

TARTU ÜLIKOOL  
Loodus- ja täppisteaduste  
valdkond Füüsika instituut

Kristel Roots

**Klorofüll  $a$  neeldumise madalaenergeetilise saba mõõtmise  
ergastusspektroskoopia abil**

Bakalaureusetöö (12 EAP)

Juhendaja:  
Kristjan Leiger

Tartu 2018

# **Klorofüll *a* neeldumise madalaenergeetilise saba mõõtmise ergastusspektroskoopia abil**

Käesolevas bakalaureuse töös on uuritud klorofüll *a* ergastusspektreid eesmärgiga avada valgusenergia neelamise uusi aspekte. Ergastades klorofüll *a* trietüülamiini lahust muudetava lainepikkusega titaan-safiir ja värvlaserite abil ning registreerides fluorestsentsi eri spektri osades, saavutati ergastusspektri mõõtmise läbi neeldumise 6 suurusjärgu liikudes kuni ca 140 nm ehk  $2600\text{ cm}^{-1}$  kauguseni neeldumismaksimumist madalama energia suunas.

Tulemuste analüüsist selgus, et klorofüll *a* neeldumisspektri langus on seni arvatust aeglasem, selle langus sõltub temperatuurist ning, et klorofüll ja bakteriklorofüll neeldumisspektrites esineb teatud erinevusi. Samuti täheldati neeldumissaba peal teatud struktuuri, mille funktsionaalsus on seni veel tundmatu. Veevaba ja töötlemata objekti neeldumise võrdlusest selgus, et kuivatatud objekti neeldumine toimub veidi sinisemas spektri piirkonnas võrreldes töötlemata objekti neeldumisega.

Märksõnad: klorofüll *a*, optiline neeldumine, ergastusspektroskoopia

CERCS koodid: P230 Aatomi- ja molekulaarfüüsika, P330 Bioenergeetika

## **The accurate measurement of the low-energy tail of chlorophyll *a* absorption by excitation spectroscopy**

The aim of this dissertation is to measure the excitation spectra of dissolved chlorophyll *a* and to investigate its new aspects of light absorption. Exciting chlorophyll *a* dissolved in triethylamine with tunable titan-sapphire and dye lasers and recording the fluorescence in different parts of the spectrum, an excitation spectrum spanning 6 orders of magnitude in absorbance and ca 140 nm or  $2600\text{ cm}^{-1}$  in wavelength / energy scale was obtained.

The results showed that the decrease in the absorption spectrum of chlorophyll *a* is slower than expected. Also, the decrease in the absorption spectrum depends on temperature and that there are certain differences between chlorophyll and bacteriochlorophyll absorption spectra. Furthermore, a certain structure has been observed on the low-energy tail of the absorption spectrum, the functionality of which is yet unknown. The analysis of anhydrous and hydrous solution spectra showed that the hydrous solution absorbs light at slightly shorter wavelengths than the anhydrous solution.

Keywords: Chlorophyll *a*, Optical absorption, Excitation spectrum

CERCS codes: P230 Atomic and molecular physics, P330 Bioenergetics

# Sisukord

<b>Sissejuhatus.....</b>	<b>4</b>
<b>Kirjanduse ülevaade.....</b>	<b>5</b>
1.1    Fotosüntees.....	5
1.2    Klorofüllid.....	7
1.3    Neeldumisspekter.....	8
1.4    Fluorestsents.....	12
1.5    Ergastusspekter.....	14
<b>Eksperimentaalne osa .....</b>	<b>16</b>
2.1    Katse skeem ja meetodid .....	16
2.1    Tulemused.....	22
2.2    Järeldused.....	26
<b>Tänuavaldused.....</b>	<b>28</b>
<b>Kirjandus.....</b>	<b>29</b>

# Sissejuhatus

Fotosünteesi kui protsessi, milles valgusenergia viiakse kogu eluslooduse säilimiseks tarvilikule kujule [1] jälgendamine on vaieldamatult fundamentaalteaduse üks olulisimaid ning kestvamaid väljakutseid. Paljude tänapäeva teadlaste eesmärgiks on looduslikke fotosünteesi etappe mõistes luua uusi energia tootmisviise, mis on süsinikdioksiidi poolest atmosfäärile vähem koormavad. Fotosünteesi valgusreaktsiooni etappideks on valguse neeldumine fotosünteesimolekulides, ergastusenergia liikumine reaktsioonitsentritesse, kus eraldatakse primaarlaeng ning laenguga osakeste transport fotosünteesi redokssüsteemidesse. Kõik need toimuvad fotosünteesivate membraanide ehk tülakoidide süsteemis, mis on rikastatud valgusreaktsioonide toimumiseks tarvilike valkudega (fotosünteesivate pigmentidega). Käesolevas uurimistöös on huvipakkuvaks pigmendiks klorofüll *a* molekul, mille valguse neelamise uusi aspekte püüdis töö autor koos oma juhendaja Kristjan Leigeriga eelneva, 2017/2018 õppeaasta jooksul tuvastada.

Vaatamata sellele, et klorofüll *a* molekuli neeldumise ja fluorestsentsi spektrid on teaduses rohkesti läbiuuritud nähtus, [1] polnud madalaenergeetilise neeldumise täpsele mõõtmisele seni keegi tähelepanu pööranud. Bakterklorofüll *a* uuringute käigus avastati Tartu Ülikooli biofüüsika laboris pooljuhuslikult, et valguse neeldumine molekulis toimub tegelikult seni arvatust laiemas spektraalvahemikus, neeldumisspektri langus on aeglane ning lisaks on neeldumisspektri „sabal“ täheldatav teatud struktuur, mille funktsionaalsus looduses on veel teadmata. Kuna bakterklorofüll ja klorofüll on oma ehituselt ning funktsionaalsuselt sarnased, tuldi mõttele, et äkki esineb sarnane seaduspära ka klorofüllil puhul.

Käesolev uurimistöö käsitlebki klorofüllil ergastusspektrite mõõtmist eesmärgiga avada selle looduses nii olulise molekuli ja tema fotosünteesivate komplekside valgusenergia neelamise uusi aspekte ning hüpoteesiks see, et kui neeldumisspektri langus on seni arvatust aeglasem, siis võiks sellel olla ka teatud funktsionaalsus looduses.

# Kirjanduse ülevaade

## 1.1 Fotosüntees

Fotosüntees on looduses laialt levinud protsess, mis võimaldab teatud elusorganismidel ära kasutada päikeseenergiat, muundades selle biomolekulidesse talletatavaks keemiliseks energiaks. Fotosünteesi lähteaineteks on süsinikdioksiid, vesi ja mineraalained ning saadusteks on süsivesikud ja hapnik (kaudselt ka muud orgaanilised ühendid). [1] Taimede fotosünteesiprotsess toimub neljas järgus, milleks on: 1) valguse neeldumine, 2) elektronide transport, mis viib NADP<sup>+</sup> taandamisele NADPH-ks, 3) ATP tootmine, 4) CO<sub>2</sub> muundamine süsivesikuteks (süsiniku sidumine). Need keemilised protsessid jagunevad omakorda valgus- ja pimereaktsioonideks. Valgusreaktsioonid on need reaktsioonid, mis on seotud footoni neeldumisega ja elektronide ülekandumisega fotosünteesivates pigmendimolekulides. Vastupidiselt valgusreaktsioonidele ei vaja pimereaktsioonid enda toimumiseks valguse olemasolu ning on seotud süsinikdioksiidi sidumisega süsivesikumolekulideks.

Kõik fotosünteesiprotsessid toimuvad taimeraku organellis, mida kutsutakse kloroplastiks. See meenutab kujult 5-mikromeetrise läbimõõduga kumerläätse, mis on ümbritsetud kahekordse membraaniga. Väline membraan sisaldab valke, mis toimivad kui suured vesikanalid ning mis on läbitavad väikestele orgaanilistele molekulidele. Sisemine membraan kontrollib orgaanilise aine ning laetud molekulide sisse- ja väljavoolu kloroplastist. Kloroplasti sisemust täidab fotosünteesivate membraanide ehk tülakoidide süsteem, milles muuhulgas paiknevad valgusreaktsioonide toimumiseks (etapid 1-3) tarvilikud pigment-valk kompleksid, mis sisaldavad ka käesolevas töös uuritavaid klorofüllid molekule. Tülakoidi membraanid on kujult tihedalt pakitud lamedad kettad, mis on ümbritsetud vedela orgaanilise keskkonnaga, mida nimetatakse stroomaks. Stroomas paiknevad valgud, mis osalevad fotosünteesi pimereaktsioonides süsinikdioksiidi sidumisel ning taandamisel süsivesikuteks. [2]

Taimede fotosüntees toimub põhiliselt kloroplasti fotosünteesivates membraanides leiduvates pigmendimolekulides neeldunud nähtava valguse mõjul. Fotosünteesi seisukohast on tähtsaimaks taimedes leiduvaks pigmendimolekuliks klorofüll *a*. Taimedes esineb vähemalt viit tüüpi klorofülle. Klorofüllid *a* ja *b* esinevad kõrgemates taimedes, sõnajalgades ja samblas, klorofülle *c*, *d* ja *e* leidub ainult vetikates ja teatavates bakterites. Lisaks on olemas n-ö „abipigmentid“, taimedes peamiselt karotenoidid (tsüanobakterites ja vetikates ka fükobiliinid), mis neelavad valgust piirkondades, mida klorofüll *a* neelab nõrgalt. [3]

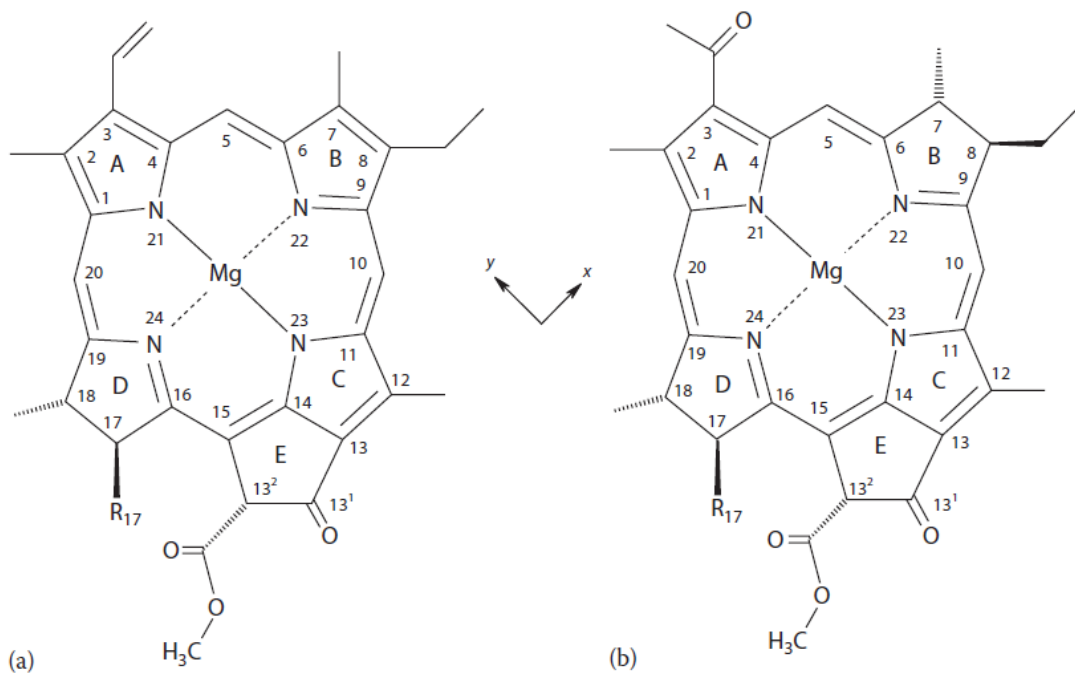
Nagu mainitud, on pigmendid kloroplasti tülakoidmembraanis koondunud pigmentvalk kompleksidesse, mis kujutavad endast moodustisi, kus valgustruktuurid hoiavad pigmente koos teatud struktuuridena. Selliseid komplekse on kaht põhilist liiki: antennikompleksid, mille ülesandeks on valgusenergia neelamine ja edasikandmine ning reaktsioonitsentrid, mis võtavad vastu antennikompleksi energia ja kasutavad seda ruumiliseks laengute eraldamiseks, mis kujul saavad energiat edasi kasutada fotosünteesi järgmised etapid.

