



# VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

## FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

## ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

# METODY IN-SITU ANALÝZY FOTOSYNTETICKÝCH PIGMENTŮ V BAKTERIÁLNÍCH BUŇKÁCH

IN-SITU ANALYSIS OF PHOTOSYNTHETIC PIGMENTS IN BACTERIAL CELLS

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

BACHELOR'S THESIS

## AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Juraj Janošec

## VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.

BRNO 2023

## Zadání bakalářské práce

Číslo práce: FCH-BAK1860/2022 Akademický rok: 2022/23  
Ústav: Ústav fyzikální a spotřební chemie  
Student: **Juraj Janošec**  
Studijní program: Chemie a chemické technologie  
Studijní obor: Chemie pro medicínské aplikace  
Vedoucí práce: **Ing. Eva Slaninová, Ph.D.**

### Název bakalářské práce:

Metody in-situ analýzy fotosyntetických pigmentů v bakteriálních buňkách

### Zadání bakalářské práce:

1. Vypracovat literární rešerši na téma: i. struktura, vlastnosti a biologický význam bakteriálních fotosyntetických pigmentů, ii. metody kvalitativní a kvantitativní analýzy fotosyntetických pigmentů.
2. Na základě vypracované rešerše zvolit vhodný soubor technik pro analýzu pigmentů a aplikovat je na modelový pigment–produkcující mikroorganismus (*Rhodospirillum rubrum*).
3. Realizovat sérii experimentů za účelem ověření možností strukturní a kvantitativní analýzy pigmentů (případně dalších relevantních buněčných komponent) v bakteriální biomase modelového mikroorganismu.
4. Na základě dosažených experimentálních výsledků zhodnotit testované metody, doporučit vhodnou kombinaci metod a optimální analytické procedury pro in-situ analýzu bakteriálních pigmentů.

### Termín odevzdání bakalářské práce: 24.5.2023:

Bakalářská práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu. Toto zadání je součástí bakalářské práce.

-----  
Juraj Janošec  
student

Ing. Eva Slaninová, Ph.D.  
vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.  
vedoucí ústavu

V Brně dne 1.2.2023

-----  
prof. Ing. Michal Veselý, CSc.  
děkan

## **ABSTRAKT**

Táto bakalárska práca sa zaoberá navrhnutím a charakterizáciou vhodnej kombinácie metód analýzy fotosyntetických pigmentov v modelovom organizme, produkujúcich fotosyntetické pigmenty. Konkrétne bol skúmaný mikroorganizmus *Rhodospirillum rubrum*, ktorý okrem fotosyntetických pigmentov produkuje aj významné produkty, ako napríklad možnú náhradu plastov, polyhydroxyalkanoáty (PHA). Pri rôznych spôsoboch kultivácie s ohľadom na svetelné podmienky, bolo analyzované štrukturálne a kvantitatívne zloženie pigmentov. Medzi použité metódy boli zahrnuté spektroskopické metódy v oblasti UV-VIS. Konkrétne, jednopaprsková a dvojpaprsková UV-VIS spektroskopia v transmisnom, difúzne transmisnom móde a fluorescenčná spektroskopia. Pomocou týchto metód bola preukázaná prítomnosť bakteriochlorofylu a viacerých karotenoidov s najvyšším zastúpením spiriloxantínu.

## **KLÚČOVE SLOVÁ**

fotosyntetické pigmenty, bakteriochlorofyl, *Rhodospirillum rubrum*, spiriloxantín, UV-VIS spektroskopia, fluorescenčná spektroskopia, fotosyntéza

## **ABSTRACT**

This bachelor's thesis deals with the design and characterization of an appropriate combination of methods for the analysis of photosynthetic pigments in a model organism that produces such pigments. Specifically, the microorganism *Rhodospirillum rubrum* was investigated, which, in addition to photosynthetic pigments, also produces significant products such as potential plastic substitutes called polyhydroxyalkanoates. Structural and quantitative composition of the pigments was analyzed under different cultivation conditions with respect to light conditions. The methods used included spectroscopic techniques, particularly UV-VIS spectroscopy. Specifically, single-beam and double-beam UV-VIS spectroscopy in transmission and diffuse transmission modes, as well as fluorescence spectroscopy, were employed. These methods confirmed the presence of bacteriochlorophyll and several carotenoids, with the highest representation being of spirilloxanthin.

## **KEYWORDS**

Photosynthetic pigments, bacteriochlorophyll, *Rhodospirillum rubrum*, spirilloxanthin, spectroscopic methods, UV-VIS spectroscopy, fluorescence spectroscopy, photosynthesis.

JANOŠEC, Juraj. Metody in-situ analýzy fotosyntetických pigmentů v bakteriálních buňkách [online]. Brno, 2023 [cit. 2023-05-24]. Dostupné z: <https://www.vut.cz/studenti/zav-prace/detail/149033>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav fyzikální a spotřební chemie. Vedoucí práce Eva Slaninová.

## ČESTNÉ PREHLÁSENIE

Čestne prehlasujem, že som túto bakalársku prácu vypracoval celú samostatne a že všetky použité literárne a elektronické zdroje som riadne a správne citoval. Bakalárska práca je z hľadiska obsahu majetkom Fakulty chemickej VUT v Brne a môže byť využitá ku komerčným účelom len so súhlasom vedúceho bakalárskej práce a dekana FCH VUT.

.....  
Podpis

### Podakovanie:

Rád by som poďakoval svojej vedúcej bakalárskej práce Ing. Eve Slaninovej, Ph.D. za odborné vedenie, ústretový prístup a pomoc pri plánovaní experimentov. Ďalej by som rád poďakoval doc. Ing. Petrovi Sedláčkovi, Ph.D. a doc. Ing. Vojtěchovi Enevovi, Ph.D. za ich čas a rady pri vyhodnocovaní experimentálnej časti.

# OBSAH

1	Úvod .....	6
2	Teoretická časť.....	7
2.1	Fotosyntéza.....	7
2.1.1	Slnko ako zdroj energie .....	7
2.1.2	Absorpcia svetelnej energie–fotosyntetické pigmenty .....	8
2.1.3	(Bakterio)chlorofyly .....	9
2.1.4	Karotenoidy.....	10
2.1.5	Prenos energie vo svetlozberných systémoch.....	11
2.1.6	Svetlozberné anténové komplexy (LHC).....	11
2.2	Fotosyntetické baktérie.....	12
2.2.1	Purpurové nesirné baktérie (PNSB).....	13
2.2.2	Jadrové anténové komplexy spojené s reakčným centrom (RC–LH1).....	13
2.2.3	Biologický význam karotenoidov .....	14
2.3	Rhodospirillum rubrum .....	15
2.3.1	Zloženie fotosyntetického aparátu (FA) .....	15
2.3.2	Biosyntéza spiriloxantínu.....	16
2.5	Metódy analýzy fotosyntetických pigmentov .....	17
2.5.1	Súčasný stav riešenej problematiky .....	17
3	Experimentálna časť .....	18
3.1	Použité baktérie, chemikálie a prístroje.....	18
3.1.1	Použité baktérie.....	18
3.1.2	Zoznam použitých chemikálií.....	19
3.1.3	Zoznam použitých prístrojov .....	19
3.2	Kultivácia .....	20
3.2.1	Príprava inokula .....	20
3.2.2	Príprava produkčných médií .....	20
3.2.3	Podmienky kultivácie.....	21
3.2.4	Príprava fosfátového pufra.....	21
3.3	Príprava vzoriek na analýzu .....	22
3.3.1	Príprava sušenej biomasy.....	22
3.3.2	Plynová chromatografia .....	22

3.3.3	Extrakcia farebných pigmentov .....	22
3.4	Spektroskopické metódy .....	22
3.4.1	UV-VIS jednopaprsková.....	22
3.4.2	UV-VIS dvojpaprsková, transmisný a difúzne trasmisný mód .....	23
3.4.3	Fluorescenčná spektroskopia .....	24
4	Výsledky a diskusia .....	25
4.1	Základná charakteristika.....	25
4.1.1	Stanovenie obsahu polyhydroxyalkanoátov.....	28
4.2	Stanovenie koncentrácie fotosyntetických pigmentov pomocou UV-VIS spektrometrie 29	
4.3	UV-VIS spektrometria metanolových extraktov.....	31
4.3.1	UV-VIS spektrometria bakteriálnych suspenzií v transmisnom móde.....	33
4.3.2	UV-VIS spektrometria bakteriálnych suspenzií v difúzne transmisnom móde..	34
4.3.3	Fluorescenčná spektrometria bakteriálnych suspenzii.....	36
5	ZávER.....	42
6	Citované diela.....	43
7	Zoznam skratiek a symbolov .....	50
7.1	Zoznam skratiek .....	50
7.2	Zoznam symbolov .....	50

# 1 ÚVOD

Fotosyntéza predstavuje primárny anabolický dej na Zemi. Udržiava rovnováhu ekosystému, zabezpečuje energetickú a materiállovú základňu väčšinu živých organizmov. Zložitými fotofyzikálnymi a fotochemickými procesmi zachytáva, premieňa a využíva energiu svetla na biosyntézu organických látok. Súčasný výskum sa zameriava na fotosyntetický aparát, komunikáciu jednotlivých komponent v energetickom metabolizme a produkciu biomasy s obsahom látok, ktoré sú následne využiteľné v potravinárstve, poľnohospodárstve, biomedicíne, bioenergetike a ochrane životného prostredia.

Medzi vhodné metódy analýzy fotosyntetických pigmentov patria spektroskopické metódy. Spektroskopické analytické metódy prešli významným vývojom v priebehu posledných desaťročí a sú dostupnou metódou štúdia interakcií svetla s hmotou. Umožňujú identifikáciu biomolekúl, interakciu a zmeny molekulárnej štruktúry s rôznymi faktormi vonkajšími faktormi, ako sú teplota, pH alebo svetelné podmienky.

Fotosyntetické baktérie predstavujú vhodný modelový organizmus pre aplikáciu spektroskopických metód a štúdium fotosyntézy. Ide o relatívne jednoduché organizmy, ktoré majú malý genom a rýchly reprodukčný cyklus. Na základe toho je možné s nimi jednoduchšie manipulovať, a skúmať ich genetiku na molekulárnej úrovni. Ich fotosyntetický aparát je spravidla jednoduchší ako majú vyššie organizmy a je možné ho skúmať s vyššou presnosťou v detailnejšom rozsahu. Niektoré fotosyntetické baktérie sú schopné vykonávať fotosyntézu aj pri extrémnych podmienkach, ako sú napríklad vysoké teploty alebo koncentrácie solí. Vďaka tomu je možné sledovať mechanizmy prispôsobenia fotosyntetického aparátu a limitné stavy fotosyntézy.

Získane informácie o fotosyntéze, štruktúre fotosyntetického aparátu a energetického metabolizmu môžu byť následne aplikované vo vývoji technológií, spojených so zvýšením výnosu biomasy a produktov so širokým spektrom aplikácií. Najmä produkcia a distribúcia energie na výrobu energie a biodegradovateľných bioplastov. Mikrobiálne zdroje zahŕňajú rôzne mikroorganizmy, ktoré produkujú bioplasty ako sú napríklad PHA (polyhydroxyalkanoáty) alebo PLA (polylaktid). Spaľovanie biomasy predstavuje alternatívu k spaľovaniu vyčerpatelných fosílnych palív, ktoré sú mimochodom zdrojom znečistenia ovzdušia a skleníkových plynov. Významným produktom niektorých fotosyntetických organizmov je vodík. Vodík je čistý zdroj energie spaľovacích motorov a palivových článkov, pričom jediný vedľajší produkt je voda. Fotosyntetické organizmy taktiež môžu slúžiť ako modelové systémy prírodou inšpirovaných fotovoltaiických článkov. Fotovoltaiické panely využívajú proces fotosyntézy na zachytenie slnečného žiarenia, rozdelenia elektrónov a tvorbu elektrického prúdu. Vytváranie a optimalizácia technológií zameraných na produkciu energie je kľúčová pre udržateľný rozvoj a ochranu životného prostredia, ako aj pre zabezpečenie potrieb rastúcej populácie a hospodárskeho rastu industriálnej spoločnosti. Štúdium fotosyntézy rozvíja energetický priemysel efektívnejším využitím obnoviteľných zdrojov energie, ktoré sú udržateľnejšie a minimalizujú negatívne dopady na životné prostredie.



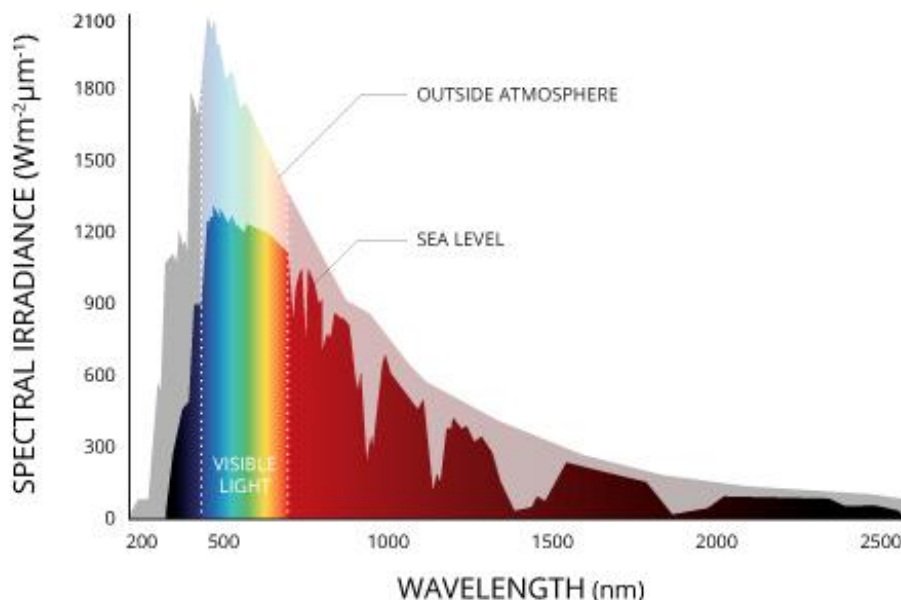
## 2 TEORETICKÁ ČÁST

### 2.1 Fotosyntéza

Fotosyntéza je proces premeny svetelnej energie na chemickú, ktorú organizmus využíva a uskladňuje. Pre život na Zemi je tato premena nevyhnutná. Podľa mechanizmu existujú dva hlavné typy: založená na chlorofyle a založená na rodopsíne. Táto práca sa venuje fotosyntéze založenej na chlorofyle, ktorá sa ďalej delí na oxygénnu a anoxygénnu podľa toho, či je kyslík medziprodukt alebo nie. Celý proces sa skladá z čiastkových dejov, absorpcie a prenosu svetelnej energie, primárny transport elektrónov v reakčnom centre (RC), stabilizácia energie sekundárnymi procesmi v elektrón-transportnom reťazci, biosyntéza a export stabilných produktov. Typickými zástupcami sú zelené rastliny, riasy, sinice a fotosyntetické baktérie [[1]; [2].

#### 2.1.1 Slnko ako zdroj energie

V prvej fáze fotosyntézy, označovanej ako svetelná fáza, je najprv absorbovaná svetelná energia, ktorá je využitá na syntézu ATP a NADPH. V temnej fáze sú tieto produkty použité v Calvinovom cykle na produkciu sacharidov asimiláciou  $\text{CO}_2$ . Elektromagnetické vlnenie, emitované Slnkom, poskytuje prírodný zdroj energie fotosyntézy. Účinky slnečného žiarenia na povrchu Zeme, vrátane zmien v intenzite, kvalite a prítomnosti UV žiarenia, ovplyvnili evolúciu fotosyntetických organizmov a stavbu ich fotosyntetického aparátu. Intenzita slnečného žiarenia závisí na faktoroch, ako zemepisná šírka, ročné obdobie, čas dňa, oblačnosť a nadmorská výška. Distribúcia energie emitovaného slnečného žiarenia vytvára spektrum ultrafialovej (UV), viditeľnej (VIS) a infračervenej (IR) oblasti [3].



Obrázok 1: Časť dopadajúceho žiarenia je rozptýlená alebo absorbovaná časticami v atmosfére. Z celkovej svetelnosti, ktorá dosiahne povrch Zeme, tvorí 49,4% IR žiarenie, 42,3% VIS a iba niečo cez 8% UV žiarenie [4]

Viditeľné spektrum obsahuje vlnové dĺžky v rozmedzí 400-700 nm a približne odpovedá fotosynteticky aktívnemu regiónu (FAR). Vlnové dĺžky FAR sú využívané fotosyntetickými organizmami najefektívnejšie. IR žiarenie nesie príliš málo energie pre fotosyntézu a môže spôsobiť prehrievanie. Významná časť fotosyntetických organizmov využíva elektromagnetické žiarenie blízko infračerveného žiarenia (NIR) [2].

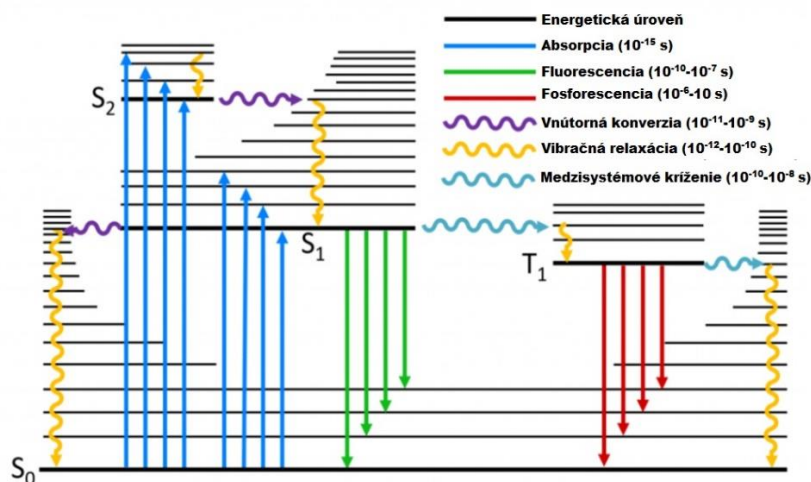
UV žiarenie s dlhšou vlnovou dĺžkou (UVA, UVB) v živých organizmoch indukuje oxidačný stres a denaturáciu proteínov. Krátkovlnné UVC žiarenie narúša integritu bunky katalýzou dimerizácie susedných pyrimidínových bází v DNA. Väčšina tohto potenciálne škodlivého žiarenia je absorbovaného ozónovou vrstvou pred dopadom na povrch Zeme [5]; [6].

## 2.1.2 Absorpcia svetelnej energie–fotosyntetické pigmenty

Fotochemické premeny svetelnej energie začínajú absorpciou fotónu fotosyntetickým pigmentom zapojeným vo fotosyntetickom aparáte (FA). FA svetelnej fáze je umiestnený vo fotosyntetických membránach. U rastlín a rias sú tieto membrány umiestnené v organelách, chloroplastoch. Jednoduchšie prokaryotické organizmy, sinice a baktérie, pre tento účel využívajú vnútorné membránové systémy (ICM). Obsahujú pigment-proteínové komplexy zodpovedné za zber svetla, prenos energie (LH) a rozdelenie náboja (RC) [2].

Energia fotónu excituje elektróny pigmentov z obsadených hladín na prázdne, vyššie energetické hladiny. K zmene elektronickej štruktúry molekuly zo základného do excitovaného stavu dochádza, iba ak je vlnová dĺžka absorbovaného fotónu rovná veľkosti energie, o ktorú sa elektronickej štruktúry líšia. Závisí na spektroskopických vlastnostiach molekuly a prostredia, v ktorom absorbuje. Spektroskopické vlastnosti, závislé na elektronickej štruktúre, prostredí a kvalite svetla definujú charakteristické funkcie molekuly, pozorované pri absorpcii, emisii a rozptyle elektromagnetického žiarenia [7] [8].

Absorpcia fotónu prebieha rádovo vo femtosekundách ( $10^{-15}$ ). *In vivo* je životnosť excitovaného stavu najbežnejšieho fotosyntetického pigmentu, chlorofylu, približne 4 ns [9]. Po uplynutí tejto doby sa nadbytočná energia uvoľňuje prostredníctvom žiarivých deaktivčných procesov fluorescencie alebo fosforescencie. Ďalšie možnosti prechodu excitovaného stavu predstavuje niekoľko nežiarivých procesov, **vnútornú konverziu**, **medzisystémové kríženie**, **prenos energie** na inú molekulu alebo chemická reakcia excitovaného elektrónu **fotochémia** [10].



