

ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΔΙΠΛΩΜΑ ΕΙΔΙΚΕΥΣΗΣ

**" ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΚΗ ΜΕΛΕΤΗ ΜΙΑΣ ΠΡΩΤΕΙΝΗΣ  
ΤΟΥ CHLOROBIVM TERIDUM ΜΕ ΣΚΕΔΑΣΗ ΑΚΤΙΝΩΝ LASER "**

**Παναγιώτης Σαμόλης**

**Υπεύθυνος Καθηγητής : Απόστολος Κ. Ρίζος**

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ  
ΣΧΟΛΗ ΘΕΤΙΚΩΝ ΕΠΙΣΤΗΜΩΝ  
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**

**ΓΕΝΙΚΟ ΜΕΤΑΠΤΥΧΙΑΚΟ ΠΡΟΓΡΑΜΜΑ**

**ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2005**

## ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Μια πρωτεΐνη απομονώθηκε από την εξωτερική μεμβράνη του φωτοσυνθετικού βακτηρίου *Chlorobium Tepidum* και μελετήθηκε με την τεχνική σκέδασης φωτός (Light Scattering) . Η πρωτεΐνη διαλυτοποιήθηκε με τη βοήθεια διαφόρων επιφανειοδραστικών αντιδραστηρίων που ονομάζονται detergents . Χρησιμοποιήθηκαν detergents διαφορετικής χημικής σύστασης και συνεπώς διαφορετικών χημικών ιδιοτήτων όπως υδρόφιλες/υδρόφοβες αλληλεπιδράσεις ή στερεοχημικές παρεμποδίσεις .

Η σκέδαση φωτός που εφαρμόστηκε είναι μια ημιελαστική διαδικασία κατά την οποία το σκεδαζόμενο φως έχει συχνότητα περίπου ίση με το προσπίπτον φως αλλά όχι ακριβώς ίση . Στην ελαστική σκέδαση (Rayleigh) τα προσπίπτοντα φωτόνια έχουν ίση συχνότητα με τα σκεδαζόμενα φωτόνια ενώ υπάρχουν και ανελαστικές σκεδάσεις (όπως για παράδειγμα το φαινόμενο Raman) κατά το οποίο τα εξερχόμενα φωτόνια έχουν διαφορετική συχνότητα από τα εισερχόμενα .

Η ημιελαστική διαδικασία σκέδασης φωτός υποδιαιρείται σε δυο βασικές κατηγορίες . α) Στατική Σκέδαση Φωτός (Static Light Scattering) . Η SLS μετρά τη μέση τιμή της έντασης του φωτός που σκεδάζεται από ένα δείγμα κατά τη διάρκεια του πειράματος . β) Δυναμική Σκέδαση Φωτός (Dynamic Light Scattering) . Η DLS μετρά τις διακυμάνσεις που υφίσταται η σκεδαζόμενη ένταση του φωτός κατά τη χρονική διάρκεια του πειράματος και καταγράφει τις χρονικές στιγμές που συμβαίνουν οι μέγιστες διακυμάνσεις . Αυτή η μέγιστη μεταβολή αντιστοιχεί στη διαδικασία της «χαλάρωσης» σκέδασης εξαιτίας της κίνησης του μορίου στο διάλυμα . Αυτή η κίνηση είναι μεταφορική ή περιστροφική , ωστόσο επειδή η περιστροφική διάχυση είναι πολύ αργή , θεωρείται αμελητέα και υπολογίζεται μόνο η διάχυση λόγω μεταφορικής κίνησης .

Ο σκοπός των πειραμάτων ήταν να εξαχθούν μερικές φυσικοχημικές παράμετροι για το βιολογικό μακρομόριο . Ένας από αυτούς είναι η γυροσκοπική ακτίνα ( $R_g$ ) που είναι η απόσταση που συνδέει το κέντρο μάζας του μακρομορίου με το εξώτατο άκρο του . Η υδροδυναμική ακτίνα ( $R_h$ ) είναι ένα εξίσου χρήσιμο μέγεθος . Θεωρώντας ότι κάθε μόριο διαλυμένης ουσίας περιστοιχίζεται από πολλά μόρια διαλύτη , σχηματίζεται τελικά μια φυσαλίδα (blob) που έχει πάντοτε σφαιρικό σχήμα και ακτίνα  $R_h$  .

Εξετάστηκαν δυο ομάδες διαλυμάτων . Η πρώτη περιείχε δείγματα μικκυλίων που αποτελούνταν μόνο από την επιφανειοδραστική ουσία και η δεύτερη περιείχε δείγματα μικκυλίων που εσώκλειαν την πρωτεΐνη . Για καλύτερη σύγκριση πάρθηκαν για κάθε detergent δείγματα διαφορετικών συγκεντρώσεων . Σχεδόν όλα τα δείγματα που υφίστανται δυναμική σκέδαση εμφανίζουν πάντα δυο κορυφές . Η πρώτη αντιστοιχεί σε μεμονωμένα μικκύλια διαστάσεων μερικών nm και η δεύτερη κορυφή αντιστοιχεί σε ογκώδη συσσωματώματα (aggregates) μεταξύ των μικκυλίων , διαστάσεων δεκάδων nm . Επομένως , ακόμα και σε πολύ αραιές συγκεντρώσεις υπάρχει συσσωμάτωση ανάμεσα στα μικκύλια . Το μοριακό βάρος των aggregates είναι πολύ μεγάλο αλλά το συνολικό ποσοστό τους κατά μάζα είναι πολύ μικρό . Ωστόσο επειδή οι διαστάσεις των μακρομορίων είναι καθοριστικός

παράγοντας στο φαινόμενο σκέδασης , η συνεισφορά τους στην ένταση σκέδασης είναι υπολογίσιμη .

Η εργασία περιλαμβάνει :

A) Μια εισαγωγή στα φαινόμενα σκέδασης , μερικούς βασικούς ορισμούς για την ημιελαστική σκέδαση και κάποιους παράγοντες που προκαλούν ατέλειες στις μετρήσεις , όπως για παράδειγμα ύπαρξη σκόνης στο διάλυμα , καθώς και πώς αντιμετωπίζονται αυτές οι ανεπιθύμητες συνεισφορές .

B) Μια εισαγωγή στο μαθηματικό υπόβαθρο της επεξεργασίας που επιτελείται σε ένα πείραμα DLS και που ονομάζεται συσχέτιση φωτονίων . Ο υπολογιστής συσχετίζει τα σκεδαζόμενα φωτόνια που δέχεται σε τακτά χρονικά διαστήματα , αποθηκεύοντας τα σε διάφορα «κανάλια» . Η συσχέτιση ανάμεσα στα φωτόνια που είναι αποθηκευμένα και τα φωτόνια που εισέρχονται , αποσκοπεί στο να εξάγει πληροφορίες για το πόσο διάστημα χρειάζεται ώστε ένα σήμα που προέρχεται από το δείγμα να χάσει τη «μνήμη» της προηγούμενης τιμής του . Έτσι κατασκευάζεται η συνάρτηση συσχέτισης “correlation function” .

Γ) Μια βιβλιογραφική αναφορά σε κάποια πειράματα SLS και DLS που έχουν γίνει σε διάφορα δείγματα μακρομορίων καθώς και τα χρήσιμα συμπεράσματα που προέκυψαν από αυτές τις μελέτες (π.χ. κινητική καταγραφή αντιδράσεων , προσδιορισμός σύστασης μείγματος ή και φθορισμομετρία) . Τα παραδείγματα περιλαμβάνουν φυσικά και χημικά πολυμερή , διάφορες πρωτεΐνες , βιολογικά δείγματα (όπως ερυθρά αιμοσφαίρια ή D.N.A.) καθώς και υπερκρίσιμα ρευστά .

Δ) Τη βασική οργανολογία των πειραμάτων , δηλαδή τα κυριότερα τμήματα που απαρτίζουν τη διάταξη , όπως το laser , το δοχείο που περιέχει το δείγμα και τον ανιχνευτή .

Ε) Μια περιγραφή των φωτοσυνθετικών βακτηρίων από τα οποία απομονώθηκε η πρωτεΐνη . Αναφέρεται η δομή του ενεργού κέντρου της φωτοσυνθετικής διαδικασίας και κάποιοι προτεινόμενοι μηχανισμοί της μεταφοράς ηλεκτρονίων . Περιλαμβάνονται επιπλέον και κάποιες ενδιαφέρουσες ιδιότητες των βακτηρίων πέραν της φωτοσύνθεσης , όπως η ενζυμική δραστηκότητά τους .

ΣΤ) Την πειραματική διαδικασία και τα αποτελέσματα των φασμάτων που λήφθηκαν από τις συναρτήσεις συσχέτισης και τους υπολογισμούς . Τα αποτελέσματα περιλαμβάνουν τις διαστάσεις των μακρομορίων αλλά και των aggregates καθώς και έναν προσδιορισμό της γεωμετρίας των σωματιδίων . Δίνονται επίσης κάποιες πληροφορίες για το πώς η χημική σύσταση του κάθε detergent μπορεί να επηρεάσει τη συμπεριφορά του δείγματος .

## ΠΕΡΙΕΧΟΜΕΝΑ

<b><u>Κεφάλαιο I. Εισαγωγή στη Σκέδαση Φωτός</u></b>	<b>σελ. 1 – 10</b>
I. A) Αλληλεπίδραση H/M ακτινοβολίας και ύλης	σελ. 1
I. B) Θεμελιώδεις αρχές της σκέδασης φωτός	σελ. 3
<b><u>Κεφάλαιο II. Συσχέτιση Φωτονίων (Correlation)</u></b>	<b>σελ. 11 – 17</b>
<b><u>Κεφάλαιο III. Πρακτικές Εφαρμογές Light Scattering</u></b>	<b>σελ. 18 – 70</b>
<b>III. Μέρος 1) Πολυμερή</b>	σελ. 18
III. 1 α) Χημικά Πολυμερή	σελ. 18
III. 1 β) Φυσικά Πολυμερή	σελ. 31
<b>III. Μέρος 2) Πρωτεΐνες</b>	σελ. 41
III. 2 α) Μακρομόρια	σελ. 41
III. 2 β) Κολλοειδή / Clusters	σελ. 48
<b>III. Μέρος 3) Βιολογικά Συστήματα</b>	σελ. 53
<b>III. Μέρος 4) Άλλες Εφαρμογές</b>	σελ. 64
III. 4 α) Resonance Light Scattering	σελ. 64
III. 4 β) Interaction Induced Raman Light Scattering	σελ. 68
<b><u>Κεφάλαιο IV. Οργανολογία</u></b>	<b>σελ. 71 – 80</b>
IV A.) Πειραματική διάταξη για σκέδαση φωτός	σελ. 71
IV B.) Πρόσθετες πληροφορίες για τη διαδικασία συσχέτισης	σελ. 74

IV Γ.) Οργανολογία διασταυρωτής συσχέτισης (cross correlation) σελ. 78

**Κεφάλαιο V. Βιοχημικό Μέρος (Chlorobium Terpidum)** σελ. 81 - 98

Εισαγωγικά για τα βακτήρια Chlorobium σελ. 81

**V. Μέρος 1) Δομή Chlorobium Terpidum** σελ. 83

V. 1 α) Γενική περιγραφή φωτοσυλλεκτικού συστήματος σελ. 83

V. 1 β) Λεπτομερής δομική ανάλυση της FMO σελ. 87

**V. Μέρος 2) Κινητική Μεταφοράς Ηλεκτρονίων** σελ. 90

V. 2 α) Προτεινόμενοι μηχανισμοί σελ. 90

V. 2 β) Επίδραση οξυγόνου στα Chlorobium Terpidum σελ. 95

V. 2 γ) Λειτουργία αναγωγάσης NAD(P)<sup>+</sup> - φερρεδοξίνης σελ. 97

**Κεφάλαιο VI. Αποτελέσματα** σελ. 99 -115

VI A.) Πειραματική διαδικασία σελ. 99

VI B.) Μελέτη Detergents σελ. 101

VI Γ.) Πρωτεϊνικά σύμπλοκα detergents σελ. 107

VI Δ.) Τελικές παρατηρήσεις – συμπεράσματα σελ. 115

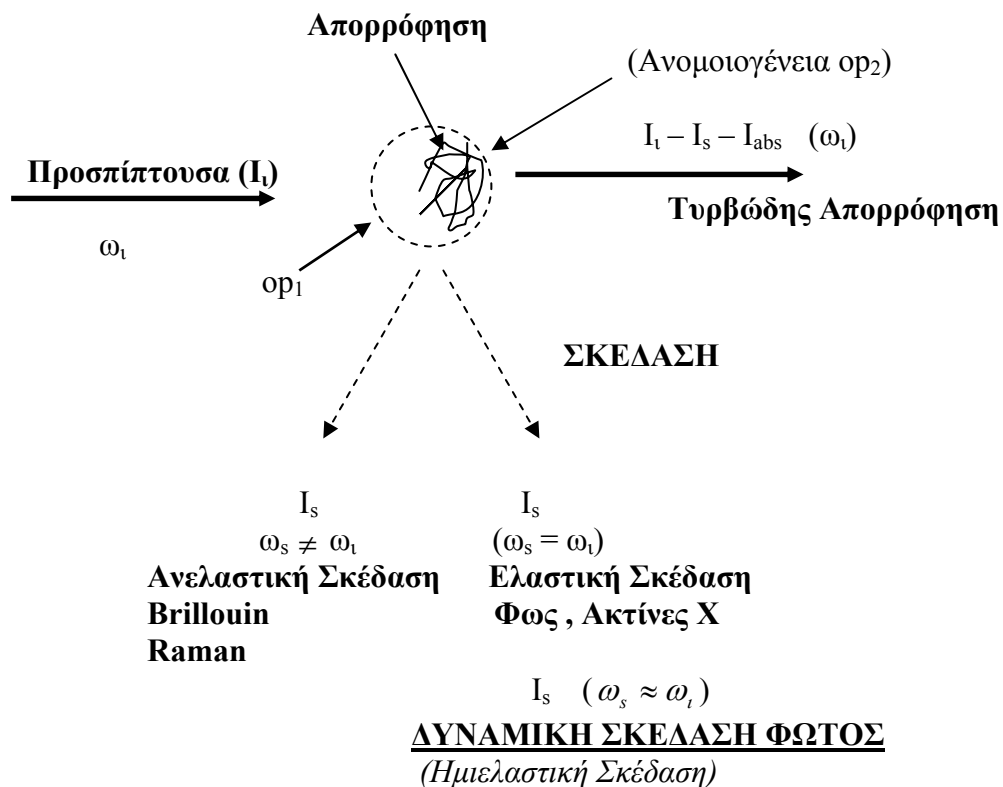
**ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ : Μελλοντικοί στόχοι** σελ. 116 - 120

**ΒΙΒΛΙΟΓΡΑΦΙΑ** σελ. 121 – 125

# **ΚΕΦΑΛΑΙΟ Ι) ΕΙΣΑΓΩΓΗ ΣΤΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ**

## A) ΑΛΛΗΛΕΠΙΔΡΑΣΗ Η/Μ ΑΚΤΙΝΟΒΟΛΙΑΣ ΚΑΙ ΥΛΗΣ

Όποτε ηλεκτρομαγνητική ακτινοβολία διαδίδεται σε ένα μέσο που θεωρείται ως συνεχές με οπτικές ιδιότητες  $op_1$  (optical properties) , αλλά με τοπικές οπτικές ανομοιογένειες  $op_2$  υπάρχει αλληλεπίδραση κάποιας μορφής [1] όπως στο παρακάτω σχήμα .



**Σχήμα 1 :** Πιθανοί τρόποι αλληλεπίδρασης Η/Μ ακτινοβολίας και ύλης

Οι ανομοιογένειες μπορεί να είναι μεμονωμένα μόρια μιας διαλυμένης ουσίας ή να θεωρηθούν ως διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς εξαιτίας της θερμικής κίνησης των μορίων . Αν δεν υπάρξει ανομοιογένεια , δε μπορεί να υπάρξει αλληλεπίδραση ακτινοβολίας – ύλης . Το μόνο μέσο διάδοσης που δεν αλληλεπιδρά με την ακτινοβολία είναι το κενό , το οποίο είναι πλήρως ομογενές . Οι αλληλεπιδράσεις που απεικονίζονται στο σχήμα και που είναι το αποτέλεσμα της επαγόμενης από την ακτινοβολία ταλάντωσης των ηλεκτρονίων των μορίων της ύλης , μπορεί να είναι σκέδαση ή απορρόφηση .

Από αυτές τις αλληλεπιδράσεις μπορούν να εξαχθούν φυσικές και χημικές πληροφορίες για την ύλη . Η διαδικασία σκέδασης μπορεί να παράσχει πληροφορίες για τη δομή και τη δυναμική της ύλης , ενώ η απορρόφηση δίνει πληροφορίες για τα διαφορετικά ενεργειακά επίπεδα των μορίων . Το μεγαλύτερο μέρος της προσπίπτουσας ακτινοβολίας με συχνότητα  $\omega_i$  και ένταση  $I_i$  εκπέμπεται και ένα μέρος της απορροφούμενης ακτινοβολίας μετατρέπεται σε θερμική κίνηση . Στο φαινόμενο της σκέδασης , το μεγαλύτερο μέρος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας θα έχει συχνότητα ίση με την προσπίπτουσα συχνότητα ( $\omega_s = \omega_i$ ) . Αυτό το φαινόμενο ονομάζεται ελαστική σκέδαση ή σκέδαση Rayleigh . Η ανάλυση που θα ακολουθήσει θα περιοριστεί στη σκέδαση αποκλείοντας τα φαινόμενα απορρόφησης . Στην κλασική θεωρία σκέδασης φωτός που πρώτος ο Rayleigh διατύπωσε , η σκέδαση από επαγωγικά ταλαντούμενα ηλεκτρικά δίπολα σε ένα μέσο λαμβάνεται υπόψιν . Όταν δέσμη φωτός συχνότητας  $\omega_i$  περάσει μέσω ενός μέσου σκέδασης , το προσπίπτον ηλεκτρικό πεδίο επάγει ταλαντούμενο δίπολο ίδιας συχνότητας σε κάθε σημείο της διαδρομής του . Αυτό το δίπολο προκαλείται από την ταλαντούμενη πολωσιμότητα των ηλεκτρονίων στον όγκο σκέδασης . Τα ηλεκτρόνια επιταχύνονται σε ένα ταλαντούμενο δίπολο και σύμφωνα με την κλασική ηλεκτρομαγνητική θεωρία επιταχυνόμενο φορτίο εκπέμπει φως προς όλες τις κατευθύνσεις . Επομένως τα επαγόμενα δίπολα (ή σκεδαστές) είναι δευτερογενείς πηγές φωτός . Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι ανάλογη προς το τετράγωνο της πολωσιμότητας των μορίων . Η σκέδαση από ένα μικρό σωματίδιο , αν θεωρηθεί ως ακτινοβολία από ένα επαγόμενο δίπολο , μπορεί να λυθεί χρησιμοποιώντας τις εξισώσεις Maxwell . Αυτό αναφέρεται συχνά ως *μονο-σωματιδιακή σκέδαση* .

Ωστόσο φαινόμενα αλληλεπίδρασης μεταξύ γειτονικών μορίων σε διαλύματα που δεν είναι αραιά , είναι πολύ σημαντικά για να αγνοηθούν . Ο Einstein πρώτος υπολόγισε το φως που σκεδάζεται από υγρά και διαλύματα . Αντί να ληφθούν υπόψη μεμονωμένα μόρια , το μέσο θεωρήθηκε τέλεια ομογενές και στο οποίο θερμικές διακυμάνσεις προκαλούν ανομοιογένειες και κατ' επέκταση διακυμάνσεις στην πυκνότητα και τη συγκέντρωση . Το πρόβλημα λοιπόν ανάγεται σε μια συζήτηση για τοπικές διακυμάνσεις της διηλεκτρικής σταθεράς (που σχετίζονται με το δείκτη διάθλασης) που προέκυψαν από διακυμάνσεις στην πυκνότητα (πίεση) και τη συγκέντρωση . Αυτό ονομάζεται *θεωρία διακυμάνσεων της σκέδασης φωτός* , στην οποία συνεισέφερε και ο Smoluchowski . Διατυπώθηκε η θεωρία ότι η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός είναι ανάλογη με τη μέση τιμή του τετραγώνου της μεταβολής

της διηλεκτρικής σταθεράς . Βεβαίως πρόκειται για μια μακροσκοπική προσέγγιση καθώς δεν υπολογίζεται λεπτομερώς η μικροσκοπική δομή του μέσου . Η πρώτη εφαρμογή της σκέδασης Rayleigh σε πολυμερικά διαλύματα έγινε από τον Debye , ενώ περαιτέρω μελέτη διεξήχθη από τον Zimm .

Με την ανάπτυξη των laser στις αρχές της δεκαετίας του 1960 που παρείχαν αποδοτικές πηγές πολωμένου μονοχρωματικού φωτός μπορούσαν να πραγματοποιηθούν και νέα είδη πειραμάτων για να μελετηθεί η κατανομή συχνότητας του σκεδαζόμενου φωτός . Η ελαστική σκέδαση προβλέπει μεν ότι η συχνότητα του φωτός δεν αλλάζει με τη σκέδαση , αλλά στην πραγματικότητα μεμονωμένα φωτόνια σκεδάζονται με μια μικρή μετατόπιση στη συχνότητα  $\pm \Delta\omega$  (συμβολίζεται και με  $\Gamma$ ) . Το πρόσημο και το μέγεθος αυτής της ενεργειακής μετατόπισης εξαρτώνται από την ταχύτητα και τη διεύθυνση του κινούμενου μέσα στο διάλυμα σωματιδίου σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία . Αυτή η διεύρυνση του φάσματος της συχνότητας αποκαλείται και Φαινόμενο Doppler . Το φάσμα του σκεδαζόμενου φωτός αποτελείται από συχνότητες περίπου ίσες με την προσπίπτουσα που βρίσκονται γύρω από την προσπίπτουσα συχνότητα , την αποκαλούμενη και γραμμή Rayleigh . Αυτή η στενή διεύρυνση της γραμμής Rayleigh οφείλεται στη συνεχή και άτακτη κίνηση Brown των σωματιδίων . Αυτή η διαδικασία σκέδασης ονομάζεται συχνά **ΔΥΝΑΜΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ** (Dynamic Light Scattering : DLS) ή ημι-ελαστική σκέδαση φωτός (*quasi-elastic light scattering*) . Δυναμικές ιδιότητες όπως ο συντελεστής διάχυσης των σωματιδίων  $D$  μπορεί να εξαχθεί από τη διεύρυνση του πλάτους της γραμμής  $\Gamma$  . Το πλάτος των συχνοτήτων είναι συνήθως αρκετά μικρό , μεταξύ 1 Hz και 100 MHz και δε μπορεί να αναλυθεί με τους κλασικούς φασματογράφους . Μια τεχνική που μπορεί να χρησιμοποιηθεί για την παρατήρηση της διεύρυνσης της γραμμής Rayleigh είναι η *τεχνική συσχέτισης φωτονίων* , μια τεχνική φασματοσκοπίας laser που ανέπτυξε ο Pike .

Το υπόλοιπο της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας σκεδάζεται σε συχνότητες μεγαλύτερες και μικρότερες από την προσπίπτουσα και το φαινόμενο ονομάζεται ανελαστική σκέδαση . Οι ανελαστικές διαδικασίες οφείλονται είτε σε διάδοση μεταβολών πυκνότητας (σκέδαση Brillouin) είτε σε μεταβολές της μοριακής πολωσιμότητας που προκαλούνται από τη δόνηση ή την περιστροφή των μορίων (φαινόμενο Raman) . Στη σκέδαση Brillouin οι θερμικές κινήσεις των μορίων προκαλούν τις μεταβολές πυκνότητας και που θεωρούνται ως επίπεδα που



διαδίδονται στο μέσο με την ταχύτητα του ήχου . Το φως που σκεδάζεται από αυτά τα διαμήκη θερμικά – ηχητικά κύματα μπορεί να θεωρηθεί ως περίθλαση Bragg .

### B) ΘΕΜΕΛΙΩΔΕΙΣ ΑΡΧΕΣ ΤΗΣ ΣΚΕΔΑΣΗΣ ΦΩΤΟΣ

Ας θεωρήσουμε ένα ισοτροπικό μέσο που δεν απορροφά , έχει μια μέση μονόμετρη διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon_r$  και μια τοπική διηλεκτρική σταθερά που κυμαίνεται γύρω από τη μέση τιμή :  $\epsilon(r,t) = \epsilon_r + \delta\epsilon(r,t)$  όπου  $\delta\epsilon(r,t)$  είναι η τοπική διακύμανση . Η προσπίπτουσα ακτινοβολία φωτίζει ένα μέρος του μέσου διάδοσης που αποκαλείται «όγκος σκέδασης»  $V$ . Ο όγκος σκέδασης  $V$  μπορεί να διαιρεθεί σε  $N$  υποπεριοχές (στοιχειώδεις όγκους) ίσου μεγέθους που συμβολίζεται με  $d^3r$  (δηλαδή  $dr*dr*dr$ ) . Ισχύει φυσικά  $d^3r = V / N$  . Οι στοιχειώδεις όγκοι υποτίθεται ότι είναι μικροί σε σχέση με το μήκος κύματος του προσπίπτοντος ηλεκτρικού πεδίου αλλά περιέχουν πολλά μόρια . Το συνολικό (στιγμιαίο) σκεδαζόμενο πεδίο μπορεί να θεωρηθεί ως η συνισταμένη των επιμέρους πεδίων από κάθε μια από τις υποπεριοχές . Σε ένα πείραμα σκέδασης φωτός το φως πρέπει να είναι ομοιόμορφο , μονοχρωματικό , επίπεδα πολωμένο Η/Μ κύμα με μήκος κύματος  $\lambda_i$  και γωνιακή συχνότητα  $\omega_i$  . Το ηλεκτρικό πεδίο ενός «κέντρου» σκέδασης  $d^3r$  σε μια θέση  $r$  του όγκου σκέδασης δίνεται από την εξίσωση

$$E_i(r, t) = \vec{e}_i E_0 \exp(i[k_i * r - \omega_i t]) \quad (1)$$

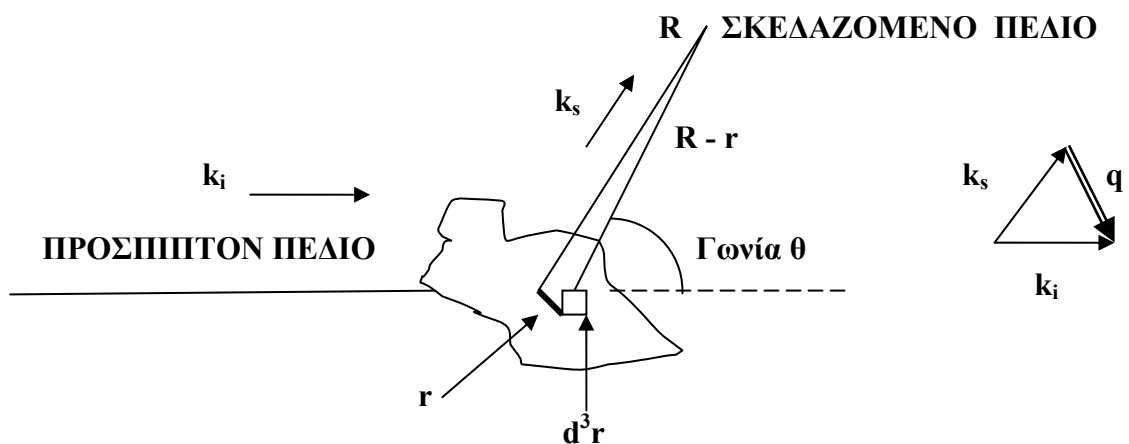
$e_i$  είναι το μοναδιαίο διάνυσμα στην κατεύθυνση του ηλεκτρικού πεδίου (η πολωσιμότητα του πεδίου) και  $E_0$  το πλάτος του πεδίου .  $k_i$  είναι το κυματάνυσμα στην κατεύθυνση του προσπίπτοντος πεδίου και κάθετο στην πολωσιμότητά του . Ο παράγοντας  $k_i * r$  είναι η φάση του κύματος στη θέση  $r$  , υποθέτοντας ότι η πηγή της ακτινοβολίας έχει φάση 0 . Το συνολικό σκεδαζόμενο ηλεκτρικό πεδίο που φτάνει στον ανιχνευτή που τοποθετείται σε απόσταση  $R$  από το κέντρο του όγκου σκέδασης , είναι η συνισταμένη των πεδίων για κάθε ένα από αυτά τα  $d^3r$  που βρίσκονται σε θέσεις  $r$  από το κέντρο του όγκου σκέδασης . Το προσπίπτον και το σκεδαζόμενο ηλεκτρικό πεδίο θα ληφθούν ως μονόμετρα μεγέθη για απλούστευση . Το συνολικό σκεδαζόμενο ηλεκτρικό πεδίο δίνεται από την παρακάτω εξίσωση

$$E_s(R,t) = \frac{1}{4\pi c^2 R} \int_V \frac{\partial^2}{\partial t'^2} (E_i(r,t') \delta \epsilon(r,t')) d^3 r \quad (2)$$

όπου ο όγκος σκέδασης  $V$  ορίζεται ως ο όγκος της προσπίπτουσας ακτίνας **μέσα στο μέσο** όπως τον «βλέπει» ο παρατηρητής (δηλαδή ένας ιδανικός σημειακός φωτοανιχνευτής) και  $t'$  είναι ο χρόνος καθυστέρησης που ορίζεται ως  $t' = t - \sqrt{\epsilon_r - |R-r|}/c$  όπου  $c$  η ταχύτητα του φωτός στο κενό .  $t$  είναι ο χρόνος ανίχνευσης του φωτός που εκπέμφθη σε πρωτότερο χρόνο  $t'$  . Οι αποστάσεις είναι συγκριτικά τόσο μεγάλες ώστε προσεγγιστικά το διάνυσμα  $|R-r|$  μπορεί να θεωρηθεί παράλληλο με το  $R$  . Η κατεύθυνση διάδοσης του σκεδαζόμενου πεδίου καθορίζεται από το κυματόνισμα . Το κυματόνισμα  $k_s$  είναι κάθετο στην πολωσιμότητά του (σε ιστροπικό μέσο , η πολωσιμότητα προσπίπτοντος και σκεδαζόμενου φωτός είναι παράλληλες ) . Το κυματόνισμα **σκέδασης**  $q$  που είναι ένα πολύ σημαντικό μέγεθος ορίζεται ως

$$q = k_i - k_s \quad (3)$$

$k_i$  και  $k_s$  είναι τα κυματόνισμα προσπίπτοντος και σκεδαζόμενου ηλεκτρικού πεδίου αντίστοιχα . Το παρακάτω σχήμα απεικονίζει διανυσματικά το φαινόμενο light scattering .



**Σχήμα 2 :** Αναπαράσταση της γεωμετρίας σκέδασης και του κυματόνισματος  $q$

Εάν και τα δυο κυματανύσματα κείτονται στο ίδιο επίπεδο (το επίπεδο της σκέδασης) η γωνία μεταξύ τους ονομάζεται γωνία σκέδασης  $\theta$ . Τα μεγέθη (σε κυματαριθμούς) των δυο διανυσμάτων  $k_i$  και  $k_s$  είναι  $2\pi n/\lambda_i$  και  $2\pi n/\lambda_s$  αντιστοίχως.  $\lambda$  είναι τα αντίστοιχα μήκη κύματος και  $n$  ο δείκτης διάθλασης του μέσου διάδοσης. Το μήκος κύματος της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας αλλάζει πολύ λίγο οπότε τα μέτρα των δυο διανυσμάτων είναι κατά προσέγγιση ίσα. Το μόνο που αλλάζει λοιπόν είναι η διεύθυνση. Το μέγεθος του κυματανύσματος σκέδασης είναι

$$q = \frac{4\pi n}{\lambda} \sin\left(\frac{\theta}{2}\right) \quad (4)$$

Αν οι εξισώσεις (1) και (3) ενσωματωθούν στη (2) (με την προϋπόθεση ότι η  $\delta\epsilon(r,t')$  μεταβάλλεται πιο αργά κατά το διάστημα  $t'$  σε σχέση με το  $1/\omega_i$ ) και με την παραδοχή ότι το μέσο διάδοσης μεταβάλλεται αργά με το χρόνο διάδοσης έτσι ώστε  $\delta\epsilon(r,t') \approx \delta\epsilon(r,t)$ , η ακόλουθη εξίσωση εξάγεται

$$E_s(R,t) = -\frac{k_s^2 E_0}{4\pi\epsilon_r R} \exp(-i\omega_i t) \int_V \delta\epsilon(r,t) \exp(iq \cdot r) d^3r \quad (5)$$

Μια επιπλέον παραδοχή είναι ότι  $k_s R \ll \omega_i t$ . Ο παράγοντας  $q \cdot r$  είναι η σχετική μετατόπιση φάσης που υπέστησαν η προσπίπτουσα και η σκεδαζόμενη ακτινοβολία από το φως που σκεδάστηκε από το στοιχειώδη όγκο σε θέση  $r$ . Ο μετασχηματισμός Fourier για τη μεταβολή  $\delta\epsilon(r,t)$  είναι :

$$\delta\epsilon(q,t) = \int_V \delta\epsilon(r,t) \exp(iq \cdot r) d^3r \quad (6)$$

Εισάγοντας την (6) στην (5) έχουμε τελικά :

$$E_s(q,t) = -\frac{k_s^2 E_0}{4\pi\epsilon_r R} \exp(-i\omega_i t) \delta\epsilon(q,t) \quad (7)$$

Όταν μελετάμε διάλυμα που περιέχει μόρια διαλύτη και διαλυμένης ουσίας, αυτό που μας ενδιαφέρει είναι η περίσσεια της σκέδασης από τη διαλυμένη ουσία. Η μέση (στο φάσμα του χρόνου) τιμή για την περίσσεια της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός, που προκύπτει από  $N$  ιδανικούς στοιχειώδεις όγκους, συμβολίζεται με  $\langle I_s \rangle = \langle E_s^*(\mathbf{R}, 0) E_s(\mathbf{R}, 0) \rangle$  και μπορεί να εκφραστεί και έτσι

$$I_s = \frac{\pi^2 V^2 I_0}{\lambda_s^4 R^2 N} \langle (\delta\epsilon)^2 \rangle \quad (8)$$

$\langle (\delta\epsilon)^2 \rangle$  είναι η μέση (χρονικά) τιμή του τετραγώνου της διακύμανσης της περισσειας της διηλεκτρικής σταθεράς για έναν στοιχειώδη όγκο  $d^3r = V / N$ .  $I_0 = E_0^2$ . Η ένταση της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας λοιπόν είναι ευθέως ανάλογη προς το τετράγωνο του όγκου σκέδασης, ευθέως ανάλογη προς το τετράγωνο του προσπίπτοντος ηλεκτρικού πεδίου και αντιστρόφως ανάλογη προς την τέταρτη δύναμη του μήκους κύματος (δηλαδή ανάλογη προς τη συχνότητα) και αντιστρόφως ανάλογη προς το τετράγωνο της απόστασης δείγματος – ανιχνευτή. Ο στοιχειώδης όγκος θεωρείται μια «σημειακή» πηγή χωρίς εσωτερικές παρεμβολές, δηλαδή διαστάσεις μικρές σε σχέση με το μήκος κύματος. Μετρώντας αυτήν τη μέση περίσσεια σκεδαζόμενης έντασης, σημαντικές παράμετροι όπως το μοριακό βάρος ή οι μοριακές αλληλεπιδράσεις μπορούν να προσδιοριστούν. Αυτή η μέθοδος σκέδασης Rayleigh ονομάζεται επίσης και **ΣΤΑΤΙΚΗ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ** (Static Light Scattering : SLS). Πειραματικά είναι δύσκολο να μετρηθούν απόλυτες τιμές έντασης. Για αυτόν το λόγο οι ερευνητές χρησιμοποιούν συχνά σχετικές εντάσεις που ορίζουν το πηλίκο (λόγο) Rayleigh

$$R_\theta = \frac{I_s}{I_0 V} R^2 \quad (9)$$

$R$  είναι η απόσταση παρατηρητή – σκεδαστή σε γωνία  $\theta$  και  $V$  ο ολικός όγκος σκέδασης. Ιδανικό θεωρείται ένα διάλυμα χωρίς διαμοριακές αλληλεπιδράσεις με σημειακούς στοιχειώδεις όγκους σκέδασης. Σε αυτήν την περίπτωση οι σημειακοί σκεδαστές ονομάζονται μονο-διασπορείς.

Σε ένα πείραμα σκέδασης φωτός για να μελετηθούν οι ενδογενείς ιδιότητες ενός σωματιδίου (π.χ. μια πρωτεΐνη ή ένα πολυμερές) οι ερευνητές στηρίζονται σε κάποιες παραδοχές [2] : Α) **Ανεξάρτητη σκέδαση** δηλαδή τα σωματίδια είναι αρκετά απομακρυσμένα το ένα σε σχέση με το άλλο και αυτό μας επιτρέπει να μελετήσουμε μεμονωμένα ένα σωματίδιο χωρίς να αναφερθούμε στους γειτονικούς σκεδαστές . Η συνολική σκεδαζόμενη ένταση από τη συλλογή όλων των σωματιδίων μπορεί επομένως να γραφτεί ως το άθροισμα των εντάσεων σκέδασης από όλα τα σωματίδια. Στην πράξη μια διασωματιδιακή απόσταση περίπου τριπλάσια της ακτίνας του σωματιδίου είναι ικανή συνθήκη για ανεξαρτησία των σωματιδίων . Β) **Απλή σκέδαση** δηλαδή αγνοούμε το φαινόμενο της πολλαπλής σκέδασης . Όλα τα σωματίδια εκτίθενται στην ίδια προσπίπτουσα ένταση και στην περιοχή κάθε σωματιδίου η συνολική σκεδαζόμενη ένταση από όλα τα υπάρχοντα σωματίδια είναι μικρή εν συγκρίσει με την αρχική προσπίπτουσα ένταση . Γ) **Χαμηλή Απορρόφηση και ασθενής ανελαστική σκέδαση** . Αφού η απορρόφηση είναι κυρίως θερμική μεταγωγή προσπίπτουσας ηλεκτρομαγνητικής ενέργειας (η οποία μετατρέπεται σε θερμότητα) πρέπει να εξασφαλίσουμε ότι είναι αμελητέα . Παρόμοια επιχειρήματα ισχύουν και για το φθορισμό , καθώς η περισσότερη ενέργεια παρά το ότι επανεκπέμπεται , μετατοπίζεται σε συχνότητα που απέχει πολύ από την αρχική προσπίπτουσα συχνότητα . Αυτό το κομμάτι της σκεδαζόμενης ακτινοβολίας απορρίπτεται με τη χρήση ενός ειδικού «φίλτρου» .

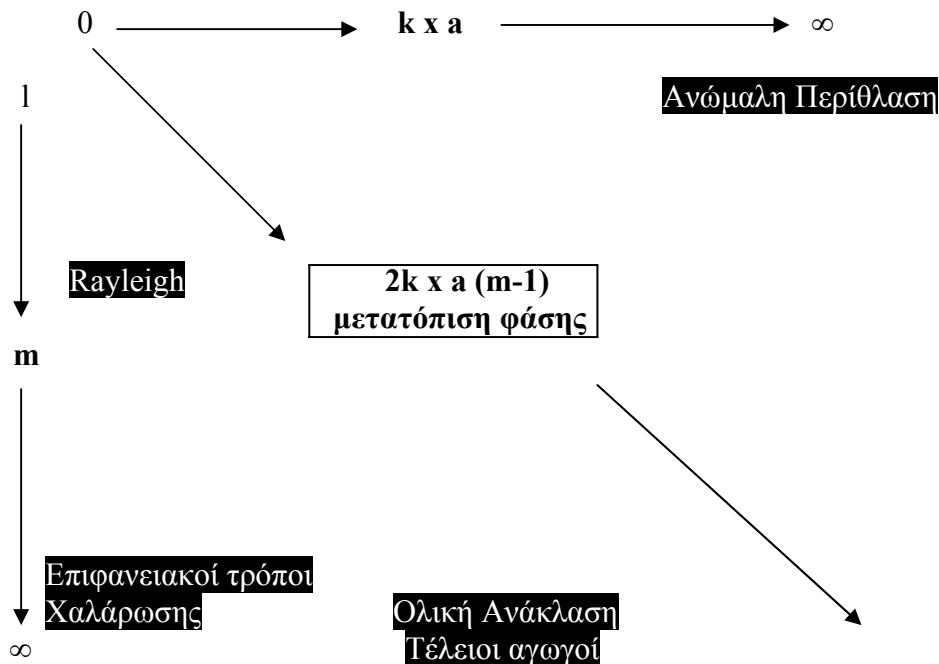
Ο Rayleigh διατύπωσε μια εξίσωση για σκέδαση σωματιδίων αρκετά μικρών σε σχέση με το μήκος κύματος έτσι ώστε τα χαρακτηριστικά τους να προσεγγίζονται από τα χαρακτηριστικά ενός ηλεκτρικού διπόλου . Η σκεδαζόμενη ένταση (για προσπίπτον κάθετα πολωμένο φως) μπορεί να γραφτεί ως εξής

$$I_{scattered} = \frac{4\pi^2 N a^6}{\lambda^4 R^2} * \left| \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \right|^2 * I_i \quad (10)$$

Η (10) μοιάζει πολύ με την (8) . Οι διαφορές είναι ότι το  $a$  συμβολίζει την ακτίνα του σωματιδίου σκέδασης (αν θεωρήσουμε ότι είναι *σφαιρικό*) και  $m$  είναι ο σύνθετος σχετικός δείκτης διάθλασης που ορίζεται έτσι

$$m = \frac{n' + in''_{(\Sigma\Omega\text{ΜΑΤΙΔΙΟ})}}{n' + in''_{(\Delta\text{ΙΑΛΥΤΗΣ})}} \quad (11)$$

$n'$  είναι μέτρο για την απορρόφηση του διαλύματος και  $i$  σταθερά αναλογίας . Για μικρή απορρόφηση το  $m$  ανάγεται στον σχετικό δείκτη διάθλασης ( $n_{(\Sigma\Omega\text{Μ})} / n_{(\Delta\text{ΙΑΛ})}$ ) . Η εξίσωση (10) εξήχθη από την ακριβή λύση του κυματανύσματος για σφαιρικό σωματίδιο αυθαίρετου μεγέθους και δείκτη διάθλασης , σαν μια ασυμπτωτική έκφραση για πολύ μικρά σωματίδια με χαμηλό σχετικό δείκτη διάθλασης . Η διαδικασία υπολογισμού για τη σφαιρική αρμονική είναι δύσκολη ακόμα και όταν το σωματίδιο έχει μικρό σχετικό δ.δ. και μέγεθος . Για αυτό το λόγο οι υπολογισμοί αυτοί ήταν ελάχιστοι έως τα μέσα της δεκαετίας του 1970 . Σήμερα έχουμε την ακριβή λύση για σκέδαση (και απορρόφηση) για μεγάλα ελλειψοειδή και κυλίνδρους με αυθαίρετους δείκτες διάθλασης και τα μαθηματικά μπορούν να επεκταθούν και σε άλλους τύπους σωματιδίων . Έτσι μπορούν να μελετηθούν φαινόμενα σκέδασης για μόρια κάθε μεγέθους , σχήματος και δ.δ. Για να το κάνουμε αυτό συστηματικά ας σχεδιάσουμε ένα επίπεδο στο οποίο ο ένας άξονας ορίζεται από το σύνθετο σχετικό δ.δ. ( $m$ ) και ο άλλος άξονας ορίζεται από μια παράμετρο μεγέθους που είναι το γινόμενο κυματάρηθος  $X$  ακτίνα μορίου .  $k \times a = \frac{2\pi a}{\lambda}$



Σχήμα 3 : Επίπεδο  $k \times a$  Vs  $m$

Για μια σφαίρα  $k \times a$  είναι ο λόγος της περιφέρειας της σφαίρας προς το μήκος κύματος στο μέσο διάδοσης. Για μη σφαιρικά σωματίδια το  $a$  είναι ο μεγάλος ημιάξονας (π.χ. σε μια έλλειψη). Το μέγεθος  $m$  μερικές φορές παίρνει και τιμές μικρότερες του 1 (φυσαλλίδες αέρα στο νερό) αλλά εδώ θα περιοριστούμε σε τιμές  $m$  στην περιοχή  $1 \leq m \leq \infty$ . Η μετατόπιση φάσης  $2k \times a (m-1)$  μας βοηθά στο να αναγνωρίσουμε τις περιοχές μέσα στο επίπεδο στις οποίες ισχύουν οι διάφορες θεωρίες (π.χ. Rayleigh ή Lorenz – Mie) και τα διάφορα οπτικά φαινόμενα (σκέδαση απορρόφηση κτλ.). Η θεωρία των Lorenz – Mie καλύπτει όλο το διάγραμμα και κάνει λόγο για επίλυση εξισώσεων Maxwell που θα εφαρμόζονται τόσο στο εξωτερικό όσο και στο εσωτερικό του μορίου και θα ικανοποιούν τις οριακές συνθήκες για την οπτική ασυνέχεια στην άκρη του σωματιδίου. Δηλαδή το ηλεκτρικό πεδίο δε μπορεί να θεωρείται τελείως ομογενές καθ' όλη την έκταση του αντικειμένου. Δυστυχώς η θεωρία LM αποκλίνει στην πράξη από μη σφαιρικά μόρια αν και περιγράφει επαρκώς σφαιρικά μόρια που δείχνουν σημαντική απόκλιση από τη θεωρία του Rayleigh. Μπορούμε με τη βοήθεια των τριών παραμέτρων  $k \times a$ ,  $m$  και  $2k \times a (m-1)$  να έχουμε μια ξεκάθαρη φυσική ερμηνεία της αλληλεπίδρασης του φωτός σε περιοχές του διαγράμματος όπου 2 τουλάχιστον από τις παραμέτρους είναι πολύ μεγάλες ή πολύ μικρές. Τα αποτελέσματα συνοψίζονται στον παρακάτω πίνακα

ΘΕΩΡΙΑ	ΜΕΓΕΘΟΣ	ΔΕΙΚΤΗΣ ΔΙΑΘΛΑΣΗΣ	ΜΕΤΑΤΟΠΙΣΗ ΦΑΣΗΣ
Ολική Ανάκλαση	$a$	$ m-1  \gg 1$	$2k \times a (m-1) \gg 1$
Ανώμαλη Περίθλαση	$k \times a \gg 1$	$ m-1  \ll 1$	$a$
Επιφανειακή Χαλάρωση	$k \times a \ll 1$	$ m-1  \gg 1$	$a$
Rayleigh	$k \times a \ll 1$	$a$	$2k \times a (m-1) \ll 1$

**Πίνακας 1 :** Οπτικά φαινόμενα συναρτήσει των διαστάσεων και του σύνθετου δείκτη διάθλασης

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙ) ΣΥΣΧΕΤΙΣΗ ΦΩΤΟΝΙΩΝ (CORRELATION)**

Στα πρώτα πειράματα σκέδασης φωτός ο αναλυτής είχε μόνο ένα «κανάλι» για το εισερχόμενο κύμα και το φάσμα χρειαζόταν μια ώρα για να παραχθεί . Με τη βοήθεια της διαρκώς αναπτυσσόμενης τεχνολογίας κατασκευάστηκαν δυο πολύ χρήσιμα εργαλεία , ικανά να παράγουν φάσμα σκεδαζόμενου φωτός σε χρόνο τόσο σύντομο όσο μερικά δευτερόλεπτα . Είναι ο φασματικός αναλυτής «αληθινού χρόνου» και ο συσχετιστής (correlator) . Ο αναλυτής φάσματος [3] χρησιμοποιεί ψηφιακές τεχνικές για να φτιάξει το φάσμα ενός αναλόγου για ένα εισερχόμενο σήμα . Σε ένα τυπικό πείραμα το εισερχόμενο σήμα θα ψηφιοποιηθεί σε 512 διαδοχικά , ισόποσα κατανεμημένα χρονικά σημεία . Κατά τη λήψη της δεύτερης σειράς 512 δειγμάτων , λαμβάνονται 256 συνιστώσες Fourier από την πρώτη συλλογή δεδομένων και παρουσιάζεται ένα φάσμα 200 σημείων . Τα αποτελέσματα από έναν αριθμό δειγματοληπιών προστίθενται για να δώσουν ένα ομαλό φάσμα . Εάν το όργανο είναι σε θέση να κάνει το μετασχηματισμό Fourier σε χρόνο λιγότερο από αυτόν που απαιτείται για να λάβει τη δεύτερη σειρά 512 σημείων , τότε το όργανο δουλεύει σε «αληθινό χρόνο» και δε χάνονται πληροφορίες . Η μέγιστη συχνότητα στην οποία επιτυγχάνεται η λειτουργία αληθινού χρόνου είναι συνήθως στην περιοχή 1 έως 5 kHz . Ο φασματικός αναλυτής είναι χρήσιμο εργαλείο για παράδειγμα σε ηλεκτροφορητικά πειράματα Light Scattering αφού το γεγονός ότι το φάσμα λαμβάνεται απευθείας μας βοηθά στο να ερμηνεύσουμε τα δεδομένα από κάθε διαφορετικό είδος χημικής ουσίας . Κάθε συνιστώσα που έχει διαφορετική ηλεκτροφορητική κινητικότητα έχει ως αποτέλεσμα και μια διακριτή κεντρική κορυφή .

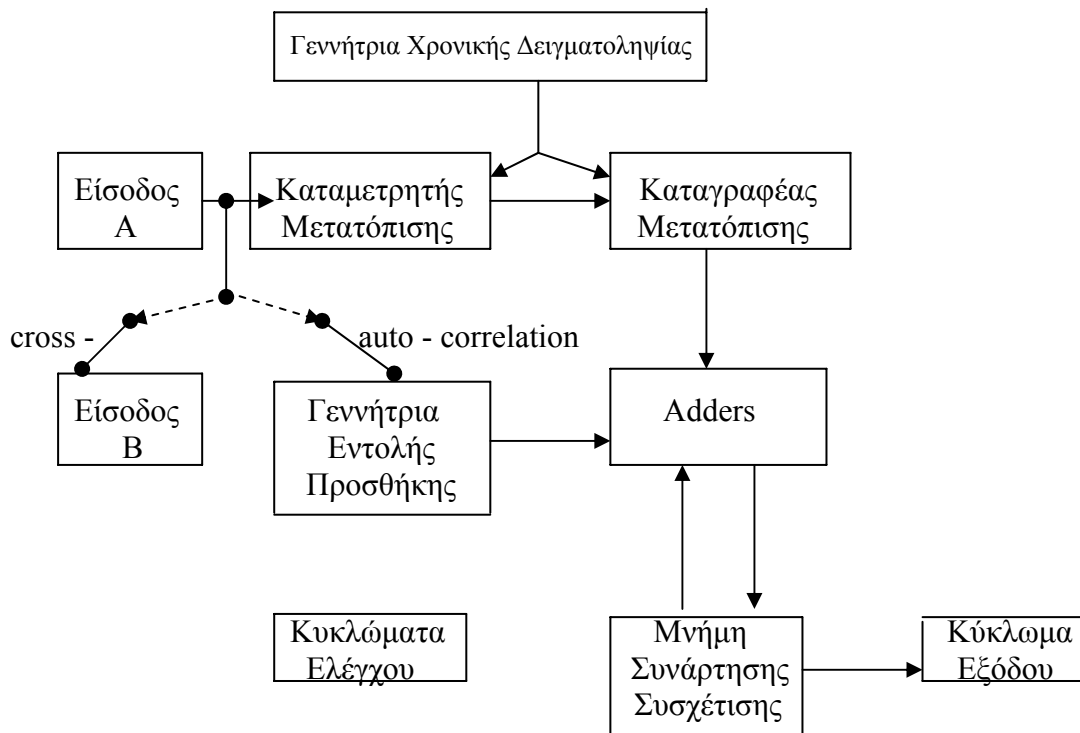
Οι correlators είναι όργανα ικανά να εξάγουν πληροφορίες για τη συνάρτηση συσχέτισης ενός ηλεκτρικού σήματος . Μαθηματικά μια συνάρτηση συσχέτισης ορίζεται ως εξής

$$G(\tau) = \lim_{T \rightarrow \infty} \frac{1}{2T} \int_{-T}^T I(t)J(t + \tau)dt \quad (12)$$

$I(t)$  και  $J(t + \tau)$  είναι σήματα που εξαρτώνται από το χρόνο . Η  $G(\tau)$  αποκαλείται συνάρτηση αυτοσυσχέτισης ή συνάρτηση διασταυρωτής συσχέτισης (cross



correlation) ανάλογα με το αν τα  $I(t)$  και  $J(t)$  είναι τα ίδια ή διαφορετικά σήματα . Υπάρχουν correlators οι οποίοι δέχονται ανάλογα εισερχόμενων σημάτων και άλλοι οι οποίοι είναι σχεδιασμένοι να δέχονται αλληλουχίες παλμών παρόμοιους με τα εξερχόμενα δεδομένα ενός μονοφωτονικού ανιχνευτή . Στο παρακάτω σχεδιάγραμμα απεικονίζεται ένας ψηφιακός ανιχνευτής . Ο συγχρονισμός και η λειτουργία του ελέγχονται από τη Γεννήτρια Χρονικής Δειγματοληψίας , η οποία χωρίζει το χρόνο σε διαστήματα ίσης διάρκειας  $\Delta t$  .



**Σχήμα 4 :** Σχηματική αναπαράσταση ενός correlator . Οι αρχές λειτουργίας του βρίσκονται στο κείμενο .

Ο αριθμός των παλμών στην είσοδο Α που συμβαίνουν σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας μετρώνται από τον Καταμετρητή Μετατόπισης . Στο παραπάνω σχήμα η διαδικασία απεικονίζεται πιο λεπτομερώς . Στο τέλος κάθε χρόνου δειγματοληψίας ο αριθμός στον Καταμετρητή μπαίνει στο πρώτο στάδιο του Καταγραφέα , ο αριθμός που βρισκόταν στο πρώτο στάδιο εισέρχεται στο δεύτερο , ο αριθμός που βρισκόταν στο δεύτερο εισέρχεται στο τρίτο κ.ο.κ. , συνεπώς αφού ο correlator έχει λειτουργήσει για ένα σύντομο χρονικό διάστημα , το πρώτο στάδιο περιέχει  $I(t - \Delta t)$  , το δεύτερο περιέχει  $I(t - 2\Delta t)$  , το τρίτο  $I(t - 3\Delta t)$  και το στάδιο  $k$  περιέχει  $I(t - k\Delta t)$  . Κατά τον τρέχοντα χρόνο δειγματοληψίας , κάθε παλμός που

εμφανίζεται στην είσοδο A (όταν έχουμε λειτουργία αυτό-συσχέτισης) ή στην είσοδο B (όταν έχουμε λειτουργία διασταυρωτής συσχέτισης) , επεξεργάζεται από τη Γεννήτρια Εντολής Προσθήκης η οποία κατευθύνει τους Adders να προσθέτουν κάθε έναν από τους αποθηκευμένους αριθμούς του Καταμετρητή στον αριθμό που είναι αποθηκευμένος σε κάθε σχετικό κανάλι της Μνήμης Συνάρτησης Μετατόπισης . Για παράδειγμα ας λάβουμε τον παλμό στο σχήμα 5 . Κατά το δεύτερο χρόνο δειγματοληψίας το γινόμενο  $n_2n_3 = 0$  προστίθεται στο κανάλι 1 της Μνήμης , το γινόμενο  $n_2n_4 = 6$  προστίθεται στο κανάλι 2 , το γινόμενο  $n_2n_5 = 0$  προστίθεται στο κανάλι 3 κ.ο.κ. Έτσι ο correlator θα συσσωρεύσει στο πρώτο κανάλι

$$G(\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_1 + n_1\tilde{n}_2 + n_2\tilde{n}_3 + \dots = \sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+1} \quad (13)$$

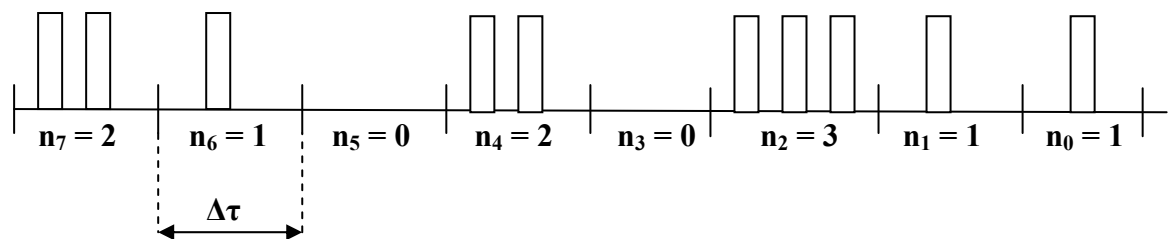
Στο δεύτερο κανάλι ο correlator θα συσσωρεύσει

$$G(2\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_2 + n_1\tilde{n}_3 + n_2\tilde{n}_4 + \dots = \sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+2} \quad (14)$$

και στο κανάλι k

$$G(k\Delta\tau) = n_0\tilde{n}_k + n_1\tilde{n}_{k+1} + n_2\tilde{n}_{k+2} + \dots = \sum_{i=0}^{N-1} n_i\tilde{n}_{i+k} \quad (15)$$

Αυτή είναι μια καλή προσέγγιση για την αληθινή συνάρτηση συσχέτισης όποτε η αλλαγή στην τιμή της συνάρτησης συσχέτισης κατά το χρονικό διάστημα  $\Delta\tau$  είναι μικρή . Σε κάθε μια από αυτές τις εκφράσεις τα  $n_i$  αντιπροσωπεύουν πόσες φορές το περιεχόμενο του κάθε σταδίου από τον Καταγραφέα προστίθεται στο αντίστοιχο κανάλι της συνάρτησης συσχέτισης της Μνήμης και οι παράγοντες  $\tilde{n}_{i+k}$  είναι οι αποθηκευμένοι αριθμοί στον Καταγραφέα .