Tähtsaimateks fotosünteesi läbiviivateks üksusteks tülakoidmembraanis on fotosüsteem I, fotosüsteem II, tsütokroom b6f kompleks ning F-ATPaas. Käesoleva töö seisukohast on olulised fotosüsteemid I ja II, mis on ehituselt ja funktsionaalsuselt võrdlemisi sarnased. Mõlemad koosnevad mitmetest reaktsioonitsentritest, paljudest antennikompleksitest, mitmesugustest valgumolekulidest ning valkudega seotud orgaanilistest ja anorgaanilistest kofaktoritest. Antennikompleksid koosnevad peamiselt klorofüllist ja karotenoididest, mille ülesandeks on võimalikult paljude footonite püüdmine ning nende ergastusenergia suunamine reaktsioonitsentritesse. Reaktsioonitsentrite peamiseks fotosünteesi määravateks elementideks on aga klorofüll, füllokinoon ning raua-väävli klastrid, mille abil toimub reaktsioonitsentritesse jõudnud valgusenergia muundamine keemiliseks energiaks.

Fotosüsteemide töö saab alguse footonite neeldumisega valgust koguvates antennikompleksis ning kogutud ergastusenergia suunamisega esmasesse laengu eraldamise tsentrisse. [4] Sarnaste energiatasemetega antennimolekulide lähestikku paiknemise tõttu on ergastatud oleku ülekande tõenäosus äärmiselt kõrge. Enam kui 90% neeldunud kvantidest kandub vaid mõne sajandiku pikosekundi vältel antennikompleksist ergastust püüdvasse reaktsioonitsentrisse, milles paiknevad elektronülekandes osalevad doonor- ja aktseptormolekulid. Fotosüsteem I korral on elektronide doonoriks valk nimega plastotsüaniid. Kõrgemates taimedes ja ka mitmetes bakteriliikides domineeriv fotosüsteem II omandab fotosünteesiks tarvilikud elektronid aga veemolekulidest, mille lõhustamise käigus eraldub jääkproduktina hapnik. Laengu eraldamise käigus vabanenud elektronid seob üks kahest reaktsioonitsentris paiknevast klorofüll *a* molekulist. Ergastusenergia liikumine antennimolekulide vahel on tingitud molekulide ülekande ajal mõjuvate dipoolmomentide vastastikmõjudest. See sõltub energia ülekandes osalevate molekulide vahelisest vahemaast, nende dipoolide suhtelisest orientatsioonist ning doonormolekuli kiirgusspektri ja elektroni aktseptori neeldumisspektrite kattuvusest.

## 1.2 Klorofüllid

Klorofüllid on tõenäoliselt maailmas kõige laialdasemalt esinevad pigmentid, nende jälgi on näha isegi kosmosest. Protoporfüriin IX-st põlvnevad klorofüllid kuuluvad tetrapürrooli (s.o. neljast pürrooliringist, tähistusega A–D, koosnevate) pigmentide rühma, mis omakorda võib esineda porfüriini, kloriini ja bakterikloriini tüüpidena. Klorofüllid iseloomustab täiendava viienda, isotsüklilise ringi E olemasolu, mispuhul porfüriini ja kloriini tüüpi molekulide nimetuses kasutatakse eesliidet „füto-“. [3] Klorofüll *a* molekul koosneb kelaatunud magneesiumi aatomiga seotud porfüriini tuumast ning karboksüülhapperühma kaudu kinnitatud pikaahelalise süsivesiniku (fütüül) kõrvalahelast. Klorofüll *a* ja bakteriklorofüll *a* on struktuurilt võrdlemisi sarnased, need erinevad teineteisest vaid porfüriini tuumaga seotud funktsionaalrühmade poolest. Seejuures see, millised funktsionaalrühmad on bakteriklorofüllid porfüriini tuumaga seotud, sõltub konkreetse bakteri liigist. Klorofüll *a* ja bakteriklorofüll *a* keemiline struktuur on esitatud joonisel 1.



**Joonis 1** Klorofüll *a* ja bakteriklorofüll *a* molekulid.  $R_{17}$  tähistab fütüülahelat. Allikas: [5].

Klorofüllid on keemiliselt ebastabiilsed nii hapete, aluste kui ka valguse oksüdatsiooni suhtes ning neil on tugev soodumus agregeeruda ja/või vastatikkõjustuda ümbritsevate molekulkeskkondadega. Füüsikaliste parameetrite seisukohast tuntakse klorofülle ergastatud

seisundite pikaalisuse ning intensiivse ulatusliku neeldumise poolest monodispergeeritud lahustes. Klorofüll *a* omab erinevates lahustites neeldumismaksimumi 660..675 nm juures ( $Q_y$ ). Sinises piirkonnas (Soret' ehk *B* ribas) on samuti tugev neeldumisriba 300..450 nm piirkonnas, vähem on kaetud vahepealne spektripiirkond (millest ka klorofüll *a* roheline värv). Klorofüll *a* neeldumisomadused tulenevad suuresti makrotsükli aromaatsusest (kaksiksidemed on tugevalt konjugeeritud ja seetõttu moodustuv  $\pi$ -elektronsüsteem hõlmab umbes 20 elektroni). Dimeerides ja rohkemakomponendilistes agregaatides toimub nii neeldumis- kui fluorestsentsmaksimumide punanihe, näiteks fotosüsteem I ja II reaktsioonitsentrite (klorofüll *a* dimeeride) neeldumismaksimumid asetsevad vastavalt 700 ja 680 nm juures, muudes agregaatides võib maksimum asetuda kuni 720 nm-ni. [3]

Klorofüllid, peamiselt klorofüll *a*, täidavad fotosünteesis mitmeid olulisi rolle. Esiteks leiavad nende efektiivsed neeldumisomadused kasutust valgust koguvates antennides. Teiseks moodustavad nad süsteeme ergastusenergia kõrge kvantefektiivsusega reaktsioonitsentritesse juhtimiseks. Kolmandaks toimivad klorofüllid molekulid esmaste elektronidoonoritena reaktsioonitsentrites, algatamaks laengute eraldamise protsessi üle fotosünteesiva membraani. Laengute eraldamise tagajärjel toimub redutseerijate tootmine ning samaaegselt tekkinud membraanipotentsiaali tõttu toimub ka ATP süntees. Nii valgust koguvates kompleksides kui ka fotosünteesivates reaktsioonitsentrites paiknevad klorofüllid osalevad fotosünteesiva aparadi stabiliseerimises ja regulatsioonis. Lisaks on tõendeid sellest, et klorofüll võib olla otseselt seotud liigse energia muundumisel soojusenergiaks. [3]

### 1.3 Neeldumisspekter

Fotosünteesi käivitavaks protsessiks on valguse neeldumine pigmendi molekulis. Ühtlasi on see üheks alusprotsessiks pigmendi, antud juhul klorofüll *a*, spektroskoopiliseks uurimiseks. Klorofüllid lahust läbiv valguskiir neeldub osaliselt lahuses. Spektrit, mis mõõdab molekulis neeldunud valguse intensiivsust nimetatakse neeldumisspektri. Suurust, mis kirjeldab neeldunud valguse hulka nimetatakse neelduvuseks (optiliseks tiheduseks) ning seda kirjeldab järgnev valem:

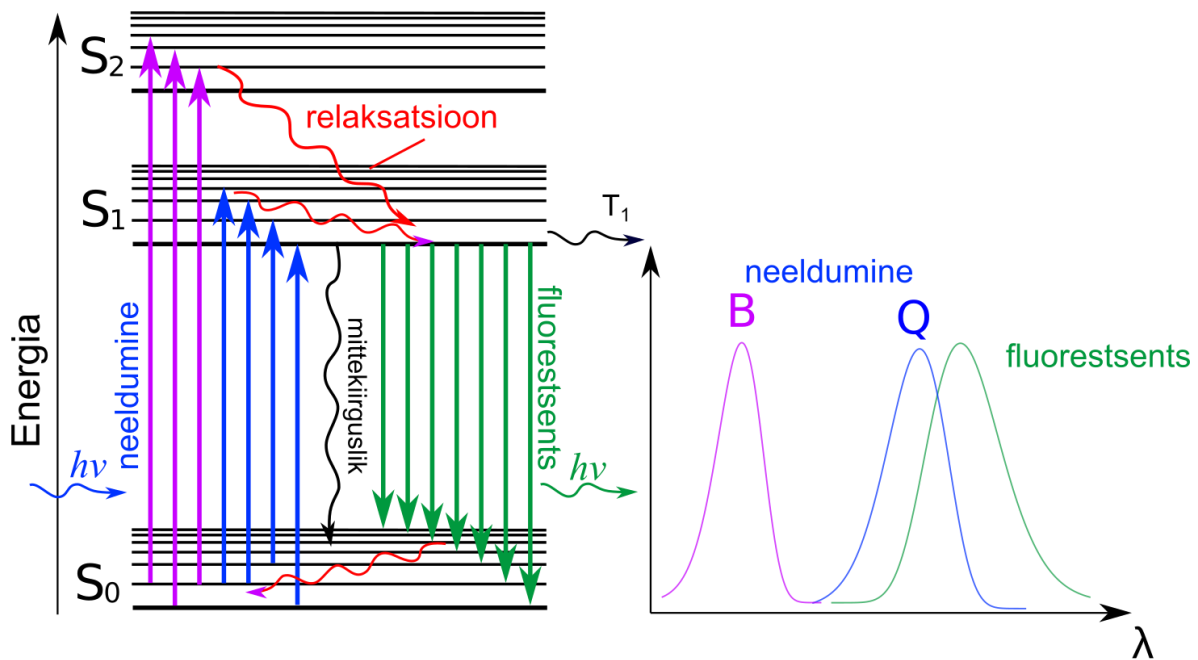
$$A = -\log \frac{I_T}{I_0} = -\log T, \quad (1)$$

kus  $I_0$ - valguse algintensiivsus,  $I_T$ - ainek läbitulnud valguse intensiivsus,  $T$ -läbilaskvus [6]. Valem (1) kirjeldab klorofüll *a* (või mistahes pigmendi) lahuse neeldumisspektri määramise eksperimentaalset poolt.

