

МІНІСТЕРСТВО ОСВІТИ І НАУКИ УКРАЇНИ
ДЕРЖАВНИЙ ВИЩИЙ НАВЧАЛЬНИЙ ЗАКЛАД
«УЖГОРОДСЬКИЙ НАЦІОНАЛЬНИЙ УНІВЕРСИТЕТ»

на правах рукопису

ТРИКУР ІВАН ІВАНОВИЧ

УДК 539.23:539.25

**ОДЕРЖАННЯ ПЛІВКОВИХ СТРУКТУР НА ОСНОВІ
БАКТЕРІОРОДОПСИНУ ТА ДОСЛІДЖЕННЯ ВПЛИВУ ВОЛОГОСТІ
Й АМІАКУ НА ЇХ ОПТИЧНІ ХАРАКТЕРИСТИКИ**

01.04.10 – фізика напівпровідників і діелектриків

Дисертація

на здобуття наукового ступеня кандидата фізико-
математичних наук

Науковий керівник:
доктор фізико-математичних наук,
професор **Різак В. М.**

Ужгород - 2015

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ	4
ВСТУП.....	5
РОЗДІЛ 1. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ	12
1.1. Структура та фізико-хімічні властивості бактеріородопсину.....	12
1.2. Постановка задачі	17
1.3. Експериментальні методики досліджень	26
Висновки до розділу 1	37
РОЗДІЛ 2. ФІЗИКО-ТЕХНОЛОГІЧНІ УМОВИ СТВОРЕННЯ ТОНКОПЛІВКОВИХ СТРУКТУР НА ОСНОВІ БАКТЕРІОРОДОПСИ- НУ.....	38
2.1 Оптимізація методики культивування галобактерій та виділення й очищення бактеріородопсину	38
2.2. Методики отримання плівок на основі бактеріородопсину з використанням різних видів матриць	47
2.3. Вплив хіміко-технологічних умов отримання на морфологію поверхні і перерізу плівкових матеріалів на основі бактеріородопсину	58
2.4. Модифікація методики отримання плівок бактеріородопсину у золь- гельних матрицях	77
Висновки до розділу 2	91
РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ВОЛОГОСТІ ТА АМІАКУ НА ОПТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ПЛІВОК БАКТЕРІОРОДОПСИНУ	92
3.1. Вплив зміни вологості на оптичні властивості плівок на основі бактеріородопсину	93
3.2. Вплив парів аміаку на оптичні параметри плівок бактеріо- родопсину.....	105
3.3. Вплив аміаку у водних розчинах на характеристики плівок бактеріо- родопсину	116

Висновки до розділу 3	127
РОЗДІЛ 4. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПЛІВОК БАКТЕРІОРОДОПСИНУ ДЛЯ ОПТИЧНОГО ЗАПИСУ ІНФОРМАЦІЇ ТА БІОСЕНСОРІВ.....	129
4.1. Залежність голографічних характеристик плівок бактеріородопсину від хімічного складу та відносної вологості оточуючого середовища	129
4.2. Вплив аміаку та вологості на люмінесценцію квантових точок у нанокомпозитних структурах на основі бактеріородопсину	138
4.3. Вплив інших газів на оптичні властивості плівок на основі бактеріородопсину.....	144
Висновки до розділу 4	149
ВИСНОВКИ	151
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ	154
ДОДАТКИ	171

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

БР - бактеріородопсин

ПМ - пурпурні мембрани

РЕМ - растрова електронна мікроскопія

АСМ - атомно-силова мікроскопія

УЗ - ультразвук

ПВС - полівініловий спирт

ДНК-за - дезоксирибонуклеаза

ТМОС - тетраметилортосилікат

ТЕОС - тетраетилортосилікат

БЕТ - модель Брунауера-Емметта-Теллера

БДХ - метод Баретта-Джойнера-Халенда

КТ - квантові точки

ТЕА - триетаноламін

АГХ - аргінінхлорид

ШО - Шифова основа

ВСТУП

Актуальність теми. Бурхливий розвиток фундаментальних досліджень властивостей біоорганічних матеріалів, активна розробка проблем інтеграції матеріалів і принципів біотехнології для синтезу елементів і функціональних середовищ, які є базисом технічних систем сприйняття, перетворення, збереження і передачі інформації дозволяють розробляти та створювати нові класи матеріалів та структур з новими функціональними можливостями та покращеними експлуатаційними характеристиками. Представником такого класу матеріалів є нанокompозитні структури на базі бактеріородопсину (БР). Чутливість до всіх параметрів оптичного випромінювання, практично необмежена реверсивність, відсутність рефрактерного періоду, висока роздільна здатність, надшвидка зміна параметрів при високих значеннях контрастності, нелінійність характеристик, можливість напрямленої модифікації параметрів, чутливість до параметрів навколишнього середовища разом з екологічною чистотою виробництва, практично не обмеженими ресурсами та розумінням будови та механізму функціонування, робить БР одним з найбільш перспективних матеріалів для сучасних пристроїв.

З точки зору прикладного застосування найбільш зручним є використання плівкових структур на основі БР. Аналіз результатів досліджень з вивчення оптичних властивостей плівкових структур на базі бактеріородопсину вказує на можливість вирішення цілого ряду реальних практичних завдань у галузі оптоелектроніки та біосенсорики за допомогою цих структур. Прикладний аспект використання передбачає функціонування БР в умовах відмінних від нативного організму. Це вносить свої зміни в динаміку перебігу фотоциклу, що виражається в зміні спектральних характеристик, динаміки нелінійності, фоточутливості тощо. Суттєвий вплив на характеристики плівок можуть чинити матеріали, що використовуються як матриця, методика отримання плівок, хімічні домішки та зміна параметрів

навколишнього середовища (зміна вологості, присутність певних газів, зміна температури, тиску тощо). У той же час попри велику кількість робіт, спрямованих на дослідження механізму функціонування молекули БР та можливості його модифікації у певному напрямку, мало робіт присвячено дослідженню безпосередньо плівкових структур і впливу таких факторів як тип матриці та методика отримання на кінцеві властивості плівок. Також недостатньо повно вивчено вплив різних газів на перебіг фотоциклу та динаміку зміни оптичних властивостей плівок на основі БР.

Таким чином, **актуальність роботи** обумовлена необхідністю проведення комплексних експериментальних досліджень залежності структури та характеристик плівок БР від методики отримання та очистки самого БР, типу матриці та методики отримання плівок. Поряд з цим актуальним є дослідження та порівняння впливу параметрів навколишнього середовища (зокрема, вологості та концентрації аміаку) на властивості плівок БР, а також дослідження впливу типу матриці та хімічного складу плівок на їх чутливість до зміни вологості та концентрації аміаку.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами. Робота виконана в Науково-дослідному інституті фізики і хімії твердого тіла Ужгородського національного університету. Дисертаційне дослідження є складовою частиною науково-дослідних тем 2004-2005 рр.: НДР-№0103U001705 «Світлочутливі плівкові структури на основі бактеріородопсину для оптоелектронних пристроїв» (тема ДБ-531); 2006-2008 рр. НДР-№0105U007691 «Чутливі елементи хімічних сенсорів на основі плівкових нанокompозитів з фотохромним компонентом та квантовими точками» (тема ДБ-619); 2009-2010 рр. НДР-01090000885 «Чутливі елементи біосенсорів на основі нанокompозитних оптичних структур з фотохромними біомолекулами та кальцій-фосфатних біосумісних матеріалів» (тема ДБ-726); 20011-2012 рр. НДР-0111U001651 «Біосенсори анестетиків з чутливим елементом на основі фотохромних біомолекулярних нанокompозитних оптичних структур» (тема ДБ-773); 20013-2014 рр. НДР-33545 «Розробка

нанокомпозитних чутливих елементів біосенсорів на основі бактеріородопсину з використанням золь-гельних матриць та квантових точок» (тема ДБ-831П). У всіх перерахованих темах автор є виконавцем проектів.

Мета і задачі дослідження. Метою роботи є оптимізація методик отримання БР та виготовлення плівок на його основі, встановлення загальних закономірностей зміни характеристик плівок залежно від рівня вологості та концентрації аміаку в навколишньому середовищі, розробка та обґрунтування універсальних механізмів впливу зовнішніх факторів на динаміку фотоіндукованих процесів у плівках БР. Для досягнення поставленої мети передбачалося вирішення **наступних задач**:

- вивчення впливу спектрального складу освітлення на продуктивність отримання БР;
- дослідження залежності оптичних параметрів плівок на основі БР від штаму галобактерій, з яких він отриманий, методики очистки БР та підготовки плівкоутворюючої суміші;
- вивчення можливості використання напівпровідникових квантових точок для створення нанокомпозитних структур на основі БР, в яких запуск фотоциклу здійснюється люмінесцентним випромінюванням квантових точок;
- розробка методики отримання плівок БР із заданими оптичними характеристиками у неорганічних золь-гельних матрицях;
- дослідження та порівняння морфології поверхні та перерізів плівок БР, отриманих з використанням різних матриць та різних методів нанесення;
- проведення порівняльного дослідження впливу вологості на оптичні параметри плівок БР у різних матрицях;
- дослідження впливу аміаку у парогазових та водних розчинах на оптичні властивості плівок БР та вивчення залежності величини індукованих аміаком змін від типу матриці та хімічного складу плівок;

Об'єктом дослідження є процеси взаємодії фрагментів пурпурних мембран з матеріалом органічних та неорганічних матриць, водою, аміаком та іншими хімічними сполуками, а також явища, які відбуваються в плівках бактеріородопсину, до складу яких входять напівпровідникові квантові точки з люмінесценцією в області спектру, де є фоточутливим бактеріородопсин.

Предметом дослідження є суспензії пурпурних мембран та плівкові структури на основі бактеріородопсину в полімерних та неорганічних SiO₂-матрицях із різним хімічним складом.

Методи досліджень. Достовірність та обґрунтованість отриманих наукових результатів базується на використанні загальноновизнаних методик експериментальних досліджень. Зокрема:

- дослідження морфології поверхонь та перерізів плівок проводилося з використанням атомно-силової та растрової електронної мікроскопії;

- дослідження пористості плівок проводилося за допомогою методу газової адсорбції з використанням установки Sorptomatic–1990;

- дослідження впливу вологості на дифракційну ефективність плівок БР проводилося з використанням методу запису тонких голограм;

- дослідження спектральних характеристик та динаміки фотоіндукованих змін у плівках в залежності від типу матриці та зовнішніх умов проводилися з допомогою автоматизованої установки на базі спектрофотометра СФ-46 та оптоволоконного спектрофотометра Ocean Optics USB4000 з використанням спеціально створених сенсорних камер у лабораторіях кафедри ТЕІБ та НДІФХТТ УжНУ.

Наукова новизна одержаних результатів:

1. Отримало подальший розвиток дослідження умов отримання бактеріородопсину на властивості плівок на його основі. Вперше виявлено, що сенситометрична чутливість, величина фотоіндукованих змін та коефіцієнт участі молекул у фотоциклі для плівок на основі бактеріородопсину залежать від штаму галобактерій, з яких він був

отриманий, і можуть бути покращені шляхом оптимізації режиму та часу обробки лізату ДНК-зою.

2. Уперше отримано нанокompозитні плівкові структури, які включають бактеріородопсин і напівпровідникові квантові точки CdSe-ZnS, та проведено їх комплексне дослідження. Виявлено, що зміна вологості або концентрації аміаку в навколишньому середовищі приводить до зміни інтенсивності люмінесцентного випромінювання напівпровідникових квантових точок в таких структурах, що дозволило створити чутливі елементи для волоконно-оптичних сенсорних систем з чутливістю до аміаку на рівні десятків ppm.

3. Показано, що незалежно від типу матриці внесення фрагментів пурпурних мембран у плівкоутворюючу суміш приводить до зростання шорсткості поверхні отриманої плівки більш ніж на порядок, порівняно з плівками без бактеріородопсину. Також виявлено, що ультразвукова обробка плівкоутворюючої суміші протягом 120 с приводить до покращення оптичної якості та фоточутливості плівок.

4. Встановлено, що плівки бактеріородопсину є мезопористими структурами, а об'єм пор для плівок на основі неорганічних матриць на 2,5 порядки перевищує аналогічний показник для плівок в органічних матрицях.

5. Експериментально доведено, що незалежно від типу матриці зростання вологості приводить до зменшення часу життя інтермедіату M_{412} та величини фотоіндукованих змін у плівках бактеріородопсину. Встановлено, що у водорозчинних желатинових матрицях при вологості вище 95% спостерігаються зміни спричинені впливом води на желатину.

6. Уперше встановлено, що взаємодія плівки бактеріородопсину з аміаком як у водних розчинах, так і в парогазових сумішах приводить до зростання часу життя інтермедіату M_{412} . Запропоновано механізм взаємодії аміаку з бактеріородопсином. Виявлено залежність чутливості до аміаку від хімічного складу плівок.

Практичне значення одержаних результатів полягає в тому, що вони можуть бути використані:

- для збільшення продуктивності отримання БР під час культивування галобактерій за рахунок оптимізації спектрального складу освітлення;
- для покращення чистоти та характеристик отриманого БР за рахунок вибору штаму та оптимального режиму обробки лізату ДНК-зою;
- для отримання плівок БР із заданими параметрами в неорганічних SiO_2 матрицях;
- для виготовлення датчиків вологості на базі плівок БР;
- виготовлення датчиків концентрації аміаку в парогазових та у водних розчинах на основі плівок БР;

Отримані результати використовуються в лекційному матеріалі та під час проведення лабораторних робіт на кафедрах фізики напівпровідників та ТЕІБ ДВНЗ УжНУ зі спецкурсів: "Молекулярна електроніка", "Біоматеріалознавство", "Методи візуалізації в медицині".

Особистий внесок здобувача. Результати, що представлені та опубліковані у співавторстві, отримані за безпосередньої участі автора на усіх етапах роботи. Здобувач приймав активну участь у процесі культивування та очистки БР, контролю його якості та оптимізації технологічних умов вирощування галобактерій і безпосереднього виділення БР [47, 51]. Брав активну участь у процесі отримання плівкових структур на базі БР, оптимізації методики нанесення, експериментального підбору оптимальних умов висушування плівок для забезпечення їх високої оптичної якості [52, 57, 58, 61, 122]. Безпосередньо проводив дослідження структури та властивостей отриманих плівок, дослідження впливу на їх характеристики зміни вологості, аміаку та ряду інших газів [71, 73-75, 103]. Поряд з цим автор приймав активну участь у обробці та інтерпретації одержаних результатів, формулюванні наукових положень та написанні усіх опублікованих статей та оформленні патенту на корисну модель [81].

Основна частина представлених результатів доповідалась автором на всеукраїнських та міжнародних конференціях [49, 50, 70, 76-80].

Апробація результатів дисертації. Основні результати роботи представлялися та обговорювалися на таких заходах: VII European Conference on Optical Chemical Sensors and Biosensors (Europt(R)ode VII) (Madrid, Spain, 2004); 17th International Conference on Optical Fibre Sensors (Bruges, Belgium, 2005); International Congress on Optics and Optoelectronics (Warsaw, Poland, 2005); Міжнародна конференція “Сенсорна електроніка та мікросистемні технології” (СЕМСТ-4) (Одеса, Україна, 2010); Міжнародна конференція з фізики і технології тонких плівок і наносистем МКФТТПН-ХІІ (Ворохта, Україна, 2009); The 2nd International Meeting on Clusters and Nanostructured Materials (CNM-2) (Uzhgorod, Ukraine, 2009); Fourth international conference on optical, optoelectronic and photonic materials and applications (ICOOPMA 2010) (Budapest, Hungary, 2010); Mediterranean-East-Europe Meeting Multifunctional nanomaterials: NanoEuroMed (Uzhgorod, Ukraine, 2011); Український Міжнародний конгрес «Стоматологічна імплантація. Остеоінтеграція» (Ужгород, Україна, 2013); International Meeting Cluster and Nanostructured Materials (CNM-3), (Uzhhorod, Ukraine, 2012); щорічних підсумкових наукових конференціях викладачів та наукових співробітників фізичного факультету Ужгородського національного університету (Ужгород, 2003-2015).

Публікації. За матеріалами дисертації опубліковано 21 роботу, з них 12 статей у фахових вітчизняних та іноземних наукових журналах, 8 тез доповідей на наукових конференціях та 1 патент на корисну модель.

Структура та об'єм роботи. Дисертація складається зі вступу, чотирьох розділів, висновків, списку використаних джерел (155 найменувань) і 6 додатків. Загальний обсяг роботи – 187 сторінок, включаючи 100 рисунків та 18 таблиць, при чому основний текст викладено на 150 сторінках друкованого тексту. Обсяг ілюстрацій, таблиць та додатків становить 37 сторінок.

РОЗДІЛ I. ЗАГАЛЬНІ ВІДОМОСТІ

1.1. Структура та фізико-хімічні властивості бактеріородопсину

Фотохромні білки надзвичайно рідкісні у природі. Однак, ці декілька білків відіграють ключову роль у життєдіяльності практично всіх організмів, оскільки саме вони виступають як фотореакційні центри у фотосинтезі та зоровому сприйнятті. Через їх надзвичайну важливість та унікальність були проведені численні дослідження функцій цих молекул, їх взаємодії зі світлом і механізму, за допомогою якого світлова енергія перетворюється у хімічну енергію або фізіологічний сигнал. Виявлений механізм має досить складну природу і в той же час є дуже ефективним. Досить простий представник класу фотохромних білків був виявлений близько 40 років тому і названий бактеріородопсином (БР) за подібність до зорового пігменту родопсину [1]. БР виробляється галобактеріями і є ключовим білком, який забезпечує їх фотосинтетичні можливості. У другій половині 80-х років минулого століття активні дослідження БР розпочалися і в Ужгороді [2-5]. Ідеї щодо його практичного використання виникли практично одразу після перших досліджень властивостей БР і продовжують з'являтися й сьогодні [2-9]. І хоча на даний момент БР можна вважати найбільш детально вивченою білковою молекулою [14-28], багато груп науковців у провідних інститутах світу продовжують займатися його дослідженням [29-32]. БР володіє цілим рядом унікальних характеристик. Одна з них – те, що білок у мікроорганізмах представлений як двомірна кристалічна ґратка [33], завдяки чому БР має вражаючу стійкість до хімічної та термічної денатурації. Але навіть більш важливим є те, що фоточутливість та реверсивність цього біологічного фотохрому набагато перевищує можливості штучно синтезованих матеріалів [34, 35]. Крім того бактеріородопсин може бути в значній мірі модифікований і служити як платформа для повністю нового класу матеріалів. Ключем до цього є те, що фізичний механізм функціонування БР вже сьогодні зрозумілий на молекулярному рівні і для його модифікації можуть бути використані інструменти генної інженерії .

У фотосинтетичній системі галобактерій БР - єдиний білок необхідний для перетворення енергії світла у хімічну енергію [1, 6, 36]. Порівняно з фотосинтетичними системами, які базуються на хлорофілі, БР надзвичайно простий. Жорсткі природні умови, в яких живуть галобактерії, можуть бути поясненням того, чому цей, очевидно, найстаріший еволюційно отриманий спосіб перетворення світлової енергії зберігся до наших днів. Галобактерії живуть у екстремальному середовищі. Теплі концентровані сольові розчини з низькими концентраціями кисню та поживних речовин – це умови, які можна знайти у солеварнях та солоних озерах, і саме до таких умов адаптовані ці мікроорганізми. Інтенсивного фіолетового забарвлення воді (рис. 1.1) у природних чи штучних солеварнях надають саме галобактерії. Такі умови можна назвати «автостерильними» оскільки будь-які інші організми не можуть вижити при високій концентрації солі. Оскільки таке середовище надзвичайно бідне на поживні речовини, основним джерелом енергії для життєдіяльності є сонячне світло. Під час еволюційного розвитку галобактерії пристосувалися до таких умов, розвинувши у себе фототрофні властивості, які реалізуються за допомогою БР. Ефективність перетворення сонячного світла у хімічну енергію для БР знаходиться на рівні 15% [6].

У галобактеріях молекули БР вбудовані в цитоплазматичну мембрану, в якій утворюють області, що містять виключно даний білок та супутні ліпіди (рис. 1.2). Такі ділянки називають пурпурними мембранами (ПМ). До 80% поверхні бактерії можуть бути вкриті однією чи кількома ПМ, які складаються тільки з БР та ліпідів [6, 36]. Всі молекули БР орієнтовані в одному напрямку. Кожна молекула БР діє як світлокерована протонна помпа, напрямлена зсередини назовні. Після поглинання кванту світла молекулою спостерігається перенос протону з цитоплазматичної області у позаклітинне середовище. За допомогою цього процесу енергія світла перетворюється у протонний градієнт, який виникає на клітинній мембрані, і використовується для запасання енергії. Мембранно-зв'язані АТФ-комплекси використовують зворотну дифузію протонів для регенерації АТФ з АДФ, які

використовуються для забезпечення енергією молекулярних. У галобактерій є також два види, так званого, сенсорного родопсину (SRI та SRII), які дозволяють галобактеріям визначати чи містить падаюче електромагнітне випромінювання довжини хвиль необхідні для запуску фотоциклу БР, що супроводжується перетворенням енергії світла. Жовто-зелене світло запускає фотоцикл, в той час як синє світло блокує його проходження. Різні довжини хвиль детектуються SRI та SRII які, в свою чергу, керують флагелярним руховим апаратом. За допомогою цього елементарного процесу зорового сприйняття, галобактерія рухається у напрямку світла з оптимальним спектральним складом. На додаток є ще так званий галородопсин (HR), світлокерований хлоридний насос, який забезпечує ефективний рівень аніонів хлору всередині клітини. Всі ці молекули а також флагелярний руховий апарат є надзвичайно цікавими і також можуть розглядатися для практичного використання в техніці [6].

Білки зустрічаються у розчиненій або мембранно-зв'язаній формах. Надзвичайно рідко зустрічаються випадки, коли вони організовані у кристалічну ґратку. В організмі галобактерій БР організований у ПМ, які по суті є двомірним кристалом, який вбудовано у цитоплазматичну мембрану бактерії [38]. В самій ПМ молекули БР об'єднуються в тримери, які розміщуються у вузлах двомірної кристалічної ґратки (рис. 1.3). Виділені бляшки ПМ мають неправильну форму, діаметр близько декількох сотень нанометрів і товщину близько 5 нм [39]. Кристалічна структура, що формується тримерами молекул БР та ліпідами, має гексагональну симетрію, але також описані орторомбічні структури. Фазовий перехід у ПМ виникає в області 70°C. Наявність кристалічної структури приводить до суттєвого зростання, порівняно з іншими білками, стійкості ПМ до дії хімічних та температурних факторів. Сухий шар ПМ стабільний у температурному діапазоні до 140°C. При проведенні сольобілізації ПМ до мономерного стану ця властивість втрачається.



Рис. 1.1. Солеварні. Забарвлення воді надають мікроорганізми *Halobacterium salinarum*, які містять бактеріородопсин [37].

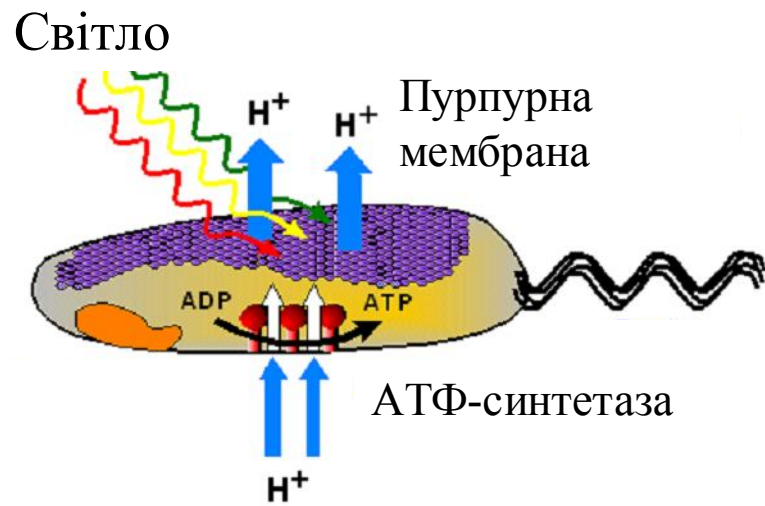


Рис. 1.2. Будова галобактерії та структура ПМ [6].

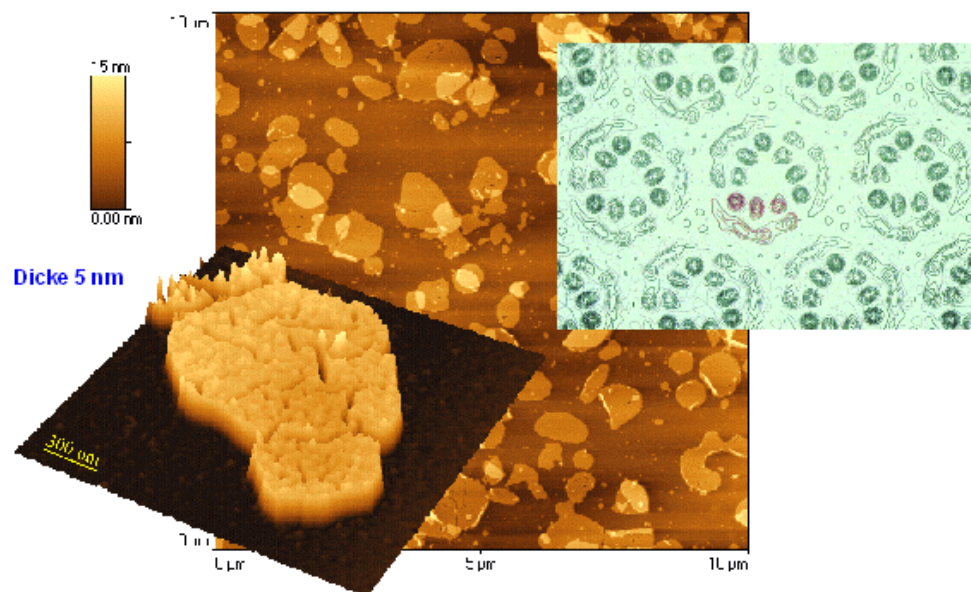


Рис. 1.3. Вигляд та структура пурпурних мембран [39].

Бактеріородопсин належить до сімейства семи-спіральних трансмембранних білків (рис. 1.4). Його структура досліджена з роздільною здатністю $2,5\text{\AA}$, тобто практично на атомарному рівні. БР складається з 248 амінокислот, які об'єднані у сім α -спіральних сегментів всередині ліпідної мембрани і формують порожнину, де розміщена хромофорна група, яка складається з ретиналю та внутрішньої оболонки взаємодіючих амінокислотних залишків, що визначають спектр поглинання та фотохімічний рух ретиналю. Через Шифову основу ретиналь приєднаний до Lys216 і розміщений під кутом 20° до зовнішньої сторони мембрани. БР – світлокерована протонна помпа. Для молекули БР в природних умовах потрібно близько 10 мс для повного завершення каталітичного циклу. Оскільки БР характеризується повною відсутністю рефрактерного періоду, при наявності світлового збудження одна молекула за 1 с може перенести близько 100 протонів з внутрішнього середовища мікроорганізму назовні.

Поглинання кванту світла переводить молекулу з основного стану ***B*** у збуджений ***J***, тим самими запускаючи цикл реакцій, який називають фотоциклом (див. рис. 1.4). Фотоцикл БР складається з кількох інтермедіатів, які можуть бути ідентифіковані завдяки їх спектральним характеристикам, переважно за максимумами спектрів поглинання. В той час як всі переходи між інтермедіатами є реверсивними, перехід між M^1 та M^2 формами розглядається як основний нереверсивний крок у фотоциклі. Протягом цього переходу відбувається перемикання доступності протонування азоту Шифової основи із зовнішньоклітинної частини каналу на внутрішньоклітинну. Ця процедура реалізується завдяки ізомеризаційним змінам у структурі ретиналю. Переорієнтація доступності Шифової основи для протонів, є молекулярною передумовою направлено переносу протону через білок. Всі переходи у фотоциклі (крім виходу з основного стану) є темновими, тобто не потребують додаткового поглинання енергії. На формування певних інтермедіатів, а отже і загальний час одного циклу, може

впливати температура, тиск, рівень рН, хімічний склад навколишнього середовища тощо.

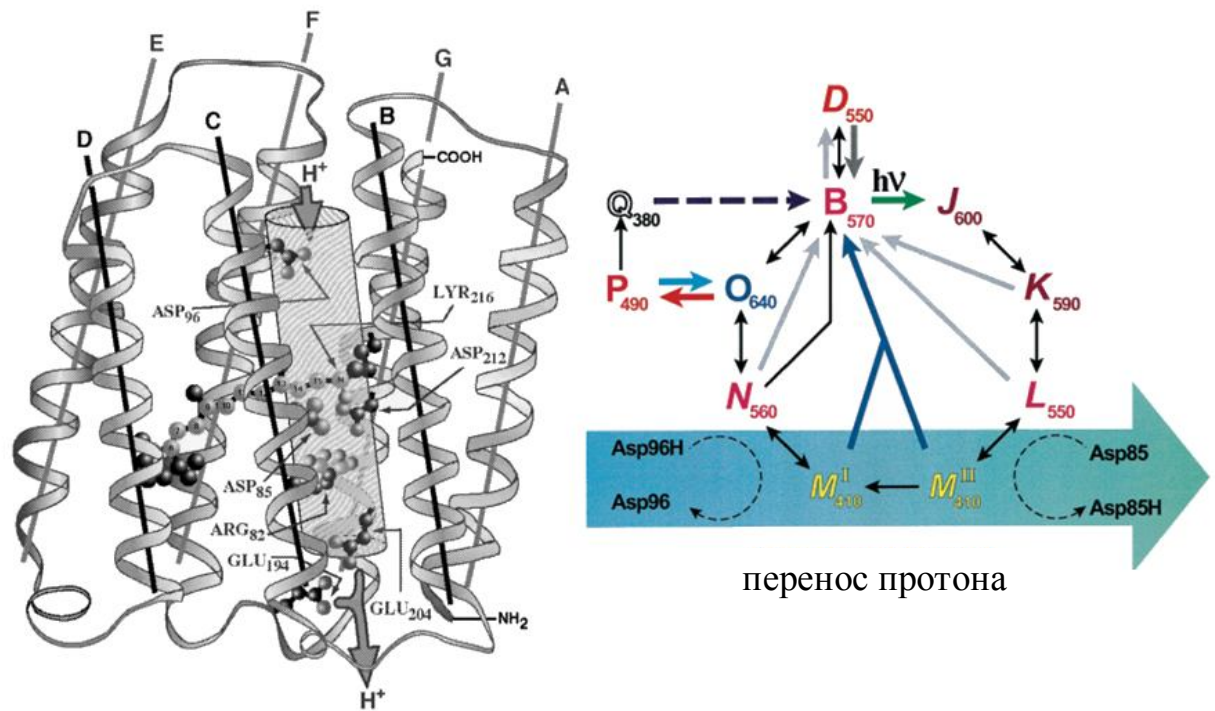


Рис. 1.4. Структура молекули БР та фотоциклу [6].

Крім основного фотоциклу, є деякі стани, які не виникають в природних умовах, однак мають значення для практичного використання. *P* і *Q* стани містять ретиналь хромофорних груп у 9-*cis* стані. Дані стани можуть бути отримані шляхом хімічної модифікації оточення молекул БР або методам генної інженерії шляхом заміни певних амінокислотних залишків. Утворені таким чином ПМ називають синіми мембранами. З дикого типу досить важко отримати та утримувати у стабільному стані сині мембрани. Вони мають схильність до агрегації та неререверсивного вицвітання. Мутовані види БР, такі як БР-D85N, роблять доступною 9-*cis* фотохімію при кімнатних умовах.

1.2. Постановка задачі

В сучасній прикладній електроніці активно досліджується проблема розробки процесів і принципів біотехнології для ціленаправленого синтезу елементів і функціональних середовищ, які становлять базис технічних

систем сприйняття, перетворення, збереження і передачі інформації. Стрімке зростання обсягів даних, які необхідно зберігати та передавати, як між окремими елементами обчислювальних систем, так і в мережі, веде до критичного зростання вимог до матеріалів використовуваних в комп'ютерній техніці. Альтернативою сучасним неорганічним матеріалам, які використовують для запису та обробки інформації, можуть стати матеріали органічного походження. Яскравим представником такого класу матеріалів є нанокмпозитні структури на базі БР, які використовують унікальні властивості даного білка. Індикатором очікувань комерційного використання нових матеріалів та технологій є патенти. На даний час зареєстровано більше 60 японських, 20 американських та 10 європейських патентів, які підтверджують використання БР для розробки матеріалів та приладів. Кількість патентів постійно збільшується [6].

З практичної точки зору найбільш привабливими є плівкові структури на базі БР, хоча для спроб 3-D запису інформації використовувалися об'ємні зразки, а в літературі описані спроби використання навіть суспензій. Різними групами науковців проводилися дослідження різноманітних матеріалів як матриць для плівок та розробка методик нанесення плівкових структур. На даний момент відпрацьовані методики з отримання високоякісних плівкових структур із заданою товщиною та концентрацією БР як в органічних, так і в золь-гельних матрицях на різних підкладках. Основні характеристики плівок БР, як матеріалу для оптичного запису та інформації, наведені в табл. 1.1.

Для довготривалого зберігання інформації циклічність не є критичним параметром. Кілька сотень тисяч циклів достатньо, але набагато більші вимоги до густини запису. Теоретично через кожні 5 нм на плівці БР може бути записана бінарна інформація шляхом переведення в той чи інший стан окремої молекули чи тримера. Така можливість забезпечує фантастичні густини запису. При такій роздільній здатності можна записати 100 000 ліній на 1 мм. Для традиційних оптичних систем середня величина становить 500 нм - 2000 ліній/мм максимум [6, 40]. Однак на даний час не розроблено

зручної технології, яка може адресно передати випромінювання до конкретної молекули. Оптична мікроскопія ближнього поля наблизилася до межі 10 нм, але це аналітичний інструмент, який не може забезпечити відповідних швидкостей передачі даних. Тому у випадку традиційного 2-D запису матеріали на основі БР поки не можуть конкурувати з традиційними неорганічними носіями.

Табл. 1.1.

Оптичні характеристики плівок БР [6]

Спектральний діапазон	400 - 700 нм
<i>Динамічний запис</i>	
В→М	520 нм – 640 нм
М→В	400 нм – 430 нм
<i>Запис для довготривалого зберігання</i>	
О→Р	630 нм – 700 нм
Р→В	430 нм – 530 нм
Роздільна здатність (оптична)	≥5000 ліній/мм
Оптична густина (570 нм)	1-5
Максимальний відсоток зміни кольору	95%
Показник заломлення	1.47
Зміна показника заломлення	0.001-0.01
Дифракційна ефективність	1-3% (мах – 7%)
Світлова чутливість	0.1-20 мДж/см ²
Поляризаційний запис	Можливий
Реверсивність	≥10 ⁶ циклів
Час зберігання	Роки
Товщина плівок	10–500 мкм (20-40 мкм)
Час запису/стирання	10 ⁻³ -1 с
Апертура	необмежена

У випадку 3-D запису ситуація виглядає краще. На даний момент розроблено три основні методики, які дозволяють використовувати БР - середовища для оптичного запису та збереження інформації: голографічний посторінковий метод запису, метод, що базується на використанні ефекту розгалуженого фотоциклу та метод з використанням двофотонного збудження. У випадку останнього використовується зведення двох лазерних пучків, квант випромінювання кожного з яких несе енергію, яка становить

половину від величини, потрібної для того, щоб перевести БР з основного у М стан у певній точці об'єму матеріалу. Довжина хвиль випромінювання повинна задовольняти умові $1/\lambda_{36}=1/\lambda_1+1/\lambda_2$ (наприклад, два пучки з довжинами хвиль 820 та 1140 нм для збудження М та В станів, відповідно). Для того, щоб уникнути паразитного збудження, або для технічної зручності можна вибрати якісь інші довжини хвиль, які задовольняють дане рівняння. Надзвичайно зручним є той факт, що можна вибрати таку довжину хвилі, яка не буде поглинатися у матеріалі. Такий метод запису можливий через надзвичайно високе значення перерізу двофотонного поглинання, характерне для молекул БР. Однак довговічність збереження інформації таким способом може бути забезпечена лише при охолодженні матеріалу.

Інший метод, який можна використовувати для довготривалого зберігання даних, використовує розгалужену модель фотоциклу. Схема для даного методу зображена на рис. 1.5. Спочатку імпульс зеленого лазера переводить молекули з основного стану у **J** стан. Далі за рахунок темнових переходів за час t відбувається перехід у форму **O**. Через час t у перпендикулярному напрямку спрямовують імпульс червоного лазера, який переводить молекули з **B** стану у **P** стан, який характеризується 9-цис ізомеризацією ретиналю. Тільки фотохімічним збудженням можна перевести даний інтермедіат у **Q** стан, який релаксує до основного **B** стану. Зчитування інформації проводиться аналогічним способом. Ребро такої елементарної комірки може складати від 3 до 6 мікрон [10]. Провівши прості розрахунки, можемо знайти, що у 1 кубічному міліметрі можна записати від 4.4 до 0.55 Гбайт інформації, відповідно. Знову ж слід відмітити що обмеження на густину запису накладаються не матеріалом а наявними на сьогоднішній день технологіями адресації випромінювання.

У випадку голографічного запису інформації, кожний раз відбувається запис однієї повної сторінки інформації. На сьогоднішній день, паралельно можуть бути оброблені близько 10^6 бінарних точок даних [11]. Після запису сторінки відбувається зміщення матеріалу, поворот його на певний кут або

зміна кута між опорним та інформаційним пучком, і проводиться запис наступної сторінки даних. Зчитування інформації у паралельному режимі відбувається цілою сторінкою шляхом експозиції опорним пучком при таких самих значеннях координат та кутів, як і при записі.

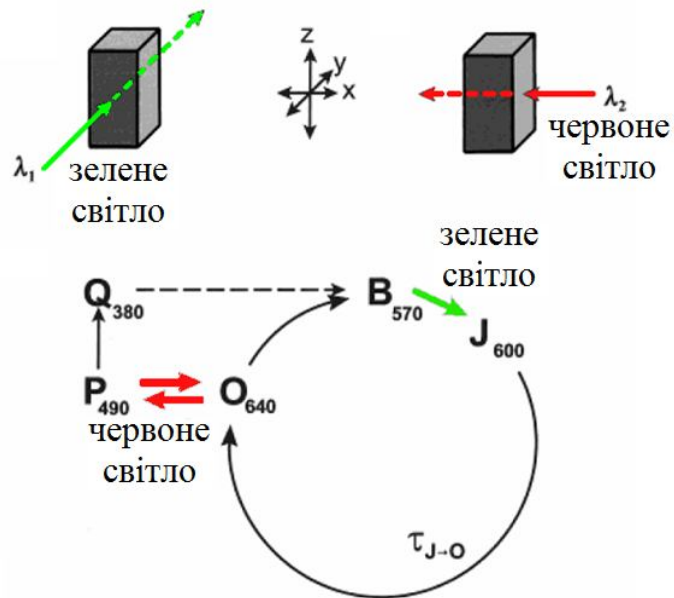


Рис. 1.5. Запис даних з використанням розгалуженого фотоциклу [6].

В той же час основним напрямком практичного використання БР можна вважати системи оптичної обробки інформації. Тут на перше місце виступає реверсивність матеріалу. Наприклад, обробка відеоінформації вимагає більше 10^6 циклів запису-зчитування-стирання в одній комірці пам'яті протягом одного робочого дня. Ця вимога унеможливує використання більшості синтетичних фотохромних матеріалів. Однак ця величина не є критичною для матеріалів на основі БР. Крім реверсивності БР характеризується наявністю багатьох інших позитивних якостей, однак у даному випадку саме реверсивність робить його унікальним. Наявність двох фотоактивних станів дозволяє реалізовувати контроль світла світлом. Можливість поляризаційного запису може бути незамінною, якщо потрібне низьке відношення сигнал-шум. Можливість оптичної обробки інформації полегшує реалізацію задач на розпізнавання образів та оптичної інтерферометрії. Термічна релаксація забезпечує повернення матеріалу до

вихідного стану при відсутності випромінювання. Нелінійне поглинання є необхідністю в одному випадку і недоліком у іншому. В той же час для голографічних методів важливою є зміна показника заломлення. У таблиці 1.2 перераховані деякі приклади оптичного використання БР та наведено оцінку корисності тих чи інших його властивостей для кожного випадку.

Табл. 1.2.

Приклади практичного використання оптичних властивостей БР [6, 45, 47].

Застосування	Зміна поглинання	Зміна n	Світлова чутливість	Нелінійність	Два фотоактивні стани	Реверсивність
Нелінійна фільтрація	+	-	\pm	++	++	++
Просторові світлові модулятори	+	\pm	\pm	--	++	++
Фазова кон'югація	-	++	-	\pm	\pm	++
Розпізнавання образів	-	+	--	++	++	++
Інтерферометрія	-	++	++	\pm	++	++

Ще одним аспектом можливого практичного використання фотоіндукованої зміни поглинання та показника заломлення є створення оптичних перемикачів та комутаторів на основі БР [41 - 43]. Якщо покрити оптичний хвилевод шаром БР, то контролюючи його стан та характеристики за допомогою зовнішньої засвітки, можна контролювати перерозподіл випромінювання в каналі [44]. Реалізовані таким чином перемикачі на переході $B \rightarrow M$ по часу спрацювання набагато випереджують аналогічні електронні перемикачі. У минулому році група Ласло Фабіана з Сегедського університету підтвердила можливість використання для даної мети високошвидкісних переходів у K та J стан [41].

Підсумовуючи все перераховане вище, можна зробити висновок, що на даному етапі, поки можливості традиційної електроніки ще себе не

вичерпали, досить важко аргументувати необхідність використання даного матеріалу як середовища для збереження інформації. В той же час у напрямку систем обробки інформації матеріали на основі БР практично не мають достойних конкурентів. Розроблені плівкові матеріали для інтерферометрії, нелінійної фільтрації та голографічного розпізнавання образів вже використовуються у реальних установках. Використання швидких переходів між інтермедіатами дозволяє здійснювати перемикання оптичних потоків з частотою більше 100 ГГц, що дає можливість збільшити швидкість передачі даних практично до 1 Тбіт/с. Враховуючи розвиток біо- та нанотехнологій, щоденно зростаючі вимоги до комунікаційних мереж, можна стверджувати, що питання практичного використання БР або біоматеріалів на його основі – це лише питання часу.

В той же час кінцеві характеристики плівок на основі БР залежать від цілого ряду факторів. Так фоточутливість плівок залежить від штаму, з якого був отриманий БР та технології очистки [47]; важливою є методика підготовки плівкоутворюючої суміші та використана методика нанесення плівок [4, 48]; суттєвий вклад вносить тип та підготовка підкладки, а також матеріал матриці [5, 51]; на характеристики плівки може суттєво впливати зміна хімічного складу [2, 49, 50, 52-56] та параметри навколишнього середовища (такі як вологість, температура, концентрація певних газів) [57-60]. Тому дослідження та розробка нових матеріалів на основі БР, з'ясування впливу типу та структури матриці на оптичні характеристики БР, оптимізація процесів отримання як самого бактеріородопсину так і функціональних матеріалів на його основі, дуже актуальні на даний час.

Багато досліджень різних груп науковців були спрямовані на вивчення впливу зовнішнього середовища, зокрема вологості [61-64], місцевих анестетиків [65-72], органічних розчинників [58] а також аміаку та аміновмісних речовин [57, 73, 74], на фотохромні властивості плівок БР. Всі вказані фізичні та хімічні чинники впливають на спектральні та кінетичні параметри плівок БР. З точки зору використання БР для запису інформації,

залежність його характеристик від умов навколишнього середовища - це негативна властивість. Однак вона відкриває можливість іншого застосування БР – створення чутливих елементів для оптичних сенсорів [69-71, 74-90]. Вплив на оптичні властивості БР параметрів навколишнього середовища, таких як наявність різних хімічних речовин, значення рН та інших зовнішніх чинників, надає можливість контролю за цими параметрами шляхом реєстрації змін оптичних характеристик БР, індукованих зовнішніми факторами. Слід відмітити, що колектив нашої лабораторії одним з перших запропонував такий варіант використання БР.

На початковому етапі вплив дегідратації на характеристики плівок на основі БР виділеного як з диких штамів, так і з мутантів, таких як штам D96N, проводили для того, щоб зрозуміти межі використання цього матеріалу для застосування в області оптичного запису. Зменшення відносної вологості зумовлює зміщення в максимумах поглинання основного стану БР у бік менших довжин хвиль, а також до зменшення поглинальної здатності незалежно від природи БР (рис. 1.6) [64].

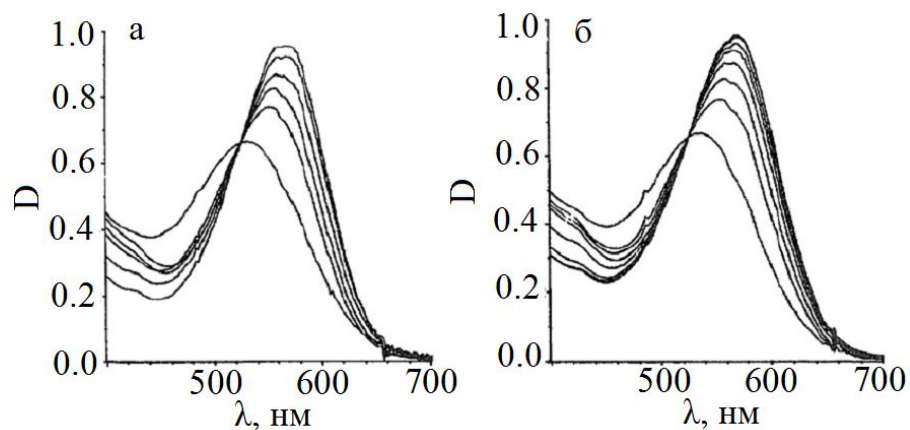


Рис. 1.6. Зміни спектру поглинання плівки БР обумовлені зменшенням відносної вологості від 85 до 3%; а – БР, виділеного з природних штамів, б – мутант D96N [64].

Дослідження, проведені з використанням БР, отриманого з мутантного штаму D96N, показали, що однакова зміна вологості приводить до різних

змін оптичних властивостей плівок. На відміну від плівок БР, виділеного з природних штамів, де зменшення відносної вологості зовнішнього середовища на 12% приводить до 200-кратного збільшення тривалості часу життя М інтермедіату, мутант D96N демонструє тільки 17–20-кратне збільшення часу життя М стану [64]. Проведення досліджень впливу вологості на параметри плівок БР з різними хімічними домішками показало, що величина оптичних змін залежить і від хімічного складу плівки [53, 61, 62]. Дані результати підтверджують, що плівки БР можна використовувати як чутливий елемент для оптичного датчика вологості, при чому робочий діапазон та чутливість може задаватися параметрами плівки та її хімічним складом.

В роботі [91] суспензія ПМ була вибрана для вивчення, на молекулярному рівні, механізмів анестезії та визначення кількісного взаємозв'язку між режимами дії анестезії та концентрації анестетиків. В залежності від типу анестетика та його концентрації автори виділили три різних режими дії. Кожний з них характеризується відмінностями в амплітуді та реверсивності змін [65, 91]. Вплив летючих анестетиків, таких як ефір та хлороформ, на оптичні властивості тонких плівок БР показав, що збільшення концентрації анестетиків приводить до зменшення поглинання на 570 нм. При концентрації летючих анестетиків 7,5% поглинання на 480 нм в розчині БР збільшується з ізобатичною точкою на 510 нм та з'являється нова смуга поглинання біля 400 нм [91]. В той же час спостерігається хороша реверсивність оптичних властивостей плівки (рис. 1.7), коли БР піддається дії диетилового ефіру, що дозволяє використовувати плівку БР як чутливий шар для оптичних сенсорів диетилового ефіру.

Підсумовуючи літературні дані [46-91] бачимо, що було виявлено вплив різноманітних хімічних речовин, таких як анестетики, детергенти, аміак, бензиламін, сечовина, ацетилхолін та пеніцилін на спектральні характеристик плівки, динаміку та амплітуду фотоіндукованих змін, що є підтвердженням взаємодії досліджуваних речовин саме з БР. В кожному

окремому випадку амплітуда та реверсивність змін відрізнялася і залежала від хімічного складу та структури плівки.

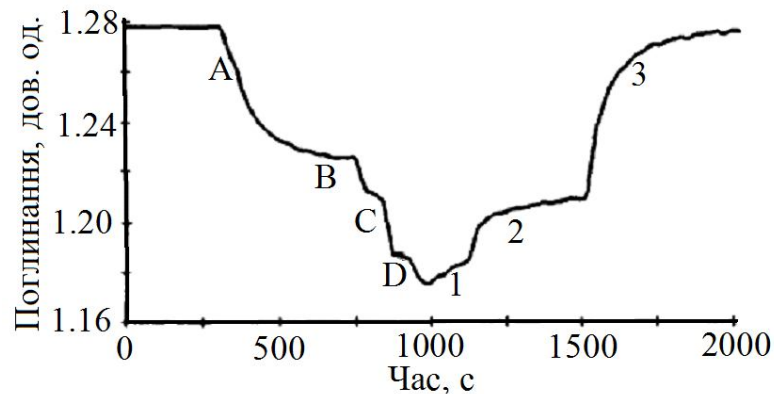


Рис. 1.7. Зміна поглинання плівки БР на 570 нм спричинена дією діетилового ефіру, при збільшенні (A, B, C, D) та зменшенні (1, 2, 3) концентрації [69].