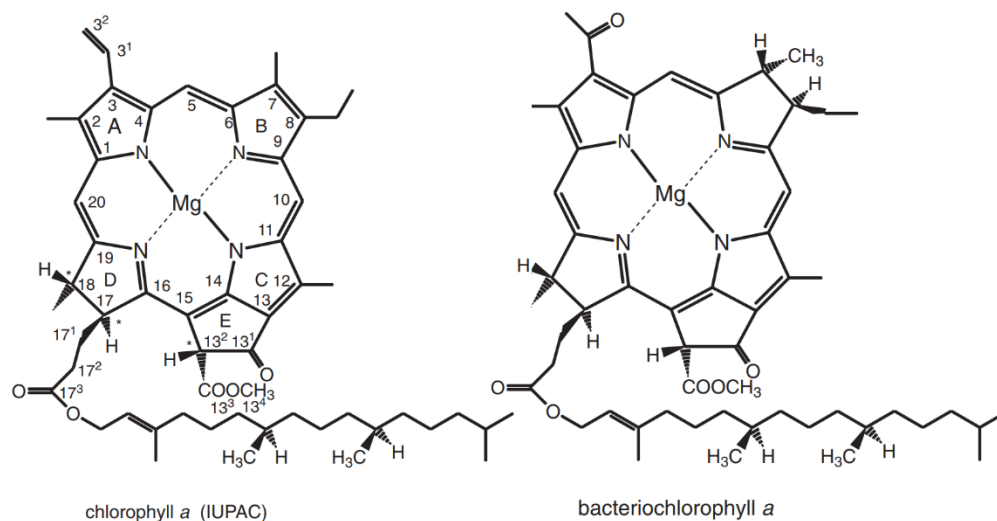
Obrázok 2: Jablonského diagram. Čierne hrubé čiary označujú energetickú úroveň základných vibračných hladín. Tenké čierne čiary označujú energie elektrónov v excitovaných vibračných stavoch. Hladiny  $S_0$ - $S_2$  označujú základný a excitované singletové stavy molekuly s rovnakou spinovou multiplicitou.  $T_1$  označuje prvú excitovanú hladinu v tripletovom stave. Farebné priamky označujú žiarivé a farebné krivky nežiarivé prechody medzi energetickými hladinám. Prevzané z [11], upravené

Jednou z možných adaptácií fotosyntetického organizmu na svetelné podmienky sú zmeny v elektronickej štruktúre fotosyntetických pigmentov. Neustále sa meniace životné prostredie,

jeho variabilita a nutnosť organizmov prispôbiť sa, viedla k biosyntéze pozoruhodného množstva molekúl naprieč širokým spektrom fotosyntetických organizmov. Medzi hlavné typy prírodných pigmentov spojených s RC patria chlorofyly (*Chl*) a bakteriochlorofyly (*BChl*). *Chl* tvoria skupinu zelených pigmentov, absorbujúcich vo viditeľnom rozsahu spektra, vo všetkých eukaryotických fotosyntetických organizmoch a siniciach. Prokaryotické organizmy využívajú pre rovnaký účel *BChl*. Doplnkové pigmenty fungujú v spojení s (*B*)*Chl*, aby maximalizovali absorpciu svetelnej energie a zvýšili účinnosť fotosyntézy. Najbežnejšími typmi doplnkových pigmentov sú karotenoidy (*Car*) a fykobilíny [2]. **Fykobilíny** sú vo vode rozpustné pigmenty nachádzajúce sa v niektorých typoch rias a siníc a absorbujú svetlo v modrej a zelenej oblasti spektra. Vytvárajú tetrapyrolovú lineárnu štruktúru bez centrálného kovu a sú viazané na proteíny z vonkajšej strany tylakoidovej membrány [12].

### 2.1.3 (Bakterio)chlorofyly

(*B*)*Chl* sú substituované cyklické tetrapyroly, ktorých existuje niekoľko typov, *Chl a–d* a *BChl a–g*. Všetky pozostávajú z chlorínoveho kruhu derivovaného z porfyrínu a esterovou väzbou viažu hydrofóbny fytolový reťazec. Štyri atómy dusíku v kruhu sú koordinované na centrálny atóm horčíku. Tvoria plochý kruhový útvar konjugovaných väzieb o veľkosti približne 10 Å, ktorý je zodpovedný za absorpciu svetelnej energie. Fytolový reťazec slúži na ukotvenie chlorofylu na tylakoidovú membránu v chloroplastoch. V *BChl* acylová skupina na uhlíku C-3 kruhu A a jednoduchá väzba v kruhu B medzi C-7 a C-8 namiesto dvojitej väzby v chlorofyloch znižuje stupeň konjugácie makrocyklu a symetriu molekuly v porovnaní s chlorofylmi. Táto zmena v štruktúre posúva absorpčné maximum smerom k vyšším vlnovým dĺžkami [2].



Obrázok 3: Štruktúra molekúl chlorofylu a a bakteriochlorofylu a, prevzané z [2], upravené

Absorpčné spektrum všetkých *Chl* zahŕňa dve hlavné spektrálne pásma: Soretov a Q pás. Soretov pás je v modrej časti absorpčného spektra, s maximom pre rôzne *Chl* v rozsahu 430-470 nm (pre *BChl* 350-400 nm), ktorý pozostáva z dvoch prekrývajúcich hladín B<sub>X</sub> a B<sub>Y</sub>. Kvantovo-chemické výpočty naznačujú prítomnosť viacerých spektrálnych pásov. Niektoré sú zakázané pre excitáciu jedným fotónom a označujú sa ako „tmavé“. Q pás sa rozdeľuje podľa Goutermanovho modelu na menej energetický Q<sub>Y</sub> pás (620-700 nm) a Q<sub>X</sub> pás (550-630 nm). Q pás v (*B*)*Chl* sa rozprestiera v rozsahu od 700-1010 nm X a y podľa ich smeru polarizácie

v makrocykle. V *Chl a* tieto prechody mieša silná vibronická väzba. Vďaka konjugovanému  $\pi$  elektrónovému systému v makrocykle chlorínu, sú tieto pásy spôsobené  $\pi$ - $\pi^*$  prechodmi.  $Q_y$  pás predstavuje základný HOMO–LUMO prechod, ktorý predstavuje prechod zo základného stavu do prvého excitovaného stavu, zatiaľ čo Soretov pás zodpovedá prechodu do vyššieho excitovaného stavu. Okrem singletových stavov popísaných vyššie, majú (*B*)*Chl* aj nižšie tripletové stavy, ktoré vznikajú s 30% účinnosťou prostredníctvom intersystémového prechodu z  $Q_y$ . Tripletové stavy (*B*)*Chl*a sa neúčastnia funkcie fotosyntézy, ale sú pre fotosyntetický aparát nebezpečné prostredníctvom reakcie s kyslíkom [13].

#### 2.1.4 Karotenoidy

**Karotenoidy** sú tetraterpénové pigmenty vyskytujúce sa vo fotosyntetických organizmoch, niektorých archebaktérií a hubách, riasach, rastlinách a živočíchoch. *De novo* syntetizujú karotenoidy iba fotosyntetické baktérie, huby, riasy a rastliny (Obrázok 8). Rozdeľujú sa na dve základné skupiny: karotény a xantofyly. Karotény sú tetraterpenoidy tvorené z poly–nenasýteného uhl'ovodíkoveho reťazca s rozsiahlym konjugovaným systémom dvojitých väzieb a metylovými substituentmi. Xantofyly majú navyše funkčné skupiny kyslíku, ako napríklad hydroxy, keto alebo epoxy skupiny. Uhl'ovodíkový reťazec je modifikovaný na úrovni hydrogenácie, cis–trans izomerizácie a cyklizácie na jednom alebo oboch koncoch. Ich biosyntetické modifikácie viedli k vzniku pozoruhodného množstva viac ako 850 molekúl [14].

Medzi významné vlastnosti karotenoidov patria lipofilicita, fotoabsorpcia a redoxné vlastnosti. Prirodzene sa vyskytujú v hydrofóbných lipidových dvojvrstvách buniek. In vivo sú ich fyzikálne-chemické a hlavne elektronické vlastnosti ovplyvnené väzbou blízkych molekúl, najmä bielkovín a membránových lipidov. Naopak, karotenoidy ovplyvňujú vlastnosti týchto subcelulárnych štruktúr z hľadiska stabilizácie, fluidity, permeability a ďalších. V prírode majú viacero funkcií. Vo fotosyntéze sú známe: absorpcia vlnových dĺžok neabsorbovaných (*B*)*Chl*, fotoprotekcia a antioxidačná aktivita (2.2.3)[15].

Fotofyzikálne vlastnosti karotenoidov sú prevažne determinované efektívnou dĺžkou konjugácie ( $N_{ef}$ ). Absorpcia energie spôsobuje prechod väzobných  $\pi$  elektrónov do neväzobných  $\pi^*$  ( $\pi \rightarrow \pi^*$ ). Energia prechodu delokalizovaných elektrónov do excitovaného stavu zodpovedá svetlu v oblasti viditeľného spektra. Excitácia má najvyšší absorpčný koeficient ( $\epsilon \sim 10^5 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ ) v rozsahu približne 400–550 nm [16]. Vďaka týmto prechodom majú karotenoidy charakteristickú žltú, oranžovú a červenú farbu. Tento prechod je zo základného stavu ( $S_0$ ) až do druhého singletového stavu ( $S_2$ ). Prvý singletový stav ( $S_1$ ) je opticky neaktívny pre jednofotónovú excitáciu zo základného stavu [17]. Dlhú dobu sa predpokladalo, že to je z dôvodu ich symetrie, avšak nedávno bolo poukázané, že metylové skupiny túto symetriu narúšajú a je nutný nový teoretický model [18][19].

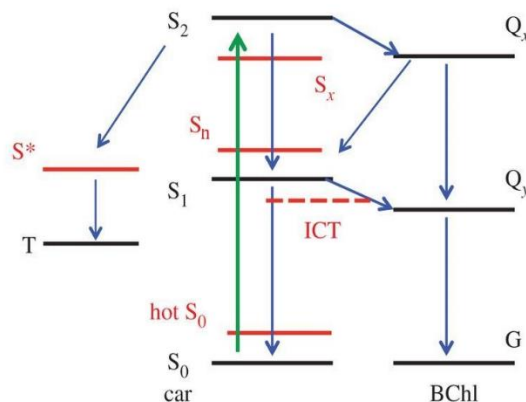
$S_2$  podlieha vnútornej konverzii do stavu  $S_1$  v intervale ( $\sim 100$ – $300$  fs) [20].  $S_1$  typicky prechádza do  $S_0$  nežiarivo v priebehu pár pikosekúnd [21]. Medzi faktory, ktoré vplyvajú na rozdiel energie  $S_2$  a  $S_1$  patria: (i) štruktúra *Car* a dĺžka konjugovaného systému, (ii) interakcia konjugovaného systému a prostredia, (iii) konformácia indukovaná proteínmi v LHC [22]. Životnosť  $S_1$  klesá so zvyšovaním dĺžky efektívnej konjugácie ( $N_{ef}$ ), s ktorou klesá energia tohto stavu a teda rozdiel energie medzi  $S_0$  a  $S_1$  [23]. V karotenoidoch s vyšším stupňom konjugácie ( $N_{ef} > 9$ ) existujú ďalšie „tmavé“ stavy medzi energetickými hladinami  $S_1$  a  $S_2$ . Tieto medzistavy, označené ako  $S_x$  a  $S^*$ , sú pravdepodobne zapojené do relaxačných ciest medzi  $S_2 \rightarrow S_1$  [24]; [25]

### 2.1.5 Prenos energie vo svetlozberných systémoch

Absorbovaná energia je prenášaná ako excitačná energia pigmentami v svetlozbernom komplexe (LH) a následne medzi jednotlivými LH, až kým nie je zachytená v RC. V RC dochádza k fotochemickej reakcii separácii nábojov s takmer jednotkovou kvantovou účinnosťou [26]. **Transfer excitačnej energie (EET)** prebieha v LH rôznymi mechanizmami: (i) Coulombovými dipól–dipól interakciami [27], (ii) interakciami v dôsledku prekryvu intermolekulárnych orbitálov [28].

Vzdialenosť a orientácia majú zásadný vplyv na elektronické viazanie pigmentov a mechanizmus EET. Elektronické viazanie popisuje mieru elektrostatickej interakcie medzi štruktúrami dvoch alebo viacerých chromofórov. Rozmanité svetlozberné komplexy pokrývajú široký rozsah intenzity elektronického viazania pigmentov.

Slabo viazané chromofóry, vzdialené približne (10-100) Å, prenášajú energiu mechanizmom Försterovho rezonančného transferu energie (FRET), pomenovaným po svojom autorovi v roku 1948. Podmienkou je prekryv emisného spektra darcu s absorpčným spektrom akceptora, čo je znakom spoločnej energetickej hladiny potrebnej na prenos excitácie Coulombovým (dipól–dipól) mechanizmom [29]. Svetlozberné systémy obsahujú častokrát vysoké koncentrácie pigmentov, až 0,6 M. Vzďialenosť susedných chromofórov je vtedy nižšia. Pohybuje sa v rozmedzí (5-20) Å. Dochádza k prekryvu orbitálov a vplyv elektrostatických interakcií sa stáva významný. Energia je prenášaná delokalizáciou excitónu v susedných chromofóroch, mechanizmom koherentného elektronického transferu energie (CEET)[28].



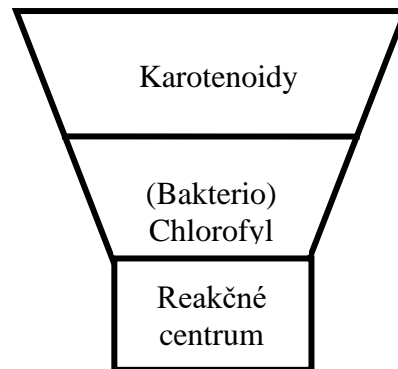
Obrázok 4: Jablonského diagram energetických stavov a prenosu energie karotenoidov (car) a (bakterio)chlorofylu [30].

Karotenoidy rozširujú absorpčný rozsah fotosyntetických organizmov absorpciou svetla v modro-zelenom regióne. EET nastáva zo singletového stavu na singletový stav červeno-posunutého chlorofylového pigmentu. Prenos  $Car \rightarrow (B)Chl$  môže nastať z dvoch energeticky najnižších stavov karotenoidov  $S_1$  a  $S_2$ . Existujú prípady, kedy EET  $Car \rightarrow (B)Chl$  nastáva iba z  $S_2$ , čo vo výsledku limituje efektívnosť prenosu na <60% [30].

### 2.1.6 Svetlozberné anténové komplexy (LHC)

Dôvodom pre rozvoj sofistikovaného systému zhromažďovania energie je skutočnosť, že chlorofyly v reakčnom centre (RC) nie sú schopné absorbovať slnečné svetlo dostatočne rýchlo pre efektívnu fotosyntézu. Táto neefektívnosť je spôsobená tým, že molekula chlorofylu absorbuje len pár fotónov za sekundu, čo je nedostatočné na poháňanie

viacelektrónového procesu fotosyntézy, ak by sa reakčné centrá nachádzali samostatne v membráne. Riešením tohto nedostatku je spojenie supramolekulárnych štruktúr pigmentov a proteínov, nazývaných svetlozberné anténové komplexy (LHC), s RC. LHC tvoria dôležitú súčasť fotosyntetického aparátu, ktorá vytvára pigmentom vhodné prostredie pre zachytávanie a prenos svetelnej energie. Stabilizačná energia proteínov LHC prispieva k zachovaniu vhodnej geometrie pigmentov, ktorá je nutná pre efektívny prenos energie. V LHC sa nachádzajú chemicky rozličné pigmenty, ktoré absorbujú energiu vo väčšom rozsahu spektra. Z evolučného hľadiska boli tieto systémy optimalizované aby mechanizmus EET bol schopný konkurencie extrémne rýchlim deaktivácnym procesom a energia mohla byť kontinuálne prenášaná do RC [2].



Obrázok 5: Schématické znázornenie zberu a prenosu energie krátkych vln karotenoidmi a následný prenos energie do reakčného centra v energetickom kanále.

Pigmenty absorbujúce krátko-vlnné fotóny majú relatívne vysokú energiu. V LHC dochádza k prenosu energie medzi vysoko-energetickými a nízko-energetickými pigmentami, ktoré sú k RC priblížené podľa klesajúcej energie. Každý prenos energie je spojený s jej úbytkom vo forme tepla a priblížením excitácie k RC. Svojím usporiadaním teda vytvárajú energetické kanály, ktoré smerujú excitačnú energiu do RC [31].

Podľa polohy voči membráne a spojení s RC môžu byť rozdelené na **integrálne** a **periférne anténové komplexy**. Proteíny integrálnych komplexov prechádzajú lipidovou dvojvrstvou a pigmenty sú častokrát vnútri. Periférne anténové komplexy sú spojené s medzimebránovými komponentami, ale dovnútra nevstupujú.

Integrálne membránové komplexy **zlúčených antén a reakčných centier** zahrňujú pigmenty a anténové systémy priamo viazané s RC. Tieto komplexy sa biochemicky nedajú oddeliť od elektrón-transportných komponentov, pretože sú viazané na rovnaký polypeptid. Príkladom zložitých proteínových komplexov zlúčených antén a reakčných centier sú fotosystémy I a II rastlín a siníc. **Jadrové anténové komplexy (RC-LH1)** majú presne definovanú stechiometriu pigmentov a orientáciu, aby efektívne prenášali excitačnú energiu na RC. Nie sú však priamo viazané na rovnaký polypeptid ako RC. Posledný typ integrálnych membránových komplexov zastupujú **doplňkové antény (LH2-3)**. Vždy sa nachádzajú v organizmoch ako doplnky k zlúčeným alebo jadrovým komplexom. Môžu byť prítomné vo variabilných množstvách v závislosti od podmienok rastu a ich fyzické usporiadanie s ostatnými anténami a komplexmi reakčného centra nie je fixné v čase ani v priestore [2].

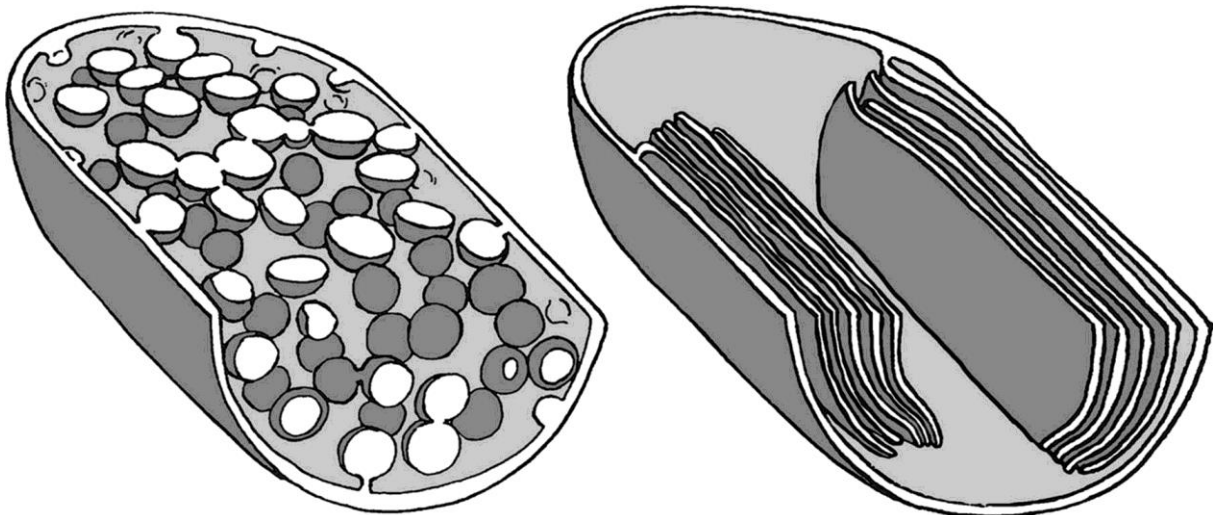
## 2.2 Fotosyntetické baktérie

Prvé známky života fotosyntetických organizmov na Zemi sú datované približne pred 3,4 miliardami rokov. Medzi ich ranných zástupcov patria práve fotosyntetické baktérie a

primitívne riasy. Existuje 5 rozličných skupín baktérií, ktoré sú schopné fotosyntézy. 4 z nich sú anoxygenné, takže neprodukujú kyslík. Patria sem purpurové baktérie, zelené siričné/ nesiričné baktérie a heliobaktérie. Jedinú skupinu oxygenných fototrofov tvoria sinice s hlavným fotosyntetickým pigmentom, chlorofylom [32].

### 2.2.1 Purpurové nesiričné baktérie (PNSB)

Významnú skupinu metabolicky prispôsobivých fotosyntetických organizmov predstavujú **purpurové nesiričné baktérie (PNSB)**. Dokážu rásť fotoautotrofne, fotoheterotrofne, fermentáciou a anaerobným, či aerobným dýchaním. Rastú vo všetkých druhoch vodných prostredí a sedimentoch s dostatkom svetla a nízkym obsahom kyslíku, prípadne v anoxických podmienkach. V týchto podmienkach im je k dispozícii ďaleké červené a zelené svetlo, ktoré nebolo odfiltrované vyššími organizmami s chlorofylovými pigmentami. Svetlo absorbujú fotosyntetickým aparátom v intracytoplazmatickej membráne (ICM). ICM je modifikovaná oblasť vnútornej bunkovej membrány. Vytvára trubice, vezikuly alebo ploché lamelárne membrány [33].



Obrázok 6: Ilustrácia vezikulárnej (vľavo) a lamelárnej (vpravo) ICM architektúry *Rba. sphaeroides* a *Rps. palustris* jednotlivo [34]

Parciálny tlak kyslíka a intenzita svetla sú hlavnými vonkajšími faktormi, ktoré vplyvajú na tvorbu ICM a vývoj fotosyntetického aparátu a teda kvalitu a kvantitu zapojených pigmentov. Pri nízkej svetelnej intenzite dochádza k zvýšenej produkcii ICM a anténových proteínov, aby organizmus dokázal zozbierať čo najviac fotónov potrebných pre tvorbu protónového gradientu. Naopak, pri vysokých intenzitách svetla je nevyhnutné zabrániť poškodeniu z nadmernej excitácie. Nadmerné množstvo energie totiž môže viesť k produkcii nestabilných molekúl kyslíka. V tomto stave majú tendenciu reagovať s bunkovými štruktúrami a narúšať ich integritu [35].

Všetky druhy PNSB obsahujú jadrové komplexy svetlozberných antén spojených s reakčným centrom (RC–LH1). Niektoré druhy môžu obsahovať aj pomocné periférne antény (LH2). RC–LH1 Komplexy PNSB viažu bakteriochlorofyl a karotenoidy.

### 2.2.2 Jadrové anténové komplexy spojené s reakčným centrom (RC–LH1)

RC–LH1 komplexy purpurových baktérií *Rhodobacter sphaeroides* [36] a *Rhodospseudomonas palustris* [37] sa podarilo rozlúštiť pomocou röntgenovej kryštalografie a kryoelektrónovej mikroskopie. Variácia v štruktúre poukazuje z evolučného hľadiska na

významný mechanizmus adaptácie na premenlivé enviromentálne podmienky PNSB spojené s efektívnou fotosyntézou.

