

**ΠΑΝΕΠΙΣΤΗΜΙΟ ΚΡΗΤΗΣ
ΤΜΗΜΑ ΧΗΜΕΙΑΣ**



ΔΙΔΑΚΤΟΡΙΚΗ ΔΙΑΤΡΙΒΗ

**ΜΕΛΕΤΗ ΥΠΕΡΤΑΧΕΙΩΝ ΦΩΤΟΦΥΣΙΚΩΝ ΔΙΕΡΓΑΣΙΩΝ
ΤΩΝ ΠΡΩΤΕΙΝΩΝ ΦΟΥΚΟΞΑΝΘΙΝΗΣ ΧΛΩΡΟΦΥΛΛΗΣ
(FCPs) ΠΟΥ ΑΠΟΜΟΝΩΝΟΝΤΑΙ ΑΠΟ ΔΙΑΤΟΜΑ ΜΕΣΩ
ΧΡΟΝΟΑΝΑΛΥΟΜΕΝΗΣ ΦΑΣΜΑΤΟΣΚΟΠΙΑΣ ΛΕΙΖΕΡ**

Μαρία Πολυχρονάκη

Υπεύθυνος Καθηγητής: Δημήτριος Άγγλος

ΗΡΑΚΛΕΙΟ 2023

**UNIVERSITY OF CRETE
DEPARTMENT OF CHEMISTRY**



DOCTORAL THESIS

**INVESTIGATION OF THE ULTRAFAST
PHOTOPHYSICAL PROCESSES OF FUCOXANTHIN-
CHLOROPHYLL PROTEINS (FCPs) ISOLATED FROM
DIATOMS VIA TRANSIENT ABSORPTION SPECTROSCOPY**

Maria Polychronaki

Thesis Supervisor: Demetrios Anglos

HERAKLION 2023

*Στον άνθρωπο που ομόρφυνε την
ζωή μου αυτά τα τέσσερα χρόνια...*

ΜΠ

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ

Δημήτριος Άγγλος

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Παναγιώτης Λουκάκος

*Κύριος Ερευνητής, Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ, Ίδρυμα
Τεχνολογίας και Έρευνας*

Κωνσταντίνος Βαρότσης

Καθηγητής, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου

Αθανάσιος Κουτσολέλος

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ιωάννης Παυλίδης

Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Απόστολος Ρίζος

Καθηγητής, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο Κρήτης

Ευάγγελος Δασκαλάκης

*Αναπληρωτής Καθηγητής, Τμήμα Χημικών Μηχανικών, Τεχνολογικό
Πανεπιστήμιο Κύπρου*

ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ

Στο πλαίσιο αυτής της διδακτορικής διατριβής, θέλω να εκφράσω τις ειλικρινείς μου ευχαριστίες προς όλους όσους συνέβαλαν και με στήριξαν κατά τη διάρκεια αυτής της σημαντικής ακαδημαϊκής προσπάθειας.

Θα ήθελα να ευχαριστήσω τον κύριο Δημήτριο Άγγλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και επιβλέποντα της παρούσας εργασίας για την εκτενή συνεισφορά του στην εκπαίδευσή μου, από τις προπτυχιακές μου σπουδές μέχρι και την ολοκλήρωση της διδακτορικής μου διατριβής. Η διαρκής υποστήριξη και καθοδήγησή του ήταν κρίσιμα εφόδια για την ανάπτυξη των επιστημονικών μου δεξιοτήτων και την επίτευξη των ερευνητικών μου στόχων.

Εκφράζω τις θερμές μου ευχαριστίες στον κύριο Παναγιώτη Λουκάκο, Κύριο Ερευνητή του Ινστιτούτου Ηλεκτρονικής Δομής και Λείζερ του Ιδρύματος Τεχνολογίας και Έρευνας για την εξαιρετική ευκαιρία που μου παρείχε να διεξαγάω την έρευνά μου στο εργαστήριό του. Η φιλοξενία στο εργαστήριό του μου προσέφερε πολύτιμη εμπειρία στη χρήση προηγμένου εξοπλισμού και μεθόδων ανάλυσης.

Η έρευνά μου δεν θα ήταν δυνατή χωρίς την πολύτιμη συνεισφορά του κύριου Κωνσταντίνου Βαρώτση, Καθηγητή του Τμήματος Χημικών-Μηχανικών του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου. Τον ευγνωμονώ για την ευγενική παροχή των δειγμάτων, που μελετήθηκαν στην παρούσα διατριβή και την συνεισφορά του στην ανάλυση των δεδομένων.

Ευχαριστώ θερμά τα μέλη της επιτροπής κύριο Αθανάσιο Κουτσολέλο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και κύριο Ιωάννη Παυλίδη, Επίκουρου Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης που συνεργάστηκαν μαζί μου και πρόσφεραν εποικοδομητικές συμβουλές για την πρόοδο της μελέτης μου. Επιπλέον, ευχαριστώ τον κύριο Απόστολο Ρίζο, Καθηγητή του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης και τον κύριο Ευάγγελο Δασκαλάκη, Αναπληρωτή Καθηγητή του Τμήματος Χημικών-Μηχανικών του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, για την προθυμία τους να αξιολογήσουν την εργασία μου και να μοιραστούν τις γνώσεις τους.

Η παρούσα διδακτορική διατριβή χρηματοδοτήθηκε στα πλαίσια των έργων HELLAS-CH, AENAO, ULEDYCA SYNERGY GRANT 2021 IESL, IKYDA 2022, ReMade@ARI και Laserlab Europe. Η χρηματοδότηση που έλαβα συντέλεσε στην οικονομική μου στήριξη και επέτρεψε την υλοποίηση της έρευνας μου.

Ευχαριστώ από καρδιάς τη Μαρία Πηγιάκη, Υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Η αφοσίωση και η πολύτιμη βοήθεια της κατέστησαν δυνατή την επίτευξη της παρούσας διδακτορικής διατριβής. Η Μαρία συνέβαλε σημαντικά στη λήψη και στην ανάλυση των δεδομένων, αλλά κυρίως με υποστήριξε ψυχολογικά καθ' όλη τη διάρκεια αυτής της ερευνητικής πορείας. Η ευγνωμοσύνη μου προς το πρόσωπο της είναι απεριόριστη και θεωρώ τον εαυτό μου τυχερό που είχα την ευκαιρία να συνεργαστώ μαζί της όλα αυτά τα χρόνια.

Επιπλέον, είμαι ιδιαίτερα ευγνώμων στον Χαράλαμπο Ανδρέου, Υποψήφιο Διδάκτορα του Τμήματος Χημικών-Μηχανικών του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου, ο οποίος εργάστηκε εντατικά για την απομόνωση των πρωτεϊνών που μελετήθηκαν στην παρούσα διδακτορική διατριβή. Η συνεισφορά του ήταν κρίσιμη για την υλοποίηση της παρούσας μελέτης.

Επίσης, ευγνωμονώ θερμά την Φανή Μαγκανά Διδάκτορα της Μοριακής Βιολογίας και Βιοχημείας και την Μαριλένα Κωνσταντίνου, Υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος Χημείας του Πανεπιστημίου Κρήτης. Οι επιστημονικές συζητήσεις που έκανα μαζί τους αποδείχθηκαν ιδιαίτερα εποικοδομητικές, καθώς μέσω αυτών έλαβα συμβουλές, κατευθύνσεις και αντάλλαξα ιδέες που πραγματικά συνέβαλαν στην πρόοδο και την ανάπτυξη της έρευνάς μου.

Θα ήθελα να εκφράσω την βαθιά μου εκτίμηση προς τους γονείς μου Σούλα Στρατάκη και Νίκο Πολυχρονάκη που υπήρξαν μια συνεχής πηγή αγάπης, ενθάρρυνσης και ηθικής υποστήριξης κατά τη διάρκεια αυτής της απαιτητικής προσπάθειας. Επίσης, σε αυτή την προσπάθεια συνέβαλαν τα αδέρφια μου Ελένη Πολυχρονάκη, Σάκης Καφφεισάκης, Χαράλαμπος Πολυχρονάκης και Ανδρέας Πολυχρονάκης, Υποψήφιος Διδάκτωρ της Σχολής Ηλεκτρολόγων Μηχανικών και Μηχανικών Υπολογιστών του Πολυτεχνείου Κρήτης, καθώς με βοήθησαν να ξεπεράσω προκλήσεις και να επιτύχω τους στόχους μου. Αισθάνομαι ευγνωμοσύνη προς την οικογένεια μου που είναι πάντα δίπλα μου, συνεισφέροντας τόσο σε πρακτικό όσο και σε ψυχολογικό επίπεδο.

Τέλος, ευχαριστώ τις αγαπημένες μου φίλες Ελπίδα Ντέρη, Μαρία Σηφάκη, Διδάκτορα Αναπτυξιακής Ψυχολογίας, Μαντώ Αλεξάκη, Βασιλική Καρζή, Υποψήφια Διδάκτορα του Τμήματος Ιατρικής του Πανεπιστημίου Κρήτης, Μαρία Αυγενάκη, Χρύσα Γιαταγάνα, Νικάνδρα Παπακώστα και τον πολύτιμο φίλο μου Μιχάλη Σηφάκη για την ανεκτίμητη στήριξη και την συμπαράσταση που μου παρείχαν κατά τη διάρκεια αυτής της απαιτητικής περιόδου.

ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ

Μαρία Πολυχρονάκη Χημικός (Ειδίκευση στην Φυσικοχημεία)

polymaria@iesl.forth.gr
Ηράκλειο, Κρήτη, Ελλάδα

ΕΚΠΑΙΔΕΥΣΗ

Διδακτορικό στην Επιστήμη της Χημείας

Ιούλιο 2019 - Ιούλιο 2023
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών
Επιστημών του Πανεπιστημίου
Κρήτης

Μεταπτυχιακό Δίπλωμα Ειδίκευσης με Κατεύθυνση Φυσικοχημεία

Σεπτέμβριο 2016 - Ιούλιο 2019
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών
Επιστημών του Πανεπιστημίου
Κρήτης
Βαθμολογία: 9.25/10.00

Πτυχίο Χημείας

Σεπτέμβριο 2016 - Ιούλιο 2019
Σχολή Θετικών και Τεχνολογικών
Επιστημών του Πανεπιστημίου
Κρήτης
Βαθμολογία: 7.89/10.00

ΓΛΩΣΣΕΣ

Αγγλικά

Examination for the Certificate of
Proficiency in English (ECPE)

Ελληνικά

Μητρική

ΓΝΩΣΕΙΣ Η/Υ

MS Office

Word, Excel, Power Point

Γλώσσες Προγραμματισμού *C, MATLAB*

Εργαστηριακά Προγράμματα
Origin, Labview, Glotaran,
Andor Solis

Φυσικοχημικός με εξαετή εμπειρία σε εύρος φασματοσκοπικών μεθόδων και στην κατασκευή μη γραμμικών οπτικών πειραματικών διατάξεων. Επιστημονικό ενδιαφέρον αποτελεί η φωτοφυσική μελέτη βιομορίων, όπως ένζυμα και πρωτεΐνες. Εξαιρετικά εργατική, συνεργάσιμη, και με ισχυρή επιθυμία για μάθηση.

ΕΡΓΑΣΙΑΚΗ ΕΜΠΕΙΡΙΑ

Ερευνήτρια Υποψήφια Διδάκτωρ

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής
Δομής και Λέιζερ | Ιούλιο 2019 – Ιούλιο 2023

Ερευνήτρια Υποψήφια Διδάκτωρ στα πλαίσια του προγράμματος ΙΚΥΔΑ 2022

Friedrich Alexander Universität Department of Chemistry and
Pharmacy | Σεπτέμβριο 2022 - Οκτώβριο 2022

Μεταπτυχιακή Φοιτήτρια

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής
Δομής και Λέιζερ | Σεπτέμβριο 2016 – Ιούλιο 2019

Προπτυχιακή Φοιτήτρια – Διπλωματική Εργασία

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής
Δομής και Λέιζερ | Σεπτέμβριο 2015 – Ιούλιο 2016

Πρακτική Άσκηση

Ίδρυμα Τεχνολογίας και Έρευνας (ΙΤΕ) Ινστιτούτο Ηλεκτρονικής
Δομής και Λέιζερ | Ιούλιο 2015 – Οκτώβριο 2015

ΕΘΕΛΟΝΤΙΣΜΟ

Μεταπτυχιακή Βοηθός Διδασκαλίας

2016-2017, 2017-2018, 2019-2020, 2020-2021

Στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο της
Κρήτης.

Προπτυχιακή Βοηθός Διδασκαλίας

2015-2016

Στο Εργαστήριο Φυσικοχημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο της
Κρήτης.

Προπτυχιακή Βοηθός Εργαστηρίου

2013-2014

Στο Εργαστήριο Γενικής Χημείας, Τμήμα Χημείας, Πανεπιστήμιο της
Κρήτης.

ΘΕΡΙΝΑ ΣΧΟΛΕΙΑ

Laserlab Europe Nordic Training School for Potential Users
“Luminescence Dynamics: Analyzing relaxation processes”, Laser
Center, University of Latvia, 10 – 12/04/2019 Riga, Latvia.

ΔΙΠΛΩΜΑ ΟΔΗΓΗΣΗΣ

ΔΗΜΟΣΙΕΥΣΕΙΣ

- D. Karanikolopoulos, E. Gagaoudakis, S. Droulias, D. Louloudakis, K. Mouratis, **M. Polychronaki**, G. E. Katsoprinakis, E. Aperathitis, D. Vernardou, V. Binas, C. Kalpouzou, G. Kiriakidis, E. Koudoumas, A. Lappas, P. A. Loukakos. (2021) Influence of Mg doping on the ultrafast electron dynamics of VO₂ films. *Applied Physics A*, 127, 751-763. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00339-021-04886-y>
- E. Nikoloudakis, M. Pigiaki, **M. N. Polychronaki**, A. Margaritopoulou, G. Charalambidis, E. Serpetzoglou, A. Mitraki, P. A. Loukakos, A. G. Coutsolelos. (2021) Self-Assembly of Porphyrin Dipeptide Conjugates toward Hydrogen Production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9, 7781-7791. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.1c00978>
- O. Kokkinaki, A. Klini, **M. Polychronaki**, N. C. Mavrikakis, K. G. Siderakis, E. Koudoumas, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, K. Kalpouzou, D. Anglos. (2020) Assessing the type and quality of high voltage composite outdoor insulators by remote LIBS analysis: A feasibility study. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 165, 105768-105779. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105768>
- N. Mavrikakis, E. Koudoumas, K. Siderakis, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, O. Kokkinaki, A. Klini, C. Kalpouzou, **M. Polychronaki**, D. Anglos. Insulators' pollution problem: Experience from the coastal transmission system of Crete. Published in 2017 52nd International Universities Power Engineering Conference (UPEC). (2017).

ΣΥΝΕΛΠΙΑ

- Ultrafast Photophysical Processes of Flavins and Enzymes Using Time-Resolved Laser Spectroscopy. **Maria N. Polychronaki**, Maria Pigiaki, Nikos S. Hatzakis, Demetrios Anglos, Panagiotis A. Loukakos. Colloquium Spectroscopicum Internationale XLII 2022, 30/05-03/06/2022, Gijon, Spain.
- Ultrafast Dynamics of Self-Assembled Porphyrin Dipeptide Conjugates toward Hydrogen Production. Maria Pigiaki, **Maria N. Polychronaki**, Emmanouil Nikoloudakis, Alexandra Margaritopoulou, Georgios Charalambidis, Efthymis Serpetzoglou, Anna Mitraki, Athanassios G. Coutsolelos and Panagiotis A. Loukakos. Colloquium Spectroscopicum Internationale XLII 2022, 30/05-03/06/2022, Gijon, Spain.
- Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy of D-Luciferin Firefly Substrate. Maria Pigiaki, **Maria Polychronaki**, Panagiotis A. Loukakos, Athanassios G. Coutsolelos. 21st International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence & XIX International Symposium on Luminescence Spectrometry, 30/05-03/06/2022, Gijon, Spain.
- Ultrafast Photophysical Processes of Flavins and Enzymes Using Time-Resolved Laser Spectroscopy. **Maria N. Polychronaki**, Maria Pigiaki, Nikos S. Hatzakis, Demetrios Anglos, Panagiotis A. Loukakos. 1 st Symposium of Graduate Students of the Chemistry Department, NKUA "Chemistry and its Applications", 17-18/03/2022, Athens, Greece.
- Ultrafast Dynamics of Firefly d-Luciferin. Maria Pigiaki, **Maria N. Polychronaki**, Athanassios G. Coutsolelos, Panagiotis A. Loukakos. 1 st Symposium of Graduate Students of the Chemistry Department, NKUA "Chemistry and its Applications", 17-18/03/2022, Athens, Greece.
- Ultrafast Time-Resolved Spectroscopy for Analysis of Flavins FMN and FAD, Cofactors of Cytochrome P450 Oxidoreductase. **M. Polychronaki**, D. Karanikolopoulos, N. S. Hatzakis, D. Anglos and P. A. Loukakos. 12th Scientific Conference of Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH), 15-16/10/2019, Patra, Greece.
- Application of the Ultrafast Time-Resolved Laser Spectroscopy to the Cofactors of the Cytochrome P450 Oxidoreductase. **M. Polychronaki**, D. Karanikolopoulos, N. S. Hatzakis and P. A. Loukakos. 21st Postgraduates' Conference on Chemistry, 15-17/05/2019, Heraklion, Greece.
- Remote LIBS for Assessing the Condition of Field-Aged Composite HV Outdoor Insulators. O.Kokkinaki, A. Klini, **M.Polychronaki**, N.Mavrikakis, K. Siderakis, E. Koudoumas, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, C. Kalpouzou, D. Anglos. 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA - 2017), 17-21/09/ 2017, Heraklion, Greece.

CURRICULUM VITAE

Maria Polychronaki

Physical Chemist

polymaria@iesl.forth.gr
Heraklion, Crete, Greece

EDUCATION

Doctor of Philosophy in Chemistry

July 2019 - July 2023

Faculty of Sciences and Engineering, University of Crete

Master of Science in Chemistry

September 2016 - July 2019

Faculty of Sciences and Engineering, University of Crete
Grade: 9.25/10.00

Bachelor of Science in Chemistry

September 2012 - July 2016

Faculty of Sciences and Engineering, University of Crete
Grade: 7.89/10.00

LANGUAGE SKILLS

English

Examination for the Certificate of Proficiency in English (ECPE)

Greek

Native language

COMPUTER SKILLS

MS Office

Word, Excel, Power Point

Programming Languages

C, MATLAB

Laboratory Software

Origin, Labview, Glotaran, Andor Solis

Physical chemist with six years of experience in a wide variety of spectroscopic methods and a solid background in the construction of non-linear optical experimental setups. Passionate for the photophysical study of bio-molecules such as enzymes and proteins. Highly cooperative, hard worker, and with a desire for learning.

EXPERIENCE

Researcher Ph.D. Candidate

Foundation for Research and Technology - Hellas (FORTH)
Institute of Electronic Structure & Laser | July 2019 – July 2023

Researcher Ph.D. Candidate in IKYDA 2022

Friedrich Alexander Universität Department of Chemistry and Pharmacy | September 2022 - October 2022

Master Student

Foundation for Research and Technology - Hellas (FORTH)
Institute of Electronic Structure & Laser | September 2016 – July 2019

Undergraduate Student - Apprenticeship

Foundation for Research and Technology - Hellas (FORTH)
Institute of Electronic Structure & Laser | September 2015 – July 2016

Student Internship

Foundation for Research and Technology - Hellas (FORTH)
Institute of Electronic Structure & Laser | July 2015 – October 2015

VOLUNTEERING

Graduate Teaching Assistant

2016-2017, 2017-2018, 2019-2020, 2020-2021

In Physical Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete.

Undergraduate Teaching Assistant

2015-2016

In Physical Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete.

Undergraduate Laboratory Assistant

2013-2014

In General Chemistry Laboratory, Department of Chemistry, University of Crete.

SUMMER SCHOOL

Laserlab Europe Nordic Training School for Potential Users "Luminescence Dynamics: Analyzing relaxation processes", Laser Center, University of Latvia, 10 – 12/04/2019 Riga, Latvia.

DRIVER LICENCE

PUBLICATIONS

- D. Karanikolopoulos, E. Gagaoudakis, S. Droulias, D. Louloudakis, K. Mouratis, **M. Polychronaki**, G. E. Katsoprinakis, E. Aperathitis, D. Vernardou, V. Binas, C. Kalpouzou, G. Kiriakidis, E. Koudoumas, A. Lappas, P. A. Loukakos. (2021) Influence of Mg doping on the ultrafast electron dynamics of VO₂ films. *Applied Physics A*, 127, 751-763. <https://link.springer.com/article/10.1007/s00339-021-04886-y>
- E. Nikoloudakis, M. Pigiaki, **M. N. Polychronaki**, A. Margaritopoulou, G. Charalambidis, E. Serpetzoglou, A. Mitraki, P. A. Loukakos, A. G. Coutsolelos. (2021) Self-Assembly of Porphyrin Dipeptide Conjugates toward Hydrogen Production. *ACS Sustainable Chemistry & Engineering*, 9, 7781-7791. <https://pubs.acs.org/doi/10.1021/acssuschemeng.1c00978>
- O. Kokkinaki, A. Klini, **M. Polychronaki**, N. C. Mavrikakis, K. G. Siderakis, E. Koudoumas, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, K. Kalpouzou, D. Anglos. (2020) Assessing the type and quality of high voltage composite outdoor insulators by remote LIBS analysis: A feasibility study. *Spectrochimica Acta - Part B Atomic Spectroscopy*, 165, 105768-105779. <https://doi.org/10.1016/j.sab.2020.105768>
- N. Mavrikakis, E. Koudoumas, K. Siderakis, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, O. Kokkinaki, A. Klini, C. Kalpouzou, **M. Polychronaki**, D. Anglos. Insulators' pollution problem: Experience from the coastal transmission system of Crete. Published in 2017 52nd International Universities Power Engineering Conference (UPEC). (2017).

CONFERENCES

- Ultrafast Photophysical Processes of Flavins and Enzymes Using Time-Resolved Laser Spectroscopy. **Maria N. Polychronaki**, Maria Pigiaki, Nikos S. Hatzakis, Demetrios Anglos, Panagiotis A. Loukakos. Colloquium Spectroscopicum Internationale XLII 2022, 30/05-03/06/2022, Gijon, Spain.
- Ultrafast Dynamics of Self-Assembled Porphyrin Dipeptide Conjugates toward Hydrogen Production. Maria Pigiaki, **Maria N. Polychronaki**, Emmanouil Nikoloudakis, Alexandra Margaritopoulou, Georgios Charalambidis, Efthymis Serpetzoglou, Anna Mitraki, Athanassios G. Coutsolelos and Panagiotis A. Loukakos. Colloquium Spectroscopicum Internationale XLII 2022, 30/05-03/06/2022, Gijon, Spain.
- Ultrafast Transient Absorption Spectroscopy of D-Luciferin Firefly Substrate. Maria Pigiaki, **Maria Polychronaki**, Panagiotis A. Loukakos, Athanassios G. Coutsolelos. 21st International Symposium on Bioluminescence and Chemiluminescence & XIX International Symposium on Luminescence Spectrometry, 30/05-03/06/2022, Gijon, Spain.
- Ultrafast Photophysical Processes of Flavins and Enzymes Using Time-Resolved Laser Spectroscopy. **Maria N. Polychronaki**, Maria Pigiaki, Nikos S. Hatzakis, Demetrios Anglos, Panagiotis A. Loukakos. 1 st Symposium of Graduate Students of the Chemistry Department, NKUA "Chemistry and its Applications", 17-18/03/2022, Athens, Greece.
- Ultrafast Dynamics of Firefly d-Luciferin. Maria Pigiaki, **Maria N. Polychronaki**, Athanassios G. Coutsolelos, Panagiotis A. Loukakos. 1 st Symposium of Graduate Students of the Chemistry Department, NKUA "Chemistry and its Applications", 17-18/03/2022, Athens, Greece.
- Ultrafast Time-Resolved Spectroscopy for Analysis of Flavins FMN and FAD, Cofactors of Cytochrome P450 Oxidoreductase. **M. Polychronaki**, D. Karanikolopoulos, N. S. Hatzakis, D. Anglos and P. A. Loukakos. 12th Scientific Conference of Foundation for Research and Technology-Hellas (FORTH), 15-16/10/2019, Patra, Greece.
- Application of the Ultrafast Time-Resolved Laser Spectroscopy to the Cofactors of the Cytochrome P450 Oxidoreductase. **M. Polychronaki**, D. Karanikolopoulos, N. S. Hatzakis and P. A. Loukakos. 21st Postgraduates' Conference on Chemistry, 15-17/05/2019, Heraklion, Greece.
- Remote LIBS for Assessing the Condition of Field-Aged Composite HV Outdoor Insulators. O.Kokkinaki, A. Klini, **M.Polychronaki**, N.Mavrikakis, K. Siderakis, E. Koudoumas, D. Pylarinos, E. Thalassinakis, C. Kalpouzou, D. Anglos. 10th International Conference on Instrumental Methods of Analysis: Modern Trends and Applications (IMA - 2017), 17-21/09/ 2017, Heraklion, Greece.

ΠΕΡΙΛΗΨΗ

Τα διάτομα είναι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί, οι οποίοι συμβάλλουν στην ελάττωση του διοξειδίου του άνθρακα της ατμόσφαιρας και στην αύξηση της συγκέντρωσης του οξυγόνου. Ο οργανικός άνθρακας που παράγουν αποτελεί τροφή για τους θαλάσσιους οργανισμούς.

Η εκκίνηση της διαδικασίας της φωτοσύνθεσης των διατόμων πραγματοποιείται μέσω των πρωτεϊνών φουκοξανθίνης χλωροφύλλης (FCPs), οι οποίες είναι υπεύθυνες για τη συλλογή της ηλιακής ακτινοβολίας. Τα FCPs διαθέτουν ως χρωμοφόρα τα καροτενοειδή φουκοξανθίνη (Fx), διαδινοξανθίνη (Ddx) και διατινοξανθίνη (Dtx) και τις χλωροφύλλες τύπου a και τύπου c (Chl-a, Chl-c). Η συλλεγόμενη ακτινοβολία καταλήγει μέσω διεργασιών μεταφοράς ενέργειας στις χλωροφύλλες τύπου a και από αυτές στο κέντρο αντίδρασης, όπου πραγματοποιούνται οι αντιδράσεις της φωτοσύνθεσης. Ο ρόλος της διαδινοξανθίνης και διατινοξανθίνης είναι η προστασία των FCPs από την υψηλής έντασης ηλιακή ακτινοβολία.

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν FCPs, που απομονώθηκαν από τα διάτομα *Fragilariopsis sp.* και *Phaeodactylum tricornutum*, με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ (Ultrafast Time-Resolved Laser Spectroscopy). Η συγκεκριμένη τεχνική επιτυγχάνει, με την χρήση παλμού λέιζερ, τη διέγερση των FCPs σε εξαιρετικά μικρό χρονικό διάστημα (30×10^{-15} s). Ο βραχύς χρόνος διαταραχής του συστήματος επιτρέπει την ανίχνευση και φασματοσκοπική παρακολούθηση υπερταχειών διεργασιών οι οποίες επιφέρουν μεταβολές στα φάσματα απορρόφησης. Πιο συγκεκριμένα, στην παρούσα μελέτη, για τη διέγερση των FCPs χρησιμοποιήθηκαν παλμοί λέιζερ, μήκους κύματος $\lambda = 395$ nm, οι οποίοι προκάλεσαν διέγερση όλων των χρωστικών που εμπεριέχονται στις πρωτεΐνες, στην ηλεκτρονιακή τους κατάσταση S_2 .

Προκειμένου να εξετάσουμε εάν οι συνθήκες ανάπτυξης των FCPs επηρεάζουν την σύσταση και τη λειτουργία τους, τα FCPs του *Fragilariopsis sp.* αναπτύχθηκαν σε συνθήκες υψηλής και χαμηλής έντασης λευκού φωτός, καθώς και ερυθρού φωτός. Αντίστοιχα, τα FCPs του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum* αναπτύχθηκαν σε συνθήκες χαμηλής έντασης λευκού φωτός και ερυθρού φωτός. Η ανάπτυξη των FCPs σε συνθήκες χαμηλής έντασης λευκού φωτός προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των διατόμων στη φύση, ενώ η ανάπτυξη σε υψηλής έντασης λευκό φως και σε ερυθρό φως επιλέχθηκε ως ακραία συνθήκη ανάπτυξης του οργανισμού.

Η μελέτη των φωτοφυσικών διεργασιών δυο ειδών FCPs, του κλάσματος 1 και του κλάσματος 3, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp.* που είχε αναπτυχθεί σε χαμηλής έντασης λευκό φως, απέδωσε διαφορετικούς μηχανισμούς λειτουργίας για τα δύο είδη. Τα FCPs του κλάσματος 3 χαρακτηρίζονται ως τυπικά FCPs, καθώς διαθέτουν ως κύριες χρωστικές την Fx, την Chl-a και την Chl-c. Η δυναμική των FCPs του κλάσματος 3 χαρακτηρίζεται από δυο χρόνους ζωής, $\tau = 1.9 \pm 0.05$ ps και $\tau = 61 \pm 2$ ps, εκ των οποίων ο πρώτος αποδίδεται στην δονητικά διεγερμένη κατάσταση S_1 (hot S_1) της Fx και ο δεύτερος στην κατάσταση S_1 της Fx. Τα FCPs του κλάσματος 1 περιέχουν τις ενώσεις Fx, Ddx και το χλωροφυλλίδιο-a (Chlide-a). Η δυναμική των FCPs του κλάσματος 1 περιγράφεται από τρεις χρόνους ζωής, $\tau = 0.7 \pm 0.02$ ps, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps και $\tau = 77 \pm 20.9$ ps. Ο πρώτος χρόνος ζωής αποδίδεται στα δονητικά διεγερμένα επίπεδα των καταστάσεων S_1 (hot S_1) της Ddx και της Fx, ο δεύτερος χρόνος οφείλεται στην κατάσταση S_1 της Ddx και ο τρίτος χρόνος αποδίδεται στην μεταφορά ενέργειας από την Fx στο Chlide-a και στην κατάσταση S_1 της Fx.

Οι διαφορές των μηχανισμών λειτουργίας των δυο ειδών FCPs αποδίδονται στον διαφορετικό ρόλο που έχουν στο διάτομο *Fragilariopsis sp.* Τα FCPs του κλάσματος 1 πραγματοποιούν μεταφορά ενέργειας από την Fx στο Chlide-a, όταν διεγερθούν μέσω του παλμού άντλησης σε $\lambda = 395$ nm, ενώ τα FCPs του κλάσματος 3 δεν επιτελούν την αντίστοιχη διεργασία. Συνεπώς, εξάγεται το συμπέρασμα ότι, ενδεχομένως, τα FCPs του κλάσματος 1 συμμετέχουν στην προστασία του διατόμου από ακτινοβολία υψηλής ενέργειας βοηθούμενα από την παρουσία της Ddx που διαθέτουν και, παράλληλα, πραγματοποιώντας διεργασίες μεταφοράς ενέργειας. Αντίθετα, ο ρόλος των FCPs του κλάσματος 3 δεν ήταν δυνατό να αποσαφηνιστεί στην παρούσα εργασία, καθώς δεν συλλέχθηκαν επαρκείς πληροφορίες.

Τα FCPs του κλάσματος 1, που απομονώθηκαν από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* και αναπτύχθηκαν στις ίδιες συνθήκες, παρουσίασαν παρόμοιο μηχανισμό λειτουργίας με τα FCPs του κλάσματος 1, του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* Από το γεγονός αυτό, συμπεραίνουμε ότι υπηρετούν τον αντίστοιχο προστατευτικό ρόλο στο διάτομο, καθώς και ότι λειτουργία των FCPs είναι ίδια και ανεξάρτητη του οργανισμού προέλευσης.

Η χρήση λευκού φωτός υψηλής έντασης για την ανάπτυξη του διατόμου *Fragilariopsis sp.* μετέβαλε τη σύσταση των χρωστικών των FCPs του κλάσματος 1 και του κλάσματος 3. Τα FCPs του κλάσματος 1 περιείχαν τις χρωστικές Fx, Ddx, Chlide-a και Dtx, ενώ τα FCPs του κλάσματος 3 διέθεταν την Fx, την Chl-a, την Chl-c, το Chlide-a και το Ddx. Η μελέτη των φωτοφυσικών

διεργασιών των τροποποιημένων FCPs έδειξε ότι οι αλλαγές στην σύσταση δεν επηρεάζουν την λειτουργία των FCPs. Η ανάπτυξη των διατόμων *Fragilariopsis sp.* και *Phaeodactylum tricornutum* σε ερυθρό φως δεν μετέβαλε τη σύσταση των FCPs του κλάσματος 1, που απομονώθηκαν από τα δυο διατόμα και δεν επηρέασε το μηχανισμό λειτουργίας τους. Αντίθετα, η σύσταση των FCPs του κλάσματος 3, που απομονώθηκαν από το διάτομο *Fragilariopsis sp.*, διαφοροποιήθηκε με την εμφάνιση του Chlide-a. Η παρουσία του Chlide-a, ωστόσο, δεν επηρέασε τον μηχανισμό λειτουργίας των FCPs.

Τα αποτελέσματα της παρούσας μελέτης συντέλεσαν στην εξαγωγή συμπερασμάτων σχετικά με το ρόλο των δυο ειδών FCPs, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp.* Επιπλέον, λήφθηκαν πληροφορίες σχετικά με την συνεισφορά δυο παραγόντων στην λειτουργία των FCPs, του οργανισμού προέλευσης και των συνθηκών του φωτός ανάπτυξης. Οι πληροφορίες που λήφθηκαν απαιτούν περαιτέρω διερεύνηση με, ταυτόχρονη, βελτιστοποίηση των τεχνικών για την συλλογή των δεδομένων. Τα συμπεράσματα που εξήχθησαν από την παρούσα μελέτη δύνανται να συνεισφέρουν στην ανάπτυξη του τομέα της βιοτεχνολογίας και της κατασκευής φωτοβολταϊκών συστημάτων, καθώς τα διάτομα και τα FCPs βρίσκουν εφαρμογή στους συγκεκριμένους τομείς έρευνας.

Λέξεις κλειδιά: Υπετραχεία Χρονοαναλυόμενη Φασματοσκοπία Λέιζερ, Global Ανάλυση, Φωτοφυσικές Διεργασίες, Διάτομα, *Phaeodactylum tricornutum*, *Fragilariopsis sp.*, Πρωτεΐνες Φουκοξανθίνης Χλωροφύλλης, FCPs.

ABSTRACT

Diatoms are photosynthetic organisms that play a vital role in reducing the concentration of carbon dioxide and increasing the concentration of oxygen in the atmosphere. The organic carbon they generate serves as a food source for various marine organisms.

The process of photosynthesis in diatoms is initiated by the involvement of Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins (FCPs), which are responsible for the absorption of solar radiation. FCPs include carotenoids, such as Fucoxanthin (Fx), Diadinoxanthin (Ddx) and Diatoxanthin (Dtx), as well as type-a and type-c Chlorophylls (Chl-a, Chl-c). The absorbed radiation is directed towards Chl-a via energy transfer mechanisms and is subsequently directed to the reaction center, where photosynthesis reactions occur. Diadinoxanthin and diatoxanthin play a protective role, shielding FCPs from the potentially damaging intensity of solar radiation.

In the context of the present study, we investigated the photophysical and photochemical processes of FCPs isolated from two types of diatoms, *Fragilariopsis sp.* and *Phaeodactylum tricornutum*, using Ultrafast Time-Resolved Laser Spectroscopy. The key feature of this technique is the utilization of an ultrashort pump pulse (30×10^{-15} s) to excite the FCPs. The brief duration of the system's perturbation enables the observation of ultrafast kinetic processes by probing changes in the absorption spectrum. The pump pulse is centered at $\lambda = 395$ nm and results in excitation of the FCP chromophores to their second electronically excited state, S_2 .

To investigate the influence of the diatom growth conditions on the composition and function of the FCPs, the FCPs from *Fragilariopsis sp.* were cultivated with exposure to high- and low-intensity white light, as well as red light. Similarly, the FCPs from *Phaeodactylum tricornutum* were cultivated under low-intensity white light and red light. The cultivation of diatoms under low-intensity white light simulates the natural growth conditions, while the growth of FCPs under high-intensity white light and red light mimics extreme developmental conditions.

Examining the photophysical processes of two FCP types (Fraction 1 and Fraction 3) isolated from the *Fragilariopsis sp.* cultivated under low-intensity white light revealed two distinct photophysical mechanisms. FCPs of Fraction 3, containing mainly Fx, Chl-a, and Chl-c, exhibit characteristic lifetimes: $\tau = 1.9 \pm 0.05$ ps and $\tau = 61 \pm 2$ ps. The former corresponds to the hot S_1 state of Fx, while the latter corresponds to the S_1 state of Fx. Fraction 1 FCPs, comprising Fx, Ddx, and Chlorophyllide a (Chlide-a), demonstrate lifetimes of $\tau = 0.7 \pm 0.02$ ps, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps, and

$\tau = 77 \pm 20.9$ ps. The first corresponds to the hot S_1 state of Fx and the hot S_1 state of Ddx, the second to the S_1 state of Ddx, and the third to the energy transfer process taking place from Fx to Ddx and the S_1 state of Fx.

The distinction in mechanisms of operation arises from the role the FCPs play in the diatom *Fragilariopsis sp.* The FCPs of Fraction 1 facilitate energy transfer from Fx to Chlide-a (Protochlorophyllide-a) upon excitation by the pump pulse ($\lambda = 395$ nm), whereas the FCPs of Fraction 3 do not engage in this photophysical process. Consequently, it is hypothesized that the FCPs of Fraction 1 contribute to diatom protection against high intensity illumination via conducting energy transfer processes based on the presence of Ddx. The role of the FCPs of Fraction 3 was not elucidated because of inadequate resolution of the spectral-kinetic information that was collected.

The FCPs of Fraction 1, isolated from the *Phaeodactylum tricornutum* diatom, cultivated under low-intensity white light, exhibit a comparable mechanism of operation to that of the FCPs from Fraction 1 isolated from the *Fragilariopsis sp.* diatom. As a result, it is hypothesized that the FCPs of Fraction 1 once again play a role in diatom protection, indicating that the mechanism of operation of FCPs remains independent of the protein's origin.

The utilization of high-intensity white light to cultivate *Fragilariopsis sp.* induces changes in the composition of FCPs Fraction 1 and Fraction 3. FCPs of Fraction 1 were found to contain Fx, Ddx, Chlide-a and Dtx, while FCPs of Fraction 3 contain Fx, Chl-a, Chl-c, Chlide-a, and Ddx. The study of the modified FCPs indicates that the alterations in the composition do not affect their mechanism of operation. The cultivation of *Fragilariopsis sp.* and *Phaeodactylum tricornutum* with red light does not disturb the structure of FCPs of Fraction 1, thus the mechanism of operation remains unaffected. In contrast, the configuration of FCPs of Fraction 3 transforms due to the presence of Chlide-a, yet, this does not influence the mechanism of operation of the FCPs.

The results of this study have contributed to drawing conclusions regarding the roles of the two types of FCPs isolated from the diatom *Fragilariopsis sp.* Moreover, insights into the impact of origin and cultivation conditions on the mechanism of operation of FCPs have been obtained. The acquired information requires further investigation, and the technique needs to be optimized to achieve higher quality data. The conclusions drawn from this study are anticipated to make

contributions for further progress in the field of biotechnology, as well as the design of solar systems, as diatoms and FCPs find application in these research domains.

Keywords: Transient Absorption Spectroscopy, Global Analysis, Photophysical Processes, Diatoms, *Phaeodactylum tricornutum*, *Fragilariopsis sp.*, Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins, FCPs.

Περιεχόμενα

ΕΞΕΤΑΣΤΙΚΗ ΕΠΙΤΡΟΠΗ	4
ΕΥΧΑΡΙΣΤΙΕΣ	5
ΒΙΟΓΡΑΦΙΚΟ ΣΗΜΕΙΩΜΑ	7
CURRICULUM VITAE	9
ΠΕΡΙΛΗΨΗ	11
ABSTRACT	14
ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ	19
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1	20
<i>Χρονοαναλυόμενη Υπερταχεία Φασματοσκοπία Λείζερ</i>	20
1.1 Εισαγωγή	20
1.2 Ιστορική Αναδρομή	21
1.3 Βασική Αρχή Λειτουργίας Υπερταχείας Χρονοαναλυόμενης Φασματοσκοπίας Λείζερ	23
1.4 Παλμός «Probe»	25
1.4.1 Αυτοδιαμόρφωση Φάσης (Self-Phase Modulation-SPM)	26
1.5 Παλμός «Pump»	28
1.5.1 Γένεση Δεύτερης Αρμονικής	28
1.6 Καταγραφόμενο σήμα.....	30
1.7 Βιβλιογραφία	33
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2	35
<i>Θεωρητικό Υπόβαθρο Πρωτεϊνών Φουκοξανθίνης-Χλωροφύλλης (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins-FCPs)</i>	35
2.1 Ιστορική Αναδρομή των Διατόμων	35
2.2 Δομή, Αναπαραγωγή και Λειτουργία Διατόμων	36
2.2.1 <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	39
2.2.2 <i>Fragilariopsis sp.</i>	40
2.3 Πρωτεΐνες Φουκοξανθίνης Χλωροφύλλης (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins-FCPs)	40
2.3.1 Χλωροφύλλες.....	42
2.3.2 Φουκοξανθίνη (Fucoxanthin).....	46
2.3.3 Διαδινοξανθίνη και Διατινοξανθίνη (Diadinoxanthin and Diatoxanthin)	49

2.4 Φασματοσκοπική μελέτη των Πρωτεϊνών Φουκοξανθίνης Χλωροφύλλης (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins FCPs)	52
2.5 Βιβλιογραφία	56
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3	59
<i>Πειραματική Διαδικασία, Οργανολογία και Μέθοδος Ανάλυσης</i>	59
3.1 Πειραματική Διαδικασία.....	59
3.2 Πειραματική Διάταξη της Τεχνικής Χρονοαναλυόμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ	60
3.2.1 Λείζερ	61
3.2.2 Φασματογράφος Andor Shamrock SR-303i	71
3.2.3 Ανιχνευτής CCD Newton	72
3.3 Τυπική Μέτρηση με την Τεχνική της Χρονοαναλυόμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ	74
3.4 Προεπεξεργασία Δισδιάστατων Απεικονίσεων Χρονοαναλυόμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ	75
3.5 Μέθοδος Ανάλυσης Δεδομένων	80
3.5.1 Global Analysis.....	83
3.6 Βιβλιογραφία	86
ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4	88
<i>Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων</i>	88
4.1 Υπερταχεία δυναμική των FCPs του κλάσματος 3, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό <i>Fragilariopsis sp</i>	88
4.2 Υπερταχεία δυναμική των FCPs του κλάσματος 1, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό <i>Fragilariopsis sp</i>	101
4.3 Υπερταχεία δυναμική των FCPs του κλάσματος 1 που απομονώθηκαν από τον οργανισμό <i>Phaeodactylum tricornutum</i>	114
4.4 Σύγκριση των δυναμικών διεργασιών των διαφορετικών ειδών FCPs.....	120
4.5 Βιβλιογραφία	123
ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ	125

ΣΥΝΤΟΜΟΓΡΑΦΙΕΣ

FCPs: Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins

IVR: Internal Vibrational Relaxation

OD: Optical Density

GVD: Group Velocity Dispersion

Fx: Fucoxanthin

Fx_{blue}: Blue Fucoxanthin

Fx_{green}: Green Fucoxanthin

Fx_{red}: Red Fucoxanthin

Ddx: Diadinoxanthin

Dtx: Diatoxanthin

Chl-a: Chlorophyll-a

Chl-c: Chlorophyll-c

PChlide: Protochlorophyllide

Chlide: Chlorophyllide

NPQ: Nonphotochemical Quenching
System

GSB: Ground State Bleaching

SE: Stimulated Emission

ESA: Excited-State Absorption

ICT: Internal (Intramolecular) Charge
Transfer

HPLC: High Performance Liquid
Chromatography

Tric: *Phaeodactylum tricornutum*

Frag: *Fragilariopsis sp.*

LL: Low Light

HL: High Light

RL: Red Light

BBO: Beta Borium Borate Crystal

LED: Light Emitting Diode

CCD: Charged-Coupled Device

MOS: Metal Oxide Semiconductor

FWHM: Full Width at Half Maximum

IRF: Instrument Response Function

SVD: Singular Value Decomposition

SSE: Sum Squares Errors

EADS: Evolution – Associated Difference
Spectra

DADS: Decay Associated Difference
Spectra

μs: microsecond

ns: nanosecond

ps: picosecond

fs: femtosecond

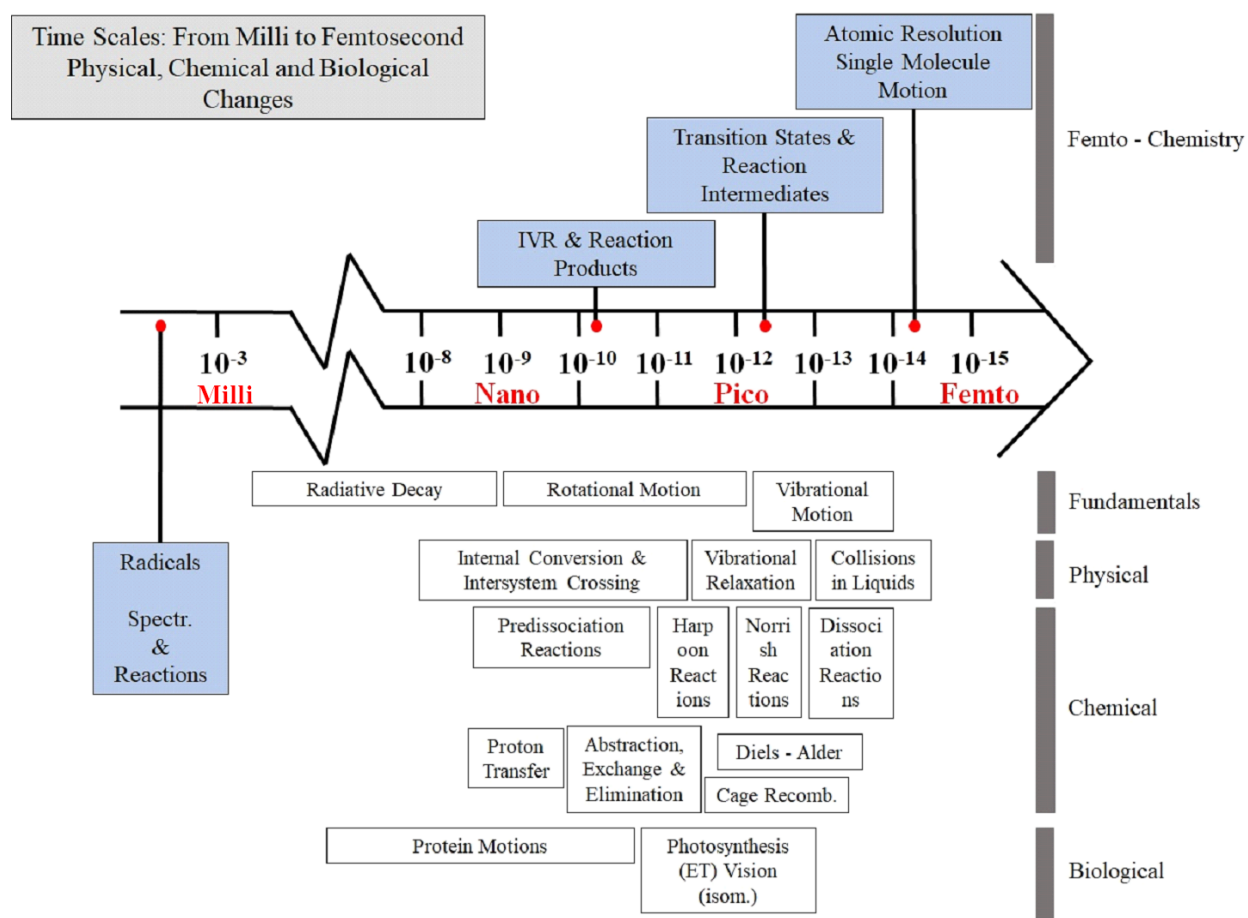
as: attosecond

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 1

Χρονοαναλύσιμη Υπερταχεία Φασματοσκοπία Λείζερ

1.1 Εισαγωγή

Ως φασματοσκοπία ορίζεται η μελέτη της αλληλεπίδρασης του φωτός (ηλεκτρομαγνητικής ακτινοβολίας) με την ύλη. Η απορρόφηση φωτός οδηγεί στο σχηματισμό διεγερμένων καταστάσεων και ενεργών ενδιάμεσων, του υπό μελέτη συστήματος, οι οποίες μελετώνται μέσω δυο διαφορετικών προσεγγίσεων: τη στατική και τη χρονοαναλύσιμη φασματοσκοπία. Η στατική φασματοσκοπία επιτρέπει την καταγραφή του φάσματος απορρόφησης/ φθορισμού των φωτοενεργών ειδών και προσδιορισμό της ενεργειακής διαφοράς μεταξύ θεμελιώδους και διεγερμένων καταστάσεων και της πιθανότητας απορρόφησης του φωτός, δεν προσφέρεται, ωστόσο, για την καταγραφή κινητικών διαδικασιών οι οποίες είναι ταχείες ή υπερταχείες. Η συνεχής ακτινοβολία του συστήματος οδηγεί σε ισορροπία μεταξύ των διαδικασιών διέγερσης και αποδιέγερσης, οδηγώντας το σύστημα σε στάσιμη κατάσταση (steady state) στην οποία κυριαρχεί η θεμελιώδης κατάσταση και κατά συνέπεια λαμβάνονται φασματικές μετρήσεις που αντανakλούν τη συγκέντρωση αυτής. Στη χρονοαναλύσιμη φασματοσκοπία, μικρής διάρκειας διέγερση, του υπό μελέτη συστήματος, παράγει τις διεγερμένες καταστάσεις, των οποίων η χρονική εξέλιξη καταγράφεται με την πάροδο του χρόνου. Η καταγραφή των κινητικών διαδικασιών είναι εφικτή καθώς η διέγερση υφίσταται μόνο «στιγμιαία». Συνεπώς, με τη χρονοαναλύσιμη φασματοσκοπία είναι δυνατή η καταγραφή του φάσματος απορρόφησης των διεγερμένων ειδών και ο προσδιορισμός των σταθερών ταχύτητας των διεργασιών στις οποίες αυτά συμμετέχουν. Τέτοιες διεργασίες αφορούν ενδιάμεσες καταστάσεις φωτοχημικών αντιδράσεων, μεταφορά φορτίου ή ηλεκτρονίου, διαμορφωτικές αλλαγές μορίων, εκπομπή φθορισμού ή φωσφορισμού κ.α. Απαραίτητη προϋπόθεση για την καταγραφή των κινητικών φαινομένων είναι η χρήση παλμών χρονικά μικρότερων από την προς μελέτη κινητική [1], [2].



Σχήμα 1.1: Χρονική κλίμακα και πεδίο δράσης των υπερταχείων φαινομένων στη φυσική, τη χημεία και τη βιολογία. Άνωθεν της κλίμακας αναφέρονται τα θεμελιώδη στοιχεία για τη δυναμική του χημικού δεσμού (ενδομοριακή δονητική χαλάρωση (IVR), μεταβατικά επίπεδα, και η κίνηση μεμονωμένου μορίου). Κάτωθεν της κλίμακας παρουσιάζονται οι περιστροφικές και οι δονητικές κινήσεις, καθώς και παραδείγματα μελετών φυσικών, χημικών και βιολογικών διεργασιών [3].

1.2 Ιστορική Αναδρομή

Στα τέλη του 19^{ου} αιώνα, άρχισε να απασχολεί την επιστημονική κοινότητα η έννοια της χρονικής ανάλυσης. Οι πρώτες πληροφορίες σχετικά με την κλίμακα των σταθερών ταχύτητας των αντιδράσεων δόθηκαν από τον Arrhenius (1889) [4], ενώ σημαντική ήταν και η συνεισφορά των Eyring και M. Polanyi (1931) [5]. Συστηματικές μελέτες των σταθερών (ή συντελεστών) ταχύτητας αντιδράσεων ήταν δύσκολο να πραγματοποιηθούν έως τα μέσα του 19^{ου} αιώνα. Η πρώτη μέτρηση σταθεράς ταχύτητας έγινε από τον L. Wilhelmy (1850), ο οποίος κατάφερε να μετρήσει ποσοτικά τη σταθερά ταχύτητας της αντίδρασης υδρόλυσης διαλύματος σακχαρόζης σε γλυκόζη και φρουκτόζη [6]. Το 1901 δόθηκε το βραβείο Nobel στον van't Hoff για τις θεωρητικές

εκφράσεις του σχετικά με τη χημική δυναμική [7], ενώ βραβείο Nobel έλαβε και ο Arrhenius το 1903.

Την ίδια περίοδο γίνεται η πρώτη αναφορά στη σημασία του συγχρονισμού σε πειράματα τύπου pump-probe. Συγκεκριμένα, το 1899 ο Abraham και ο Lemoine πραγματοποίησαν ένα «έξυπνο» πείραμα, κατά το οποίο ρύθμισαν τις χρονικές καθυστερήσεις με χρήση μιας μεταβλητής οδού για το φως [8].