**Σχήμα 5 :** Η αλληλουχία παλμών που επεξεργάζεται ένας correlator . Τα  $\Delta\tau$  τα οποία είναι τα διαστήματα χρόνου δειγματοληψίας είναι όλα ίσα .

Τα χαρακτηριστικά ενός correlator που είναι σημαντικά για ένα πείραμα σκέδασης φωτός είναι η αποδοτικότητα της λειτουργίας , η χωρητικότητα του Καταμετρητή και επομένως του Καταγραφέα , το εύρος των διαθέσιμων χρόνων δειγματοληψίας και ο αριθμός των καναλιών . Η επάρκεια με την οποία ένας correlator βρίσκει τα αθροίσματα όπως αυτά στις εξισώσεις (13) – (15) εξαρτάται πολύ από τη δομή του οργάνου . Η διάταξη που φαίνεται στο σχήμα 4 διαθέτει ένα ξεχωριστό adder και ξεχωριστό multibit μετρητή για κάθε κανάλι . Αυτό δεν είναι τόσο πολύπλοκο και δαπανηρό όσο ακούγεται γιατί ο κάθε adder πρέπει να χειριστεί μόνο 4 bit με ένα άθροισμα 4-bit (προϋποθέτοντας ότι ο καταγραφέας έχει χωρητικότητα 4 – bit) . Οι multibit καταμετρητές δεν είναι ιδιαίτερα δαπανηροί . Αν ένας adder μπορεί να υπολογίζει ένα άθροισμα κάθε  $10^{-7}$  sec , η ταχύτητα εξαγωγής αθροισμάτων σε έναν correlator με 64 κανάλια (συνηθισμένος αριθμός) είναι  $64 \times 10^7$  αθροίσματα / sec . ***Ένα όργανο μπορεί υπό αυτές τις συνθήκες να λειτουργεί με σχεδόν 100 % απόδοση σε χρόνους δειγματοληψίας 100 nsec ή και μεγαλύτερους .***

Μια εναλλακτική προσέγγιση που χρησιμοποιείται συχνά σε όργανα τα οποία προορίζονται για ανάλογα εισερχόμενων σημάτων , είναι η χρήση μιας απλής αριθμητικής μονάδας και μνήμη μακράς κλίμακας . Για κάθε κύκλο νεοεισερχόμενων δεδομένων (έχοντας πάλι 64 κανάλια) αυτό απαιτεί 64 αναγνώσεις μνήμης , 64 πολλαπλασιασμούς και προσθέσεις και 64 καταγραφές μνήμης . Αυτό μπορεί να γίνει με πλήρη απόδοση μόνο αν ο χρόνος δειγματοληψίας είναι μεγάλος ( $10^{-3}$  sec και πάνω) . Για μικρότερους χρόνους δειγματοληψίας τα όργανα δουλεύουν με περιορισμένη απόδοση καθώς μόνο ένα κλάσμα από τους όρους της εξίσωσης (15) συμπεριλαμβάνονται . Ως αποτέλεσμα υπάρχει σημαντική απώλεια δεδομένων . Σε χρόνους μάλιστα της τάξεως των  $10^{-7}$  sec , η απόδοση συχνά είναι μικρότερη του 1%. Αυτή η μειωμένη απόδοση είναι ιδιαίτερα σοβαρή όταν πειράματα σκέδασης φωτός πραγματοποιούνται σε χαμηλά επίπεδα φωτός . Υπό άριστες συνθήκες η διάρκεια μιας μέτρησης μπορεί να αυξηθεί από ένα λεπτό σε πάνω από μια ώρα . Πολλές φορές η μεγάλη χρονική διάρκεια κάνει το πείραμα αδύνατον γιατί το δείγμα υφίσταται αλλαγές στην περίοδο μιας ώρας .

Η χωρητικότητα του Καταγραφέα μετράται με τον αριθμό των bits πληροφορίας που χρησιμοποιούνται για να αναπαραστήσουν την ένταση σε κάθε χρόνο δειγματοληψίας . Οι κοινοί correlators που χρησιμοποιούνται σε φασματογράφους διακυμάνσεων διαθέτουν συνήθως 1 ή 4 bits . Ο correlator του 1 bit

(ή clip correlator = διακεκομμένος συσχετιστής) εισάγει 0 στον Καταγραφέα εάν ο αριθμός των φωτονίων που ανιχνεύεται σε ένα διάστημα δειγματοληψίας είναι λιγότερος ή ίσος με έναν προκαθορισμένο αριθμό (clipping level = επίπεδο περικοπής) και εισάγει 1 εάν ο αριθμός φωτονίων ξεπερνά το clipping level . Παρά το ότι φαινομενικά η συνάρτηση που υπολογίζει το όργανο έχει μικρή ομοιότητα με την αληθινή συνάρτηση συσχέτισης , μπορεί να αποδειχθεί ότι η περικομμένη συνάρτηση είναι *ανάλογη* προς την αληθινή συνάρτηση . Πιο συγκεκριμένα , η περικομμένη συνάρτηση τηρεί αυτήν την αναλογία εάν το σήμα υπακούει τυχαία Γκαουσιανή κατανομή . Αυτή η συνθήκη ικανοποιείται όταν το σήμα προέρχεται από μεγάλο αριθμό ανεξάρτητων σκεδαστών και είναι ανεξάρτητο από τη μορφή της συνάρτησης συσχέτισης . Ωστόσο αν το δείγμα περιέχει μικρό αριθμό σκεδαστών ή αν οι σκεδαστές είναι συζευγμένοι , η περικομμένη συνάρτηση αλλοιώνεται .

Correlators με καταγραφείς 4-bit εξάγουν μια ακριβή μορφή συνάρτησης συσχέτισης για ευρύτερη περιοχή σημάτων εισόδου , αλλά γίνεται αντιληπτό ότι ορισμένες τάξεις σημάτων εισόδου ενδεχομένως θα ξεπεράσουν το λειτουργικό εύρος του οργάνου . Για παράδειγμα ένα σήμα με δυο (ή περισσότερες) αισθητά διαφορετικές εντάσεις , με μικρές αλλά σημαντικές διακυμάνσεις το καθένα , θα δώσουν εσφαλμένα αποτελέσματα . Οι correlators με 4-bit είναι πιο εύχρηστοι γιατί έχουν πιο εύκολα ρυθμιζόμενο clipping level . Μερικές φορές η παρουσία clipping level είναι αχρείαστη . Οι χρόνοι δειγματοληψίας για κάθε πρακτική εφαρμογή δεν έχουν ανώτατο όριο (μπορούν να πάρουν οποιαδήποτε τιμή) . Ωστόσο ο ελάχιστος χρόνος δειγματοληψίας είναι σημαντικός παράγοντας . Για τα κοινά πειράματα της φασματοσκοπίας διακυμάνσεων ένας ελάχιστος χρόνος 100 nsec είναι ικανοποιητικός και τα όργανα με αυτήν την ταχύτητα είναι διαθέσιμα με μέτριο κόστος . Αρκετοί correlators με χρόνους 20 nsec ή και γρηγορότεροι κοστίζουν πολύ περισσότερο . Ο αριθμός των απαιτούμενων καναλιών εξαρτάται από τη φύση της υπό μελέτη συνάρτησης συσχέτισης . Αν αυτή η συνάρτηση αποτελείται από μια απλή εκθετική καμπύλη ή από μια στενή κατανομή από εκθετικές καμπύλες , ένα όργανο με 64 κανάλια αρκεί για να δώσει λεπτομερώς όλες τις πληροφορίες . Αν όμως υπάρχει ένα ευρύ φάσμα από εκθετικές χρονικές σταθερές (με αναλογία μέγιστης και ελάχιστης χρονικής σταθεράς παραπάνω από 5) ή αν υπάρχει μια παλινδρομική συνάρτηση συσχέτισης , τότε απαιτούνται περισσότερα κανάλια . Σε κάθε περίπτωση ο correlator πρέπει να έχει αρκετά κανάλια που να μπορούν να καθυστερούν κατά μια επαρκή ποσότητα ώστε να κατοχυρώνουν ένα baseline .

Η θεώρηση του λόγου Σήμα προς Θόρυβο (S / N) είναι αρκετά πολύπλοκη καθώς το φαινόμενο επηρεάζεται από πολλούς παράγοντες . Κάποιοι από αυτούς όπως η σκόνη μπορούν να αντιμετωπιστούν μόνο με γενικούς όρους , ενώ άλλοι όπως θόρυβος από ανεπιθύμητη σκέδαση (π.χ φυσαλλίδες αέρα ή προσμείξεις στο διάλυμα) επιδέχονται μια ακριβή θεωρητική περιγραφή . Οι ερευνητές αναγνωρίζουν κυρίως 3 πηγές θορύβου που περιορίζουν την ακρίβεια των μετρήσεων . Υπάρχουν επιδράσεις εξαιτίας της πεπερασμένης έντασης του φωτός , επιδράσεις από τον πεπερασμένο χρόνο του πειράματος και συνεισφορά ανεπιθύμητης σκέδασης π.χ. από σκόνη . Η πιο σημαντική κατηγορία και που θα αναλυθεί εδώ είναι η τρίτη . Φαινόμενα όπως 1) Διακυμάνσεις στην ένταση του laser 2) Ανεπιθύμητο φως του laser εξαιτίας ανακλάσεων ή εκλάμπεις που δεν είναι σκέδαση αλλά τοπικός ταλαντωτής 3) Θερμικές μεταγωγές 4) Σκόνη , φυσαλλίδες αέρα , κομμάτια γυαλιού από τα τοιχώματα , βακτήρια , ξένες ουσίες 5) Σκέδαση φωτός από μόρια του διαλύτη δημιουργούν σημαντικό θόρυβο . Η κύρια δυσκολία είναι ότι οι μετρήσεις είναι επαναλήψιμες από πείραμα σε πείραμα αλλά δίνουν λάθος αποτελέσματα . Το φαινόμενο 2 για παράδειγμα συμβαίνει όταν μικρό ποσοστό του φωτός (σε σχέση με το πραγματικά σκεδαζόμενο) ΔΕΝ σκεδαάζεται και δρα σαν τοπικός ταλαντωτής . Η συνάρτηση συσχέτισης θα περιέχει δυο εκθετικά μέρη , το ένα με χρόνο αποδιέγερσης  $2Dq^2$  (D ο συντελεστής διάχυσης και q το κυματόνισμα) και το άλλο με χρόνο εξασθένησης  $Dq^2$  ανάλογο σε πλάτος εντάσεως με την ένταση φωτός από τον τοπικό ταλαντωτή . Αν η προκύπτουσα συνάρτηση συσχέτισης προσαρμοστεί σε μια απλή εκθετική , ο υπολογισθείς χρόνος εξασθένησης θα διαφέρει από το σωστό αποτέλεσμα σύμφωνα με την ακόλουθη σχέση

$$\frac{\Delta t_{decay}}{t_{decay}} = -\frac{16 I_{\text{ΤΟΠ.ΤΑΛΛΑΝ}}}{9 I_{\text{ΣΚΕΔΑΣΗΣ}}} \quad (16)$$

Παρόμοιοι μαθηματικοί υπολογισμοί βοηθούν στην εξάλειψη και των υπόλοιπων ανεπιθύμητων φαινομένων . Τα μόρια του διαλύτη συνήθως δε δημιουργούν πρόβλημα καθώς η σκέδασή τους έχει πολύ ευρύ φάσμα . Ωστόσο όταν τα μόρια του διαλύτη είναι πολύ ογκώδη , για παράδειγμα όταν γλυκόζη προστίθεται σε κάποιο διάλυμα για να μεταβάλλει το ιξώδες , τα συστηματικά σφάλματα είναι μεγάλα . Τότε μελετώνται οι συναρτήσεις συσχέτισης για το σκέτο διαλύτη . Οι συναρτήσεις αυτές

πρέπει να είναι επίπεδες στους χρόνους δειγματοληψίας που θα γίνει το πείραμα για το πραγματικό διάλυμα . Εάν δεν είναι επίπεδες , τότε το υπόβαθρο του διαλύτη αφαιρείται με προσεκτικές διαδικασίες προσαρμογής καμπύλης (fit) . Για τον καθαρισμό ενός δείγματος υπάρχουν τρεις μέθοδοι αν αυτό έχει ήδη παρασκευαστεί , η απόσταξη , η διήθηση και η φυγοκέντρωση . Σχετικά με την παρουσία συσσωματωμάτων και μεγάλων σωματιδίων σκόνης συνήθως ο correlator απαγορεύει την είσοδο σε σήματα πολύ μεγάλης έντασης . Υπάρχει ωστόσο δυσκολία στην επιλογή της σκεδαζόμενης έντασης που λειτουργεί ως ανώτατο όριο οπότε αυτή η μέθοδος πρέπει να εφαρμόζεται με ιδιαίτερη προσοχή και μόνο μετά από εκτεταμένη μελέτη και κατανόηση των πιθανών συνεπειών εκ μέρους του ερευνητή .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ ΙΙΙ) ΠΡΑΚΤΙΚΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ LIGHT SCATTERING**

### **ΜΕΡΟΣ 1<sup>ON</sup> : ΠΟΛΥΜΕΡΗ**

#### **ΙΙΙ) 1.α ΧΗΜΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ**

Είναι γνωστό ότι η συσχέτιση στις διακυμάνσεις (fluctuations) της συγκέντρωσης σε πολυμερικά διαλύματα μέτριας συγκέντρωσης φθίνει με το χρόνο με δυο μηχανισμούς . Ο πρώτος είναι αμοιβαία διάχυση του πολυμερούς και του διαλύτη λόγω βαθμίδωσης των χημικών τους δυναμικών και ο δεύτερος ιξωδοελαστική «χαλάρωση» των πολυμερικών αλυσίδων εξαιτίας της πίεσης που παράγεται από διαταραχές στις κατανομές ισορροπίας τους [4] . Διάλυμα μέτριας συγκέντρωσης πολυστυρένιου σε βενζόλιο στους 25.0 °C , σε κυκλοεξάνιο στους 34.5 °C και σε diethyl malonate στους 35.0 °C παρουσιάζουν διαφορετική συμπεριφορά στις ιξωδοελαστικές τους ιδιότητες . Για να προσδιοριστεί το μοριακό βάρος του πολυμερούς έγιναν πειράματα Στατικής και Δυναμικής Σκέδασης Φωτός . Ο συντελεστής διάχυσης  $D$  και ο συντελεστής τριβής  $\zeta$  σχετίζονται μεταξύ τους στην παρακάτω εξίσωση .

$$D = \frac{(1 - \nu c)^2}{\zeta} \left( \frac{\partial \pi}{\partial c} \right)_{T,P} \quad (17)$$

$\nu$  είναι ο μερικός ειδικός όγκος της διαλυμένης ουσίας ,  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία ,  $P$  η πίεση ,  $c$  η συγκέντρωση και  $\pi$  η οσμωτική πίεση . Η μεταβολή της οσμωτικής πίεσης σε σχέση με τη θερμοκρασία υπολογίζεται από την κάτωθι πολύ σημαντική σχέση :

$$\left( \frac{\partial \pi}{\partial c} \right)_{T,P} = RT(M_w^{-1} + 2A_2c + 3A_3c^2) \quad (18)$$

Η  $R$  είναι η σταθερά των αερίων .  $A_2$  και  $A_3$  είναι αντίστοιχα ο δεύτερος και ο τρίτος συντελεστής virial . **Ο  $A_2$  είναι ζωτικής σημασίας γιατί είναι μέτρο για τις διαμοριακές αλληλεπιδράσεις στο διάλυμα και αποτελεί κριτήριο ιδανικότητας .** Τα διαγράμματα συσχέτισης συναρτήσεως του  $\log(t)$  και για τα 3 διαλύματα είχαν δυο περιοχές , οι οποίες αντιστοιχούν στο γρήγορο και στον αργό τρόπο χαλάρωσης . Το βενζόλιο θεωρείται καλός διαλύτης για το πολυστυρένιο ενώ το κυκλοεξάνιο (CH)

και το diethyl malonate (DM) ονομάζονται διαλύτες Θ (κακοί διαλύτες στους οποίους δεν υπάρχει αλληλεπίδραση διαλύτη – ουσίας και τα πολυμερικά μόρια συνήθως συσπειρώνονται γιατί έχουν μεγαλύτερη συγγένεια με τον εαυτό τους) . Για τους δυο διαλύτες Θ (CH & DM) η συνεισφορά των αργών περιοχών στη συνάρτηση συσχέτισης είναι μεγάλες . Αντιθέτως ο καλός διαλύτης (Bz) έχει πολύ μικρή ένταση στην αργή περιοχή (η καμπύλη φθίνει απότομα) . Η ερμηνεία που δίνεται είναι ότι ο γρήγορος τρόπος χαλάρωσης οφείλεται σε αμοιβαία διάχυση μορίων πολυμερούς και διαλύτη και η έντασή του καθορίζεται σημαντικά από την ωσμωτική πίεση του διαλύματος η οποία αυξάνεται σημαντικά με την ποιότητα του διαλύτη (όπως το βενζόλιο) . Η αργή περιοχή αποδίδεται σε ιξωδοελαστική χαλάρωση των πολυμερικών αλυσίδων που έχουν σχηματίσει ένα εκτεταμένο δίκτυο όπου η μια εφάπτεται της άλλης . Λογαριθμικά διαγράμματα  $\log D$  έναντι  $\log c$  για τα 3 διαλύματα έδειξαν ότι στην περίπτωση του Bz ο συντελεστής διάχυσης αυξάνεται συναρτήσει της  $c$  με ευθεία κλίση αλλά για τους Θ διαλύτες οι αντίστοιχες καμπύλες είναι ελαφρώς κυρτές προς τα κάτω . Αντίστοιχα διαγράμματα  $\log \zeta$  έναντι  $\log c$  έδειξαν ότι και τα 3 διαλύματα έχουν περίπου την ίδια κλίση η οποία είναι μάλιστα ανεξάρτητη του μοριακού βάρους . Δηλαδή ενώ η διάχυση επηρεάζεται από την ποιότητα του διαλύτη , ο συντελεστής τριβής όχι . Ο λόγος που το  $D$  εξαρτάται από το διαλύτη είναι η εξάρτηση της βαθμίδωσης της ωσμωτικής πίεσης  $(\frac{\partial \pi}{\partial c})_{T,P}$ , που αποτελεί την κινητήριο δύναμη για την αμοιβαία διάχυση , από την ποιότητα του διαλύτη .

Ημιαραιό διάλυμα πολυστυρενίου σε βενζόλιο παρουσίασε επιπλέον τρόπους χαλάρωσης . Η ημιαραιή συγκέντρωση επιτυγχάνεται μόνο για πολυμερή μοριακού βάρους  $10^5 - 10^7$  και  $c = 5 \%$  ( $\text{gr}/\text{cm}^3$ ) . Μια αλυσίδα πολυμερούς σε ένα ημιαραιό διάλυμα στο οποίο υπάρχουν ενδεχομένως εφαπτόμενες αλυσίδες , παρουσιάζει μια αναλογία μεταξύ του χρόνου χαλάρωσης και της συγκέντρωσης . Συγκεκριμένα  $T_{\text{relaxation}} \sim N^3 c^{3/2}$  . Το  $N$  είναι ο δείκτης πολυμερισμού για το πολυμερές . Όταν  $c > c^*$  έχουμε ημιαραιά κατάσταση . Η κρίσιμη  $c^*$  είναι η συγκέντρωση επικάλυψης για την οποία δεχόμαστε το συνηθισμένο ορισμό .

$$c = \frac{M}{\frac{4}{3} \pi N_{\text{Avogadro}} R_g^3} \quad (19)$$



Μ το μοριακό βάρος του πολυμερούς και  $R_g$  η **ΓΥΡΟΣΚΟΠΙΚΗ ΑΚΤΙΝΑ** της αλυσίδας [5] . Ο  $T_{relaxation}$  είναι επίσης και ο χρόνος επαφής μεταξύ δυο αλυσίδων . Έχουν θεωρηθεί δυο περιοχές , η μια σε χαμηλές συχνότητες όπου  $\omega T_r \ll 1$  και το διάλυμα συμπεριφέρεται σαν υγρό με χαρακτηριστική ταχύτητα χαλάρωσης  $\Gamma = D_c q^2$  ,  $q$  το κυματόνισμα και  $D_c$  ο βοηθητικός συντελεστής διάχυσης . Σε αυτήν την «υδροδυναμική» περιοχή οι αλυσίδες χάνουν την επαφή τους κατά το χρόνο διάχυσης  $(D_c q^2)^{-1}$  . Στην περιοχή υψηλών συχνοτήτων  $\omega T_r \gg 1$  το διάλυμα συμπεριφέρεται σαν gel με χαρακτηριστικό χρόνο χαλάρωσης  $\Gamma = D_g q^2$  , όπου  $D_g$  ο συντελεστής διάχυσης του gel . Οι αλυσίδες εφάπτονται και βρίσκονται σε «παγωμένη» κατάσταση . Οι διακυμάνσεις στη συγκέντρωση είναι αρκετά παρόμοιες με ενός αληθινού gel . Ο δυναμικός παράγοντας δομής για ημιαραιά διαλύματα θεωρείται ότι αποτελείται από δυο εκθετικές συνιστώσες

$$S(q, t) = A_1 \exp(-\Gamma_1 t) + A_2 \exp(-\Gamma_2 t) \quad (20)$$

Όταν ικανοποιείται η συνθήκη  $q < (T_{rel} D_g)^{-1/2}$  τότε έχουμε

$$\Gamma_1 = D_g q^2 = \frac{\mu}{c} (E_{os} + E_g) q^2 \quad (21)$$

$$\Gamma_2 = \frac{D_c}{D_g T_r} = \frac{E_{os}}{(E_{os} + E_g) T_r} \quad (22)$$

$E_g$  είναι ο ελαστικός συντελεστής συνάφειας για το μεταβατικό gel ,  $E_{os}$  ο ωσμωτικός συντελεστής και  $\mu$  η δραστική κινητικότητα του μονομερούς . Επομένως η διακύμανση στη συγκέντρωση προκαλεί βαθμίδωση συγκέντρωσης και ελαστική πίεση . Όταν ο χρόνος είναι  $t < T_R$  κυριαρχεί η πρώτη εκθετική και ο χρόνος χαλάρωσης είναι ο  $\Gamma_1^{-1}$  (συμπεριφορά gel) . Όταν ισχύει  $t > T_R$  επικρατεί η δεύτερη εκθετική και ο  $t_{decay} = \Gamma_2^{-1}$  (μπορούν να αποκοπούν η μια από την άλλη) . Οι εξισώσεις (21) & (22) ισχύουν κυρίως για διαλύτες  $\Theta$  όπου οι δυο συντελεστές  $E$  έχουν ίδια τάξη μεγέθους , ωστόσο στις κατάλληλες συγκεντρώσεις με τη χρήση κατάλληλων συντελεστών  $E_g$  και  $E_{os}$  που να πλησιάζουν σε πηλίκιο 1 , οι εξισώσεις περιγράφουν ικανοποιητικά και καλούς διαλύτες (όπως σε αυτήν την περίπτωση το

βενζόλιο) . Όσο αυξάνεται η ποιότητα του διαλύτη η διάχυση γίνεται όλο και πιο έντονη . Γι' αυτό στο σύστημα (PS/Bz) υπολογίστηκε η χρονικά εξαρτώμενη συνάρτηση συσχέτισης . Διατυπώθηκε η θεωρία ότι η χαλάρωση αυτού του συστήματος αποτελείται από 3 στάδια : το συνεργειακό στάδιο με χρόνο χαλάρωσης τον ήδη αναφερθέντα  $\tau_c$  , το στάδιο Rouse με χρόνο χαλάρωσης  $\tau_R$  και το στάδιο reptation (δηλαδή ερπυσμού) . Το στάδιο Rouse εμφανίζεται σε μεγάλους χρόνους , όπου στο διάλυμα άλλα μόρια είναι τεντωμένα και άλλα συμπιεσμένα . Αυτή η ένταση ανάμεσα στις πολυμερικές αλυσίδες οδηγεί σε ανακατανομή των συνδέσμων μεταξύ των αλυσίδων . Αν  $\delta = E_g / E_{os}$  τότε η συνάρτηση συσχέτισης για το πρώτο συνεργειακό στάδιο είναι  $g_c(t) = \exp[-(1+\delta)D_c q^2 t]$  και το πλάτος  $A_c = 1/(1+\delta)$  . Το  $\delta$  συνήθως είναι μικρό  $\sim 0.04$  , το πλάτος κοντά στη μονάδα και το πλάτος για τα άλλα δυο στάδια είναι μικρό . Συγκεκριμένα το  $A_{Rouse} \approx \delta/6$  και ο ελαστικός συντελεστής στο στάδιο Rouse μειώνεται και γίνεται

περίπου  $\overline{E_g} = 0.8E_g$  . Το τελευταίο στάδιο ερπυσμού έχει πλάτος  $A_{rp} = \frac{\overline{E_g}}{E_g + E_{os}}$  και

χαρακτηρίζεται όχι από έναν , αλλά από πολλούς χρόνους χαλάρωσης .

Σε καθορισμένη συγκέντρωση 5 % , το μοριακό βάρος του πολυμερούς δεν επηρεάζει τη μορφή των διαγραμμάτων συσχέτισης . Όλα τα φάσματα του PS-Bz διαφόρων μοριακών βαρών έχουν κοινή μορφή με μια μεγάλη κορυφή σε μικρούς χρόνους η οποία φυσικά αντιστοιχεί στο πρώτο συνεργειακό στάδιο . Οι συντελεστές  $D_c$  που υπολογίστηκαν στην περιοχή μοριακού βάρους γύρω στα 400 kDalton ήταν περίπου ίσοι . Πριν από αυτήν την περιοχή ο  $D_c$  μειώνεται με αύξηση του μοριακού βάρους . Το όριο στο οποίο ο συντελεστής διάχυσης τείνει ασυμπτωτικά και σχηματίζει ευθεία , είναι το κρίσιμο μοριακό βάρος  $M_c^*$  το οποίο εξαρτάται από τη συγκέντρωση και ονομάζεται μοριακό βάρος επικάλυψης . Σε αυτό το μοριακό βάρος οι αλυσίδες αλληλεπιδρούν και σχηματίζουν blobs (φουσαλλίδες) **χωρίς όμως να εφάπτονται η μια στην άλλη** . Ένα πολύ χρήσιμο μέγεθος είναι το μήκος συσχέτισης  $\xi$  το οποίο μπορεί να είναι το μέγεθος του blob ή η μέση απόσταση μεταξύ δυαδικών επαφών ανάμεσα σε δυο πολυμερικές αλυσίδες . Με καλύτερη ανάλυση των φασμάτων βρέθηκε ότι η συνάρτηση συσχέτισης περιέχει 3 ακόμα αργές περιοχές , ασθενούς εντάσεως . Η τρίτη από αυτές τις περιοχές δίνει πολύ μεγάλη ακτίνα , κάτι που σημαίνει αυτή η συνιστώσα σίγουρα αντιστοιχεί σε clusters (και συναντάται

βεβαίως σε διαλύματα που έχουν εφαπτόμενες αλυσίδες) . Οι δυο εναπομείνουσες αργές κορφές προσομοιώθηκαν με χρήση διπλής εκθετικής συνάρτησης .

$$g_s(t) = A_I \exp[-(t / \tau_I)^{\beta_1}] + A_{II} \exp[-(t / \tau_{II})^{\beta_2}] + B \quad (23)$$

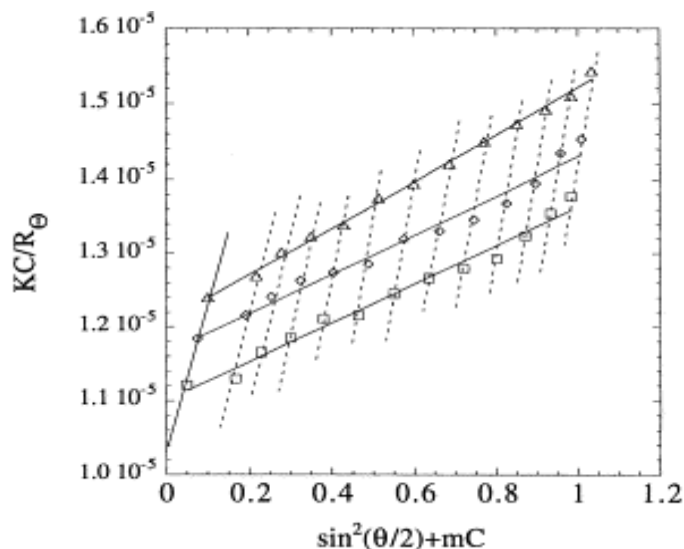
Οι εκθέτες  $\beta_1$  και  $\beta_2$  συμβολίζουν τη στενότητα των κατανομών . Ο χρόνος χαλάρωσης  $\Gamma_{II}$  βρέθηκε ότι είναι ανεξάρτητος της τιμής  $q^2$  και κατά συνέπεια δεν έχει γωνιακή εξάρτηση . Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι ο χρόνος ερπυσμού ακολουθεί μια κατανομή του τύπου  $\tau_p = 2\tau^*/\Delta$  (όπου  $\Delta$  ανάλογη του  $cN$  και  $\tau^*$  ο μεγαλύτερος χαρακτηριστικός χρόνος χαλάρωσης για τον οποίο ο δείκτης πολυμερισμού  $N$  ικανοποιεί την ημιαραιά συνθήκη) και η οποία είναι ανεξάρτητη από το  $q$  , οδηγεί στο συμπέρασμα ότι η δεύτερη από τις 3 κορυφές αντιστοιχεί σε διαδικασία ερπυσμού . Η πρώτη αργή διαδικασία έχει  $\beta \sim 1$  και είναι μονοεκθετική . Ο χρόνος χαλάρωσης  $\Gamma_I$  εξαρτάται γραμμικά από τη γωνία δηλαδή το  $q^2$  . Υπολογίζεται ένας συντελεστής διάχυσης  $D_I$  που είναι 13.5 φορές μικρότερος από τον  $D_{fast}$  . Το τελικό συμπέρασμα είναι ότι πρόκειται για μια δευτερεύουσα αργή διαδικασία διάχυσης , η οποία έχει χρόνο χαλάρωσης αντίστοιχο με το χρόνο της κύριας διάχυσης . Η πρώτη αργή περιοχή λοιπόν αποδίδεται σε δυναμική που συνδέεται με τα διαστήματα που μεσολαβούν ανάμεσα στις θέσεις επαφής δυο αλυσίδων .

Οι δυναμικές ιδιότητες ενός πολυμερούς εξαρτώνται και από το είδος του διαλύτη [4,6] . Για παράδειγμα η ακτίνα του blob που σχηματίζει ένα μόριο σε ένα διάλυμα ονομάζεται ΥΔΡΟΔΥΝΑΜΙΚΗ ΑΚΤΙΝΑ  $R_H$  για το πολυφαινυλακετυλένιο (PPA) η  $R_H$  μπορεί να μεταβληθεί αλλάζοντας το διαλύτη . Συγκεκριμένα , δείγματα PPA μελετήθηκαν σε διαλύτη τετραυδροφουράνιο (THF) , τολουόλιο και χλωροφόρμιο με στατική και δυναμική σκέδαση . Η στατική σκέδαση βοηθά στον υπολογισμό του μοριακού βάρους , της γυροσκοπικής ακτίνας και του δεύτερου συντελεστή virial  $A_2$  . Οι εξισώσεις που συνδέουν αυτά τα μεγέθη είναι

$$\frac{KC}{\Delta R_\theta} = \left\{ 1 + \frac{16\pi^2 R_g^2}{3\lambda^2} \sin^2(\theta/2) \right\} * \left\{ \frac{1}{M_w} + 2A_2 C \right\} \quad (24)$$

$$\text{όπου} \quad K = \frac{2\pi^2 n_0^2}{N\lambda^4} \left( \frac{dn}{dc} \right)^2 \quad (25) \quad \text{και} \quad \Delta R_\theta = \frac{\Delta I}{I_0} d^2 \sin \theta \quad (26)$$

$n_0$  ο δείκτης διάθλασης του διαλύτη ,  $n$  ο δ.δ. του διαλύματος ,  $N$  ο αριθμός Avogadro και  $dn/dC$  η μεταβολή του δείκτη διάθλασης με τη συγκέντρωση . Η κατασκευή ενός λεγόμενου *διαγράμματος Zimm* με  $Y$  το  $KC/R_\theta$  και  $X$  το  $q^2 + mC$  ( $m$  σταθερά που προσδιορίζει την κλίμακα) , βοηθά από τις κλίσεις των ευθειών στον υπολογισμό  $M_w$   $R_g$  κτλ. όπως φαίνεται από την (24) .



**Σχήμα 6 :** Διάγραμμα Zimm για PPA σε THF σε 3 διαφορετικές συγκεντρώσεις από 0.25 έως 1 g/mL .

Και στις 3 περιπτώσεις το  $M_w$  υπολογίζεται με παρεκβολή της κλίσης της ευθείας σε μηδενικές συγκεντρώσεις & γωνίες . Βρέθηκε γύρω στα 98 kDa αφού και τα 3 διαλύματα όπως φαίνεται έχουν την ίδια κλίση . Το μοριακό βάρος του πολυμερούς δεν επηρεάζεται από τη συγκέντρωση , ωστόσο αλλάζει με χρήση διαφορετικού διαλύτη . Μια ενδιαφέρουσα παρατήρηση είναι ότι το μοριακό βάρος μπορεί και να μεταβληθεί με το χρόνο αποθήκευσης του δείγματος . Στο THF αυξάνεται , στο χλωροφόρμιο μειώνεται και στο τολουόλιο παραμένει το ίδιο . Οι διαφορετικές αλληλεπιδράσεις με τα μόρια του διαλύτη εξαιτίας της υψηλής στερεοεκλεκτικότητας cis-trans αλλάζουν την τρισδιάστατη δομή του πολυμερούς και μάλιστα το διάλυμα αλλάζει χρώμα . Ο διαλύτης επηρεάζει και την  $R_H$  που υπολογίζεται με DLS . Η υδροδυναμική ακτίνα στο τολουόλιο και το χλωροφόρμιο ξεκινά από 2000 -3000  $\text{\AA}$  και μειώνεται με το χρόνο φτάνοντας σε σταθερή κατάσταση μετά από 500 – 1000 min . Στο THF όμως το πολυμερές έχει μια εντυπωσιακά σταθερή τιμή  $R_h$  περίπου

270 nm . Συμπερασματικά το χλωροφόρμιο προκαλεί τόσο ισομερείωση (μείωση υδροδυναμικής ακτίνας λόγω σχηματισμού ελικοειδούς δομής) όσο και αποικοδόμηση στις πολυμερικές μονάδες (μείωση μοριακού βάρους) .

Υπάρχει διαφορετικό μήκος συσχέτισης  $\xi$  που υπολογίζεται από τη στατική και τη δυναμική μέθοδο . Όταν ένα πολυμερές σε οργανικό διαλύτη αποκτήσει μια κρίσιμη θερμοκρασία  $T_c$  τότε οι φάσεις διαχωρίζονται [7] . Υπάρχει επίσης μια θερμοκρασία  $T_X$  όπου το στατικό μήκος  $\xi_s$  γίνεται ίσο με τη γυροσκοπική ακτίνα . Σε μεγαλύτερες θερμοκρασίες της  $T_X$  το  $\xi < R_g$  και το διάλυμα μπαίνει πλέον στην περιοχή  $\Theta$  . Οι «συνθήκες  $\Theta$ » σημαίνουν ότι οι ελκτικές αλληλεπιδράσεις ανάμεσα στα πολυμερικά τμήματα αντισταθμίζονται από επίδραση αποκλειόμενου όγκου και η διαμόρφωση του «άθικτου» πολυμερούς που δεν επικαλύπτεται με γειτονικά μόρια περιγράφεται με Γκαουσιανή στατιστική .

$$\xi_s = \frac{R_g(\Theta)}{\sqrt{3}} \quad (27)$$

Το δυναμικό μήκος  $\xi_d$  είναι λιγότερο μελετημένο . Μελέτη με DLS που έγινε σε οργανικό πολυμερές πολυ-διμεθυλο-σιλοξάνιο (PDMS) σε δυο διαφορετικούς διαλύτες (υπερκρίσιμο ρευστό  $CO_2$  και βρωμο-βενζόλιο) επικεντρώθηκαν σε θερμοκρασίες  $\Theta$  . Σε όλα τα δείγματα ανεξαρτήτως μοριακού βάρους υπάρχει μια αργή περιοχή μικρού πλάτους . Η εξάρτηση στα διαγράμματα  $\Gamma$  έναντι  $q^2$  είναι πάντοτε γραμμική κάτι που αποδεικνύει ότι ο τρόπος χαλάρωσης είναι η διάχυση . Δυστυχώς η ανάλυση δεν είναι εύκολη καθώς πάνω από την  $T_c$  εμφανίζεται έντονη τυρβώδης δραστηριότητα που οδηγεί σε ανεπιθύμητη πολλαπλή σκέδαση . Όσο προσεγγίζουμε την  $T_c$  το  $\Gamma$  όπως είδαμε εξαρτάται από το  $q^2$  . Πλησιάζοντας όμως πολύ κοντά στην κρίσιμη θερμοκρασία η συνολική ταχύτητα χαλάρωσης δείχνει μια ιδιόρρυθμη εξάρτηση από την τρίτη δύναμη  $q^3$  . Τόσο το στατικό όσο και το δυναμικό μήκος συσχέτισης μπορούν να περιγραφούν από παρόμοιους εκθετικούς νόμους

$$\xi_d^* = \xi_0^* |\tau|^{-\nu^*} \quad (28)$$

και

$$\xi_s = \xi_0 |\tau|^{-\nu} \quad (29)$$

Ο  $\nu$  είναι ένας πειραματικά υπολογιζόμενος εκθέτης και το  $\tau = \frac{T - T_c}{T_c}$  δηλαδή η

σχετική απόκλιση της θερμοκρασίας από την κρίσιμη τιμή διαχωρισμού φάσεων . Οι συνηθισμένες τιμές  $\nu$  για συνθήκες  $\Theta$  είναι 0.7 – 0.85 και οι υπολογισμοί εντάσσονται στην «υδροδυναμική περιοχή» ( $q\xi \ll 1$ ) . Όταν όμως ο  $\nu$  τείνει στο μηδέν τότε η περιγραφή εισέρχεται στη λεγόμενη «κρίσιμη περιοχή» ( $q\xi_s > 1$ ) όπου δεν υπάρχει διάχυση . Σε αυτήν την περιοχή το στατικό μήκος μειώνεται καθώς η παράμετρος  $\tau$  τείνει στο μηδέν ενώ το δυναμικό μήκος παραμένει ανεξάρτητο της θερμοκρασίας .

Ακόμα και αραιά πολυμερικά διαλύματα μπορούν να μελετηθούν με SLS και DLS και να εξαχθούν χρήσιμα συμπεράσματα για τη δυναμική τους . Πειράματα στατικής σκέδασης σε υδατικό αραιό διάλυμα συμπλόκου πολυβινυλοπυρρολιδόνης (PVP) και φουλερενίου ( $C_{60}$ ) απέδειξαν ότι 4 – 6 επαναλαμβανόμενες μονάδες πολυβινυλοπυρρολιδόνης αλληλεπιδρούν με ένα μόριο φουλερενίου [8] . Η υδροφιλική άπωση μεταξύ των μορίων PVP συναγωνίζεται με την τάση των υδρόφοβων φουλερενίων να συσσωματωθούν στο νερό και έχουν ανιχνευθεί ισχυρές διαμοριακές δυνάμεις στο αραιό διάλυμα . Ωστόσο για να είναι δυνατές αυτές οι δυνάμεις πρέπει να περιοριστούμε σε μια μικρή περιοχή συγκεντρώσεων που να εξασφαλίζει ότι δεν υπάρχει επικάλυψη των αλυσίδων . Αξιοσημείωτα , σε αυτό το σύστημα οι διαμοριακές αυτές δυνάμεις είναι παρούσες και σε πολύ αραιές συγκεντρώσεις . Η μέθοδος SLS έδειξε ότι δεν υπάρχει γωνιακή εξάρτηση της έντασης του σκεδαζόμενου φωτός , άρα το διάγραμμα Zimm είναι ανεπαρκές για υπολογισμό  $R_g$  και  $M_w$  . Ο λόγος για την αποτυχία αυτής της θεωρίας είναι ότι οι **σκεδαστές πρέπει να είναι ανεξάρτητοι και να μην αλληλεπιδρούν** . Ποιοτικά η αύξηση των διακυμάνσεων στη συγκέντρωση από την αύξηση του αριθμού των σκεδαστών ανά μονάδα όγκου , συναγωνίζεται τη μείωση των διακυμάνσεων εξαιτίας ισχυρών διαμοριακών αλληλεπιδράσεων σε υψηλές συγκεντρώσεις . Πέρα από μια κρίσιμη συγκέντρωση λοιπόν παρατηρείται μόνο μια κορυφή στα φάσματα DLS η οποία αποδίδεται σε διάχυση . Κάτω από την κρίσιμη συγκέντρωση , αραιώνοντας το διάλυμα , οι αποστάσεις μεταξύ φουλερενίων ξεπερνούν το  $\xi$  και η ενοποιημένη μορφή του συμπλόκου γίνεται ασταθής . Συμβαίνει διαχωρισμός σε μικρότερα θραύσματα με την ίδια δομή καθώς και με τις ίδιες μέσες αποστάσεις ανάμεσα στα φουλερένια . Τα θραύσματα αυτά είναι όντως ανεξάρτητοι σκεδαστές και μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τον υπολογισμό του μοριακού βάρους (για κάθε θραύσμα) *όχι όμως και της γυροσκοπικής ακτίνας* . Υπάρχουν ισχυρές ενδομοριακές

αλληλεπιδράσεις μεταξύ των μεμονωμένων συμπλόκων σε κάθε θραύσμα . Έχει βρεθεί ότι η κρίσιμη απόσταση μεταξύ φουλερενίων όπου εξισορροπούνται ελκτικές και απωστικές δυνάμεις δεν εξαρτάται από το μοριακό βάρος του πολυμερούς , ούτε από τη συγκέντρωση , αλλά ούτε και από το περιεχόμενο του φουλερενίου στο σύμπλοκο . Η μέθοδος DLS δείχνει ότι πάνω από την κρίσιμη συγκέντρωση η κίνηση των μορίων είναι παρεμποδισμένη διάχυση στο οργανωμένο διάλυμα . Σε χαμηλότερες της κρίσιμης συγκεντρώσεις η συνάρτηση συσχέτισης έχει πιο πολύπλοκη γωνιακή εξάρτηση . Κάτω από γωνία σκέδασης  $90^\circ$  υπάρχει μια απλή εκθετική καμπύλη και ο συντελεστής διάχυσης  $D$  είναι ίδιος με αυτόν της υπερκρίσιμης συγκέντρωσης , δηλαδή περιγράφει την κίνηση κατά την οποία τα σύμπλοκα έχουν παρόμοια δομή με τις περιοχές . Για γωνίες μεγαλύτερες των  $90^\circ$  , η κατανομή εμφανίζει δυο εκθετικές και επίσης μια αργή περιοχή μικρής έντασης εμφανίζεται δίπλα στη γρήγορη . Η επιπλέον χαλάρωση μπορεί να οφείλεται είτε στις διαμοριακές δυνάμεις είτε στην πολυδιασπορά των δειγμάτων . Στην πρώτη περίπτωση υπάρχει εξάρτηση μεταξύ του  $D_s$  και του αντίστοιχου συντελεστή σε άπειρη αραιότητα καθώς και της συγκέντρωσης  $\rho_s$  (σωματίδια ανά μονάδα όγκου) δηλαδή  $D_s \sim (D_0 / \rho_s)$  . Ο στατικός παράγοντας σκέδασης για αυτά τα συστήματα περιγράφεται από την παρακάτω σχέση

$$S(q, R) = \{1 - 4\pi\rho_s \int_0^a R^2 [1 - g(R)] \left[ \frac{\sin(qR)}{qR} \right] dR\} \quad (30)$$

Το  $g(R)$  είναι συνάρτηση συσχέτισης για τη σύζευξη μορίων διαλυμένης ουσίας που για ισοτροπικά συστήματα εξαρτάται μόνο από την απόσταση των δυο μορίων του θεωρούμενου ζεύγους  $R = \sqrt{(r_i - r_j)(r_i + r_j)}$  όπου  $r_i$  και  $r_j$  είναι οι στιγμιαίες θέσεις για τα σωματίδια  $i$  και  $j$  . Το ανώτατο όριο ολοκλήρωσης  $a$  συμβολίζει το εύρος των αλληλεπιδράσεων πάνω από το οποίο η  $g(R)$  δε διαφέρει σημαντικά από τη μονάδα .

Η SLS υπολογίζει εύκολα τις γνωστές ιδιότητες ακόμα και σε ψευδο-τριαδικά συστήματα όπως σε δυαδικό σύστημα δυο διαφορετικών πολυμερών [9] . Σε αρκετά αραιές συγκεντρώσεις , τα μοριακά βάρη  $M_{w,bin}$  (δυαδικό μείγμα) ,  $M_{w,1}$  (πολυμερές 1) και  $M_{w,2}$  (πολυμερές 2) συνδέονται με τη σχέση  $M_{w,bin} = w_1 M_{w,1} + w_2 M_{w,2}$  , όπου  $w_1$  και  $w_2$  τα κλάσματα μάζας για τα δυο συστατικά αντίστοιχα . Η μεταβολή του δείκτη διάθλασης με τη συγκέντρωση πρέπει να είναι η ίδια για τα

δυο συστατικά ώστε να πετύχει το πείραμα . Η μέση τιμή του τετραγώνου της γυροσκοπικής ακτίνας στον άξονα z για το δυαδικό μείγμα συνδέεται με τις αντίστοιχες ακτίνες για τα συστατικά 1 και 2 όπως και με τα μοριακά βάρη μέσω της παρακάτω εξίσωσης

$$\langle r^2 \rangle_{z,bin} = \frac{w_1 M_{w,1}}{w_1 M_{w,1} + w_2 M_{w,2}} \langle r_1^2 \rangle_z + \frac{w_2 M_{w,2}}{w_1 M_{w,1} + w_2 M_{w,2}} \langle r_2^2 \rangle_z \quad (31)$$

Γνωρίζοντας τη σύσταση ενός μείγματος πολυμερών , το μέγεθος και το μοριακό βάρος καθενός , μπορούμε να υπολογίσουμε το μοριακό βάρος ή τη γυροσκοπική ακτίνα του συστήματος . Με μεγάλη αραιώση και υποθέτοντας ότι τα μόρια κάθε συστατικού έχουν συγγένεια για τα ομοειδή μόρια , μπορούμε να αγνοήσουμε τις αλληλεπιδράσεις μεταξύ των δυο συστατικών και μπορούμε να αντικαταστήσουμε στην εξίσωση (30) τις γυροσκοπικές ακτίνες με τους δεύτερους συντελεστές virial . Έτσι  $(A_2)_{z,1}$  είναι ο μέσος συντελεστής virial για το σύστημα πολυμερές 1 – νερό ,  $(A_2)_{z,2}$  είναι ο αντίστοιχος συντελεστής για το σύστημα πολυμερές 2 – νερό και το αποτέλεσμα της εξίσωσης θα είναι το  $(A_2)_{z,bin}$  το οποίο είναι ο συντελεστής για το σύστημα μείγμα πολυμερών – νερό . Εκτιμώντας τους  $A_2$  σε μεμονωμένα υδατικά διαλύματα κάθε συστατικού μπορούμε να προβλέψουμε τις αλληλεπιδράσεις στο δυαδικό μείγμα . Τα φυσικά πολυμερή μεταβάλλουν συχνά τη διαμόρφωσή τους με αύξηση της θερμοκρασίας . Η ζελατίνη σε φυσιολογική θερμοκρασία έχει ελικοειδή μορφή που κάνει το μόριο να μοιάζει με ραβδί (rod) . Από τους 35 °C και πάνω υπάρχει μια σταθεροποίηση του μοριακού βάρους (όπως δείχνει η SLS) δηλαδή τα μόρια δεν αλληλεπιδρούν . Με ψύξη κάτω από τους 35 °C το μόριο συσσωματώνεται . Η γυροσκοπική ακτίνα με θέρμανση πάνω από τους 35 °C δε μεταβάλλεται αισθητά (οποιαδήποτε διακύμανση οφείλεται σε άτακτη κίνηση Brown) αλλά με ψύξη κάτω από τους 35 °C αυξάνεται καθώς το μόριο υιοθετεί μια εκτεταμένη μορφή rod . Πάνω από την κρίσιμη θερμοκρασία τα μόρια έχουν μια μπερδεμένη μορφή σαν κουβάρι (coil) . Τα θαλάσσια φύκια όμως δε μεταβάλλουν το μοριακό τους βάρος ούτε τη γυροσκοπική τους ακτίνα με αύξηση της θερμοκρασίας . Τα φύκη δε διαλύονται καλά στο νερό και επιπλέον οι συντελεστές  $A_2$  υπολογίζονται ελαφρώς αρνητικοί που σημαίνει ότι λόγω της φτωχής τους συγγένειας με το νερό τα μόρια του πολυμερούς συσπειρώνονται και αποκτούν δομή coil (κουβάρι) . Η δομή



τους διατηρείται σταθερή αν και εκτιμάται ότι κάτω των 50 °C συμβαίνει κάποια συσσωμάτωση μεταξύ των coil . Το δυαδικό μείγμα των δυο πολυμερών φαίνεται ότι διατηρεί τις αρχικές ιδιότητες των συστατικών του . Η καθοριστική ένδειξη για αυτήν τη συμπεριφορά είναι η εξάρτηση των αποτελεσμάτων από το ποσοστό της ζελατίνης στο μείγμα . Πρώτα από όλα οι μοριακές μάζες για όλα τα διαλύματα είναι σταθερές για θερμοκρασίες άνω των 50 °C , λογικό αφού κανένα από τα δυο συστατικά δε συσσωματώνεται σε τόσο θερμές συνθήκες . Σε χαμηλότερες θερμοκρασίες όμως τα μείγματα με χαμηλή περιεκτικότητα σε ζελατίνη παρουσιάζουν πιο απότομη άνοδο μοριακού βάρους κατά την ψύξη , απ' ότι τα μείγματα με υψηλό ποσοστό ζελατίνης . Αυτό αποδίδεται στο σχηματισμό συσσωματωμάτων από μόρια των φυκών ενώ τα μόρια ζελατίνης είναι ακόμα απομονωμένα . Αν η ψύξη προχωρήσει κάτω από τους 35 °C , η συμπεριφορά αλλάζει καθώς η μεταβολή για διαλύματα πλούσια σε ζελατίνη είναι πιο απότομη , απόδειξη ότι ξεκίνησε η συσσωμάτωση της ζελατίνης . Άρα η θερμοδυναμική συμπεριφορά του ενός συστατικού δεν επηρέασε τη συμπεριφορά του άλλου στο αραιό διάλυμα .