Як видно з наведених даних, плівки БР можуть реверсивно змінювати свої характеристики під дією різноманітних факторів навколишнього середовища. В той же час амплітуда та швидкість таких змін залежить від структури БР-вмісного матеріалу, причому селективність можна контролювати за допомогою хімічного складу. В даному контексті актуальними задачами є дослідження змін оптичних характеристик плівок БР під дією зовнішніх факторів, вплив хімічного складу та структури плівок на їх чутливість, оптимізація хімічного складу плівок та технології їх отримання, розробка конструкції чутливих елементів, яка дозволить спростити їх будову, покращити ефективність та розширити діапазон практичного використання тощо. Розгляду та розв'язанню цих задач і присвячена дана робота.

1.3. Експериментальні методики досліджень

Морфологія поверхні та перерізу плівок на основі БР визначається багатьма чинниками (методика нанесення, параметри плівкоутворюючої суміші, тип матриці та підложки, тощо). В той же час оптичні характеристики плівок суттєво залежать від їх структури. Для дослідження

поверхні та об'єму плівок були використані такі методики, як растрова електронна мікроскопія (РЕМ) та атомно-силова мікроскопія (АСМ).

Растрова електронна мікроскопія - метод дослідження поверхневої структури мікрооб'єкта шляхом аналізу відбитого «електронного зображення». Дана методика дозволяє отримувати зображення поверхні зразка з роздільною здатністю до кількох нанометрів. Зображення, які отримують в растровому електронному мікроскопі, виглядають трьохмірними і зручними для вивчення структури поверхні. Додаткові методи дозволяють отримувати інформацію про елементний склад поверхні. Принцип роботи скануючого електронного мікроскопа показано на рис. 1.8.

Сфокусований електронний промінь сканує прямокутну ділянку зразка, внаслідок чого з поверхні емітуються вторинні та пружно-відбиті електрони. Сигнали, утворені цими електронами, детектуються і направляються на синхронізовану скануючу розгортку монітора, утворюючи зображення поверхні в різних режимах. Крім вторинних та пружно-відбитих електронів аналізуються сигнали від інших детекторів, які знаходяться навколо камери мікроскопа.



Рис. 1.8. Загальний вигляд та принцип роботи растрового електронного мікроскопа FE-SEM Hitachi S-5200 with EDS. [92, 93].

В залежності від механізму реєстрації сигналу розрізняють декілька режимів роботи скануючого електронного мікроскопа: режим вторинних електронів, режим відбитих електронів, режим катодолюмінісценції. Вторинні електрони за своєю природою є низько-енергетичними (<50 eV), виходять з приповерхневого шару зразка товщиною до 10 нм під дією падаючого високоенергетичного електронного променя (2-30 keV). Інтенсивність емітованих вторинних електронів залежить від хімічного складу поверхні і від морфології поверхні. Пружно-відбиті електрони - це електрони, відбиті від поверхні. Вони мають приблизно таку ж енергію, що і падаючі електрони. Порівняно з вторинними, пружно-відбиті електрони дозволяють отримати інформацію про більш глибокі шари зразка (до кількох мікрометрів). Пружно-відбиті електрони дозволяють отримувати контрастну картину композиційного складу (середнього атомного номера) та топографічне зображення. Ці зображення одержують при допомозі спеціальних детекторів та методик. Явище катодолюмінісценції теж можна досліджувати за допомогою РЕМ, оскільки в певного класу матеріалів виникає свічення у видимій області під дією падаючого електронного променя. Рентгеноспектральний мікроаналіз – метод визначення елементного складу поверхні речовини за допомогою якісного та кількісного аналізу характеристичного та гальмівного рентгенівського випромінювання речовини, яке виникає внаслідок її бомбардування електронним пучком мікроскопа. Це можуть бути як якісні, так і кількісні вимірювання з реєстрацією домішок з чутливістю 0,1-0,01% за масою.

Для досліджень морфології поверхні, поперечного перерізу і розподілу елементів у плівках на основі БР використовувався растровий електронний мікроскоп (FE-SEM) Hitachi S-5200 з роздільною здатністю в 1.8 нм на 1 кВ, доповнений EDS системою [93]. Для проведення РЕМ досліджень плівки БР наносили на скляну підкладку, розмір якої відповідав тримачу зразків мікроскопа. Перед дослідженням плівки висушували у вакуумі протягом 6 годин з метою усунення зі зразків усієї води, а потім їх покривали тонкою

(5 нм) платиновою плівкою для розрядження поверхні зразка під час взаємодії з електронним пучком.

Атомно-силова мікроскопія (АСМ) - вид зондової мікроскопії, в основі якого лежить силова взаємодія атомів зонда і досліджуваного зразка (рис. 1.9). Силу взаємодії зонда із зразком можна отримати, якщо підсумувати елементарні взаємодії для кожного атома зонда. Для зонда, що характеризується деяким радіусом кривизни R ($R \gg z$, де z - відстань від зонда до поверхні) і абсолютно плоского зразка, в наближенні механіки суцільних середовищ сила притягання буде пропорційно R/z^2 (формула Гамакера), відштовхування - приблизно R/z^8 . Для того, щоб "відчути" такі взаємодії атома з атомом, необхідно, щоб зонд був атомних розмірів. Реальні зонди мають розміри в декілька нанометрів і довжину 1-2 мкм.

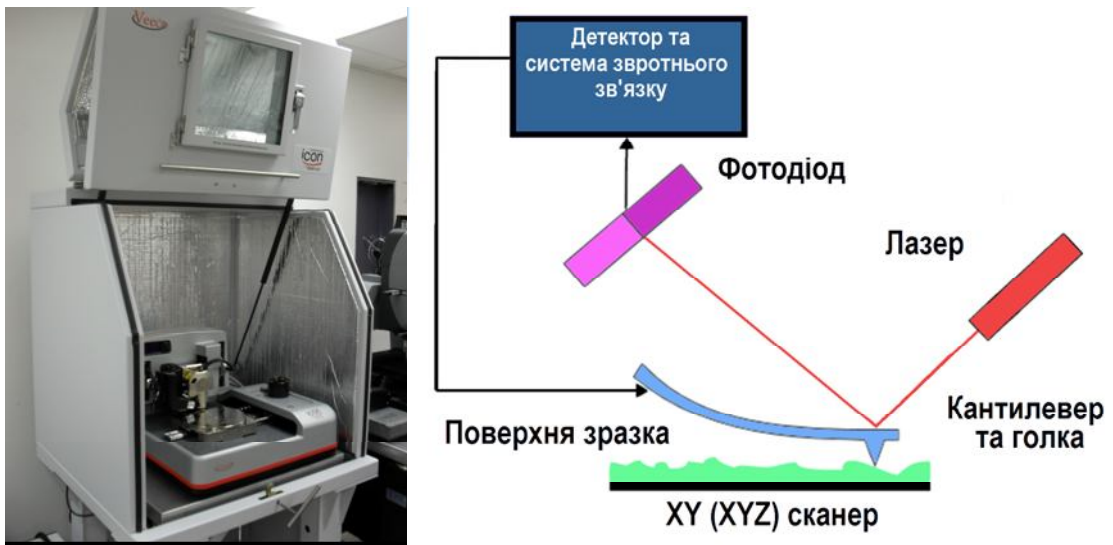


Рис. 1.9. Загальний вигляд та принцип роботи атомно-силового мікроскопа Dimension Icon AFM with Scan Asyst (Veeco) [94].

Зонд розташований на вільному кінці кантилевера. Зонди в основному виготовляють з таких матеріалів, як кремній і Si_3N_4 . Чим менше радіус кривизни і кут сходження вістря, тим менше його вплив на зображення досліджуваного об'єкта. Кантилевер - це пружна пластинка, за відхиленням якої можна судити про силу взаємодії вістря із зразком. Коли вістря наближається до зразка, між ними починають діяти сили обмінної взаємодії.

Залежно від того, наскільки мала відстань між вістрям і зразком, це буде сила притягання або відштовхування. Звідси і виникають два різних режими сканування - контактний і безконтактний.

При контактному режимі, або режимі відштовхування, вістря настільки близько підходить до досліджуваного зразка, що говорять про так званий "фізичний контакт". При цьому сила відштовхування врівноважується силою пружності консолі і капілярною силою, яка виникає, коли вимір проводять на повітрі: зонд "протикає" тонкий шар вологи, який адсорбується на зразку. Константа пружності консолі в цьому режимі повинна бути досить маленькою, для того щоб зонд делікатно відстежував профіль поверхні, не руйнуючи її. Рельєф досліджуваної поверхні формується, як правило, або в режимі сталої висоти, або в режимі сталої сили. У першому випадку кантилевер пересувається у горизонтальній площині і реєструється його відхилення у кожній точці. У другому випадку за допомогою системи зворотних зв'язків постійним підтримується сталий рівень відхилення кантилевера, тобто сила взаємодії його із зразком. Пересування зразка або кантилевера відбувається за допомогою п'єзоелектричного маніпулятора.

Ще один режим, який часто використовують, - режим переривчастого контакту або режим короткочасного натискання. У багатьох випадках (в основному, при дослідженні м'яких матеріалів, таких як полімерні ланцюги і різні біооб'єкти) він дозволяє підвищити якість одержуваного зображення. При такому способі сканування за допомогою ще одного п'єзоелектричного маніпулятора здійснюються вимушені механічні коливання кантилевера з частотою, близькою до резонансної (зазвичай це десятки і сотні кілогерц) та амплітудою близько 100 нм. У нижній точці коливань вістря "торкається" зразка. У цьому режимі, як і у контактному режимі, можливо продавлювання зразка голкою. При пересуванні скануючої голки (або зразка) відстежується зміна резонансної амплітуди кантилевера (вона залежить від зовнішньої сили). Даний метод дозволяє підвищити роздільну здатність мікроскопа при спостереженні об'єктів із зниженою механічною жорсткістю, оскільки тут

усунуто вплив капілярних сил. При такому методі також виключаються різні латеральні сили і сили тертя, які можуть призводити до зміщення структур на площині зразка.

Безконтактний режим "працює" на Ван-дер-Ваальсівському притяганні. Відстань між зондом і зразком повинна бути не дуже мала (щоб відштовхування вже не відіграло велику роль) і не надто велика (взаємодія швидко спадає з відстанню). Оскільки нахил кривої енергії Ван-дер-Ваальсівського притягання менший, ніж в області відштовхування, то і сили притягання менші за сили відштовхування. А оскільки в цьому режимі константа пружності консолі вже повинна бути, навпаки, велика (щоб не відбувалося прилипання зонда до зразка), то для отримання якісного зображення необхідна більш чутлива схема детектування вертикального переміщення кантилевера. Вертикальні відхилення вимірюються, наприклад, високоточними оптичними методами (лазерний промінь відбивається від дзеркальної поверхні кантилевера і реєструється фотодіодом). Даний режим у порівнянні з попередніми двома використовується не так часто. Наочне тривимірне зображення поверхні отримують лише після відповідної математичної обробки цифрової інформації, яка складається з масивів чисел, що відображають, наприклад, залежність відхилення кантилевера від координати.

Для аналізу поверхні плівок ми використовували атомно-силові мікроскопи JSPM-5210 (Jeol) та Dimension Icon AFM with Scan Asyst (Veeco). PEM і АСМ являються доповнюючими методами, які використовують різні принципи сканування поверхні і можуть дати аналітичну інформацію про властивості поверхні зразка [95].

Пористість - це відношення загальної суми об'єму пор до загального об'єму матеріалу. Це важлива характеристика, яка може визначати ефективність та динаміку чутливості плівки до зміни параметрів навколишнього середовища. За рахунок великої пористості матриці можна одержати плівки з великою сумарною площею поверхні. Відповідно, хімічні

речовини проникають і взаємодіють з БР всередині всього об'єму плівки, таким чином збільшуючи чутливість плівки до зміни зовнішніх умов. Дані про структуру пор – це важливий етап у процесі визначення властивостей матеріалу, коли прогнозують зміну характеристики речовин під впливом зовнішніх подразників.

Існує два види пор: *закриті пори*, які повністю ізольовані від зовнішньої поверхні, а отже, доступу речовин з навколишнього середовища до таких пор неможливий, та *відкриті пори*, які зв'язані проходами з поверхнею зразка. У такі пори можливе проникнення різних рідин та газів. У даній роботі визначення пористості матеріалів, які використовуються як матриці для виготовлення плівок на основі БР, проводилося з врахуванням тільки відкритих пор. Визначення властивостей матеріалів з точки зору пористості складається із визначення наступних параметрів: розміру пор за номінальним діаметром (мікропори – менше ніж 2 нм; мезопори – між 2 і 50 нм; макропори – більше ніж 50 нм); питомого об'єму пор; розподілу пор по розміру; загальної об'ємної густини; пористості у процентному відношенні; питомої поверхні, яка рівна загальній площі поверхні зразка, що контактує із зовнішнім середовищем, і виражена у квадратних метрах на грам сухого зразка ($\text{м}^2/\text{г}$).

Розподіл пор за розміром і питома поверхня були визначені за допомогою статичного об'ємного принципу, який застосовується для визначення властивостей плівок методом газової адсорбції [98]. Принцип роботи установки базується на послідовному підведенні відомої кількості адсорбату до тримача зразка, який міститься у рідкому азоті при температурі 77 К. Схематичне зображення принципу дії статичного об'ємного адсорбування наведено на рис. 1.10.

Адсорбція газу зразком приводить до повільного пониження тиску до встановлення рівноважного тиску. У результаті відомо рівноважний тиску і кількість поглинутого газу на кожному етапі. Аналіз повної адсорбції/десорбції називають ізотермою адсорбції. Існує шість стандартних

ізотерм [97] відмінних між собою, оскільки системи демонструють різні механізми взаємодії газу з твердим тілом. Після отримання ізотерми, можна використати різні теорії розрахунків для визначення питомої площі поверхні (Brunauer-Emmet-Teller (B.E.T.), Dubinin, Langmuir, і ін.) або об'єму макро- і мезопор та їх розподілу за розміром (Barret-Joyner-Halenda (BJH), Dollimore-heal (DH), Horvat-Kavazoe (HK), і ін.).

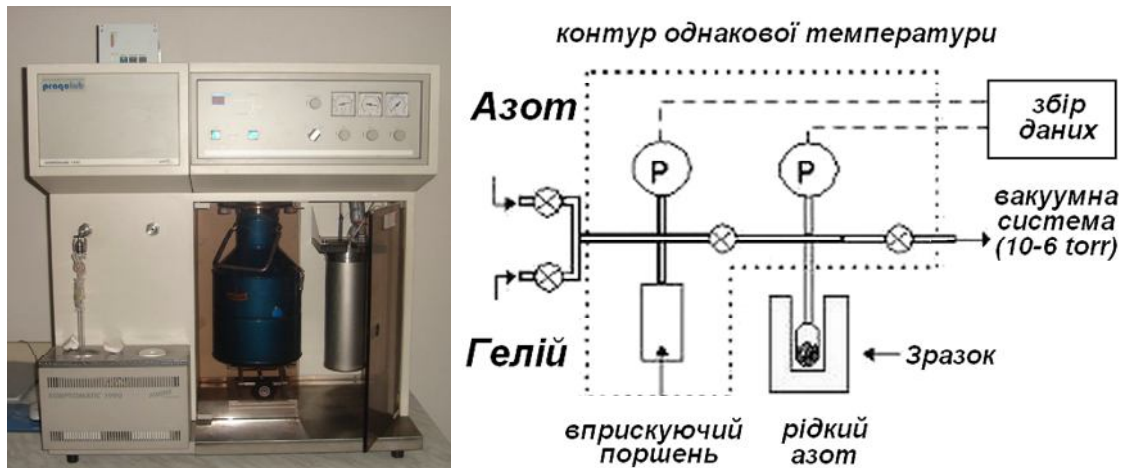


Рис. 1.10. Загальний вигляд та блок-схема установки для вимірювань пористості “Sorptomatic–1990” [96].

Для розрахунку питомої площі поверхонь і розподілу за розміром пор були використані теорія Брунауера-Емметта-Теллера (БЕТ) [99] і метод Barret-Joyner-Halenda (BJH) [100], відповідно. За допомогою установки "Sorptomatic-1990" досліджували пористість матеріалів, які використовуються як матриці для плівок БР. Плівкоутворюючий розчин наносили на скляну підкладку, оброблену таким чином, щоб отримати гідрофобізовану поверхню. Після висушування у ексікаторі протягом 24 годин плівку видаляли з скляної поверхні і розрізали на частини, які відповідали розмірам тримача "Sorptomatic-1990". Середня вага одного шматка плівки становила 0,002 кг. Плівки розміщали у тримачі зразків, зважували й піддавали дегазації, яка займала 24 години й проходила при температурі 50°C . Потім тримач зі зразками поміщався у кювету з рідким

азотом, що забезпечувало проведення експерименту при температурі кипіння рідкого азоту.

Дослідження оптичних характеристик. Всі зміни, які відбуваються у плівках БР під дією тих чи інших факторів, знаходять своє відображення у спектральних особливостях та динаміці їх змін. Для дослідження спектральних параметрів плівок бактеріородопсину на скляних підкладках та торцях оптичних волокон використовували оптоволоконний спектрофотометр Ocean Optics USB4000 (Рис. 1.11). Даний прилад дозволяє досліджувати як статичні спектральні характеристики так і динаміку оптичних змін у плівках на основі бактеріородопсину при засвітці та дії хімічних реагентів.

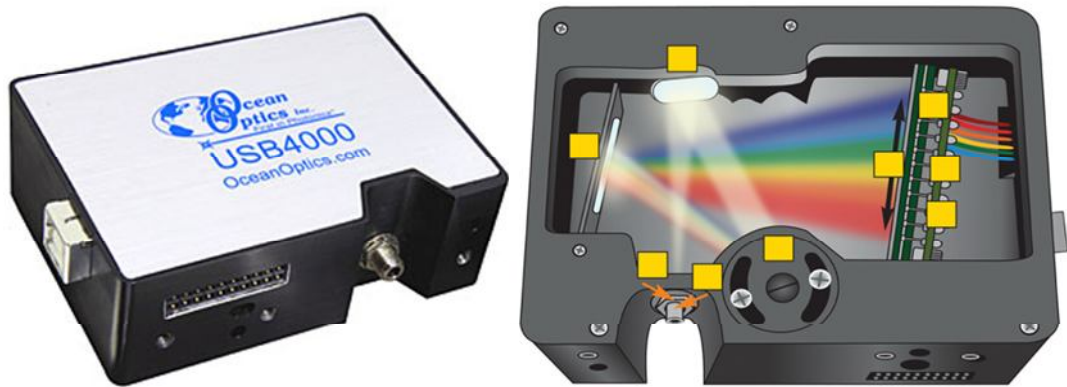


Рис. 1.11. Загальний вигляд та схематичне зображення будови спектрофотометра Ocean Optics USB4000 [101].

Спектрометр укомплектований SMA з'єднувачем для хорошого з'єднання з оптичним волокном; вхідною щілиною шириною 5 мкм; дифракційною ґраткою HC-1 і фільтром вищих порядків дифракції, що забезпечують роботу у спектральному діапазоні 200-1100 нм та оптичну роздільну здатність 1.0 нм. Для реєстрації випромінювання використовується лінійний ПЗЗ-детектор з 3648 елементами. Дифракційна ґратка HC-1 зі змінним кутом блиску розроблена фірмою Ocean Optics спеціально для роботи у діапазоні 200-1100 нм. Крім ґратки, у спектрофотометрі встановлений змінний довгохвильовий фільтр, що усуває другі і треті

порядки дифракції [101]. Функції управління та обробки результатів реалізуються через програмне забезпечення SpectraSuite.

Як джерело світла використовували кварцову галогенну лампу КГМ 24-250. Для стабілізації живлення лампи використовували випрямляч змінного струму ВСА-5А-К. Підведення випромінювання до зразка та до спектрофотометра реалізовувався за допомогою 600-мікронного оптичного волокна Ocean Optics FIBER-600-UV. Для зменшення втрат світла всі з'єднання оптичних волокон проводилися з використанням стандартних роз'ємів Ocean Optics Premium-Grade SMA 905 Connector. Світло від лампи фокусувалося за допомогою системи лінз та вводилося у оптичне волокно за допомогою спеціальної колімаційної лінзи (Ocean Optics 74UV Colimating Lens), яка під'єднувалася безпосередньо до SMA-конектора на волокні. Для дослідження спектрів відбивання плівок на торці волокна використовували 600-мікронний волоконно-оптичний Y-розгалуджувач.

Для *дослідження голографічних характеристик* плівок БР з домішкою ТЕА використовували запис тонких голограм. Для тонких голограм дифраговані пучки розділяються у просторі між собою та з нульовими пучками. Це дає можливість слідкувати за зміною інтенсивності всіх записуючих та дифрагованих.

Запис голограми проводився двома пучками He-Ne лазера з $\lambda=663$ нм. Інтенсивність кожного пучка становила 15 мВт, а кут між ними складав 3° . Діаметр плями на плівці був 6-8 мм. Накладання записуючих пучків створювало модуляцію інтенсивності освітлення плівки за рахунок їх інтерференції і приводило до запису дифракційної ґратки. Для зчитування голограми використовувався пучок He-Ne лазера з інтенсивністю 0.2 мВт, некогерентний до записуючих пучків. Розподіл дифракційних порядків у просторі для голографічного методу з використанням тонкої голограми наведено на рис. 1.12. Даний метод включає необхідність використання пробного пучка, який дає можливість незалежного відслідковувати параметри запису в процесі фотоперетворення БР.

Кожен із пучків, що падають на голограму, дифрагує на ній і, у першому наближенні, має свій розподіл порядків. Для пробного пучка розподіл дифракційних порядків простий $0, \pm 1, \pm 2$ і так далі відображає інтегральну зміну характеристик матеріалу. Розподіл порядків у картині дифракції записуючих пучків (так званій самодифракції) більш складний. Ці порядки перекриваються між собою. У напрямі кожного дифракційного порядку розповсюджується по два пучки. У напрямі нульових порядків розповсюджуються пучки $+1$ або -1 порядків від сусідніх записуючих пучків. При рівних інтенсивностях записуючих пучків перекриття порядків у напрямі нульових порядків у загальному випадку взаємно компенсується і не впливає на їх інтенсивності. Для високих порядків (наприклад, у напрямі $D1$ перекриваються $\{+1\}$ порядок від E_1 та $\{+2\}$ порядок від E_2) результат перекриття може бути неоднозначним і залежить від характеристик реєструючого матеріалу. Сумарна інтенсивність у цих порядках дифракції буде залежати від того динамічним чи статичним є характер відгуку матеріалу, локальна чи нелокальна ґратка формується у процесі запису. Тобто, характер кінетики інтенсивності високих дифракційних порядків для записуючих пучків визначається особливостями оптичного відгуку досліджуваного матеріалу.

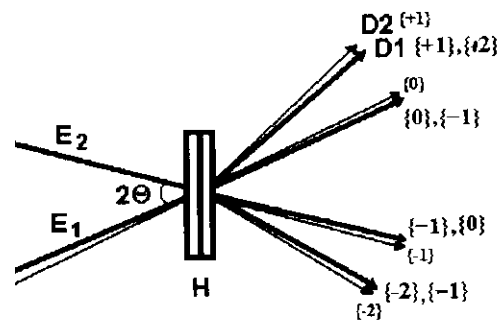


Рис. 1.12. Розподіл порядків при дифракції на тонкій голограмі [102].

В процесі досліджень за допомогою цифрового запам'ятовуючого осцилографа TDS2014 (Tektronix) фіксувалася кінетика зміни інтенсивності для першого та нульового порядку на дифракційній картині для пробного та

одного записуючого пучка. Для роботи фотоприймачів у лінійному режимі інтенсивності пучків зменшувалися набором каліброваних фільтрів. У каналі першого порядку дифракції пробного пучка використовувався двадцятикратний підсилювач сигналу. Для розрахунків інтенсивності записуючого пучка та падаючого пробного пучка визначалися за допомогою заміни плівки БР на порожню підкладку. Оцінка дифракційної ефективності проводилась за допомогою ділення інтенсивності дифрагованого пробного пучка на інтенсивність пробного пучка, що падає на плівку. Дослідження проводились для світлоадаптованих плівок. Світлова адаптація забезпечувалась при освітленні плівки одним з записуючих пучків на протязі певного часу [102].

Висновки до розділу 1

1. Аналіз літературних даних показав, що БР поєднує в собі функції які еволюція оптимізувала протягом мільйонів років і які можуть ефективно використовуватися в сучасній техніці. Сучасна хімія та генна інженерія є потужними інструментами для модифікації цього матеріалу таким чином, щоб компенсувати його недоліки і не втратити переваги. У той же час біотехнологія спроможна виробляти технічні обсяги БР за конкурентною ціною. Таким чином, бактеріородопсин - це тестовий приклад нового підходу в області нанотехнологій, де сучасні біотехнології використовуються для виробництва функціональних елементів електроніки.

2. На основі проведеного літературного огляду встановлено, що на момент початку дисертаційного дослідження у науковій літературі не висвітлено або ж висвітлено в недостатній мірі такі питання, як вплив штаму галобактерій на оптичні характеристики БР, залежність характеристик плівок від типу матриці та методики отримання, впливу аміаку та вологості на оптичні параметри плівок БР у різних матрицях тощо.

РОЗДІЛ 2. ФІЗИКО-ТЕХНОЛОГІЧНІ УМОВИ СТВОРЕННЯ ТОНКОПЛІВКОВИХ СТРУКТУР НА ОСНОВІ БР

2.1. Оптимізація методики культивуації галобактерій та виділення й очищення БР

Молекула бактеріородопсину представляє собою стабільний, ефективний і досить простий перетворювач світлової енергії. Механізм функціонування цього білку та перспективи його практичного використання активно досліджуються рядом колективів як в Україні, так і за кордоном. Тому постає питання оптимізації та модифікації методик вирощування галобактерій, очистки безпосередньо бактеріородопсину та зміни його характеристик у заданому напрямку. Системно розглянувши ці питання, можна виділити декілька основних підходів, використання яких дозволить впливати на продуктивність та характеристики отриманого матеріалу, а саме: модифікація та оптимізація методики вирощування *Halobacterium salinarium*; оптимізація методики виділення та очистки білка; модифікація структури та складу амінокислотної послідовності методами генної інженерії; поєднання декількох з вищенаведених методів. Важливим етапом, який суттєво впливає на характеристики БР у конкретному приладі, є також методика отримання функціональних елементів на його основі. На параметри таких елементів буде впливати тип та характеристики використаної матриці, хімічний склад, методика отримання тощо.

У ході досліджень нами було проведено низку різноманітних заходів, спрямованих на модифікацію методів отримання БР за допомогою підбору оптимальних умов культивування галобактерій та очистки БР [013, 104]. Також було проведено дослідження впливу типу матриці, методики підготовки плівкоутворюючої суміші, методики нанесення на характеристики отриманих плівкових покриттів. Дослідження показали, що продуктивність отримання залежить від умов та методики культивуації, а фотохромні властивості плівок на основі БР залежать як від штаму

мікроорганізмів, так і від методики виділення та очистки білка. Властивості плівок можна змінювати в потрібному напрямку, коригуючи їх хімічний склад та методику отримання.

Спектральні особливості різних штамів галобактерій. Технологія вирощування *Halobacterium salinarum* різних штамів була налагоджена за відомою методикою (див. додаток А).

Особливістю спектрів поглинання галобактерій є наявність піку поглинання в області 570 нм, який відповідає максимуму смуги поглинання БР. Дана особливість спектру може бути використана для ідентифікації галобактерій, що містять БР. Крім того, достовірність ідентифікації може підтверджуватися наявністю піків поглинання, характерних для інших речовин, наявних у клітинах галофілів. Експресність даної методики дозволяє використовувати її для контролю за змінами оптичних параметрів біомаси галофільних бактерій у процесі вирощування і оптимізації технологічних параметрів процесу культивування. Крім того, по інтенсивності поглинання на 570 нм, яке залежить від концентрації БР у галофілах, можна проводити кількісні оцінки параметрів росту.

На рис 2.1. наведено спектри оптичної густини для лізатів різних штамів галофільних мікроорганізмів, наявних у музеї штамів УжНУ. З отриманих спектрів видно, що у кожного штаму спостерігається різний за величиною пік в околі 570 нм. Відмінності у інтенсивності поглинання можна пояснити тим, що мембрани бактерій різних штамів відрізняються за кількістю молекул БР, тобто характеризуються різною продуктивністю по виробництву БР. З спектрів також видно, що для лізатів різних штамів спостерігаються значні відмінності у інтенсивності поглинання в області 475-525 нм. Це зумовлено наявністю та кількістю каротиноїдів у мікроорганізмах. Оскільки за масою каротиноїди подібні до БР, то при очистці білку одна з найскладніших задач полягає у відділенні фрагментів ПМ від каротиноїдів. Тому для культивування перевагу віддають малокаротиноїдним штамам.

Так, штам 353П високопродуктивний стосовно виробництва БР, у той же час він містить велику кількість каротиноїдів. Аналогічна ситуація для дикого штаму (WT), який характеризується значним вмістом БР при великій кількості каротиноїдів, про що свідчить наявність смуги поглинання в області 570 нм, яка відповідає смугі поглинання БР, і сильне поглинання в області 450-550 нм, де знаходяться лінії поглинання каротиноїдів. У той же час для малокаротиноїдного штаму R₁M₁ поглинання в області 400-500 нм набагато менше, однак і оптична густина в області поглинання БР має менше значення. Враховуючи дані, отримані в результаті досліджень спектральних характеристик лізатів різних штамів галобактерій, можемо зробити висновок, що незважаючи на велику кількість БР у мікроорганізмах таких штамів як С6, RmR та WT, для практичного отримання БР більше підходять малокаротиноїдні штами такі, як R1M1 та ET1001. Менша кількість білку в мікроорганізмах компенсується за рахунок зменшення втрат матеріалу, що виникають при проведенні додаткових етапів очистки для видалення каротиноїдів.

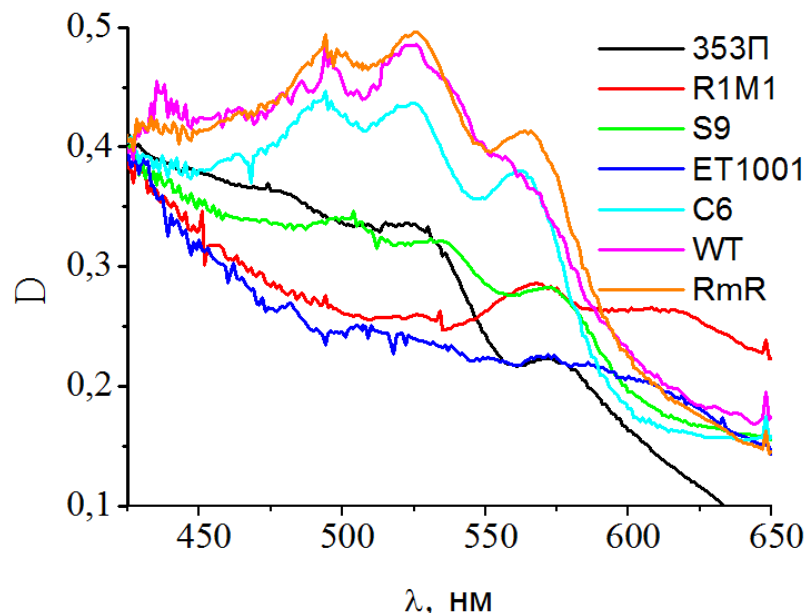


Рис 2.1. Спектри поглинання лізатів різних штамів галобактерій.

Наявність смуги поглинання в області 570 нм у лізаті або культурі мікроорганізмів свідчить про наявність БР. Оскільки даний білок

продукується лише галобактеріями, за наявності даного піку ми можемо ідентифікувати мікроорганізми даного типу. Відмінність у співвідношенні інтенсивностей поглинання у різних спектральних областях, при культивуванні в однакових умовах, для лізатів галобактерій різних штамів може дозволити проводити попередню ідентифікацію мікроорганізмів на предмет приналежності до того чи іншого штаму.

Очистка БР проводиться у декілька етапів, які передбачають центрифугування при різних швидкостях з метою відділити ПМ від фрагментів клітинної стінки та залишків внутрішніх частин бактерії. Основним параметром у такому випадку виступає розподіл фракцій за масою, хоча є роботи, які передбачають можливість виділення ПМ з лізату за допомогою двофазних систем, коли основним фактором для розділення виступають специфічні властивості поверхні ПМ, а не їх маса [105, 106]. Використання для очистки маси ПМ, як основної характеристики, приводить до того, що залишкові фрагменти бактерії, подібні за масою до ПМ, при центрифугуванні будуть осаджуватися разом з ПМ. Така ситуація приводить до того, що властивості отриманого БР будуть залежати від того, з якого штаму і яким чином він був отриманий. Для проведення таких досліджень БР у формі ПМ був виділений з галобактерій штамів 353П, S9, R₁M₁ та ET1001. Вирощування, очистка та виділення БР проводилося при однакових умовах згідно стандартної методики [107]. Для оцінки характеристик отриманого БР проводилися дослідження плівок на його основі. Плівки на скляних підкладках одержували із суспензії ПМ з оптичною густиною в межах 30 – 35 (концентрація БР при цьому складала 14.5 кг/м³) методом поливу згідно методики, описаної в [55]. Як матрицю використовували фотографічну желатину марки SIGMA. Дослідження отриманих плівкових структур та розрахунок їх характеристик проводився згідно методики, описаної в [48]. Для порівняльної оцінки різних плівок БР проводили розрахунок наступних характеристик: сенситометричної чутливості на довжинах хвиль 570 нм (S₅₇₀) та 412 нм (S₄₁₂), напівперіоду життя інтермедіату M₄₁₂ (τ_{12}^{412}), діапазону

фотоіндукованих змін оптичної густини для 570 нм та 412 нм (ΔD_{570} , ΔD_{412}) та коефіцієнту участі молекул БР у фотоциклі (k). Розрахунок значення фотоіндуковані зміни оптичної густини (ΔD) плівкових структур на основі БР проводять за вимірними значеннями коефіцієнтів пропускання, які визначають після 150 секунд освітлення збуджуючим випромінюванням згідно формули:

$$\Delta D = \log \frac{T_0}{T_{150}}, \quad (2.1)$$

де T_0 - коефіцієнт пропускання до освітлення, T_{150} - коефіцієнт пропускання через 150 с освітлення. Коефіцієнт участі молекул БР у фотоциклі розраховується як відношення ΔD_{412} до оптичної густини на 570 нм і характеризує відсоток молекул в яких виникають фотоіндуковані зміни.

Визначення монохроматичної сенситометричної чутливості проводять згідно ГОСТ 10691.2-84 по формулі:

$$S = \frac{0.8}{P \cdot t}, \quad (2.2)$$

де P - густина потужності збуджуючого випромінювання, t - час зміни оптичної густини на $(D_0+0.1)$, вважаючи D_0 - значенням оптичної густини до освітлення.

Фізичний зміст напівперіоду життя інтермедіату M_{412} - це час, за який половина молекул релаксує з проміжного інтермедіату M_{412} в основний стан при відсутності зовнішнього освітлення. Розрахунок $\tau_{1/2}^{412}$ проводиться з кривих зміни пропускання після зняття зовнішнього освітлення і визначається як час від моменту вимкнення освітлення до моменту коли ΔT_{570} досягає 50% від максимального значення. Даний параметр дозволяє зробити висновки про зміни у проходженні фотоциклу.

Результати досліджень наведено в таблиці 2.1. Як видно з результатів, різні характеристики плівок досить суттєво відрізняються у залежності від того з якого штаму був отриманий БР. Так БР отриманий з штаму 353П характеризується високою сенситометричною чутливістю та максимальним

часом життя інтермедіату M_{412} . Тому такі плівки можна використовувати для запису та зберігання інформації. У той же час для плівок, отриманих а основі БР, виділеного з штаму R_1M_1 , при достатньо високій сенситометричній чутливості час життя інтермедіату M_{412} мінімальний. Відповідно, такого типу матеріали доцільніше використовувати для детектування та комутації світлових потоків.

Таблиця 2.1

Характеристики плівок БР, отриманого з різних штамів.

Тип штаму	Оптичні параметри					
	ΔD_{570}	ΔD_{412}	k, %	S_{570} , см ² /Дж	S_{412} , см ² /Дж	τ_{12}^{412} , с
353-П	0,85	0,49	56	485	165	88
ET-1001	0,38	0,21	28	296	96	39
R_1M_1	0,41	0,26	30	395	84	14
S-9	0,57	0,36	56	258	145	79

Отже, для отримання оптимальних характеристик при розробці функціональних біоматеріалів на основі БР, у кожному конкретному випадку необхідно окрім продуктивності штаму враховувати й функціональні особливості отриманого БР.

Модифікація методики вирощування галобактерій за допомогою оптимізації спектрального складу освітлення. Життєдіяльність галобактерій залежить від різних умов [108, 109] і у значній мірі від освітлення. Для оптимізації методики культивування галобактерій з метою підвищення продуктивності отримання БР, були проведені експериментальні дослідження, пов'язані з вивченням впливу спектрального складу світла, що використовується для освітлення культури галофілів, на процес росту клітин штамів ET 1001 і RmR Halobacterium salinarium та утворення у них БР.

Освітлення кювет з поживним середовищем проводили лампами марки Philips з різними спектральними характеристиками, а саме: зелена - Spotline R63 ($\lambda_{\max} = 533$ нм), біла - Spotline ($\lambda_{\max} = 543$ нм) та синя - Spotline R63

($\lambda_{\max}=493$ нм). Спектри випромінювання ламп наведено на рис. 2.2. Культивування припиняли при досягненні оптичної густини середовища 1.0.

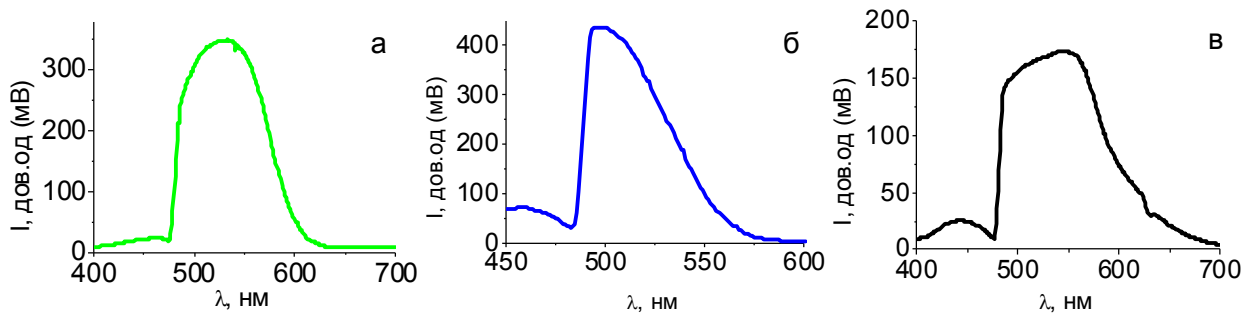


Рис. 2.2. Спектри випромінювання ламп: а - зелена, б - синя, в - біла.

Криві росту клітин штамів ET1001 і RmR, вирощуваних при освітленні різними лампами, практично не відрізнялись, але отримані лізати клітин виявились не однаково пігментованими. Найбільш чітко різниця у пігментації проявляється у спектрах поглинання лізатів клітин. Смуга поглинання в області 570 нм свідчить про наявність БР у суспензії, в той же час різна величина оптичної густини свідчить про різну його кількість. Спектри поглинання лізатів вимірювались за допомогою спектрофотометра СФ-46.

На рис. 2.3 (а) представлено спектри оптичної густини для лізатів штаму ET1001 *Halobacterium salinarium*, вирощеного при освітленні різними лампами. Добре видно, що в області довжини хвилі 570 нм сильніше всього поглинає лізат клітин, вирощених при освітленні зеленим світлом, менше - білим, а при освітленні синьою лампою утворення БР найменше для цього штаму. Отже, для штаму ET1001 оптимальним є культивування при освітленні зеленою лампою. На рис. 2.3 (б) наведено спектри оптичної густини лізату галофілів штаму RmR, вирощених при різному освітленні. На графіку видно, що максимальна оптична густина в області 570 нм спостерігається для лізату, вирощеного при освітленні білим світлом. У той же час при використанні синьої лампи, як і у випадку штаму ET1001, бактеріородопсину в лізаті набагато менше. Це означає, що максимальний

вихід БР для даного штаму можна отримати при використанні білого світла. Слід відмітити, що спектри суттєво відрізняються і за кількістю каротиноїдів.

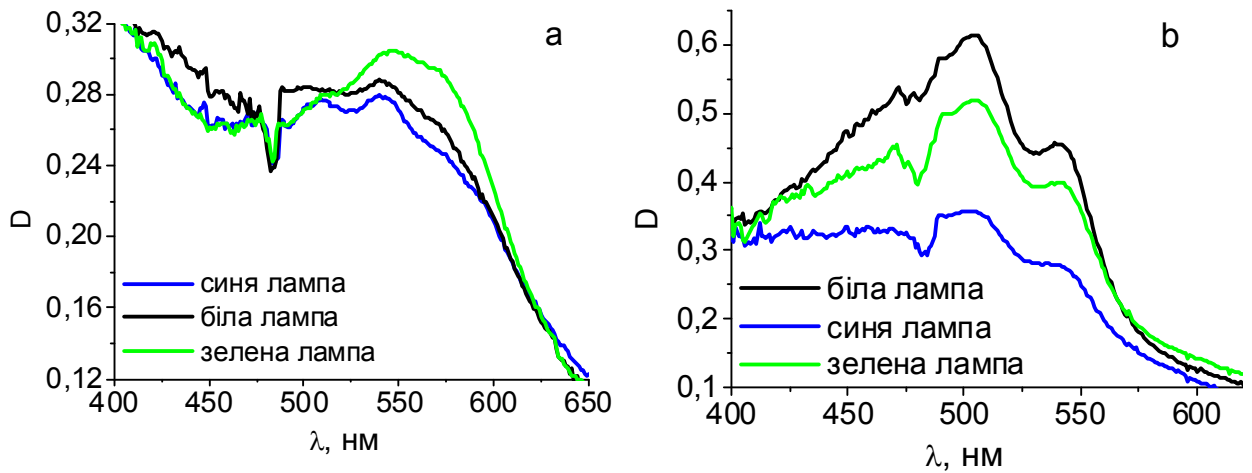


Рис 2.3. Спектри поглинання лізатів штаму ET1001 (а) та RmR (б)

H. Salinarium, вирощених при освітленні різними лампами.

Підсумовуючи наведені дані, можна зробити висновок, що не тільки інтенсивність а й спектральний склад освітлення, яке використовується при культивуванні галобактерій, впливає на активність росту мікроорганізмів та вироблення ними БР. Коригуючи спектральний склад освітлення для конкретного штаму, можна досягти збільшення продуктивності отримання бактеріородопсину.

Модифікація методики очистки БР за допомогою оптимізації часу обробки лізату ДНК-зою. На характеристики отриманого БР впливає його чистота, тобто кількість забруднюючих фрагментів бактерії, які не вдалося відділити на етапі очистки. Клітинна стінка бактерії руйнується при зменшенні концентрації солі, однак нитки ДНК зберігають цілісність і перешкоджають процесу очистки, збільшуючи в'язкість лізату. Для руйнування ДНК використовують дезоксирибонуклеазу (ДНК-зу). Для оптимізації методики очистки було проведено дослідження впливу часу обробки лізату ДНК-зою на якість отриманого БР.

В літературних джерелах приводять різні часи обробки лізату галобактерій ДНК-зою. Так, у роботі [107] проводять діаліз лізату

галобактерій з доданою ДНК-зою протягом ночі. Інші автори проводять обробку ферментом протягом 30 хвилин при активному перемішуванні [105]. Для дослідження впливу ДНК-зи на оптичні характеристики плівок використовували БР отриманий з штаму 353П. У даному випадку біомасу з кювети розділяли на три рівні частини, для кожної з яких змінювалася тривалість обробки лізату ферментом на етапі очистки. Після виділення та очистки БР, на його основі отримували плівки і проводили дослідження їх оптичних характеристик. Для проведення досліджень характеристик плівок використовували методику, описану в [48]. У таблиці 2.2. наведені оптичні параметри плівок бактеріородопсину, виділеного при 0.5, 3.0 та 20 годинах обробки лізату ДНК-зою. Обробка проводилася при постійному перемішуванні суспензії на магнітній мішалці. Як видно з результатів, час обробки ДНК-зою впливає на оптичні параметри плівок. При різних часах обробки спостерігаються зміни як чутливості так, і динаміки переходів між інтермедіатами фотоциклу.

Таблиця 2.2

Характеристики БР, отриманого при різних часах обробки лізату ДНК-зою.

Час обробки, год	Оптичні параметри				
	ΔD_{570}	ΔD_{412}	k, %	S_{570} , $\text{см}^2/\text{Дж}$	S_{412} , $\text{см}^2/\text{Дж}$
20 год.	0,52	0,29	26,5	365	111
3 год.	0,85	0,49	56	485	165
0,5 год.	0,44	0,25	27	385	88

З отриманих результатів видно, що оптимальними характеристиками володіють плівки, отримані при обробці лізату протягом трьох годин. Погіршення характеристик плівок, отриманих на основі БР, виділеного при довготривалій обробці лізату, може бути пов'язано з тим, що при великих часах обробки повне руйнування молекул ДНК приводить до утворення фрагментів подібних за масою до ПМ. Тому осаджена суспензія ПМ буде містити залишкові фрагменти ДНК, що буде приводити до погіршення чистоти виділеного БР та плівок на його основі. У випадку ж малих часів

обробки, неповне руйнування ДНК приводить до недостатнього зменшення в'язкості лізату і погіршення якості та виходу БР. Тому для поліпшення оптичних параметрів плівок час обробки ДНК-азою необхідно скоротити до оптимального значення, яке визначається процесом руйнування ДНК галофільних бактерій.

2.2. Методики отримання плівок на основі бактеріородопсину з використанням різних видів матриць

Технологічний процес отримання плівкових структур на основі органічних матеріалів має свої особливості. Вони зумовлені, у першу чергу, низьким рівнем критичних температур, при яких органічні речовини зберігають свої функціональні характеристики. По друге, великі маси молекул не дозволяють реалізувати стандартні методики нанесення шляхом випаровування, які широко використовуються для неорганічних речовин. У випадку БР, для покращення адгезії та оптичних властивостей плівок, а у деяких випадках для захисту фоточутливого матеріалу від впливу навколишнього середовища, використовують додаткові матеріали, які виконують роль матриці, в яку вкраплені фрагменти ПМ.

Процес отримання плівки, таким чином, складається з декількох етапів. По-перше, необхідно підібрати матеріал матриці, який водорозчинний, сумісний з БР, дозволяє отримати однорідні прозорі плівки з високою адгезією, потрібними механічними характеристиками та температурними режимами отримання. Одним з перших матеріалів, який був використаний для цього, була фотографічна желатина. Є методики, які дозволяють отримати плівки БР з використанням як матриці полівінілового спирту (ПВС), неорганічного золь-гельного скла, тощо. По-друге, підготувати плівкоутворюючу суміш, у яку входить матеріал матриці, суспензія ПМ та додаткові домішки, якщо вони потрібні. Наступний етап - процес безпосереднього нанесення плівкоутворюючої суміші на попередньо підготовлену підкладку. У залежності від того, якої товщини потрібно

плівку, використовують методи формування, поливу або центрифугування. Детально методики отримання плівок описані в додатку Б. Якщо критичним фактором є орієнтація ПМ, використовують методи електрофоретичного осадження або метод Ленгмюра-Блоджет. Останнім етапом є висушування отриманої плівки. Для різних типів матриць та методик нанесення використовують різні методи висушування плівок. Так, для плівок у желатинових матрицях оптимальним є режим висушування в ексікаторі при кімнатних температурах. В той же час при виготовленні плівок в матриці золь-гельного скла достатню оптичну якість можна отримати тільки при висушуванні у закритій чашці Петрі при температурі 4°C.

Отримання плівок БР з використанням полімерних матриць. Для отримання плівок БР в полімерних матрицях використовували фотографічну желатину та полівініловий спирт. Як желатина, так і полівініловий спирт, є водорозчинними, добре суміщаються з водною суспензією ПМ, дають оптично прозорі покриття, змочують поверхню підкладки, легко та рівномірно розподіляються на очищеній поверхні скла.

БР отримували зі штаму 353П у вигляді фрагментів пурпурних мембран за стандартними методиками [107]. Співвідношення білок/ліпіди в пурпурних мембранах становило 3:1 (молекулярна вага) та 1:10 (кількість молекул). Плівкові структури виготовлялись із суспензій ПМ з оптичною густиною в межах 30 – 35 (концентрація ПМ при цьому складає (12.4 – 14.5 кг/м³). Безпосередньо перед використанням суспензію ПМ ретельного перемішували на магнітній мішалці протягом 1 години. У випадку використання ліофілізованого БР, суспензію фрагментів пурпурних мембран (14 мг ліофілізованого порошку/мл) отримували вимочуючи протягом 20 хв, а потім розмішували протягом 6 годин в дистильованій воді. Для отримання водного розчину желатини або полівінілового спирту порошок відповідної речовини попередньо вимочували в дистильованій воді протягом 20 хв. Потім суміш підігрівали до 60°C і неперервно перемішували протягом 30-40 хвилин. Залежно від кількості використаної води, отримують розчин

відповідної концентрації. Для виготовлення плівок використовували розчини з концентрацією в межах 6-10% за вагою.