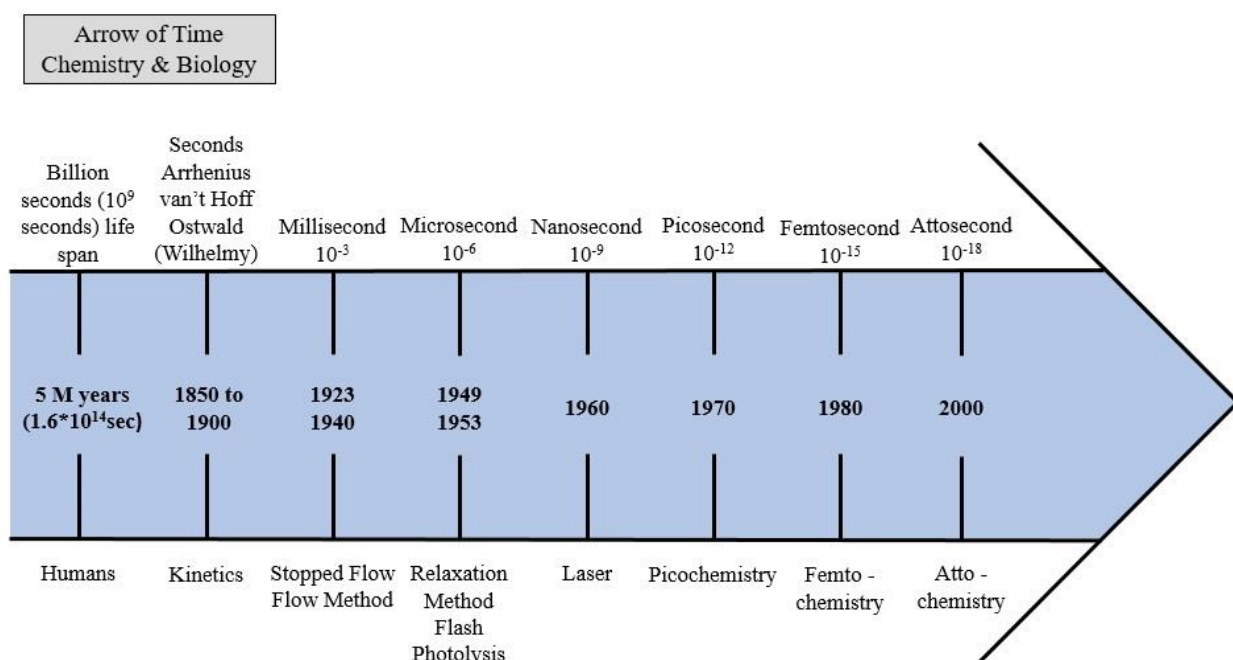
Ο M. Eigen [9], από τη Γερμανία, και οι R. G. W. Norrish και G. Porter [10], από την Αγγλία, το 1950, ανέπτυξαν τεχνικές που επέτρεπαν τη διεξαγωγή φασματοσκοπικών μετρήσεων σε χρονική κλίμακα μικρο-δευτερολέπτων (μs) και για τις εργασίες αυτές τους απονεμήθηκε το βραβείο Nobel το 1967. Ο Eigen ανέπτυξε τη «μέθοδο χαλάρωσης» (relaxation method), η οποία κυμαινόταν στην κλίμακα του χρόνου από μικρο-δευτερόλεπτα (μs) έως νανο-δευτερόλεπτα (ns). Η βασική αρχή της μεθόδου ήταν η διατάραξη της ισορροπίας του διαλύματος τη χρονική στιγμή $t = 0 \text{ s}$ και έπειτα η καταγραφή της κινητικής, έως ότου το σύστημα επιστρέψει σε ισορροπία.

Η ανάπτυξη του πρώτου λέιζερ ρουμπινίου, το 1960, από τον Maiman άνοιξε νέους δρόμους για την ανάπτυξη της χρονικής διακριτικής ικανότητας [11]. Η ανάπτυξη παλμικών πηγών λέιζερ έγινε δυνατή, το 1961, από τον Hellwarth [12], αν και με μεγάλη διάρκεια παλμού, εν συγκρίσει με τα σημερινά δεδομένα (παλμοί με χρονική διάρκεια νανο-δευτερολέπτων (ns)). Παλμοί λέιζερ μικρής χρονικής διάρκειας δημιουργήθηκαν το 1966 από τον De Maria (χρονική διάρκεια πικο-δευτερολέπτων (ps)) [13]. Το 1974 ο C. Shank και ο E. Ippen παρήγαγαν παλμούς διάρκειας μικρότερης από 1 ps από λέιζερ χρωστικών [14]. Ο πρώτος παλμός λέιζερ με διάρκεια 6 φεμτο-δευτερολέπτων (fs) δημιουργήθηκε το 1987. Αξιοσημείωτη είναι η παραγωγή παλμών λέιζερ με διάρκεια φεμτο-δευτερολέπτων (fs) με χρήση λέιζερ στερεάς κατάστασης, το 1991 από τον Sibbett [15]. Ο παλμός λέιζερ, της τάξης των φεμτο-δευτερολέπτων, μικρότερης χρονικής διάρκειας, που έχει καταγραφεί, είναι 4 φεμτο-δευτερόλεπτα (fs) και κατέχει μία θέση στο βιβλίο παγκοσμίων ρεκόρ Guinness (D. Wiersma) [16].

Τα όρια της διακριτικής ικανότητας για τη μελέτη υπερταχειών διεργασιών μειώθηκαν στην τάξη των φεμτο-δευτερόλεπτων (fs) χάρη στην ανάπτυξη των λέιζερ, γεγονός που έδωσε, το 1999, το βραβείο Nobel στον A. H. Zewail [3].

Η πρώτη καταγραφή τρένων παλμών χρονικής διάρκειας υπο-φεμτο-δευτερόλεπτων έγινε το 1999 από το Ν. Παπαδογιάννη και τους συνεργάτες του (ΙΗΔΛ-ΙΤΕ και Πανεπιστήμιο Κρήτης)

ενώ η παραγωγή μεμονωμένων παλμών διάρκειας 650 αττο-δευτερολέπτων (as) πραγματοποιήθηκε, το 2001, από τον Hentschel (Σχ. 1.2) [17], [18].

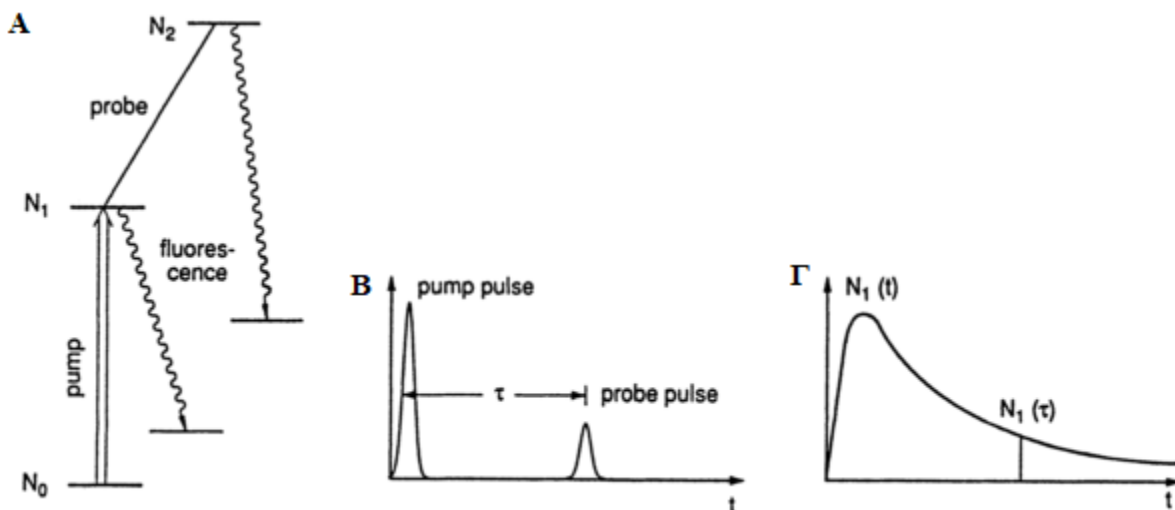


Σχήμα 1.2: Το βέλος του χρόνου με σημαντικά γεγονότα στην ανάπτυξη της χρονικής διακριτικής ικανότητας [3].

1.3 Βασική Αρχή Λειτουργίας Υπερταχείας Χρονοαλυόμενης Φασματοσκοπίας Λείζερ

Στη φασματοσκοπία η χρονική ανάλυση, για την παρακολούθηση υπερταχειών φαινομένων, πραγματοποιείται με χρήση παλμών λέιζερ με διάρκεια μικρότερη από το συνολικό χρόνο πραγματοποίησης του φαινομένου. Η τεχνική της υπερταχείας χρονοαλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ βασίζεται στη χρήση δυο παλμών λέιζερ, του παλμού άντλησης (pump) και του παλμού ανίχνευσης (probe). Ο παλμός άντλησης προκαλεί τη διαταραχή του δείγματος (διέγερση των μορίων) ενώ ο παλμός ανίχνευσης καταφθάνει στο δείγμα με χρονική καθυστέρηση, ως προς τον παλμό άντλησης, επιτρέποντας την καταγραφή της μεταβολής στην απορρόφηση, που προκλήθηκε από τη διέγερση [1], [19]. Σε ένα τυχαίο σύστημα κατά την διέγερση με τον παλμό άντλησης ένας αριθμός μορίων εγκαταλείπουν τη θεμελιώδη κατάσταση και μεταφέρονται σε μια διεγερμένη. Κατά συνέπεια η συγκέντρωση της θεμελιώδους κατάστασης μειώνεται, οδηγώντας σε αντίστοιχη μείωση του σήματος στο φάσμα απορρόφησης. Αντίστοιχα,

η αύξηση του πληθυσμού στη διεγερμένη κατάσταση οδηγεί σε αύξηση του σήματος στο φάσμα απορρόφησης, το οποίο με την πάροδο του χρόνου φθίνει λόγω της αποδιέγερσης των μορίων.



Σχήμα 1.3: Α) Ενεργειακές μεταβολές που προκαλούνται από τους παλμούς pump και probe, για παράδειγμα σε ένα τυχαίο δείγμα. Β) Χρονική καθυστέρηση μεταξύ παλμού pump και παλμού probe. Γ) Μεταβολή της πυκνότητας πληθυσμού της διεγερμένης κατάστασης με το χρόνο [19].

Η μεταβολή της οπτικής πυκνότητας (optical density-OD, ισοδύναμη της χρονοανεξάρτητης απορρόφησης) έχει ως αποτέλεσμα την εμφάνιση νέων μεταβάσεων ή την εξαφάνιση προϋπαρχουσών. Η χρονική ανάλυση παρέχει πληροφορίες σχετικά με την δυναμική των αλλαγών αυτών.

Ο ανιχνευτής καταγράφει την ένταση του παλμού probe πριν ($I_0(\nu)$) και μετά ($I(\nu, \Delta t)$) τη διαταραχή του συστήματος. Με βάση το νόμο του Beer-Lambert:

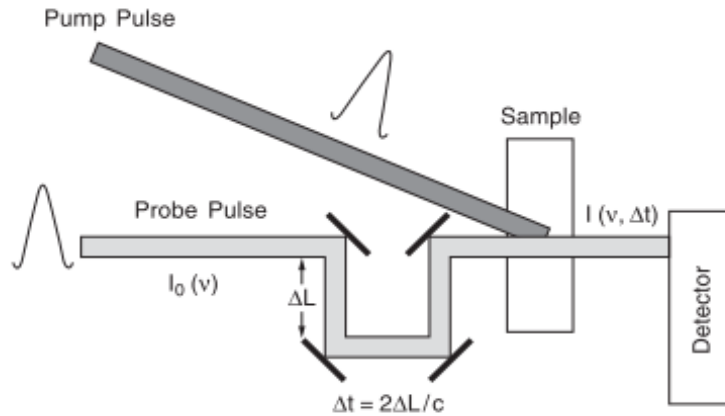
$$I(\nu, \Delta t) = I_0(\nu) * 10^{-\epsilon_\nu N(\Delta t)l} \quad (1.1)$$

Όπου ϵ_ν είναι ο συντελεστής απορροφητικότητας του δείγματος σε συχνότητα ν , $N(\Delta t)$ ο πληθυσμός που απορροφάει σε χρόνο Δt και συχνότητα ν και l η οπτική διαδρομή (το μήκος του δείγματος που διεγείρεται). Η οπτική πυκνότητα OD, δίνεται από τη σχέση:

$$OD(\nu, \Delta t) = \log \frac{I_0(\nu)}{I(\nu, \Delta t)} = \epsilon_\nu N(\Delta t)l \quad (1.2)$$

Στη σχέση (1.2) φαίνεται η εξάρτηση της οπτικής πυκνότητας από την συχνότητα (ν), καθώς και από τη μεταβολή του χρόνου (Δt). Η συσχέτιση αυτή επιτρέπει την ταυτόχρονη καταγραφή των φασμάτων σε διαφορετικές χρονικές στιγμές και των κινητικών συμπεριφορών του συστήματος σε διαφορετικά μήκη κύματος.

Μεταβολή της χρονικής καθυστέρησης μεταξύ των δύο παλμών αποδίδει την χρονοεξαρτώμενη μεταβολή της απορροφητικότητας. Ο παλμός άντλησης είναι μεγαλύτερης έντασης ώστε να προκαλέσει μετρήσιμη διέγερση του δείγματος, εν αντιθέσει με τον παλμό ανίχνευσης για τον οποίο επιδιώκεται μικρή ένταση δέσμης, ώστε να επηρεάσει όσο το δυνατό λιγότερο το δείγμα.



Σχήμα 1.4: Σχηματική αναπαράσταση της τεχνικής pump-probe. Παλμός «άντλησης» (pump) (σκούρο γκρι) και ο χρονικώς καθυστερημένος παλμός «ανίχνευσης» (probe) (ανοιχτό γκρι) [1].

Η μεταβολή που προκαλεί ο παλμός pump στο δείγμα μπορεί να αναλυθεί με δυο τρόπους με τη βοήθεια του παλμού probe: 1) συγκρίνοντας τα χαρακτηριστικά του παλμού probe (ένταση, φάση, διάνυσμα κύματος) αφού διέλθει από το δείγμα, πριν και μετά τη δράση του παλμού pump (τεχνική απορρόφησης με βάση το χρόνο) και 2) παρατηρώντας τυχόν νέες μεταβολές που προκαλούνται από τον παλμό probe πριν και μετά την επίδραση του παλμού pump (τεχνική σκέδασης Raman, τεχνική φθορισμού επαγόμενου από λέιζερ (LIF), κλπ) [1].

1.4 Παλμός «Probe»

Το φασματικό εύρος του παλμού probe ποικίλει από ευρύ σε μονοχρωματικό. Οι παλμοί probe μεγάλου φασματικού εύρους χρησιμοποιούνται στις περιπτώσεις που δεν είναι γνωστή η ακριβής περιοχή απορρόφησης του συστήματος. Η παραγωγή των παλμών probe μεγάλου φασματικού εύρους λαμβάνονται: 1) από τη παραγωγή υπερσυνεχούς λευκού φωτός (white light super continuum generation) με εστίαση ενός παλμού υψηλής ισχύος σε ένα οπτικό μέσο (υγρό, γυαλί, κλπ) προκαλώντας την φυσική διεργασία της αυτοδιαμόρφωσης φάσης (self-phase modulation-SPM) και 2) από τη χρήση ευρυφασματικού λέιζερ χρωστικών (broadband laser)

μέσω ενισχυμένης αυθόρμητης εκπομπής (amplified spontaneous emission-ASE). Το φασματικό εύρος της ενισχυμένης αυθόρμητης εκπομπής είναι μικρότερο σε σχέση με εκείνο του υπερσυνεχούς λευκού φωτός, αλλά εμφανίζει υψηλότερη ένταση. Στην περίπτωση της γένεσης ενισχυμένης αυθόρμητης εκπομπής, το σχήμα και η διάρκεια των παλμών probe που προκύπτουν, επηρεάζεται σημαντικά από τις συνθήκες άντλησης [1].

1.4.1 Αυτοδιαμόρφωση Φάσης (Self-Phase Modulation-SPM)

Η διάδοση ενός παλμού λέιζερ σε ένα ιστροπικό μέσο μπορεί να περιγραφεί από την κυματοσυνάρτηση ενός επίπεδου κύματος:

$$\left(\frac{\partial^2}{\partial z^2} - \frac{n_0^2}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2}\right) E = \frac{4\pi}{c^2} \frac{\partial^2}{\partial t^2} P^{(3)} \quad (1.3)$$

όπου:

$$E = E(z, t) \exp(ik_0 z - i\omega_0 t),$$

$$P^{(3)} = \chi^{(3)} |E|^2 E$$

και n_0 είναι ο γραμμικός δείκτης διάθλασης του μέσου. Χρησιμοποιώντας την προσέγγιση του αργού μεταβαλλόμενου πλάτους, η εξίσωση (1.3) γίνεται:

$$\left(\frac{\partial}{\partial z} - \frac{n_0}{c} \frac{\partial}{\partial t}\right) E = -\frac{4\pi\omega_0^2}{i2k_0 c^2} \chi^{(3)} |E|^2 E \quad (1.4)$$

Η προσέγγιση αυτή υποθέτει επιπλέον μια στιγμιαία απόκριση του $\chi^{(3)}$, οπότε ισχύει $z' \equiv z + ct/n_0$ και $E = |E| \exp(i\varphi)$, άρα από την παραπάνω εξίσωση λαμβάνουμε τα εξής:

$$\frac{\partial |E|}{\partial z'} = 0$$

$$\frac{\partial \varphi}{\partial z'} = \frac{2\pi\omega_0^2}{k_0 c^2} \chi^{(3)} |E|^2 \quad (1.5)$$

Οπότε προκύπτει η λύση:

$$|E| = |E(t)| \quad (1.6)$$

$$\varphi(z, t) = \varphi_0 + \frac{2\pi\omega_0^2}{k_0 c^2} \chi^{(3)} |E(t)|^2 z \quad (1.7)$$

Η εξίσωση (1.6) υποδηλώνει ότι ο παλμός του λέιζερ διαδίδεται στο μέσο χωρίς να προκληθεί κάποια παραμόρφωση στο σχήμα του παλμού, ενώ η εξίσωση (1.7) δείχνει ότι η επαγόμενη αλλαγή φάσης $\Delta\varphi(t) = \varphi(z, t) - \varphi_0$ αντιστοιχεί στην επιπρόσθετη μετατόπιση φάσης που παρατηρείται στο κύμα κατά την διάδοση του από το 0 έως το z , λόγω της παρουσίας

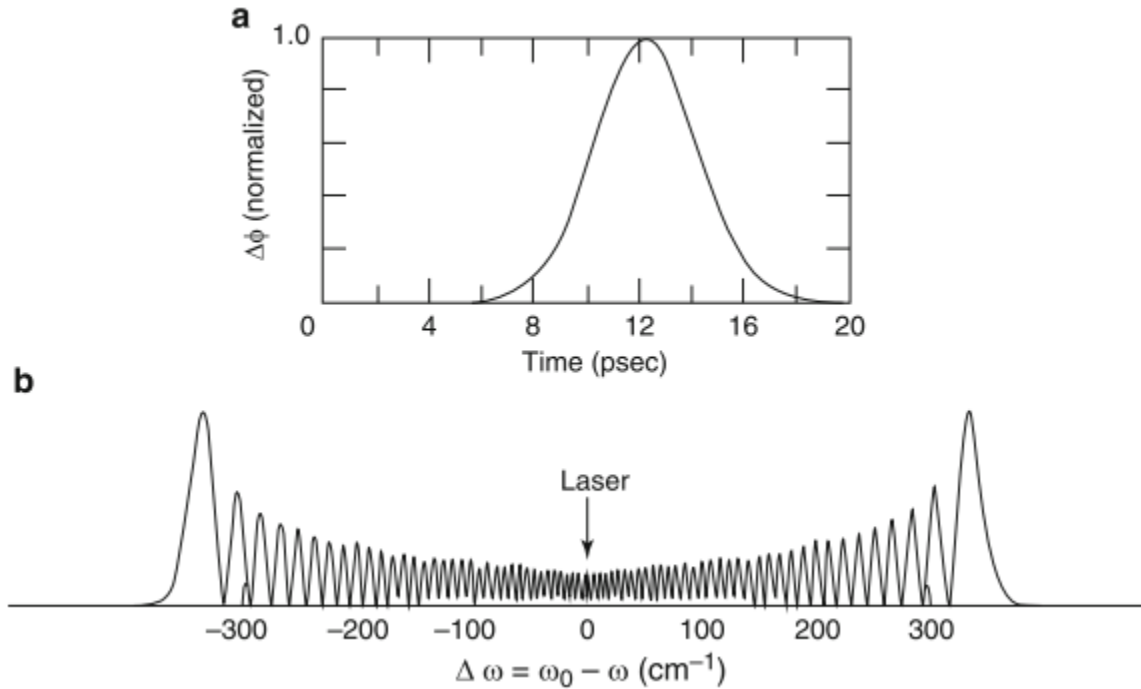
του επαγόμενου δείκτη διάθλασης $\Delta n = (2\pi/n_0)\chi^{(3)}|E|^2$, και προκύπτει από την σχέση $\Delta\varphi = (\frac{\omega}{c}) \int_0^z \Delta n dz$. Δεδομένου ότι η συχνότητα του κύματος είναι $\omega = \omega_0(\frac{\partial\Delta\varphi}{\partial t})$, η διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi(t)$ οδηγεί σε μια διαμόρφωση συχνότητας:

$$\Delta\omega(t) = -\frac{\partial(\Delta\varphi)}{\partial t} = -\frac{2\pi\omega_0^2}{k_0c^2}\chi^{(3)}\frac{\partial|E|^2}{\partial t}z \quad (1.8)$$

Κατά συνέπεια, το φάσμα του πεδίου με αυτοδιαμόρφωση φάσης αναμένεται να είναι διευρυμένο. Από τον μετασχηματισμό Fourier μπορεί να πραγματοποιηθεί ο υπολογισμός αυτού [20]:

$$|E(\omega)|^2 = \left| \frac{1}{2\pi} \int_{-\infty}^{\infty} E(t)e^{-i\omega_0t+i\omega t} dt \right|^2 \quad (1.9)$$

Από έναν παλμό 4.5 ps (picosecond), με προφίλ Gauss, ο οποίος διαδίδεται σε ένα μη γραμμικό μέσο, το οποίο αποδίδει μια αυτοδιαμόρφωση φάσης με μέγιστη διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi_{max} = 72\pi$ rad, προκύπτει ένα φάσμα με διεύρυνση μερικών εκατοντάδων cm^{-1} με μια ψευδο-περιοδική ταλάντωση. Η μορφή του παλμού με αυτοδιαμόρφωση φάσης σε σχέση με το χρόνο, καθώς και το προκύπτον φάσμα του παλμού απεικονίζονται στο παρακάτω σχήμα (Σχ. 1.5):



Σχήμα 1.3: Θεωρητικό φάσμα που λαμβάνεται ως αποτέλεσμα στιγμιαίας απόκρισης του δείκτη διάθλασης στη μεταβολή της έντασης $|E(t)|^2$, έτσι ώστε η διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi(t)$ να είναι ανάλογη του $|E(t)|^2$. α) Διαμόρφωση φάσης $\Delta\varphi$ έναντι της διάρκειας του παλμού t , β) φάσμα του παλμού που έχει υποστεί αυτοδιαμόρφωση φάσης [20].

Το φάσμα είναι συμμετρικό ως προς την εισερχόμενη συχνότητα λείζερ, όπως συμμετρικός είναι και ο παλμός αυτοδιαμόρφωσης φάσης. Το αρχικό τμήμα του παλμού με αυτοδιαμόρφωση φάσης είναι υπεύθυνο για την διεύρυνση Stokes ενώ το τελικό τμήμα είναι υπεύθυνο για την διεύρυνση Anti-Stokes. Η δομή του φάσματος γίνεται πιο κατανοητή αν παρατηρηθεί προσεκτικά η καμπύλη της αυτοδιαμόρφωσης φάσης που έχει σχήμα «καμπάνας». Η ύπαρξη συμμετρίας έχει ως αποτέλεσμα αντιδιαμετρικά σημεία να έχουν την ίδια κλίση, με εξαίρεση την περίπτωση του σημείου καμπής. Δεδομένου ότι $\frac{\partial\varphi}{\partial t} = -\omega$, τα αντιδιαμετρικά αυτά σημεία περιγράφουν κύματα ακτινοβολίας ίδιας συχνότητας, αλλά διαφορετικής φάσης. Από την συμβολή των κυμάτων αυτών προκύπτει ενισχυτική συμβολή αν η διαφορά φάσης, $\Delta\varphi_{12}$, είναι ακέραιο πολλαπλάσιο του 2π , ενώ αποσβεστική εάν το $\Delta\varphi_{12}$ είναι περιττό πολλαπλάσιο του π . Η απεικόνιση του είδους της συμβολής στο φάσμα γίνεται μέσω κορυφών και κοιλάδων. Τα σημεία καμπής όπου εμφανίζεται η μέγιστη κλίση εμφανίζονται στις δύο εξώτατες κορυφές για τις οποίες ισχύει $|\omega_{max}| \sim \left| \frac{\partial\varphi}{\partial t} \right|_{max}$. Ο αριθμός των κορυφών του φάσματος προκύπτει από το φ_{max} , από το οποίο, επίσης, υπολογίζεται ο αριθμός των ζευγών ενισχυτικών και καταστροφικών συμβολών ή, αλλιώς, το $N \sim \varphi_{max}/2\pi$ για κάθε πλευρά του φάσματος. Λόγω του γεγονότος ότι το $\Delta\varphi(t)$ είναι ανάλογο του $|E(t)|^2$ και του ότι ο παλμός είναι συμμετρικός [20] το διευρυμένο φάσμα έχει συμμετρία Stokes–Anti–Stokes.

1.5 Παλμός «Pump»

Η διέγερση των υπό μελέτη μορίων απαιτεί ισχυρούς παλμούς άντλησης (pump). Η γένεση συνεχούς (continuum generation) λευκού φωτός δεν ενδείκνυται για τη χρήση ως παλμός pump λόγω αδυναμίας παροχής υψηλής ενέργειας. Συνεπώς, γίνεται χρήση μη γραμμικών κρυστάλλων για την παραγωγή παλμών διαφορετικών μηκών κύματος, και συγκεκριμένα στην παρούσα μελέτη μέσω του φαινομένου της γένεση 2^{ης} αρμονικής[1].

1.5.1 Γένεση Δεύτερης Αρμονικής

Η μη γραμμική πόλωση, που επάγεται σε ένα άτομο ή μόριο δρα ως μια πηγή νέων κυμάτων με συχνότητες $\omega = \omega_1 \pm \omega_2$, με το ω_1 και το ω_2 να αντιστοιχούν στις κυκλικές συχνότητες των συνιστωσών του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, οι οποίες προκύπτουν από την διάδοση του πεδίου στο μη γραμμικό μέσο. Οι συχνότητες (ω) έχουν ταχύτητα φάσης

$v_{ph} = \omega/k = c/n(\omega)$. Οι μικροσκοπικές συνιστώσες που δημιουργούνται από τα άτομα σε διαφορετικές θέσεις (x, y, z) στο μη γραμμικό μέσο, προστίθενται σε ένα μακροσκοπικό κύμα με σημαντική ένταση, μόνο εάν τα διανύσματα των ταχυτήτων φάσης των προσπιπτόντων επαγόμενων κυμάτων και τα κύματα πόλωσης ταιριάζουν κατάλληλα. Αυτή η συνθήκη ταύτισης φάσης (phase-matching condition) γράφεται ως εξής:

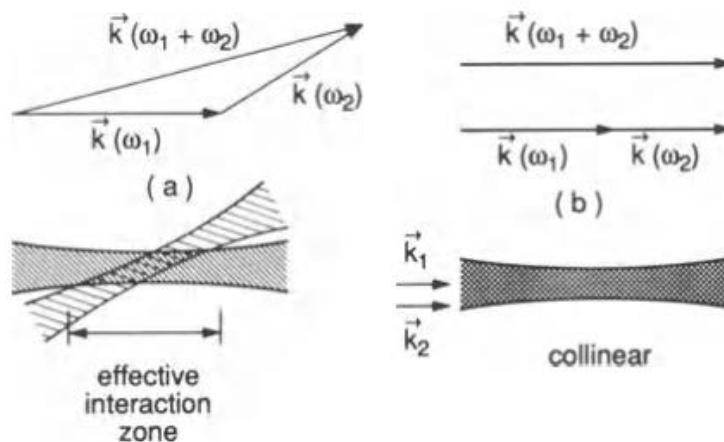
$$k = (\omega_1 \pm \omega_2) = k(\omega_1) \pm k(\omega_2) \quad (1.10)$$

και μπορεί να ερμηνευτεί ως η διατήρηση της ορμής για τα 3 φωτόνια που συμμετέχουν στην διαδικασία ανάμειξης [18], [19].

Η συνθήκη ταύτισης φάσης απεικονίζεται στο Σχήμα 1.6. Εάν οι γωνίες μεταξύ των τριών διανυσμάτων κύματος είναι εξαιρετικά μεγάλες η περιοχή αλληλοεπικάλυψης μεταξύ των εστιασμένων δεσμών μειώνεται προκαλώντας αντίστοιχη μείωση στην απόδοση της γένεσης συχνοτήτων αθροίσματος και διαφοράς. Η μέγιστη αλληλοεπικάλυψη επιτυγχάνεται κατά την παράλληλη διάδοση των τριών κυμάτων, δηλαδή $k_1 \parallel k_2 \parallel k_3$, και δεδομένου ότι $c/n = \omega/k$ και $\omega_3 = \omega_1 \pm \omega_2$ προκύπτει η συνθήκη:

$$n_3 \omega_3 = n_1 \omega_1 \pm n_2 \omega_2 \Rightarrow n_3 = n_1 = n_2 \quad (1.11)$$

για τους δείκτες διάθλασης n_1 , n_2 και n_3 .



Σχήμα 1.6: Συνθήκη ταύτισης φάσης (phase matching condition) α) για μη παράλληλη και β) για παράλληλη διάδοση των τριών κυμάτων [19].

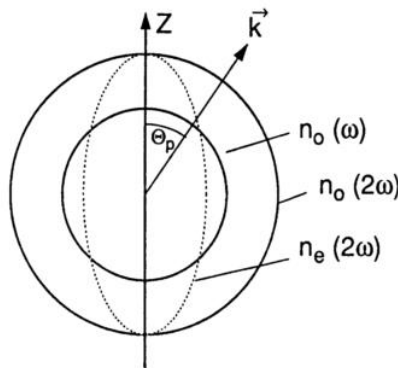
Η συνθήκη ταύτισης φάσης σε ένα μέσο που έχει διασπορά μπορεί να επιτευχθεί με διπλοθλαστικούς κρυστάλλους, οι οποίοι εμφανίζουν δυο διαφορετικούς δείκτες διάθλασης n_o και n_e για τα τακτικά και τα έκτακτα κύματα, αντίστοιχα. Ο τακτικός δείκτης διάθλασης n_o δεν

εξαρτάται από την κατεύθυνση διάδοσης του κύματος (k) και από το διάνυσμα της πόλωσης (E) ενώ ο έκτακτος δείκτης διάθλασης εξαρτάται και από τα δυο.

Στην περίπτωση της γένεσης δεύτερης αρμονικής (Second Harmonic Generation-SHG) έχουμε την υπόθεση $\omega_1 = \omega_2 = \omega$ και η συνθήκη ταύτισης φάσης γίνεται:

$$k(2\omega) = 2k(\omega) \Rightarrow v_{ph}(2\omega) = v_{ph}(\omega) \quad (1.12)$$

από όπου προκύπτει ότι οι ταχύτητες φάσης του εισερχόμενου κύματος και του κύματος δεύτερης αρμονικής είναι ίσες. Αυτό μπορεί να επιτευχθεί σε μια συγκεκριμένη κατεύθυνση θ_p σε σχέση με τον οπτικό άξονα, στην οποία ο έκτακτος δείκτης διάθλασης, $n_e(2\omega)$, για το κύμα δεύτερης αρμονικής, ισούται με τον τακτικό δείκτη διάθλασης, $n_o(\omega)$, του θεμελιώδους κύματος σε έναν αρνητικό διπλοθλαστικό κρύσταλλο με έναν άξονα (Σχ. 1.7).

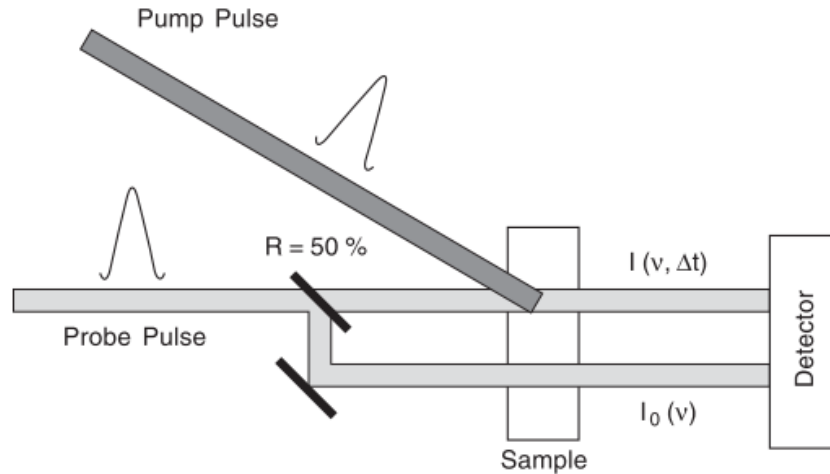


Σχήμα 1.7: Ταύτιση τιμών δείκτη διάθλασης για τη γένεση δεύτερης αρμονικής σε ένα αρνητικό διπλοθλαστικό κρύσταλλο με μόνο έναν άξονα [19].

Όταν το εισερχόμενο κύμα διαδίδεται στην κατεύθυνση θ_p μέσα στο κρύσταλλο, οι τοπικές συνεισφορές της επαγόμενης μη γραμμικής πόλωσης $P(2\omega, r)$ προστίθενται σε φάση και προκύπτει μακροσκοπικό κύμα δεύτερης αρμονικής με συχνότητα 2ω . Η κατεύθυνση πόλωσης του κύματος, αυτού, δεύτερης αρμονικής είναι ορθογώνια ως προς αυτή του θεμελιώδους κύματος [19].

1.6 Καταγραφόμενο σήμα

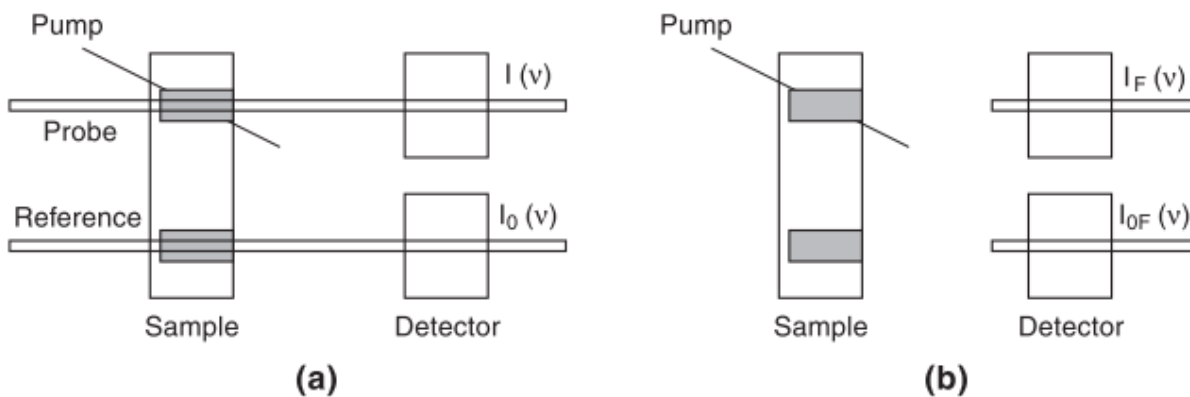
Η οπτική πυκνότητα (OD) ορίζεται ως ο λογαριθμικός λόγος της έντασης του παλμού πριν και μετά το διαταραγμένο δείγμα. Η ευαισθησία της μέτρησης ενισχύεται με την ταυτόχρονη καταγραφή της φασματικής κατανομής του παλμού probe παρουσία και απουσία της διαταραχής του συστήματος. Η ενίσχυση αυτή επιτυγχάνεται με τη διαίρεση της δέσμης probe, σε δύο δέσμες, όπως φαίνεται (Σχ. 1.8).



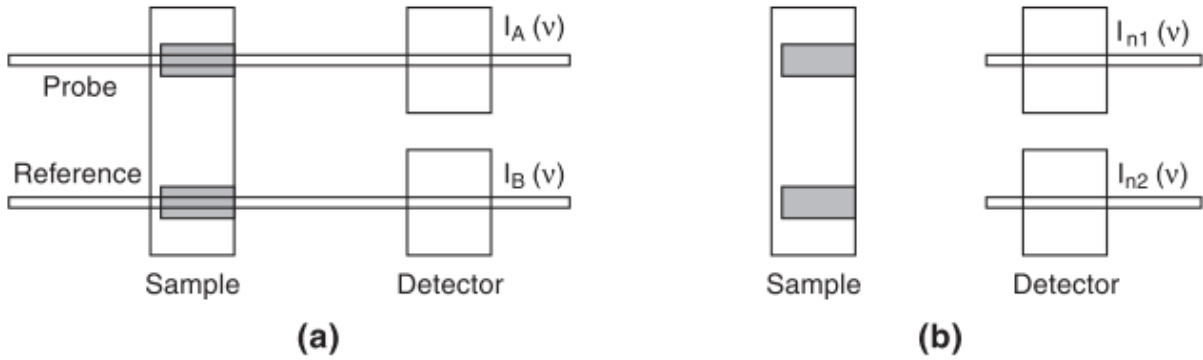
Σχήμα 1.8: Pump-probe πείραμα διπλής δέσμης [1].

Η δέσμη probe, που συμπίπτει χωρικά με τη δέσμη άντλησης, διασχίζει μια διαταραγμένη περιοχή του δείγματος, ενώ η δέσμη αναφοράς διασχίζει μια μη διαταραγμένη περιοχή. Οι δυο δέσμες καταγράφονται από κάμερα CCD (Charged Coupled Devices) [1].

Η άμεση καταγραφή της αναλογίας $I_0(v)/I(v, \Delta t)$ αυξάνει την ευαισθησία της μέτρησης. Η καταγραφή επιπλέον σημάτων, όπως παράσιτη ακτινοβολία, ηλεκτρονικός θόρυβος, φθορισμός, κ.α. επιτρέπουν τη διόρθωση της οπτικής πυκνότητας. Στα σχήματα 1.9 και 1.10 απεικονίζεται η καταγραφή των επιπλέον σημάτων.



Σχήμα 1.9: α) Καταγραφή των σημάτων της δέσμης probe και της δέσμης αναφοράς (reference) παρουσία της δέσμης pump β) Καταγραφή της εκπομπής φθορισμού κατόπιν άντλησης του δείγματος [1].



Σχήμα 1.10: α) Καταγραφή σημάτων που επιτρέπουν τη διόρθωση των φασματικών διαφορών μεταξύ της δέσμης probe και της δέσμης αναφοράς απουσία διέγερσης β) Καταγραφή του θορύβου (φως περιβάλλοντος και ηλεκτρονικός θόρυβος) [1].

Οι ποσότητες που καταγράφονται είναι οι εξής:

- $I(v)$ και $I_0(v)$, που αντιστοιχούν στη φασματική κατανομή των καταγεγραμμένων σημάτων παρουσία των παλμών pump, probe και αναφοράς στο δείγμα (Σχ. 1.9 α).
- $I_F(v)$ και $I_{0F}(v)$, που αντιστοιχούν στις φασματικές κατανομές των καταγεγραμμένων σημάτων παρουσία του παλμού pump και απουσία των παλμών probe και αναφοράς (Σχ. 1.9 β). Στην περίπτωση, αυτή, ο ανιχνευτής καταγράφει την εκπομπή του δείγματος και τον θόρυβο.
- $I_A(v)$ και $I_B(v)$, που αντιστοιχούν στις φασματικές κατανομές των καταγεγραμμένων σημάτων απουσία του παλμού pump και παρουσία των παλμών probe και αναφοράς (Σχ. 1.10 α). Στην περίπτωση αυτή ο ανιχνευτής καταγράφει τις φασματικές κατανομές της δέσμης probe και της δέσμης αναφοράς που υπερκαλύπτονται από το θόρυβο.
- $I_{n1}(v)$ και $I_{n2}(v)$, που αντιστοιχούν σε καταγεγραμμένα σήματα απουσία όλων των παλμών (Σχ. 1.10β). Σε αυτή την περίπτωση οι ανιχνευτές καταγράφουν μόνο ηλεκτρονικό και περιβαλλοντικό θόρυβο.

Με βάση τις πιο πάνω ποσότητες που καταγράφονται για μια συγκεκριμένη καθυστέρηση μεταξύ δέσμης pump και δέσμης probe (Δt), η οπτική πυκνότητα, διορθωμένη από τη παράσιτη ακτινοβολία και τις πιθανές αλλαγές στην φασματική κατανομή, υπολογίζεται από την σχέση [1]:

$$OD(v, \Delta t) = \log \left(\frac{I_0(v) - I_{0F}(v)}{I(v) - I_F(v)} \right) \left(\frac{I_B(v) - I_{n2}(v)}{I_A(v) - I_{n1}(v)} \right) \quad (1.13)$$

1.7 Βιβλιογραφία

- [1] Rulliere, C. Femtosecond Laser Pulses Principles and Experiments. Springer, New York, USA, (2005).
- [2] Dantus, M., Gross, P. (1998). Ultrafast Spectroscopy. Encyclopedia of Applied Physics, 22, 431-456. [https://doi.org/10.1016/S0030-4018\(98\)00086-8](https://doi.org/10.1016/S0030-4018(98)00086-8).
- [3] Zewail, A. H. (2000). Femtochemistry: Atomic-Scale Dynamics of the Chemical Bond. The Journal of Physical Chemistry A, 104 (24), 5660-5694. <https://doi.org/10.1021/jp001460h>.
- [4] Arrhenius, S. (1887). Über die Reaktionsgeschwindigkeit bei der Inversion von Rohrzucker durch Säuren. Z. Phys. Chem. (Leipzig), 4, 226.
- [5] Eyring, B. H., Polanyi, M. (1931). On Simple Gas Reactions. Z. Phys. Chem. 227, 1221-1245. <https://doi.org/10.1524/zpch.2013.9023>.
- [6] Laidler, K. J. (1987). Chemical Kinetics, Pearson Ottawa, Canada.
- [7] Van 't Hoff, M. J. H. (1884). Etudes de dynamique chimique. p 333-336.
- [8] Abraham, H., Lemoine, T. (1899). Disparition instantanée du phénomène de Kerr. Compt. Rend. (Paris), 129, 206.
- [9] Eigen, M. (1954). Methods for Investigation of Ionic Reactions in Aqueous Solutions with Half-Times as Short as 10^{-9} sec, M. Discuss. Faraday Soc., 17, 194.
- [10] Norrish, R. G. W., Porter, G. (1949). Chemical Reactions Produced by Very High Light Intensities. Nature, 164, 658.
- [11] Maiman, T. H. (1960) Stimulated Optical Radiation in Ruby. Nature. 493-494.
- [12] Hellwarth, R.W. (1961) Control of fluorescent pulsations, in Advances in Quantum Electronics, R. Singer, Ed., New York Columbia University Press, pp. 334-341.
- [13] De Maria, A. J., Stetser, D. A., Heynau, H. (1966). Self mode-locking of lasers with saturable absorbers, 174, 74-77. <https://doi.org/10.1063/1.1754541>.
- [14] Shank, C. V, Ippen, E. P. (1978). Subpicosecond kilowatt pulses from a modelocked cw dye laser Subpicosecond kilowatt pulses from a mode-locked cw dye laser, 373 (1974), 26-29. <https://doi.org/10.1063/1.1655222>.
- [15] Spence, D. E., Kean, P. N., Sibbett, W. (1991). 60-fsec pulse generation from a self-mode-locked Ti : sapphire laser, 16 (1), 42-44.

- [16] Pshenichnikov, M. S., Wiersma, D. A. (1998). Amplitude and phase characterization of 4.5-fs pulses by frequency-resolved optical gating, 23 (18), 1474-1476.
- [17] Papadogiannis, N. A., Witzel, B., Kalpouzos, C., Charalambidis, D. (1999). Observation of attosecond light localization in higher order harmonic generation. Physical Review Letters, 83 (21), 4289-4292. <https://doi.org/10.1103/PhysRevLett.83.4289>.
- [18] Hentschel, M., Kienberger, R., Spielmann, C., Reider, G. A., Milosevic, N., Brabec, T., Krausz, F. (2001). Attosecond metrology. Nature, 414 (6863), 509-513. <https://doi.org/10.1038/35107000>.
- [19] Demtröder W. Laser Spectroscopy: Basic Concepts and Instrumentation, Springer, New York, USA, (1996).
- [20] Alfano R. R. The Supercontinuum Laser Source: The Ultimate White Light, Springer, New York, USA, (2013).

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 2

Θεωρητικό Υπόβαθρο Πρωτεϊνών Φουκοξανθίνης-Χλωροφύλλης (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins-FCPs)

2.1 Ιστορική Αναδρομή των Διατόμων

Οι κύριες κατηγορίες των μικροοργανισμών που κατοικούν στους ωκεανούς είναι τα κυανοβακτήρια, τα ετερότροφα βακτήρια, τα αρχαία, οι ιοί και τα ευκαρυωτικά πλαγκτόν. Τα περισσότερα φυτοπλαγκτόν στην θάλασσα είναι τα κυανοβακτήρια του γένους *Prochlorococcus*, ενώ μεγαλύτερη ποικιλομορφία παρουσιάζουν τα διάτομα με περίπου διακόσιες χιλιάδες διαφορετικά είδη που διαφέρουν ως προς το μέγεθος (από μερικά μικρόμετρα (μm) έως μερικά χιλιοστά (mm)).

Η ονομασία των διατόμων προέρχεται από την ελληνική λέξη διατέμνω και αναφέρεται στο χαρακτηριστικό κυτταρικό τοίχωμα αυτών των οργανισμών, το οποίο αποτελείται από δυο τμήματα. Μελέτες υποστηρίζουν ότι τα διάτομα προέκυψαν την Τριασική περίοδο (Triassic Period) περίπου πριν από διακόσια πενήντα εκατομμύρια χρόνια, ενώ τα πρώτα διατηρημένα απολιθώματα προέρχονται από την πρώιμη Ιαρουσική περίοδο (Jurassic Period) πριν από εκατόν πενήντα εκατομμύρια χρόνια. Το φυτοπλαγκτόν που υπήρχε πριν την εμφάνιση των διατόμων υποστηρίζεται ότι ήταν κυρίως τα κυανοβακτήρια και η πράσινη άλγη, η οποία ήταν ελάχιστα μεγαλύτερη από τα βακτήρια. Η αύξηση των διατόμων, των δινομαστιγωτών (dinoflagellates) και των κοκκολιθοφόρων (coccolithophorids) προκάλεσε αλλαγή στον παγκόσμιο κύκλο του άνθρακα, εκκινώντας μια εποχή μείωσης της συγκέντρωσης του ατμοσφαιρικού διοξειδίου του άνθρακα (CO₂) και αύξησης του ατμοσφαιρικού οξυγόνου (O₂). Οι οργανισμοί αυτοί βυθίσαν το CO₂, προκαλώντας την συσσώρευση του οργανικού άνθρακα στις ηπειρωτικές όχθες και στις ρηχές θάλασσες, δημιουργώντας πετρελαϊκά αποθέματα.

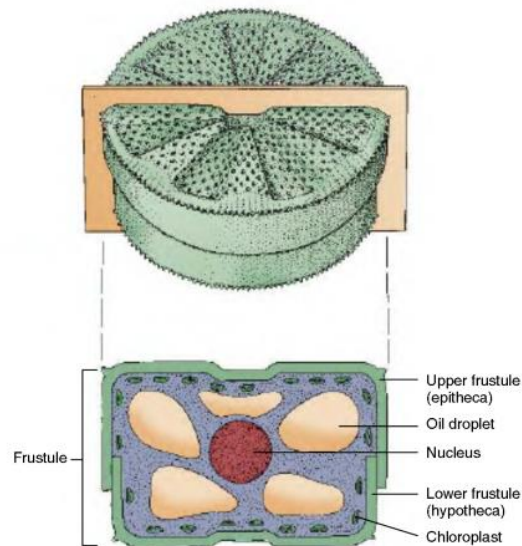
Την εποχή του Μεσοζωικού αιώνα (Mesozoic Era) η συγκέντρωση του CO₂ ήταν οχτώ φορές μεγαλύτερη από ότι σήμερα, η θερμοκρασία της γης ήταν σημαντικά υψηλότερη και η Αφρική ξεκίνησε να διαχωρίζεται από την Ευρώπη προκαλώντας πλημμύρες στις ηπειρωτικές υφαλοκρηπίδες. Οι αλλαγές αυτές προκάλεσαν την απελευθέρωση υψηλών ποσοτήτων θρεπτικών συστατικών, τα οποία αύξησαν την δραστηριότητα του φυτοπλαγκτόν.

Παρά του ότι κατά την Κρητιδική περίοδο (Cretaceous period) (εκατό εκατομμύρια χρόνια πριν) η συγκέντρωση του CO₂ είχε μειωθεί, υποστηρίζεται ότι ήταν πέντε φορές μεγαλύτερη από την σημερινή. Οι προμήθειες των θρεπτικών συστατικών στην επιφάνεια της θάλασσας συνέχισαν να αυξάνονται οδηγώντας στον περαιτέρω πολλαπλασιασμό των διατόμων και άλλων φωτοσυνθετικών οργανισμών, καθώς και στην αύξηση της συγκέντρωσης του O₂. Στην περίοδο αυτή παρατηρήθηκε μείωση της διαθεσιμότητας σιδήρου (Fe), ενός απαραίτητου ιχνοστοιχείου για την λειτουργία των διατόμων.

Στο τέλος της Κρητιδικής περιόδου πριν από 65 εκατομμύρια χρόνια πραγματοποιήθηκε το φαινόμενο της μαζικής εξαφάνισης, κατά την οποία περίπου 85% των ζωντανών οργανισμών εξαφανίστηκε. Το φαινόμενο αυτό προκλήθηκε όταν ένας αστεροειδής συγκρούστηκε με την Γη. Τα διάτομα επέζησαν από το συγκεκριμένο φαινόμενο και ξεκίνησαν να αποικίζουν περιοχές με λιγότερα θρεπτικά συστατικά, όπως ο ανοιχτός ωκεανός, οι οποίες όμως είχαν αποθέματα Fe. Οι συγκεντρώσεις του οξυγόνου σταθεροποιήθηκαν στα σημερινά επίπεδα πριν από 50 εκατομμύρια χρόνια, ενώ μειώθηκαν περαιτέρω οι συγκεντρώσεις του Fe και του CO₂ [1].

2.2 Δομή, Αναπαραγωγή και Λειτουργία Διατόμων

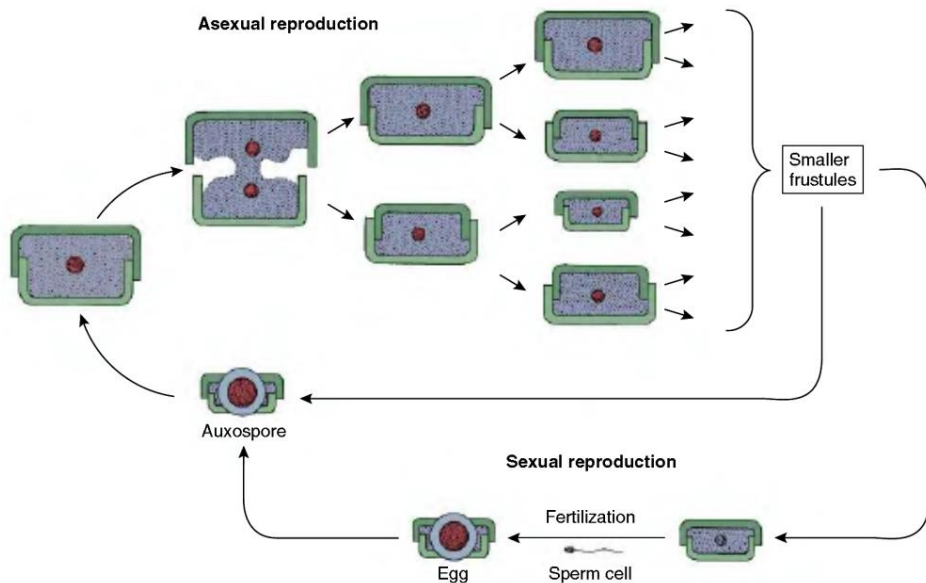
Τα διάτομα είναι μονοκύτταροι οργανισμοί, οι οποίοι συχνά οργανώνονται σε δομές αλυσίδας. Κύριο χαρακτηριστικό των διατόμων αποτελεί το κυτταρικό τους τοίχωμα (Frustule), το οποίο αποτελείται από διοξείδιο του πυριτίου (SiO₂), δηλαδή από γυαλί. Το κέλυφος γυαλιού χωρίζεται σε δυο τμήματα, τα οποία έχουν στρογγυλό σχήμα και ενώνονται ισχυρά μεταξύ τους (Εικόνα 2.1).



Σχήμα 2.1: Αναπαράσταση της κύριας δομής των διατόμων. Πάνω απεικονίζονται τα δυο τμήματα του κελύφους γυαλιού των διατόμων και κάτω φαίνεται η εσωτερική οργάνωση του κυττάρου σε εγκάρσια τομή. Τα βασικά οργανίδια που παρατηρούνται είναι ο πυρήνας, οι χλωροπλάστες, οι σταγόνες λαδιού (βοηθούν στην κίνηση του διατόμου στο νερό), και τα δυο τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος από γυαλί. [2].