Ο καθορισμός του σχήματος με τη βοήθεια DLS δεν περιορίζεται μόνο σε πολυμερή αλλά και σε μικρογαλακτώματα – aerosols [10] . Αμφιφιλικά πολυμερή που προσροφώνται σε διάλυμα μπορούν να χρησιμεύσουν για να ελέγξουν την ηλεκτρική ροή σε ένα σύστημα aerosol που σχηματίζει το δυσσοκυτλ-σουλφοσουλκινικό νάτριο . Το OT (όπως αναφέρεται συντομευμένα) σχηματίζει γαλάκτωμα στο σύστημα επτάνιο – νερό , εξαιτίας των δυο ουρών του. Το πολικό μέρος προσανατολίζεται προς την υδάτινη φάση και το άπολο μέρος προσανατολίζεται στην οργανική φάση . Τα αμφιφιλικά πολυμερή που προσροφώνται θα καταμεριστούν με τη σειρά τους στην διεπιφάνεια των σταγόνων λόγω της δομής τους . Αυτή η συγγένεια των πολυμερών για τα σταγονίδια μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να ελέγξει εκτός από την ηλεκτρική συμπεριφορά και άλλες ιδιότητες όπως την έλξη μεταξύ των σταγόνων . Όταν η θερμοκρασία ή ο όγκος της υδατικής φάσης αυξάνεται , στο σύστημα aerosol υπάρχει ροή ηλεκτρικού ρεύματος και η ειδική αγωγιμότητα αυξάνεται . Αυτό ερμηνεύεται με θερμικές κρούσεις μεταξύ των σταγονιδίων τα οποία ωστόσο διατηρούν το σφαιρικό τους σχήμα . Το «κατώφλι» ηλεκτρικής ροής θεωρείται μέτρο για τις ελκτικές δυνάμεις (πολλές αποτελεσματικές κρούσεις) ή για τις απωστικές δυνάμεις (λίγες αποτελεσματικές κρούσεις) μεταξύ των σταγόνων . Όσο μεγαλύτερη η συγκέντρωση των σταγονιδίων , τόσο χαμηλότερη είναι η

θερμοκρασία στην οποία παρατηρείται απότομη άνοδος της αγωγιμότητας . Η DLS χρησιμοποιήθηκε για να μετρηθεί η υδροδυναμική ακτίνα των σταγόνων .

$$D_T = \frac{k_B T}{6\pi\eta R_h} \quad (32)$$

$k_B$  η σταθερά του Boltzmann ,  $T$  η απόλυτη θερμοκρασία ,  $\eta$  το ιξώδες του υγρού και  $D_T$  ο συντελεστής μεταφορικής διάχυσης των σωματιδίων . Ο  $D_T$  είναι η κλίση της ευθείας στα διαγράμματα  $\Gamma$  έναντι  $q^2$  . Αν ο  $D_T$  υπολογιστεί συναρτήσει της συγκέντρωσης μπορεί να γίνει παρεκβολή σε άπειρη αραιώση και να εξαχθεί ο  $D_0$  . Ο  $D_0$  μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να περιγράψει μια τιμή υδροδυναμικής ακτίνας ανεξάρτητης από τη συγκέντρωση , αφού σε άπειρη αραιώση δεν υπάρχουν διαμοριακές αλληλεπιδράσεις . Η κλίση του συντελεστή διάχυσης συναρτήσει της συγκέντρωσης δίνει το  $k_d$  τον virial συντελεστή διάχυσης . Στην ακόλουθη σχέση αγνοούμε τους όρους υψηλής τάξης .

$$D_T = D_0(1 + k_d C + \dots) \quad (33)$$

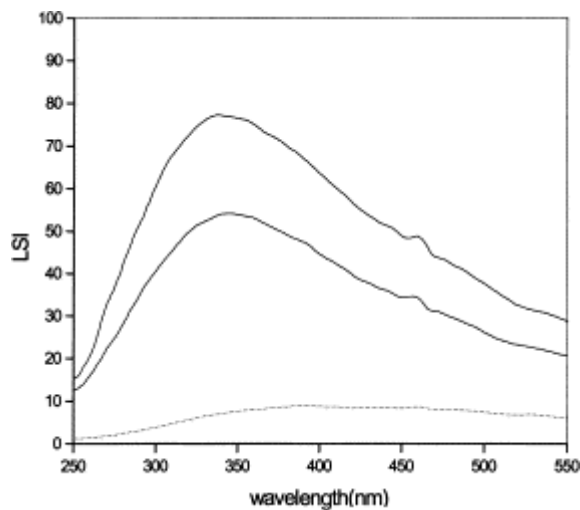
Τα αμφιφιλικά πολυμερή που χρησιμοποιήθηκαν για τη μελέτη συμπεριλάμβαναν καρβοξυτελικό πολυβουταδιένιο (PBd-COOH) , πολυμερές με δομή «κτένας» πολυμαλεικό ανυδρίτης οκτυλ-βινυλ-αιθέρας (PMAOVE) και συσταδικό (block) πολυμερές πολυβουταδιένιο πολυαιθυλενοοξειδίου (PBd-PEO) . Το PMAOVE ευνοεί με την προσρόφησή του την αγωγιμότητα μειώνοντας το κατώφλι θερμοκρασίας 3 – 5 βαθμούς ανάλογα με την ποσότητά του σε γαλάκτωμα συγκεκριμένης αναλογίας νερού-επτανίου . Το block πολυμερές PBd-PEO όμως αυξάνει το κατώφλι σε υψηλότερες θερμοκρασίες . Το καρβοξυλικό πολυμερές δεν προκαλεί καμία μεταβολή στο κατώφλι . Οι υδροδυναμικές ακτίνες από το DLS υπολογίστηκαν συναρτήσει της θερμοκρασίας . Στην περίπτωση του PMAOVE η  $R_h$  συγκρινόμενη με το ελεύθερο γαλάκτωμα δεν παρουσιάζει μεταβολή μέχρι το κατώφλι (40°C) , αλλά σε υψηλότερες θερμοκρασίες η υδροδυναμική ακτίνα μεγαλώνει ραγδαία με τη θερμοκρασία . Για να μελετηθεί ο μηχανισμός της επίδρασης των πολυμερών στις σταγόνες εκτιμήθηκαν τα χαρακτηριστικά μήκη για κάθε μόριο με τη σχέση  $L = bN^{3/5}$  όπου  $b$  το μήκος της μονομερούς μονάδας και  $N$  ο αριθμός των μονομερών μονάδων σε κάθε πολυμερές . Η υδροδυναμική ακτίνα για τα σταγονίδια επίσης υπολογίστηκε

με παρεκβολή με τη βοήθεια DLS και βρέθηκε 12.2 nm . Το καρβοξυτελικό πολυμερές θεωρείται ότι δεν προκαλεί μεταβολές στην αγωγιμότητα γιατί προτιμά την οργανική φάση και προσροφάται λίγο στην επιφάνεια των σταγόνων .

Το PMAOVE δείχνει προτίμηση για τη διεπιφάνεια νερού – επτανίου και κατά συνέπεια καταλαμβάνει μεγάλο μέρος της επιφάνειας της σταγόνας . Οι υδρογονανθρακικές αλυσίδες (οκτύλιο) επεκτείνονται στην οργανική φάση και αναμειγνύονται με τις άπολες ουρές του γαλακτώματος OT (οκτύλιο) . Οι ογκώδεις δικαρβοξυλικές ομάδες έλκονται από το νερό αλλά ταυτόχρονα απωθούνται από τις ανιονικές ομάδες του OT (σουλφονική ομάδα) . Το τελικό αποτέλεσμα είναι η διατάραξη του κλειστού πακεταρίσματος των σταγόνων OT και η δημιουργία ενός λιγότερο άκαμπτου και ευρύχωρου στρώματος όπου πολυμερές και επιφανειακή ουσία αναμειγνύονται περισσότερο . Αυτή η δομική αλλαγή ευνοεί ανταλλαγή ιόντων νατρίου ανάμεσα στις σταγόνες και χαμηλώνει το κατώφλι αγωγιμότητας . Τα μόρια PMAOVE ενδεχομένως να λειτουργούν και ως μεταβατικές γέφυρες μεταξύ των σταγόνων ευνοώντας την έλξη και την ταχύτητα σύγκρουσης μεταξύ των σταγόνων , κάτι που ερμηνεύεται από την αύξηση της  $R_h$  . Όταν το συσταδικό PBd-PEO πολυμερές ενσωματωθεί στο μικρογαλάκτωμα ο μηχανισμός προσρόφησης είναι πολύ διαφορετικός . Το τμήμα του πολυβουταδιενίου εισχωρεί στο επτάνιο αλλά το τμήμα του πολυαιθυλενο-οξειδίου προτιμά την υδάτινη φάση . Είναι γνωστό ότι ουδέτερα πολυμερή δεσμεύονται από ανιονικές ομάδες , έτσι το τμήμα PEO θα τοποθετηθεί κοντά στις πολικές κεφαλές (σουλφο-ομάδα) του OT . Αυτό το φαινόμενο κάνει πιο στενό το πακετάρισμα της σταγόνας και η ανταλλαγή ιόντων νατρίου γίνεται λιγότερο πιθανή αφού τα τμήματα του πολυμερούς τυλίγουν τις πολικές ουρές κάνοντας τις πιο δυσπρόσιτες . Μέτρηση των  $R_h$  για όλα τα συστήματα απέδειξε ότι ανεξαρτήτως προσροφώμενου πολυμερούς το μικρογαλάκτωμα διατηρεί σφαιρική μορφή σταγόνας .

### III) 1.β. ΦΥΣΙΚΑ ΠΟΛΥΜΕΡΗ

Το γλυκογόνο σε υδατικά διαλύματα εμφανίζει έντονη σκέδαση φωτός [11]. Η υδροδυναμική του ακτίνα υπολογίζεται εύκολα με DLS σε μια προσπάθεια να κατανοηθεί καλύτερα η δομή του και να συγκριθούν τα αποτελέσματα ανάμεσα σε διαφορετικά είδη οργανισμών. Δείγματα γλυκογόνου που απομονώθηκαν από ήπαρ κουνελιού και από στρείδι διαλύθηκαν σε νερό. Τα διαλύματα μελετήθηκαν με LS συναρτήσεως του μήκους κύματος. Τα φάσματα είχαν μια ευρεία κορυφή στην περιοχή 250 – 350 nm και το μέγιστο παρατηρείται στα 350 nm. Η απορρόφηση για το γλυκογόνο του κουνελιού είναι αισθητά μεγαλύτερη από του στρειδιού. Οι συγκεντρώσεις για τα δείγματα είναι φυσικά οι ίδιες και για baseline πάρθηκε και το αντίστοιχο φάσμα του νερού το οποίο βεβαίως έχει πολύ μικρή ένταση όπως φαίνεται και από το σχήμα



**Σχήμα 7 :** Φάσμα σκέδασης φωτός συναρτήσεως του  $\lambda$  για Rabbit Liver (RL): πάνω καμπύλη, Oyster (O) : κάτω καμπύλη και για νερό (---)

Μετρήσεις  $R_h$  έδειξαν ότι το γλυκογόνο σε νερό έχει σχεδόν σφαιρικό σχήμα. Για το RL γλυκογόνο η ακτίνα βρέθηκε περίπου 22 nm και παρουσιάζει μια αξιοσημείωτη σταθερότητα με αυξανόμενη συγκέντρωση που δείχνει πως τα σωματίδια γλυκογόνου δε συσσωματώνονται παραπάνω ακόμα και αν η συγκέντρωση μεγαλώσει. Επίσης οι κατανομές στις διακυμάνσεις χρόνου χαλάρωσης ( $\Gamma$ ) είναι πολύ στενές κάτι που

αποδεικνύει ότι τα μόρια έχουν το ίδιο σχήμα . Επειδή η διάσταση των σωματιδίων βρίσκεται μικρότερη σε σχέση με το μήκος κύματος της ακτινοβολίας μπορούν να εφαρμοστούν κάποιοι τύποι που διατυπώθηκαν από τον Rayleigh .

$$R(\theta) = \frac{i(\theta)r^2}{I} = \frac{9\pi^2}{2\lambda^4} \left( \frac{n_1^2 - n_0^2}{n_1^2 + 2n_0^2} \right)^2 N_0 u^2 (1 + \cos^2 \theta) \quad (34)$$

$R(\theta)$  ο λόγος Rayleigh ,  $n_1$  και  $n_0$  οι δείκτες διάθλασης διαλυμένης ουσίας και διαλύτη αντίστοιχα ,  $I$  η ένταση του προσπίπτοντος φωτός ,  $N_0$  ο αριθμός των μορίων ανά μονάδα όγκου και  $u$  ο όγκος του σωματιδίου . Το γινόμενο  $N_0 u$  είναι ίσο με το πηλίκο  $c / \rho$  όπου  $c$  η συγκέντρωση σε  $\mu\text{g} / \text{ml}$  και  $\rho$  η πυκνότητα του κάθε σωματιδίου . Συνεπώς αφού η  $\rho$  καθώς και οι δείκτες διάθλασης είναι σταθερά μεγέθη , τότε σύμφωνα με την (34) η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός υπό γωνία  $\theta$  αποκτά εξάρτηση από τη συγκέντρωση . Για συγκεκριμένη γωνία και συγκέντρωση μεγαλύτερο μέγεθος σωματιδίων σκεδάζει πιο έντονα το φως . Η υδροδυναμική ακτίνα για το δείγμα γλυκογόνου  $O$  υπολογίστηκε ίση με 18 nm και για αυτόν το λόγο το  $O$  έχει χαμηλότερη ένταση στο φάσμα από το δείγμα  $RL$  . Ο υπολογισμός των  $R_h$  για τα δείγματα  $RL$  και  $O$  απέδειξε ότι παράγοντες όπως η θερμοκρασία , το  $pH$  , η ιονική ισχύς , ο χρόνος αποθήκευσης , ανάμειξη με άλλες ενώσεις όπως μονοσακχαρίτες ή μεταλλικά ιόντα δεν επηρεάζουν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός και τα υδατικά διαλύματα γλυκογόνου είναι πολύ σταθερά . Η προσθήκη οργανικού διαλύτη βέβαια όπως αιθανόλη ή οξικό οξύ μειώνει τη συγγένεια του γλυκογόνου για το νερό και τα συσσωμάτωμα που τελικά σχηματίζονται αυξάνουν την ένταση του σκεδαζόμενου φωτός . Η μέθοδος του DLS πλεονεκτεί σε σχέση με άλλες για την ευκολία στη χρήση της , πολύ μεγάλη ευαισθησία (έως και 0.8 ppm) και επαναληψιμότητα αποτελεσμάτων . Συσσωμάτωση με τη χρήση ιόντων  $\Gamma$  θα απαιτούσε περισσότερα αντιδραστήρια και πολυπλοκότερη πειραματική διαδικασία με πιο αμφίβολα αποτελέσματα .

Πολυσακχαρίτες που έχουν μελετηθεί με LS είναι οι ετεροξυλάνες [12] . Πρόκειται για πολυμερή που απαρτίζουν το 40 % περίπου των κυτταρικών τοιχωμάτων στα νήματα του αραβόσιτου . Περιέχουν μια σπονδυλική στήλη από  $\beta$ -(1-4)- συνδεδεμένα κατάλοιπα D-ξυλόζης που είναι υψηλά υποκατεστημένα με διάφορες λειτουργικές ομάδες σε θέσεις  $O - 2$  ή / και  $O - 3$  στους σακχαρικούς

δακτυλίους . Η κατανομή του μοριακού βάρους και μεγέθους υπολογίστηκε με δεδομένα Στατικής και Δυναμικής Σκέδασης . Παρασκευάστηκαν διαφορετικά δείγματα ανάλογα με τις θερμοκρασίες (60 ή 100°C) και με την αλκαλική ουσία που βοήθησε στην απομόνωση (KOH ή Ca(OH)<sub>2</sub>). Η καθαρότητα των δειγμάτων είναι πολύ σημαντική γι' αυτό στη χρωματογραφία μοριακού αποκλεισμού χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μεγέθη φίλτρων για να διαπιστωθεί αν περνάνε συσσωματώματα στο δείγμα . Πραγματικά οι κατανομές χρόνου για τα διαφορετικά φίλτρα είχαν διαφορετική μορφή και τιμές χρόνων χαλάρωσης . Με μείωση της ακτίνας της πορώδους μεμβράνης η αργή κορυφή που αντιστοιχεί στα συσσωματώματα μειώνεται , ενώ αντιθέτως η ασθενής γρήγορη κορυφή που αντιστοιχεί σε κανονικά μόρια αυξάνεται ραγδαία . Τα διαφορετικά δείγματα ετεροξυλάνης με τη βοήθεια DLS και SLS και παρεκβολές σε μηδενικές γωνίες και συγκεντρώσεις απεδείχθη ότι έχουν παραπλήσιες τιμές για τα μέσα μοριακά βάρη  $\langle M \rangle_w$  , τους συντελεστές virial  $A_2$  , τις τετραγωνικές ρίζες για τις z – μέσες τιμές των τετραγώνων για τη γυροσκοπική και υδροδυναμική ακτίνα  $\sqrt{\langle R_g^2 \rangle_z}$  και  $\sqrt{\langle R_h^2 \rangle_z}$  αντίστοιχα . Οι συνθήκες εξαγωγής για την ετεροξυλάνη δεν επηρεάζουν λοιπόν τις διαστάσεις των ανεξάρτητων μακρομορίων με την προϋπόθεση ότι δεν υπάρχουν συσσωματώματα . Ωστόσο , όσο οι συνθήκες εξαγωγής όπως η θερμοκρασία γίνονται πιο έντονες , το μέσο μοριακό βάρος  $\langle M \rangle_w$  αυξάνεται λίγο . Οι χημικές ιδιότητες φαίνεται να είναι ανεξάρτητες από τις συνθήκες εξαγωγής , αλλά οι ιξώδεις ιδιότητες επηρεάζονται από αυτές . Έχει προταθεί ότι οι ετεροξυλάνες συναρμόζονται πάνω σε πρωτεΐνες του κυτταρικού τοιχώματος και μέσω εστερικών συνδέσμων στο κυτταρικό τοίχωμα που τις κάνουν να μοιάζουν με σκάλα . Οι αλκαλικές ουσίες διαρρηγνύουν τους εστερικούς δεσμούς και απελευθερώνουν το πολυμερές . Μετρήσεις ιξώδους έδειξαν ότι το πολυμερές καταλαμβάνει μικρότερο όγκο σε διάλυμα . Η αναλογία  $R_g / R_h$  που αποτελεί τον παράγοντα δομής  $\rho$  και που για όλα τα δείγματα παίρνει τιμή μεγαλύτερη του 1 , αποδεικνύει ότι το μόριο έχει τη μορφή τυχαίου κουβαριού (random coil) . Η ερμηνεία που δίνεται είναι ότι πολλές μικρές πλευρικές αλυσίδες ετεροξυλάνης συγκεντρώνονται γύρω από το σκελετό του μορίου και προκαλούν μια πιο πυκνή δομή . Η πιθανή δομή είναι το σταυρωτό μικκύλιο , το οποίο αναπτύσσει πλευρικές διαμοριακές ευθυγραμμίσεις και τμήματα ελεύθερης αλυσίδας που προσφέρουν συμπαγή δομή αλλά και σημαντική ευκινησία . Στο διάλυμα οι διαστάσεις του μακρομορίου εξαρτώνται από τις αλληλεπιδράσεις

τμήματος – τμήματος (σε ένα μόριο) και τμήματος – διαλύτη που εκφράζονται μέσω του παράγοντα διεύρυνσης  $\alpha$ . Για να εξαλειφθούν οι επιδράσεις του διαλύτη οι διαστάσεις του πολυμερούς υπολογίστηκαν με τη χρήση της εξίσωσης

$$\langle R_g^2 \rangle_z = \alpha^2 \langle R_{g\theta}^2 \rangle_z \quad (35)$$

Ο όρος  $\langle R_{g\theta}^2 \rangle_z$  είναι η συνιστώσα  $z$  της γυροσκοπικής ακτίνας στη «μη διαταραγμένη» κατάσταση, χωρίς επίδραση διαλύτη. Το  $\alpha$  μπορεί να υπολογιστεί με την εξίσωση Flory – Orofino.

$$A_2 = \frac{16\pi}{3^{3/2}} \frac{N}{\langle M_z \rangle^2} \langle R_g^2 \rangle_z^{3/2} \ln\left[1 + \frac{\sqrt{\pi}}{2} (\alpha^2 - 1)\right] \quad (36)$$

Τα  $\langle R_{g\theta}^2 \rangle_z$  βρέθηκαν παρόμοια σε όλα τα δείγματα και με συμπληρωματικές μετρήσεις ιξώδους αποδείχθη ότι οι ετεροξυλάνες είναι ημι-εύκαμπτα τυχαία coils.

Τα πολυμερή σχηματίζουν υπό κάποιες συνθήκες gel και αυτά τα συστήματα εμφανίζουν συνυπάρχουσες συμπεριφορές στερεού και υγρού σώματος. Λόγω των ιδιαίτερων χαρακτηριστικών του νερού ως διαλύτη η φαινομενολογία στα gel με διαλύτη νερό είναι πολύπλοκη και ενδιαφέρουσα και τα σώματα αυτά ονομάζονται hydrogels [13]. Υπάρχουν δυο βασικές κατηγορίες, τα χημικά hydrogels όπου το δίκτυο των χημικών γεφυρών που συνδέουν δυο αλυσίδες μπορούν να δημιουργηθούν με σταυρωτή σύνδεση ογκωδών πολυμερών σε διάλυμα και τα φυσικά hydrogels στα οποία οι αλυσίδες συγκρατούνται με αλληλεπιδράσεις διπόλου – διπόλου ή / και δεσμούς υδρογόνου. Η πυκνότητα των σταυρωτών συνδέσμων είναι σημαντική και για τα δυο είδη. Η DLS βοήθησε στον προσδιορισμό του δυναμικού παράγοντα δομής  $f(q,t)$  και στη συμπεριφορά του  $f$  για διαφορετικές γωνίες σκέδασης. Παρασκευάστηκε ένα χημικό hydrogel με τη βοήθεια πολυβινυλο-αλκοόλης (PVA). Η PVA υπέστη κάποια χημική τροποποίηση ώστε να σχηματιστούν διασταυρωνόμενες γέφυρες ανάμεσα στις αλυσίδες της. Το φυσικό hydrogel παρασκευάστηκε με ανάμειξη δυο φυσικών πολυμερών και κάποιες τροποποιήσεις. Τα δυο βιοπολυμερή είναι αμφότερα πολυσακχαρίτες, ξανθάνη και γλυκομαννάνη. Η παρουσία δεσμών υδρογόνου είναι υπεύθυνη για το σχηματισμό του δικτύου. Ο δυναμικός παράγοντας και για τα δυο είδη μειώνεται αρχικά με την πάροδο του χρόνου και στη συνέχεια σταθεροποιείται σε μια σταθερή τιμή  $f(q, \infty)$ .

Αυτό είναι αναμενόμενο για όλα τα gel γιατί ο  $f$  είναι σταθερός και δεν έχει σημαντικές διακυμάνσεις . Τα μόρια στα hydrogel έχουν κάποιες σχεδόν σταθερές θέσεις στο πλέγμα και μπορούν να κάνουν μόνο περιορισμένη κίνηση Brown . Αν με  $\langle I(q) \rangle_T$  συμβολίσουμε τη συνολική ένταση σκεδαζόμενου φωτός καλύπτοντας το χρονικό φάσμα και με  $\langle I(q) \rangle_E$  την αντίστοιχη ένταση που περιλαμβάνει το μέσο όρο όλης της συλλογής «ensemble» των μορίων , τότε ο λόγος  $Y$  είναι  $\langle I(q) \rangle_E / \langle I(q) \rangle_T$  . Ο κανονικοποιημένος δυναμικός παράγοντας για τα hydrogels είναι

$$f(q, t) = \frac{Y-1}{Y} + \frac{1}{Y} \sqrt{g_T^{(2)} - \sigma_1^{(2)}} \quad (37)$$

$g_T$  η χρονική συνάρτηση συσχέτισης και το  $\sigma_1^{(2)}$  είναι η μέση τιμή του τετραγώνου για τη διακύμανση της έντασης

$$\sigma_1^{(2)} = \frac{\langle I(q)^2 \rangle_T}{(\langle I(q) \rangle_T)^2} - 1 \quad (38)$$

Το μοντέλο που προτάθηκε για τη μελέτη λέει ότι τα μόρια σχηματίζουν ζεύγη από blobs . Το ζεύγος blob θεωρείται η κλασματική μονάδα για το δίκτυο του gel . Λόγω της συμπαγούς δομής , οι μεταφορικοί και περιστροφικοί τρόποι διάχυσης θεωρούνται παγωμένοι και η εσωτερική δυναμική του συστήματος αναφέρει  $N + 1$  διαδοχικά εσωκλειόμενα υπο-clusters . Υπάρχει δηλαδή μια ιεραρχία στα υπο-clusters που δηλώνεται από την ακτίνα τους . Το υπο-cluster με ακτίνα  $R_i$  εσωκλείεται στο αμέσως εξώτερο με ακτίνα  $R_{i+1}$  . Κάθε ένα από αυτά θεωρείται και ένας φθίνων αρμονικός ταλαντωτής με σταθερά ελατηρίου  $k_i$  και χρόνο χαλάρωσης  $\tau_i$  που συνδέονται ως εξής :  $\tau_i = 6\pi\eta R_i / k_i$  . Η μέση τιμή του τετραγώνου της διακύμανσης για τη μετατόπιση κάθε blob είναι το άθροισμα για όλες τις συνεισφορές των ταλαντωτών σε κάθε cluster  $\langle \Delta r_i^2(t) \rangle = \sum_{i=0}^N \langle \Delta r_i^2 \rangle$  . Η Δυναμική συμπεριφορά σε όλη τη χρονική περιοχή για αυτήν τη διακύμανση  $\Delta r$  είναι

$$\langle \Delta r_i^2(t) \rangle = \langle \Delta r_i^2 \rangle [1 - \exp(-t / \tau_i)] \quad (39)$$



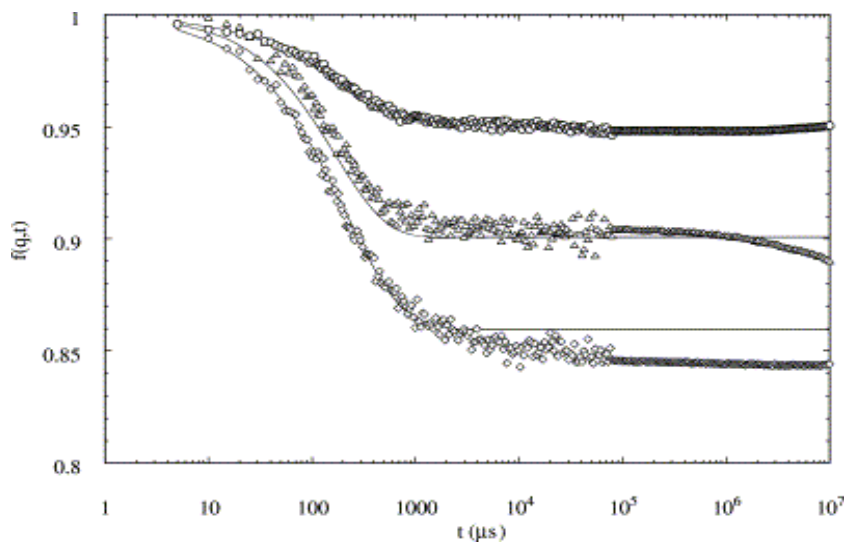
Αυτή είναι η συνεισφορά κάθε υποcluster στο φάσμα του χρόνου . Η παρακάτω εξίσωση περιγράφει τη συμπεριφορά όλων των υποclusters στη χρονική περιοχή .

$$\langle \Delta r^2(t) \rangle = \frac{3k_B T}{\beta k \ln(f)} [1 - \exp(-t/b\tau)^p] \quad (40)$$

Το  $3k_B T$  είναι η ενέργεια του αρμονικού ταλαντωτή (θεώρημα ισοκατανομής ενέργειας)  $k$  και  $\tau$  η σταθερά ελατηρίου και ο χρόνος χαλάρωσης για ΟΛΟ το cluster αντίστοιχα ,  $\beta$  και  $p$  χαρακτηριστικές παράμετροι για τις κλασματικές ιδιότητες του δικτύου ,  $f$  μια κλίμακα μεγέθους ίση με  $R_{i+1} / R_i$  . Η (40) δίνει έγκυρα αποτελέσματα σε χρόνους μέχρι  $10\tau$  . Με τις κατάλληλες τροποποιήσεις των (38) , (39) και (40) η γενική έκφραση για τον δυναμικό παράγοντα γίνεται

$$f(q,t) = \frac{S(q,t)}{S(q,0)} = \exp[-q^2 \frac{\langle \Delta r^2(t) \rangle}{6}] \quad (41)$$

Τα χημικά hydrogels PVA παρουσιάζουν εξάρτηση του δυναμικού παράγοντα  $f(q,t)$  με τη γωνία σκέδασης . Η πτώση του  $f$  με την πάροδο του χρόνου γίνεται όλο και πιο απότομα καθώς η  $\theta$  αυξάνεται .

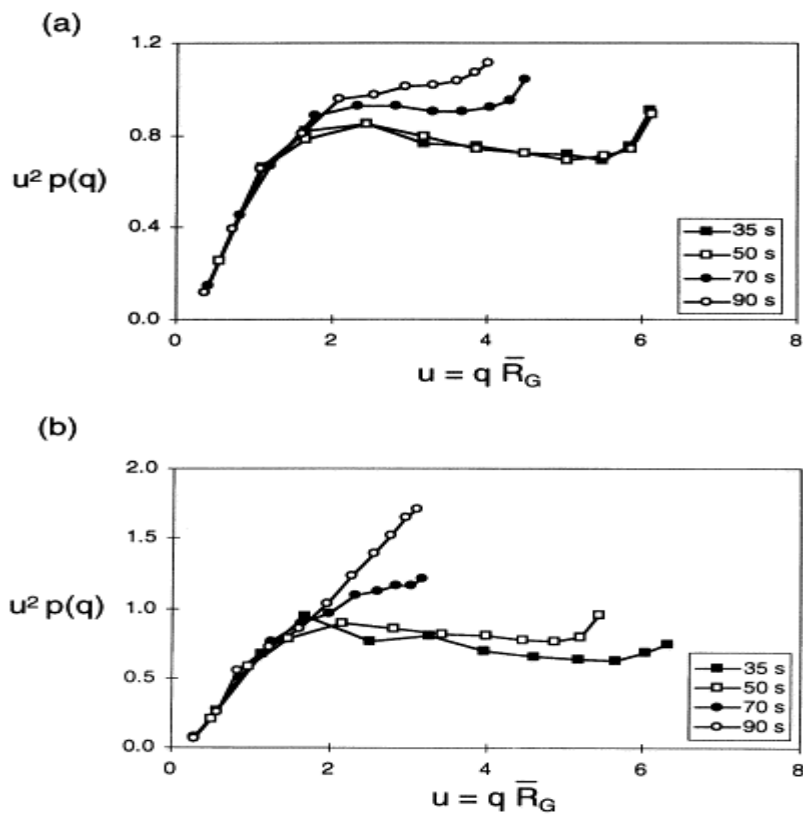


**Σχήμα 8 :** Δυναμικός παράγοντας  $f(q,t)$  συναρτήσεως χρόνου για  $\theta = 60^\circ$  (πάνω καμπύλη) ,  $70^\circ$  (μεσαία καμπύλη) &  $80^\circ$  (κάτω καμπύλη)

Με προσαρμογή στις καμπύλες αποδεικνύεται ότι οι χαρακτηριστικοί χρόνοι συσχέτισης δεν αλλάζουν με αυξανόμενη  $\theta$  . Παρόμοια συμπεριφορά εμφανίζει και το φυσικό hydrogel . Συμπερασματικά λοιπόν τα hydrogels είναι μη εργοδικά συστήματα δηλαδή η μέση χρονική τιμή της έντασης συσχέτισης φωτός για μια μόνο μέτρηση δεν είναι ίση με τη μέση τιμή της έντασης για όλη τη συλλογή σε αντίθεση με τα εργοδικά συστήματα . Οι τιμές για τις διαστάσεις του πλέγματος και οι χρόνοι συσχέτισης που υπολογίζονται από την τεχνική LS δείχνουν ότι οι πολυμερικές αλυσίδες φτιάχνουν δίκτυο και παρά την παρουσία 99.5 % (w/v) νερού είναι αρκετά άκαμπτο .

Οι μέθοδοι LS είναι χρήσιμο εργαλείο για τον προσδιορισμό της σύστασης ενός δυαδικού μείγματος πολυμερών [9,14] . Το άμυλο περιέχει δυο είδη μακρομοριακών α-γλυκανών , την αμυλόζη που είναι κυρίως γραμμική και την αμυλοπηκτίνη που έχει πολλές διακλαδώσεις . Τα δομικά στοιχεία των δυο συστατικών και η αναλογία κατά βάρος στο δείγμα επηρεάζει τη συμπεριφορά τους στο διάλυμα , όπως τις μοριακές διαστάσεις , την υδροδυναμική ακτίνα και την εσωτερική κινητικότητα . Με τη βοήθεια SLS τα μέσα μοριακά βάρη αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης βρέθηκαν στις περιοχές  $2.1 \cdot 10^6 - 2.0 \cdot 10^7$  g/mol και  $60 \cdot 10^6 - 110 \cdot 10^6$  g/mol αντίστοιχα . Οι γυροσκοπικές ακτίνες αμυλόζης και αμυλοπηκτίνης είναι 19-60 nm για την πρώτη και περίπου 220 nm για τη δεύτερη . Η αμυλόζη και η αμυλοπηκτίνη στην πραγματικότητα δε μπορούν ποτέ να διαχωριστούν πλήρως σε ένα δείγμα από άμυλο και αυτό που θα λάβουμε είναι ενδιάμεσα κλάσματα . Το συστατικό με το μεγαλύτερο ποσοστό κυριαρχεί στο φαινόμενο σκέδασης φωτός . Για την καλύτερη κατανόηση της συμπεριφοράς του αμύλου παρασκευάστηκαν 4 δείγματα , δυο πλούσια σε αμυλόζη και δυο πλούσια σε αμυλοπηκτίνη . Με δεδομένη τη σύσταση κατά βάρος για κάθε δείγμα και το μοριακό βάρος για κάθε συστατικό , υπολογίστηκε το μοριακό βάρος για το άμυλο . Με κατάλληλες παρεκβολές υπολογίστηκαν και οι  $R_g$  . Τα  $M_w$  για τα πλούσια σε αμυλοπηκτίνη δείγματα είναι 10 φορές μεγαλύτερα από τα φτωχά σε αμυλοπηκτίνη . Οι  $R_g$  για τα δείγματα με υψηλό ποσοστό αμυλοπηκτίνης βρέθηκαν 1.5 φορά μεγαλύτερες από τα άλλα . Είναι φανερό πως η σύσταση επηρεάζει τις ιδιότητες του αμύλου . Με τη βοήθεια log-log διαγραμμάτων για  $R_g$  συναρτήσει του μοριακού βάρους φαίνεται ότι όσο αυξάνεται το ποσοστό της αμυλόζης οι κλίσεις μετατοπίζονται σε χαμηλότερα μοριακά βάρη .

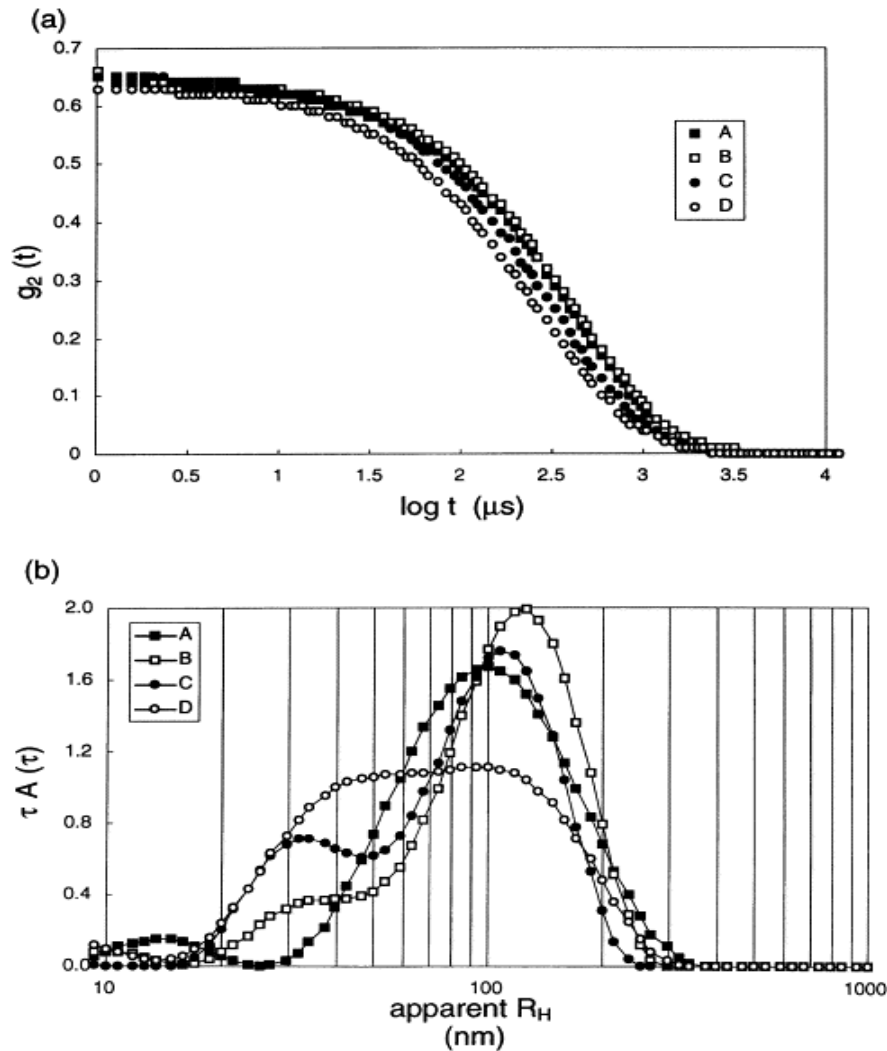
Αν η αλφαβητική σειρά A , B , Γ , Δ για τα δείγματα αντιπροσωπεύει την αύξηση του ποσοστού αμυλόζης , τότε για μια δεδομένη δομή  $R_g$  , το  $M_w$  μειώνεται με τη σειρά  $\Delta < \Gamma < B < A$  . Αυτό σημαίνει πως το Δ είναι λιγότερο πυκνό από το Γ και τα δείγματα A και B είναι τα πιο πυκνά . Κάθε δείγμα θερμάνθηκε και παρατηρήθηκε σε σχέση με τον παράγοντα σωματιδιακής σκέδασης  $P(q)$  και διαφορετικούς χρόνους θέρμανσης . Σε μικρούς χρόνους μέτρησης (π.χ. 35s) δεν αναμένεται να παρατηρηθεί αποικοδόμηση . Τα λεγόμενα διαγράμματα Kratky έχουν ως άξονα X το γινόμενο  $u = qR_g$  που σε αυτό το σύστημα είναι μεγαλύτερο του 1 και ως άξονα Y το γινόμενο  $u^2 P(q)$  . Παρακάτω απεικονίζονται τα αποτελέσματα στα δείγματα A και B για 4 διαφορετικούς χρόνους . Στα 35 s το  $u^2 P(q)$  σταθεροποιείται γρήγορα κάνοντας plateau . Στους μεγαλύτερους χρόνους θέρμανσης οι κλίσεις γίνονται πιο απότομες και ο άξονας Y παίρνει μεγαλύτερες τιμές αυξανόμενου του  $u$  . Παρόμοια συμπεριφορά για τους ίδιους χρόνους εμφανίζουν και τα δείγματα Γ και Δ . Η προτεινόμενη ερμηνεία είναι ότι η θέρμανση προκαλεί αποικοδόμηση . Η πυκνότητα διακλάδωσης μειώνεται γιατί σχηματίζονται μικρές ευθύγραμμες αλυσίδες . Τα Γ και Δ παρουσιάζουν μια ιδιορρυθμία γιατί η καμπύλη των 70 s φθίνει ελαφρώς πιο αργά από των 90 s . Ίσως η συσσωμάτωση αλυσίδων αμυλόζης που φτάνουν σε εκείνο το χρόνο το κατώφλι διάλυσης να αυξάνει προσωρινά τη συμπαγή δομή .



**Σχήμα 9 :** Διαγράμματα Kratky για τα δυο δείγματα φτωχά σε αμυλόζη A (πάνω) και B (κάτω) σε διαφορετικούς χρόνους θέρμανσης (35 , 50 , 70 , 90 s) .

Η εξάρτηση του παράγοντα σωματιδιακής σκέδασης  $P$  από το  $q$  είναι πολύ σημαντική γιατί μπορεί να δώσει πληροφορίες για τη δομή χωρίς επίγνωση της  $R_g$  . Ο  $P(q)$  περιγράφει τη γωνιακή κατανομή του σκεδαζόμενου φωτός . Από τη σχέση  $P(q) = R(q) / R(q=0)$  όπου το  $R(q = 0)$  είναι σταθερό και υπολογίζεται εύκολα , τότε μπορούν να υπολογιστούν τα διάφορα  $R(q)$  . Η κλίση της ευθείας σε ένα διάγραμμα  $\log R$  Vs  $\log q$  παρουσιάζει plateau σε υψηλές τιμές  $q$  . Η προσαρμογή αυτής της ασύμπτωτης δίνει απευθείας τη λεγόμενη κλασματική διάσταση  $d_f$  . Σε χαμηλούς χρόνους θέρμανσης όπου δεν υπάρχει αποικοδόμηση υπάρχει αισθητή διαφορά στις δυο ομάδες δειγμάτων . Οι τιμές  $d_f$  για τα φτωχά σε αμυλόζη A και B είναι παραπλήσιες με γνωστές τιμές για διασταυρωνόμενα clusters που είναι μετρίως διογκωμένα . Στα Γ και Δ οι τιμές  $d_f$  είναι μικρότερες και χαρακτηριστικές για γραμμική δομή . Καθώς αυξάνεται ο χρόνος θέρμανσης για τα A και B , η  $d_f$  μειώνεται γιατί οι γραμμικές αλυσίδες αμυλόζης αποκολλώνται από το μείγμα . Τα Γ και Δ ακολουθούν παρόμοια συμπεριφορά .

Οι υδροδυναμικές ακτίνες για τα δείγματα υπολογίστηκαν με DLS . Η  $R_h$  φαίνεται να ακολουθεί εκθετική εξάρτηση από το μοριακό βάρος  $R_h \sim M_w^\nu$  . Ο δείκτης  $\nu$  είναι περίπου ίδιος για τα A , B , Γ (~0.24) αλλά αισθητά μεγαλύτερος για το Δ (0.66) . Οι υδροδυναμικές ακτίνες στους περισσότερους χρόνους θέρμανσης ήταν μεγαλύτερες για τα A και B από τα Γ και Δ . Οι υπολογισμοί γίνονται πολύπλοκοι αν αναλογιστεί κανείς ότι τα μακρομόρια είναι τεράστια , δεν αποτελούν σημειακούς σκεδαστές και επομένως δε μπορούν να αγνοηθούν οι συνεισφορές των εσωτερικών τρόπων χαλάρωσης . Το Γ δηλαδή μπορεί να μην έχει απαραίτητα εξάρτηση από το τετράγωνο του  $q$  , αλλά μια μεταβαλλόμενη εκθετική εξάρτηση δηλαδή  $\Gamma \sim q^a$  . Από τα 35 έως τα 90 sec η τιμή του εκθέτη  $a$  μειώνεται για όλα τα δείγματα από τιμές 2.85 – 2.90 έως 2.62 – 2.74 . Η αναλογία αμυλόζη / αμυλοπηκτίνη επηρεάζει την «κατανομή» της υδροδυναμικής ακτίνας . Το παρακάτω σχήμα περιλαμβάνει τη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης για 4 δείγματα (α) και το γινόμενο  $\tau A(\tau)$  όπου  $\tau$  ο χρόνος χαλάρωσης και  $A(\tau)$  η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης συναρτήσει της  $R_h$  και για τα 4 δείγματα (β) . Οι μετρήσεις έγιναν στην ίδια γωνία σκέδασης ( $90^\circ$ ) και στον ίδιο χρόνο θέρμανσης (35 s) .



**Σχήμα 10 :** (a) Συνάρτηση αυτοσυσχέτισης έναντι χρόνου για τα A,B,C,D (b) Κατανομές χρόνων χαλάρωσης έναντι υδροδυναμικής ακτίνας για τα  $R_h$  (A,B,C,D)

Όλες οι καμπύλες στο (b) είναι αρκετά ευρείες με κορυφές γύρω στα 100 – 150 nm και ζώνη μεταξύ 0 και 350 nm . Το A περιέχει ελάχιστη αμυλόζη και έχει μόνο μια κορυφή . Τα B, Γ, Δ που έχουν περισσότερη αμυλόζη έχουν κατανομή με δυο περιοχές , εμφανίζουν δηλαδή έναν ώμο σε μικρές ακτίνες . Η ένταση του ώμου αυξάνεται από το B έως το Δ . Το τελικό συμπέρασμα από τα μαθηματικά δεδομένα είναι ότι η συμπεριφορά LS ελέγχεται από την αμυλοπηκτίνη σε χαμηλά ποσοστά

αμυλόζης (0 – 28.5 %) και ότι η αμυλόζη καθορίζει τα φαινόμενα σκέδασης φωτός όταν βρίσκεται σε ποσοστό 50 % , παρά το γεγονός ότι είναι μικρότερη σε μέγεθος από την αμυλοπηκτίνη .

## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ON</sup> : ΠΡΩΤΕΪΝΕΣ

### III) 2.α ΜΑΚΡΟΜΟΡΙΑ

Μια από τις πιο έντονα μελετημένες σφαιρικές πρωτεΐνες είναι η β-λακτοσφαιρίνη (β-Ig) που αποτελεί το κύριο συστατικό του ξινόγαλου . Στο μεγαλύτερο εύρος του pH η λακτοσφαιρίνη σχηματίζει ετερογενή gel με πυκνές πρωτεϊνικές περιοχές που μπορούν να ονομαστούν και τμηματικά gel . Είναι γνωστό ότι η σφαιρική πρωτεΐνη αποδιατάσσεται και σχηματίζει συσσωματώματα με αύξηση της θερμοκρασίας . Η συσσωμάτωση συμβαίνει σε δυο στάδια . Στο πρώτο σχηματίζονται τα πρωτογενή συσσωματώματα . Στο δεύτερο στάδιο σχηματίζονται τα δευτερογενή συσσωματώματα μέχρι να καταληφθεί όλος ο όγκος και να σχηματιστεί το gel . Επειδή όμως αυτό το δεύτερο στάδιο παρεμποδίζεται από ηλεκτροστατικές απώσεις πρέπει τα πρωτογενή συσσωματώματα να βρίσκονται σε χαμηλές συγκεντρώσεις και χαμηλή ιονική ισχύ . Τα πρωτεϊνικά gels όμως σε χαμηλή ιονική ισχύ έχουν τυρβώδη συμπεριφορά , γι' αυτό η μελέτη της λακτοσφαιρίνης έγινε με μια πιο σύγχρονη τεχνική DLS διασταυρωτής συσχέτισης (cross correlation) [15] . Δυο ταυτόχρονα πειράματα σκέδασης εκτελούνται πάνω στον ίδιο όγκο σκέδασης και με πανομοιότυπα κυματανύσματα  $q$  αλλά με τους 2 ανιχνευτές σε διαφορετικές θέσεις στο χώρο . Συσχετίζοντας τις εντάσεις μόνο απλά σκεδαζόμενα φωτόνια συνεισφέρουν στη συνάρτηση . Η συνεισφορά από την ανεπιθύμητη πολλαπλή σκέδαση των φωτονίων τα οποία δε θα συσχετιστούν , είναι μείωση στο τμήμα της συνάρτησης συσχέτισης . Επομένως η ένταση απλά σκεδαζόμενων φωτονίων μπορεί να αφαιρεθεί από τη μείωση του τμήματος της συνάρτησης .

Στα gel ένα κλάσμα των διακυμάνσεων στη συγκέντρωση χαλαρώνει πολύ αργά ή είναι στατικό στη χρονική κλίμακα του πειράματος . Για να εξασφαλίσουμε πλήρη χαλάρωση της συνάρτησης τα δείγματα περιστρέφονταν με αργό ρυθμό ώστε η ταχύτητα περιστροφής να καθορίζει την τελική χαλάρωση . Τα πρωτεϊνικά διαλύματα καθώς θερμαίνονται , περιέχουν ένα ενδογενές τμήμα από καθαρές πρωτεΐνες το οποίο φυσικά μειώνεται με το χρόνο . Η συνεισφορά τους όμως

στη σκέδαση είναι πολύ μικρή γιατί η ένταση των συσσωματωμάτων και του gel είναι πολύ μεγαλύτερη . Δηλαδή η εξάρτηση της I από το q αντιπροσωπεύει το δομικό παράγοντα των συσσωματωμένων ή πηκτών πρωτεϊνών . Ο δομικός αυτός παράγοντας συνδέεται με το μήκος συσχέτισης  $\xi$  με βάση τη θεωρία των Ornstein – Zernike

$$S(q) = \frac{1}{1 + q^2 \xi^2} \quad (42)$$

Τα  $\xi$  υπολογίστηκαν συναρτήσει του χρόνου θέρμανσης και της συγκέντρωσης . Σε υψηλές c το  $\xi$  αυξάνεται γρήγορα με το χρόνο θέρμανσης και σταθεροποιείται . Για χαμηλότερες c το  $\xi$  αυξάνεται συνεχώς με το χρόνο και δε σχηματίζει plateau . Ίσως αυτό να οφείλεται στο ότι το gel σχηματίζεται με πιο βραδύ ρυθμό . Η επίδραση της αραιώσης στο δομικό παράγοντα πρέπει να μελετηθεί πριν το σημείο πήξης γιατί το gel δε διογκώνεται σημαντικά . Το  $\xi$  υπολογίστηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις . Με αυξανόμενη αραιώση το  $\xi$  μεγαλώνει και κάποια στιγμή σταθεροποιείται . Η συσσωμάτωση των πρωτεϊνών κατά τη θέρμανση ελέγχεται από την ποσότητα . Η ακριβής μορφή του S(q) εξαρτάται από τη δομή των συσσωματωμάτων και την κατανομή μεγέθους τους . Τα συσσωματώματα είναι πολυδιάσπαρτα και γι' αυτό μικρά clusters μπορούν να διαπεράσουν τα μεγαλύτερα . Με αραιώση τα μικρά clusters αποκολλώνται από τα μεγαλύτερα και ο δομικός τους παράγοντας αποκαλύπτεται γι' αυτό το μήκος  $\xi$  μεγαλώνει . Το gel που τελικά σχηματίζεται όταν η θέρμανση προχωρήσει είναι αραιό και διάσπαρτο από τμήματα συσσωματωμάτων . Το τμήμα της πηκτής αυξάνεται όσο συνεχίζεται η θέρμανση . Πριν το σημείο πήξης οι τρόποι χαλάρωσης είναι συνεργειακή διάχυση και εσωτερική κίνηση . Κοντά στο σημείο πήξης οι χρόνοι χαλάρωσης είναι πολύ μεγάλοι και δεν είναι εύκολο να μελετηθούν γιατί περιλαμβάνουν διάχυση μεμονωμένων συσσωματωμάτων και ανακατανομή του gel .

Διάχυση δεξτράνης στο ανθρώπινο αίμα επηρεάζει πολύ το μεταβολισμό για τις λιποπρωτείνες χαμηλής πυκνότητας (Low Density Lipoprotein) . Η δεξτράνη δεσμεύεται ισχυρά με τις LDL και ο σχηματισμός του συμπλόκου απομακρύνει ως και το 40 % της LDL από το πλάσμα . Η υδροδυναμική ακτίνα για μια ανθρώπινη LDL βρέθηκε περίπου 12.9 nm με DLS και η  $R_g$  πάνω από 100 nm με SLS [16] . Μελετήθηκαν τα  $R_h$  για δεξτράνες διαφορετικού μοριακού βάρους σε συγκεκριμένη συγκέντρωση και τα αποτελέσματα ήταν 3.5 nm ( $M_w = 40000$ ) και 6.3 nm ( $M_w =$

70000) . Σε υψηλότερες συγκεντρώσεις δεξτράνης η ακτίνα μειώνεται . Πειράματα SLS στην λιποπρωτεΐνη στο ρυθμιστικό διάλυμα με  $pH = 7$  που γίνεται η μελέτη , απέδειξαν ότι τα μόρια σχηματίζουν συσσωματώματα . Η τεχνική SLS εφαρμόστηκε σε σύμπλοκα δεξτράνης – LDL στα δυο διαφορετικά  $M_w$  και σε δυο διαφορετικές συγκεντρώσεις δεξτράνης (10 και 50 g/l) . Διαγράμματα  $Kc/R(\theta)$  έναντι  $q^2$  για τα 4 δείγματα και για καθαρή LDL έδειξαν ότι η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός , η οποία είναι αντιστρόφως ανάλογη προς το  $Kc/R(\theta)$  σύμφωνα με τις εξισώσεις (24) – (26) είναι μικρότερη για την LDL από τα σύμπλοκα . Διαγράμματα κατανομής της έντασης έναντι της  $R_h$  για καθαρή LDL και για σύμπλοκο δείχνουν ότι υπάρχει μια ασθενής πρώτη περιοχή (μικρή ακτίνα) και στις δυο περιπτώσεις που αντιστοιχεί σε αναλλοίωτα σωματίδια LDL . Η δεύτερη κορυφή (μεγάλη ακτίνα) δείχνει τα συσσωματώματα και στην περίπτωση του συμπλόκου η ένταση της δεύτερης κορυφής αυξάνεται σε τεράστιο βαθμό . Ο παράγοντας μοριακό βάρος της δεξτράνης δεν επηρεάζει τις διαστάσεις του συμπλόκου ιδιαίτερα , το ίδιο και η συγκέντρωση της δεξτράνης . Σε όλες τις περιπτώσεις η  $R_h$  συμπλόκου είναι 68 – 77 nm και η γυροσκοπική ακτίνα 150 – 210 nm . Είναι φανερό ότι τα μόρια δεξτράνης όντως συσσωματώνονται με τις LDL και οι διαστάσεις αυξάνονται σημαντικά . Τα αποτελέσματα ωστόσο κρύβουν σημαντικά συστηματικά σφάλματα γιατί στα μείγματα οι ακτίνες μειώνονται σε σχέση με αραιά διαλύματα δεξτράνης . Η θεώρηση του ιξώδους μόνο για τον καθαρό διαλύτη επίσης δεν είναι ρεαλιστική και για αυτό έγιναν διορθώσεις με τη χρήση του «αποτελεσματικού» ιξώδους διάχυσης . Επίσης χαμηλές συγκεντρώσεις δεξτράνης είναι πιο αξιόπιστες για να μην υπερβούμε την κρίσιμη συγκέντρωση και βρεθούμε στην ημι-αραιά περιοχή . Τα συστηματικά σφάλματα μειώνουν τα αποτελέσματα για τις διαστάσεις . Η δεξτράνη θεωρείται ότι ουσιαστικά βοηθά τα μόρια LDL να αλληλεπιδράσουν μεταξύ τους . Η επίδραση της δεξτράνης σχηματίζει κάποιο σύμπλοκο όχι λόγω κάποιων αρνητικά φορτισμένων σουλφομάδων (όπως οι περισσότεροι πολυσακχαρίτες) , αλλά μέσω δυνάμεων Van Der Waals και ασθενών δεσμών υδρογόνου που αναπτύσσονται ανάμεσα στις LDL . Τα συσσωματώματα δε μπορούν να μελετηθούν με υπερφυγοκέντρωση ή ηλεκτροφόρηση γιατί οι μηχανικές και ηλεκτρικές δυνάμεις αυτών των μεθόδων καταστρέφουν τις ασθενείς διαμοριακές δυνάμεις ανάμεσα στα συσσωματώματα . Μόνο η τεχνική σκέδασης φωτός αφήνει τα σύμπλοκα αναλλοίωτα και επιτρέπει την παρατήρησή τους . Η σκέδαση φωτός είναι ακόμα πιο απλή και εύχρηστη από την ηλεκτρονική μικροσκοπία στην οποία τα δείγματα πρέπει να ξηραθούν στο κενό . Η



μελέτη απέδειξε ότι και μη σουλφουρωμένοι πολυσακχαρίτες επιδρούν με τις LDL και πειράματα *in vitro* απέδειξαν ότι τα συσσωματώματα LDL μπορούν να πάρουν διαστάσεις μέσης διαμέτρου έως και 5.6  $\mu\text{m}$ .