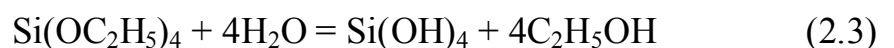
З метою отримання хімічно модифікованих плівок БР, крім плівкоутворюючих речовин, концентрація яких знаходиться в межах від 3 до 18 %, можна використовувати різні фотосенсибілізуючі речовини. При цьому БР зберігає свої спектральні характеристики [87]. Обов'язковим критерієм при виборі сенсibiliзуючих речовин є їх розчинність у воді, оскільки при одержанні плівок БР використовується водна суспензія ПМ [2, 87]. Змішування суспензії ПМ, розчинів желатини та сенсibiliзуючих речовин у відповідному співвідношенні проводили протягом 15 -20 хвилин на магнітній мішалці в ексікаторі в двостінній посудині, конструкція якої забезпечувала циркуляцію термостатованої при 305 К води. Для видалення маленьких бульбашок з плівкоутворюючої суміші з ексікатору викачували повітря (до моменту інтенсивної появи піни на поверхні суміші). Підготовлену таким чином суміш у кількості 0.2 – 0.5 мл на 5 см² використовували для одержання полімерних плівок БР методами, описаними у додатку Б.

Використання желатини та ПВС у ролі основних матеріалів для впровадження БР у полімерну плівку дозволило отримати однорідні плівки з високою оптичною якістю, яка визначається за відношенням величини поглинання на 280 нм до величини поглинання на 570 нм. Дана величина повинна складати 1:25 [110, 111]. Це відношення вказує на те, що плівка демонструє високу прозорість при низькому розсіюванні світла. Включення до складу плівок певних хімічних домішок, в різних комбінаціях, дозволяє впливати на фоточутливість та часові характеристики фотоциклу в широких діапазонах значень [87]. Додатки можуть забезпечувати покращення хімічної чутливості та селективності плівок БР.

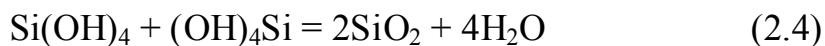
Отримання плівок БР в неорганічних матрицях. За останні роки зріс інтерес до використання золь-гельних стекел як матриць для формування композитних структур з ферментами та білками [110-121]. Золь-гельний процес – це низькотемпературна технологія для виробництва неорганічних

матеріалів шляхом гідролізу і поліконденсації лужних оксидів. Золь-гельні покриття недорогі, також вони мають декілька переваг над органічними полімерами, таких як механічна міцність, хімічна інертність та водонерозчинність. Ферменти та білки, які відбираються для інкапсулювання за допомогою згаданої золь-гельної процедури, повинні бути розчинні у воді і порівняно стійкі до денатурації спиртом, який виділяється під час підготовки золь-гелю. У літературі згадується можливість впровадження в золь-гельне скло білків [112, 114], тому дана методика може бути використана для інкапсулювання БР. Процес формування кремнеземних аерогелів включає два основні етапи: формування вологого гелю та його висушування. Для одержання аерогелів у більшості золь-гельних методик як вихідні матеріали використовуються різні тетраалкоксисилікати з низькою молекулярною вагою, такі як тетраметилортосилікат (ТМОС) і тетраетилортосилікат (ТЕОС). Однак, враховуючи високу токсичність ТМОС, при виготовленні кремнеземних аерогелів переважно використовують ТЕОС, хоча аерогелі, виготовлені з застосуванням ТЕОС у присутності кислого каталізатора, часто мають певні недоліки, такі як більш тривалий час гелеутворення (мінімум 2-3 дні), більша усадка (до 30%), низьке оптичне пропускання (до 65%) і вища густина ($\sim 0,2 \text{ г/см}^3$) [115].

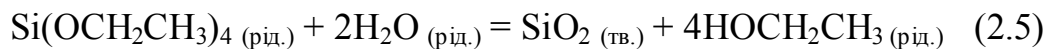
Зазвичай, при проведенні золь-гель процесу вихідні алкоксиди розчиняють у спорідненому спирті, після чого проводять гідроліз, додаючи воду. При цьому відбувається заміна алкоксидних лігандів на гідроксильні. Так, гідроліз тетраетилортосилікату проводиться у присутності кислого каталізатора згідно такого рівняння реакції :



Процес конденсації проходить за участі гідроксильних лігандів з утворенням олігомерів або полімерів, що містять *Si-O-Si* та *Si-μ(OH)-Si* зв'язки. Цей процес відбувається з додаванням лужного каталізатора відповідно до наступного рівняння реакції:



Збалансоване хімічне рівняння для формування силікагелю з ТЕОС має вигляд:



Густина отриманого кремнеземного аерогелю залежить від концентрації мономерів алкоголяту кремнію в розчині. Необхідно відзначити, що стехіометрія реакції вимагає наявності двох молів води на моль ТЕОС. На практиці ця кількість води веде до неповної реакції та до утворення мутних аерогелів. Тому в рецептах більшості аерогелів використовується більша кількість води, ніж необхідна згідно збалансованого рівняння реакції (від 4 до 30 еквівалентів).

Кінетика вищезгаданої реакції відчутно повільна при кімнатній температурі, тому часто потрібно декілька днів, щоб досягти її завершення. Для збільшення швидкості реакції додають кислі або лужні каталізатори. Кількість та тип каталізатора, що використовується, відіграє основну роль у формуванні мікроструктури кінцевого аерогельного продукту. Кислотним каталізатором може бути довільна кислота, наприклад, HCl . У каталізі з використанням лугу зазвичай використовують аміак, частіше аміак і фтористий амоній або буферні розчини з лужним рН. Коли золь досягає точки гелю, часто припускають, що гідроліз і реакції конденсації реагенту алкоголята кремнію завершені. Це далеко не так. Точка гелю лише представляє момент, коли полімерні зразки кремнію поширюються в контейнері, що містить золь. У цій точці кремнієвий кістяк гелю містить значну кількість непрореагованих алкоголятних груп. У дійсності, гідроліз і конденсація можуть продовжуватися набагато довше, ніж необхідно для гелеутворення. Для зміцнення структури кремнію необхідний значний час. При цьому всі етапи старіння гелю контролюються дифузією. На дифузію, в свою чергу, впливає товщина шару гелю. Отже, час, необхідний для кожного

етапу обробки, сильно збільшується при збільшенні товщини шару гелю. На практиці це обмежує виробництво аерогелів до товщини шарів 1-2 см.

Таким чином, фізико-хімічні властивості золь-гельних плівкових структур визначаються вихідними умовами приготування та, безперечно, зазнають певних змін під час старіння. При внесенні фрагментів ПМ у розчин прекурсорів, гідроліз та конденсація тетраалкосиланів під час золь-гельного процесу сприяють формуванню твердої силікатної матриці навколо ПМ [122]. БР зберігає свої характерні оптичні властивості при впровадженні його до кремнієвого скла в ході золь-гельного процесу [110, 113, 123], тому цей процес можна використати для виготовлення чутливих елементів для біосенсорного застосування [124, 125]. Підготовка сухих плівок на основі БР з високою оптичною якістю суттєво розширює можливості застосування БР для виготовлення чутливих елементів інтегрально- та волоконно-оптичних сенсорів.

Використовуючи золь-гельну технологію, у полістироловій пробірці при кімнатній температурі була підготовлена плівкоутворююча суміш (ТЕОС, H_2O , C_2H_5OH , HCl). Потрібно зазначити, що для запобігання денатурації світлочутливого білку, загальний рН золь-гельного розчину дорівнював $\sim 6,0$. Після приготування, суміш обробляли ультразвуком на протязі 1 год., додавали водну суспензію БР і залишали золь-гель при кімнатній температурі на 2-3 години. Ця методика дає можливість отримати об'ємні зразки високої оптичної якості (рис. 2.4) [122].

Однорідні плівки отримували методом поливу, використовуючи золь-гель (ТЕОС, H_2O , HCl) з додаванням суспензії БР у боратному буферному розчині при рН=9. Спочатку суміш ТЕОС, H_2O , HCl обробляли ультразвуком протягом 20 хв. у водяній бані з льодом. Після цього до неї додавали дистильовану воду у співвідношенні 1:1 і перемішували на магнітній мішалці. Потім відбирали 0,5 мл суміші, додавали 0,25 мл буферного розчину та 0,2 мл водної суспензії БР. Для того, щоб отримати плівки різної товщини, на підкладки однакового розміру наносили різну кількість плівкоутворюючої

суміші. Процес висихання тривав 7 днів у закритій чашці Петрі при температурі $4\text{ }^{\circ}\text{C}$ (рис. 2.5, а). Ця методика була взята за основу при виготовленні хімічно модифікованих золь-гельних плівок на основі БР. Коли при виготовленні золь-гельних плівок замість буферного розчину з лужним рН використали буфер з рН=6, утворювалася неоднорідна за кольором плівка (рис. 2.5, б). Очевидно, в кислому середовищі (при використанні як каталізатора HCl) деяка частина молекул БР губить хромофор, що приводить до зміни забарвлення плівки. Якщо методом поливу нанести на підкладку суміш золь-гелю з БР вищенаведеного складу і проводити висушування при кімнатній температурі, спостерігається суттєва зміна поверхні плівки під час старіння. Внутрішні напруги, які виникають під час усадки, приводять до появи тріщин по всій поверхні плівки (рис. 2.6, а).

Додавання триетаноламіну у плівку приводить до утворення кристалічних вкраплень (рис. 2.6, б), та ділянок, де плівка зберігає однорідність навіть при висушуванні у кімнатних умовах. І хоча причина такої поведінки поки нами не з'ясована і потребує детальних досліджень, можна зробити висновок що за допомогою модифікації хімічного складу плівкоутворюючої суміші можна отримати золь-гельні плівки покращеної оптичної якості.

Підтвердженням того факту, що БР зберігає функціональність, є наявність смуги поглинання на 570 нм та наявність фотоіндукованих змін пропускання з утворенням смуги на 410 нм. Тому вплив інкапсуляції на оптичні параметри БР контролювався за допомогою оптичної спектроскопії під час формування гелю. Порівняння спектру пропускання БР (рис. 2.7) у рідкому розчині золь-гелю (а) та сухій плівці (б) показує, що форма смуги пропускання не зазнала змін, звідки можна зробити висновок, що спектроскопічні властивості білка зберігаються під час формування скла



Рис. 2.4. Золь-гельне скло з інкапсульованим БР.

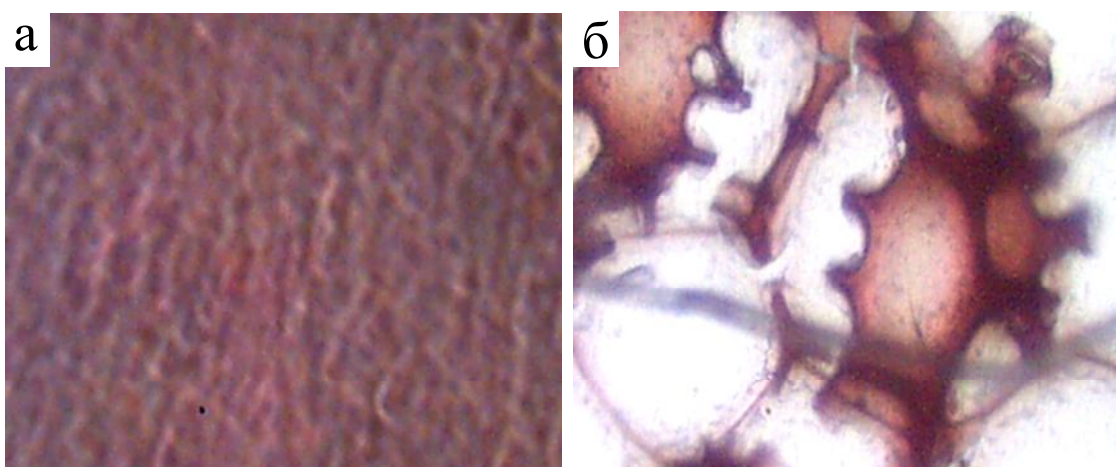


Рис. 2.5. Мікроскопічний знімок поверхні плівки БР, інкапсульованого в золь-гельну матрицю: а) при рН=9, б) при рН=6. (Збільшення 1200).

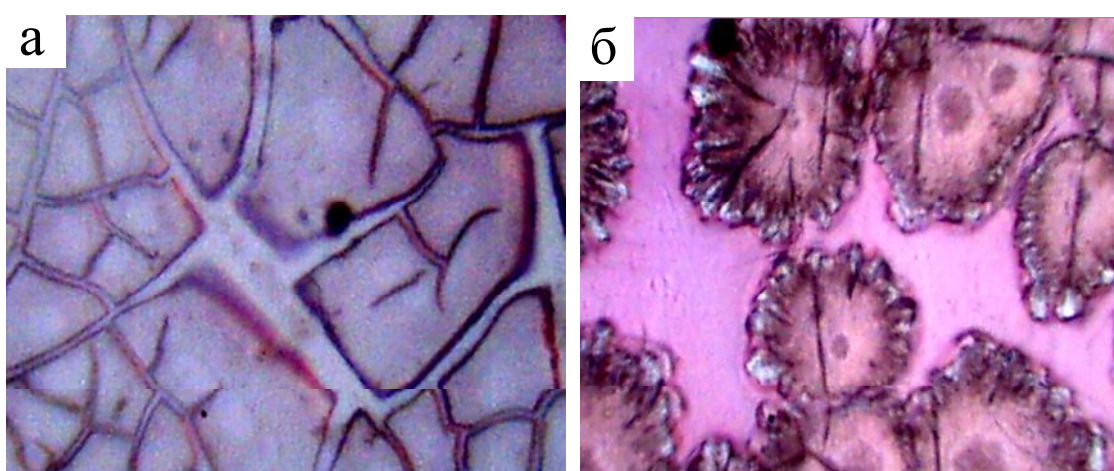


Рис. 2.6. Мікроскопічний знімок поверхні плівки БР, інкапсульованого в золь-гельну матрицю: а) - без домішок, б) з домішкою ТЕА. Висушування - при кімнатній температурі. (Збільшення 1200)

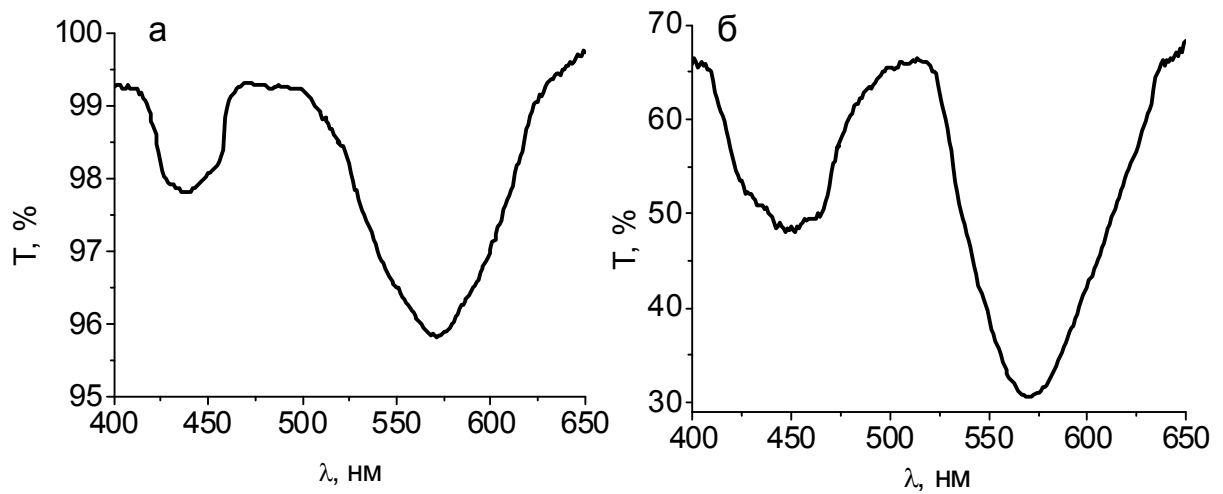


Рис. 2.7. Спектр пропускання суспензії ПМ у рідкому золь-гелі (а), та у золь-гельній матриці на 8 день після висушування (б).

Для вивчення впливу інкапсуляції на динаміку проходження фотоциклу БР у золь-гельному склі, ми спостерігали за кінетикою релаксації M_{412} під час формування гелю. На рис. 2.8 наведено кінетику зміни пропускання на 412 нм, яка спричинена розпадом M_{412} при знятті зовнішньої засвітки для БР у рідкому золь-гелі (а) і на 8 день після висушування (б). Напівперіод життя інтермедіату M_{412} для БР у рідкому золь-гелі $\tau_{1/2}=29$ с, а для плівки після висушування $\tau_{1/2}=35$ с. Збільшення напівперіоду життя інтермедіату M_{412} характерне при утворенні плівок і виникає за рахунок зменшенням гідратації БР при висушуванні і узгоджується з [110].

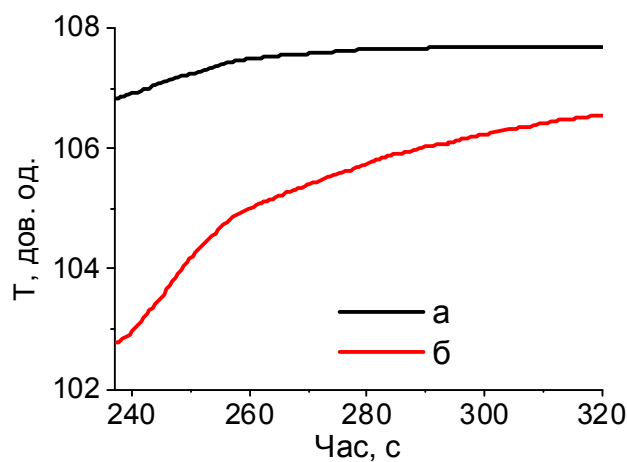


Рис. 2.8. Кінетика релаксації М-інтермедіату в фотоциклі БР у рідкому золь-гелі (а) і на 8 день після висушування (б).

Підсумовуючи результати досліджень, можна зробити висновок, що дотримуючись методики, описаної вище, можна отримати як об'ємні, так і плівкові зразки задовільної оптичної якості, і хоча за оптичними показниками такі плівки поступаються желатиновим, вони мають ряд переваг, зокрема, водонерозчинність та високу пористість. У таких матеріалах БР інкапсульований у золь-гельне скло, при чому утворення кремнеземної скляної матриці не впливає ні на загальну структуру та властивості БР, ні на локальну структуру хромофору в білку.

Вплив ультразвукової обробки суспензії на характеристики плівок БР. Слід відмітити, що суттєву роль у підготовці плівкоутворюючих матеріалів на основі БР відіграє якість суспензії ПМ. При нанесенні плівок з використанням суспензії ПМ, яка зберігається протягом певного часу в холодильнику або морозильній камері, спостерігається значне збільшення коефіцієнта розсіювання (більше 0,8) в отриманих плівках. Дослідження поверхні плівок за допомогою АСМ показали, що збільшення коефіцієнту розсіювання відбувається за рахунок об'єднання окремих пурпурних мембран у конгломерати (рис. 2.9). Експериментально встановлено, що додаткова обробка суспензії БР ультразвуком перед нанесенням або в процесі додавання матеріалу матриці чи фотосенсибілізуючих домішок приводить до розділення конгломератів на окремі ПМ (див. рис. 2.9).

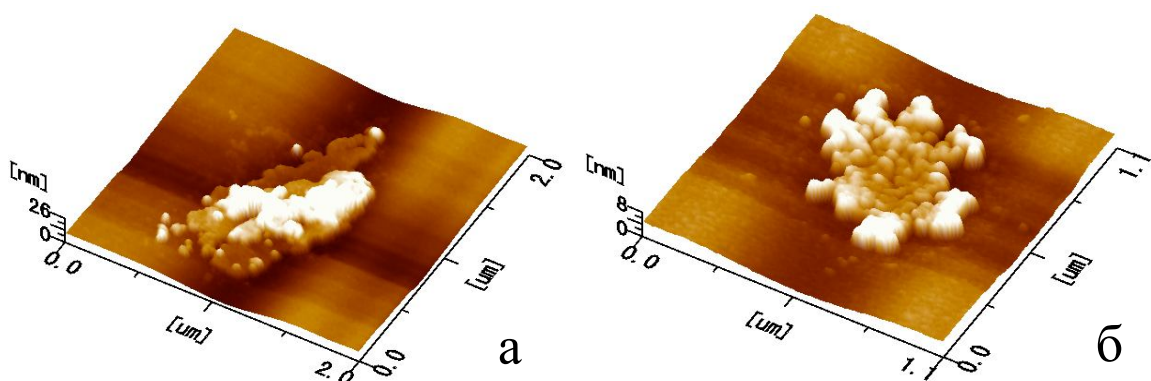


Рис. 2.9. Скупчення окремих ПМ при довготривалому зберіганні суспензії (а) та окрема пурпурна мембрана після УЗ-обробки (б).

В той же час довготривала обробка суспензії ультразвуком приводить до руйнування ПМ та денатурації білка. Тому було проведено дослідження впливу ультразвуку на оптичні властивості плівок на основі БР. Обробка ультразвуком проводилася в декількох різних режимах та протягом різного часу. Результати досліджень представлені в таблиці 2.3.

Таблиця 2.3

Характеристики плівок БР, отриманих при різних часах та режимах УЗ-обробки плівкоутворюючої суміші.

Режим обробки УЗ	Час обробки УЗ, с	ΔD_{570}	ΔD_{412}	k, %	$S_{570}, \text{см}^2/\text{Дж}$	$S_{412}, \text{см}^2/\text{Дж}$
1	30	0,202	0,128	20,2	77,0	6,0
1	120	0,200	0,108	17,2	78,0	7,0
1	210	0,189	0,104	16,0	60,0	5,5
2	30	0,228	0,138	23,8	84,0	5,3
2	120	0,261	0,160	36,6	128,0	10,3
2	210	0,247	0,159	23,9	83,6	6,5
3	30	0,279	0,175	36,2	108,3	36,6
3	120	0,301	0,190	39,0	128,0	37,0
3	210	0,265	0,169	32,1	96,2	28,1

Примітка: режим 1 – обробка ультразвуком плівкоутворюючої суміші, яка містить БР, матрицю і сенсibiliзуючі домішки; режим 2 – обробка ультразвуком суспензії бактеріородопсину і желатинової матриці; режим 3 – обробка ультразвуком суспензії бактеріородопсину без матриці і сенсibiliзуючих домішок;

Як видно з результатів, обробка ультразвуком суміші, що включає всі компоненти, приводить до зменшення сенситометричної чутливості та інтенсивності фотоіндукованих змін при збільшенні часу обробки. Якщо обробку суспензії проводити перед додаванням сенсibiliзуючих добавок, то фоточутливість плівки покращується. Максимальні показники реєструються при обробці суспензії протягом 120 с. Збільшення часу обробки до 210 секунд приводить до значного зменшення коефіцієнту участі молекул БР у фотоциклі та зменшення інтенсивності фотоіндукованих змін у плівці. Найкращі показники фотоактивності реєструються для плівок, отриманих у випадку, коли ультразвуковій обробці піддавалася суспензія ПМ, після чого

до неї додавався матеріал матриці та сенсibiliзуючі домішки. Максимальні значення фотоактивності плівки, як і в попередньому випадку, реєструються для плівок з часом обробки 120 с.

Таким чином, для покращення оптичних характеристик та фоточутливості плівок необхідно проводити обробку ультразвуком суспензії ПМ протягом 120 с. Як показала практика, навіть при таких незначних часах обробки ультразвуком частина ПМ руйнується. Для видалення фрагментів зруйнованих ПМ, після УЗ-обробки суспензії, доцільно проводити додаткову очистку за допомогою центрифугування, хоча до суттєвого покращення характеристик плівок це не приводить.

2.3. Вплив хіміко-технологічних умов отримання на морфологію поверхні і перерізу плівкових матеріалів на основі бактеріородопсину

Фізичні властивості плівкових матеріалів суттєво залежать від хімічного складу, структури, пористості та однорідності вказаних характеристик по всьому об'єму плівки. У свою чергу, на перераховані характеристики впливає тип підкладки, методика підготовки плівкоутворюючої суміші, методика нанесення та висушування самої плівки. Тому постає питання дослідження впливу методики отримання та хімічного складу плівок на морфологію їх поверхні та перерізу.

Дослідження морфології поверхні та перерізу плівок проводилось з використанням растрового електронного мікроскопу S-5200 (Hitachi), з роздільною здатністю 0.5 нм. Аналіз поверхні плівок проводився атомно-силовими мікроскопами JSPM-5210 (Jeol) та Dimension Icon AFM with Scan Asyst (Veeco). Дослідження пористості плівкових структур проводилося з використанням установки Sorptomatic-1990. Методики досліджень детально описані в підрозділі 1.4. Для проведення досліджень з допомогою РЕМ та АСМ зразки плівок БР були нанесені на скляні підкладки площею 25 мм², розміри яких відповідають розмірам тримачів зразків відповідних установок.

Морфологія поверхні та перерізу плівок БР без матриці. Отримати плівки на основі БР можна на різних матеріалах. Але оскільки найбільш цікавими є оптичні характеристики БР, то однією з найперших вимог до підкладки є її прозорість у видимому оптичному діапазоні. У нашій лабораторії для підкладок використовували силікатне скло, оргскло, слюду та кварц. Технологічно найпростіше отримати якісні плівки на скляних підкладках. Такі зразки можна отримати потрібної форми та розміру, вони зручні для проведення досліджень. Для підкладок використовували оксидне покривне скло з товщинами 0,5 та 2,0 мм. Оскільки на адгезію та характеристики плівок впливає стан поверхні використовуваних підкладок, проведено їх дослідження за допомогою АСМ. З отриманих результатів (рис. 2.10) видно, що шорсткості підкладок і максимальні перепади по висоті (R_{max}) є низькими а поверхня однорідною. Різниця в величині шорсткості для досліджуваних підкладок незначна і, скоріш за все, викликана технологією їх отримання. У переважній більшості випадків для отримання плівкових структур використовувались скляні підкладки із покривного оптичного скла товщиною 2 мм. Хоча такі підкладки мають дещо більшу шорсткість, вони менш крихкі і з ними зручніше працювати.

Плівки "чистого" БР осаджувались на скляні підкладки за рахунок висихання водної суспензії ПМ. Для таких плівок характерні низькі адгезійні та когезійні властивості та значна оптична неоднорідність. Вивчення морфології їх поверхні за допомогою растрової електронної мікроскопії (рис. 2.11), показало, що плівки є рихлими, фрагменти пурпурних мембран при висушуванні збираються в значні за розмірами конгломерати (а), які в переважній більшості лежать паралельно підкладці (б). На окремих "великих", з площею більше 10 мкм², фрагментах пурпурних мембрани осаджені більш мілкі (в), що створює значні неоднорідності поверхні. Дослідження морфології поверхні за допомогою атомно-силової мікроскопії показало, що для плівки чистого БР шорсткість поверхні зростає у 8-10 разів порівняно з шорсткістю для чистої підкладки (рис. 2.12).

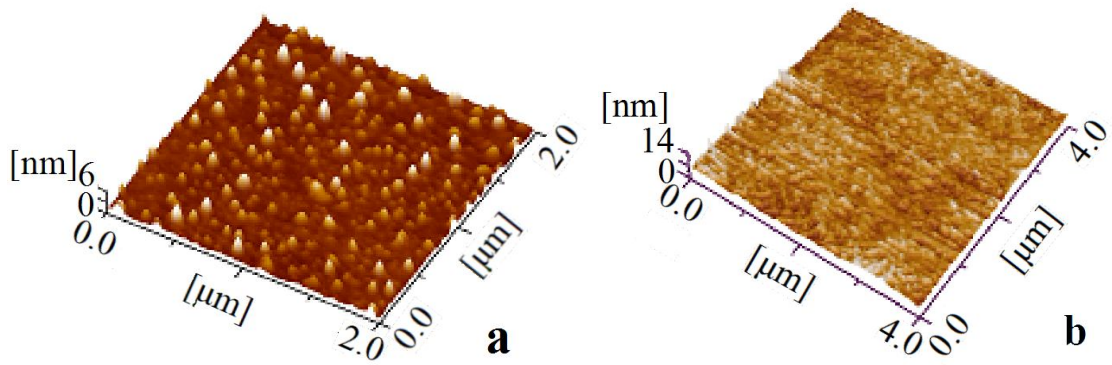


Рис. 2.10. Поверхня скляних підкладок після очистки. а) оксидне скло товщиною 0.5 мм ($R_{\max}=6$ нм); б) оксидне скло товщиною 2 мм ($R_{\max}=14$ нм).

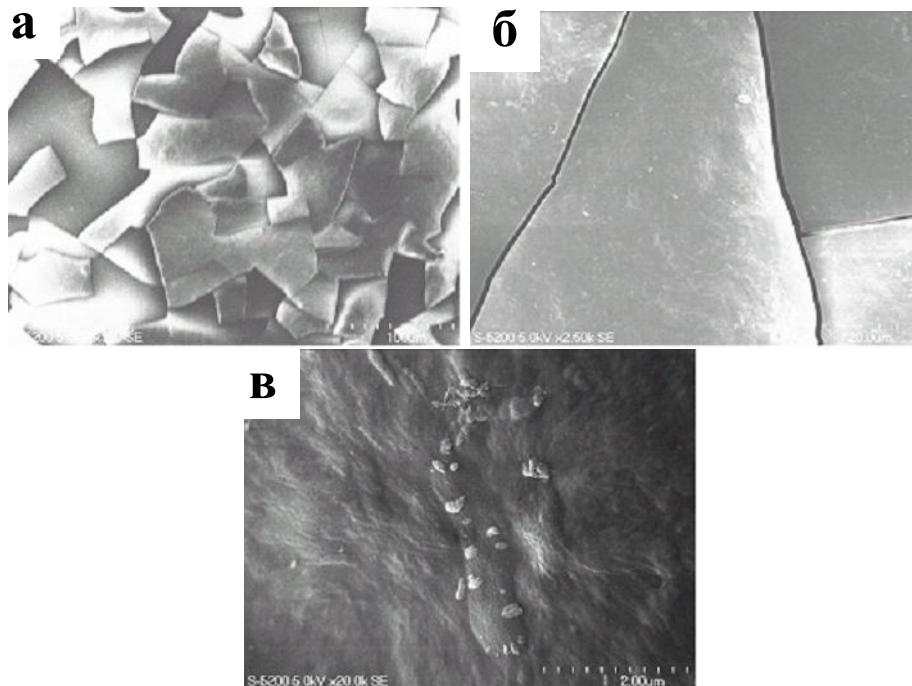


Рис. 2.11. Поверхня плівок, утворених із пурпурних мембран без матриці при різному збільшенні: а) – 100 мкм, б) – 20 мкм в) – 2 мкм.

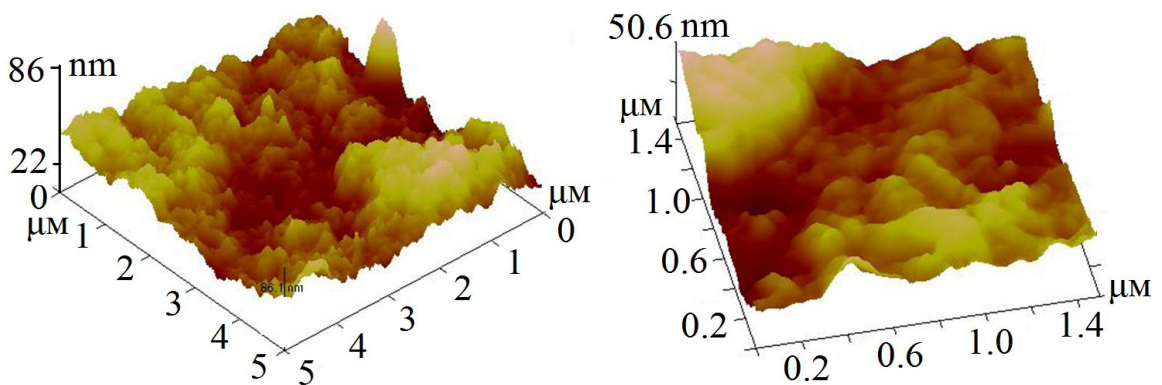


Рис. 2.12. Поверхня плівок ПМ без матриці на скляних підкладках. а) $R_{\max}=86$ нм при $S=25$ мкм²; б) $R_{\max}=50$ нм при $S=2,25$ мкм².

Таким чином, плівки утворені, із чистих пурпурних мембран без використання матриці, характеризуються макропористістю і значною неоднорідністю. Шорсткість таких плівкових структур майже на порядок більша порівняно з шорсткістю чистої підкладки. Про слабку адгезію матеріалу плівки до підкладки свідчить той факт, що у деяких зразках спостерігалось часткове відшарування плівки у процесі висихання. На нашу думку, такі неоднорідності спричинені здатністю ПМ об'єднуватися у великі конгломерати, що і приводить до нерівномірності розподілу матеріалу по поверхні підкладки, і появи як оптичних, так і структурних неоднорідностей.

Характеристики плівок на основі БР в полімерних матрицях.

Відомо [2, 87, 125], що оптичні властивості та параметри фотоциклу плівок чистого БР відрізняються від характеристик композитних плівок, виготовлених з використанням полімерних матриць, тому представляє інтерес вивчення стану поверхні та перерізів плівкових структур на основі БР у різних матрицях та при різних технологіях отримання. Серед органічних полімерних матеріалів як матрицю при виготовленні плівок часто використовують желатину та полівініловий спирт. Технологічність та водорозчинність цих матеріалів дозволяють отримати високоякісні прозорі плівки різної товщини. З метою вивчення впливу типу матриці на структуру плівки проведено дослідження поверхні і перерізу плівок БР в матриці желатини і полівінілового спирту (рис. 2.13).

Як показало порівняння отриманих електронно-мікроскопічних знімків, морфологія поверхні та перерізу практично не відрізняється для таких типів матриць. На рис. 2.14 показана морфологія поверхні плівок БР у желатиновій та полівініловій матрицях. Шорсткість поверхні плівок на основі БР складає 3,46 нм для желатинової і 3,10 нм для полівінілової матриць, відповідно. Максимальна неоднорідність поверхні по висоті - 45 нм для желатинової та 60 нм для полівінілової плівок. Результати порівняння характеристик плівок БР у матрицях желатини та полівінілового спирту, одержані при використанні як растрової електронної, так і атомно-силової

мікроскопії, не виявили суттєвих відмінностей у плівках, нанесених методом поливу та формування. При цьому якість поверхні плівок з товщиною ~ 10 мкм практично однакова і характеризується однаковою шорсткістю. Оскільки більш зручним матеріалом, з точки зору технології отримання плівок, є желатина, а плівки БР у желатиновій матриці характеризуються більш розвинутою системою пор, у подальшому для виготовлення плівок і проведення досліджень як матрицю ми використовували саме желатину.

Для плівок чистої желатини максимальні неоднорідності поверхні сягають 10 нм (рис. 2.15) і не перевищують неоднорідностей підкладки (див. рис. 2.10). Тобто, в процесі висихання водного розчину желатини проходить полімеризація з утворенням досить гладкої поверхні. Внесення ПМ приводить до зміни структури поверхні утворюваної плівки (див. рис. 2.15). Як видно з результатів, наявність ПМ у плівці приводить до зміни максимальної неоднорідності по висоті з 13 до 46 нм. Тобто навіть у плівках товщиною близько 10 мкм певні фрагменти ПМ виступають над поверхнею плівки, що приводить до збільшення шорсткості. Змінюється морфологія не лише поверхні, а й перерізу плівок (рис. 2.16). Якщо для плівки із чистої желатини є характерними пори вздовж всієї товщини плівок, то внесення БР приводить до значної зміни як структури, так і розмірів наявних пор.

Дослідження за допомогою електронної мікроскопії показали, що плівки БР у желатиновій матриці, виготовлені методом поливу, мають однорідну структуру з фрагментами пурпурних мембран, діаметр яких складає 0,3-0,5 мкм, а товщина 5 нм, що узгоджується з літературними даними [6, 127, 128]. Як видно з результатів (рис. 2.17.), фрагменти ПМ орієнтуються переважно паралельно поверхні підкладки по всій товщині плівки. Для відносно "товстих" плівок БР у полімерній матриці навіть коагульовані фрагменти мембран встигають у процесі висихання зануритись у товщу полімерної матриці і лише деякі окремі ПМ виступають на поверхні плівки, про що свідчить висота неоднорідностей у таких плівках (див. рис. 2.15).

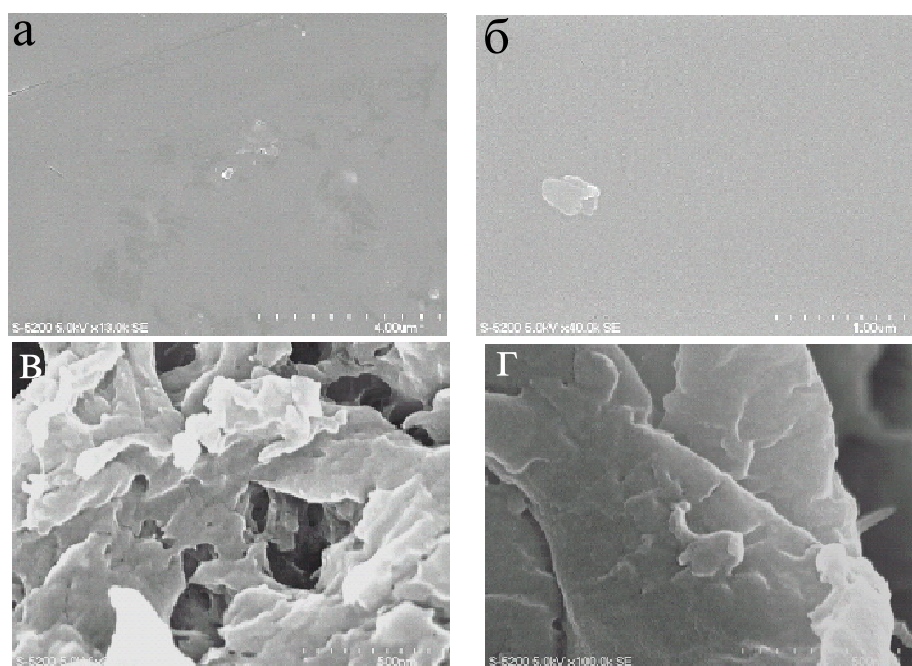


Рис. 2.13. РЕМ - зображення поверхні та перерізу плівки на основі БР у матриці желатини (а, в) та ПВС (б, г,) відповідно.

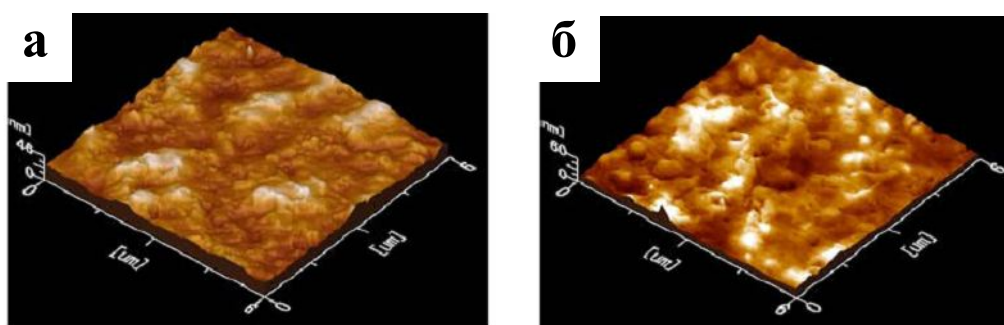


Рис. 2.14. Морфології поверхні плівок БР у желатиновій матриці (а) та в полівінілової матриці (б).

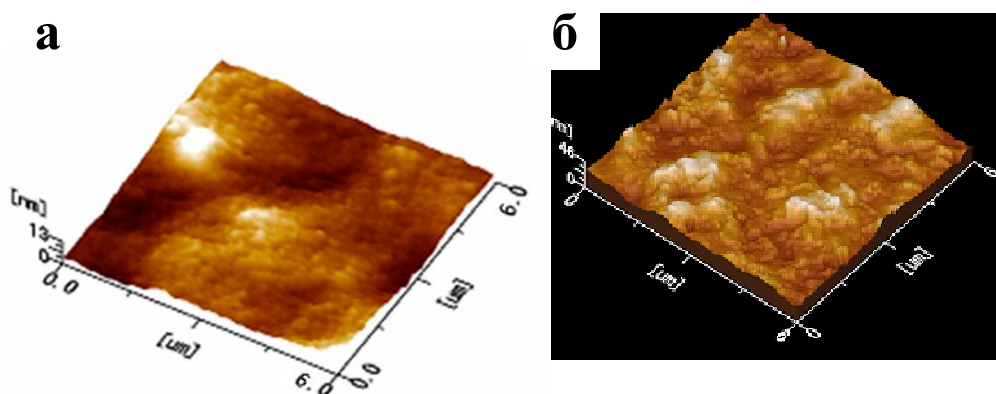


Рис. 2.15. Поверхня плівки желатини (а, $R_{\max}=13$ нм) та БР в матриці желатини (б, $R_{\max}=46$ нм), одержані методом поливу.

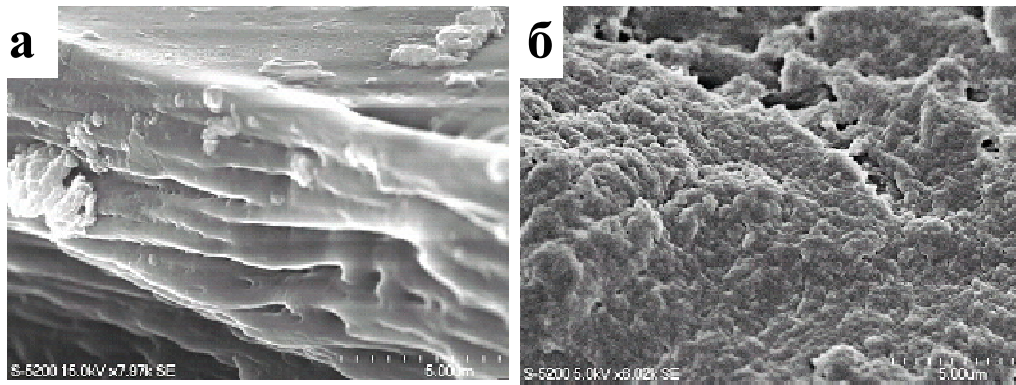


Рис. 2.16. Переріз плівки чистої желатини (а) та з 14% вмістом пурпурних мембран (б) отриманих методом поливу.

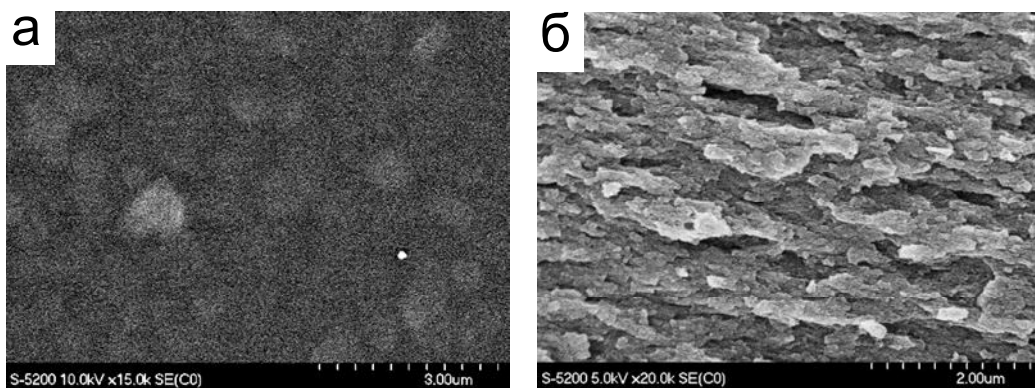


Рис. 2.17. РЕМ-зображення морфології поверхні (а) та поперечного перерізу (б) плівок на основі БР в желатиновій матриці, виготовленій методом поливу.

Для створення інтегрально-оптичних елементів на основі БР виникає необхідність виготовлення плівкових структур товщиною менше 1 мкм. Для такої мети використовують метод центрифугування. Детально метод описаний у додатку Б. У випадку нанесення рідкого плівкоутворюючого матеріалу, водорозчинного полімеру і фрагментів ПМ, під дією відцентрової сили виникають умови формування плівок дещо інші, ніж у випадку поливу і формування. Структура і товщина отриманої плівки будуть залежати як від в'язкості розчину та температури підкладки, так і від частоти її обертання. Тому були проведені дослідження плівок як чистої желатини, так і плівок з БР у желатинових матрицях отриманих при різних швидкостях обертання підкладки і, відповідно, різних товщинах отримуваних плівкових структур. Структура одержаних тонких плівок чистої желатини є такою ж як і для

плівок, одержаних методами формування і поливу. Тобто у випадку чистої желатини зміна методики приводить до утворення такої самої плівки як, і у випадку методу поливу, але в залежності від швидкості обертання підкладки буде змінюватися товщина плівки. Введення в матрицю желатини фрагментів ПМ, для плівок, одержаних центрифугуванням, викликає певні зміни в морфології, що добре видно з рис. 2.18. У полімерній матриці спостерігаються скупчення фрагментів пурпурних мембран, які можуть локально навіть змінювати товщину плівок.

На рис. 2.19 показано поперечний переріз желатинової плівки та плівки БР у желатиновій матриці. Плівка на основі БР у желатині має більшу пористість порівняно з плівкою з чистої желатини. Це зумовлено впровадженням великих фрагментів ПМ у желатинову полімерну структуру під час осадження. Дослідження морфології поверхні плівок за допомогою АСМ підтвердили той факт, що внесення фрагментів ПМ суттєво впливає на структуру плівок желатини та форму їх поверхні. (рис. 2.20).

Якщо для плівки желатини шорсткість поверхні не переважає шорсткість скляної підкладки, то для композиту неоднорідності зростають в середньому до 100 нм, що викликано фрагментами ПМ. Порівняння поверхні плівок на основі БР в полімерних матрицях, отриманих центрифугуванням з поверхнею плівок, отриманих методом поливу і формування, показує, що для товстих плівок поверхня є більш гладкою. Отримані результати мають важливе практичне значення, оскільки неоднорідності, що утворюються на поверхні з розмірами більше 100 нм, унеможливають створення якісних планарних хвилеводів на базі такого роду плівкових структур.

Результати досліджень морфології поверхні та поперечних перерізів плівок БР у полімерних матрицях дають можливість зробити певні висновки. Методики, які використовуються для отримання плівкових структур, забезпечують рівномірний розподіл БР по об'єму плівки, причому фрагменти ПМ переважно орієнтуються паралельно поверхні підкладки. Плівки мають розвинуту систему пор.



Рис. 2.18. Переріз плівки на основі БР у матриці желатини. (Швидкість обертання –1000 об/хв.)

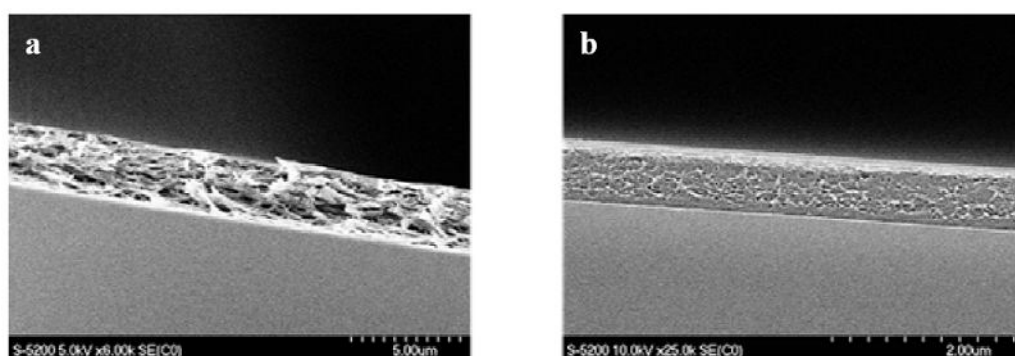


Рис. 2.19. Поперечний переріз плівки БР у желатиновій матриці (а) та желатинової плівки (б), яка нанесена при 750 об/хв.

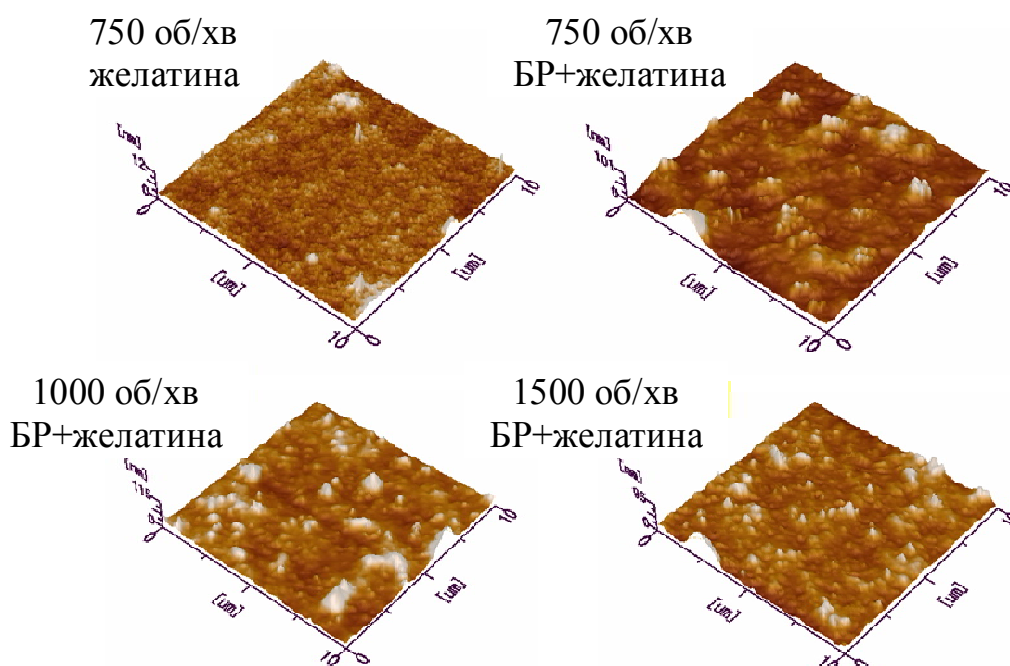


Рис. 2.20. Поверхня плівок желатини та БР в желатиновій матриці при різних швидкостях обертання.