Valgusenergia neeldumine toimub eeldusel, et neelatud footoni sagedus rahuldab tingimust  $h\nu = \frac{hc}{\lambda} = \Delta E$ . [5] Siin  $\Delta E$  on alg- ja lõppolekute energiatega vahe,  $\nu$  on footoni sagedus ning  $h$  Plancki konstant. Ergastatud elektroni energiatasemed jagunevad elektroonseteks ning võnketasemeteks. Sõltuvalt ergastatud elektroni spinni orientatsioonist põhiolekuga suhtes toimub molekuli ergastamine singlet (vastupidised spinnid, Pauli keeluprintsiip) või triplet (samapildised spinnid) olekutesse. Käesoleva uurimistöös raames toimuvad üleminekud peamiselt põhi- ( $S_0$ ) ja ergastatud ( $S_1, S_2, \dots$ ) singletsete tasemete vahel, eriti aga põhi- ja madalaima ergastatud singlet-taseme ( $S_1$ ) vahel. Molekuli ergastamisel kõrgemasse singletolekusse toimub algul üleminek kõrgematele võnketasemetele ning seejärel kohene relaksatsioon madalaimale võnketasemele ergastatud singlet-taseme ulatuses. Protsessis vabanenud energia muundub keskkonda hajuvaks soojuseks. [5], [6]

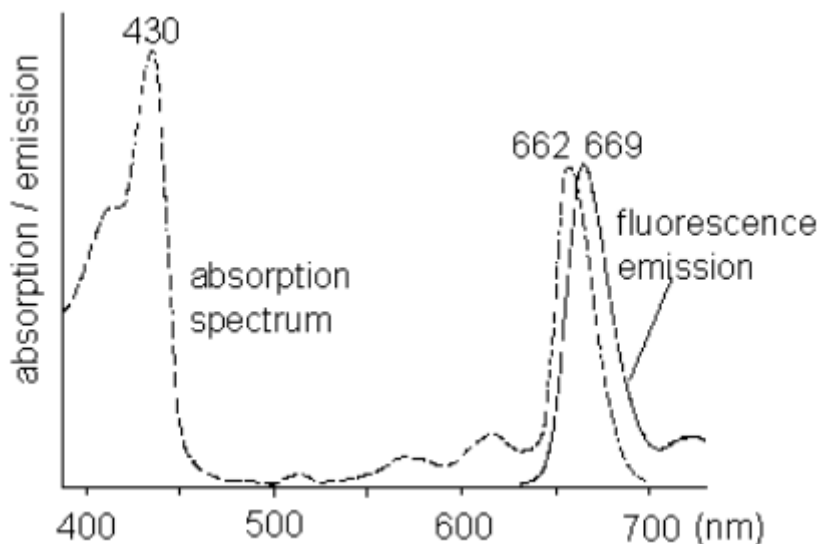
Molekuli energiatasemete ja vastavate üleminekute visualiseerimiseks kasutatakse Jablonski diagrammi, mis on klorofüll *a* jaoks lihtsustatud kujul esitatud joonisel 2. Joonisel on kujutatud põhitaset  $S_0$  ja kahte ergastatud taset  $S_1, S_2$  koos vastavate võnketasemetega. Lihtsuse mõttes on ära jäetud triplet-elektronitasemed ja võnketasemetest veel peenema struktuuriga pöörlemistasemed, mis antud töö seisukohast olulist rolli ei mängi. Kujutatud on ka vastavad tekkivad neeldumisspektrid, samuti fluorestsentsi teke, millest lähemalt järgmises peatükis.

Klorofüllil neeldumisspektri moodustavad üldiselt kaks põhilist neeldumisriba (vt joonis 3), milleks on *Q* ja mitmetest maksimumidest koosnev Soret' (*B*) neeldumisriba. *Q* neeldumismaksimum tekib üleminekul  $S_0 \rightarrow S_1$  ning asub seetõttu pikemalainelises (nähtava valguse) spektri osas, ca vahemikus 660..675 nm. Soret' neeldumismaksimum tekib üleminekute  $S_0 \rightarrow S_2$  tagajärjel ning asub spektri lühemate lainepikkuste (UV kiirguse) juures, ca vahemikus 300..450 nm.



**Joonis 2. Jablonski diagramm klorofüll a neeldumise ja fluorestsentsi selgitamiseks.** Vasakul on esitatud Jablonski diagramm ning paremal, diagrammile vastavad neeldumise ja fluorestsentsi spektrid.  $S_0$ ,  $S_1$  rasvased jooned tähistavad elektroonseid tasemeid, tihedad peenjooned neile vastavaid võnketasemeid.

Mõlemad neeldumised on põhjustatud  $\pi \rightarrow \pi^*$  elektronergastusest.  $Q$  neeldumisriba koosneb kahest komponendist  $Q_y$  ja  $Q_x$ , mis vastavad neeldunud valguse polarisatsiooni suunale molekuli mõttelise kesktelje suhtes ( $x$  ja  $y$  teljed joonisel 1), samas kui Soret' neeldumisriba asukoht on enam-vähem sama mõlema polarisatsiooni suuna korral.



**Joonis 3. Klorofüll a neeldumise ja fluorestsentsi spekter.** Maksimum 662 nm juures vastab  $Q_y$ , 615 nm  $Q_x$  üleminekule, 430 nm on Soret'riba (mõlemad komponendid). Näidatud on ka fluorestsentsi spekter [7]

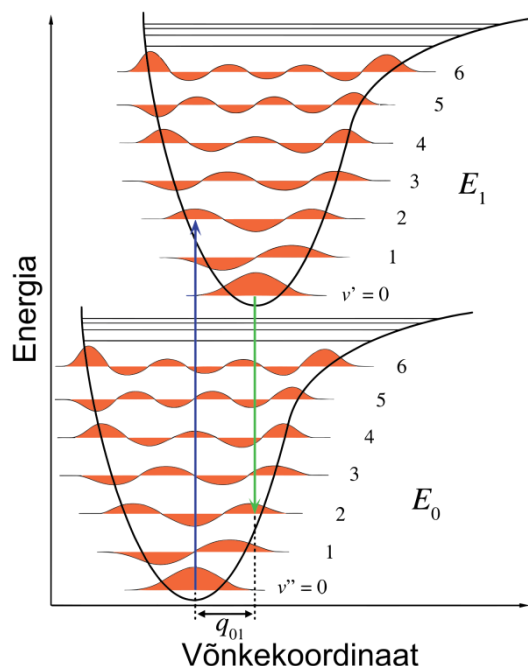
Klorofüllü neeldumist kirjeldab joonis 3, seda võib võrrelda ka käesolevas uurimistöös eksperimentaalselt mõõdetud klorofüllü  $Q$ -piirkonna neeldumisega (vt joonis 7). Sellest on näha, et klorofüll  $a$  molekulis toimub 660 nm juures võrdlemisi intensiivne  $Q_y$  neeldumine ning 615 nm juures ca 5 korda nõrgem  $Q_x$  neeldumine. Neeldumisspektri kuju määravad põhiliselt kolm faktorit: algolekute tihedus, nende asustatus ja üleminekutõenäosus nendelt mingi etteantud energia võrra kõrgemale ergastatud elektronoleku võnketasemele. Kvalitatiivse hinnangu tarvis võib algolekute tiheduse konstantseks lugeda, ülejäänud kahe osas võib välja tuua mõningaid kaalutlusi.

Üleminekul põhi- ja ergastatud olekute vahel, relaksatsioon vastavate võnketasemete vahel ning üleminekute seos spektri kujuga on seletatavad Franck-Condoni printsiibi abil. Üldiselt tähendab see printsiip seda, et elektroonsed üleminekul toimuvad võrreldes molekuli liikumisega nii kiiresti, et molekuli võib elektroonse ülemineku ajaks lugeda paigalseisvaks. Nimetatud lihtsustuse tõttu toimub elektronsiire põhi ja ergastatud taseme vahel (võnkekoordinaat – energia esituses, joonis 4) vertikaalses sihis. Kvantmehaanika seisukohast tähendab Frank-Condoni printsiip seda, et ülemineku intensiivsus kahe võnketaseme vahel on võrdeline kahe ülemineku osaleva taseme võnkefunktsiooni kattumisintegraali ruuduga. Printsiibi kohaselt toimub elektroonne üleminekul seda tõenäolisemalt, mida suurem on alg- ja lõpptasemete võnkeseisundite lainefunktsioonide kattumisintegraal. [8]

Mis puudutab algolekute asustatust, siis see sõltub temperatuurist: vastavalt statistilisele mehhaanikale on osakeste jaotus energiatasemete vahel määratud Boltzmanni jaotusega

$$P(E, T) \propto e^{\frac{-E}{kT}}, \quad (2)$$

kus  $k$  on Boltzmanni konstant. Arvestades, et molekulide koguarv süsteemis on jääv, on keskmiselt asustatud seda kõrgemad tasemed, mida kõrgem on temperatuur. Sellest järelduvalt võib üldiselt eeldada, et kõrgema temperatuuri korral ulatub neeldumissaba kaugemale punasesse, kuna keskmiselt kõrgemalt asustatud algtasemetelt on võimalik väiksema energiaga ulatuda ergastatud elektronseisundisse. Tuleb küll meeles pidada, et asustatuse faktor on kõigest üks kolmest seda määravast komponendist, aga temperatuuri piisaval alandamisel peaks neeldumissaba aeglasemat langust kindlasti olema võimalik jälgida.



**Joonis 4. Franck-Condoni printsiibi illustatsioon:** molekuli võnkumise potentsiaalikäverad põhi- ja ergastatud elektronolekus (mustad jooned) ja vastavad vibroonsed olekufunktsioonid (pruunid). Allikas: Wikipedia.

Madalaenergeetiliste ergastuste ja üleminekute roll fotosünteesis on vastuoluline. Üldiselt oleks loomulik eeldada, et sellised ergastused (ja neid omavad süsteemid) ei saa osaleda energiahõives ega -ülekandes, kuna, olles energeetiliselt süsteemi ülejäänud osadest madalamal, kipuvad nad toimima miinimumidena, mis energia endasse tõmbavad. Ometi on leitud tõendeid sellest, et teatud fotosünteesimehhanismid käivituvad just madalama energiaga footonite neeldumisel. [9] Kuigi viidatud töös välja toodud mehhanismid realiseeruvad peamiselt kromofoor- Valk kompleksides, tekkis käesoleva uurimistöö käigus hüpotees, et äkki esineb teatav funktsionaalsus juba ka molekuli tasemel.