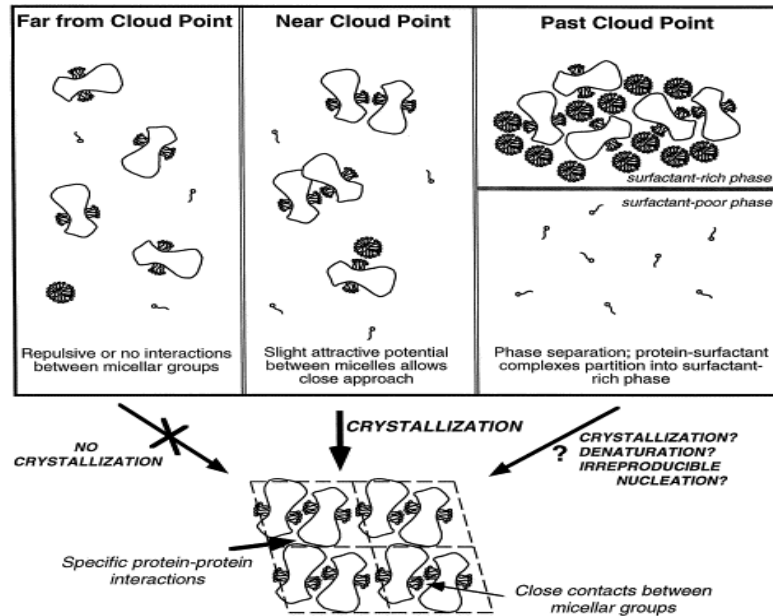
Μια άλλη μικρή σφαιρική πρωτεΐνη είναι ο αναστολέας της θρυψίνης που απομονώθηκε από βοδινό πάγκρεας (Bovine pancreatic trypsin inhibitor). Ο BPTI έχει μοριακό βάρος 6500 και είναι γνωστό ότι ολιγομερίζεται σε διαλύματα σχηματίζοντας έως και δεκαμερή. Ο ολιγομερισμός του και η αλληλεπίδρασή του με διάφορα μέσα εξαλάτωσης όπως NaCl ή φωσφορικά άλατα, μελετήθηκαν με τεχνική DLS [17]. Είναι γνωστό ότι παρουσία των αλάτων τα μόρια του BPTI κρυσταλλοποιούνται. Δοκιμάστηκαν διαφορετικές συγκεντρώσεις NaCl σε καθορισμένη συγκέντρωση BPTI και διαφορετικές συγκεντρώσεις μείγματος όξινων φωσφορικών αλάτων  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$ . Η κατεργασία με NaCl σχηματίζει κρύσταλλους μόνο σε  $\text{pH} = 4.6$  που έχουν τη μορφή κόλουρης διπυραμίδας (και από τις δυο κορυφές). Για μεγαλύτερο  $\text{pH}$  δεν παρατηρείται τίποτα εκτός για πολύ υψηλή συγκέντρωση άλατος. Αντιθέτως η προσθήκη  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  ευνοεί τον σχηματισμό κρυστάλλων όχι σε όξινο αλλά σε ουδέτερο  $\text{pH} = 7.0$  ή και σε ελαφρώς αλκαλικές τιμές  $\sim 8.3$ . Οι κρύσταλλοι έχουν σχήμα ραβδιού (rod). Επίσης σε  $\text{pH} = 10$  σχηματίστηκαν μικροκρύσταλλοι σε σχήμα δίσκου. Η εξάρτηση του συντελεστού διάχυσης  $D$  από τη συγκέντρωση του BPTI μετρήθηκε σε διαγράμματα που έγιναν και για τα δυο είδη αλάτων, σε  $\text{pH}$  που ευνοούσαν ή όχι την κρυσταλλοποίηση. Για το NaCl οι κλίσεις στις καμπύλες για ευνοϊκό ή μη  $\text{pH}$  διαφέρουν σημαντικά, όπως και οι τιμές παρεκβολής για να βρεθεί ο συντελεστής  $D_0$  σε άπειρη αραιώση. Στην περίπτωση των  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  ωστόσο οι καμπύλες δεν είχαν προφανείς διαφορές. Στη συνέχεια μελετήθηκε η εξάρτηση του  $D$  από τις συγκεντρώσεις των ηλεκτρολυτών σε διάφορες τιμές  $\text{pH}$ . Το NaCl και πάλι παρουσιάζει διαφοροποίηση, καθώς οι περισσότερες καμπύλες είχαν παρόμοια τιμή  $D$  για όλες τις συγκεντρώσεις αλλά για την ευνοϊκή τιμή  $\text{pH} = 4.6$  το  $D$  πέφτει ραγδαία με αυξανόμενη συγκέντρωση. Αντιθέτως κάθε καμπύλη  $\text{pH}$  για τα  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  δίνει παρόμοιες τιμές  $D$  αυξανόμενης της συγκέντρωσης αλάτων και μάλιστα οι τιμές σε όλες τις καμπύλες δε διαφέρουν σημαντικά. Η πιθανή ερμηνεία για την επιρροή των αλάτων στον BPTI είναι ότι με αλλαγές στο  $\text{pH}$ , το επιφανειακό φορτίο του μακρομορίου αλλάζει. Το φορτίο επιφανειακού δικτύου για τη συγκεκριμένη πρωτεΐνη είναι περίπου +8 για  $\text{pH} = 4.5$ , +5 για  $\text{pH} = 7.5$  και +4 για  $\text{pH} = 9.0$ . Όσο πιο όξινο το  $\text{pH}$  λοιπόν, τόσο περισσότερα θετικά φορτία έχει η επιφάνεια και τόσο

περισσότερα μικρά αρνητικά ιόντα χρειάζονται για να τα εξουδετερώσουν , ώστε να συμβεί η κρυσταλλοποίηση . Τα ανιόντα χλωρίου ευνοούν το φαινόμενο μόνο όταν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι ισχυρές (όξινο pH) , ενώ τα πιο ογκώδη φωσφορικά ιόντα φαίνεται ότι αποδίδουν μόνο όταν οι ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις είναι αδύναμες (αλκαλικό pH) .

Οι υδροδυναμικές ακτίνες για τα μονομερή της πρωτεΐνης δε διαφέρουν σημαντικά από το μέγεθος των κρυστάλλων που σχηματίζονται σε όλο το εύρος του pH παρουσία  $\text{NaH}_2\text{PO}_4 / \text{K}_2\text{HPO}_4$  (~1.4-1.5 nm) κάτι που συνηγορεί υπέρ του ότι ο κρύσταλλος είναι ένα μονομερές . Στην περίπτωση του NaCl για pH = 4.6 όμως , η  $R_h = 2.5$  nm που είναι συγκρίσιμη τιμή με δεκαμερή που είναι γνωστό ότι σχηματίζει ο BPTI (3.0 nm) σε διαλύματα άλλων ηλεκτρολυτών όπως KSCN . Είναι πιθανό ότι η ενδιάμεση αυτή τιμή δηλώνει τη συνύπαρξη μονομερών και δεκαμερών κρυστάλλων . Η κρυσταλλοποίηση στην περίπτωση του NaCl γίνεται όταν τα επιφανειακά φορτία των BPTI είναι υψηλά , δηλαδή ο σχηματισμός του δεκαμερούς ευνοείται από ηλεκτροστατικές αλληλεπιδράσεις . Η συγκέντρωση του NaCl όμως πρέπει να είναι υψηλή ώστε να υπάρχει αποτελεσματική εξουδετέρωση ειδήλλως το δεκαμερές δε σχηματίζεται . Υψηλότερα pH επίσης δε βοηθούν τον ολιγομερισμό . Τα χλωρο-ιόντα πιθανώς να μην καλύπτουν μόνο τις μακρομοριακές επιφάνειες αλλά και να γεφυρώνουν τις επιφάνειες σε ένα δεκαμερές . Τα φωσφορικά ιόντα δε μπορούν να λειτουργήσουν ως γέφυρες λόγω του ογκώδους μεγέθους τους και για αυτό δε σχηματίζουν δεκαμερή . Οι μηχανισμοί είναι οπωσδήποτε διαφορετικοί για τους δυο ηλεκτρολύτες . Οι παράμετροι  $k_d$  (αναλογία D και συγκέντρωσης) υπολογίζονται αρνητικοί σε όλα τα διαλύματα άλατος , δηλαδή οι αλληλεπιδράσεις είναι αρνητικές . Στην περίπτωση των δεκαμερών οι τιμές είναι κατ' απόλυτη τιμή μικρότερες από τα μονομερή , ίσως λόγω χαμηλότερης συγκέντρωσης των δεκαμερών . Το γεγονός ότι η συγκέντρωση των φωσφορικών δεν επηρεάζει το D σε κανένα pH υποδεικνύει ότι η αλληλεπίδραση άλατος – BPTI δεν είναι ηλεκτροστατικής φύσεως όπως στο NaCl , αλλά η κρυσταλλοποίηση ίσως να είναι αποτέλεσμα άλλων δυνάμεων όπως υδροφοβικές έλξεις ή δεσμοί υδρογόνου .

Τα detergents (απορρυπαντικά) χρησιμεύουν για να διαλυτοποιήσουν και να καθαρίσουν μεμβρανικές πρωτεΐνες . Τα detergents σχηματίζουν σύμπλοκα με τις πρωτεΐνες δεσμευόμενα στην επιφάνειά τους . Για αυτό το λόγο η κρυσταλλοποίηση των μεμβρανικών πρωτεϊνών γίνεται στην πραγματικότητα παρουσία detergents [18] .

Τα σύμπλοκα αυτά αποτελούνται έως και 50 % από μικκύλια που σχηματίζουν τα detergents . Επομένως η συνεισφορά τους στη σκέδαση φωτός του δείγματος είναι πολύ σημαντική και δε μπορεί να αγνοηθεί . Για να σχηματίσει μια διαλυτή πρωτεΐνη κρυστάλλους θα πρέπει να ευνοηθούν οι επαφές πλέγματος πρωτεΐνης – πρωτεΐνης . Για τα σύμπλοκα αυτά , ίση προσοχή πρέπει να δοθεί στην προσέγγιση των επιφανειών των detergents . Δηλαδή πρέπει να χρησιμοποιηθεί κάποιο μέσο που να εξασφαλίσει την αλληλεπίδραση και για τα δυο τμήματα του συμπλόκου . Για να προσδιοριστεί το πρόβλημα , είναι σημαντικό να αναλυθεί το φαινόμενο του σημείου νέφους των detergents . Τα μικκύλια σε ένα ιδανικό διάλυμα δεν αλληλεπιδρούν αρκεί η συγκέντρωση των μικκυλίων να μην ξεπερνά μια κρίσιμη τιμή (CMC) . Μεταβάλλοντας όμως τις συνθήκες όπως τη θερμοκρασία , συμβαίνει μια μεταβατική τυρβώδης δραστηριότητα που τελικά διαχωρίζει το μείγμα σε δυο διακριτές φάσεις . Η μια περιέχει ουσιαστικά όλη την ποσότητα detergent στη μορφή συσσωματωμένων μικκυλίων και η άλλη είναι ουσιαστικά απαλλαγμένη από detergent . Το σημείο που υπάρχει αυτή η τυρβώδης δραστηριότητα ονομάζεται σημείο νέφους . Το σημείο νέφους αντιπροσωπεύει ουσιαστικά ένα όριο συνδιάλυσης όπου τα detergents συσσωματώνονται . Μακριά από το σημείο νέφους τα μικκύλια αναπτύσσουν απωστικές δυνάμεις ανάμεσα στα επιφανειακά detergents και δεν επιτρέπουν κοντινές επαφές . Πέρα από το όριο συνδιάλυσης οι μεμβρανικές πρωτεΐνες κατανέμονται στην πλούσια σε detergent φάση . Αυτό ενδεχομένως τις αποδιατάσσει και συμβαίνει μη αντιστρεπτή πυρήνωση . Μόνο όταν βρισκόμαστε κοντά στο σημείο νέφους , χωρίς να το ξεπερνάμε , αναπτύσσονται οι επιθυμητές διαμικκυλιακές ασθενείς δυνάμεις που επιτρέπουν την εγγύτητα των συμπλόκων χωρίς τον ανεπιθύμητο διαχωρισμό των φάσεων . Μόνο υπό αυτές τις συνθήκες όπου επικρατούν ενδιάμεσες ελκτικές δυνάμεις μπορεί να υπάρξει αποτελεσματική κρυσταλλοποίηση . Αυτό συμβαίνει γιατί ο προσανατολισμός και η ισχύς των διαμοριακών δυνάμεων είναι κατάλληλα ώστε να ευνοείται το στενό πακετάρισμα . Στις διαχωρισμένες φάσεις όμως αυτό δε μπορεί να συμβεί γιατί οι ελκτικές δυνάμεις είναι τόσο ισχυρές που ο προσανατολισμός είναι άτακτος και επιπλέον υπάρχει μεγάλη ποσότητα από μικκύλια που αποτελούνται μόνο από detergents . Η τόσο μεγάλη πυκνότητα καθώς και η πιθανή αποδιάταξη των πρωτεϊνών μειώνει την πιθανότητα για σχηματισμό κρυστάλλων . Όλα αυτά παριστάνονται στο παρακάτω σχήμα :



**Σχήμα 11 :** Σχηματική απεικόνιση των αποτελεσμάτων των διαμικκυλιακών αλληλεπιδράσεων στην κρυσταλλοποίηση συμπλόκων detergents – μεμβρανικών πρωτεϊνών.

Από την εξίσωση (24) φαίνεται ότι η συγκέντρωση είναι ανάλογη προς τον δεύτερο συντελεστή virial  $A_2$  ο οποίος ως μέτρο των διαμοριακών δυνάμεων είναι πολύ χρήσιμος . Ωστόσο στην περίπτωση αυτών των συστημάτων οι υπολογισμοί δεν είναι τόσο εύκολοι γιατί υπάρχουν δυο είδη που σκεδάζουν το φως . Αν δεν υπήρχε πρωτεΐνη οι μόνοι σκεδαστές θα ήταν τα μικκύλια των detergents . Συμβατικά η καθαρή συγκέντρωση της πρωτεΐνης (δηλαδή των μικκυλίων που περιέχουν την πρωτεΐνη) βρίσκεται αφαιρώντας από τη συνολική συγκέντρωση των detergents τη CMC . Με τροποποίηση της εξίσωσης (24) μπορούμε να βρούμε τη σκεδαζόμενη ένταση αν συμβολίσουμε τη συγκέντρωση του υπό μελέτη συμπλόκου με  $c_p$  γιατί αντανακλά τη συγκέντρωση της πρωτεΐνης .

$$\frac{Kc_p}{R_{90}} = \frac{1}{M_w} + 2A_2(1 + \delta)^2 c_p \quad (43)$$

$\delta$  η αναλογία βάρους detergent / πρωτεΐνη και  $90$  η γωνία σκέδασης . Πρόσθετα αντιδραστήρια στο διάλυμα που να ευνοούν την καθίζηση αλλάζουν την τιμή του  $A_2$  . Η κλίση της ευθείας στο διάγραμμα  $Kc_p/R_{90}$  έναντι  $c_p$  , δηλαδή ο  $A_2$  , μειώνεται ραγδαία με την προσθήκη ενός τέτοιου αντιδραστηρίου (π.χ. PEG) και μπορεί

μάλιστα να πάρει και αρνητικές τιμές . Ενδιαφέρον είναι και το φαινόμενο προσθήκης PEG σε ιδανικά διαλύματα σκέτων detergents . Πριν την προσθήκη δεν υπάρχουν αλληλεπιδράσεις και ο  $A_2 \approx 0$  . Με προσθήκη PEG ο  $A_2$  μειώνεται σε αρνητικές τιμές . Το γεγονός αυτό σε συνδυασμό με το ότι οι τιμές  $A_2$  που υπολογίζονται για τα σύμπλοκα είναι αξιοσημείωτα παρόμοιες με αυτές που υπολογίζονται για τα σκέτα detergents , **μας οδηγούν στο συμπέρασμα ότι η συνεισφορά των detergents στο συνολικό ελκτικό δυναμικό μεταξύ των σωματιδίων είναι πολύ πιο σημαντική από τη συνεισφορά των πρωτεϊνών και ίσως να είναι η επικρατούσα** . Για να μπορέσουμε να πετύχουμε τον προσδιορισμό του σημείου νέφους και κατά συνέπεια την κρυσταλλοποίηση πρέπει να βρεθούν οι άριστες τιμές  $A_2$  . Αυτό όμως είναι δύσκολο γιατί αυτές οι τιμές κυμαίνονται σε πολύ στενές περιοχές και δε μπορούν να προσδιοριστούν άνετα .

### III) 2.β ΚΟΛΛΟΕΙΔΗ / CLUSTERS

Τα κολλοειδή συσσωματώματα ή clusters που σχηματίζονται εντάσσονται σε δυο βασικές κατηγορίες ανάλογα με το μηχανισμό σχηματισμού τους . Υπάρχει η συσσωμάτωση cluster που ρυθμίζεται από τη διάχυση και η συσσωμάτωση cluster που ρυθμίζεται από την αντίδραση . Στην πρώτη περίπτωση τα clusters κινούνται μόνο εξαιτίας φαινομένου Brown και σχηματίζουν μεγαλύτερο cluster αν συγκρουστούν . Η δεύτερη περίπτωση συμβαίνει όταν οι κρούσεις δεν σχηματίζουν όλες καινούριους δεσμούς , δηλαδή χρειάζεται μεγάλος αριθμός κρούσεων για να κολλήσουν τα clusters . Η DLS μπορεί να προσδιορίσει το μέσο συντελεστή διάχυσης αθροίζοντας όλους τους συντελεστές διάχυσης για κάθε ένα σωματίδιο ανά αριθμό σε ένα σύστημα από κολλοειδή κόμματα [19] . Η SLS παρέχει τις κλασματικές διαστάσεις των clusters . Το μοντέλο που προτείνεται αφορά πολλαπλές επαφές ανάμεσα στα clusters , ότι δηλαδή δεν αρκεί μόνο μια επαφή και ένας δεσμός ανάμεσα σε δυο μονομερή για σχηματιστεί σταθερό cluster . Λαμβάνονται υπόψη έτσι οι αλληλεπιδράσεις μονομερούς – μονομερούς καθώς και αλληλεπιδράσεις μεταξύ cluster που αυξάνουν την πιθανότητα περαιτέρω συσσωμάτωσης . Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός με δεδομένη κατανομή μεγέθους  $N_n$  , όπου n ο αριθμός των

μονομερών σωματιδίων σε κάθε cluster , σχετίζεται με τους δομικούς παράγοντες σύμφωνα με την ακόλουθη αναλογία .

$$I \sim \sum_{n=1}^{\infty} N_n n^2 S(qR_g) P(qR_0) \quad (44)$$

S και  $R_g$  ο δομικός παράγοντας και η γυροσκοπική ακτίνα του cluster και P και  $R_0$  τα αντίστοιχα μεγέθη για το μονομερές . Αν θεωρήσουμε ότι οι διαστάσεις του μονομερούς είναι πολύ μικρότερες από το μήκος κύματος και από τις διαστάσεις του cluster , τότε ο P γίνεται 1 και η (44) γίνεται  $I \sim (qR_g)^{-d_f}$  , όπου ο εκθέτης  $d_f$  είναι η κλασματική διάσταση . Σύμφωνα με το μοντέλο , η ταχύτητα χαλάρωσης  $\Gamma$  που θα υπολογίσει η DLS συνδέεται με τους μεταφορικούς και περιστροφικούς συντελεστές διάχυσης για ένα cluster n μονομερών με τη σχέση  $\Gamma_n = D_n q^2 + 6D_n^{\text{rot}}$  . Αν ο πρώτος όρος είναι πολύ μεγαλύτερος από το δεύτερο τότε η συνάρτηση συσχέτισης θα εξαρτάται από το συντελεστή μεταφορικής διάχυσης μόνο . Η κινητική της συσσωμάτωσης περιγράφεται επιτυχημένα από την εξίσωση ταχύτητας του Smoluchowski

$$\frac{dN_n}{dt} = \frac{1}{2} \sum_{i+j=n} k_{ij} N_i N_j - N_n \sum_{i=1}^{\infty} k_{in} N_i \quad (45)$$

Η εξίσωση αυτή ισχύει για αραιά διαλύματα και με την προϋπόθεση ότι δε συμβαίνει θραυσματοποίηση των clusters μετά την κρούση . Ο συντελεστής συσσωμάτωσης  $k_{ij}$  ποσοτικοποιεί την ταχύτητα με την οποία δυο clusters με μεγέθη i και j συγκρούονται σχηματίζοντας συσσωμάτωμα μεγέθους i+j . Το  $k_{ij}$  είναι ο μέσος όρος πιθανών προσανατολισμών και κατευθύνσεων της ταχύτητας συσσωμάτωσης για δυο συγκεκριμένα clusters που συγκρούονται . Ο πρώτος όρος περιγράφει την ταχύτητα συγκρούσεων για αλληλεπίδραση όλων των πιθανών ζευγών σωματιδίων (και για στατιστικούς λόγους διαιρείται με 2 για να απαλειφθούν τα επαναλαμβανόμενα ζεύγη π.χ 1 - 2 , 2 - 1) και ο δεύτερος όρος περιγράφει την ταχύτητα σύγκρουσης ενός cluster με όλα τα υπόλοιπα (και αφαιρείται επίσης για στατιστικούς λόγους) . Το μοντέλο Brown (το οποίο ωστόσο είναι ανεπαρκές γιατί θεωρεί ότι όλες οι κρούσεις

είναι επιτυχημένες καθώς και ότι όλα τα μόρια είναι συμπαγείς σφαίρες) δίνει την αναλυτική μορφή  $k_{ij} = 4\pi(D_i + D_j)(R_i + R_j)$  όπου R οι ακτίνες των σφαιρών .

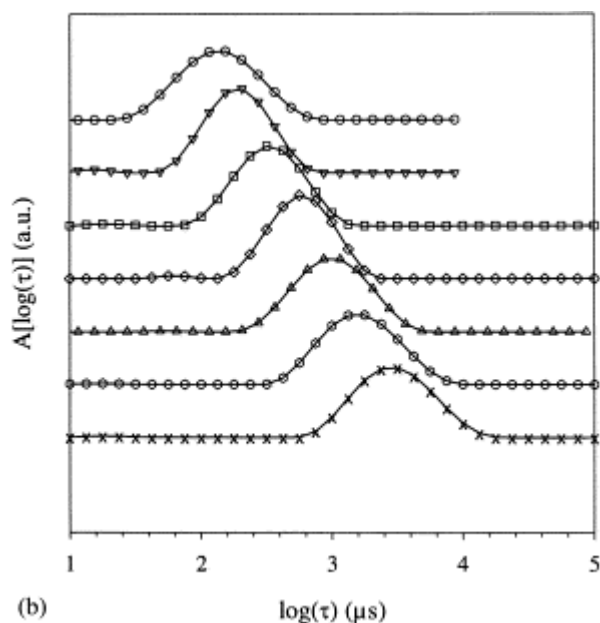
Τα πειράματα έγιναν παρουσία ηλεκτρολύτη KBr . Οι  $d_f$  υπολογίστηκαν με διάγραμμα  $I(q)$  έναντι  $q^2$  . Η συγκέντρωση KBr επηρέαζε τις διαστάσεις καθώς και τις σταθερές κρούσεων  $k$  . Αυξανόμενης της [KBr] η  $d_f$  μειώνεται ενώ αντιθέτως η ταχύτητα συσσωμάτωσης αυξάνεται . Οι συντελεστές διάχυσης D (αγνοώντας την πολύ αργή περιστροφική διάχυση) υπολογίζονται απευθείας ως κλίσεις των διαγραμμάτων  $\Gamma$  Vs  $q^2$  . Η χρονική εξέλιξη των συντελεστών D παρακολούθηθηκε και με τα δυο μοντέλα για διαφορετικές ποσότητες ηλεκτρολύτη . Η καλύτερη συμφωνία μεταξύ πειραματικών δεδομένων , μοντέλου Brown και μοντέλου πολλαπλών κρούσεων συμβαίνει σε υψηλή [KBr] . Όσο μειώνεται όμως η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη , τόσο μεγαλύτερη απόκλιση υπάρχει μεταξύ του μοντέλου Brown και των πειραματικών δεδομένων . Το μοντέλο πολλαπλών κρούσεων εξακολουθεί να έχει καλή ταύτιση . Όσο μειώνονται τα μόρια του ηλεκτρολύτη στο διάλυμα οι απωστικές δυνάμεις των μακρομορίων γίνονται πιο σημαντικές . Οι δυνάμεις αυτές μειώνουν την πιθανότητα σύνδεσης δυο μονομερών . Επίσης οι καμπύλες Brown σε μικρούς χρόνους έχουν μικρότερες τιμές από τις καμπύλες Πολλαπλών Κρούσεων , ενώ σε μεγαλύτερους χρόνους η τάση αυτή αντιστρέφεται . Αυτό σημαίνει ότι σε πρώιμα στάδια που σχηματίζονται μικρά συσσωματώματα το μοντέλο Brown προβλέπει υψηλές ταχύτητες , ενώ η θεωρία Πολλαπλών Κρούσεων προβλέπει υψηλές ταχύτητες στα καθυστερημένα στάδια όπου σχηματίζονται μεγάλα συσσωματώματα , αφού πια έχουν γίνει πολλές κρούσεις και το ποσοστό των ενεργών κρούσεων αυξηθεί σημαντικά . Οι κλασματικές διαστάσεις και οι σταθερές ταχύτητας απέδειξαν ότι το κόμμι έχει ενδιάμεσο μηχανισμό συσσωμάτωσης , δηλαδή βρίσκεται στην ενδιάμεση περιοχή συσσωμάτωσης η οποία δε ρυθμίζεται ούτε από την αντίδραση , αλλά ούτε από τη διάχυση . Ο καθοριστικός παράγοντας φαίνεται πως είναι τελικά οι διασωματιδιακές απώσεις .

Το μοριακό βάρος μπορεί επίσης να παίζει καθοριστικό ρόλο στη διαδικασία συσσωμάτωσης . Οι Carrageenans είναι μια οικογένεια γραμμικών σουλφο-υποκατεστημένων γαλακτανών που απομονώνονται από τα κόκκινα φύκια . Οι κ-carrageenans προκύπτουν από τροποποίηση παραγώγων της γαλακτόζης . Είναι γνωστό ότι παρουσία KBr οι γαλακτάνες αυτές συσσωματώνονται . Η σκέδαση φωτός έχει αποδείξει ότι σε χαμηλές συγκεντρώσεις η συσσωμάτωση είναι σχεδόν

ανεξάρτητη από τη θερμοκρασία και τα συσσωματώματα έχουν σχήμα ραβδιού . Η δυναμική και η στατική σκέδαση μπορούν να περιγράψουν τη συμπεριφορά των συσσωματωμάτων σε διαφορετικούς ηλεκτρολύτες [20] . Τα δείγματα επεξεργάστηκαν με υπέρηχο σε διαφορετικούς χρόνους . Με αυξανόμενο χρόνο παραμονής στον υπέρηχο τα  $M_w$  , οι  $R_g$  &  $R_h$  μειωνόντουσαν και οι συντελεστές διάχυσης αυξάνονταν . Οι ηλεκτρολύτες που χρησιμοποιήθηκαν είναι NaCl και NaI . Το NaCl είναι γνωστό ότι προκαλεί δομή coil και το NaI δομή έλικας . Αξιοσημείωτα , τα αντίστοιχα δείγματα (π.χ.  $t = 5 \text{ min}$ ) για τους δυο ηλεκτρολύτες εμφάνιζαν παρόμοιες τιμές σε όλες τις άνωθεν ιδιότητες (μοριακό βάρος κτλ.) . Η γυροσκοπική ακτίνα για τα δείγματα μπορεί εύκολα να υπολογιστεί από τις παραμέτρους των διαγραμμάτων Zimm . Η γυροσκοπική ακτίνα εμφανίζει έντονη μείωση με αυξανόμενη συγκέντρωση . Αυτό τουλάχιστον ισχύει για τα δείγματα με μικρό χρόνο παραμονής στον υπέρηχο . Τα δείγματα που παρέμειναν πολλή ώρα στον υπέρηχο (30 ή 120 λεπτά) δεν παρουσιάζουν καμία μεταβολή με τη συγκέντρωση και είναι τα δείγματα με τα μικρότερα μοριακά βάρη αφού τα δείγματα αποικοδομούνται με τον υπέρηχο . Το NaI δεν ευνοεί τη συσσωμάτωση των ελικοειδών μορίων όμως ενδέχεται να προκαλεί αντιστρεπτό ολιγομερισμό . Επειδή οι τιμές γυροσκοπικών *και* υδροδυναμικών ακτίνων είναι πολύ κοντά για τις δυο γεωμετρίες , η διαφορά στο σχήμα μπορεί να ερμηνευτεί μόνο μέσω διαφορετικού υδροδυναμικού όγκου . Τα μοριακά βάρη διαφέρουν κάπως και συγκεκριμένα από 10000 έως 60000 . Στις ελικοειδείς μορφές (NaI) τα  $M_w$  είναι πάντοτε λίγο μεγαλύτερα από τις coil (NaCl) . Επειδή μοριακό βάρος και υδροδυναμικός όγκος είναι ανάλογα , ο  $V_h$  είναι μεγαλύτερος για την έλικα από το coil . Επίσης οι συντελεστές virial  $A_2$  είναι μικρότεροι στην περίπτωση της έλικας .

Η DLS δίνει τη χρονική εξέλιξη της συνάρτησης συσχέτισης και με τη βοήθεια αλγόριθμων όπως το REPES μπορούμε να μελετήσουμε την κατανομή του χρόνου χαλάρωσης  $A(\log t)$  συναρτήσει του χρόνου για διάφορες γωνίες . Σε κανένα από τα παρακάτω διαγράμματα δεν υπάρχει δεύτερη (αργή) κορυφή που θα υποδείκνυε παρουσία cluster . Οι κορυφές δίνουν το χαρακτηριστικό χρόνο χαλάρωσης .



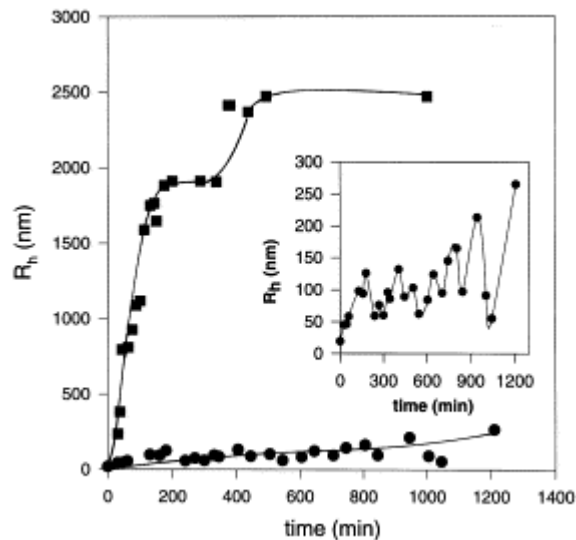


**Σχήμα 12 :** Κατανομές χρόνων χαλάρωσης από προσαρμογή συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης με REPES για διαφορετικές γωνίες σκέδασης ( $27^\circ$  ,  $37^\circ$  ,  $47^\circ$  ,  $62^\circ$  ,  $82^\circ$  ,  $113^\circ$  ,  $142^\circ$  από κάτω προς τα πάνω) . Τα δείγματα είναι κ-carrageenan ίδιας συγκεντρώσεως , χωρίς κατεργασία με υπέρηχο , παρουσία 0.1 M NaCl (coil) .

Το πλάτος των κορυφών βέβαια δεν είναι το ίδιο για δομή έλικας και coil . Στα coil όπως βλέπουμε και από το σχήμα ο  $\tau$  μετατοπίζεται σε μικρότερες τιμές με αύξηση της  $\theta$  . Αντιθέτως τα φάσματα της έλικας είναι πιο ευρεία δηλαδή κατευθύνονται και σε μεγαλύτερους και σε μικρότερους  $\tau$  . Φαίνεται πως παρουσία NaI σχηματίζονται όντως ολιγομερή (μικρή μετατόπιση σε μεγαλύτερους  $\tau$ ) . Με αυξανόμενη συγκέντρωση και συνεπώς αυξανόμενη ιονική ισχύ , τα ιόντα  $\Gamma$  εξομαλύνουν ένα μέρος των διασωματιδιακών απόσεων όπως φαίνεται και από τη μείωση του  $A_2$  . Η κινητική της συσσωμάτωσης των γαλακτανών , που έγινε υπό ειδικές συνθήκες , μελετήθηκε σε διαφορετικές θερμοκρασίες και χρόνους υπερηχητικής κατεργασίας . Παρουσία KCl και σε θερμοκρασίες κάτω από ένα όριο οι γαλακτάνες συσσωματώνονται εξαιτίας της μετάβασης coil – έλικα . Αυτό οδηγεί τις αλυσίδες σε στοίβαξη σχηματίζοντας ημι-άκαμπτες «δεσμίδες» . Η ταχύτητα της συσσωμάτωσης επηρεάζεται από τους υπέρηχους ή τη θερμοκρασία αλλά η δομή των συσσωματωμάτων παραμένει πάντοτε η ίδια . Αυτό αποδεικνύεται από τη μορφή της καμπύλης σε διαγράμματα  $I / C$  έναντι  $q$  για τους διαφορετικούς χρόνους υπερηχητικής επεξεργασίας . Οι τιμές στον  $Y$  μεταβάλλονται αλλά οι κλίσεις είναι γενικά οι ίδιες .

### ΜΕΡΟΣ 3<sup>ON</sup> : ΒΙΟΛΟΓΙΚΑ ΣΥΣΤΗΜΑΤΑ

Οι μελαμίνες είναι πασίγνωστες χρωστικές αλλά η δομή τους και η λειτουργία τους δεν έχει γίνει ακόμα κατανοητή . Θεωρείται ότι είναι μείγματα παρόμοιων πολυμερών που συνδέονται με σταθερούς δεσμούς . Οι δομικές μονάδες φαίνεται ότι είναι δακτύλιοι που μοιάζουν με ινδόλια και συνδέονται με τυχαίες διαμορφώσεις , σταυρωτές ή πασσαλωτές . Η βιοσυνθετική της πορεία είναι αρκετά πολύπλοκη , ωστόσο είναι γνωστό ότι το πρώτο βήμα καταλύεται από το ένζυμο Τυροσινάση που μετατρέπει την τυροσίνη σε DOPA . Με τη βοήθεια των SLS και DLS προσδιορίστηκαν τα  $M_w$  ,  $R_g$  &  $R_h$  για τρία είδη μελαμίνης , ένα φυσικό από τους μελανόσακους της σουπιάς και δυο συνθετικά που παρασκευάστηκαν υπό διαφορετικές συνθήκες pH και ιονικής ισχύος [21] . Τα συνθετικά δείγματα παρασκευάστηκαν με αυτοοξειδωση της DOPA υπό κατάλληλες συνθήκες ή με ενζυματική οξείδωση με τη βοήθεια της Τυροσινάσης . Οι μελαμίνες είναι γνωστό ότι συσσωματώνονται και καθιζάνουν υπό μορφή κόκκων . Με την παραδοχή ότι η κίνηση για σφαίρες είναι μονάχα Brown , η DLS υπολογίζει το μέσο συντελεστή μεταφορικής διάχυσης με τη βοήθεια της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης. Η σχέση που τα συνδέει είναι  $g(t) = \exp(-2q^2Dt)$  για αραιό διάλυμα με σφαιρικούς σκεδαστές . Με υπολογισμό του  $D$  , η  $R_h$  προκύπτει εύκολα από την (32) . Η χρονική συμπεριφορά της  $R_h$  περιγράφει την κινητική του σχηματισμού των κόκκων για τα δυο συνθετικά δείγματα . Στο παρακάτω διάγραμμα η απότομη καμπύλη είναι το δείγμα ενζυμικής οξείδωσης και η ευθεία γραμμή είναι το δείγμα αυτοοξειδωσης . Είναι φανερό πως η συσσωμάτωση προχωρά ραγδαία παρουσία ενζύμου ενώ χωρίς τον καταλύτη οι μεταβολές είναι συγκριτικά πολύ μικρότερες . Η σκέδαση φωτός λοιπόν βοηθά και στην κινητική καταγραφή ενός φαινομένου .



**Σχήμα 13 :** Διάγραμμα υδροδυναμικής ακτίνας έναντι χρόνου , για την εξέλιξη της εμφάνισης κόκκων για δυο συνθετικά είδη μελαμίνης . (●) Αυτοοξειδωση (■) Ενζυματική οξείδωση . Το πλαίσιο είναι μεγέθυνση σε μικρότερο εύρος ακτίνας για τη διαδικασία αυτοοξειδωσης .

Η μεγέθυνση για την αυτοοξειδωση δείχνει μια ιδιόρρυθμη συμπεριφορά για τη διαδικασία αυτή . Παρά το ότι η μέση τιμή της  $R_h$  αυξάνεται τελικά , η καμπύλη έχει μεγάλες , σχεδόν περιοδικές διακυμάνσεις . Η τελική μέση  $R_h$  εξαρτάται από το pH και από την ιονική ισχύ . Οι ακτίνες για τη διαδικασία αυτοοξειδωσης μειώνονται ραγδαία με μεταβολή μιας μονάδας pH από ουδέτερη σε αλκαλική τιμή . Αντιθέτως αυξάνοντας την ιονική ισχύ σε σταθερό pH , οι διαστάσεις των κόκκων μεγαλώνουν . Με τη βοήθεια των διαγραμμάτων Zimm , η SLS υπολόγισε τα  $\langle M_w \rangle$  και τις  $\langle R_g^2 \rangle^{1/2}$  για τα συνθετικά δείγματα και για το φυσικό δείγμα από μελανόσακο . Το φυσικό δείγμα έχει τις μικρότερες διαστάσεις από όλα , αλλά και το μεγαλύτερο μοριακό βάρος . Η  $R_g$  για το ενζυμικό δείγμα είναι τριπλάσια του δείγματος αυτοοξειδωσης , ενώ η  $R_h$  είναι δεκαπλάσια . Τα συμπεράσματα από το σχήμα 13 για την κινητική σχηματισμού της ενζυμικής μελαμίνης είναι πως αποτελείται από δυο στάδια . Το πρώτο plateau σχηματίζεται περίπου μετά από 2.5 ώρες και οδηγεί σε ακτίνες περίπου  $2 \times 10^3$  nm και το δεύτερο plateau σχηματίζεται μετά από 6 – 8 h και δίνει ακτίνες έως και  $2.5 \times 10^3$  nm . Η  $R_g$  για το ενζυμικό δείγμα είναι πολύ μικρότερη από την  $R_h$  . Η ερμηνεία είναι πως οι κόκκοι της μελαμίνης δεν έχουν ομογενή πυκνότητα και το σχήμα τους είναι ένας πυκνός πυρήνας , γύρω από τον οποίον υπάρχει ένα διακλαδωμένο κέλυφος χαμηλής πυκνότητας με πολλές διακλαδώσεις . Αυτό εξηγεί και την πολύ μεγάλη τιμή  $R_h$  σε σχέση με τα άλλα δείγματα και η οποία

μάλλον περιέχει σημαντικό συστηματικό σφάλμα . Ο πυκνός πυρήνας είναι ισχυρός σκεδαστής αλλά στις μικρές γωνίες οι διακλαδώσεις συνεισφέρουν στη σκεδαζόμενη ένταση . Οι ακτίνες που υπολογίστηκαν για τη φυσική μελαμίνη έχουν μια αναλογία  $R_g / R_h < 1$  κάτι που συνηγορεί υπέρ του ότι οι κόκκοι είναι σφαιρικής μορφής .

Η ενζυμική διαδικασία οδηγεί στο σχηματισμό μεγαλύτερων κόκκων , ωστόσο οι υπολογισμοί για τη διαδικασία αυτοοξειδωσης δείχνουν μεγαλύτερη συμφωνία με το σφαιρικό μοντέλο . Βοηθητικά διαγράμματα έντασης σκεδαζόμενου φωτός έναντι  $q$  και σύγκριση της πειραματικής καμπύλης με θεωρητική πρόβλεψη για το δομικό παράγοντα  $P(q)$  του μοντέλου coil , υπολογίστηκαν και για τα 3 δείγματα , Ο σκοπός ήταν να εκτιμηθεί κατά πόσο οι διακλαδώσεις των πολυμερών συντελούν στην αλλοίωση της δομής . Η καλύτερη συμφωνία θεωρητικών και πειραματικών τιμών ήταν για τη φυσική μελαμίνη και για την αυτο-οξειδωση που αποδεικνύει ότι αυτοί οι κόκκοι έχουν πιο ευμετάβλητο σχήμα σε σχέση με την ενζυμική . Οι δυο πρώτες κατηγορίες λοιπόν φαίνεται πως σχηματίζουν κόκκους με προσθήκη μικρών μονάδων . Η σκληρότητα του πολυμερούς φαίνεται ότι οφείλεται σε στερεοχημική παρεμπόδιση της πασσαλωτής διάταξης των ινδολικών δακτυλίων . Η ανοιχτή δομή εξαιτίας των διακλαδώσεων κάνει τη δομή να μοιάζει με κουβάρι . Στην περίπτωση της ενζυμικής μελαμίνης η κινητική δυο σταδίων και οι υπολογισμοί δείχνουν ότι η δομή είναι πιο αραιή γύρω από τον πυρήνα . Υψηλή ενυδάτωση κάνει το μόριο να αποκλίνει από τη σφαιρική γεωμετρία . Για να εκτιμηθεί ο βαθμός της ενυδάτωσης μπορούν να εφαρμοστούν κάποιοι εύχρηστοι τύποι που υπολογίζουν την  $R_s$  που είναι η ισοδύναμη ακτίνα σφαίρας . Αν  $N_A$  ο αριθμός Avogadro και  $\bar{u}_p$  ο μερικός ειδικός

όγκος τότε  $R_s = \sqrt[3]{\frac{3\bar{u}_p \langle MW \rangle}{4\pi N_A}}$  . Ο λόγος  $R_h / R_s$  μπορεί να είναι μεγαλύτερος της

μονάδας για πολύ ενυδατωμένα μόρια . Αν το  $\delta\bar{u}_0$  σε ml/g αντιστοιχεί σε όγκο του περιβλήματος ενυδάτωσης τότε έχουμε

$$\frac{R_h}{R_s} = \sqrt[3]{\frac{\bar{u}_p + \delta\bar{u}_0}{\bar{u}_p}} \quad (46)$$

Για καθαρό νερό  $\bar{u}_0 = 1 \text{ ml / g}$  . Οι υπολογισμοί έδειξαν όντως ότι το ενζυμικά παρασκευασμένο δείγμα έχει μεγάλο ποσό νερού . Χαμηλότερες τιμές για τα άλλα

δείγματα επιβεβαίωσαν τη σφαιρική συμμετρία τους . Ο λόγος για τον οποίο οι διαστάσεις μειώνονται τόσο δραστικά με αύξηση του pH ερμηνεύεται ως εξής : Σε χαμηλό pH (7 ή 8) η συσσωμάτωση γίνεται με βραδύ ρυθμό ωστόσο τα προϊόντα είναι πιο σταθερά γιατί τα μονομερή έχουν περισσότερο χρόνο για να εξετάσουν πιθανές θέσεις σύνδεσης . Η αλληλοδιείσδυση είναι λοιπόν μεγαλύτερη και οι κόκκοι πιο πυκνοί . Σε μεγαλύτερα pH (9 ή 10) , το δίκτυο αρνητικού φορτίου στο πολυμερές αναπτύσσει ένα διασωματιδιακό απωστικό δυναμικό Coulomb και ευνοείται η διάσπαση . Έτσι οι κόκκοι δεν είναι συμπαγείς και το εσωτερικό τους δεν είναι εύκολα διαπερατό . Πραγματικά οι κλασματικές διαστάσεις υπολογίστηκαν υψηλότερες στην ουδέτερη περιοχή pH από τις κλασματικές διαστάσεις στην αλκαλική περιοχή .

Οι υπολογισμοί δομικών παραγόντων  $P(q,R)$  δεν είναι πάντοτε εύκολοι σε βιολογικά συστήματα . Τα ερυθρά αιμοσφαίρια για παράδειγμα είναι ελλειψοειδή μόρια και χρειάζεται προσοχή στο θεωρητικό υπόβαθρο για να ληφθεί υπόψη η ανισοτροπική συνεισφορά στη σκέδαση του φωτός . Συγκεκριμένα ένα ελλειπτικό μόριο και οι τυχαίοι προσανατολισμοί που μπορεί να έχει ο σκεδαστής σε σχέση με την προσπίπτουσα ακτινοβολία , γεννά την ανάγκη για τρεις διαφορετικούς ισοτροπικούς συντελεστές διάχυσης [22] . Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν μεγάλες διαστάσεις  $a$  σε σχέση με τα  $\lambda$  των ακτινοβολιών , οπότε  $qa > 1$  . Αυτό δημιουργεί πρόσθετα συστηματικά σφάλματα στη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης . Η συνάρτηση αυτή για αραιό διάλυμα είναι

$$g^{(1)}(q, \tau) = C \sum_{k=1}^N \exp(-q^2 D_k \tau) S_k(q, \tau) P_k(q) \quad (47)$$

το γινόμενο  $S_k(q, \tau) \exp(-D_k q^2 \tau)$  αντιπροσωπεύει την **ενδοσωματιδιακή** συνάρτηση αυτοσυσχέτισης η οποία λαμβάνει υπόψη την κίνηση των 3 διαφορετικών κέντρων μάζας κάθε σωματιδίου . Αντιπροσωπεύει τις υδροδυναμικές ιδιότητες του μορίου .

Ο στατικός παράγοντας  $P_k(q)$  ορίζεται ως

$$P_k(q) = \sum_{i=1}^{n_k} \sum_{j=1}^{n_k} \langle \exp(i\vec{q} \cdot (\vec{\rho}_i(0) - \vec{\rho}_j(0))) \rangle \quad (48)$$

και εξαρτάται αποκλειστικά από γεωμετρικούς παράγοντες . Κάθε διάνυσμα  $\rho$  που περιγράφει τη θέση ενός μορίου σε σχέση με το κέντρο του συστήματος συντεταγμένων λαμβάνεται τη χρονική στιγμή  $0$  . Οι εξισώσεις αυτές ισχύουν για μη σφαιρικά σωματίδια και λαμβάνουν υπόψη περιστροφές και αλλαγές διεύθυνσης . Τα ερυθρά αιμοσφαίρια θεωρούνται συμπαγή και αναλλοίωτα και αυτό διευκολύνει την περιγραφή τους . Το ελλειψοειδές σχήμα θεωρείται ότι έχει ημιάξονες  $a < b = c$  και αξονικό λόγο  $b/a$  και οι ανεξάρτητοι συντελεστές διάχυσης για κίνηση Brown σχετίζονται με τις κατευθύνσεις των τριών αξόνων . Η εξίσωση διάχυσης μπορεί να περιγραφεί με δυο όρους . Ο πρώτος είναι ο ισοτροπικός μεταφορικός συντελεστής  $\langle D \rangle = \bar{D}$  ο οποίος είναι ο μέσος όρος των τριών αξονικών συντελεστών , δηλαδή  $D = \frac{(D_a + D_b + D_c)}{3}$  και ο δεύτερος όρος είναι ο ανισοτροπικός μεταφορικός συντελεστής  $\varepsilon$  που ορίζεται ως εξής

$$\varepsilon = \frac{1}{D}(D_a - D_b) \quad (49)$$

Οι περιστροφικές διαχύσεις είναι συζευγμένες με τις μεταφορικές καθώς το ανισοδιάστατο μόριο κινείται . Ωστόσο επειδή βρισκόμαστε στην περιοχή  $qa > 1$  και επειδή ο λόγος του χαρακτηριστικού περιστροφικού χρόνου χαλάρωσης  $\tau_{\text{ΠΕΡ}}$  προς τον αντίστοιχο μεταφορικό χρόνο  $\tau_{\text{ΜΕΤ}}$  είναι ανάλογος του  $qa^2$  , η περιστροφική διάχυση είναι πολύ πιο βραδεία από τη μεταφορική και δε θα επηρεάσει το αποτέλεσμα , ειδικά λαμβάνοντας υπόψη τις τεράστιες διαστάσεις του κυττάρου (1-10  $\mu\text{m}$ ) . Για ελλειψοειδή μόρια με πεπλατυσμένους πόλους ( $b/a > 1$ ) οι παραπάνω τύποι εκφράζονται έτσι

$$\bar{D} = \frac{1}{3}(D_a + 2D_b) = \frac{k_B T}{6\pi\eta a} \frac{1}{\sqrt{1 - (b/a)^2}} * \arctan \sqrt{(b/a)^2 - 1} \quad (50)$$

$\arctan$  είναι το τόξο εφαπτομένης .

$$\varepsilon = \frac{3}{8}(2 + (b/a)^2 - \frac{3\sqrt{(b/a)^2 - 1}}{\arctan(\sqrt{(b/a)^2 - 1})}) * (\frac{1}{1 - (b/a)^2}) \quad (51)$$

Ο δομικός παράγοντας υπολογίζεται από τον τύπο

$$S_k(q, \tau) = \exp[-q^2 \bar{D} \varepsilon (\mu^2 - \frac{1}{3}) \tau] \quad (52)$$

μ είναι το  $\cos \varphi$ , όπου φ η γωνία που σχηματίζει ο συμβατικός ημιάξονας κίνησης α με το κυματόνισμα q. Μελετήθηκαν ανθρώπινα ερυθρά αιμοσφαίρια καθώς και βοδινά αιμοσφαίρια· οι δομές τους είναι παρόμοιες. Η κλασική μέθοδος αυτοσυσχέτισης αποτυγχάνει να δώσει υδροδυναμική ακτίνα για τα κύτταρα αυτά που να συμπίπτει με το αποτέλεσμα άλλων τεχνικών (σαρωτική ηλεκτρονική μικροσκοπία). Αν όμως γίνουν οι απαραίτητες διορθώσεις με το  $D_{\text{eff}}$  και τους γεωμετρικούς παράγοντες b/a, ε και τα λοιπά, τότε και τα ανθρώπινα και τα βοδινά ερυθροκύτταρα δίνουν τιμές 2a και 2b (διαστάσεις κυττάρου) πολύ κοντινές με της βιβλιογραφίας. Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης γράφεται έτσι

$$g^{(1)}(q, \tau) \approx \exp[-q^2 \bar{D} (1 + \Delta) \tau] \quad (53)$$

Το Δ μέσα στην παρένθεση είναι η ανισοτροπική συνεισφορά και είναι συνάρτηση του b/a. Βρέθηκε ότι η απόκλιση από την τέλεια σφαίρα και στην περίπτωση του απείρως λεπτού ραβδιού ( $b/a \rightarrow 0$ ) και στην περίπτωση απείρως λεπτού δίσκου ( $b/a \rightarrow \infty$ ) δεν ξεπερνά το 25%, άρα η μέγιστη τιμή Δ είναι 0.25. Τα ερυθρά αιμοσφαίρια έχουν b/a = 4 περίπου και από την (53) βρίσκεται ότι η ανισοτροπία δε συνεισφέρει πάνω από 8 – 9% στη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης. Τέλος, πειράματα που έγιναν με ερυθροκύτταρα σε υποτονικό διάλυμα NaCl, για να μελετηθεί η οσμωτική διόγκωσή τους, υπολόγισαν τη συνάρτηση συσχέτισης έναντι του χρόνου παραμονής στο διάλυμα τ. Τα κύτταρα εδώ έχουν σφαιρικό σχήμα (σε αντίθεση με το ελλειψοειδές σχήμα σε ισοτονικό διάλυμα) και η κλασική περιγραφή δίνει έγκυρη τιμή  $R_h$  σύμφωνα με την εξίσωση  $\ln[g^{(1)}(\tau)] = \Gamma_1 \tau$  αγνοώντας πολυδιασπορά. Αυτό αποδεικνύει ότι η LS δίνει αξιόπιστα αποτελέσματα για διαστάσεις σφαιρικών μορίων.

Το σχήμα αλλά και η πυκνότητα του μορίου επηρεάζει σημαντικά τη μέθοδο Στατικής Σκέδασης [21-23]. Η γενικευμένη προσέγγιση των Rayleigh – Gans – Debye για SLS, δηλώνει πως η ένταση του προσπίπτοντος ηλεκτρικού πεδίου είναι ίδια σε όλα τα σημεία του χώρου. Δηλαδή οι τοπικές μεταβολές του πεδίου

αγνοούνται σε αντίθεση με τη θεωρία Lorenz-Mie (LM) στην οποία αυτές οι μεταβολές υπολογίζονται σαφώς . Για να είναι σωστή η προσέγγιση των R-G-D πρέπει να τηρείται η συνθήκη  $2kL|n_p-n_s| \ll 1$  , όπου η αγκύλη περιέχει τη διαφορά στους δείκτες διάθλασης σωματιδίου και διαλύτη , L μια χαρακτηριστική διάσταση του μορίου (π.χ. η ακτίνα) και  $k = 2\pi/\lambda_0$  . Οι φυσαλλίδες φωσφατιδυλοχολίνης θεωρούνται σφαίρες και αν αγνοηθεί η ανισοτροπική σκέδαση που είναι πολύ μικρή για αυτά τα μεγέθη , η θεωρία RGD μπορεί να χρησιμέψει για να προσδιοριστεί πιο λεπτομερώς η δομή και η πυκνότητα των μορίων [23] . Τα γεωμετρικά μοντέλα που μπορούν να χρησιμοποιηθούν για τις θεωρητικές καμπύλες είναι πολλά . Οι πειραματικές τιμές σκεδαζόμενης έντασης εξαρτώνται από το σωματιδιακό παράγοντα  $P(q)$  . Στον παρακάτω πίνακα βρίσκονται οι θεωρητικές τιμές του  $P(q)$  για διάφορες γεωμετρίες

ΣΧΗΜΑ	ΣΤΑΤΙΚΟΣ ΔΟΜΙΚΟΣ ΠΑΡΑΓΟΝΤΑΣ
Συμπαγής Σφαίρα	$P(q) = \left[ \frac{3}{q^3 R_0^3} (\sin qR_0 - qR_0 \cos qR_0) \right]^2$
Κούφια Σφαίρα	$P(q) = \left[ \frac{3}{q^3 (R_0^3 - R_i^3)} (\sin qR_0 - \sin qR_i - qR_0 \cos qR_0 + qR_i \cos qR_i) \right]^2$
Απείρως λεπτό κέλυφος	$P(q) = \left( \frac{\sin qR_0}{qR_0} \right)^2$
Λεπτό Ραβδί (rod)	$P(q) = \frac{2}{qL} \sin qL - \left[ \frac{2}{qL} \sin\left(\frac{qL}{2}\right) \right]^2$

**Πίνακας 2 :** Σωματιδιακοί παράγοντες για διάφορες γεωμετρίες σκέδασης .  $R_0$  και  $R_i$  είναι οι εξωτερικές και εσωτερικές ακτίνες αντιστοίχως . Στο ραβδί , L είναι το μήκος του ραβδιού και η ημιτονοειδής συνάρτηση στον πρώτο όρο της εξίσωσής του μπορεί να αντικατασταθεί με το ολοκλήρωμα του x για αυτές τις διαστάσεις .

Όπως βλέπουμε στον πίνακα , η γωνιακή μεταβολή της έντασης εξαρτάται μόνο από τις γεωμετρικές παραμέτρους του σκεδαστή και όχι από τις οπτικές ιδιότητες όπως ο δείκτης διάθλασης , καθώς η ανισοτροπία εδώ θεωρείται αμελητέα . Οι δομικοί παράγοντες μπορούν να εκφραστούν και συναρτήσει των  $R_g$  . Οι



εξισώσεις είναι βεβαίως δυναμοσειρές , στις οποίες οι μεγάλοι όροι παραλείπονται συνήθως . Ο μηδενικός και ο πρώτος όρος είναι πάντοτε κοινοί και ο δεύτερος όρος ξεκινά τη διαφοροποίηση . Ενδεικτικά οι δυναμοσειρές για απείρως λεπτό κέλυφος και λεπτό ραβδί είναι αντίστοιχα :

$$P(q) = 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} + \frac{2q^4 R_g^4}{45} + \dots \quad (54) \quad \text{και} \quad P(q) = 1 - \frac{q^2 R_g^2}{3} + \frac{2q^4 R_g^4}{25} + \dots \quad (55)$$

Σωματίδια με διάμετρο από 40 έως 115 nm παρασκευάστηκαν μεταβάλλοντας τις πειραματικές συνθήκες και συγκεκριμένα την ταχύτητα διάλυσης , την αρχική συγκέντρωση των λιπιδίων κ.α. Στατικά πειράματα για επτά διαφορετικά μεγέθη φυσαλλίδων έγιναν με κανονικοποίηση των εντάσεων (για καλύτερη σύγκριση) ως προς την ένταση σε γωνία  $90^\circ$  . Οι καμπύλες για τα 7 διαφορετικά είδη παρουσιάζουν πολύ διαφορετικές κλίσεις συναρτήσει της γωνίας . Όπως είναι αναμενόμενο όλα τα σωματίδια σκεδιάζουν λιγότερο σε υψηλές  $\theta$  , αλλά οι πτωτικές κλίσεις είναι πιο απότομες στην περίπτωση μεγάλων σωματιδίων (105 ή 111 nm) από τις κλίσεις μικρών φυσαλλίδων (40 ή 56 nm) όπου οι ευθείες είναι σχεδόν οριζόντιες . Οι εντάσεις που υπολογίστηκαν αντιστοιχούν σε δομικούς παράγοντες  $P(q)$  και οι γωνίες  $\theta$  σε κυματανύσματα . Έτσι τα αποτελέσματα συγκρίθηκαν με τα γεωμετρικά μοντέλα και βρέθηκε πως αυτό που περιγράφει με μεγάλη ακρίβεια τη φυσαλλίδα είναι η κούφια σφαίρα . Δυστυχώς η γεωμετρία αυτή δεν επιτρέπει συσχετισμό του  $P$  με την  $R_g$  γιατί εκτός από τη γωνία  $\theta$  , θα έπρεπε να ληφθούν υπόψη και η πυκνότητα των τοιχωμάτων . Η πυκνότητα των τοιχωμάτων φυσικά καθορίζεται από τη διαφορά  $R_0 - R_i$  . Πρώτα από όλα έγινε σύγκριση και για τα υπόλοιπα μοντέλα για φυσαλλίδες 40 nm . Τα διαγράμματα Zimm με άξονα  $Y$  τον αντίστροφο δομικό παράγοντα  $P^{-1}(q)$  και άξονα  $X$  το  $q^2$  έγιναν για όλες τις γεωμετρίες για να διαπιστωθεί αν οι θεωρητικές τιμές  $R_g$  θα συμπίπτουν με τα 40 nm . Πρώτα απ' όλα η καμπύλη για ραβδί είχε τη μεγαλύτερη απόκλιση από τις άλλες 3 γι' αυτό απορρίφθηκε κατευθείαν . Στη συνέχεια έγιναν υπολογισμοί και για τα υπόλοιπα μεγέθη (80 , 90 nm κτλ) . Το μοντέλο της συμπαγούς σφαίρας δίνει αποκλίσεις 18-25 % από τις πραγματικές τιμές . Το λεπτό κέλυφος έχει και αυτό σημαντικές αποκλίσεις αν και όχι τόσο μεγάλες . Τέλος για την κούφια σφαίρα δοκιμάστηκαν 3 διαφορετικές τιμές πάχους για τα τοιχώματα 3 , 4 και 5 nm . Οι μέσοι όροι για τις θεωρητικές τιμές των 3 nm και των 4 nm συνέπιπταν με τις πραγματικές τιμές . Το συμπέρασμα λοιπόν είναι ότι οι

φυσαλλίδες της φωσφατιδυλοχολίνης είναι κοίλες σφαίρες με πάχος τοιχωμάτων 3.6 nm περίπου κάτι που συμφωνεί με πειραματικά δεδομένα περίθλασης ακτίνων X . Συνεπώς η τεχνική LS με την προσέγγιση RGD περιγράφει ικανοποιητικά τη σκέδαση ισότροπων βιολογικών φυσαλλίδων και επίσης δίνει έγκυρες εκτιμήσεις για το πόσο παχιά είναι τα επιφανειακά τοιχώματα .