Všeobecne platí, že všetky jadrové komplexy RC–LH1 musia plniť dve základné funkcie:

- poskytnúť vedenie pre prenos excitačnej energie, ktorá spojí absorpciu svetla v anténovom systéme s fotochemickým oddelením nábojov v reakčnom centre (RC)
- redukované prenášače musia byť schopné prejsť cez prstenec LH1 a zúčastniť sa redoxných reakcií v elektróntransportnom reťazci. Po transporte elektrónov cez cytochróm b/c1 komplex sú vracané späť do RC, kde sú opäť excitované fotónmi svetla a proces sa opakuje cyklickou formou [2].

Fotosyntetické baktérie majú oproti rastlinám a sinicám komplexnejšiu cyklickú dráhu, ktorá zahŕňa viaceré chinoidné prenášače a cytochrómy. Tento komplexný systém umožňuje baktériám aktívny transport protónov do extracelulárneho priestoru. Vytvorený protónový gradient slúži ako hnacia sila pre syntézu ATP, ktorá je katalyzovaná enzýmom ATP syntázy v membráne [38].

### 2.2.3 Biologický význam karotenoidov

Ako svetlozberné pigmenty sú zapojené do fotosyntetického aparátu (FA) takmer všetkých fotosyntetických organizmov. Absorpciou v oblasti (400–550) nm a prenosom excitačnej energie na bakterio(chlorofyl) umožňujú efektívne využitie rozsahu žiarenia s najvyššou intenzitou. Chránia fotosyntetický aparát pred nadmerným slnečným žiarením a vplyvajú na štruktúru, vlastnosti a stabilitu membrán.

**Absorpcia svetla.** Funkcia komplementárnej absorpcie je obzvlášť dôležitá pre purpurové nesírne baktérie (PNSB), ktorých prirodzené svetelné podmienky sú pre ich rast obvykle limitujúce. PNSB baktérie, ktoré produkujú fotoaktívny pigment bakteriochlorofyl a veľké množstvo karotenoidov s dĺžkou konjugácie  $N=9-13$ . V RC tvoria komplexy s karotenoidom sferoidénom odvodeným od neurosporénu ( $N=9$ ) alebo so spirilloxantínom ( $N=13$ ) odvodeným od lycopénu. Dĺžka konjugácie je kľúčový parameter pre stanovenie efektivity mechanizmu prenosu energie. Neurosporén prenáša energiu s takmer 100% účinnosťou, zatiaľ čo spirilloxantín dosahuje účinnosť len približne 30% [39];[40].

**Fotoprotekcia.** Esenciálne pre FA baktérií sú predovšetkým z dôvodu schopnosti rozptýliť prebytočnú energiu priamo vo forme tepla alebo prostredníctvom xantofylového cyklu. Prebytočná energia, ktorá nevedie k oddeleniu nábojov RC vytvára tripletové stavy bakterio(chlorofylu). Experimentálne bolo potvrdené, že vznik tripletových stavov je priamo-úmerný intenzite svetla [41]. Životnosť tripletov dosahuje hodnôt rádovo až v mikrosekundách. Za tento čas v aerobných podmienkach dochádza k ich reakcii s kyslíkom a vytvoreniu reaktívnych kyslíkových častíc (ROS). Kyslík s prebytočnou energiou, singletový kyslík, je potenciálne škodlivý pre integritu významných biomolekúl ako proteíny, lipidy a DNA. Karotenoidy dokážu tlmiť vytvorené tripletové stavy a zabrániť tak tvorbe singletovému kyslíku. Táto reakcia je známa ako triplet-tripletový transfer energie. Na túto reakciu však karotenoidy potrebujú byť umiestnené v blízkosti (bakterio)chlorofylových pigmentov a energetická hladina tripletu karotenoidu musí byť tiež nižšia ako energetická hladina tripletu excitovaného (bakterio)chlorofylu a radikálu kyslíka [42].

**Antioxidačná aktivita.** Okrem zamedzenia vzniku singletového kyslíku fungujú ako aktívne zberače už vzniknutých ROS. V tomto procese sa karotenoidy zvyčajne zapájajú do reakcie s ROS pomocou kyslých vodíkov. Produkty reakcie sú častokrát ďalej chemicky modifikované a ďalej degradované. Redukované karotenoidy už nemusia fungovať ako účinné antioxidanty, ale naopak vytvárajú potenciálne nebezpečné oxidanty schopné reakcie s



biomolekulami. Antioxidačná aktivita karotenoidov sa exponenciálne zvyšuje s ich oxidačným potenciálom, ktorý klesá s dĺžkou konjugovaného reťazca. Elektrón–akceptorné skupiny alebo skupiny odoberajúce elektrónovú hustotu z konjugovaného reťazca oxidačný potenciál zvyšujú. Obe štrukturálne úpravy znižujú energiu najvyššieho okupovaného orbitálu (HOMO)[43].

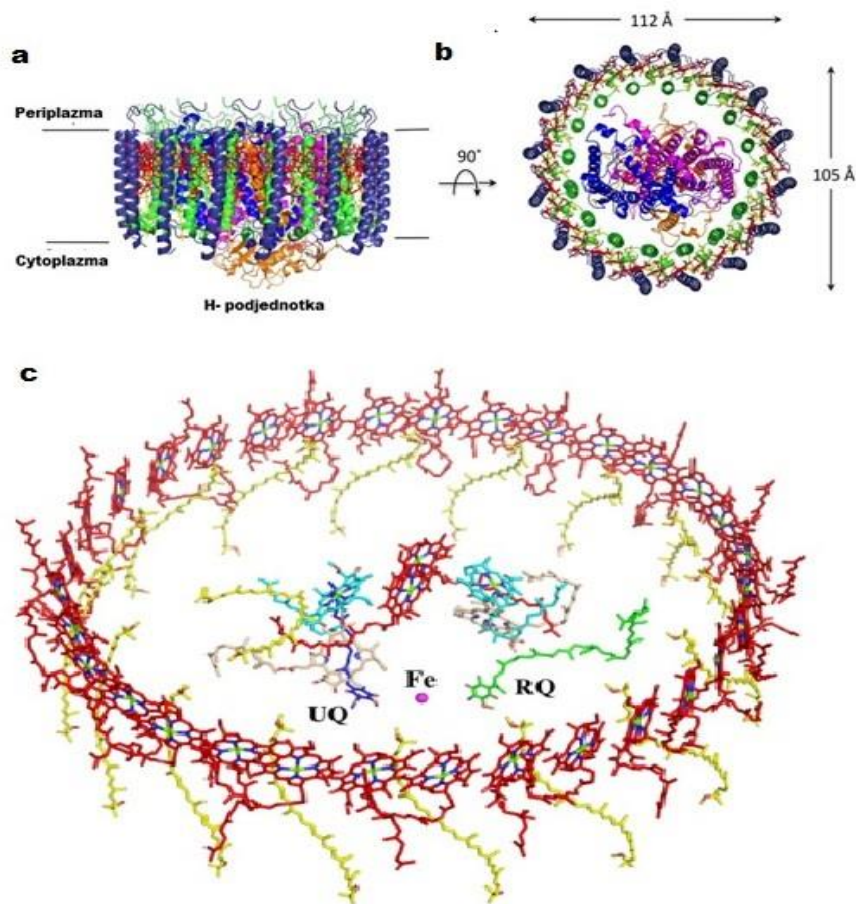
Vzhľadom na ich výnimočné vlastnosti s potenciálne prospešnými účinkami na ľudské zdravie, vrátane ochrany proti oxidačnému stresu, kardiovaskulárnym ochoreniam a rakovine, získavajú karotenoidy pozornosť vo farmaceutickom, potravinárskom a kozmetickom priemysle. Avšak najmä vo farmaceutickom priemysle zostáva výzvou vývoj nosičových systémov, ktoré by mohli prispôsobiť antioxidačnú aktivitu a stabilitu pre potrebné účely a zvýšiť tak biologickú dostupnosť [44].

## 2.3 Rhodospirillum rubrum

*Rhodospirillum rubrum* (*R. rubrum*) patrí do rodu *Rhodospirillum*, spadajúcej do čeľade Rhodospirillaceae, triedy *Alphaproteobacteria*. *R. rubrum* patrí do skupiny purpurových nesírnych baktérií (PNSB). Jedná sa o anoxygennú fotorganotrofnú baktériu, ktorá je schopná produkovať hodnotné bioprodukty vrátane polyhydroxyalkanátov (PHA), vodíku a karotenoidových pigmentov [45]. *R. rubrum* je zároveň jedným z nejpoužívanějších modelových organizmov v bakteriálnej fotosyntéze vďaka jej schopnosti rasti v rôznych enviromentálnych podmienkach, jednoduchému genetickému zloženiu a unikátnemu fotosyntetickému aparátu.

### 2.3.1 Zloženie fotosyntetického aparátu (FA)

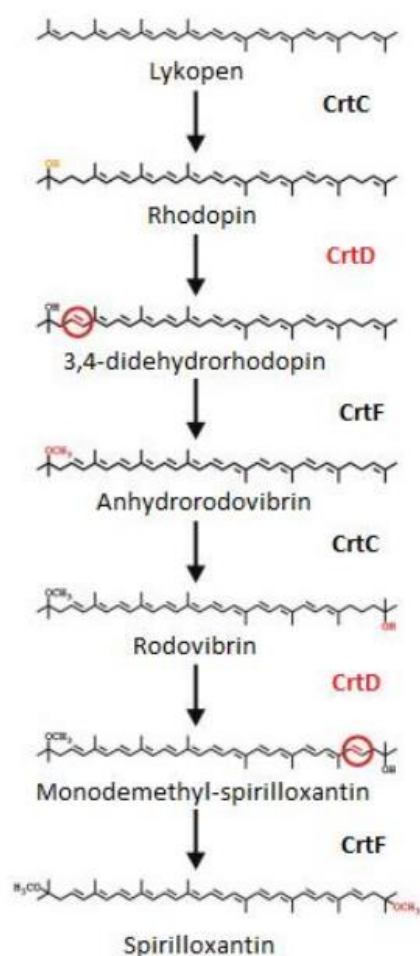
*R. rubrum* syntetizuje iba RC–LH1 komplex bez doplnkových antén. LH1 komplex tvorí uzavretý, mierne eliptický dvojité kruh pozostávajúci z 16 párov  $\alpha$  (vnútorných) a  $\beta$  (vonkajších) helikálnych polypeptidov. Každý polypeptidový pár je tvorený dvoma molekulami bakteriochlorofylu *a* a jednou molekulou trans–spiriloxantínu. Fotosyntetické pigmenty bakteriochlorofylu *a* (BChl *a*) sú esterifikované na reťazci propiónovej kyseliny geranylgeraniolom (BChl *a*<sub>G</sub>) namiesto fytolu. Postranné reťazce geranylgeranylu tvoria s  $\beta$ -polypeptidom konformáciu smerujúcu nahor s vyššou štrukturálnou homogenitou. Táto unikátna konformácia umožňuje  $\pi$ – $\pi$  interakcie medzi polypeptidmi prostredníctvom dvojitých väzieb v geranylgeranyl skupine a blízkymi bakteriochlorínmi. Prítomnosť viacerých dvojitých väzieb v geranylgeranyl skupine vedie k stabilnejšej konformácii [46].



Obrázok 7: Prehľad štruktúry komplexu LHI-RC *Rsp. rubrum*. (a) Pohľad z boku na LHI-RC rovnobežne s rovinou membrány. (b) Pohľad zhora na LHI-RC z periplazmatickej strany membrány. (c) Sklonený pohľad na usporiadanie kofaktorov. Farebná schéma: LHI- $\alpha$ , zelená; LHI- $\beta$ , sivomodrá; L-podjednotka, fialová; M-podjednotka, modrá; BChl a<sub>g</sub> v LHI a špeciálny pár, červené tyče; Doplnkový BChl a<sub>g</sub>, modré tyče; BPhe a<sub>g</sub>, svetloružové tyče; Spirilloxantín, žlté tyče; UQ10, modré tyče; RQ-10, zelené tyče; Fe, fialová guľa. Fosfolipidy a detergenty sú vynechané pre zjednodušenie. Prevzaté z [46], upravené

### 2.3.2 Biosyntéza spiriloxantínu

Purpurové nesírne baktérie (PNSB) prirodzene vynikajú vysokým obsahom karotenoidov, ktoré inkorporujú do svojho fotosyntetického aparátu (FA) (RC–LH1). Rovnako ako ICM, tak aj biosyntéza karotenoidov je regulovaná intenzitou a kvalitou svetla a množstvom kyslíku. Nedávno bola biosyntéza karotenoidov u PNSB rozdelená do dvoch hlavných tried: "normálna" dráha typu spiriloxantín a "neobvyklá" dráha spiriloxantínu. Baktéria *Rhodospirillum rubrum* využíva na syntézu karotenoidov "normálnu" dráhu spiriloxantínu, ktorá začína postupnou denaturáciou centrálného 24-uhlíkového fytoénu enzýmom - fytoendesaturázou - s výsledným karotenoidom lycopénom, kde 3,4- a 3'4'-uhlíky zostávajú nasýtené. Nasleduje hydratácia, desaturácia a metylácia na každom konci, čím vzniká symetrický karotenoid, spirilloxantín.



Obrázok 8: Syntéza spirilloxantínu, CrtD sú vyznačené ako svetlocitlivé enzýmy prevzané z [48]

## 2.5 Metódy analýzy fotosyntetických pigmentov

V predchádzajúcich kapitolách bola popísaná kľúčová úloha fotosyntetických pigmentov pre rast organizmu zapojením do fotosyntézy. Efektivita procesu premeny svetelnej energie je priamo závislá na zložení fotosyntetického aparátu a enviromentálnych podmienkach. Znalosť elektrónovej štruktúry, kompozície a funkcie pigmentov poskytuje hodnotné informácie pre porozumenie mechanizmu a adaptácie organizmu. Ako najvhodnejší typ analytických metód pre tieto účely sa javia spektroskopické metódy, ktoré umožňujú pozorovať interakcie hmoty so svetelným žiarením a získať informácie o elektronickej štruktúre a jej dynamike v rôznych prostrediach. Jedným z praktických aspektov vlastností absorpcie svetla je kvantitatívne stanovenie materiálu vo vzorke použitím Beer–Lambertového zákona. Štúdium baktérie *R. rubrum* použitím spektroskopických metód má potenciálne aplikácie v oblasti udržateľnej energie, biotechnologickom priemysle a mikrobiálnej ekológie.

### 2.5.1 Súčasný stav riešenej problematiky

*Qian a spol.* v 2003 charakterizovali pomocou optickej spektroskopie a kryo-elektrónovej mikroskopie mutanta *R. rubrum* [*pSK1bchP*] modifikovaného esterifikáciou bakteriochlorofylov pomocou génu *bchP* z *Rhodobacter sphaeroides*. Na zistenie vplyvu tejto zmeny bola použitá absorpčná a fluorescenčná spektroskopia pri nízkej teplote a cirkulárny dichroizmus na RC–LH1 komplexoch obsahujúcich fytolovaný Bchl *a*. Zloženie karotenoidov

*R. rubrum* [pSK1bchP] sa výrazne líšilo od divokého typu a najviac zastúpený bolo jeden z prekursorov spiriloxantínu, rodovibrin. Výsledky ukázali, že fytolovaný BChl môže nahradiť pôvodný pigment bez výrazných porúch na väzobných miestach a môže byť úspešne použitý vo fotosyntetickom aparáte *R. rubrum* [49].

*Kosumi a spol.* v 2012 merali dynamiku excitovaných stavov spiriloxantínu v roztoku a viazaných na RC–LH1 baktérie *R. rubrum*, indukovaných dvoma po sebe idúcimi laserovými impulzmi metódou femtosekundovej pump-probe spektroskopie (FPPS). Tato sofistikovaná a cenovo náročná metóda sa využíva najmä na štúdium excitovaných stavov molekúl a polovodičov, kde sú excitované stavy krátkodobo stabilné a prechádzajú rýchlymi procesmi. V tejto metóde sa najprv použije krátky laserový impulz (pump) na excitáciu materiálu na následne sa použije slabší laserový pulz (probe) na meranie absorpčných zmien v materiáli po určitom čase excitácie. Použitím tejto metódy pozorovali S\* stav spiriloxantínu v roztoku aj viazaného na RC–LH1, zatiaľ čo najnižší tripletový stav spiriloxantínu existoval iba v prípade viazania na proteín [50].

*Maiuri a spol.* v 2015 použili ultra-širokospektrálnu dvojrozmernú elektronickú spektroskopiu (2DES) na štúdium dráh prenosu excitačnej energie vo fotosyntetickom aparáte *R. rubrum*. Konkrétne fotoindukované procesy: (i) S<sub>2</sub>→S<sub>1</sub> internú-konverziu (IC) spiriloxantínu (Spx), mediovaného stavom S<sub>x</sub>, (ii) vytvorenie S\* stavu v Spx s reaktívne dlhou životnosťou, (iii) EET z S<sub>2</sub> Spx na Q<sub>x</sub> BChl a nasledovaný Q<sub>x</sub>→Q<sub>y</sub> IC a (iv) priamy Q<sub>x</sub>→Q<sub>y</sub> IC BChl a [51].

*D. Kaftan a M. Koblizek* v 2019 skúmali vplyv teploty na fotosyntetické reakcie použitím časovo rozlíšenej fluorescencie bakteriochlorofylu, stacionárnej diferenciálnej absorpčnej spektroskopie a polarografických meraní dýchania v intaktných bunkách. Bolo zistené, že aktivita elektrónového transportu sa zvyšovala s teplotou až do teplot 60°C, kedy sa primárna fotochémia stala reverzibilne inhibovaná. Nad 71°C sa fotosyntetické komplexy začali rozkladať, čo sa prejavilo poklesom všetkých fluorimetrických parametrov a vymiznutím absorpčného pásma LH1 pri 880 nm. Tento experiment ukázal dobrú tepelnú stabilitu fotosyntetického aparátu *R. rubrum* [52].

*Yukihara a spol.* v 2022 stanovili pomocou fluorescenčnej excitačnej spektroskopie efektívnosť EET z karotenoidu vyšších rastlín β-apo-8'-karotenalu inkorporovaného v LH1 komplexe mutanta bez karoteknoidov *R. rubrum* G9+ na 77–79%. β-apo-8'-karotenal generuje excitovaný stav s intramolekulárnym rozdelením náboja detegovaný pomocou FPPS [53].

*M. Niedzwiedzki a spol.* skúmali rezonančnou Ramanovou spektroskopiou funkcionality svetlozbernej antény (LH2) komplexov geneticky modifikovaného kmeňa *Rhodobacter sphaeroides*, kde bola expresovaná syntéza spiriloxantinových typov karotenoidov. Prvý singletný stav (S<sub>1</sub>) karotenoidov s počtom konjugovaných dvojtých väzieb N ≥ 13 mal podobnú životnosť v LH2 ako aj v organickom rozpúšťadle. Efektívnosť prenosu energie spiriloxantínu/ diketospiriloxantínu na BChl a bola stanovená na ~40% a prevažne spôsobená IC z S<sub>2</sub>. Celkový výťažok prenosu energie bol nižší v porovnaní s karotenoidmi s krátkym reťazcom [54].

### 3 EXPERIMENTÁLNA ČASŤ

#### 3.1 Použité baktérie, chemikálie a prístroje

##### 3.1.1 Použité baktérie

V experimentálnej časti boli použité kultúry bakteriálneho kmeňa *Rhodospirillum rubrum* DSM 467, získané z nemeckej zbierky mikroorganizmov.

### 3.1.2 Zoznam použitých chemikálií

- LB Broth (Sigma Aldrich Inc.)
- Agar powder (HIMEDIA)
- Biotin (Sigma Aldrich Inc.)
- D-fruktóza (Lach-Ner, ČR)
- Dihydrogenfosforečnan draselný,  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  (Lach-Ner, ČR)
- Disodná sůl kyseliny ethylendiamintetraoctové,  $\text{Na}_2\text{EDTA}$  (Lach-Ner, ČR)
- Heptahydrát síranu hořečnatého,  $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$  (Lach-Ner, ČR)
- Hydrogenfosforečnan disodný,  $\text{Na}_2\text{HPO}_4$  (Lach-Ner)
- Hydrogenfosforečnan draselný,  $\text{K}_2\text{HPO}_4$  (Lach-Ner, ČR)
- Hydroxid sodný,  $\text{NaOH}$  (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid amonný,  $\text{NH}_4\text{Cl}$  (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid draselný,  $\text{KCl}$  (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid nikelnatý,  $\text{NiCl}_2$  (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid sodný,  $\text{NaCl}$  (Lach-Ner, ČR)
- Chlorid vápenatý,  $\text{CaCl}_2$  (Lach-Ner, ČR)
- Kvasniční extrakt (HIMEDIA)
- Kyselina boritá,  $\text{H}_3\text{BO}_3$  (Lachema, ČR)
- Molybdenan sodný,  $\text{Na}_2\text{MoO}_4$  (Lach-Ner, ČR)
- MOPS (Sigma Aldrich Inc.)
- Síran železnatý,  $\text{FeSO}_4$  (Lach-Ner, ČR)
- Trihydrát octanu sodného,  $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$  (Penta)
- Metanol p.a. (Lach-Ner, ČR)

### 3.1.3 Zoznam použitých prístrojov

- Analytické váhy, Ohaus Pioneer PA224C
- Centrifúga, Hettich EBA 200
- Centrifúga, Hettich EBA Hettich
- Centrifúga, Sartorius Sigma 1-15
- Inkubátor, Binder Avantgarde
- Laminárny box, Euroclone BioAir Auro mini
- Magnetická míchačka, Biosan MMS-3000
- Nanofotometer, PEARL
- pH meter, Thermo Scientific pHTester 30
- Plynový chromatograf s FID, Thermo Scientific Trace 1300
- $\phi 60$  príslušenstvo integračnej komory (P/N 2J2-0176)
- Spektrofluorometer, Edinburgh Instruments FS5
- Temperovaná trepačka, Heidolph Unimax 1010, Heidolph Instruments
- Temperovaná trepačka, IKA KS4000i control
- Termostat, LS-35
- UV-VIS spektrofotometer, Hitachi U-3900H
- Váhy, Kern EW 620-3NM
- Vortex, Benchmark BenchMixe

## 3.2 Kultivácia

### 3.2.1 Príprava inokula

Bakteriálna kultúra *Rhodospirillum rubrum* bola najprv z kryoskúmavky zaočkovaná bakteriálnou kľučkou na Petriho misky so sterilným kultivačným médiom LB Broth o zložení:

Trypton	10 g
Kvasničný extrakt	5 g
NaCl	5 g
Agar	20 g
Destilovaná voda	1000 ml

Agarové platne boli uložené v chladničke na 5 dní. Ďalej bolo pripravené inokulum pre rast bakteriálnej kultúry *Rhodospirillum rubrum*:

- Erlenmeyerové banky o objemu 500 ml
- 100 ml tekutého LB Broth
- po sterilizácii zaočkované pomocou bakteriálnej kľučky z agárovej platne

Po zaočkovaní boli inokulá uložené na temperovanej trepačke s frekvenciou trepania 160 rpm a teplotou 30 °C, po dobu 72 h za svetla.