Επιπλέον, το κυτταρικό τοίχωμα τυπικά εμφανίζει περίπλοκες οπές και αγκάθια. Οι οπές επιτρέπουν στο διαλυτοποιημένο CO_2 και στα θρεπτικά συστατικά να εισέλθουν ή να εξέλθουν από το κύτταρο, ενώ τα αγκάθια είναι εμποτισμένα με ελαιώδεις ουσίες, ώστε να ελέγχεται η βύθιση του κυττάρου στην θάλασσα. Το «γυάλινο» κυτταρικό τοίχωμα καθιστά επιτρεπτή την διέλευση του φωτός στο κύτταρο, ώστε οι χλωροπλάστες να δεσμεύσουν την ενέργεια του για την διαδικασία της φωτοσύνθεσης. Οι χλωροπλάστες έχουν χαρακτηριστικό κίτρινο-καφέ χρώμα, το οποίο οφείλεται στις χρωστικές δέσμευσης που διαθέτουν, οι οποίες είναι τα καροτενοειδή φουκοξανθίνη (Fucoxanthin-Fx), διαδινοξανθίνη (Diadinoxanthin-Ddx) και διατινοξανθίνη (Diatoxanthin-Dtx), καθώς και οι χλωροφύλλες a και c (Chlorophylls a, Chls-c) [2].

Τα διάτομα αναπαράγονται κυρίως μέσω της διαδικασίας της κυτταρικής διαίρεσης (μονογονική αναπαραγωγή), στην οποία τα δύο τμήματα του κυτταρικού τοιχώματος διαχωρίζονται και το κάθε ένα από αυτά αναπτύσσει ένα νέο μικρότερο τμήμα κυτταρικού τοιχώματος από διοξείδιο του πυριτίου (Εικόνα 2.2). Τα διάτομα αναπαράγονται, επίσης, μέσω αμφιγονικής (σεξουαλικής) αναπαραγωγής, κατά την οποία κάποια κύτταρα αναπτύσσουν ωάρια, ενώ άλλα σπερματοζώαρια. Η ένωση των δυο γαμετών προκαλεί τον σχηματισμό σπόρων (auxospores, Εικόνα 2.2).



Σχήμα 2.2: Αναπαραγωγικές διαδικασίες του διατόμου [2]. Στο άνω τμήμα της εικόνας απεικονίζεται η διαδικασία της κυτταρικής διαίρεσης και στο κάτω απεικονίζεται η αναπαραγωγή μέσω γαμετών και ο σχηματισμός των σπόρων (auxospores).

Σε ευνοϊκές περιβαλλοντικές συνθήκες, όπως για παράδειγμα, παρουσία πληθώρας θρεπτικών συστατικών και βέλτιστης θερμοκρασίας, πραγματοποιούνται περίοδοι φυτοπλαγκτικής «άνθησης» (bloom), κατά τις οποίες τα διάτομα αναπαράγονται με ταχείς ρυθμούς. Κατά την διάρκεια των συγκεκριμένων περιόδων τα διάτομα αποκτούν προοδευτικά μικρότερο μέγεθος γιατί το μικρό τμήμα του κυτταρικού τοιχώματος του γονικού διατόμου γίνεται το μεγάλο τμήμα στα νέα διάτομα. Το πλήρες μέγεθος επανακτάται μέσω της ανάπτυξης των σπόρων (auxospores) [1, 2].

Τα διάτομα διεξάγουν το ένα πέμπτο της φωτοσύνθεσης που πραγματοποιείται στη Γη και βρίσκονται σε περιοχές που υπάρχει επαρκές φως και ποσότητα θρεπτικών συστατικών. Η ποσότητα οργανικού άνθρακα που παράγεται μέσω των διατόμων στην θάλασσα είναι περίπου ίση με την ποσότητα που παράγουν αθροιστικά όλα τα δάση της γης. Ο άνθρακας αυτός αποτελεί τροφή άλλων θαλάσσιων οργανισμών, ενώ ένα ελάχιστο τμήμα που δεν καταναλώνεται εναποτίθεται στον πυθμένα της θάλασσας και συνεισφέρει στο σχηματισμό αποθεμάτων πετρελαίου.

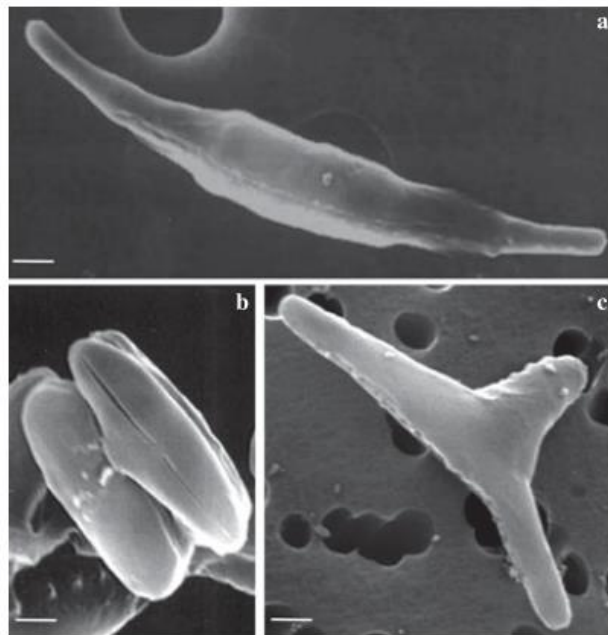
Το γυάλινο κυτταρικό τοίχωμα των νεκρών διατόμων εναποτίθεται στον πυθμένα της θάλασσας σχηματίζοντας λεπτές επιφάνειες πυριτικών υλικών. Τα πυριτικά αυτά υλικά χρησιμοποιούνται ως φίλτρα καθαρισμού νερού σε υδατοδεξαμενές και κολυμβητήρια, ως

θερμομονωτικά και ηχομονωτικά υλικά αλλά και ως συστατικό σε οδοντόπαστες που βοηθά στη λείανση των δοντιών.

Στην παρούσα διατριβή έχουν επιλεγθεί προς μελέτη δυο διαφορετικά είδη διατόμων: Το *Phaeodactylum tricornutum* και το *Fragilariopsis sp.*, τα οποία διαφέρουν δομικά μεταξύ τους και αναπτύσσονται σε περιοχές που παρουσιάζουν διαφορετικές περιβαλλοντικές συνθήκες.

2.2.1 *Phaeodactylum tricornutum*

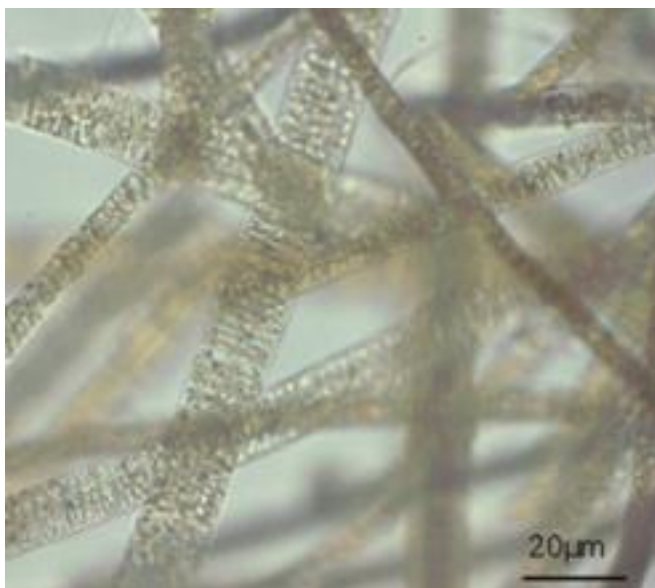
Το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* αναφέρθηκε πρώτη φορά βιβλιογραφικά από τον Bohlin το 1897, ο οποίος το ανακάλυψε σε δείγματα που είχε συλλέξει από το Πλύμουθ (Ηνωμένο Βασίλειο) και από βραχώδεις λίμνες των Βαλτικών Χωρών. Ο Bohlin περιέγραψε το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* ως μονοκύτταρο οργανισμό που έχει μορφή τριών-αξόνων (triradiate), έναν κίτρινο-καφέ χλωροπλάστη και ένα λεπτό κυτταρικό τοίχωμα που αποτελείται από SiO_2 . Αργότερα ανακαλύφθηκε ότι το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* είναι πολυμορφικό και πέραν της μορφής τριών-αξόνων δύναται να λάβει επίσης ωοειδή (oval) δομή ή δομή ατράκτου (Fusiform, Σχήμα 2.3) [3]. Το συγκεκριμένο διάτομο αναπτύσσεται σε παράκτιες θαλάσσιες περιοχές αλλά είναι ικανό να προσαρμοστεί σε συνεχώς μεταβαλλόμενες περιοχές όπως είναι οι εκβολές των ποταμών και οι βραχώδεις λίμνες.



Σχήμα 2.3: Δομή του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum* α) δομή ατράκτου (Fusiform) β) ωοειδής δομή (Oval) και γ) δομή τριών-αξόνων (Triradiate) [3].

2.2.2 *Fragilariopsis sp.*

Το διάτομο *Fragilariopsis sp.* είναι μονοκύτταρος οργανισμός, έχει ωοειδή δομή και συνήθως οργανώνεται με άλλα κύτταρα του ίδιου είδους σε αλυσίδες, όπως απεικονίζεται στο Σχήμα 2.4. Το κίτρινο-καφέ χρώμα τους οφείλεται στους χλωροπλάστες που διαθέτουν για να συλλέγουν την ηλιακή ακτινοβολία και το κυτταρικό τους τοίχωμα είναι ενισχυμένο από SiO₂. Η περιοχή που ακμάζει το συγκεκριμένο είδος διατόμου είναι ο Ανταρκτικός ωκεανός και σε αντίθεση με το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*, το διάτομο *Fragilariopsis sp.* βρίσκεται στην ανοιχτή θάλασσα και όχι σε παράκτιες περιοχές [1, 4].



Σχήμα 2.4: Δομή αλυσίδας των διατόμων *Fragilariopsis sp.* [4].

2.3 Πρωτεΐνες Φουκοξανθίνης Χλωροφύλλης (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins-FCPs)

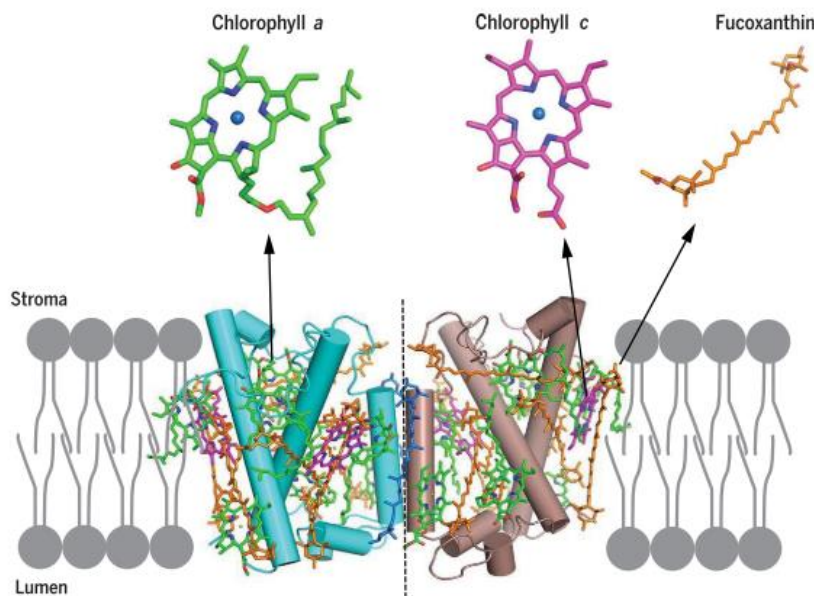
Οι φωτοσυνθετικοί οργανισμοί διαθέτουν πρωτεΐνες δέσμησης φωτός, οι οποίες έχουν ως συμπαράγοντες ενώσεις που απορροφούν την ακτινοβολία και τη μεταφέρουν στα σύμπλοκα των φωτοσυστημάτων, με στόχο την εκκίνηση αντιδράσεων διαχωρισμού φορτίου και μεταφοράς ηλεκτρονίων. Στα διάτομα οι κεραίες δέσμησης της ακτινοβολίας είναι οι πρωτεΐνες Φουκοξανθίνης - Χλωροφύλλης (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins FCPs). Το όνομα «FCPs» προκύπτει από τα αρχικά των ονομάτων των χρωστικών που διαθέτουν, οι οποίες είναι το καρροτενοειδές φουκοξανθίνη (Fucoxanthin-Fx), η χλωροφύλλη τύπου α και η χλωροφύλλη τύπου

c (Chlorophylls a/c-Chls). Η Fx και η Chl-c προσδίδουν ένα κίτρινο-καφέ χρώμα στα FCPs και την ικανότητα αποδοτικής απορρόφησης της κυανής-πράσινης ακτινοβολίας, η οποία είναι ικανή να διεισδύει σε μεγάλο βάθος του ωκεανού.

Η συνεχής κίνηση του νερού στην επιφάνεια των ωκεανών προκαλεί μεταβολές στην ένταση της ακτινοβολίας στην οποία εκτίθενται οι οργανισμοί. Αυτό έχει ως αποτέλεσμα τα διάτομα να υποβάλλονται σε ακτινοβολίες άλλοτε εξαιρετικά ισχυρές και άλλοτε ασθενείς. Προκειμένου να ρυθμίσουν την περίσσεια ενέργειας από την έκθεση σε ισχυρή ακτινοβολία και να προστατευτούν από την φωτοκαταστροφή (photodamage), τα FCPs, διαθέτουν ένα μη-φωτοχημικό σύστημα απόσβεσης (nonphotochemical quenching (NPQ) system), μέσω του οποίου μετατρέπουν την περίσσεια ενέργειας σε θερμότητα. Η διαδικασία αυτή περιλαμβάνει μια χημική αντίδραση κατά την οποία το καροτενοειδές διαδινοξανθίνη (Diadinoxanthin-Ddx) μετατρέπεται στο καροτενοειδές διατοξανθίνη (Diatoxanthin-Dtx). Η αντίστροφη διαδικασία πραγματοποιείται σε συνθήκες έκθεσης σε ασθενή ακτινοβολία ή έλλειψης φωτός.

Η δομή ενός FCP, που απομονώθηκε από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*, προσδιορίστηκε πρόσφατα (2019) από τον Wang και συνεργάτες μέσω της τεχνικής της κρυσταλλογραφίας [5]. Η μελέτη αυτή αποτελεί τη μοναδική βιβλιογραφική αναφορά που χρησιμοποιεί την τεχνική της κρυσταλλογραφίας για την εύρεση της δομής των FCPs, ενώ είναι υπό διερεύνηση η ομοιότητα του συστήματος αυτού με τα φωτοσυνθετικά συστήματα δέσμευσης φωτός άλλων διατόμων.

Τα FCPs, σύμφωνα με τον Wang και συνεργάτες, είναι διμερείς πρωτεΐνες με μοριακό βάρος 64 kDa, που βρίσκονται στην μεμβράνη των θυλακοειδών (Σχήμα 2.5). Το μονομερές περιέχει επτά Fx, δύο Chls-c, επτά Chls-a και μία Ddx. Τα μόρια των χρωστικών απέχουν μεταξύ τους μερικά Å γεγονός που καθιστά εφικτή την ισχυρή σύζευξη μεταξύ των ενώσεων και ερμηνεύει την αποδοτική και ραγδαία μεταφορά ενέργειας στα σύμπλοκα FCPs [5].



Σχήμα 2.5: Δομή της μεμβρανικής πρωτεΐνης Φουκοξανθίνης-Χλωροφύλλης (FCP). Με πράσινο χρώμα απεικονίζεται η χλωροφύλλη τύπου α, με μοβ η χλωροφύλλη τύπου c και με πορτοκαλί η φουκοξανθίνη [5].

Τα φάσμα απορρόφησης της Fx μεταβάλλεται λόγω των διαφορετικών αλληλεπιδράσεων της κετονομάδας, που διαθέτει, με το περιβάλλον του μορίου. Στα FCPs διακρίνονται τρεις κατηγορίες Fxs οι οποίες απορροφούν σε διαφορετική περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος λόγω του διαφορετικού περιβάλλοντος που βρίσκονται. Στην πρώτη κατηγορία ανήκουν δυο, εκ των επτά, Fxs, οι οποίες βρίσκονται σε υδρόφοβο περιβάλλον και απορροφούν στην κυανή περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Ως εκ τούτου ονομάζονται κυανές/μπλε Fxs (Fxs_{blue}). Η δεύτερη κατηγορία περιλαμβάνει τις Fxs που βρίσκονται σε υδρόφοβο περιβάλλον αλλά είναι κοντά και σε πολικούς θύλακες. Σε αυτή την ομάδα ανήκουν δυο από τις επτά Fxs των FCPs και ονομάζονται πράσινες Fxs (Fxs_{green}), καθώς το φάσμα απορρόφησης τους βρίσκεται στην ενδιάμεση φασματική περιοχή του ορατού. Οι υπόλοιπες τρεις Fxs ανήκουν στην κατηγορία των κόκκινων Fxs (Fxs_{red}) και απορροφούν την ερυθρή/κόκκινη περιοχή του ηλεκτρομαγνητικού φάσματος. Οι κόκκινες Fxs βρίσκονται σε πολικό περιβάλλον [5].

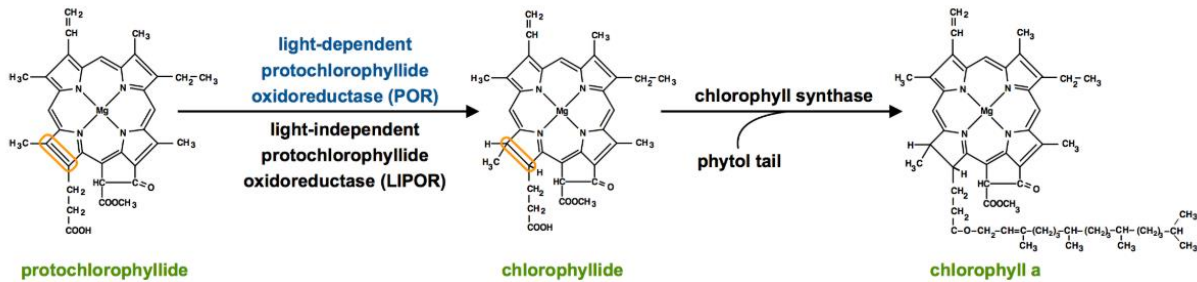
2.3.1 Χλωροφύλλες

Η χλωροφύλλη προσδίδει το πράσινο χρώμα στα φυτά και από αυτή της την ιδιότητα προέκυψε το όνομα της, καθώς το πρώτο συνθετικό της ονομασίας της είναι το «χλωρό», που σημαίνει πρασινοκίτρινο, ενώ το δεύτερο συνθετικό είναι το «φύλλο». Στην ομάδα των

χλωροφυλλών ανήκουν χρωστικές που διαθέτουν ένα πορφυρινικό δακτύλιο (Porphyrin) μεταλλωμένο με μαγνήσιο ή έναν ανηγμένο πορφυρινικό δακτύλιο (Chlorin) εξίσου μεταλλωμένο με μαγνήσιο. Επιπλέον δομικό χαρακτηριστικό των χλωροφυλλών είναι η ύπαρξη διαφορετικών περιφερειακών υποκαταστατών [6]. Στα FCPs, όπως προαναφέρθηκε, περιέχονται η χλωροφύλλη τύπου a και η χλωροφύλλη τύπου c.

Χλωροφύλλη τύπου a (Chlorophyll a-Chls-a)

Η βιοσύνθεση της Chl-a ξεκινάει από την πρόδρομη ένωση πρωτοχλωροφυλλίδιο (Protochlorophyllide-PChlide), το οποίο μέσω ενζυμικής αντίδρασης μετατρέπεται στην ένωση χλωροφυλλίδιο (Chlorophyllide-Chlide). Η προσθήκη της ομάδας φυτολίου (phytol) στο Chlide οδηγεί στον σχηματισμό της Chl-a (Σχήμα 2.6) [7].

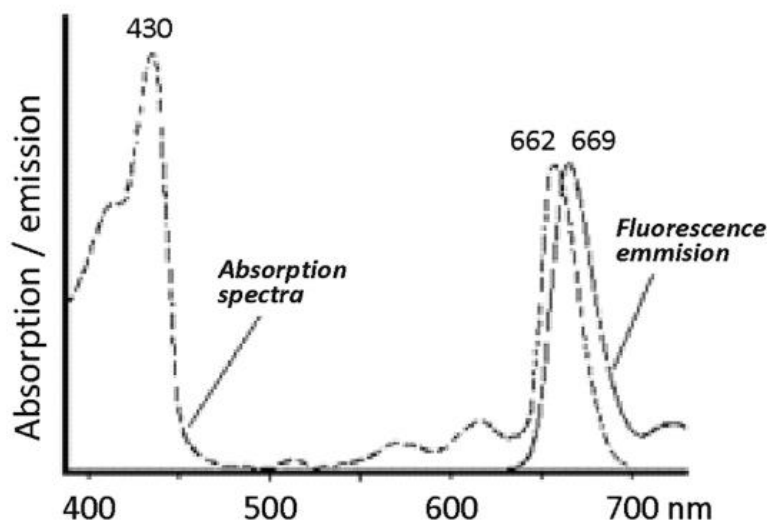


Σχήμα 2.6: Αντιδράσεις βιοσύνθεσης της Chl-a [7].

Η Chl-a αποτελείται από έναν ανηγμένο πορφυρινικό δακτύλιο μεταλλωμένο με μαγνήσιο και έχει συναρμοσμένη μια υδρόφοβη αλυσίδα είκοσι ανθράκων (ομάδα φυτολίου), εστεροποιημένη σε μια πλευρική αλυσίδα οξέος.

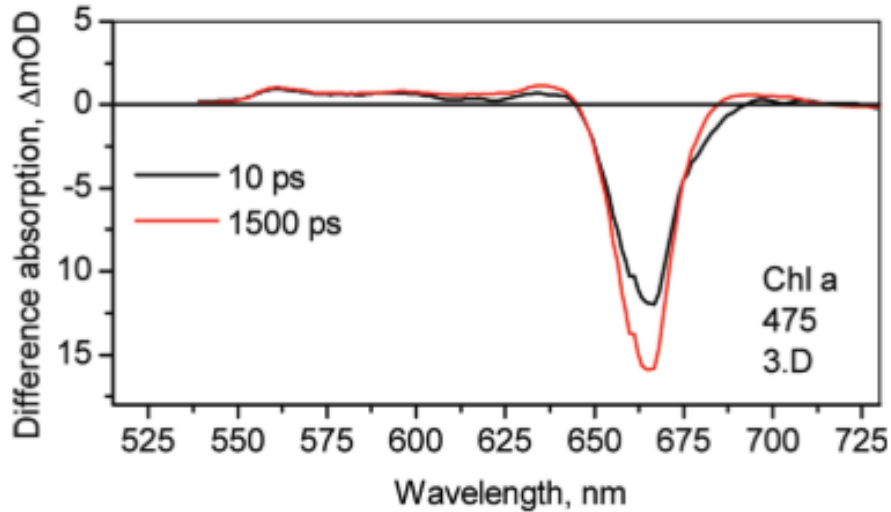
Το φάσμα απορρόφησης της Chl-a αποτελείται από την ταινία Soret και τέσσερις κορυφές απορρόφησης που ονομάζονται Q-ταινίες (Σχήμα 2.7). Η ταινία Soret εμφανίζει μέγιστο σε $\lambda = 430 \text{ nm}$ και προέρχεται από την μετάβαση $S_0 \rightarrow S_2$, ενώ οι Q-ταινίες παρουσιάζονται σε μεγαλύτερα μήκη κύματος και αποδίδονται σε ηλεκτροδονητικές μεταβάσεις από το θεμελιώδες δονητικό επίπεδο της θεμελιώδους κατάστασης (S_0) σε υψηλότερα δονητικά επίπεδα της πρώτης διεγερμένης κατάστασης (S_1). Η κορυφή στα $\lambda = 662 \text{ nm}$ ονομάζεται $Q_y(0,0)$ και οφείλεται στην μετάβαση $S_0(u' = 0) \rightarrow S_1(u'' = 0)$, ενώ η κορυφή σε $\lambda = 619 \text{ nm}$ είναι η $Q_x(0,1)$ και προέρχεται από την μετάβαση $S_0(u' = 0) \rightarrow S_1(u'' = 1)$. Στο φάσμα φθορισμού (Σχήμα 2.7) παρατηρούνται δυο κορυφές σε $\lambda = 669 \text{ nm}$ ($S_1(u'' = 0) \rightarrow S_0(u' = 0)$) και σε $\lambda = 721 \text{ nm}$

($S_1 (u'' = 0) \rightarrow S_0 (u' = 1)$) που αντανακλούν την αποδιέγερση του μορίου από την πρώτη διεγερμένη κατάσταση.



Σχήμα 2.7: Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού της Chl-a [8].

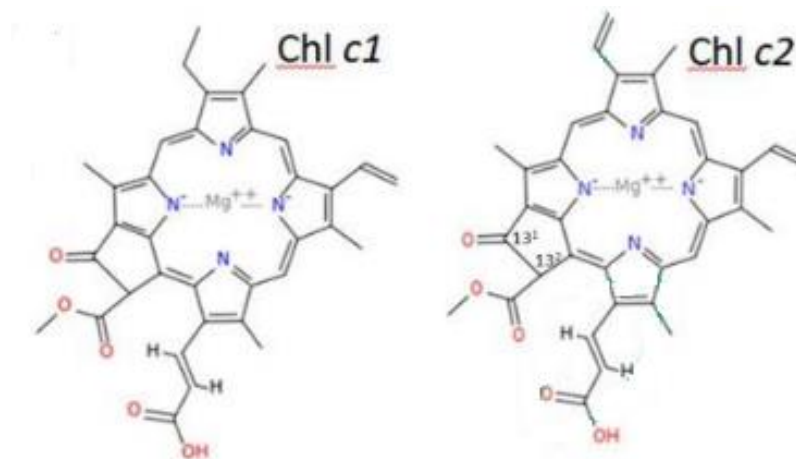
Η δυναμική εξέλιξη των φωτοφυσικών διεργασιών της Chl-a, κατόπιν διέγερσης στην κατάσταση S_2 , έχει μελετηθεί με την τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ και τα δεδομένα που έχουν αναλυθεί με την μέθοδο της ενιαίας και στοχευμένης ανάλυσης (global and target analysis) [9]. Η ανάλυση global των δεδομένων απέδωσε δυο φάσματα διαφορικής απορρόφησης που σχετίζονται με την εξέλιξη (Evolution-associated difference spectra-EADS, Βλέπε Κεφάλαιο 3) με χρόνους ζωής $\tau = 10$ ps και $\tau = 1500$ ps (Σχήμα 2.8). Στα φάσματα τύπου EADS παρατηρήθηκε μια αρνητική κορυφή σε $\lambda = 670$ nm, που αποδόθηκε σε απώλεια πληθυσμού από την θεμελιώδη κατάσταση (Ground State Bleaching-GSB) και σε εξαναγκασμένη εκπομπή από την πρώτη διεγερμένη κατάσταση (Stimulated Emission-SE) και μια θετική ταινία από 500-625 nm, που προέρχεται από απορρόφηση διεγερμένης κατάστασης (Excited-State Absorption, ESA, $S_1 \rightarrow S_n$). Στα EADS παρατηρήθηκε αύξηση του σήματος για την κορυφή σε $\lambda = 670$ nm με χρόνο ζωής $\tau = 10$ ps, ακολουθούμενη από απόσβεση με χρόνο ζωής $\tau = 1500$ ps [9].



Σχήμα 2.8: Φάσματα EADS της Chl-a με $\lambda_{\text{rump}} = 475 \text{ nm}$ [9].

Χλωροφύλλη τύπου c (Chlorophyll c-Chls-c)

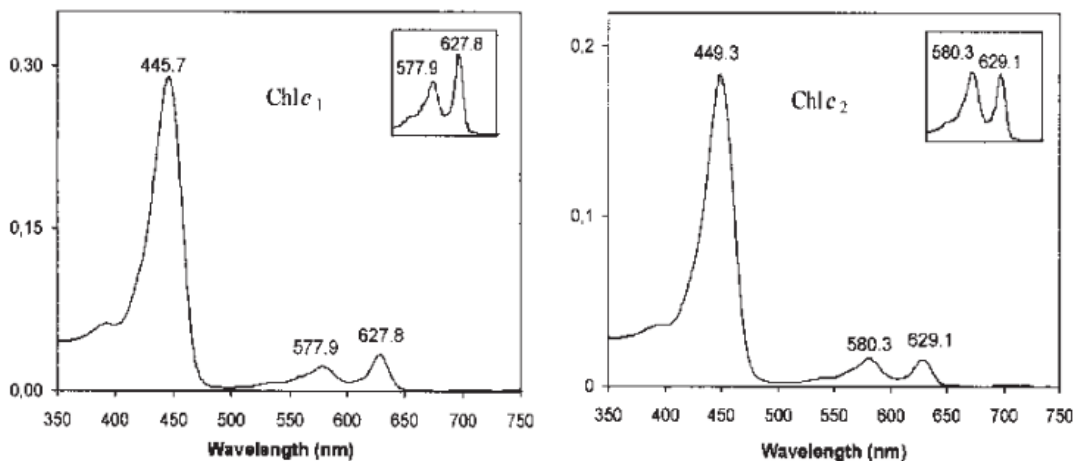
Οι Chls-c διαφέρουν από την Chl-a, καθώς έχουν πορφυρινικό δακτύλιο μεταλλομένο με μαγνήσιο και δεν διαθέτουν ομάδα φυτολίου. Η δομική αυτή τροποποίηση καθιστά τις Chls-c υδρόφιλες σε αντίθεση με την Chl-a που είναι υδρόφοβη. Η οικογένεια των Chls-c αποτελείται από πολλά μέλη με κύρια την Chl-c₁ και την Chl-c₂, των οποίων οι δομές τους απεικονίζονται στο Σχήμα 2.9 και είναι συστατικά των FCPs.



Σχήμα 2.9: Δομή της Chl-c₁ και της Chl-c₂ [5].

Η δομή των Chls-c παρουσιάζει ομοιότητες με το Pchl_{id}, γεγονός που οδήγησε τον Bogorad (1976) στην υπόθεση ότι το Pchl_{id} θα μπορούσε να είναι πρόδρομη ένωση και των Chls-c [10].

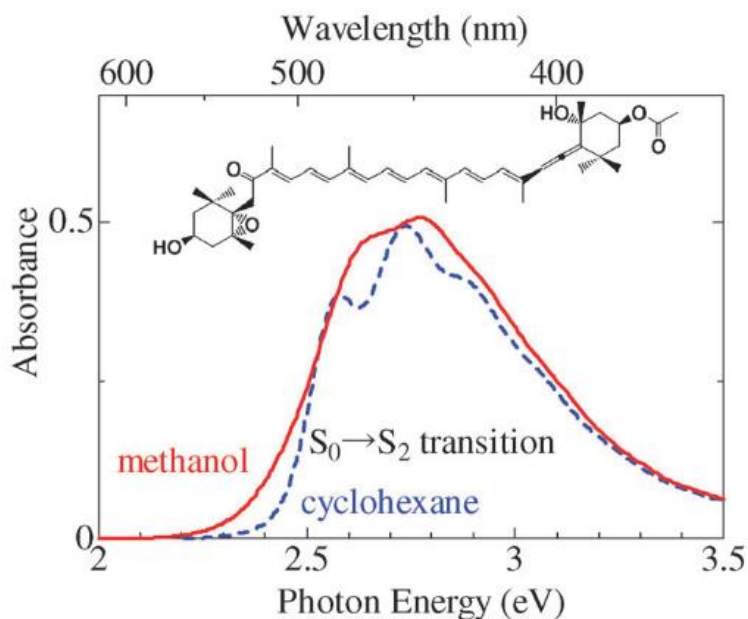
Τα φάσματα απορρόφησης των Chl-c₁ και Chl-c₂ παρουσιάζουν ομοιότητες με το φάσμα της Chl-a, αφού και αυτά παρουσιάζουν τις τρεις κύριες κορυφές Soret, Q_y και Q_x (Σχήμα 2.10). Στο φάσμα της Chl-c₁ η Soret ταινία είναι σε $\lambda = 446$ nm, η Q_y σε $\lambda = 628$ nm και η Q_x σε $\lambda = 578$ nm. Οι κορυφές στο φάσμα της Chl-c₂ είναι ελαφρώς μετατοπισμένες σε μεγαλύτερα μήκη κύματος αφού η Soret ταινία είναι σε $\lambda = 449$ nm, η Q_y σε $\lambda = 629$ nm και η Q_x σε $\lambda = 580$ nm.



Σχήμα 2.10: Φάσματα απορρόφησης των Chl-c₁ και Chl-c₂ [10].

2.3.2 Φουκοξανθίνη (Fucoxanthin)

Η Fx ανήκει στην ομάδα των κετο-καροτενοειδών, καθώς πέραν της εκτεταμένης συζυγίας των οχτώ διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα διαθέτει και έναν διπλό δεσμό άνθρακα-οξυγόνου (Σχήμα 2.11). Τα κετο-καροτενοειδή ανήκουν στην ομάδα συμμετρίας C_{2h}, οπότε η κατάσταση S₀ έχει συμμετρία 1¹A_g⁻, η S₁ 2¹A_g⁻ και η S₂ 1¹B_u⁺. Με βάση τους κανόνες επιλογής η μετάβαση S₀→S₁ είναι απαγορευμένη, οπότε δεν παρατηρείται στο φάσμα απορρόφησης, ενώ η μετάβαση S₀→S₂ είναι επιτρεπτή και εμφανίζεται ως μια ευρεία ταινία σε $\lambda = 400-500$ nm (Σχήμα 2.11) Δεδομένου ότι η μετάβαση S₀→S₁ είναι απαγορευμένη, ο φθορισμός από την κατάσταση S₁ είναι εξαιρετικά ασθενής (δεν παρουσιάζεται φάσμα φθορισμού).

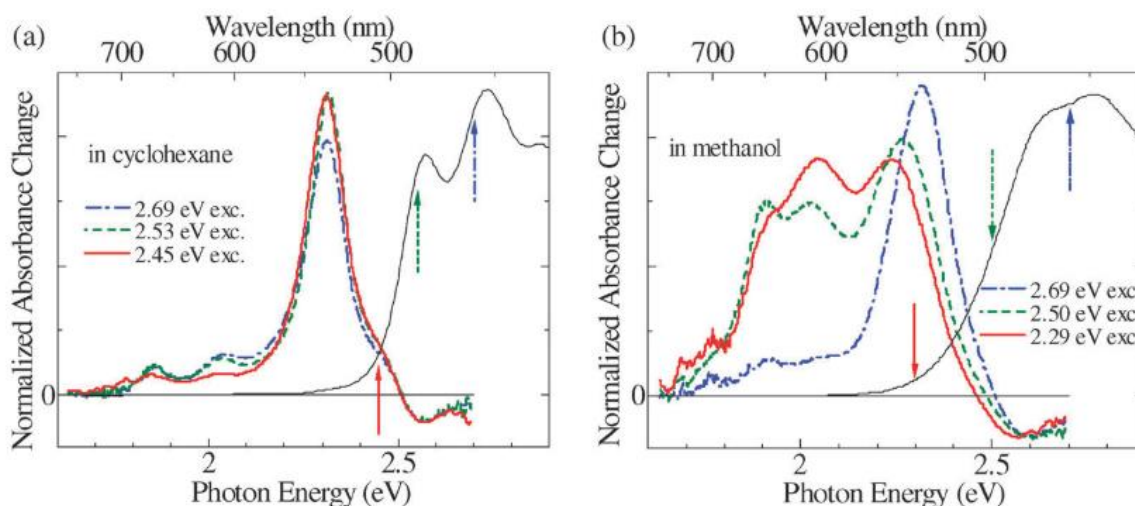


Σχήμα 2.11: Φάσμα απορρόφησης της Fx σε μεθανόλη (κόκκινο) και σε κυκλοεξάνιο (μπλε) [11].

Το φάσμα της Fx επηρεάζεται από την πολικότητα του διαλύτη όπως φαίνεται και στο Σχήμα 2.11. Συγκεκριμένα, ο μη πολικός διαλύτης (κυκλοεξάνιο) επιτρέπει την παρατήρηση της δονητικής υφής του φάσματος, ενώ ο πολικός (μεθανόλη) προκαλεί μετατόπιση (προς μικρότερα μήκη κύματος) και διεύρυνση της κορυφής. Οι διαφορές αυτές αποδίδονται σε ύπαρξη δυο διαμορφώσεων που λαμβάνει η Fx όταν βρίσκεται σε πολικό διαλύτη. Οι διαμορφώσεις αυτές καθορίζονται από την συμμετρία που έχει η καρβονυλική ομάδα ως προς την αλυσίδα των ανθράκων (συζυγία). Όταν η καρβονυλική ομάδα είναι ασύμμετρη ως προς την συζυγία σχηματίζεται η *s-trans* Fx (Fx_{red}), ενώ όταν είναι συμμετρική σχηματίζεται η *s-cis* Fx (Fx_{blue}). Τα δυο αυτά είδη παρουσιάζουν ελαφρώς μετατοπισμένα φάσματα απορρόφησης, προκαλώντας την διεύρυνση και την μετατόπιση του φάσματος της Fx όταν συνυπάρχουν στον πολικό διαλύτη [11].

Η τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ έχει εφαρμοστεί για την μελέτη των φωτοφυσικών διεργασιών της Fx, όταν αυτή διαλύεται σε μη πολικό ή πολικό διαλύτη. Το φάσμα παροδικής απορρόφησης της Fx σε διαλύτη κυκλοεξάνιο (Σχήμα 2.12) παρουσιάζει μια κύρια θετική κορυφή σε $\lambda = 539$ nm, που αποδίδεται σε μετάβαση ESA της κατάστασης S_1 ($S_1 \rightarrow S_n$). Επιπλέον, έχει εξεταστεί η εξάρτηση του φάσματος διεγερμένης κατάστασης από την ενέργεια διέγερσης. Παρατηρήθηκε ότι η μετάβαση σε $\lambda = 539$ nm της Fx σε κυκλοεξάνιο εξαρτάται ελάχιστα από την ενέργεια διέγερσης. Συγκεκριμένα, αυξάνοντας την

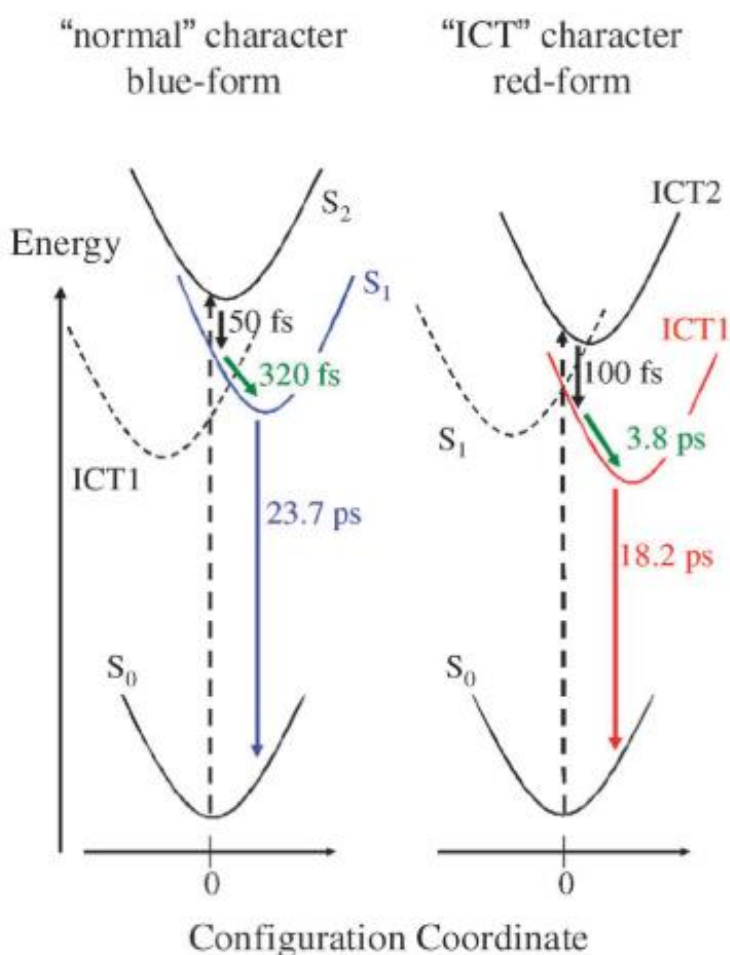
ενέργεια διέγερσης μεγεθύνεται το εύρος της ταινίας ESA, γεγονός που προκαλείται από την διεργασία της δονητικής χαλάρωσης στην κατάσταση S_1 . Το φάσμα διαφορικής απορρόφησης της Fx σε μεθανόλη, ωστόσο, παρουσιάζει εξάρτηση από την ενέργεια διέγερσης (Σχήμα 2.12). Η χρήση $\lambda_{\text{pump}} = 460 \text{ nm}$ (2.69 eV, μήκος κύματος διέγερσης- λ_{pump}) για την διέγερση της Fx σε μεθανόλη, αποδίδει ένα φάσμα διαφορικής απορρόφησης, όμοιο με το φάσμα της Fx σε κυκλοεξάνιο με κυρίαρχη την μετάβαση ESA της κατάστασης S_1 ($\lambda = 539 \text{ nm}$). Μειώνοντας την ενέργεια διέγερσης το φάσμα διαφέρει σημαντικά και παρουσιάζει μια επιπλέον κορυφή σε $\lambda = 649 \text{ nm}$ (1.91 eV), που οφείλεται σε μετάβαση ESA από την κατάσταση εσωτερικής μεταφοράς φορτίου (Internal Charge Transfer-ICT). Η περαιτέρω μείωση της ενέργειας διέγερσης προκαλεί αύξηση στην ένταση της κορυφής της $\text{ICT} \rightarrow S_n$ και μείωση της κορυφής της $S_1 \rightarrow S_n$. Οι φασματικές τροποποιήσεις που παρατηρούνται στα φάσματα διαφορικής απορρόφησης της Fx σε μεθανόλη οφείλονται στις δυο διαμορφώσεις που λαμβάνει το συγκεκριμένο καροτενοειδές. Με $\lambda_{\text{pump}} = 460 \text{ nm}$ διεγείρεται η Fx_{blue} , της οποίας το διαφορικό φάσμα δεν παρουσιάζει την κορυφή σε $\lambda = 649 \text{ nm}$, καθώς υποστηρίζεται ότι η μετάβαση $\text{ICT} \rightarrow S_n$ είναι απαγορευμένη. Η χρήση μεγαλύτερου λ_{pump} διεγείρει την Fx_{red} , της οποίας η συμμετρία καθιστά επιτρεπτή την μετάβαση $\text{ICT} \rightarrow S_n$ και το φάσμα απορρόφησης της περιέχει την κορυφή σε $\lambda = 649 \text{ nm}$.



Σχήμα 2.12: Φάσματα παροδικής απορρόφησης της Fx σε α) κυκλοεξάνιο και β) μεθανόλη [11].

Οι φωτοφυσικές διεργασίες που πραγματοποιούνται μετά τη διέγερση της Fx_{blue} είναι η εσωτερική μετατροπή από την κατάσταση S_2 στην S_1 με χρόνο ζωής $\tau = 50 \text{ fs}$ (χρόνος ζωής της κατάστασης S_2), η δονητική χαλάρωση στο χαμηλότερο δονητικό επίπεδο της κατάστασης S_1 με

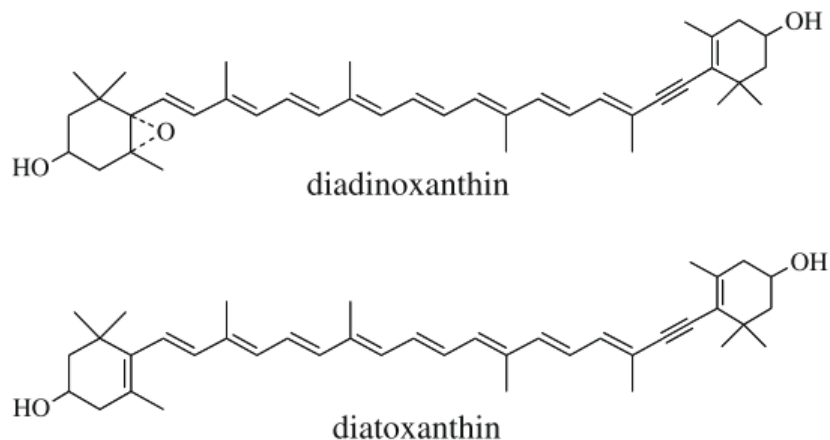
χρόνο ζωής $\tau = 320$ fs (χρόνος ζωής της δονητικά διεγερμένης κατάστασης S_1 (hot S_1)) και η αποδιέγερση της S_1 στην θεμελιώδη κατάσταση με χρόνο ζωής $\tau = 23.7$ ps (χρόνος ζωής της S_1) (Σχήμα 2.13). Ο μηχανισμός της $F_{x_{red}}$ περιλαμβάνει παρόμοιες διεργασίες: ο πληθυσμός της S_2 μεταβαίνει στην κατάσταση ICT με χρόνο ζωής $\tau = 100$ fs, η δονητική χαλάρωση στην ICT χαρακτηρίζεται από το χρόνο ζωής $\tau = 3.8$ ps και τέλος ο χρόνος ζωής της ICT είναι $\tau = 18.2$ ps (Σχήμα 2.13) [11]. Ο χρόνος ζωής είναι ο χρόνος που η τιμή της έντασης αντιστοιχεί στο $1/e$ της αρχικής έντασης.



Σχήμα 2.13: Σχηματική αναπαράσταση των φωτοφυσικών διεργασιών της F_x σε μεθανόλη [11].

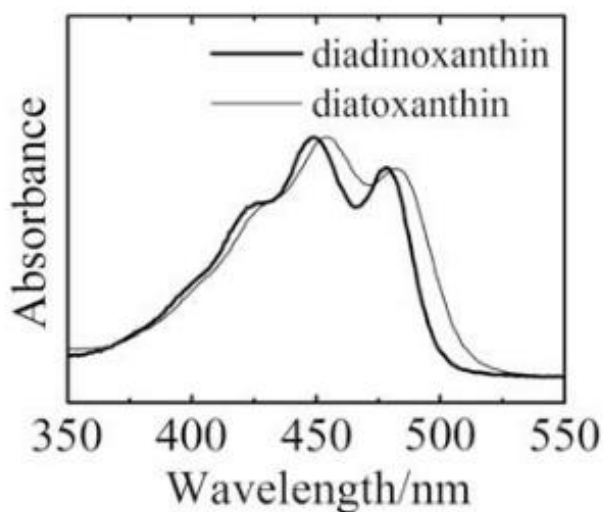
2.3.3 Διαδινοξανθίνη και Διατινοξανθίνη (Diadinoxanthin and Diatoxanthin)

Η διαδινοξανθίνη (Diadinoxanthin-Ddx) και η διατινοξανθίνη (Diatoxanthin-Dtx) είναι καροτενοειδή, όπως και η F_x (Σχήμα 2.14). Η Ddx αποτελείται από μια εκτεταμένη συζυγία οχτώ διπλών δεσμών άνθρακα-άνθρακα, ενώ η Dtx έχει εννέα διπλούς δεσμούς άνθρακα-άνθρακα.



Σχήμα 2.14: Χημική δομή της Ddx και της Dtx [12].

Όμοια με την Fx, η Ddx και η Dtx ανήκουν στην ομάδα συμμετρίας C_{2h} και η θεμελιώδης κατάσταση S_0 έχει συμμετρία $1^1A_g^-$, η S_1 $2^1A_g^-$ και η S_2 $1^1B_u^+$. Με βάση τους κανόνες επιλογής η μετάβαση $S_0 \rightarrow S_1$ είναι απαγορευμένη και για αυτά τα καροτενοειδή, ενώ στο φάσμα απορρόφησης ανιχνεύεται μια ευρεία ταινία στα 400-500 nm που αποδίδεται στην μετάβαση $S_0 \rightarrow S_2$ (Σχήμα 2.15). Ο φθορισμός από την S_1 είναι ασθενής οπότε δεν παρουσιάζεται φάσμα εκπομπής φθορισμού.



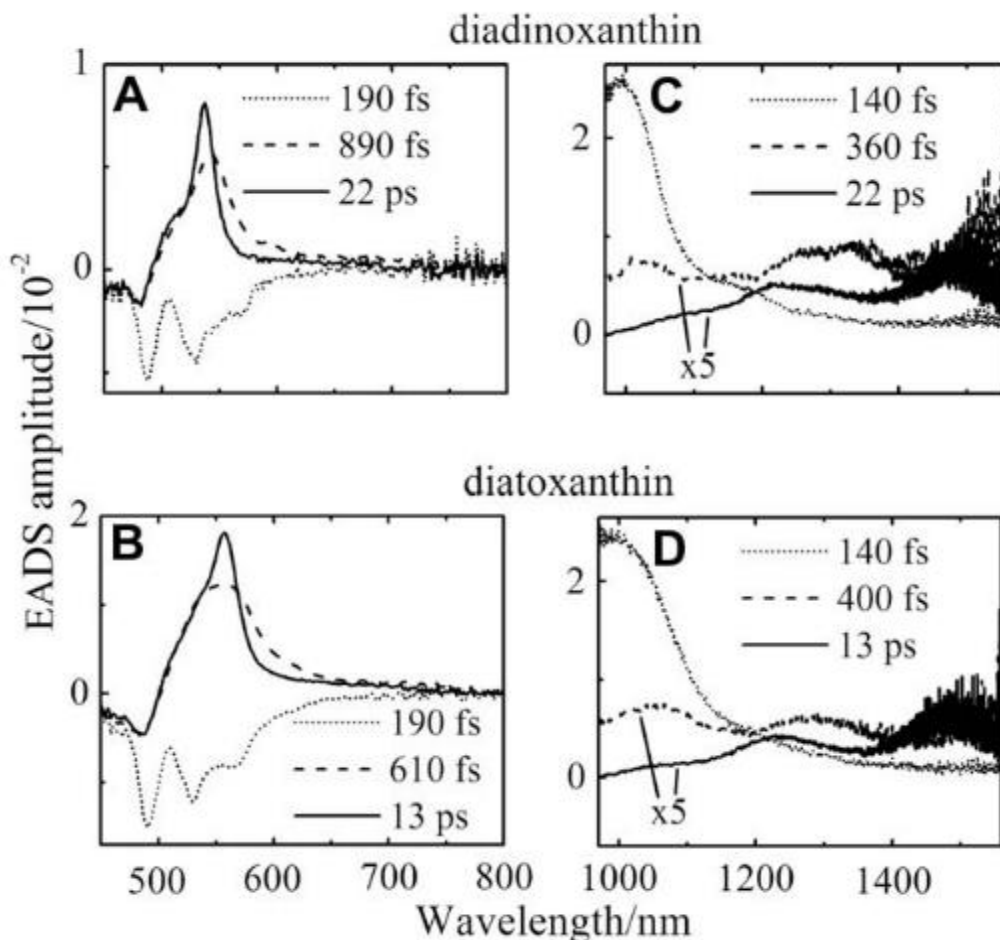
Σχήμα 2.15: Φάσματα απορρόφησης της Ddx και της Dtx [12].

Τα φάσματα απορρόφησης των δυο ενώσεων είναι παρόμοια, ωστόσο το φάσμα της Dtx είναι ελαφρώς μετατοπισμένο προς μεγαλύτερα μήκη κύματος σε σχέση με το φάσμα της Ddx, εξαιτίας

της ύπαρξης του επιπλέον διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα που διαθέτει η Dtx, ο οποίος μειώνει την ενέργεια της μετάβασης $S_0 \rightarrow S_2$.

Η μελέτη των καρτενοειδών Ddx και Dtx με την τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ απέδωσε φάσματα παροδικής απορρόφησης σε διάφορες χρονικές στιγμές, τα οποία αναλύθηκαν με την μέθοδο ανάλυσης global. Στην πρώτη σειρά του Σχήματος 2.16 απεικονίζονται τα EADS που προέκυψαν για την Ddx (A: υπεριώδους-ορατού, C: εγγύς υπέρυθρο), ενώ στην δεύτερη σειρά τα EADS της Dtx (B: υπεριώδους-ορατού, D: εγγύς υπέρυθρο). Το 1^ο EADS της Ddx με χρόνο ζωής $\tau = 140-190$ fs παρουσιάζει μια αρνητική κορυφή σε περιοχή από 500-600 nm, που αποδίδεται στο GSB/SE και μια ESA από στην κατάσταση S_2 στα 1000 nm. Ο χρόνος ζωής του 1^{ου} EADS αποδίδεται στην κατάσταση S_2 . Το 2^ο EADS με χρόνο ζωής

$\tau = 400-900$ fs προέρχεται από την δονητικά διεγερμένη κατάσταση S_1 και παρουσιάζει δύο μεταβάσεις ESA σε $\lambda \sim 550$ nm ($S_1 \rightarrow S_n$) και $\lambda = 1250$ nm ($S_1 \rightarrow S_n$). Το 3^ο EADS αποτελείται από μια στενή ESA σε $\lambda = 537$ nm και μια ESA σε $\lambda \sim 1300$ nm. Ο χρόνος ζωής $\tau = 22$ ps αποδίδεται στην δονητικά αποδιεγερμένη κατάσταση S_1 . Τα EADS της Dtx είναι παρόμοια με της Ddx, ωστόσο οι χρόνοι ζωής των καταστάσεων της είναι μικρότεροι. Ο χρόνος ζωής της S_2 είναι $\tau = 140$ fs, της δονητικά διεγερμένης S_1 είναι $\tau = 400-600$ fs και της δονητικά αποδιεγερμένης S_1 είναι $\tau = 13$ ps. Σημαντική διαφορά των EADS των δυο ενώσεων είναι η θέση της ESA, που προέρχεται από την κατάσταση S_1 . Η ESA της Dtx ($\lambda = 556$ nm) είναι μετατοπισμένη προς μεγαλύτερα μήκη κύματος κατά 36 nm σε σχέση με την ESA της Ddx και το εύρος της είναι μεγαλύτερο. Οι διαφορές αυτές οφείλονται στον επιπλέον διπλό δεσμό άνθρακα-άνθρακα που διαθέτει η Dtx και στην διαμορφωτική παραμόρφωση που επάγεται στην αλυσίδα ανθράκων από την παρουσία του πιο ευλύγιστου β-δακτυλίου. Η αύξηση της συζυγίας ενός μορίου οδηγεί σε μείωση της ενέργειας της διεγερμένης κατάστασης και κατ' επέκταση σε μετατόπιση των κορυφών του φάσματος απορρόφησης προς μεγαλύτερα μήκη κύματος.