Плівки в желатинових матрицях, отримані за допомогою методу центрифугування, характеризуються більшою шорсткістю поверхні порівняно з плівками, отриманими за допомогою методів поливу та формування. Не спостерігається значних структурних відмінностей при порівнянні плівок з використанням желатинових та полівінілових матриць, за винятком більшої кількості пор у желатинових плівках. За допомогою обох цих полімерів можна отримати однорідні плівки з можливістю контролю товщини.

Характеристики плівок БР в золь-гельних матрицях. Для плівок чистого ТЕОС скла характерна однорідність та мала шорсткість на рівні 0,586 нм (рис. 2.21). Тобто неоднорідності таких плівок не перевищують неоднорідностей скляної підкладки. Як відмічалось у попередньому розділі, якість золь-гельних плівок, одержаних методом поливу, суттєво залежить від технологічних умов отримання. На рис. 2.22 наведено переріз та поверхню плівок, одержаних на основі ТЕОС при швидкому висиханні. Внаслідок виникнення внутрішніх механічних напруг на етапі старіння та висихання золь-гелю по всій поверхні та об'єму плівки утворюються значні за розміром (>1мкм) неоднорідності, що й приводить до оптичної недосконалості таких структур. При збільшенні часу та зменшенні температури та швидкості випаровування розчинника при висушуванні таких плівок якість їх значно покращується. Впровадження БР в ТЕОС золь-гельну матрицю значно збільшує шорсткість поверхні плівки (рис. 2.23). Як і у випадку желатинових матриць збільшення перепадів по висоті значно перевищує товщину однієї ПМ, тому можна припустити, що збільшення шорсткості обумовлене агрегацією фрагментів пурпурних мембран з утворенням конгломератів.

Вивчення поперечного перерізу золь-гельних плівок показало, що вони мають зернисту структуру, що, в свою чергу, повинно забезпечувати сильно розвинену мікро- та мезопористість (рис. 2.24 та 2.25).

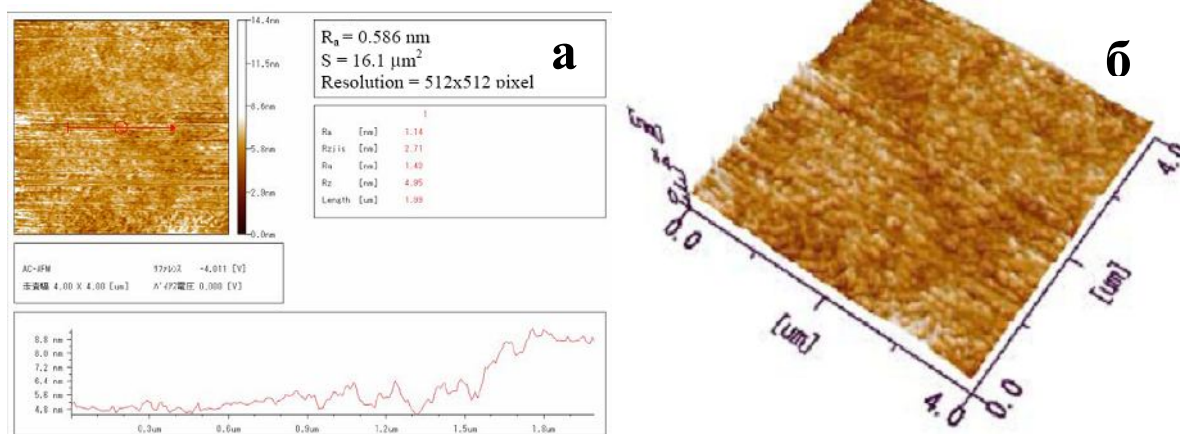


Рис. 2.21. Шорсткість (а) та АСМ - зображення морфології поверхні (б) чистої TEOS золь-гельної матриці, виготовленої методом поливу.

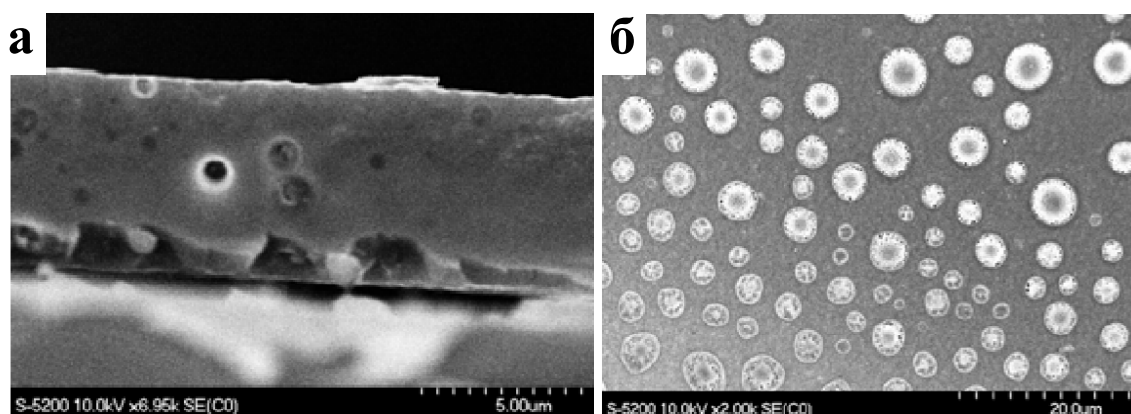


Рис. 2.22. Переріз (а) та поверхня (б) плівки золь-гелю, виготовленої за технологією TEOS при швидкому висиханні.

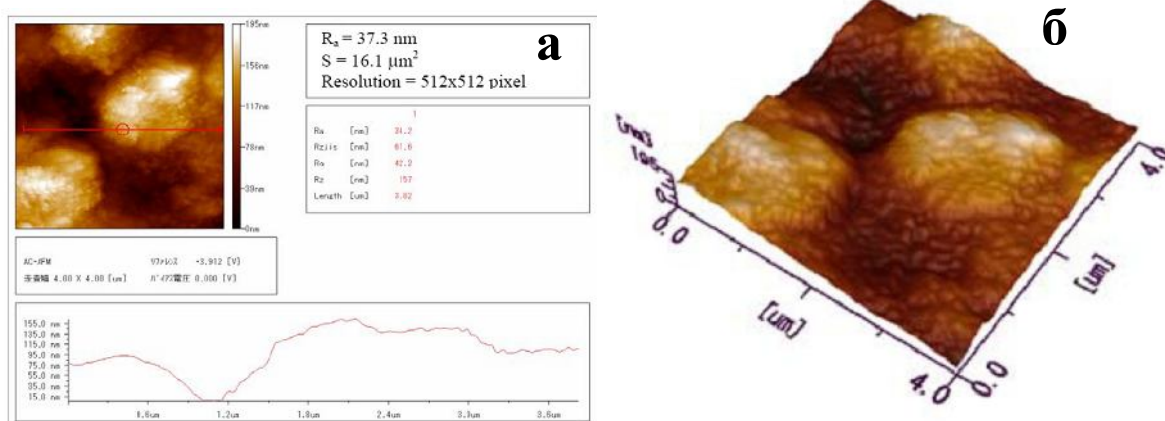


Рис. 2.23. Шорсткість (а) та АСМ - зображення морфології поверхні (б) БР в TEOS золь-гельній матриці, виготовленої методом поливу (співвідношення мас БР:TEOS = 5,5:94,5; $S=16 \text{ мкм}^2$).

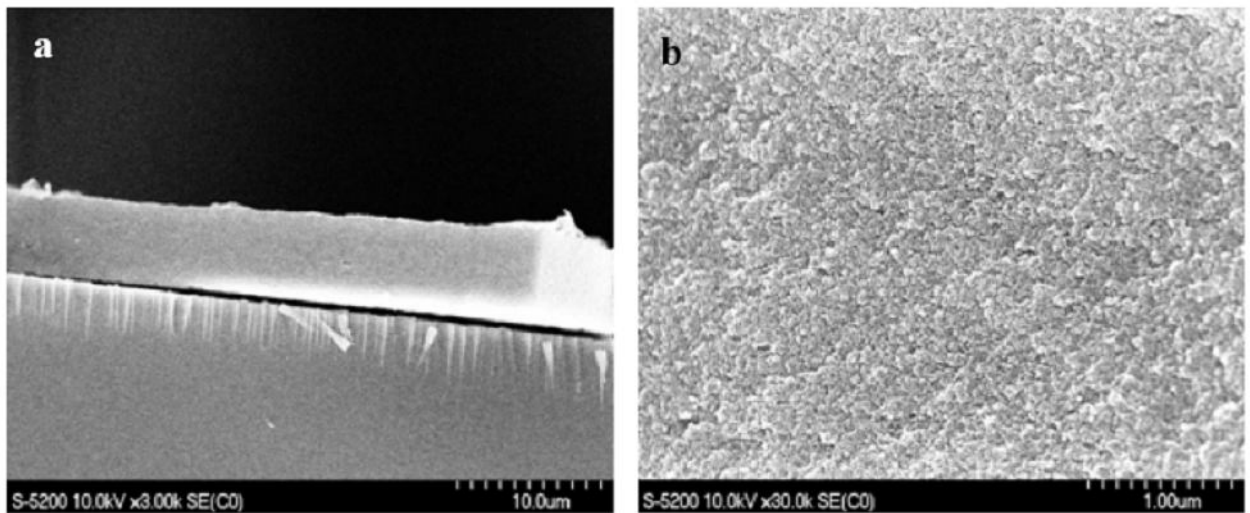


Рис. 2.24. РЕМ-зображення поперечного перерізу TEOS золь-гельної матриці, виготовленої методом поливу та висушування.

Внесення БР в матрицю не приводить до виникнення суттєвих змін у видимій структурі перерізу. У той же час слід відмітити, що для таких плівок характерне зменшення однорідності структури, збільшення середнього розміру зерен золь-гелю до 1-2 мкм (Рис. 2.25) і, як наслідок, зростання пористості порівняно з чистим золь-гельним склом.

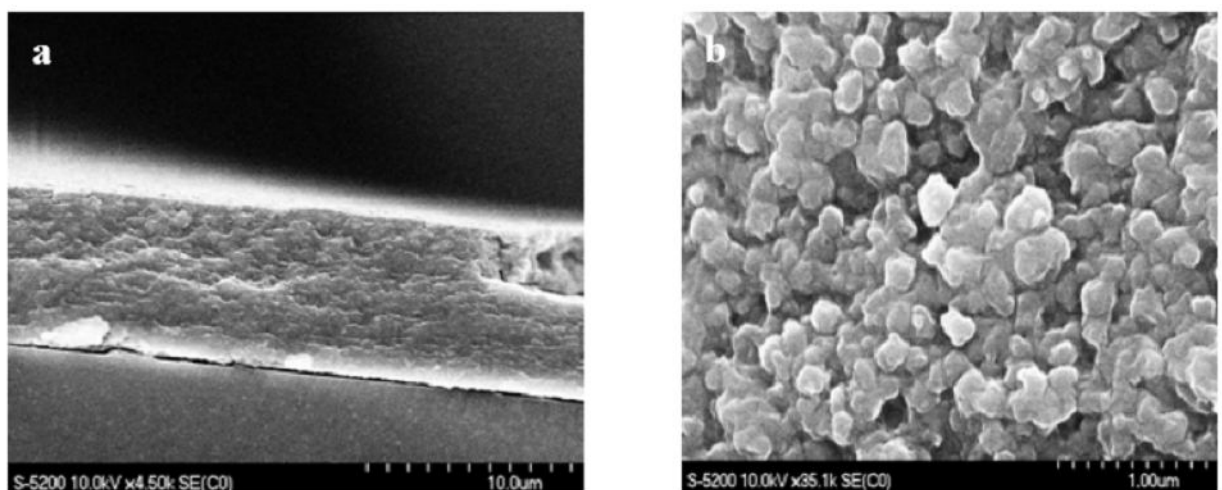


Рис. 2.25. РЕМ - зображення поперечного перерізу плівки БР в TEOS золь-гельній матриці виготовленої методом поливу та висушування (співвідношення мас БР:TEOS = 5,5:94,5).

При виготовленні плівок БР в золь-гельній матриці сильно зростають вимоги до технології висушування зразків. Під час висушування золь-гелю формується пориста структура за рахунок випаровування розчинника. Останнє в свою чергу приводить до появи внутрішніх механічних напруг у зразку. При правильній технології виготовлення у чистому золь-гелі механічні напруги недостатні для руйнування зразка будь-якої форми. Якщо внести у структуру додаткові включення у виді ПМ, здатні до конгломерації, з розмірами набагато більшими за розміри пор (60% пор у золь-гелі мають розмір 1,5-3 нм з максимальним розміром пор 5 нм, причому середній розмір ПМ - 5 x 1 мкм), міцність структури стає залежною від розміру включень. При формуванні об'ємного зразка, "кістяк", який утворюють молекули кремнію, має достатню міцність і гнучкість за рахунок великої кількості молекул і зв'язків, які між ними утворюються, щоб витримати внутрішні навантаження, пов'язані з випаровуванням розчинника, незважаючи на наявність ПМ. У випадку формування товстої плівки в діапазоні товщини від 1 до 40 мкм на етапі старіння і висихання золь-гелю відбувається розтріскування плівки і, як наслідок, зменшення її однорідності та оптичної прозорості (рис. 2.26).

Використовуючи як розчинник воду, а не спирт, проводячи процеси висихання при низькій температурі та з малими швидкостями, нам вдалося отримати серію плівок задовільної якості. Аналізуючи роботи, опубліковані з даного питання за останні кілька років, можна зробити висновки, що з аналогічними проблемами стикнулися інші дослідницькі групи, які займаються даною проблематикою [110, 112, 114].

У випадку використання методу центрифугування для нанесення плівок золь-гелю, отримувалися плівки дуже малої товщини навіть при використанні низьких частот обертання підкладки. Це можна пояснити низькою в'язкістю плівкоутворюючої суміші, оскільки збільшення густини суспензії відбувається в результаті поліконденсації на етапі гелеутворення та старіння гелю. Мікрорельєф поверхні плівки чистого золь-гелю на скляній

підкладці отриманої методом центрифугування при частоті обертання підкладки в 750 обертів на хвилину наведено на рис. 2.27.

Шорсткість для таких плівок знаходиться в діапазоні 0,267-0,356 нм. Такі показники менші за аналогічні навіть для чистої скляної підкладки (див. рис. 2.11). Пояснити цей факт можна тим, що рідка суміш прекурсорів, заповнює неоднорідності рельєфу поверхні скляної підкладки, а надлишковий матеріал виноситься за межі підкладки. Після проходження золь-гельного процесу утворюється гладка однорідна поверхня. Оскільки плівка тонка, механічні напруги, які виникають на етапі усадки, невеликі і не приводять до деформації її поверхні. При додаванні суспензії ПМ у розчин прекурсорів після центрифугування на поверхні скляної підложки залишається лише невелика кількість золь-гелю і окремі фрагменти ПМ. На рис. 2.28 наведено зображення фрагменту ПМ отримане з допомогою атомно-силової мікроскопії при нанесенні плівок БР в золь-гельній матриці методом центрифугування. Як видно з рисунку, товщина фрагменту становить близько 5 нм, що добре узгоджується з літературними даними.

Результати досліджень морфології поверхні та поперечних перерізів плівок БР в золь-гельних матрицях можна узагальнити наступним чином. Чистий золь-гель при використанні методів поливу та формування утворює однорідну гладку поверхню, шорсткість якої не перевищує нерівностей підкладки, однак навіть незначні відхилення від технології висушування через внутрішні напруги, які виникають в плівках, приводять до утворення тріщин і неоднорідностей по всьому об'єму плівки. Внесення фрагментів ПМ у матрицю золь-гелю, приводить до значного зростання шорсткості та пористості плівок. Вимоги до технології отримання таких плівок суттєво зростають. Плівки мають розвинуту пористу структуру. Отримати плівки достатньої товщини за допомогою методу центрифугування не вдається через низку в'язкості плівкоутворюючої суміші. При дотриманні технології процесу можна отримати однорідні плівки БР задовільної якості в золь-гельній матриці з можливістю точного контролю товщини.

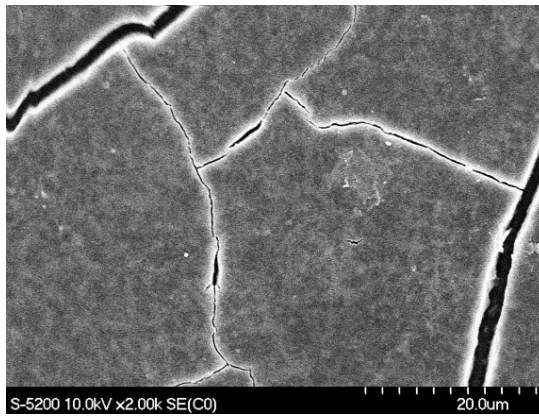


Рис. 2.26. РЕМ-зображення дефектів в товстій плівці на основі БР в золь-гельній матриці, які виникають при висушуванні.

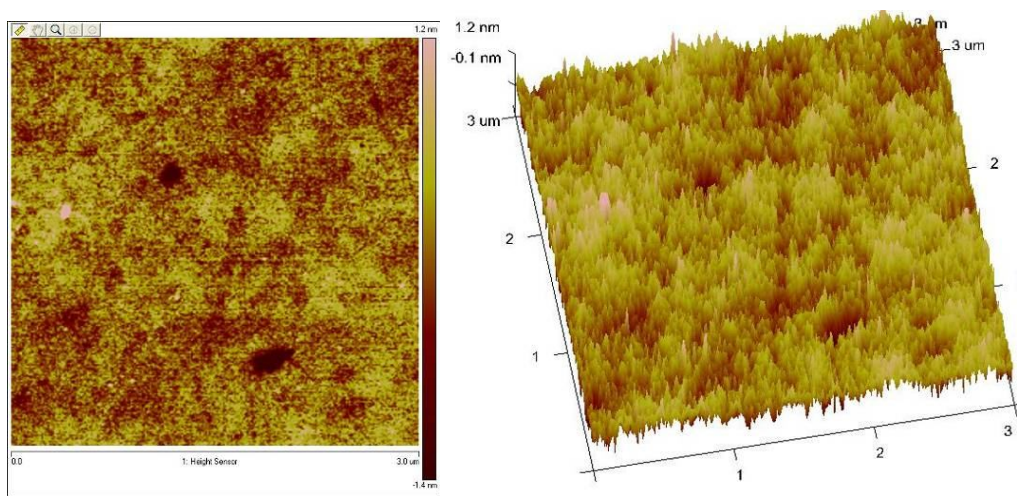


Рис. 2.27. 2D та 3D АСМ - зображення фрагменту плівки чистого золь-гелю на скляній підкладці (центрифугування при 750 об/хв).

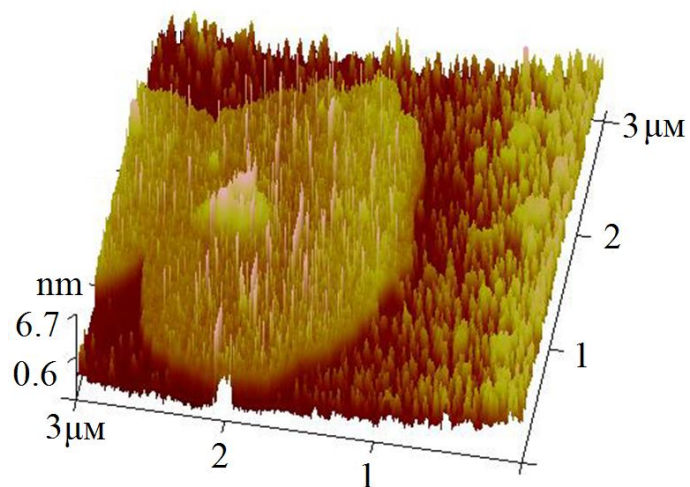


Рис. 2.28. АСМ - зображення фрагменту ПМ у плівці БР в золь-гельній матриці, отриманій методом центрифугування при 750 об./хв.

Вплив матриці та технології отримання плівкових структур на основі БР на їх пористість. При виборі матриці для плівок БР важливим параметром є пористість матеріалу. Висока пористість дозволяє збільшити сумарну площу поверхні плівки, у великих порожнинах можуть розміщуватися фрагменти ПМ, від пористості залежать оптичні характеристики тощо. З метою визначення пористості матриць, які використовуються для виготовлення плівок на основі БР, були проведені дослідження структури та типів пор у полімерних та золь-гельних матрицях з використанням установки Sorptomatic-1990. Підготовка зразків проводилася згідно методики, описаної в розділі 1.3. Для вимірювання контрольних даних і калібрування порожнин використовувався гелій. Ізотерми адсорбції/десорбції, одержані в результаті експерименту, для зразків плівок желатини й ПВС наведено на рис. 2.29.

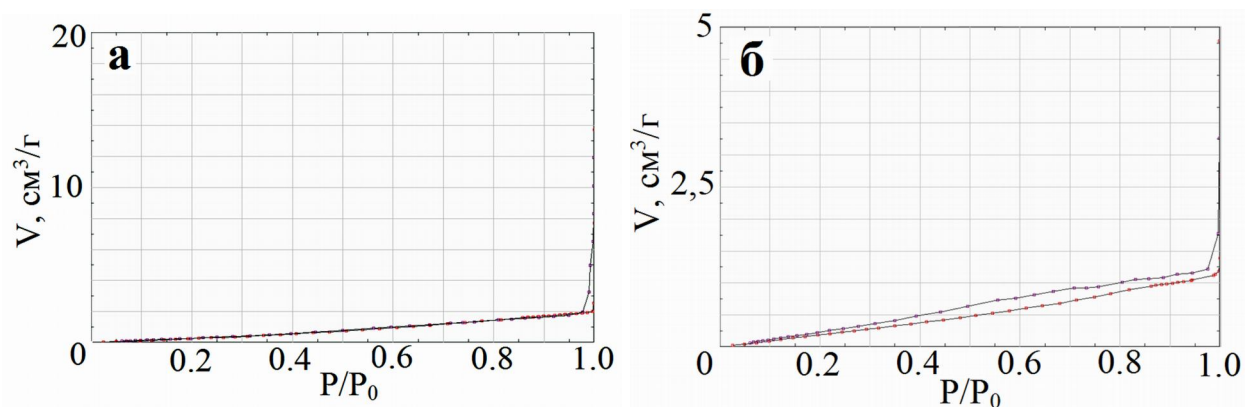


Рис.2.29. Ізотерма адсорбції плівки желатини (а) та ПВС (б).

Отримані ізотерми добре описуються моделлю Брунауера-Емметта-Теллера (БЕТ) [99]. Існує деякий гістерезис у процесах адсорбції й десорбції - десорбційна гілка ізотерми йде нижче адсорбційної, що є наслідком капілярної конденсації адсорбата в мезопорах плівок. Величини питомої площі поверхні, розраховані методом БЕТ, для плівок желатини й ПВС становили 2,63 і 1,68 m^2/g , відповідно. Величини питомої площі поверхні, розраховані по методу Баретта-Джойнера-Халенда (БДХ) [100], склали 3,45 і 2,93 m^2/g , відповідно (табл. 2.4). Питома площа поверхні плівок желатини

більша, ніж у плівок ПВС, тому при використанні желатини як матриці, для фрагментів ПМ спостерігається менше відмінностей у функціонуванні БР порівняно з нативним станом. Більш розвинена пористість дозволяє проникати й затримуватися більшої кількості води, що дуже важливо для функціонування БР.

Розподіл пор за розмірами (розмірний спектр пор) визначали методом десорбції парів азоту. Для розрахунків застосовувалася модель БДХ, що дозволяє одержати розподіл пор за розмірами з ізотерм десорбції. Величина пор у плівках желатини коливається від 1 до 200 нм. Детальні характеристики розмірних спектрів плівок желатини й ПВС наведено в таблиці 2.5 та на рис 2.30.

Таблиця 2.4

Площа поверхні та об'єм пор для плівок желатини та ПВС.

Назва зразка	Площа поверхні БЕТ $A, [m^2/g]$	Об'єм пор, $V, [cm^3/g]$	Площа поверхні БДХ $A, [m^2/g]$
Желатина	2,63	0,003	3,45
ПВС	1,68	0,001	2,93

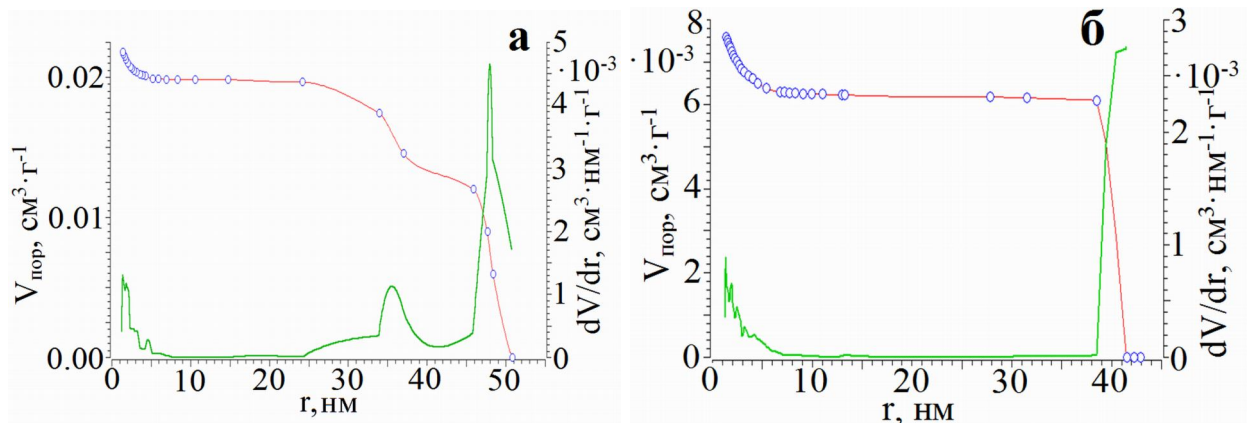


Рис. 2.30. Спектр розподілу пор плівок желатини (а) та ПВС (б) за розмірами.

У плівках желатини й ПВС переважають пори діаметром від 1,5 до 50 нм, що вказує на те, що згідно прийнятої класифікації [129], плівки є мезопористими. Величина діаметрів пор у плівці желатини коливається від 0 до 200 нм (макропор - 2%, мезопор - 84%, мікропор - 14%). Розмірний спектр

пор півки ПВС несуттєво відрізняється від розмірного спектра пор півок желатини. Величина діаметрів пор у півці ПВС знаходиться в інтервалі від 0 до 50 нм (макропор - 0%, мезопор - 85%, мікропор - 15%). Одержані результати показують, що півки желатини й ПВС володіють досить розвинутою пористістю. Об'єм пор у желатиновій півці більший ніж у півці ПВС, тому як матрицю для одержання півок на основі БР більш доцільно використовувати желатину.

Відомо [130-132], що використання різних факторів при проходженні золь-гельного процесу може вплинути на пористість отриманого скла; наприклад температура, тиск та каталізатор, який використовується для проведення золь-гельної реакції. Золь-гельні скляні зразки були підготовлені з використанням різних каталізаторів для того, щоб з'ясувати при якому каталізаторі отримані зразки мають максимальну пористість. На рис. 2.31 показана типова ізотерма адсорбції золь-гельного скла, отримана за допомогою адсорбції та десорбції азоту. Характеристики цієї адсорбційної ізотерми добре описуються за допомогою БЕТ моделі. Величини питомої площі поверхні розраховані з допомогою БЕТ моделі, для золь-гельних зразків, підготованих у ідентичних зовнішніх умовах, з використанням HCl, H₂O та HCl+NaV₄ як каталізаторів, були рівні 584,4, 676,6 та 544,8 м²/г, відповідно.

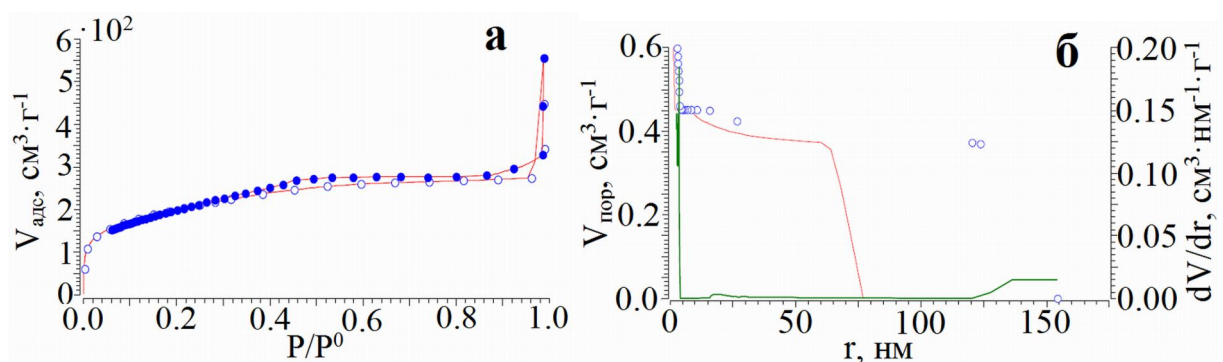


Рис. 2.31. Ізотерма для золь-гельного (ТЕОС) скла (а): заповнені символи – адсорбційна частина ізотерми, пусті – десорбційна частина. Розподіл пор за розмірами в золь-гельному склі (б)

Таблиця 2.5

Специфічна поверхнева площа та розподіл пор за розміром.

Зразок	Ефективна площа поверхні, м ² /г, БЕТ	Ефективний об'єм пор, см ³ /г	Ефективна площа поверхні, м ² /г, БДХ	Величина пор		
				Від (нм)	До (нм)	А%
Желатинова плівка	2,6	0,003	3,45	0	1,5	13,9
				1,5	3	41,9
				3	5	8,9
				10	50	32
Плівка ПВС	1,7	0,001	2,93	0	1,5	15,5
				1,5	3	44,5
				3	5	13,9
				10	50	22,1
Золь-гельна плівка	676,6	0,519	–	0	1,5	17,9
				1,5	3	58,9
				3	5	13,9

Дослідження показали, що при використанні води замість спирту значення питомої поверхні максимальне. З попередніх даних відомо, що плівки БР у золь-гельних матрицях з використанням води у якості розчинника мають найкращу оптичну якість. Єдиним недоліком в даному випадку залишається великий час формування та висихання гелю.

Розподіл пор за розмірами був визначений за допомогою методу десорбції азоту, використовуючи БГХ модель. На рис. 2.31 показано спектр розмірів пор золь-гельного скла. Розміри пор від 0-1.5 нм та 1.5-5 нм, вказують на те, що золь-гельне скло має добре розвинуту мікро- та мезопористу структуру. Порівняння поверхневої площі та розподілу пор за розмірами у полімерних та золь-гельних плівках наведено в табл. 2.5.

З узагальнення отриманих даних бачимо, що пористість золь-гельних плівок набагато більша, ніж у полімерних плівок. Крім того, питомі площі поверхонь золь-гельного скла та желатинових плівок більша, ніж у плівках, отриманих з використанням полівінілового спирту. Звідси випливає, що використання золь-гельних та желатинових матриць для отримання плівок БР більш прийнятне в силу їх більшої пористості.

2.4. Модифікація методики отримання плівок бактеріородопсину у золь-гельних матрицях

Плівки БР у золь-гельних матрицях мають ряд переваг над плівками в полімерних матрицях. У той же час навіть при дотриманні всіх технологічних особливостей дуже важко отримати стабільні плівки БР у золь-гельній матриці з високою оптичною якістю. Тому нами було розглянуто декілька варіантів, які дозволяють компенсувати оптичні недоліки, або уникнути їх появи.

Одним із варіантів практичного використання БР є можливість створення на його основі чутливих елементів біосенсорів, оскільки його оптичні властивості можуть змінюватися під дією факторів навколишнього середовища. Зміна саме оптичних характеристик приводить до того що ключовим параметром для плівок є їх висока оптична якість. Введення в плівкові структури, які містять БР, напівпровідникових квантових точок (КТ) з фото- або електролюмінесценцією, спектр випромінювання яких співпадає зі смугою поглинання основного стану бактеріородопсину (570 нм), дає можливість створення принципово нового типу матеріалів. Такі структури містять у якості компонентів як випромінювачі (квантові точки), так і фотодетектори (фрагменти ПМ). Таким чином, контролюючи спектральний склад та інтенсивність люмінесцентного випромінювання, ми можемо зробити висновки про зміни в характеристиках БР, які відбуваються під впливом навколишнього середовища. Така структура первинного перетворювача суттєво зменшує вимоги до оптичної прозорості плівок.

В процесі досліджень був запропонований ще один варіант вирішення проблеми низької оптичної якості плівок БР у золь-гельних матрицях. Плівки чистого БР мають достатню оптичну якість, але водорозчинні. Тонкі плівки чистого золь-гелю теж однорідні та позорі і нерозчинні у воді. Тому пошарове нанесення на скляну підкладку спочатку плівку чистого БР, а зверху тонкої плівки чистого золь-гелю, має привести до утворення двошарової структури, в якій не буде великих внутрішніх напруг. Золь-

гельний покривний шар буде забезпечувати нерозчинність у воді, в той же час за рахунок високої пористості золь-гелю речовини аналіти можуть вільно проникати в плівку для взаємодії з БР.

Вибір квантових точок з оптимальними характеристиками. З метою розробки фото- та електролюмінесцентних волоконно-оптичних сенсорів хімічних компонент у газових середовищах та водних розчинах нами вперше було запропоновано нанокмпозитні структури БР-органічна (желатина) або неорганічна (золь-гельна SiO_2) матриця - квантові напівпровідникові точки CdSe/ZnS. В основі роботи такого чутливого елемента лежить можливість запуску фотоциклу в БР за рахунок люмінесцентного випромінювання квантових точок, а досліджуваний хімічний компонент, діючи на поглинання БР в основному стані, реєструється за рахунок зміни інтенсивності вихідного люмінесцентного випромінювання [133]. Люмінесценція квантових точок може збуджуватися як за допомогою оптичного випромінювання, так і за допомогою електричного поля. Наявність джерела світла для запуску фотоциклу безпосередньо в структурі плівки суттєво спрощує конструкцію датчика і зменшує вимоги до оптичної досконалості плівок.

Необхідною умовою роботи такого сенсора є співпадіння смуги випромінювання квантових точок та смуги поглинання основного стану БР. Цю умову можна задовольнити, використовуючи квантові напівпровідникові точки CdSe/ZnS, у яких за рахунок геометричних розмірів у широкому спектральному діапазоні змінюється смуга люмінесцентного випромінювання [134]. У нашому випадку були використані напівпровідникові квантові точки CdSe/ZnS виробництва фірми EVIDENT (США), стабілізовані в дистильованій воді з допомогою COOH-груп (емісійний пік – 576 нм) та амінами (емісійний пік – 575 нм). Концентрація квантових точок у воді складала 0,25 мг/мл [74]. Для досліджень використовувалися квантові точки, стабілізовані з допомогою COOH груп, оскільки інтенсивність люмінесценції для таких КТ у 3 рази вища.

З практичної точки зору збудження люмінесценції квантових точок найбільш зручно проводити за допомогою малогабаритних високоінтенсивних світлодіодів. Спектральна смуга в напівпровідникових світлодіодів досить вузька, що, при правильному підборі, попередить блокування проміжних переходів у фотоциклі. При виборі світлодіоду важливо також врахувати інтенсивність люмінесценції, яка збуджується його випромінюванням. Були проведені дослідження залежності інтенсивності люмінесценції КТ від інтенсивності збуджуючого випромінювання для світлодіодів з максимумами при 380, 395 та 450 нм (рис. 2.32). Враховуючи особливості спектрів поглинання інтермедіатів фотоциклу, найбільш прийнятним є використання світлодіодів з максимумом випромінювання при 450 нм, оскільки жоден інтермедіат не поглинає в даній області спектру. Однак квантовий вихід при використанні таких світлодіодів значно нижчий, незважаючи на більш високу інтенсивність збуджуючого світла. У той же час максимальна інтенсивність люмінесценції спостерігається для світлодіоду з максимумом випромінювання при 380 нм. Враховуючи те, що він достатньо віддалений по спектральній смузі від максимуму поглинання M_{412} , для подальших досліджень ми використовували збудження за допомогою даного світлодіоду.

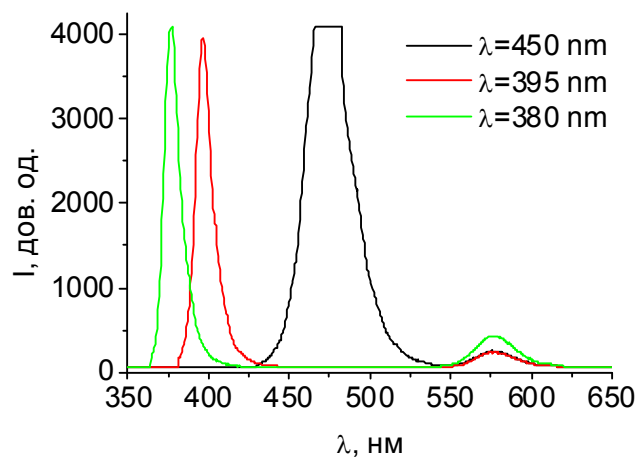


Рис. 2.32. Інтенсивність збуджуючого та люмінесцентного випромінювання квантових точок у водному розчині при використанні світлодіодів з різними довжинами хвиль ($\lambda = 380, 395$ та 450 нм).

Доказом того, що люмінесценція квантових точок приводить до запуску фотоциклу, можуть стати порівняння спектрів люмінесценції КТ у водних розчинах та плівкоутворюючій суміші при використанні різних джерел збуджуючого випромінювання. Результати такого дослідження наведено на рис. 2.33. Для проведення досліджень ми використали світлодіоди з максимумом при 395 нм (близький до максимуму поглинання M_{412}) та 450 нм (співпадає з точкою перегину в спектрі пропускання БР, де величина поглинання не залежить від освітлення). З попереднього рисунку видно, що квантовий вихід при збудженні світлом на 450 нм набагато менший. Аналогічний результат ми отримали і тут – для розчину квантових точок інтенсивність люмінесценції при збудженні на 395 нм майже в 2 рази більша. Однак, при дослідженні люмінесценції плівкоутворюючої суміші, яка містить БР, спостерігається зовсім інша картина. Інтенсивність люмінесценції на 570 нм, при збудженні світлом з максимумом при 450 нм вдвічі більша ніж, при збудженні на 395 нм.

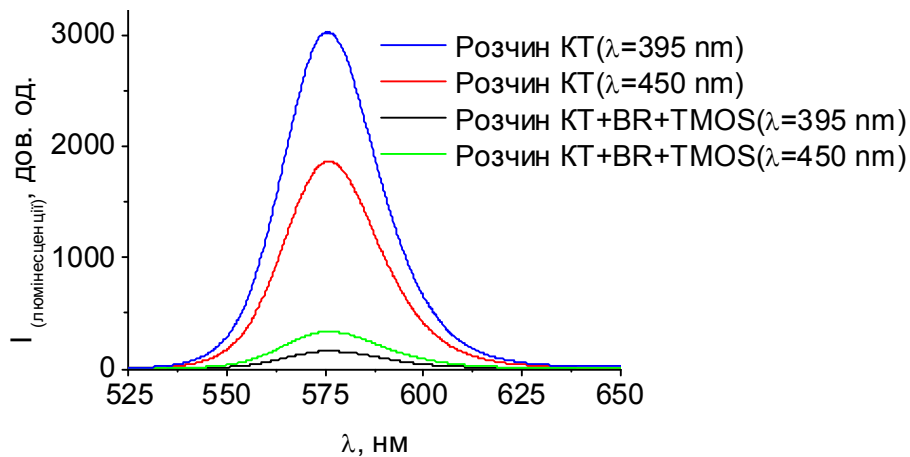


Рис. 2.33. Спектри люмінесценції водного розчину КТ та плівкоутворюючої суміші з БР та КТ при різних довжинах хвилі (395 та 450 нм) збуджуючого випромінювання.

Пояснити такі результати можна наступним чином. При дослідженні люмінесценції простого водного розчину ми фіксуємо випромінювання КТ, практично неослаблене середовищем. Якщо у суспензії крім КТ присутні фрагменти ПМ, буде відбуватися послаблення фіксованої інтенсивності

люмінесценції через поглинання люмінесцентного світла бактеріородопсином (смуга поглинання БР майже співпадає з максимумом люмінесценції КТ). Після поглинання кванту світла молекула БР проходить через ряд проміжних інтермедіатів, найбільше значення часу життя з яких має M_{412} (максимум поглинання на 412 нм), після чого повертається у вихідний стан. Тобто при наявності зовнішньої засвітки встановлюється певна рівновага між основним станом BR_{570} та інтермедіатом M_{412} , положення якої буде залежати від інтенсивності збуджуючого світла. У випадку використання для збудження люмінесценції світлодіоду з максимумом при 450 нм, описана ситуація буде реалізовуватися на практиці. Якщо ж у якості джерела використовувати світлодіод з максимумом при 395 нм, то частина збуджуючого випромінювання буде поглинатися інтермедіатом M_{412} , переводячи його в основний стан. Тому інтенсивність люмінесценції на 570 нм буде меншою з двох причин: по-перше, через поглинання люмінесцентного випромінювання бактеріородопсином, по-друге, через ослаблення інтенсивності збуджуючого люмінесценцію випромінювання через поглинання проміжним інтермедіатом M_{412} . Саме таку ситуацію й описують результати, наведені на рис. 2.33. Отримані результати чітко вказують на наявність фотоциклу в розчині БР під дією люмінесцентного випромінювання напівпровідникових КТ. При чому слід відмітити, що при використанні світлодіоду з максимумом випромінювання при 380 нм ефект зменшення часу життя M_{412} не спостерігається, що дозволяє використовувати такі світлодіоди як джерела для збудження люмінесценції КТ.

Для отримання плівкових структур використовували БР у вигляді фрагментів ПМ, виділений за стандартними методиками [107]. У якості прекурсорів для отримання золь-гельного скла використовували TEOS. Золь-гельне скло отримали, використовуючи дещо змінену методику, описану в роботі [113]. Використовуючи цей метод, 7 мл TEOS, 3 мл дистильованої води та 1 мл 0,04 М HCl перемішали разом та обробили ультразвуком протягом 20 хв. Одержаний в результаті продукт, розвели рівним об'ємом

дистильованої води. 0,5 мл цього розчину змішали з 0,25 мл буферного розчину борнокислого натрію (рН 9) і 0,2 мл розчину БР (14 мг/мл) для отримання плівкоутворюючої суміші.

При виготовленні плівок БР у золь-гельній матриці водний розчин БР змішували з розчином КТ у співвідношенні 3:1, до змішування із золь-гельною сумішшю, а потім 0,02 мл суміші БР з квантовими точками вводили в 0,12 мл розчину прекурсорів. Виготовлення чистих золь-гельних плівок та плівок БР у золь-гельній матриці з квантовими точками CdSe/ZnS товщиною 20 мкм здійснювалося шляхом нанесення 0,1 мл плівкоутворюючої суміші на поверхню скляних підкладок площею 5 см². Плівки висушували в холодильнику при 4°C протягом 24 год.

Характеристики плівок на основі БР з додаванням КТ. Для проведення досліджень було виготовлено серію плівок БР з КТ в різних матрицях та при різних умовах отримання. Досліджувалися спектральні характеристики, морфологія поверхні та перерізу, розподіл КТ по об'єму плівки тощо. На рис. 2.34 показані оптичні спектри поглинання плівок на основі БР в золь-гельній матриці при різних концентраціях БР. Характерні максимуми поглинання підтверджують той факт, що БР у сухій золь-гельній матриці зберігає свої оптичні властивості та структуру, не зважаючи на зміни в технології отримання плівки. Одним з вирішальних параметрів, який відповідає за структуру та характеристики золь-гельних плівок, є швидкість висихання розчинника на етапі старіння золь-гелю. Тому ми провели дослідження впливу швидкості висушування на параметри плівок. Найбільша швидкість висихання забезпечувалась при вакуумній (ліофільній) сушці. В результаті були отримані покриття, які мали порошкоподібну структуру, дуже слабку адгезію і велике розсіювання. Меншою була швидкість при висиханні плівок у відкритій кюветі і найбільш повільна в закритому ексікаторі. При висиханні в закритому ексікаторі утворювалась найбільш якісна однорідна плівкова структура. Спектри люмінесценції для отриманих зразків при різних швидкостях висушування наведені на рис. 2.35. Плівки

наносилися на торець спільного каналу Y-розгалужувача (діаметр оптичного волокна 400 мкм), збудження фотолюмінесценції проводилось світлодіодом (довжина хвилі 380 нм) по одному каналу, реєстрація люмінесценції проводилась на іншому каналі за допомогою спектрофотометра. Також було проведено порівняння інтенсивності люмінесценції квантових точок для плівок з різними матрицями (рис. 2.36). Плівки в желатиновій матриці оптично більш досконалі, а в неорганічній матриці наявні тріщини, які приводять до значного розсіювання.

Як видно з одержаних результатів, попри значні відмінності у оптичній якості та механічних характеристиках, інтенсивність люмінесцентного випромінювання в нанокompозитних структурах не суттєво змінюється в залежності від технології отримання зразків та вибору матриці. Таким чином можна зробити висновок, що оптична досконалість таких плівкових структур для сенсорів не є критичним параметром, що дає значну перевагу порівняно з сенсорами, в яких контроль характеристик чутливого середовища здійснюється за рахунок контролю змін пропускання, для чого необхідна висока оптична якість.

Вивчення з допомогою АСМ стану поверхні плівок бактеріородопсину із квантовими точками в желатиновій матриці показало, що для плівок одержаних методом поливу (товщина $\sim 5-10$ мкм) шорсткість поверхні складає ~ 60 нм. Для плівок, отриманих центрифугуванням (товщина $\sim 0.5-1$ мкм) нерівності поверхні зростають в 2 рази. Дослідження ж перерізу отриманих плівок показало, що квантові точки в структурі розподілені нерівномірно і концентруються переважно в одному нанорозмірному шарі (рис. 2.37). Дослідження за допомогою атомно-силового мікроскопа плівок БР в золь-гельній матриці з квантовими точками показало, що структура поверхні одержаних зразків не відрізняється від поверхні плівок, у яких квантові точки відсутні.

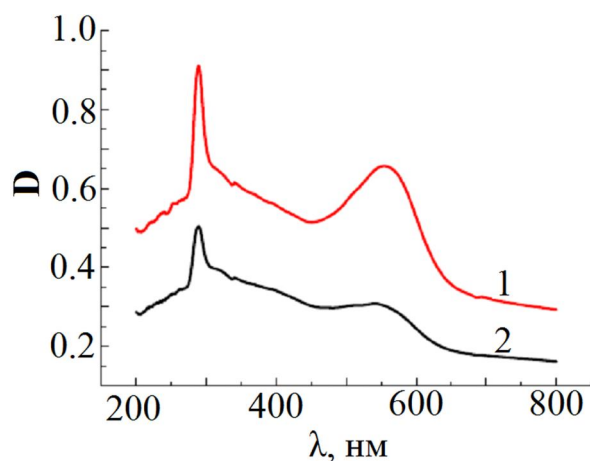


Рис. 2.34. Спектри поглинання плівок на основі БР в золь-гельній матриці: співвідношення мас БР:TEOS лінія 1 - 5,5:94,5; лінія 2 - 2,25:97,75.

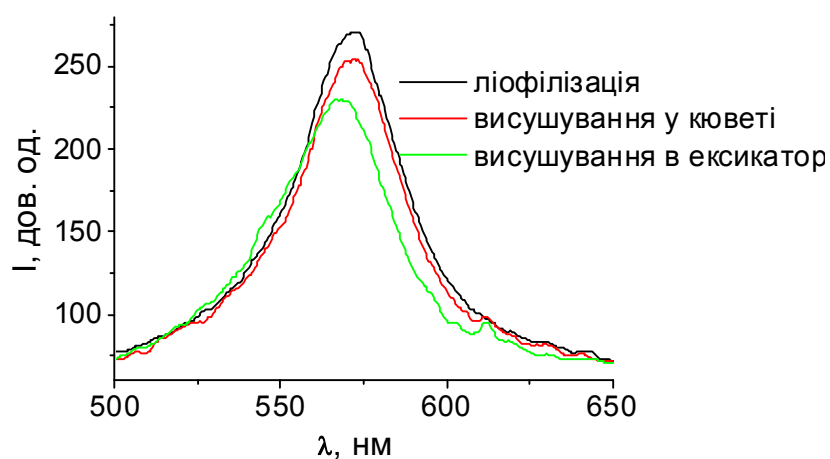


Рис. 2.35. Спектри люмінесценції для зразків на торці оптичного волокна при різних режимах висушування ($\lambda_{\text{збудж}}=380$ нм).

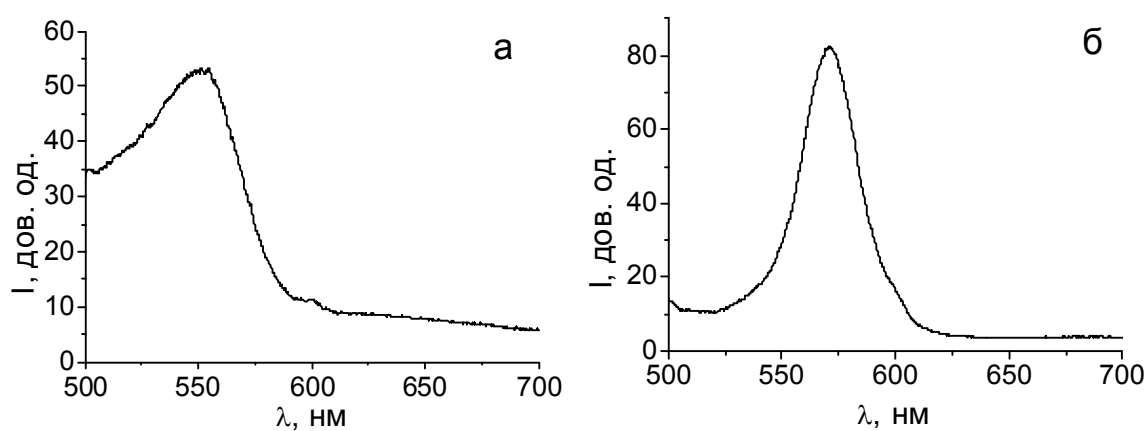


Рис. 2.36. Спектр люмінесценції квантових точок у плівках БР - КТ в золь-гельній (а) та желатиновій (б) матрицях, отриманих методом поливу ($\lambda_{\text{збудж}}=380$ нм).