### 3.2.2 Príprava produkčných médií

Na kultiváciu *Rhodospirillum rubrum* boli použité 2 typy produkčných médií (PM), ktoré sa líšili v objeme a použitom laboratórnom skle:

- 1) 45 ml produkčného média SYN+FAY v 50 ml plastových skúmavkách s uzáverom
- 2) 100 ml produkčného média SYN+FAY v 100 ml Erlenmeyerových bankách

Zloženie PM SYN+FAY:

SYN salts (5x) (viď nižšie)	200 ml
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> / KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> (200 mM, pH 7,0)	0,5 ml
Biotin (20 mg/l, po sterilizácii)	0,1 ml
Roztok fruktózy (1,5 M)	10 ml
Roztok octanu sodného (1 M)	10 ml
Roztok kvasničného extraktu (50 g/l)	20 ml
Destilovaná voda	1000 ml

SYN salts (5x):

MgSO <sub>4</sub> · 7H <sub>2</sub> O	1,25 g
MOPS	10,5 g
NH <sub>4</sub> Cl	5 g
CaCl <sub>2</sub> · 2H <sub>2</sub> O	0,66 g
Roztok NiCl <sub>2</sub> (20 mM)	5 ml
Chelatovaný roztok FeMo (viď nižšie)	50 ml
Destilovaná voda	1000 ml

Výsledné pH roztoku SYN salts (5x) bolo upravené na hodnotu 7,1 pomocou NaOH.

Chelatovaný roztok FeMo:

H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	0,28 g
--------------------------------	--------

Na <sub>2</sub> EDTA	2 g
FeSO <sub>4</sub>	0,4 g
Na <sub>2</sub> MoO <sub>4</sub>	0,1 g
Destilovaná voda	1000 ml

Pripravené produkčné média (PM) boli rozliate do 8x 50 ml skúmaviek a 8x 100 ml Erlenmeyerových baniek po 45 ml a 100 ml jednotlivo. PM boli sterilizované sýtou vodnou parou s výkonom 1800 W, počas doby 30 min. Plastové skúmavky boli zabalené v alobale. Po vychladnutí sterilných PM na teplotu 30 °C bol asepticky pridaný biotín. Nakoniec boli PM zaočkované vypočítaným objemom bakteriálnej kultúry *Rhodospirillum rubrum* v exponenciálnej fáze rastu tak, aby optická hustota zaočkovaného PM dosahovala hodnotu 0,1 pri vlnovej dĺžke 660 nm.

### 3.2.3 Podmienky kultivácie

Baktérie *Rhodospirillum rubrum* boli kultivované v mikroaerobných podmienkach za tmy a za svetla. Všetky kultivácie boli prevedené bez premiešavania roztoku, aby bolo zamedzené prestupu kyslíku, pri teplote 30 °C v termostate a dobe kultivácie 6 dní. Pri kultivácii za tmy bol termostat prikrytý svetlone-priepustnou plachtou a za svetla bol použitý umelý zdroj žiarenia počas celej doby kultivácie. Vzorky na analýzu boli odoberané v časoch 72h, 96h, 120h, 144h z oboch produkčných médií.



Obrázok 9: kultivácia baktérie *R.rubrum* za svetla

### 3.2.4 Príprava fosfátového pufru

Na spektroskopickú analýzu vzoriek bakteriálnej suspenzie bol na riedenie a ako blank použitý roztok fosfátového pufru (PBS). Hmotnosti látok použitých na prípravu PBS boli nasledovné:

NaCl	8 g
KCl	0,2 g
Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	1,44 g

KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	0,24 g
Destilovaná voda	1000 ml

Výsledné pH bolo upravené na 7,5.

### 3.3 Príprava vzoriek na analýzu

#### 3.3.1 Príprava sušenej biomasy

Z bakteriálnej suspenzie bolo pipetou odobratých 10 ml do plastových skúmaviek. Plastové skúmavky boli odstredené na centrifúge pri 4000 otáčkach za minútu po dobu 6 minút. Po odstredení bol supernatant zliaty, k usadenej biomase bolo pridaných 5 ml PBS a obsah skúmavky bol premiešaný na vortexe. Zmes bola opäť odstredená za rovnakých podmienok. Po odstredení bol supernatant zliaty a skúmavka s biomasou bola umiestnená do termostatu pri teplote 70 °C. Sušenie biomasy prebiehalo minimálne 72 hodín. Po vysušení bola biomasa zvážená a použitá na stanovenie obsahu polyhydroxyalkanoátov (PHA) plynovou chromatografiou, popísanou v nasledujúcej kapitole.

#### 3.3.2 Plynová chromatografia

Vzorky vysušenej biomasy (príprava opísaná v kapitole 3.3.1) o hmotnosti 8-11 mg boli rozpustené v 1 ml chloroformu. K roztoku bolo pridaných 0,8 ml esterifikačnej zmesi (5% kyseliny sírovej v metanole) s vnútorným štandardom (5 mg/ml kyseliny benzoovej) 5% kyseliny sírovej. Vzorky boli pevne uzatvorené v krimpovacích vialkách a esterifikované po dobu 3 hodín pri teplote 94 °C.

Esterifikované vzorky boli prevrhnuté do väčších, uzavierateľných vialiek s 0,5 ml 0,5M NaOH, kde boli pretrepané a extrahované. Po oddelení fázi bolo zo spodnej fáze odobraných 50 µl metylesteru, ku ktorým bolo pridaných 0,9 ml etanolu.

#### 3.3.3 Extrakcia farebných pigmentov

Extrakcia pigmentov bola prevedená podľa protokolu od Zavřel a spol, 2015 [55]. Pipetou boli odobrané 2 ml bakteriálnej suspenzie do plastovej skúmavky s uzáverom. Následne bola odstredená relatívnou centrifugálnou rýchlosťou 7000 × g po dobu 7 minút. Po odstredení bol supernatant zliaty a k biomase boli pridané 2 ml extrakčného činidla metanolu, ktorý bol vychladený na 4 °C. Zmes bola zhomogenizovaná na vortexe, zabalená do hliníkovej fólie a inkubovaná pri teplote 4 °C minimálne 40 min. Po extrakcii bola zmes odstredená pri teplote 4 °C, 15000 × g po dobu 7 minút. Po pridaní extrakčného činidla boli pracovné podmienky limitované na minimálne množstvo svetla, aby bolo zabránené degradácii pigmentov.

Extrahované pigmenty boli použité pre spektroskopickú analýzu metódami opísanými v kapitole (Spektroskopické metódy).

### 3.4 Spektroskopické metódy

#### 3.4.1 UV-VIS jednopaprsková

Na stanovenie bakteriochlorofylu *a* bol použitý jednopaprskový Nanofotometer, PEARL v oblasti UV-VIS. Využíva CCD (Charge-Coupled Device), čo je typ detektoru vyrobeného z polovodičového materiálu a obsahuje 1024 mikroskopických pixelov, ktoré zachytávajú svetlo a premieňajú ho na elektrický náboj. Tento náboj je potom čítaný a digitalizovaný, čo umožňuje získanie hodnoty absorbie. Výhodou CCD detektorov je, že sú bez pohyblivých

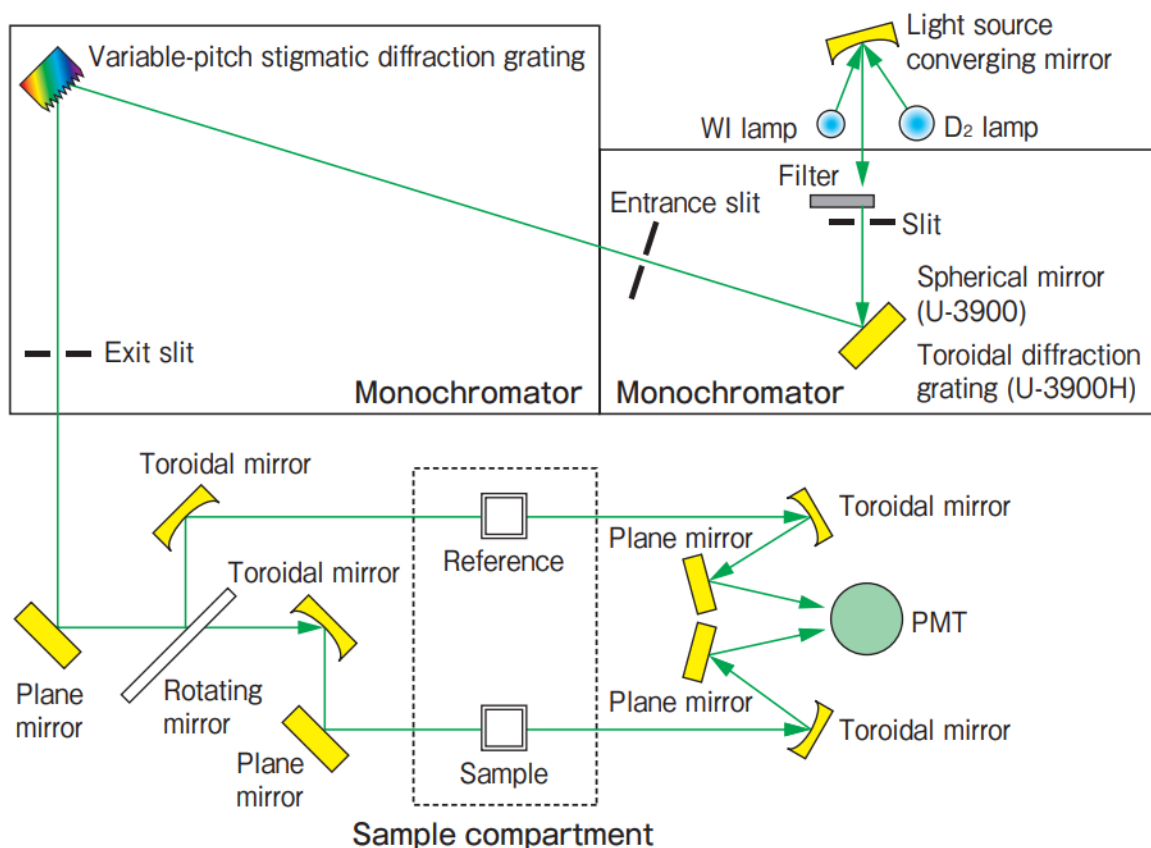


částí, čo prispieva k rýchlosti, presnosti a opakovateľnosti meraní. Je teda vhodný pre rutinnú analýzu s jednoduchou obsluhou, hlavne pokiaľ nie je nutné merať celé spektrum vzorky.

### 3.4.2 UV-VIS dvojpaprsková, transmisný a difúzne transmisný mód

Vzorky metanolvých extraktov a bakteriálnych suspenzií boli charakterizované pomocou UV-VIS spektroskopie, použitím spektrofotometru Hitachi U-3900H v oblasti 190 až 900 nm. Prístroj je vybavený dvojitým paprskom (vzorkovým a referenčným) a zdrojom monochromatického žiarenia (deuteriová lampa v oblasti UV, volfrám-jódová v oblasti VIS) s možnosťou zapojenia integračnej komory. Na analýzu boli použité rovnaké, nepoškodené kremenné kvety s optickou dráhou 1 cm a všetky vzorky boli merané pri laboratórnej teplote  $22 \pm 1$  °C.

Výsledky merania boli spracované v programe MS Excel, z ktorých boli zostavené grafy závislosti absorpcie na excitačnej vlnovej dĺžke. Absorpčné spektra boli použité pre stanovenie a porovnanie koncentrácií farebných pigmentov pri rôznych podmienkach kultivácie. Ďalej boli použité na štrukturálnu charakteristiku fotosyntetického aparátu a jeho zmien *in situ* baktérií *R.rubrum*, detekciou charakteristických píkav karotenoidov a bakteriochlorofylu.



Obrázok 10: Schematické znázornenie prístroja Hitachi U3900H, prevzané z [59]

Vzorkový paprsek prechádza cez vzorku obsahujúcu fotosyntetické pigmety, kde dochádza k absorpcii svetla. Referenčný paprsek prechádza cez štandardnú vzorku (blank), ktorá neobsahuje fotosyntetické pigmety a slúži ako referenčný bod pre meranie. Porovnaním intenzít vzorkového a referenčného paprsku bola zaznamenaná intenzita signálu a automaticky vyhodnotená programom UV Solutions for U-3900 ako hodnota absorpcie v rozsahu (-5.5-

5.5 Abs). S presnosťou meraní:  $\pm 0.002$  Abs (0-0.5 Abs),  $\pm 0.003$  Abs (0.5-1.0 Abs),  $\pm 0.006$  Abs (1.0-2.0 Abs),  $\pm 0.3\%T$  nad 2 Abs.

### **3.4.3 Fluorescenčná spektroskopia**

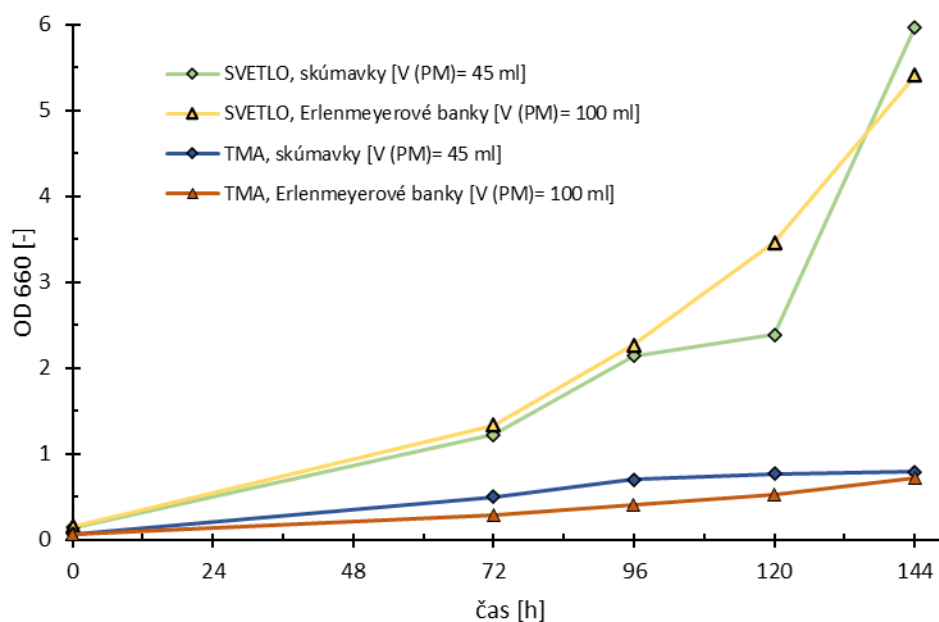
Vzorky bakteriálnych suspenzií boli charakterizované pomocou fluorescenčnej spektroskopie, použitím spektrofluorimetru Edinburgh Instruments FS5. Bola vybraná metóda excitačno-emisných máp (EEM) tvorených inkrementálnou zmenou excitačnej vlnovej dĺžky, pričom emisná vlnová dĺžka bola v rozsahu od 300 nm do 700 nm. Excitačná vlnová dĺžka bola v rozsahu od 240 nm do 600 nm s krokom 5 nm a intervalom medzi zmenou excitačnej vlnovej dĺžky 0,2 s, počas ktorej je zaznamenávaná intenzita fluorescencie. Inkrementálna zmena excitačnej vlnovej dĺžky poskytuje informácie o vzťahu medzi excitačnými a emisnými vlnovými dĺžkami. Meraním emisného spektra pri každom inkrementálnom kroku je možné identifikovať zmeny v intenzite fluorescencie pri rôznych emisných vlnových dĺžkach v závislosti na energii excitácie. Intenzita fluorescencie z programu prístroja Fluoracle bola korelovaná absorbancom vzorky pri excitačnej a emisnej vlnovej dĺžke v programe MS Excel a 3D mapy boli získané v programe Origin 2019b. Ako držiak na fluorescenčné kremenné kvety s optickou vlnovou dĺžkou 1 cm bol použitý SC-25 TE-Cooled Sample Holder - Standard Range, temperovaný na teplotu 22 °C.

## 4 VÝSLEDKY A DISKUSIA

Práca je zameraná na aplikáciu vhodných analytických techník na modelový fotosyntetický mikroorganizmus, produkujúci fotosyntetické pigmenty. Ako modelový mikroorganizmus bola zvolená purpurová nesírna baktéria, *Rhodospirillum rubrum*, ktorá je schopná produkcie pigmentov pri rôznych svetelných podmienkach kultivácie. V práci bola baktéria kultivovaná za svetla a za tmy. Mikroaeróbne podmienky boli zvolené z dôvodu zamedzenia oxidačného stresu na produkciu a degradáciu pigmentov a boli použité pre všetky kultivácie. Vplyv kultivačných podmienok bol analyzovaný z hľadiska rýchlosti rastu baktérií, zafarbenia, obsahu biomasy, zloženia a množstva zásobných polyestérov, polyhydroxyalkanoátov. Spektroskopické analytické metódy boli použité na analýzu pigmentov v ich natívnom prostredí (*in situ*), kde sú zapojené v zložitom systéme fotosyntetického aparátu a ich absorpčné vlastnosti sú významne ovplyvnené. Navrhnuté analytické metódy boli posudzované z hľadiska ich možnosti štrukturálnej a kvantitatívnej *in situ* analýzy pigmentov.

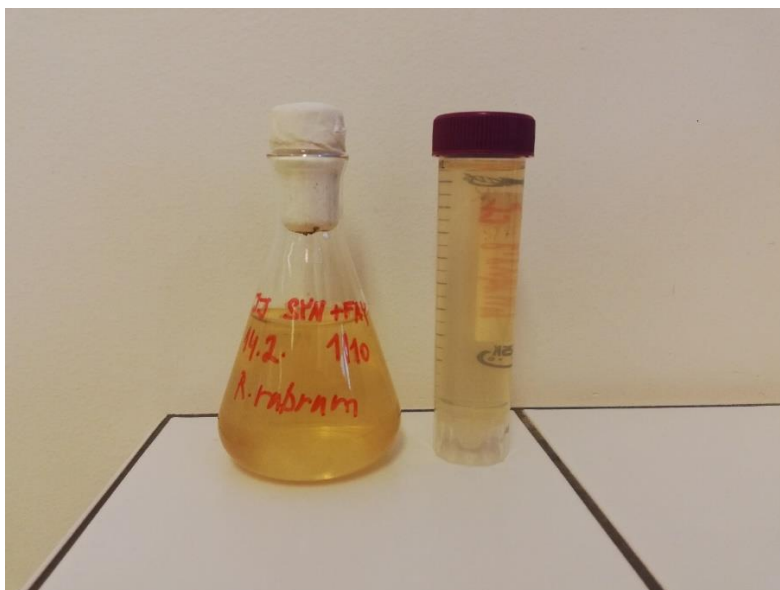
### 4.1 Základná charakteristika

Na charakterizáciu rastu baktérií pri rôznych svetelných podmienkach a objemoch média bolo použité spektroskopické meranie optickej hustoty (OD) jednopaprskovým spektrofotometrom pri vlnovej dĺžke 660 nm. Vzorky boli odoberané v časoch (72, 96, 120, 144) h. Interval lineárnej oblasti detekcie absorpcie spektrofotometru sa pohybuje medzi 0,1-1 a.u. Vzorky boli podľa potreby riedené PBS pufrom.



Obrázok 11: Rastová krivka *Rhodospirillum rubrum* v produkčnom médiu (PM) Syn FAY pre rôzne podmienky

Fototrofný rast *R. rubrum* je spojený s produkciou svetlozberného komplexu LH1 zloženého z chromofórov, bakteriochlorofylov *a* (*BChl a<sub>G</sub>*) a karotenoidov (*car*), prevažne *trans*-spiriloxantínu v pomere 2:1. Kompletná štruktúra LH1 spojená s reakčným (R centrom) je opísaná v kapitole (2.3.1). Tieto pigmenty sú zodpovedné za absorpciu svetla a premenu na energiu v procese fotosyntézy. Bakteriochlorofyl *a* absorbuje vo VIS a NIR spektre, čo vedie k charakteristickej purpurovej farbe. Karotenoidy splňajú ochrannú funkciu absorpciou nadbytočného svetla a prispievajú k červenej farbe.