Το D.N.A. είναι γνωστό ότι αλληλεπιδρά με φάρμακα όπως θειοβαρβιτουρικά , διφαινυλαμίνη ή δις-ιμιδαζόλιο . Επίσης κάποια τρισθενή κατιόντα του περιοδικού πίνακα όπως La(III) ή Y(III) χρησιμοποιούνται για τον προσδιορισμό και τη δομή των νουκλεϊκών οξέων γιατί η αλληλεπίδρασή τους προκαλεί φαινόμενα φθορισμού. Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός για την α,β,γ,δ-τετρακίς – [4-(τριμεθυλαμμωνιο)-φαινυλο]-πορφυρίνη (TAPP) ενισχύεται από την παρουσία νουκλεϊκού οξέος σε pH = 7.48 και ιονική ισχύ 0.004 . Επομένως η TAPP με τα φαινόμενα φθορισμού της μπορεί να χρησιμεύσει ως τιτλοδότης για τον προσδιορισμό του DNA [24] . Δείγματα DNA και RNA από βοδινό θυμοειδή αδένια μετρήθηκαν σε κατάλληλα μήκη κύματος ώστε να υπάρχει ισχυρός συντελεστής μοριακής απορροφητικότητας . Οι συγκεντρώσεις των δειγμάτων ποικίλλανε από 0.3 – 3.6 M ανά 0.3 μονάδες molarity . Πάρθηκε επίσης δείγμα 7.5 M . Οι πειραματικές συνθήκες για την πορφυρίνη (ιονική ισχύς κτλ) είναι επίσης τέτοιες ώστε να έχει υψηλό ε . Η τεχνική που ακολουθήθηκε είναι μια σύγχρονη μορφή σκέδασης φωτός που ονομάζεται Συντονισμός Σκέδασης Φωτός ( Resonance Light Scattering ) . Η Resonance LS χρησιμοποιεί ένα ειδικό φασματοφωτόμετρο που ανιχνεύει φαινόμενα φθορισμού και επομένως έχει πολλές πρακτικές και χρήσιμες εφαρμογές [25,26] . Η ένταση του σκεδαζόμενου φωτός λοιπόν θα είναι ένα μέτρο εκτίμησης για την **απορρόφηση** ακτινοβολίας από το δείγμα . Το καθαρό TPAΑ ακόμα και υπό άριστες συνθήκες έχει σχετικά μικρή ένταση . Το μέγιστο της κορυφής είναι στα 412 nm . Παρουσία DNA ή RNA όμως το μέγιστο αποκτά σημαντικά μεγαλύτερη ένταση (σχεδόν διπλάσια) . Μάλιστα πριν αρχίσει η απότομη άνοδος , η καμπύλη φτάνει στο ελάχιστό της . Η ενεργός διατομή της απορρόφησης που σχετίζεται με την ενεργό διατομή της σκέδασης δίνεται από τη σχέση

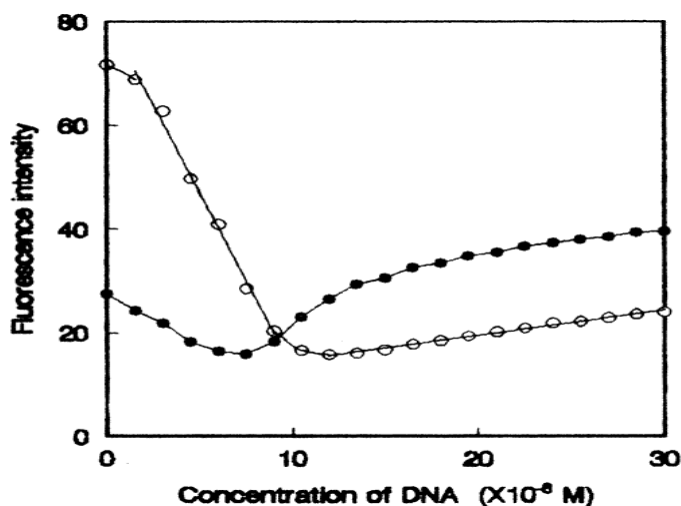
$$C_{abs} = (4\pi r^2) \times \text{Im} \frac{m^2 - 1}{m^2 + 2} \quad (56)$$

I η ένταση της προσπίπτουσας ακτινοβολίας , r η ακτίνα του σφαιρικού σωματιδίου , x είναι μια αδιάστατη παράμετρος μεγέθους ίση με  $2\pi n_s / \lambda$  , όπου  $n_s$  ο δείκτης

διάθλασης του διαλύτη , και  $m$  ο σχετικός δείκτης διάθλασης , δηλαδή η αναλογία δ.δ. της σφαίρας προς τον δ.δ. του διαλύτη . Όσο υψηλότερη η συγκέντρωση , τόσο ισχυρότερη η απορρόφηση από τις σφαίρες . Στην περίπτωση της ενεργούς διατομής για τη σκέδαση , η εξάρτηση για το κλάσμα που περιέχει τα  $m$  είναι δευτέρου και όχι πρώτου βαθμού όπως στην (56) , άρα η σκέδαση εξαρτάται πιο ζωτικά από τον  $m$  . Αν λοιπόν έχουμε χαμηλή συγκέντρωση σωματιδίων τα φαινόμενα απορρόφησης εξασθενούν και τα φαινόμενα σκέδασης ενισχύονται . Τα μόρια TAPP φαίνεται πως δεσμεύονται στα μόρια DNA και σχηματίζουν μικρά σωματίδια και γι' αυτό ενισχύουν τη σκέδαση . Αυτό επιβεβαιώνεται από την κατακόρυφη πτώση της Resonance έντασης με αυξανόμενη ιονική ισχύ ενώ το φάσμα LS για την καθαρή TPAΑ δεν παρουσιάζει καμία μεταβολή . Καθώς δηλαδή αυξάνεται η συγκέντρωση του ηλεκτρολύτη , τα εύκαμπτα μόρια του DNA σκληραίνουν και αυτό παρεμποδίζει την εισχώρηση της TPAΑ ανάμεσα στις δυο αλυσίδες , ή τη δέσμευση της TPAΑ στη μεγάλη αύλακα που αποτελούν τους δυο πιθανότερους μηχανισμούς για το σχηματισμό του συμπλόκου . Κατασκευάστηκαν καμπύλες βαθμονόμησης για DNA και RNA σε διαφορετικά μήκη κύματος . Η ένταση Resonance δείχνει να έχει μια αξιοθαύμαστη γραμμικότητα με τη συγκέντρωση τουλάχιστον μέχρι τις πολύ πυκνές συγκεντρώσεις όπου παρατηρούνται ελαφρές αποκλίσεις . Αξίζει να σημειωθεί πως η τεχνική resonance σκέδασης είναι πολύ πιο ευαίσθητη από άλλες τεχνικές φθορισμομετρίας . Η γραμμικότητά της καλύπτει μεγαλύτερο εύρος συγκεντρώσεων , ανιχνεύει κατά πολύ μικρότερες συγκεντρώσεις (έως και  $10^{-8}$  M) , έχει πολύ καλή αξιοπιστία και επιπλέον δεν επηρεάζεται σημαντικά από προσμείξεις . Διάφορα πειράματα προσθήκης ξένων ουσιών σε μικρές συγκεντρώσεις , όπως πρωτεΐνες , αζωτούχες βάσεις (γουανίνη , κυτοσίνη κτλ) και διάφορα άλατα ποικίλων μετάλλων όπως Al(III) , Hg(II) , Cu(II) , Ca(II) , Mg(II) κ.α. , διαπιστώθηκε πως είχαν μικρές αλλαγές στην ένταση της resonance σκέδασης (από 0.1 έως 10%) , ενώ η απόκλιση για τις καμπύλες σε σχέση με το καθαρό σύμπλοκο είναι επίσης αρκετά μικρή και πολύ ικανοποιητική . Επομένως η τεχνική Resonance LS μπορεί να χρησιμοποιηθεί ως μια πολύ ευαίσθητη μέθοδος ενόργανης ανάλυσης .

Το μέγιστο της κορυφής στο φάσμα του συντονισμού μεταβάλλεται ελαφρώς με τη συγκέντρωση [DNA] . Συγκεκριμένα στα διάφορα είδη νουκλεϊκού οξέος που εξετάστηκαν (DNA από θυμοειδή αδένια μοσχαριού , DNA από σπέρμα ψαριού και RNA από ζύμη) το  $\lambda$  έχει ελαφρές αυξομειώσεις αυξανόμενης της συγκέντρωσης . Όταν η μοριακή αναλογία [DNA]/[TAPP] είναι 4 : 1 , τότε συμβαίνει

η αύξηση της κορυφής στο φάσμα της καθαρής TAPP . Σε χαμηλή συγκέντρωση το μέγιστο από τα 412 μετατοπίζεται ελαφρώς γύρω στα 420 nm . Αυτό σημαίνει ότι το σύμπλοκο σχηματίστηκε και απορροφά πιο έντονα . Σε γενικές γραμμές αύξηση της συγκέντρωσης DNA / RNA μεγαλώνει το  $\lambda$  . Ο φθορισμός που δίνει το σύμπλοκο είναι φυσικά σε μεγαλύτερα μήκη κύματος 639.0 – 652.0 nm αφού το σύστημα έχει χάσει ενέργεια . Η αυξανόμενη συγκέντρωση και πάλι μετατοπίζει το  $\lambda$  σε μεγαλύτερες τιμές . Η αντίδραση σχηματισμού του συμπλόκου έχει δυο μηχανισμούς που εξαρτώνται από τη συγκέντρωση των νουκλεϊκών οξέων . Το διάγραμμα που ακολουθεί δείχνει την εξάρτηση της έντασης resonance scattering συναρτήσει της [DNA] για καθορισμένη συγκέντρωση TAPP. Πάρθηκαν δυο καμπύλες για δυο ξεχωριστά μήκη κύματος εκπομπής (φθορισμού) .



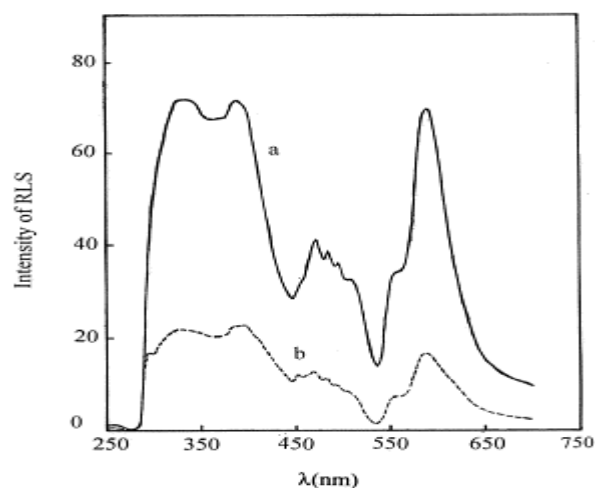
**Σχήμα 14 :** Ένταση φθορισμού για την αντίδραση μεταξύ DNA από βοδινό θυμοειδή αδένια και TAPP . (○) Ένταση φθορισμού στα 638.0 nm (διέγερση στα 413.0 nm) (●) Ένταση φθορισμού στα 652.0 nm (διέγερση στα 422.0 nm) , [TAPP] =  $2.4 \times 10^{-6}$  M

Ο ένας μηχανισμός συμβαίνει όταν η αναλογία των αντιδρώντων είναι μικρότερη από 4 : 1 και χαρακτηρίζει τη δημιουργία του συμπλόκου . Η υποχρωμία (μείωση απορρόφησης) και η απόσβεση του φθορισμού κυριαρχούν . Όπως φαίνεται και από το σχήμα η ένταση φθορισμού πέφτει ενώ ταυτόχρονα αυξάνεται η ένταση της resonance σκέδασης . Το φαινόμενο που κυριαρχεί λοιπόν είναι η σκέδαση . Στη δεύτερη περιοχή όπου [DNA]/[TAPP] > 4 : 1 φαίνεται πως σχηματίζεται ένα καινούριο σύμπλοκο που φθορίζει , όπως φαίνεται από τις αυξανόμενες εντάσεις φθορισμού στο σχήμα .

## ΜΕΡΟΣ 4<sup>ON</sup> : ΑΛΛΕΣ ΕΦΑΡΜΟΓΕΣ

### III) 4.α Resonance Light Scattering

Η συντονισμένη σκέδαση φωτός είναι χρήσιμο εργαλείο και στον ποσοτικό προσδιορισμό των πρωτεϊνών . Άλλες τεχνικές όπως χρωματισμός και φασματοφωτομέτρηση με Coomassie blue είναι φτωχές ως προς την ευαισθησία , δίνουν μη γραμμικές καμπύλες βαθμονόμησης , δίνουν ασταθή σύμπλοκα ένωσης – χρωστικής και επηρεάζονται σε μέγιστο βαθμό από προσμείξεις . Η Resonance LS κάποιων μικρών οργανικών ενώσεων μπορεί να ενισχυθεί σημαντικά παρουσία βιοπολυμερών ή κάποιων ανόργανων ιόντων εξαιτίας φαινομένων συσσωμάτωσης ή αντιδράσεων συναρμογής . Το σύμπλοκο του εξασθενούς μολυβδαινίου με μια οργανική ένωση (διβρωμο-υδροξυ-φαινυλ-fluorone DBHPF) χρησιμοποιήθηκε ως τιτλοδότης για τον φασματοχημικό προσδιορισμό μιας πρωτεΐνης [25] . Μελετήθηκαν αλβουμίνες ορού από άνθρωπο (HSA) και από μοσχάρι (BSA) . Η Resonance LS προσφέρει μεγάλη ευχέρεια , σταθερότητα και αξιοθαύμαστα μικρά όρια ανίχνευσης . Για την HSA , η ευαισθησία φτάνει και τη συγκέντρωση των 15 ng/ml . Η ενίσχυση της έντασης σκέδασης συντονισμού είναι η ΔΙ και ορίζεται ως η διαφορά μεταξύ δείγματος (I) και καθαρού συμπλόκου Mo(VI) – DBHPF χωρίς αλβουμίνη , το οποίο είναι το «τυφλό» ( $I_0$ ) . Η απορρόφηση του συμπλόκου που έχει μέγιστο στα 533 nm , μειώνεται δραστικά παρουσία αλβουμίνης και η σκέδαση ευνοείται . Το ελάχιστο λοιπόν στα 533 nm που έχει το φάσμα σκέδασης αυξάνεται σημαντικά ενώ οι υπόλοιπες κορυφές εντείνονται και αυτές ραγδαία στα 386 και στα 390 nm . Όλα αυτά φαίνονται στο παρακάτω σχήμα .

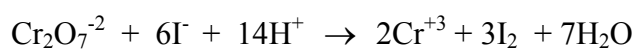


**Σχήμα 15 :** Ένταση Resonance σκέδασης φωτός . Οι συνθήκες μέτρησης έγιναν υπό άριστες συνθήκες . a) *Mo(VI)-DBHPF-bovine serum albumin* (—) b) Καθαρό σύμπλοκο *Mo(VI)-DBHPF* (-----) .

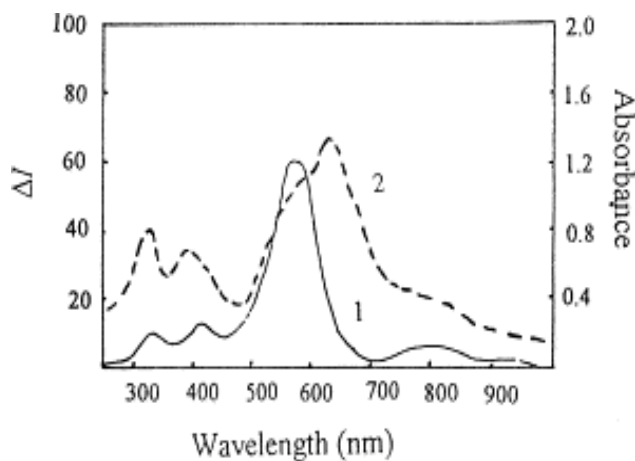
Η ένταση σκέδασης συντονισμού επηρεάζεται σημαντικά από το pH και η άριστη τιμή είναι 2.8 . Στις υπόλοιπες τιμές η ένταση είναι ελάχιστη . Η ερμηνεία που προτείνεται είναι η εξής . Η BSA βρίσκεται σε κατιονική μορφή και αντιδρά με το αρνητικά φορτισμένο σύμπλοκο  $Mo(VI) - DBHPF$  , κυρίως μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων . Καθώς αυξάνεται το pH , η συσσώρευση πρόσθετου αρνητικού φορτίου στο σύμπλοκο μάλλον αυξάνει την αλληλεπίδρασή του με την αλβουμίνη . Ταυτόχρονα όμως η αύξηση του αρνητικού φορτίου πάνω στην αλβουμίνη χαλαρώνει τη δέσμευσή της πάνω στην οργανική ένωση λόγω απωστικών δυνάμεων . Η τιμή στην οποία συμβιβάζονται τα δυο ανταγωνιστικά φαινόμενα είναι η 2.8 . Η επιρροή του μοριακού λόγου  $Mo(VI)$  προς  $DBHPF$  , είναι επίσης καθοριστική για το φαινόμενο σκέδασης . Η ιδανική αναλογία moles είναι μολυβδαίνιο προς οργανική ένωση = 1 : 2 στην οποία επιτυγχάνεται μέγιστη ένταση στα φάσματα συντονισμού . Αν μειωθεί η συγκέντρωση  $DBHPF$  και ο μοριακός λόγος μεγαλώσει , η ένταση μειώνεται κατακόρυφα . Έγιναν πολλά πειράματα προσθήκης ξένων ουσιών , όπως ανόργανα ιόντα , αμινοξέα , σάκχαρα και άλλες οργανικές ενώσεις και βρέθηκε ότι η ανεκτικότητα της μεθόδου είναι πολύ μεγάλη καθώς η απόκλιση από την αρχική ένταση δεν ξεπερνά ποτέ το 6 % . Αυτή η διαδικασία λοιπόν είναι σχεδόν ανεπηρέαστη από την παρεμβολή detergents . Οι καμπύλες βαθμονόμησης λοιπόν που προκύπτουν από τη μέτρηση των ΔΙ συναρτήσει της συγκέντρωσης αλβουμίνης είναι πολύ αξιόπιστες και γραμμικές σε μεγάλο εύρος (0.05 – 0.75 mg / l) . Τα

αποτελέσματα είναι επαναλήψιμα και οι αντιδράσεις που συμβαίνουν αρκετά γρήγορες . Η συμφωνία των υπολογισμών με άλλες τεχνικές και με διάφορα άλλα δείγματα επιβεβαιώνουν την εγκυρότητα της μεθόδου .

Με ανάλογο τρόπο χρησιμοποιείται η τεχνική συντονισμού στον ποσοτικό προσδιορισμό ιόντων εξασθενούς χρωμίου παρουσία διαφόρων χρωστικών ουσιών [26] . Σε όξινο διάλυμα μια βασική χρωστική τριφαινυλ-μεθανίου (BTPMD) έχει ασθενή ένταση Resonance LS . Τέτοιες βασικές χρωστικές υπάρχουν πολλές , όπως το βιολετί του αιθυλίου (EV) , το πράσινο του ιωδίου (IG) ή το κρυστάλλινο βιολετί (CV) . Αν όμως υπάρχουν κάποια ίχνη Cr(VI) και περίσσεια ιόντων  $\Gamma^-$  , τότε το χρώμιο οξειδώνει καταλυτικά τα ιόντα ιωδίου παράγοντας  $I_2$  και στη συνέχεια σχηματίζεται  $I_3^-$  . Τα ιόντα τριωιδίου συναρμόζονται με τη χρωστική και σχηματίζουν σύμπλοκο [BTPMD][ $I_3$ ] , το οποίο έχει πολύ ενισχυμένη ένταση LS . Η ένταση αυτού του συντονισμού είναι ευθέως ανάλογη προς τη συγκέντρωση του Cr(VI) για τη χρωστική CV . Έχει βρεθεί ότι ακόμα και σύμπλοκα απλών ιόντων ιωδίου με τη χρωστική ενισχύουν τη σκέδαση συντονισμού , όμως επειδή η οξείδωση προς μοριακό ιώδιο και τελικά σε τριωιδίο πάντοτε συμβαίνει , ενώ επιτυγχάνεται η μέγιστη ενίσχυση της έντασης , αυτό το φαινόμενο είναι το καθοριστικό . Η χρωστική CV έχει τη μέγιστη ενίσχυση από τις υπόλοιπες και για αυτό μελετήθηκε εκτενώς . Σε άριστες τιμές συγκέντρωσης ιόντων ιωδίου οι χρόνοι αντίδρασης είναι σχετικά γρήγοροι και οι μετρήσεις στα κατάλληλα μήκη κύματος δείχνουν πολύ καλή γραμμικότητα στις καμπύλες βαθμονόμησης . Οι περιοχές γραμμικότητας κυμαίνονται από 0 – 1.5  $\mu\text{g} / 25 \text{ ml}$  και επομένως μπορούν να ανιχνευτούν μικρά ποσά Cr(VI) . Για τη CV ευαισθησία της μεθόδου κατέρχεται σε συγκέντρωση 0.065  $\text{ng} / \text{ml}$  . Ο σχηματισμός του συμπλόκου προτείνεται ότι συμβαίνει ως εξής : η χρωστική υπάρχει στις συνηθισμένες πειραματικές συνθήκες ως κατιονικό μονομερές  $R^+$  και η ένταση Resonance είναι αρκετά χαμηλή . Τα μόρια των BTPMD δεν είναι συνεπίπεδα και υπάρχει κάποια περιορισμένη περιστροφή . Αυτό όχι απλά τα κάνει μη φθορίζοντα μόρια αλλά συντελεί και στην ασθενή σκέδαση . Υπό άριστο μοριακό λόγο Cr(VI) : BTPMD = 1 : 1.5 , ο μηχανισμός συναρμογής ιόντων έχει ως εξής .



Όταν το  $I_3^-$  προσεγγίζει το  $R^+$  ανάμεσα στα δυο φαινύλια μέσω ηλεκτροστατικών δυνάμεων και υδροφοβικών αλληλεπιδράσεων τα αποτελέσματα είναι 1) Το μοριακό βάρος γίνεται πολύ μεγαλύτερο 2) Η περιστροφή των δυο φαινυλίων παρεμποδίζεται λόγω των φραγμών θετικού και αρνητικού φορτίου και στερικών φαινομένων . Το μόριο γίνεται πιο συνεπίπεδο και άκαμπτο και έτσι η resonance σκέδαση αυξάνεται . Η ταινία σκέδασης μάλιστα για τα σύμπλοκα αυτών των χρωστικών με τα  $I_3^-$  συμπίπτει με την ταινία απορρόφησης . Το παρακάτω διάγραμμα συμπεριλαμβάνει τα φάσματα απορρόφησης και σκέδασης συντονισμού . Είναι φανερό πως οι δυο ζώνες είναι πολύ κοντά μεταξύ τους .



**Σχήμα 16 :** Φάσματα για το σύμπλοκο  $[CV][I_3]$  συναρτήσει του μήκους κύματος (1) Φάσμα σκέδασης LS συντονισμού σε  $\Delta I$ , αριστερός άξονας (—) (2) Φάσμα απορρόφησης UV-Vis σε αυθαίρετες μονάδες, δεξιός άξονας (-----)

Με υπολογιστικά μοντέλα βρέθηκε ότι η συναρμογή των δυο ιόντων συντελεί σε ένα σύμπλοκο μεταφοράς φορτίου από το αρνητικό ιόν στο θετικό . Αυτό συνεπάγεται μεγάλες μεταβολές στην κατανομή των  $\pi$  φορτίων στους φαινυλικούς δακτύλιους . Όταν το μόριο της χρωστικής είναι μόνο του έχει ομογενή κατανομή  $\pi$  φορτίου και πολύ χαμηλή πολικότητα . Μετά την αντίδραση η ομοιόμορφη κατανομή του  $\pi$  φορτίου μειώνεται και η πολικότητα του μορίου αυξάνεται . Είναι γνωστό ότι η ένταση της σκέδασης συντονισμού είναι ανάλογη προς το τετράγωνο της πολικότητας , επομένως το φαινόμενο resonance ενισχύεται . Η εκλεκτικότητα της μεθόδου είναι καλή αλλά κάποια ιόντα μπορούν να επηρεάσουν το αποτέλεσμα και για αυτό θα πρέπει να διαχωρίζονται πριν αρχίσει η πειραματική διαδικασία .



Από το σχήμα 16 γίνεται αντιληπτό ότι για να υπάρξει η συντονισμένη σκέδαση δεν αρκεί απλά το μήκος κύματος σκέδασης να είναι ίσο ή πολύ παραπλήσιο σε τιμή με το προσπίπτον μήκος κύματος, όπως στις κλασικές ελαστικές σκεδάσεις Rayleigh. Πρέπει ακόμα το μήκος κύματος να είναι πάρα πολύ κοντά σε μια ζώνη μοριακής απορρόφησης. Έτσι η εξάρτηση της σκεδαζόμενης έντασης αποκλίνει σημαντικά από το  $\lambda^{-4}$  και μπορεί να πάρει πολύ υψηλές τιμές σε κάποια μήκη κύματος.

### III) 4.β Interaction Induced Raman Light Scattering

Η μέθοδος της Raman σκέδασης φωτός που επάγεται από αλληλεπιδράσεις έχει διαφορετικό μαθηματικό υπόβαθρο, κάνει χρήση υπολογιστικών μοντέλων και εφαρμόζεται σε υπερκρίσιμα ρευστά για την καλύτερη κατανόηση των αλληλεπιδράσεων διαλύτη – διαλυμένης ουσίας. Δυαδικά μείγματα υπερκρίσιμων ρευστών CH<sub>4</sub> / CO και CH<sub>4</sub> / CO<sub>2</sub> μελετήθηκαν με 10% περιεκτικότητα σε μεθάνιο το οποίο δρα απλά ως σταθεροποιητής και δε θεωρείται ότι επηρεάζει σημαντικά τις ιδιότητες του ρευστού [27]. Η ένταση που ενδιαφέρει ένα πείραμα ii-Raman LS είναι η ανισοτροπική και που περιγράφεται από την ακόλουθη εξίσωση

$$I_{aniso} = [N_{12} - N_{11}]^2 \left\langle q^2 \left[ \sum_{i \neq j} (\Delta\Pi_{ij})'^{(XY)} \right]^2 \right\rangle \quad (57)$$

Η ανισοτροπική ένταση είναι η ένταση της σκέδασης που προκύπτει όταν η πόλωση του αναλυτή διασταυρώνεται με το μεγάλο διάνυσμα του ηλεκτρικού πεδίου E. Ο όρος μέσα στην αγκύλη είναι τοπική αριθμητική πυκνότητα διαλύτη – διαλυμένης ουσίας μείον την τοπική αριθμητική πυκνότητα διαλύτη-διαλύτη. q είναι η εντελώς συμμετρική κανονική συντεταγμένη έκτασης των μορίων μεθανίου και το  $\Delta\Pi_{ij}$  είναι η παράγωγος της διαμοριακής πολωσιμότητας από την αλληλεπίδραση διαλύτη (i) και ουσίας (j) όπως καταγράφεται από την ανισότροπη xy συνιστώσα της πολωσιμότητας. Δεν επιτρέπεται καταμέτρηση ενδομοριακής πολωσιμότητας ( $i \neq j$ ) και επιπλέον η (57) δεν περιέχει αλληλεπιδράσεις 3 σωματιδίων. Η διαφορά των αριθμητικών πυκνοτήτων δηλώνει κατάσταση ισορροπίας. Αφού μόνο το μόριο του

μεθανίου καταγράφεται δεν παρατηρούμε αλληλεπίδραση διαλύτη – διαλύτη . Το μεθάνιο επομένως χρησιμοποιείται ως αισθητήριο μόριο . Ο υπολογισμός της διαφοράς πυκνοτήτων γίνεται ως εξής

$$[N_{12} - N_{11}] = \frac{3\rho \int_{r_0}^R [g(r)_{12}^{\infty} - g(r)_{11}^0] r^2 dr}{(R^3 - r_0^3)} \quad (58)$$

$\rho$  είναι η πυκνότητα του μείγματος κατ' όγκον ,  $r_0$  είναι η πρώτη μη μηδενική τιμή των ακτινικών συναρτήσεων κατανομής  $g(r)_{ij}$  για τις αλληλεπιδράσεις διαλύτη – ουσίας και διαλύτη – διαλύτη .  $R$  είναι η τιμή του πρώτου ελαχίστου σε αυτές τις συναρτήσεις . Οι υπολογισμοί αποδεικνύουν ότι τα ολοκληρώματα αυτά  $G_{ij}$  σχετίζονται με την ελεύθερη ενέργεια Gibbs επιδιαλύτωσης  $\Delta G_{\text{solv}}$  . Η  $G_{ij}$  αποκλίνει καθώς πλησιάζουμε την κρίσιμη θερμοκρασία του διαλύτη . Τα διαγράμματα που ως άξονα Y έχουν την  $I_{\text{ανισο}} / d$  και άξονα X την πυκνότητα  $d$  (mole / L) σε θερμοκρασία 323 °K έδωσαν καμπύλες αναφοράς πολυωνυμικής μορφής ογδού βαθμού και για τα δυο συστήματα . Ωστόσο υπάρχουν σημαντικές διαφορές ανάμεσα σε CO και CO<sub>2</sub> . Στο CO υπάρχει διακριτή κορυφή κοντά στα 4 mol / l , μετά μια σχεδόν επίπεδη περιοχή (9-17 mol/l) και τελικά μια απότομη άνοδος στις μεγάλες περιοχές (~22 mol/l) . Αντιθέτως το CO<sub>2</sub> δείχνει διαρκώς άνοδο αυξανόμενης της πυκνότητας . Η πρώτη κορυφή είναι κοντά στην κρίσιμη πυκνότητά του (10.7 mol/l) , ακολουθεί μια ελαφριά πτώση κοντά στα 15 mol/l και τελικά μια απότομη άνοδος στα 22 mol/l . Οι διαφορές στα δυο συστήματα προκύπτουν από το γεγονός ότι το φως σκεδάζεται από μια κυβοτακτική περιοχή του συστήματος CO (4 mol/l) , ενώ στην περίπτωση του CO<sub>2</sub> το φως σκεδάζεται σε μεγαλύτερο εύρος λόγω του στοχαστικού συστήματος διαλύτη ουσίας . Κυβοτακτική είναι μια περιοχή με συγκεκριμένη διεύθυνση χώρου με μόρια διαλύτη και ουσίας που έλκονται . Όταν δεν υπάρχει κυβοτακτική διάταξη τότε η σκέδαση είναι στοχαστική , δηλαδή τυχαία από διάσπαρτα μόρια στο μείγμα . Μια άλλη σημαντική διαφορά είναι ότι η θερμοκρασία πειράματος είναι πολύ κοντά στην κρίσιμη θερμοκρασία του CO<sub>2</sub> και διπλάσια από την κρίσιμη θερμοκρασία του CO . Επομένως στην περίπτωση του CO<sub>2</sub> είμαστε ακόμα σε επιτρεπτά όρια συμπίεστικότητας , όπου υπάρχουν ακόμα πολλά διαμοριακά κενά στο σύστημα και τα μόρια του μεθανίου κατανέμονται στοχαστικά στο απωθητικό αυτό σύστημα . Καθώς η πυκνότητα αυξάνεται τα κενά συμπληρώνονται ολοένα και περισσότερο από τα

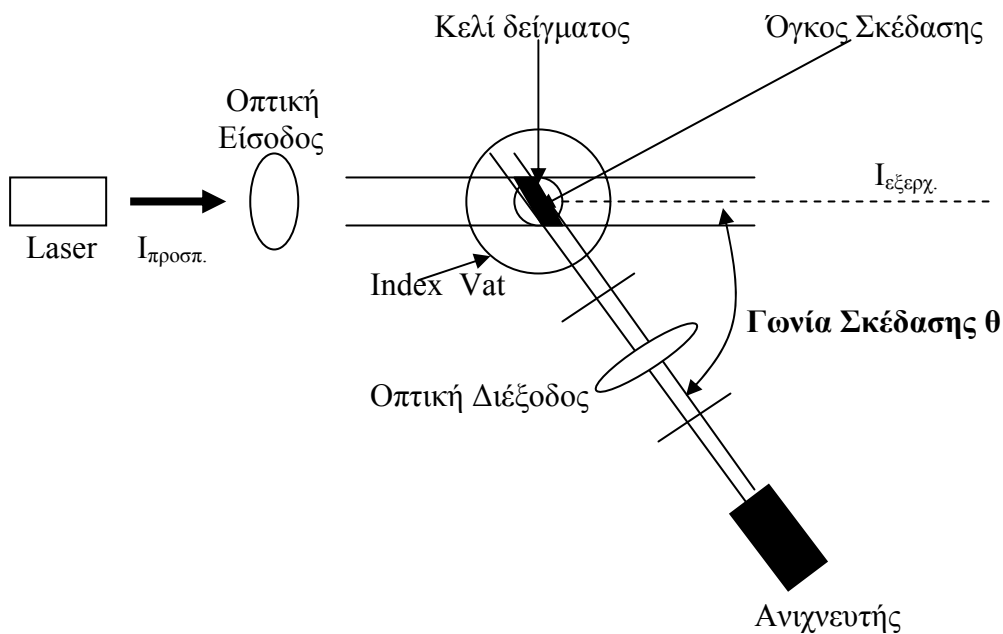
μεθάνια και ο όγκος σκέδασης έχει μεγαλύτερη συνεισφορά από το μεθάνιο . Για αυτό το λόγο το σήμα διαρκώς αυξάνεται . Το ελάχιστο που παρατηρείται κάποια στιγμή ίσως να οφείλεται σε αλληλεπιδράσεις 3 σωματιδίων όταν τα μόρια έχουν πια πλησιάσει πολύ , όμως αν η πυκνότητα αυξηθεί και άλλο τότε τα μόρια  $CO_2$  ανακατανέμονται στις περιοχές του μεθανίου και το σήμα αυξάνεται ξανά .

Στην περίπτωση του κυβοτακτικού συστήματος του  $CO$  όμως δεν υπάρχουν περιθώρια συμπίεστότητας . Το μέγιστο του σήματος στα  $4 \text{ mol/l}$  αντανακλά την οργανωμένη δομή . Αν η πυκνότητα αυξηθεί , τότε δε θα αυξηθεί η αριθμητική πυκνότητα των μεθανίων στον όγκο σκέδασης γιατί δεν υπάρχουν αρκετά δομικά κενά . Συνεπακόλουθα για μια μεγάλη περιοχή πυκνοτήτων δε θα υπάρξει σημαντική μεταβολή του σήματος . Αν όμως η πυκνότητα πάρει πολύ μεγάλες τιμές , πάνω από τα  $18 \text{ mol/l}$  , τότε τα μόρια  $CH_4$  στο σύστημα αυξάνονται τόσο πολύ που ενδεχομένως να διαμορφώνουν μια νέα κυβοτακτική περιοχή που ενισχύει πολύ το σήμα ανισοτροπικής σκέδασης . Η κυριότερη διαφορά μεταξύ των δυο συστημάτων φαίνεται ότι είναι η ύπαρξη κυβοτακτικότητας . *Το  $CO_2$  δε μπορεί να σχηματίσει τέτοιες περιοχές γιατί είναι απωστικό με το  $CH_4$*  . Σε θερμοκρασίες κοντά στην  $T_{\text{critical}}$  φαίνεται πως κυριαρχούν οι τυχαίες , μεγάλου βεληνεκούς , αλληλεπιδράσεις διαλύτη και ουσίας , ενώ σε θερμοκρασίες μακριά από την  $T_{\text{crit}}$  κυριαρχούν φαινόμενα σκέδασης από περιοχές με μεγαλύτερη δομική τάξη .

## **ΚΕΦΑΛΑΙΟ IV) ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ**

### A) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΤΑΞΗ ΓΙΑ ΣΚΕΔΑΣΗ ΦΩΤΟΣ

Τα πλεονεκτήματα της τεχνικής LS συμπεριλαμβάνουν το μέτριο κόστος των οργάνων και την υψηλή ροή των φωτονίων που παράγονται από τα laser . Σήμερα όλα τα εμπορικά διαθέσιμα μηχανήματα μπορούν να κάνουν τόσο ελαστικές όσο και ανελαστικές σκεδάσεις [2] . Το παρακάτω σχήμα είναι μια τυπική αναπαράσταση για ένα σύγχρονο πείραμα LS . Αποτελείται από μια πηγή φωτός , μια οπτική είσοδο , το δοχείο εξομάλυνσης δείκτη διάθλασης , το κελί του δείγματος , την οπτική διέξοδο και έναν ανιχνευτή . Η γωνία που σχηματίζει ο ανιχνευτής με την εξερχόμενη ακτινοβολία είναι η γωνία σκέδασης  $\theta$  και ρυθμίζεται με το γωνιόμετρο .



**Σχήμα 17 :** Διαγραμματική απεικόνιση ενός κοινού γωνιομέτρου Light Scattering

- Η πηγή του φωτός

Τα γωνιόμετρα είναι συνήθως εξοπλισμένα με μονοχρωματική πηγή φωτός , συνήθως laser Ar [5,8,10,11], He/Ne [6,13,15,21] ή Kr . Το laser όχι απλώς είναι

η μόνη αποτελεσματική πηγή φωτός αλλά και η πιο δαπανηρή . Μπορούν επίσης να χρησιμοποιηθούν φασματικές γραμμές καθαρών στοιχείων . Ωστόσο η ένταση που παράγουν αυτές οι λάμπες , όπως για παράδειγμα η λάμπα υδραργύρου , είναι χαμηλή και ο μέσος χρόνος ζωής είναι μικρός συγκρινόμενος με ενός laser . Πρέπει να σημειωθεί πως η εξερχόμενη ένταση ενός laser μπορεί να παρουσιάζει και διακυμάνσεις οι οποίες πρέπει να αποφευχθούν . Αυτές οι διακυμάνσεις οφείλονται στους γνωστούς παράγοντες όπως τυχαία πόλωση , παγιδευμένες φυσαλλίδες αέρα στο υγρό δείγμα ή ταλαντώσεις του υγρού δείγματος αν το κελί δεν είναι σταθερό .

- Η οπτική είσοδος

Αυτό το τμήμα της διάταξης μπορεί να συμμετάσχει πολύ ή λίγο , ανάλογα με το είδος του πειράματος δηλαδή Ελαστική Σκέδαση Φωτός (ELS) , ημι-ελαστική σκέδαση (QELS) ή μέτρηση ταχυτήτων Doppler του laser LDV . Τα μέρη που την αποτελούν είναι πάντοτε ένας εξασθενητής (φίλτρο) , μερικοί εστιακοί φακοί και μια σειρά από οπές για να εξαλείψουν το μη ευθύγραμμο φως . Είναι απαραίτητη η εστίαση της δέσμης laser · πρώτα απ' όλα επειδή η ακτινοβολία έχει ελαφρές αποκλίσεις από την ευθεία κατεύθυνση και δεύτερον επειδή θέλουμε να σκεδαστεί στο μέγιστο βαθμό φως σε μια μικρή απλή επιφάνεια συνοχής . Το εστιακό μήκος του φακού εισόδου πρέπει να είναι όσο πιο μικρό γίνεται . Ωστόσο ένα υπερβολικά μικρό εστιακό μήκος έχει ανεπιθύμητες παρενέργειες όπως το ότι ο ορισμός του διανύσματος σκέδασης γίνεται πιο λιγότερο ακριβής . Επίσης η ακτινοβολία μετά το σημείο εστίασης θα έχει σίγουρα υψηλές αποκλίσεις και ο φακός βρίσκεται πολύ κοντά στο δοχείο index matching , κάτι που περιορίζει πολύ τη γωνιακή ευελιξία των μετρήσεων αν θέλουμε μεγάλες γωνίες σκέδασης . Θα πρέπει λοιπόν να υπάρξει κάποιος συμβιβασμός , οπότε το οπτικό εστιακό μήκος είναι συνήθως στην περιοχή 10 – 20 cm . Ανάλογα με το πείραμα υπάρχουν και διαφορές στη διάταξη . Ένας επιπρόσθετος διαχωριστής ακτινοβολίας (beam splitter) είναι απαραίτητος αν πρέπει να καταγραφεί η ένταση του laser (μεγάλοι χρόνοι συσσώρευσης ή απόλυτες εντάσεις) ή αν χρειάζεται να γίνει πείραμα LDV σε μεγάλες γωνίες .

- Index matching bath (Λουτρό εξίσωσης δείκτη διάθλασης)

Όταν εστιασμένη δέσμη χτυπήσει στην επιφάνεια του κελιού δείγματος , προκύπτουν φαινόμενα περίθλασης και ψευδείς κορυφές έντασης σε διάφορες γωνίες επειδή ο σχετικός δείκτης διάθλασης μεταξύ γυαλιού και αέρα είναι περίπου 1.5 . **Για αυτό το λόγο ο διαλύτης του δείγματος πρέπει απαραίτητως να έχει δείκτη διάθλασης πολύ κοντά στο δείκτη διάθλασης του γυαλιού** . Συνηθισμένοι διαλύτες που χρησιμοποιούνται για αυτόν το λόγο είναι το τολουόλιο ή η δεκαλίνη . Το παράθυρο εισόδου και το παράθυρο εξόδου του δοχείου index matching τα οποία περιστοιχίζουν το κελί του δείγματος πρέπει να είναι επίπεδα για να αποφευχθεί απόκλιση του φωτός . Το ίδιο το κελί του δείγματος μπορεί να είναι σφαιρικό , κυβικό ή ορθογώνιο , αναλόγως το πείραμα . Για μεγάλο γωνιακό εύρος τα κυλινδρικά κελιά είναι πιο κατάλληλα παρά το ότι σε μικρές γωνίες η ακριβής τους ευθυγράμμιση είναι δύσκολη.

- Οπτική διέξοδος (συλλογή δεδομένων)

Αυτή η οπτική διάταξη περιλαμβάνει μια σειρά από οπές και φακούς και καθορίζει τον όγκο σκέδασης και τον αριθμό των περιοχών συνοχής που «βλέπει» ο ανιχνευτής. Μπορούμε να θεωρήσουμε ότι είναι μια κάμερα που αποσκοπεί να σχεδιάσει τον όγκο σκέδασης . Ο αριθμός των περιοχών συνοχής είναι σημαντικός μόνο για πειράματα DLS . Διακυμάνσεις στην τοπική διηλεκτρική σταθερά  $\epsilon$  δημιουργούνται από τυχαίες κινήσεις Brown ή από την κατευθυνόμενη κίνηση που προκαλείται από μια εφαρμοζόμενη ροή ή από H / M πεδίο . Οι διακυμάνσεις αυτές στη σκεδαζόμενη ένταση μπορούν να παρατηρηθούν σε οποιοδήποτε σημείο του πεδίου . Διακυμάνσεις σε δυο διαφορετικά σημεία δε μπορούν να συμπέσουν παρά μόνο αν τα σημεία είναι πολύ κοντά . Πρέπει λοιπόν η οπτική διέξοδος να σχηματίζει μικρή γωνία ειδάλλως το σήμα θα εξασθενήσει. Πολύ μικρή γωνία  $\theta$  όμως ελαττώνει την ένταση σκέδασης σε τόσο χαμηλά επίπεδα που είναι μη επιτρεπτά . Για άλλη μια φορά πρέπει να επιτευχθεί ένας συμβιβασμός .

- Ανιχνευτής

Ο ανιχνευτής συνήθως είναι ένας φωτοπολλαπλασιαστής (Photomultiplier) PMT που ακολουθείται από ένα μεγεθυντή παλμού και ένα διαλογέα (discriminator) . Αυτό το σύστημα ονομάζεται (PAD : pulse amplifier – discriminator) . Ο κύριος σκοπός του φωτοπολλαπλασιαστή είναι να ενισχύσει το απλό μονοφωτονικό σήμα που είναι ασθενές . Το εισερχόμενο φωτόνιο μετατρέπεται σε ηλεκτρόνιο που επιταχύνεται από ένα ηλεκτρικό πεδίο πάνω σε ένα μεταλλικό φύλλο . Η διαδικασία εξάγει πολλά ακόμα ηλεκτρόνια από τη μεταλλική επιφάνεια τα οποία με τη σειρά τους επιταχύνονται και το καθένα εξάγει και άλλα ηλεκτρόνια . Μετά από 9 ως 14 τέτοια βήματα αυτή η “αλυσίδα δυνόδου” (dynode) έχει πολλαπλασιάσει το αρχικό ηλεκτρόνιο  $10^5$  έως και  $10^7$  φορές . Αυτά τα ηλεκτρόνια πρέπει να μετατραπούν σε παλμό κατάλληλου πλάτους και διάρκειας (για τις ακόλουθες μονάδες επεξεργασίας παλμού) . Επίσης οι μικροί παλμοί που προέρχονται από άλλες πηγές πρέπει να απορριφθούν . Αυτή είναι η λειτουργία του PAD που λαμβάνει τα εξερχόμενα σήματα του PMT και μετατρέπει τα καταμετρημένα ηλεκτρόνια σε παλμούς . Ο αριθμός των παλμών σε ένα δεδομένο «χρονικό παράθυρο» είναι ανάλογος προς το μέγεθος της διακύμανσης και η χρονική διάρκεια κάθε παλμού περιέχει τις πληροφορίες που σχετίζονται με το χρόνο χαλάρωσης της διακύμανσης που συμβαίνει μέσα στο δείγμα . Ο PMT πρέπει να έχει μικρό νεκρό χρόνο , μεγάλη κβαντική απόδοση και μικρούς μεταπαλμούς (είναι οι δευτερεύοντες παλμοί που παράγει ένα θετικό ιόν) .

### B) ΠΡΟΣΘΕΤΕΣ ΠΛΗΡΟΦΟΡΙΕΣ ΓΙΑ ΤΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ

Η correlation function περιγράφει συνοπτικά πόσο γρήγορα μεταβάλλεται το σήμα λόγω των τυχαίων διακυμάνσεων (φαινόμενο Brown) και πόσος χρόνος απαιτείται ώστε το σήμα να χάσει τη «μνήμη» της προηγούμενης τιμής του [28] . Αν βρεθούν πολλά σωματίδια στο στοιχειώδη όγκο σκέδασης θα προκληθεί ισχυρή σκέδαση της ακτινοβολίας . Το αντίθετο συμβαίνει όταν τα σωματίδια απομακρύνονται από το στοιχειώδη όγκο . Επειδή ο χρόνος δειγματοληψίας ,  $\Delta t$  , είναι πολύ μικρός οι θέσεις των σωματιδίων δε διαφοροποιούνται σημαντικά σε αυτά τα χρονικά πλαίσια . Αν ληφθούν μεγαλύτερα  $\Delta t$  , τότε δε μπορεί να γίνει συσχέτιση . Η συσχέτιση για DLS

είναι ένα μέτρο της ομοιότητας δυο μεγεθών . Αν ο όγκος σκέδασης  $V$  χωριστεί σε στοιχειώδεις όγκους σε σχέση με το  $\lambda$  της ακτινοβολίας , τότε το συνολικά σκεδαζόμενο ηλεκτρικό πεδίο  $E_S$  μπορεί να θεωρηθεί ως υπέρθεση των πεδίων που σκεδάζει ο κάθε όγκος  $E_S = \sum_n E_S^{(n)}$  , όπου  $E_S^{(n)}$  το πεδίο που σκεδάζει κάθε στοιχειώδες τμήμα . Αν κάθε  $dV$  θεωρηθεί ότι είναι αρκετά μεγάλο για να επιτρέπει ανεξάρτητη κίνηση των σωματιδίων που περιέχει , τότε τα σκεδαζόμενα πεδία μπορούν να θεωρηθούν ανεξάρτητες μεταβλητές και το συνολικό πεδίο θεωρείται τυχαία μεταβλητή με Gaussian κατανομή . Η συνάρτηση συσχέτισης δίνεται από τη σχέση του Siegert

$$G^{(2)}(t) = |G^{(1)}(0)| \left( 1 + \frac{|G^{(1)}(t)|^2}{|G^{(1)}(0)|^2} \right) \quad (59)$$

Αυτό που πρακτικά μας ενδιαφέρει είναι η κανονικοποιημένη μορφή της συνάρτησης συσχέτισης της έντασης που δίνεται από τη σχέση

$$g^{(2)}(q,t) = \frac{G^{(2)}(q,t)}{|G^{(1)}(q,0)|^2} = 1 + f^* |ag^{(1)}(q,t)|^2 \quad (60)$$

όπου  $g^{(1)}(q,t) = \frac{G^{(1)}(q,t)}{G^{(1)}(q,0)}$  η κανονικοποιημένη συνάρτηση **αυτοσυσχέτισης** του πεδίου ,  $f^*$  ένας παράγοντας που εξαρτάται από την πειραματική διάταξη και  $a$  το ποσοστό της σκεδαζόμενης DLS έντασης που είναι μετρήσιμη με φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων . Μια συνηθισμένη τιμή  $a$  είναι  $10^{-3}$  ή  $10^{-4}$  .

Σε ένα πείραμα συσχέτισης , η ένταση  $I$  μπορεί να πάρει και αρνητικές τιμές . Η μορφή της καμπύλης στον άξονα του χρόνου παρουσιάζει διάφορες θετικές και αρνητικές κορυφές και έχει διακυμάνσεις , ωστόσο θυμίζει λίγο μια ημιτονοειδή συνάρτηση χωρίς όμως σταθερή φάση [29] . Αν υποθέσουμε ότι έχουμε μονοδιάσπαρτα σωματίδια μικρού μεγέθους , τότε η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης φθίνει ως απλή εκθετική της μορφής  $G^{(1)}(t) = B \exp(-q^2Dt)$  , όπου  $D$  ο συντελεστής διάχυσης που βρίσκεται στο χρονικό γινόμενο και μπορεί να υπολογιστεί εύκολα συναρτήσει των χρόνων δειγματοληψίας  $\tau$  στους οποίους μετράται η συνάρτηση . Οι χρόνοι χαλάρωσης είναι δεκάδες και το χρονικό διάστημα που πρέπει να διαρκέσει



ένα επαρκές πείραμα είναι αρκετά μεγάλο . Για αυτό το λόγο οι συσχετιστές φωτονίων χρησιμοποιούν λογαριθμική απόσταση μεταξύ των χρόνων καθυστέρησης έτσι ώστε ο χρόνος δειγματοληψίας να αυξάνεται όσο προχωρά ο χρόνος καθυστέρησης . Η πειραματική σταθερά του οργάνου  $f^*$  σχετίζεται με το μέγεθος του όγκου σκέδασης ο οποίος καθορίζεται από το μέγεθος των οπών στις οπτικές διόδους και την περιοχή συνοχής της δέσμης . Η περιοχή συνοχής (coherence area) είναι η περιοχή όπου όλα τα σκεδαζόμενα φωτόνια που φτάνουν στην επιφάνεια του ανιχνευτή έχουν την ίδια φάση [30] . Αν ο όγκος σκέδασης έχει ακτίνα  $a$  ή η απόσταση από τον ανιχνευτή  $R$  (ακτίνα  $b$ ) είναι αρκετά μεγάλα τότε τα φωτόνια που προέρχονται από διαφορετικές περιοχές του όγκου σκέδασης θα ακολουθήσουν διαφορετικού μήκους διαδρομές και θα φτάσουν στον ανιχνευτή με διαφορετικές φάσεις . Για να εξαλείψουμε στο μέγιστο βαθμό αυτές τις διαφορές φάσης και να υπάρχει συγχρονισμός η επιφάνεια του ανιχνευτή θα πρέπει να είναι μικρότερη ή ίση με μια επιφάνεια συνοχής

$$A_{coh} = \pi b^2 = \frac{\lambda^2 R^2}{\pi \alpha^2} \quad (61)$$

Αν ο όγκος σκέδασης έχει ακτίνα  $a$  ώστε η επιφάνεια σκέδασης  $\pi a^2$  να είναι μεγαλύτερη από την περιοχή συνοχής , τότε ο φωτοπολλαπλασιαστής θα ανιχνεύσει μικρότερες διακυμάνσεις στη σκεδαζόμενη ένταση . Όσο οι διακυμάνσεις που ανιχνεύονται ελαττώνονται , ανιχνεύεται μικρότερη δυναμική πληροφορία από το δείγμα . Δηλαδή τα φωτόνια βρίσκονται εκτός φάσης όχι μόνο επειδή έχουν να διανύσουν διαφορετικές αποστάσεις , αλλά και λόγω κινήσεων των πολυμερικών ή μακρομοριακών αλυσίδων . Η τιμή της συνάρτησης από την (60) ελαττώνεται από τη μέγιστη τιμή που είναι 1 στην ελάχιστη τιμή που είναι  $f^*$  (θεωρητικά βέβαια αν λάβουμε το ποσοστό  $\alpha = 100\%$ ) . Αυτό το φαινόμενο μπορεί να χρησιμοποιηθεί για να υπολογιστεί η σταθερά  $f^*$  του οργάνου . Για παράδειγμα αν έχουμε ένα αραιό διάλυμα πολυστυρενίου σε τολουόλιο το  $f^*$  υπολογίζεται με τον εξής τύπο

$$f^* = \frac{A}{[1 - (1 - \phi) * \frac{I_{tol}}{I_{PS/tol}}]^2} \quad (62)$$

Α είναι το πλάτος της συνάρτησης του διαλύματος πολυστυρενίου ,  $I_{tol}$  η ένταση που σκεδάζεται από καθαρό τολουόλιο και  $I_{PS/tol}$  η ένταση που σκεδάζεται από το πρότυπο διάλυμα .  $\phi$  είναι το κλάσμα όγκου διαλυμένης ουσίας προς διαλύτη . Η παράμετρος  $a$  υπολογίζεται επίσης εύκολα . Λαμβάνοντας υπόψη πως όλη η σκεδαζόμενη ένταση του διαλύματος βρίσκεται μέσα στο παράθυρο του συσχετιστή , τότε  $a = (I_{διαλ.} - I_{tol}) / I_{διαλ.}$

Η επεξεργασία των συναρτήσεων αυτοσυσχέτισης που καταγράφονται γίνονται με μαθηματικά μοντέλα και υπολογιστικά προγράμματα για να διεξαχθούν οι κατάλληλες προσαρμογές (fits) . Τα δυο κυριότερα είναι η συνάρτηση των Kohlrausch – Williams – Watts (KWW) και ο αντίστροφος μετασχηματισμός Laplace (Inverse Laplace Transformation) . Η συνάρτηση KWW δίνεται από τη σχέση

$$g^{(1)}(q, t) = a(q) \exp[-(\frac{t}{\tau(q)})^\beta] \quad (63)$$

$a(q)$  είναι το πλάτος ,  $\tau$  ο χρόνος χαλάρωσης και η παράμετρος  $\beta$  σχετίζεται με τη μορφή της καμπύλης [31] . Αν  $\beta = 1$  έχουμε απλή εκθετική συνάρτηση που όντως ισχύει για απλές διαδικασίες διάχυσης . Χαλαρώσεις σε τμήματα της αλυσίδας είναι πιο πλατειές και ο εκθέτης παίρνει τιμές μικρότερες ή ίσες με 0.5 . Η εκθετική εξασθένιση μιας διάχυσης μπορεί να διαστρεβλωθεί λόγω πολυδιασποράς , ωστόσο το  $\beta$  είναι πάντα μεγαλύτερο από 0.8 για ανιονικά πολυμερή . Για να μην υπάρχουν ελαττωματικές μετρήσεις , το μοντέλο KWW εφαρμόζεται όταν υπάρχει απόλυτη βεβαιότητα πως η διαδικασία χαλάρωσης είναι απλή εκθετική .