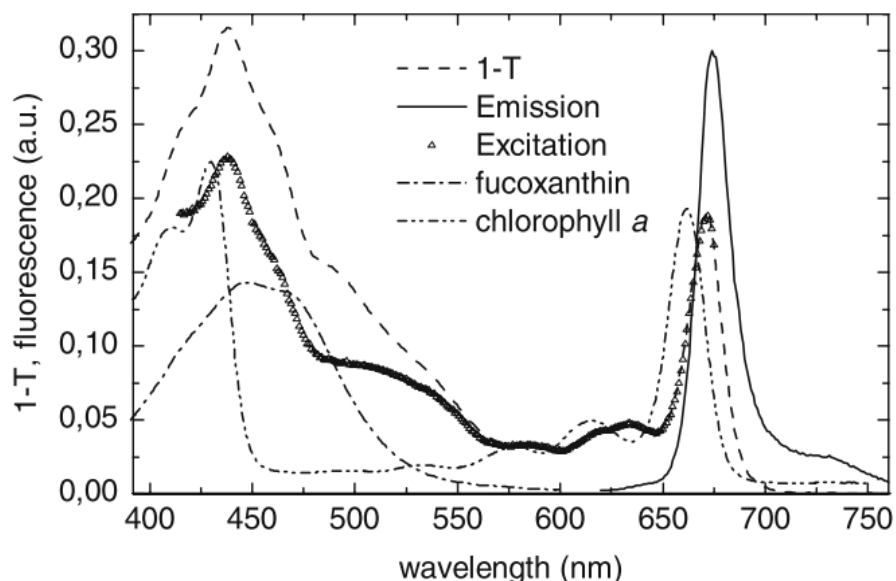


Σχήμα 2.16: Φάσματα EADS της Ddx και της Dtx [12].

2.4 Φασματοσκοπική μελέτη των Πρωτεϊνών Φουκοξανθίνης Χλωροφύλλης (Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins FCPs)

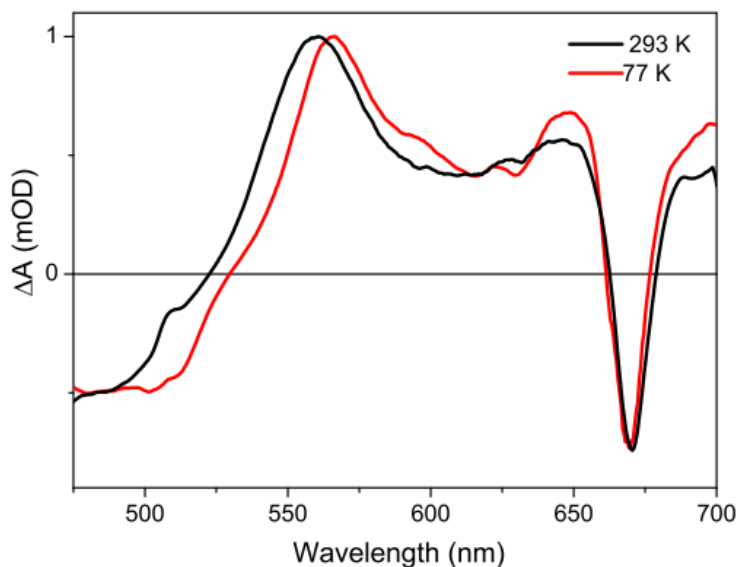
Το φάσμα απορρόφησης των FCPs (Σχήμα 2.17) παρουσιάζει τις χαρακτηριστικές κορυφές απορρόφησης της Chl-a, $\lambda_{\text{Soret}} = 450 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{Qy}} = 670 \text{ nm}$ και της Chl-c, $\lambda_{\text{Soret}} = 460 \text{ nm}$ και $\lambda_{\text{Qy}} = 635 \text{ nm}$. Η ευρεία κορυφή στην περιοχή $\lambda = 480\text{-}560 \text{ nm}$ προκύπτει από τη μετάβαση $S_0 \rightarrow S_2$ των Fxs. Το φάσμα εκπομπής φθορισμού των FCPs (Σχήμα 2.17) εμφανίζει μια κορυφή με μέγιστο σε $\lambda = 674 \text{ nm}$ που αποδίδεται στην Chl-a. Το φάσμα διέγερσης φθορισμού (Σχήμα 2.17) καταγράφηκε σε $\lambda_{\text{emission}} = 674 \text{ nm}$. Από τη σύγκριση του φάσματος διέγερσης φθορισμού με το αντίστοιχο φάσμα απορρόφησης γίνεται φανερή η ομοιότητα των δύο φασμάτων και συνεπώς εξάγεται το συμπέρασμα ότι μεταφέρεται ενέργεια από όλες τις χρωστικές προς την

Chl-a. Ωστόσο, η ένταση στο φάσμα διέγερσης φθορισμού είναι χαμηλότερη από την αντίστοιχη ένταση του φάσματος απορρόφησης για $\lambda < 550$ nm και συγκρίσιμη για $\lambda > 550$ nm. Η διαφοροποίηση, αυτή, στην ένταση του φάσματος για $\lambda < 550$ nm φανερώνει ότι οι Fx, που απορροφούν στην μπλε περιοχή του φάσματος μεταφέρουν ενέργεια λιγότερο αποδοτικά στην Chl-a σε σχέση με τις Fx που απορροφούν στην κόκκινη περιοχή.



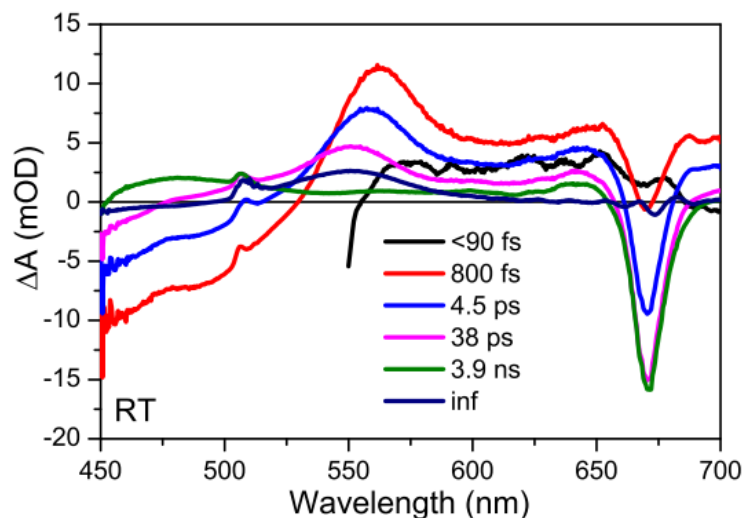
Σχήμα 2.17: Φάσματα απορρόφησης, εκπομπής φθορισμού και διέγερσης φθορισμού των FCPs [13].

Τα φάσματα διαφορικής απορρόφησης (Σχήμα 2.18) των FCPs κατόπιν επιλεκτικής διέγερσης των Fxs ($\lambda_{\text{pump}} = 510$ nm) εμφανίζουν μια ταινία με αρνητικό ΔA σε $\lambda = 450-525$ nm, που αποδίδεται στο GSB της Fx. Η ένταση της ταινίας αυτής με την πάροδο του χρόνου αποκτά θετικό πρόσημο και το σήμα που απομένει οφείλεται σε μετάβαση ESA από την κατάσταση S_1 της Chl-a. Η θετική ευρεία κορυφή στην περιοχή $\lambda = 550-650$ nm οφείλεται σε μετάβαση ESA από την κατάσταση S_1/ICT της Fx. Εντός του εύρους αυτού διακρίνονται δυο κορυφές, σε $\lambda = 560$ nm, εξαιτίας της μετάβασης $S_1 \rightarrow S_n$ και σε $\lambda \sim 625$ nm από την μετάβαση $ICT \rightarrow S_m$. Η κορυφή σε $\lambda = 670$ nm οφείλεται σε GSB/SE της Chl-a [13, 14, 15, 16, 17].



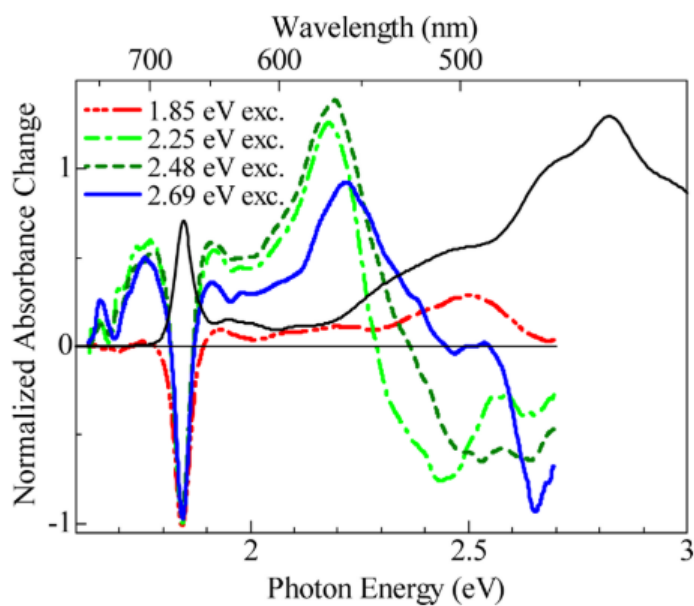
Σχήμα 2.18: Φάσματα διαφορικής απορρόφησης των FCPs που απομονώθηκε από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*. Τα φάσματα καταγράφηκαν 1 ps μετά την διέγερση του δείγματος με παλμό διέγερσης $\lambda_{\text{pump}} = 510$ nm. Το μαύρο φάσμα καταγράφηκε σε θερμοκρασία δωματίου $T = 293$ K και το κόκκινο σε θερμοκρασία $T = 77$ K. Τα φάσματα είναι κακονικοποιημένα ως προς την κορυφή σε $\lambda = 560$ nm [17].

Η ανάλυση των δεδομένων με τη μέθοδο global analysis [10] απέδωσε τα EADS που φαίνονται στο Σχήμα 2.19. Το 1^ο φάσμα EADS αποδίδεται στο χρόνο ζωής της κατάστασης S_2 της Fx ($\tau < 90$ fs), ενώ το 2^ο και το 3^ο EADS ($\tau = 800$ fs, $\tau = 4.5$ ps, αντίστοιχα) οφείλονται σε ένα βραχύχρονο και ένα μακρόχρονο κανάλι μεταφοράς ενέργειας από την κατάσταση S_1/ICT της Fx προς την κατάσταση S_1 της Chl-a. Το 4^ο φάσμα EADS ($\tau = 38$ ps) συνδέεται με το χρόνο ζωής της κατάστασης S_1 της Fx, το 5^ο φάσμα EADS ($\tau = 3.9$ ns) συσχετίζεται με το χρόνο ζωής της κατάστασης S_1 της Chl-a ενώ το 6^ο φάσμα EADS ($\tau = \infty$) σχετίζεται με το χρόνο ζωής της πρώτης τριπλής διεγερμένης κατάστασης (T_1) της Fx [17]. Η μελέτη των FCPs, που έχουν απομονωθεί από το διάτομο *Cyclotella meneghiniana*, απέφερε παρόμοιους χρόνους, οι οποίοι αποδόθηκαν στις ίδιες διεργασίες [13, 14, 15].



Σχήμα 2.19: Φάσματα EADS των FCPs που απομονώθηκε από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* [17].

Μεταβάλλοντας το μήκος κύματος διέγερσης μπορεί να επιλεγεί η διέγερση των Fx_{blue} ή των Fx_{red} των FCPs, γεγονός που προκαλεί την μεταβολή του φάσματος παροδικής απορρόφησης (Σχήμα 2.20). Η μείωση του λ_{pump} (διέγερση των Fx_{blue}) οδηγεί σε αύξηση των χρόνων ζωής των διεργασιών, λόγω της αύξησης της συνεισφοράς της S_1 στην κατάσταση S_1/ICT της Fx . Οι Fx_{red} παρουσιάζουν μικρότερους χρόνους ζωής αφού έχουν ενισχυμένη την συνεισφορά της ICT στην κατάσταση S_1/ICT .



Σχήμα 2.20: Φάσματα παροδικής απορρόφησης των FCPs που απομονώθηκε από καφέ άλγη. Τα φάσματα καταγράφηκαν 0.5 ps μετά την διέγερση του δείγματος με διαφορετικούς παλμούς διέγερσης [16].

Οι συνθήκες ανάπτυξης των διατόμων έχει δειχθεί ότι επηρεάζουν τη σύσταση των χρωστικών των FCPs. Συγκεκριμένα, όταν τα διάτομα αναπτύσσονται υπό συνθήκες υψηλής έντασης φωτός παρουσιάζουν αύξηση των καροτενοειδών Ddx και Dtx, και μείωση των Fx. Η διαφοροποίηση αυτή προστατεύει τις πρωτεΐνες μέσω του συστήματος NPQ [18, 19]. Τα FCPs, που έχουν αναπτυχθεί τόσο υπό συνθήκες χαμηλής έντασης φωτός (Low Light-LL) όσο και υπό συνθήκες υψηλής έντασης φωτός (High Light-HL) έχουν μελετηθεί με την τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ. Τα φάσματα διαφορικής απορρόφησης που προέκυψαν δεν παρουσίαζαν διαφορές, ένδειξη ότι τα μόρια Ddx και Dtx δεν συνεισφέρουν στις διεργασίες μεταφοράς ενέργειας από τις Fx στις Chls-a [15].

Στην παρούσα έρευνα θα μελετηθούν με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ, FCPs, που απομονώθηκαν από τα διάτομα *Phaeodactylum tricornutum* και *Fragilariopsis sp.* Στόχος είναι η διερεύνηση των φωτοφυσικών διεργασιών των FCPs και η συνεισφορά του οργανισμού προέλευσης στην λειτουργία τους. Κάθε διάτομο περιλαμβάνει περισσότερα από ένα είδος FCPs, τα οποία διεξάγουν διαφορετικές λειτουργίες [11]. Στην παρούσα έρευνα θα μελετηθεί ένα είδος FCP από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum* και δυο είδη FCPs από το διάτομο *Fragilariopsis sp.*, ώστε να διερευνηθεί ο ρόλος των διαφορετικών ειδών FCPs στη λειτουργία των διατόμων. Επιπλέον, θα ελεγχθεί η επίδραση των συνθηκών ανάπτυξης των FCPs στις φωτοφυσικές διεργασίες που πραγματοποιούν. Συγκεκριμένα, θα μελετηθούν FCPs που απομονώθηκαν από διάτομα, που αναπτύχθηκαν υπό συνθήκες (i) χαμηλής έντασης λευκού φωτός, (ii) υψηλής έντασης λευκού φωτός και (iii) χαμηλής έντασης κόκκινου φωτός. Η συγκεκριμένη έρευνα αναμένουμε να συντελέσει στην περαιτέρω κατανόηση του μηχανισμού λειτουργίας των FCPs και να βοηθήσει στην ανάπτυξη της βιοτεχνολογίας, αφού τα διάτομα θα μπορούσαν να χρησιμοποιηθούν σε περιβαλλοντικές εφαρμογές για την διαχείριση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης και τα FCPs σε φωτοβολταϊκά συστήματα για την συλλογή της ηλιακής ακτινοβολίας.

2.5 Βιβλιογραφία

- [1] Armbrust, E., V. (2009). The life of diatoms in the world's oceans. Nature, 459 (7244), 185-192. doi:10.1038/nature08057
- [2] Castro P., Huber M. E. Marine Biology, McGraw-Hill Companies, New York, USA, (2002).

- [3] Martino D. A., Meichenin A., Shi J., Pan K., Bowler C. (2007). Genetic and Phenotypic Characterization of *Phaedactylum Tricornutum* (Bacillariophyceae) Accessions. *J. Phycol.*, 43 (5), 992–1009. <https://doi.org/10.1111/j.1529-8817.2007.00384.x>
- [4] Jyothibabu R., Arunpandi N., Karnan C., Jagadeesan L., Manojkumar T. M., Balachandran K. K., Naqvi S. W. A. (2018). *Fragilariopsis sp.* bloom causes yellowish-brown waters off Alappuzha, south-central Kerala coast, India, during the mud bank-upwelling phase. *Current Science*, 115 (1), 152-159. <https://www.jstor.org/stable/26978162>
- [5] Wang W., Yu L. J., Xu C., Tomizaki T., Zhao S., Umena Y., Chen X., Qin X., Xin Y., Suga M., Han G., Kuang T., Shen J. R. (2019). Structural basis for blue-green light harvesting and energy dissipation in diatoms. *Science*, 363 (6427). <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aav0365>
- [6] Berg J. M., Tymoczko J.L., Stryer L. Βιοχημεία, Πανεπιστημιακές εκδόσεις Κρήτης, Ηράκλειο, Ελλάδα, (2012).
- [7] Hunsperger H. M., Ford C. J., Miller J. S., Cattolico R. A. (2016). Differential Regulation of Duplicate Light- Dependent Protochlorophyllide Oxidoreductases in the Diatom *Phaeodactylum tricornutum*. *PLoS ONE*, 11 (7). <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0158614>
- [8] Poniedziałek B., Falfushynska H. I., Rzymiski P. (2017). Flow cytometry as a valuable tool to study cyanobacteria: A mini-review. *Limnol. Rev.*, 17 (2), 89-95. <https://doi.org/10.1515/limre-2017-0009>
- [9] Sytina O. A., Van Stokkum I. H.M., Heyes D. J., Hunter N. C., Van Grondelle R., Groot M. L. (2010). Protochlorophyllide Excited-State Dynamics in Organic Solvents Studied by Time-Resolved Visible and Mid-Infrared Spectroscopy. *J. Phys. Chem. B*, 114 (12), 4335-4344. <https://doi.org/10.1021/jp9089326>
- [10] Grimm B., Porra R. J., Rüdiger W., Scheer H. Chlorophylls and Bacteriochlorophylls: Biochemistry, Biophysics, Functions and Applications Springer, Dordrecht, The Netherlands, (2006).
- [11] Kosumi D., Kusumoto T., Fujii R., Sugisaki M., Iinuma Y., Oka N., Takaesu Y., Taira T., Iha M., Frank H. A., Hashimoto H. (2011). Ultrafast excited state dynamics of fucoxanthin: excitation energy dependent intramolecular charge transfer dynamics. *Phys. Chem. Chem. Phys.*, 13 (22), 10762-10770. <https://doi.org/10.1039/C0CP02568B>

- [12] Enriquez M. M., Lafountain A. M., Budarz J., Fuciman M., Gibson G. N., Frank H. A. (2010). Direct determination of the excited state energies of the xanthophylls diadinoxanthin and diatoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum*. *Chemical Physics Letters*, 493 (4-6), 353-357. <https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.05.051>
- [13] Papagiannakis E., Van Stokkum I. H. M., Fey H., Büchel C., Van Grondelle R. (2005). Spectroscopic characterization of the excitation energy transfer in the fucoxanthin–chlorophyll protein of diatoms. *Photosynthesis Research*, 86 (1-2), 241-250. <https://doi.org/10.1007/s11120-005-1003-8>
- [14] Gildenhoff N., Herz J., Gundermann K., Büchel C., Wachtveitl J. (2010). The excitation energy transfer in the trimeric fucoxanthin–chlorophyll protein from *Cyclotella meneghiniana* analyzed by polarized transient absorption spectroscopy. *Chemical Physics*, 373 (1-2), 104-109. <https://doi.org/10.1016/j.chemphys.2010.02.012>
- [15] Gildenhoff N., Amarie S., Gundermann K., Beer A., Büchel C., Wachtveitl J. (2010). Oligomerization and pigmentation dependent excitation energy transfer in fucoxanthin–chlorophyll proteins. *Biochimica et Biophysica Acta*, 1797 (5), 543-549. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.01.024>
- [16] Kosumi D., Kita M., Fujii R., Sugisaki M., Oka N., Takaesu Y., Taira T., Iha M., Hashimoto H. (2012). Excitation Energy-Transfer Dynamics of Brown Algal Photosynthetic Antennas. *J. Phys. Chem. Lett.*, 3 (18), 2659-2664. <https://doi.org/10.1021/jz300612c>
- [17] West R. G., Bina D., Fuciman M., Kuznetsova V., Litvín R., Polívka T. (2018). Ultrafast multi-pulse transient absorption spectroscopy of fucoxanthin chlorophyll a protein from *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1859 (5), 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.02.011>
- [18] Beer A., Gundermann K., Beckmann J., Büchel C. (2006). Subunit Composition and Pigmentation of Fucoxanthin-Chlorophyll Proteins in Diatoms: Evidence for a Subunit Involved in Diadinoxanthin and Diatoxanthin Binding. *Biochemistry* 45 (43), 13046-13053. <https://doi.org/10.1021/bi061249h>
- [19] Tselios C., Varotsis C. (2022). Evidence for reversible light-dependent transitions in the photosynthetic pigments of diatoms. *RSC Advances* 12 (49) 31555-31563. <https://doi.org/10.1039/D2RA05284A>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 3

Πειραματική Διαδικασία, Οργανολογία και Μέθοδος Ανάλυσης

3.1 Πειραματική Διαδικασία

Τα δείγματα που μελετήθηκαν στην παρούσα εργασία προήλθαν από το Τεχνολογικό Πανεπιστήμιο Κύπρου και την ερευνητική ομάδα του κ. Κωνσταντίνου Βαρώτση. Συγκεκριμένα, απομονώθηκαν FCPs από τα διάτομα: *Phaeodactylum tricornutum* και *Fragilariopsis sp.* Δυο είδη FCPs λήφθηκαν από κάθε διάτομο, το κλάσμα 1 και το κλάσμα 3, μέσω της μεθόδου υγρής χρωματογραφίας υψηλής πίεσης (High-Performance Liquid Chromatography-HPLC). Τα διάτομα αναπτύχθηκαν σε διαφορετικές συνθήκες φωτός: χαμηλής έντασης λευκό φως, υψηλής έντασης λευκό φως και κόκκινο φως. Αναλυτικά τα δείγματα που μελετήθηκαν είναι:

- *Phaeodactylum tricornutum*, κλάσμα 1, χαμηλή έντασης λευκό φως (Tric-LL-Fraction-1)
- *Phaeodactylum tricornutum*, κλάσμα 1, κόκκινο φως (Tric-RL-Fraction-1)
- *Fragilariopsis sp.*, κλάσμα 1, χαμηλή έντασης λευκό φως (Frag-LL-Fraction-1)
- *Fragilariopsis sp.*, κλάσμα 1, υψηλής έντασης λευκό φως (Frag-HL-Fraction-1)
- *Fragilariopsis sp.*, κλάσμα 1, κόκκινο φως (Frag-RL-Fraction-1)
- *Fragilariopsis sp.*, κλάσμα 3, χαμηλή έντασης λευκό φως (Frag-LL-Fraction-3)
- *Fragilariopsis sp.*, κλάσμα 3, υψηλής έντασης λευκό φως (Frag-HL-Fraction-3)
- *Fragilariopsis sp.*, κλάσμα 3, κόκκινο φως (Frag-RL-Fraction-3)

Η τεχνική HPLC χρησιμοποιήθηκε από την ερευνητική ομάδα του Τεχνολογικού Πανεπιστημίου Κύπρου για την εύρεση της σύστασης των χρωστικών εντός των FCPs. Συγκεκριμένα για κάθε δείγμα βρέθηκαν οι συγκεντρώσεις:

- Tric-LL-Fraction-1: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.920 mol Chl-c/ mol Chl-a, 5.291 mol Fx/ mol Chl-a, 4.241 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.181 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.162 mol Dtx/ mol Chl-a, 7.443 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 0.390 mol Chlide-b/ mol Chl-a

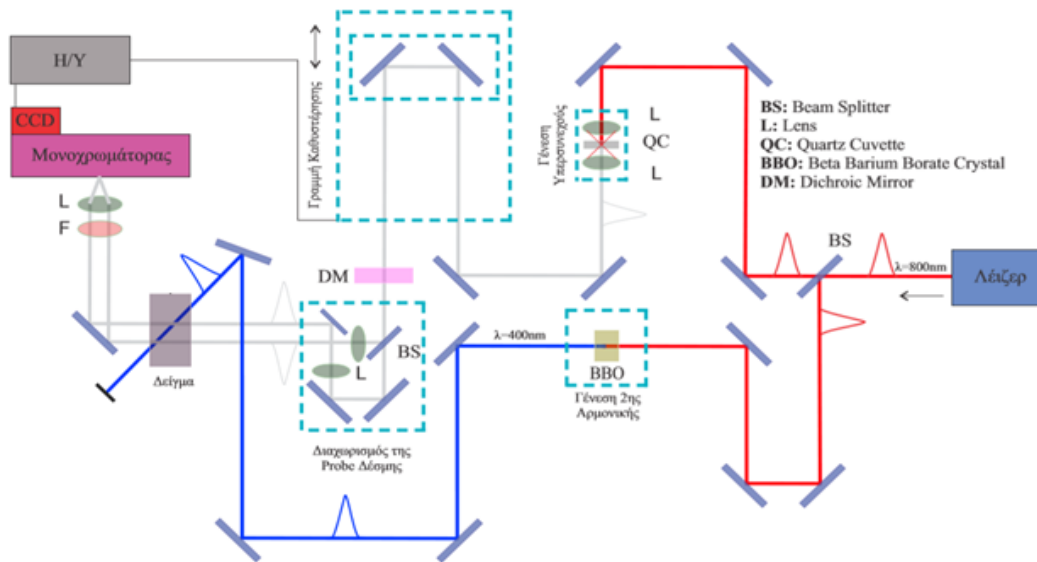
- Tric-RL-Fraction-1: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.257 mol Chl-c/ mol Chl-a, 4.799 mol Fx/ mol Chl-a, 2.501 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.074 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.516 mol Dtx/ mol Chl-a, 4.966 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 0.546 mol Chlide-b/ mol Chl-a
- Frag-LL-Fraction-1: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.664 mol Chl-c/ mol Chl-a, 7.115 mol Fx/ mol Chl-a, 4.104 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.177 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.059 mol Dtx/ mol Chl-a, 4.713 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 1.006 mol Chlide-b/ mol Chl-a
- Frag-HL-Fraction-1: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.220 mol Chl-c/ mol Chl-a, 4.165 mol Fx/ mol Chl-a, 4.448 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.208 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.674 mol Dtx/ mol Chl-a, 2.313 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 0.331 mol Chlide-b/ mol Chl-a
- Frag-RL-Fraction-1: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.054 mol Chl-c/ mol Chl-a, 1.674 mol Fx/ mol Chl-a, 0.682 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.018 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.136 mol Dtx/ mol Chl-a, 0.667 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 0.075 mol Chlide-b/ mol Chl-a
- Frag-LL-Fraction-3: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.374 mol Chl-c/ mol Chl-a, 0.617 mol Fx/ mol Chl-a, 0.011 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.046 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.001 mol Dtx/ mol Chl-a, 0.000 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 0.000 mol Chlide-b/ mol Chl-a
- Frag-HL-Fraction-3: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 1.421 mol Chl-c/ mol Chl-a, 1.891 mol Fx/ mol Chl-a, 0.230 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.005 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.066 mol Dtx/ mol Chl-a, 1.041 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 1.899 mol Chlide-b/ mol Chl-a
- Frag-RL-Fraction-3: 1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.693 mol Chl-c/ mol Chl-a, 1.303 mol Fx/ mol Chl-a, 0.072 mol Ddx/ mol Chl-a, 0.051 mol β-καροτένιο/ mol Chl-a, 0.009 mol Dtx/ mol Chl-a, 1.551 mol Chlide-a/ mol Chl-a, 0.053 mol Chlide-b/ mol Chl-a

Οι αναλογίες των χρωστικών εντός των FCPs συντελεί στην ερμηνεία των δεδομένων που εξάγονται από την τεχνική της χρονοαναλύομενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ.

3.2 Πειραματική Διάταξη της Τεχνικής Χρονοαναλύομενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ

Η πειραματική διάταξη της τεχνικής της χρονοαναλύομενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ, που χρησιμοποιήθηκε στην παρούσα μελέτη, διαθέτει ως πηγή φωτός παλμικό λέιζερ FEMTOPOWER COMPACT PRO, Ti:sapphire, χρονικής διάρκειας fs, φασματογράφο SR-303i

για την ανάλυση του φάσματος του φωτός και ανιχνευτή CCD Newton για την μετατροπή του αναλογικού σήματος σε ψηφιακό.



Σχήμα 3.1: Σχηματικό διάγραμμα της πειραματικής διάταξης χρονοαναλύομενης υπερταχείας φασματοσκοπίας.

Η δέσμη που παράγεται από το λέιζερ κατευθύνεται σε διαχωριστή δέσμης (beam splitter), παράγοντας δύο νέες δέσμες, που θα αποτελέσουν τη δέσμη άντλησης (pump) και τη δέσμη ανίχνευσης (probe). Η δέσμη ανίχνευσης οδηγείται μέσω κατόπτρων σε κυψελίδα με απιονισμένο ύδωρ, με αποτέλεσμα τη γένεση του υπερσυνεχούς λευκού φωτός. Στη συνέχεια, το υπερσυνεχές λευκό φως κατευθύνεται σε οπισθοανακλαστή (back reflector), ο οποίος είναι τοποθετημένος σε κινούμενο μοτέρ προκαλώντας τη χρονική καθυστέρηση της δέσμης. Η χρονικά καθυστερημένη δέσμη διαχωρίζεται με χρήση διαχωριστή δέσμης παράγοντας τη δέσμη ανάλυσης (probe) και τη δέσμη αναφοράς (reference). Οι δύο δέσμες εστιάζονται μέσω φακών στο δείγμα και διαπερνώντας το, καταλήγουν στο φασματογράφο και στη συνέχεια τον ανιχνευτή. Η δέσμη άντλησης οδηγείται μέσω κατόπτρων σε κρύσταλλο BBO (Beta Barium Borate Crystal-BBO) για τη γένεση της δεύτερης αρμονικής και εστιάζεται μέσω κατόπτρων στο δείγμα, ώστε να συμπίπτει με τη δέσμη ανάλυσης (Σχ. 3.1). Το δείγμα βρίσκεται υπό ανάδευση μέσω περιστρεφόμενης κυψελίδας (spinning cell) για να αποφευχθεί το φαινόμενο της φωτόλυσης.

3.2.1 Λείζερ

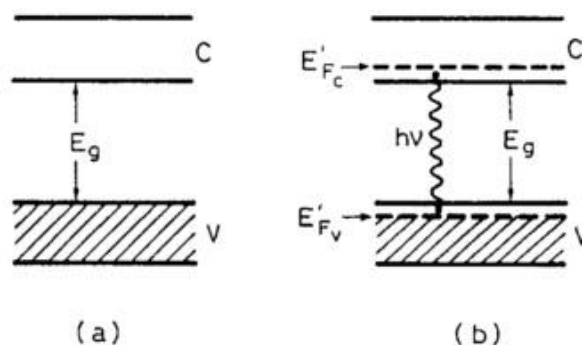
Η παραγωγή του παλμού γίνεται από σύστημα λέιζερ Ti:sapphire, FEMTOPOWER COMPACT PRO, που εκπέμπει ακτινοβολία σε περιοχή $\lambda = 800 \pm 40$ nm. Η χρονοδιάρκεια του

παλμού είναι $\tau \leq 30$ fs ενώ η τιμή της ενέργεια εξόδου $E \geq 0.8$ mJ/pulse. Η συχνότητα επανάληψης των παλμών (pulse repetition rate) είναι $1 \text{ kHz} \pm 5\%$, η διάμετρος της δέσμης είναι 15 mm και η πόλωση είναι οριζόντια. [1].

Το FEMTOPOWER COMPACT PRO αποτελείται από ένα λέιζερ διόδων, το οποίο αντλεί ένα κρύσταλλο Nd:YVO₄ για την παραγωγή ακτινοβολίας χαρακτηριστικής συχνότητας, ικανής να αντλεί τον κρύσταλλο Ti:sapphire. Το λέιζερ Nd:YLF διεγείρει τον κρύσταλλο Ti:sapphire, που βρίσκεται στον ενισχυτή. Τα βασικά τμήματα του λέιζερ είναι ο ταλαντωτής (oscillator), ο διαπλατυντής (stretcher), ο ενισχυτής (amplifier) και ο συμπιεστής (compressor). Η παραγωγή του παλμού λέιζερ πραγματοποιείται μέσω της διαδικασίας της εγκλειδωσης των ρυθμών.

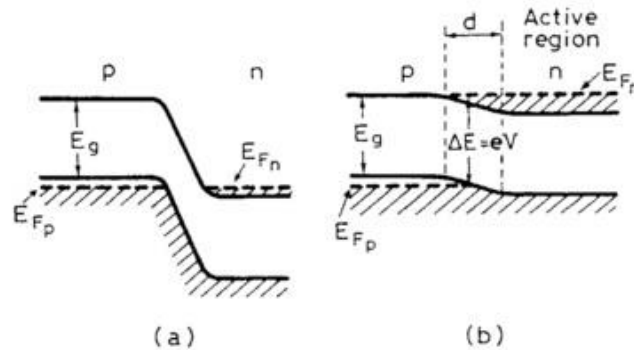
Λείζερ διόδων

Έστω ένας ημιαγωγός με συμπληρωμένη τη ζώνη σθένους (V) και κενή τη ζώνη αγωγιμότητας (C), η οποία απέχει ενεργειακά από την ζώνη σθένους, E_g . Μερικά ηλεκτρόνια διεγείρονται από την ζώνη σθένους στην ζώνη αγωγιμότητας και, έπειτα, πολύ γρήγορα (~ 1 ps) τα ηλεκτρόνια, που θα βρίσκονται στην ζώνη αγωγιμότητας θα επιστρέψουν στα χαμηλότερα μη κατειλημμένα ενεργειακά επίπεδα της ζώνης αυτής. Παράλληλα το ίδιο θα συμβεί και με τις οπές της ζώνης σθένους, οι οποίες θα συσσωρευθούν στα υψηλότερα ενεργειακά επίπεδα της ζώνης αυτής. Η εκπομπή φωτός επιτυγχάνεται με την επανασύνδεση των ηλεκτρονίων από τη ζώνη αγωγιμότητας με μια οπή από τη ζώνη σθένους. Ο μηχανισμός αυτός για την παραγόμενη ακτινοβολία από επανασύνδεση είναι ο μηχανισμός εκπομπής φωτός από μια δίοδο LED (Light Emitting Diode).



Σχήμα 3.2: Αρχή λειτουργίας ενός λέιζερ ημιαγωγού. α) Απεικόνιση ζώνης σθένους (V), ζώνης αγωγιμότητας (C) και ενεργειακής απόστασης των ζωνών (E_g). β) Απεικόνιση της διέγερσης των ηλεκτρονίων στην ζώνη αγωγιμότητας και της επανασύνδεσης ηλεκτρονίου-οπής [2].

Στην περίπτωση που ο παραπάνω μηχανισμός γίνει εξαναγκασμένα μπορεί να οδηγήσει στην ακτινοβολία λέιζερ. Ο πιο διαδεδομένος τρόπος εξαναγκασμένης παραγωγής της ακτινοβολίας του λέιζερ είναι η εφαρμογή διαφοράς δυναμικού (τάσης) στην επαφή του ημιαγωγού.



Σχήμα 3.3: α) Δομή ενεργειακών ζωνών μιας επαφής p-n ενός λέιζερ ημιαγωγού σε μηδενικό εξωτερικό ηλεκτρικό πεδίο. β) Η αλλαγή των ενεργειακών ζωνών του α) υπό την επίδραση εξωτερικού ηλεκτρικού πεδίου [2].

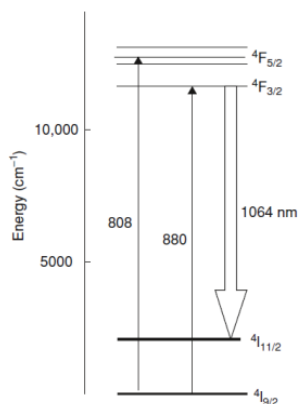
Το επίπεδο Fermi των ενεργειακών ζωνών μιας επαφής p-n ευρίσκεται στην ζώνη σθένους για την περιοχή p (E_{Fp}) και στην ζώνη αγωγιμότητας για την περιοχή n (E_{Fn}). Απουσία εξωτερικού πεδίου τα δυο ενεργειακά επίπεδα Fermi, των δυο περιοχών, είναι ευθυγραμμισμένα (Σχ. 3.3α). Εφαρμόζοντας, μια τάση V στην επαφή p-n προκύπτει διαχωρισμός των επιπέδων Fermi, με ενέργεια ΔE μεταξύ τους. Ως αποτέλεσμα αυτού, στην περιοχή της επαφής, τα ηλεκτρόνια από την ζώνη σθένους της περιοχής n μεταφέρονται στην ζώνη αγωγιμότητας της και οι οπές από την ζώνη αγωγιμότητας της περιοχής p περνούν στην ζώνη σθένους της (Σχ. 3.3β). Εξαιτίας των φαινομένων αυτών ικανοποιείται η συνθήκη αναστροφής πληθυσμών για την παραγωγή λέιζερ.

Nd:YVO₄

Ο κρύσταλλος υτρίου βαναδίου με ιόντα νεοδυμίου (Nd:YVO₄) διεγείρεται στις ενεργειακές καταστάσεις $^4F_{5/2}$ και $^4F_{3/2}$ μέσω παλμών άντλησης μήκους κύματος $\lambda = 808$ nm και $\lambda = 880$ nm αντίστοιχα, ενώ η ακτινοβολία λέιζερ $\lambda = 1064$ nm προκύπτει μέσω της μετάβασης $^4F_{3/2} \rightarrow ^4I_{11/2}$ (Σχ. 3.4). Η χρήση του παλμού άντλησης $\lambda = 880$ nm συνεισφέρει στην μείωση της κβαντικής θέρμανσης, καθώς η διαφορά των μηκών κύματος του παλμού άντλησης και του εκπεμπόμενου παλμού είναι μικρή. Η δεύτερη αρμονική του λέιζερ Nd:YVO₄ χρησιμοποιείται ως πηγή άντλησης άλλων λέιζερ όπως είναι το Ti:sapphire.

Οι κρύσταλλοι βαναδίου είναι εκ φύσεως διπλοθλαστικοί, επάγοντας γραμμική πόλωση στην εξαγόμενη δέσμη λέιζερ. Επιπλέον, ο συντελεστής απορροφητικότητας του κρυστάλλου εξαρτάται από την πόλωση, αφού η μέγιστη απορροφητικότητα επιτυγχάνεται όταν ο παλμός άντλησης έχει την ίδια πόλωση με τον παλμό που εκπέμπεται.

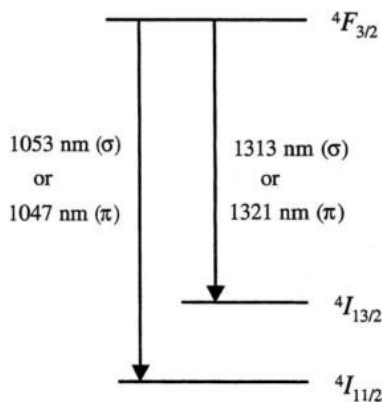
Το λέιζερ Nd:YVO₄ έχει το πλεονέκτημα της υψηλής ενεργού διατομής της εξαναγκασμένης εκπομπής και την ευρεία απορρόφηση σε $\lambda = 809$ nm, ενώ μειονεκτεί στην σχετικά χαμηλή θερμική αγωγιμότητα και τον μικρό χρόνο ζωής φθορισμού.



Σχήμα 3.4: Απλοποιημένο διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων του Nd:YVO₄ [3].

Nd:YLF

Η χημική δομή του κρυστάλλου Nd:YLF είναι Nd⁺³:LiYF₄. Ο κρύσταλλος εμφανίζει τρία μέγιστα απορρόφησης στα 792, 797 και 806 nm, με υψηλότερη απορρόφηση στα 792 nm, ωστόσο, τα περισσότερα λέιζερ διόδων, που αντλούν τον κρύσταλλο, παράγουν ακτινοβολία στα 806 nm και λιγότερα στα 792 nm.

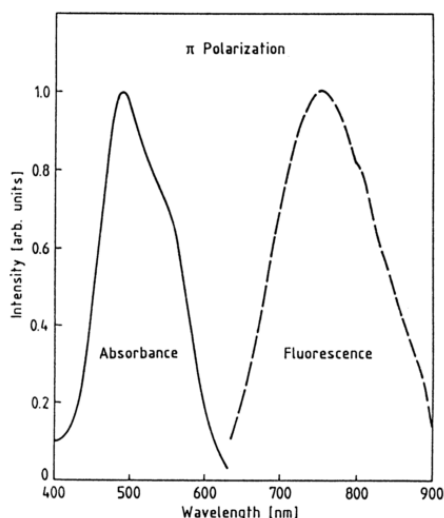


Σχήμα 3.5: Απλοποιημένο διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων του Nd:YLF [3].

Οι εκπομπές της ακτινοβολίας λέιζερ αντιστοιχούν σε μεταβάσεις από το επίπεδο $^4F_{3/2}$ σε ενεργειακά χαμηλότερα επίπεδα, δύο μεταβάσεις περίπου στα 1.05 μm και δύο περίπου στα 1.3 μm , όπως παρατηρείται και από το διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων του Nd:YLF (Σχ. 3.5). Ο κρύσταλλος του Nd:YLF είναι διπλοθλαστικό υλικό προκαλώντας την επιθυμητή μετάβαση με ρύθμιση της πόλωσης. Για παράδειγμα, τοποθετώντας έναν εσωτερικό πολωτή στην κοιλότητα μπορεί να γίνει επιλογή είτε των 1047 nm (έκτακτη δέσμη) είτε των 1053 nm (τακτική δέσμη). Το ίδιο ισχύει και για τις δυο μεταβάσεις γύρω από τα 1.3 μm , με τη διαφορά ότι είναι απαραίτητη η καταστολή των μεταβάσεων λέιζερ στα 1.05 μm . Η χρήση των μεταβάσεων λέιζερ στα 1.3 μm γίνεται για την παραγωγή κόκκινου φωτός ενώ η διπλάσια συχνότητα λέιζερ του Nd:YLF, περίπου στα 0.65 μm , χρησιμοποιείται πολύ συχνά για την άντληση του λέιζερ Ti:sapphire [3].

Ti:sapphire

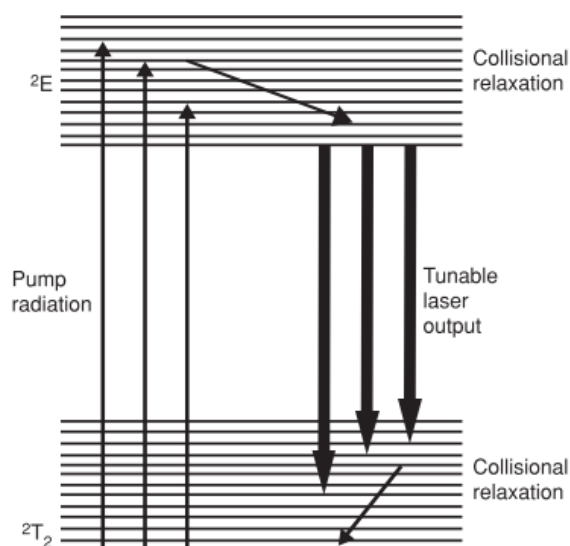
Το υλικό Ti:sapphire σχηματίζεται κατά την αντικατάσταση ιόντος Al^{3+} με Ti^{3+} στο πλέγμα του Al_2O_3 . Ο κρύσταλλος, αποτελείται από ζαφείρι (Al_2O_3) με προσμίξεις 0.1% Ti^{3+} κατά βάρος.



Σχήμα 3.6: Φάσματα απορρόφησης και φθορισμού του ιόντος Ti^{3+} σε Al_2O_3 (ζαφείρι) [3].

Οι κρύσταλλοι $\text{Ti}:\text{Al}_2\text{O}_3$ παρουσιάζουν μια ευρεία ζώνη απορρόφησης στην κυανή-πράσινη περιοχή του ορατού φάσματος με μέγιστο απορρόφησης περίπου στα 500 nm. Η δεύτερη αρμονική συχνότητα του λέιζερ Nd:YLF εμπίπτει σε αυτή την περιοχή μηκών κύματος και χρησιμοποιείται ως πηγή άντλησης του κρύσταλλου Ti:sapphire. Η εκπομπή του λέιζερ

Ti:sapphire αναμένεται στα 780 nm με εύρος περίπου 180 nm (FWHM), όπως πιστοποιείται και από το φάσμα εκπομπής φθορισμού.



Σχήμα 3.7: Διάγραμμα ενεργειακών επιπέδων του Ti:sapphire [3].

Η μετάβαση λέιζερ πραγματοποιείται από το διεγερμένο επίπεδο 2E στο θεμελιώδες επίπεδο 2T_2 . Η οπτική άντληση διεγείρει τα ιόντα Ti^{3+} στο ανώτατο επίπεδο λέιζερ και έπειτα μέσω δονητικής χαλάρωσης, αυτά, καταλήγουν στο κατώτερο δονητικό επίπεδο από όπου πραγματοποιείται η μετάβαση λέιζερ. Μέσω αποδιέγερσης τα ιόντα οδηγούνται στο κατώτερο δονητικό επίπεδο του θεμελιώδους επιπέδου. Η ισχυρή αλληλεπίδραση των ατόμων Ti και του κρύσταλλου ξενιστή σε συνδυασμό με την μεγάλη ηλεκτρονική κατανομή μεταξύ των δυο ενεργειακών επιπέδων, καθιστά την κορυφή ευρεία.

Η δομή των ενεργειακών επιπέδων του ιόντος Ti^{3+} διαφέρει από αυτή των μεταβατικών μετάλλων, λόγω της απουσίας ενεργειακών επιπέδων d, υψηλότερης ενέργειας από το επίπεδο λέιζερ. Αυτή η απλή δομή ενεργειακών επιπέδων (διαμόρφωση $3d^1$) εκμηδενίζει την πιθανότητα πραγματοποίησης του φαινομένου της απορρόφησης διεγερμένης κατάστασης (excited-state absorption-ESA), το οποίο περιορίζει την λειτουργία των λέιζερ, που περιέχουν μέταλλα μετάπτωσης [3].

Ταλαντωτής (Oscillator)

Ο ταλαντωτής (oscillator) του λέιζερ αποτελεί ένα συνδυασμό δυο βασικών συνιστωσών, ενός οπτικού ενισχυτή (optical amplifier) και ενός οπτικού αντηχείου (optical resonator). Το

οπτικό αντηχείο περιλαμβάνει δυο επίπεδα ή κοίλα κάτοπτρα, που βρίσκονται σε κατάλληλη γωνία σε σχέση με τον άξονα του ενεργού υλικού. Ο ρόλος του αντηχείου είναι να συζευγνύει την φάση του σήματος, που προκύπτει από το ενισχυμένο μέσο.

Η άντληση προκαλεί την αναστροφή του πληθυσμού των ηλεκτρονίων του υλικού λέιζερ οδηγώντας σε αποθήκευση της ενέργειας στο υψηλότερο επίπεδο λέιζερ. Μόλις αυτή η ενέργεια απελευθερωθεί στην οπτική δέσμη μέσω της εξαναγκασμένης εκπομπής, ξεκινά η διαδικασία της ενίσχυσης. Το σύστημα θα ξεκινήσει να ταλαντώνεται μόνο αν αντισταθμιστούν οι εσωτερικές απώλειες από την απολαβή (η διαδικασία κατά την οποία μια ταλάντωση ενισχύεται και έπειτα η νέα ενισχυμένη ταλάντωση ενισχύεται ξανά). Η έκταση της απολαβής καθορίζεται από την ανακλαστικότητα των καθρεφτών του αντηχείου και, προφανώς, μείωση της ανακλαστικότητας των καθρεφτών συνεπάγεται μείωση του συντελεστή απολαβής. Ο καθρέφτης στην έξοδο του λέιζερ είναι εν μέρει διαπερατός, για ένα κλάσμα της ακτινοβολίας, ώστε να μπορεί να διαφύγει η ακτινοβολία από τον ταλαντωτή (oscillator) [3].

Πιο αναλυτικά, ο ρόλος του αντηχείου είναι η διατήρηση μιας διαμόρφωσης του ηλεκτρομαγνητικού πεδίου, του οποίου οι απώλειες αναπληρώνονται από το μέσο ενίσχυσης, μέσω της επαγόμενης εκπομπής. Με αυτό τον τρόπο, το αντηχείο ορίζει τα φασματικά, κατευθυντικά και χωρικά χαρακτηριστικά της ακτινοβολίας λέιζερ και το μέσο ενίσχυσης χρησιμεύει ως πηγή ενέργειας.

Διαπλατυντής (Stretcher)

Η δέσμη, που εξέρχεται από τον ταλαντωτή οδηγείται στον διαπλατυντή, ύαλο SF57 υπό γωνία Brewster. Η αρχή λειτουργίας ενός διαπλατυντή είναι ο χωρικός και χρονικός διαχωρισμός των διαφόρων μηκών κύματος μιας δέσμης λέιζερ που διέρχεται μέσω αυτού. Η ακτινοβολία με το μικρότερο μήκος κύματος (μικρότερη ταχύτητα) θα πραγματοποιήσει μεγαλύτερη οπτική διαδρομή συγκριτικά με την ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος (μεγαλύτερη ταχύτητα), οδηγώντας στον διαχωρισμό τους, στο χώρο και στο χρόνο. Η δέσμη έπειτα από τον διαπλατυντή οδηγείται στον ενισχυτή [1].

Οπτικός ενισχυτής (Optical Amplifier)

Η αρχή λειτουργίας του ενισχυτή είναι η παραγωγή υψηλότερης πυκνότητας φωτονίων καθώς η δέσμη λέιζερ διαπερνά το μέσο ενίσχυσης (gain medium). Ο ενισχυτής, που

χρησιμοποιείται στην παρούσα εργασία είναι ένας ενισχυτής πολλαπλών διελεύσεων (multi-pass amplifier), που αποτελείται από δυο φακούς, το μέσο ενίσχυσης και από δυο ζεύγη όπισθο-ανακλαστών (retroreflectors). Το μέσο ενίσχυσης είναι κρύσταλλος Ti:sapphire σε θάλαμο κενού που ψύχεται μέσω συστήματος Peltier. Όταν δέσμη λέιζερ διέρχεται από το ενεργό υλικό (μέσο απολαβής) καταλήγει στους όπισθο-ανακλαστές, και μετατοπίζεται οριζόντια, ώστε να πραγματοποιηθεί η επόμενη διέλευση [1]. Η διαδικασία της ενίσχυσης πραγματοποιείται σε δυο στάδια:

1. Αρχικά πραγματοποιούνται τέσσερις διελεύσεις μέσα από τον κρύσταλλο και εν συνεχεία η δέσμη καταλήγει στη κυψελίδα Pockels (Pockels Cell).
2. Στην κυψελίδα Pockels επιλέγεται ένας παλμός από το τρένο παλμών για να ενισχυθεί περαιτέρω. Ο παλμός αυτός πραγματοποιεί επιπλέον τέσσερις διελεύσεις μέσα από το μέσο ενίσχυσης και έπειτα καταλήγει στους φακούς mode-matching, οι οποίοι ρυθμίζουν το μέγεθος της δέσμης, ώστε να πραγματοποιηθεί η τελευταία διέλευση από το μέσο ενίσχυσης.

Συμπιεστής (Compressor)

Η ενισχυμένη δέσμη, που καταλήγει στο συμπιεστή, οδηγείται σε δυο ζεύγη πρισμάτων, μέσω οπτικών. Η αρχή λειτουργίας των ζευγών πρισμάτων Brewster βασίζεται στην μικρότερη οπτική διαδρομή που θα διανύσει ακτινοβολία μικρότερου μήκους κύματος (μικρότερη ταχύτητα) εν συγκρίσει με ακτινοβολία μεγαλύτερου μήκους κύματος (μεγαλύτερη ταχύτητα) επιτυγχάνοντας μείωση της χρονικής και χωρικής διαφοράς των διάφορων μηκών κύματος της δέσμης [1].