Obrázok 12: Baktérie *R. rubrum* v produkčnom médiu Syn FAY v čase zaočkovania to



Obrázok 13: Erlenmeyrové banky 100 ml v čase kultivácie 72 h. Vľavo, kultivácia za tmy. Vpravo kultivácia za svetla



Obrázok 14: Skúmavky 50 ml v čase kultivácie 72 h. Vľavo, kultivácia za tmy. Vpravo kultivácia za svetla



Obrázok 15: Porovnanie zafarbenia v časoch kultivácie: zľava 96, 120 a 144 hodín. Intenzívnejšie zafarbené média odpovedajú kultivácií za svetla, svetlejšie za tmy

Po 72 hodinách kultivácie bolo pozorované červené zafarbenie produkčného média, ktoré bolo intenzívnejšie pri kultivácii na svetle. Skúmavky po 144 h na svetle boli zafarbené do purpurova najintenzívnejšie, čo taktiež odpovedá najväčšiemu množstvu biomasy (viď základná charakteristika 4.1). Vo všetkých prípadoch je možné predpokladať prítomnosť fotosyntetických pigmentov. Čo taktiež môže vysvetľovať prítomnosť reakčných centier fotosyntézy a teda rýchlejši rast baktérií na svetle.

#### 4.1.1 Stanovenie obsahu polyhydroxyalkanoátov

Hodnota PHA v produkčných médiách jednotlivých kultivácií *R. rubrum* bola stanovená pomocou plynovej chromatografie. Vzorky boli pripravené podľa postupu opísaného v kapitole 3.3.2. Kalibračná krivka bola vytvorená riedením štandardu PHB a PHV v rôznych pomeroch a následnou analýzou plynovou chromatografiou s detektorom FID. Regresná rovnica bola zostrojená na základe závislosti pomerov plôch pík analytu a kyseliny benzoovej na koncentrácii PHB a PHV jednotlivo. Koncentrácia PHB a PHV v analyzovaných vzorkách bola vypočítaná pomocou týchto rovníc.

Tabuľka 1: Obsah polyhydroxyalkanoátov zložených z kopolyméru P(3HB-co-3HV) a percentuálne zastúpenie 3-hydroxyvalerátu pri kultivácii v tme

Podmienky	Syn FAY	čas [h]	OD <sub>660</sub> [-]	biomasa [mg/L]	P(3HB-co-3HV) [mg/L]	3HV [%]	PHA [%]
TMA	skúmavky	72	0,50	72	2,4	20,70	3,31
		96	0,70	246	16,8	36,70	6,81
		120	0,77	326	32,2	37,90	9,88
		144	0,80	353	25,0	40,60	7,10
	Erlenmeyerové banky	72	0,28	112	2,6	7,46	2,36
		96	0,40	139	2,7	13,41	1,96
		120	0,52	222	8,3	27,10	3,72
		144	0,72	249	18,6	33,90	7,45

Tabuľka 2: Obsah polyhydroxyalkanoátov zložených z kopolyméru P(3HB-co-3HV) a percentuálne zastúpenie 3-hydroxyvalerátu pri kultivácii na svetle

Podmienky	Syn FAY	čas [h]	OD <sub>660</sub> [-]	biomasa [mg/L]	P(3HB-co-3HV) [mg/L]	3HV [%]	PHA [%]
SVETLO	skúmavky	72	1,23	392	38,5	11,44	9,84
		96	2,14	513	43,8	14,17	8,53
		120	2,39	870	122,0	15,43	14,02
		144	5,97	2090	167,2	65,58	8,00
	Erlenmeyerové banky	72	1,34	457	16,8	11,15	3,67
		96	2,27	681	56,3	18,25	8,28
		120	3,46	1146	179,1	47,65	15,63
		144	5,41	1258	180,1	48,45	14,32

V tabuľkách 1 a 2 sú prezentované výsledky obsahu polyhydroxyalkanoátov (PHA) zložených z kopolyméru P(3HB-co-3HV) a percentuálne zastúpenie 3-hydroxyvalerátu pri kultivačných podmienkach *R. rubrum* za tmy a na svetle. V tabuľke 1 sú uvedené výsledky pre kultivácie v skúmavkách a Erlenmeyerových bankách za tmy, zatiaľ čo v tabuľke 2 sú uvedené výsledky kultivácie na svetle.

Obsah PHA sa v oboch typoch laboratorného skla s dobou kultivácie zvyšoval vo všetkých prípadoch, až na kultiváciu v skúmavkách za tmy pri 144 hodinách, kedy došlo k poklesu z 32,2 mg/L na 25 mg/L. Pri kultiváciách v skúmavkách na svetle bola pozorovaná zvýšená produkcia PHA v porovnaní s kultiváciami za tmy. Obsah PHA bol v rozmedzí od 38,5 mg/L počas 72 hodín kultivácie až po hodnotu 167,2 mg/L po 144 hodinách kultivácie. Percentuálne zastúpenie 3HV bolo rôznorodé, pričom najvyššia hodnota 65,58 % bola dosiahnutá pri 144 hodinách kultivácie.

V Erlenmeyerových bankách bol pozorovaný nižší obsah PHA vo všetkých časoch v porovnaní so kultiváciou v skúmavkách. Rovnako, ako aj percentuálne zastúpenie 3HV bolo nižšie vo všetkých časoch.

#### 4.2 Stanovenie koncentrácie bakteriochlorofylu *a* pomocou UV-VIS spektrometrie

Na stanovenie koncentrácie bakteriochlorofylu *a* bol použitý jednopaprskový spektrometer, Nanofotometer, PEARL (viď kapitola 3.4.1). Celkovo bolo analyzovaných 16 vzoriek odoberaných v časoch (72, 96, 120, 144) h.

Koncentrácie bakteriochlorofylu *a* boli vypočítané z maxima jeho píku v metanole pri vlnovej dĺžke 771 nm pomocou lineárnej závislosti absorbancie na koncentrácií absorbujúcej látky podľa protokolu od Namsaraev a spol. [56] podľa rovnice (1). Pigmenty boli extrahované zo všetkých typov kultivačných podmienok a laboratórnych skiel, podľa postupu opísaného v kapitole (3.3.3). Výsledky sú uvedené v (Tabuľka 3).

Tabuľka 3: Koncentrácie bakteriochlorofylu *a* pri rôznych podmienkach kultivácie

	čas [h]	Tma	Svetlo		Tma	Svetlo
		BChla [µg/L]	BChla [µg/L]		BChla [µg/L]	BChla [µg/L]
Skúmavky	72	2,000	4,033	Erlenmeyerové banky	0,800	4,017
	96	1,783	8,417		0,967	11,400
	120	2,667	10,283		1,917	17,867
	144	1,883	33,017		1,917	19,783

$$BChla \left[ \frac{\mu g}{L} \right] = \frac{1000}{V} \cdot \frac{A_{771} \cdot A_{850}}{60} \quad [56] \quad (1)$$

Pri kultivačných podmienkach za svetla bola koncentrácia bakteriochlorofylu *a* najvyššia po 144 hodinách kultivácie. Pri kultivačných podmienkach za tmy bola koncentrácia bakteriochlorofylu *a* najvyššia po 120 hodinách kultivácie. Za tmy sa koncentrácia bakteriochlorofylu mení iba minimálne, ale pri kultivácií za svetla je jej nárast významný.

Vzhľadom na to, že funkcia bakteriochlorofylu je absorpcia a premena svetelnej energie na chemickú v procese fotosyntézy, je tento výsledok očakateľný (viď kapitola 2.1.2). Na základe prezentovaných výsledkov je teda možné potvrdiť prítomnosť regulačných mechanizmov baktérie *R.rubrum*, ako napríklad expresiu špecifických svetlocitlivých génov zúčastnených na biosyntéze fotosyntetických pigmentov.

Nižší nárast koncentrácie pigmentov v Erlenmeyerových bankách oproti skúmavkám môže byť zapríčinený vyšším prestupom kyslíku v produkčnom médiu a oxidačnej degradácií. Taktiež v Erlenmeyerových bankách bola väčšia priestorová distribúcia buniek. Toto

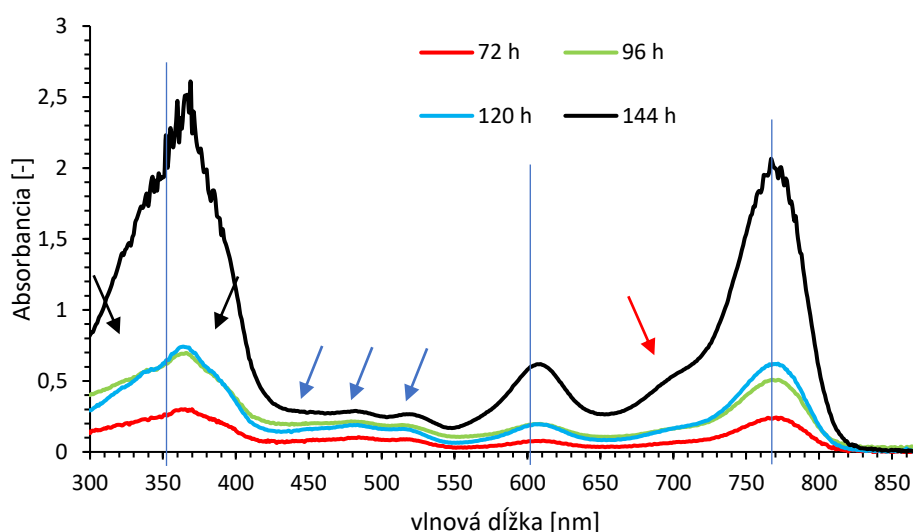
usporiadanie viedlo k vyššiemu svetelnému toku, ktorý mohol byť príliš vysoký a teda mohlo dôjsť k degradácii fotosystému z nadmernej svetelnej intenzity (viď kapitola 2.2.1).

Uzavierateľné skúmavky s objemom tekutého produkčného média 45 ml boli vybrané ako vhodný typ laboratorného skla pre produkcia farebných pigmentov baktérie *R.rubrum*. Ďalšia spektroskopická analýza bola testovaná na tomto type laboratorného skla a porovnávaná s kultivačnými podmienkami za tmy.



### 4.3 UV-VIS spektrometria metanolových extraktov

Touto metódou boli analyzované farebné pigmenty 8 vzoriek metanolových extraktov bakteriálnej suspenzie *R.rubrum*, kultivovanej v produkčnom médiu Syn FAY. Vzorky sa líšili dobou kultivácie a svetelnými podmienkami. Pri kultivácii za tmy a rovnako aj na svetle boli skúmavky odoberané v časoch ( 72, 96, 120, 144) h. Zo skúmaviek boli odoberané vzorky pre extrakciu metanolom podľa postupu opísaného v kapitole (3.3.3). Extrakty boli merané v oblasti (300-850) nm pomocou dvojpraskového spektrometru Hitachi U-3900H (viď kapitola 3.4.2)



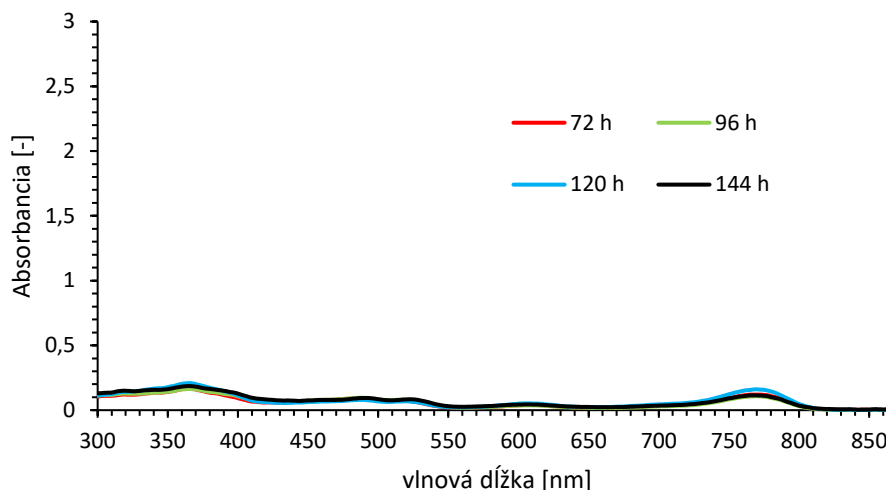
Obrázok 16: Absorpčné spektrum fotosyntetických pigmentov metanolových extraktov *R.rubrum* kultivovanej za svetla v skúmavkách

Absorpčné spektrá metanolových extraktov bakteriálnej suspenzie *R.rubrum* vykazujú najvyšší nárast absorbanie v UV oblasti (300-420) nm a NIR oblasti (680-810) nm. Ďalej môžeme pozorovať nárast absorbanie vo viditeľnom spektre v rozsahu (440-540) nm a výraznejší nárast v oblasti (570-640) nm. Čiarou vyznačené píky (v Obrázok 16) odpovedajú hodnotám absorbanie približne (363, 608 a 771) nm a sú zhodné pre všetky časy a podmienky kultivácie. Tieto hodnoty odpovedajú hodnotám absorbanie bakteriochlorofylu *a* v metanole [58]. Jednotlivo môžeme pozorovať Soretov absorpčný pás (363 nm),  $Q_x$  pás (608 nm) a  $Q_y$  pás (771 nm) (viď kapitola 2.1.3). Široký Soretov absorpčný pás naznačuje prítomnosť viacerých prekrývajúcich píkov a vibračných hladín tohto prechodu (čierna šípka), avšak v metanole nie sú rozlíšiteľné. Metanol je polárne rozpúšťadlo s vysokou dielektrickou konštantou a schopnosťou tvoriť vodíkové väzby. Silné interakcie medzi molekulami rozpúšťadla a chromofórov spôsobujú rýchlu relaxáciu vibračných stavov, čo vedie k rozmazaniu vibračných Soretových a  $Q_y$  pásov v absorpčnom spektre. Pozorovateľný nárast absorbanie označený červenou šípkou odpovedá prechodu do vyššieho vibračného stavu excitovaného stavu  $Q_y$ .  $Q_y$  pás s najvyššou intenzitou odpovedá prechodu do základnej hladiny excitovaného stavu.

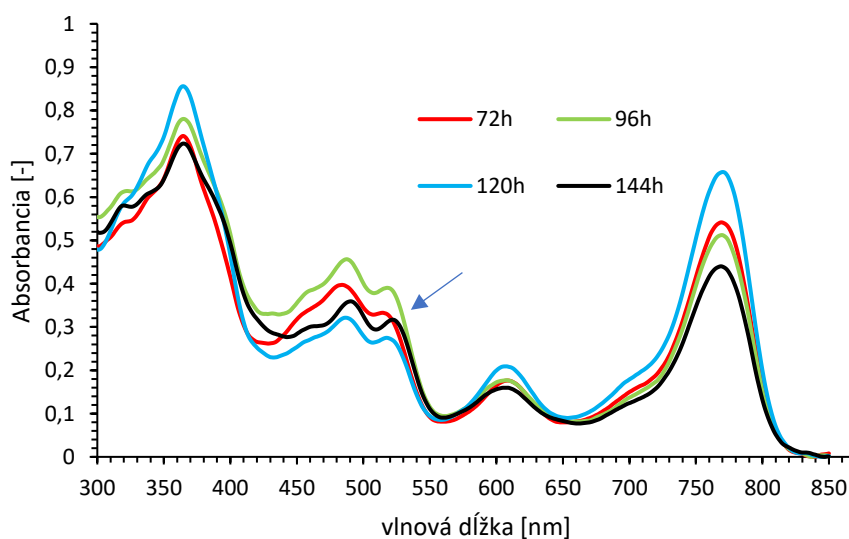
Prítomnosť troch píkov s hodnotami približne (450, 485, 525) nm vo viditeľnej oblasti absorpčného spektra (modré šípky), naznačuje prítomnosť karotenoidov, ktoré absorbujú svetlo práve v tejto oblasti. Charakteristický je ich trojpek s spôsobený prechodom molekúl

$S_0 \rightarrow S_2$ , druhej, prvej a základnej vibračnej hladiny excitovaného stavu podľa klesajúcej energie excitácie (viď kapitola 2.1.4).

Pre porovnanie je na nasledujúcej strane zobrazené absorpčné spektrum metanolových extraktov bakteriálnej suspenzie kultivovanej za tmy. Osa absorbancie je zámerne škálovaná podľa hodnôt absorbancie kultivácie na svetle.



Obrázok 17: Absorpčné spektrum fotosyntetických pigmentov metanolových extraktov *R. rubrum* kultivovanej za tmy v skúmavkách pre porovnanie s hodnotami absorbancie kultivácie za svetla (Obrázok 16)



Obrázok 18: Absorpčné spektrum fotosyntetických pigmentov metanolových extraktov *R. rubrum* kultivovanej za tmy v skúmavkách

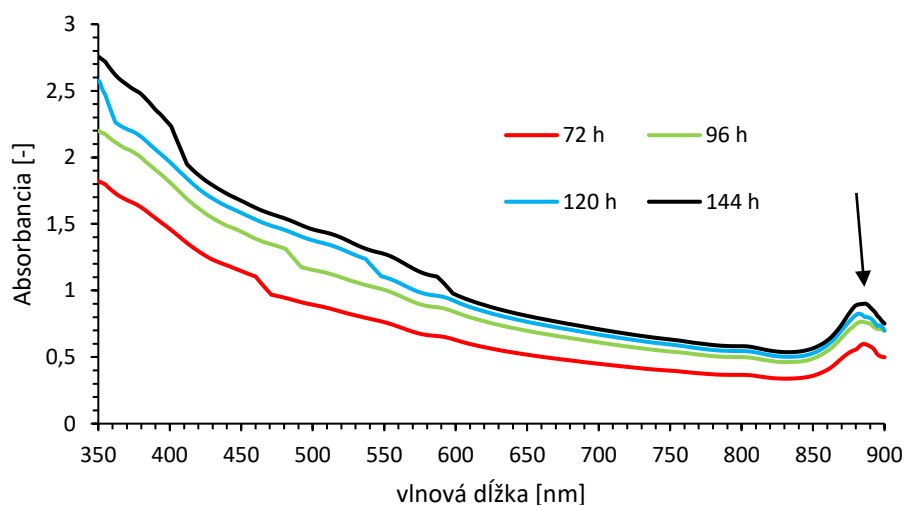
Absorpčná krivka kultivácie za tmy vykazuje rovnaké absorpčné maxima ako za svetla. Jediný rozdiel nastáva pri dobe kultivácie po 144 hodinách (modrá šípka), kde je absorpčné maximum karotenoidov posunuté k vyšším vlnovým dĺžkam. Možno teda predpokladať vyšší obsah spiriloxantínu, ktorý je charakteristický najvyšším stupňom efektívnej konjugácie, čo znižuje energiu potrebnú na absorpciu (viď kapitola 2.1.4). Taktiež je možné pozorovať vyšší pomer karotenoidov k bakteriochlorofylu *a* pri kultivácii za tmy. Toto zistenie je konzistentné s funkciou karotenoidov pri fotoprotekcii fotosyntetického aparátu (viď kapitola 2.2.3) a nedochádza k významnej degradácii karotenoidov pôsobením svetelného žiarenia. Možno teda predpokladať, že kvalitatívne sa fotosyntetické pigmenty pri kultivácii za tmy a na svetle výrazne nelíšia. Podľa Lambert-Beerovho zákona vyplýva, že najvyššia koncentrácia

bakteriochlorofylu *a* je po 144 hodinách pri kultivácii za svetla a karotenoidov po 96 hodinách pri kultivácii za tmy. Výsledky sú konzistentné s výpočtami pomocou predchádzajúcej metódy (vid' Tabuľka 3). Výsledky si však odporujú pri koncentráciách bakteriochlorofylu *a* pri kultivácii za tmy v časoch 144 hodín a 96 hodín. Z grafu vyplýva, že koncentrácia bakteriochlorofylu *a* je vyššia pri 96 hodinách. V (Tabuľka 3) je naopak koncentrácia vyššia pri 144 hodinách.

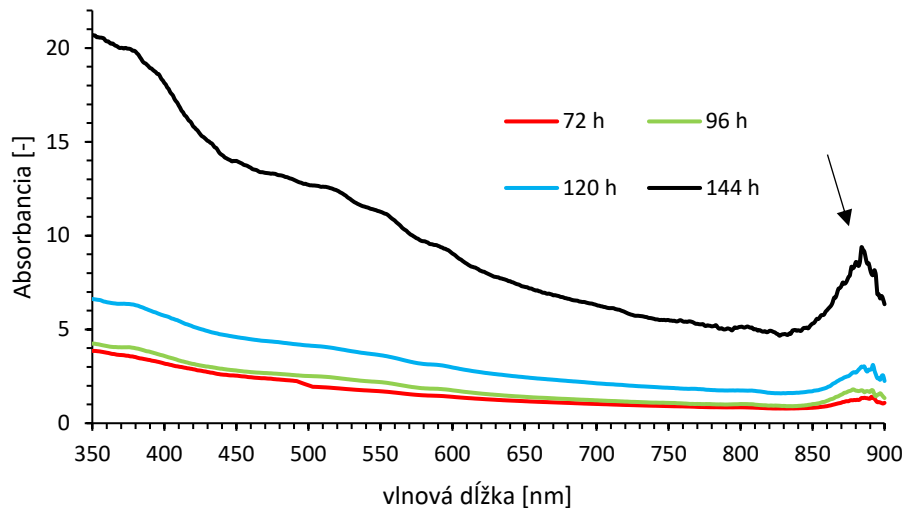
Samotná extrakcia pigmentov je však relatívne časovo náročný proces, ktorý vyžaduje minimálne svetelné podmienky, aby nedošlo k degradácii farebných pigmentov na svetle. Zabezpečenie minimálnych svetelných podmienok môže byť častokrát nereálne v bežnom laboratórnom prevoze. To vyžaduje rýchlu a precíznu prácu pri extrakcii. V tejto práci boli použité vzorky s objemom 2 ml, čo si vyžadovalo dobu extrakcie minimálne 40 minút. Ďalej prekursor spiriloxantínu, hlavného fotosyntetického karotenoidu baktérie *R.rubrum*, lycopén je v metanole nerozpustný, preto ho nie je možné stanoviť touto metódou. Zároveň použité rozpúšťadlo pôsobí rozdielne na štrukturálne odlišné látky a mení tak ich absorpčné vlastnosti. Vo výsledku sú absorpčné spektrá zaťažené chybou merania závislého na úspešnosti prevedenia extrakcie.