Το δεύτερο μοντέλο εφαρμόζεται πιο συχνά γιατί καλύπτει και περιπτώσεις όπου πάνω από δυο διαδικασίες χαλάρωσης συνεισφέρουν στη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης . Το μοντέλο KWW κάνει τα δεδομένα αμφισβητούμενα και τότε η ανάλυση ILT δίνει τη λύση . Η μορφή της συνάρτησης αυτοσυσχέτισης δεν έχει μια απλή μορφή  $L(\ln t)$  , αλλά είναι μια υπέρθεση εκθετικών

$$ag^{(1)}(q, t) = \int_{-\infty}^{\infty} L(\ln \tau) \exp[-t / \tau(q)] d(\ln \tau) \quad (64)$$

Αυτή η εξίσωση ορίζει ένα συνεχές φάσμα από χρόνους χαλάρωσης  $L(\ln t)$  . Οι μέσοι χρόνοι που λαμβάνονται από τη συνάρτηση  $L(\ln t)$  χρησιμοποιούνται για να

χαρακτηρίσουν τις διαδικασίες χαλάρωσης . Είναι πολύ σημαντικό το γεγονός ότι η μεταβλητή δεν είναι πια ο χρόνος  $\tau$  , αλλά ο λογάριθμος του χρόνου  $\ln\tau$  που μας επιτρέπει να καλύψουμε πολύ μεγαλύτερο χρονικό εύρος .

### Γ) ΟΡΓΑΝΟΛΟΓΙΑ ΔΙΑΣΤΑΥΡΩΤΗΣ ΣΥΣΧΕΤΙΣΗΣ (CROSS CORRELATION)

Η πολυδιασπορά είναι ένα σημαντικό πρόβλημα και μια τεχνική για να εξαλειφθούν αποτελεσματικά τα φαινόμενα πολλαπλής σκέδασης , χωρίς μεγάλη αραίωση , είναι η cross – correlation [15] . Δυο διαφορετικά πειράματα σκέδασης διεξάγονται ταυτόχρονα στον ίδιο όγκο σκέδασης . Υπάρχουν λοιπόν δυο διαφορετικά διανύσματα προσπίπτουσας ακτινοβολίας  $k_{i1}$  και  $k_{i2}$  και δυο ανιχνευτές σε διαφορετικές θέσεις που σχηματίζουν διανύσματα  $k_{f1}$  και  $k_{f2}$  . Τα σήματα που δέχονται οι ανιχνευτές διασταυρώνονται . Με τη χρήση του ίδιου κυματανύσματος  $q$  αλλά διαφορετικές θέσεις σκέδασης και αγνοώντας την πολλαπλή σκέδαση , οι σχέσεις που περιγράφουν το δομικό παράγοντα  $S(q,\tau)$  και οι μετρούμενες συναρτήσεις αυτοσυσχέτισης  $G_{11}^1(\tau)$  και διασταυρωτής συσχέτισης  $G_{12}^1(\tau)$  , όπου ο δείκτης (1) υπονοεί απλή σκέδαση , μπορούν να γραφούν ως εξής

$$G_{11}^{(1)}(\tau) = I_1^{(1)2} (1 + \beta |S(q, \tau)|^2) \quad (65)$$

$$G_{12}^{(1)}(\tau) = I_1^{(1)} I_2^{(1)} (1 + \beta_{12} |S(q, \tau)|^2) \quad (66)$$

όπου  $I_1$  και  $I_2$  οι μέσες εντάσεις που καταγράφουν οι ανιχνευτές 1 και 2 και η παράμετρος  $\beta_{12}$  της συνάρτησης cross correlation  $G_{12}^{(1)}(\tau)$  δίνεται από τη σχέση

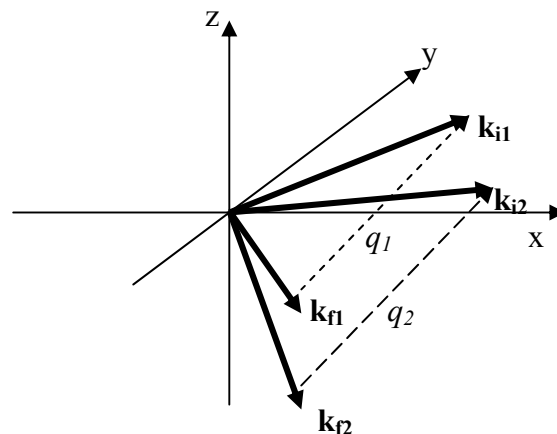
$$\beta_{12} = \beta \exp(-\delta q^2 R^2 / 4) \exp(-\delta x^2 / R^2) \quad (67)$$

Το  $\beta$  που υπολογίζεται στη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης εξαρτάται από οπτικές παραμέτρους και οι επιπρόσθετοι όροι περιγράφουν τη μείωση του  $\beta_{12}$  λόγω διαφοράς φάσεων . Το  $\delta q$  κατ' απόλυτη τιμή περιγράφει πόσο συμπίπτουν τα δυο

κυματανύσματα . Το  $\delta x$  δηλώνει τη χωρική απόκλιση μεταξύ των δυο όγκων σκέδασης . Επειδή όμως τα φαινόμενα πολλαπλής σκέδασης είναι αναπόφευκτα , η πραγματική μορφή της (65) είναι

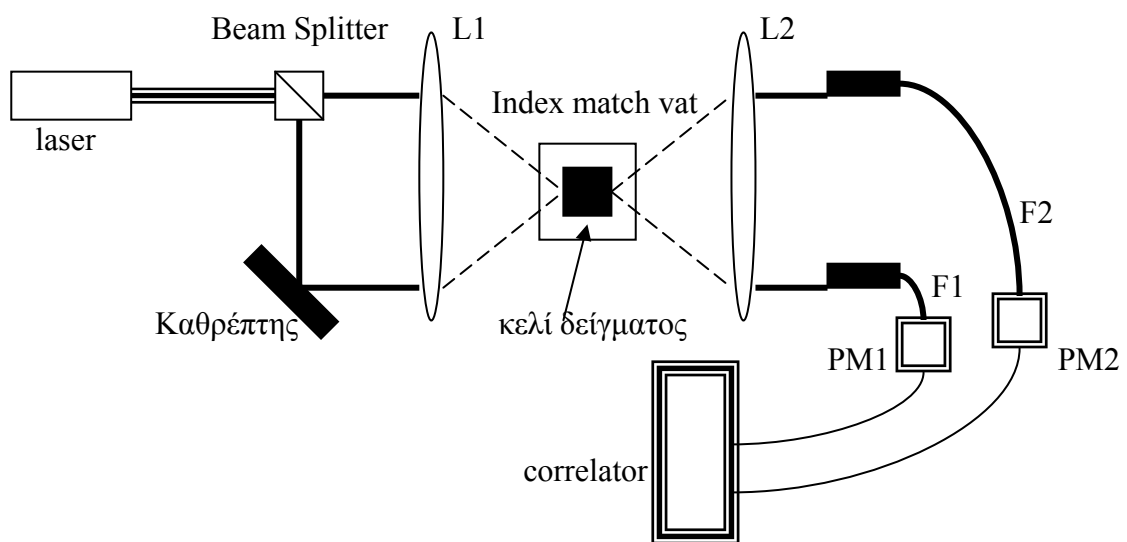
$$G_{12}(\tau) \approx I_1 I_2 + \beta_{12} I_1^{(1)} I_2^{(1)} |S(q, \tau)|^2 \quad (68)$$

όπου  $I_j$  είναι η μέση ένταση από όλες τις διαδικασίες σκέδασης (απλή και πολλαπλή) που μετρά ο ανιχνευτής  $j$  , και  $I_j^{(1)}$  η ένταση που οφείλεται μόνο σε απλή σκέδαση . Η εξίσωση (67) λοιπόν δίνει το δομικό παράγοντα  $S(q, \tau)$  ακόμα και σε τυρβώδη αιωρήματα με έντονη πολλαπλή σκέδαση . Μια κοινή γεωμετρική διάταξη για αυτού του είδους τα πειράματα είναι η λεγόμενη τρισδιάστατη cross – correlation . Οι δυο προσπίπτουσες και οι δυο ανιχνευόμενες οπτικές διαδρομές τοποθετούνται υπό γωνία  $\delta/2$  πάνω και κάτω από το επίπεδο συμμετρίας του πειράματος σκέδασης [32] . Τα αρχικά διανύσματα  $k_{i1}$  και  $k_{i2}$  και τα τελικά διανύσματα  $k_{f1}$  και  $k_{f2}$  περιστρέφονται ανά ζεύγη γύρω από το **κυματάνυσμα  $q = q_1 = q_2$  που είναι κοινό** για τις δυο διαδικασίες σκέδασης  $\text{πηγή } 1 \rightarrow \text{ανιχνευτής } 1$  και  $\text{πηγή } 2 \rightarrow \text{ανιχνευτής } 2$  , ενώ οι διαδικασίες  $1 - 2$  και  $2 - 1$  που θα μετρήσει το πείραμα θα έχουν διαφορετικά κυματάνυσμα  $q$  . Η μέγιστη τιμή αυτής της ανεπιθύμητης συνεισφοράς που εκφράζεται ως υπόβαθρο μέσω της παραμέτρου  $\beta_{12}$  είναι 25 % της ακτινοβολίας , δηλαδή 0.25 . Οι γεωμετρίες των διανυσμάτων στο καρτεσιανό επίπεδο φαίνονται καλύτερα στο σχήμα που ακολουθεί



**Σχήμα 18 :** Διαγραμματική περιγραφή της διάταξης των κυματανυσμάτων σε πείραμα 3-D cross correlation . Η γωνία  $\theta$  που σχηματίζει κάθε ζεύγος αρχικού-τελικού διανύσματος  $k_{i(n)} - k_{f(n)}$  , όπου  $n$  ο ανιχνευτής , είναι κοινή . Η γωνία  $\delta$  που σχηματίζει κάθε ζεύγος αρχικού – αρχικού ή τελικού-τελικού διανύσματος κατά την περιστροφή είναι κοινή . Τα κυματάνυσμα  $q_1$  και  $q_2$  που προκύπτουν με αυτές τις προϋποθέσεις είναι παράλληλα και ίσα σε μέτρο

Η ακτίνα laser χωρίζεται σε δυο παράλληλες δέσμες όταν βγαίνει από την πηγή, με τη βοήθεια ενός beamsplitter. Ένας φακός  $L_1$  (επίπεδος κυρτός) δέχεται τις δυο δέσμες και τις εστιάζει στο λουτρό index vat δημιουργώντας γωνία  $\delta$  μεταξύ τους. Η μια δέση προσπίπτει απευθείας στο φακό και η δεύτερη προσανατολίζεται με τη βοήθεια ενός καθρέφτη. Η  $\delta$  πρέπει να είναι αρκετά μεγάλη για να εξαλείφει συνεισφορές πολλαπλής σκέδασης. Για  $\delta = 18^\circ$  το multiple scattering μειώνεται πάνω από χίλιες φορές. Η θερμοκρασία του λουτρού ελέγχεται με θερμοστάτη. Οι εξερχόμενες ακτινοβολίες (που εξακολουθούν να σχηματίζουν γωνία  $\delta$ ) προσπίπτουν σε ένα πανομοιότυπο με τον προηγούμενο φακό  $L_2$ . Τα κυματανύσματα εξόδου συλλέγονται με τη βοήθεια οπτικών ινών  $F_1$  και  $F_2$ . Οι ίνες οδηγούν σε δυο διαφορετικούς φωτοπολλαπλασιαστές PM1 & PM2 και τελικά στον επεξεργαστή.



**Σχήμα 19 :** Πειραματική διάταξη για 3D cross correlation

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ V) ΒΙΟΧΗΜΙΚΟ ΜΕΡΟΣ : CHLOROBBIUM TERPIDUM

### ΕΙΣΑΓΩΓΙΚΑ ΓΙΑ ΤΑ ΒΑΚΤΗΡΙΑ CHLOROBBIUM

Τα πράσινα θειοβακτήρια (Chlorobiaceae) είναι αυστηρά αναερόβιοι φωτοαυτοτροφικοί οργανισμοί που αναπτύσσονται σε ισχυρά αναγωγικές συνθήκες (π.χ. περιβάλλον πλούσιο σε  $H_2S$ ) σε χαμηλό φως . Χαρακτηρίζονται από την παρουσία ενός συστήματος μεγάλων κεραιών , τα αποκαλούμενα «χλωροσώματα» , που καθορίζουν την προσαρμογή τους σε χαμηλό φως . Τα θειοβακτήρια έχουν ενεργά κέντρα που παρουσιάζουν πολλές δομικές ομοιότητες με τα φωτοσυστήματα PS I σε φυτά και κυανοβακτήρια . Έχουν προταθεί διάφορες παραλλαγές χρωστικών που παίζουν το ρόλο πρωτεύοντα δέκτη ηλεκτρονίων (το ανάλογο του ηλεκτρονιακού υποδοχέα  $A_0$  στα PS I) οι οποίες συμπεριλαμβάνουν βακτηριοφαιοφυτίνη (BPh-c) , βακτηριοχλωροφύλλη (BChl-c) , όπως επίσης και ισομερές χλωροφύλλης α . Το είδος *Chlorobium limicola thiosulfatophilum* μελετήθηκε με φασματοσκοπία υπεριώδους-ορατού καθώς και συντονισμού Raman για να εξακριβωθεί ποιος είναι ο υποδοχέας του ενεργού κέντρου . Το φάσμα UV-Vis παρουσιάζει μέγιστο απορρόφησης στα 816 nm , το οποίο είναι γνωστή απορρόφηση για μια χρωστική που ονομάζεται βακτηριοχλωροφύλλη α (BChl α) και έναν ώμο στα 840 nm που αντιστοιχεί στον πρωτεύοντα δότη ηλεκτρονίων που ονομάζεται P840 . Η Soret ζώνη απορρόφησης για την BChl α έχει μέγιστο γύρω στα 370 nm . Οι Soret μεταπτώσεις για όλες τις αντίστοιχες χρωστικές (BChl c , Chl α κτλ.) είναι στο εύρος 410 – 430 nm . Η ενέργεια διέγερσης στα 441.6 nm κρίθηκε ως η πιο κατάλληλη για να εξαχθούν εκλεκτικές πληροφορίες συντονισμού Raman .

Στα  $1600 - 1615 \text{ cm}^{-1}$  το φάσμα Resonance Raman των βακτηριοχλωρινών έχει μια ζώνη που προέρχεται από δονήσεις τάσεως γεφυρών μεθυλενίου [33] . Αυτή η απορρόφηση είναι ευαίσθητη ως προς τον αριθμό συναρμογής των κεντρικών ατόμων μαγνησίου στις πορφυρίνες . Υπάρχει επίσης απορρόφηση στην περιοχή  $1600 - 1700 \text{ cm}^{-1}$  που αντιστοιχεί σε δονήσεις έκτασης του C=O του  $C_9$  . Η δόνηση αυτή παρατηρείται γύρω στους 1700 όταν το καρβονύλιο είναι ελεύθερο από αλληλεπιδράσεις και στους 1660 όταν συμμετέχει σε αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου . Υπάρχει ακόμα ζώνη γύρω στους  $1550 \text{ cm}^{-1}$  που είναι χαρακτηριστική για μόρια χλωρίνης . Πειραματικά δεδομένα σε

διαφορετικές ενέργειες διέγερσης αποδεικνύουν ότι οι καρβονυλικές δονήσεις έκτασης προέρχονται αποκλειστικά από την BChl α . Οι κορυφές στα 1555 και στα 1610  $\text{cm}^{-1}$  υποδεικνύουν πεντασυναρμοσμένη γεωμετρία του ιόντος μαγνησίου στο μόριο της πορφυρίνης (από ανάλογα πειράματα με άλλες χλωροφύλλες) . Αυτό αποδεικνύει ότι το Mg συναρμόζεται με μονάχα έναν αξονικό υποκαταστάτη . Αν υπήρχε αριθμός συναρμογής 6 οι κορυφές αυτές θα έπρεπε να είναι κατά 10  $\text{cm}^{-1}$  τουλάχιστον μικρότερες . Η κορυφή στα 1666 είναι ένδειξη ότι το καρβονύλιο C<sub>9</sub> έχει κάποιου είδους διαμοριακή αλληλεπίδραση . Δεν είναι αρκετά χαμηλής συχνότητας για να υποθεθεί πως υπάρχει συναρμογή με το κεντρικό Mg , οπότε κατά πάσα πιθανότητα υπάρχει δεσμός υδρογόνου .

Το γονίδιο για τα ενεργά κέντρα της *C. limicola* έχει ανακαλυφθεί και καθορίστηκε μονάχα μια αλληλουχία γονιδιώματος για τον πρωτεϊνικό πυρήνα . Αυτό έρχεται σε αντίθεση με τα δυο διακριτά γονίδια *psaA* & *psaB* για το PS I , τα οποία κωδικοποιούν δυο μεγάλες μεμβρανικές πρωτεΐνες που σχηματίζουν έναν ετεροδιμερή πυρήνα . *Η παρουσία ενός γονιδίου για το Chlorobium υπονοεί έντονα την ύπαρξη ομοδιμερούς στον πυρήνα του ενεργού κέντρου .*

## ΜΕΡΟΣ 1<sup>ON</sup> : ΔΟΜΗ CHLOROBIVM TERPIDUM

### V) 1.a ΓΕΝΙΚΗ ΠΕΡΙΓΡΑΦΗ ΦΩΤΟΣΥΛΛΕΚΤΙΚΟΥ ΣΥΣΤΗΜΑΤΟΣ

Το ομοδιμερές που σχηματίζεται από το γονίδιο PsaA στο Chlorobium Terpidum περιέχει το δότη ηλεκτρονίων P<sub>840</sub> (ένα ειδικό ζεύγος από BChl α), ένα μονομερές BChl α (αρχικός δέκτης ηλεκτρονίων), έναν ενδιάμεσο δέκτη ηλεκτρονίων αντίστοιχο με τον κοινό A<sub>1</sub> στα PS I, ο οποίος φημολογείται ότι είναι μια μενακινόνη, και clusters Fe – S ανάλογα με τα F<sub>x</sub> των PS I. Τέλος υπάρχει και ένα σύστημα από 7 BChl α το οποίο ονομάζεται πρωτεΐνη των Fenna – Matthews – Olson (FMO) και που δε συναντάται στα υπόλοιπα είδη φωτοσυνθετικών βακτηρίων [34]. Το απομονωμένο σύμπλοκο του ενεργού κέντρου περιέχει τις πρωτεΐνες PscA, PscB, PscC, PscD & FMO. Η αλληλεπίδραση των συμπλόκων που σχηματίζουν τα PscA & PscC με την FMO μελετήθηκε σε διαφορετικές συγκεντρώσεις ηλεκτρολύτη NaCl. Τα εκλούόμενα δείγματα είχαν ως κύρια κορυφή το σύμπλοκο PscA-PscC και μια μικρή κορυφή που αντιστοιχούσε σε ένα άλλο πρωτεϊνικό κλάσμα. Το γεγονός ότι οι δυο κορυφές είχαν διαφορετικές αναλογίες απορρόφησης σε μετρήσεις με διαφορετικά μήκη κύματος, υποδεικνύει ότι υπάρχουν δυο διαφορετικά σύμπλοκα σε κάθε κορυφή και όχι διαφορετικά στάδια συσσωμάτωσης του ίδιου συμπλόκου. Η αυξανόμενη συγκέντρωση άλατος στο υγρό έκλυσης δεν επηρέασε πολύ τις απορροφήσεις κάτι που επαληθεύει την παραπάνω παρατήρηση. Είναι βέβαιο ότι η FMO αλληλεπιδρά με το σύμπλοκο.

Η SDS ηλεκτροφόρηση έδωσε ζώνες στα 100, 70, 55, 42 και 20 kDa. Η ζώνη των 55 kDa αντιστοιχεί στην PscA. Η ζώνη χαμηλότερου μοριακού βάρους (20 kDa) ανήκει στην PscC. Η ζώνη στα 42 kDa είναι αρκετά ασθενής και ανήκει στην FMO. Οι υπόλοιπες ζώνες ανήκουν μάλλον σε υπομονάδες που συσσωματώνονται. Με τη βοήθεια ηλεκτροφόρησης και φασματοσκοπίας STEM βρέθηκε ότι το βάρος για ολόκληρο το σύμπλοκο είναι 248 kDa. Η προτεινόμενη δομή είναι δυο μονάδες PscA (2 x 82.5 kDa), μια μονάδα PscC (20 kDa), 20 μόρια BChl α – κεραίες (20 x 1 kDa) και περίπου 50 kDa που αποδίδονται στο detergent ή τον λιπιδικό δακτύλιο που βοήθησε στη διαλυτοποίηση και την απομόνωση της μεμβράνης. Το ενεργό κέντρο έχει λιγότερες μεμβρανικές πρωτεΐνες σε σχέση με τα PS I. Η πυκνότητα είναι μεγάλη στα άκρα των μεγάλων αξόνων και μικρότερη στο

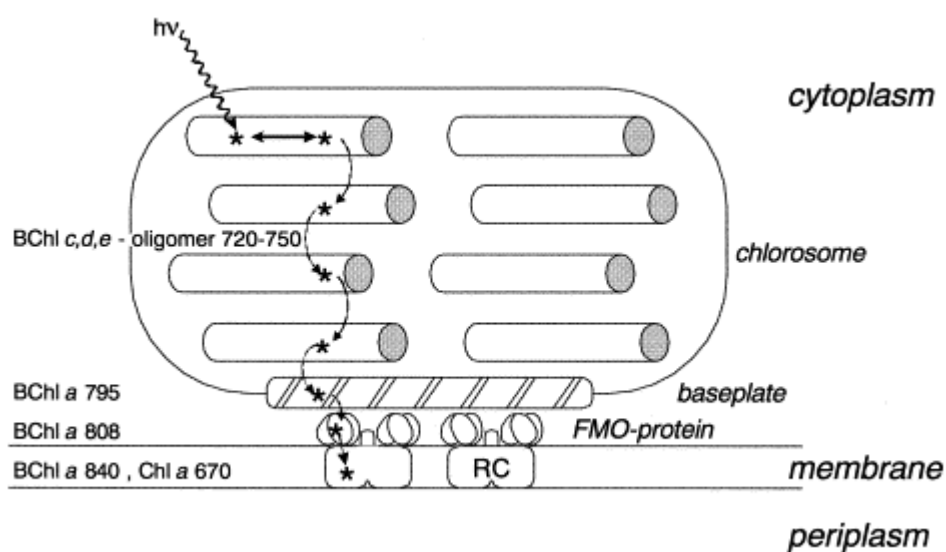


μέσο . Οι δυο μεγαλύτερες προεξοχές από τον πυρήνα μάλλον αναπαριστούν τις μεγάλες υδροφιλικές αλυσίδες που προβλέπονται από την πρωτοταγή διάταξη των πρωτεϊνών . Στην κορυφή υπάρχει ασυμμετρία , κάτι που συνηγορεί υπέρ του ότι υπάρχει μόνο μια μονάδα PscC . Υπάρχει επίσης ασυμμετρία στις πλευρικές περιοχές , κάτι που υποδεικνύει ότι η οδόντωση (δηλαδή η θέση σύνδεσης του ενεργού κέντρου) βρίσκεται κυρίως στη μια πλευρά του ομοδιμερούς συμπλόκου . Η ανάλυση των μικρών σωματιδίων που υπάρχουν στους χάρτες STEM και είναι οι FMO , έδειξαν τριγωνικό σχήμα . Υπάρχει οδόντωση γύρω από τον άξονα συμμετρίας τριπλής τάξης και έχει επιβεβαιωθεί ότι η FMO έχει τριμερή δομή .

Εκτιμάται ότι υπάρχουν ένα ή δυο τριμερή FMO ανά ενεργό κέντρο . Λεπτομερέστερη ανάλυση SDS απέδειξε ότι υπάρχει ζώνη στα 23 και στα 16 kDa . Η πρώτη αποδίδεται στην PscB και η δεύτερη στην PscD . Αμφότερες οι πρωτεΐνες απαντώνται μια φορά στο ενεργό κέντρο [35] . Μέσες τιμές που πάρθηκαν από μελέτη πολλών ενεργών κέντρων υποδεικνύουν τη σύνδεση δυο πρωτεϊνικών περιοχών . Η μια έχει μήκος 15 nm και πλάτος 6 nm , ελλειψοειδές σχήμα και δυο περιφερειακές προεξοχές . Η άλλη είναι πιο συμπαγής , με διαστάσεις 8 nm x 6 nm και βρίσκεται στην περιφέρεια της επιμήκους περιοχής . Η σύνδεση των δυο περιοχών γίνεται με μια προεξοχή που προέρχεται από το κέντρο του συμπλόκου . Η πιθανή δομή είναι ότι η μικρή περιοχή είναι το τριμερές FMO το οποίο αλληλεπιδρά με την επιμήκη περιοχή (το κυρίως ενεργό κέντρο) . Η σύνδεση των δυο μονάδων γίνεται με δυο τρόπους : περιφερειακά και μέσω της προεξοχής από το κέντρο . Πιθανώς αυτή η προεξοχή να είναι οι περιοχές PscB – PscD . Σε αναλογία με τα κυανοβακτηριακά PS I , οι κεραίες της BChl *a* στο ενεργό κέντρο αναμένεται να σχηματίσουν ένα ωοειδές cluster με μεγάλο άξονα γύρω στα 13 nm . Η υπομονάδα PscD τείνει να αλληλεπιδρά με τις FMO , άρα προφανώς η συνδετική γέφυρα τριμερούς FMO – ενεργού κέντρου είναι η PscD . Η κυτταροπλασματική πρωτεΐνη που εντοπίζεται στο μέσο του ομοδιμερούς PscA είναι μάλλον η PscB που περιέχει τα clusters Fe-S . Η κεντρική αυτή θέση για το Fe – S είναι σε αναλογία με κυανοβακτήρια . Το τριμερές FMO μπορεί να ανιχνευθεί με STEM καθώς δίνει κορυφή γύρω στα 183 kDa .

Στις φωτοσυνθετικές μονάδες διαφορετικών φωτοσυστημάτων οι διεγερμένες καταστάσεις των χρωστικών μεταφέρονται από τις εξωτερικές κεραίες στις εσωτερικές , μέχρι τελικά να παγιδευτούν στο ενεργό κέντρο . Στην περίπτωση του *Chlorobium Terpidum* η φωτεινή ενέργεια διοχετεύεται στο γλωρόσωμα το οποίο

είναι ένα εκτεταμένο σύστημα από βακτηριοχλωροφύλλες – κεραίες . Υπάρχουν περίπου 200000 κεραίες ανά χλωρόσωμα . Έχει εκτιμηθεί ότι κάθε ενεργό κέντρο διαθέτει 5000 περίπου BChl (διαφόρων τύπων στα άλλα είδη Chlorobium) , οπότε κάθε 40 ενεργά κέντρα συνιστούν ένα χλωρόσωμα . Οι BChl c ( /d/e) περικλείονται σε κυλινδρικές στοίβες με μέγιστο απορρόφησης μεταξύ 720 – 750 nm . Η μεταφορά ενέργειας προχωρά μέσω αυτών των κυλίνδρων σε ένα δίσκο από BChl a με μέγιστο στα 795 nm . Στη συνέχεια η φωτεινή ενέργεια διαβιβάζεται στα τριμερή FMO και τέλος στο ενεργό κέντρο .

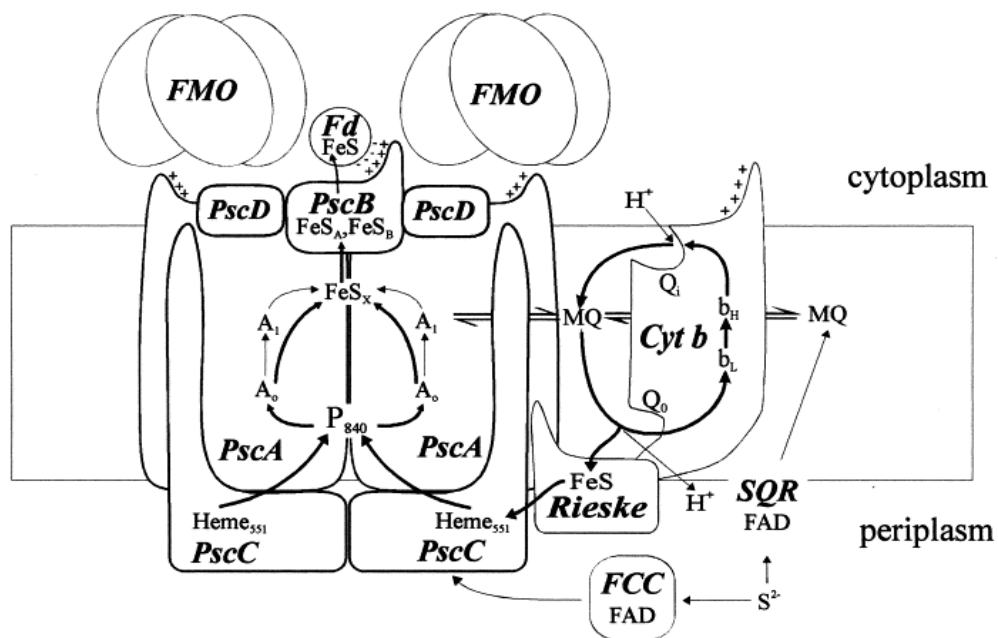


**Σχήμα 20 :** Αναπαράσταση του φωτοσυλλεκτικού συστήματος για τα πράσινα θειοβακτηρίδια . Οι αριθμοί δίπλα στα ονόματα των χρωστικών δηλώνουν το μήκος κύματος μέγιστης απορρόφησης .

Η FMO έχει μέγιστο απορρόφησης στα 808 nm . Η PscA που αποτελεί τη μεγαλύτερη πρωτεϊνική μονάδα στο ενεργό κέντρο δεσμεύει τον αρχικό δότη ηλεκτρονίων P840 , τον πρωταρχικό δέκτη ηλεκτρονίων  $A_0$  και clusters 4Fe-4S , που μπορούν να ονομαστούν και  $F_x$  . Η PscB δεσμεύει τα δυο τελικά clusters 4Fe-4S τα οποία ονομάζονται κέντρο 1 – κέντρο 2 ή  $F_A$  και  $F_B$  [36] . Συνολικά λοιπόν κάθε ενεργό κέντρο περιέχει τρία διαφορετικά είδη cluster Fe – S τα οποία συμμετέχουν σε διαφορετικά διακριτά στάδια της μεταφοράς ηλεκτρονίων . Διαλυτοποίηση του ενεργού κέντρου με detergent οδηγεί σε μερική απομάκρυνση της FMO κάτι που αποσταθεροποιεί το αρχικό σύμπλοκο . Οι υπομονάδες PscB και PscD αποδεσμεύονται , δηλαδή υπάρχει σημαντική απώλεια των clusters Fe-S . Έχει αποδειχτεί ότι οι υπομονάδες αυτές αλληλεπιδρούν με την FMO . Ο ρόλος της FMO

φαίνεται ότι είναι περισσότερο δομικός και συντελεί στη σταθεροποίηση του ενεργού κέντρου και συνεπακόλουθα στη λειτουργία του, τη μεταφορά ηλεκτρονίων. Συγκριτικές εικόνες STEM μεταξύ συμπλόκου (ενεργό κέντρο – FMO) και καθαρής FMO αποδεικνύουν πως η FMO δεσμεύεται με δυο από τις τρεις μονάδες της πάνω σε μια προεξοχή του ενεργού κέντρου, συνεπώς το τριμερές είναι μια καθαρά περιφερειακή πρωτεΐνη και δεν εσωκλείεται έστω και μερικώς στη μεμβράνη.

Ο δέκτης  $A_1$  ονομάζεται και φυλλοκινόνη. Η μενακινόνη (MQ) είναι ένας υποτιθέμενος ενδιάμεσος δέκτης. Ο ρόλος της όμως αμφισβητείται γιατί η μεταφορά ηλεκτρονίων γίνεται και σε δείγματα που αφαιρέθηκε η MQ. Η πιθανότερη ερμηνεία είναι ότι η MQ εξυπηρετεί ένα εναλλακτικό παρακλάδι της μεταφοράς  $e^-$ , στο οποίο συμμετέχουν επιπλέον κινόνες  $Q_1$  και  $Q_0$  που βρίσκονται στο ενδότερο τμήμα (κοντά στο κυτταρόπλασμα) και στο εξώτερο τμήμα (κοντά στο περίπλασμα) αντιστοίχως. Η ανηγμένη μορφή της MQ, δηλαδή η  $MQH_2$  φαίνεται πως ανταλλάσσει πρωτόνια και ηλεκτρόνια με αυτήν την «αποθήκη» κινόλης εξυπηρετώντας σύνθεση ATP μέσω κυκλικής μεταφοράς ηλεκτρονίων. Δυο υδροφοβικά κυτοχρώματα c 551 είναι δεσμευμένα στο ενεργό κέντρο, ανάγοντας τον  $P840^+$ .

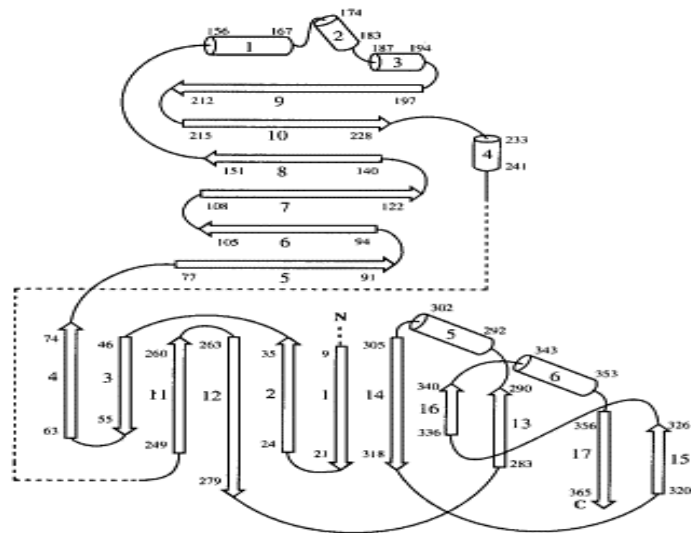


**Σχήμα 21 :** Μεμβρανική τοπολογία για το κέντρο αντίδρασης P-840 και την αλυσίδα μεταφοράς ηλεκτρονίων σε πράσινα θειοβακτήρια.

Τα τμήματα που συμμετέχουν στην οξειδοαναγωγική αλυσίδα (P840 , A<sub>0</sub> , A<sub>1</sub> , F<sub>x</sub>) τοποθετούνται ασύμμετρα στο ομοδιμερές (PscA)<sub>2</sub> – P840 . Οι υπομονάδες συγκρατούνται μέσω ενός διατηρημένου καταλοίπου ιστιδίνης του P840 και των clusters Fe-S του F<sub>x</sub> . Η PscB προεξέχει στην κορυφή της κυτταροπλασματικής πλευράς με ασύμμετρο τρόπο . Δυο τριμερή FMO πλευρίζουν την προεξοχή αυτή και δημιουργούν ένα ενεργό κέντρο αρκετά παρεμποδισμένο ώστε να δεσμεύει μόνο μικρές πρωτεΐνες . Τα κυτοχρώματα c 551 ωστόσο δεσμεύονται με συμμετρικό τρόπο στις υπομονάδες και οι αίμες τους είναι εκτεθειμένες στην υδατική φάση της περιπλασμικής μεμβρανικής επιφάνειας .

#### V) 1.β ΛΕΠΤΟΜΕΡΗΣ ΔΟΜΙΚΗ ΑΝΑΛΥΣΗ ΤΗΣ FMO

Η πρωτεΐνη που περιέχει τις BChl α (δηλαδή η FMO) , αποτελείται από τρεις πανομοιότυπες υπομονάδες που συνδέονται με έναν τριπλό άξονα συμμετρίας . Σε κάθε υπομονάδα του τριμερούς η σπονδυλική στήλη του πολυπεπτιδίου σχηματίζει μια εκτεταμένη β – πτυχωτή επιφάνεια που αποτελείται από 17 φύλλα και περικλείει έναν κεντρικό πυρήνα με 7 μόρια BChl α . Κάθε ένα από τα 17 φύλλα περιέχει κατά μέσο όρο 12 κατάλοιπα . Τα φύλλα της β – πτυχωτής επιφάνειας χωρίζονται σε δυο ομάδες . Αυτά που επεκτείνονται κατά μήκος εμπρός από τον πυρήνα και αυτά που επεκτείνονται στον άξονα της πίσω μεριάς του πυρήνα με τέτοιο τρόπο , ώστε οι δυο ομάδες είναι σχεδόν κάθετες μεταξύ τους [37] . Υπάρχουν επίσης 6 περιοχές α-έλικας με μέσο μήκος 10 κατάλοιπα . Οι α-έλικες 1 , 2 , 3 είναι συνεχόμενες και συνδέονται με σύντομες θηλιές και οι άλλες 3 είναι διάσπαρτες και λειτουργούν ως συνδετικές γέφυρες για κάποια από τα 17 β-φύλλα .



**Σχήμα 22 :** Σχηματική αναπαράσταση του ξεδιπλώματος του πολυπεπτιδίου στην FMO υπομονάδα . Τα αριθμημένα βέλη (1-17) είναι οι β-πτυχωτές επιφάνειες και οι κύλινδροι (1-6) είναι οι α-έλικες .

Τα 7 μόρια BChl α εσωκλείονται στις β-πτυχωτές επιφάνειες και είναι διατεταγμένα σε δυο ομάδες . Τα μόρια BChl α (3,4,5,6,7) σχηματίζουν ένα όριο στη μια πλευρά του πυρήνα και τα άλλα δυο σχηματίζουν ένα όριο στην άλλη πλευρά του πυρήνα , πιο συγκεκριμένα στην εξωτερική μεριά . Τα 3 – 7 βρίσκονται ουσιαστικά θαμμένα κοντά στον πυρήνα . Το χημικό περιβάλλον για τις δυο ομάδες δεν είναι συνεπώς το ίδιο . Περίπου το 70% από τα κατάλοιπα που βρίσκονται στις διεπιφάνειες ανάμεσα στις 3 μονομερικές μονάδες είναι πολικά ή φορτισμένα (λυσίνη , αργινίνη , γλουταμινικό κτλ.) . Εκτός από πολικές – πολικές αλληλεπιδράσεις , οι τρεις μονάδες συγκρατώνται από γέφυρες άλατος μεταξύ καταλοίπων π.χ. αργινίνης – ασπαραγινικού . Οι BChl α 1 και 2 που βρίσκονται στην επιφάνεια του μονομερούς θάβονται στον πυρήνα του τελικού τριμερούς όταν αυτό σχηματιστεί . Τα μόρια BChl α σε μια υπομονάδα βρίσκονται αρκετά μακριά από τα αντίστοιχα μόρια σε μια από τις 2 άλλες υπομονάδες . Τα κεντρικά μαγνήσια σε όλες αυτές τις χλωροφύλλες είναι πεντασυναρμοσμένα , ωστόσο το είδος του πέμπτου υποκαταστάτη ποικίλλει . Για να μπορέσει η FMO να μεταφέρει ηλεκτρόνια στο ενεργό κέντρο πρέπει να υπάρχει επιτυχημένη σύζευξη των οπτικών μεταβατικών ροπών στις χλωροφύλλες . Οι διεγερμένες καταστάσεις των μορίων BChl α που συνεισφέρουν στη διαδικασία ονομάζονται  $Q_y$  . Η μεταβατική διπολική ροπή  $Q_y$  για μια τέτοια χλωροφύλλη κείται στο μοριακό άξονα Y που συνδέει το N του πυρρολίου I και το άζωτο του πυρρολίου III . Οι σχετικοί προσανατολισμοί των μεταβατικών διπόλων και οι αντίστροφοι

κύβιοι των αποστάσεων μεταξύ των μορίων BChl α καθορίζουν το μέγεθος των αλληλεπιδράσεων . Οι  $Q_y$  διπολικές ροπές για τα μόρια 1 , 4 και 7 είναι σχεδόν παράλληλες μεταξύ τους , το ίδιο οι ροπές για το ζεύγος (2,5) και το ζεύγος (3,6) . Οι γωνίες ανάμεσα στα ζεύγη (2,5) και (3,6) είναι περίπου  $30^\circ$  . Τα δίπολα (1,4,7) και (3,6) απέχουν κατά γωνία  $60^\circ$  . Σε μια υπομονάδα οι σχετικές αποστάσεις των 7 BChl α , οι αλληλεπιδράσεις δεσμού υδρογόνου και οι αλληλεπιδράσεις με γειτονικές περιοχές είναι περίπου ίδιες . Ωστόσο διαφορές στις σχετικές θέσεις των αμινοξέων που περιστοιχίζουν τις δυο ομάδες , οδηγούν σε διαφορές των επιπέδων που βρίσκεται κάθε μόριο . Το γεγονός ότι τα μόρια δεν είναι παράλληλα είναι που καθορίζει την ιδιότητα της πρωτεΐνης να μεταφέρει ηλεκτρόνια .

Το ενεργό κέντρο του *Chlorobium Terpidum* μελετήθηκε με διαφορεικά φάσματα υπεριώδους – ορατού . Το ενεργό κέντρο φωτομετρήθηκε σε οξειδωμένη μορφή και σε ανηγμένη με διθειοθρεϊτόλη , και το φάσμα οξειδωμένη μείον ανηγμένη μορφή συναρτήσεως του μήκους κύματος έδωσε σημαντικές πληροφορίες . Με τη βοήθεια των συντελεστών μοριακής απόσβεσης  $\Delta\epsilon_{830}$  (μέγιστη απορρόφηση P840) και  $\Delta\epsilon_{552-540}$  (περιοχή μέγιστης απορρόφησης για το κυτόχρωμα c) , αποδεικνύεται ότι το ενεργό κέντρο έχει 1.9 – 2.2 αίμες ανά P840 . Η flash επαγόμενη κινητική του P840 μετρήθηκε σε  $20^\circ\text{C}$  και μελετήθηκαν διαφορές στις απορροφήσεις . Η αίμη c οξειδώθηκε σε μια φάση με χρόνο ημιζωής 110  $\mu\text{s}$  . Το 80 % του  $\text{P840}^+$  ανήχθη με χρόνο ημιζωής επίσης 110  $\mu\text{s}$  και το υπόλοιπο με πιο αργό χρόνο ημιζωής που ξεπερνά τα 150  $\mu\text{s}$  . Συνεπώς η γρήγορη φάση με  $t_{1/2} = 110 \mu\text{s}$  αντιστοιχεί αναμφίβολα στην αναγωγή του P840 από το κυτόχρωμα [38] . Η φωτοοξείδωση της αίμης c επίσης μελετήθηκε με flash φωτόλυση . Μετά τον πέμπτο παλμό η μεταβολή στην απορρόφηση είναι διπλάσια σε σχέση με τον πρώτο , κάτι που υποδεικνύει ότι δυο αίμες ανάγουν ένα  $\text{P840}^+$  . Το  $\text{P840}$  οξειδωνόταν με την ίδια έκταση μετά από κάθε παλμό . Το  $\text{P840}^+$  το οποίο σχηματίστηκε ανάγεται γρήγορα μετά τον πρώτο παλμό , ενώ το μη ανηγμένο  $\text{P840}^+$  αυξάνεται με τον αριθμό των παλμών . Δηλαδή σε κάθε στάδιο η διακύμανση στην απορρόφηση μειώνεται . Η ατελής αναγωγή του  $\text{P840}^+$  μετά από κάθε παλμό υποδηλώνει διαφορά στα ημιδυναμικά οξειδοαναγωγής  $E_{1/2}$  για το κυτόχρωμα c και το  $\text{P840}$  . Αν δυο αίμες συνδέονται με το  $\text{P840}$  τα δεδομένα αποδεικνύουν πως τα ενεργά κέντρα έχουν 19 % του  $\text{P840}$  και το 41 % από τις αίμες c σε οξειδωμένη κατάσταση , 800  $\mu\text{s}$  μετά τον παλμό . Με τη βοήθεια μιας απλής εξίσωσης που δίνεται στη συνέχεια αποδεικνύεται ότι σε αυτήν τη χρονική στιγμή δυο αίμες και ένα  $\text{P840}$  βρίσκονται σε ισορροπία . Η

τιμή της διαφοράς ημιδυναμικού που υπολογίζεται σε αυτές τις συνθήκες είναι περίπου 28 mV .

$$\Delta E_{1/2} = \frac{RT}{F} \ln \left( \frac{heme_{RED} P840_{OXID}}{heme_{OXID} P840_{RED}} \right) \quad (69)$$

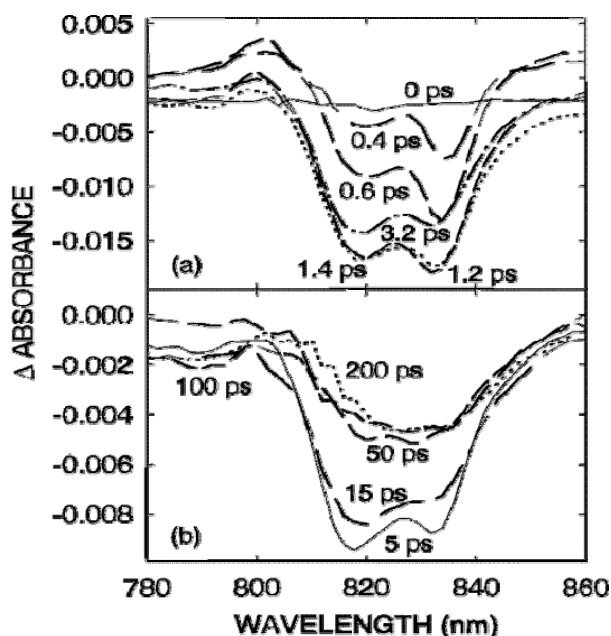
Η τιμή που υπολογίζεται είναι σε καλή συμφωνία με τις θεωρητικές προβλέψεις ημιδυναμικού . Αν υποθέταμε ότι μόνο μια αίμη συνδέεται με το P840 , τότε 19 % του P840 και 81 % της αίμης βρίσκονται σε οξειδωμένη μορφή και η τιμή  $\Delta E_{1/2}$  είναι πολύ μεγάλη και δε συμφωνεί με τη διαφορά για τα καθαρά  $E_{1/2}$  που έχουν το κυτόχρωμα c και το P840 . Μετά τη γρήγορη αναγωγή του από την αίμη , το P840<sup>+</sup> ανάγεται πιο αργά μετά από 43 ms και μετά από δυο ή τέσσερις παλμούς η αναγωγή βρίσκεται σε εκατοντάδες ms . Αυτό υποδεικνύει πως το P840<sup>+</sup> ανάγεται και από άλλα συστατικά και όχι μόνο από το κυτόχρωμα c . Επίσης οι οξειδωμένες αίμες μπορούν να αναχθούν ξανά . Συγκεκριμένα ο  $t_{1/2} = 43$  ms αντιπροσωπεύει τη διαδικασία αναγωγής του P840<sup>+</sup> από τα ανηγμένα clusters Fe-S .

## ΜΕΡΟΣ 2<sup>ON</sup> : ΚΙΝΗΤΙΚΗ ΜΕΤΑΦΟΡΑΣ ΗΛΕΚΤΡΟΝΙΩΝ

### V) 2.α ΠΡΟΤΕΙΝΟΜΕΝΟΙ ΜΗΧΑΝΙΣΜΟΙ

Αλλαγές στη μεταβατική διπολική ροπή των ενεργών κέντρων με διαφορεικά φάσματα απορρόφησης μελετήθηκαν με ανάλυση picosecond και με παλμικές διεγέρσεις ανά 200 fs στα 590 nm . Οι καμπύλες που αντιστοιχούν σε διαφορετικούς χρόνους ανάλυσης παρουσιάζουν ανεξαιρέτως μια μεγάλη αρνητική κορυφή γύρω στα 815 nm και έναν ώμο γύρω στα 835 nm . Σε χρόνο 200 ps η αρνητική κορυφή έχει μειωθεί κατά 60 % . Μετά τα 200 ps η ανάκαμψη γίνεται με πολύ αργό ρυθμό [39] . Αυτό δείχνει πως υπάρχουν κάποια μόρια τα οποία διεγείρονται με αργό ρυθμό στα 590 nm και που δεν απορροφούν στην περιοχή των 830 nm [38] . Περαιτέρω ανάλυση σε διαφορετικά μήκη κύματος στην περιοχή 815 – 840 nm αποδεικνύει πως η ΔΑ έχει πάντοτε 3 διαφορετικές συνιστώσες . Μια μετά από 3 ps , μια μετά από 55 ps και μια η οποία δε φθίνει με το χρόνο . Τα 3.3 ps εμφανίζουν αρνητικό πλάτος σε μήκος κύματος μικρότερο των 840 nm και θετικό πλάτος σε  $\lambda > 840$  nm κάτι που

σημαίνει πως αναπαριστά τη διάδοση της ενέργειας διέγερσης και συνεπώς τη μεταφορά ηλεκτρονίων αμέσως μετά το φωτολυτικό παλμό . Η συνιστώσα των 55 ps έχει αρνητικό πλάτος στην περιοχή 815 – 835 nm και μάλλον αντιπροσωπεύει τη φθίνουσα ενέργεια διέγερσης μέσα στο σύστημα των κεραιών . Για να μελετηθεί η μεταφορά των ηλεκτρονίων από τον πυρήνα με τις κεραιές στο ενεργό κέντρο , η ενέργεια διέγερσης λήφθηκε 840 nm . Η ανακατανομή της διέγερσης συναρτήσει διαφορετικών χρόνων αντανακλάται από τις μεταβολές στην απορρόφηση . Οι πρώτοι χρόνοι (0-0.6 ps) έχουν μια μεγάλη ταινία απόσβεσης στα 835 nm και μια πιο ευρεία ζώνη στα 820 nm . Καθώς οι χρόνοι προχωράνε (1.2 – 3.2 ps) το πλάτος της 820 αυξάνει που σημαίνει ότι αυξάνονται οι διεγέρσεις σε αυτήν τη ζώνη . Η ζώνη των 835 επίσης αυξάνεται αλλά λιγότερο . Σε μεγάλους χρόνους πάνω από 5 ps ξεκινά η ανάκαμψη . Η αρνητική καμπύλη μειώνεται γρήγορα σε ποσοστό 50 % μέχρι το χρόνο των 100 ps . Μετά τα 100 έως τα 200 ps το φάσμα παραμένει σχεδόν αναλλοίωτο . Στα 200 ps το φάσμα έχει λίγο πιο ευρείες ταινίες από την κλίμακα των ms και έχει μεγάλες κορυφές στα 825 και τα 835 nm και μια πιο ασθενή γύρω στα 790 nm . Τα φάσματα παρατίθενται στο επόμενο σχήμα .

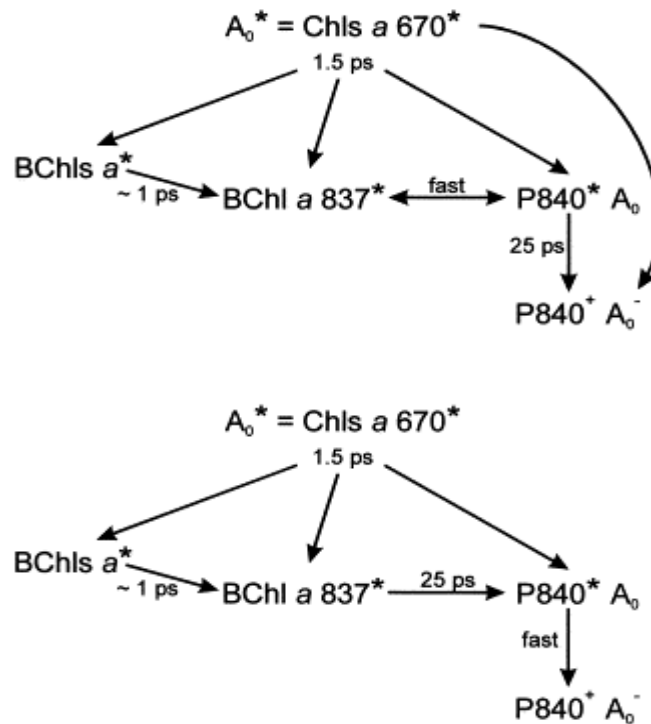


**Σχήμα 23 :** *Time-resolved* διαφορικά φάσματα για το *Chlorobium Tepidum* σε θερμοκρασία δωματίου με ενέργεια διέγερσης 840 nm (a) πρώτοι χρόνοι [0-1.4 ps] (b) μεγάλοι χρόνοι [5 – 200 ps]



Σύγκριση στα διαφορετικά φάσματα απορρόφησης με ενέργειες διέγερσης στα 590 nm και στα 840 nm έδειξαν ότι η κυριότερη διαφορά τους είναι μια μεγάλη κορυφή γύρω στα 812 nm στην καμπύλη των 590 , που συμφωνεί πολύ με το φάσμα της αμιγούς FMO . Ακόμα και σε μεγαλύτερους χρόνους των 200 ps η καμπύλη δεν ανακάμπτει πάνω από 40 % . Αυτό δηλώνει πως κάποιες από τις διεγέρσεις παραμένουν στις κεραίες των FMO και δε μεταφέρονται στο ενεργό κέντρο . Για να επιτευχθεί η μέγιστη δυνατή διοχέτευση ηλεκτρονίων η ενέργεια διέγερσης πρέπει να είναι 840 nm στην οποία η FMO απορροφά ελάχιστα και όχι 590 nm . Αυτά τα αποτελέσματα δηλώνουν για μια ακόμα φορά πως ο ρόλος της FMO είναι περισσότερο δομικός .

Σύγκριση φασμάτων απορρόφησης σε δείγματα απαλλαγμένα από FMO σε διαφορετικές θερμοκρασίες , αποδεικνύουν ότι η μεταφορά ηλεκτρονίων από μια ενδιάμεση χλωροφύλλη BChl α 837 στο σύστημα P840 – A<sub>0</sub> ολοκληρώνεται εντός 2 ps και πως ακολουθείται από μετατόπιση φορτίου στο σύστημα P840 – A<sub>0</sub> μέσα σε 25 ps . Η ενέργεια διέγερσης επίσης κατανέμεται σε 2 ps αν προέρχεται από τη χλωροφύλλη Chls α 670 , που αποτελεί συστατικό του A<sub>0</sub> . Σε αυτήν την περίπτωση όμως ο διαχωρισμός φορτίου είναι πιο αποδοτικός . Έχουν προταθεί δυο μοντέλα για να εξηγήσουν αυτήν τη διαφορά [36] . Το σύστημα είτε περιορίζεται από το διαχωρισμό φορτίου στο P840 – A<sub>0</sub> (όριο παγίδευσης φορτίου) , είτε περιορίζεται από την τελική μεταφορά της ενέργειας διέγερσης από τη BChl - α 837 στο P840 (όριο διάχυσης φορτίου) . Δηλαδή στο πρώτο μοντέλο το καθοριστικό αργό στάδιο είναι ο τελικός διαχωρισμός φορτίου (P840 – A<sub>0</sub>) → P840<sup>+</sup> - A<sub>0</sub><sup>-</sup> και στο δεύτερο μοντέλο το καθορίζον στάδιο είναι η μεταφορά από τη χλωροφύλλη στο P840 – A<sub>0</sub> . Και στις δυο περιπτώσεις η Chls α 670 προσφέρει μια πιο γρήγορη εναλλακτική διαδρομή στο σύστημα . Το παρακάτω σχήμα δείχνει όλες τις προτεινόμενες διαδικασίες μεταφοράς ηλεκτρονίων . Το πάνω μέρος δείχνει τις δυο διαδρομές για όριο παγίδευσης φορτίου και το κάτω μέρος είναι οι δυο διαδρομές σε περίπτωση που το σύστημα έχει αργή διάχυση φορτίου .