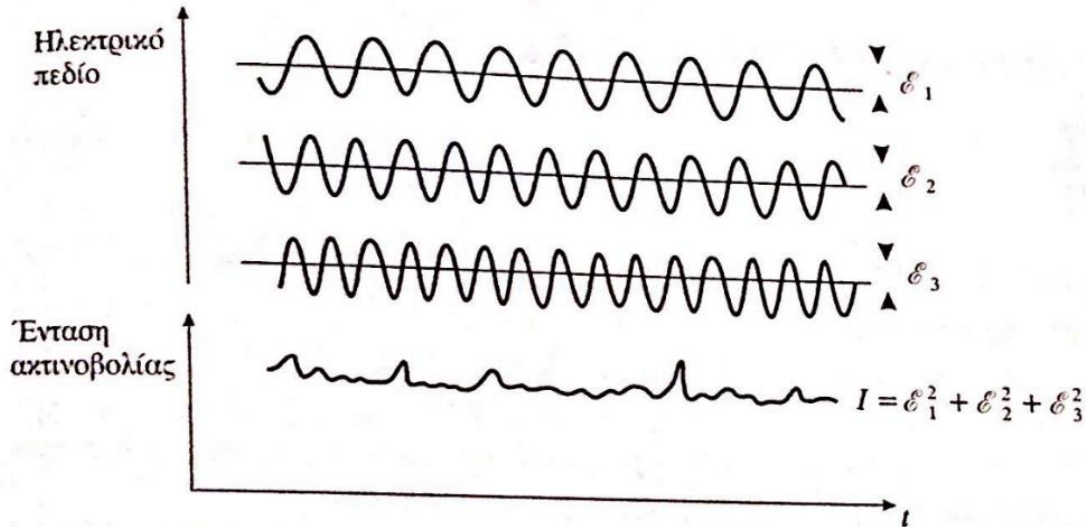
Εγκλείδωση Ρυθμών (Mode-Locking)

Η εγκλείδωση ρυθμών χρησιμοποιείται για την παραγωγή περιοδικών, υψηλής ισχύος και μικρής χρονικής διάρκειας παλμών λέιζερ. Μια τυπική μη-ομογενώς διευρυμένη κοιλότητα λέιζερ υποστηρίζει ταλαντώσεις σε πολλούς ρυθμούς ταυτόχρονα. Η έξοδος λέιζερ ως συνάρτηση του χρόνου, εξαρτάται από τις σχετικές φάσεις, τις συχνότητες και τα πλάτη των ρυθμών. Το ηλεκτρικό πεδίο συναρτήσει του χρόνου δίνεται από την σχέση:

$$E(t) = \sum_{n=0}^{N-1} (E_0)_n \exp [i(\omega_n t + \delta_n)] \quad (3.1)$$

όπου $(E_0)_n$ είναι το πλάτος, ω_n είναι η γωνιακή συχνότητα και δ_n είναι η φάση του νιοστού ρυθμού.

Οι παράμετροι αυτοί μεταβάλλονται έχοντας ως αποτέλεσμα οι ρυθμοί να είναι ασύμφωνοι και η ολική ένταση της ακτινοβολίας να είναι το άθροισμα των εντάσεων ακτινοβολίας των ανεξάρτητων ρυθμών (Σχ. 3.8) [4].



Σχήμα 3.8: Μη εγκλειδωμένοι ρυθμοί, που οι εντάσεις ακτινοβολίας έχουν τυχαίες διακυμάνσεις [4].

Η ολική ένταση ακτινοβολίας δίδεται από τη σχέση:

$$I = NE_0^2 \quad (3.2)$$

με την παραδοχή ότι όλοι οι ρυθμοί N έχουν πλάτος E_0 . Η ένταση της ακτινοβολίας παρουσιάζει μικρές διακυμάνσεις στην περίπτωση που δυο ή τρεις ρυθμοί είναι σε φάση κάποια χρονική στιγμή.

Εξαναγκάζοντας τους διάφορους ρυθμούς να διατηρήσουν την ίδια φάση δ ο ένας με τον άλλον (εγκλειδωση των παλμών λείζερ), δηλαδή $\delta_n = \delta$, η ολική ένταση ακτινοβολίας υπολογίζεται προσθέτοντας τα ανεξάρτητα ηλεκτρικά πεδία. Η νέα ολική έντασης ακτινοβολίας δίνεται από τον τύπο:

$$E(t) = E_0 \exp(i\delta) \sum_{n=0}^{N-1} \exp(i\omega_n t) \quad (3.3)$$

Αντικαθιστώντας το ω_n με $\omega - n\delta\omega$, όπου ω είναι η γωνιακή συχνότητα του ρυθμού με την μεγαλύτερη συχνότητα και $\delta\omega$ ($\delta\omega = \pi c/L$) είναι η διαφορά (γωνιακής) συχνότητας μεταξύ των ρυθμών η εξίσωση (3.3) γίνεται:

$$E(t) = E_0 \exp(i\delta) \sum_{n=0}^{N-1} \exp[i(\omega - n\delta\omega)t] = E_0 \exp[i(\omega t + \delta)] \sum_{n=0}^{N-1} \exp\left(-\frac{\pi i n c t}{L}\right)$$

ή

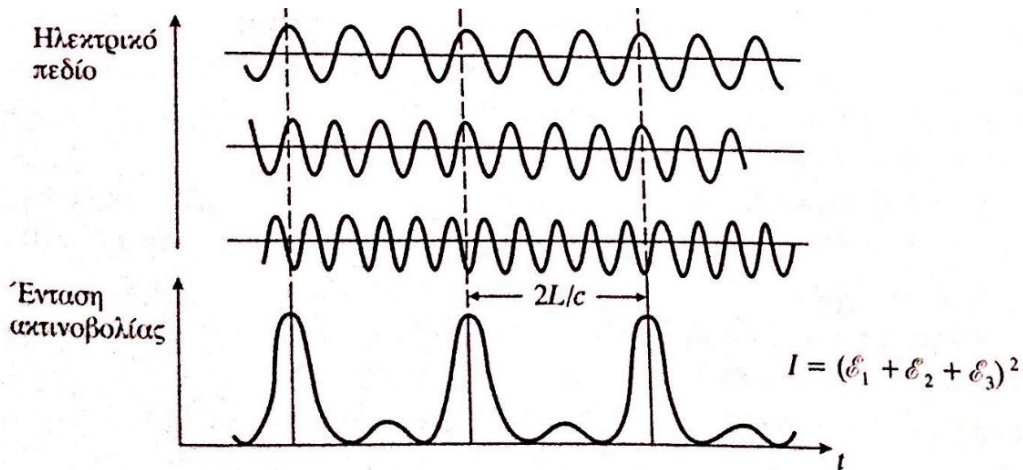
$E(t) = E_0 \exp[i(\omega t + \delta)] \{1 + \exp(-i\varphi) + \exp(-2i\varphi) + \dots + \exp[-(N-1)i\varphi]\}$ (3.4)
 όπου $\varphi = \text{pc}t/L$. Ο όρος που ευρίσκεται στην αγκύλη είναι γεωμετρική πρόοδος και η εξίσωση (3.4) μετατρέπεται [4]:

$$E(t) = E_0 \exp[i(\omega t + \delta)] \frac{\sin(\frac{N\varphi}{2})}{\sin(\frac{\varphi}{2})} \quad (3.5)$$

Η νέα ένταση ακτινοβολίας I δίνεται από τον τύπο:

$$I = E_0^2 \frac{\sin^2(\frac{N\varphi}{2})}{\sin^2(\frac{\varphi}{2})} \quad (3.6)$$

Η μορφή της εξίσωσης (3.6), για $N=3$, απεικονίζεται στο Σχήμα 3.8:



Σχήμα 3.9: Εγκλειδωμένοι ρυθμοί, που οι σχέσεις των φάσεων των ρυθμών κρατιούνται σταθερές και οι παλμοί που παράγονται είναι μικρής χρονικής διάρκειας και ισχυροί. Η χρονική απόσταση των παλμών είναι $2L/c$ και η χρονική διάρκεια $(1/N)/(2L/c)$ [4].

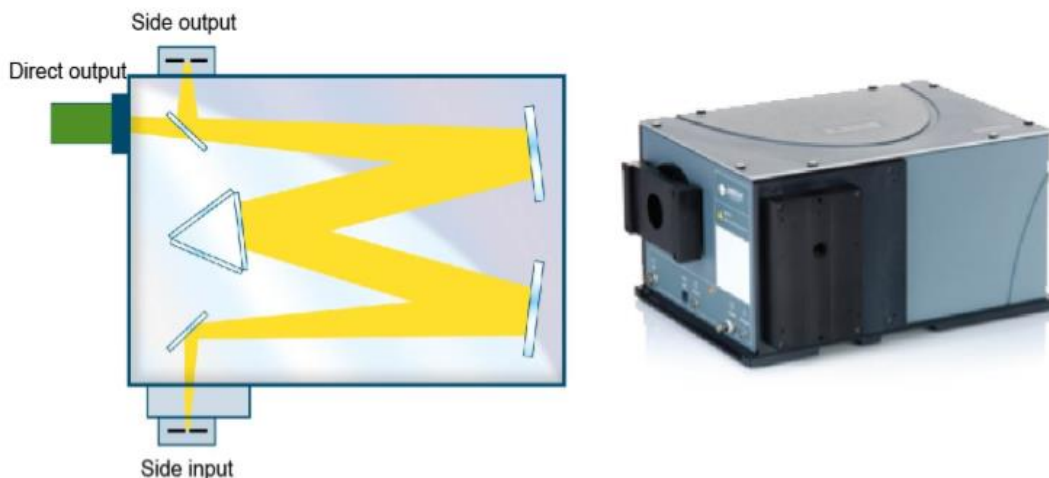
Η ένταση ακτινοβολίας $I(t)$ είναι περιοδική ($\Delta\varphi = 2\pi$) για το χρονικό διάστημα $t = 2L/c$, το οποίο είναι ο χρόνος που χρειάζεται η ακτινοβολία για να πραγματοποιήσει έναν πλήρη κύκλο (μια πλήρη διαδρομή) μέσα στην κοιλότητα. Η μέγιστη τιμή της έντασης είναι $N^2 E_0^2$ και προκύπτει για τιμές $\varphi = 0$ ή π , όπου p είναι ένας ακέραιος για τον οποίο η τιμή της συνάρτησης $\sin^2(N\varphi/2)/\sin^2(\varphi/2)$ ισούται με N^2 . Παρομοίως, η ελάχιστη τιμή της ακτινοβολίας, το μηδέν, προκύπτει όταν $N\varphi/2 = p\pi$, όπου p είναι ένας μη μηδενικός ακέραιος, γεγονός που πραγματοποιείται όταν $\varphi = 2p\pi/N$ ή $t = (1/N)(2L/c)p$. Επομένως, η χρονική διάρκεια των μεγίστων, η οποία είναι ο χρόνος που απαιτείται για να μειωθεί η ένταση της ακτινοβολίας από την μέγιστη τιμή της σε μια σχεδόν μηδενική ($p = 1$), είναι $(1/N)(2L/c)$. Η έξοδος ενός λείζερ εγκλειδωμένων ρυθμών αποτελείται από μια σειρά παλμών μικρής χρονικής διάρκειας, οι οποίοι απέχουν χρονικά $2L/c$ και ο καθένας έχει ισχύ κορυφής (peak power) ίση με N φορές τη μέση

ισχύ. Ο λόγος της χρονικής απόστασης των παλμών ως προς το εύρος του παλμού είναι προσεγγιστικά ίσος με τον αριθμό των ρυθμών, δηλαδή $(2L/c)/[(2L/c)(1/N)] = N$. Για να αποκτηθούν υψηλής ισχύος, μικρής χρονικής διάρκειας παλμοί ο αριθμός των ρυθμών πρέπει να είναι μεγάλος, γεγονός που προκύπτει από μια διευρυμένη μετάβαση μετάβαση λέιζερ και μια κοιλότητα μεγάλου μήκους [4].

3.2.2 Φασματογράφος Andor Shamrock SR-303i

Στην παρούσα εργασία χρησιμοποιήθηκε φασματογράφος περιθλαστικού φράγματος τύπου Czerny-Turner (Andor Technologies) Shamrock SR-303i. Ο φασματογράφος έχει εστιακό μήκος $f = 30.3$ cm και περιέχει περιθλαστικό φράγμα διακριτικής ικανότητας 150 grooves/mm. Η αντίστροφη γραμμική διασπορά $d\lambda/dy$ του φράγματος είναι 21.56 nm/mm, όταν η γωνία περίθλασης είναι $\theta = 45^\circ$ και η διακριτική ικανότητα $\Delta\lambda$ για $\lambda = 300$ nm είναι 0.87 [5].

Η ακτινοβολία που εισέρχεται στο φασματογράφο μέσω της σχισμής εισόδου κατευθύνεται ως αποκλίνουσα δέσμη στο πρώτο κοίλο κάτοπτρο, το οποίο ευθυγραμμίζει (παραλληλίζει) το φως και το κατευθύνει στο φράγμα περίθλασης. Ιδανικά εφόσον το φως προβάλλεται σε όλη την επιφάνεια του φράγματος, επιτυγχάνεται η μέγιστη δυνατή ανάλυση. Στην συνέχεια η ακτινοβολία ανακλάται από το φράγμα σε διαφορετικές γωνίες, βάσει του μήκους κύματος της (φαινόμενο περίθλασης-συμβολής), και οδηγείται σε ένα δεύτερο κοίλο κάτοπτρο, το οποίο την εστιάζει στον ανιχνευτή (Σχ. 3.10).



Σχήμα 3.10: Σχηματική αναπαράσταση της ροής της ακτινοβολίας εντός του φασματογράφου και φωτογραφία του φασματογράφου Andor Shamrock SR-303i [5].

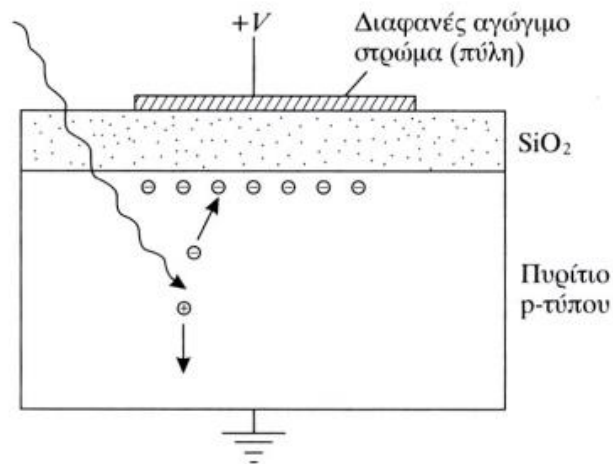
Η αντίστροφη διασπορά δίνεται από τον τύπο:

$$\frac{d\lambda}{dy} = \frac{\alpha_N \cdot \cos\theta}{n_d \cdot f} \quad (3.7)$$

όπου α_N είναι η απόσταση διαγραμμισμού, το αντίστροφο του αριθμού των αυλακώσεων ανά μονάδα μήκους, θ είναι η γωνία μεταξύ της κάθετα προσπίπτουσας δέσμης στο φράγμα και της περιθλώμενης, n_d είναι η τάξη περίθλασης και f είναι η εστιακή απόσταση του κατόπτρου [5].

3.2.3 Ανιχνευτής CCD Newton

Η διάταξη συζευγμένου φορτίου (Charged Coupled Devices-CCD) αποτελείται από ένα πυκνωτή μετάλλου-οξειδίου(μονωτής)-ημιαγωγού (Metal Oxide Semiconductor-MOS), στο οποίο ως μονωτής χρησιμοποιείται SiO_2 . Ο ημιαγωγός είναι τύπου p και το μέταλλο είναι ένα ηλεκτρόδιο.

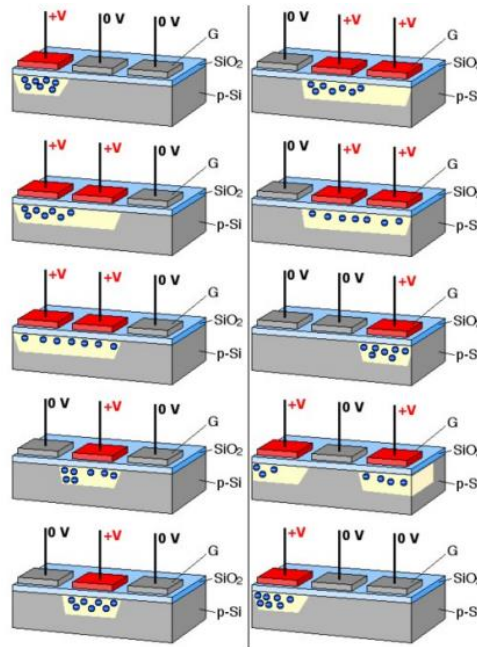


Σχήμα 3.11: Πυκνωτής MOS [4].

Στο σύστημα εφαρμόζεται ορθή ηλεκτρική πόλωση (forward bias) σε σχέση με το πυρίτιο. Η προσπίπτουσα ακτινοβολία δημιουργεί ζεύγη ηλεκτρονίων και οπών. Τα ηλεκτρόνια θα διαχωριστούν από τις οπές λόγω του δυναμικού με αποτέλεσμα να συγκεντρωθούν στο κάτω μέρος του πυριτίου. Το ποσό του φορτίου που θα φτάσει κοντά στο πυρίτιο είναι ανάλογο προς την ολική φωτεινή ροή που προσπίπτει στην διάταξη κατά την διάρκεια της μέτρησης [4].

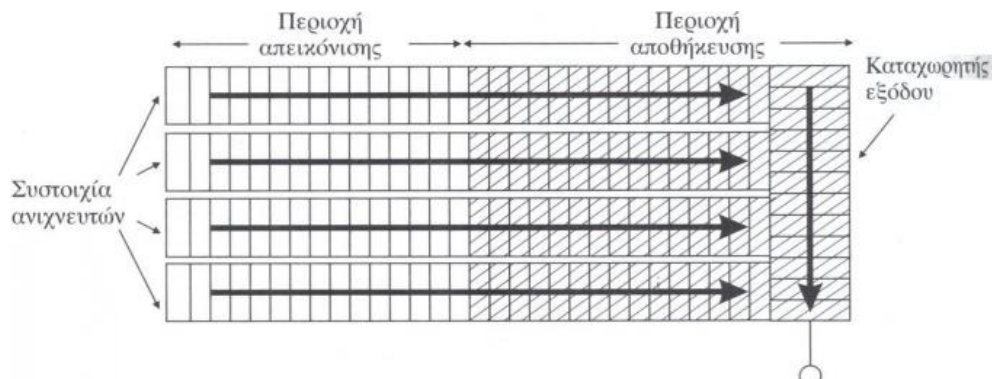
Η χρήση συστοιχίας CCD, που αποτελείται από μια σειρά τριών πυκνωτών MOS βοηθά στην σειριακή σάρωση του σήματος. Εφαρμόζοντας δυναμικό στη πρώτη πύλη συσσωρεύεται το φορτίο κάτω από το πρώτο ηλεκτρόδιο. Έπειτα, γίνεται εφαρμογή δυναμικού στη δεύτερη πύλη και μηδενίζεται το δυναμικό στη πρώτη έτσι ώστε το φορτίο από το πρώτο ηλεκτρόδιο να

μεταφερθεί κάτω από το δεύτερο. Τέλος, με την ίδια διαδικασία το φορτίο συσσωρεύεται κάτω από το 3^ο ηλεκτρόδιο. Με αυτό τον τρόπο έχει πραγματοποιηθεί η σειριακή σάρωση.



Σχήμα 3.12: Σχηματική απεικόνιση της διαδικασίας επίτευξης της σειριακής σάρωσης [4].

Λόγω αδυναμίας της διάταξης να πραγματοποιεί 2^η σάρωση πριν την ολοκλήρωση της 1^{ης} σάρωσης, δημιουργήθηκε διάταξη στην οποία μια συστοιχία CCD λαμβάνει το σήμα και, ακριβώς δίπλα της, μια άλλη συστοιχία, χρησιμεύει για την αποθήκευση. Το σήμα αφού διέλθει από τις υπάρχουσες συστοιχίες καταλήγει στον καταχωρητή εξόδου. Η όλη διάταξη ονομάζεται μεταφορά μεταξύ γραμμών [4].

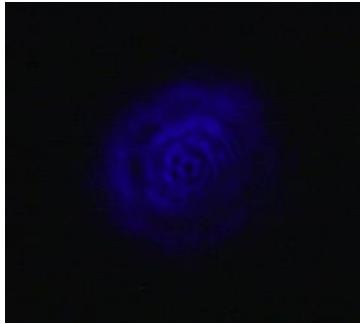


Σχήμα 3.13: Μεταφορά σήματος μεταξύ γραμμών [4].

Η διάταξη μεταφοράς σήματος μεταξύ γραμμών επιτρέπει τη γρήγορη και συνεχόμενη ανάλυση του σήματος που καταφθάνει από τον ενισχυτή εικόνας [4].

3.3 Τυπική Μέτρηση με την Τεχνική της Χρονοαναλυόμενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λείζερ

Το πρώτο βήμα για τη λήψη μιας μέτρησης με την τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λείζερ είναι η ευθυγράμμιση του συστήματος (ευθυγράμμιση δεσμών λείζερ). Στη συνέχεια, πραγματοποιείται η μέτρηση των προφίλ των δεσμών λείζερ (παλμός άντλησης (pump), παλμός ανίχνευσης (probe), η οποία γίνεται με την χρήση κάμερας CCD 1645C της εταιρείας Thorlabs.



Σχήμα 3.14: Προφίλ του παλμού άντλησης (pump).

Χρησιμοποιώντας το λογισμικό Origin 9.0 γίνεται μέτρηση του πλάτους στο ήμισυ του μεγίστου (Full width at half maximum-FWHM) για το ύψος και το πλάτος του προφίλ, τα οποία πολλαπλασιάζονται με την τιμή $\sqrt{\frac{1}{2\ln 2}}$. Η μονάδα μέτρησης των οντοτήτων αυτών είναι pixel και για την μετατροπή τους σε cm χρησιμοποιείται ως δεδομένο ότι 1 pixel, της κάμερας, αντιστοιχεί σε $3.6 \cdot 10^{-4}$ cm. Με βάση τον τύπο του εμβαδού της έλλειψης υπολογίζεται το εμβαδόν του προφίλ του παλμού άντλησης:

$$E_{\text{έλλειψης}} = \pi * FWHM_x * FWHM_y \quad (3.8)$$

όπου $FWHM_x$ είναι το πλάτος στο ήμισυ του μεγίστου, ως προς τον άξονα των x , πολλαπλασιασμένο με $\sqrt{\frac{1}{2\ln 2}}$, και $FWHM_y$ είναι το πλάτος στο ήμισυ του μεγίστου, ως προς τον άξονα των y , πολλαπλασιασμένο με $\sqrt{\frac{1}{2\ln 2}}$ σε cm.

Επόμενο βήμα είναι ο υπολογισμός της ισχύος της δέσμης άντλησης (pump), που απορροφάται από το δείγμα και πραγματοποιείται με βάση την ακόλουθη σχέση:

$$I_A = I_0 - I_T - I_R \quad (3.9)$$

όπου I_A είναι η ισχύς που απορροφάται, I_0 είναι η ισχύς της δέσμης άντλησης, I_T είναι η ισχύς που διαπερνά το δείγμα και I_R είναι η ισχύς που ανακλάται από το δείγμα. Οι μετρήσεις αυτών των παραμέτρων πραγματοποιούνται με την χρήση μετρητή ισχύος (powermeter) της εταιρίας Thorlabs. Μέσω υπολογισμών και δεδομένου ότι ο ρυθμός επανάληψης των παλμών είναι 1 kHz, υπολογίζεται η ενέργεια του παλμού λέιζερ:

$$\text{Ενέργεια παλμού λέιζερ} = \frac{\text{Ισχύς δέσμης λέιζερ}}{\text{ρυθμός επανάληψης παλμών}} \quad (3.10)$$

και η πυκνότητα (ροή) ενέργειας (Fluence):

$$\text{Πυκνότητα της ενέργειας} = \frac{\text{Ενέργεια του παλμού λέιζερ}}{\text{Προφιλ του παλμού λέιζερ}} \quad (3.11)$$

Στη συνέχεια, ρυθμίζεται το χρονικό παράθυρο για τη λήψη της μέτρησης και τα «βήματα» που θα πραγματοποιήσει η οπτική βάση (μοτέρ), στο συγκεκριμένο χρονικό παράθυρο. Η αύξηση του αριθμού των «βημάτων» βελτιώνει τη χρονική διακριτική ικανότητα της μέτρησης, με τον περιορισμό ότι δεν μπορεί να γίνει μικρότερη από την χρονική διάρκεια του παλμού. Ακόμη, ρυθμίζονται οι επαναλήψεις (iterations), των μετρήσεων.

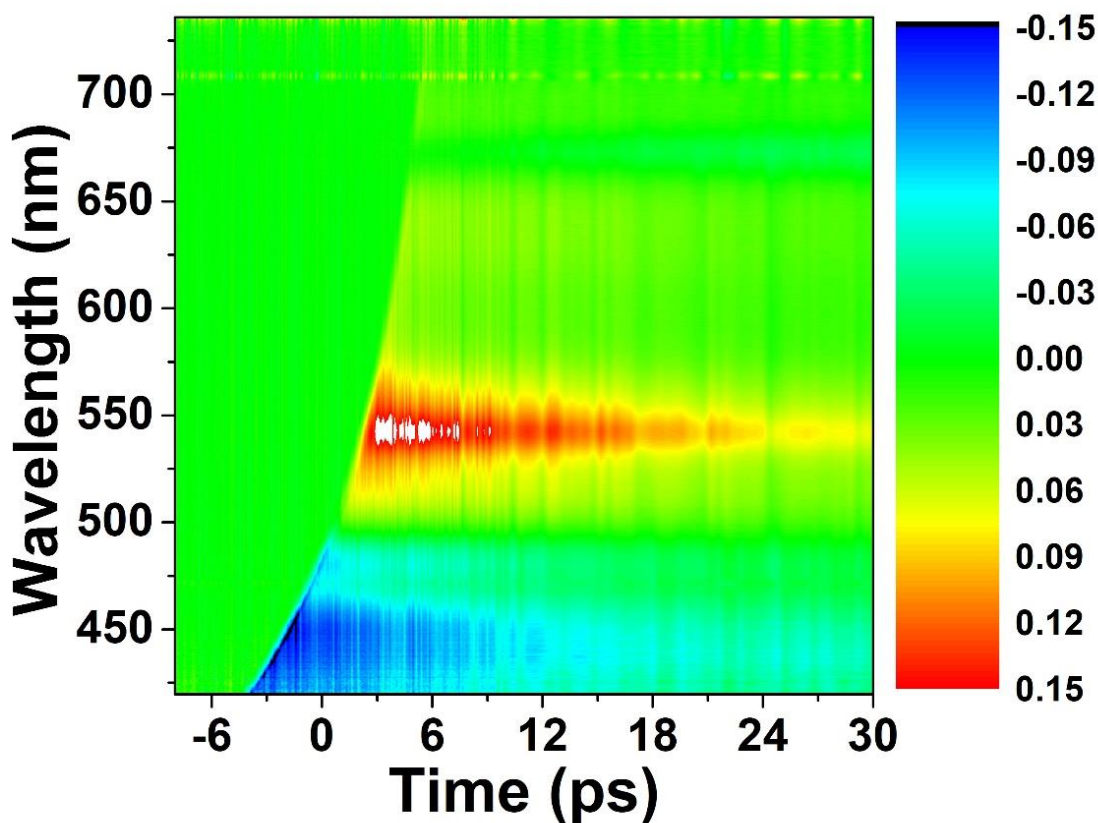
Τέλος, ο ανιχνευτής καταγράφει οχτώ διαφορετικά σήματα για τον υπολογισμό της μεταβολής της οπτικής πυκνότητας.

3.4 Προεπεξεργασία Δισδιάστατων Απεικονίσεων Χρονοαναλύομενης Υπερταχείας Φασματοσκοπίας Λέιζερ

Με την τεχνική της χρονοαναλύομενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ πραγματοποιείται η καταγραφή φασμάτων για διαφορετικές τιμές χρονικής καθυστέρησης μεταξύ του παλμού άντλησης και ανίχνευσης. Το διάγραμμα που προκύπτει είναι μια δισδιάστατη απεικόνιση των φωτοφυσικών και φωτοχημικών διεργασιών και της κινητικής αυτών. Ο άξονας y αντιστοιχεί στο μήκος κύματος του φασματικού εύρους του παλμού ανίχνευσης, ο άξονας x αντιστοιχεί στη χρονική διαφορά άφιξης των δυο παλμών στο δείγμα (pump και probe) και η ψευδοχρωματική απεικόνιση (χρωματική κλίμακα) υποδεικνύει την μεταβολή της οπτικής πυκνότητας, για διαφορετικά μήκη κύματος, με την πάροδο του χρόνου.

Ενδεικτικά παρατίθεται η δισδιάστατη απεικόνιση του FCP, απομονωμένου από τον οργανισμό *Fragilariopsis* sp (Σχήματα 3.15, 3.16, 3.17, Δείγμα Frag-LL-Fraction-1). Το γράφημα (Σχήμα. 3.15) εμφανίζει μια παραβολοειδή καμπύλη, η οποία εκτείνεται από τη χρονική στιγμή -3 ps (κάτω αριστερά) έως τη χρονική στιγμή +5 ps (πάνω δεξιά). Η καμπύλη δηλώνει το χρόνο

σύμπτωσης της δέσμης probe με την δέσμη pump στα διαφορετικά μήκη κύματος. Η γένεση λευκού φωτός (WL generation), από την οποία προκύπτει η δέσμη ανίχνευσης, λόγω διασποράς της ταχύτητας ομάδας (Group velocity dispersion-GVD), εμφανίζει χρονική καθυστέρηση, η οποία εξαρτάται από το μήκος κύματος και είναι υπεύθυνη για το χρονικό εύρος της παραβολοειδούς καμπύλης. Σε αρνητικού χρόνου (αριστερά από την καμπύλη) η διαφορά της οπτικής πυκνότητας είναι μηδέν, εφόσον δεν έχει πραγματοποιηθεί διέγερση του δείγματος, ενώ στους θετικούς χρόνους (δεξιά της καμπύλης) εμφανίζονται έγχρωμες ζώνες, οι οποίες υποδηλώνουν την πραγματοποίηση των φωτοχημικών διεργασιών.



Σχήμα 3.15: Δισδιάστατη απεικόνιση του FCP (κλάσμα 1) απομονωμένου από το διάτομο *Fragilariopsis* sp, το οποίο είχε αναπτυχθεί σε συνθήκες χαμηλής έντασης λευκού φωτός (δείγμα Frag-LL-Fraction-1). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται δεν έχουν επεξεργαστεί για την διόρθωση του θορύβου και της διασποράς της ταχύτητας της ομάδας.

Τα δεδομένα πριν αναλυθούν με την μέθοδο της ανάλυσης global υφίστανται επεξεργασία μέσω του λογισμικού Glotaran με στόχο την μείωση του θορύβου. Συγκεκριμένα, πραγματοποιούνται οι εντολές αφαίρεση του υποβάθρου (Baseline Correction) και αφαίρεση των έντονων διαταραχών (Outlier Correction).

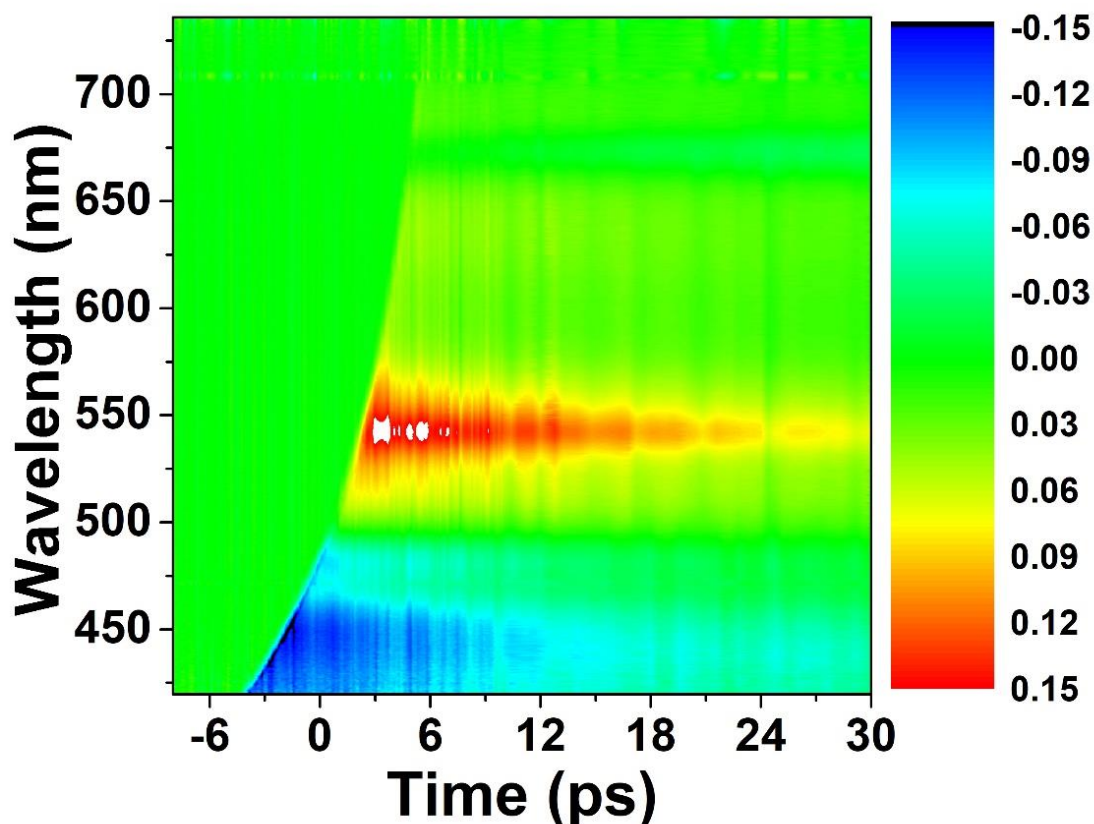
Baseline Correction

Στους αρνητικούς χρόνους η οπτική πυκνότητα αναμένουμε να ισούται με το μηδέν ($\Delta OD = 0$) υποδηλώνοντας απουσία φωτοχημικής διαδικασίας. Ωστόσο, στα φάσματα που λήφθηκαν στην παρούσα μελέτη η οπτική πυκνότητα σε αρνητικούς χρόνους διέφερε του μηδενός το οποίο αποδίδεται στην συνεισφορά στο σήμα σκεδάσεων κατά την πρόσπτωση της δέσμης σε διαφορετικά σημεία της κυψελίδας ανάδευσης. Για την διόρθωση των ληφθέντων φασμάτων αφαιρείται από την ένταση κάθε φάσματος μια σταθερή συνάρτηση η οποία προκύπτει από το μέσο όρο πολλών σαρώσεων/φασμάτων σε αρνητικούς χρόνους.

Outlier Correction

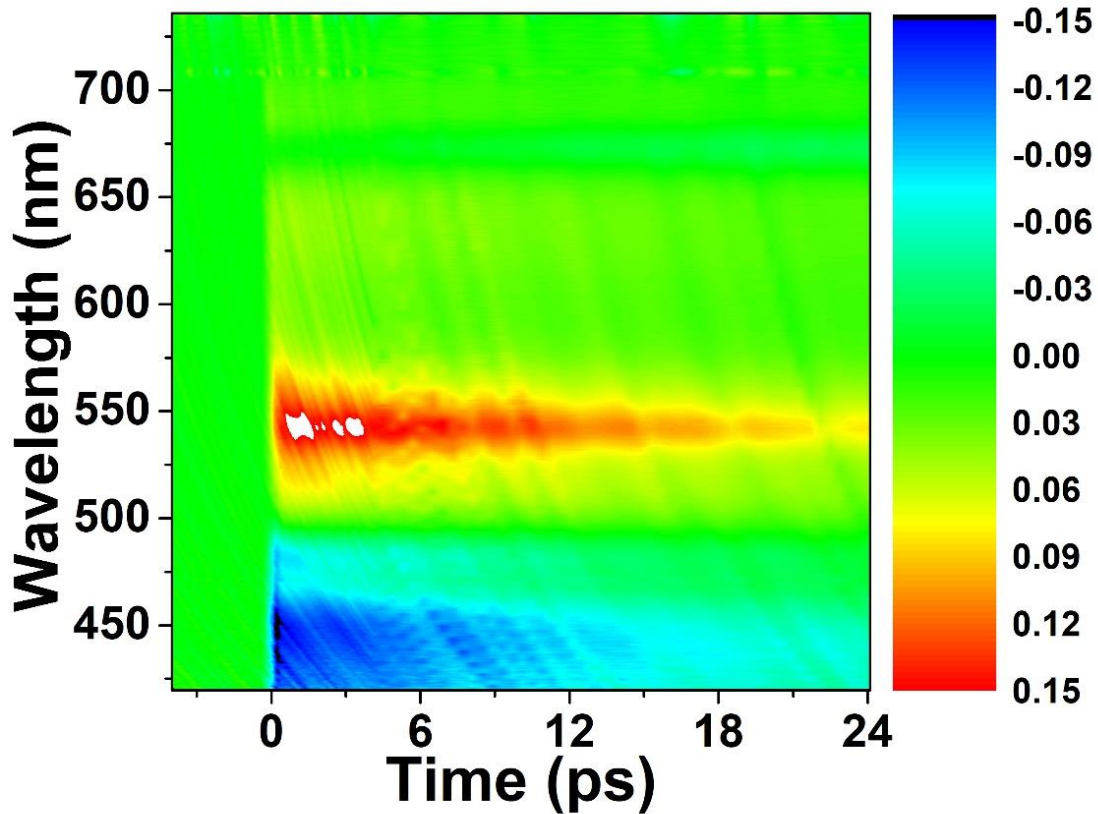
Στην πειραματική διαδικασία που ακολουθείται, ο ανιχνευτής CCD καταγράφει τα φάσματα διαφορετικής απορρόφησης σε καθορισμένες χρονικές στιγμές. Η περιστροφή της κυψελίδας κατά την διαδικασία της καταγραφής του σήματος προκαλεί διακυμάνσεις στην καταγραφόμενη ένταση μεταξύ διαφορετικών φασμάτων. Το φαινόμενο αυτό έχει ως αποτέλεσμα το σχηματισμό ακίδων (spikes), δηλαδή έντονων μεταβολών της έντασης στις κινητικές καμπύλες. Η μέθοδος outlier correction ανιχνεύει ακραίες τιμές της έντασης εντός προκαθορισμένου εύρους εντάσεων, το οποίο ορίζεται από τον χρήστη για κάθε φάσμα, και αντικαθιστά την ακραία τιμή οπτικής πυκνότητας με τη μέση τιμή που προκύπτει από τον συνυπολογισμό των γειτονικών μη ακραίων τιμών.

Αντιπροσωπευτική 2D απεικόνιση που έχει υποστεί επεξεργασία για την μείωση του θορύβου φαίνεται στο Σχήμα 3.16.



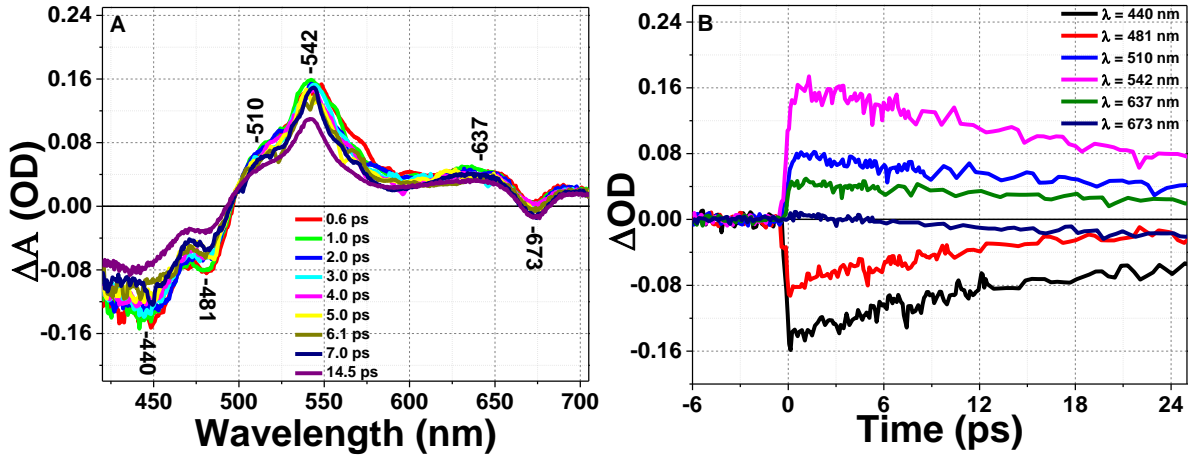
Σχήμα 3.16: 2D απεικόνιση του FCP (κλάσμα 1) απομονωμένου από το διάτομο *Fragilariopsis* sp, το οποίο είχε αναπτυχθεί σε συνθήκες χαμηλής έντασης λευκού φωτός (δείγμα Frag-LL-Fraction-1). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται έχουν υποβληθεί σε κατάλληλη επεξεργασία για την μείωση του θορύβου.

Για την ανάλυση των αποτελεσμάτων πραγματοποιήθηκε η διαδικασία αντιστάθμισης της διασποράς (dispersion compensation). Στην μέθοδο αυτή η παραβολοειδής καμπύλη προσομοιάζεται με την εξίσωση ενός πολυώνυμου και τα δεδομένα της δισδιάστατης απεικόνισης κανονικοποιούνται ως προς αυτό το πολυώνυμο. Η επεξεργασία των δεδομένων έχει ως αποτέλεσμα η παραβολοειδής καμπύλη να μετατρέπεται σε ευθεία γραμμή (Σχήμα 3.17) και να είναι ανεξάρτητη πλέον του μήκους κύματος. Η διόρθωση του φαινομένου, στην παρούσα μελέτη, πραγματοποιήθηκε με χρήση αλγορίθμου, που δημιουργήθηκε στο πρόγραμμα MATLAB.



Σχήμα 3.17: 2D απεικόνιση του FCP (κλάσμα 1) απομονωμένου από το διάτομο *Fragilariopsis* sp, το οποίο είχε αναπτυχθεί σε συνθήκες χαμηλής έντασης λευκού φωτός (δείγμα Frag-LL-Fraction-1). Τα δεδομένα που παρουσιάζονται έχουν υποβληθεί σε κατάλληλη επεξεργασία για την μείωση του θορύβου και για την διασπορά της ταχύτητας ομάδας (GVD).

Φασματικές και κινητικές πληροφορίες σχετικά με τα υπό μελέτη συστήματα λαμβάνονται μέσω των οριζόντιων και κάθετων τομών των 2D απεικονίσεων, που έχουν υποστεί τις απαραίτητες τροποποιήσεις (Σχήμα 3.18). Οι φασματικές τομές χρησιμοποιούνται για την μελέτη της χρονικής εξέλιξης των μεταβάσεων, καθώς και για τον ακριβή καθορισμό του μήκους κύματος αυτών, ενώ οι χρονικές τομές για τον καθορισμό του χρόνου ζωής των φωτοφυσικών διεργασιών του υπό μελέτη συστήματος.



Σχήμα 3.18: Α) Φάσματα παροδικής απορρόφησης (κάθετες τομές της 2D απεικόνισης) και Β) Κινητικές καμπύλες (οριζόντιες τομές της 2D απεικόνισης) του δείγματος Frag-LL-Fraction-1.

3.5 Μέθοδος Ανάλυσης Δεδομένων

Τα δεδομένα που λαμβάνονται από την τεχνική της χρονοαναλύμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ περιγράφονται με ένα μαθηματικό μοντέλο, το οποίο εφαρμόζει κάποιες βασικές υποθέσεις (παραδοχές). Η πρώτη υπόθεση είναι ότι το σύστημα που μελετάται είναι ομοιογενές, δηλαδή τα δεδομένα αναπαρίστανται από ένα σύνολο διακριτών παραμέτρων. Στην περίπτωση ενός ανομοιογενούς συστήματος τα δεδομένα περιγράφονται από κατανομή παραμέτρων. Η δεύτερη υπόθεση σχετίζεται με την διαχωριστικότητα. Υποστηρίζεται ότι οι φασματοσκοπικές ιδιότητες ενός μείγματος συνιστωσών είναι μια υπέρθεση των φασματοσκοπικών ιδιοτήτων των μεμονωμένων συνιστωσών, με συντελεστή βαρύτητας τις αντίστοιχες συγκεντρώσεις τους. Στην φασματοσκοπία απορρόφησης αυτή η γραμμική σχέση μεταξύ απορρόφησης (οπτικής πυκνότητας) και συγκέντρωσης μιας συνιστώσας συνδέεται με τον νόμο του Beer-Lambert. Συνεπώς, τα χρονοαναλυόμενα φάσματα (ψ) χωρίς την ύπαρξη θορύβου μπορούν να αναπαρασταθούν ως υπέρθεση των συνεισφορών διαφορετικών συνιστωσών (n_{comp}):

$$\psi(t, \lambda) = \sum_{l=1}^{n_{comp}} c_l(t) \varepsilon_l(\lambda) \quad (3.12)$$

όπου $c_l(t)$ και $\varepsilon_l(\lambda)$ είναι η συγκέντρωση και το φάσμα της συνιστώσας l , αντίστοιχα. Η σχέση (3.12) σε μορφή πινάκων γράφεται:

$$\Psi = CE^T \quad (3.13)$$

όπου ως Ψ αναπαρίσταται ένας πίνακας $m \times n$, που δηλώνει τα χρονοαναλυόμενα φάσματα που μετρήθηκαν σε n χρονικές στιγμές και σε m μήκη κύματος. Κάθε στήλη του $m \times n_{comp}$ πίνακα C ,

συμβολίζει το προφίλ συγκέντρωσης c_i της συνιστώσας I ως συνάρτηση της ανεξάρτητης μεταβλητής t , ενώ κάθε στήλη του $n \times n_{\text{comp}}$ πίνακα E περιγράφει ένα φάσμα e_i της συνιστώσας I ως συνάρτηση της δεύτερης ανεξάρτητης μεταβλητής λ . Ο αριθμός των συνιστωσών που μπορούν να μελετηθούν αποδοτικά κυμαίνεται μεταξύ ενός έως δέκα, ενώ οι αριθμοί των διαφορετικών μηκών κύματος και των διαφορετικών χρονικών στιγμών μπορεί να κυμαίνεται από n_{comp} έως μερικές χιλιάδες [6].

Στόχος της μεθόδου ανάλυσης είναι να ανακτηθούν τα δεδομένα που υπάρχουν στον πίνακα C ή E σε όρους σημαντικών φυσικών παραμέτρων, δηλαδή να βρεθεί μια σταθερά ταχύτητας απόσβεσης μιας συνιστώσας ή η τιμή μήκους κύματος (λ_{max}) ενός μέγιστου του φάσματος μιας συγκεκριμένης συνιστώσας. Η επίτευξη αυτού του σκοπού πραγματοποιείται μέσω ενός μοντέλου περιγραφής του C (κινητικό μοντέλο), βάσει του οποίου εκτιμώνται οι σχετικές παράμετροι $c_i(t)$. Το κινητικό μοντέλο περιγράφει τις συγκεντρώσεις των συνιστωσών μιας μέτρησης με το πέρασ του χρόνου, δηλαδή μοντελοποιεί τις δυναμικές διεργασίες του συστήματος (δείγματος). Συνήθως, οι μετρήσεις προσδιορίζονται από κινητική πρώτης τάξης, οπότε οι συγκεντρώσεις ορίζονται από γραμμικές διαφορικές εξισώσεις πρώτης τάξης. Η λύση ενός συστήματος γραμμικών διαφορικών εξισώσεων πρώτης τάξης είναι ένα άθροισμα εκθετικών συναρτήσεων απόσβεσης σε συνένλιξη με την συνάρτηση της απόκρισης του οργάνου (Instrument Response Function-IRF). Το IRF είναι μια συνάρτηση που προσδιορίζει τις αρχικές συνθήκες διέγερσης/αποδιέγερσης του δείγματος, που σχηματίζονται από τα χρονικά προφίλ των παλμών rump και probe. Η μαθηματική έκφραση ενός κινητικού μοντέλου που περιγράφει τα μετρούμενα δεδομένα Ψ ως συνάρτηση του χρόνου και της ανεξάρτητης φασματικής μεταβλητής λ είναι:

$$\psi(t, \lambda) = \sum_{l=1}^{n_{\text{comp}}} (\exp(-k_l t) \oplus i(t)) e_l(\lambda) \quad (3.14)$$

όπου το k_l συμβολίζει την σταθερά ταχύτητας απόσβεσης της συνιστώσας I και το σύμβολο « \oplus » την συνένλιξη με το IRF ($i(t)$). Τα πλάτη των προφίλ συγκέντρωσης περιγράφονται από τα φάσματα $e_l(\lambda)$. Σε συμβολισμό πινάκων η εξίσωση (3.14) γίνεται:

$$\Psi = C(\theta_l)E^T \quad (3.15)$$

όπου $C(\theta_l)$ είναι ο πίνακας των προφίλ των συγκεντρώσεων όπως περιγράφεται από το διάνυσμα των μη-γραμμικών παραμέτρων θ_l . E είναι ο πίνακας των φασματικών πλατών, του οποίου οι οντότητες εκτιμώνται ως υπό συνθήκες γραμμικές παράμετροι. Η αντιμετώπιση των οντοτήτων του πίνακα E ως υπό συνθήκες γραμμικές παραμέτρους, προσφέρει την δυνατότητα να ληφθούν τα φασματικά προφίλ χωρίς να προσδιοριστούν οι παράμετροι ενός φασματικού μοντέλου [7].

Η περιγραφή των δεδομένων με ένα κινητικό μοντέλο όπως της εξίσωσης (3.15) έχει ως απώτερο σκοπό την εκτίμηση των παραμέτρων σε όρους σημαντικών φυσικών τιμών. Οι παράμετροι που εκτιμώνται είναι: οι μη-γραμμικές παράμετροι (το διάνυσμα θ_l) και οι υπό συνθήκες γραμμικές παράμετροι (E^T) της εξίσωσης (3.15). Οι μη-γραμμικές παράμετροι δεν είναι δυνατό να υπολογιστούν με κάποια μαθηματική μέθοδο, οπότε είναι απαραίτητο να δοθούν κάποιες αρχικές τιμές, ενώ οι υπό συνθήκες γραμμικές παράμετροι μπορούν να υπολογιστούν για δεδομένες μη-γραμμικές παραμέτρους. Συνεπώς, σε ένα κινητικό μοντέλο βελτιστοποιείται το διάνυσμα παραμέτρων (θ_l) που καθορίζει τους χρόνους ζωής κάθε συνιστώσας, ενώ ταυτόχρονα υπολογίζονται τα βέλτιστα πλάτη των φασμάτων, με στόχο την ελαχιστοποίηση των καταλοίπων (residuals). Μαθηματικά η παραπάνω έκφραση παριστάνεται ως:

$$\min \|\Psi - \sum_{l=1}^{n_{comp}} (c(\theta_l)) \varepsilon_l\|^2 \quad (3.16)$$

όπου το Ψ είναι ο πίνακας δεδομένων με διαστάσεις $m \times n$ και το c είναι μια συνάρτηση του διανύσματος μη-γραμμικών παραμέτρων θ_l , το οποίο έχει μήκος διανύσματος m . Το ε_l είναι διάνυσμα μήκους n που περιέχει τις υπό συνθήκες γραμμικές παραμέτρους, οι οποίες εκτιμώνται από το διάνυσμα των παραμέτρων θ_l και το σύμβολο « $\|\ \|$ » υποδηλώνει το μέτρο του διανύσματος. Σε μορφή πινάκων η σχέση (3.16) γίνεται:

$$\min \|\Psi - C(\theta_l)E^T\|^2 \quad (3.17)$$

όπου Ψ είναι ο πίνακας δεδομένων με διαστάσεις $m \times n$, C ο πίνακας των συγκεντρώσεων, ο οποίος εξαρτάται από το εκτιμώμενο διάνυσμα μη-γραμμικών παραμέτρων θ_l και E^T είναι ο πίνακας που περιέχει τα διανύσματα των υπό συνθήκες γραμμικών παραμέτρων [7].

Η εξίσωση (3.17) επιλύεται μέσω της τεχνικής ανάπτυξης των προβολών των μεταβλητών (Variable Projection), η οποία ανάγει το αρχικό πρόβλημα σε δυο υποπροβλήματα, τα οποία επιλύονται διαδοχικά. Το πρώτο υποπρόβλημα είναι μη-γραμμικό πρόβλημα ελαχίστων τετραγώνων, του οποίου η επίλυση οδηγεί στην εύρεση των μη-γραμμικών παραμέτρων. Η λύση του πρώτου υποπροβλήματος είναι περίπλοκη, όμως προσφέρει το πλεονέκτημα της μείωσης των αρχικών άγνωστων παραμέτρων, καθώς θα υπάρχουν μόνο οι μη-γραμμικές παράμετροι. Το δεύτερο υποπρόβλημα είναι απλό, γραμμικό πρόβλημα ελαχίστων τετραγώνων για την εύρεση των υπό συνθήκες γραμμικών παραμέτρων. Δεδομένου ότι οι μη-γραμμικές παράμετροι είναι γνωστές (έχουν αποδοθεί αρχικές τιμές) το πρόβλημα της εξίσωσης (3.17) τροποποιείται μέσω της εξίσωσης (3.18):

$$E^T = C^+(\theta_l)\Psi \quad (3.18)$$

όπου ο πίνακας $C^+(\theta_l)$ είναι ο Moore-Penrose γενικευμένος ψευδοαντίστροφος του $C(\theta_l)$

$$C^+(\theta_l) = (C(\theta_l)^T C(\theta_l))^{-1} C(\theta_l)^T \quad (3.19)$$

Με αντικατάσταση στην εξίσωση (3.17) προκύπτει η μαθηματική εξίσωση:

$$\min \|\Psi - C(\theta_l)C^+(\theta_l)\Psi\|^2 \quad (3.20)$$

Συνεπώς, το πρόβλημα της ελαχιστοποίησης είναι μόνο συνάρτηση των μη-γραμμικών παραμέτρων θ_l και λύνεται μέσω των γενικών μεθόδων αριθμητικής βελτιστοποίησης (μέθοδος Newton, μέθοδος Gauss-Newton και μέθοδος Levenberg-Marquardt) [6].

3.5.1 Global Analysis

Υπάρχοντα πειραματικά δεδομένα που λήφθηκαν μέσω της τεχνικής χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ μπορούν να προσομοιωθούν μέσω ενός κινητικού μοντέλου, εάν το υπό μελέτη σύστημα είναι ομοιογενές και διαχωρίσιμο, ενώ το μοντέλο διαθέτει μη-γραμμικές παραμέτρους και υπό συνθήκες γραμμικές παραμέτρους. Οι προδιαγραφές αυτές επιτρέπουν την εφαρμογή της μεθόδου variable projection για να εκτιμηθούν οι τιμές των παραμέτρων που υπάρχουν στα πειραματικά δεδομένα σε όρους σημαντικών φυσικών παραμέτρων που περιγράφουν το υπό μελέτη σύστημα. Η χρήση ενός ενιαίου διαχωρίσιμου μη-γραμμικού μοντέλου για την περιγραφή όλων των μετρήσεων που συλλέγονται για πολλές ανεξάρτητες μεταβλητές ονομάζεται global ανάλυση.