При дослідженні структур золь-гельна SiO_2 матриця - БР - КТ за допомогою растрової електронної мікроскопії, як на поверхні (рис. 2.38), так і в об'ємі плівки (рис. 2.39) чітко видно включення окремих квантових точок (світлі фрагменти, які проявляються внаслідок катодолюмінесценції під дією електронного пучка). Результати статистичної обробки різних ділянок плівок показали, що в плівках БР в золь-гельних матрицях, на відміну від желатинових, КТ рівномірно розподілені по всьому об'єму нанокompозитної структури.

Результати досліджень свідчать про те, що внесення напівпровідникових квантових точок не впливає на оптичну якість та структуру поверхні плівок БР як в желатинових, так і в золь-гельних матрицях. Для золь-гельних матриць характерний рівномірний розподіл КТ по об'єму плівки, тоді як для желатинових - КТ концентровані переважно в одному шарі плівки. Структура, якість та тип матриці плівки суттєво не впливають на сумарну реєстровану люмінесценцію квантових точок у плівці.

Методика пошарового нанесення плівок. Характеристики двошарових структур на основі БР. Оскільки отримання плівок БР у золь-гельних матрицях з високою оптичною якістю і товщинами в межах 1 - 40 мкм є досить складним з технологічної точки зору, було запропоновано методику пошарового нанесення плівок БР. Дана методика є комбінацією методу поливу та центрифугування і передбачає нанесення на підкладку плівки БР, яка покривається тонким шаром золь-гелю. Схематичне зображення методу наведено на рис. 2.40.

Для таких структур відсутні механічні пошкодження зразків за рахунок внутрішніх напруг і, відповідно, покращується оптична якість плівок. Оскільки золь-гельне скло має високу пористість, речовини аналіти можуть вільно проникати у плівку для взаємодії з БР. Технологія виготовлення таких двошарових структур набагато простіша, а якість отриманих плівок набагато краща порівняно з плівками БР в золь-гельній матриці, які наносяться методом поливу.

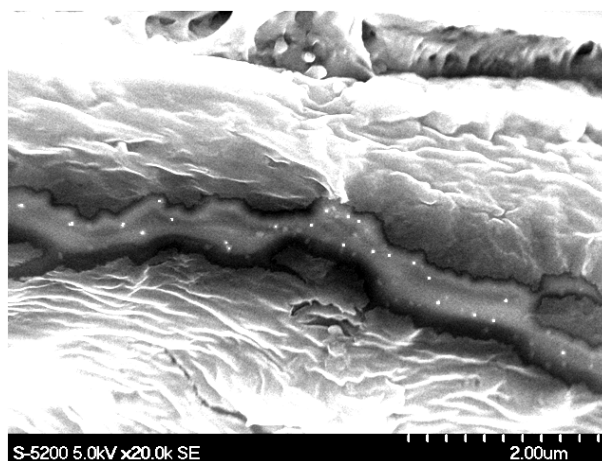


Рис. 2.37. РЕМ-зображення перерізу плівки *желатинова матриця - BR - КТ*.

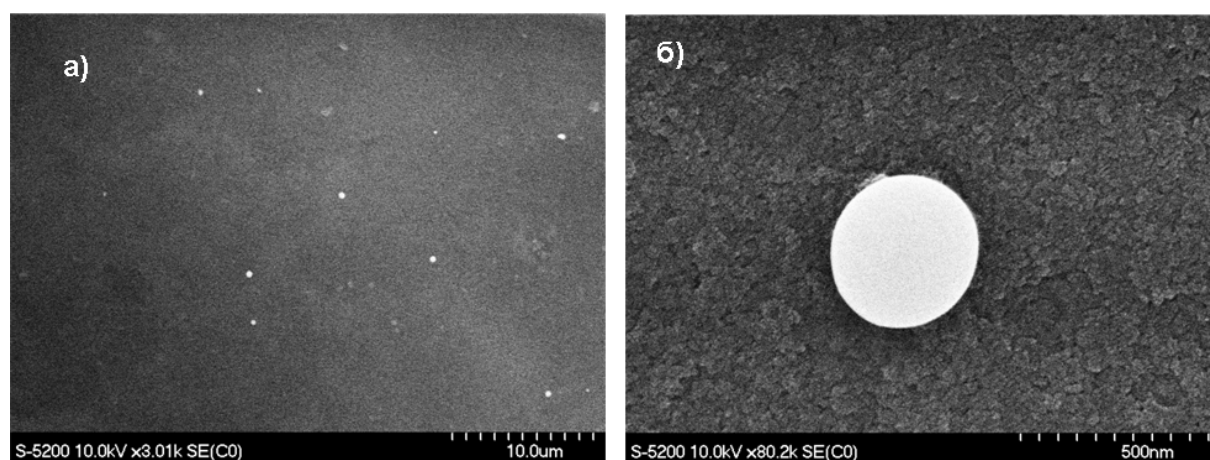


Рис. 2.38. РЕМ-зображення поверхні нанокompозитної плівки *SiO₂-матриця- BR-квантові точки*: а) збільшення – х 3010; б) збільшення – х 80200.

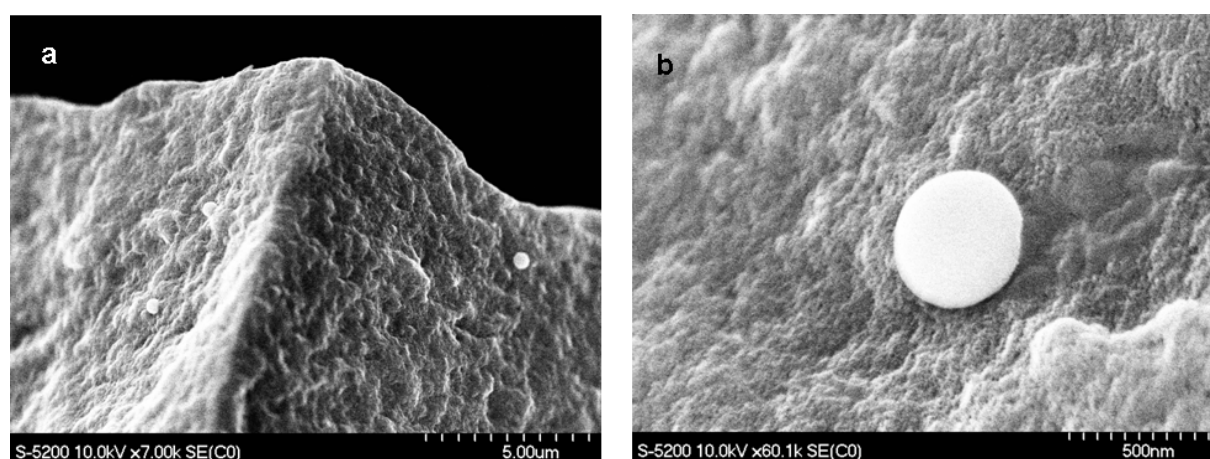


Рис. 2.39. РЕМ-зображення перерізу плівки *SiO₂ матриця-квантові точки- BR*: а) збільшення – х 7000; б) збільшення – х 80100 .

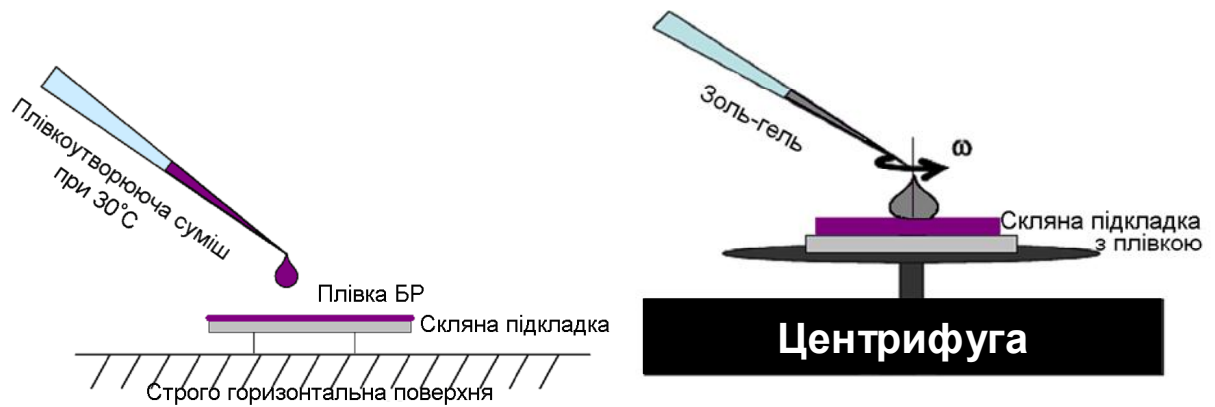


Рис. 2.40. Схема нанесення багатошарової плівки на основі бактеріородопсину із золь-гельним покриттям.

На рис. 2.41 наведено мікрознімки багатошарової плівки чистого золь-гелю у процесі послідовного нанесення шарів. Поверхня багатошарової структури однорідна, оскільки вона утворена із шарів одного і того ж матеріалу, всі шари мають однорідну гладку поверхню з шорсткістю на рівні 0,2-0,4 нм. При нанесенні методом центрифугування плівок із суміші золь-гелю і суспензії ПМ теоретично можна отримати багатошарові однорідні плівки без дефектів. Однак оскільки один шар буде мати товщину на рівні 5-10 нм, отримання багатошарових структур для досягнення потрібної товщини економічно не вигідне через великі витрати матеріалу в процесі виготовлення таких структур.



Рис. 2.41. Отримання тонких багатошарових SiO_2 плівок методом центрифугування: а) 1 шар, б) 2 шари, в) 3 шари.

Для виготовлення плівки БР запропонованим методом 0,5 мл водного розчину БР поміщали на очищену скляну підкладку і висушували в

ексикаторі протягом 24 год. Після того, як плівка БР висихала, зверху наносився шар золь-гельного SiO_2 скла. Для нанесення золь-гелю на плівку БР використовували метод центрифугування. У нашому випадку крапля плівкоутворюючої суміші об'ємом ~ 10 мкл наносилася на скляну підкладку, швидкість обертання якої складала 750 об/хв. Як і у випадку з плівками золь-гелю, отримуваними методом поливу, використовували 3 режими висушування: протягом 24 годин при кімнатній температурі, 48 год. при $4\text{ }^\circ\text{C}$ в холодильнику у відкритій чашці Петрі та протягом 6 діб при $4\text{ }^\circ\text{C}$ у закритій чашці Петрі. Мікроснімки поверхні отриманих плівок наведено на рис. 2.42. Як видно з фотографій, під час висихання на поверхні плівок з'являються мікротріщини. При висиханні золь-гелю при $4\text{ }^\circ\text{C}$ у закритій чашці Петрі дефекти поверхні відсутні. Останнє можна пояснити наступним чином. За рахунок тривалості процесу полімеризації (6 діб) і висихання в атмосфері насиченої пари розчинника, швидкість випаровування рідини із пор золь-гельного скла була дуже низькою. Останнє сповільнило процес «усадки» золь-гельного скла в процесі старіння і зробило можливим утворення додаткових зв'язків у структурі кістяка, які взяли на себе частину навантаження, спричиненого внутрішніми напруженнями.

На рис. 2.43. для порівняння наведено характеристики поверхні типових двошарових плівок БР, покритого тонким шаром золь-гелю, та плівки чистого БР без покриття. Дослідження отриманих двошарових структур за допомогою АСМ, показало, що після нанесення покривного шару золь-гелю, шорсткість плівок зменшується в середньому на 15-20% з 18,5 до 14,0 нм. Максимальний перепад по висоті зменшується майже на 30% - з 290 нм для плівок чистого БР до 205 нм для плівки БР, покритої шаром золь-гельного скла. Зменшення шорсткості поверхні досягається, як і у випадку зі скляною підкладкою, за рахунок заповнення нерівностей поверхні рідким розчином золь-гелю. Зменшення неоднорідностей поверхні приводить до зменшення розсіювання на неоднорідностях поверхні і підвищення оптичної якості плівки.

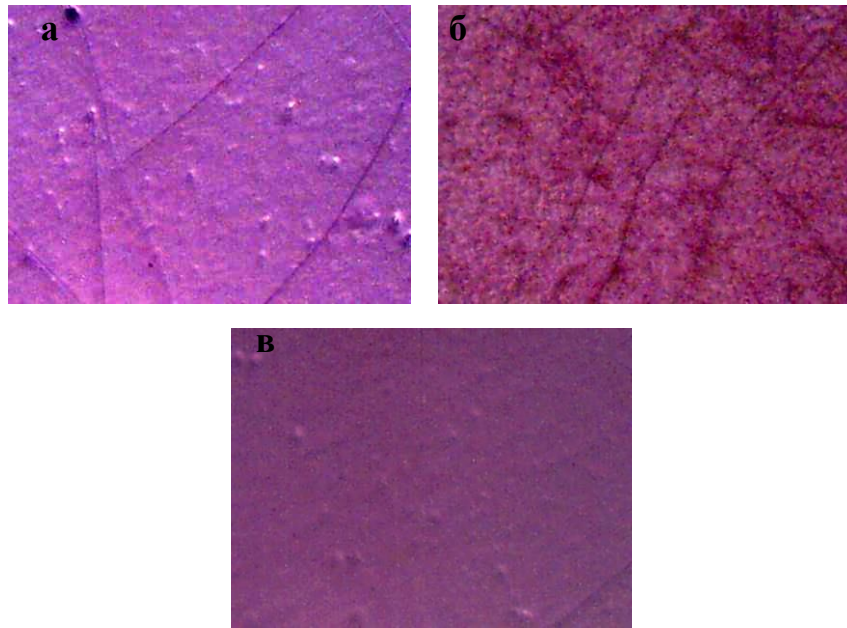


Рис. 2.42. Гелеутворення при кімнатній температурі (а), в холодильнику, у відкритій чашці Петрі (б), в холодильнику в закритій чашці Петрі (в).

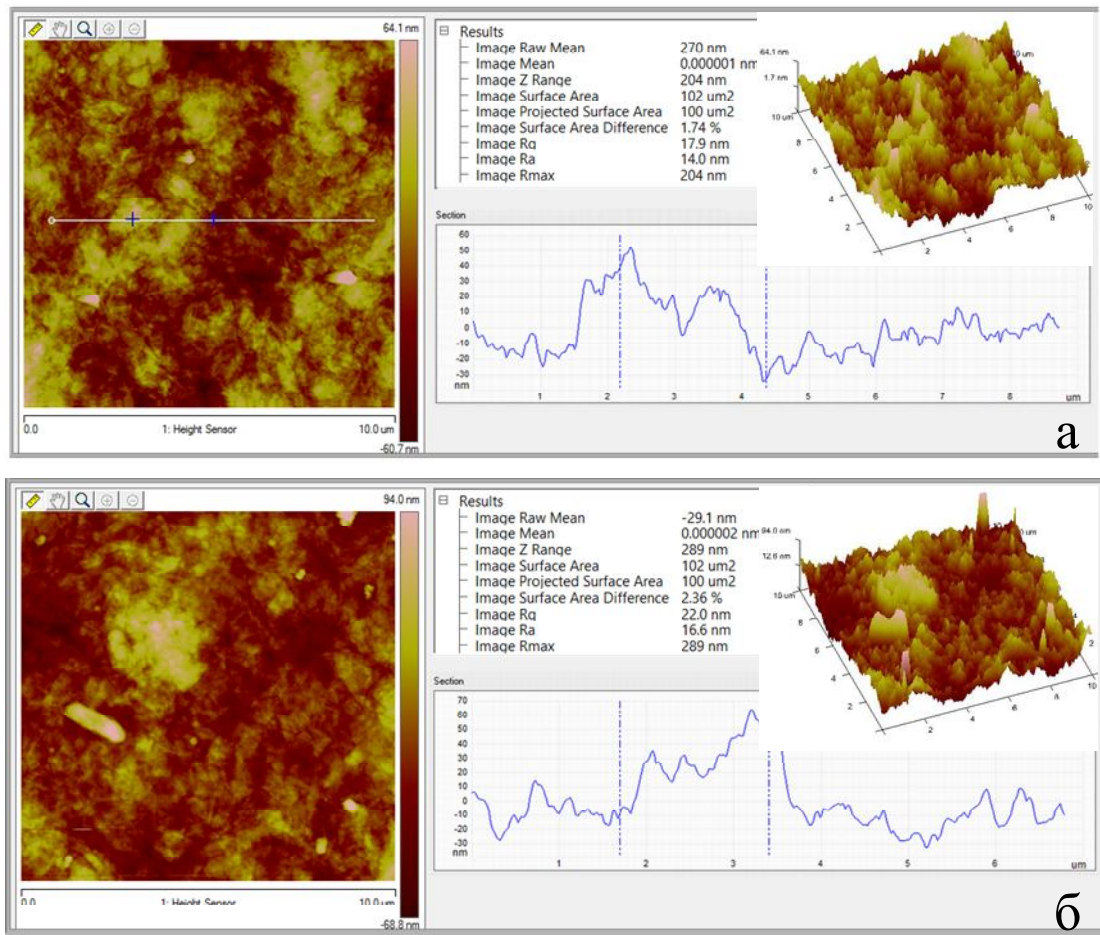


Рис. 2.43. Морфологія поверхні плівки чистого БР, покритої шаром золь-гелю (а), та плівки чистого БР без покриття (б).

На рис. 2.44. наведені спектри пропускання для плівки чистого БР, плівки золь-гелю та двошарової структури БР+золь-гель. Як видно з графіків, для скляної підкладки, покритої шаром золь-гельного скла, відсутні смуги поглинання в досліджуваному діапазоні. В той же час для плівки чистого БР та двошарової плівки БР, покритої шаром золь-гелю спостерігається чітка смуга поглинання в області 570 нм. Причому для двошарової плівки пропускання дещо зростає порівняно з плівкою чистого БР, незважаючи на виникнення додаткової межі поділу БР/золь-гель. Даний результат можна пояснити зменшенням розсіювання на неоднорідностях поверхні плівки.

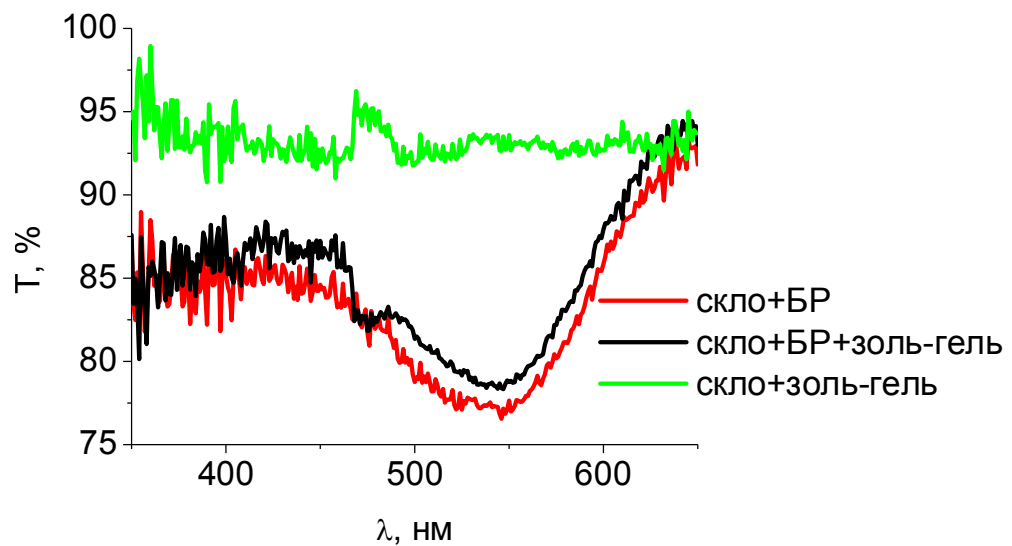


Рис. 2.44. Спектри пропускання плівок чистого золь-гелю, БР без матриці та плівки БР, покритої шаром золь-гелю.

В результаті використання даного методу нами були отримані двошарові плівкові структури на основі бактеріородопсину із задовільною оптичною якістю, які не руйнуються під дією води і можуть використовуватися як первинні перетворювачі для хімічних датчиків водних розчинів. Покриття плівки чистого БР тонким шаром золь-гельного скла приводить до вирівнювання поверхні плівки і зменшення розсіювання на неоднорідностях поверхні. Дослідження спектральних та динамічних характеристик показало, що при нанесенні покривного шару золь-гелю БР зберігає характерні функціональні та оптичні властивості.

Висновки до розділу 2

1. Проведено оптимізацію технологічних умов отримання плівкових структур на основі бактеріородопсину (вибір штаму, оптимізація часу обробки лізату ДНК-зою та УЗ-обробки плівкоутворюючої суміші) з метою покращення сенситометричної чутливості та збільшення величини фотоіндукованих змін у плівках на основі БР. Встановлено, що спектральний склад освітлення, яке використовується при культивуванні галобактерій, впливає на продуктивність отримання БР.

2. На основі комплексних досліджень морфології поверхні та перерізів плівок БР в різних матрицях за допомогою АСМ та РЕМ показано, що незалежно від типу матриці внесення фрагментів ПМ приводить до зростання шорсткості поверхні плівки більш ніж на порядок. Причому плівки, отримані методом поливу, характеризуються мінімальними значеннями шорсткості, а плівки, отримані методом центрифугування - максимальними. Використані методики нанесення забезпечують рівномірний розподіл БР по об'єму плівки, а фрагменти ПМ орієнтуються переважно паралельно поверхні підложки.

3. Показано, що у плівках як з полімерними, так і з золь-гельними матрицями переважають пори діаметром від 1,5 до 50 нм, що вказує на те, що плівки являються мезопористими, при чому ефективний об'єм пор для плівок на основі неорганічних матриць на 2,5 порядки перевищує аналогічний показник для плівок в органічних матрицях.

4. Виявлено, що внесення напівпровідникових квантових точок не впливає на оптичну якість та структуру поверхні плівок бактеріородопсину як в желатинових, так і в золь-гельних матрицях, при чому для золь-гельних матриць характерний рівномірний розподіл КТ по об'єму плівки, тоді як для желатинових КТ концентровані переважно в одному шарі плівки. Доведено, що люмінесцентне випромінювання квантових точок може запускати фотоцикл бактеріородопсину.

РОЗДІЛ 3. ВПЛИВ ВОЛОГОСТІ ТА АМІАКУ НА ОПТИЧНІ ПАРАМЕТРИ ПЛІВОК БАКТЕРІОРОДОПСИНУ

Водні розчини бактеріородопсину - зручні об'єкти для проведення дослідження змін оптичних параметрів БР під дією різних хімічних речовин. Хімічний склад таких розчинів суттєво впливає на параметри фотоциклу. Зокрема, в останні роки опубліковано ряд робіт, де представлено вплив рН, аміаку, деяких класів анестезуючих речовин [57-60, 65-68, 135-137, 140-142] на проходження фотоциклу БР, що й дозволило рекомендувати цей матеріал для створення чутливих елементів хімічних сенсорів [138]. З точки зору практичного використання для оптоелектроніки та біосенсорики найбільш зручними є плівкові структури на базі БР. У випадку використання плівок виникає цілий ряд додаткових параметрів, які впливають на характеристики матеріалу. Структура та стан матеріалу, тип та характеристики матриці, хімічний склад плівки, методика отримання, степінь гідратації - всі ці фактори можуть значно впливати на оптичні властивості БР у плівках [2, 5, 53, 54, 139-144]. В той же час, аналіз публікацій на момент початку дисертаційного дослідження показав, що дуже мала кількість робіт присвячена дослідженню властивостей БР у плівкових структурах. Як показано в деяких роботах [5, 53-56, 61, 62], тип матриці та хімічний склад може визначати селективність та чутливість плівок БР до певних хімічних компонентів розчинів та парогазових сумішей. Тому було проведено ряд досліджень, спрямованих на з'ясування впливу хімічного складу плівок та типу матриці на їх чутливість до певних параметрів навколишнього середовища. Зокрема було проведено дослідження впливу типу матриці на чутливість плівок до зміни відносної вологості. Крім того, проводилися дослідження чутливості плівок на основі БР з різними хімічними домішками до аміаку. Також проводилися дослідження можливості використання плівок на основі БР у різних матрицях для моніторингу водних розчинів аміаку. Дослідження показали, що чутливість і час відклику плівок БР до аміаку та

зміни відносної вологості можна покращити, використовуючи комбінації матриць та хімічних домішок. Оскільки селективність чутливих елементів на основі таких структур може задаватися хімічним складом плівки, виникає сприятлива ситуація створення сенсорної системи для газових середовищ та водних розчинів з однотипними чутливими елементами. Найбільш зручна їх реалізація у виді плівок, нанесених на торці оптичних волокон. Уніфікованість такого типу сенсорів дає можливість створення хімічної сенсорної системи з низькою вартістю, за допомогою якої можна проводити якісний та кількісний компонентний аналіз досліджуваного середовища.

3.1. Вплив зміни вологості навколишнього середовища на оптичні властивості плівок на основі БР

Вплив зміни вологості на спектральні характеристики плівок БР в різних матрицях. Вода відіграє важливу роль у функціонуванні молекули БР [139], оскільки у природних умовах білок знаходиться у водному середовищі. Інкorporація фрагментів ПМ в матеріал матриці проводить як до зменшення вологості середовища, так і до накладання певних механічних навантажень за рахунок виникнення внутрішніх напруг у структурі плівки. Відомо, що хімічний склад плівок може впливати на їх чутливість до зміни вологості [2, 53], тому дослідження впливу типу матриці на чутливість плівки до зміни вологості навколишнього середовища актуальна на даний момент задача. Для вирішення цього завдання було проведено дослідження впливу вологості на спектральні характеристики та динаміку фотоіндукованих змін для плівок БР у різних матрицях. Методика вимірювань детально описана в додатку В. Для експериментів використовувались желатинові плівки, матриця яких є водорозчинною, та золь-гельні плівки, які не є розчинними у воді. Для забезпечення ідентичності умов для всіх зразків плівки з різними матрицями та чиста скляна підкладка (для порівняння) розміщувалися на спільному тримачі в кварцовій кюветі, в якій створювався потрібний рівень вологості.

На рис. 3.1 наведено спектри поглинання плівок БР в желатиновій та золь-гельній матрицях при різних значеннях вологості. Як видно з рисунку, поведінка плівок при зміні вологості відрізняється для різних матриць, хоча для обох видів матриць реєструється зростання поглинання при збільшенні вологості. Для плівки з желатиновою матрицею суттєве збільшення висоти максимуму поглинання спостерігається лише для максимального рівня вологості. У діапазоні 47% - 66% спостерігаються несуттєві зміни висоти максимуму поглинання. Загальна зміна висоти максимуму поглинання при зміні вологості від 47% до 97% становить майже 17 %. Зменшення оптичної густини в області 412 нм фіксується лише при досягненні максимальної вологості. Спектрального зсуву при зменшенні вологості не спостерігається. Отримані результати узгоджуються з літературними даними [137], де автори спостерігали збільшення поглинання у плівках БР без матриці при збільшенні вологості.

У випадку золь-гельної матриці спостерігається більш складна зміна оптичної густини при зміні відносної вологості. При зростанні вологості від 47% до 66% реєструється незначне зменшення висоти максимуму поглинання. При подальшому зростанні вологості реєструється зростання його висоти, як і у випадку желатинових плівок. Слід відмітити, що для золь-гельних плівок характерна менша величина відношення сигнал/шум порівняно з желатиновими плівками. Це пов'язано з гіршою оптичною якістю золь-гельних плівок, що приводить до збільшення розсіювання. Зміна висоти максимуму оптичної густини при зміні вологості від 47% до 97% становить більше 22%. Зменшення оптичної густини в області 412 нм спостерігається не лише для максимальної вологості, а й для менших значень.

На диференційних спектрах, отриманих відніманням спектру пропускання плівки при 47% від спектрів пропускання плівки при більших значеннях вологості (рис. 3.2), чітко видно, що основні зміни відбуваються в області 570 та 412 нм. Даний факт служить доказом того, що спостережувані зміни є результатом впливу вологості на властивості БР. Для желатинової

матриці виникнення негативної смуги в області 570 нм супроводжується формування позитивної смуги в області 412 нм. У випадку золь-гельної матриці зростання вологості приводить до формування незначної позитивної смуги в області 570 нм, яка при зростанні переходить у негативну. Формування смуги в області 412 нм не спостерігається імовірно через високий рівень шумів. Такі зміни пропускання свідчать про зміну рівноваги між основним станом BR_{570} та основним інтермедіатом M_{412} під дією вологості.

Крім дослідження спектральних характеристик проводився моніторинг зміни пропускання на характеристичних довжинах хвиль для плівок БР в різних матрицях при неперервній зміні вологості в діапазоні від 30 до 85%. Результати таких досліджень наведені на рис. 3.3 для желатинової та золь-гельної матриць відповідно. Для моніторингу на 570 нм спостерігаються зміни, аналогічні до тих які спостерігалися у випадку фіксованих значень вологості. У випадку желатинової матриці основна зміна пропускання на 570 нм спостерігається в діапазоні від 30% до 60%. Далі суттєвих змін не відбувається. У той же час для золь-гельної плівки в діапазоні низьких значень вологості пропускання практично не змінюється. Так при зростанні вологості від 40% до 60% спостерігається незначне зростання пропускання, що узгоджується з результатами, отриманими для статичних значень вологості. При подальшому зростанні вологості спостерігається досить різке зменшення пропускання. У той же час зміна пропускання на 412 нм для желатинових матриць демонструє нетипову поведінку. У випадку золь-гельної матриці зменшення пропускання на 570 нм корелює зі зростанням пропускання на 412 нм. Це можна пояснити зменшенням часу перебування молекул у проміжному стані M_{412} при збільшенні вологості. Для желатинових матриць аналогічна кореляція спостерігається в діапазоні вологостей від 30-45%. Далі спостерігається зменшення пропускання як на 570, так і на 412 нм. Така поведінка не може бути пояснена в рамках теорії фотоциклу, тому даний ефект скоріше за все пов'язаний зі змінами характеристик матриці

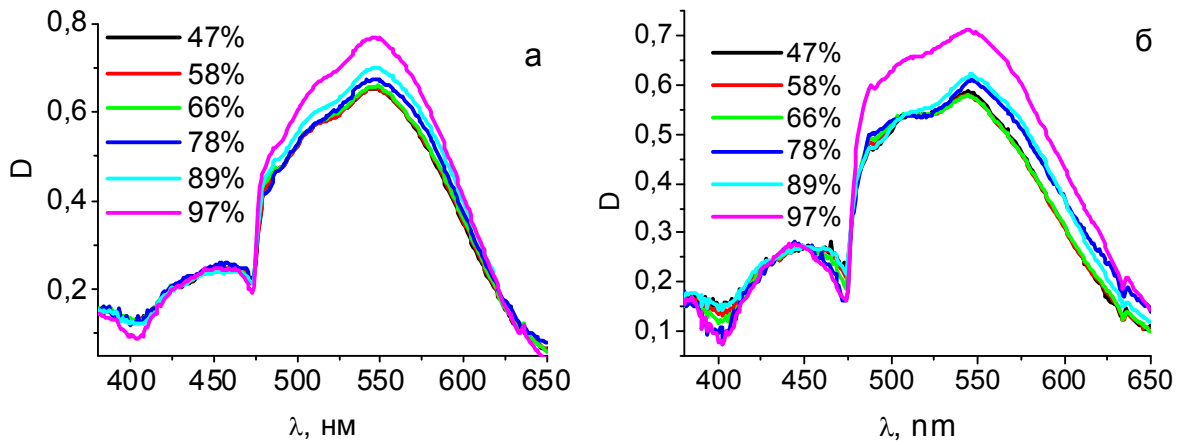


Рис. 3.1. Спектри поглинання плівки БР в желатиновій (а) та золь-гельній (б) матриці при різних значеннях відносної вологості.

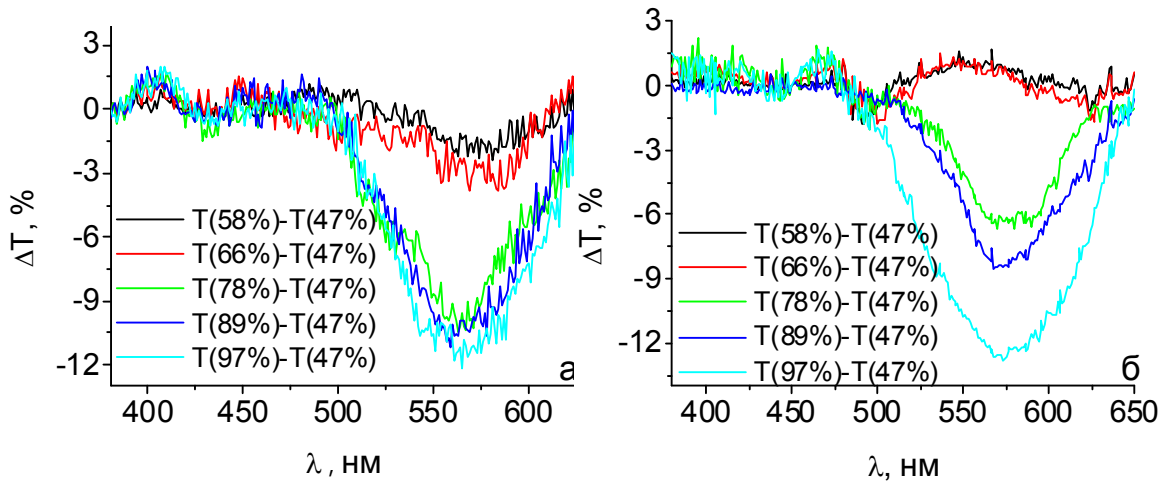


Рис. 3.2. Диференційний спектр пропускання для плівок БР у желатиновій (а) та золь-гельній (б) матриці.

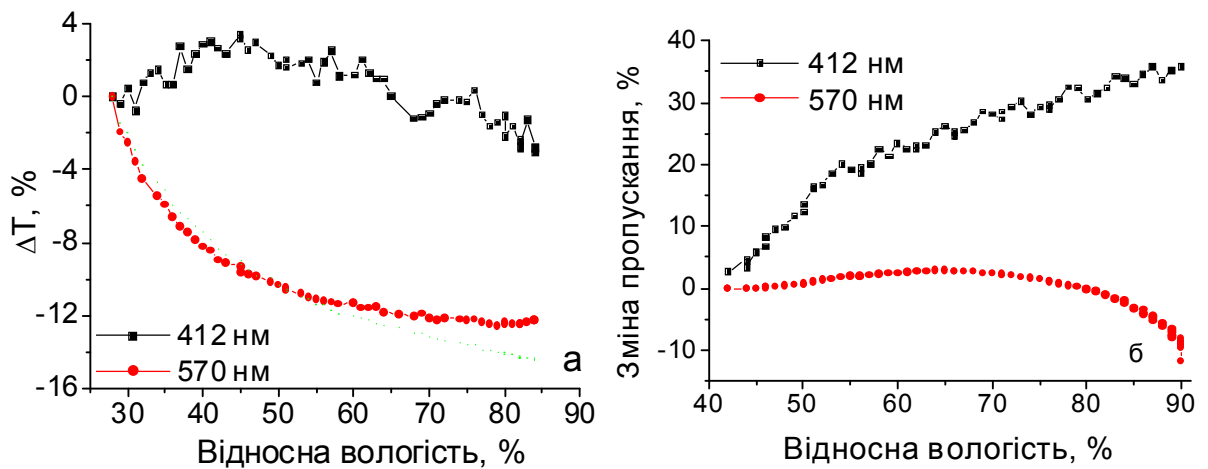


Рис. 3.3. Зміна пропускання на характерних довжинах хвиль при зміні вологості для плівки БР у желатиновій (а) та золь-гельній (б) матриці.

Відмінності у динаміці зміни характеристик при неперервному зростанні вологості можна пояснити також за рахунок різної пористості плівок. Оскільки желатинова матриця характеризується малою пористістю, молекулам води потрібно набагато більше часу, щоб проникнути всередину плівки і змінити ступінь гідратованості всіх молекул БР. Цим частково пояснюється нетипова залежність пропускання плівок БР на 412 та 570 нм при зміні вологості. У випадку ж плівки у золь-гельній матриці, висока пористість дозволяє воді проникати у плівку по всьому об'єму практично синхронно зі зміною вологості навколишнього середовища. Тому зміни у випадку золь-гельної матриці як на 570 нм так і на 412 нм можна пояснити в рамках теорії фотоциклу у всьому діапазоні зміни вологості. Такі плівки можна використовувати для моніторингу вологості в широкому діапазоні.

Вплив зміни вологості на динаміку фотоциклу БР у плівках з різними матрицями. Для дослідження кінетики фотоіндукованих процесів у плівках БР при різній вологості проводилися дослідження зміни пропускання плівок при дії збуджуючого випромінювання. Дослідження проводилися на довжинах хвиль 412 та 570 нм для кожного значення вологості.

Методика проведення досліджень була наступною. На початковому етапі фіксувався темновий струм фотоприймача спектрофотометра, щоб виключити похибки, спричинені перепадами напруги чи роботою приладу. Потім відкривали шторку фотоприймача і фіксували інтенсивність сигналу на потрібній довжині хвилі. Після цього вмикали збуджуюче випромінювання і реєстрували зміну сигналу, яка була спричинена зміною пропускання БР під дією випромінювання. Після того як процеси прямих та зворотних переходів між основним станом та інтермедіатом M_{412} врівноважуються, сигнал стабілізується. Зазвичай для стабілізації пропускання плівки було достатньо 150 с. Після стабілізації сигналу збуджуюче випромінювання вимикали і фіксувалася динаміка зміни пропускання плівки, спричинена переходом молекул БР зі збудженого в основний стан.

Типові криві зміни пропускання в на 570 нм під дією зовнішньої засвітки для плівки бактеріородопсину у желатиновій матриці зображено на рис. 3.4. Аналогічні дослідження проводилися і для довжини хвилі 412 нм. Алгоритм проведення експерименту аналогічний до попереднього випадку. Зміна пропускання плівки після зняття зовнішнього збуджуючого випромінювання на довжинах хвиль 412 нм та 570 нм при різних вологостях для плівок БР у різних матрицях наведено на рис. 3.5 та рис. 3.6. Як видно з результатів, поведінка сигналу на різних довжинах протилежна: після зняття збуджуючого випромінювання на 570 нм спостерігається зменшення пропускання, в той час як на 412 - зростання. Це пояснюється тим, що після зняття зовнішньої засвітки молекули переходять з інтермедіату M_{412} в основний стан. Наявність таких змін пропускання підтверджує, що інтенсивність засвітки достатня для запуску фотоциклу.

На основі отриманих кривих можна обчислити зміну пропускання (ΔT) плівки БР під дією збуджуючого випромінювання та оцінити залежність цієї величини від вологості. Динаміка зміни пропускання дає можливість розрахувати значення напівперіоду життя інтермедіату M_{412} ($\tau_{1/2}$) при різних значеннях вологості. Фізичний зміст напівперіоду життя інтермедіату M_{412} - це час, за який половина молекул релаксує з проміжного інтермедіату M_{412} в основний стан при відсутності зовнішнього освітлення. Даний параметр дозволяє зробити висновки про зміни у проходженні фотоциклу.

Значення, розраховані на основі експериментальних кривих, наведено на рис. 3.7 та рис. 3.8. Як видно з результатів, на довжині хвилі 570 нм фотоіндукована зміна пропускання ΔT зростає майже лінійно при зменшенні вологості як для золь-гельної, так і для желатинової плівки. Слід відмітити, що для плівки БР у золь-гельній матриці залежність величини фотоіндукованої зміни пропускання від вологості наближена до лінійної у всьому діапазоні. В той же час для желатинової плівки лінійність спостерігається лише в при зміні вологості від 47% до 89%. При збільшенні вологості до максимального значення спостерігається різке зменшення ΔT .

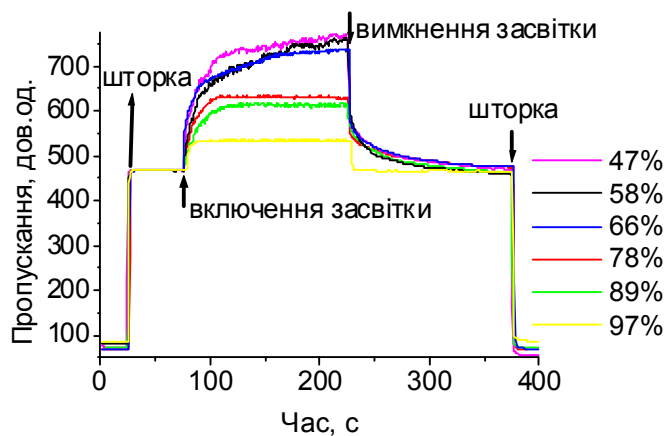


Рис. 3.4. Зміна пропускання плівки БР в желатиновій матриці під дією зовнішнього освітлення при різних значеннях вологості.

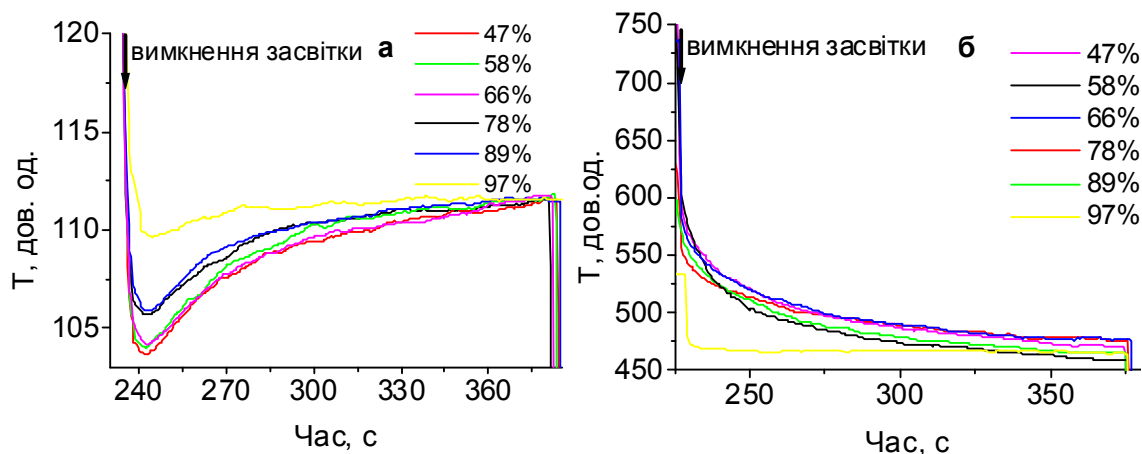


Рис. 3.5. Зміна пропускання плівки БР у желатиновій матриці на $\lambda = 412$ нм (а) та $\lambda = 570$ нм (б) після зняття засвітки при різних вологостях.

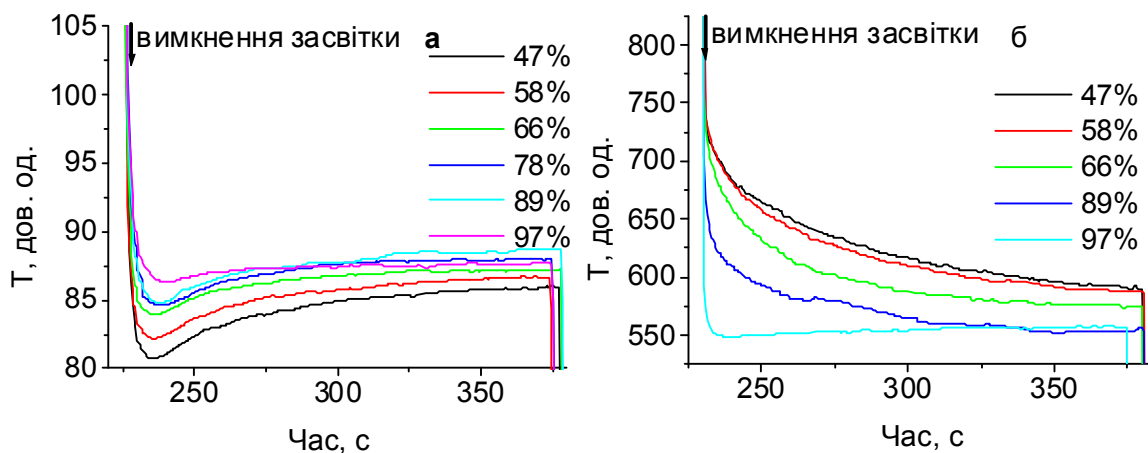


Рис. 3.6. Зміна пропускання плівки БР у золь-гельній матриці на $\lambda = 412$ нм (а) та $\lambda = 570$ нм (б) після зняття засвітки при різних вологостях.

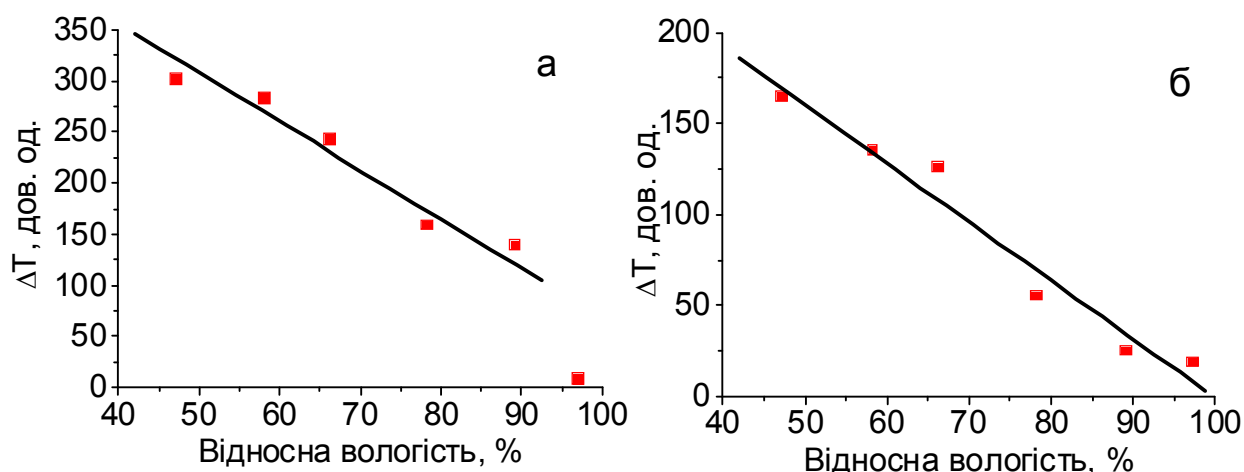


Рис. 3.7. Залежність величини фотоіндукованої зміни пропускання на 570 нм від вологості для желатинової (а) та золь-гельної (б) плівок БР.

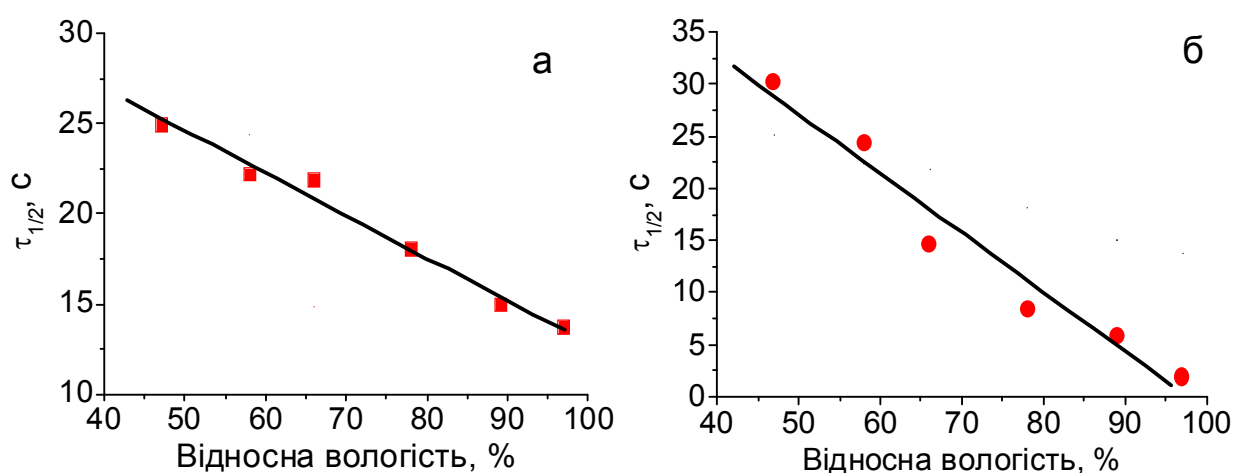


Рис. 3.8. Залежність напівперіоду життя інтермедіату M_{412} від вологості для плівок БР в желатиновій (а) та золь-гельній (б) матрицях.