## 1.4 Fluorestsents

Fluorestsents on ainest eralduv kiirgus footoni neeldumise tagajärjel. Pauli keeluprintsiibi kohaselt on kaks võrdse energiaga elektroni vastupidiste spinnidega ning asuvad singlet spinn-olekus. Footoni neeldumisel siirdub üks kahest elektronist ergastatud olekusse. Ergastatud olekud on reeglina ebastabiilsed, mistõttu toimub sageli spontaanne relaksatsioon elektroni põhiolekusse footoni või soojuskiirguse eraldumise kaudu. Üleminekut kõrgemast singlet olekust singlet põhiolekusse, mille käigus eraldub valguskiirgus, nimetatakse fluorestsentsiks. Fluorestsentsi käigus eraldub footon  $10^{-9}$ - $10^{-6}$  s jooksul.

Elektronide üleminekuga ergastatud olekust põhiolekusse kaasneb molekuli vibratsioonenergia vähenemine. Selle tulemusel nihkub kiirgusspekter neeldumisspektrist suuremate lainepikkuste poole. Kirjeldatavat nähtust tuntakse kui Stokes'i reeglit (Stokes'i nihe) ning mida suurem on Stokes'i nihe, seda lihtsam on eristada kiirgusvalgust ergastavast valgusest. Kui Stokes'i nihe on väike, siis võib kõrgematel lainepikkustel asetsev neeldumisspekter teatud määral kattuda madalamatel lainepikkustel asuva kiirgusspektriga.

Kiiratava valguse intensiivsuse maksimum on tavaliselt ergastava kiirguse maksimumist oluliselt väiksem ning kiirgusspektri kujuks on sageli suuremate lainepikkuste poole nihutatud neeldumisspektri peegelpilt. See tuleneb sellest, et võnkeenergiatasemed on madalaima ergastatud oleku ja põhioleku korral ligikaudu samad. Maksimaalse luminesentsi intensiivsuse saavutamiseks ergastatakse uuritavat objekti sageli valgusega, mille lainepikkus vastab neeldumisspektri maksimumile. Kiirguse intensiivsust määratakse eelistatuna valgusel, mille lainepikkus vastab kiirgusspektri maksimumile. Kuna ergastuskiirgus on märkimisväärselt intensiivsem objekti valguskiirgusest, tuleb kahe spektri kattumine sobiva ergastus- ja kiirgusfiltri valikuga elimineerida. Vastasel korral pole luminesentsi intensiivsus selgelt detekteeritav.[10]–[12]

Oluline fluorestsentsi iseloomustav parameeter on kiirguse kvantsaagis, mis näitab, mitu fluorestsentsi footonit kiirgub iga neeldunud kvandi kohta. Singlet üleminekute käigus esinenud energiakadude tõttu (võnkeenergia muundumine soojuseks) on fluorestsentsi kvantsaagis tavaliselt 1-st madalam ning on leitav järgmisest seosest:

$$\varphi_{fl} = \frac{k_{fl}}{k_{fl} + \sum_i k_i} \quad (3)$$

kus  $k_{fl}$  tähistab fluorestsentsi kiiruskonstanti (eluea pöördväärtust) ja nimetajas summeeritud kiiruskonstandid  $k_i$  vastavad erinevatele (selle ülemineku seisukohast) mittekiirguslikele protsessidele: otsene mittekiirguslik siire madalamasse elektronseisundisse (sisekonversioon), siire tripletseisundisse, molekulide süsteemi korral ka energiaülekanne. Sõltuvalt lahustist ja kontsentratsioonist on klorofüll  $a$  eeldatav kvantsaagis lahustes 0.14..0.26 [13].

## 1.5 Ergastusspekter

Ergastusspekter on spekter, mis kirjeldab fluorestsentsi suhtelise intensiivsuse sõltuvust ergastava kiirguse lainepikkusest. Ergastusspekter saadakse fluorestsentsi intensiivsuse mõõtmisel fikseeritud lainepikkusel või lainepikkuste vahemikus, varieerides ergastava kiirguse lainepikkust üle kogu neeldumisspektri, kasutades võimalikult monokromaatset ergastusallikat (laser, monokromaator) ja jagades saadud intensiivsuse ergastusintensiivsusega. Sõltuvalt katse eesmärgist ja võimalustest on luminescentsi võimalik mõõta erinevatel kindlatel lainepikkustel eraldi või integreerides üle kogu või osa kiirgusspektri. [12]

Optilisel ergastusel siirdub molekul põhiolekust mõne ergastatud elektroneisundi ( $S_1$ ,  $S_2$ ,  $S_3$ ) võnkenivoole. Kiire võnkerelaksatsiooni tulemusena on suuremõõtmelistes orgaanilistes molekulides, nt. klorofüllis, luminescentsi kvantsaagis märgatav vaid madalaima ergastatud oleku korral (Kasha reegel). See tähendab, et luminescents tekib luminofoori üleminekul madalaimast ergastatud olekust põhiolekusse. Antud seaduspära tingib nii eraldunud valguse lainepikkuse kui ka selle kvantsaagise sõltumatuse ergastusvalguse lainepikkusest.

Eelnevast tulenevalt peegeldab ergastusspekter suuresti sobivalt normeeritud neeldumisspektrit. Täpsemalt, kuna iga neeldunud footon tekitab kvantsaagisele vastava tõenäosusega footoni kiirgusspektris, on eraldunud footonite arv võrdeline neeldunud footonite arvuga:

$$I_{erald}(v) = \varphi_{fl}(I_0(v) - I(v)), \quad (4)$$

mistõttu mõõdetud ja ergastusvõimsusega taandatud ergastusspekter avaldub:

$$I_{ex}(v) = \frac{\eta I_{erald}(v)}{I_0(v)} = \eta \varphi_{fl}(1 - T(v)), \quad (5)$$

kus kasutegur  $\eta$  võtab arvesse nii mõõtesüsteemi efektiivsust kui ka asjaolu, et registreeritakse ainult teatud osa kogu kiirgusspektrist. Kuna see kasutegur ei oma eeldatavalt sõltuvust ergastuse lainepikkusest, siis ei tohiks seda omada ka üks ega teine nimetatud komponent. Ergastusspektri seos neeldumisspektriga ( $A = -\log(T)$ ) avaldub seega:

$$I_{ex}(v) \propto (1 - 10^{-A(v)}), \quad (6)$$

kust nähtub, et lahjade vaatlusobjektide korral on neeldumis- ja ergastusspektrid ligikaudselt võrdelised ( $I_{ex} \approx \varphi_{fl}A$ ). [5]

Vaatamata ergastusspektri sarnasusele (või ühtimisele) neeldumisspektriga on ergastusspektril ka hulk eripärasid. Tavapärase neeldumise mõõtmise probleemiks on sageli piiratud dünaamiline diapason: liiga suured neeldumised põhjustavad küllastusnähtusi ja liiga väikesed kaovad erinevatesse taustaprobleemidesse. Kui suure neeldumise probleemi saab lahendada objekti kontrollitud lahjendamisega, siis väikese neeldumise puhul võib abi olla ergastusspektroskoopiast. Käesolevas töös leiab kasutust asjaolu, et fluorestsentsi mõõtmine omab suuremat tundlikkust, mistõttu saavutatakse parem signaal-müra suhe kui läbilaskvuse mõõtmisel (neeldumisspektri määramiseks) ja vastavalt on võimalik mõõtmispiirkonda laiendada väiksema neeldumise suunas. Ergastusspektrit on võimalik mõõta ka selliste katseobjektide korral (pulbrid, läbipaistmatule alusele kantud kiled, keerulise kujuga kristallid jms), mille tavaneeldumisspektrit on keeruline määrata. [12] Lisaks on ergastusspekter informatiivsem, kandes infot luminestsentsi tekitavate energiaüleminekute kvantsaagise kohta, juhul kui eeldus nende sõltumatuse kohta ergastuse lainepikkusest paika ei pea. [10]

Siiski on ergastusspektroskoopiaal võrreldes tavaneeldumisega ka mõningaid puudusi. Esiteks, ergastusspektri edukaks mõõtmiseks peab olema täidetud teatav hulk eeldusi, eelkõige piisav ja lainepikkusest sõltumatu fluorestsentsi kvantsaagis. Teiseks, väikese Stokes'i nihke korral võib olla raskendatud ergastusspektri mõõtmine neeldumismaksimumi ümbruses, kuna koos ergastusega tuleb mõõdetavast signaalist tõenäoliselt välja filtreerida ka suur osa kiirgusspektrist. Nii on tavaneeldumine ja ergastusspektrist saadud neeldumine omamoodi komplementaarsed. Seda efekti oli näha ka käesolevas töös.

# Eksperimentaalne osa

Eksperimentaalse osa peamiseks sisuks on trietüülamiinis lahustatud klorofüll *a* neeldumise mõõtmine tava- ja ergastusspektroskoopia meetodil. Ergastusspektri saamiseks ergastatakse klorofüll *a* molekuli kitsa spektrijoonega eri lainepikkusi kiirgavate laseritega (titaan-safiir ja värvjoalaser). Lahuses tekkivast summaarsest kiirgusest lõigatakse filtrite abil välja ergastuse piirkond ja mõõdetakse ülejäänud osa intensiivsuse sõltuvust ergastuse lainepikkusest.

## 2.1 Katse skeem ja meetodid

### Katseobjekti ettevalmistamine

Katseobjektina kasutati kommertsiaalselt saadud klorofüll *a*-d (Sigma). Uurimisobjekt lahustati trietüülamiinis. Objekti lahendus valiti selline, et optiline tihedus neeldumismaksimumis (661 nm) oleks vahemikus 0.1...0.5 1 mm proovi kohta. Neeldumise mõõtmiseks asetati proov 1mm paksusesse kvartsküveti (Helma). Ehkki vee lahustuvus trietüülamiinis on üldiselt väike, teostati võimaliku lahustunud veest tuleneva klorofüllü agregeerumise efekti kindlaks tegemiseks osa mõõtmisi lahustiga, mis oli täiendavalt veest vabastatud. Selleks hoiti trietüülamiini vähemalt 24 tundi enne mõõtmiste algust 3 Å pooriläbimõõduga molekulaarsõeltel (Wako 3 Å 1/16).

### Mõõtesüsteemi kirjeldus

Katse skeem neeldumise ja ergastusspektrite mõõtmiseks koos vastava aparatuuriga on esitatud joonisel 5. Proovi ergastamine toimus kahe eri tööpiirkonnaga ergastusallika abil, eesmärgiga suurendada ergastusspektrite uurimispiirkonda. 715-800nm spektri osa saadi objekti ergastamisel muudetava lainepikkusega pideva titaan-safiirlaseri (Spectra Physics, mudel 3900S) abil ning 625-700nm spektri osa saadi kasutades DCM värvainega värvjoalaserit (Spectra Physics, mudel 395). Lainepikkuse määramiseks kasutati titaan-safiirlaseri korral lainepikkusemõõtjat (Burleigh WA-10L), värvjoalaseri korral Ne joonte abil kalibreeritud spektromeetrit Jobin-Yvon THR1500 koos Andori kaameraga DU-420. Mõlema laseri korral kasutati pumpava allikana 8 W Millennia Nd:YAG laserit (532 nm, ka Spectra Physics). Ergastusallikast lähtuv kiirgus suunati läbi kollimaatoritega varustatud 400 µm fiibri (Thorlabs) isekoostatud mikrospektroskoopiaseadmesse, mis põhineb Olympuse mikroskoobil IX-71. Seadme sisendis oli kahest läätsest koosnev teleskoopsüsteem, mis ühe läätse nihutamise kaudu

võimaldas korrigeerida ergastuse kollimeeritust ja ühtlasi ka reguleerida ergastuslaigu suurust (vst. ergastuse intensiivsust). Edasi juhiti ergastus objektile dikroilise peegli (950dosp, Chroma) ja objektiivi (Mitutoyo 10x, NA = 0.28) abil. Tagasipeegeldunud kiirgus läbis samuti objektiivi ning sattus seejärel spektromeetrise Shamrock 303i (Andor), kus tekkivat spektrit mõõdeti kaamera DU-420A (Andor) abil.