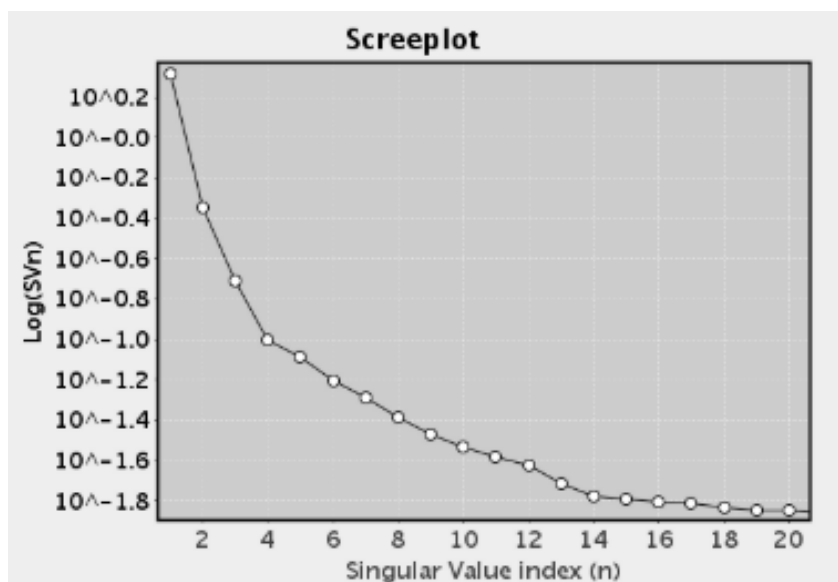
Μέθοδος Ανάλυσης Πίνακα σε Ιδιάζουσες Τιμές (Singular Value Decomposition-SVD)

Η πρώτη διαδικασία που πραγματοποιείται στην global ανάλυση, όταν χρησιμοποιείται κινητικό μοντέλο, είναι η προσαρμογή των δεδομένων με επαρκή αριθμό εκθετικών συναρτήσεων (δηλαδή, με τους χρόνους ζωής των συνιστωσών). Ο αριθμός των συνιστωσών μπορεί να εκτιμηθεί βασιζόμενος σε προηγούμενες γνώσεις αλλά συνήθως προέρχεται από την εκτίμηση του αποτελέσματος της μεθόδου ανάλυσης πίνακα σε ιδιάζουσες τιμές (Singular Value Decomposition-SVD). Η μέθοδος SVD μετατρέπει κάθε πίνακα διαστάσεων $m \times n$ σε SVD μορφή:

$$\Psi_{m \times n} = U_{m \times m} S_{m \times n} W_{n \times n}^T \quad (3.21)$$

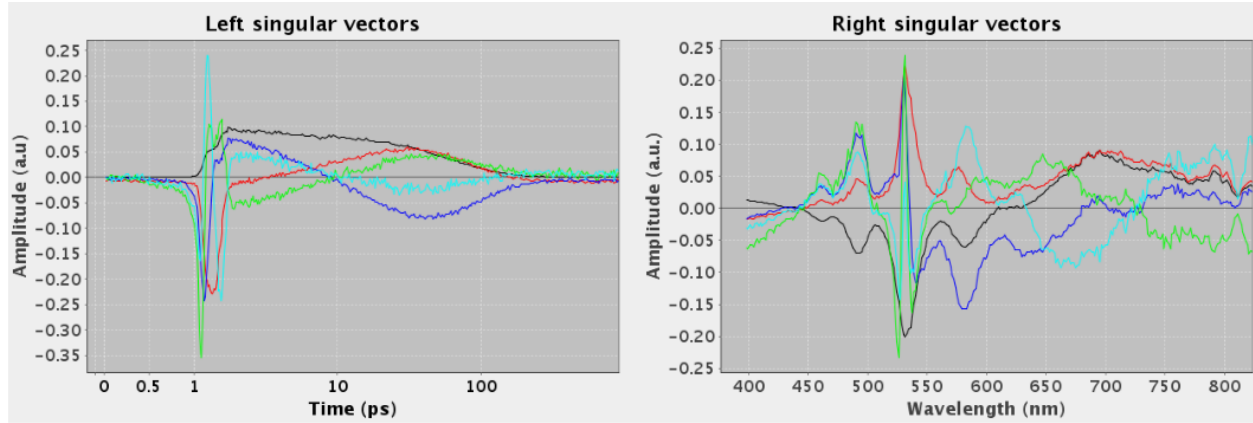
όπου το U και το W είναι ορθογώνιοι πίνακες που περιέχουν τα αριστερά και τα δεξιά ιδιάζοντα διανύσματα, αντίστοιχα, ενώ ο S πίνακας περιέχει την τιμή μηδέν εκτός διαγωνίου και στην διαγώνιο τις ιδιάζουσες τιμές. Οι ιδιάζουσες τιμές αποτελούν μια ένδειξη για τον αριθμό των

συνιστωσών στα πειραματικά δεδομένα. Σε δεδομένα χωρίς θόρυβο υπάρχουν n_{comp} σημαντικές ιδιάζουσες τιμές που διαφέρουν από το μηδέν ($s_1 \geq s_2 \geq s_{n_{\text{comp}}} \geq s_{n_{\text{comp}}+1} = \dots = 0$). Στην περίπτωση που τα δεδομένα περιλαμβάνουν θόρυβο, οι ιδιάζουσες τιμές δεν μπορούν να ισούνται με το μηδέν, οπότε οι σημαντικές ιδιάζουσες τιμές είναι αυτές που διαφέρουν έντονα από τις υπόλοιπες. Η εύρεση των σημαντικών ιδιάζουσών τιμών σε δεδομένα που περιέχουν θόρυβο μπορεί να επιτευχθεί ευκολότερα μέσω μιας γραφικής παράστασης, που ο άξονας y περιέχει τις τιμές των ιδιάζουσών τιμών σε λογαριθμική κλίμακα και ο άξονας x τον αριθμό της κάθε ιδιάζουσας τιμής (π.χ. πρώτη ιδιάζουσα τιμή = 1, κ.ο.κ.) (Σχήμα 3.19) [8].



Σχήμα 3.19: Γραφική παράσταση των πρώτων είκοσι ιδιάζόντων τιμών που προέκυψαν από την εφαρμογή της μεθόδου SVD σε τυπικά πειραματικά δεδομένα που εμπεριέχουν θόρυβο. Το συγκεκριμένο γράφημα προκύπτει από το λογισμικό Glotaran [8].

Παρατηρώντας το Σχήμα 3.19 είναι φανερό ότι δεν είναι σαφές πόσες συνιστώσες υπάρχουν στα πειραματικά δεδομένα που περιέχουν θόρυβο. Συνεπώς, ο αναλυτής πρέπει να λάβει υπόψιν του και τα δεξιά και αριστερά ιδιάζοντα διανύσματα, τα οποία παρουσιάζουν τα φυσικά χαρακτηριστικά της κάθε συνιστώσας.



Σχήμα 3.20: a) Αριστερά ιδιάζοντα διανύσματα, που αναπαριστούν την χρονική εξάρτηση των πέντε πρώτων συνιστωσών. b) Δεξιά ιδιάζοντα διανύσματα, που αναπαριστούν την φασματική εξάρτηση των πρώτων πέντε συνιστωσών. Τα γραφήματα προκύπτουν από το λογισμικό Glotaran [8].

Συγκεκριμένα τα αριστερά ιδιάζοντα διανύσματα παρουσιάζουν την χρονική εξάρτηση των συγκεκριμένων συνιστωσών (Σχήμα 3.20 a), ενώ τα δεξιά ιδιάζοντα διανύσματα την φασματική εξάρτηση (Σχήμα 3.20 b). Ο αναλυτής παρατηρώντας τα δεξιά και αριστερά ιδιάζοντα διανύσματα ελέγχει εάν οι καμπύλες ομοιάζουν με τον θόρυβο. Στην περίπτωση που για παράδειγμα η καμπύλη της έκτης συνιστώσας ομοιάζει με τον θόρυβο, ενώ η πέμπτη συνιστώσα παρουσιάζει φασματικό και κινητικό προφίλ, τότε ο αναλυτής καταλήγει στο συμπέρασμα ότι το υπό μελέτη σύστημα έχει τουλάχιστον πέντε συνιστώσες.

Η μέθοδος SVD χρησιμοποιείται πέρα από την εύρεση των συνιστωσών του συστήματος και για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων, που προκύπτουν από την εφαρμογή του κινητικού μοντέλου. Συγκεκριμένα, η μέθοδος SVD εφαρμόζεται στον πίνακα των καταλοίπων (residuals) με στόχο τον υπολογισμό της τιμής του αθροίσματος τετραγώνων των σφαλμάτων (Sum Squares Errors-SSE). Η SVD μορφή του πίνακα των residuals είναι:

$$Z = \Psi - CE^T = U_Z S_Z W_Z^T \quad (3.22)$$

όπου οι πίνακες U και W είναι μοναδιαίοι πίνακες, οπότε το SSE ισούται με το άθροισμα των τετραγώνων των ιδιαζόντων τιμών (Λ_Z):

$$\Lambda_Z = \sum_{i=1}^{\min(n,m)} S_{Z,i}^2 \quad (3.23)$$

Η τιμή του SSE χρησιμοποιείται για την αξιολόγηση των αποτελεσμάτων που εξάγονται από την εφαρμογή των διαφορετικών μοντέλων στα πειραματικά δεδομένα [8].

Είδη Κινητικών Μοντέλων

Το απλούστερο κινητικό μοντέλο για την προσαρμογή των πειραματικών δεδομένων είναι το παράλληλο, σύμφωνα με το οποίο κάθε συνιστώσα αποσβένει ανεξάρτητα. Η εφαρμογή του παράλληλου κινητικού μοντέλου σε πειραματικά δεδομένα που προέρχονται από την τεχνική της χρονοαναλυόμενης υπερταχείας φασματοσκοπίας λέιζερ έχει ως αποτέλεσμα φάσματα διαφορικής απορρόφησης που σχετίζονται με την απόσβεση (Decay Associated Difference Spectra-DADS) της κάθε συνιστώσας.

Το κινητικό μοντέλο στο οποίο οι συνιστώσες αποσβένουν εξαρτώμενα με αυξανόμενους χρόνους ζωής (δηλαδή η πρώτη συνιστώσα έχει μικρότερο χρόνο ζωής από την δεύτερη κ.ο.κ.), ονομάζεται διαδοχικό μοντέλο ($1 \rightarrow 2 \rightarrow \dots \rightarrow n_{\text{comp}}$). Σε αυτή την υπόθεση η πρώτη συνιστώσα αποκτά πληθυσμό από τον παλμό διέγερσης και έπειτα αποσβένει σχηματίζοντας την δεύτερη συνιστώσα. Η δεύτερη συνιστώσα, εν συνεχεία, χάνει πληθυσμό δημιουργώντας την τρίτη και ούτω καθεξής έως ότου σχηματιστεί η ν-οστή συνιστώσα, η οποία αποσβένει στην θεμελιώδη κατάσταση. Τα εκτιμώμενα φάσματα που προκύπτουν από την εφαρμογή του διαδοχικού μοντέλου ονομάζονται διαφορικά φάσματα που σχετίζονται με την εξέλιξη (Evolution-associated difference spectra-EADS). Τα EADS παρουσιάζουν την φασματική εξέλιξη, για παράδειγμα το τρίτο EADS, που προκύπτει σε μια ανάλυση, δημιουργείται με το χρόνο ζωής της δεύτερης συνιστώσας και αποσβένει με τον χρόνο ζωής της τρίτης. Στο διαδοχικό μοντέλο θεωρείται ότι οι πίσω-αντιδράσεις δεν πραγματοποιούνται. Το λογισμικό Glotaran εξάγει επιπρόσθετα τα κανονικοποιημένα φάσματα EADS διευκολύνοντας τον χρήστη να εξάγει άμεσα πληροφορίες για την θέση των κορυφών και για τυχόν μεταβολές στο εύρος τους.

3.6 Βιβλιογραφία

- [1] FEMTO LASERS. FEMTOPOWER COMPACT PRO. USER'S MANUAL.
- [2] Μπενής Μ. Φυσική Των Laser. Πανεπιστήμιο Ιωαννίνων, Ιωάννινα. (2014).
- [3] Koechner, W. (2014). Solid-State Laser Engineering-6th Edition. Igarss 2014. <https://doi.org/10.1007/s13398-014-0173-7.2>.
- [4] Wilson J., Hawkes J. Οπτοηλεκτρονική: μια εισαγωγή, Πανεπιστημιακές Εκδόσεις Ε.Μ.Π. Αθήνα. (2007).
- [5] Andor Shamrock SR-303i. User's Guide.

[6] Van Stokkum I. H.M., Larsen D. S., Van Grondelle R. (2004). Global and target analysis of time-resolved spectra. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1657 (2-3), 82-104.

<https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.04.011>

[7] Van Stokkum I. H.M. (2005). Global and target analysis of time-resolved spectra. Lecture notes Troisième Cycle de la Physique en Suisse Romande.

[8] Snellenburg J. J., Laptinok S. P., Seger R., Mullen K. M., Van Stokkum I. H. M. (2012). Glotaran: A Java-Based Graphical User Interface for the R Package TIMP. *Journal of Statistical Software*, 49 (3), 1-22. <https://doi.org/10.18637/jss.v049.i03>

ΚΕΦΑΛΑΙΟ 4

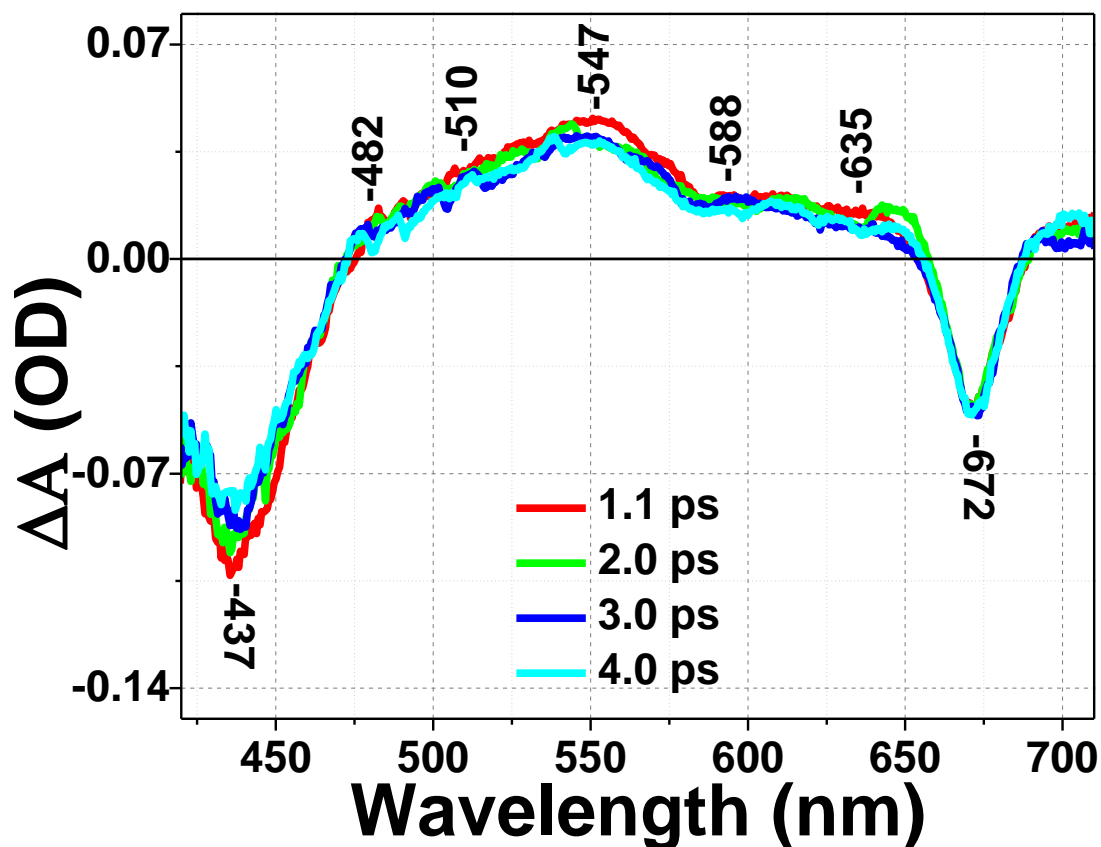
Αποτελέσματα και Συζήτηση Αποτελεσμάτων

4.1 Υπερταγεία δυναμική των FCPs του κλάσματος 3, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp.*

Fragilariopsis sp.-Low Light-Fraction-3 (Frag-LL-Fraction-3)

Η μέθοδος υγρής χρωματογραφίας υψηλής απόδοσης (High-Performance Liquid Chromatography-HPLC) χρησιμοποιήθηκε για τον προσδιορισμό της σύστασης των χρωστικών στα FCPs. Από τα αποτελέσματα προέκυψε ότι οι κύριες χρωστικές του δείγματος Frag-LL-Fraction-3 είναι η φουκοξανθίνη (Fx, 0.617 mol Fx/ mol Chl-a) και οι χλωροφύλλες τύπου a και c (1 mol Chl-a/ mol Chl-a, 0.374 mol Chl-c/ mol Chl-a). Το συγκεκριμένο δείγμα αντιπροσωπεύει ένα τυπικό FCP, όπως αυτά που αναφέρονται στην βιβλιογραφία.

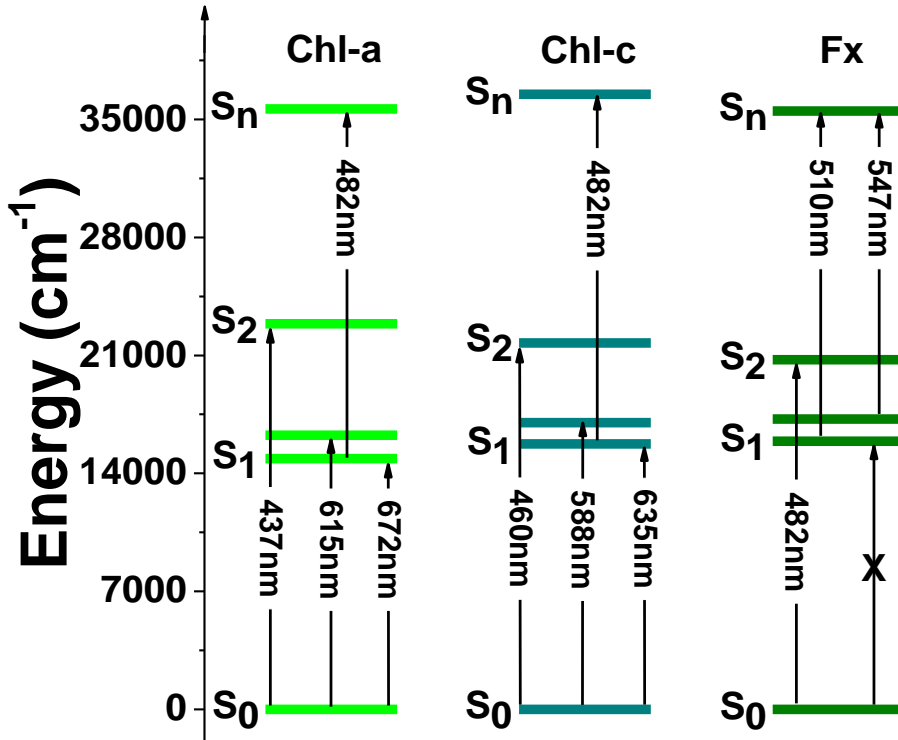
Η μελέτη του δείγματος Frag-LL-Fraction-3 με τη μέθοδο της χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ και την χρήση παλμού άντλησης μήκους κύματος $\lambda = 395$ nm είχε ως αποτέλεσμα την διέγερση όλων των χρωστικών (Fx, Chl-a και Chl-c) εντός του FCP στην δεύτερη διεγερμένη κατάσταση (S_2). Τα φάσματα παροδικής απορρόφησης απεικονίζονται στο Σχήμα 4.1.



Σχήμα 4.1: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-LL-Fraction-3.

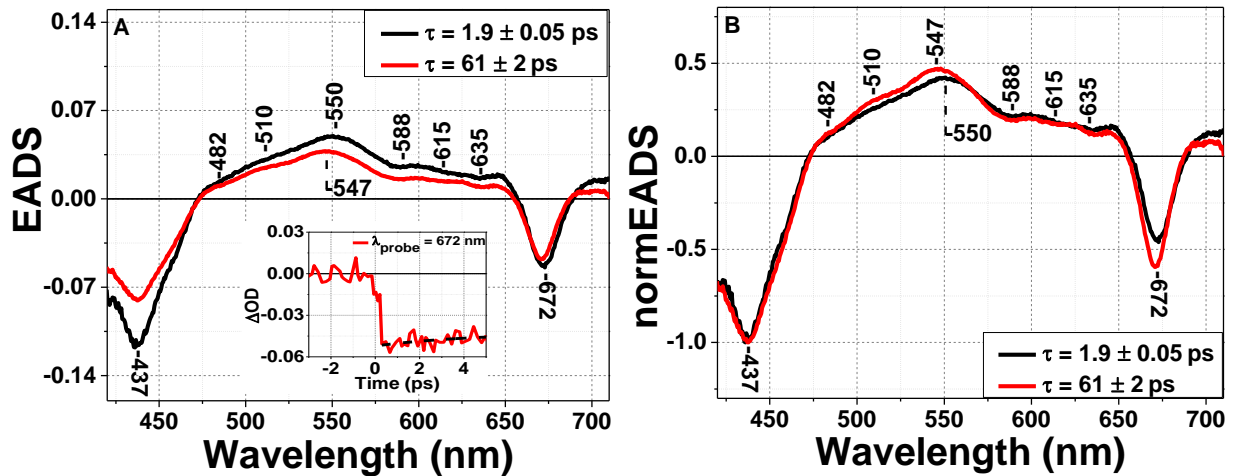
Στην φασματική περιοχή 420 - 470 nm παρατηρούνται οι μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_2$ (Ground State Bleaching-GSB) των Chl-a, Chl-c και της Fx. Η εμφάνιση της αρνητικής κορυφής σε $\lambda = 437$ nm αποδίδεται, κατά κύριο λόγο, στο GSB της Chl-a. Ωστόσο, η ένταση της συγκεκριμένης κορυφής ενισχύεται από τις μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_2$ (GSB) της Chl-c ($\lambda = 460$ nm) και της Fx ($\lambda = 400 - 560$ nm) παρά το γεγονός ότι δεν ήταν δυνατή η διάκριση των μεγίστων μηκών κύματος των κορυφών αυτών στο παρόν φάσμα.

Στην φασματική περιοχή 470 - 720 nm παρατηρείται το σήμα της μετάβασης ESA της Fx με μέγιστο σε $\lambda = 547$ nm. Παράλληλα, στην ίδια περιοχή σε $\lambda = 482$ nm εμφανίζεται η ESA της Chl-a, καθώς και τα GSB/SE (Stimulated Emission-SE) των Chl-c και Chl-a σε $\lambda = 588$ nm, 635 nm και $\lambda = 615$ nm, 672 nm, αντίστοιχα. Οι μεταβάσεις αυτές πραγματοποιούνται κατά την αλληλεπίδραση της δέσμης ανίχνευσης με το δείγμα, εφόσον αυτό έχει διεγερθεί από την δέσμη άντλησης και απεικονίζονται σε ενεργειακό διάγραμμα (Σχήμα 4.2).



Σχήμα 4.2: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Fx, Chl-a και Chl-c που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-LL-Fraction-3.

Τα πειραματικά δεδομένα αναλύθηκαν με την μέθοδο ανάλυσης global με στόχο την εξαγωγή των φασμάτων διαφορικής απορρόφησης που σχετίζονται με την εξέλιξη (Evolution-associated difference spectra-EADS, Σχήμα 4.3).

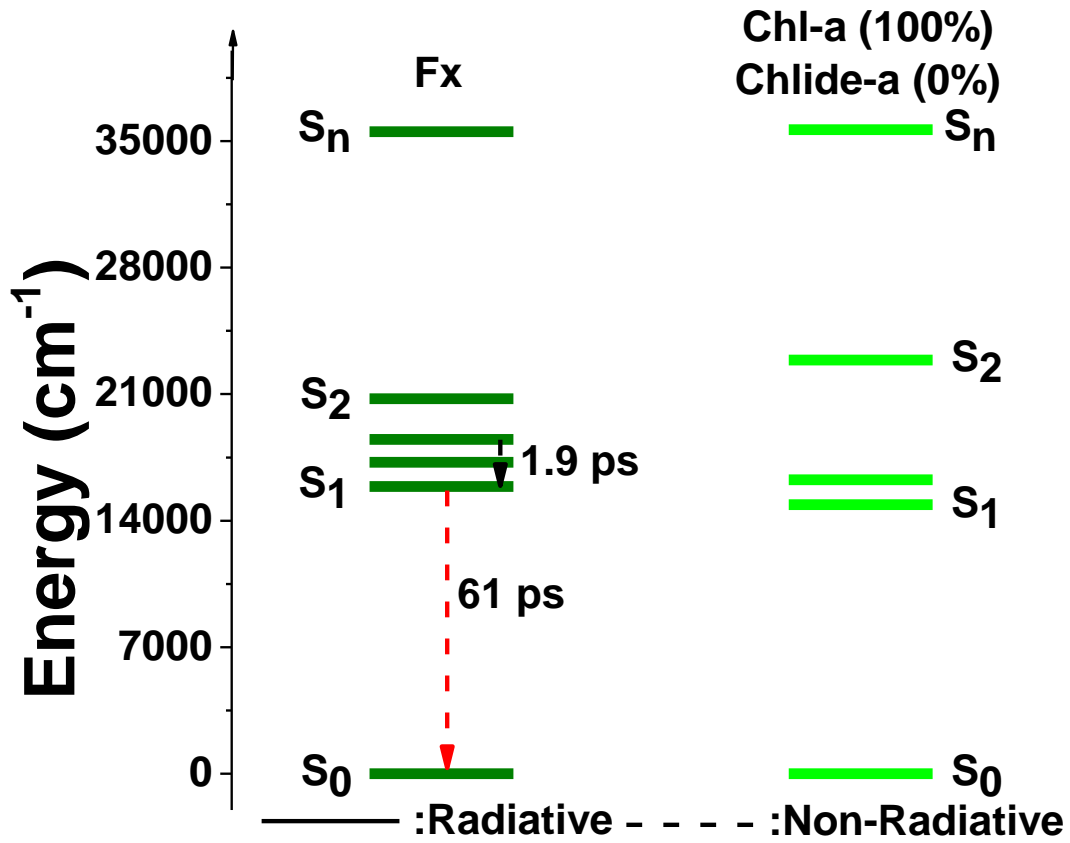


Σχήμα 4.3: Α) Φάσματα EADS και Β) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Frag-LL-Fraction-3. Ένθετο: Κινητική καμπύλη για $\lambda_{\text{probe}} = 672 \text{ nm}$.

Το 1^ο EADS με χρόνο ζωής $\tau = 1.9 \pm 0.05$ ps αποδίδεται στην δονητικά διεγερμένη κατάσταση S_1 (hot S_1) της Fx. Η πλήθυνση των δονητικών επιπέδων της κατάστασης S_1 έχει ως αποτέλεσμα την καταγραφή διευρυμένης ταινίας απορρόφησης με μέγιστο σε $\lambda = 550$ nm. Στο 2^ο EADS με χρόνο ζωής $\tau = 61$ ps είναι δυνατή η διάκριση δυο χαρακτηριστικών μεγίστων σε $\lambda = 510$ nm και σε $\lambda = 547$ nm. Η διαφοροποίηση του φάσματος οφείλεται στην δονητική χαλάρωση της κατάστασης S_1 (hot S_1), η οποία συνεπάγεται την συσσώρευση του διεγερμένου πληθυσμού στα κατώτερα δονητικά επίπεδα. Η μειωμένη ένταση του 2^{ου} EADS στην φασματική περιοχή 480 - 650 nm οφείλεται σε μερική αποδιέγερση της κατάστασης S_1 , οπότε ο 2^{ος} χρόνος ζωής, $\tau = 61 \pm 2$ ps, αποδίδεται στην κατάσταση αυτή. Ο χρόνος αυτός είναι μεγαλύτερος σε σχέση με τις βιβλιογραφικές τιμές ($\tau_{S_1, Fx} \sim 37$ ps) [1], και αποδίδεται σε αδυναμία του χρονικού παραθύρου (από -8 έως 10 ps) της μέτρησης να προσεγγίσει τον χαρακτηριστικό χρόνο του φαινομένου.

Η μείωση της έντασης της κορυφής σε $\lambda = 437$ nm από το 1^ο EADS στο 2^ο αποδίδεται στην πλήθυνση της κατάστασης S_0 της Fx. Οι μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_2$ της Chl-a και της Chl-c δεν συνεισφέρουν σε αυτή την μείωση, διότι οι χρόνοι ζωής τους είναι της τάξης των μερικών νανοδευτερολέπτων (ns) [2]. Η υπόθεση αυτή ενισχύεται και από το γεγονός ότι δεν παρατηρούνται μεταβολές στην ένταση των λοιπών κορυφών που αποδίδονται σε αυτές τις ενώσεις. Η σταθερή ένταση της κορυφής σε $\lambda = 672$ nm αποτελεί ένδειξη διατήρησης του πληθυσμού της κατάστασης S_1 της Chl-a (Ένθετο Σχήματος 4.3 A).

Οι φωτοφυσικές διεργασίες αποδιέγερσης της Fx, στις οποίες αποδόθηκαν οι χρόνοι ζωής των φασμάτων EADS απεικονίζονται στο ενεργειακό διάγραμμα του Σχήματος 4.4. Στο διάγραμμα παρουσιάζονται τα ενεργειακά επίπεδα της Chl-a παράλληλα με του χλωροφυλλιδίου τύπου a (Chlorophyllide-Chlide-a), πρόδρομης ένωσης της Chl-a. Το Chlide-a δεν εμπεριέχεται στο δείγμα Frag-LL-Fraction-3, ωστόσο επειδή συναντάται σε όλα τα άλλα δείγματα που μελετήθηκαν συμπεριλαμβάνεται στο ενεργειακό διάγραμμα απεικόνισης των παρατηρούμενων φωτοφυσικών διεργασιών για λόγους σύγκρισης με τα ενεργειακά διαγράμματα των δειγμάτων που ακολουθούν. Η Chl-c δεν συμπεριλαμβάνεται στα ενεργειακά διαγράμματα, καθώς δεν ανιχνεύονται φωτοφυσικές διεργασίες αποδιέγερσής της σε κανένα από τα μελετώμενα δείγματα.

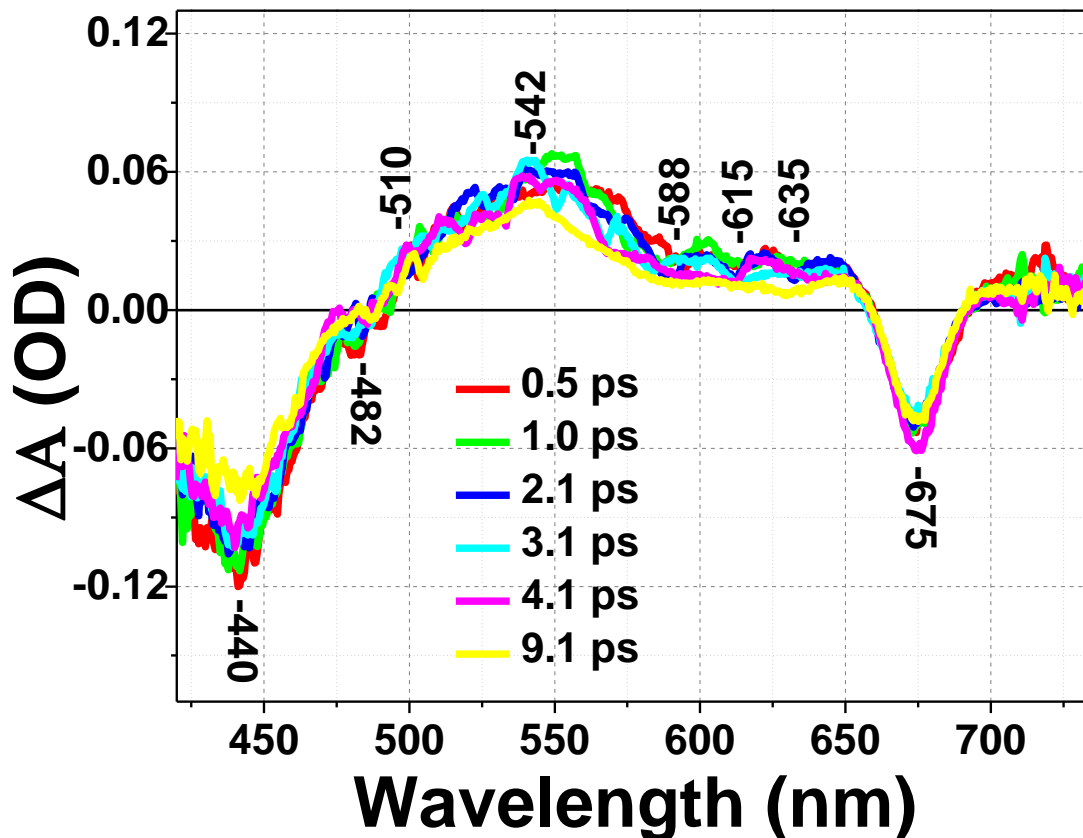


Σχήμα 4.4: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-LL-Fraction-3. Στο διάγραμμα σημειώνονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.

Fragilariopsis sp.-High Light-Fraction-3 (Frag-HL-Fraction-3)

Η ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* σε συνθήκες υψηλής έντασης λευκού φωτός έχει ως αποτέλεσμα την μεταβολή της χημικής σύστασης των FCPs. Στο δείγμα Frag-HL-Fraction-3 σε μεγαλύτερη συγκέντρωση εντοπίζονται οι χρωστικές: Fx (1.891 mol Fx/ mol Chl-a), Chl-a (1 mol Chl-a/ mol Chl-a), Chl-c (1.421 mol Chl-c/ mol Chl-a), διαδινοξανθίνη (Ddx, 0.230 mol Ddx/ mol Chl-a) και το χλωροφυλλίδιο τύπου a (Chlorophyllide-Chlide-a, 1.041 mol Chlide-a/ mol Chl-a), το οποίο είναι πρόδρομη ένωση της Chl-a. Το Chlide-a διαφέρει δομικά από την Chl-a, καθώς δεν διαθέτει την ομάδα φυτολίου (phytol group).

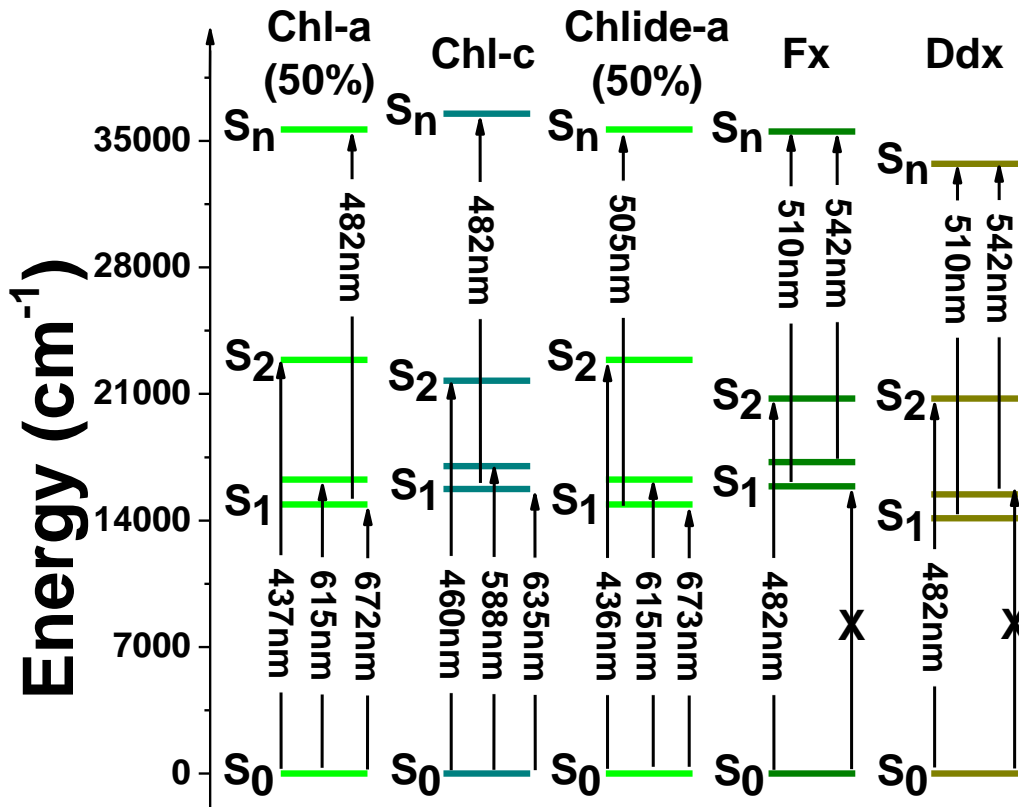
Η υπερταχεία χρονοαναλυόμενη φασματοσκοπία λέιζερ χρησιμοποιήθηκε για τη μελέτη του δείγματος Frag-HL-Fraction-3 και ο παλμός άντλησης σε $\lambda = 395$ nm προκάλεσε τη διέγερση όλων των χρωστικών του FCP στην κατάσταση S_2 . Τα φάσματα διαφορικής απορρόφησης του δείγματος Frag-HL-Fraction-3 απεικονίζονται στο Σχήμα 4.5.



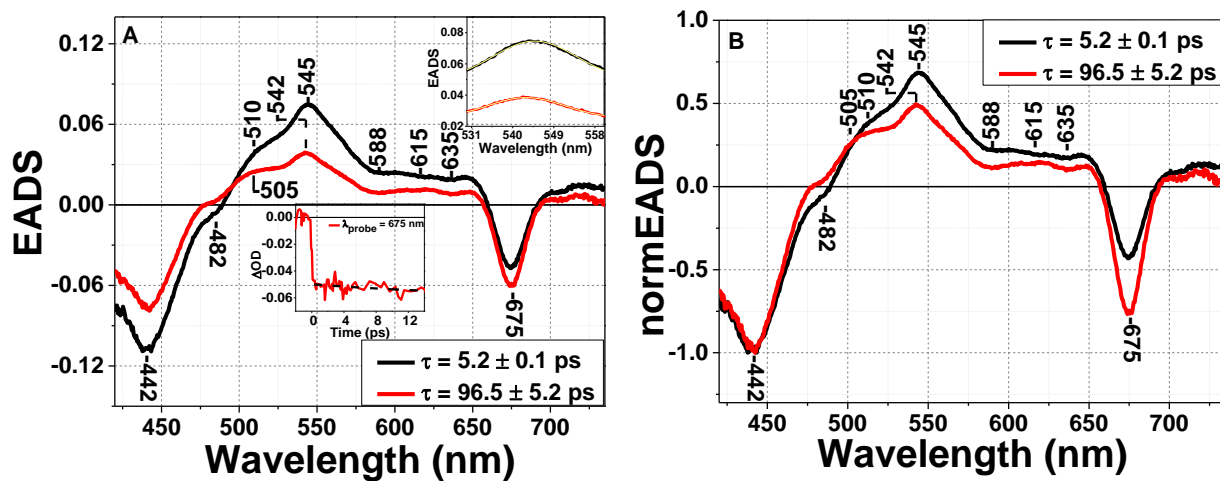
Σχήμα 4.5: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-HL-Fraction-3.

Στην φασματική περιοχή 420 - 500 nm παρατηρούνται οι μεταβάσεις GSB από την κατάσταση S_2 όλων των χρωστικών εντός του FCP (Fx, Chl-a, Chl-c, Ddx και Chlide-a). Η χαρακτηριστική κορυφή σε $\lambda = 440$ nm οφείλεται στην GSB μετάβαση της Chl-a και του Chlide-a ενώ η αρνητική κορυφή σε $\lambda = 482$ nm αποδίδεται στην GSB της Fx και της Ddx. Στην περιοχή αυτή, ($\lambda = 482$ nm) θα αναμέναμε και την εμφάνιση μιας θετικής κορυφής λόγω της μετάβασης ESA της Chl-a. Λόγω της υπέρθεσης των σημάτων για την απόδοση του τελικού φάσματος παρατηρείται μόνο η αρνητική κορυφή της Fx και της Ddx, καθώς είναι μεγαλύτερη η συγκέντρωσή τους στο δείγμα από την Chl-a (2:1).

Η ευρεία φασματική ταινία στην περιοχή 490 - 720 nm αποδίδεται σε μετάβαση ESA της Fx. Η κορυφή απορρόφησης $\lambda = 542$ nm, αποδίδεται σε μεταβάσεις από τις καταστάσεις S_1 προς τα επίπεδα S_n της Fx και της Ddx. Παράλληλα, στην περιοχή αυτή εμφανίζονται κορυφές που αποδίδονται σε μεταβάσεις GSB/SE από την κατάσταση S_1 της Chl-a σε $\lambda = 675$ nm και της Chl-c σε $\lambda = 588$ nm και $\lambda = 635$ nm. Οι παραπάνω μεταβάσεις απεικονίζονται με ενεργειακό διάγραμμα στο Σχήμα 4.6.



Σχήμα 4.6: Ενεργειακό διάγραμμα των Fx, Chl-a, Chl-c, Ddx και Chlide-a χρωστικών που περιέχονται στο δείγμα Frag-HL-Fraction-3.

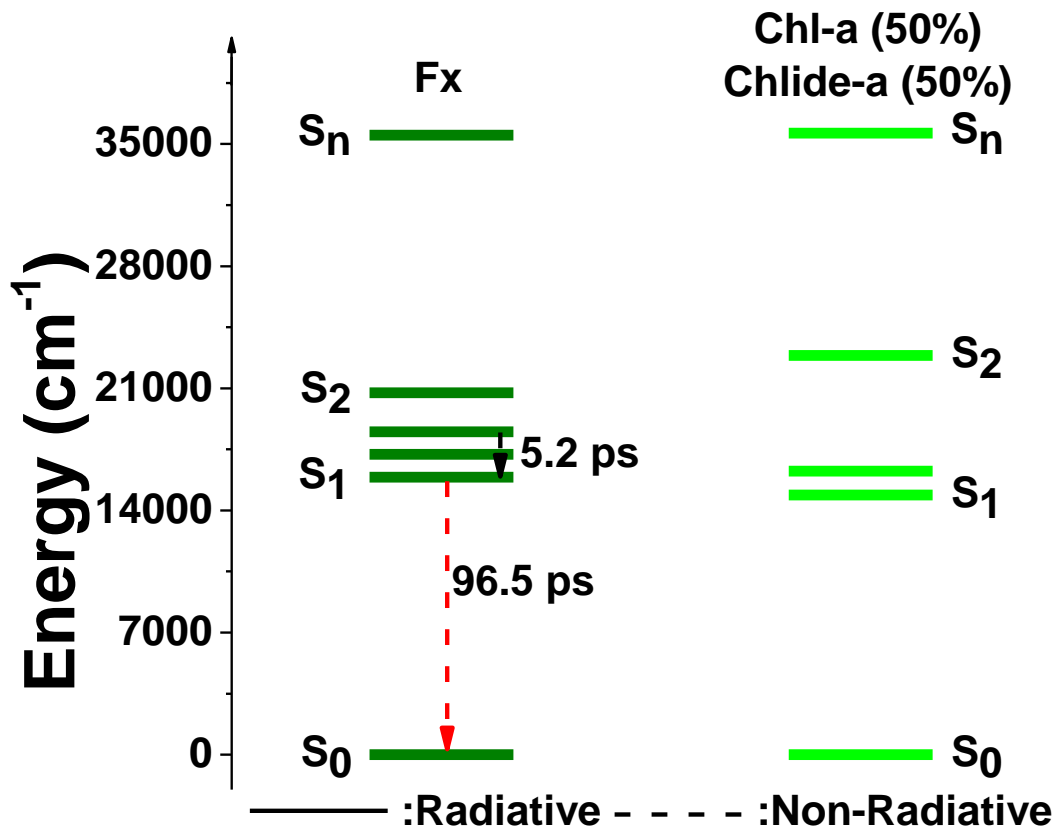


Σχήμα 4.7: Α) Φάσματα EADS και Β) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Frag-HL-Fraction-3. Ένθετα: α) Κινητική καμπύλη για λ_{probe} = 675 nm, β) Προσομοίωση με συνάρτηση Gauss της ταινίας σε λ = 540-550 nm (FWHM_{black line} = 22 nm, FWHM_{red line} = 19 nm).

Από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων με την μέθοδο ανάλυσης global (Σχήμα 4.7) προέκυψαν τα φάσματα EADS με χρόνους ζωής $\tau = 5.2 \pm 0.1$ ps και $\tau = 96.5 \pm 5.2$ ps. Ο χρόνος ζωής $\tau = 5.2 \pm 0.1$ ps, που αντιστοιχεί στο 1^ο EADS, αποδίδεται στην δονητικά διεγερμένη κατάσταση S_1 (hot S_1) της Fx. Ο χρόνος ζωής, $\tau = 96.5 \pm 5.2$ ps, του 2^{ου} EADS αποδίδεται στην κατάσταση S_1 της Fx. Ο χρόνος αυτός έχει εκτιμηθεί με σχετικά χαμηλή αξιοπιστία λόγω αδυναμίας του χρονικού παραθύρου της μέτρησης (από -8 έως 20 ps) στην προσέγγιση του χαρακτηριστικού χρόνου του φαινομένου. Οι φωτοφυσικές διεργασίες αποδιέγερσης και οι χρόνοι ζωής των καταστάσεων της Fx απεικονίζονται στο ενεργειακό διάγραμμα του Σχήματος 4.8.

Στο 1^ο EADS παρατηρείται μια φασματική ταινία με μέγιστο σε $\lambda = 545$ nm (FWHM = 22 nm), η οποία καθώς το φάσμα εξελίσσεται στο 2^ο EADS παρουσιάζει μια μετατόπιση του μεγίστου σε $\lambda = 542$ nm και παράλληλα μείωση του εύρους της κορυφής (FWHM = 19 nm). Οι μεταβολές αυτές αποδίδονται στη δονητική αποδιέγερση της κατάστασης S_1 (hot S_1) της Fx. Η μείωση της έντασης της κορυφής στα 545 nm και της κορυφής σε $\lambda = 510$ nm, στο 2^ο EADS, αποδίδεται σε μερική αποδιέγερση της κατάστασης S_1 Fx. Η μείωση αυτή των εντάσεων των συγκεκριμένων κορυφών επιτρέπει, πλέον, την διάκριση της κορυφής σε $\lambda = 505$ nm που αποδίδεται στην μετάβαση ESA του Chlide-a. Η ύπαρξη της Ddx στο δείγμα Frag-HL-Fraction-3 έχει ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των σχετικών εντάσεων των κορυφών σε $\lambda = 542$ nm και σε $\lambda = 510$ nm ($I_{542\text{nm}}/I_{510\text{nm}}$) εν συγκρίσει με τις αντίστοιχες στο δείγμα Frag-LL-Fraction-3.

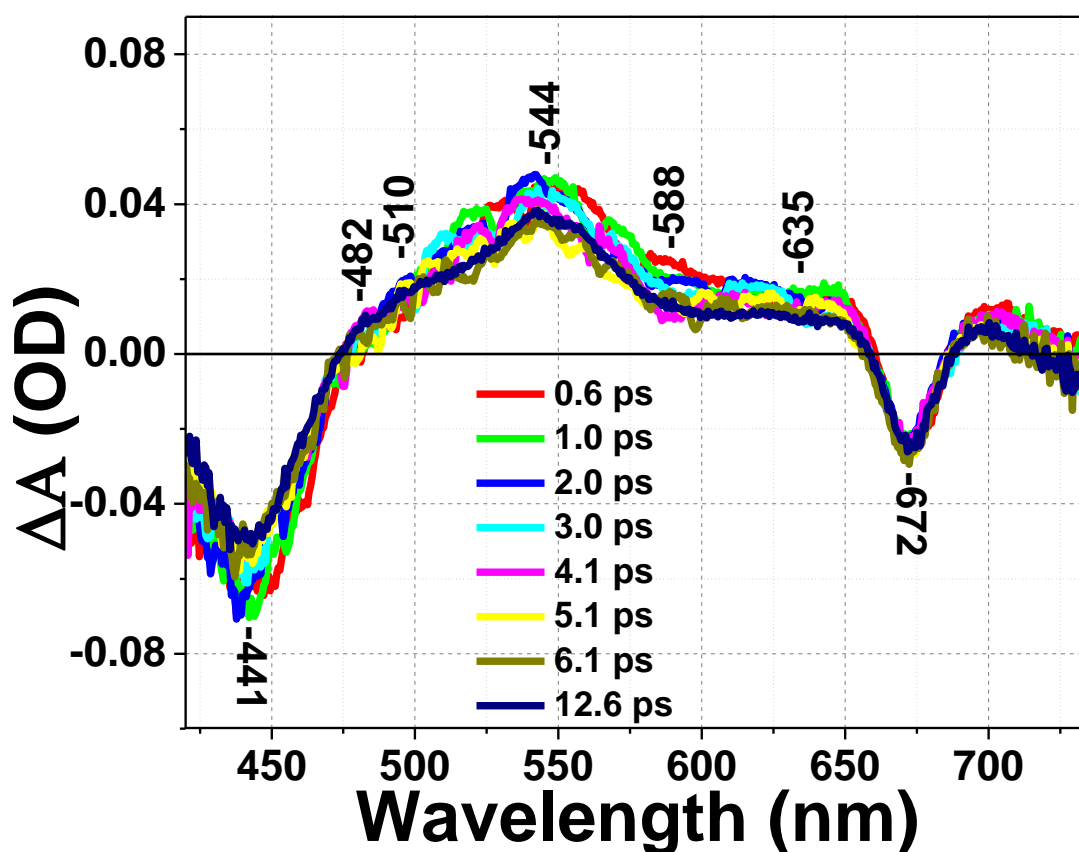
Η μείωση της έντασης της κορυφής σε $\lambda = 442$ nm, από το 1^ο EADS στο 2^ο, αποδίδεται στην πλήθυνση της κατάστασης S_0 της Fx. Οι μεταβάσεις $S_0 \rightarrow S_2$ του Chlide-a, της Chl-a και της Chl-c δεν συνεισφέρουν σε αυτή την μείωση, διότι οι χρόνοι ζωής της τους είναι της τάξης των μερικών νανοδευτερολέπτων (ns). Η κορυφή σε $\lambda = 675$ nm αποδίδεται σε μετάβαση GSB/SE από την κατάσταση S_1 του Chlide-a και της Chl-a. Η φαινομενική αύξηση της έντασης της κορυφής από το 1^ο EADS στο 2^ο δεν επιβεβαιώνεται από την κινητική καμπύλη σε $\lambda_{\text{probe}} = 675$ nm, συνεπώς θεωρούμε ότι δεν μεταβάλλεται ο πληθυσμός των καταστάσεων αυτών. Η απόκλιση της ανάλυσης global από την κινητική καμπύλη οφείλεται στον υψηλό θόρυβο των πειραματικών δεδομένων.



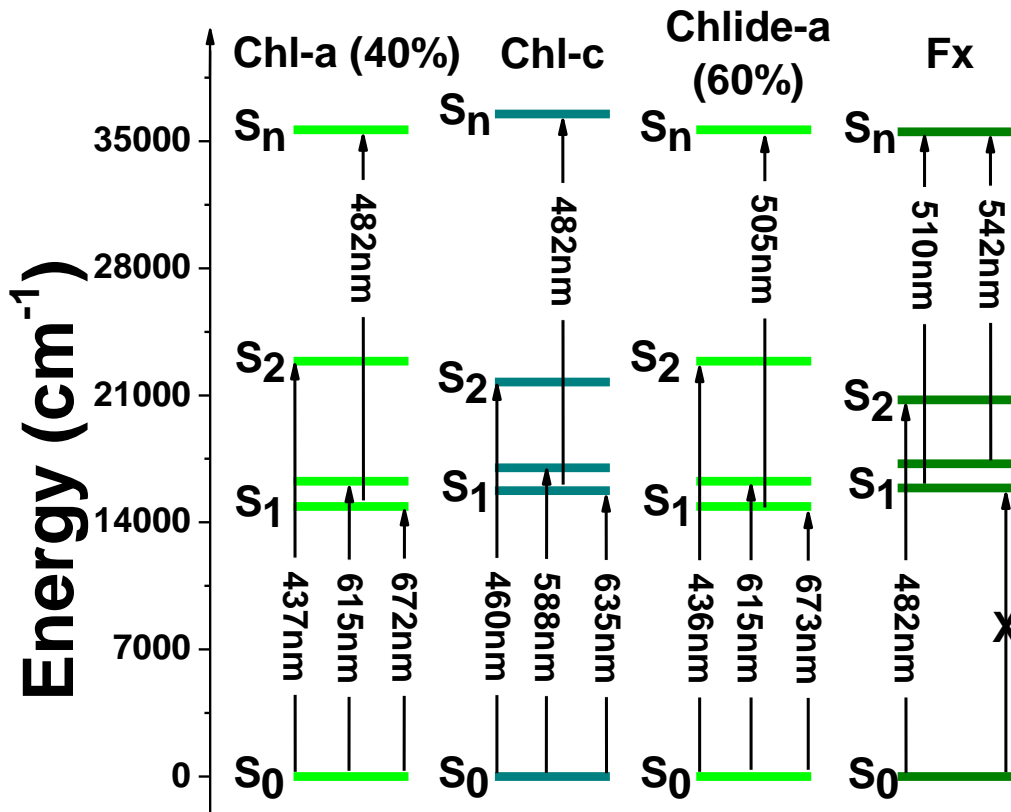
Σχήμα 4.8: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Fx, Chl-a και Chlide-a, που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-HL-Fraction-3. Στο διάγραμμα σημειώνονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.

