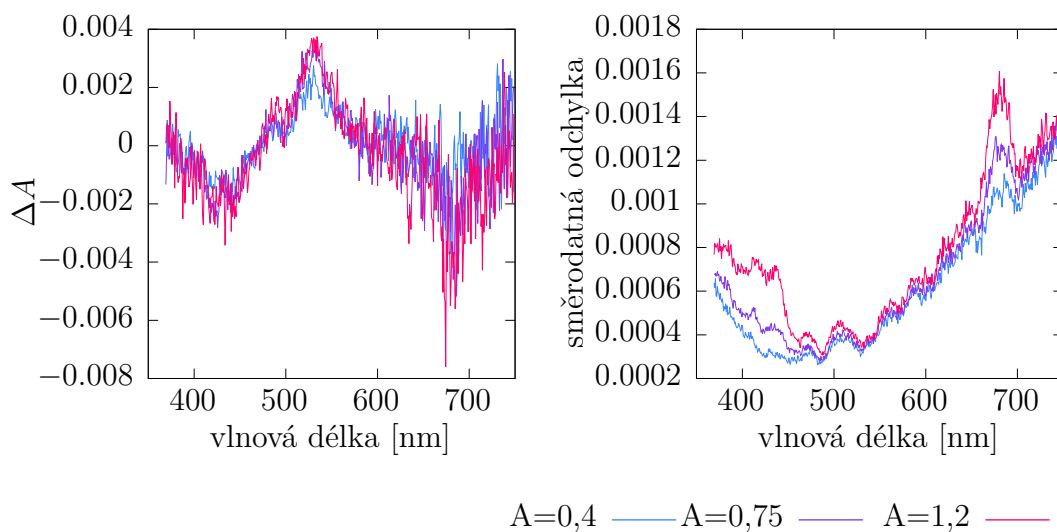
A.0.2 Dodatečné grafy pro různé koncentrace



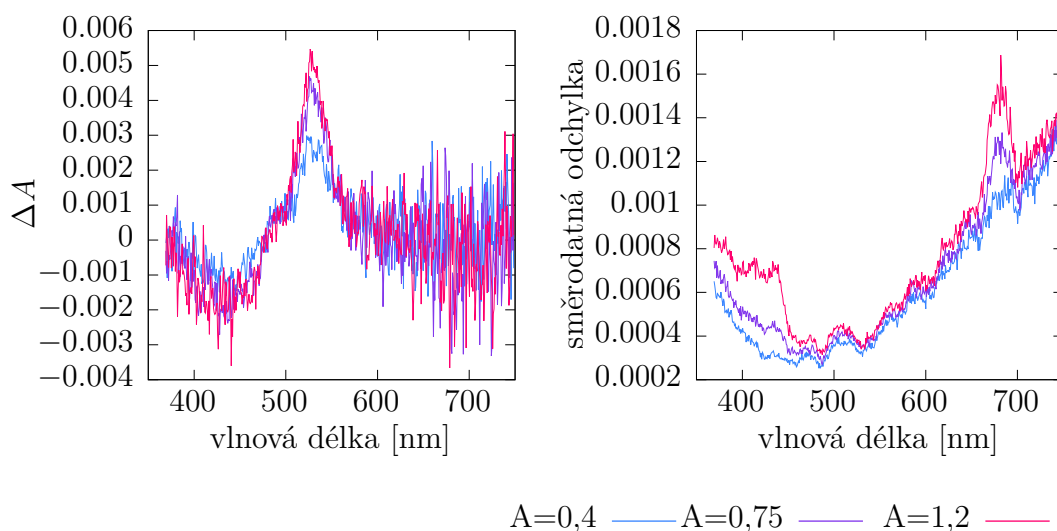
Obrázek A.3: Transientní spektrum PS I s odchylkami v čase 10 ns pro koncentrace vzorku, s excitačním pulzem o vlnové délce 440 nm.



Obrázek A.4: Transientní spektrum PS I s odchylkami v čase 100 ns pro koncentrace vzorku, s excitačním pulzem o vlnové délce 440 nm.



Obrázek A.5: Transientní spektrum PS I s odchylkami v čase 10 ns pro koncentrace vzorku, s excitačním pulzem o vlnové délce 670 nm.



Obrázek A.6: Transientní spektrum PS I s odchylkami v čase 100 ns pro koncentrace vzorku, s excitačním pulzem o vlnové délce 670 nm.