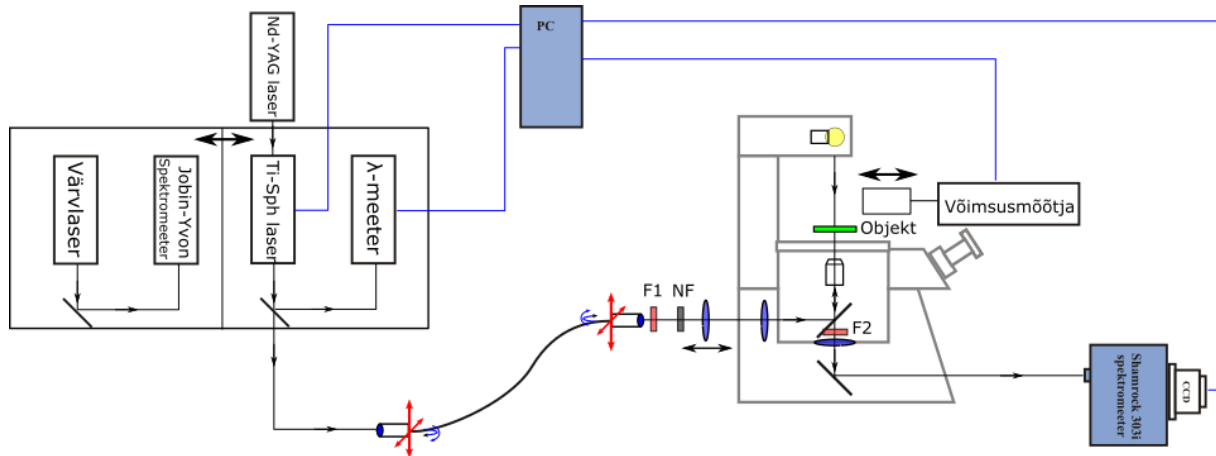
Lisaks oli ergastava valguse spektraalseks reguleerimiseks kasutusel ka kaks filtrikomplekti F1 ja F2, mis paiknesid vastavalt enne ja pärast uurimisobjekti. F1 puhastas ergastavat kiirgust võimalikest juhukomponentidest registreerimispiirkonnas ja F2 tekkivat fluorestsentsi ergastuse jääkmõjust. Ideaaljuhul moodustavad filtrid nn. ristuva süsteemi, s.o. summaarselt ei tohiks valgus aktiivses spektripiirkonnas neid üldse läbida. Küllastuse vältimiseks oli sisendkanalis kasutusel veel neutraalne filter NF, mille abil oli võimalik ergastust vajadusel täiendavalt nõrgendada. Ergastuse võimsusreferentsi mõõtmiseks kasutati võimsusmõõtjat (Newport 842-PE) koos 918D-SL fotodetektoriga. Kuna mõõtmise toimus enamjaolt läbi objekti (tagamaks võimalikult väikesi määramatusi tulenevalt muudest aspektidest, nagu ergastuskanali erinev läbilaskvus eri ergastuslainepikkustel ja võimsusmõõtja detektori asendi muutus), pidi võimsuse väärtust hiljem korrigeerima vastavalt objekti läbilaskvusele antud lainepikkusel.

Titaan-safiirlaser, lainepikkusemõõtja, võimsusmõõtja ja Shamrock 303i küljes olev kaamera võimaldasid ka andmevahetust ja/või juhtimist arvutist, mistõttu oli võimalik koostada skript programmeerimiskeeles Python, et teostada ergastusspektri automaatset registreerimist. See tõstis registreerimisjõudlust märgatavalt. Skript kontrollis pidevalt ka mõõdetud signaali suurust ning peatus, kui signaal väljus etteantud vahemikust ning tuli vahetada neutraalset filtrit. Värvjoalaseri puhul sai automatiseerimist paraku rakendada ainult osaliselt, sest oli tarvis laserijoone kuju visuaalselt kontrollida.

Tavaneeldumise mõõtmiseks kasutati mikroskoobi valgustuslampi (tavaline halogeen-hõõglamp), eemaldades dikroilise peegli ja filtri F2. Kõigepealt mõõdeti referentsspekter ilma objektita (ja küvetita) ning selle põhjal neeldumisspekter. Ainult lahustiga eraldi mõõdetud küveti neeldumine lahutati hiljem maha.

Madalatemperatuursete mõõtmiste puhul kasutati küveti rollis teemantrõhuraku (LOTO, Itaalia) koos vastava krüostaadiga (LOTO, Oxford Instruments). Sealjuures püüti hoiduda rõhu tekitamisest, aga nagu võis järeldada spektrijoone nihkest toatemperatuurisel mõõtmisel võrreldes mõõtmisega tavaküvetis (2 nm), raku tihendamisel teatav minimaalne rõhk siiski tekkis. Küveti korpusesse tekitati madal vaakum ja jahutamiseks pumbati krüostaadi sõrmest läbi vedelat lämmastikku. Temperatuuri mõõdeti rõhuraku teemandi läheduses asuva

dioodiga (Lakeshore) ja mõõteriistaga Lakeshore Model 211. Pumba sisse-ja väljalülitamise abil oli võimalik temperatuuri hoida täpsusega  $\pm 4$  K.



Joonis 5. Mõõtesüsteemi skeem.

## Mõõtmiste käik

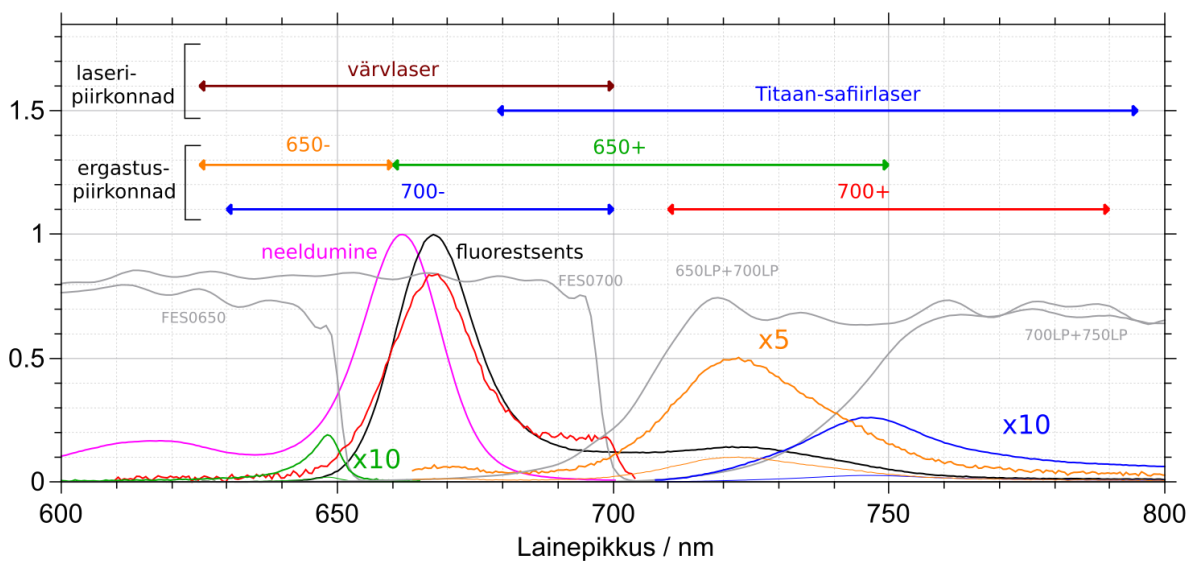
Iga katseseeria algul leiti kõigepealt klorofüll *a* trietüülamiinlahuse tavaneeldumisspekter, millest lahutati maha puhta trietüülamiinlahuse neeldumisspekter. Alati mõõdeti ära ka Ne-lambi kiirgusspekter, mida kasutati andmetötluses spektrite lainepikkuse skaala kalibreerimiseks. Edasi valiti filtrid F1 ja F2 vastavalt soovitud ergastuspiirkonnale. Seejärel selgitati mõnel selles piirkonnas võimalikult tugevat kiirgust andval ergastuslainepikkusel välja, millise maksimaalse tugevuse korral (nt.väärtus mõnes mõõdetava spektri valitud punktis) on kiirgussignaali veel lineaarselt sõltuv ergastusest. Selleks varieeriti ergastuse tugevust neutraalse filtri abil, registreeriti signaal ja võimsusmõõtjaga vastav ergastuse võimsusreferents. Saadud ergastuse – signaali lineaarsuspiirkonna infot sai anda ka näiteks registreerivale skriptile signaali tugevuse ülempiiri osas, alampiiri puhul tuli lähtuda kogemuslikust talutavast signaal-müra suhtest.

Filtrite F1 ja F2 valikut ja vastavaid ergastus- ja registreerimispiirkondi illustreerib joonis 6. Nende filtrite rollis olid kasutusel sinises spektri piirkonnas läbilaskvad (shortpass) filtrid FES0650 ja FES0700 (Thorlabs) ja punases läbilaskvad (longpass) filtrid 650LP, 700LP ja 750LP (Andor), mida kasutati kombinatsioonides 650LP+700LP ja 700LP+750LP. Vastavad läbilaskespektrid on kujutatud joonisel 6 halli joonega. Nooltega tähistatud ergastuspiirkonnad vastavad eri filtrikombinatsioonidele, samavärvilised spektrid näitavad osi fluorestsentsist, mida sai vastaval juhul mõõta (s.o. mis pääsesid läbi filtrist F2 ja ülejäänud mõõtekanalist).

Nende osade intensiivsuse kujutamisel on lähtutud samast normeringust nagu ka toodud kogufloorestsentsi spekter, aga parema nähtavuse huvides on mõned osad üles võimendatud näidatud koefitsientidega. Ergastuspiirkondade tähistused (650-, 650+, 700-, 700+) viitavad ligikaudsetele ergastuslainepikkuste väärtustele. Filtrite või nende kombinatsioonide kasutust kirjeldab järgmine tabel:

Ergastuspiirkond	F1	F2
650-	FES0650	650LP+700LP
650+	650LP+700LP	FES0650
700-	FES0700	700LP+750LP
700+	700LP+750LP	FES0700

**Tabel 1. Filtrite kasutus eri ergastuspiirkondade puhul.**



**Joonis 6. Mõõtepiirkondade skeem koos vastavate osadega fluorestsentsist.** Purpuse värviga on toodud neeldumisspekter ja mustaga kogu fluorestsentsi spekter, mõlemad on normeeritud maksimumi järgi. Hallide joontega on toodud kasutatud filtrikombinatsioonide läbilaskespektrid (vt. tabelit kasutuse kohta). Värvilised spektrid (oranž, roheline, sinine, punane) näitavad osi fluorestsentsist, mida sama värviga tähistatud mõõtepiirkonna (vastavalt 650-, 650+, 700-, 700+) puhul registreerida sai. Parema nähtavuse huvides on need osaspektrid (v.a. 700+) võimendatud näidatud koefitsientidega, peenema samavärvilise joonega on antud ka võimendamata kujud.