**Σχήμα 24 :** Ενεργειακή μεταφορά και διαχωρισμός φορτίου στο ενεργό κέντρο P840 . Το πάνω μέρος είναι το trap-limited μοντέλο και το κάτω μέρος είναι το reaction limited μοντέλο .

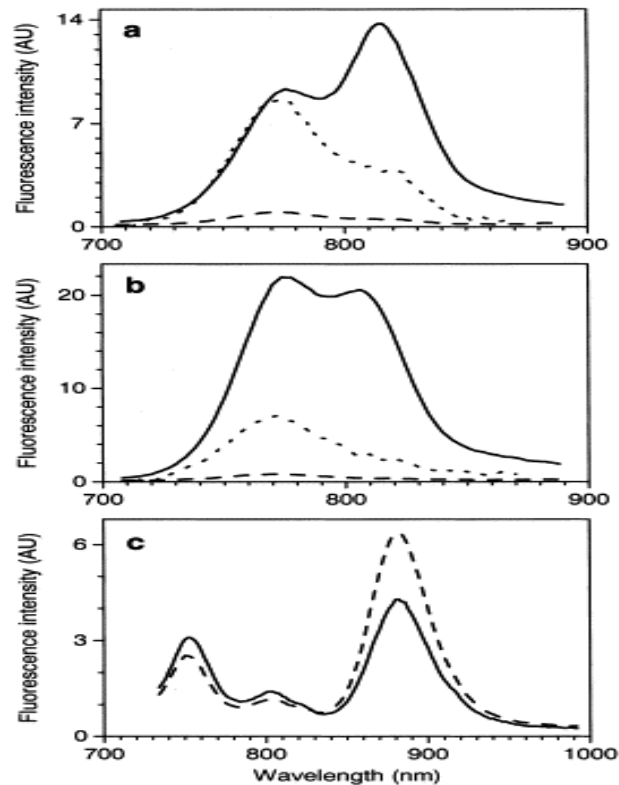
Στην πρώτη περίπτωση η υψηλότερη απόδοση επιτυγχάνεται με έλξη ενός ηλεκτρονίου από τη διεγερμένη Chls a 670 η οποία το εξάγει από το P840 δημιουργώντας την οξειδωμένη μορφή  $\text{P840}^+$  και ο  $A_0$  φυσικά ανάγεται . Στο δεύτερο μοντέλο η Chls a 670 μεταφέρει τα ηλεκτρόνια στο σύστημα P840 πιο γρήγορα από τη BChl a 837 . Έτσι το αργό στάδιο των 25 ps και στις δυο περιπτώσεις παρακάμπτεται .

Η κινητική μεταφοράς ηλεκτρονίων από τις αρχικές χλωροφύλλες BChl c/d/e στην BChl a , δηλαδή τα πρώτα στάδια , είναι επίσης ενδιαφέρουσα . Για διάφορους συνδυασμούς μήκους κύματος pump (= διέγερσης) και probe (= ανίχνευσης) στην περιοχή 710 – 770 nm , η  $Q_y$  μετάβαση βρίσκεται πάντοτε γύρω στα 740 nm . Η  $Q_y$  μετάβαση για τα *Chlorobium tepidum* μελετήθηκε σε διαφορετικά μήκη κύματος . Οι μεταβολές στην απορρόφηση μελετήθηκαν κατά τη διάρκεια του χρόνου (0-82 ps) . Η διαφορά  $\Delta A$  καθορίζεται από τις σχετικές εντάσεις απορρόφησης της διεγερμένης κατάστασης (excited state absorption ESA) και την εξαναγκασμένη εκπομπή (stimulated emission SE) . Για να περιγραφεί η κινητική χρειάζονται πολυ-εκθετικές συναρτήσεις που αναλόγως με το μήκος κύματος μπορεί

να περιέχουν από 3 – 5 χαρακτηριστικούς χρόνους  $\tau$  [40] . Τα μήκη κύματος που μελετήθηκαν ήταν 720 , 739 , 749 , 759 , 769 , 779 , 789 & 801 nm . Η πιο αργή διαδικασία φθίνουσας  $\Delta A$  παρατηρείται στα 801 nm και η πιο γρήγορη διαδικασία παρατηρείται στα 720 nm . Πιο αναλυτικά μόνο η καμπύλη των 720 nm έχει θετικές τιμές  $\Delta A$  και τα υπόλοιπα  $\lambda$  έχουν αρνητικές τιμές  $\Delta A$  . Όλες οι καμπύλες ανεξαιρέτως δεν είναι μονοτονικές αλλά περιέχουν πολλές εκθετικές συναρτήσεις . Αυτά τα πειράματα έγιναν με ίσα  $\lambda$  διέγερσης και ανίχνευσης . Για καλύτερη ανάλυση έγιναν και άλλα με διαφορετικά  $\lambda$  pump  $\rightarrow$  probe . Αξιοσημείωτα , όταν η διαφορά των  $\lambda$  ήταν γύρω στα 20 nm π.χ. 740  $\rightarrow$  760 nm δε μπόρεσαν να ανιχνευθούν φαινόμενα εξαναγκασμένης εκπομπής , παρά το ότι αυτά τα μήκη κύματος είναι γνωστό πως απορροφώνται από τη BChl *a* . Ωστόσο στο πείραμα 760  $\rightarrow$  720 nm (μείωση) , μπόρεσαν να ανιχνευτούν φαινόμενα SE . Η φασματική ανομοιογένεια της BChl *c* παίζει σημαντικό ρόλο στην κινητική μεταφοράς ηλεκτρονίων . Δηλαδή το γεγονός ότι οι BChl *c* δεν είναι όλες ισοδύναμες επηρεάζει τα φάσματα του *Chlorobium tepidum* . Σε εναλλακτικά πειράματα το δείγμα περιστράφηκε σε 3000 rpm και πάρθηκε το  $\Delta A$  έναντι του χρόνου για διαφορετική ισχύ της ακτινοβολίας διέγερσης (0.05 , 0.22 , 4.5 , 9 mW) . Η κεραία BChl *c* είναι γνωστό ότι αποδιεγείρεται μέσα σε δέκατα του ps , οπότε στη χρονική κλίμακα υπό μελέτη 0 – 10 ps δε θα συνεισφέρει και οι διαφορές στις καμπύλες ισχύος διέγερσης θα οφείλονται αποκλειστικά σε απλή – απλή εκμηδένιση και όχι σε απλή – τριπλή . Σε χαμηλή ισχύ κάθε χλωροσώμα απορροφά ένα παλμό . Η προσαρμογή των καμπυλών δείχνει ότι η αποδιέγερση έχει χρόνο ημιζωής 1.2 ps . Αυτή η χρονική κλίμακα θεωρείται πως προκύπτει με ένα μηχανισμό **μεταφοράς ηλεκτρονίων από ραβδί σε ραβδί** . Μόνο 1% από τις χρωστικές ενός χλωροσώματος είναι BChl *a* και οι υπόλοιπες είναι BChl *c* / *d* / *e* . Πειραματικά δεδομένα αποδεικνύουν πως η σύσταση , δηλαδή η σχετική αναλογία των ειδών χρωστικών δεν παίζει πολύ σημαντικό ρόλο στην κινητική μεταφοράς ηλεκτρονίων . Η δομή , δηλαδή παράγοντες όπως το μέγεθος του χλωροσώματος , των λιπιδίων ή των πρωτεϊνών είναι πιο καθοριστικοί .

## V) 2.β ΕΠΙΔΡΑΣΗ ΟΞΥΓΟΝΟΥ ΣΤΑ CHLOROBIVM TERIDUM

Η αναερόβια φύση των πράσινων θειοβακτηρίων όπως τα *Chlorobium* σχετίζεται με τα φωτοσυνθετικά τους κέντρα τα οποία παράγουν αναγωγικά μέσα χαμηλού δυναμικού όπως ανηγμένη φερρεδοξίνη . Ο φθορισμός από BChl c σε πράσινα θειοβακτήρια είναι αισθητά μεγαλύτερος υπό αναγωγικές συνθήκες παρά σε οξειδωτικές . Ο φθορισμός της BChl c αποσβένει σε ολόκληρα κύτταρα με παρουσία λιγότερο από  $\mu\text{moles}$  του οξυγόνου . Ωστόσο ο φθορισμός μπορεί να αποκατασταθεί με κυτταρικά αναγωγικά μέσα υπό αναερόβιες συνθήκες . Το  $\text{O}_2$  είναι γνωστό για την τοξικότητά του στους μικροοργανισμούς καθώς μπορεί να δημιουργήσει τοξικά παράγωγα όπως το υπεροξειδίο του υδρογόνου , αντιδρώντας με κυτταρικά συστατικά όπως η φερρεδοξίνη . Ένας συνηθισμένος αμυντικός μηχανισμός των οργανισμών είναι η ύπαρξη ενζύμων όπως η υπεροξειδική δισμουτάση . Τα *Chlorobium tepidum* μειώνουν τη μεταφορά ηλεκτρονίων τους παρουσία του  $\text{O}_2$  προκειμένου να αποφύγουν οποιαδήποτε αντίδραση αναγωγής του οξυγόνου . Η επίδραση οξειδωτικών και αναγωγικών συνθηκών μελετήθηκε σε δείγματα ολόκληρων κυττάρων από το *Chlorobium tepidum* , δείγματα απομονωμένης μεμβράνης του *Chlorobium tepidum* και δείγματα *Cfx aurantiacus* για σύγκριση [41] . Τα κύτταρα Chl. Ter. έχουν μέγιστο στο φάσμα φθορισμού τα 745 nm εξαιτίας των BChl c και έναν ώμο στα 810 nm λόγω των BChl α , που υπάρχουν κυρίως στην FMO . Πράγματι και στις δυο κατηγορίες Chlor. Ter. τα φάσματα φθορισμού είχαν κορυφή BChl c γύρω στα 770 – 780 nm και κορυφή BChl α γύρω στα 800 – 820 nm . Ο φθορισμός στα 775 nm ήταν 10 φορές περίπου μεγαλύτερος στα ολόκληρα κύτταρα σε αναγωγικές συνθήκες απ' ότι σε οξειδωτικές . Στην περίπτωση των μεμβρανών η αναλογία εντάσεων αναγωγικές / οξειδωτικές είναι μεγαλύτερη από 30 . Επίσης , όταν οι συνθήκες είναι αναγωγικές η αναλογία κορυφών φθορισμού της BChl α / BChl c είναι δραματικά μεγαλύτερη απ' ότι σε οξειδωτικές , κάτι που ισχύει και στις μεμβράνες και στα κύτταρα . Είναι προφανές ότι τα μόρια BChl α έχουν κάποιου είδους μηχανισμό απόσβεσης φθορισμού που ενεργοποιείται σε οξειδωτικές συνθήκες . Όπως φαίνεται και από το σχήμα που ακολουθεί το *Cfx. Auranticus* δεν παρουσιάζει ραγδαίες μεταβολές σε οξειδωτικές συνθήκες .



**Σχήμα 25 :** Φάσματα φθορισμού α) Κύτταρα *Ch. Terpidum* b) μεμβράνες *Ch. Terpidum* c) *Cfx. Aurantiacus* . Οι καμπύλες είναι αναγωγικές συνθήκες (—) , οξειδωτικές συνθήκες (- - -) . Επειδή οι εντάσεις στη δεύτερη περίπτωση είναι πολύ ασθενείς υπάρχει η μεγεθυμένη καμπύλη για οξειδωτικές συνθήκες (· · · · ·) .

Το φάσμα φθορισμού της BChl α έχει υψηλή ένταση στα 817 nm στα κύτταρα και χαμηλότερη ένταση στα 809 nm στις μεμβράνες . Ωστόσο το φάσμα απορρόφησης της BChl α είναι παρόμοιο με μέγιστο στα 810 nm και σε μεμβράνες και σε κύτταρα . Το φάσμα φθορισμού στα 809 nm στις μεμβράνες προέρχεται ως επί το πλείστον από χλωροσωμικές BChl α που απορροφούν στα 795 nm . Ο φθορισμός στα 817 nm των κυττάρων προέρχεται κυρίως από εξω – χλωροσωμικές BChl α που απορροφούν στα 810 nm . Η οξείδωση του κυτοχρώματος c και η μεταφορά των ηλεκτρονίων μελετήθηκαν με flash – φωτόλυση . Χρησιμοποιήθηκαν διαφορετικά μήκη κύματος που να απορροφούν εκλεκτικά τα διαφορετικά είδη χλωροφύλλης . Όταν η BChl α διεγέρθηκε εκλεκτικά δεν υπήρξε σημαντική διαφορά σε αερόβιες και αναερόβιες συνθήκες . Ωστόσο όταν διεγέρθηκε η BChl c επιλεκτικά , τότε η φωτοοξείδωση σε αερόβιες συνθήκες μειώθηκε σχεδόν στο 3 % του μεγέθους σε αναερόβιες . Με διέγερση στα 690 nm όπου απορροφούν και τα δυο είδη , οι αερόβιες συνθήκες μειώνουν τη φωτοοξείδωση σε βαθμό του 10 % απ’ ότι έχουν οι αναερόβιες . Η FMO φαίνεται πως προκαλεί την περισσότερη απορρόφηση της BChl

α στο ενεργό κέντρο . Φαίνεται ότι και η FMO έχει κάποιου είδους μηχανισμό απόσβεσης φθορισμού που εξαρτάται από τα δυναμικά οξειδοαναγωγής της αντίδρασης όπως και η BChl c . Ωστόσο οι δυο μηχανισμοί δεν είναι όμοιοι . Λαμβάνοντας υπόψη το ότι η BChl α εξακολουθούσε να έχει φθορισμό σε αερόβιες συνθήκες , ο μηχανισμός απόσβεσης της FMO δεν ενεργοποιείται παρουσία O<sub>2</sub> . Ακόμα και αν ενεργοποιείται δεν έχει μεγάλη συνεισφορά στην ολική απόσβεση . Τα clusters Fe-S επίσης είναι πολύ ευαίσθητα στο O<sub>2</sub> . Ωστόσο έχει βρεθεί ότι η BChl c είναι πιο ευαίσθητη , καθώς αν αφαιρεθεί αντιστρεπτά από το σύστημα , τα βακτήρια προσαρμόζονται καλύτερα στο O<sub>2</sub> καθώς δε σχηματίζουν τοξικά προϊόντα μαζί του .

#### V) 2.γ ΛΕΙΤΟΥΡΓΙΑ ΑΝΑΓΩΓΑΣΗΣ NAD(P)<sup>+</sup> - ΦΕΡΡΕΔΟΞΙΝΗΣ

Το *Chlorobium tepidum* μπορεί να «καθλώσει» CO<sub>2</sub> κυρίως με τον αναγωγικό κύκλο του τρικαρβοξυλικού οξέος . Αντιδράσεις αναγωγής χρειάζονται σε πολλά στάδια του κύκλου και απαιτούν ανηγμένη φερρεδοξίνη (Fd) , ανηγμένο FAD ή NAD(P)H . Το γονίδιο του Chl. Ter. κωδικοποιεί 3 φερρεδοξίνες που έχουν τη μορφή 2[4Fe-4S] . Παρουσία μιας κατάλληλης αναγωγάσης , αυτές οι φερρεδοξίνες μπορούν να προκαλέσουν αναγωγή του NADP<sup>+</sup> . Μια πρωτεΐνη που παίζει ρόλο αναγωγάσης NAD(P)<sup>+</sup> - φερρεδοξίνη (ferredoxine-NAD-reductase : FNR) απομονώθηκε από το Chl. Ter. και η μάζα της εκτιμάται γύρω στα 90 kDa . Το φάσμα απορρόφησης της FNR είναι τυπικό φάσμα φλαβινοενζύμου με κορυφές γύρω στα 272 , 385 και 466 nm . Το συνένζυμο της πρωτεΐνης προσδιορίστηκε με φθορισμό εξαρτώμενο από το pH [42] . Η αναλογία των εντάσεων φθορισμού σε δυο διαφορετικά pH 6.5 και 2.2 βρέθηκε 0.328 και είναι ενδεικτική παρουσίας συνενζύμου FAD . Υπό ειδικές πειραματικές συνθήκες η FNR προκαλεί φωτοαναγωγική δραστηριότητα , τόσο στο σύστημα Fd – NAD<sup>+</sup> όσο και στο Fd – NADP<sup>+</sup> . Συγκεκριμένα η FNR σε συγκέντρωση 0.05 μM , παρουσία φερρεδοξίνης από το Chl. Ter. ανάγει NADP<sup>+</sup> με ταχύτητα 133 μmol / h για κάθε μmol BChl α . Όταν χρησιμοποιήθηκε Fd από σπανάκι , η ταχύτητα μειώθηκε στο 1 / 3 . Σε συγκεντρώσεις FAD μικρότερες των 10 μM οι ταχύτητες αναγωγής για το NAD<sup>+</sup> είναι ελαφρώς υψηλότερες από το NADP<sup>+</sup> . Επίσης όταν η συγκέντρωση του

υποστρώματος  $\text{NADP}^+$  ξεπερνά τα  $10 \mu\text{M}$  οι ταχύτητες αναγωγής μειώνονται αν η συγκέντρωση του  $\text{NADP}^+$  συνεχίζει να αυξάνεται . Αυτός ο κορεσμός με την αυξανόμενη συγκέντρωση του υποστρώματος δεν παρατηρείται ωστόσο και για την περίπτωση του  $\text{NAD}^+$  .

Η FNR έχει επίσης τη δυνατότητα να χρησιμοποιήσει τις ανηγμένες πλέον μορφές  $\text{NAD(P)H}$  ως δότες ηλεκτρονίων προκειμένου να ανάγει τεχνητούς δέκτες ηλεκτρονίων όπως η DPIP (2,6 – διχλωροφαινολ – ινδοφαινόλη) . Αυτό ονομάζεται ιδιότητα διαφοράσης . Η FNR διαθέτει δυο φορές μεγαλύτερη δραστηριότητα διαφοράσης με το  $\text{NADPH}$  όταν αντιδρούν με το DPIP , παρά όταν χρησιμοποιείται το  $\text{NADH}$  . Η FNR του *Chl. Terp.* διαφέρει από τις FNR των υπόλοιπων φωτοσυνθετικών οργανισμών γιατί είναι διμερής , σε αντίθεση με αυτές που είναι μονομερείς . Επίσης έχει αισθητά μεγαλύτερη μοριακή μάζα . Η δραστηριότητα διαφοράσης είναι επίσης σημαντικά μεγαλύτερη σε σχέση με άλλες FNR . Η δραστηριότητα διαφοράσης ωστόσο κορεννύεται από τη συγκέντρωση του υποστρώματος  $\text{NADPH}$  από ένα σημείο και πέρα . Εκτός από την DPIP , η FNR μπορεί να ανάγει και το μοριακό οξυγόνο . Οι λόγοι ωστόσο για τους οποίους υπάρχουν διαφορές στις ταχύτητες με τα διαφορετικά υποστρώματα  $\text{NAD}^+$  ή  $\text{NADP}^+$  παραμένουν αδιευκρίνιστοι .

## ΚΕΦΑΛΑΙΟ VI) ΑΠΟΤΕΛΕΣΜΑΤΑ

### A) ΠΕΙΡΑΜΑΤΙΚΗ ΔΙΑΔΙΚΑΣΙΑ

Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες είναι αμφιφιλικά μακρομόρια τα οποία είναι ενσωματωμένα κάθετα διαμέσω της λιπιδικής μεμβράνης . Μέρος της επιφάνειάς τους που βρίσκεται σε επαφή με τη λιπιδική διπλοστιβάδα είναι υδροφοβική , ενώ άλλα τμήματα που είναι εκτεθειμένα στο υδάτινο περιβάλλον σε οποιαδήποτε πλευρά της μεμβράνης είναι υδρόφιλα . Οι μεμβρανικές πρωτεΐνες μπορούν να διαλυτοποιηθούν σε υδατικά διαλύματα όταν τα μεμβρανικά λιπίδια αντικαθίστανται από detergents ( = απορρυπαντικά) . Οι διαλυτοποιημένες πρωτεΐνες σχηματίζουν μικκύλια με το detergent . Αναλόγως με το μέγεθος της πρωτεΐνης και τη διάταξη των εκτεθειμένων αμινοξέων τα μικκύλια μπορεί να έχουν διαφορετικές γεωμετρίες , οι οποίες κυμαίνονται από φυσιολογικά μικκύλια στα οποία η πρωτεΐνη εσωκλείεται και μπορεί να προεξέχει ή και όχι (διάμετρος 4 – 6 nm) , σε πιο περίπλοκα σχήματα με επιφάνειες που αποτελούνται από στρώματα πρωτεΐνης και detergent (πάχος 2 – 3 nm) .

Η DLS είναι μια χρήσιμη τεχνική μέτρησης του μεταφορικού συντελεστού διάχυσης  $D$  ενός μακρομορίου το οποίο διεξάγει τυχαία κίνηση Brown σε ένα διάλυμα . Το μονοχρωματικό φως που σκεδάζεται από κινούμενα μακρομόρια εμφανίζει διακυμάνσεις στην ένταση αναλόγως με την κίνησή του . Μια μεμβρανική πρωτεΐνη από το φωτοσυνθετικό βακτήριο *Chlorobium Teridum* απομονώθηκε και χαρακτηρίστηκε (Ο κωδικός αριθμός της πρωτεΐνης είναι Q8KGA0 όπως καταχωρήθηκε στη βάση δεδομένων της SWISS-PROT / TrEMBL) . Με βάση την αλληλουχία αμινοξέων το εκτιμηθέν μοριακό βάρος υπολογίζεται στα 22.146 kDa . Η DLS θα βοηθήσει στη μελέτη της συμπεριφοράς της πρωτεΐνης στο διάλυμα . Σε αντίθεση με άλλες τεχνικές , η σκέδαση φωτός απαιτεί πολύ μικρές ποσότητες δείγματος , δεν καταστρέφει το μακρομόριο και το πείραμα διαρκεί μονάχα λίγα λεπτά .

Η διαλυτοποίηση της πρωτεΐνης έγινε με τη βοήθεια του detergent t-octyl-phenoxyethoxyethanol (Triton X – 100) και υπερφυγοκέντρηση [43] . Το δείγμα για να διαχωριστεί εισήχθη σε κολώνα HPLC με pH = 9 . Το buffer περιλάμβανε μεταξύ άλλων Tris – HCl , Triton X – 100 & EDTA . Το Triton X – 100

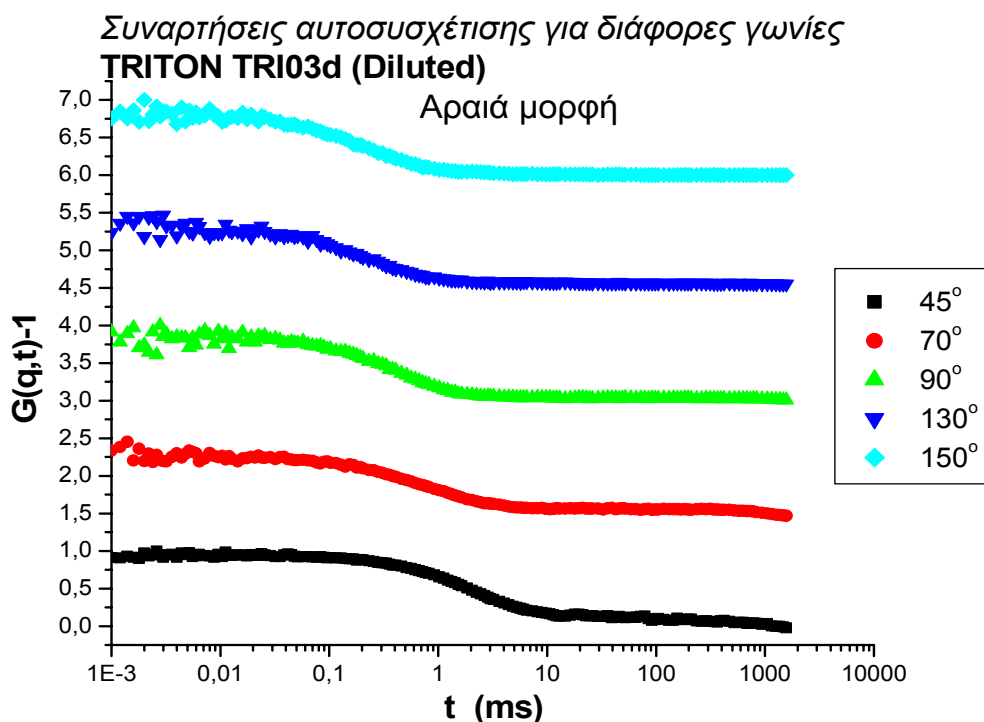


δεν είναι το μοναδικό μικκύλιο που μελετήθηκε . Με τη βοήθεια διήθησης gel διεξήχθη ανταλλαγή του εξωτερικού detergent με άλλες ουσίες ώστε να εξαχθούν συμπεράσματα για το πόσο επηρεάζει τη συμπεριφορά του μικκυλίου η χημική σύσταση του detergent . Πέραν λοιπόν από το Triton X – 100 μελετήθηκαν δείγματα που εσωκλείονταν σε : methyl -6-O-(N)- heptyl-carbamoyl –  $\alpha$  – D – glycopyranoside (HECAMEG) , dodecyl –  $\beta$  – D – maltoside (DDM) και n – octyl – oligo-oxyethylene (OCTYL – POE) .

Το laser λειτουργεί στα 532 nm με κάθετα πολωμένο φως , το οποίο στοχεύει πάνω στο κελί του δείγματος μέσω θαλάμου του οποίου η θερμοκρασία ρυθμίζεται με θερμοστάτη . Οι θερμοκρασίες των πειραμάτων είναι συνήθως 290 – 300 Kelvin . Η ομόδυνη συνάρτηση αυτοσυσχέτισης  $g(q,t)$  μετρήθηκε σε διαφορετικές γωνίες σκέδασης από  $15^\circ$  έως  $150^\circ$  . Η επεξεργασία έγινε με έναν ψηφιακό συσχετιστή ALV – 5000 . Η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης περιγράφεται από την εξίσωση (60) . Το  $\alpha$  είναι το κλάσμα της συνολικής σκεδαζόμενης έντασης που σχετίζεται με διακυμάνσεις πυκνότητας που αντιστοιχούν σε χρόνους συσχέτισης μεγαλύτερους των  $10^{-6}$  sec . Για καλύτερη μελέτη , σκεδάστηκαν πρώτα δείγματα τα οποία είχαν μικκύλια αποτελούμενα μόνο από detergents και στη συνέχεια μετρήθηκαν δείγματα με μικκύλια που περιείχαν πρωτεΐνη ώστε να γίνει σύγκριση .

## B) ΜΕΛΕΤΗ DETERGENTS

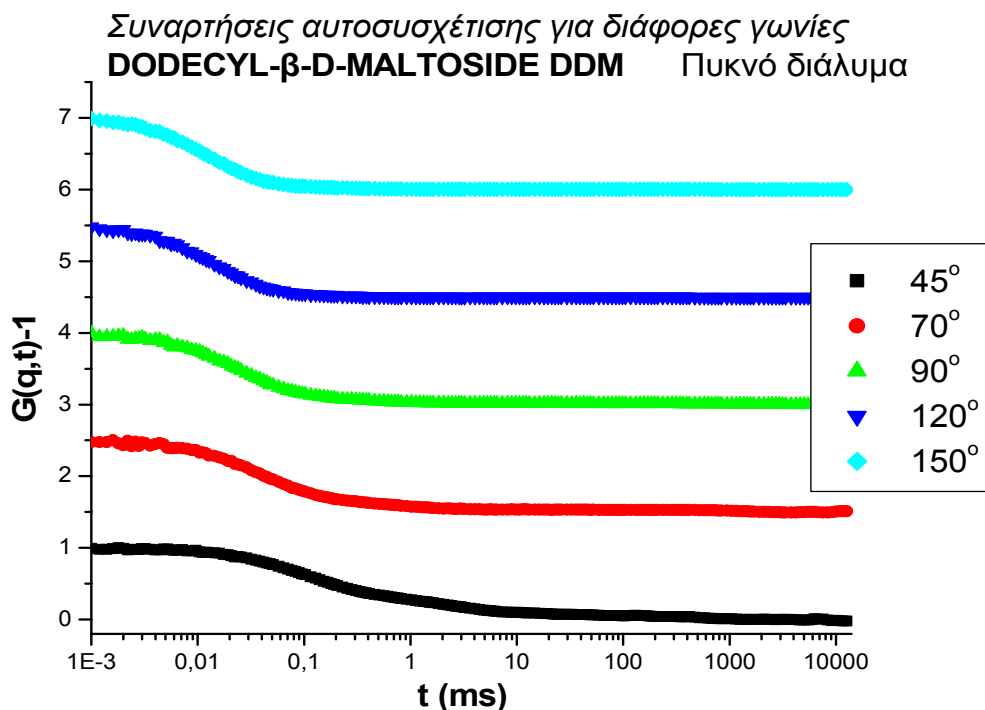
Τα μικκύλια που μελετήθηκαν ήταν τα DDM , OCTYL-POE και TRITON X-100 . Για κάθε συστατικό παρασκευάστηκαν δυο δείγματα , ένα πυκνό και ένα αραιό διάλυμα . Επειδή τα αραιά διαλύματα δεν έδωσαν ικανοποιητικά αποτελέσματα ( η χαμηλή συγκέντρωση δεν επέτρεψε σημαντική σκέδαση του φωτός από τα μόρια ) τα δεδομένα δεν παρατίθενται . Ενδεικτικά περιλαμβάνεται μόνο το διάγραμμα αυτοσυσχέτισης του αραιού διαλύματος OCTYL – POE για 5 διαφορετικές γωνίες . Το πρόγραμμα δίνει τους χρόνους χαλάρωσης (άξονας X) σε ms . Ο άξονας Y είναι η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης



**Σχήμα 26 :** Διαγράμματα correlation συναρτήσεως του χρόνου για μικκύλια αποτελούμενα μόνο από OCTYL-POE . Το διάλυμα είναι αραιό . Οι γωνίες σκέδασης είναι 45 , 70 , 90 , 130 και 150 .

Οι διακυμάνσεις στις συναρτήσεις είναι αρκετά μικρές όπως φαίνεται και στο σχήμα . Για αυτό όλοι οι υπολογισμοί των αραιών διαλυμάτων έδωσαν ελάχιστα αποτελέσματα . Αντιθέτως η σκέδαση των πυκνών διαλυμάτων ήταν ικανοποιητική

και τα δεδομένα θα αναλυθούν . Ενδεικτικά παρατίθεται το διάγραμμα αυτοσυσχέτισης για το πυκνό διάλυμα DDM σε 5 διαφορετικές γωνίες .



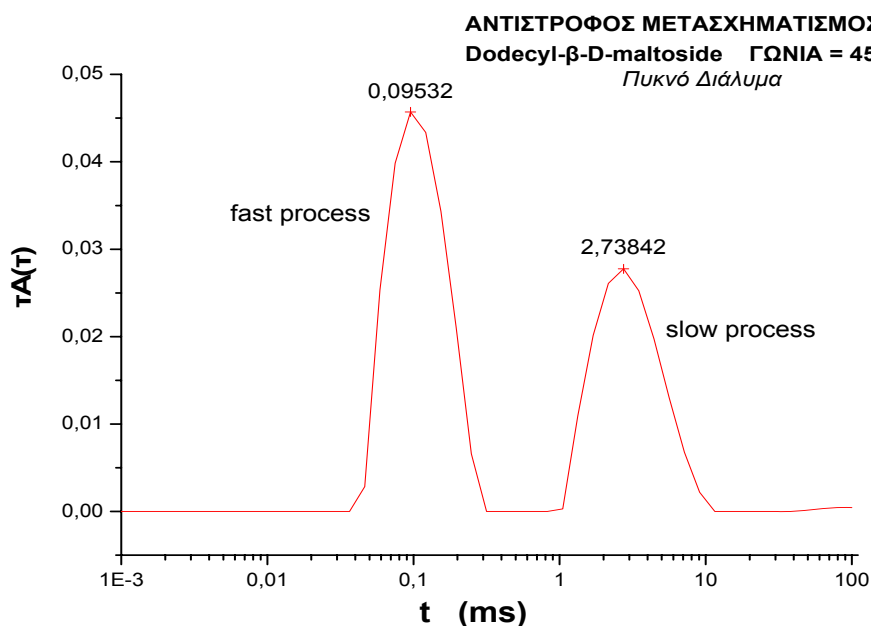
**Σχήμα 27 :** Διαγράμματα correlation συναρτήσεως του χρόνου για μικκύλια αποτελούμενα μόνο από DDM . Το διάλυμα είναι πυκνό . Οι γωνίες σκέδασης είναι 45 , 70 , 90 , 120 και 150 .

Οι διακυμάνσεις είναι αρκετά μεγάλες και τα δεδομένα μπορούν να γίνουν αντικείμενο επεξεργασίας . Όλα τα πυκνά διαλύματα έδωσαν παρόμοια διαγράμματα με το σχήμα 27 . Η μετατροπή έγινε μέσω του αλγόριθμου REPES και τη διαδικασία του αντίστροφου μετασχηματισμού Laplace (ILT) . Η μετατροπή λοιπόν είναι

$$ag(q,t) = \int_0^{\infty} A(\tau) \exp(-t/\tau) d\tau = \int_0^{\infty} \tau A(\tau) \exp(-t/\tau) d \ln \tau \quad (70)$$

Οι κατανομές των χρόνων χαλάρωσης δίνονται στη μορφή των  $\tau A(\tau)$  έναντι των  $\log \tau$  , συνεπώς τα διαγράμματα ILT δίνουν τις κορυφές που αντιστοιχούν στους χρόνους μέγιστης χαλάρωσης . Για παράδειγμα όταν η συνάρτηση αυτοσυσχέτισης υπέστη το

μετασχηματισμό ILT στο πυκνό διάλυμα του DDM σε γωνία  $45^\circ$  , έδωσε το εξής διάγραμμα



**Σχήμα 28 :** Αντίστροφος μετασχηματισμός Laplace για το πυκνό διάλυμα DDM σε γωνία  $45^\circ$  . Η κλίμακα του χρόνου είναι λογαριθμική .

Εμφανίζονται δυο διαφορετικές κορυφές που αντιστοιχούν σε δυο διαφορετικούς χρόνους χαλάρωσης . Αυτό σημαίνει παρουσία δυο διαφορετικών χημικών οντοτήτων στο διάλυμα . Είναι πολύ συνηθισμένο φαινόμενο η παρουσία δυο (ή και περισσότερων) κορυφών σε ένα φάσμα ILT . Η πρώτη κορυφή που αποκαλείται γρήγορη διαδικασία χαλάρωσης αντιστοιχεί στο μεμονωμένο μακρομόριο και η δεύτερη κορυφή που ονομάζεται αργή διαδικασία χαλάρωσης αντιστοιχεί σε συσσωματώματα (aggregates) μεταξύ των μακρομορίων τα οποία σχηματίζονται κατά κανόνα . Όλοι οι υπόλοιποι μετασχηματισμοί Laplace του πυκνού DDM για τις υπόλοιπες γωνίες ( $70^\circ$  ,  $90^\circ$  ,  $120^\circ$  &  $150^\circ$ ) έδωσαν παρόμοια αποτελέσματα . Οι δυο κορυφές σε όλα τα φάσματα πιστοποιούν την ύπαρξη συσσωματωμάτων . Το αντίστροφο του χρόνου  $\tau$  που δίνει η κορυφή του φάσματος είναι ο λεγόμενος ρυθμός χαλάρωσης  $\Gamma$  (σε  $s^{-1}$ ) . Για αυξανόμενη γωνία σκέδασης η κορυφή μετατοπίζεται σε χαμηλότερους χρόνους  $\tau$  και κατά συνέπεια σε μεγαλύτερους ρυθμούς χαλάρωσης  $\Gamma$  . Αυτό είναι φυσιολογικό καθώς το  $\Gamma$  είναι ευθέως ανάλογο με το τετράγωνο του κυματανύσματος . Το κυματάνυσμα  $q$  που

περιγράφεται από την εξίσωση (4) εξαρτάται ευθέως από τη γωνία σκέδασης  $\theta$  . Επομένως διαφορετικά  $\theta$  συνεπάγονται και διαφορετικούς ρυθμούς  $\Gamma$  . Τα αποτελέσματα για όλες τις γωνίες του πυκνού DDM και οι μετατροπές αναφέρονται στον παρακάτω πίνακα .

Γωνία Σκέδασης $\theta$	1 <sup>η</sup> κορυφή (fast) t (ms)	Μετατροπή t σε $\Gamma$ ( $\Gamma = \frac{1000}{t}$ )	2 <sup>η</sup> κορυφή (slow) t (ms)	Μετατροπή t σε $\Gamma$ ( $\Gamma = \frac{1000}{t}$ )
45	0.09532	10491	2.73842	365.2
70	0.057215	17478	1.5409	649.0
90	0.03065	32626	0.7708	1297
120	0.01778	56243	0.30907	3236
150	0.01778	56243	0.50022	1999

**Πίνακας 3 :** Αποτελέσματα φασμάτων ILT για το πυκνό διάλυμα DDM σε 5 διαφορετικές γωνίες . Η 1<sup>η</sup> κορυφή αντιστοιχεί στο μεμονωμένο μακρομόριο και η 2<sup>η</sup> στο συσσωμάτωμα

Όσο η γωνία αυξάνεται ο χρόνος μέγιστης χαλάρωσης πρέπει να μειώνεται . Παρατηρούμε ωστόσο πως η γωνία των 150 εμφανίζει για την πρώτη κορυφή ίδιο χρόνο με την 120 ενώ για τη δεύτερη κορυφή ο χρόνος είναι μεγαλύτερος από την 120 . Είναι πολύ συνηθισμένο φαινόμενο οι μεγάλες γωνίες ( μεγαλύτερες ή ίσες με την 140) να μη δίνουν αξιόπιστες κορυφές και για αυτό συνήθως απορρίπτονται . Τα δεδομένα από την 150 λοιπόν δε θα χρησιμοποιηθούν γιατί δεν είναι έγκυρα . Η εξάρτηση  $\Gamma$  και  $q$  δίνεται από τον τύπο

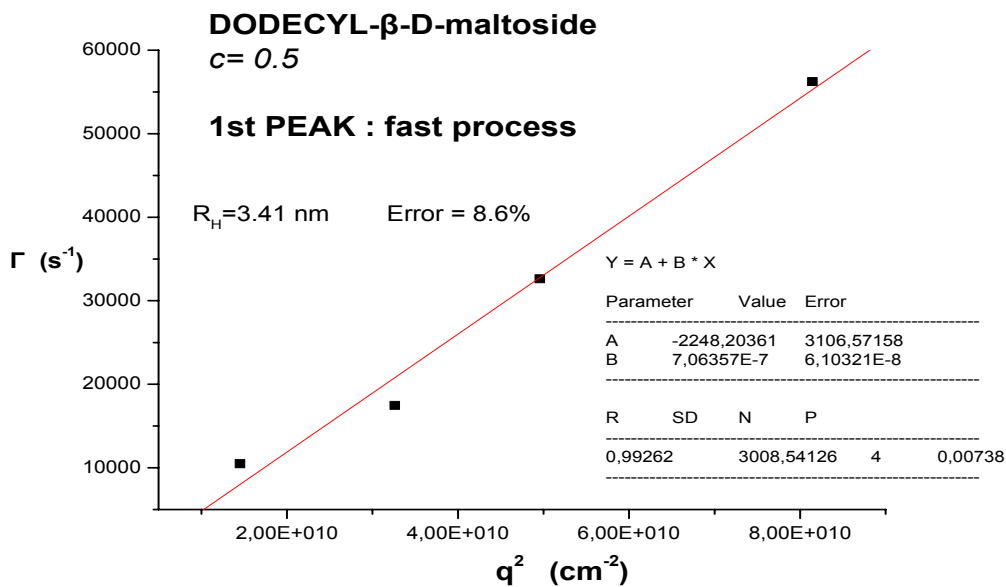
$$\Gamma = Dq^2 \quad (71)$$

Ένα διάγραμμα λοιπόν με άξονα Y τους υπολογισθέντες ρυθμούς χαλάρωσης  $\Gamma$  και άξονα X τα αντίστοιχα τετράγωνα των κυματανυσμάτων μας βοηθά να υπολογίσουμε άμεσα το μεταφορικό συντελεστή D για το μόριο υπό μελέτη . Για παράδειγμα το κυματόνισμα σε κυματάρηθους για τη γωνία 45 είναι σύμφωνα με την εξίσωση (4)

$q = \frac{4 * 3.14 * 1.333}{532 * 10^{-7}} \sin\left(\frac{45}{2}\right) = 1.205 * 10^5 \text{ cm}^{-1}$  περίπου . Ο δείκτης διάθλασης του νερού είναι περίπου 1.333 και το μήκος κύματος της ακτινοβολίας του laser  $532 * 10^{-7} \text{ cm}$  . Το τετράγωνο του  $q$  είναι  $1.452 * 10^{10} \text{ cm}^{-2}$  . Ομοίως για τις άλλες 3 γωνίες βρίσκονται τα  $q^2$  . Για την  $70 = 3.262 * 10^{10}$  , για την  $90 = 4.957 * 10^{10}$  και για την  $120 = 7.436 * 10^{10}$  . Η κλίση της ευθείας του διαγράμματος  $\Gamma$  Vs  $q^2$  με τα 4 σημεία δίνει απευθείας το  $D$  . Για τη γρήγορη κορυφή του πυκνού DDM ο συντελεστής διάχυσης είναι περίπου  $7.064 * 10^{-7} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$  . Μέσω της εξίσωσης Stokes – Einstein η Υδροδυναμική ακτίνα  $R_h$  μπορεί να υπολογιστεί άμεσα αν είναι γνωστό το  $D$  .

$$R_H = \frac{kT}{6\pi\eta D} \quad (71)$$

Συνεπώς για τη γρήγορη κορυφή του DDM η υδροδυναμική ακτίνα του μεμονωμένου μικκυλίου DDM βρέθηκε ίση με 3.41 nm περίπου . Από το σφάλμα της γραφικής παράστασης υπολογίζεται και το σφάλμα στον υπολογισμό της  $R_h$  .



**Σχήμα 29 :** Υπολογισμός συντελεστή διάχυσης  $D$  και υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  για τη γρήγορη κορυφή του μικκυλίου DDM . Ο συντελεστής διάχυσης έχει μονάδες  $\text{cm}^2 \text{ s}^{-1}$  και είναι η παράμετρος  $B$  του Linear Fit . Το σφάλμα του  $D$  (8.6%) είναι και το σφάλμα της ακτίνας  $R_h$  .

Τα δεδομένα που χρησιμοποιήθηκαν ήταν  $7.064 \cdot 10^{-11} \text{ m}^2\text{s}^{-1}$  για το συντελεστή διάχυσης,  $9 \cdot 10^{-4} \text{ Pa}\cdot\text{s}$  για το ιξώδες του νερού και η απόλυτη θερμοκρασία 296 Kelvin. Το αποτέλεσμα λοιπόν για το μικκύλιο DDM είναι  $R_h = 3.41 \pm 0.293 \text{ nm}$ . Κατασκευάζοντας την ίδια γραφική παράσταση για την αργή κορυφή του DDM το αποτέλεσμα είναι  $R_h = 97.38 \pm 4.87 \text{ nm}$  που είναι το μέγεθος του συσσωματώματος DDM.

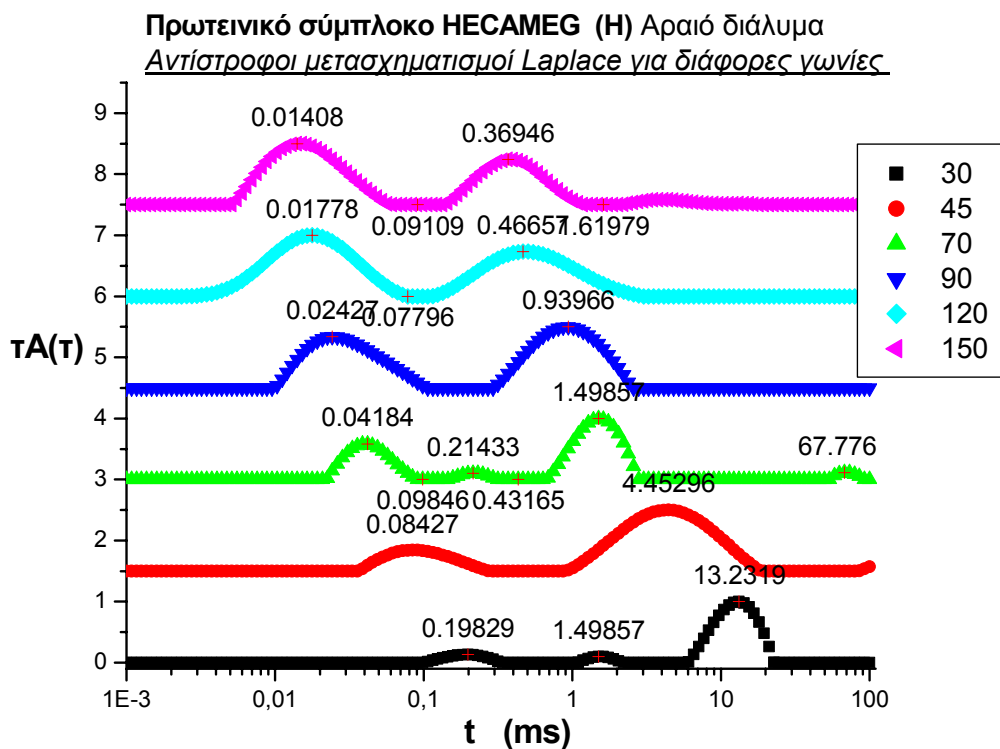
Η ίδια διαδικασία τηρήθηκε και για τα άλλα 2 είδη detergents. Το πυκνό OCTYL – POE έδωσε και αυτό μια γρήγορη και μια αργή κορυφή για όλες τις γωνίες σκέδασης. Το Triton X – 100 έδωσε μόνο μια αργή κορυφή και καθόλου γρήγορη. Για αυτό το λόγο, επειδή είναι γνωστό ότι υπάρχουν μεμονωμένα μικκύλια Triton X -100 πάρθηκε μια τιμή υδροδυναμικής ακτίνας από τη βιβλιογραφία. Υπολογίστηκαν οι ρυθμοί χαλάρωσης και οι συντελεστές διάχυσης χωριστά για κάθε κορυφή. Τα τελικά αποτελέσματα για τις R αναγράφονται στον πίνακα που ακολουθεί

<i>Είδος Detergent</i>	<b>1<sup>η</sup> κορυφή (μικκύλιο)</b>	<b>Σφάλμα (<math>\pm</math>) σε nm</b>	<b>2<sup>η</sup> κορυφή (aggregates)</b>	<b>Σφάλμα (<math>\pm</math>) σε nm</b>
<b>Triton X – 100</b>	$R_h = 4.84 \text{ nm}^{***}$	-----	<b><math>R_h = 111.18 \text{ nm}</math></b>	<b>21.6</b>
<b>DDM</b>	<b><math>R_h = 3.41 \text{ nm}</math></b>	<b>0.293</b>	<b><math>R_h = 97.38 \text{ nm}</math></b>	<b>4.87</b>
<b>OCTYL - POE</b>	<b><math>R_h = 5.16 \text{ nm}</math></b>	<b>0.44</b>	<b><math>R_h = 120.24 \text{ nm}</math></b>	<b>17.6</b>

**Πίνακας 4 :** Αποτελέσματα όλων των μετρήσεων υδροδυναμικών ακτίνων για τα πυκνά διαλύματα. Η μέτρηση της 1<sup>ης</sup> κορυφής του Triton X - 100 είναι από την αναφορά [43] για αυτό δεν περιέχει σφάλμα. Όλα τα σφάλματα δεν ξεπερνούν το 20% και επομένως τα αποτελέσματα είναι έγκυρα.

### Γ) ΠΡΩΤΕΪΝΙΚΑ ΣΥΜΠΛΟΚΑ DETERGENTS

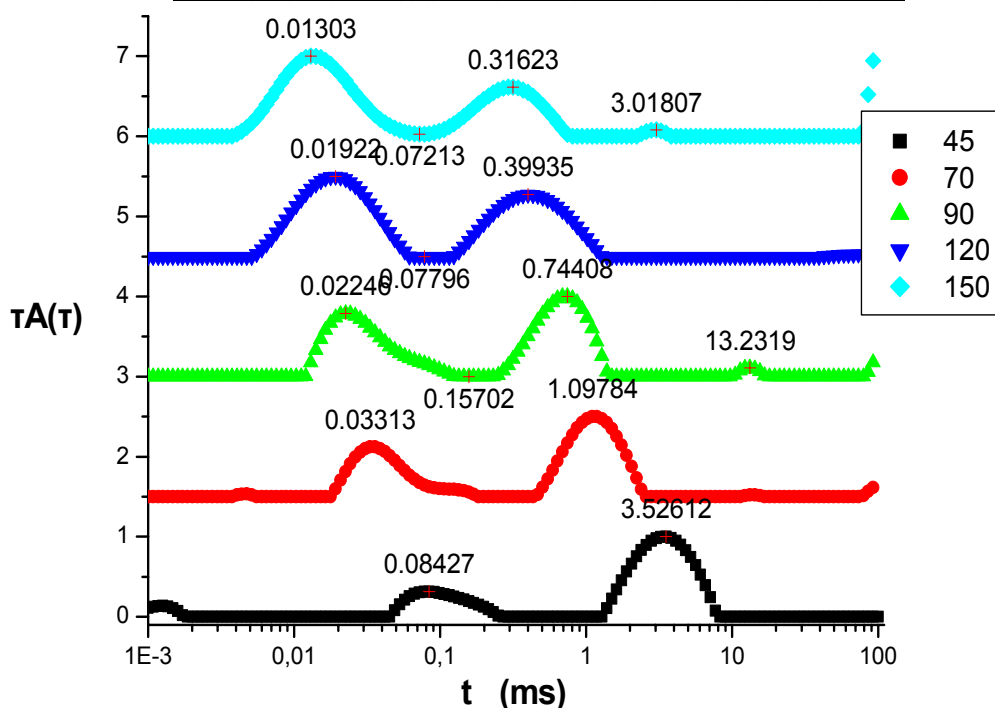
Τα δείγματα που μελετήθηκαν για τα μικκύλια τα οποία περιέχουν στο εσωτερικό τους την πρωτεϊνική μεμβράνη του *Chlorobium Terpidum* , περιλαμβάνουν και τις 4 κατηγορίες detergents . TRITON X -100 , OCTYL-POE , HECAMEG και DDM . Για κάθε δείγμα έγινε μέτρηση με ένα πυκνό και ένα αραιό διάλυμα . Σε αντίθεση με την προηγούμενη ομάδα , τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα έδωσαν αξιόπιστες κορυφές τόσο στα πυκνά όσο και στα αραιά δείγματα . Η Hecameg που περιέχει στο εσωτερικό της το δείγμα από το βακτήριο *Chl. Terpidum* δίνει δυο κορυφές , μια γρήγορη και μια αργή και στις δυο περιεκτικότητες . Μερικές φορές εμφανίζονται ασθενείς κορυφές στο φάσμα ILT οι οποίες βρίσκονται σε περιοχές πολύ υψηλών χρόνων και οφείλονται μονάχα στο θόρυβο του οργάνου . Στη συνέχεια δίνονται τα διαγράμματα ILT για όλες τις γωνίες σκέδασης των πυκνών και αραιών διαλυμάτων



**Σχήμα 30 :** Κορυφές μέγιστων χρόνων χαλάρωσης για τα αραιά διαλύματα μικκυλίων πρωτεΐνης – Hecameg σε 6 διαφορετικές γωνίες (30 , 45 , 70 , 90 , 120 & 150) . Οι κορυφές σε πάνω από 2 ms οφείλονται σε θόρυβο του οργάνου και αγνοούνται .

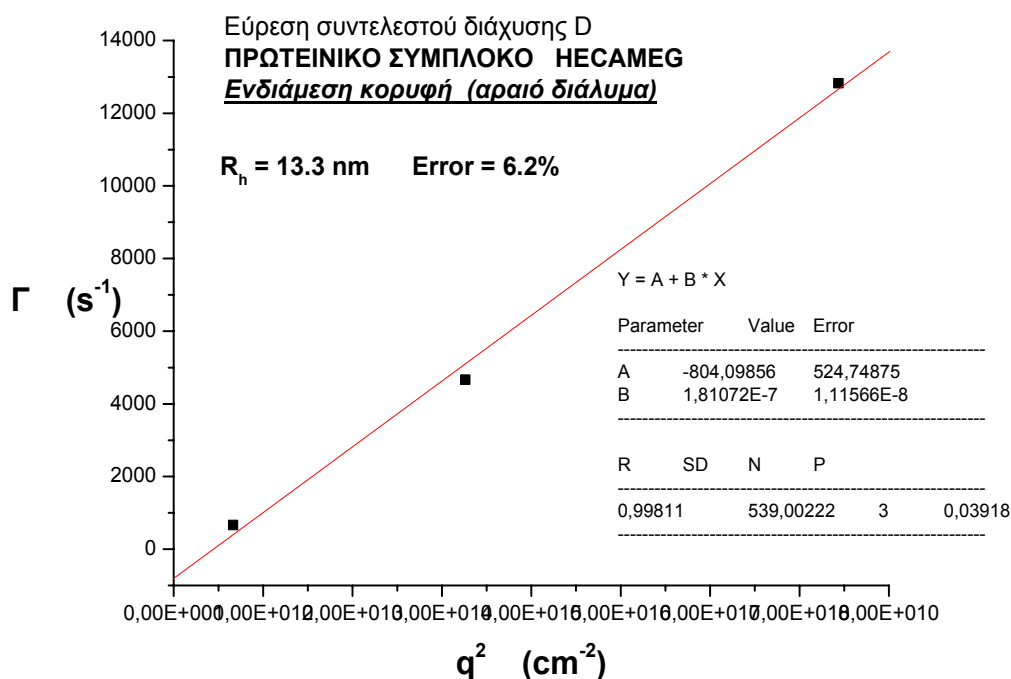


**Πρωτεϊνικό σύμπλοκο HECAMEG (H) Πυκνό διάλυμα**  
Αντίστροφοι μετασχηματισμοί Laplace για διάφορες γωνίες



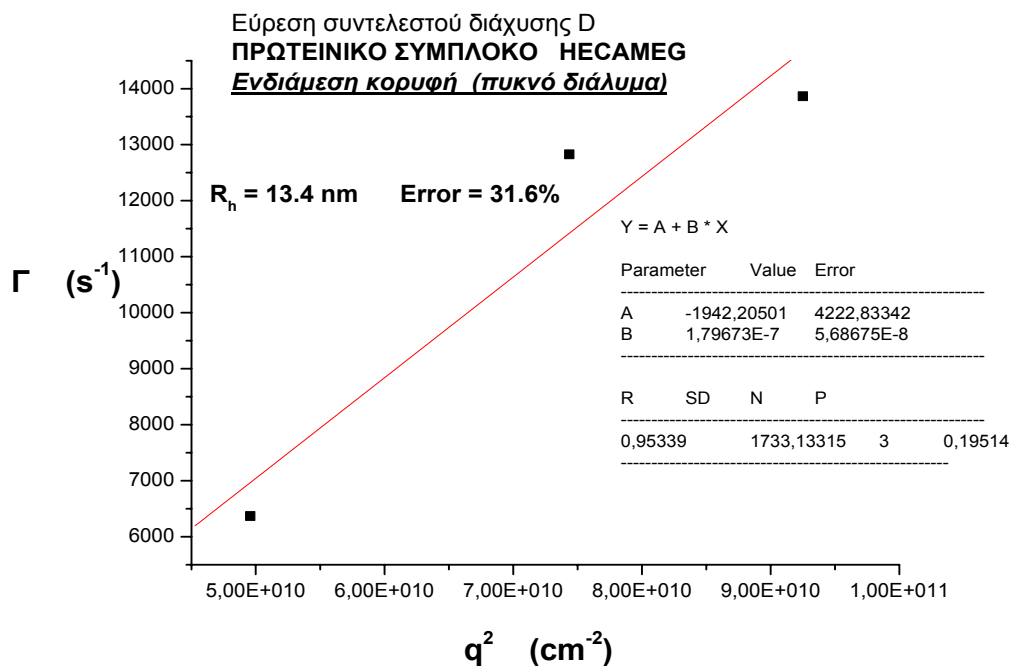
**Σχήμα 31 :** Κορυφές μέγιστων χρόνων χαλάρωσης για τα πυκνά διαλύματα μικκυλίων πρωτεΐνης – Hecameg σε 5 διαφορετικές γωνίες (45 , 70 , 90 , 120 & 150) . Οι κορυφές σε πάνω από 2 ms οφείλονται σε θόρυβο του οργάνου και αγνοούνται .