Для обох типів плівок також спостерігається збільшення $\tau_{1/2}$ при зменшенні вологості. Величина зміни $\tau_{1/2}$ для желатинової плівки становить близько 12 с при зміні вологості від 47% до 97%. Для золь-гельної плівки при даних умовах спостерігається зміна $\tau_{1/2}$ на 28 с. Як видно з рисунку, різкого зменшення часу життя інтермедіату M_{412} при максимальних значеннях вологості не спостерігається ні для желатинової ні для золь-гельної плівки. Звідси можна зробити висновок, що різка зменшення величини фотоіндукованої зміни для желатинової плівки при максимальному значенні вологості (Рис. 3.7. а) скоріше за все зумовлена змінами характеристик

желатинової матриці, оскільки аналогічних змін у проходженні фотоциклу не спостерігається.

Механізм впливу води на характеристики плівкових структур БР у різних матрицях. Спираючись на літературні дані та результати наших досліджень, можна сформулювати наступний алгоритм функціонування протонного каналу у суспензіях пурпурних мембран та нативних мікроорганізмах. Активна область молекули БР складається з протонованої Шифової основи (ШО), ковалентно зв'язаного з нею ретиналю, амінокислотного залишку Asp85, який виступає в ролі протиіону, та зв'язаної води, що стабілізує дані заряджені групи [143, 144].

Поглинання ретиналем кванту світла приводить до його фотоізомеризації з all-транс до 13-цис стану, зміни геометрії та перебудови π -електронної системи вздовж його ланцюга. Внаслідок цього, різниця pK_a між ШО та Asp85 зменшується від 5 до менш ніж 1, що в свою чергу приводить до депротонування ШО та передачі протону до Asp85 [145]. Оскільки Asp85 протонується, pK_a Glu204 зменшується з 9 до 5. У результаті Glu204 передає свій протон Glu194, а потім він випускається з зовнішньоклітинної поверхні мембрани. При нейтральних (фізіологічних) рН випуск протону є енергетично вигідний. Депротонування Glu204 приводить до подальшого зростання pK_a Asp85 і зсуває рівновагу протонування ШО до майже повної передачі протону [146]. Цей перехід ідентифікують як $M_1 \rightarrow M_2$. Він завершує першу фазу транспортного циклу. Тепер репротонування ШО від Asp85 більше не є можливим.

Передача протону від ШО до Asp85 та перерозподіл зарядів приводить до локальних конформаційних змін та структурних перебудов у білковій компоненті БР. Дифракційні знімки нейтронної, рентгенівської та електронної мікроскопії М-стану демонструють зростання густини у цитоплазматичній області спіралі В та G [144]. Синє зміщення максимуму поглинання хромофору з депротонованою ШО в цей момент у мутанта D96N та відсутність останнього у дикого штаму [147] свідчать про те, що на даному

етапі фотоциклу ШО зв'язана з Asp96, імовірно через внутрішні молекули води [144]. Отже, коли після передачі протону до Asp85 зворотна його передача стає енергетично не вигідною через збереження високого pK_a цього залишку, зв'язок ШО "перемикається" до Asp96. Існування таких змін "доступності" базується на геометричній перебудові ШО, про що свідчить також те, що транспорт проходить навіть коли Asp96 та Asp85 заміщені нейтральними залишками [148]. Саме зміни локальної геометрії ініціюють другий етап протонної транслокації.

В цей момент фотоциклу pK_a ШО рівне 8, тобто набагато нижче за його початкову величину (близько 13), але pK_a Asp96 залишається все ще вище 11, тобто таким, яким воно було на початку. Пізніше pK_a зменшиться до 7, таким чином роблячи Asp96 донором протону для ШО. Причиною цього є подальші конформаційні зміни у білковій частині молекули, що полягають у відхиленні цитоплазматичного кінця спіралі F.

Результати дослідження дегідратації цитоплазматичної області осмотичними агентами та гідростатичним тисками дозволяють припустити, що саме збільшення гідратації даної області білка понижує pK_a Asp96 і робить його донором [144]. Збільшення гідратації цитоплазматичної частини протонного каналу відбувається за рахунок відхилення кінця спіралі F. Повернення кінця спіралі F до вихідного положення відновлює високий рівень pK_a цього залишку, чим забезпечує його репротонування з цитоплазматичної поверхні.

Репротонування ШО приводить до зменшення pK_a Asp85 і передачі його протону до Glu204. Після цього відбувається реізомеризація ретиналю до викривленого all-транс стану. Релаксація викривленого ретиналевого ланцюга приводить до зворотних структурних перебудов, що в свою чергу приводить до зменшення гідратації цитоплазматичної частини каналу, відновлення початкового рівня pK_a Asp96 і до його наступного протонування з цитоплазматичної поверхні, що по суті завершує фотоцикл. Відновлення початкових властивостей Asp85 ($pK_a=2.5$) та Glu204 ($pK_a=9$) забезпечує

неможливість зворотної передачі протону. Саме тому, що Asp85 повертається до свого попереднього низького значення pK_a , протонний транспорт може проходити знову навіть проти високого трансмембранного протонного градієнту [149].

Для плівкових структур та зразків, де молекули БР зафіксовані у певній матриці, механізм функціонування протонного каналу має свої особливості, про що свідчать результати різних авторів [63, 64, 110, 113, 137, 140, 150-152]. Плівки БР, які використовуються для досліджень, можна розділити на два типи: а) чисті плівки БР, які отримують різними способами з суспензії ПМ у дистильованій воді [137, 140, 150, 151]; та б) плівки, де молекули БР впроваджені в певну полімерну чи неорганічну матрицю. Найчастіше як матрицю використовують желатину [63, 139, 150]. Є дані про можливість використання в ролі матриці неорганічних матеріалів, отриманих за допомогою золь-гельної технології [113, 152]. Для плівок БР при 100% вологості параметри дуже близькі до характеристик суспензій БР. Так, у роботі [139] автори приводять результати, які свідчать про ідентичність раманівських спектрів, у роботі [137] автори не зафіксували суттєвих відмінностей у параметрах фотоциклу вологих плівок та суспензій БР. Однак висушування вологих плівок приводить до значних змін у спектрах плівок та кінетиці фотоциклу. У багатьох роботах зареєстровано збільшення напівперіоду життя інтермедіату M_{412} як для чистих плівок, так і для плівок у різних матрицях [64, 111, 113, 137, 139, 150-152]. У роботі [63] наведені дані про формування фотопродукту з максимумом поглинання на 660 нм у хімічно модифікованого БР з 14-F-ретиналем для дикого штаму та D96N мутанту, яке спостерігалися для суспензій при опроміненні жовтим світлом. Для плівкових структур того ж складу формування даного фотопродукту спостерігалося лише для дикого штаму при рівні відносної вологості не менше 84%. Висушування плівок проявляється у зростанні швидкостей первинних реакцій фотоциклу, які відповідають за утворення інтермедіату

M_{412} , та зменшення швидкостей переходів другої частини фотоциклу. Також зафіксовано появу серії реверсивних та шунтуючих переходів [137].

Виділяють два основні моменти, які відрізняють стан молекули БР у суспензії від плівки і можуть відповідати за зміни, які спостерігаються. По-перше, у плівці маємо певний фіксований рівень вологості, тоді як у суспензії і у нативних мікроорганізмах кількість молекул води, які припадають на молекулу БР, не обмежується. По-друге, у плівкових структурах молекули БР тим чи іншим чином зафіксовані, що може додатково обмежувати їх рухливість при конформаційних перетвореннях.

Відомо, що вода відіграє важливу роль у функціонуванні протонного каналу [137, 139]. Молекули води безпосередньо взаємодіють з ШО, стабілізуючи положення протону відносно протиіону. При висушуванні плівок проходить перерозподіл та зменшення кількості молекул води в протонному каналі. Оскільки протиіон має більшу основність, відбувається зміщення протону до протиіону. Однак протон не повністю відривається від ШО, про що свідчить не дуже велике зміщення (з 570 \rightarrow 530) [139]. Таке структурне розміщення протону впливає на первинні процеси, що проходять після фотозбудження. Якщо у суспензіях після поглинання фотону проходить ізомеризація ретиналю, то у плівках при низьких рівнях вологості в першу чергу відбувається переміщення протону до ШО [139]. Іншим важливим процесом, у якому вода відіграє важливу роль – репротонування ШО від Asp96. Саме за рахунок збільшення гідратації цього залишку при відхиленні цитоплазматичного кінця спіралі F понижується його pK_a і передача протону до ШО стає енергетично вигідною [143].

Як видно з отриманих результатів, для обох типів плівок спостерігаються зміни, які добре узгоджуються з описаним вище механізмом впливу зміни вологості на характеристики БР. У той же час спостерігається нетипова зміна характеристик плівки в желатиновій матриці при вологостях, близьких до 100%. Оскільки для золь-гельної плівки таких відмінностей не спостерігається, такі зміни, ймовірно, спричинені впливом високої вологості

на властивості желатини, яка є водорозчинним матеріалом. Відмінності, які спостерігаються при моніторингу зміни параметрів плівки при зростанні вологості в режимі реального часу, можуть бути пояснені за рахунок різної пористості плівок. У той час як для золь-гельних матриць за рахунок високої пористості вологість в об'ємі плівки буде змінюватися практично синхронно з вологістю в камері, для желатинових плівок зменшення кількості води у плівці буде відбуватися набагато повільніше.

Підсумовуючи, можемо зробити висновок, що тип матриці в значній мірі впливає на чутливість плівок БР до зміни вологості, причому для плівок в золь-гельних матрицях, на відміну від желатинових плівок, зміни параметрів можна пояснити змінами у проходженні фотоциклу у всьому досліджуваному діапазоні вологостей.

3.2. Вплив аміаку на оптичні параметри плівок БР

Вплив хімічного складу плівки на чутливість до дії аміаку. Відомо, що наявність хімічних домішок може суттєво впливати на чутливість параметрів плівок БР до зміни вологості [2, 53]. Також відомо, що аміак, навіть у малих кількостях присутній в атмосфері довкола плівки, може суттєво впливати на перебіг фотоциклу та спектральні особливості поглинання плівок [574, 73-75]. Тому наступним етапом наших досліджень було вивчення впливу хімічного складу плівки на її чутливість до аміаку. Для цього проведено серію вимірювань для плівок БР в желатинових матрицях без домішок та з домішками триетаноламіну (ТЕА), аргінінхлориду (АГХ) та комбінацією ТЕА з АГХ. Проводилися дослідження динаміки фотоіндукованих змін на характеристичних лініях фотоциклу БР: 412 нм та 570 нм у присутності аміаку та без нього. Методика досліджень описана в додатку Г.

На початковому етапі роботи були проведені якісні дослідження впливу парів аміаку на параметри плівок БР. У процесі вимірювання плівка поміщалася у герметичну кварцову кювету, концентрація парів аміаку у якій

здавалася за допомогою пробірки з водним розчином аміаку відомої концентрації. Для пробних досліджень використовувався 10%-ий розчин аміаку. Отримані результати наведені на рис. 3.9 та 3.10.

Як видно із графіків, наявність парів аміаку в атмосфері істотно впливає на кінетику фотоциклу БР. На рисунках наведені часові залежності на двох довжинах хвиль: 412 нм та 570 нм для кожної плівки. Той факт, що присутність парів аміаку викликає зміни на обох довжинах хвиль, ще раз доводить, що присутність аміаку приводить до зміни динамічних характеристик саме фотоциклу. По отриманим кривим були розраховані напівперіод життя інтермедіату M_{412} та величина фотоіндукованих змін на 570 нм для різних плівок. Результати розрахунків наведені у таблиці 3.1.

Таблиця 3.1.

Залежність характеристик плівок бактеріородопсину різного хімічного складу від наявності аміаку.

Склад плівки	Аміак відсутній		Аміак наявний (10%)	
	$\tau_{1/2}$, с	ΔT , %	$\tau_{1/2}$, с	ΔT , %
БР+желатина+ТЕА	17,3	19,24	25,2	23,30
БР+желатина	3,2	13,65	60,0	47,65
БР+желатина+АГХ	13,2	9,65	43,9	55,09
БР+желатина+ТЕА+АГХ	26,0	20,51	31,4	44,79

Як видно із таблиці, в присутності аміаку суттєво змінюється як напівперіод життя інтермедіату M_{412} , так і величина фотоіндукованих змін пропускання. Величина змін залежить від складу плівки. Найбільш чутливою до наявності аміаку є плівка без домішок. Найменші зміни зафіксовані для плівок з домішкою триетаноламіну.

Присутність аміаку відображається не лише на динаміці переходів фотоциклу а й на спектральних характеристиках плівок. Індуковані аміаком спектральні зміни поглинання плівок БР в желатиновій матриці без домішок та з додаванням триетаноламіну, наведені на рис. 3.11.

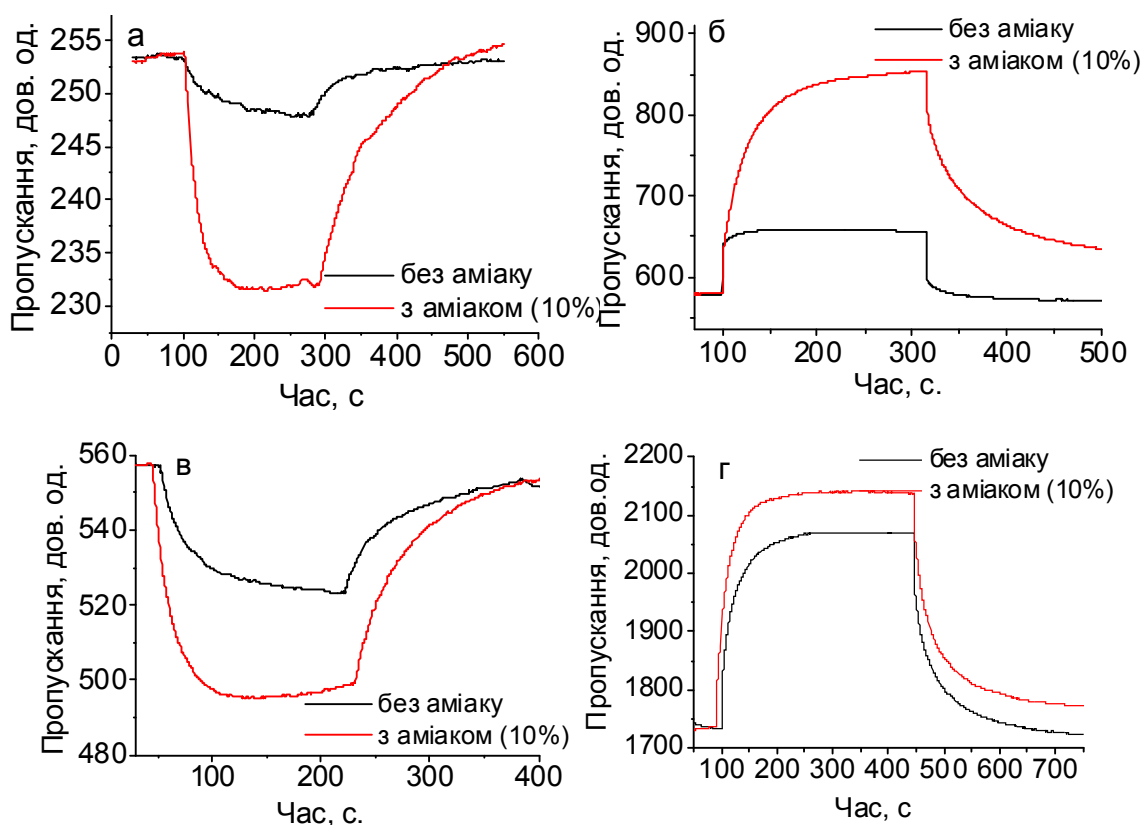


Рис. 3.9. Динаміка зміни пропускання на 412 нм (а, в) та 570 нм (б, г) для плівки БР без домішок та з добавкою ТЕА при додаванні аміаку.

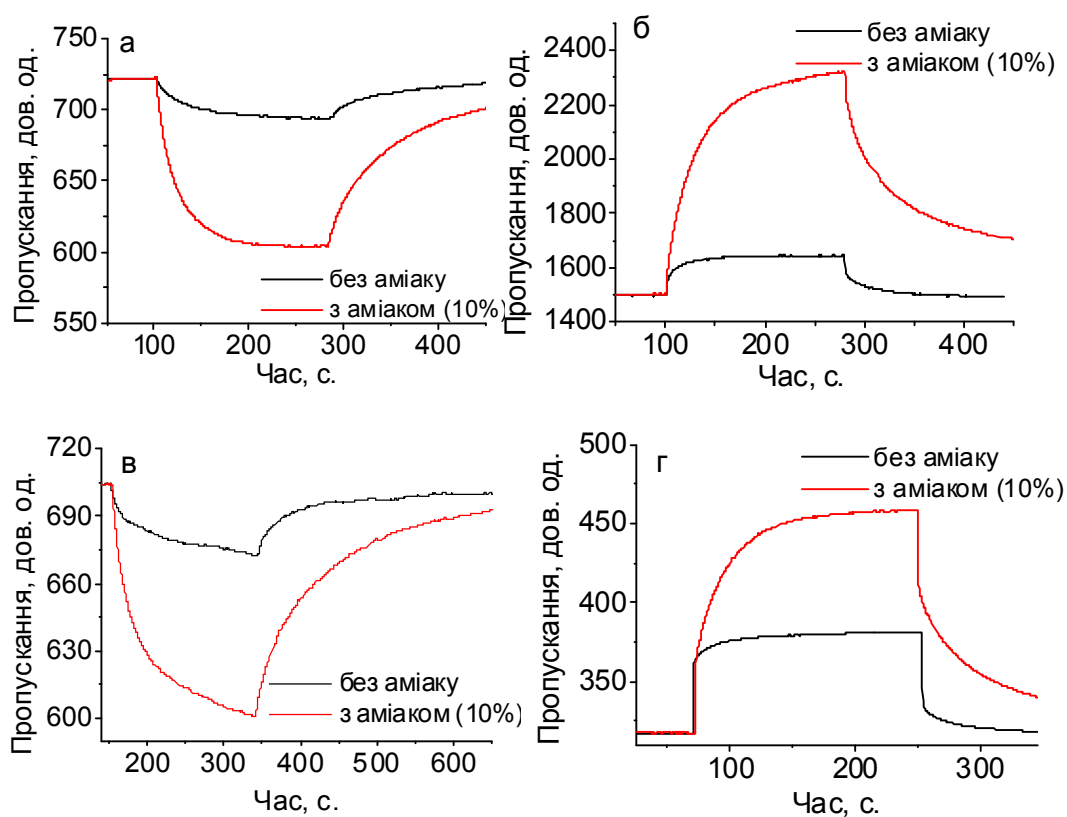


Рис. 3.10. Динаміка зміни пропускання на 412 нм (а, в) та 570 нм (б, г) для плівки БР з домішкою АГХ та АГХ+ТЕА, відповідно.

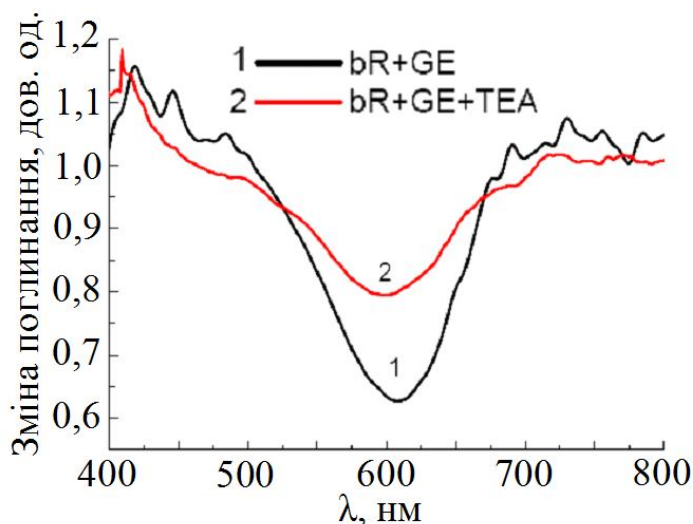


Рис. 3.11. Спектри індукованих аміаком змін поглинання (відношення спектра поглинання при наявності аміаку концентрацією 10% до спектра поглинання на чистому повітрі: чорна крива 1 – плівка БР без домішок; червона крива 2 - плівка БР з ТЕА.

Згідно закону Ламберта-Бугера-Бера спектри поглинання можуть бути описані, використовуючи вираз 3.1:

$$A(\lambda) = \varepsilon(\lambda) \cdot C \cdot L, \quad (3.1)$$

де $A(\lambda)$ – поглинання на довжині хвилі λ ; $\varepsilon(\lambda)$ – коефіцієнт затухання на довжині хвилі λ ; C – концентрація БР у плівці; L – товщина плівки БР.

При цьому лише оптичні властивості ($\varepsilon(\lambda)$) БР залежні від впливу аміаку, в той час як концентрація БР та товщина плівки не залежать від впливу аміаку. Отже, відношення спектрів однієї плівки дослідженої при різних умовах, наприклад, у присутності аміаку та на чистому повітрі виключить C та L з рівняння 3.2:

$$\frac{A(\lambda, NH_3 [10\%])}{A(\lambda, NH_3 [0\%])} = \frac{\varepsilon(\lambda, NH_3 [10\%]) \cdot C \cdot L}{\varepsilon(\lambda, NH_3 [0\%]) \cdot C \cdot L} \quad (3.2)$$

Одержані результати підтверджують те, що чутливість до аміаку вища у плівки БР у желатиновій матриці без хімічних добавок порівняно з плівкою, в якій присутній ТЕА. На нашу думку, амінні групи триетаноламіну та молекули аміаку мають аналогічний механізм впливу на БР, тому

наявність триетаноламіну частково нівелює вплив аміаку на БР та зменшує амплітуду оптичного відклику плівки БР порівняно з плівкою БР без хімічних добавок.

На рис. 3.12 графічно зображені зміни поглинання у плівках БР у желатиновій матриці без домішок та з триетаноламіном індуковані різними концентраціями аміаку. Плівка БР без хімічних добавок демонструє кращу чутливість та менший час відклику порівняно із плівкою БР з ТЕА. Мінімальна концентрація, при якій можна спостерігати зміни пропускання (LOD, розрахована по формулі 3.3) для плівки БР з ТЕА становить 18 ppm, що в 3 рази вище ніж для плівки БР без домішок.

$$LOD = 3 \frac{\sigma}{m}, \quad (3.3)$$

де σ – стандартне відхилення, а m – нахил калібровочної кривої.

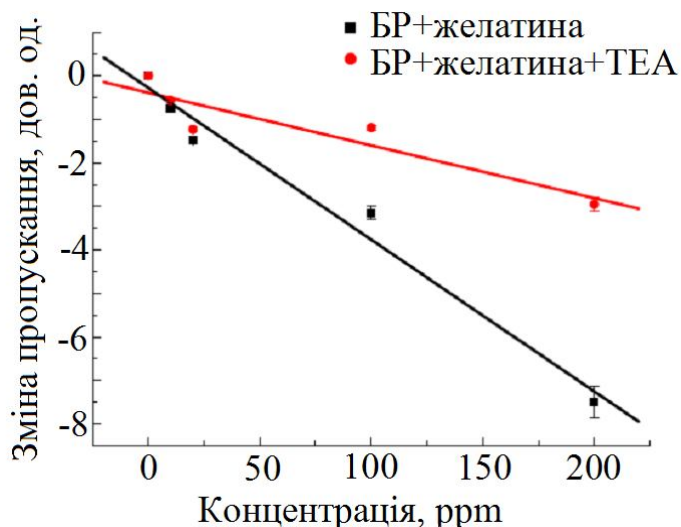


Рис. 3.12. Залежність фотоіндукованої зміни пропускання плівки БР на 570 нм від концентрації парів аміаку для плівок чистого БР та плівок БР з домішкою триетаноламіну.

Подальші дослідження проводились з використанням плівок БР у желатиновій матриці без домішок. Оскільки плівки БР без домішок характеризуються максимальною чутливістю, були проведені дослідження зміни їх характеристик при різних концентраціях аміаку. Дослідження

залежності оптичних параметрів плівок та характеристик фотоциклу від концентрації парів аміаку проводилось при шести різних її значеннях: 1%, 5%, 10%, 15%, 20% та 25%. Досліджувались процеси формування та розпаду інтермедіату M_{412} при дії зовнішнього збуджуючого випромінювання. Отримані експериментальні криві наведені на рис 3.13.

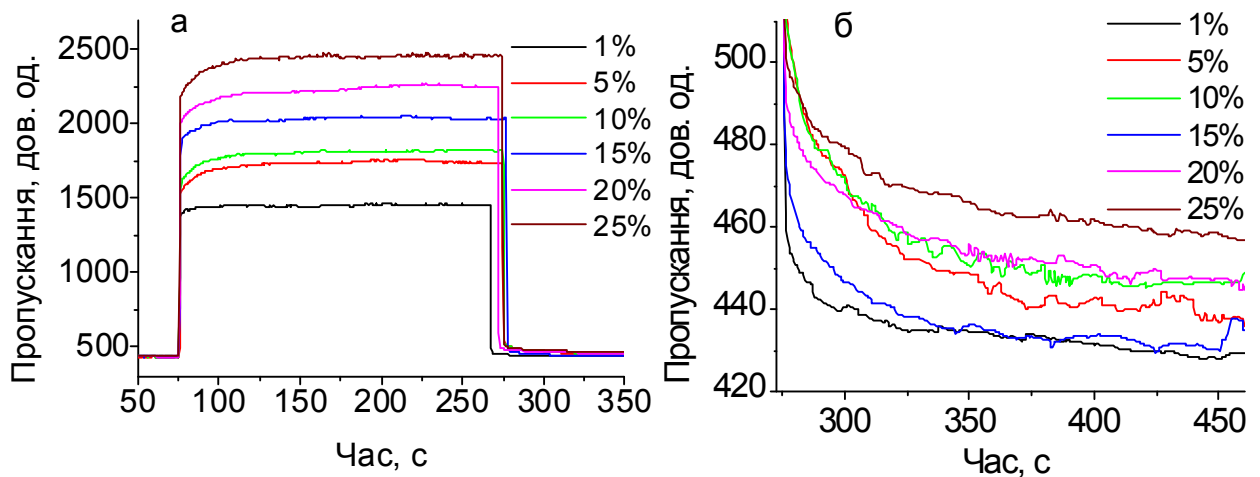


Рис. 3.13. Динаміка фотоіндукованої зміни пропускання на 570 нм (а) та криві розпаду інтермедіату M_{412} після зняття зовнішнього збуджуючого випромінювання (б) для плівки БР при різних значеннях концентрації аміаку.

За отриманими результатами, розраховувався напівперіод життя інтермедіату M_{412} та загальна фотоіндукована зміна пропускання плівки. Результати розрахунків наведені у табл. 3.2 та на рис. 3.14.

Таблиця 3.2.

Залежність напівперіоду життя інтермедіату M_{412} та фотоіндукованої зміни пропускання ($\lambda=570$ нм) від концентрації аміаку.

$C, \%$	$\tau_{1/2}, \text{с}$	$\Delta T, \text{дов. од.}$
1	11,2	1015,08
5	22,32	1297,12
10	21,92	1388,87
15	24,16	1599,60
20	38,84	1813,52
25	43,94	2017,31

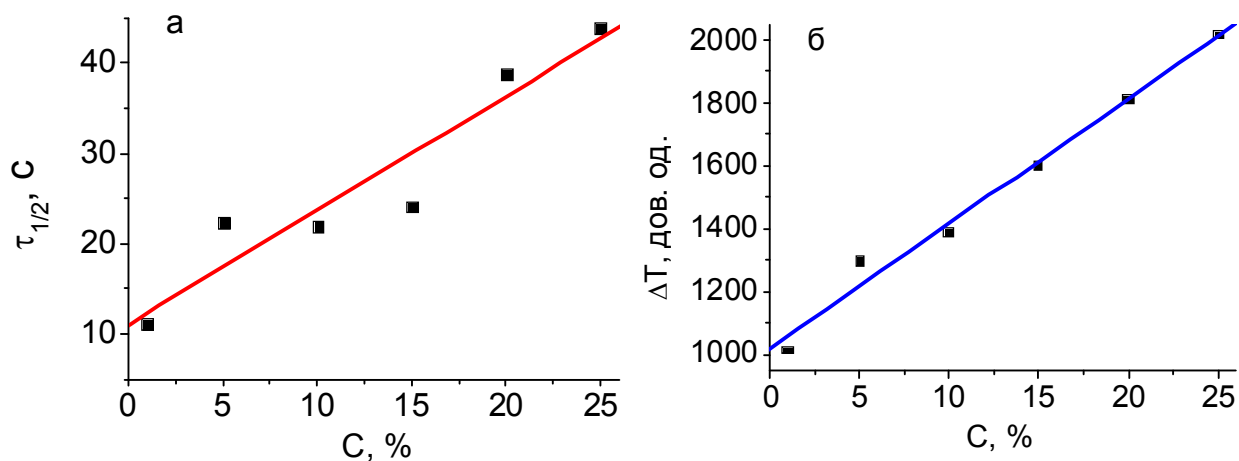


Рис 3.14. Залежність напівперіоду життя інтермедіату M_{412} від концентрації парів аміаку (а) і залежність загальної фотоіндукованої зміни пропускання на 570 нм плівки БР від концентрації парів аміаку (б).

З отриманих результатів видно, що напівперіод життя $\tau_{1/2}$ інтермедіату M_{412} та загальна фотоіндукована зміна пропускання плівки БР ΔT змінюються при зміні концентрації аміаку. При збільшенні концентрації парів аміаку спостерігається збільшення $\tau_{1/2}$ та ΔT .

Відклик на наявність аміаку в залежності від типу матриці. Як видно з результатів, наведених у розділі 3.1, тип матриці може суттєво впливати на чутливість плівки до зміни вологості. Тому були проведені дослідження чутливості плівок БР в різних матрицях до дії аміаку. Оскільки максимальною чутливістю володіє плівка БР без домішок для досліджень використовували плівки БР без матриці, в матриці желатини та золь-гелю. Проводилися як спектральні дослідження, так і дослідження динаміки фотоіндукованих змін. Плівки БР без матриці отримували методом поливу. 0,5 мл водного розчину БР (14 мг ліофілізованого порошку на мл) наносили на скляну підкладку і висушували в ексикаторі протягом 24 годин. Плівки з використанням матриць отримували згідно методик, описаних у розділі 2.

Для дослідження зміни спектрів пропускання плівок у різних матрицях проводили їх порівняння без аміаку та під дією аміаку з концентрацією 10%. Спектри пропускання плівок БР та диференційні спектри пропускання

(пропускання на чистому повітрі мінус пропускання при наявності аміаку) різних плівок наведено на рис. 3.15.

Як видно з диференційних спектрів, максимальні спектральні зміни під дією аміаку відбуваються в області 570 нм, що підтверджує зміну властивостей плівки за рахунок взаємодії аміаку з БР. Найкращу чутливість до аміаку продемонстрували плівка БР без матриці та плівка БР в желатиновій матриці. БР, впроваджений в золь-гельне скло, демонструє найнижчу чутливість до аміаку. Це може бути пов'язане з низькою концентрацією БР в золь-гельному склі. У процесі виготовлення золь-гельної плівки не вдалося одержати зразки з високою концентрацією БР, що обумовлене агрегацією фрагментів пурпурних мембран у значні за розмірами утворення. Крім порівняння спектральних характеристик при сталій концентрації, були проведені дослідження зміни пропускання плівок при поступовому збільшенні концентрації аміаку. Результати таких досліджень наведено на рис. 3.16 та 3.17.

Як видно наведених кривих, зміни пропускання індуковані наявністю аміаку, пропорційні концентрації аміаку незалежно від типу матриці. Плівки без матриці та в матриці желатини демонструють схожу поведінку з різким зростанням сигналу при високих концентраціях. Для золь-гельних плівок характерне більш рівномірне зростання сигналу на всіх етапах підвищення концентрації. Даний факт чітко видно, якщо побудувати залежність нормалізованої зміни пропускання від концентрації аміаку (рис. 3.18). У випадку золь-гельної матриці залежність близька до лінійної, в той час як у випадку плівки без матриці та желатинової матриці залежність носить явно нелінійний характер. Час відклику плівки (t^{90}) БР в золь-гельній матриці в 10 разів та в 3 рази менший, ніж у плівки БР в матриці желатини та без матриці відповідно (таблиця 3.3). Це можна пояснити, враховуючи той факт, що пористість золь-гельної матриці в 200 разів більша за пористість полімерних плівок, що обумовлює швидшу дифузію газу в структуру плівки БР.

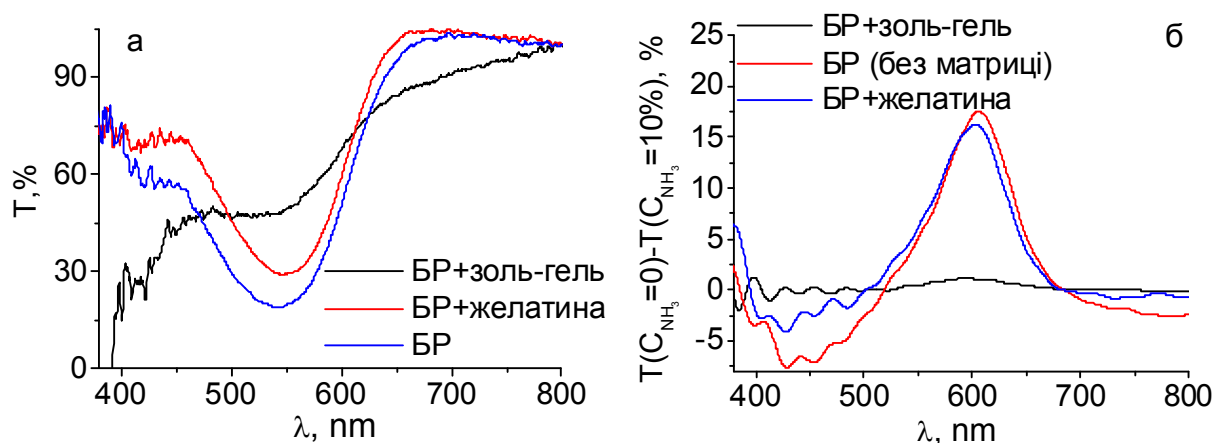


Рис. 3.15. Спектри пропускання (а) та диференційні спектри поглинання плівок БР у різних матрицях в атмосфері аміаку з концентрацією 10% (БР:желатина (ПВС) = 12,5:87,5; БР:ТЕОС = 5,5:94,5)

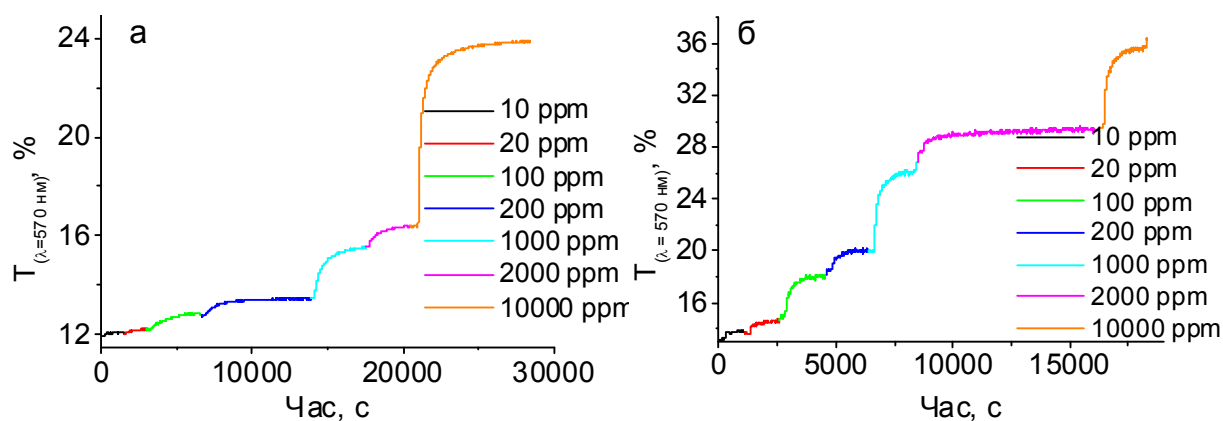


Рис. 3.16. Динаміка зміни пропускання плівки чистого БР без матриці (а) та в золь-гельній матриці (б) на 570 нм при зростанні концентрації аміаку.

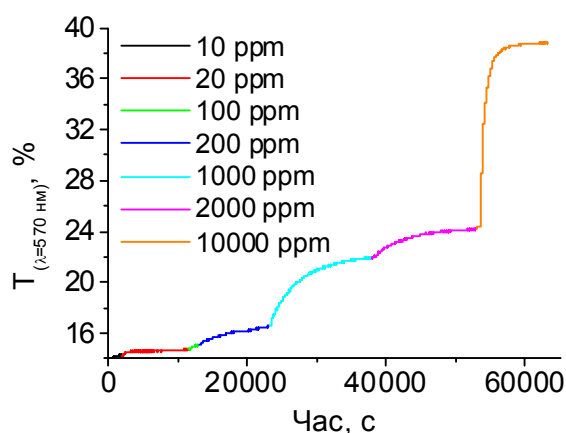


Рис. 3.17. Динаміка зміни пропускання плівки БР в желатиновій матриці на 570 нм при зростанні концентрації аміаку.

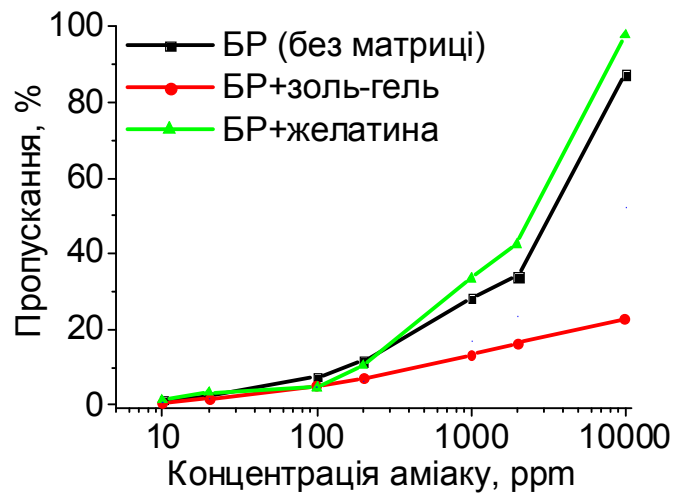


Рис. 3.18. Зміна пропускання плівок БР у різних матрицях на 570 нм в залежності від концентрації аміаку.

Таблиця 3.3.

Час відклику ($C=1000$ ppm) та LOD для плівок БР у різних матрицях

Зразок	Час відклику		LOD, ppm	Лінійний діапазон, ppm	Чутливість $\Delta A/\Delta C$, %/ ppm	БР:матр.	Площа поверхні, м ² /г, В.Е.Т.
	t_{90} , хв.	t_{50} , хв.					
БР+ТЕОС	10	1,9	8	10-200	$-0,017 \pm 0,002$	5,5:94,5	676,6
БР	28	5,8	3	10-100	$-0,040 \pm 0,004$	100:0	-
БР+GE	120	67	5	10-100	$-0,035 \pm 0,003$	12,5:87,5	2,6

Нещодавно було продемонстровано, що плівку БР в золь-гельній матриці з високою концентрацією БР та незначним розсіюванням світла можна виготовити за допомогою метода, запропонованого Pandey та ін [152]. Збільшення концентрації БР у золь-гельному склі дозволить усунути такий недолік, як низька чутливість до аміаку.

Присутність аміаку змінює оптичні параметри плівок БР незалежно від типу матриці. Однак амплітуда та динаміка наростання змін оптичних характеристик суттєво відрізняється для плівок у різних матрицях. Чутливість та час відклику залежать від структури матеріалу матриці та концентрації БР у плівці. В результаті проведених досліджень виявилось, що БР, впроваджений в золь-гельне скло, демонструє найшвидший відклик і в той же час найнижчу чутливість.

Механізм впливу аміаку на оптичні параметри плівок. По отриманим залежностям видно, що напівперіод життя $\tau_{1/2}$ інтермедіату M_{412} та загальна фотоіндукована зміна пропускання плівки бактеріородопсину ΔT залежать від концентрації аміаку. При збільшенні концентрації парів аміаку спостерігається збільшення $\tau_{1/2}$ та ΔT .

Характер зміни оптичних параметрів плівок у присутності парів аміаку нагадує зміну оптичних властивостей плівок з азотовмісними домішками [2, 53]. Хоча немає загального механізму взаємодії даних домішок з БР та желатиною матрицею, гіпотетичний механізм полягає в тому, що всі ці домішки містять атоми азоту, які мають неподілену електронну пару. Завдяки цьому молекули домішок можуть приєднувати вільні протони і ефективно затримувати їх. Оскільки основна роль у фотоциклі БР відводиться фотоіндукованому трансмембранному переміщенню протона, присутність речовин, які можуть його затримувати, приводить до збільшення часу репротонування Asp96, відповідно ШО і збільшення напівперіоду життя інтермедіату M_{412} .

На нашу думку, аналогічним є вплив аміаку. Аміак (NH_3) має неподілену електронну пару, за рахунок якої може затримувати протонний транспорт шляхом тимчасового приєднання протону.

Зростання напівперіоду життя при збільшенні концентрації парів аміаку свідчить про те, що присутність останнього приводить до значних змін у фотоциклі БР. Збільшення $\tau_{1/2}$ є доказом того, що присутність аміаку утруднює розпад M_{412} , а значить репротонування ШО. Донором протону для ШО виступає амінокислотний залишок Asp96. Отже, аміак може блокувати процес передачі протону від Asp96 до ШО. Однак, такий механізм взаємодії потребує знаходження молекул аміаку у транспортному каналі, а на даний час немає експериментальних даних, які б свідчили про те, що молекули аміаку можуть проникати у транспортний канал з цитоплазматичної сторони. В той же час, присутність молекули аміаку біля хромофору привела б до перерозподілу електричних полів і зміщення протона Шифової основи, що

одразу знайшло б відображення у структурі спектру основного стану. Таких змін не спостерігається навіть при високих концентраціях аміаку, в той час як зменшення гідратації протиіону ШО при зміні вологості приводить до змін спектру поглинання основного стану БР. Це теж є доказом того, що аміак не проникає у транспортний канал БР.

Іншим механізмом впливу може бути блокування процесу репротонування Asp96 з цитоплазматичної сторони мембрани. Якщо даний залишок залишиться непротонованим, то у наступному циклі він не зможе виступити донором протону для ШО, що й викличе зростання $\tau_{1/2}$ для M_{412} . Для з'ясування, який процес з двох наведених має місце, потрібні подальші більш поглиблені дослідження.

Відмінності в амплітуді та динаміці змін оптичних параметрів плівок БР під дією аміаку та вологості в залежності від хімічного складу та типу матриці вказують на те, що чутливість, селективність та час відклику можна варіювати, підбираючи оптимальний хімічний склад та тип матриці. Чиста плівка БР демонструє найбільшу чутливість до аміаку, але питання покращення слабкої адгезії цієї плівки до підкладки (скляна пластина або кварцове оптичне волокно) потребує більш детального вивчення. Альтернативою таким плівкам можуть служити плівки БР у золь-гельній матриці які володіють аналогічними часами відклику та хорошою адгезією при умові підвищення їх оптичної якості.

3.3. Вплив аміаку у водних розчинах на характеристики плівок бактеріородопсину

Для дослідження можливості використання плівок БР для сенсорів водних розчинів були проведені дослідження впливу водних розчинів аміаку на параметри плівок БР різного хімічного складу та технології отримання. Для проведення досліджень була сконструйована спеціальна камера детально описана в додатку Д.

Дослідження впливу водних розчинів на плівки бактеріородопсину в желатинових матрицях. У якості матриці для чутливих елементів на основі БР для використання в газових датчиках може використовуватися желатина. Плівкові структури отримані, з використанням желатини, мають високу оптичну якість, однорідність та адгезію.

Ми провели дослідження впливу води на параметри плівки чистої желатини. Результати дослідження зміни відбивання на різних довжинах хвиль від плівки желатини під дією води наведено на рис. 3.19. Як видно з графіків, під дією води желатинова плівка набухає і поступово розчиняється. Набухання желатини приводить до зміни величини зазору між торцем волокна та поверхнею плівки, за рахунок чого виникає інтерференція, яка чітко спостерігається на графіках. У кінцевому результаті відбувається повне руйнування плівки. В результаті заміщення матеріалу плівки водою зменшується різниця показників заломлення на межу торець волокна-досліджуваній матеріал, що відображається в суттєвому зменшенні інтенсивності відбивання на всіх довжинах хвиль.

Наступним етапом було проведення досліджень для плівок БР у матриці желатини. На початковому етапі були проведені дослідження зміни характеристик плівки БР у желатиновій матриці зануреної у дистильовану воду. Проводився моніторинг на характерних для бактеріородопсину довжинах хвиль – 410 та 570 нм, а також на 800 нм. Також проводилися дослідження спектрів відбивання плівки. Результати наведені на рис. 3.20.

Як видно з рис. 3.20, після напуску води відбуваються зміни інтенсивності відбивання на всіх довжинах хвиль, за рахунок зміни різниці показників заломлення на межах розділу торець-плівка та підкладка-повітря. Після цього спостерігається незначне зростання відбивання на 410 нм та спад на 570 нм. Це можна пояснити зменшенням часу життя інтермедіату M_{412} , внаслідок чого рівновага $BR_{570} \leftrightarrow M_{412}$ зсувається в бік основного стану, тому поглинання на 570 нм зростає, а на 410 нм – зменшується. Після цього ніяких змін на протязі години не реєструється. На спектрі відбивання (рис. 3.20) до

початку експерименту чітко спостерігається смуга поглинання бактеріородопсину. Після витримування у воді та висушування смуга поглинання бактеріородопсину зникає.

На рис. 3.21 наведено фотографії плівки до та після витримування у воді. Як видно з фотографій, однорідна плівка у місці контакту з волокном зруйнувалася. Розбухання желатинової матриці під час витримування у воді привело до перерозподілу матеріалу плівки і після зливу рідини частина плівкоутворюючої суміші сконцентрувалася довкола торця волокна, в той час як під самим торцем бактеріородопсину не залишилося, чим і пояснюється відсутність смуги поглинання на спектрі. З отриманих результатів можна зробити висновок, що через свою водорозчинність желатина не підходить для ролі матриці у плівках, що будуть використовуватися для досліджень водних розчинів.

Дослідження впливу водних розчинів аміаку на плівки бактеріородопсину в золь-гельних матрицях. Для використання у датчиках для водних розчинів більше підходять плівки на основі неорганічних матриць. Для проведення досліджень використовували плівки БР у SiO_2 -матриці, отримані згідно методик, описаних в розділі 2.

Для дослідження впливу води на характеристики плівок БР у золь-гельній матриці проводили моніторинг відбивання на довжинах хвиль 410, 570, та 800 нм і запис спектрів відбивання у процесі напуску води, витримування у ній плівки та зливу води. Результати моніторингу відбивання для плівки БР у золь-гельній матриці у процесі напуску, витримування, зливу води та висихання плівки наведено на рис. 3.22.

Як видно з результатів, ніяких змін крім перепадів інтенсивності відбивання, які викликані зміною різниці показників заломлення у процесі заміщення водою прошарків повітря, не спостерігається. Незначні зміни інтенсивності відбивання на 570 та 410 нм одразу після напуску води можна пояснити зміною часу життя інтермедіату M_{412} , спричинені зміною вологості.

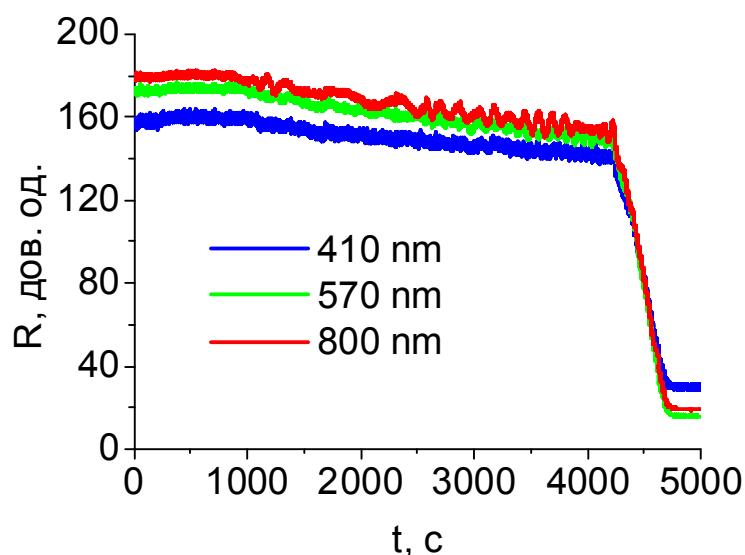


Рис. 3.19. Динаміка зміни відбивання від желатинової плівки під дією води.

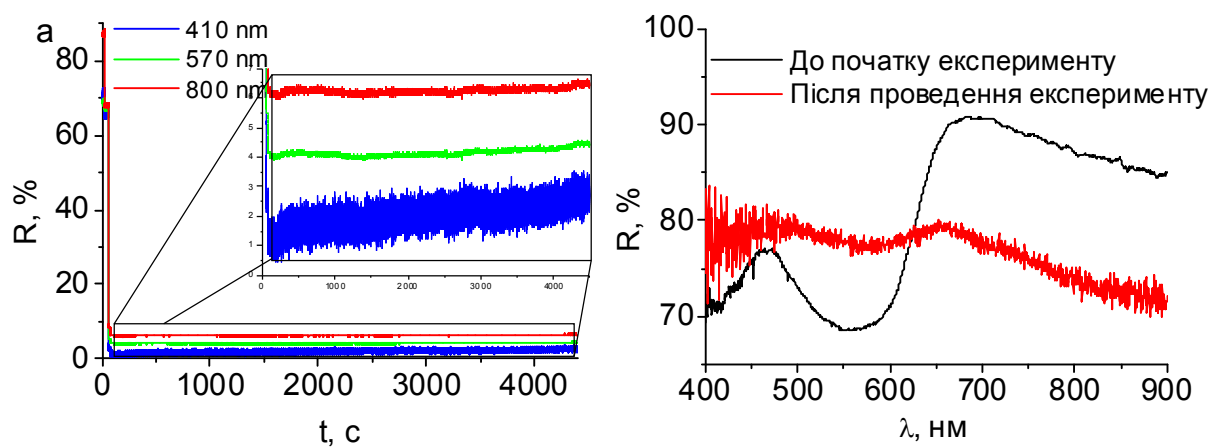


Рис. 3.20. Динаміка зміни відбивання (а) та спектри відбивання (б) плівки БР в желатиновій матриці у процесі занурення та витримування у воді.