## Andmete töötlemine

Saadud andmed töödeldi mitmes järgus. Iga ergastuspiirkonna jaoks koostati kõigepealt vastava osalise fluorestsentsi spektri mudelkujude, mis saadi kõigi vastavas režiimis tehtud mõõtmiste keskmistamisel. Need mudelkujud vastavad joonisel 6 näha olevatele osaspektritele. Ühtlasi oli võimalik ka kontrollida, et kujud kogu piirkonna ulatuses sama püsivad, välistamaks erinevaid liitstruktuure.

Edasi lähendati üksikutel mõõtmistel saadud fluorestsentsispektrid mudelkujude lineaarteisendusega ( $y = Ax + B$ , kus  $y$  vastab üksikmõõtmisele ja  $x$  mudelile) ja fikseeriti lineaarliikme kordajad  $A$ . Sellise protseduuri mõtteks oli muuhulgas saada ka parameetrite standardhälbed, mis võimaldaksid hinnata tulemuste määramatusi. Jagades kordajad  $A$  vastavate korrigeeritud võimsusreferentsidega, saadigi kordaja täpsusega ergastusspekter vastavas piirkonnas. Võimsusreferentside korrigeerimiseks (kuna referents registreeritakse läbi objekti) korrutati need läbi mõõdetud neeldumisspektrist arvatud läbilaskvusega ergastuse lainepikkusel.

Seejärel sobitati eri režiimides mõõdetud piirkonnad paarikaupa kattuvates osades omavahel kokku. Selleks leiti kummaski piirkonnas samadel lainepikkustel mõõdetud ergastuste suhted ning siis nende kaalutud keskmine vastavalt mõlemast piirkonnast pärit punktide suhteliste määramatuste summale (kaaluks võeti selle summa ruudu pöördväärtus). Saadud kordajaga ühe piirkonna ergastusi korrutades saigi nad sobitada teise piirkonnaga.

Liites nii kõik mõõdetud piirkonnad, saadi tulemuseks üldine ergastusspekter, mis on põhimõtteliselt määratud ka veel ikkagi kordaja täpsusega (piirkondade sobitamisel üks kordaja jääb alati lahtiseks). Seda pidi lähendama mõõdetud neeldumisspektriga, aga nagu mainitud peatükis 1.5, tuli lisaks arvestada, et ergastusspekter on tegelikult 1 – läbilaskespekter. Seega tuli lähendamise käigus viia ka neeldumisspekter mainitud kujule (või siis arvutada ergastusspekter ümber neeldumise-esisusse, aga eelistame siiski esimest varianti). Selliseks lähendamiseks kasutati valemit

$$Ex(\lambda) = k \left( 1 - 10^{\frac{-(A(\lambda) - A_0)}{c}} \right), \quad (5)$$

kus  $Ex(\lambda)$  tähistab ergastusspektrit,  $A(\lambda)$  vastavat neeldumisspektrit,  $k$  on otsitav kordaja,  $A_0$  parand neeldumise võimaliku nullnivoo korrigeerimiseks ja  $c$  arvestab asjaoluga, et kiht, kust pärinevad kasutatavad neeldumise väärtused ja see, kust pärineb ergastuse käigus mõõdetud kiirgus, on üldiselt erineva paksusega. Lähendamiseks tuli valida piirkond, kus

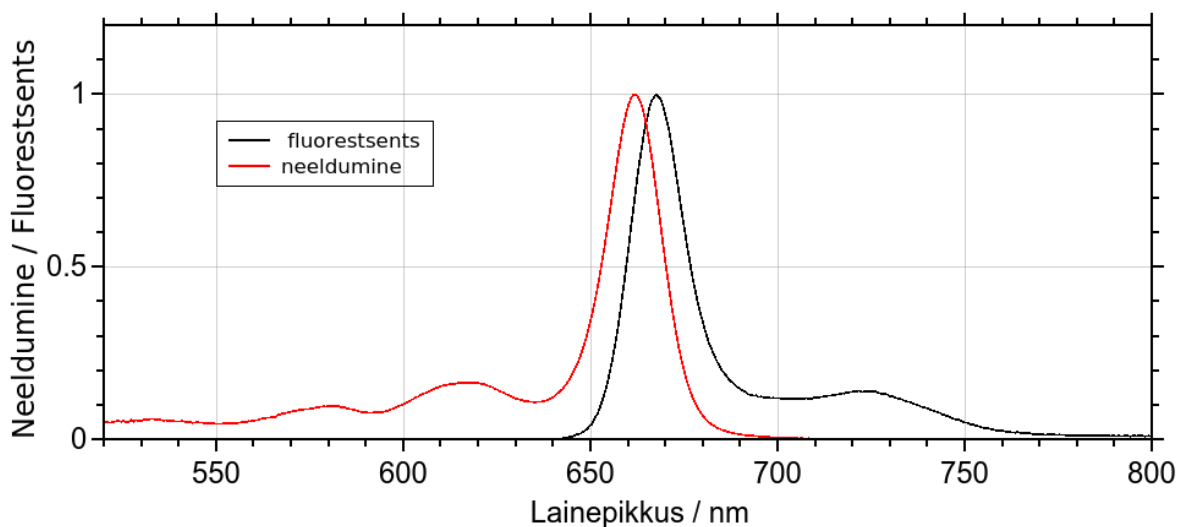
tavaneeldumisspekter on mõõdetav arvestatava täpsusega. Antud töös valiti selleks 630..700 nm.

Lähendamiseks (nagu ka esialgsete spektrite ja mudelkuju korral) kasutati SciPy arvutuspaketti [14] kuuluvat protseduuri *curve\_fit*, mis võib sisendina arvesse võtta ka punktide määramatuse hinnanguid ja kujundada selle põhjal lähenduspunkti kaalu (= määramatuse ruudu pöördväärtus). Antud juhul oli võimalik ette anda ergastuse määramatuse hinnangud. Lähendamise tulemusel saadud parameetrite põhjal ühitati mõõdetud ergastusspekter ja vastavalt valemile (5) ergastuse (1 – läbilaskvuse) esitusse ümberarvutatud neeldumisspekter. Lõpuks normeeriti mõlemad spektrid vastavalt (teisendatud) neeldumise maksimumile, võimaldamaks eri mõõtmiste paremat võrdlust.

Lisame paar märkust veel ergastuse määramatuste hindamise kohta. Nagu öeldud, saab esialgsest lähendusest kätte koefitsiendi standardhälbe, mis on ilmselt põhikomponent ergastuse määramatuses, peegeldades fluorestsentsisignaali tugevust / mürarohkest. Samuti on võimalik, mõõtes võimsusreferentsi aegreana, saada sealt kätte vastav standardhälve. Nende põhjal leitakse vastavad suhtelised määramatused, kasutades kattetegurit 2.6, mis vastab usaldusnivoole ~99 % suure hulga (100..200) punktide korral. Nende suhteliste määramatuste summeerimisel saadakse ergastuse üldine suhteline määramatus, millest edasi ergastuse väärtusega korrutamisel absoluutne määramatus.

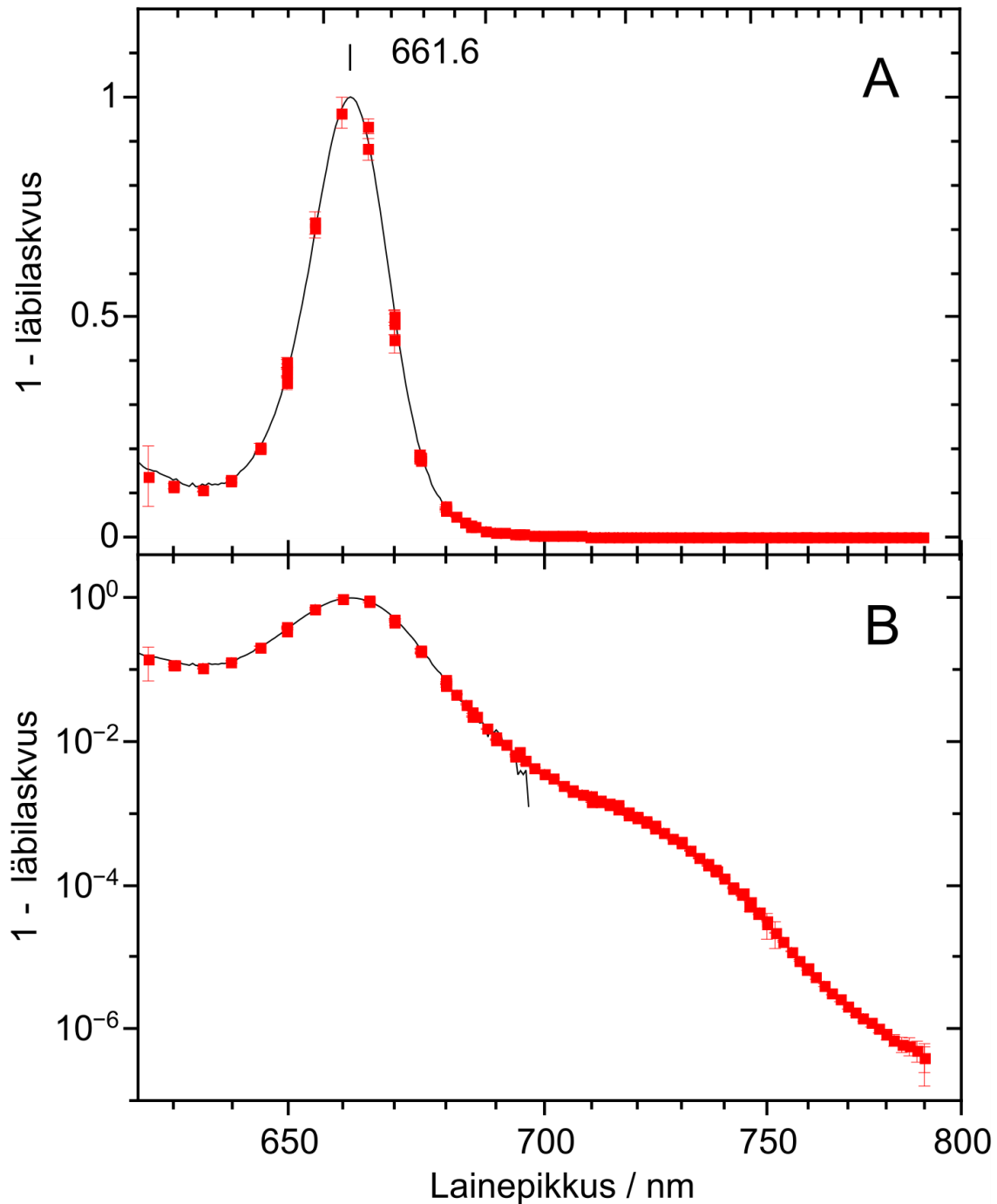
## 2.1 Tulemused

Joonisel 7 on toodud mõõdetud neeldumise ja fluorestsentsi spektrid.