#### 4.3.1 UV-VIS spektrometria bakteriálnych suspenzií v transmisnom móde

Na analýzu farebných pigmentov v bakteriálnych bunkách *R.rubrum* v transmisnom móde bol použitý dvojpaprskový spektrometer Hitachi U-3900H v oblasti (300-900) nm (vid' kapitola 3.4.2). Vzorky boli riedene fosfátovým pufrom PBS s fyziologickým pH, do hodnoty maximálnej absorpcie 2 s odchylkou  $\pm 0.006$  a následne násobené riedením.



Obrázok 19: Absorpčné spektrum bakteriálnych suspenzií *R.rubrum* v PBS kultivovaných za tmy pri rôznej dobe kultivácie



Obrázok 20

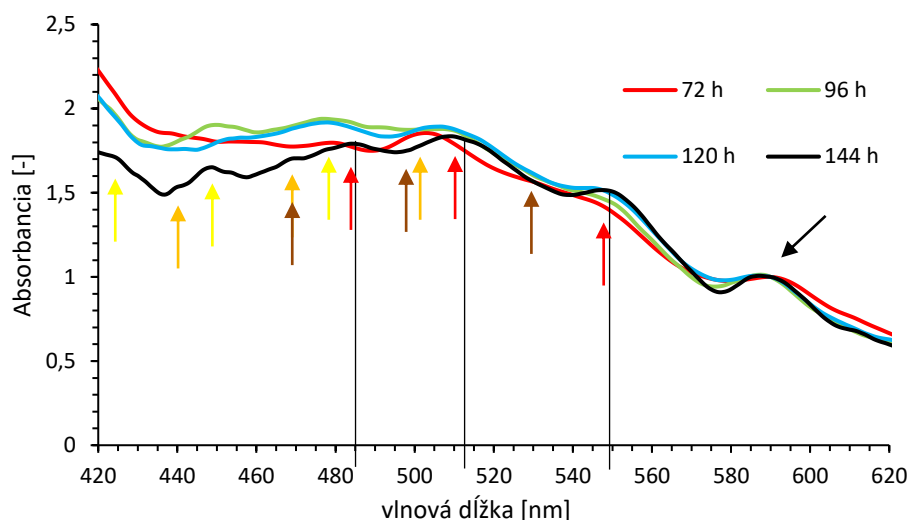
Absorpčné krivky bakteriálnych suspenzií kultivovaných za tmy a za svetla nevykazujú jasne viditeľný trojpek karotenoidov, avšak dochádza k nárastu absorbancie v tejto oblasti. Charakteristický je posun absorbancie bakteriochlorofylu *a* v reakčnom centre do infračervenej oblasti pre Q<sub>Y</sub> pík s maximom 883 nm a (čierna šípka). *In situ* je maximum Q<sub>Y</sub> závislé na zložení svetlozberných antén spojených s reakčným centrom. Maximum tohto píku naznačuje prítomnosť prevažne spiriloxantínu (viď Obrázok 23).

Najvyššia hodnota absorbancie bakteriochlorofylu *a* pri kultivácii za tmy (Obrázok 19) je po 144 hodinách, čo naznačuje, že pri extrakcii farebných pigmentov došlo k degradácii alebo neboli extrahované úplne.

Spôľahlivosť tejto analytickej metódy pri meraní absorpčných spektier farebných pigmentov v bakteriálnych suspenziách môže byť ovplyvnená viacerými faktormi. Prvým faktorom je rozptyl svetla spôsobený prítomnosťou buniek vo vzorke, ktoré môžu rozptyľovať svetlo a spôsobovať nežiaduce odrazy, ktoré vplyvajú na intenzitu detegovaného žiarenia. Ďalším faktorom je nerovnomerná distribúcia buniek vo vzorke a tvorba agregátov, čo môže ovplyvniť merané hodnoty absorpcie a ťažšie určiť presnú koncentráciu pigmentov, najmä pokiaľ vzorky s rozdielnou optickou hustotou. Bakteriálne suspenzie obsahujú okrem fotosyntetických pigmentov aj proteíny a iné molekuly absorbujúce v UV-VIS oblasti. Ich prítomnosť môže narušovať detekciu signálu v oblasti absorpcie farebných pigmentov, hlavne karotenoidov.

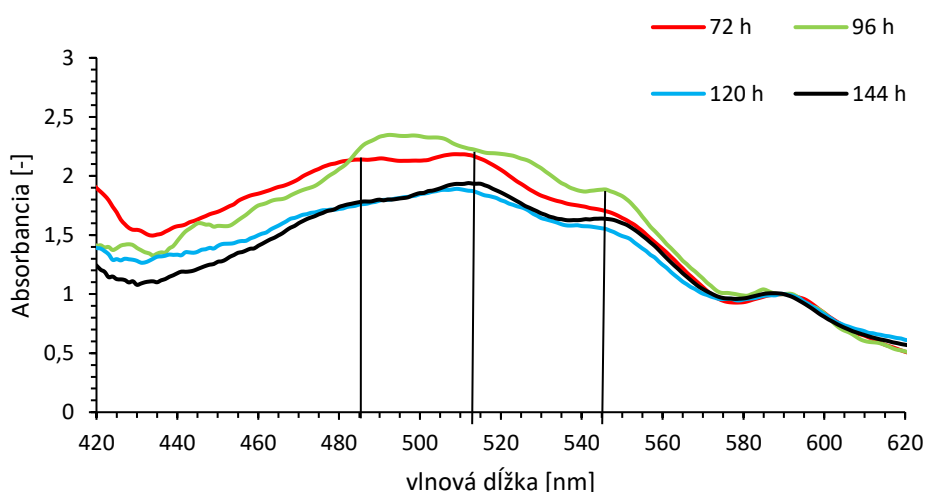
#### 4.3.2 UV-VIS spektrometria bakteriálnych suspenzií v difúzne transmisnom móde

Na analýzu farebných pigmentov v bakteriálnych bunkách *R. rubrum* v difúzne transmisnom móde bol použitý dvojpraskový spektrometer Hitachi U-3900H so zapojenou integračnou komorou  $\phi 60$  (P/N 2J2-0176) v oblasti (300-800) nm (viď kapitola 3.4.2). Rozsah iba do 800 nm je z dôvodu doporučenia výrobcu. Nad túto hodnotu boli výsledky nespoľahlivé. Použité vzorky boli rovnaké ako v prípade meraní v transmisnom móde. Cieľom bolo overiť závislosť koncentrácie karotenoidov na koncentrácií bakteriochlorofylu *a* a priblížiť štruktúru karotenoidov.



Obrázok 21: Absorpčné spektrum bakteriálnych suspenzií *R.rubrum* v PBS kultivovaných za tmy pri rôznej dobe kultivácie, normalizované na pík  $Q_x$

Absorpčné spektrum bakteriálnych suspenzií kultivovaných za tmy, normalizovaných na pík  $Q_x$  (590 nm), vykazuje jasne rozlíšiteľné píky karotenoidov. Čierna krivka s čiernymi čiarami odpovedá hodnotám (486, 513, 550) nm, čo naznačuje najvyššie zastúpenie *spiriloxantínu* (Obrázok 23). Ďalšie menej rozlíšiteľné píky (žlté šípky) (425, 452, 483) nm, *neurosporén*, (oranžové šípky) (448, 469, 502) nm, *sféroiden*, (hnedé šípky) (469, 498, 530) nm, *anhydrorodovibrín*, (červené šípky) (484, 512, 548) nm, *lykópén*. Krivky kratšej doby kultivácie sú posunuté k nižším vlnovým dĺžkam a ich píky sú širšie, najmä pri dobe kultivácie 72 hodín, čo môže naznačovať prítomnosť karotenoidov v biosyntetickej ceste s nižším efektívnym stupňom konjugácie, ako je rodopín a rodovibrín.

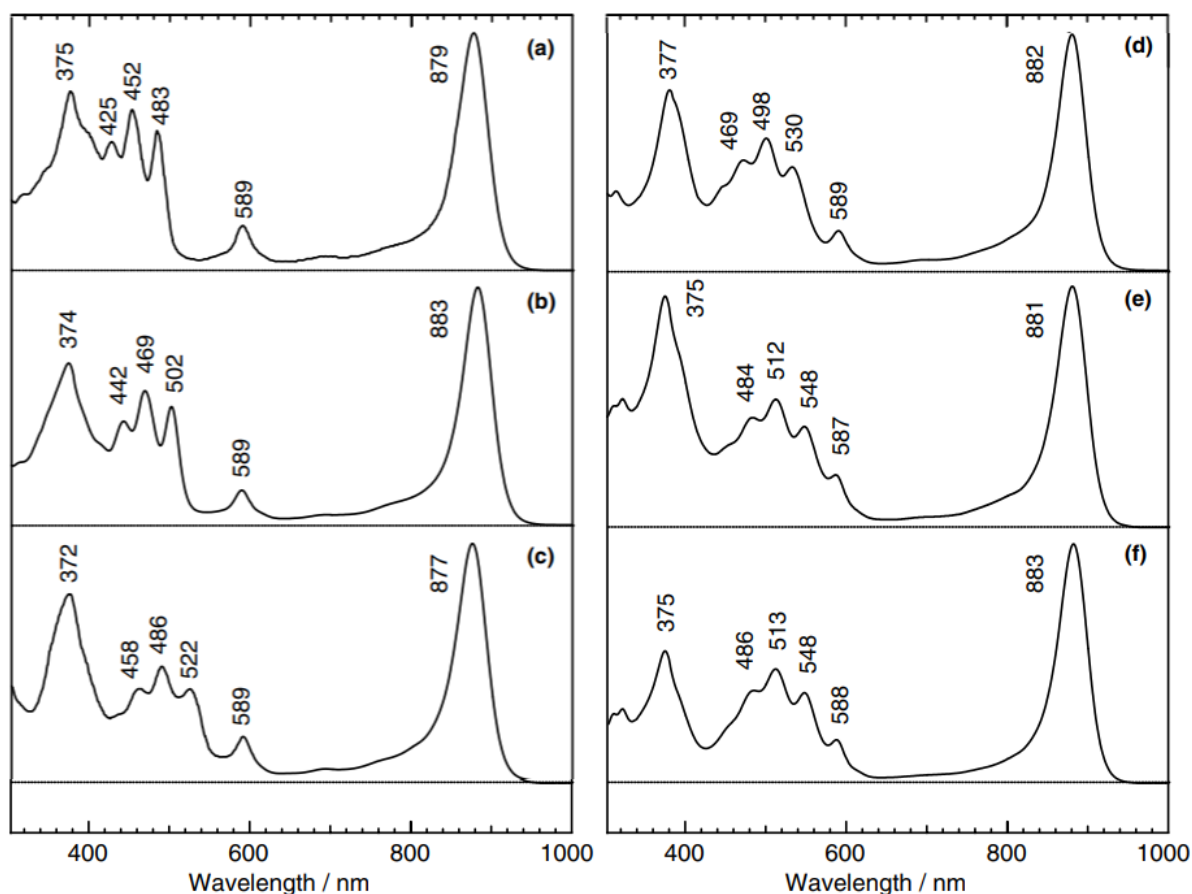


Obrázok 22: Absorpčné spektrum bakteriálnych suspenzií *R.rubrum* v PBS kultivovaných na svetle pri rôznej dobe kultivácie, normalizované na pík  $Q_x$

Absorpčné spektrum bakteriálnych suspenzií kultivovaných na svetle vykazuje väčšiu uniformitu spektra s troma dominantnými píkmami pri vlnových dĺžkach (486, 513, 550) nm, odpovedajúcich najvyššiemu zastúpeniu *spiriloxantínu* (čierna čiara). Najvyššiu absorbanciu vykazuje zelená krivka po 96 hodinách so širokým píkom v intervale (486-505) nm,

naznačujúcim prítomnosť viacerých karotenoidov, avšak nie je možné jednoznačne rozlíšiť zloženie karotenoidov v tejto oblasti. Po 72 hodinách je krivka posunutá k nižším vlnovým dĺžkam, čo odpovedá prekursorom spiriloxantínu (viď kapitola 16). Možno teda usudzovať, že k syntéze hlavného karotenoidu reakčného centra baktérie *R.rubrum* dochádza v čase medzi 72 h a 96 h. Po čase 96 h na svetle dochádza k poklesu absorpcie karotenoidov, pravdepodobne z dôvodu degradácie zapríčinennej fotoprotekciou rekčného centra, čo je konzistentné s ostatnými metódami. Najvyššia koncentrácia spiriloxantínu oproti ostatným karotenoidom pri porovnaní s kultiváciou za tmy naznačuje zvýšenú aktivitu svetlocitlivých génov [*CrtD*] baktérie *R.rubrum* zapojených v biosyntéze karotenoidov.

Rovnako ako v transmisnom móde je jednou z hlavných výhod UV-VIS spektrometrie v difúzne transmisnom móde možnosť merania absorpčného spektra vo forme suspenzie, bez potreby ich predchádzajúcej separácie alebo úpravy. Navyše zapojením integračnej komory je možné minimalizovať vplyv rozptylu svetla bunkovými komponentmi a zvýšiť presnosť a kvalitu spektrálnych údajov.

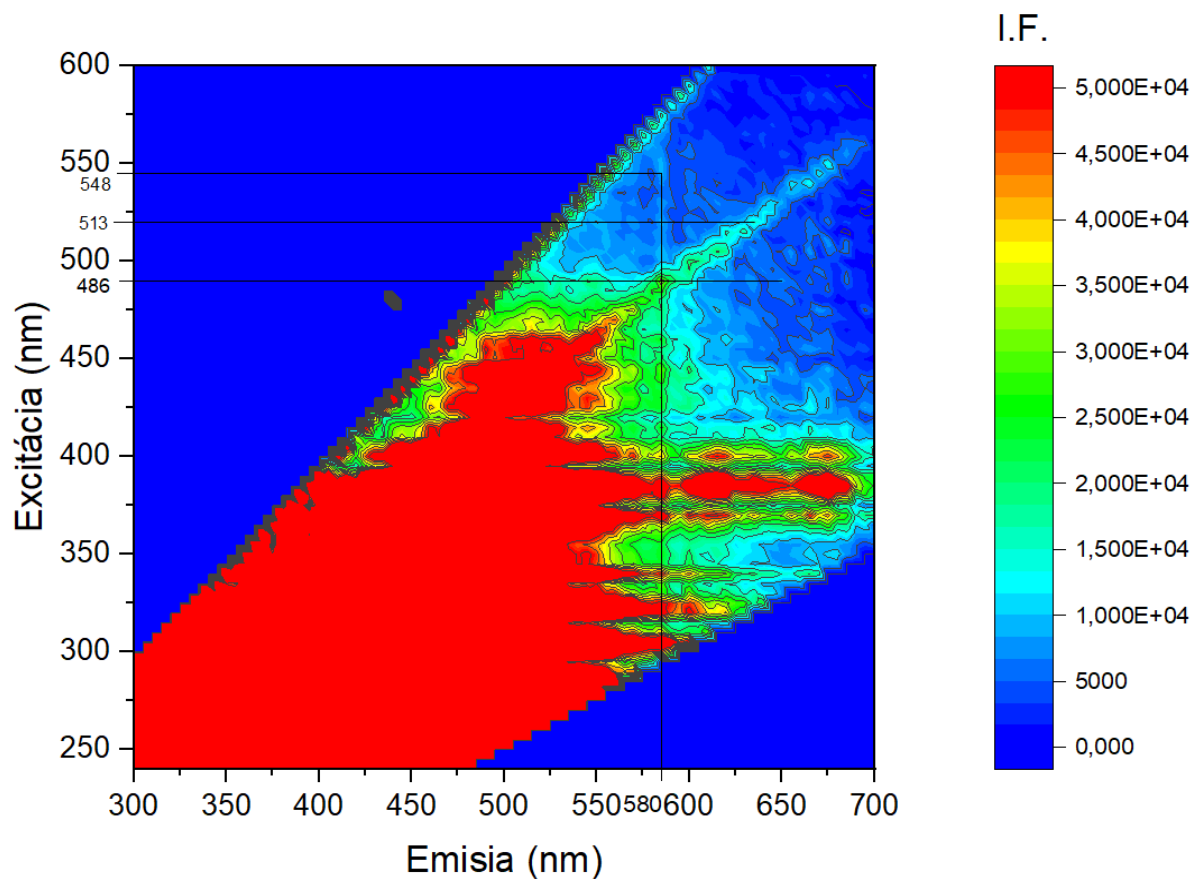


Obrázok 23: absorpčné spektrá LHI, rekonštituovaných s (a) neurosporénom, (b) sferoidénom, (c) lykopénom, (d) anhydrorhodovibrinom a (e) spiriloxantínom. (f) Je zobrazené absorpčné spektrum pôvodného komplexu LHI z *Rsp. rubrum* S1, obsahujúceho spiriloxantín ako hlavnú zložku. Prevzaté z [57], upravené.

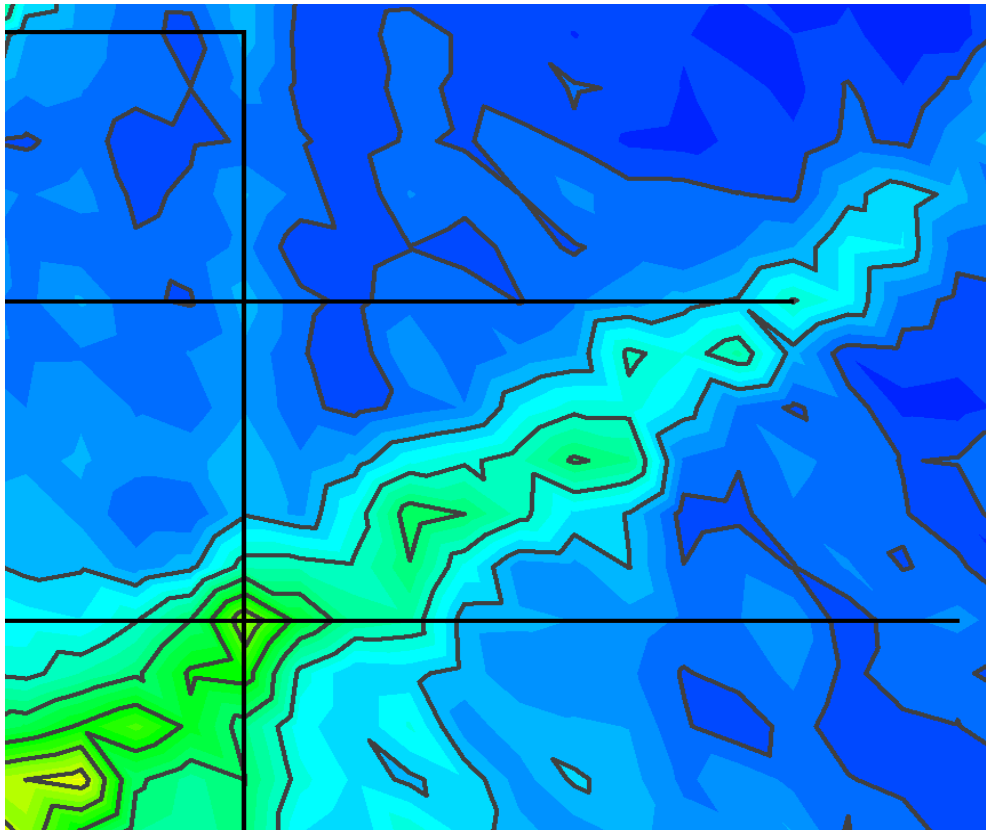
### 4.3.3 Fluorescenčná spektrometria bakteriálnych suspenzií

Snímanie 3D excitačne-emisných máp bolo prevedené inkrementálnou metódou pri excitačnej vlnovej dĺžke (240-600) nm s krokom 5 nm. Emisná vlnová dĺžka bola v rozsahu (300-700) nm. Excitačno-emisné mapy (EEM) boli zostavené za účelom overenia možnosti charakterizácie karotenoidového profilu baktérie *R.rubrum* kultivovanej na svetle. Na základe

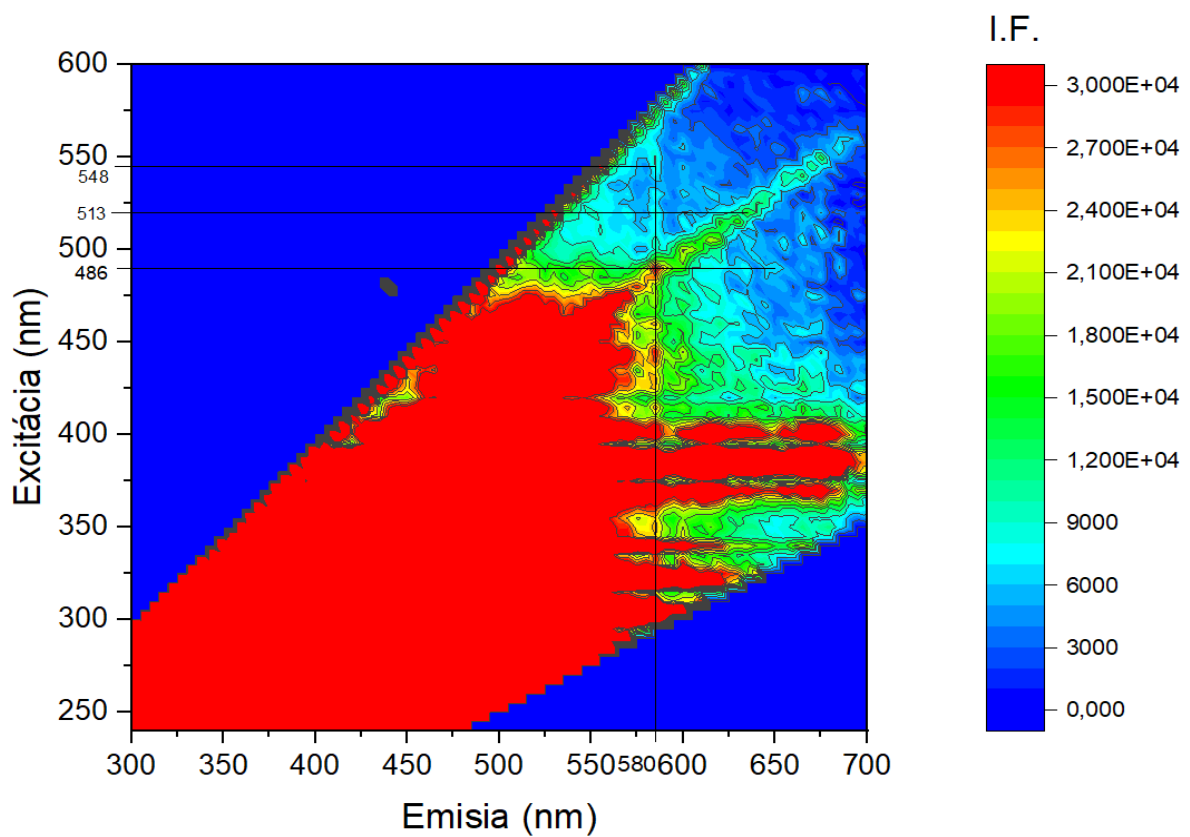
predchádzajúcich metód bol vybraný čas kultivácie po 96 hodinách, kedy došlo k najvýraznejšiemu nárastu spiriloxantínu a zároveň nedošlo k významnej degradácii.