Fragilariopsis sp.-Red Light-Fraction-3 (Frag-RL-Fraction-3)

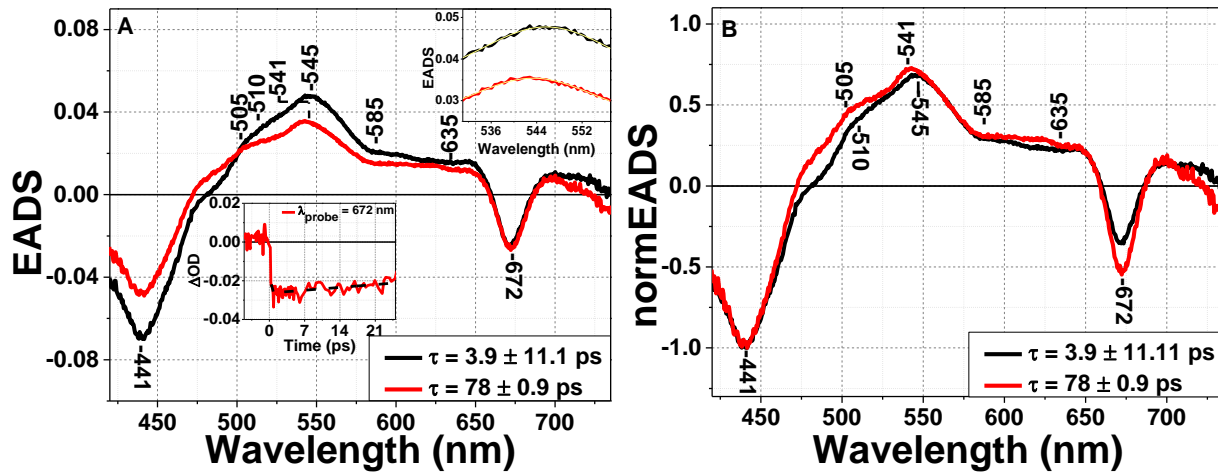
Η χρήση κόκκινου φωτός για την ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* είχε ως αποτέλεσμα οι κύριες χρωστικές των FCPs να είναι η Fx (1.303 mol Fx/ mol Chl-a), η Chl-a (1 mol Chl-a/ mol Chl-a), η Chl-c (0.693 mol Chl-c/ mol Chl-a) και το Chlide-a (1.551 mol Chlide-a/ mol Chl-a). Η μελέτη του δείγματος Frag-RL-Fraction-3 με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ και την χρήση παλμού άντλησης σε $\lambda = 395 \text{ nm}$ είχε ως αποτέλεσμα να διεγερθούν όλες οι χρωστικές στην κατάσταση S_2 και να προκύψουν τα φάσματα διαφορικής απορρόφησης του Σχήματος 4.9.



Σχήμα 4.9: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-RL-Fraction-3.



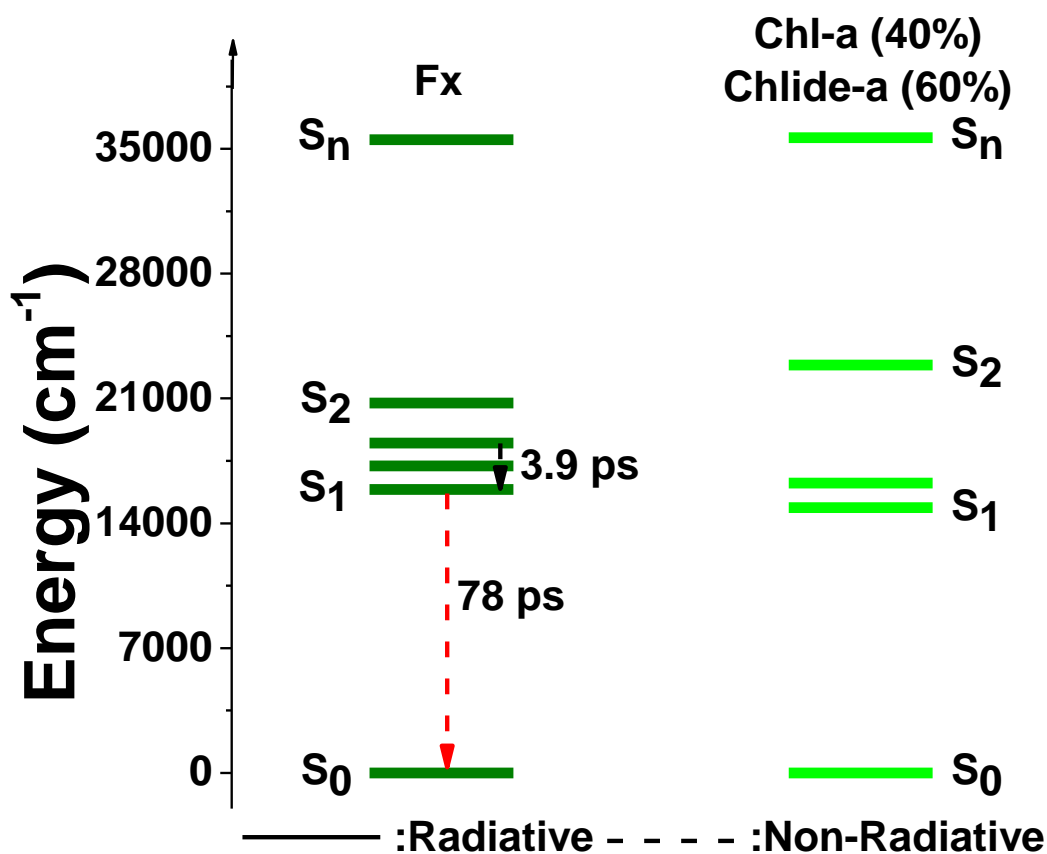
Σχήμα 4.10: Ενεργειακό διάγραμμα των Fx, Chl-a, Chl-c και Chlide-a χρωστικών που περιέχονται στο δείγμα Frag-RL-Fraction-3.



Σχήμα 4.11: Α) Φάσματα EADS και Β) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Frag-RL-Fraction-3. Ένθετα: α) Κινητική καμπύλη για λ_{probe} = 672 nm, β) Προσομοίωση με συνάρτηση Gauss της κορυφής σε λ = 540-550 nm (FWHM_{black line} = 25 nm, FWHM_{red line} = 23 nm).

Τα φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-RL-Fraction-3 εμφανίζουν το ίδιο προφίλ με τα φάσματα του δείγματος Frag-HL-Fraction-3, το οποίο μπορεί να αιτιολογηθεί

από την παρόμοια χημική σύσταση των δυο FCPs στις περιεχόμενες χρωστικές. Από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων με την μέθοδο ανάλυση global (Σχήμα 4.11) προέκυψαν τα φάσματα EADS με χρόνους ζωής $\tau = 3.9 \pm 11.1$ ps και $\tau = 78 \pm 0.9$ ps. Ο χρόνος ζωής, $\tau = 3.9 \pm 11.1$ ps, που αντιστοιχεί στο 1^ο EADS, αποδίδεται στην δονητικά διεγερμένη κατάσταση S_1 (hot S_1) της Fx. Ο χρόνος ζωής, $\tau = 78 \pm 0.9$ ps, του 2^{ου} EADS αποδίδεται στην κατάσταση S_1 της Fx. Ο χρόνος αυτός έχει εκτιμηθεί με μικρή πιστότητα λόγω αδυναμίας του χρονικού παραθύρου της μέτρησης (από -8 έως 30 ps) στην προσέγγιση του χαρακτηριστικού χρόνου του φαινομένου. Οι προαναφερόμενες φωτοφυσικές διεργασίες απεικονίζονται στο Σχήμα 4.12.



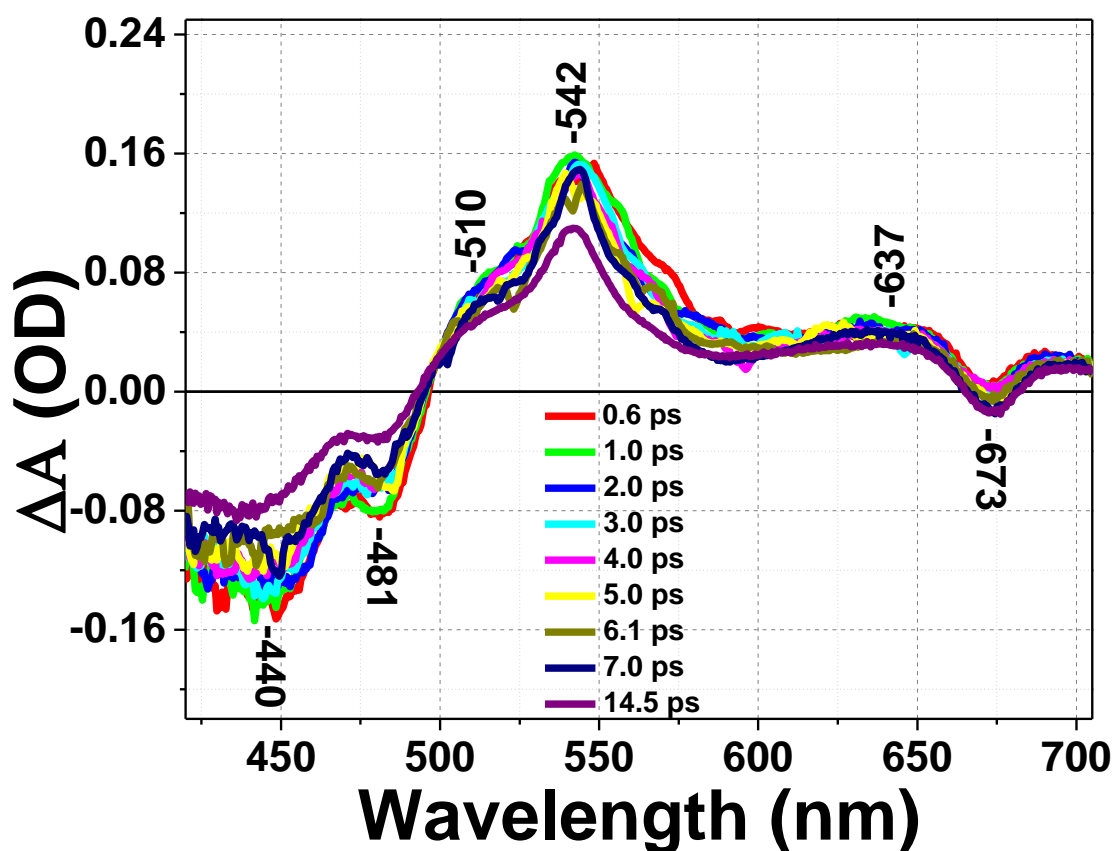
Σχήμα 4.12: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Fx, Chl-a και Chlide-a, που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-RL-Fraction-3. Στο διάγραμμα σημειώνονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.

4.2 Υπερταχεία δυναμική των FCPs του κλάσματος 1, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp.*

Fragilariopsis sp.-Low Light-Fraction-1 (*Frag-LL-Fraction-1*)

Χρησιμοποιώντας την μέθοδο HPLC πραγματοποιήθηκε η απομόνωση ενός δεύτερου είδους πρωτεϊνών FCP (κλάσμα 1) από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp* και προσδιορίστηκε η σύσταση των χρωστικών αυτού. Οι κύριες χρωστικές που εμπεριέχονται στο δείγμα *Frag-LL-Fraction-1* είναι η Fx (7.115 mol Fx/ mol Chl-a), Ddx (4.104 mol Ddx/ mol Chl-a) και Chlide-a (4.713 mol Chlide-a/ mol Chl-a).

Τα φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος *Frag-LL-Fraction-1* (Σχήμα 4.13) προέκυψαν έπειτα από διέγερση όλων των χρωστικών εντός του FCP (Fx, Ddx και Chlide-a) στην κατάσταση S_2 .

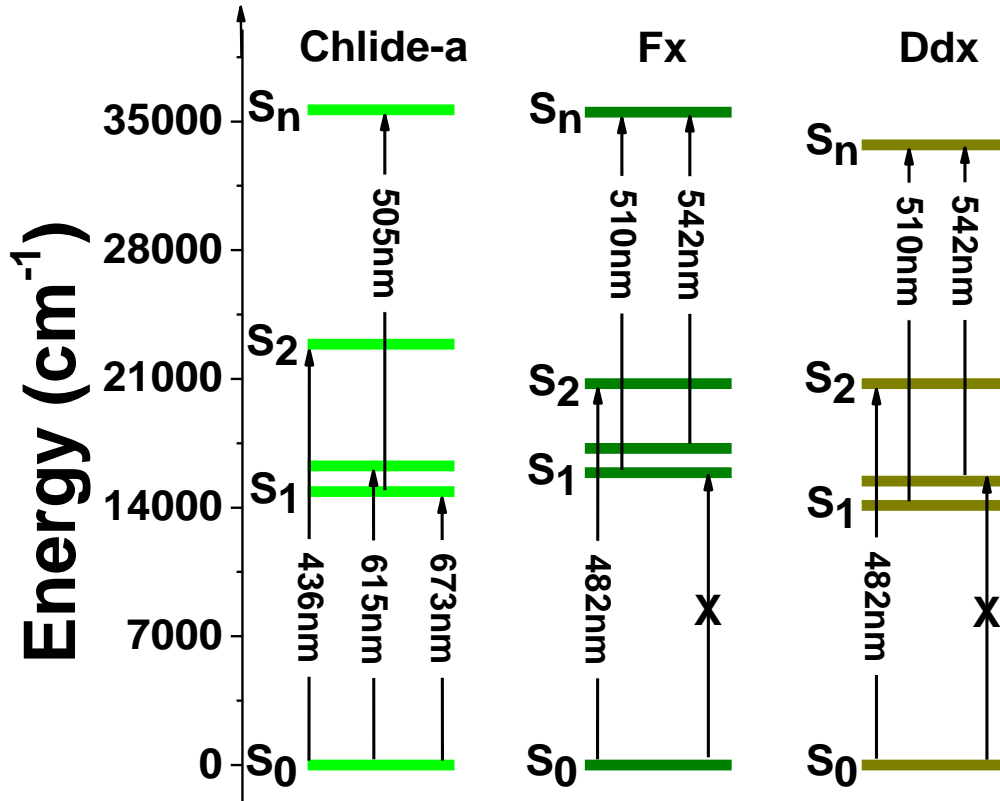


Σχήμα 4.13: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος *Frag-LL-Fraction-1*.

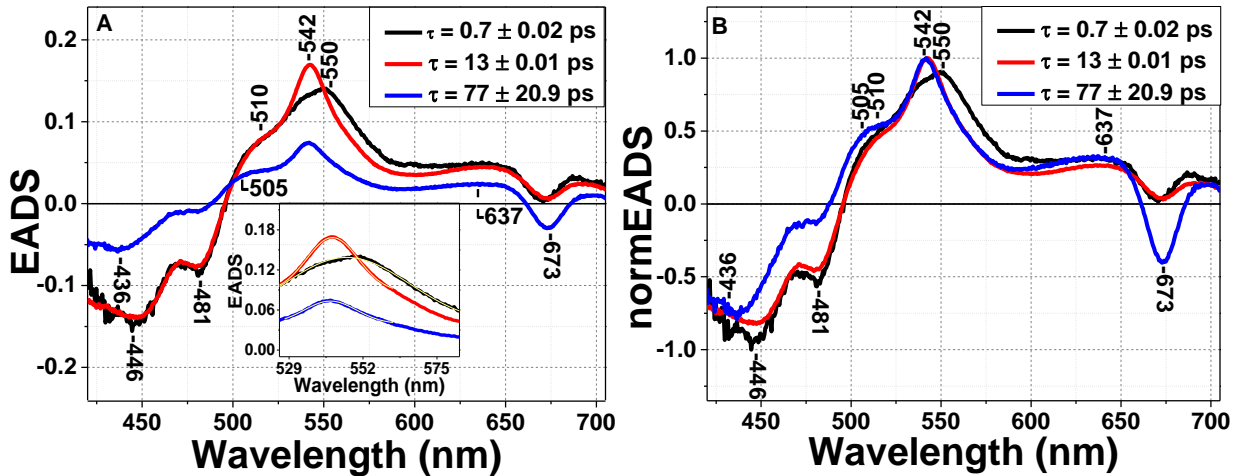
Στην φασματική περιοχή 420 - 490 nm παρατηρούνται οι μεταβάσεις GSB των Chlide-a, Ddx και Fx από την κατάσταση S_2 . Η αρνητική κορυφή σε $\lambda = 440$ nm αποδίδεται, κατά κύριο λόγο, στο Chlide-a και η κορυφή σε $\lambda = 481$ nm στα καροτενοειδή (Ddx και Fx) (Σχήμα 4.14).

Η μετάβαση ESA της Fx από την κατάσταση S_1 αποδίδει μια ευρεία φασματική ταινία στην περιοχή 500 nm - 720 nm με μέγιστα σε $\lambda = 510$ nm, $\lambda = 542$ nm και $\lambda = 637$ nm. Οι κορυφές σε $\lambda = 510$ nm και $\lambda = 542$ nm οφείλονται σε μεταβάσεις $S_1 \rightarrow S_n$ από διαφορετικά δονητικά επίπεδα, ενώ η ταινία απορρόφησης σε $\lambda = 637$ nm προέρχεται από το επίπεδο εσωτερικής (ενδομοριακής) μεταφοράς φορτίου (Internal Charge Transfer-ICT) στο επίπεδο S_n [3]. Παράλληλα, στην ίδια περιοχή (500 - 600 nm) εμφανίζεται και η μετάβαση ESA της Ddx που έχει, επίσης, μέγιστα σε $\lambda = 510$ nm και $\lambda = 542$ nm (Σχήμα 4.14).

Η κορυφή σε $\lambda = 673$ nm αποδίδεται σε GSB/SE από την κατάσταση S_1 του Chlide-a (Σχήμα 4.14). Η κορυφή παρατηρείται σε παραπλήσια μήκη κύματος με την αντίστοιχη κορυφή της μετάβασης GSB/SE από την κατάσταση S_1 για την Chl-a, όπως αυτή παρατηρήθηκε στα φάσματα των δειγμάτων με έλλειψη ή αρκετά χαμηλή συγκέντρωση σε Chlide-a. Η κυρίαρχη παρουσία του Chlide-a έναντι της Chl-a δεν μεταβάλλει τα φασματικά αποτελέσματα συνεπώς θεωρούμε ότι η ομάδα φυτολίου (phytyl group) δεν επηρεάζει τις ιδιότητες του πορφυρινικού δακτυλίου, ακόμα και παρουσία πρωτεϊνικού περιβάλλοντος ή παρουσίας γειτονικών χρωστικών (π.χ. Fx). Η παρατήρηση φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών της Chl-c στα φάσματα διαφορετικής απορρόφησης του δείγματος Frag-LL-Fraction-1 δεν ήταν δυνατή δεδομένης της αμελητέας ποσότητας της στο δείγμα (Βλέπε Κεφάλαιο 3).



Σχήμα 4.14: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Chlide-a, Fx και Ddx, που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-LL-Fraction-1.



Σχήμα 4.15: A) Φάσματα EADS και B) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Frag-LL-Fraction-1. Ένθετο: Προσομοίωση με συνάρτηση Gauss της κορυφής σε $\lambda = 540-550$ nm ($\text{FWHM}_{\text{black line}} = 47$ nm, $\text{FWHM}_{\text{red line}} = 18$ nm, $\text{FWHM}_{\text{blue line}} = 14$ nm).

Η ανάλυση των πειραματικών δεδομένων με την μέθοδο ανάλυση global παράγαγε τα φάσματα EADS του Σχήματος 4.15, με χρόνους ζωής $\tau = 0.7 \pm 0.02$ ps, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps και $\tau = 77 \pm 20.9$ ps. Ο χρόνος ζωής $\tau = 0.7 \pm 0.02$ ps, που αντιστοιχεί στο 1^ο EADS, αποδίδεται στις δονητικά διεγερμένες καταστάσεις S_1 (hot S_1) της Fx και της Ddx. Ο χρόνος ζωής, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps, του 2^ο EADS αποδίδεται στην κατάσταση S_1 της Ddx. Ο τρίτος χρόνος ζωής, $\tau = 77 \pm 20.9$ ps, του 3^ο EADS αποδίδεται στην μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 του Chlide-a και στην αποδιέγερση της Fx. Ο χρόνος αυτός δεν είναι εφικτό να εκτιμηθεί με μεγάλη ακρίβεια λόγω του περιορισμένου χρονικού παραθύρου της μέτρησης (από -8 έως 30 ps). Στο ενεργειακό διάγραμμα του Σχήματος 4.16 απεικονίζονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που αναλύθηκαν παραπάνω.

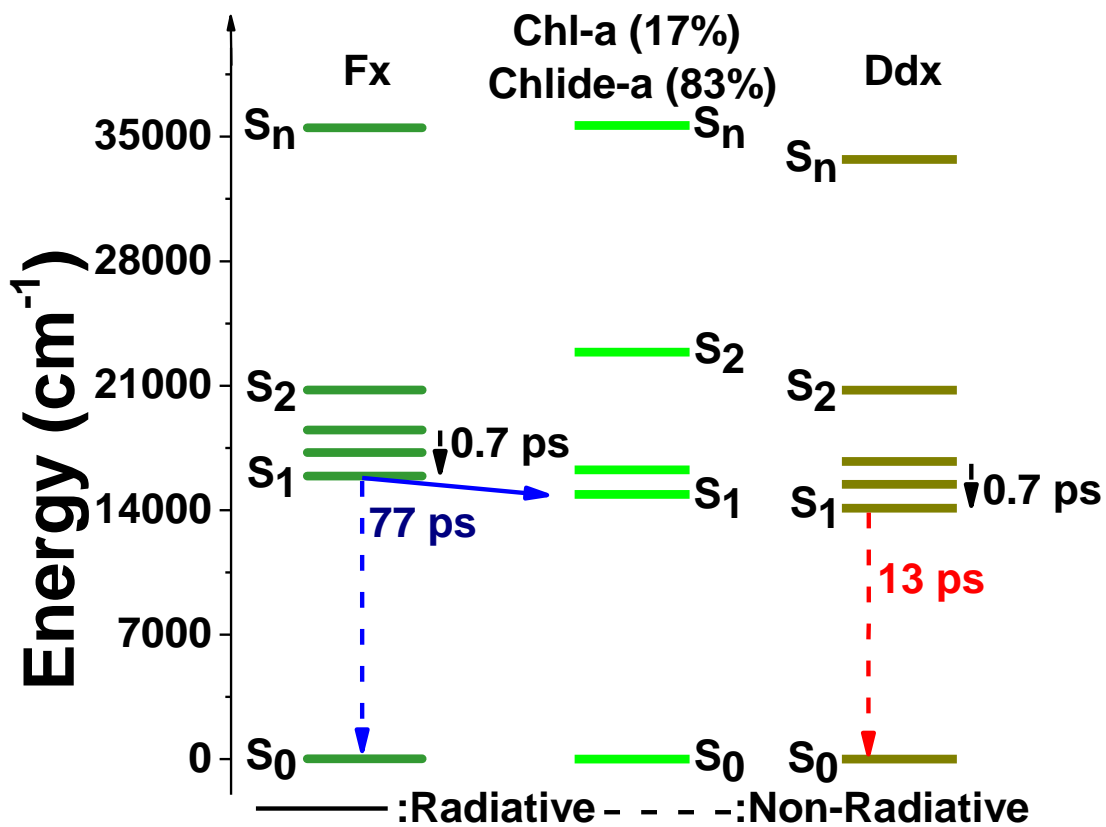
Κατά την εξέλιξη του φάσματος από το 1^ο στο 2^ο EADS, παρατηρείται μετατόπιση του μεγίστου της κορυφής από $\lambda = 550$ nm σε $\lambda = 542$ nm με παράλληλη μείωση του εύρους της κορυφής από FWHM = 47 nm σε FWHM = 18 nm. Οι μεταβολές αυτές αποδίδονται στη δονητική αποδιέγερση των καταστάσεων S_1 (hot S_1) της Fx και της Ddx. Η μεταβολή των κορυφών αυτών δεν ακολουθείται από κάποια μεταβολή στα φασματικά χαρακτηριστικά των περιοχών 420 - 500 nm και 625 - 730 nm, όπου εντοπίζονται μεταβάσεις που σχετίζονται με το Chlide-a, το οποίο αποκλείει οποιοδήποτε ενδεχόμενο μεταφοράς ενέργειας μεταξύ του Chlide-a και της Ddx.

Ο χρόνος ζωής, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps, του 2^ο EADS αποδίδεται στην κατάσταση S_1 της Ddx. Κατά την εξέλιξη του φάσματος από το 2^ο στο 3^ο EADS, η κορυφή σε $\lambda = 542$ nm στενεύει φασματικά (FWHM = 14 nm). Η μεταβολή αυτή αποδίδεται στην αποδιέγερση της Ddx με αποτέλεσμα την μείωση της συνεισφοράς της συγκεκριμένης μετάβασης στο εύρος της κορυφής σε $\lambda = 542$ nm. Ο χρόνος ζωής, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps, του 2^ο EADS αποκλίνει από την βιβλιογραφική τιμή του χρόνου ζωής για την αποδιέγερση της Ddx σε διάλυμα (22 ps) [4], ωστόσο, εκτιμάται ότι η απόκλιση αυτή μπορεί να αιτιολογηθεί από την συνεισφορά του πρωτεϊνικού περιβάλλοντος των χρωστικών. Η μετατόπιση του μεγίστου της κορυφής από $\lambda = 446$ nm, στο 2^ο EADS, σε $\lambda = 436$ nm, στο 3^ο EADS, αποδίδεται, επίσης, στην αποδιέγερση των καροτενοειδών, της Ddx και της Fx. Η κορυφή σε $\lambda = 436$ nm, στο 3^ο EADS, οφείλεται στο εναπομείναν σήμα της μετάβασης GSB του Chlide-a.

Ο τρίτος χρόνος ζωής, $\tau = 77 \pm 20.9$ ps, του 3^ο EADS αποδίδεται στην μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 του Chlide-a και στην αποδιέγερση της Fx. Η

αποδιέγερση πλέον, της Ddx και της Fx, στο 3^ο EADS έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έντασης της κορυφής σε $\lambda = 545$ nm, καθώς και της κορυφής σε $\lambda = 510$ nm γεγονός που επιτρέπει, πλέον, την διάκριση της κορυφής σε $\lambda = 505$ nm που αποδίδεται στην μετάβαση ESA του Chlide-a. Επιπλέον, η αποδιέγερση της κατάστασης S₁ της Fx έχει ως αποτέλεσμα την μείωση της έντασης των κορυφών στην περιοχή 420 - 650 nm.

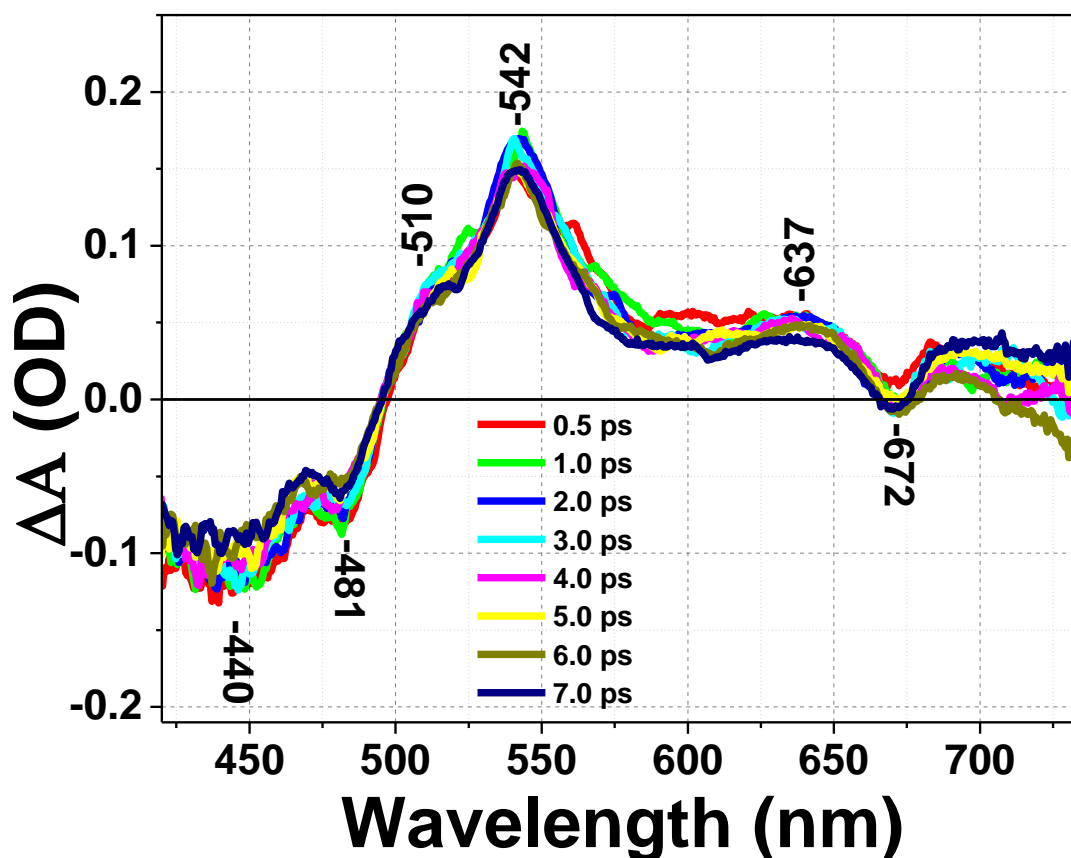
Η παράλληλη μείωση της έντασης των κορυφών στην ίδια περιοχή με την παρατηρούμενη αύξηση της έντασης της κορυφής σε $\lambda = 673$ nm, κατά την εξέλιξη του 2^{ου} EADS στο 3^ο, αποδίδεται σε μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S₁ της Fx στην κατάσταση S₁ του Chlide-a.



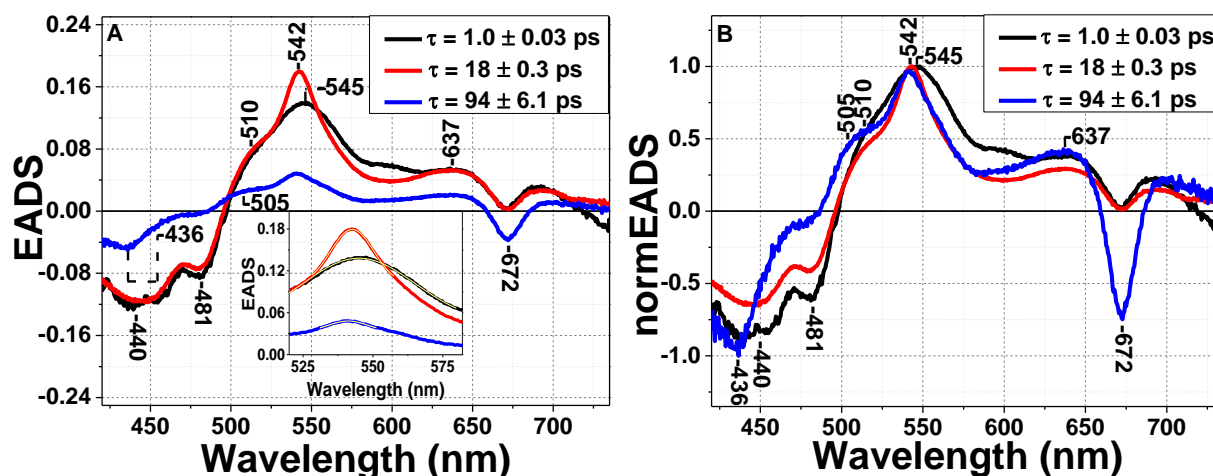
Σχήμα 4.16: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Fx, Chl-a, Chlide-a και Ddx, που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-LL-Fraction-1. Στο διάγραμμα σημειώνονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.

Fragilariopsis sp.-Red Light-Fraction-1 (Frag-RL-Fraction-1)

Η χρήση κόκκινου φωτός για την ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* είχε ως αποτέλεσμα οι πρωτεΐνες FCPs του κλάσματος 1 (Frag-RL-Fraction-1) να έχουν ως κύριες χρωστικές την Fx (1.674 mol Fx/ mol Chl-a), την Ddx (0.682 mol Ddx/ mol Chl-a) και το Chlide-a (2.313 mol Chlide-a/ mol Chl-a). Η μελέτη του δείγματος Frag-RL-Fraction-3 με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ και τη χρήση παλμού άντλησης σε $\lambda = 395$ nm είχε ως αποτέλεσμα να διεγερθούν όλες οι χρωστικές στην κατάσταση S_2 και να προκύψουν τα φάσματα διαφορικής απορρόφησης του Σχήματος 4.17.

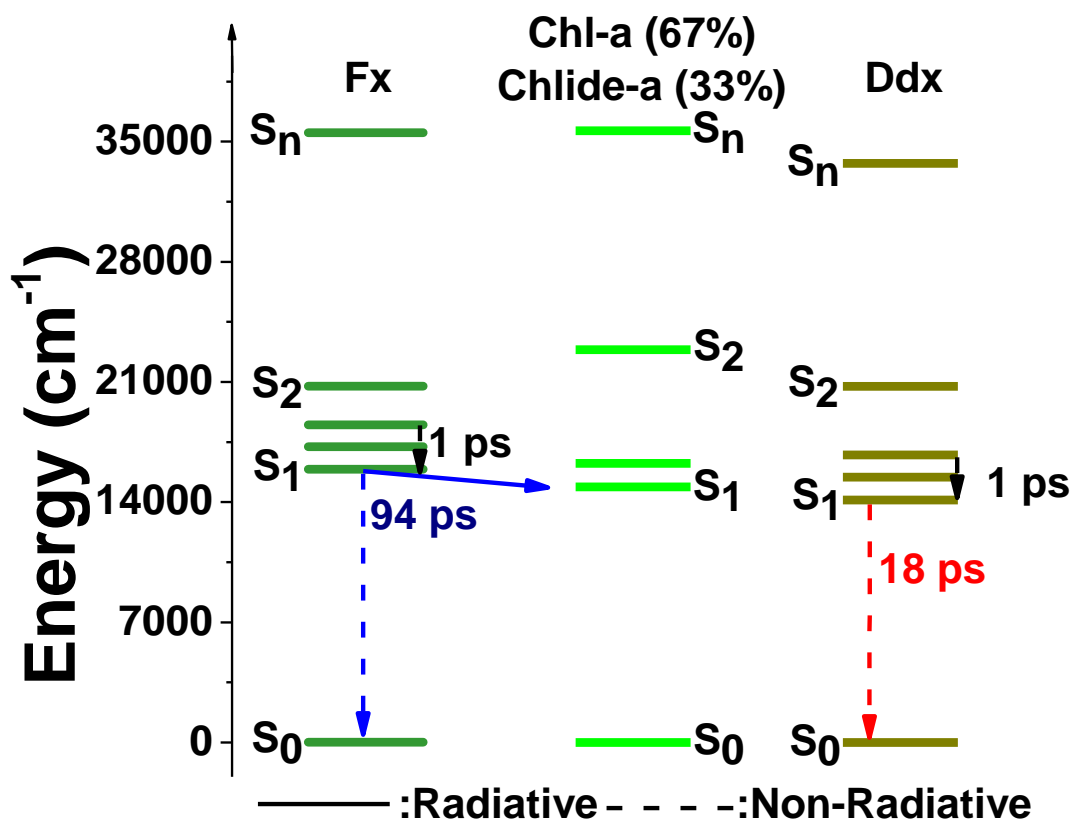


Σχήμα 4.17: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-RL-Fraction-1.



Σχήμα 4.18: A) Φάσματα EADS και B) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Frag-RL-Fraction-1. Ένθετο: Προσομοίωση με συνάρτηση Gauss της κορυφής σε $\lambda = 540\text{-}550\text{ nm}$ ($\text{FWHM}_{\text{black line}} = 47\text{ nm}$, $\text{FWHM}_{\text{red line}} = 18\text{ nm}$, $\text{FWHM}_{\text{blue line}} = 14\text{ nm}$).

Τα φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-RL-Fraction-1 εμφανίζουν το ίδιο προφίλ με τα φάσματα του δείγματος Frag-LL-Fraction-1. Από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων με την μέθοδο ανάλυση global (Σχήμα 4.18) προέκυψαν τα φάσματα EADS με χρόνους ζωής $\tau = 1.0 \pm 0.03\text{ ps}$, $\tau = 18 \pm 0.3\text{ ps}$ και $\tau = 94 \pm 6.1\text{ ps}$. Ο χρόνος ζωής $\tau = 1.0 \pm 0.03\text{ ps}$, που αντιστοιχεί στο 1^ο EADS, αποδίδεται στις δονητικά διεγερμένες καταστάσεις S_1 (hot S_1) της Fx και της Ddx. Ο χρόνος ζωής, $\tau = 18 \pm 0.3\text{ ps}$, του 2^{ου} EADS αποδίδεται στην κατάσταση S_1 της Ddx. Ο χρόνος ζωής του 3^{ου} EADS, αποδίδεται στην μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 του Chlide-a και στην αποδιέγερση της Fx. Ο χρόνος αυτός έχει εκτιμηθεί με μικρή αξιοπιστία λόγω περιορισμένου χρονικού παραθύρου της μέτρησης (από -8 έως 40 ps). Οι παραπάνω φωτοφυσικές διεργασίες απεικονίζονται στο Σχήμα 4.19.

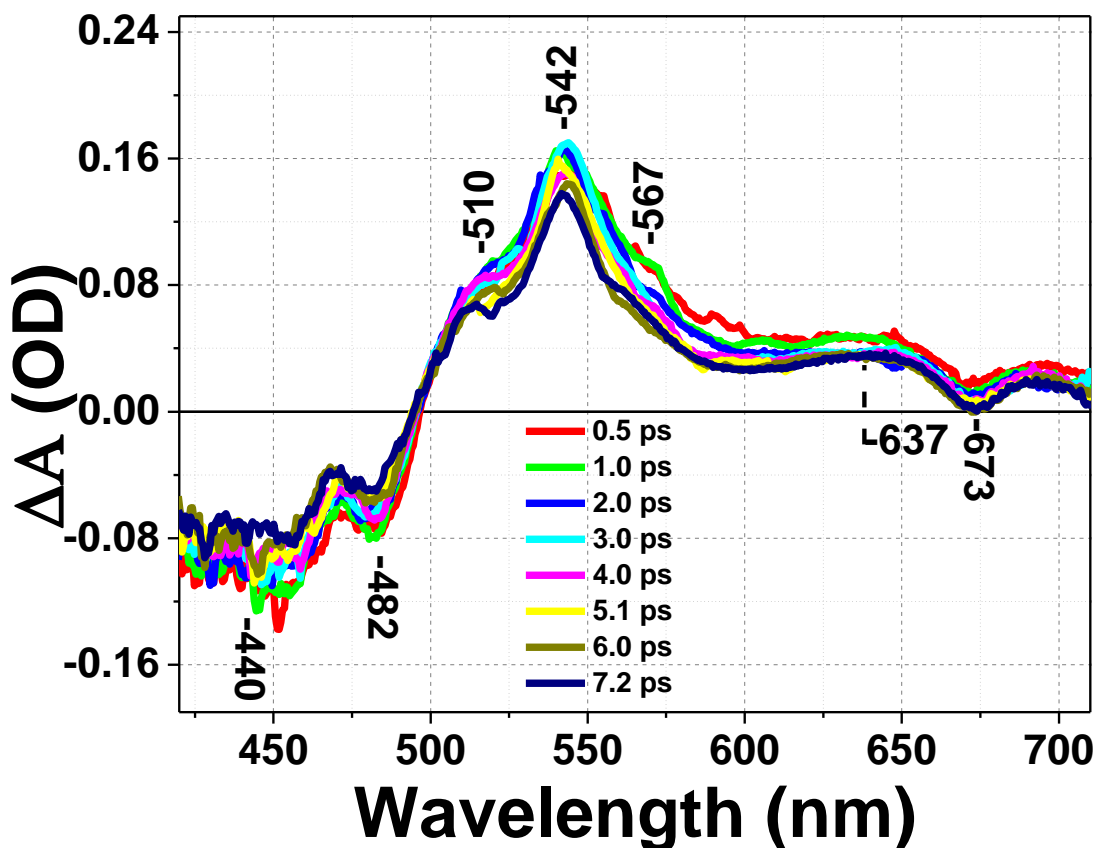


Σχήμα 4.19: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Fx, Chl-a, Chlide-a και Ddx, που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-RL-Fraction-1. Στο διάγραμμα σημειώνονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.

Fragilariopsis sp.-High Light-Fraction-1 (Frag-HL-Fraction-1)

Η ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp* με υψηλής έντασης λευκό φως είχε ως αποτέλεσμα να μεταβληθεί η σύσταση των πρωτεϊνών FCPs. Στο δείγμα Frag-HL-Fraction-1 κύριες χρωστικές είναι η Fx (4.104 mol Fx/ mol Chl-a), η Ddx (4.448 mol Ddx/ mol Chl-a), το Chlide-a (2.313 mol Chlide-a/ mol Chl-a) και η διατινοξανθίνη (Dtx, 0.674 mol Dtx/ mol Chl-a). Η Ddx και η Dtx είναι καροτενοειδή που συμμετέχουν στην προστασία των πρωτεϊνών FCPs από την υψηλή ένταση της ακτινοβολίας (Βλέπε Κεφάλαιο 2).

Η μελέτη του δείγματος Frag-HL-Fraction-1 με την χρονοαναλυόμενη φασματοσκοπία λέιζερ απέδωσε τα φάσματα παροδικής απορρόφησης του Σχήματος 4.20. Ο παλμός άντλησης που χρησιμοποιήθηκε για την διέγερση του δείγματος ήταν συντονισμένος σε $\lambda = 395$ nm, προκαλώντας την διέγερση όλων των χρωστικών του FCP στην κατάσταση S_2 .



Σχήμα 4.20: Φάσματα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-HL-Fraction-1.

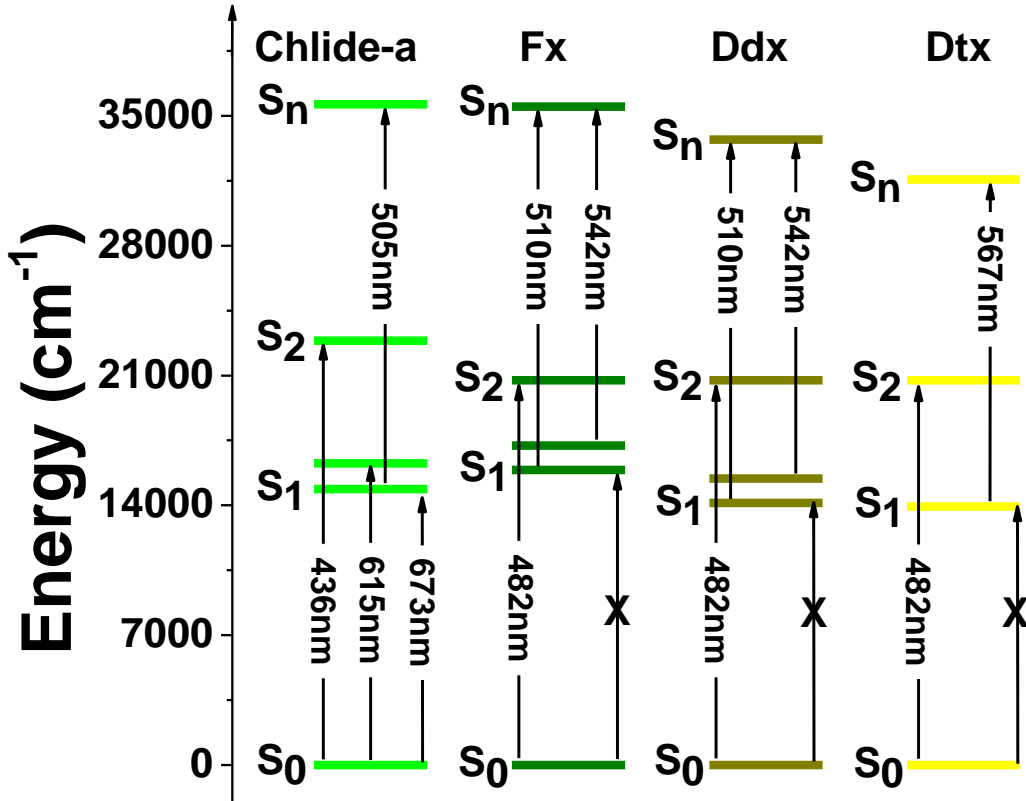
Η χαρακτηριστική διαφορά των φασμάτων του δείγματος Frag-HL-Fraction-1 από εκείνα του δείγματος Frag-LL-Fraction-1 και Frag-RL-Fraction-1 οφείλεται στην ύπαρξη της χρωστικής

Dtx στο δείγμα. Στο φάσμα εντοπίζεται ένας ώμος σε $\lambda = 567$ nm, ο οποίος αποδίδεται στη μετάβαση $S_1 \rightarrow S_n$ της Dtx (Σχήμα 4.21). Οι κορυφές της Dtx είναι ελαφρώς μετατοπισμένες συγκριτικά με τις κορυφές της Ddx και της Fx, λόγω της ύπαρξης ενός επιπλέον δεσμού άνθρακα-άνθρακα στην συζυγία του μορίου και εξαιτίας μια διαμορφωτικής παραμόρφωσης που επάγεται από τον β-δακτύλιο (Βλέπε Κεφάλαιο 2) [4].

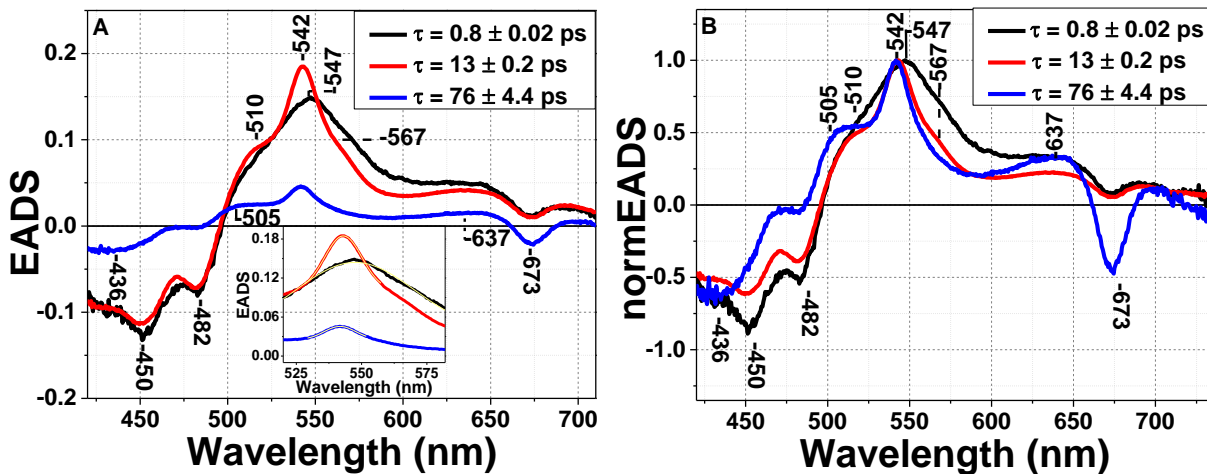
Πέρα των διαφοροποιήσεων του φάσματος του δείγματος Frag-HL-Fraction-1 λόγω της ύπαρξης της Dtx, τα φάσματα παρουσιάζουν παρόμοια μορφή με τα εκείνα των δειγμάτων Frag-LL-Fraction-1 και Frag-RL-Fraction-1. Πιο συγκεκριμένα, στην φασματική περιοχή 420 - 490 nm παρατηρούνται οι μεταβάσεις GSB των Chlide-a, Ddx, Dtx και Fx από τις καταστάσεις S_2 . Η κορυφή σε $\lambda = 440$ nm αποδίδεται στο Chlide-a κατά κύριο λόγο, ενώ η κορυφή σε $\lambda = 482$ nm στα καρτενοειδή (Ddx, Dtx και Fx) (Σχήμα 4.21).

Η ευρεία φασματική ταινία στην περιοχή 500 - 700 nm αποδίδεται στην μετάβαση ESA της Fx. Στην συγκεκριμένη φασματική περιοχή παρατηρούνται οι κορυφές σε $\lambda = 510$ nm και $\lambda = 542$ nm που οφείλονται σε μεταβάσεις $S_1 \rightarrow S_n$ από διαφορετικά δονητικά επίπεδα της Fx και της Ddx (Σχήμα 4.21).

Η κορυφή σε $\lambda = 673$ nm αποδίδεται σε GSB/SE από την κατάσταση S_1 του Chlide-a (Σχήμα 4.21). Όπως και στην περίπτωση των δυο άλλων δειγμάτων του Fraction-1, η παρατήρηση των φασματοσκοπικών χαρακτηριστικών της Chl-c είναι αδύνατη λόγω της αμελητέας ποσότητας της στο δείγμα (Βλέπε Κεφάλαιο 3).



Σχήμα 4.21: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Chlide-a, Fx, Ddx και Dtx που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-HL-Fraction-1.



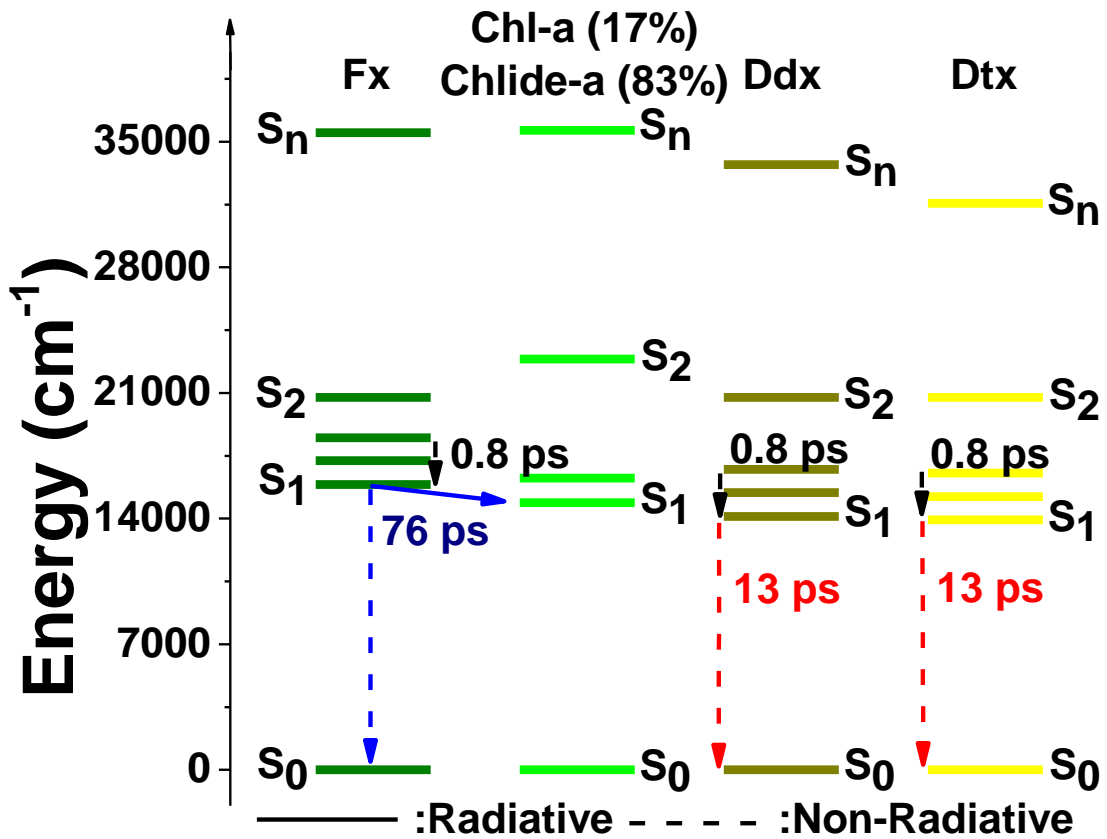
Σχήμα 4.22: Α) Φάσματα EADS και Β) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Frag-HL-Fraction-1. Ένθετο: Προσομοίωση με συνάρτηση Gauss της κορυφής σε $\lambda = 540-550$ nm (FWHM_{black line} = 53 nm, FWHM_{red line} = 16 nm, FWHM_{blue line} = 14 nm).

Τα EADS του Σχήματος 4.26 έχουν χρόνους ζωής $\tau = 0.8 \pm 0.02$ ps, $\tau = 13 \pm 0.2$ ps και $\tau = 76 \pm 4.4$ ps. Ο πρώτος χρόνος, $\tau = 0.8 \pm 0.02$ ps, αποδίδεται στις δονητικά διεγερμένες καταστάσεις S_1 (hot S_1) της Fx, της Ddx και της Dtx. Ο δεύτερος χρόνος αποδίδεται στις καταστάσεις S_1 της Ddx και της Dtx. Ο τρίτος χρόνος αποδίδεται στην μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 του Chlide-a και στην αποδιέγερση της Fx. Ο χρόνος αυτός έχει εκτιμηθεί με μικρή πιστότητα λόγω περιορισμένου χρονικού παραθύρου της μέτρησης (από -8 έως 30 ps). Στο ενεργειακό διάγραμμα του Σχήματος 4.23 απεικονίζονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που αναλύθηκαν παραπάνω.