**Joonis 7. Klorofüll *a* trietüülamiinlahuse neeldumise (punane joon) ja fluorestsentsi (must joon) spekter.** Maksimumide väärtused on normeeritud. Fluorestsentsi ergastamiseks kasutatud 594 nm He-Ne laserit.

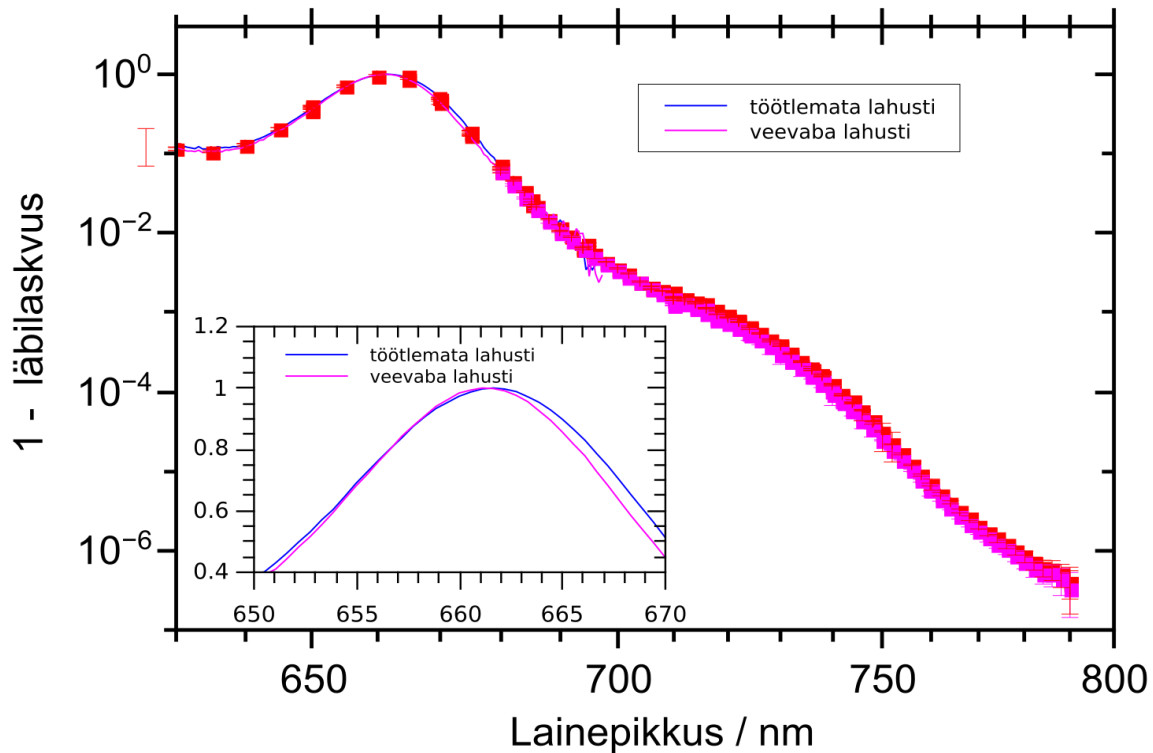
Joonisel 8 on võrreldud eelpool kirjeldatud viisil mõõdetud ja töödeldud ergastusspektrit ja vastavat tavaneeldumisspektrit samas esituses. Siit on näha, et tavaneeldumisspektri mõõtmine annab usaldusväärseid tulemusi vaid kuni 690 nm-ni. Samas on ergastusspektroskoopia meetodi abil võimalik neeldumise ulatust pikendada veel lausa 100 nm võrra, kuni 790 nm-ni. Sel moel ulatub mõõdetud neeldumine läbi umbes 6 suurusjärgu. Seda on sobiv jälgida, kasutades poollogaritmilist skaalat (joonis 7, B). Selles skaalas peaks pöördeksponentsiaalne ( $a^{-\lambda}$  ga võrdeline) seos väljenduma sirgjoonena, ja nagu näha, kui välja arvata „kühm“ 720-740 nm piirkonnas, on olukord sellele küllaltki lähedane.



**Joonis 8. Lineaarses (A) ja poollogaritmilises skaalas (B) ergastusspekter.** Pidevjoon tähistab otsemõõdetud neeldumisspektrit ning punased ruudud tavaneeldumisspektriga ühitatud töödeldud ergastusspektrite osi. Neeldumismaksimum vastab 661.6nm. Laine pikkused on esitatud energiaga lineaarses pöördskaalas

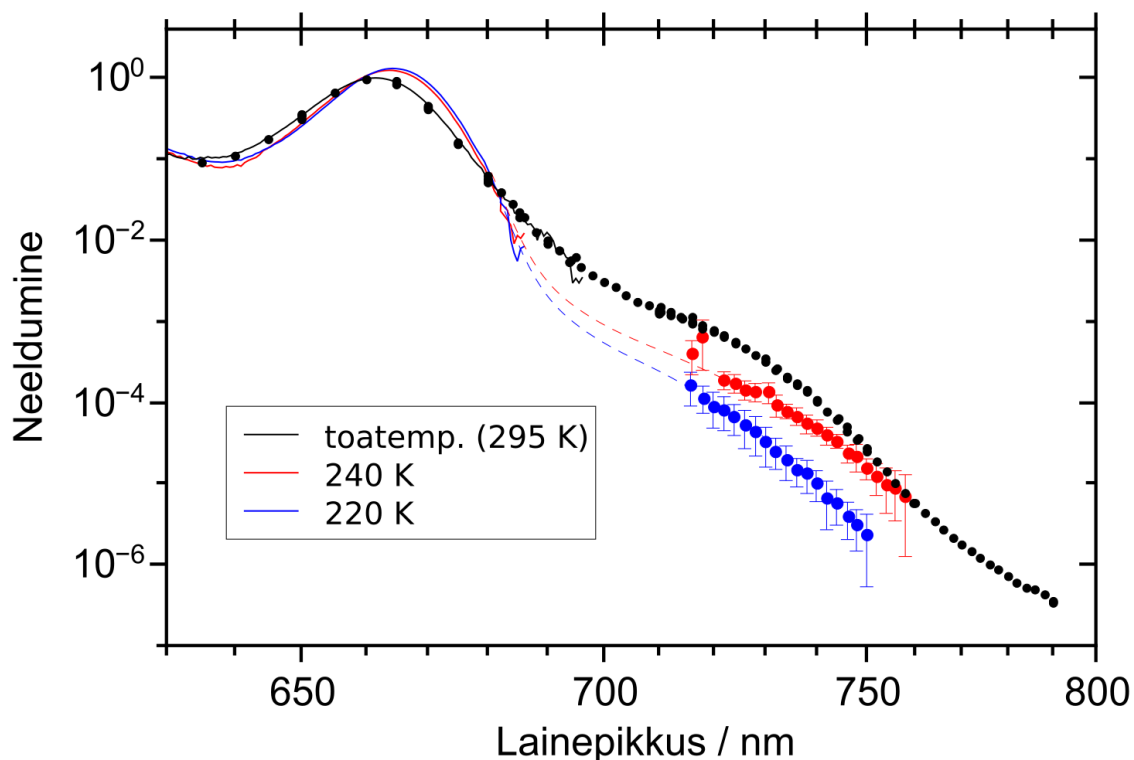
Mõningatel juhtudel, näiteks bakterklorofüllü molekulide puhul teatud lahustites, on täheldatud molekulide agregaatide tekkimist, mida hoiavad koos lahustis lisandina leiduvad vee molekulid [14]. Selline agregeerumine põhjustab neeldumisspektrite märgatavat punanihet ja võib põhimõtteliselt mõjutada ka spektri käitumist kaugemal maksimumist. Selliste efektide selgitamiseks teostatigi tavaneeldumise ja ergastusspektri punase (titaan-safiirlaseriga

mõõdetava) osa mõõtmised ka täiendava veest vabastatud lahustiga. Nagu näha joonisel 9, langevad veevaba lahustiga objektide ergastusspektrid küll veidike sinakamasse spektri ossa kui kuivatamata proovidest saadud spektrid, samas on see nihe üsna väike ( $\sim 0.4$  nm) ja on näha, et neeldumissaba käitumisele vee eemaldamine märgatavat mõju ei avalda.

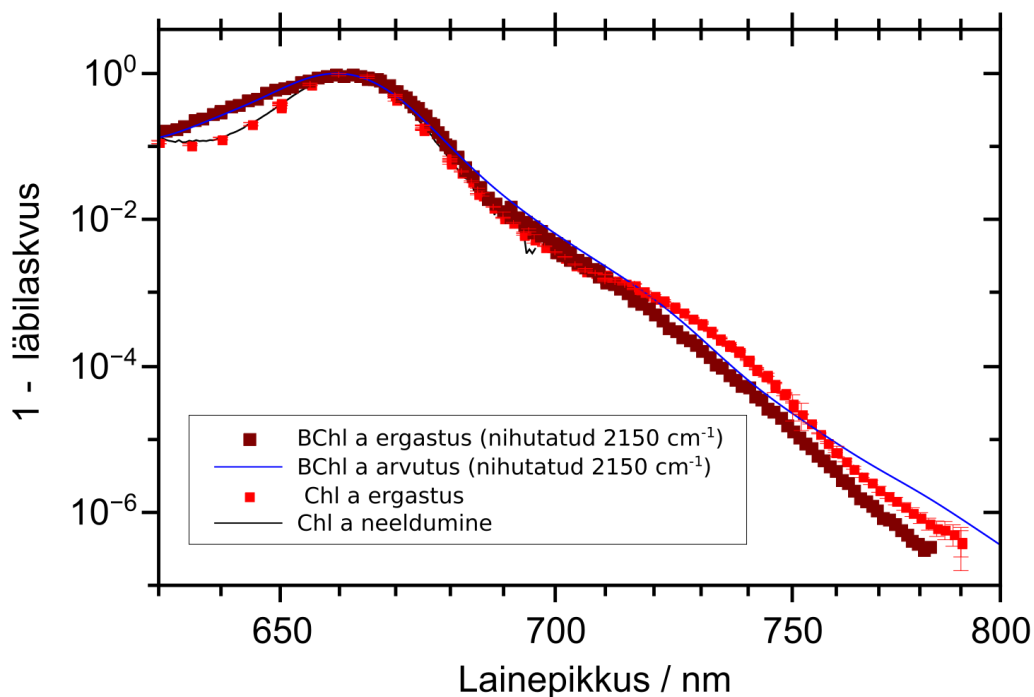


**Joonis 9. Molekulaarsõelte abil veest vabastatud lahusti ergastusspektri võrdlus töötlemata lahusti ergastusspektriga.** Väikesel joonisel on esitatud töötlemata ja veevaba lahusti neeldumisspektrite maksimumid. Punaste ruutudega on tähistatud töötlemata lahusti ergastusspektrit ning roosad veevaba lahusti ergastusspektrit. Pidevjoonega on tähistatud kummagi lahustiga saadud tavaneeldumisspektrid.