Obrázok 24: Excitačno-emisná mapa bakteriálnej suspenzie *R.rubrum* kultivovanej na svetle po 96 hodinách (maximum intenzity fluorescencie 50 0000 a.u.)

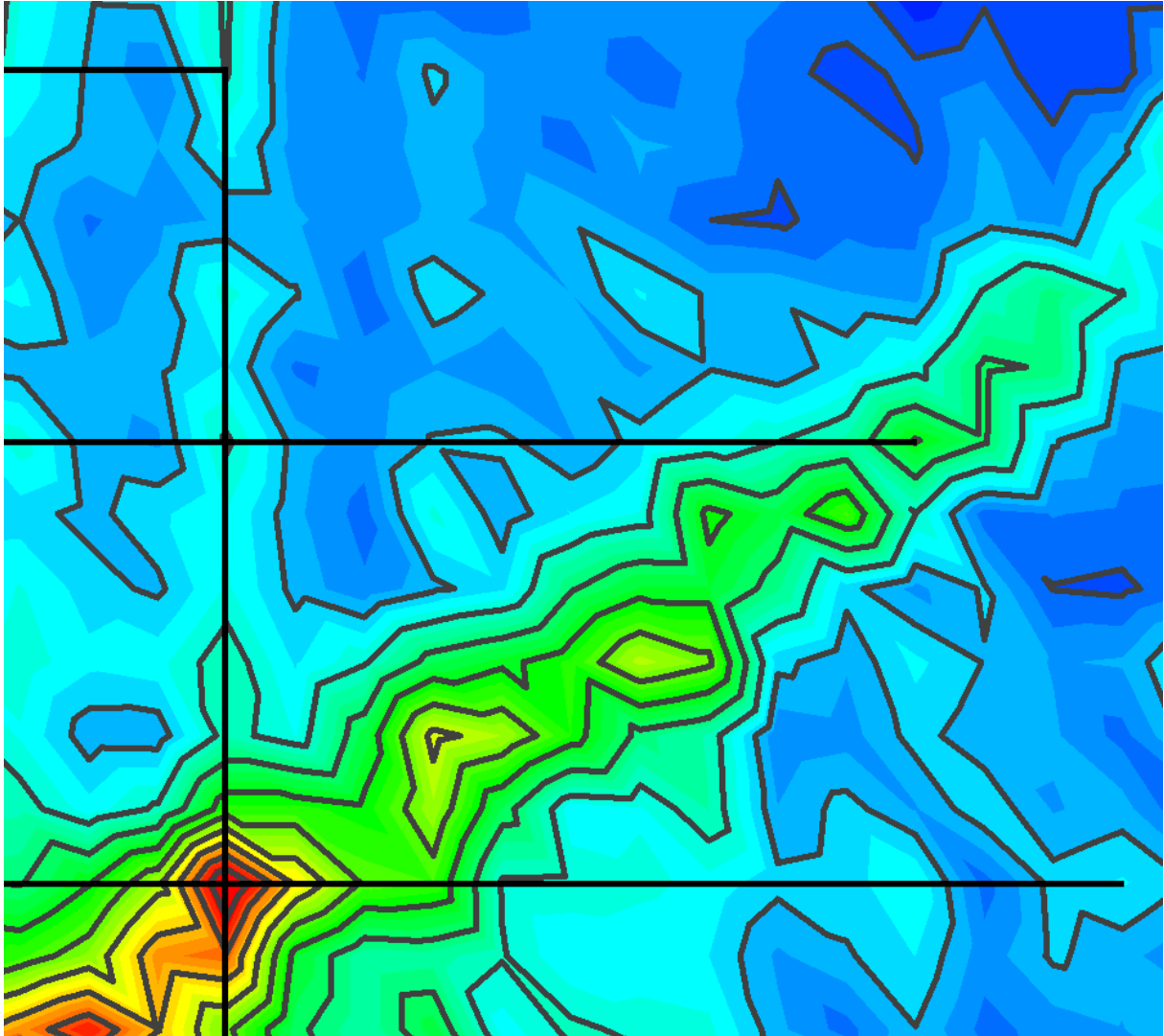


Obrázok 25: Priblíženie obrázku 24

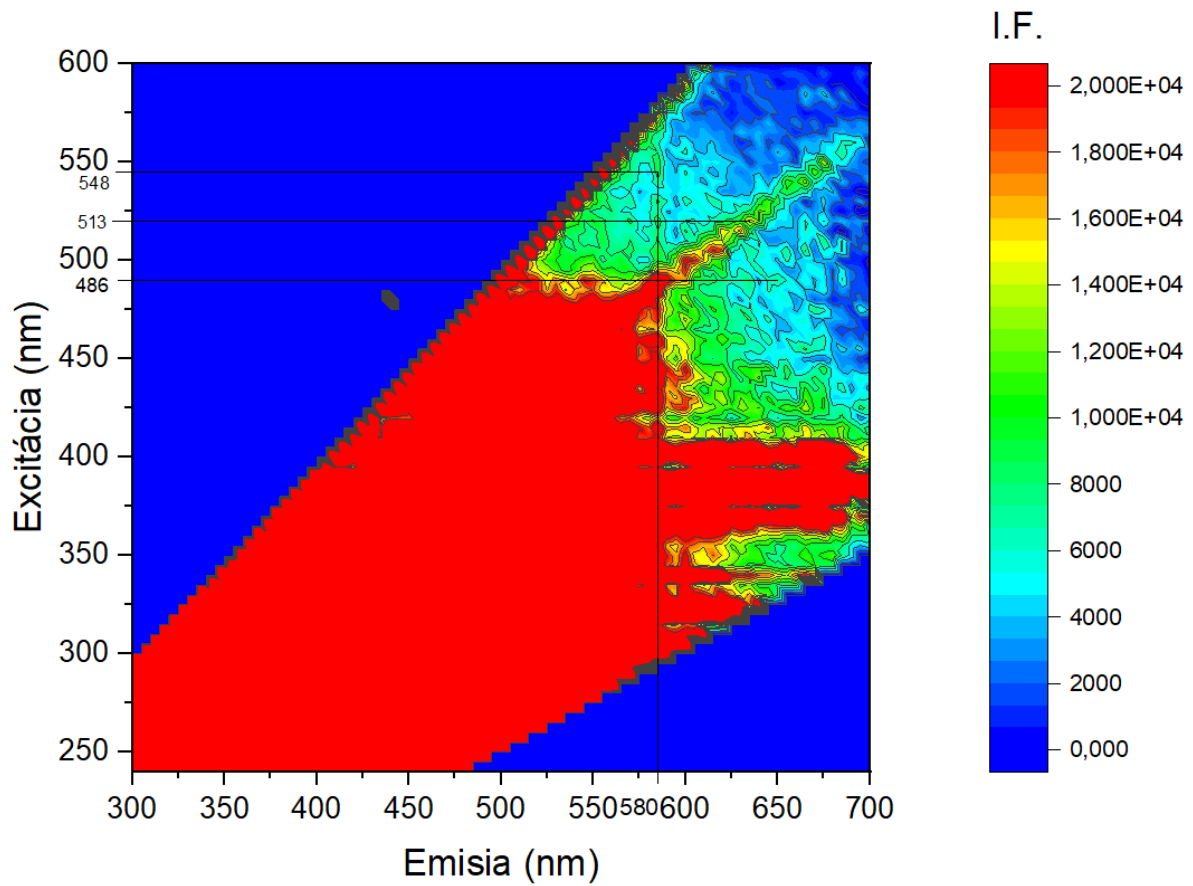


Obrázok 26: Excitačno-emisná mapa bakteriálnej suspenzie *R.rubrum* kultivovanej na svetle po 96 hodinách (maximum intenzity fluorescencie= 30 0000 a.u.)

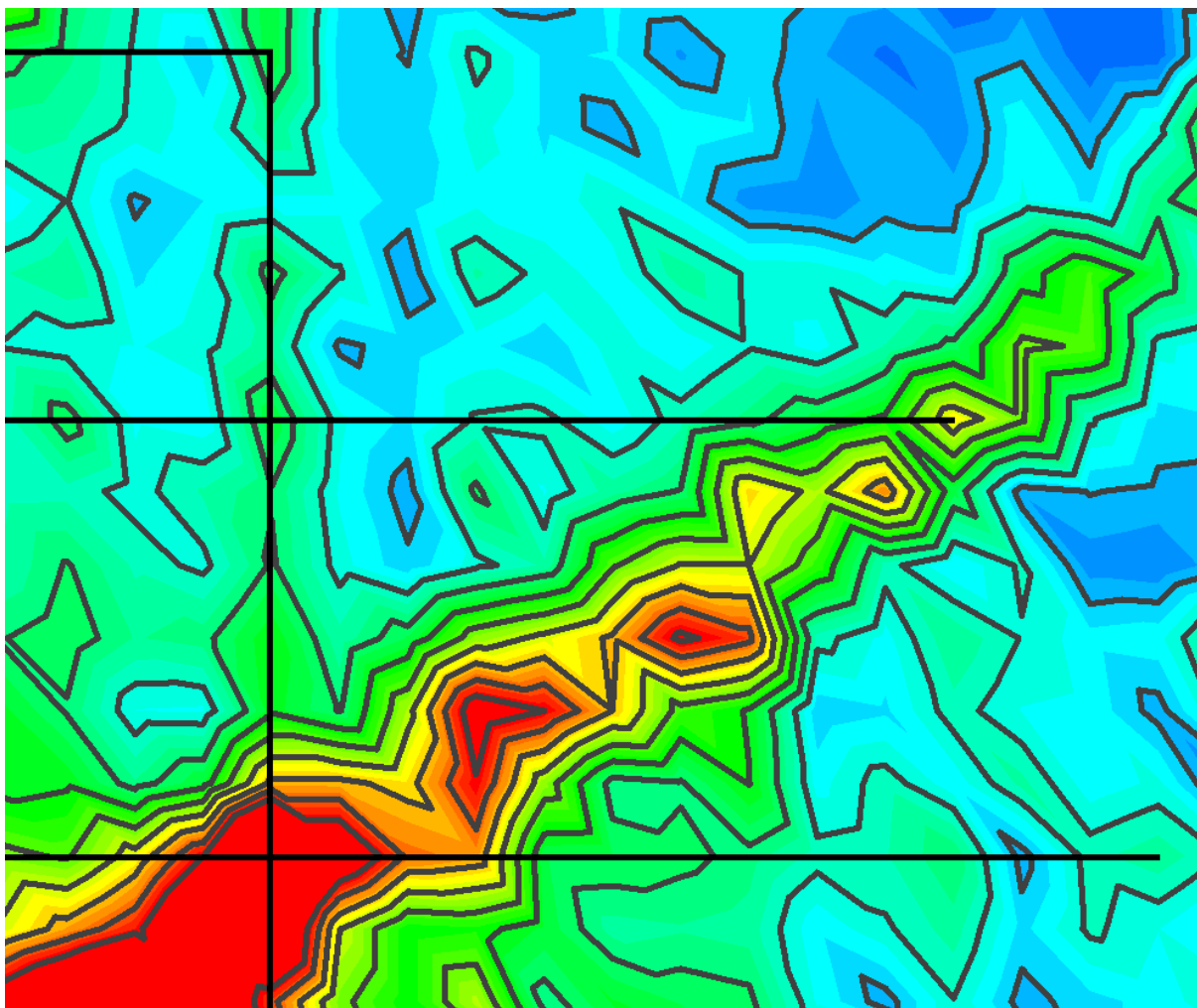




Obrázok 27: priblíženie obrázku 26



Obrázok 28: Excitačno-emisná mapa bakteriálnej suspenzie *R.rubrum* kultivovanej na svetle po 96 hodinách (maximum intenzity fluorescencie 20 000 a.u.)



Obrázok 29: priblíženie obrázku 28

EEM boli postupne škálované na rôznu intenzitu fluorescencie s cieľom objaviť charakteristické trojpíky spiriloxantínu pri excitačných vlnových dĺžkach (486, 513, 548) nm. Aj napriek nízkej intenzite fluorescencie karotenoidov (viď kapitola 10) je možné objaviť emisiu blízkých trojpíkov, ktorú môžeme pozorovať pri viacerých emisných vlnových dĺžkach. Navyše je možné v (Obrázok 24) pozorovať ohraničenú emisiu z excitačných vlnových dĺžok približne (370, 385, 398) nm, ktorá intenzívne fluoreskuje až do vlnovej dĺžky 680 nm. Naznačuje to emisiu bakteriochlorofylu s prenosom excitačnej energie a zároveň prítomnosť viacerých reakčných centier, ktoré sa môžu líšiť medzi jednotlivými bunkami.. Ďalej je možné pozorovať emisiu pri viacerých vlnových dĺžkach pochádzajúcich z jednej excitačnej vlnovej dĺžky, čo naznačuje prenos energie medzi farebnými pigmentami v svetlozberných komplexoch a emisiu karotenoidov z rôznych vibračných hladín, nie len nulte (viď kapitola 11).

Celkovo sa táto metóda preukázala ako citlivá a presná metóda, ktorá poskytuje charakteristický otláčok fotosyntetických pigmentov a je vhodná aj na bakteriálne suspenzie. Bol pomocou nej jednoznačne rozlíšený hlavný karotenoid reakčného centra, spiriloxantín, čo predstavuje obrovskú výhodu oproti ostatným metódam. Nevýhodou je však nepochybne jej časová náročnosť, ktorá by mohla byť minimalizovaná špecifickejšim nastavením, ako napríklad meranie v užšom rozsahu spektra. Pokiaľ ide o stanovenie karotenoidov (400-600) nm. Vzhľadom na rýchlu relaxáciu karotenoidov je tiež vhodné nastaviť interval zmeny excitačnej vlnovej dĺžky pri inkrementálnom skene na vyššiu rýchlosť. K zvýšeniu rozlíšenia

a presnosti stanovenia môže prispieť niekoľkonásobné riedenie, keďže metóda sa preukázala ako veľmi citlivá.

## 5 ZÁVER

Cieľom tejto bakalárskej práce bolo na základe vypracovanej literárnej rešerše zvoliť a overiť vhodný súbor analytických techník na modelový fotosyntetický mikroorganizmus, produkujúci fotosyntetické pigmenty. Konkrétne purpurovú nesírnu baktériu, *Rhodospirillum rubrum*.

Pomocou plynovej chromatografie bol stanovený obsah zásobného polyméru P(3HB-co-3HV) a jeho zloženie. Podľa výsledkov merania bol obsah polyhydroxyalkanoátov najvyšší pri kultivácii na svetle v skúmavkách s objemom produkčného média Syn FAY a minimálnym prístupom kyslíku. Tieto podmienky boli najlepšie aj pre syntézu fotosyntetických pigmentov, konkrétne bakteriochlorofylu *a*, čo bolo preukázané jednopaprskovou UV-VIS spektroskopiou metanolových extraktov bakteriálnych suspenzií. Porovnaním s metódou dvojpaprskovej UV-VIS spektroskopie vzoriek kultivovaných v skúmavkách na svetle a za tmy bola preukázaná prítomnosť ďalších fotosyntetických pigmentov, karotenoidov. Pre bližšiu charakterizáciu fotosyntetického aparátu boli použité spektroskopické metódy fotosyntetických pigmentov v ich natívnom prostredí (*in situ*) na vzorkách bakteriálnej suspenzie kultivovanej v skúmavkách za svetla.

Ako prvá metóda bola použitá dvojpaprsková UV-VIS spektrometria v transmisnom móde, ktorá preukázala vplyv interakcií proteínov s pigmentami na zmeny v absorpčných vlastnostiach. Zároveň bolo touto metódou poukázané na nevýhody metódy spektroskopického stanovenia koncentrácie fotosyntetických pigmentov z metanolových extraktov. V transmisnom móde však nebolo možné jednoznačne preukázať a bližšie charakterizovať karotenoidy, kvôli nadmernému rozptylu svetla bunkovými komponentmi v UV-VIS oblasti.

Do tohto analytického usporiadania spektrometru bola zapojená integračná komora (difúzne transmisný mód) v snahe eliminovať vplyv rozptylu svetla a charakterizovať štrukturálne zmeny v zložení karotenoidov v závislosti na čase kultivácie. Oproti transmisnému módu boli získané spektrá s oveľa lepším rozlíšením v oblasti absorpcie karotenoidov a píkovej bakteriochlorofylu *a* absorbujúcich pri nižších vlnových dĺžkach (Soretov a  $Q_x$  pásy). Bolo taktiež možné pozorovať prítomnosť rôznych prekursorov v biosyntetickej ceste k spiriloxantínu.

Poslednou testovanou metódou *in situ* analýzy bola fluorescenčná spektroskopia pomocou ktorej boli získané excitačno-emisné mapy. 3D mapy závislosti intenzity fluorescencie pri rôznych excitačných a emisných vlnových dĺžkach umožňujú vďaka koreláciám na absorbanciu vzoriek v difúzne transmisnom móde rozlíšiť jednotlivé fluorofory. Konkrétne bola preukázaná prítomnosť spiriloxantínu vo väčšom množstve karotenoidov, absorbujúcich rovnako intenzívne pri ostatných metódach. Taktiež je pomocou týchto získaných máp vysvetliť biologickú funkciu pigmentov pri fotosyntéze a stanoviť ich koncentráciu. Kombinácia týchto dvoch metód v UV-VIS oblasti poskytuje najspolahlivejšie a najpresnejšie informácie o fotosyntetických pigmentoch.

V rámci bakalárskej práce boli otestované viaceré spektroskopické metódy analýzy fotosyntetických pigmentov a boli diskutované ich hlavné výhody a nevýhody. V ďalšom výskume bude ideálne sa zamerať na optimalizáciu kombinácie metód UV-VIS spektroskopie v difúzne transmisnom móde spolu s fluorescenčnou spektroskopiou a interpretácií excitačno-emisných máp.