Πέραν από τις δυο συνηθισμένες κορυφές , σε μερικές γωνίες παρατηρείται και μια μικρή κορυφή ανάμεσα στις δυο μεγάλες η οποία πρέπει να υπολογισθεί καθώς δεν πρόκειται για σφάλμα του οργάνου . Αυτό αποδεικνύεται από το ότι ο χρόνος του μεγίστου της κορυφής μειώνεται όσο η γωνία σκέδασης  $\theta$  αυξάνεται , κάτι που δηλώνει παρουσία σωματιδίου . Οι ενδιάμεσες κορυφές μπορούν να φανούν στο φάσμα ILT έστω και αν είναι ασθενούς εντάσεως . Για παράδειγμα στο αραιό δείγμα λαμβάνονται υπόψη οι ενδιάμεσες κορυφές για 30 , 70 και 120 . Το διάγραμμα  $\Gamma V_s q^2$  που ακολουθεί έχει πολύ καλή γραμμικότητα και αξιοπιστία . Το σφάλμα της «ενδιάμεσης» υδροδυναμικής ακτίνας είναι πολύ μικρό και επομένως η μέτρηση είναι έγκυρη .



**Σχήμα 32 :** Γραφική παράσταση ρυθμού χαλάρωσης  $\Gamma$  συναρτήσει του τετραγώνου κυματανύσματος  $q^2$  για τον υπολογισμό της ενδιάμεσης υδροδυναμικής ακτίνας στο πρωτεϊνικό αραιό διάλυμα με detergent το Hecameg .

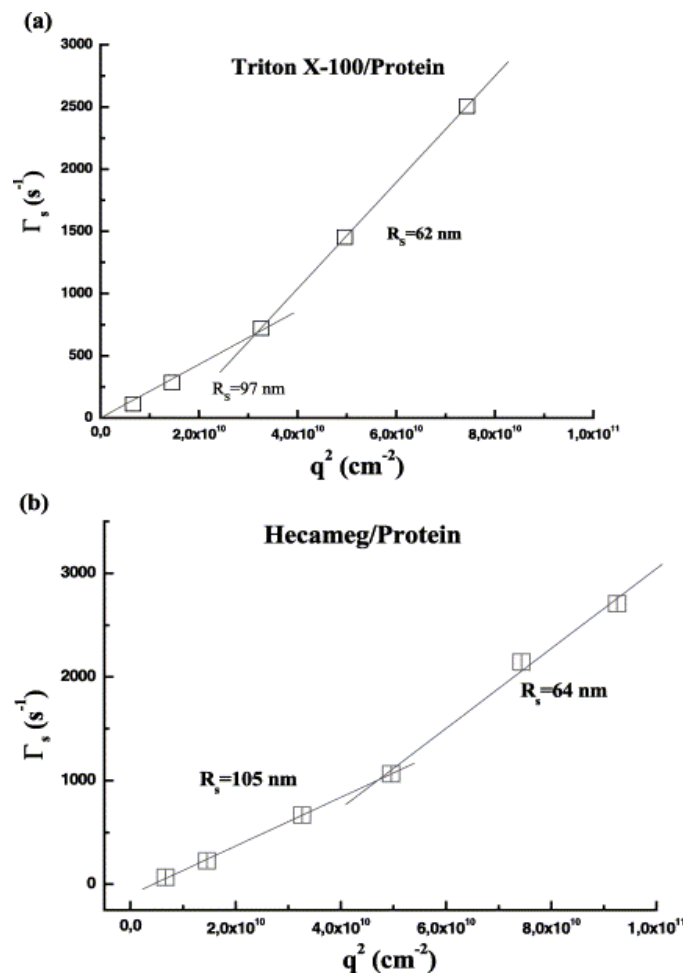
Η ίδια διαδικασία τηρείται για τα πυκνά διαλύματα Hecameg για τις γωνίες 90 , 120 & 150 . Παρά το γεγονός ότι το σφάλμα είναι πολύ μεγαλύτερο , η τιμή της υδροδυναμικής ακτίνας που υπολογίζεται είναι αξιοσημείωτα κοντά με του αραιού δείγματος . Τα σωματίδια που αντιστοιχούν σε αυτήν την ενδιάμεση ακτίνα είναι ενδιάμεσα συσσωματώματα τα οποία δρουν ως «γέφυρα» μεταξύ των απλών μορίων και των μεγάλων συσσωματωμάτων . Το μέγεθος τους (όπως εκφράζεται από την  $R_h$ ) κυμαίνεται από 10 έως και 40 nm . Ουσιαστικά είναι τα πρωτογενή συσσωματώματα τα οποία θα εξελιχθούν σε μεγαλύτερα συσσωματώματα . Στην επόμενη σελίδα βρίσκεται η γραφική παράσταση για το πυκνό διάλυμα της Hecameg .



**Σχήμα 33 :** Γραφική παράσταση ρυθμού χαλάρωσης  $\Gamma$  συναρτήσει του τετραγώνου κυματανύσματος  $q^2$  για τον υπολογισμό της ενδιάμεσης υδροδυναμικής ακτίνας στο πρωτεϊνικό πυκνό διάλυμα με detergent το Hecameg .

Ενδιάμεση κορυφή δεν παρατηρείται μόνο στα διαλύματα Hecameg , αλλά και στα διαλύματα του Octyl – POE τόσο τα πυκνά όσο και τα αραιά (τα δεδομένα δεν αναγράφονται) . Φυσικά υπάρχει τόσο η αργή όσο και η γρήγορη κορυφή . Οι ενδιάμεσες ακτίνες που υπολογίζονται είναι *επίσης* σε πολύ καλή συμφωνία (18.8 nm για το πυκνό και 18.85 nm για το αραιό) .

Μερικές φορές υπάρχουν κορυφές που δε φαίνονται άμεσα από τα φάσματα ILT αλλά μπορούν να υπολογιστούν έμμεσα από τα διαγράμματα  $\Gamma$  Vs  $q^2$  . Όταν τα σημεία από μια γωνία και πέρα αυξάνουν την τιμή του  $\Gamma$  απότομα , τότε γίνονται διακριτές δυο διαφορετικές κλίσεις ευθειών οι οποίες πρέπει να διαχωριστούν και να υποστούν ξεχωριστά Linear Fit . Οι διαφορετικοί συντελεστές D και οι διαφορετικές ακτίνες  $R_h$  που υπολογίζονται , αντιστοιχούν σε διαφορετικές αργές διαδικασίες που ονομάζονται συνήθως «αργή 1» και «αργή 2» και σε διαφορετικά μεγέθη συσσωματωμάτων . Στην περίπτωση μας τα πρωτεϊνικά σύμπλοκα Hecameg & Triton X – 100 έχουν διπλές κλίσεις και επομένως δυο αργές διαδικασίες . Στη συνέχεια δίνονται γραφικές παραστάσεις με δυο κλίσεις για ενδεικτικά πρότυπα διαλύματα Hecameg και Triton X – 100 [43] .

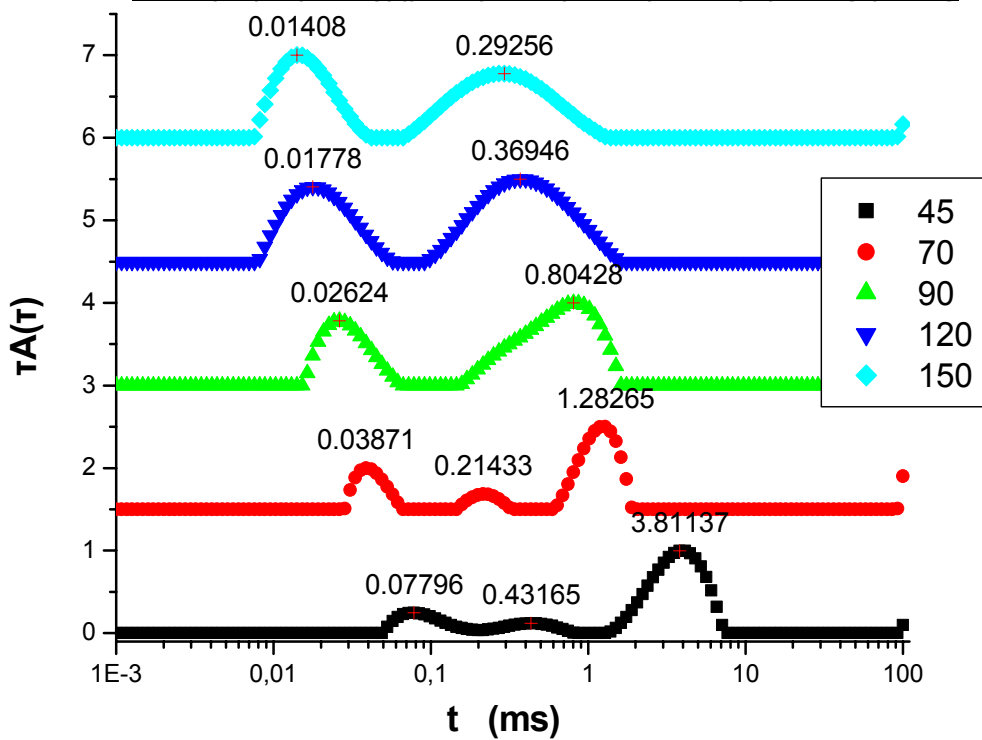


**Σχήμα 34 :** Γραφικές παραστάσεις  $\Gamma$  Vs  $q^2$  με δυο διαφορετικές κλίσεις για την αργή διαδικασία 1 και την αργή διαδικασία 2 . (α) Διάλυμα μικκυλίων Triton X – 100 (b) Διάλυμα μικκυλίων Hecameg . Κάθε κλίση αντιστοιχεί και σε διαφορετικό μέγεθος συσσωματώματος

Σε κανένα από τα φάσματα ILT των Triton X-100 ή Hecameg δεν είναι ορατές άμεσα δυο αργές διαδικασίες και γι' αυτό ο διαχωρισμός πρέπει να γίνεται έμμεσα .

Τα DDM είχαν μόνο μια γρήγορη και μια αργή διαδικασία διάχυσης , ενώ το OCTYL – POE είχε (όπως προαναφέρθηκε) μια γρήγορη , μια ενδιάμεση και μια αργή κορυφή . Στη συνέχεια δίνονται τα διαγράμματα των πυκνών διαλυμάτων για τα δείγματα OCTYL και TRITON X-100 σε όλες τις διαφορετικές γωνίες σκέδασης , με τους χαρακτηριστικούς χρόνους χαλάρωσης για τις κορυφές . Ακολουθούν επίσης οι πίνακες με τα τελικά αποτελέσματα υδροδυναμικών ακτίνων και τα σφάλματά τους .

**ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ OCTYL-POE** Πυκνό διάλυμα  
*Αντίστροφοι μετασχηματισμοί Laplace για διαφορετικές γωνίες*

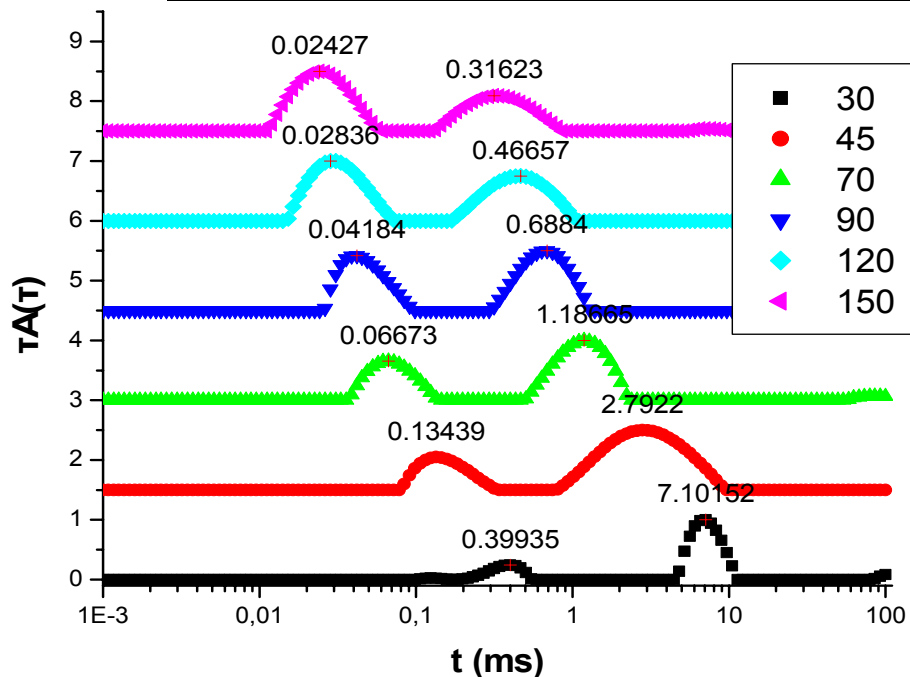


**Σχήμα 35 :** Κορυφές μέγιστων χρόνων χαλάρωσης για τα πυκνά διαλύματα μικκυλίων πρωτεΐνης – OCTYL-POE σε 5 διαφορετικές γωνίες (45 , 70 , 90 , 120 & 150) . Η ενδιάμεση κορυφή είναι ορατή στα 45 και 70 .

Είδος Detergent	1 <sup>η</sup> κορυφή (γρήγορη)	Ενδιάμεση κορυφή	Αργή Διαδικασία #1	Αργή Διαδικασία #2
TRITON X -100	$R_h = 5.46 \pm 0.075 \text{ nm}$		$R_h = 69.2 \pm 2.98 \text{ nm}$	
OCTYL-POE	$R_h = 3.38 \pm 0.091 \text{ nm}$	$R_h = 18.6 \pm 0.763 \text{ nm}$	$R_h = 64.2 \pm 2.18 \text{ nm}$	
DDM	$R_h = 4.70 \pm 0.052 \text{ nm}$		$R_h = 48.84 \pm 2.78 \text{ nm}$	
HECAMEG	$R_h = 2.69 \pm 0.13 \text{ nm}$	$R_h = 13.4 \pm 4.93 \text{ nm}$	$R_h = 66.46 \pm 3.07 \text{ nm}$	$R_h = 82.6 \pm 4.05 \text{ nm}$

**Πίνακας 5 :** Αποτελέσματα όλων των μετρήσεων υδροδυναμικών ακτίνων για τα πυκνά διαλύματα . Τα μικκύλια είναι πρωτεϊνική μεμβράνη από το *Chlorobium Teridum* που περικλείεται σε διαφορετικό είδος detergent . Όλα τα σφάλματα είναι μικρά και ικανοποιητικά .

**ΠΡΩΤΕΙΝΙΚΟ ΣΥΜΠΛΟΚΟ TRITON X-100** Πυκνό διάλυμα  
Αντίστροφοι μετασχηματισμοί Laplace για διαφορετικές γωνίες



**Σχήμα 36 :** Κορυφές μέγιστων χρόνων χαλάρωσης για τα πυκνά διαλύματα μικκυλίων πρωτεΐνης – TRITON X-100 σε 6 διαφορετικές γωνίες (30 , 45 , 70 , 90 , 120 & 150) .

Είδος Detergent	1 <sup>η</sup> κορυφή (γρήγορη)	Ενδιάμεση κορυφή	Αργή Διαδικασία #1	Αργή Διαδικασία #2
TRITON X -100	$R_h = 5.22 \pm 0.072$ nm		$R_h = 68.02 \pm 0.068$ nm	$R_h = 111.4 \pm 2.1$ nm
OCTYL-POE	$R_h = 3.17 \pm 0.076$ nm	$R_h = 18.85 \pm 2.96$ nm	$R_h = 60.49 \pm 6.41$ nm	
DDM	$R_h = 4.92 \pm 0.15$ nm		$R_h = 55.82 \pm 3.76$ nm	
HECAMEG	$R_h = 3.64 \pm 0.098$ nm	$R_h = 13.3 \pm 0.825$ nm	$R_h = 79.1 \pm 4.54$ nm	$R_h = 99.45 \pm 5.47$ nm

**Πίνακας 6 :** Αποτελέσματα όλων των μετρήσεων υδροδυναμικών ακτίνων για τα αραιά διαλύματα . Τα μικκύλια είναι πρωτεϊνική μεμβράνη από το *Chlorobium Teridum* που περικλείεται σε διαφορετικό είδος detergent . Όλα τα σφάλματα είναι μικρά και ικανοποιητικά .

Στις περισσότερες περιπτώσεις η συμφωνία μεταξύ πυκνών και αραιών διαλυμάτων είναι ικανοποιητική και μάλιστα σε κάποιες κορυφές όπως π.χ. τη γρήγορη κορυφή του OCTYL-POE οι τιμές είναι αξιοσημείωτα κοντά . Για αυτόν το λόγο σε όλες τις περιπτώσεις λαμβάνονται οι μέσες τιμές .

Είδος Detergent	1 <sup>η</sup> κορυφή (γρήγορη)	Ενδιάμεση κορυφή	Αργή Διαδικασία #1	Αργή Διαδικασία #2
TRITON X -100	R <sub>h</sub> = 5.34 nm		R <sub>h</sub> = 68.61 nm	R <sub>h</sub> = 111.4 nm
OCTYL-POE	R <sub>h</sub> = 3.28 nm	R <sub>h</sub> = 18.73 nm	R <sub>h</sub> = 62.26 nm	
DDM	R <sub>h</sub> = 4.81 nm		R <sub>h</sub> = 52.34 nm	
HECAMEG	R <sub>h</sub> = 3.17 nm	R <sub>h</sub> = 13.35 nm	R <sub>h</sub> = 72.78 nm	R <sub>h</sub> = 91.03 nm

**Πίνακας 7 :** Τελικά αποτελέσματα όλων των μετρήσεων υδροδυναμικών ακτίνων για τα πρωτεϊνικά διαλύματα (τα σφάλματα δεν περιλαμβάνονται).

Οι τιμές μεταξύ του πίνακα 4 και του πίνακα 7 είναι διαφορετικές κάτι που αποδεικνύει πως η παρουσία πρωτεΐνης στο εσωτερικό του μικκυλίου διαφοροποιεί την ακτίνα εξαιτίας αλληλεπιδράσεων με τα detergents . Διεξήχθησαν επίσης στατικές μετρήσεις σκέδασης (τα δεδομένα δεν αναγράφονται) και υπολογίστηκε η γυροσκοπική ακτίνα R<sub>G</sub> . Ο παράγοντας  $\rho = R_G / R_H$  βοηθά στον προσδιορισμό της δομής του σκεδαζόμενου μακρομορίου [43] . Όσο ο παράγοντας  $\rho$  πλησιάζει την τιμή 0.78 προσεγγίζει την ιδανική σφαιρική γεωμετρία . Αντιθέτως όσο ο  $\rho$  αυξάνεται και παίρνει τιμές μεγαλύτερες του 1 ή και του 2 , τότε το σωματίδιο έχει δομή ελλειψοειδούς ή και Γκαουσιανού «κουβαριού» (coil) . Για όλα τα δείγματα και συγκεκριμένα τα μεγάλα συσσωματώματα , το  $\rho$  βρέθηκε γύρω στο 0.75 πράγμα που φανερώνει σφαιρική γεωμετρία . Αξίζει να σημειωθεί ότι παρά το γεγονός ότι τα συσσωματώματα έχουν μεγάλο μοριακό βάρος και συνεισφέρουν το μεγαλύτερο ποσοστό στη σκεδαζόμενη ένταση , στην πραγματικότητα το κλάσμα τους κατά αριθμό στο διάλυμα είναι πολύ μικρό .

## Δ) ΤΕΛΙΚΕΣ ΠΑΡΑΤΗΡΗΣΕΙΣ / ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

- ▶ Μια μεμβρανική πρωτεΐνη από το φωτοσυνθετικό βακτήριο *Chlorobium* Terpidum απομονώθηκε και διαλυτοποιήθηκε με τη βοήθεια 4 διαφορετικών detergents . Η διαλυτοποίηση αποδείχτηκε επιπρόσθετα με SDS ηλεκτροφόρηση που αποκάλυψε μια ταινία στα 30 kDa .
  
- ▶ Τα 4 διαφορετικά detergents μελετήθηκαν επίσης με χρωματογραφία HPLC . Όλα τα δείγματα είχαν παρόμοιες μορφές στα διαγράμματα έκλουσης , ενδεικτικές του βιολογικού τμήματος . Αυτό αποδεικνύει ότι η χημική σύσταση του μικκυλίου δεν επηρεάζει την κατάσταση συσσωμάτωσης . Τα συσσωματώματα επίσης βρέθηκαν ότι είναι όλα σφαιρικής γεωμετρίας (  $\rho \approx 0.75$  ) άρα η χημική σύσταση του detergent δεν επηρεάζει τη γεωμετρία της πρωτεΐνης σε υδατικό διάλυμα .
  
- ▶ Οι «γρήγορες» κορυφές αποκαλύπτουν ότι τα μεμονωμένα μόρια πρωτεΐνης στο διάλυμα υπάρχουν με τη μορφή μικκυλίων ακτίνας 3 – 6 nm . Ακόμα και σε χαμηλές συγκεντρώσεις όμως υπάρχουν μεγάλα συσσωματώματα μεταξύ των μικκυλίων , με διαστάσεις που κυμαίνονται μεταξύ 20 και 110 nm . Όλα τα είδη detergent έχουν συσσωματώματα στην περιοχή 60 – 80 nm .
  
- ▶ Τα συσσωματώματα με TRITON X - 100 και HECAMEG παρουσιάζουν «διπλές» αργές διαδικασίες διάχυσης . Αυτό αποδεικνύει ότι υπάρχουν ακόμα μεγαλύτερα συσσωματώματα τα οποία έχουν διαστάσεις που φτάνουν έως και τα 110 nm .
  
- ▶ Κάποια από τα μικύλια και συγκεκριμένα τα HECAMEG και OCTYL – POE παρουσιάζουν ενδιάμεσες κορυφές που αντιστοιχούν στα αρχικά στάδια συσσωμάτωσης . Δηλαδή τα μεμονωμένα μόρια ενώνονται πολύ γρήγορα σε ενδιάμεσα aggregates της τάξης του 10 – 40 nm τα οποία λειτουργούν ως «πυρήνες» συσσωμάτωσης , στους οποίους προσκολλώνται τα υπόλοιπα μακρομόρια και δημιουργούν τα μεγάλα συσσωματώματα (60 - 110 nm) . Αυτό σημαίνει ότι η συσσωμάτωση με αυτά τα detergents είναι ραγδαία .



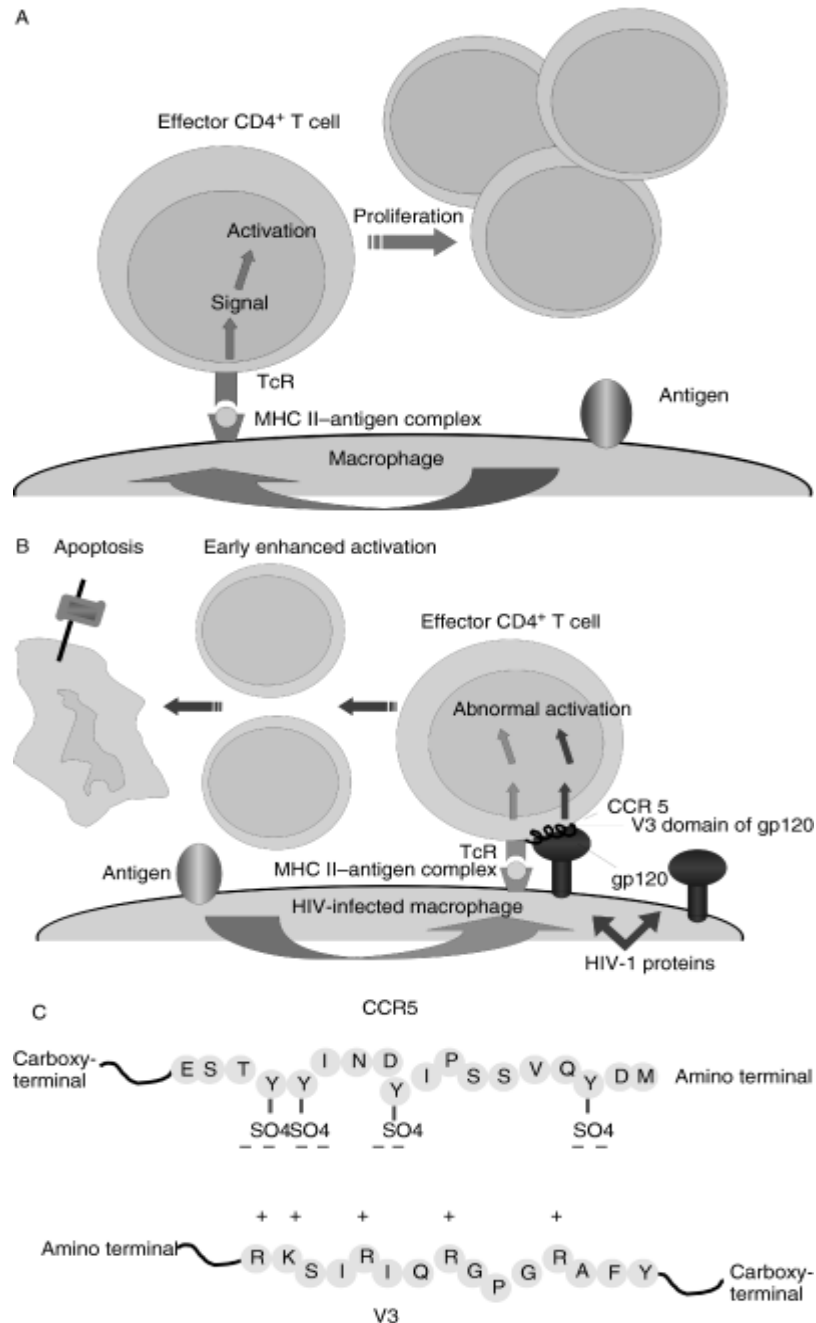
## **ΠΑΡΑΡΤΗΜΑ : ΜΕΛΛΟΝΤΙΚΟΙ ΣΤΟΧΟΙ**

*Δομική περιγραφή ανοσογενών περιοχών που απομονώνονται από τη θηλιά V3 της gp120 του ιού του AIDS .*

Ο ιός του AIDS , δηλαδή ο ιός του συνδρόμου επίκτητης ανοσολογικής ανεπάρκειας , μολύνει τα κύτταρα-ξενιστές που στοχεύει με μια αρκετά πολύπλοκη διαδικασία . Ο HIV-1 , όπως ονομάζεται εναλλακτικά , έχει ένα πρωτεϊνικό περίβλημα , το οποίο έχει τριμερή δομή που συνίσταται από 3 ετεροδιμερή σύμπλοκα , ονομαζόμενα gp160 . Το gp σημαίνει γλυκοπρωτεΐνη (glycoprotein) . Κάθε ένα από αυτά τα ετεροδιμερή αποτελείται από μια εξωτερική μεμβράνη γλυκοπρωτεΐνης gp120 και μια διαμεμβρανική γλυκοπρωτεΐνη , τη gp41 . Και οι δυο πρωτεΐνες έχουν ένα σημαντικό ρόλο στην κυτταρική μόλυνση που προκαλεί ο HIV [44] . Ο ιός επηρεάζει κυρίως τους κυτταρικούς πληθυσμούς που ανήκουν στην οικογένεια των CD4+ T λεμφοκυττάρων . Θεωρείται ότι ο ιός μολύνει τα κύτταρα που έχουν το μόριο CD4 στην επιφάνειά τους και με το οποίο δεσμεύεται η gp120 . Η αλληλεπίδραση μεταξύ gp120 και CD4 επάγει έναν καταρράκτη δομικών αναδιατάξεων στις γλυκοπρωτεΐνες του φακέλου του ιού . Το αποτέλεσμα είναι ότι οι μέχρι πρότινος κρυμμένες περιοχές της gp120 , εκτίθενται για να παίξουν το ρόλο του συν-υποδοχέα , δηλαδή ενός βοηθητικού κέντρου δέσμευσης . Η gp120 αποτελείται από 11 ολιγοπεπτιδικές «θηλιές» εκ των οποίων οι 5 πρώτες είναι μεταβλητής σύστασης και θεωρούνται οι πιο σημαντικές . Ονομάζονται V1 , V2 , V3 , V4 , V5 . Η V3 αλληλεπιδρά με τους υποδοχείς του κυττάρου ξενιστή που ονομάζονται CCR5 και CXCR4 . Επιπλέον δομικές αλλαγές στο σύμπλοκο gp120-gp41 οδηγούν τελικά στην έκθεση της υδρόφοβης N-τελικής περιοχής και τη σύντηξη των μεμβρανών ιού και ξενιστή . Τα ιικά νουκλεϊνικά οξέα εισέρχονται έτσι στο κυτταρόπλασμα του ξενιστή και προκαλούν τη μόλυνση .

Η κύρια λειτουργία των T – λεμφοκυττάρων είναι ανοσοαπόκριση όταν **παρουσιάζεται** κάποια επιβλαβής ουσία (αντιγόνο) με έκκριση κάποιων ουσιών από άλλα κύτταρα . Θεωρείται ότι η μόλυνση που επάγει ο HIV-1 συμβαίνει όταν εμφανίζεται το αντιγόνο [45] . Η διαδικασία φυσιολογικής λειτουργίας του T – λεμφοκυττάρου και η παθογόνος επέμβαση του ιού απεικονίζονται στα δυο πρώτα τμήματα του σχήματος της επόμενης σελίδας . Η ημιδιατηρημένη περιοχή της V3 ονομάζεται PND , δηλαδή Principal Neutralizing Domain , καθώς παίζει το σημαντικότερο ρόλο . Συγκεκριμένα , η PND της V3 επάγει ένα ειδικό σήμα που

οδηγεί τελικά στην απόπτωση του λεμφοκυττάρου . Η επικρατούσα εκδοχή για τον υποδοχέα του ξενιστή που αλληλεπιδρά με τη V3 , είναι ο CCR5 . Η περιοχή του CCR5 που συνδέεται με τη V3 απεδείχθη ότι είναι η N – τελική , η οποία κείται στην εξωτερική μεριά του υποδοχέα . Απαραίτητη προϋπόθεση για αλληλεπίδραση είναι η



**Σχήμα 37 :** (A) Φυσιολογική αλληλεπίδραση T – λεμφοκυττάρου με έναν μακροφάγο που έχει μολυνθεί με αντιγόνο (B) Παρουσίαση αντιγόνου όταν ο μακροφάγος έχει μολυνθεί με ιό του AIDS και περιέχει τις gp πρωτεΐνες στην επιφάνειά του . Η επίδραση των gp οδηγεί τελικά στην απόπτωση του T – λεμφοκυττάρου . (C) Ιονική αλληλεπίδραση μεταξύ CCR5 – V3 . Οι συντομογραφίες σημαίνουν MHC : Μείζον σύμπλεγμα ιστοσυμβατότητας TcR : Υποδοχέας T – κυττάρου .

σουλφούρωση τουλάχιστον δυο καταλοίπων τυροσίνης του CCR5 , δηλαδή η ύπαρξη αρνητικού φορτίου [45,46] . Αντιθέτως η PND της V3 χαρακτηρίζεται από την ύπαρξη πολλών θετικά φορτισμένων καταλοίπων πλευρικά της θηλιάς . Αυτή η ύπαρξη των απλών ηλεκτροστατικών αλληλεπιδράσεων συντελεί στην ισχυρή δέσμευση gp – CCR5 . Δηλαδή η μόλυνση που προκαλεί τελικά ο ιός δεν εξαρτάται τόσο πολύ από μια συγκεκριμένη δομή των gp120 , αλλά από την ύπαρξη πολλών κατιονικών φορτίων στην περιοχή V3 .

Επειδή λοιπόν η σημασία της περιοχής V3 είναι πολύ μεγάλη , η μελέτη πεπτιδίων χημικής σύστασης παρόμοιας με τη V3 είναι πολύ σπουδαία . Στους παρακάτω πίνακες φαίνεται η σύσταση αμινοξέων για 9 διαφορετικά πεπτίδια που μοιάζουν με τη V3 .

HIV strain	Cell tropism	Amino acid alignment	Number of basic amino acids
LAI	T cell line tropic (X4)	R K S I R I Q R G P Q R A F Y	5
MN	T cell line tropic (X4)	• • R • H • - - • • • • • • • •	4
SF2	Dual tropic (X4R5)	• • • • N • - - • • • • • • • •	3
SF128	Macrophage tropic (R5)	• • • • Y • - - • • • • • • • •	3
SF162	Macrophage tropic (R5)	• • • • T • - - • • • • • • • •	3

LAI modifications	Amino acid alignment	Number of basic amino acids
LAI	R K S I R I Q R G P G R A F Y	5
LAI <sup>1</sup>	V G • • L • • • • • • • • A • • •	1
LAI <sup>9</sup>	• • • • • R • • R • K R • K •	9
LAI-random	A V R F S K I G R • R Q G R I	5

**Πίνακας 8 :** (πάνω) Χημικά συντιθέμενα πεπτίδια – ακριβή αντίγραφα V3 από μολυσμένα κύτταρα .

**Πίνακας 9 :** (κάτω) Χημικά συντιθέμενα πεπτίδια με παραλλαγές ως προς τη χημική σύσταση σε σχέση με τα πεπτίδια του πάνω πίνακα . (●) ίδιο αμινοξύ (-) απουσία αμινοξέος . Οι πίνακες δείχνουν επίσης και τον αριθμό των βασικών αμινοξέων .

Η αλλαγή στη διαδοχική σειρά των καταλοίπων δε βρέθηκε να επηρεάζει σημαντικά τη δραστηριότητα των T – λεμφοκυττάρων , η οποία προάγεται από την ισχυρή δέσμευση της V3 . Ο ανεξέλεγκτος πολλαπλασιασμός που προκαλεί η V3 οδηγεί τελικά στην απόπτωση του λεμφοκυττάρου . Επομένως η χημική σύσταση των πεπτιδίων δεν είναι ζωτικής σημασίας για την καταστροφική δράση του ιού [46] .

**Ωστόσο ο συνολικός αριθμός των θετικά φορτισμένων αμινοξέων επηρεάζει δραστικά την πληθυσμιακή αύξηση των λεμφοκυττάρων** . Συγκεκριμένα η διαδοχική αύξηση κατά ένα θετικό φορτίο στο πεπτίδιο από το +3 στο +4 πενταπλασιάζει το ρυθμό αύξησης πληθυσμού . Από θετικό φορτίο +4 στο +5 , ο πληθυσμός μπορεί να υπερδιπλασιαστεί . Ωστόσο περαιτέρω αύξηση (π.χ. +9) δεν προκαλεί άλλο πολλαπλασιασμό κυττάρων .

Τα πεπτίδια αυτά έχουν μελετηθεί και με τριχοειδή ηλεκτροχρωματογραφία (Capillary ElectroChromatography = CEC) . Συγκεκριμένα , θραύσματα από ένα πεπτίδιο της gp120 με διαφορετικά φορτία και επομένως διαφορετικά ισοηλεκτρικά σημεία , εξετάστηκαν εκτενώς για τη συμπεριφορά τους σε διάφορους πειραματικούς παράγοντες [47] . Τα περισσότερα από αυτά τα πεπτίδια έχουν την τάση να σχηματίζουν κάποιες δευτερεύουσες περιοχές α – έλικας σε διάλυμα . Η αλλαγή στη θερμοκρασία επηρεάζει πολύ τη σειρά έκλουσης των διαφορετικών πεπτιδίων και αποδεικνύει ότι το ιζώδες είναι καθοριστικός παράγοντας για την ωσμωτική ροή . Σε καθορισμένες συνθήκες θερμοκρασίας , pH και ιονικής ισχύος και με συγκεκριμένη στήλη και σύσταση υγρού έκλουσης , βρέθηκε ότι οι χρόνοι κατακράτησης για κάθε πεπτίδιο έχουν μια γραμμική σχέση με τους συντελεστές  $\xi$  . Ο  $\xi$  ονομάζεται συντελεστής τριβής μέγεθος – προς – μάζα και δίνεται από τον τύπο  $\xi = A * \frac{q}{M^{\frac{2}{3}}}$  ,

όπου q το δραστικό φορτίο και M η σχετική μοριακή μάζα . Το A είναι χαρακτηριστική σταθερά για το σύστημα . Ο χρόνος κατακράτησης εξαρτάται επίσης από την υδροφοβικότητα του πεπτιδίου . Πιο συγκεκριμένα η ηλεκτροφορητική κινητικότητα του πεπτιδίου σε γενικές γραμμές κυριαρχεί σε σχέση με την κατακράτηση της στήλης , λόγω των κατιονικών αμινοξέων . Αν όμως μειωθεί η πολικότητα του υγρού έκλουσης , τότε το υδρόφοβο τμήμα του πεπτιδίου υπερτερεί και ο χρόνος κατακράτησης αυξάνεται , αφού η στήλη κυριαρχεί πια έναντι της ηλεκτροχημικής κινητικότητας .

Η γλυκοπρωτεΐνη gp120 έχει μελετηθεί εκτεταμένα με μονοδιάστατο και δισδιάστατο NMR καθώς και με κυκλικό διχρωισμό [48] . Τρία πεπτίδια με διαφορετικό αριθμό καταλοίπων μελετήθηκαν με τη μέθοδο NOE 2-D NMR ( NOE = Nuclear Overhauser Effect ) . Ο δισουλφιδικός δεσμός ανάμεσα σε δυο κυστεΐνες του πεπτιδίου με τα περισσότερα αμινοξέα , συνδέει τα άκρα του μορίου , καθώς οι δυο Cys βρίσκονται σχεδόν στα άκρα της αλυσίδας . Αυτή η

σύνδεση σχηματίζει μια θηλιά που θεωρείται πολύ σημαντικό χαρακτηριστικό για την ανοσολογική δράση της gp120 . Τα πεπτίδια με τα λιγότερα κατάλοιπα επέδειξαν μια πληθώρα διαμορφώσεων . Ένα τυπικά επαναλαμβανόμενο μοτίβο στις περισσότερες δομές είναι μιας  $\beta$  – στροφής στην αλληλουχία 4 αμινοξέων Gly – Pro – Gly – Arg . Παρατηρήθηκε ισχυρό φαινόμενο NOE ανάμεσα στα αμιδικά πρωτόνια της αργινίνης και της γειτονικής γλυκίνης . Ασθενής σύνδεση NOE παρατηρήθηκε ανάμεσα στο υδρογόνο του C <sup>$\alpha$</sup>  της προλίνης και του αμιδικού υδρογόνου της αργινίνης κάτι που επαληθεύει την ύπαρξη στροφής και συνεπώς της μακρινής απόστασης ανάμεσα στα δυο αυτά κατάλοιπα . Τα υπόλοιπα τμήματα του πεπτιδίου μπορούν να διαμορφώσουν πολλές πιθανές δομές όπως αποδεικνύεται και από την έλλειψη δεδομένων NMR για μια συγκεκριμένη αναδίπλωση του μορίου . Τα φάσματα κυκλικού διχρωισμού (CD) απέδειξαν ότι τα υδατικά διαλύματα του μεγαλύτερου πεπτιδίου δεν έχουν διαμόρφωση έλικας . Ωστόσο είναι δυνατή η μετάβαση σε  $\alpha$  – έλικα με τη χρήση συνδιαλύτη τριφθοροαιθανόλης . Τα δεδομένα του NMR ωστόσο συνηγορούν στο ότι ακόμα και σε δομή  $\alpha$  – έλικας **η διαμόρφωση της  $\beta$  στροφής των 4 αμινοξέων GPGA διατηρείται .**

Μελλοντικά πειράματα για τα πεπτίδια με ανοσολογική λειτουργία παρόμοιας δομής με τη V3 προβλέπουν φασματοσκοπία NOE και CD για ακόμα καλύτερο προσδιορισμό της τρισδιάστατης δομής . Οι τεχνικές Στατικής και Δυναμικής Σκέδασης Φωτός είναι επίσης χρήσιμα εργαλεία για τη μέτρηση του μοριακού βάρους των μορίων αυτών , της γυροσκοπικής ακτίνας  $R_g$  , της υδροδυναμικής ακτίνας  $R_h$  και του δομικού παράγοντα  $\rho$  , που θα βοηθήσουν ακόμα περισσότερο στον προσδιορισμό της τριτοταγούς δομής , δηλαδή αν είναι π.χ. coils ή rods . Τέλος με την τεχνική Σκέδασης Φωτός μπορεί να προσδιοριστεί και η κατάσταση συσσωμάτωσης αυτών των πεπτιδίων . Το αν το μακρομόριο είναι ένας ανεξάρτητος σκεδαστής ή σχηματίζει συσσωματώματα είναι μεγάλης σημασίας και μόνο το Light Scattering μπορεί να το προβλέψει αξιόπιστα και εύκολα .

## **BIBΛΙΟΓΡΑΦΙΑ**

- 1) “ Solution Properties of Block Copolymers using Light Scattering “ **Karin Schillen** *Uppsala University Doctoral Dissertation 1994 (comprehensive summary)*
- 2) “ Neutron , X-Ray and Light Scattering : Introduction to an Investigative Tool for Colloidal and Polymeric Systems “ **Edited by P.Lindner , Th. Zemb** , *North – Holland – Delta Series* © *ELSEVIER SCIENCE PUBLISHERS B.V. 1991 Part VI : Using Light by Michael Hofer*
- 3) “ Dynamic Light Scattering : Applications in Photon Correlation Spectroscopy “ **Edited by Robert Pecora** © *1985 Plenum Press New York*
- 4) “ Viscoelastic characterization of moderately concentrated polystyrene solutions by dynamic light scattering “ **Yoshiyuki Einaga , Toyohiko Fujisawa** *Polymer 43 (2002) pp. 5105 – 5108*
- 5) “ Multiple Relaxations of Concentration Fluctuations in Entangled Polymer Solutions “ **Peter Stepanek , Wyn Brown** *Macromolecules 31 (1998) pp. 1889 – 1897*
- 6) “ Static and dynamic light scattering measurements of polyphenylacetylene (PPA) in different organic solvents (tetrahydrofuran , toluene and chloroform) “ **C. Cametti , P. Codastefano , R. D’ Amato , A. Furlani , M.V. Russo** *Synthetic Metals 114 (2000) pp. 173 – 179*
- 7) “ Dynamic and static correlations in solutions of polymers in liquid and supercritical solvents : dynamic light scattering and small angle neutron scattering “ **Y.B. Melnichenko , W. Brown , S. Rangelov , G.D. Wignall , M. Stamm** *Physics Letters A 268 (2000) pp. 186 – 194*
- 8) “ Static and dynamic light scattering study of strong intermolecular interactions in aqueous solutions of PVP / C<sub>60</sub> complexes “ **Maria L. Sushko , Heikki Tenhu , Stanislav I. Klenin** *Polymer 43 (2002) pp. 2769 – 2775*
- 9) “ Temperature depending light scattering measurements of aqueous gelatin and gelineate solution and their mixtures “ **Th. Windhues , W. Borchard** *European Polymer Journal 38 (2002) pp. 1219 – 1227*
- 10) “ Effects of Adsorbed Block Copolymer and Comb-like Amphiphilic Polymers in Solution on the Electrical Percolation and Light Scattering Behavior of Reverse Microemulsions of Heptane / Water / AOT “ **Thomas H. Wines and Poniseril Somasundaran** *Journal of Colloid and Interface Science 256 (2002) pp. 183 – 189*

- 11) “ Determination of glycogen by Rayleigh light scattering “ **Shu Zhen Zhang , Feng Lin Zhao , Ke An Li , Shen Yang Tong** *Analytica Chimica Acta* 431 (2001) pp. 133 - 139
- 12) “ Static and dynamic light scattering studies of heteroxylans from maize bran in aqueous solution “ **E. Chanliaud , P. Roger , L. Saulmier & J. – F. Thibault** *Carbohydrate Polymers* 31 (1996) pp. 41 – 46
- 13) “ Chemical and Physical hydrogels : two casesystems studied by quasi elastic light scattering “ **F. Bordi , G. Paradossi , C. Rinaldi , B. Ruzicka** *Physica A* 304 (2002) pp. 119 - 128
- 14) “ Contribution of amylase and amylopectin to the light scattering behaviour of starches in aqueous solution “ **P. Roger , L.A. Bello – Perez , P. Colonna** *Polymer* 40 (1999) pp. 6897 – 6909
- 15) “ Light Scattering study of Turbid Heat – Set Globular Protein Gels Using Cross – Correlation Dynamic Light Scattering “ **Taco Nicolai , Claus Urban and Peter Schurtenberger** *Journal of Colloid and Interface Science* 240 (2001) pp. 419 – 424
- 16) “ Interaction between dextran and human low density lipoproteins (LDL) observed using laser light scattering “ **Christof Ruhlmann , Maik Thieme , Martin Helmstedt** *Chemistry and Physics of Lipids* 110 (2001) pp. 173 – 181
- 17) “ pH – dependent oligomerization of BPTI in undersaturated and supersaturated solutions studied by dynamic light scattering “ **Shinpei Tanaka , Mitsuo Ataka , Kazuo Onuma , Jean – Pierre Astier , Stephane Veesler** *Journal of Crystal Growth Vol. 237 – 239 part I* (2002) pp. 289 – 294
- 18) “ Assessing the role of detergent – detergent interactions in membrane protein crystallization “ **P.J. Loll , M. Allaman , J. Wiencek** *Journal of Crystal Growth* 232 (2001) pp. 432 – 438
- 19) “ A Light Scattering Study of the Transition Region between Diffusion - and Reaction – Limited Cluster Aggregation “ **G. Odriozola , M. Tirado – Miranda , A. Schmitt , F. Martinez Lopez , J. Callejas – Fernandez , R. Martinez – Garcia and R. Hidalgo – Alvarez** *Journal of Colloid and Interface Science* 240 (2001) 90 – 96
- 20) “ Structure of aggregating  $\kappa$  – carrageenan fractions studied by light scattering “ **Vincent Meunier , Taco Nicolai , Dominique Durand** *International Journal of Biological Macromolecules* 28 (2001) pp. 157 - 165
- 21) “ Self – assembly of melamin studied by laser light scattering “ **Maria Grazia Bridelli** *Biophysical Chemistry Vol. 73 Issue 3* (1998) pp. 227 – 239
- 22) “ Quasi-elastic elastic light scattering from large anisotropic particles : application to the red blood cells “ **F. Bordi , C. Cametti , A. Di Biasio , M. Angeletti , L. Sparapani** *Bioelectrochemistry* 52 (2000) pp. 213 – 221

- 23) “ Phosphatidylcholine Vesicle Diameter , Molecular Weight and Wall Thickness Determined by Static Light Scattering “ **John H. Van Zanten and Harold G. Monbouquette** *Journal of Colloid and Interface Science* 165 (1994) pp. 512 – 518
- 24) “ Determination of Nucleic Acids by a Resonance Light – Scattering Technique with  $\alpha,\beta,\gamma,\delta$  – Tetrakis[4-(trimethylammoniumyl)phenyl] porphine “ **Cheng Zhi Huand , Ke An Li and Shen Yang Tong** *Analytical Chemistry* 68 (1996) pp. 2259 – 2263
- 25) “ A highly sensitive assay for protein using resonance light-scattering technique with dibromohydroxyphenylfluorone – molybdenum (VI) complex “ **Zhong-Xian Guo , Han – Xi Shen** *Spectrochimica Acta Part A , Vol. 55 Issue 14* (1999) pp. 2919 – 2925
- 26) “ Resonance Rayleigh Scattering of chromium(VI) – iodide – basic – triphenylmethane dye systems and their analytical application “ **Shao Pu Liu , Qin Liu , Ming Li , Cheng Zhi Huang** *Analytica Chimica Acta* 379 (1999) pp. 53 – 61
- 27) “ An interpretation of the solute – solvent interactions in supercritical binary fluids as monitored by interaction – induced Raman light scattering “ **T. Palmer , W. Stanbery and F.G. Baglin** *Journal of Molecular Liquids* 85 (2000) pp. 153 – 160
- 28) “ Φασματοσκοπικός χαρακτηρισμός βιοδραστικών πολυμερών της πολυβινυλοπυρρολιδόνης με σκέδαση ακτίνων Laser “ **Ιωάννης Αλιφραγκής** *Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης , Τμήμα Χημείας , Πανεπιστήμιο Κρήτης , Ηράκλειο 2002*
- 29) “ Κινητικά διαγράμματα φάσεων σε αστεροειδή πολυμερή “ **Στειακάκης Εμμανουήλ** *Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης , Πανεπιστήμιο Κρήτης , Τμήμα Χημείας , Σεπτέμβριος 2001*
- 30) “ Δυναμική Πολυμερικών Πολυκλαδικών Αστεριών “ **Βλάχος Γιώργος** *Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης , Πανεπιστήμιο Κρήτης , Τμήμα Χημείας , Ηράκλειο Νοέμβριος 1999*
- 31) “ Δυναμική Διακυμάνσεων Σύστασης σε τήγματα και διαλύματα συμπολυμερών – Μια μελέτη με Φασματοσκοπία συσχέτισης φωτονίων “ **Tao Jian** *Διδακτορική Διατριβή , Τμήμα Χημείας Πανεπιστημίου Αθηνών σε συνεργασία με το Ίδρυμα Τεχνολογίας Έρευνας – Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής , Ηράκλειο , Κρήτη , Ελλάδα 12 Οκτωβρίου 1994*
- 32) “ Characterization of Turbid Colloidal Suspensions Using Light Scattering Techniques Combined with Cross – Correlation Methods “ **Claus Urban and Peter Schurtenberger** *Journal of Colloid and Interface Science* 207 (1998) pp. 150 – 158
- 33) “ Structure and Binding Site of the Primary Electron Acceptor in the Reaction Center of Chlorobium “ **Ute Feiler , Delphine Albouy , Christina Pourcet , Tony A. Mattioli , Marc Lutz and Bruno Robert** *Biochemistry* (1994) 33 pp.7594 – 7599



- 34) “ Structural analysis of the photosynthetic reaction center from the green sulphur bacterium *Chlorobium Tepidum* “ **Georgios Tsiotis , Christine Hager-Braun , Brettina Wolpesinger , Andreas Engel , Gunter Hauska** *Biochimica et Biophysica Acta* 1322 (1997) pp. 163 – 172
- 35) “ The Reaction Center Complex from the Green Sulfur Bacterium *Chlorobium Tepidum* : A Structural Analysis by Scanning Transmission Electron Microscopy “ **Herve – W. Remigy , Henning Stahlberg , Dimitrios Fotiadis , Shirley A. Muller , Bettina Wolpensinger , Andreas Engel , Gunter Hauska and Georgios Tsiotis** *Journal of Molecular Biology* (1999) 290 pp. 851 – 858
- 36) “ The reaction center of green sulphur bacteria “ **G. Hauska , T. Schoedl , Herve Remigy , G. Tsiotis** *Biochimica et Biophysica Acta* 1507 (2001) pp. 260 – 277
- 37) “ Crystal Structure of the Bacteriochlorophyll a Protein from *Chlorobium tepidum* “ **Yi-Fen Li , Wenli Zhou , Robert E. Blankenship and James P. Allen** *Journal of Molecular Biology* (1997) 271 pp. 456 – 471
- 38) “ Two molecules of cytochrome c function as the electron donors to P840 in the reaction center complex isolated from a green sulphur bacterium , *Chlorobium Tepidum* “ **Hirozo Oh-oka , Shoichiro Kamei , Hiroshi Matsubara , Masayo Iwaki , Shigeru Itoh** *FEBS Letters* 365 (1996) pp. 30 – 34
- 39) “ Transient Absorption Spectroscopy of Energy Transfer and Trapping Processes in the Reaction Center Complex of *Chlorobium tepidum* “ **Hirozo Oh-oka , Shoichiro Kamei , Hiroshi Matsubara , Su Lin , Paula I. van Noort , and Robert E. Blankenship** *Journal of Physical Chemistry B* 102 (1998) pp. 8190 – 8195
- 40) “ Ultrafast energy transfer in light-harvesting chlorosomes from the green sulphur bacterium *Chlorobium tepidum* “ **Sergei Savikhin , Paula I. van Noort , Yinwen Zhu , Su Lin , Robert E. Blankenship , Walter S. Struve** *Chemical Physics* 194 (1995) pp. 245 – 258
- 41) “ Oxygen uncouples light absorption by the chlorosome antenna and photosynthetic electron transfer in the green sulphur bacterium *Chlorobium Tepidum* “ **Niels – Ulrik Frigaard , Katsumi Matsuura** *Biochimica et Biophysica Acta* 1412 (1999) pp. 108 – 117
- 42) “ Purification and characterization of ferredoxin – NAD(P)<sup>+</sup> reductase from the green sulfur bacterium *Chlorobium tepidum* “ **Daisuke Seo , Hidehiro Sakurai** *Biochimica et Biophysica Acta* 1597 (2002) pp. 123 – 132
- 43) “ Molecular size determination of a membrane protein in surfactants by light scattering “ **Michalis Aivaliotis , Panagiotis Samolis , Eleftheria Neofotistou , Herve Remigy , Apostolos K. Rizos , Georgios Tsiotis** *Biochimica et Biophysica Acta* 1615 (2003) pp. 69 – 76

- 44) “ Conformational characteristics of immunogenic domains derived from HIV – 1 gp120 V3 loop peptide studies and their role in protein – protein interaction “ **Petros A. Galanakis , Georgios A. Spyroulias , Apostolos Rizos , Dimitrios Morikis and Elias Krambovitis** *submitted (2004)*
- 45) “ Simple electrostatic interaction mechanisms in the service of HIV – 1 pathogenesis “ **E. Krambovitis , A. Zafiropoulos , S. Baritaki and D.A. Spandidos** *Scandinavian Journal of Immunology 59 (2004) pp. 231-234*
- 46) “ Ionic interaction of the HIV – 1 V3 domain with CCR5 and deregulation of T lymphocyte function “ **Stavroula Baritaki , Alexis Zafiropoulos , Maria Sioumpara , Manolis Politis , Demetrios A. Spandidos and Elias Krambovitis** *Biochemical and Biophysical Research Communications 298 (2002) pp. 574 - 580*
- 47) “ Application of CEC procedures for the analysis of synthetic peptides : characterization of linear immunogenic peptides that mimic a HIV –1 gp120 epitope “ **K. Walhagen , K.K. Unger , H. – H. Keah , M.T.W. Hearn** *Journal of Peptide Research 59 (2002) pp. 159 - 173*
- 48) “ Solution conformational preferences of immunogenic peptides derived from the principal neutralizing determinant of the HIV – 1 envelope glycoprotein gp120 “ **K. Chandrasekhar , Albert T. Profy and H. Jane Dyson** *Biochemistry 30 (1991) pp. 9187 - 9194*