Η ευρεία κορυφή σε $\lambda = 547$ nm (FWHM = 53 nm) που παρατηρείται στο 1^ο EADS, μετατοπίζεται σε $\lambda = 542$ nm και στενεύει φασματικά (FWHM = 16 nm). Οι μεταβολές αυτές αποδίδονται στην δονητική αποδιέγερση των καταστάσεων S_1 (hot S_1) της Fx, της Ddx και της Dtx. Οι φασματικές περιοχές 420 - 500 nm και 625 - 730 nm δεν μεταβάλλονται κατά την εξέλιξη του 1^{ου} EADS στο 2^ο. Αυτό αποδεικνύει ότι δεν πραγματοποιείται μεταφορά ενέργειας κατά την αποδιέγερση των hot S_1 καταστάσεων της Fx, της Ddx και της Dtx στο Chlide-a.

Στο 3^ο EADS παρατηρείται μείωση του εύρους της κορυφής σε $\lambda = 542$ nm (FWHM = 14 nm) ενώ δεν παρατηρείται η κορυφή σε $\lambda = 567$ nm, η οποία είναι χαρακτηριστική κορυφή της Dtx. Οι μεταβολές αυτές αποδεικνύουν ότι η Ddx και η Dtx δεν συνεισφέρουν φασματικά στο 3^ο EADS και ότι έχουν αποδιεγερθεί. Αυτή η παρατήρηση μας επιτρέπει να καταλήξουμε στο συμπέρασμα ότι η μείωση στην ένταση των κορυφών της φασματικής περιοχής 420 - 650 nm, που παρατηρείται στο 3^ο EADS, και η παράλληλη αύξηση της κορυφής σε $\lambda = 673$ nm οφείλονται σε μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 του Chlide-a. Παράλληλα, η μείωση των κορυφών της φασματικής περιοχής στην περιοχή 420 - 650 nm αποδίδεται στην αποδιέγερση της κατάστασης S_1 της Fx.

Η κορυφή σε $\lambda = 436$ nm στο 3^ο EADS, αποδίδεται στην μετάβαση GSB του Chlide-a ενώ η κορυφή σε $\lambda = 505$ nm αποδίδεται στην μετάβαση ESA του Chlide-a.

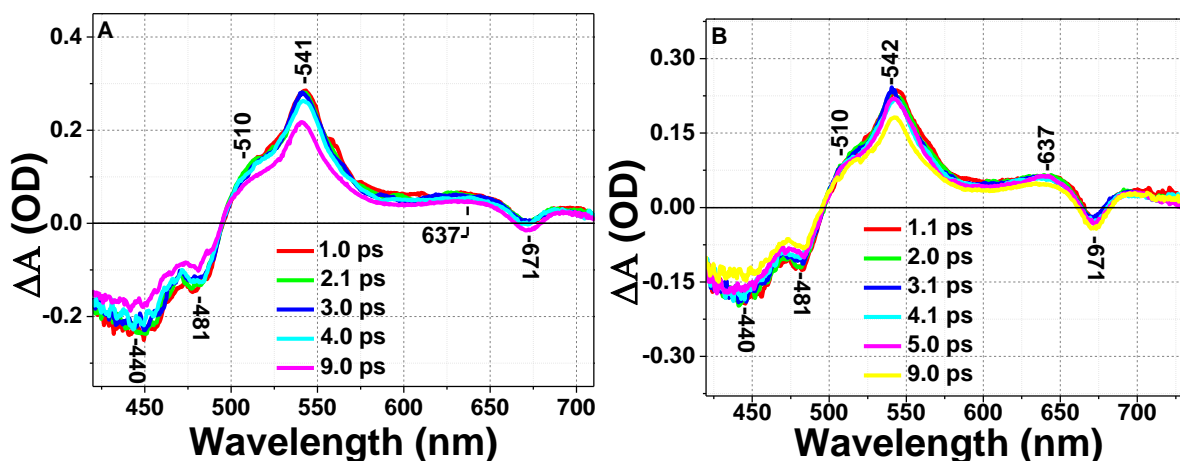


Σχήμα 4.23: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών Chlide-a, Fx, Ddx και Dtx που εμπεριέχονται στο δείγμα Frag-HL-Fraction-1. Στο διάγραμμα σημειώνονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.

4.3 Υπερταχεία δυναμική των FCPs του κλάσματος 1 που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Phaeodactylum tricornutum*

Στην παρούσα έρευνα αναπτύχθηκε κάτω από διαφορετικές συνθήκες φωτός (χαμηλής έντασης λευκό φως και κόκκινο φως) ο οργανισμός *Phaeodactylum tricornutum* και απομονώθηκαν οι πρωτεΐνες FCPs που περιέχονται σε αυτόν, με στόχο να μελετηθούν με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ. Η μελέτη FCPs διαφορετικών οργανισμών μπορεί να αναδείξει ενδεχόμενες ομοιότητες ή διαφορές στις φωτοφυσικές διεργασίες που πραγματοποιεί κάθε σύστημα. Χρησιμοποιώντας την μέθοδο HPLC προσδιορίστηκαν οι κύριες χρωστικές των δυο δειγμάτων Tricornutum -Low Light-Fraction-1 (Tric-LL-Fraction-1) και Tricornutum -Red Light-Fraction-1 (Tric-RL-Fraction-1), οι οποίες είναι η Fx, η Ddx και το Chlide-a. Οι συγκεντρώσεις των χρωστικών στο δείγμα Tric-LL-Fraction-1 είναι 5.291 mol Fx/ mol Chla, 4.241 mol Ddx/ mol Chl-a και 7.443 mol Chlide-a/ mol Chl-a, ενώ στο δείγμα Tric-RL-Fraction-1 είναι 4.799 mol Fx/ mol Chl-a, 2.501 mol Ddx/ mol Chl-a και 4.966 mol Chlide-a/ mol Chl-a.

Τα δείγματα Tric-LL-Fraction-1 και Tric-RL-Fraction-1 έχουν παρόμοια σύσταση με τα αντίστοιχα δείγματα που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp.* (Frag-LL-Fraction-1, Frag-RL-Fraction-1), γεγονός που αποδίδει και παρόμοια φάσματα παροδικής απορρόφησης (Σχήμα 4.24) με τα αντίστοιχα του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* (Σχήμα 4.13 και Σχήμα 4.17). Ο παλμός άντλησης σε $\lambda = 395$ nm προκάλεσε την διέγερση των χρωστικών Fx, Ddx και Chlide-a στην κατάσταση S_2 .



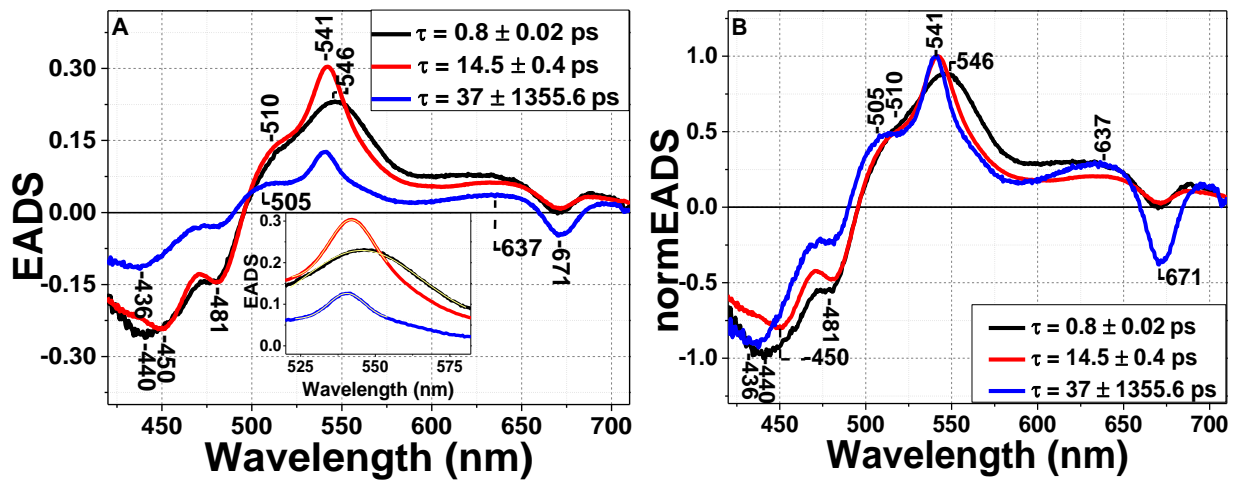
Σχήμα 4.24: Φάσματα παροδικής απορρόφησης των δειγμάτων A) Tric-LL-Fraction-1 και B) Tric-RL-Fraction-1.

Στην φασματική περιοχή 420 - 490 nm παρουσιάζονται οι μεταβάσεις GSB της Fx, της Ddx και του Chlide-a. Η κορυφή σε $\lambda = 440$ nm οφείλεται κυρίως στο Chlide-a, ενώ η κορυφή σε $\lambda = 481$ nm στα καροτενοειδή (Fx, Ddx).

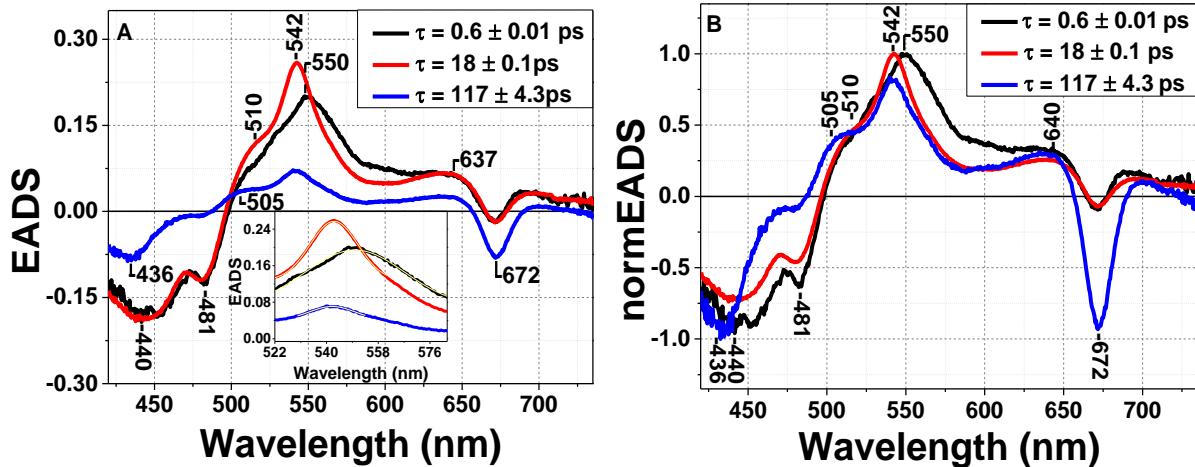
Η φασματική ταινία στην περιοχή 500 - 700 nm οφείλεται σε μετάβαση ESA της Fx. Στην περιοχή αυτή εντοπίζονται δυο κύριες κορυφές σε $\lambda = 510$ nm και $\lambda = 542$ nm, που αποδίδονται σε μεταβάσεις $S_1 \rightarrow S_n$ από διαφορετικά δονητικά επίπεδα της Fx και της Ddx και η κορυφή σε $\lambda = 637$ nm, που αποδίδεται στην μετάβαση $ICT \rightarrow S_n$ της Fx.

Η κορυφή σε $\lambda = 673$ nm αποδίδεται σε GSB/SE από την κατάσταση S_1 του Chlide-a. Η Chl-c δεν ανιχνεύεται φασματικά, λόγω της αμελητέας της ποσότητας στο δείγμα. Το σύνολο των μεταβάσεων αυτών απεικονίζονται στο ενεργειακό διάγραμμα του Σχήματος 4.14.

Τα φάσματα EADS που προέκυψαν μέσω της εφαρμογής της μεθόδου global στα πειραματικά δεδομένα του δείγματος Tric-LL-Fraction-1 απεικονίζονται στο Σχήμα 4.25, ενώ τα φάσματα EADS του δείγματος Tric-RL-Fraction-1 στο Σχήμα 4.26.



Σχήμα 4.25: A) Φάσματα EADS και B) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Tric-LL-Fraction-1. Ένθετο: Προσομοίωση με συνάρτηση Gauss της κορυφής σε $\lambda = 540$ -550 nm ($FWHM_{\text{black line}} = 47$ nm, $FWHM_{\text{red line}} = 18$ nm, $FWHM_{\text{blue line}} = 14$ nm).



Σχήμα 4.26: Α) Φάσματα EADS και Β) Κανονικοποιημένα φάσματα EADS του δείγματος Tric-RL-Fraction-1. Ένθετο: Προσομοίωση με συνάρτηση Gauss της κορυφής σε $\lambda = 540-550$ nm (FWHM_{black line} = 40 nm, FWHM_{red line} = 20 nm, FWHM_{blue line} = 19 nm).

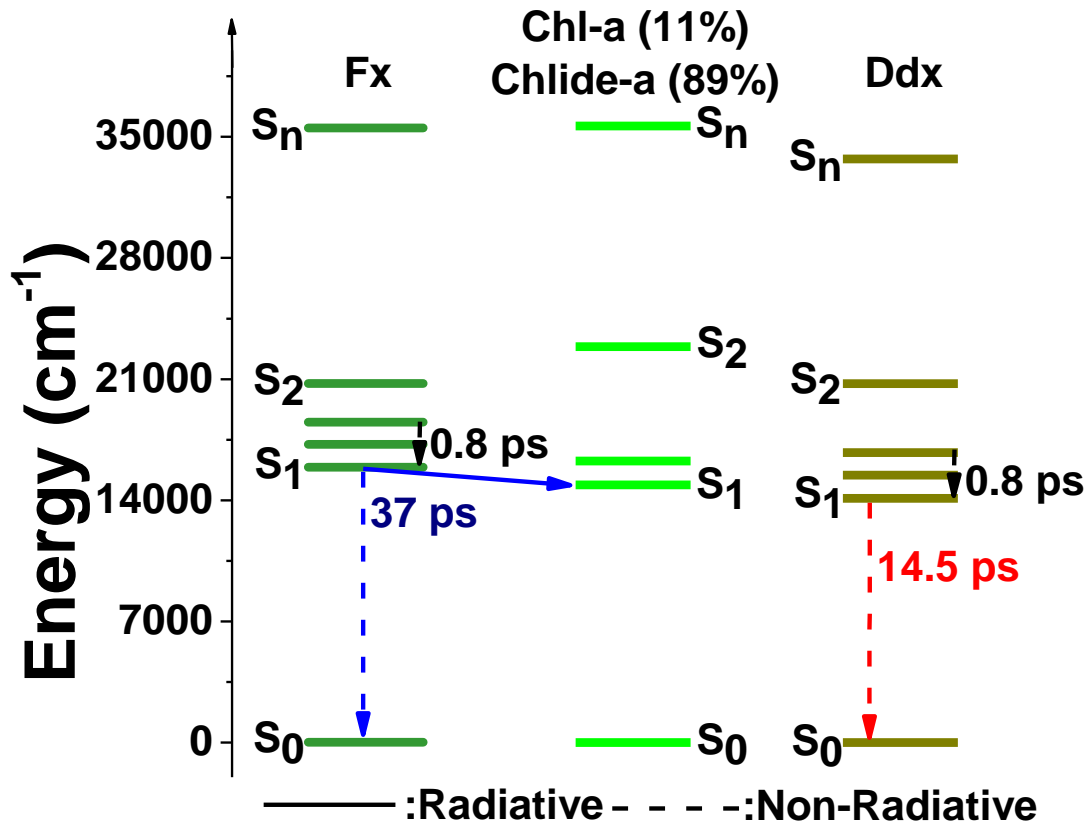
Τα EADS που προέκυψαν από την ανάλυση των πειραματικών δεδομένων του δείγματος Tric-LL-Fraction-1 είχαν χρόνους ζωής $\tau = 0.8 \pm 0.02$ ps, $\tau = 14.5 \pm 0.4$ ps και $\tau = 37 \pm 1355.64$ ps, ενώ τα EADS του δείγματος Tric-RL-Fraction-1 είχαν χρόνους ζωής $\tau = 0.6 \pm 0.01$ ps, $\tau = 18 \pm 0.1$ ps και $\tau = 117 \pm 4.3$ ps. Οι χρόνοι ζωής που αντιστοιχούν στα πρώτα EADS ($\tau_{LL} = 0.8 \pm 0.02$ ps, $\tau_{RL} = 0.6 \pm 0.01$ ps) αποδίδονται στις δονητικά διεγερμένες καταστάσεις S_1 (hot S_1) της Fx και της Ddx. Οι χρόνοι ζωής των 2^{ov} EADS ($\tau_{LL} = 14.5 \pm 0.4$ ps, $\tau_{RL} = 18 \pm 0.1$ ps) οφείλονται στην κατάσταση S_1 της Ddx. Οι χρόνοι ζωής των 3^{ov} EADS ($\tau_{LL} = 37 \pm 1355.6$ ps, $\tau_{RL} = 117 \pm 4.3$ ps) αποδίδονται στην μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 του Chlide-a και στην αποδιέγερση της Fx. Οι χρόνοι των 3^{ov} EADS εκτιμήθηκαν με μικρή ακρίβεια λόγω περιορισμένου χρονικού παραθύρου της μέτρησης (από -8 έως 20 ps για το δείγμα Tric-LL-Fraction-1 και από -8 έως 40 ps για το δείγμα Tric-RL-Fraction-1). Στα ενεργειακά διαγράμματα των Σχημάτων 4.27 και 4.28 απεικονίζονται οι φωτοφυσικές διεργασίες που πραγματοποιούνται στο δείγμα Tric-LL-Fraction-1 και στο δείγμα Tric-RL-Fraction-1, αντίστοιχα.

Η ευρεία κορυφή σε $\lambda = 546-550$ nm του 1^{ov} EADS μετατοπίζεται σε $\lambda = 541-542$ nm στο 2^o EADS και στενεύει φασματικά. Η παραπάνω φασματική μεταβολή παρατηρείται και στα δύο δείγματα και οφείλεται στη δονητική αποδιέγερση των καταστάσεων S_1 (hot S_1) της Fx και της Ddx. Η μεταβολή αυτή δεν ακολουθείται από κάποια μεταβολή στις φασματικές περιοχές 420 - 500 nm και 625 - 730 nm κατά την εξέλιξη του 1^{ov} EADS στο 2^o και στα δύο δείγματα,

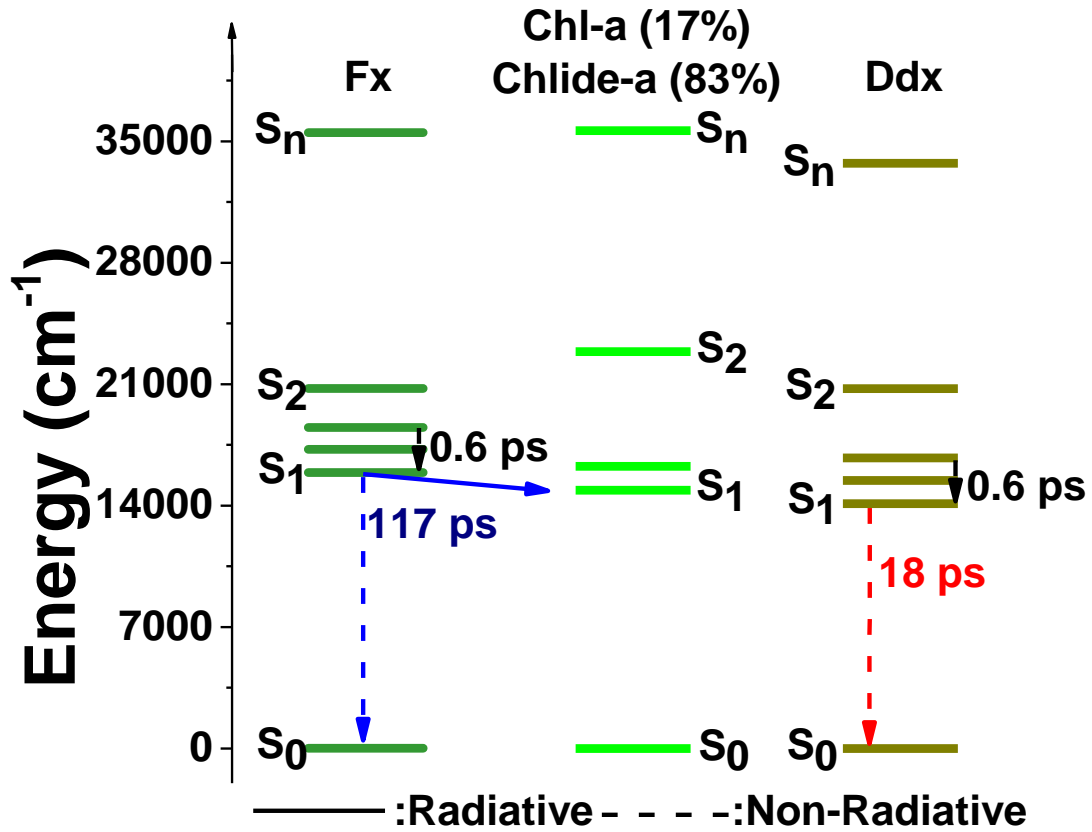
αποδεικνύοντας ότι δεν πραγματοποιείται κάποια μεταφορά ενέργειας από τις hot S_1 καταστάσεις της Ddx και της Fx στο Chlide-a.

Κατά την εξέλιξη του 2^{ου} EADS στο 3^ο, μειώνεται το εύρος της κορυφής σε $\lambda = 542$ nm το οποίο αποδίδεται στην αποδιέγερση της Ddx και στην απουσία συνεισφορά της στο φάσμα του στο φάσμα του στο φάσμα του 3^{ου} EADS. Συνεπώς, η παρατηρούμενη μείωση της έντασης των κορυφών στην περιοχή 420 - 650 nm και η παράλληλη αύξηση της έντασης της κορυφής σε $\lambda = 673$ nm αποδίδονται στην μεταφορά ενέργειας, αποκλειστικά και μόνο, από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 του Chlide-a, καθώς και στην αποδιέγερση της κατάστασης S_1 της Fx. Η μείωση των εντάσεων των κορυφών σε $\lambda = 545$ nm και $\lambda = 510$ nm, που οφείλεται στην αποδιέγερση της Ddx και της Fx, έχει ως αποτέλεσμα να γίνει διακριτή η κορυφή σε $\lambda = 505$ nm που αποδίδεται στην μετάβαση ESA του Chlide-a.

Επιπλέον, από το 2^ο EADS στο 3^ο παρατηρείται μετατόπιση της κορυφής σε $\lambda = 440$ nm σε $\lambda = 436$ nm. Η μετατόπιση αυτή προέρχεται από την αποδιέγερση των καροτενοειδών και επικράτηση τελικώς του σήματος του GSB του Chlide-a.



Σχήμα 4.27: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών που περιέχονται στο δείγμα Tric-LL-Fraction-1, που παρουσιάζει τις φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.



Σχήμα 4.28: Ενεργειακό διάγραμμα των χρωστικών που περιέχονται στο δείγμα Tric-RL-Fraction-1, που παρουσιάζει τις φωτοφυσικές διεργασίες που παρατηρήθηκαν πειραματικά.

4.4 Σύγκριση των δυναμικών διεργασιών των διαφορετικών ειδών

FCPs

Η μελέτη της δυναμικής του δείγματος Frag-LL-Fraction-3, που έχει ως κύριες χρωστικές την Fx, την Chl-a και την Chl-c, απέδωσε δυο χαρακτηριστικούς χρόνους ζωής. Ο πρώτος χρόνος $\tau = 1.9 \pm 0.05$ ps αποδίδεται στα δονητικά διεγερμένα επίπεδα της κατάστασης S_1 της Fx (hot S_1) και ο δεύτερος μεγαλύτερος χρόνος, $\tau = 61 \pm 2$ ps, που δεν εκτιμάται με μεγάλη ακρίβεια οφείλεται στην κατάσταση S_1 της Fx (Σχήμα 4.4). Η μελέτη αυτή δεν φανέρωσε πληροφορίες για τις δυναμικές διεργασίες των χλωροφυλλών, καθώς το χρονικό παράθυρο της μέτρησης αδυνατεί να καταγράψει τις σχετικά μεγάλης διάρκειας φωτοφυσικές διεργασίες των χρωστικών αυτών. Φασματικά λαμβάνονται πληροφορίες για την ύπαρξη της Chl-a και της Chl-c στο δείγμα, καθώς παρατηρούνται οι χαρακτηριστικές τους κορυφές (ταινία Soret και Q ταινίες). Στο φάσμα διαφορικής απορρόφησης του δείγματος αυτού παρατηρείται, μια θετική κορυφή σε $\lambda = 482$ nm, που αποδίδεται σε μετάβαση ESA της Chl-a (Σχήμα 4.1 και 4.3).

Η ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* σε υψηλής έντασης λευκό φως έχει ως αποτέλεσμα το FCP του κλάσματος 3 να περιλαμβάνει πέραν των χρωστικών του δείγματος Frag-LL-Fraction-3 και τις ενώσεις Chlide-a και Ddx. Η ύπαρξη του Chlide-a ανιχνεύεται φασματικά από την χαρακτηριστική μετάβαση ESA που εμφανίζεται σε $\lambda = 505$ nm. Η κορυφή στα φάσματα αλληλεπικαλύπτεται από την έντονη κορυφή σε $\lambda = 510$ nm, που οφείλεται στην μετάβαση ESA της Fx. Κατά την αποδιέγερση ωστόσο της Fx η μείωση της έντασης της κορυφή σε $\lambda = 510$ nm επιτρέπει την παρατήρηση της μετάβασης ESA του Chlide a ($\lambda = 505$ nm) (Σχήμα 4.7). Η ύπαρξη της Ddx στο δείγμα Frag-HL-Fraction-3 έχει ως αποτέλεσμα την διαφοροποίηση των σχετικών εντάσεων των κορυφών σε $\lambda = 542$ nm και σε $\lambda = 510$ nm ($I_{542\text{nm}}/I_{510\text{nm}}$) εν συγκρίσει με τις αντίστοιχες στο δείγμα Frag-LL-Fraction-3 (σύγκριση Σχημάτων 4.3 και 4.7). Επιπλέον η αυξημένη συγκέντρωση των καροτενοειδών (Fx, Ddx) στο δείγμα Frag-HL-Fraction-3 έχει ως αποτέλεσμα την παρατήρηση αρνητικής κορυφής σε $\lambda = 482$ nm εν αντιθέσει με τη θετική κορυφή του δείγματος Frag-LL-Fraction-3 (σύγκριση Σχημάτων 4.3 και 4.7). Ωστόσο, οι αλλαγές στη σύσταση των χρωστικών του FCP δεν επηρεάζουν την λειτουργία του, καθώς η μελέτη του δείγματος Frag-HL-Fraction-3 με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λείζερ απέδωσε δυο χαρακτηριστικούς χρόνους ($\tau = 5.2 \pm 0.1$ ps, $\tau = 96.5 \pm 5.2$ ps), οι οποίοι είναι παρόμοιοι με τους αντίστοιχους

χαρακτηριστικούς χρόνους του δείγματος Frag-LL-Fraction-3 και αποδίδονται στις ίδιες φωτοφυσικές διεργασίες αποδιέγερσης της Fx (Σχήμα 4.8). Οι αποκλίσεις στους χρόνους ζωής των δυο δειγμάτων αποδίδονται σε πειραματικές διακυμάνσεις και το πεπερασμένο χρονικό παράθυρο των μετρήσεων που δεν επιτρέπουν την απόλυτη σύγκλιση των εκθετικών εξισώσεων.

Η χρήση κόκκινου φωτός για την ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* είχε ως αποτέλεσμα το FCP του κλάσματος 3 να περιέχει τις χρωστικές Chl-a, Chl-c, Fx και Chlide-a. Όπως και στο δείγμα Frag-HL-Fraction-3 έτσι και το δείγμα Frag-RL-Fraction-3 η ύπαρξη του Chlide-a δεν επηρεάζει την λειτουργία του FCP. Η διεργασία που παρατηρείται είναι η αποδιέγερση της Fx μέσω δυο διαδοχικών μονοπατιών, που έχουν χρόνους ζωής $\tau = 3.9 \pm 11.1$ ps και $\tau = 78 \pm 0.9$ ps (Σχήμα 4.12). Οι χρόνοι ζωής αποκλίνουν από τους χρόνους ζωής των δυο άλλων δειγμάτων (Frag-LL-Fraction-3, Frag-HL-Fraction-3), γεγονός που αποδίδεται στο πεπερασμένο στατιστικό δείγμα και τον αναπόφευκτο πειραματικό θόρυβο των μετρήσεων. Η ύπαρξη του Chlide-a ανιχνεύεται μέσω της παρατήρησης της μετάβασης ESA σε $\lambda = 505$ nm (Σχήμα 4.11). Το δείγμα Frag-RL-Fraction-3 δεν περιέχει Ddx, οπότε η αναλογία $I_{542\text{nm}}/I_{510\text{nm}}$ είναι όμοια με του δείγματος Frag-LL-Fraction-3 (σύγκριση Σχημάτων 4.3 και 4.11).

Στην παρούσα έρευνα απομονώθηκε από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp.* ένα δεύτερο είδος FCP, το κλάσμα 1. Το δείγμα Frag-LL-Fraction-1 περιέχει τις χρωστικές Fx, Ddx και Chlide-a. Η λειτουργία των FCPs του κλάσματος 1 διαφέρει από την λειτουργία των FCPs του κλάσματος 3, σύμφωνα με την μελέτη της δυναμικής του δείγματος. Πιο συγκεκριμένα, η μελέτη του δείγματος Frag-LL-Fraction-1 με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ απέδωσε τρεις χαρακτηριστικούς χρόνους. Ο πρώτος χρόνος, $\tau = 0.7 \pm 0.02$ ps αποδίδεται στα δονητικά διεγερμένα επίπεδα των καταστάσεων S_1 της Ddx και της Fx και ο δεύτερο χρόνος, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps, οφείλεται στην κατάσταση S_1 της Ddx. Ο τρίτος χρόνος, $\tau = 77 \pm 20.9$ ps, δεν εκτιμάται με μεγάλη ακρίβεια λόγω του περιορισμένου εύρους της μέτρησης και αποδίδεται σε δυο μηχανιστικά μονοπάτια. Το πρώτο μονοπάτι είναι η μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 της Chl-a και το δεύτερο είναι η αποδιέγερση της κατάστασης S_1 της Fx (Σχήμα 4.16). Φασματικά η ύπαρξη του Chlide-a πιστοποιείται μέσω της κορυφής σε $\lambda = 505$ nm, που αποδίδεται σε μετάβαση ESA. Η ύπαρξη της Ddx στο δείγμα παρατηρείται από την αύξηση της αναλογίας $I_{542\text{nm}}/I_{510\text{nm}}$. Η κορυφή σε $\lambda = 482$ nm είναι αρνητική, καθώς η ποσότητα των καροτενοειδών (Fx, Ddx) είναι αυξημένη σε

σύγκριση με το δείγμα Frag-LL-Fraction-3. Η αμελητέα ποσότητα της Chl-c στο δείγμα δεν επιτρέπει την ανίχνευση των φασματοσκοπικών της χαρακτηριστικών (Σχήμα 4.15).

Η ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* σε συνθήκες υψηλής έντασης λευκού φωτός είχε ως αποτέλεσμα τα FCPs του κλάσματος 1 να περιλαμβάνουν τις χρωστικές Fx, Ddx, Dtx και Chlide-a. Η ύπαρξη της χρωστικής Dtx δεν επηρεάζει την λειτουργία των FCPs του κλάσματος 1 με βάση την μελέτη της δυναμικής του δείγματος Frag-HL-Fraction-1. Συγκεκριμένα, παρατηρήθηκαν οι ίδιες φωτοφυσικές διεργασίες με αυτές του δείγματος Frag-LL-Fraction-1 και οι χρόνοι ζωής που προέκυψαν από την ανάλυση είναι $\tau = 0.8 \pm 0.02$ ps, $\tau = 13 \pm 0.2$ ps και $\tau = 76 \pm 4.4$ ps (Σχήμα 4.23). Ο τρίτος χρόνος ζωής έχει εκτιμηθεί με μικρή πιστότητα λόγω του περιορισμένου χρονικού παραθύρου της μέτρησης. Το φάσμα παροδικής απορρόφησης του δείγματος Frag-HL-Fraction-1 είναι όμοιο με το φάσμα του δείγματος Frag-LL-Fraction-1. Η διαφορά τους έγκειται στην ύπαρξη μιας κορυφής σε $\lambda = 567$ nm στο φάσμα του δείγματος Frag-HL-Fraction-1. Η κορυφή αποδίδεται σε μετάβαση ESA της Dtx (Σχήμα 4.22). Η κορυφή της Dtx εμφανίζεται σε μεγαλύτερο μήκος κύματος έναντι των δυο άλλων καροτενοειδών (Fx, Ddx) εξαιτίας του επιπλέον διπλού δεσμού άνθρακα-άνθρακα που διαθέτει στην συζυγία της και της διαμορφωτικής παραμόρφωσης που υφίσταται ο δακτύλιος της [4]. Στα δύο πρώτα φάσματα EADS του δείγματος Frag-HL-Fraction-1 παρατηρούνται δυο κορυφές σε $\lambda = 450$ nm και

$\lambda = 482$ nm, οι οποίες δεν παρατηρούνται τόσο έντονα στα φάσματα EADS των άλλων δειγμάτων. Η διαφοροποίηση αυτή προέρχεται από την αυξημένη ποσότητα καροτενοειδών (Fx, Ddx, Dtx) που παρουσιάζει το δείγμα Frag-HL-Fraction-1 έναντι των άλλων δειγμάτων. Φασματικά χαρακτηριστικά της Chl-c δεν ανιχνεύονται λόγω της αμελητέας ποσότητας της στο δείγμα (Σχημα 4.22).

Η χρήση κόκκινου φωτός στην ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* δεν επηρέασε την σύσταση των FCPs του κλάσματος 1, που ως κύριες χρωστικές διαθέτουν την Fx, την Ddx και το Chlide-a. Η λειτουργία των FCPs του δείγματος Frag-RL-Fraction-1 είναι όμοια με του δείγματος Frag-LL-Fraction-1 (σύγκριση Σχημάτων 4.19 και 4.16), αφού τα δυο δείγματα δεν διαφέρουν ως προς την σύσταση τους. Οι χρόνοι ζωής που προέκυψαν από την μέθοδο της ανάλυσης global είναι $\tau = 1 \pm 0.03$ ps, $\tau = 18 \pm 0.3$ ps και $\tau = 94 \pm 6.1$ ps. Ο τρίτος χρόνος έχει εκτιμηθεί με μικρή πιστότητα.

Τέλος, στην παρούσα έρευνα μελετήθηκαν FCPs, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Phaeodactylum tricornutum* ώστε να ελεγχθούν ενδεχόμενες διαφοροποιήσεις στην λειτουργία FCPs διαφορετικών οργανισμών. Ο οργανισμός *Phaeodactylum tricornutum* αναπτύχθηκε σε συνθήκες χαμηλής έντασης λευκού φωτός και απομονώθηκαν τα FCPs του κλάσματος 1. Το δείγμα Tric-LL-Fraction-1 περιείχε τις χρωστικές Fx, Ddx και Chlide-a και η μελέτη του με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ απέδωσε τρεις χρόνους ζωής: $\tau = 0.8 \pm 0.02$ ps, $\tau = 14.5 \pm 0.4$ ps και $\tau = 37 \pm 1355.6$ ps. Οι χρόνοι αυτοί αποδόθηκαν στις ίδιες φωτοφυσικές διεργασίες του δείγματος Frag-LL-Fraction-1. Πιο συγκεκριμένα ο πρώτος χρόνος αποδίδεται στα δονητικά διεγερμένα επίπεδα των καταστάσεων S_1 της Ddx και της Fx, ο δεύτερος χρόνος οφείλεται στην κατάσταση S_1 της Ddx και ο τρίτος χρόνος είτε σε μεταφορά ενέργειας από την κατάσταση S_1 της Fx στην κατάσταση S_1 της Chl-a είτε σε αποδιέγερση της κατάστασης S_1 της Fx (Σχήμα 4.27). Ο τρίτος χρόνος ζωής εκτιμήθηκε με μικρή ακρίβεια λόγω του περιορισμένου παραθύρου της μέτρησης. Φασματικά η ύπαρξη του Chlide-a πιστοποιείται μέσω της κορυφής σε $\lambda = 505$ nm, που αποδίδεται σε μετάβαση ESA. Η ύπαρξη της Ddx στο δείγμα παρατηρείται από την αύξηση της αναλογίας $I_{542\text{nm}}/I_{510\text{nm}}$. Η αμελητέα ποσότητα της Chl-c στο δείγμα δεν επιτρέπει την ανίχνευση των φασματοσκοπικών της χαρακτηριστικών (Σχήμα 4.25).

Η ανάπτυξη του οργανισμού *Phaeodactylum tricornutum* με την χρήση κόκκινου φωτός δεν προκάλεσε μεταβολή στην σύσταση των FCPs του κλάσματος 1, που ως κύριες χρωστικές διέθεταν την Fx, την Ddx και το Chlide-a. Οι φωτοφυσικές διεργασίες τους δείγματος Tric-RL-Fraction-1 είναι ίδιες με του δείγματος Frag-LL-Fraction-1 και περιγράφονται από τους χρόνους ζωής, $\tau = 0.6 \pm 0.01$ ps, $\tau = 18 \pm 0.1$ ps και $\tau = 117 \pm 4.3$ ps (Σχήμα 4.28). Ο χρόνος ζωής, $\tau = 117 \pm 4.3$ ps, εκτιμήθηκε με μικρή ακρίβεια.

4.5 Βιβλιογραφία

- [1] West R. G., Bina D., Fuciman M., Kuznetsova V., Litvín R., Polívka T. (2018). Ultrafast multi-pulse transient absorption spectroscopy of fucoxanthin chlorophyll a protein from *Phaeodactylum tricornutum*. *Biochimica et Biophysica Acta – Bioenergetics*, 1859 (5), 357-365. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.02.011>
- [2] Sytina O. A., Van Stokkum I. H.M., Heyes D. J., Hunter N. C., Van Grondelle R., Groot M. L. (2010). Protochlorophyllide Excited-State Dynamics in Organic Solvents Studied by Time-

Resolved Visible and Mid-Infrared Spectroscopy. J. Phys. Chem. B, 114 (12), 4335-4344.
<https://doi.org/10.1021/jp9089326>

[3] Kosumi D., Kita M., Fujii R., Sugisaki M., Oka N., Takaesu Y., Taira T., Iha M., Hashimoto H. (2012). Excitation Energy-Transfer Dynamics of Brown Algal Photosynthetic Antennas. J. Phys. Chem. Lett., 3 (18), 2659-2664. <https://doi.org/10.1021/jz300612c>

[4] Enriquez M. M., Lafountain A. M., Budarz J., Fuciman M., Gibson G. N., Frank H. A. (2010). Direct determination of the excited state energies of the xanthophylls diadinoxanthin and diatoxanthin from *Phaeodactylum tricornutum*. Chemical Physics Letters, 493 (4-6), 353-357.
<https://doi.org/10.1016/j.cplett.2010.05.051>

ΣΥΜΠΕΡΑΣΜΑΤΑ

Στην παρούσα εργασία μελετήθηκαν FCPs, που απομονώθηκαν από τα διάτομα *Fragilariopsis sp.* και *Phaeodactylum tricornutum* με την τεχνική της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ (Ultrafast Time-Resolved Laser Spectroscopy). Στο πλαίσιο της εργασίας αυτής πραγματοποιήθηκε μια πλήρης χρονική-δυναμική μελέτη δυο διαφορετικών ειδών FCPs, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp* και λήφθηκαν πληροφορίες σχετικά με το ρόλο αυτών των πρωτεϊνών στην λειτουργία του διατόμου. Επιπλέον, εξετάστηκε η βιοποικιλότητα των FCPs, αφού μελετήθηκαν FCPs, που απομονώθηκαν από το διάτομο *Phaeodactylum tricornutum*. Ακόμη, ερευνήθηκε η επίδραση των συνθήκων του φωτός ανάπτυξης στην σύσταση των FCPs και στην λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, χρησιμοποιήθηκε χαμηλής έντασης (Low Light), υψηλής έντασης (High Light) λευκό φως και κόκκινο φως (Red Light) για την ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* και μελετήθηκε ο μηχανισμός λειτουργίας των FCPs του κλάσματος 1 και του κλάσματος 3. Χαμηλής έντασης (Low Light) λευκό φως και κόκκινο φως (Red Light) χρησιμοποιήθηκαν για την ανάπτυξη του οργανισμού *Phaeodactylum tricornutum* και μελετήθηκε ο μηχανισμός λειτουργίας των FCPs του κλάσματος 1. Η χρήση του λευκού φωτός χαμηλής έντασης προσομοιάζει τις φυσιολογικές συνθήκες ανάπτυξης των διατόμων στη φύση ενώ η χρήση υψηλής έντασης φωτός προσομοιάζει τις συνθήκες ανάπτυξης των διατόμων σε ακραίες συνθήκες. Το κόκκινο φως χρησιμοποιήθηκε για να ελεγχθούν ενδεχόμενες αλλαγές στην ανάπτυξη των FCPs των διατόμων σε περιορισμένου εύρους φασματική ακτινοβολία.

Ο οργανισμός *Fragilariopsis sp.* διαθέτει διαφορετικά είδη FCPs, τα οποία αναμένεται ότι διεξάγουν διαφορετικές λειτουργίες του οργανισμού. Στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν και μελετήθηκαν τα FCPs του κλάσματος 3 και του κλάσματος 1. Σε συνθήκες χαμηλής έντασης λευκού φωτός τα FCPs του κλάσματος 3 αποτελούν τυπικά FCPs, καθώς ως κύριες χρωστικές διαθέτουν την Fx, την Chl-a και την Chl-c. Αντίθετα, τα FCPs του κλάσματος 1 περιέχουν τις ενώσεις Fx, Ddx και Chlide-a. Η μελέτη της δυναμικής των FCPs του κλάσματος 3 απέδωσε δυο χαρακτηριστικούς χρόνους ζωής ($\tau = 1.9 \pm 0.05$ ps, $\tau = 61 \pm 2$ ps), της δονητικά διεγερμένης κατάστασης S₁ της Fx και της κατάστασης S₁ της Fx. Η δυναμική των FCPs του κλάσματος 1 διαφέρει από των FCPs του κλάσματος 3, καθώς παρατηρούνται τρεις χαρακτηριστικοί χρόνοι, οι οποίοι αποδίδονται σε διαφορετικές φωτοφυσικές διεργασίες. Ο πρώτος χρόνος ζωής,

$\tau = 0.7 \pm 0.02$ ps αποδίδεται στα δονητικά διεγερμένα επίπεδα των καταστάσεων S_1 της Ddx και της Fx, ο δεύτερο χρόνος, $\tau = 13 \pm 0.01$ ps, οφείλεται στην κατάσταση S_1 της Ddx και ο τρίτος χρόνος, $\tau = 77 \pm 20.9$ ps αποδίδεται στην μεταφορά ενέργειας από την Fx στο Chlide-a και στην κατάσταση S_1 της Fx.

Οι διαφορές στον μηχανισμό λειτουργίας των δυο ειδών FCPs αποδίδονται στην διαφορετική λειτουργία που διεκπεραιώνουν στο διάτομο *Fragilariopsis sp.* Τα FCPs του κλάσματος 1 πραγματοποιούν μεταφορά ενέργειας από την Fx στο Chlide-a, ενώ τα FCPs του κλάσματος 3 δεν επιτελούν την αντίστοιχη μεταφορά ενέργειας από την Fx στην Chl-a. Στα FCPs του κλάσματος 3 οι Fxs είναι λιγότερες από τις Chls (0.617 mol Fx/ mol Chl-a, 1 mol Chl-a/ mol Chl-a) το οποίο έχει ως αποτέλεσμα να είναι μεγαλύτερες οι αποστάσεις μεταξύ των χρωστικών. Η διεργασία της μεταφοράς ενέργειας εξαρτάται από την απόσταση δότη-δέκτη, καθώς αυξάνοντας την απόσταση των χρωμοφόρων μειώνεται η απόδοση του φαινομένου. Επιπλέον, ενδέχεται το πρωτεϊνικό περιβάλλον των FCPs του κλάσματος 3 να ενισχύει την διεύρυνση των αποστάσεων μεταξύ των χρωστικών με αποτέλεσμα να μην πραγματοποιείται το φαινόμενο μεταφοράς ενέργειας. Αντίθετα, στα FCPs του κλάσματος 1 οι Fxs είναι περισσότερες ή ίσες με το Chlide-a (7.115 mol Fx/ mol Chl-a, 4.713 mol Chlide-a/ mol Chl-a), οπότε οι αποστάσεις μεταξύ των χρωστικών ενδέχεται να είναι μικρότερες ώστε να επιτρέπουν το φαινόμενο της μεταφοράς ενέργειας. Παράλληλα το πρωτεϊνικό περιβάλλον των FCPs του κλάσματος 1 ενδεχομένως ευνοεί το φαινόμενο αυτό.

Από τα παραπάνω εξάγεται το συμπέρασμα ότι, τα FCPs του κλάσματος 1 συνεισφέρουν στην προστασία του διατόμου *Fragilariopsis sp.* από ακτινοβολίες υψηλής ενέργειας. Συγκεκριμένα, τα FCPs του κλάσματος 1 προστατεύουν το διάτομο μέσω της αυξημένης συγκέντρωσης σε Ddx που διαθέτουν και μέσω της πραγματοποίησης διαδικασιών μεταφοράς ενέργειας. Η Ddx διαχειρίζεται την περίσσεια ενέργειας μέσω χημικής μετατροπής σε Dtx. Ο ρόλος των FCPs του κλάσματος 3 ήταν δύσκολο να προσδιοριστεί από τα αποτελέσματα της παρούσας εργασίας, καθώς δεν παρατηρήθηκαν αλληλεπιδράσεις μεταξύ των χρωστικών που εμπεριέχονται στις συγκεκριμένες πρωτεΐνες.

Η παρουσία της χρωστικής Dtx στα FCPs του διατόμου *Fragilariopsis sp.* του κλάσματος 1 σε συνθήκες υψηλής έντασης λευκού φωτός και των χρωστικών Chlide-a και Ddx, στο αντίστοιχο κλάσμα 3 του ίδιου διατόμου πιστοποιούν την ενεργοποίηση του μηχανισμού προστασίας των διατόμων. Η μελέτη των φωτοφυσικών διεργασιών των δειγμάτων

Frag-HL-Fraction-1 και Frag-HL-Fraction-3 έδειξε ότι οι αλλαγές στην σύσταση, που επάγονται από την υψηλής έντασης ακτινοβολία δεν επηρεάζουν την λειτουργία των FCPs.

Η χρήση κόκκινου φωτός για την ανάπτυξη του οργανισμού *Fragilariopsis sp.* δεν προκάλεσε αλλαγή στην σύσταση των FCPs του κλάσματος 1, αλλά μετέβαλε την σύσταση των FCPs του κλάσματος 3. Συγκεκριμένα, τα FCPs του κλάσματος 3 περιείχαν επιπλέον Chlide-a. Ο μηχανισμός λειτουργία των FCPs του δείγματος Frag-RL-Fraction-3, ωστόσο, δεν επηρεάστηκε από την ύπαρξη του Chlide-a.

FCPs απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Phaeodactylum tricornutum* με στόχο να μελετηθεί ο μηχανισμός λειτουργίας τους και να εξαχθούν συμπεράσματα σχετικά με την συνεισφορά του οργανισμού προέλευσης στην λειτουργία τους. Συγκεκριμένα, στην παρούσα εργασία απομονώθηκαν και μελετήθηκαν τα FCPs του κλάσματος 1, που διαθέτουν τις χρωστικές Fx, Ddx και Chlide-a. Ο μηχανισμός λειτουργίας των FCPs του κλάσματος 1, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Phaeodactylum tricornutum* είναι όμοιος με τον μηχανισμό λειτουργίας των αντίστοιχων FCPs, που απομονώθηκαν από τον οργανισμό *Fragilariopsis sp.* Οι χρόνοι ζωής που προέκυψαν είναι $\tau = 0.8 \pm 0.02$ ps, $\tau = 14.5 \pm 0.4$ ps, $\tau = 37 \pm 1355.6$ ps και αποδίδονται στα δονητικά διεγερμένα επίπεδα των καταστάσεων S_1 της Ddx και της Fx, στην κατάσταση S_1 της Ddx και στην μεταφορά ενέργειας από την Fx στο Chlide-a, καθώς και στην κατάσταση S_1 της Fx, αντίστοιχα. Στο δείγμα Tric-LL-Fraction-1 οι Chls είναι περισσότερες από τις Fx (5.291 mol Fx/ mol Chl-a, 7.443 mol Chl-a/ mol Chl-a), ωστόσο παρατηρείται η διεργασία της μεταφοράς ενέργειας, που δεν ήταν διακριτή στην περίπτωση του δείγματος Frag-LL-Fraction-3, όπου επίσης η ποσότητα των Chls υπερέβαινε αυτή των Fxs. Η μεταφορά ενέργειας πιθανώς πραγματοποιείται εξαιτίας της συγκέντρωσης των χρωστικών στο δείγμα Tric-LL-Fraction-1 (5.291 mol Fx/ mol Chl-a, 7.443 mol Chl-a/ mol Chl-a), που είναι πολύ μεγαλύτερη από του δείγματος Frag-LL-Fraction-3 (0.617 mol Fx/ mol Chl-a, 1 mol Chl-a/ mol Chl-a), οπότε οι χρωστικές βρίσκονται σε κοντινή απόσταση για να αλληλοεπιδράσουν. Επιπλέον, ενδέχεται να συμβάλει το πρωτεϊνικό περιβάλλον των FCPs του κλάσματος 1, στην αλληλεπίδραση της Fx με το Chlide-a. Συνεπώς, ο οργανισμός προέλευσης δεν επηρεάζει την λειτουργία των FCPs και τα FCPs του κλάσματος 1 πιθανώς συμμετέχουν στην προστασία του διατόμου *Phaeodactylum tricornutum*.

Κόκκινο φως, επιπλέον, χρησιμοποιήθηκε για την ανάπτυξη του οργανισμού *Phaeodactylum tricornutum* και απομονώθηκαν τα FCPs του κλάσματος 1. Η χρήση της μεθόδου

HPLC έδειξε ότι η σύσταση των FCPs δεν αλλάζει. Η μελέτη του δείγματος Tric-RL-Fraction-1 με την τεχνική της χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ πιστοποίησε ότι ο μηχανισμός λειτουργίας των FCPs του κλάσματος 1 δεν μεταβάλλεται.

Οι πληροφορίες που λήφθηκαν από τις παραπάνω μελέτες, επιδέχονται περαιτέρω διερεύνησης με, ταυτόχρονη, βελτιστοποίηση των συνθηκών λήψης των δεδομένων. Συγκεκριμένα, η χρήση κρουστάτη για την διατήρηση του δείγματος σε χαμηλή θερμοκρασία κατά την διάρκεια της μέτρησης θα παρείχε αύξηση του χρόνου ζωής του δείγματος και άρα της διάρκειας της πειραματικής μέτρησης. Η αύξηση της διάρκειας του πειράματος θα παρείχε την δυνατότητα διεύρυνσης του χρονικού παραθύρου της μέτρησης και άρα θα ήταν δυνατή η καταγραφή όλων των φωτοφυσικών διεργασιών που πραγματοποιούνται έπειτα από την διέγερση του δείγματος. Επιπλέον, θα ήταν εφικτό να αυξηθεί ο αριθμός των επαναλήψεων του πειράματος βελτιώνοντας έτσι την αναλογίας σήματος προς θόρυβο. Η βελτιστοποίηση των μετρήσεων θα μπορούσε να επιτευχθεί και με διαφοροποίηση της τεχνικής της υπερταχείας χρονοαναλυόμενης φασματοσκοπίας λέιζερ. Θα μπορούσε να μην χρειάζεται η χρήση δέσμης αναφοράς (reference) αλλά αντί αυτής να χρησιμοποιηθεί ένας συγχρονισμένος τεμαχιστής δέσμης (Chopper) ο οποίος να ρυθμίζει την συχνότητα πρόσπτωσης του παλμού άντλησης στο δείγμα (pump-on / pump-off) και με αυτόν τον τρόπο να επιτυγάνεται η διαφορική καταγραφή του σήματος της δέσμης ανίχνευσης. Οι μετατροπές αυτές της τεχνικής θα οδηγούσαν στην βελτιστοποίηση της αναλογίας σήματος προς θόρυβο και θα μείωναν την ανάγκη ανάδευσης του δείγματος με χρήση περιστρεφόμενης κυψελίδας (spinning cell), καθώς το δείγμα θα ακτινοβολούταν λιγότερο και θα μειωνόταν το φαινόμενο της φωτοδιάσπασης. Επιπλέον, η χρήση μη-συγγραμμικού οπτικού παραμετρικού ενισχυτή (Noncollinear-Optical Parametric Amplifier-NOPA) θα παρείχε την δυνατότητα χρήσης παλμών άντλησης διαφορετικών μηκών κύματος για την διέγερση των FCPs. Η χρήση παλμών άντλησης με διαφορετικό μήκος κύματος θα παρείχε την δυνατότητα επιλεκτικής διέγερσης των χρωστικών εντός των FCPs και παρατήρησης των φωτοφυσικών τους διεργασιών χωρίς την επιπλοκή της υπέρθεσης των σημάτων.

Οι πληροφορίες που προέκυψαν στην παρούσα έρευνα αναμένεται να προσφέρουν σημαντική βασική γνώση στον τομέα της βιοτεχνολογίας και στην ανάπτυξη των φωτοβολταϊκών συστημάτων, καθώς τα διάτομα συμμετέχουν στην διαχείριση της ατμοσφαιρικής ρύπανσης και τα FCPs βρίσκουν εφαρμογή στα συστήματα συλλογής ηλιακής ακτινοβολίας.