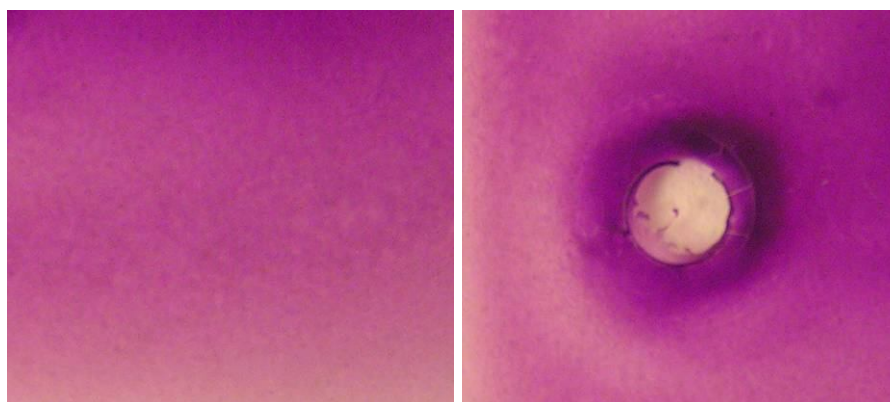


Рис. 3.21. Плівка бактеріородопсину у желатиновій матриці до та після витримування у воді протягом 24 годин.

На рис. 3.23 наведені спектри відбивання плівки до та після витримання у воді. Як видно з результатів, навіть до напуску води смуга бактеріородопсину на спектрі відбивання, досить слабка. Значна розбіжність у розмірах між молекулами золь-гелю та фрагментами пурпурних мембран приводить до виникнення механічних напруг під час висихання плівки. Механічні напруги, в свою чергу, приводять до виникнення тріщин та різного роду дефектів як на поверхні, так і в об'ємі плівки. В результаті низької оптичної якості виникає значне розсіювання, що і пояснює слабку смугу бактеріородопсину на спектрі відбивання.

За результатами досліджень динаміки та спектрів відбивання видно, що під дією води ніяких змін у плівці бактеріородопсину у золь-гельній матриці не спостерігається. Мікроскопічні дослідження поверхні плівки бактеріородопсину у золь-гельній матриці (рис. 3.24), на відміну від плівки у желатиновій матриці, не виявили змін у структурі поверхні плівки ні в центральній області, ні на периферії.

Оскільки після витримання у воді ніяких змін у плівці виявлено не було, наступним кроком було дослідження впливу водного розчину аміаку на параметри плівки. Як і в попередніх експериментах, контроль проводився в динамічному режимі на довжинах хвиль 410, 570 та 800 нм, також фіксувалися спектри в ключові моменти часу. Результати досліджень наведено на рис. 3.25 - 3.27. Створення розчину аміаку заданої концентрації досягалося введенням у камеру концентрованого водного розчину аміаку відомої концентрації. Із співвідношення об'ємів дистилату у камері і розчину аміаку, який вводився, вираховувалася концентрація розчину, в якому знаходилася плівка.

Як видно з рис. 3.25, після додавання першої порції аміаку (загальна концентрація розчину в камері складала 1%) фіксується зростання поглинання на всіх трьох довжинах хвиль. Найбільші зміни відбуваються на 570 нм. Реакція плівки на додавання ще однієї порції аміаку була аналогічна.

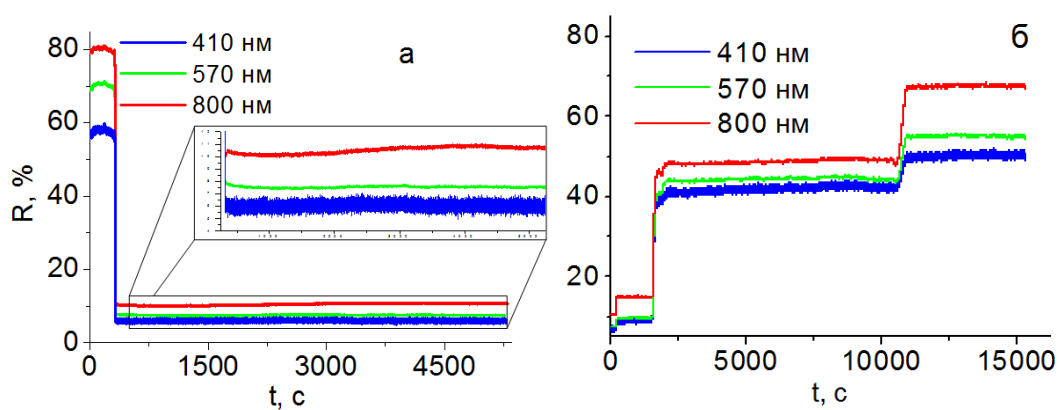


Рис. 3.22. Динаміка зміни відбивання від плівки БР у золь-гельній матриці на скляній підкладці у процесі напуску (а) та зливу (б) води.

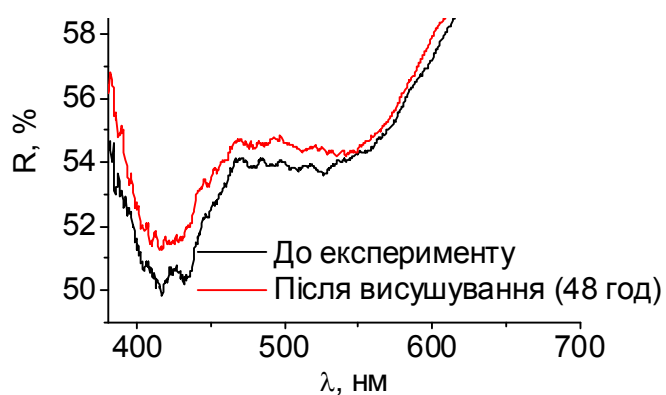


Рис. 3.23. Спектри відбивання від плівки БР у матриці золь-гелю на скляній підкладці у процесі занурення у воду і висихання.

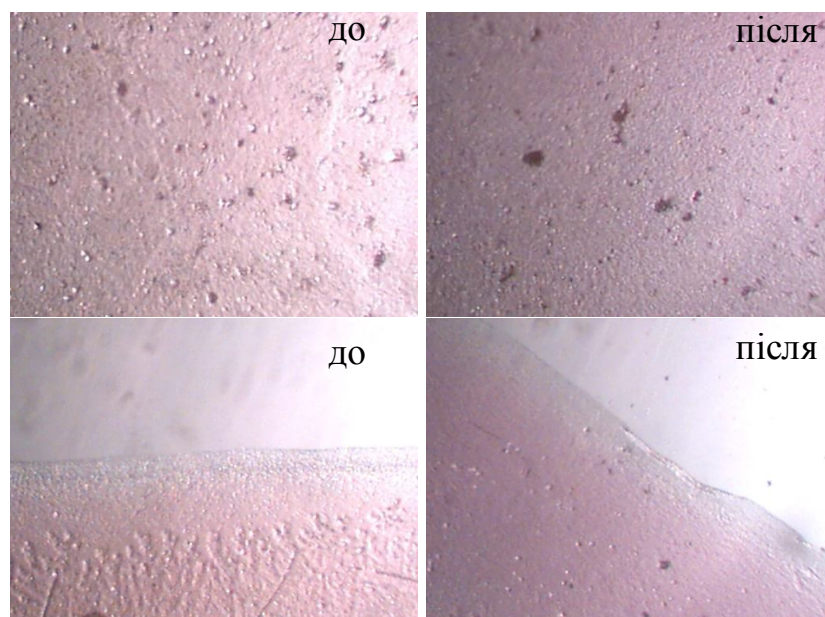


Рис. 3.24. Фотографії різних ділянок плівки БР у матриці золь-гелю на скляній підкладці до та після витримування у воді і висихання.

Оскільки на довжині хвилі 800 нм ніяких смуг поглинання у плівок БР немає, зміни відбивання на даній довжині хвилі будуть відображати зміни, не пов'язані з БР. Таким чином, розділивши значення відбивання на 410 та 570 нм на значення відбивання на 800 нм, ми можемо виключити небажані впливи на результат експерименту. На рис. 3.25-б наведена динаміка відбивання в процесі додавання аміаку отримана в результаті такої обробки даних. Як видно з даного графіку, після додавання аміаку фіксується зростання інтенсивності відбивання на 570 нм та зменшення інтенсивності на 410 нм. Це можна пояснити тим, що наявність аміаку збільшує час життя інтермедіату M_{412} , це, в свою чергу, приводить до зростання кількості молекул, які заходяться проміжному стані і зменшення кількості молекул в основному стані. Звідси маємо зменшення інтенсивності поглинання (а значить зростання інтенсивності відбивання) на 570 нм. Протилежний процес можна спостерігати на 410 нм. Динаміка відбивання у процесі зливання розчину та висихання плівки наведена на 3.26. Як видно з результатів, у даному випадку спостерігаємо процес зворотній до попереднього. Після зливання розчину в місці контакту торця з плівкою, залишається частина розчину. Однак, за рахунок випаровування аміаку концентрація розчину падає. Відповідно до цього відбуваються зміни і у відбиванні плівки. З приведенного до 800 нм графіка чітко видно зростання поглинання на 410 нм (за рахунок зменшення часу життя інтермедіату M_{412}) і зменшення відбивання на 570 нм. Результати досліджень спектрів відбивання плівок під впливом водного розчину аміаку різної концентрації наведено на рис. 3.27 та табл. 3.4.

Табл. 3.4

Зміна параметрів плівки БР у SiO_2 матриці під дією аміаку.

C(NH ₃), %	R, %		$\lambda_{\text{мін}}$, нм
	570 нм	$\lambda_{\text{мін}}$	
вода	6,999	6,847	551
1%	7,481	7,315	555
2%	8,507	8,168	531

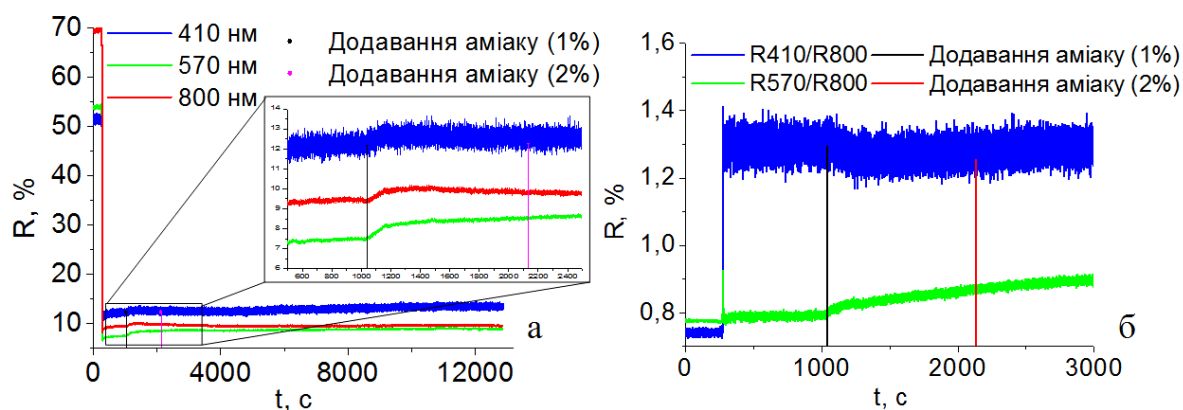


Рис. 3.25. Динаміка зміни відбивання (а) та приведенної зміни відбивання (б) від плівки БР у матриці золь-геля при зануренні у воду і додаванні аміаку.

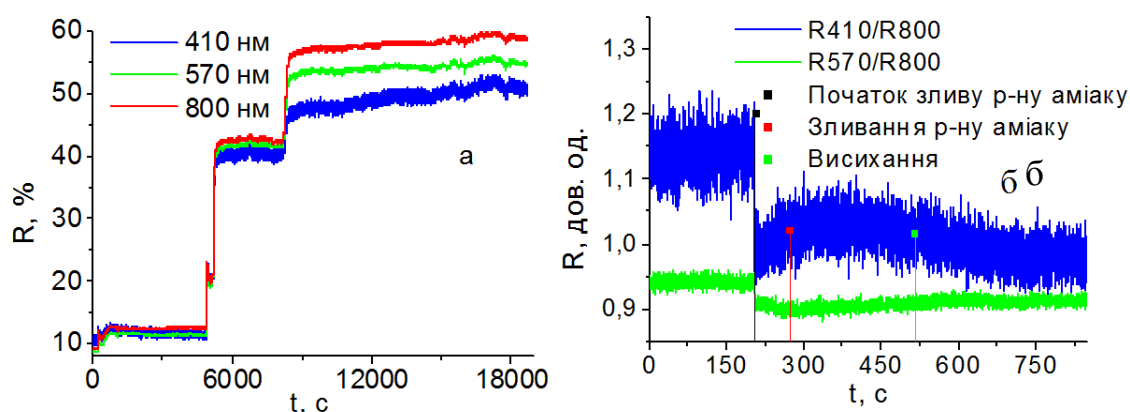


Рис. 3.26. Динаміка зміни відбивання плівки БР у матриці золь-геля у процесі висихання: а – проста, б - приведена діленням на значення сигналу на 800 нм.

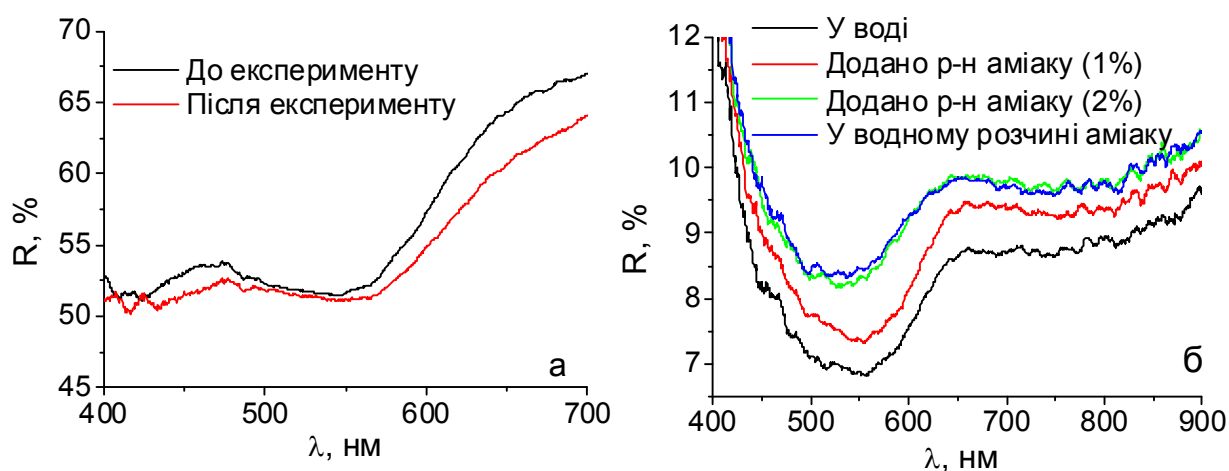


Рис. 3.27. Спектри відбивання плівки БР у матриці золь-геля до та після витримування у розчині аміаку (а) та водному розчині аміаку різної концентрації (б).

Як видно з рис. 3.27-б, зростання концентрації аміаку приводить до зростання інтенсивності відбивання смуги поглинання основного стану БР. Це теж підтверджує той факт, що наявність аміаку впливає на перерозподіл швидкостей прямих та зворотних реакцій у фотоциклі. Також відмічено зсув максимуму смуги поглинання БР (близько 20 нм) під дією аміаку. Причому спектри відбивання плівки до початку та після закінчення експерименту (рис. 3.27-а) майже не відрізняються, що свідчить про хорошу реверсивність.

Виходячи з даних результатів, можна зробити висновок, що плівки бактеріородопсину у водонерозчинних золь-гельних матрицях підходять для використання для хімічних датчиків водних розчинів. До недоліків даних плівкових структур слід віднести їх погану оптичну якість, що приводить до зменшення корисного сигналу і в результаті погіршення чутливості датчика.

Дослідження впливу водних розчинів на характеристик багатошарових плівок на основі БР та SiO_2 золь-гельного скла. Для того, щоб покращити якість плівок і в той же момент уникнути їх руйнування під дією води, було виготовлено та проведено дослідження двошарових плівок. У таких плівках шар чистого БР наносився методом поливу на скляну підкладку. Після повного висихання плівки вона покривалася плівкою чистого золь-гелю методом центрифугування. Отримані таким чином зразки мають хорошу оптичну якість та однорідну поверхню. В той же час за рахунок високої пористості та малої товщини покривний шар золь-гелю не повинен обмежувати доступ аналітів до БР.

Для таких плівок були проведені спектральні дослідження та дослідження динаміки відбивання на фіксованих довжинах хвиль. Результати дослідження динаміки відбивання наведені на рис. 3.28 та рис. 3.29. Вплив аміаку на спектри відбивання плівки наведено на рис. 3.30 та табл. 3.5. Алгоритм проведення експерименту не відрізняється від попередніх досліджень. Спочатку в кювету напускали дистильовану воду і після стабілізації сигналу додавалися порції концентрованого розчину аміаку для отримання потрібної концентрації розчину у камері. У проведенні

досліджень для даної плівки ми використали промивання камери дистильованою водою для дослідження реакції плівки на поступове зменшення концентрації аміаку у розчині.

Як видно з рис. 3.29, після додавання першої порції аміаку відбувається зростання відбивання на 570 нм і зменшення відбивання на 410 нм. Дані зміни, як і у попередньому випадку, можна пояснити змінами у проходженні фотоциклу БР. Після додавання другої порції аміаку – спостерігаємо аналогічний процес. Після того як камеру почали промивати дистильованою водою, спостерігається зворотній процес: інтенсивність відбивання на 570 зменшується а на 410 зростає. Даний процес свідчить про реверсивність процесів, які проходять у плівці БР.

Табл. 3.5

Зміна параметрів багат шарового чутливого елемента на основі БР та SiO₂ золь-гельного скла під дією аміаку.

C(NH ₃), %	R, %		$\lambda_{\text{мін}}$, нм
	570 нм	$\lambda_{\text{мін}}$	
вода	5,39	5,348	562
1%	6,124	6,112	560
2%	6,992	6,756	541

Як видно з рисунку 3.30-а, на 570 нм реєструється чітка смуга поглинання БР. Останнє можна пояснити тим, що завдяки хорошій оптичній якості та однорідності плівки менше випромінювання втрачається на розсіювання та поглинання на дефектах плівки, в результаті чого ми отримуємо більшу інтенсивність відбитого сигналу. При зануренні у воду та додаванні аміаку різних концентрацій реєструється зменшення смуги поглинання БР із зростанням концентрації аміаку у розчині (рис. 3.30-б). Також реєструється зсув максимуму поглинання у синю область приблизно на 20 нм. Дані зміни аналогічні до результатів отриманих для плівки БР у матриці золь-гелю, що дозволяє зробити висновок про те, що тип матриці та

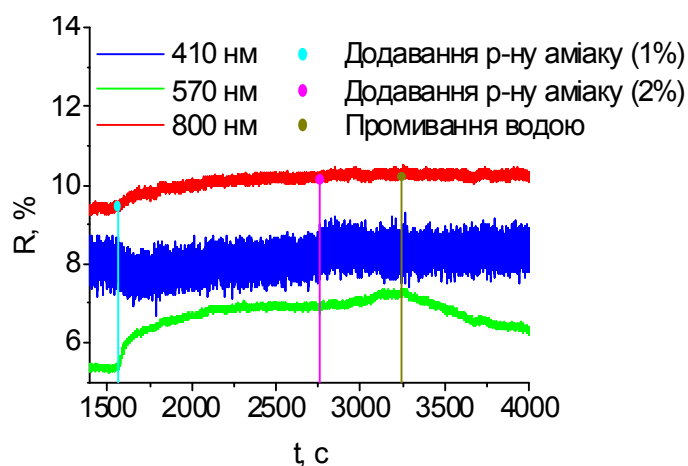


Рис. 3.28. Динаміка зміни відбивання від плівки БР, вкритої золь-гелем у процесі зміни концентрації аміаку у розчині.

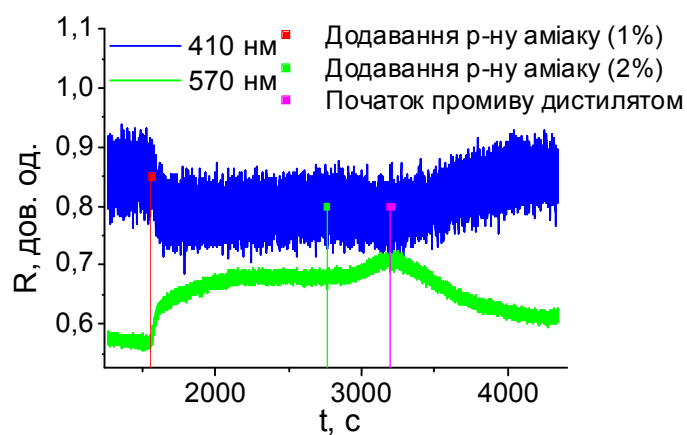


Рис. 3.29. Динаміка приведеної зміни відбивання від плівки БР вкритої золь-гелем у додавання аміаку.

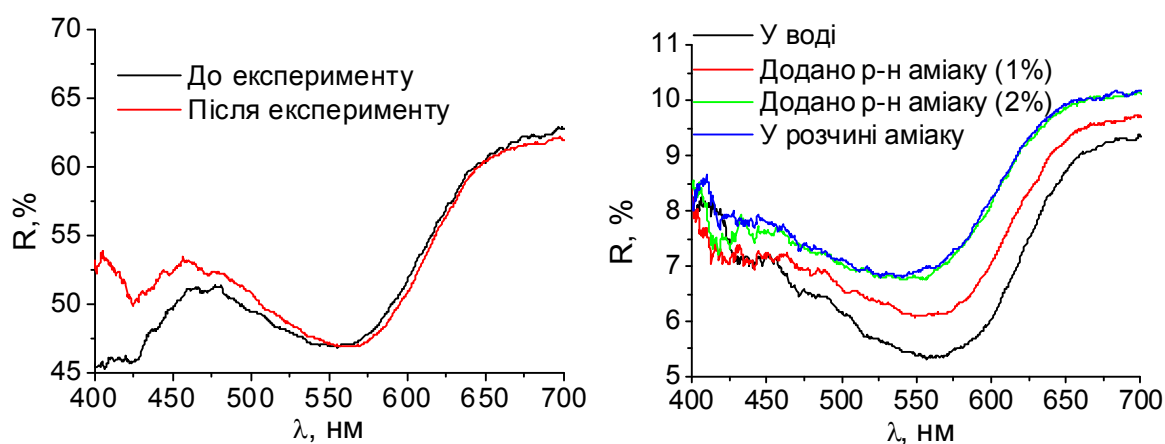


Рис. 3.30. Спектри відбивання плівки БР вкритої золь-гелем до та після витримання у розчині аміаку (а) та у водному розчині аміаку різної концентрації (б).

метод отримання плівки не впливає на механізм взаємодії бактеріородопсину з аміаком. Після того як розчин аміаку злили і плівка висохла, смуга поглинання повернулася до вихідного положення, що дозволяє судити про реверсивність змін спричинених впливом аміаку.

Таким чином ми провели серію аналогічних досліджень для трьох різних плівкових структур на базі бактеріородопсину, які виготовлені за різними технологіями та з використанням різних матеріалів у якості матриці для БР. Порівнюючи отримані результати можна зробити наступні висновки: плівкові чутливі елементи з використанням желатини не підходять для контролю водних розчинів, оскільки під дією води желатина набухає і плівка руйнується. Плівки з використанням неорганічної золь-гельної SiO_2 матриці не руйнуються під дією води, чутливі до дії аміаку і мають хорошу реверсивність, однак погана оптична якість плівок приводить до зменшення інтенсивності корисного сигналу, що зменшує чутливість датчика. Двошарові плівки з покривним шаром із золь-гельного SiO_2 скла теж не руйнуються під дією води і чутливі до дії аміаку в розчині, в той же час хороша оптична якість плівок забезпечує достатню інтенсивність відбитого сигналу і відповідно покращує чутливість сенсора в якому використовується такий чутливий елемент.

Висновки до розділу 3

1. Сконструйовано спеціальні сенсорні камери, які дозволяють проводити дослідження впливу як парогазових так і водних розчинів різних речовин на оптичні характеристики плівок на основі БР.

2. Показано, що для плівок БР як в желатинових, так і в золь-гельних матрицях спостерігається збільшення висоти основної смуги поглинання та зменшення часу життя інтермедіату M_{412} та величини фотоіндукованої зміни пропускання при зменшенні вологості. Для золь-гельних плівок зміни оптичних характеристик можна пояснити з точки зору фотоциклу у всьому діапазоні вологостей, тоді як для плівок у желатинових матрицях при

вологостях до 95%. При вищих значеннях вологості зміни, частково спричинені впливом вологості на матеріал матриці.

3. Встановлено, що присутність аміаку у повітрі або водному розчині довкола плівки БР приводить до зростання часу життя інтермедіату M_{412} та величини фотоіндукованих змін пропускання незалежно від типу матриці. Показано, що чутливість до аміаку залежить від хімічного складу плівки. Найбільш чутливою до наявності аміаку є плівка без домішок. Найменші зміни зафіксовані для плівок з домішкою триетаноламіну. Запропоновано механізм впливу аміаку на параметри БР, який полягає у тимчасовому зв'язуванні вільних протонів молекулами аміаку, що створює їх дефіцит і утруднює репротонування відповідних амінокислотних залишків.

РОЗДІЛ 4. ПЕРСПЕКТИВИ ВИКОРИСТАННЯ ПЛІВОК БАКТЕРІОРОДОПСИНУ ДЛЯ ОПТИЧНОГО ЗАПISУ ІНФОРМАЦІЇ ТА БІОСЕНСОРІВ

4.1. Залежність голографічних характеристик плівок БР від хімічного складу та відносної вологості навколишнього середовища.

Вплив хімічного складу на голографічні характеристики плівок на основі БР. Інформація в плівкових структурах на базі БР реєструється завдяки фотоіндукованій зміні поглинання при переході молекул між основним станом (БР₅₇₀) та інтермедіатом з найбільшим часом життя (M₄₁₂) під час проходження фотоциклу. При переході між інтермедіатами також змінюється показник заломлення та поляризаційні характеристики середовища, що теж може впливати на формування зображення у плівці. Голограма, що записується на плівці БР, має амплітудний і фазовий компоненти. Порівняльна характеристика світлочувливих плівкових структур на базі БР з традиційними середовищами для запису голограм (табл. 4.1) наочно показує переваги БР.

Таблиця 4.1.

Характеристика фотоматеріалів для голографії [154].

Матеріал	Спектральна область (нм)	Світло-чутливість (Дж/м ²)	Роздільна здатність (лінії / мм)	Дифракційна ефективність (%)
Галіди срібла	400 - 700	10 ⁻⁴ – 10 ⁰	<500	5 - 6
Біхромати	350 - 500	10 ³	>10 ³	100
Рідкі кристали	300 - 500	10 ³	10 ⁴	50
Склоподібні н/п	500 - 700	10 ³ - 10 ⁴	10 ⁴ - 10 ⁵	10
Фотохроми	400 - 700	10 ²	10 ³ - 10 ⁴	1 – 2
Біохром – БР	400 - 700	10 ⁰	>10 ⁴	5 - 7

Існує багато практичних задач для реалізації яких потрібні голографічні плівки з високою роздільною здатністю та апертурою, які працюють у режиму реального часу: голографічна інтерферометрія,

резонансна голографія, голографія в реальному часі для оптичної кореляції тощо. Надзвичайно висока циклічність БР при наявності світлочутливості до всіх параметрів оптичного випромінювання у широкому спектральному діапазоні, включаючи й поляризацію світла, зумовлює великий інтерес до плівкових структур на базі БР для використання їх у динамічній голографії.

Голографічні характеристики плівок на основі БР залежать від цілого ряду факторів. Так фоточутливість плівок залежить від штаму, з якого був отриманий БР та технології очистки; важливою є методика підготовки плівкоутворюючої суміші та використана методика нанесення плівок; суттєвий вклад вносить тип та підготовка підкладки а також матеріал, використаний як матриця; суттєво на характеристики плівки може впливати зміна хімічного складу (використання домішок, які впливають на динаміку перебігу фотоциклу) та параметри навколишнього середовища (такі як вологість, температура, наявність та концентрація певних газів). Дослідження впливу домішок на характеристики плівок показало, що однією з речовин, яка найбільш ефективно може коригувати динамічні характеристики переходів фотоциклу БР є триетаноламін (ТЕА) [154]. Досліджувались динаміка запису та релаксації голограм, дифракційна ефективність в залежності від часу експозиції та складу плівкових структур на базі БР у желатиновій матриці з вмістом ТЕА у межах від 0 до 250 молекул ТЕА на одну молекулу БР. Плівки отримували методом поливу, згідно методики описаної в розділі 2. Результати наведено на Рис. 4.1. та 4.2.

Як видно з результатів, на дифракційну ефективність впливає як хімічний склад плівки, так і час експозиції. Результати дослідження динаміки запису голограми свідчать про те, що максимальна значення дифракційної ефективності може бути досягнуто для плівкових структур у яких співвідношення кількості молекул ТЕА до кількості молекул БР знаходиться у діапазоні від 100 до 250. При виході за межі даного діапазону спостерігається різке зменшення величини дифракційної ефективності. Аналогічна залежність спостерігається і для константи часу, за значенням

якої можна судити про час стирання голографічного зображення. Вона досягає максимального значення при співвідношенні ТЕА/БР 100 – 250 (Рис. 4.1. б) і перевищує 600 мс.

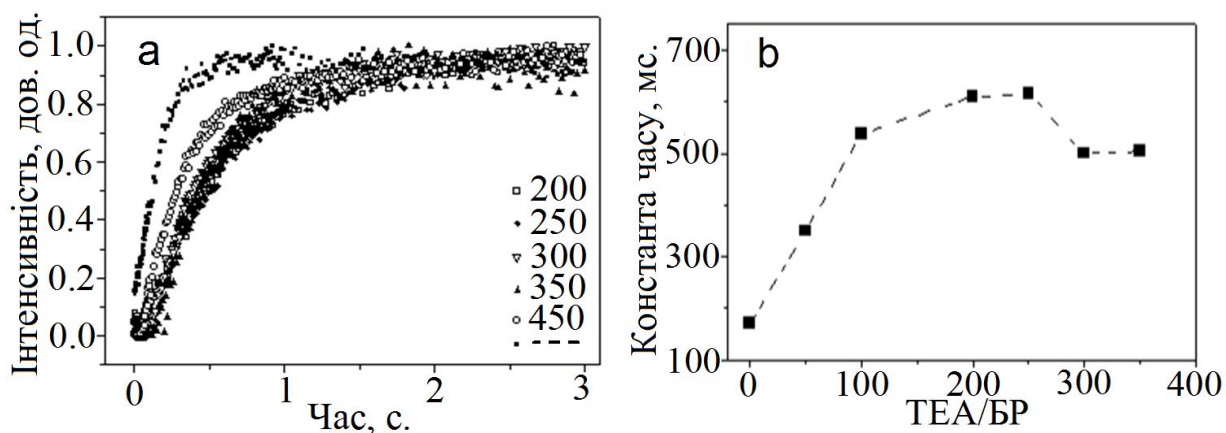


Рис. 4.1. Залежність нормалізованої інтенсивності дифрагованого променя від часу експозиції He-Ne лазером (а) та константи часу від співвідношення ТЕА/БР (по кількості молекул) (б) у плівках БР з різним вмістом ТЕА. [154]

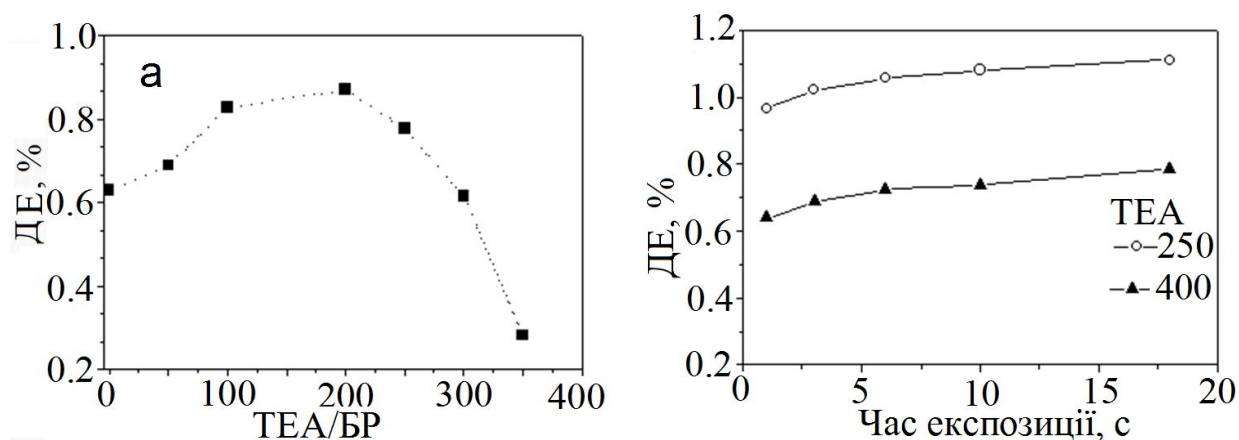


Рис. 4.2. Залежність максимального значення ДЕ плівок БР від величини співвідношення ТЕА/БР (по кількості молекул) (а) та залежність ДЕ від часу експозиції для зразків з співвідношенням ТЕА/БР 250 та 400. [154].

Слід зазначити, що описані вище дослідження голографічних властивостей плівок проводилися при кімнатних умовах. В той же час, як видно з результатів описаних у розділі 2, на властивості плівки впливає рівень вологості навколишнього середовища. Тому нами було проведено

дослідження впливу зміни відносної вологості середовища на дифракційну ефективність плівок на основі БР. Для досліджень використовували плівки БР у желатиновій матриці з домішкою триетаноламіну (ТЕА/БР = 120) отримані методом поливу.

Для дослідження характеристик плівок БР+ТЕА було використано запис тонких голограм. Для тонких голограм дифраговані пучки розділяються у просторі між собою та з нульовими пучками. Це дає можливість слідкувати за зміною інтенсивності всіх записуючих та дифрагованих пучків та одержувати додаткову інформацію про процес запису. Голографічний метод, який був використаний, не є методом прямих вимірювань параметрів плівки з БР. У процесі дії збуджуючого випромінювання змінюються всі оптичні параметри плівки. Характер таких змін залежить від штаму БР, стану плівки (темно- чи світлоадаптована), матриці, домішок, факторів навколишнього середовища, довжини хвилі збуджуючого випромінювання та його інтенсивності. Методика досліджень детально описана в Розділі 1.

Нами було проведено дослідження кінетик запису голограм у плівці БР з ТЕА при відносній вологості навколишнього середовища 43%, 60% 80%, 90% та 93%. Для контролю вологості та температури використовували малогабаритний цифровий термо-гігрометр (TFA Dostmann GmbH, Germany, catalog number 30.5010). Вологість створювалася за допомогою розміщення у кюветі відкритої посудини з водою. Для зменшення вологості збільшували повітряний обмін з навколишнім середовищем із меншою відносною вологістю, шляхом відкривання додаткових отворів у кюветі. Для досягнення вологості меншої за кімнатну використовували силікагель.

На Рис. 4.3. наведено динаміку зміни інтенсивності дифрагованих пучків у процесі запису дифракційної ґратки для плівок БР з ТЕА при відповідних значеннях вологості.

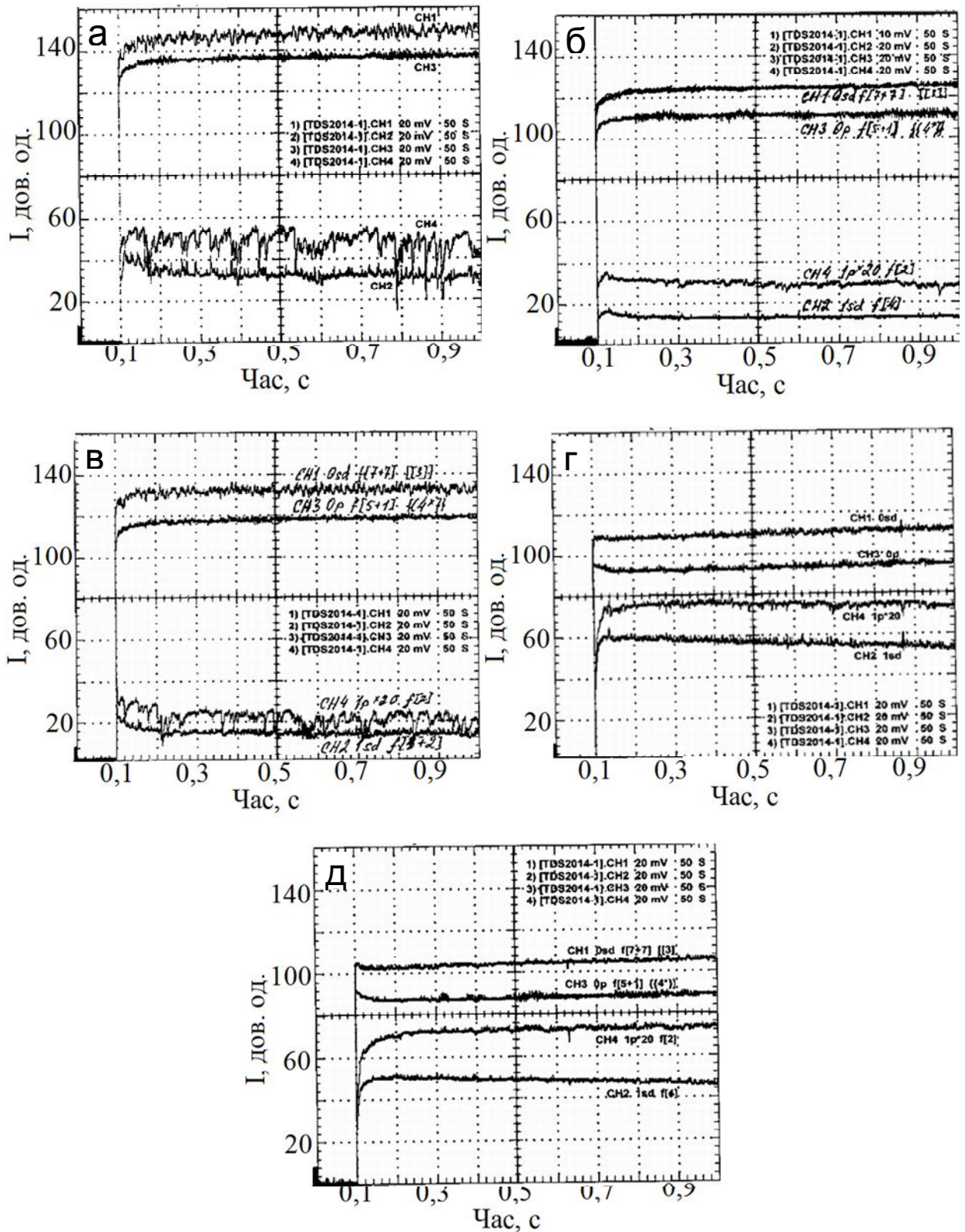


Рис. 4.3. Динаміка зміни інтенсивності дифрагованих пучків для світлоадаптованої плівки БР під час експозиції лазерним пучком при відносній вологості 43% (а), 60% (б), 80% (в), 90% (г) та 93% (д) відповідно.

Поглинання плівки БР у процесі запису голограми при вологості 43% змінилося від 40% на початку до 22% у кінці запису. Час наростання і спаду параметрів голограм можна оцінити з наведених кривих. Криві на графіках: CH1 0sd та CH3 0p інтенсивності записуючого та тестового пучків, що пройшли крізь плівку відповідно; CH2 1sd та CH4 1p інтенсивності пучків першого порядку дифракції для записуючого та тестового випромінювання, відповідно. Максимальна чутливість плівок зберігається не більше 5 хвилин. При витримуванні в темноті більше 5 хвилин чутливість плівки поступово знижується, тобто у плівці починається процес темноадаптації.

На рис. 4.4. показано інтенсивності записуючого та пробного пучків, які падають на плівку, в умовних одиницях. При цьому необхідно враховувати пропускання фільтрів $f[x+y]$ (табл.4.2.). Числа, що стоять у подвійних дужках $[[n]]$ та $\{\{m^*\}\}$ вказують на інтенсивності в пучках. Для $[[3]]$ інтенсивність записуючого пучка складає 10,0 mW при діаметрі пучка 5 - 6 мм. Для пробного пучка $\{\{4^*\}\}$ падаюча інтенсивність складає 0,15 mW.

Таблиця 4.2.

Ослаблення інтенсивності сигналів різними фільтрами.

F1	F2	F3	F4	F5	F6	F7
93,0%	74,5%	50,0%	28,7%	14,7%	9,80%	4,95%

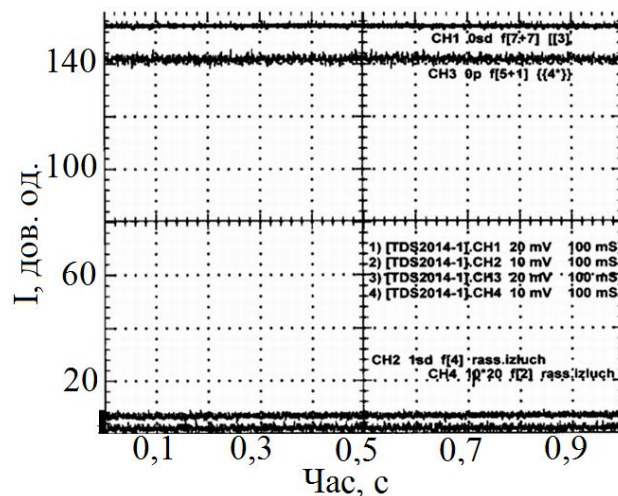


Рис. 4.4. Інтенсивності записуючих та пробних пучків.

На основі отриманих кривих можна виділити декілька етапів фотоперетворення: початковий, перехідний та етап динамічної рівноваги. Початковий етап фотоперетворення починається з моменту включення збуджуючого (у даному випадку записуючого) випромінювання і закінчується моментом досягнення максимуму інтенсивності в дифрагованому порядку пробного пучка. Він характеризується однаковим часом наростання інтенсивності і не залежить від умов експонування. Цей факт можна пояснити тим, що на початковому етапі після поглинання світла проходять фотохімічні перетворення безпосередньо молекули БР без участі навколишнього середовища. Після досягнення максимуму інтенсивності спостерігається її спад. На даному етапі зростає кількість фотозбуджених молекул БР у зонах з низькою освітленістю і в той же час зростає кількість молекул які релаксували із збудженого в основний стан у освітлених областях. Це приводить до зменшення контрасту між освітленими і затемненими областями і, так би мовити, "змивання" штрихів ґратки. При тривалому записі голограми зміни у кінетиці продовжуються до досягнення стану динамічної рівноваги. На даному етапі характеристики плівки та динаміка їх зміни будуть визначатися часом життя збудженого стану молекули БР, який, у свою чергу, залежить від вологості. Тривалі зміни у кінетиці запису пояснюються поступовим переходом молекул БР з темно- у світлоадаптований стан. Для нас цікавим є значення дифракційної ефективності після її виходу на стаціонарний рівень. Величина ДЕ визначається характером динамічної рівноваги процесів переходу БР з основного у збуджений стан і навпаки. Якщо у першому випадку перетворення відбуваються лише у середині молекули, то при релаксації зі збудженого в основний стан на швидкість переходу впливають параметри навколишнього середовища, зокрема вологість. Тому у даному випадку дифракційна ефективність залежить від вологості. На основі отриманих результатів згідно формул 4.1 та 4.2 можна розраховувати технічну дифракційну ефективність, до якої входить величина пропускання плівки БР,

або голографічну, у якій величина пропускання автоматично виключається з розрахунків.

$$\eta_{\text{голографічна}}^{(p)} = \frac{I_{1p}}{I_{0p} + I_{1p}}; \quad \eta_{\text{голографічна}}^{(sd)} = \frac{I_{1sd}}{I_{0sd} + I_{1sd}} \quad (4.1)$$

$$\eta_{\text{технічна}}^{(p)} = \frac{I_{1p}}{I_{\text{пад.пробн.}}}; \quad \eta_{\text{технічна}}^{(sd)} = \frac{I_{1sd}}{I_{\text{зан.пучок}}}, \quad (4.2)$$

де $\eta^{(p)}$ – дифракційна ефективність для пробного пучка; $\eta^{(sd)}$ – ДЕ для самодифракції; I_{0p} та I_{1p} - інтенсивності нульового та першого максимумів дифракції для пробного пучка; I_{0sd} та I_{1sd} - інтенсивності нульового та першого максимумів самодифракції;

Результати розрахунків для плівок БР при різних значення вологості наведено в таблиці 4.3. та на рис. 4.5.

Таблиця 4.3.

Значення ДЕ плівок БР в залежності від вологості.

Вологість, %	$\eta_{sd(\text{тех})}$, %	$\eta_{sd(\text{гол})}$, %	$\eta_{p(\text{тех})}$, %	$\eta_{p(\text{гол})}$, %
43	0,10	0,11	0,23	0,24
60	0,07	0,08	0,18	0,22
80	0,06	0,06	0,13	0,15
90	0,21	0,28	0,47	0,68
93	0,24	0,35	0,47	0,73

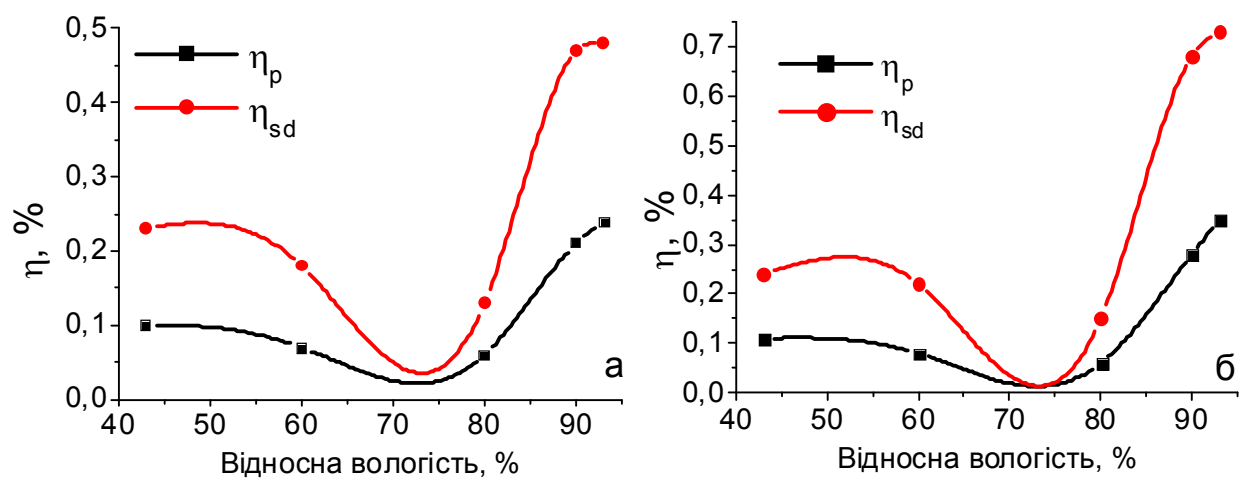


Рис. 4.5. Залежність технічної (а) та голографічної (б) дифракційної ефективності від вологості для світлоадаптованих плівок БР з ТЕА.

Як видно з отриманих результатів, при збільшенні вологості спостерігається зменшення дифракційної ефективності з мінімумом в області 75-80% а далі різке її зростання при подальшому збільшенні вологості. Пояснити таку залежність ДЕ від вологості можна наступним чином. Авторами [135-137, 150-152] було встановлено, що в залежності від вологості кінетика фотоциклу змінюється. У процесі зменшення ступеня гідратованості плівки БР співвідношення швидкостей прямих і зворотних реакцій фотоциклу БР змінюється, спостерігається також зміна кількості зв'язаної води на поверхні ПМ. Через зниження вологості уповільнюється рух білку, зменшується гнучкість α -спіральных ланцюгів молекули білку. Загальноприйнятим вважається те, що у фотоциклі сухих плівкових структур БР після M_1 відсутній M_2 та інтермедіати N і O, а багатофазна релаксація інтермедіату M сповільнюється. У плівкових структурах на базі БР в атмосфері з відносною вологістю у діапазоні 85% - 100% часові параметри фотоциклу БР дуже близькі до кінетики БР у суспензії ПМ [139]. При вологості 85% амплітуда фотоіндукованої зміни поглинання найбільша. В той же час при відносній вологості 50% час релаксації збільшується до сотень секунд, спостерігається зміна поглинання в межах 15%. Так у плівках БР з ТЕА в інтервалі відносної вологості між 100% - 50% спостерігається зміна напівперіоду життя M_{412} на три порядки. При подальшому зменшенні вологості напівперіод життя M_{412} знижується. В той же час, характер зміни оптичного поглинання для желатинових плівок БР та желатинових плівок БР з ТЕА при відносній вологості у межах 0 – 100% відрізняється. Максимальне значення оптичного поглинання желатинових плівок БР без домішок спостерігається при значенні відносної вологості 100%, а для плівкових структур БР+Ж+ТЕА - при 80% [154].