Temperatuuri alandamisel on märgata neeldumisspektrite punanihet. Antud töös kasutatud süsteemis lisandus sellele küll veel ka rõhuraku sulgemisel tekkinud väikese hüdrostaatilise rõhu tekitatud spektraalne nihe (2 nm), mis oli samuti punanihe. Joonisel 10 on näha kahel madalamal temperatuuril, 240 K ja 220 K, saadud tulemusi, tavaneeldumist ja ergastusspektrit. Viimast õnnestus nõrga signaali tõttu paraku mõõta ainult 700+ filtri piirkonnas (vt. joon. 6), mistõttu neeldumise käitumine piirkonnas 680 – 716 nm, nagu ka ergastuse üldine normeerimine tuli juhindudes tavaneeldumise sabast ja toatemperatuuril saadud andmetest umbkaudselt rekonstrueerida.



**Joonis 10. Madalamatel temperatuuridel registreeritud ergastus- ja neeldumisspektrite võrdlus toatemperatuuril mõõdetud spektritega.** Eri värvi ringid tähistavad erinevatel temperatuuridel mõõdetud ergastusspektreid ning ringidega sama värvi pidevjooned nende temperatuuridele vastavaid otsemõõdetud neeldumisspektreid. Punktiirjoontega on tähistatud ergastuse arvatav käik piirkonnas, kus mõõtmist ei saanud teostada.



**Joonis 11. Klorofüll *a* ergastusspektri võrdlus bakterklorofüll *a* andmetega tööst [14].** Helesinine pidevjoon tähistab [14] arvutuslikult saadud bakterklorofüll *a* neeldumist, tume pidevjoon klorofüll *a* otsemõõdetud neeldumist ning ruudud vastavaid ergastusi. Bakterklorofüll *a* ja klorofüll *a* spektri languse ning kuju võrdluse huvides on bakterklorofüll *a* spektreid nihutatud ( $2150 \text{ cm}^{-1}$  võrra) lühemate lainepikkuste suunas.

## 2.2 Järeldused

Töö peamiseks tulemuseks on kinnitus hüpoteesile, et klorofüll *a* neeldumine omab madalate energiatega suunas arvestatavat mõõdetavat väärtust kuni ca 140 nm ( $\sim 2600 \text{ cm}^{-1}$ ) kauguseni maksimumist. Seda, kuivõrd see on vastuolus mingite olemasolevate mudelitega, on isegi raske hinnata, sest kuigi tavaneeldumise jooni õnnestub sageli lähendada Gaussi jaotusega, kehtib selline lähendus tavaliselt pigem neeldumismaksimumi lähiümbruses. Praktilises mõttes sellepärast, et, nagu ka käesolevast tööst näha, on tavaneeldumise mõjupiirkond piiratud, aga ka teoreetiliselt viitab selline kuju enamasti pigem mittehomoogeensele jaotusfunktsioonile (molekulide individuaalsete spektrijoonte erinev laienemine), samas kui neeldumissaba omadused on rohkem määratud homogeense jaotusega (molekulide individuaalsete spektrijoonte ühetaoline laienemine). Seetõttu Gaussi jaotusest järelduv  $\exp -(v - v_0)^2$  tüüpi käitumine ei pruugi kehtida. Tulemustest nähtuvalt, kuna saba langus on poollogaritmilisel skaalal peaaegu lineaarne, ongi käitumine pigem pöördeksponentsiaalne.

Madalatemperatuursetest spektritest nähtub, et üldjoontes temperatuuri alandamisel neeldumissaba langus kiireneb (võrreldes omavahel 240 K ja 220 K andmeid), aga „kühm“ tundub siiski ka teatud mõju avaldavat. Kindlasti oleks vaja katset korrata täiustatud katseseadmega, võimalusel madalamal temperatuuril ja laiemas spektrivahemikus.

Sarnaseid mõõtmisi on varem tehtud bakterklorofüll *a* jaoks [14], laias laastus ka sarnaste tulemustega. Sel juhul on läbi viidud ka kvantkeemilisi simulatsioone, leidmaks Franck-Condoni faktoreid erinevate vibroonsete üleminekute jaoks põhiolekust esimesse ergastatud olekusse ja seeläbi hindamaks võimalust, et termiliselt asustatud põhioleku võnketasemetelt saab toimuda sellise madala energiaga üleminekuid ergastatud elektronolekusse. Tulemusena selgus, et võttes arvesse ka molekuli võnkumiste ülemtoone (täisarvkordeid sagedusi), on võimalik saada eksperimentaalsetele tulemustele küllaltki lähedane neeldumissaba kuju.

Joonisel 11 on võrreldud bakterklorofüll *a* jaoks saadud tulemusi tööst [14] käesolevas töös saadud neeldumisandmetega. Selleks on bakterklorofüllil arvatud ja eksperimentaalset neeldumis- (vst. ergastus-) spektrit nihutatud  $2150 \text{ cm}^{-1}$  võrra sinisemaks. Nähtub, et kuigi kvalitatiivselt on spektri punased servad mõlemal juhul üsna sarnased (isegi langused toodud skaalas on keskmiselt üsna lähedased), on siiski ka teatud erinevusi. Iseäranis on tulemustest näha neeldumisspektri saba peal ka teatud struktuuri 720 – 750 nm piirkonnas, mille tõlgendus on seni veel ebaselge. Teadaolevalt on arvutusi tehtud ka selle kirjeldamiseks, aga on selgunud,

et arvutused võnkumiste ülemtoonidega, nagu bakterklorofüll *a* puhul, ei osutu klorofüll *a* puhul piisavaks. Lootus on, et selle puhul aitab teatud võnkemoodide kombinatsioonide arvessevõtmine.

Madalaenergeetiliste ergastuste roll fotosünteesis on olnud viimasel ajal arutlusteemaks, aga peamiselt on väljapakutud mehhanismid olnud sõltuvad kollektiivsetest ergastustest erinevates kompleksides. [9] Selle töö valguses võib aga püstitada ka hüpoteesi, et äkki algavad sedalaadi protsessid juba madalamalt, molekuli tasemelt.

Milline võiks olla madalaenergeetiliste ergastuste funktsionaalsus klorofüll *a* molekulis? Näiteks võib see lisada klorofüll *a*-d sisaldavatele fotosüsteemidele paremad eeldused äärmuslike keskkonnatingimustega kohanemiseks (olukord, kus kõik muud lainepikkused peale spektri punase osa on ära tarbitud) või mõjutada energia ülekandetaspekte footonergastuse järgselt.

# Tänuavaldused

Töö autor soovib tänada enda juhendajat Kristjan Leigerit suure abi ja toetava hoiaku eest kogu bakalaureusetöö valmimise vältel. Veel soovib autor tänada Tartu Ülikooli Füüsika instituudi Biofüüsikalabori juhatajat Arvi Freibergi, kes töö teoreetilise baasi mõistmiseks asjakohast kirjandust jagas ning kõiki Biofüüsikalabori töötajaid, kes töö valmimise lõpujärgus rohkesti huvitavaid küsimusi ja ettepanekuid esitasid.

# Kirjandus

- [1] B. Ke, *Photosynthesis: Photobiochemistry and Photobiophysics*. Springer Netherlands, 2001.
- [2] P. H. Raven, R. F. Evert, ja S. E. Eichhorn, *Biology of Plants*, 7th tr. New York: W.H. Freeman and Company Publishers, 2005.
- [3] B. Grimm, R. J. Porra, W. Rüdiger, ja H. Scheer, *Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications*. Springer Science & Business Media, 2007.
- [4] J. Barber, „Photosystem II: the engine of life“, *Q. Rev. Biophys.*, kd 36, nr 1, lk 71–89, veebr 2003.
- [5] A. Freiberg ja G. Garab, „Basic optical spectroscopy for light harvesting“, *Light Harvesting in Photosynthesis*, CRC Press, 2018, lk 381–425.
- [6] J. R. Lakowicz, *Principles of Fluorescence Spectroscopy*, 3. tr. Springer US, 2006.
- [7] L. Jörg, „leipner photosynthesis consulting - applications - ozone damage“, *Chlorophyll a fluorescence measurements in plant biology*. [Online]. Available at: <http://www.photosynthesis.ch/fluorescence.htm>. [Vaadatud: 31-mai-2018].
- [8] J. Adolphs, „Theory of Excitation Energy Transfer in Pigment-Protein Complexes“, lk 7–28, 2008.
- [9] J. R. Reimers *et al.*, „Challenges facing an understanding of the nature of low-energy excited states in photosynthesis“, *Biochim. Biophys. Acta BBA - Bioenerg.*, kd 1857, nr 9, lk 1627–1640, sept 2016.
- [10] A. Freiberg ja G. Garab, „Basic optical spectroscopy for light harvesting“, 2018, lk 373–417.
- [11] M. . Davidson, „Molecular Expressions Microscopy Primer: Light and Color - Fluorescence - Overview of Excitation and Emission Fundamentals“. [Online]. Available at: <http://micro.magnet.fsu.edu/primer/lightandcolor/fluoroexcitation.html>. [Vaadatud: 25-mai-2018].
- [12] V. Kiisk, „Spektroskoopia alused (loengukonspekt)“, lk 30–31.
- [13] L. S. Forster ja R. Livingston, „The Absolute Quantum Yields of the Fluorescence of Chlorophyll Solutions“, *J. Chem. Phys.*, kd 20, nr 8, lk 1315–1320, aug 1952.
- [14] K. Leiger, J. M. Linnanto, ja A. Freiberg, „Vibronic Origin of the Q<sub>y</sub> Absorption Tail of Bacteriochlorophyll a Verified by Fluorescence Excitation Spectroscopy and Quantum Chemical Simulations“, *J. Phys. Chem. Lett.*, kd 8, nr 17, lk 4231–4235, sept 2017.

# **Lihtlitsents lõputöö reprodutseerimiseks ja lõputöö üldsusele kättesaadavaks tegemiseks**

Mina, Kristel Roots,

1. annan Tartu Ülikoolile tasuta loa (lihtlitsentsi) enda loodud teose

**„Klorofüll  $\alpha$  neeldumise madalaenergeetilise saba täpsem mõõtmine ergastusspektroskoopia abil“,**

mille juhendaja on Kristjan Leiger,

- (a) reprodutseerimiseks säilitamise ja üldsusele kättesaadavaks tegemise eesmärgil, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace-is lisamise eesmärgil kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni;
- (b) üldsusele kättesaadavaks tegemiseks Tartu Ülikooli veebikeskkonna kaudu, sealhulgas digitaalarhiivi DSpace'i kaudu kuni autoriõiguse kehtivuse tähtaja lõppemiseni.

2. olen teadlik, et punktis 1 nimetatud õigused jäävad alles ka autorile.

3. kinnitan, et lihtlitsentsi andmisega ei rikuta teiste isikute intellektuaalomandi ega isikuandmete kaitse seadusest tulenevaid õigusi.

Tartu, 1.06.2018.