## 6 CITOVANÉ DIELA

- [1] MIRKOVIC, Tihana, Evgeny E. OSTROUMOV, Jessica M. ANNA, Rienk VAN GRONDELLE, GOVINDJEE a Gregory D. SCHOLLES. Light Absorption and Energy Transfer in the Antenna Complexes of Photosynthetic Organisms. *Chemical Reviews* [online]. 2017, **117**(2), 249-293 [cit. 2023-05-11]. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/acs.chemrev.6b00002
- [2] BLANKENSHIP, Robert E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 978-1-4051-8976-7.
- [3] , Robert G. Wetzel. *Limnology: lake and river ecosystems* [online]. 3rd ed. San Diego, CA: Academic Press, 2001 [cit. 2023-05-09]. ISBN 0080574394, 9780080574394.
- [4] [online]. In: . [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://www.fondriest.com/environmental-measurements/parameters/weather/photosynthetically-active-radiation/>
- [5] MCKENZIE, Richard L., Lars Olof BJÖRN, Alkiviadis BAIS a Mohammad ILYASD. *Changes in biologically active ultraviolet radiation reaching the Earth's surface* [online]. 2003, **2**(1), 5-15 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1474-905X. Dostupné z: doi:10.1039/b2111155c
- [6] RASTOGI, Rajesh P., Lars Olof RICHA, Ashok KUMAR, Madhu B. TYAGI a Rajeshwar P. SINHA. Molecular Mechanisms of Ultraviolet Radiation-Induced DNA Damage and Repair. *Journal of Nucleic Acids* [online]. 2010, **2010**(1), 1-32 [cit. 2023-05-09]. ISSN 2090-021X. Dostupné z: doi:10.4061/2010/592980
- [7] VALEUR, Bernard a Mário Nuno BERBERAN-SANTOS. *Molecular Fluorescence* [online]. 2012-04-25 [cit. 2023-05-09]. Dostupné z: doi:10.1002/9783527650002
- [8] KHRISTENKO, S.V, A.I MASLOV a V.P SHEVELKO. *Molecules and Their Spectroscopic Properties*. Berlin: Springer-Verlag, 1998. ISBN 35-406-3466-5.
- [9] CONNOLLY, John S., A. Frederick JANZEN a Edward B. SAMUEL. FLUORESCENCE LIFETIMES OF CHLOROPHYLL a: SOLVENT, CONCENTRATION AND OXYGEN DEPENDENCE. *Photochemistry and Photobiology* [online]. 1982, **36**(5), 559-563 [cit. 2023-05-09]. ISSN 0031-8655. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.1982.tb04416.x
- [10] STEPHENSON, L. M., G. S. HAMMOND, Barry D. STEIN, Adrien DUCRET, Yves V. BRUN, James B. MCKINLAY a Caroline S. HARWOOD. Deactivation of Excited States: from single molecules to in vivo membranes. *Angewandte Chemie International Edition in English* [online]. 1969, **8**(4), 261-270 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0570-0833. Dostupné z: doi:10.1002/anie.196902611
- [11] [online]. [cit. 2023-05-15]. Dostupné z: <https://www.edinst.com/us/blog/jablonski-diagram/>

- [12] LIU, Lu-Ning, Xiu-Lan CHEN, Yu-Zhong ZHANG a Bai-Cheng ZHOU. Characterization, structure and function of linker polypeptides in phycobilisomes of cyanobacteria and red algae: An overview. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2005, 1708(2), 133-142 [cit. 2023-05-11]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2005.04.001
- [13] BALLOTTARI, Matteo, Milena MOZZO, Julien GIRARDON, Rainer HIENERWADEL a Roberto BASSI. Chlorophyll Triplet Quenching and Photoprotection in the Higher Plant Monomeric Antenna Protein Lhcb5. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. 2013, **117**(38), 11337-11348 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp402977y
- [14] MAOKA, Takashi, Milena MOZZO, Julien GIRARDON, Rainer HIENERWADEL a Roberto BASSI. Carotenoids as natural functional pigments. *Journal of Natural Medicines* [online]. 2020, **74**(1), 1-16 [cit. 2023-05-15]. ISSN 1340-3443. Dostupné z: doi:10.1007/s11418-019-01364-x
- [15] GRUSZECKI, Wiesław I., Kazimierz STRZAŁKA, Julien GIRARDON, Rainer HIENERWADEL a Roberto BASSI. Carotenoids as modulators of lipid membrane physical properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* [online]. 2005, **1740**(2), 108-115 [cit. 2023-05-15]. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbadis.2004.11.015
- [16] CHRISTENSEN, Ronald L., Kazimierz STRZAŁKA, Julien GIRARDON, Rainer HIENERWADEL a Roberto BASSI. The Electronic States of Carotenoids. *The Photochemistry of Carotenoids* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, **1740**(2), 137-159 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 09254439. Dostupné z: doi:10.1007/0-306-48209-6\_8
- [17] SCHULTEN, K., M. KARPLUS, Jessica M. ANNA, Rienk VAN GRONDELLE, GOVINDJEE a Gregory D. SCHOLLES. On the origin of a low-lying forbidden transition in polyenes and related molecules. *Chemical Physics Letters* [online]. 1972, **14**(3), 305-309 [cit. 2023-05-11]. ISSN 00092614. Dostupné z: doi:10.1016/0009-2614(72)80120-9
- [18] FIEDOR, Leszek a Mariusz PILCH. Side Methyl Groups Control the Conformation and Contribute to Symmetry Breaking of Isoprenoid Chromophores. *Angewandte Chemie International Edition* [online]. 2018, 57(22), 6501-6506 [cit. 2023-05-09]. ISSN 1433-7851. Dostupné z: doi:10.1002/anie.201802094
- [19] FIEDOR, Leszek, Alina DUDKOWIAK a Mariusz PILCH. The origin of the dark S 1 state in carotenoids: a comprehensive model. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2019, **16**(158) [cit. 2023-05-11]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2019.0191
- [20] POLÍVKA, Tomáš, Villy SUNDSTRÖM, Julien GIRARDON, Rainer HIENERWADEL a Roberto BASSI. Ultrafast Dynamics of Carotenoid Excited States—From Solution to Natural and Artificial Systems. *Chemical Reviews* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, **104**(4), 2021-2072 [cit. 2023-05-15]. Advances in

- Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 0009-2665.  
Dostupné z: doi:10.1021/cr020674n
- [21] WASIELEWSKI, Michael R., Lowell D. KISPERT, Julien GIRARDON, Rainer HIENERWADEL a Roberto BASSI. Direct measurement of the lowest excited singlet state lifetime of all-trans- $\beta$ -carotene and related carotenoids. *Chemical Physics Letters* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1986, **128**(3), 238-243 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 00092614. Dostupné z: doi:10.1016/0009-2614(86)80332-3
- [22] PORTOLES, Manuel J., Andrew A. PASCAL a Bruno ROBERT. Electronic and vibrational properties of carotenoids: from in vitro to in vivo. *Journal of The Royal Society Interface* [online]. 2017, 14(135) [cit. 2023-05-11]. ISSN 1742-5689. Dostupné z: doi:10.1098/rsif.2017.0504
- [23] CHYNWAT, Veeradej, Harry A. FRANK a Bruno ROBERT. The application of the energy gap law to the S1 energies and dynamics of carotenoids: from in vitro to in vivo. *Chemical Physics* [online]. 1995, 194(2-3), 237-244 [cit. 2023-05-11]. ISSN 03010104. Dostupné z: doi:10.1016/0301-0104(95)00017
- [24] KOYAMA, Yasushi, Ferdy S. RONDONUWU, Ritsuko FUJII, Yasutaka WATANABE a Roberto BASSI. Light-harvesting function of carotenoids in photo-synthesis: The roles of the newly found 11Bu- state. *Biopolymers* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, **74**(1-2), 2-18 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 0006-3525. Dostupné z: doi:10.1002/bip.20034
- [25] POLÍVKA, Tomáš, Villy SUNDSTRÖM, Hiroshi KARASAWA, Masazumi FUJIWARA, Richard J. COGDELL, Hideki HASHIMOTO a Masayuki YOSHIZAWA. Dark excited states of carotenoids: Consensus and controversy. *Chemical Physics Letters* [online]. 2009, 477(1-3), 1-11 [cit. 2023-05-11]. ISSN 00092614. Dostupné z: doi:10.1016/j.cplett.2009.06.011
- [26] WRAIGHT, Colin A., Roderick K. CLAYTON, Yasutaka WATANABE, Yasushi KOYAMA a Jian-Ping ZHANG. The absolute quantum efficiency of bacteriochlorophyll photooxidation in reaction centres of Rhodospseudomonas spheroides. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 1974, **333**(2), 246-260 [cit. 2023-05-13]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/0005-2728(74)90009-7
- [27] ANDREWS, D.L., Roderick K. CLAYTON, Yasutaka WATANABE, Yasushi KOYAMA a Jian-Ping ZHANG. A unified theory of radiative and radiationless molecular energy transfer. *Chemical Physics* [online]. 1989, **135**(2), 195-201 [cit. 2023-05-13]. ISSN 03010104. Dostupné z: doi:10.1016/0301-0104(89)87019-3
- [28] OLAYA-CASTRO, Alexandra, Gregory D. SCHOLES, Yasutaka WATANABE, Yasushi KOYAMA a Jian-Ping ZHANG. Energy transfer from Förster–Dexter theory to quantum coherent light-harvesting. *International Reviews in Physical Chemistry* [online]. 2011, **30**(1), 49-77 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0144-235X. Dostupné z: doi:10.1080/0144235X.2010.537060
- [29] FÖRSTER, Th., Gregory D. SCHOLES, Yasutaka WATANABE, Yasushi KOYAMA a Jian-Ping ZHANG. Zwischenmolekulare Energiewanderung und

- Fluoreszenz. *Annalen der Physik* [online]. 2006, **437**(1-2), 55-75 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0003-3804. Dostupné z: doi:10.1002/andp.19484370105
- [30] GRADINARU, Claudiu C., John T. M. KENNIS, Emmanouil PAPAGIANNAKIS, Ivo H. M. VAN STOKKUM, Richard J. COGDELL, Graham R. FLEMING, Robert A. NIEDERMAN a Rienk VAN GRONDELLE. An unusual pathway of excitation energy deactivation in carotenoids: Singlet-to-triplet conversion on an ultrafast timescale in a photosynthetic antenna. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2001, **98**(5), 2364-2369 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.051501298
- [31] GILMORE, Adam M., Theodore L. HAZLETT, Peter G. DEBRUNNER, Ivo H. M. GOVINDJEE, Richard J. COGDELL, Graham R. FLEMING, Robert A. NIEDERMAN a Rienk VAN GRONDELLE. Photosystem II chlorophyll a fluorescence lifetimes and intensity are independent of the antenna size differences between barley wild-type and chlorina mutants: Photochemical quenching and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching of fluorescence. *Photosynthesis Research* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1996, **48**(1-2), 171-187 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 0166-8595. Dostupné z: doi:10.1007/BF00041007
- [32] KIANG, Nancy Y., Theodore L. HAZLETT, Peter G. DEBRUNNER, Ivo H. M. GOVINDJEE, Richard J. COGDELL, Graham R. FLEMING, Robert A. NIEDERMAN a Rienk VAN GRONDELLE. The Color of Plants on Other Worlds: Photochemical quenching and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching of fluorescence. *Scientific American* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2008, **298**(4), 48-55 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 0036-8733. Dostupné z: doi:10.1038/scientificamerican0408-48
- [33] COGDELL, Richard J., Andrew GALL, Jürgen KÖHLER, Yasushi KOYAMA a Jian-Ping ZHANG. The architecture and function of the light-harvesting apparatus of purple bacteria: from single molecules to in vivo membranes. *Quarterly Reviews of Biophysics* [online]. 2006, **39**(3), 227-324 [cit. 2023-05-13]. ISSN 0033-5835. Dostupné z: doi:10.1017/S0033583506004434
- [34] LASARRE, Breah, David T. KYSELA, Barry D. STEIN, Adrien DUCRET, Yves V. BRUN, James B. MCKINLAY, Caroline S. HARWOOD a Rienk VAN GRONDELLE. Restricted Localization of Photosynthetic Intracytoplasmic Membranes (ICMs) in Multiple Genera of Purple Nonsulfur Bacteria: Photochemical quenching and xanthophyll cycle-dependent nonphotochemical quenching of fluorescence. *MBio* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2018, **9**(4), e00780-18 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-5942-9. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1128/mBio.00780-18
- [35] DREWS, Gerhart, Jochen R. GOLECKI, Barry D. STEIN, Adrien DUCRET, Yves V. BRUN, James B. MCKINLAY, Caroline S. HARWOOD a Rienk VAN GRONDELLE. Structure, Molecular Organization, and Biosynthesis of Membranes of Purple Bacteria: Photochemical quenching and xanthophyll cycle-dependent



- nonphotochemical quenching of fluorescence. *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2004, **9**(4), 231-257 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-3681-X. ISSN 2161-2129. Dostupné z: doi:10.1007/0-306-47954-0\_12
- [36] QIAN, Pu, Miroslav Z. PAPIZ, Philip J. JACKSON, et al. Three-Dimensional Structure of the Rhodobacter sphaeroides RC-LH1-PufX Complex: Dimerization and Quinone Channels Promoted by PufX. *Biochemistry* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2013, **52**(43), 7575-7585 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-3681-X. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi4011946
- [37] RICHTER, Martin F., Jürgen BAIER, June SOUTHALL, et al. Refinement of the x-ray structure of the RC-LH1 core complex from Rhodospseudomonas palustris by single-molecule spectroscopy: Dimerization and Quinone Channels Promoted by PufX. *Proceedings of the National Academy of Sciences* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2007, **104**(51), 20280-20284 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-3681-X. ISSN 0027-8424. Dostupné z: doi:10.1073/pnas.0704599105
- [38] OKUNO, D., R. IINO, H. NOJI, et al. Rotation and structure of FoF1-ATP synthase: Dimerization and Quinone Channels Promoted by PufX. *Journal of Biochemistry* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2011, **149**(6), 655-664 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-3681-X. ISSN 0021-924X. Dostupné z: doi:10.1093/jb/mvr049
- [39] NIEDZWIEDZKI, Dariusz M., Preston L. DILBECK, Qun TANG, et al. Functional characteristics of spirilloxanthin and keto-bearing Analogues in light-harvesting LH2 complexes from Rhodobacter sphaeroides with a genetically modified carotenoid synthesis pathway: Dimerization and Quinone Channels Promoted by PufX. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2015, **1847**(6-7), 640-655 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-3681-X. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2015.04.001
- [40] CONG, Hong, Dariusz M. NIEDZWIEDZKI, George N. GIBSON, et al. Ultrafast Time-Resolved Carotenoid to-Bacteriochlorophyll Energy Transfer in LH2 Complexes from Photosynthetic Bacteria: Dimerization and Quinone Channels Promoted by PufX. *The Journal of Physical Chemistry B* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 2008, **112**(34), 10689-10703 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-3681-X. ISSN 1520-6106. Dostupné z: doi:10.1021/jp711946w
- [41] COGDELL, Richard J., Neil W. ISAACS, Andy A. FREER, et al. The structure and function of the LH2 (B800-850) complex from the purple photosynthetic bacterium Rhodospseudomonas acidophila strain 10050: Dimerization and Quinone Channels Promoted by PufX. *Progress in Biophysics and Molecular Biology* [online]. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers, 1997, **68**(1), 1-27 [cit. 2023-05-15]. Advances in Photosynthesis and Respiration. ISBN 0-7923-3681-X. ISSN 00796107. Dostupné z: doi:10.1016/S0079-6107(97)00010-2

- [42] HASHIMOTO, Hideki, Chiasa URAGAMI a Richard J. COGDELL. Carotenoids and Photosynthesis. *Carotenoids in Nature* [online]. Cham: Springer International Publishing, 2016, 2016-08-03, 74(1), 111-139 [cit. 2023-05-09]. Subcellular Biochemistry. ISBN 978-3-319-39124-3. ISSN 1340-3443. Dostupné z: doi:10.1007/978-3-319-39126-7\_4
- [43] YOUNG, Andrew a Gordon LOWE. Carotenoids—Antioxidant Properties. *Antioxidants* [online]. 2018, **7**(2), 1-16 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2076-3921. Dostupné z: doi:10.3390/antiox7020028
- [44] DAS, Kaushik a Aryadeep ROYCHOUDHURY. Reactive oxygen species (ROS) and response of antioxidants as ROS-scavengers during environmental stress in plants. *Frontiers in Environmental Science* [online]. 2014, **2**(2), 1-16 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2296-665X. Dostupné z: doi:10.3389/fenvs.2014.00053
- [45] NAJAFPOUR, G. D. a H. YOUNESI. Bioconversion of synthesis gas to hydrogen using a light-dependent photosynthetic bacterium, *Rhodospirillum rubrum*. *World Journal of Microbiology and Biotechnology* [online]. 2007, **23**(2), 275-284 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0959-3993. Dostupné z: doi:10.1007/s11274-006-9225-2
- [46] TANI, Kazutoshi, Ryo KANNO, Xuan-Cheng JI, et al. Cryo-EM Structure of the Photosynthetic LH1-RC Complex from *Rhodospirillum rubrum*. *Biochemistry* [online]. 2021, **60**(32), 2483-2491 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/acs.biochem.1c00360
- [47] AUTENRIETH, Caroline, Robin GHOSH, Xuan-Cheng JI, et al. Random mutagenesis and overexpression of rhodopin-3,4-desaturase allows the production of highly conjugated carotenoids in *Rhodospirillum rubrum*. *Archives of Biochemistry and Biophysics* [online]. 2015, **572**(32), 134-141 [cit. 2023-05-15]. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/j.abb.2015.01.023
- [48] RUBANOVÁ, Blanka. Studium metabolismu polyhydroxyalkanoátů u bakterie *Rhodospirillum rubrum* [online]. Brno, 2022 [cit. 2022-05-25]. Dostupné z: <https://www.vutbr.cz/studenti/zavprace/detail/138823>. Bakalářská práce. Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, Ústav chemie potravin a biotechnologií. Vedoucí práce Eva Slaninová.
- [49] QIAN, Pu, Hugh A. ADDLESEE, Alexander V. RUBAN, et al. A Reaction Center-Light-harvesting 1 Complex (RC-LH1) from a *Rhodospirillum rubrum* Mutant with Altered Esterifying Pigments. *Journal of Biological Chemistry* [online]. 2003, **278**(26), 23678-23685 [cit. 2023-05-15]. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1074/jbc.M302753200
- [50] KOSUMI, Daisuke, Satoshi MARUTA, Tomoko HORIBE, et al. Ultrafast excited state dynamics of spirilloxanthin in solution and bound to core antenna complexes: Identification of the S\* and T 1 states. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 2012, **137**(6), 23678-23685 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0021-9606. Dostupné z: doi:10.1063/1.4737129
- [51] MAIURI, Margherita, Julien RÉHAULT, Anne-Marie CAREY, et al. Ultra-broadband 2D electronic spectroscopy of carotenoid-bacteriochlorophyll interactions in the LH1 complex of a purple bacterium: Identification of the S\* and T 1

- states. *The Journal of Chemical Physics* [online]. 2015, **142**(21), 23678-23685 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0021-9606. Dostupné z: doi:10.1063/1.4919056
- [52] KAFTAN, David, David BÍNA, Michal KOBLÍŽEK, et al. Temperature dependence of photosynthetic reaction centre activity in *Rhodospirillum rubrum*: Identification of the S\* and T 1 states. *Photosynthesis Research* [online]. 2019, **142**(2), 181-193 [cit. 2023-05-15]. ISSN 0166-8595. Dostupné z: doi:10.1007/s11120-019-00652-7
- [53] YUKIHIRA, Nao, Chiasa URAGAMI, Kota HORIUCHI, et al. Intramolecular charge-transfer enhances energy transfer efficiency in carotenoid-reconstituted light-harvesting 1 complex of purple photosynthetic bacteria: Identification of the S\* and T 1 states. *Communications Chemistry* [online]. 2022, **5**(1), 181-193 [cit. 2023-05-15]. ISSN 2399-3669. Dostupné z: doi:10.1038/s42004-022-00749-6
- [54] NIEDZWIEDZKI, Dariusz M., Preston L. DILBECK, Qun TANG, et al. Functional characteristics of spirilloxanthin and keto-bearing Analogues in light-harvesting LH2 complexes from *Rhodobacter sphaeroides* with a genetically modified carotenoid synthesis pathway: Identification of the S\* and T 1 states. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* [online]. 2015, **1847**(6-7), 640-655 [cit. 2023-05-15]. ISSN 00052728. Dostupné z: doi:10.1016/j.bbabi.2015.04.001
- [55] ZAVREL, Tomas, Maria SINETOVA a Jan CERVENY. Measurement of Chlorophyll a and Carotenoids Concentration in Cyanobacteria. *BIO-PROTOCOL* [online]. 2015, **5**(9) [cit. 2023-05-16]. ISSN 2331-8325. Dostupné z: doi:10.21769/BioProtoc.1467
- [56] NAMSARAEV, Z. B., Maria SINETOVA a Jan CERVENY. Application of extinction coefficients for quantification of chlorophylls and bacteriochlorophylls. *Microbiology* [online]. 2009, **78**(6), 794-797 [cit. 2023-05-16]. ISSN 0026-2617. Dostupné z: doi:10.1134/S0026261709060174
- [57] AKAHANE, Junji, Ferdy S RONDONUWU, Leszek FIEDOR, Yasutaka WATANABE a Yasushi KOYAMA. Dependence of singlet-energy transfer on the conjugation length of carotenoids reconstituted into the LH1 complex from *Rhodospirillum rubrum* G9. *Chemical Physics Letters* [online]. 2004, **393**(1-3), 184-191 [cit. 2023-05-16]. ISSN 00092614. Dostupné z: doi:10.1016/j.cplett.2004.06.021
- [58] PERMENTIER, Hjalmar P., Ferdy S RONDONUWU, Leszek FIEDOR, Yasutaka WATANABE a Yasushi KOYAMA. Dependence of singlet-energy transfer on the conjugation length of carotenoids reconstituted into the LH1 complex from *Rhodospirillum rubrum* G9. *Photosynthesis Research* [online]. 2004, **64**(1), 27-39 [cit. 2023-05-16]. ISSN 01668595. Dostupné z: doi:10.1023/A:1026515027824
- [59] [online]. [cit. 2023-05-21]. Dostupné z: <https://www.hitachi-hightech.com/products/images/9751/U-3900%20Brochure-HTB-E046R.pdf>

## 7 ZOZNAM SKRATIEK A SYMBOLOV

### 7.1 Zoznam skratiek

• PLA	polylaktid
• PHA	polyhydroxyalkanoát
• FAR	fotosynteticky aktívny región
• IR	Infra-red
• NIR	Near-infra-red
• UVA	ultraviolet A
• UVB	ultraviolet B
• DNA	deoxyribonukleová kyselina
• FA	fotosyntetický aparát
• ICM	intracytoplazmatická membrána
• LH	svetlozberný (komplex/ aparát)
• RC	reakčné centrum
• (B)Chl	(bakterio)chlorofyl
• Car	karotenoid
• $N_{ef}$	efektívna dĺžka konjugácie
• FRET	Förster resonance energy transfer
• CEET	Coherent electronic energy transfer
• RC–LH1	svetlozberná anténa spojená s reakčným centrom
• EET	electronic energy transfer
• PNSB	purpurové nesírne baktérie
• ATP	adenozíntrifosfát
• 2DES	dvojrozmernú elektronická spektroskopia
• PM	produkčné médium
• VIS	viditeľné spektrum
• EEM	Excitačno-emisná mapa
• P(3HB-co-3HV)	poly(3-hydroxybutyrát-co-3-hydroxyvalerát)

### 7.2 Zoznam symbolov

• °C	stupeň Celzia
• nm	nanometre
• A	absorbance
• M	molárna koncentrácia
• cm	centimeter
• $\mu\text{m}$	mikrometer
• g	gram
• mg	miligram
• ml	mililiter
• l	liter
• h	hodina
• rpm	otáčky za minútu