Саме той факт, що внесення ТЕА у плівку модифікує її чутливість до зміни вологості, скоріше за все й приводить до появи мінімуму в значеннях дифракційної ефективності в області значень вологості 75-80% для плівок такого складу.

4.2. Вплив аміаку та вологості на люмінесценцію квантових точок у нанокompозитних структурах на основі БР

Вплив вологості та аміаку на інтенсивність люмінесценції квантових точок у плівках бактеріородопсину. З використанням камери, описаної в додатку Е, були проведені дослідження впливу вологості та аміаку на нанокompозитні структури золь-гельна SiO_2 матриця – БР –квантові точки, отримані з використанням різних технологічних умов. У даних дослідженнях реєструвалася зміна інтенсивності люмінесцентного випромінювання квантових точок на 570 нм, яке збуджувалося світлодіодами. Величина досліджуваної інтенсивності даного випромінювання залежить від ефективності його поглинання молекулами БР, які знаходяться в основному стані. В свою чергу кількість молекул БР, які знаходяться в основному стані, залежить від проходження фотоциклу, на перебіг якого впливають зовнішні фактори, у даному випадку вологість та концентрація аміаку.

При дослідженні впливу вологості на характеристики плівок БР відносна вологість різко збільшувалась на протязі декількох секунд шляхом напуску в камеру насиченої водяної пари. Оскільки кришка камери залишалася відкритою, вологість одразу починала вирівнюватися з кімнатною. Впродовж всіх цих маніпуляцій фіксувалася інтенсивність люмінесцентного випромінювання квантових точок. Хоча структура матриці може досить сильно відрізнятися при різних технологіях отримання плівки, сумарна інтенсивність люмінесценції, як це показано в розділі 2.4, практично не змінюється. Тому для нас цікавим було дослідити, чи впливає структура матриці на взаємодію плівки з навколишнім середовищем, наприклад при зміні вологості, і як це буде впливати на люмінесценцію. Результати досліджень зміни інтенсивності люмінесцентного випромінювання при зміні вологості для плівок, отриманих за допомогою різних технологій висушування, наведені на рис. 4.6. та 4.7.

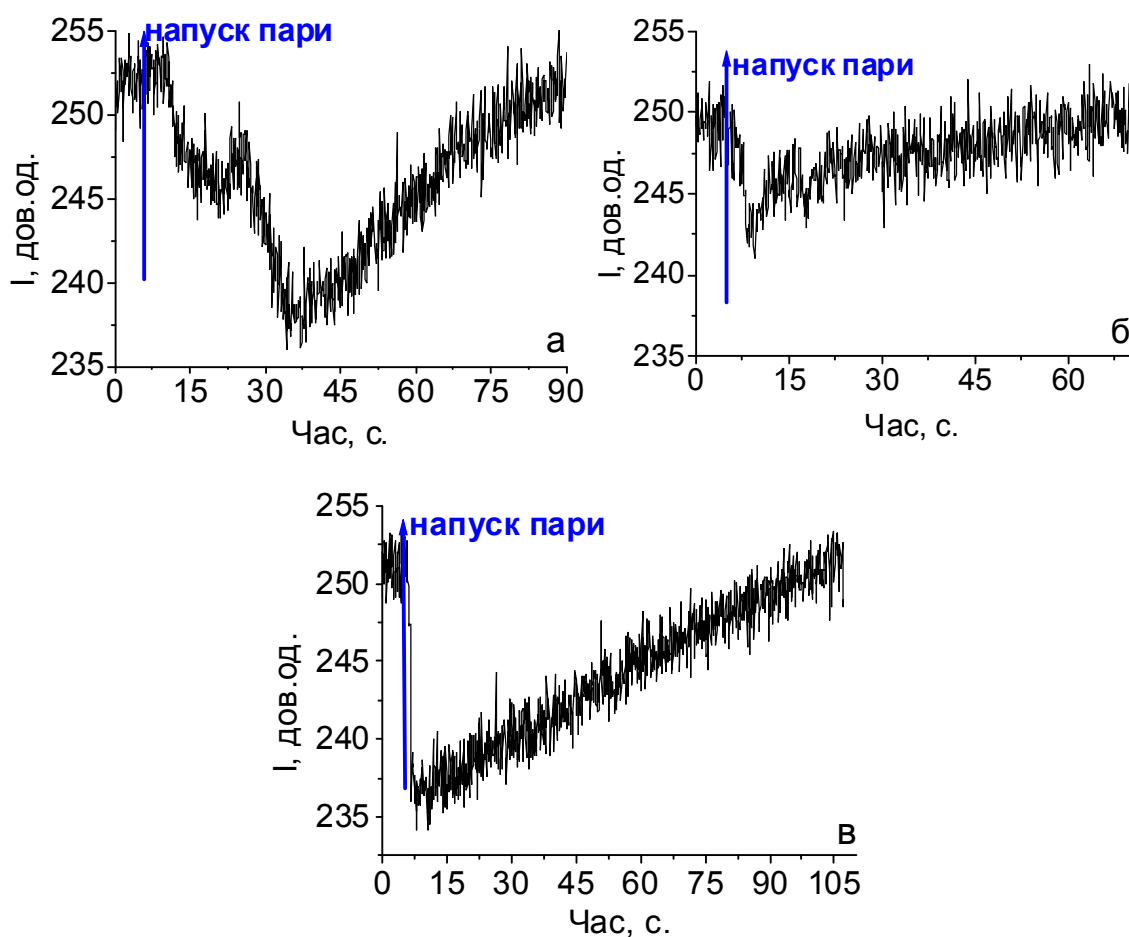


Рис. 4.6. Вплив зміни вологості на інтенсивність люмінесценції ($\lambda=570$ нм) КТ у плівках БР у золь-гельній матриці, отриманих при різних технологіях висушування: а - ліофілізація; б - висушування у кюветі; в - в ексікаторі.

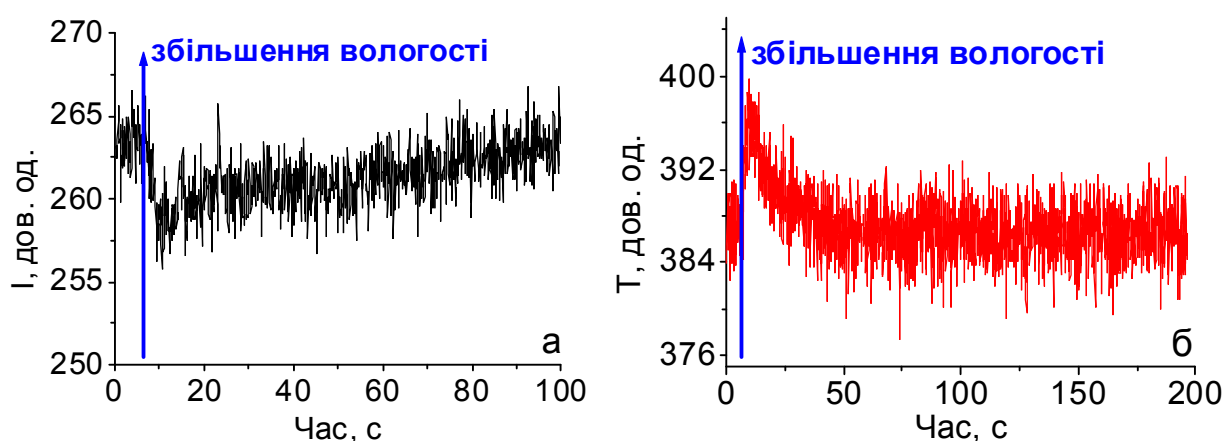


Рис. 4.7. Вплив зміни вологості на люмінесценцію КТ ($\lambda=570$ нм) - (а) та оптичне пропускання на 412 нм - (б) для плівки золь-гельна матриця – БР – напівпровідникові квантові точки. ($\lambda_{36}=380$ нм).

Як видно з результатів, час, амплітуда та динаміка відклику відрізняється в залежності від технології отримання плівки, що очевидно пов'язано з різною структурою та пористістю матриць. Зміна інтенсивності люмінесценції складає близько 7% для плівок, отриманих за допомогою ліофілізації та висушування в ексікаторі, і близько 2% для плівок, отриманих за допомогою висушування у відкритій кюветі. Швидкість відклику плівки на зміну вологості складає від одиниць до декількох десятків секунд.

Зміни інтенсивності люмінесценції можна легко пояснити з точки зору змін у проходженні фотоциклу, індукованих зміною вологості. Зростання вологості від кімнатної (53%) до майже 100% приводить до збільшення гідратації плівки, зменшення часу життя інтермедіату M_{412} і збільшення кількості молекул, що знаходяться в основному стані. Оскільки максимум поглинання основного стану знаходиться в області 570 нм і співпадає з максимумом люмінесценції квантових точок, зростання поглинання у матеріалі приведе до зменшення інтенсивності досліджуваного сигналу. Зменшення вологості за рахунок обміну з середовищем приводить до відновлення початкових значень характеристики плівки і рівня люмінесцентного сигналу. Паралельна реєстрація змін інтенсивності люмінесценції на 570 нм та пропускання плівок на 412 нм (рис. 4.7) підтвердила, що люмінесцентне випромінювання запускає фотоцикл і переводить частину молекул БР з основного у стан M_{412} . При зростанні відносної вологості, після напуску пари, зменшується час життя інтермедіату M_{412} , що приводить до зростання інтенсивності поглинання плівки на 570 нм і, відповідно, зменшення інтенсивності люмінесцентного випромінювання плівки. В той же час смуга поглинання стану M_{412} зменшується. Дані міркування цілком узгоджуються з отриманими результатами експерименту.

Плівки, отримані за допомогою повільного висушування в ексікаторі, характеризуються оптимальними показниками за амплітудою зміни сигналу та часу відклику. Індуковані перепадом вологості зміни люмінесцентного сигналу є цілком прийнятним для створення на основі таких плівок чутливих

елементів сенсорів вологості.

Аналогічні експерименти були проведені для дослідження впливу аміаку на люмінесценцію квантових точок. Для даних експериментів використовували плівки, отримані при повільному висушуванні в закритому ексикаторі, оскільки вони характеризуються найкращою оптичною якістю та оптимальною чутливістю. Отримані результати наведено на рис. 4.8 та 4.9.

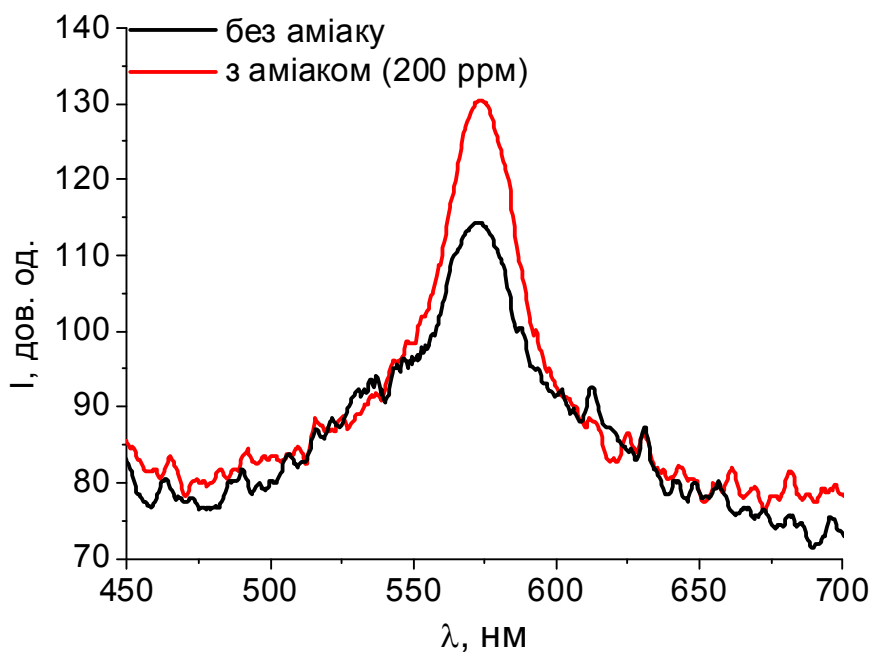


Рис. 4.8. Інтенсивність люмінесценції квантових точок ($\lambda = 570$ нм) - у присутності аміаку та без нього для плівкової структури золь-гельна SiO_2 матриця - БР - квантові точки. Збудження люмінесценції проводилося за допомогою фотодіоду з максимумом випромінювання при $\lambda = 380$ нм.

На рис. 4.8 наведено зміну спектру люмінесценції КТ у плівках на основі БР під дією аміаку. Концентрація аміаку в даному випадку складала 200 ppm. Як видно з рисунку, інтенсивність смуги люмінесценції у присутності аміаку зростає майже на 15%. Це свідчить про те, що поглинання плівки в області люмінесценції зменшилося.

Дослідження, проведені при напуску в камеру аміаку різної концентрації, показали, що при збільшенні концентрації аміаку пропорційно зростає фіксована інтенсивність люмінесцентного випромінювання

квантових точок. Результати зміни інтенсивності випромінювання квантових точок у залежності від концентрації аміаку в камері наведено на рис. 4.9.

Пояснити отриманий результат можна за рахунок зміни оптичних властивостей матеріалу. З попередніх робіт [75, 85, 86] відомо, що взаємодія БР з аміаком приводить до збільшення часу життя інтермедіату M_{412} . Відповідно, більша кількість молекул протягом більшого інтервалу часу буде знаходитися у проміжному стані, максимум поглинання якого віддалений від 570 нм. Зменшення кількості молекул в основному стані приведе до зменшення поглинання люмінесцентного випромінювання БР, у результаті чого інтенсивність реєстрованого люмінесцентного випромінювання зі збільшенням концентрації аміаку буде зростати.

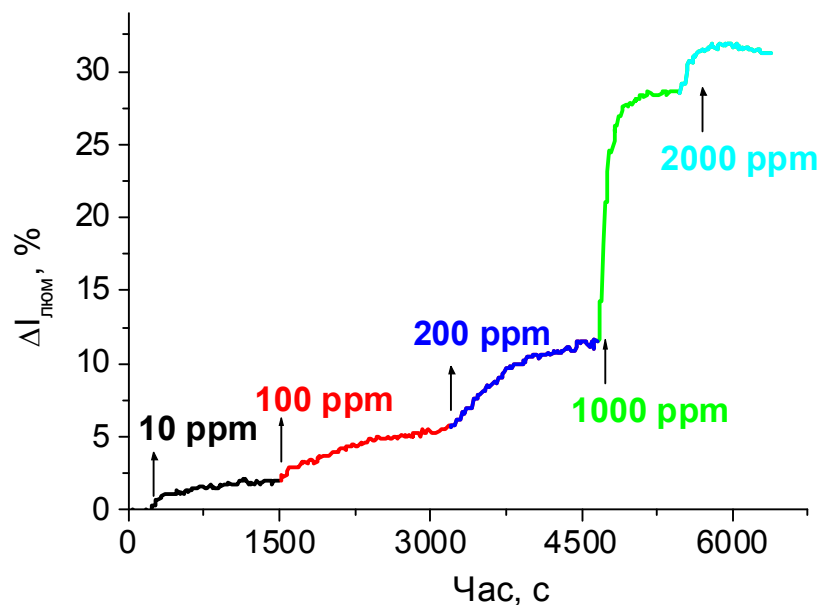


Рис. 4.9. Динаміка зміни інтенсивності люмінесценції нанокompatитних плівкових структур золь-гельна SiO_2 матриця – БР – напівпровідникові квантові точки при різних концентраціях аміаку.

На рис. 4.10 наведено криву залежності величини зміни люмінесцентного випромінювання від концентрації аміаку в напівлогарифмічній шкалі, побудованій на основі даних, отриманих з рис. 4.9. Як видно з результатів, концентраційна залежність зміни люмінесценції має нелінійний характер.

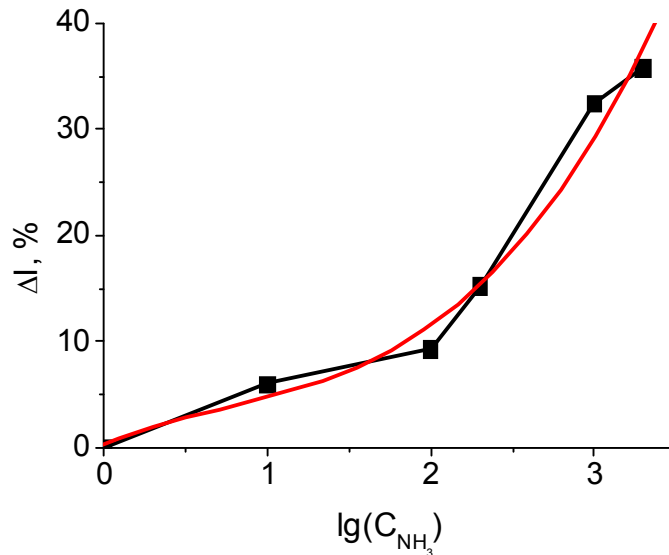


Рис. 4.10. Залежність зміни інтенсивності люмінесцентного випромінювання квантових точок у плівках БР від концентрації аміаку.

Кількісний та якісний аналіз отриманих результатів свідчить про те, що на основі нанокомпозитних структур, які включають фотохромний БР та квантові точки, можливе створення чутливих елементів для волоконно-оптичних сенсорних систем з чутливістю до аміаку на рівні десятків ppm. В загальному на основі таких структур можливе створення волоконно-оптичних сенсорів пропускаючого або відбиваючого типу, в яких запуск фотоциклу БР здійснюється випромінюванням квантових точок, а контроль змін фотоциклу відбувається за рахунок контролю зміни пропускання плівки або інтенсивності люмінесценції КТ. Така конструкція датчиків набагато простіша і ефективніша, оскільки передбачає створення і випромінюючого і реєструючого середовища в одній плівковій структурі. Дана особливість спрощує обслуговування та зменшує вартість такого роду сенсорів. Крім того, відкривається можливість створення чутливих елементів, робота яких базується на вимірюванні напівперіоду життя інтермедіату M_{412} . В обох зазначених можливостях збудження люмінесценції квантових точок може здійснюватися з допомогою електричного поля, що теж спрощує конструкцію сенсорів, оскільки достатньо контролювати лише інтенсивність люмінесцентного випромінювання.

4.3. Вплив інших газів на оптичні властивості плівок на основі бактеріородопсину

Крім дослідження впливу парів аміаку, проводились дослідження впливу різноманітних газів та парогазових сумішей на оптичні характеристики плівок бактеріородопсину. Серед них були як хімічно нейтральні речовини, такі як аргон та вуглекислий газ, так і хімічно агресивні речовини, такі як пари перекису водню та етилового спирту. Дослідження проводилися з використанням герметичної кварцової кювети та установки на базі спектрофотометра СФ-46. Для створення атмосфери того чи іншого газу використовували продування кювети відповідним газом. Для створення парогазових сумішей у кюветі розміщували ємність із відповідною рідиною. Зокрема, проводились порівняння параметрів плівок БР різного складу при кімнатній атмосфері та в атмосфері аргону. Результати спектральних досліджень наведено на рис. 4.11. Як видно з результатів, суттєвих змін у спектральних характеристиках не спостерігається. Незначна зміна пропускання, яка спостерігається для плівки з домішкою триетаноламіну, скоріше за все, пояснюється зміною вологості. Оскільки в процесі заповнення камери інертним газом кімнатне повітря витісняється, загальна вологість у камері зменшується. Оскільки плівки з ТЕА найбільш чутливі до зміни вологості [154], нам вдалося зафіксувати спектральні зміни, індуковані зменшенням вологості для таких плівок, в той час коли для плівок без домішок при аналогічних умовах видимих змін не зафіксовано. Крім спектральних досліджень, також проводилися дослідження змін у проходженні фотоциклу. Дослідження динаміки фотоіндукованих змін проводились на довжинах хвиль 412 та 570 нм. Криві зміни пропускання у процесі релаксації молекул бактеріородопсину із збудженого в основний стан після зняття збуджуючого випромінювання наведено на рис. 4.12 та 4.13.

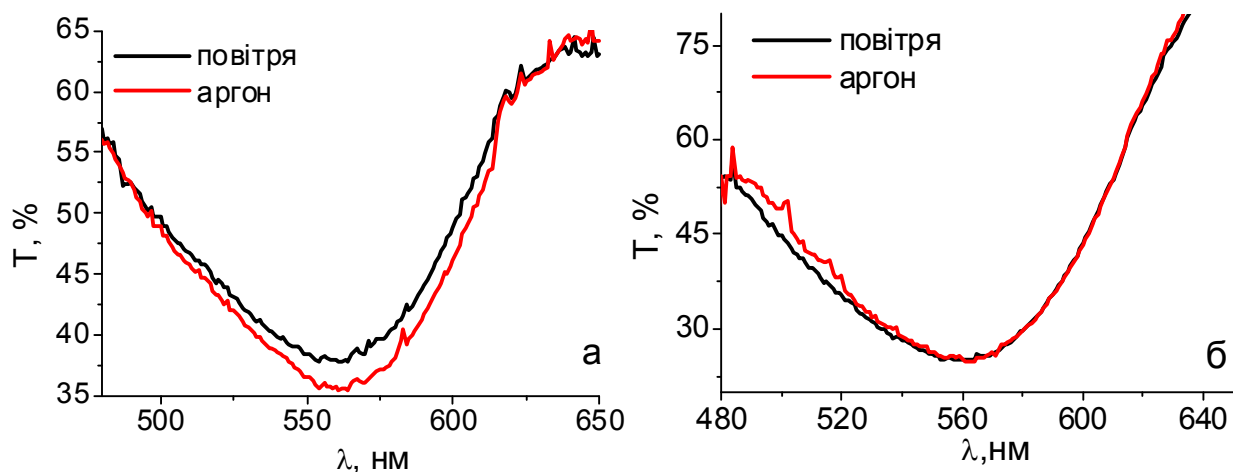


Рис. 4.11. Спектри пропускання плівок БР у атмосфері аргону: а) плівка БР з домішкою триетаноламіну; б) плівка БР без домішок;

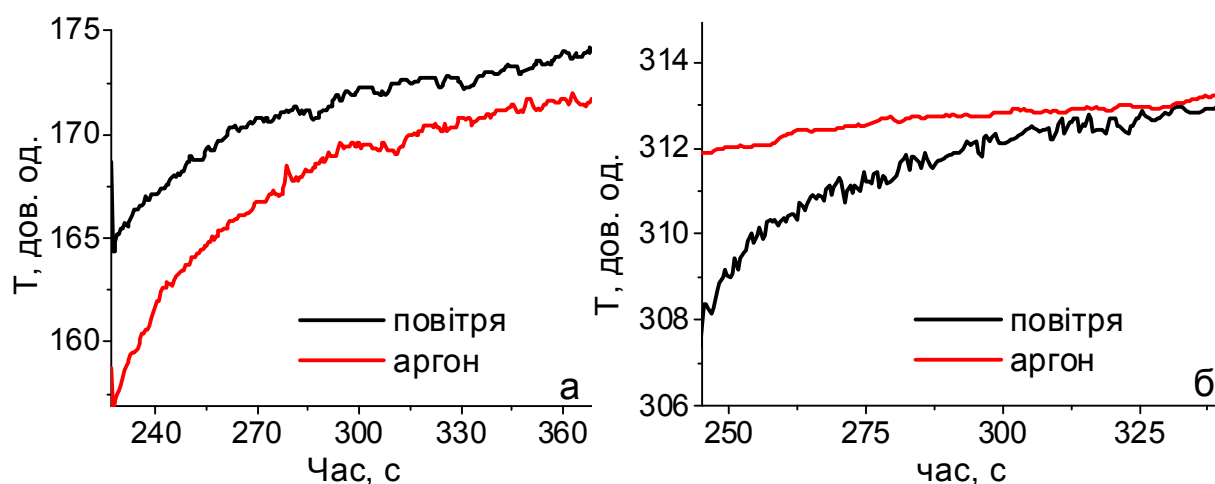


Рис. 4.12. Зміна пропускання на $\lambda=412$ нм після зняття збуджуючого випромінювання: а) плівка БР з домішкою ТЕА; б) плівка БР без домішок;

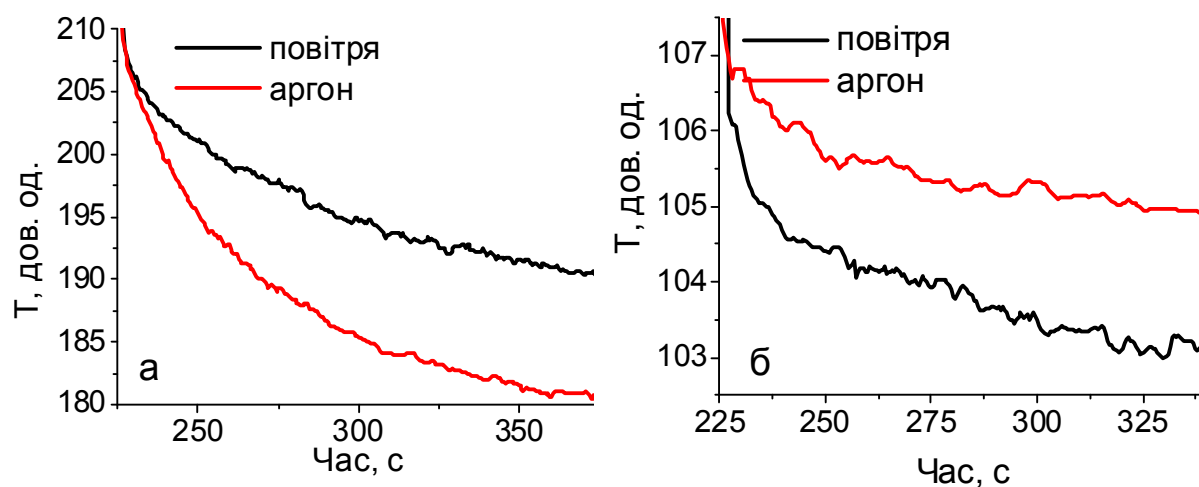


Рис. 4.13. Зміна пропускання на $\lambda=570$ нм після зняття збуджуючого випромінювання: а) плівка БР з домішкою ТЕА; б) плівка БР без домішок.

Як видно з результатів, заміщення кімнатного повітря аргонном приводить до появи незначних відмінностей у динаміці фотоіндукованих змін, однак їх теж можна пояснити зменшенням вологості.

На основі експериментальних кривих було проведено розрахунок напівперіоду життя інтермедіату M_{412} та загальної фотоіндукованої зміни пропускання для плівок БР з різним хімічним складом у різних умовах. Результати розрахунків наведено у таблиці 4.4.

Таблиця 4.4.

Характеристики плівок на основі БР у атмосфері аргону.

Плівка БР без домішок	$\tau_{1/2}$, с	ΔT , дов. од.
У повітрі	19	31
У атмосфері аргону	33	21
Плівки БР з домішкою ТЕА	$\tau_{1/2}$, с	ΔT , дов. од.
У повітрі	35	56
У атмосфері аргону	10	72

Як видно з результатів, для плівки БР без домішок спостерігається збільшення напівперіоду життя інтермедіату M_{412} і зменшення фотоіндукованої зміни пропускання при заміні повітря на аргон. Таку поведінку можна пояснити тим, що у атмосфері чистого аргону відбувається зменшення гідратації плівки через низьку відносну вологість, що приводить до збільшення напівперіоду життя інтермедіату M_{412} , а також зменшення кількості молекул, в яких може проходити фотоцикл, що приводить до зменшення ΔT . Для плівок БР з домішками ТЕА спостерігається протилежний ефект порівняно з простою плівкою БР. Попередні дослідження по впливу вологості на плівки БР з домішками ТЕА [154] показали, що при зменшенні вологості напівперіод життя M_{412} зменшується. Оскільки продув аргонном приводить до зменшення вологості, то і зменшується $\tau_{1/2}$ у атмосфері аргону порівняно з повітрям.

Аналогічні експерименти проводилися з вуглекислим газом. Як і у випадку з аргонном, продування камери вуглекислим газом приводить до незначних змін у характеристиках плівок, спричинених не взаємодією CO_2 з

БР, а зменшенням вологості. Порівняння характеристик плівок, розрахованих на основі експериментальних кривих, наведено у табл. 4.5.

Таблиця 4.5.

Характеристики плівок на основі БР у атмосфері CO₂.

	$\tau_{1/2}$, с	ΔT , дов. од.
У повітрі	26	33
У атмосфері CO ₂	38	22
Плівки БР з домішкою ТЕА	$\tau_{1/2}$, с	ΔT , дов. од.
У повітрі	36	58
У атмосфері аргону	17	67

Вплив CO₂ на оптичні параметри плівок БР аналогічний впливу аргону, що ще раз підтверджує висунуту раніше гіпотезу про механізм впливу інертних газів на параметри процесів, які проходять у плівках БР.

Аналогічно до попередніх експериментів, проводилися дослідження впливу парів перекису водню на властивості плівок на основі БР. Зокрема проводилися дослідження динаміки фотоіндукованих змін у плівці в присутності парів перекису водню. Дослідження проводилися для плівок з різним хімічним складом. Оскільки перекис водню достатньо нестабільна речовина, його випаровування буде скоріше за все приводити до збільшення вологості та наявності надлишкових іонів кисню в атмосфері в процесі розкладання перекису на воду та кисень.

Тому ми проводили дослідження плівок, спочатку піддаючи їх дії високої вологості, а потім - парів перекису водню. Результати досліджень динаміки фотоіндукованих змін у таких середовищах для плівки БР у матриці полівінілового спирту з додаванням ТЕА наведені на рис. 4.14.

У випадку збільшення вологості, зміни проходили у два етапи. На початковому етапі, одразу після внесення води у герметичну камеру з плівкою, відбувається поступове зростання вологості, що відображається нетиповою поведінкою пропускання при зовнішньому фотозбудженні (червона крива). Після стабілізації вологості спостерігається типова крива,

характерна для стану з мінімальними часами існування інтермедіату M_{412} (зелена крива). Після висушування плівки відбувається повернення до вихідних характеристик (фіолетова крива). У випадку внесення перекису водню ситуація дещо відрізняється. Крива (оранжева), яка характеризує фотодинаміку після стабілізації атмосфери плівки, практично не відрізняється від кривої, яка спостерігалася у випадку простого зростання вологості. Однак на початковому етапі, одразу після внесення перекису водню в камеру, форма кривої свідчить про короткочасне зростання часу життя інтермедіату M_{412} .

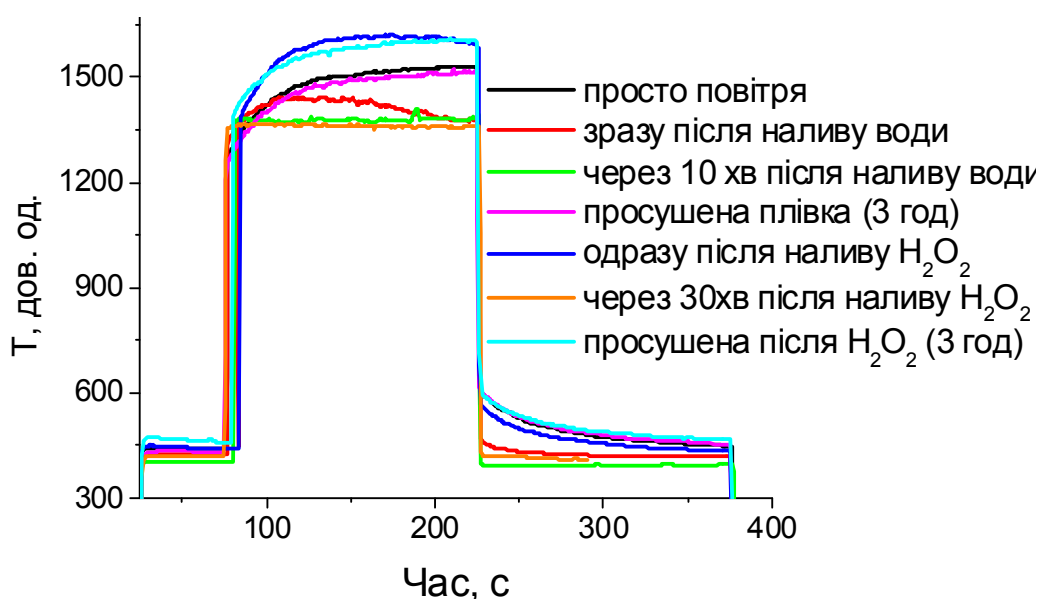


Рис. 4.14. Динаміка фотоіндукованих змін плівки БР з домішкою ТЕА у матриці ПВС при дії високої вологості та парів перекису водню.

Аналогічні дослідження, проведені для плівок з різними домішками та різними матрицями, показали, що для всіх них існують відмінності у характеристиках, спричинені впливом перекису водню. Однак всі відмінності спостерігаються лише на початковому етапі. Після стабілізації парогазової суміші зміни у характеристиках плівок аналогічні до тих, які спричинені високою вологістю. Зміна характеристик на початковому етапі для плівок з різним складом наведена в таблиці 4.6.

Зміни характеристик плівок БР з різними домішками, спричинені дією парів перекису водню.

Склад плівки	Повітря/Пара H_2O_2	
	$\Delta\tau_{1/2}$, с	ΔT , с
БР+желатина	2,5	4,1
БР+ПВС+ТЕА	13	39
БР+желатина+ТЕА	25	30
БР+желатина+АГХ	11	7
БР+желатина+ТЕА+АГХ	23	4

Як видно, максимальні зміни відбуваються у плівках з домішкою ТЕА, незалежно від типу матриці. Натомість мінімальні відхилення спостерігаються для плівки, у якій домішки відсутні. Це дозволяє зробити висновок, що зміни, які ми спостерігаємо, відбуваються за рахунок зміни ефективності впливу домішок на БР під дією парів перекису водню.

Для вивчення селективності плівок БР вони піддавалися впливу газу хлору (Cl_2) та парів етанолу. При дії газу Cl_2 на плівку БР у матриці желатини не спостерігалось ніяких значних змін оптичних властивостей плівки. А вплив парів етанолу високої концентрації викликав незворотні зміни поглинання на 570 нм, що вказує на денатурацію БР [155].

Висновки до розділу 4

1. Виявлено, що на відміну від плівок БР без домішок, де дифракційна ефективність постійно зростає при збільшенні вологості, для світлоадаптованих плівок БР з домішкою ТЕА (БР/ТЕА=1/120) дифракційна ефективність проходить через мінімум в області 75-80% при підвищенні вологості навколишнього середовища. Наявність мінімуму пояснюється присутністю у складі плівки триетаноламіну, який модифікує чутливість БР до зміни вологості. Максимальні значення дифракційної ефективності зафіксовані для вологості 93%.

2. Показано, що зміна вологості та концентрації аміаку довкола плівки БР приводить до зміни інтенсивності фіксованого люмінесцентного випромінювання квантових точок. Даний факт пояснюється зміною поглинальної здатності БР у спектральній області люмінесценції квантових точок під дією вологості та аміаку. Час, амплітуда та динаміка відклику відрізняється в залежності від технології отримання плівок, що очевидно пов'язано з різною структурою та пористістю матриць.

3. Встановлено, що вплив CO_2 та аргону на спектральні та фотоіндуковані зміни параметрів плівок на основі БР незначний і спричинений не взаємодією газу і БР, а зменшенням вологості плівки у процесі продування кювети газом. Показано, що у випадку дії парів перекису водню на плівку БР спостережені зміни відрізняються від змін, спричинених високою вологістю, лише на початковому етапі взаємодії. Максимальною чутливістю до парів H_2O_2 характеризуються плівки з домішкою ТЕА, незалежно від типу матриці. Мінімальні відхилення спостерігаються для плівки, у якій домішки відсутні. Це дозволяє зробити висновок, що зміни, які ми спостерігаємо, відбуваються за рахунок зміни функціональності домішок під дією парів перекису водню. Встановлено, що дія газу Cl_2 на плівку БР не приводить до змін її оптичних властивостей, у той же час вплив парів етанолу викликає незворотні зміни поглинання на 570 нм, що вказує на денатурацію БР.

ВИСНОВКИ

1. Встановлено, що максимальна продуктивність отримання бактеріородопсину досягається при використанні освітлення із заданим спектральним складом у процесі культивування (для штаму ET1001 максимальне утворення пурпурних мембран досягається при освітленні зеленою лампою з $\lambda_{\text{max}}=533$ нм, а для штаму RmR - при освітленні білою з $\lambda_{\text{max}}=543$ нм). Показано, що максимальні значення сенситометричної чутливості, величини фотоіндукованих змін та коефіцієнту участі молекул у фотоциклі досягаються для бактеріородопсину, отриманого з штаму 353-П під час обробки лізату ДНК-зою, протягом 3 годин.

2. Виявлено, що вдосконалені методики нанесення плівкових структур забезпечують рівномірний розподіл бактеріородопсину по об'єму плівки, при чому фрагменти пурпурних мембран орієнтуються переважно паралельно до поверхні підкладки; додаткова ультразвукова обробка плівкоутворюючої суміші протягом 120 с приводить до покращення оптичної якості та фоточутливості плівок. Внесення фрагментів ПМ приводить до зростання шорсткості поверхні плівки більш ніж на порядок, незалежно від типу використаної матриці, при чому плівки, отримані методом поливу, характеризуються мінімальними значеннями шорсткості, а плівки отримані методом центрифугування, – максимальними. Виявлено, що у плівках як з полімерними, так і з золь-гельними матрицями переважають пори діаметром від 1,5 до 50 нм, що вказує на те, що плівки є мезопористими, а об'єм пор для плівок на основі неорганічних матриць на 2,5 порядки перевищує аналогічний показник для плівок в органічних матрицях.

3. Встановлено, що для плівок БР у золь-гельних матрицях, так само як і у плівках з полімерними матрицями, зростання вологості від 47% до 97% приводить до збільшення поглинання плівки БР на 570 нм, зменшення величини фотоіндукованої зміни пропускання та часу життя інтермедіату M_{412} . Для плівок БР у золь-гельних матрицях у всьому діапазоні вологостей зміни оптичних характеристик пояснюються зменшенням часу існування

інтермедіату M_{412} і добре узгоджуються з даними представленими у науковій літературі. В той же час для желатинових плівок при вологостях вище 95% зміни, які ми спостерігали, частково спричинені впливом вологості на матеріал матриці.

4. Дослідження індукованих аміаком змін динаміки проходження фотоциклу та спектрів пропускання плівок БР показали, що наявність аміаку в навколишньому середовищі приводить до його адсорбції плівкою і, як наслідок, зростання часу життя інтермедіату M_{412} та амплітуди фотоіндукованих змін. Ці процеси відбуваються через тимчасове зв'язування вільних протонів молекулами аміаку, що створює їх локальний дефіцит і ускладнює репротонування ключових амінокислотних залишків. Показано, що описані вище зміни виникають під дією аміаку у плівках БР, отриманих з використанням як полімерних, так і золь-гельних матриць.

5. Виявлено, що, на відміну від плівок БР без домішок, де дифракційна ефективність постійно зростає при збільшенні вологості, для світлоадаптованих плівок БР з домішкою ТЕА (БР/ТЕА=1/120) дифракційна ефективність проходить через мінімум в області 75-80% при підвищенні вологості навколишнього середовища. Існування мінімуму пояснюється наявністю у складі плівки триетаноламіну, який модифікує чутливість БР до зміни вологості. Максимальні значення дифракційної ефективності зафіксовані для вологості 93%.

6. На основі нанокompозитних структур, які включають фотохромний БР та напівпровідникові квантові точки, створено чутливі елементи для волоконно-оптичних сенсорних систем з чутливістю до аміаку на рівні десятків ppm. Встановлено, що внесення напівпровідникових квантових точок не впливає на оптичну якість та структуру поверхні плівок БР і у желатинових, і у золь-гельних матрицях, при чому для золь-гельних матриць характерний рівномірний розподіл КТ по об'єму плівки, а для желатинових плівок КТ концентровані переважно в одному шарі плівки.

7. Встановлено, що люмінесцентне випромінювання квантових точок може запускати фотоцикл бактеріородопсину. Зміна вологості або концентрації аміаку приводить до зміни інтенсивності люмінесцентного випромінювання, що спричинено зміною поглинальної здатності БР у спектральній області люмінесценції квантових точок під дією вологості та аміаку.

СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ

1. Oesterhelt D. Rhodopsin-like Protein from the Purple Membrane of *Halobacterium halobium* / D. Oesterhelt, W. Stoeckenius // *Nature: New biology*. - 1971. - Vol. 233. P. 149-152.
2. Влияние азотосодержащих добавок и смачивателя на оптические свойства бактериородопсина / И. К. Бандровская, Б. Н. Зинзиков, С. Н. Ратушняк, [и др.] // *Метрологическое обеспечение производства и контрольно-измерительная техника*. - Ужгород. - 1988. - № 6. - С. 15-18.
3. Пуга Г. Д. Взаимодействие монокинетических электронов низких энергий с пленками бактериородопсина / Г. Д. Пуга, Ю. Д. Шершун. // *Украинский физический журнал*. - 1990. - Том 35, №3. - С. 438-440.
4. Оптические параметры пленок на основе БР / И. К. Бандровская, Ю. Д. Шершун, А. В. Склянкин, [и др.] // *Вопросы оборонной техники*. - 1989. – Т. 22/№6. – С. 21-25.
5. Бандровская И. К. О механизме взаимодействия пурпурной мембраны с матрицей и химическими добавками / И. К. Бандровская, Ю. Д. Шершун, З. И. Батори-Тарци, Т. А. Красницкая // *Разработка и исследование активной и элементарной базы устройств оптической обработки информации*. - К.: Изд. ИП МЭ АН УССР. - 1989. - Вып.3. - С. 172-180.
6. Hampp N. Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories / N. Hampp // *Chem Rev.* - 2000. - Vol. 100. - P. 1755-1776.
7. Hampp N. Large aperture bacteriorhodopsin films / N. Hampp // *SPIE's International Technical Group Newsletter. Holography*. - 1999. - Vol. 10. - P. 7.
8. Wang W. W. Biomedical Optics & Medical Imaging Toward mimicking biological vision with protein-based flexible imaging arrays / W. W. Wang, G. K. Knopf and A. S. Bassi // *SPIE*. - 2006. - Vol. 20. - P. 33-37.
9. Vectorial insertion of bacteriorhodopsin for directed orientation assays in various polymeric biomembranes / H. Lee, D. Ho, K. Kuo, C. D. Montemagno // *Polymer*. - 2006. - Vol. 47. - P. 2935–2941.

10. Bacteriorhodopsin – perspective biomaterial for molecular nanophotonics / G. E. Adamov, A. G. Devyatkov, L. N. Gnatyuk, [et al.] // *Journal of Photochemistry and Photobiology A: Chemistry*. - 2007. - Vol. 263. - P. 1-19

11. Dynamic holography in bacteriorhodopsin/gelatin films: effects of light-dark adaptation at different humidity / E. Korchemskaya, N. Burykin, S. Bugaychuk, [et al.] // *Photochem and Photobiol.* - 2007. - Vol. 83. - P. 403-408.

12. Bacteriorhodopsin as an electronic conduction medium for biomolecular electronics / Y. Jin, T. Honig, I. Ron, [et al.] // *Chem. Soc. Rev.* - 2008. - Vol. 37. - P. 2422–2432.

13. Protein-based ultrafast photonic switching / L. Fabian, Z. Heiner, M. Mero [et al.] // *Optics Express*. - 2011. - Vol. 19. - P. 18861-18870.

14. Reversal in the kinetics of the M state decay of D96N bacteriorhodopsin: probing of enzyme catalyzed reactions / P. C. Pandey, S. Singh, B. Upadhyay, [et al.] // *Sensors & Actuators B*. 1996. - Vol. 36. - P. 470–474.

15. Балашов С. П. Фотохимические превращения бактериородопсина / С. П. Балашов, Ф. Ф. Литвин // М.: - Изд-во Моск. ун-та. - 1985. - 168 с.

16. Varo G. Effects of the crystalline structure of purple membrane on the kinetics and energetics of the bacteriorhodopsin photocycle / G. Varo, J. K. Lanyi // *Biochemistry*. - 1991. - Vol. 30. - P. 1165-1171.

17. Inter-helical Hydrogen Bonds Are Essential Elements for Intra-protein Signal Transduction: The Role of Asp115 in Bacteriorhodopsin Transport Function / A. Peralvarez-Marín, V. A. Lorenz-Fonfria, J. L. Bourdelande, [et al.] // *J. Mol. Biol.* - 2007. - Vol. 368. - P. 666–676.

18. Lanyi J. K. Proton transfers in the bacteriorhodopsin photocycle / J. K. Lanyi // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2006. - Vol. 1757. P. 1012–1018.

19. Dynamic aspects of extracellular loop region as a proton release pathway of bacteriorhodopsin studied by relaxation time measurements by solid state NMR / I. Kawamura, M. Ohmine, J. Tanabe, [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2007. - Vol. 1768. - P. 3090–3097.

20. Lanyi J.K. Structural Changes in the L Photointermediate of Bacteriorhodopsin / J.K. Lanyi, B. Schobert // *J. Mol. Biol.* - 2007. - Vol. 365. - P. 1379–1392.

21. Suppression of the back proton-transfer from Asp85 to the retinal Schiff base in bacteriorhodopsin: A theoretical analysis of structural elements / A.N. Bondar, S. Suhai, S. Fischer, [et al.] // *Journal of Structural Biology.* - 2007. - Vol. 157. - P. 454–469.

22. Simultaneous measurements of fast optical and proton current kinetics in the bacteriorhodopsin photocycle using an enhanced spectrophotometer / J.W. Kakareka, P.D. Smith, T.J. Pohida, R.W. Hendler // *J. Biochem. Biophys. Methods.* - 2008. - Vol. 70. - P. 1116–1123.

23. Crystal Structures of Different Substates of Bacteriorhodopsin's M Intermediate at Various pH Levels / M. Yamamoto, N. Hayakawa, M. Murakami, T. Kouyama // *J. Mol. Biol.* - 2009. - Vol. 393. - P. 559–573.

24. Chen D. Structural Changes in the N and N0 States of the Bacteriorhodopsin Photocycle // D. Chen, J. K. Lanyi // *Biophysical Journal.* - 2009. - Vol. 96. - P. 2779–2788.

25. Photoelectrochemical Cycle of Bacteriorhodopsin / I.V. Kalaidzidis, A.D. Kaulen, A.N. Radionov, L.V. Khitrina // *Biochemistry (Moscow).* - 2001. - Vol. 66/11. - P. 1220-1233.

26. Khitrina L.V. Bacteriorhodopsin. Correspondence of the Photocycle and Electrogenesis with Sites of the Molecule / L.V. Khitrina, A.L. Ksenofontov // *Biokhimiya.* - 2004. - Vol. 69/12. - P. 1725-1728.

27. Mechanism of Primary Proton Transfer in Bacteriorhodopsin / A. N. Bondar, M. Elstner, S. Suhai, [et al.] // *Structure.* - 2004. - Vol. 12. - P. 1281–1288.

28. Lanyi J.K. X-Ray Crystallography of Bacteriorhodopsin and Its Photointermediates: Insights into the Mechanism of Proton Transport / J.K. Lanyi // *Biochemistry (Moscow).* - 2001. - Vol. 66/11. - P. 1192-1196.

29. Predicted bacteriorhodopsin from *Exiguobacterium sibiricum* is a functional proton pump / L.E. Petrovskaya, E.P. Lukashev, V.V. Chupin, [et al.] // FEBS Letters. - 2010. - Vol. 584. - P. 4193–4196.

30. Suppressed or recovered intensities analysis in site-directed ¹³C NMR: Assessment of low-frequency fluctuations in bacteriorhodopsin and D85N mutants revisited / H. Saito, A. Kira, T. Arakawa [et al.] // Biochimica et Biophysica Acta. - 2010. - Vol. 1798. - P. 167–176.

31. Ahmadi M. Effective atomic numbers and electron densities of bacteriorhodopsin and its comprising amino acids in the energy range 1 keV–100 GeV / M. Ahmadi, N. Lunscher, J.T.W. Yeow // Nuclear Instruments and Methods in Physics Research B. - 2013. - Vol. 300. - P. 30–34.

32. Role of trimer–trimer interaction of bacteriorhodopsin studied by optical spectroscopy and high-speed AFM / H. Yamashita, K. Inoue, M. Shibata, [et al.] // Journal of Structural Biology. - 2013. - Vol. 184. - P. 2–11.

33. Blaurock A.E. Structure of the purple membrane / A. E. Blaurock, W. Stoeckenius // Nature. - 1971. - Vol. 233. - P. 152–155.

34. Всеволодов Н. Н. Биопигменты - фоторегистраторы. Фотоматериал на бактериородопсине / Н.Н. Всеволодов // - М. : Наука. - 1988. - 222 с.

35. Светочувствительные биологические комплексы и оптическая регистрация информации : [сб. науч. работ / науч. ред. Иваницкий Г. Р.]. - Пушино: Рута, 1986. - 310 с.

36. W. Stoeckenius A Morphological study of *Halobacterium Halobium* and its lysis in media of low salt concentration / W. Stoeckenius, R. Rowen // The Journal of Cell Biology. - 1967. - Vol. 34. - P. 365 - 393.

37. BR Saline [Электронный ресурс] / N. Hampp // Philipps-Universität Marburg. - 2014. - Режим доступа: <http://www.uni-marburg.de/fb15/ag-hampp/forschung/BR/Galerie/BRVergroesserungen/BRSaline>

38. Henderson R. The Structure of the Purple Membrane from *Halobacterium halobium* - Analysis of the X-ray Diffraction Pattern/ R. Henderson // J. Mol. Biol. - 1975.- Vol. 93.- P. 123 - 138.

39. Atomic force microscopy of native purple membrane / D. J. Muller, J. B. Heymann, F. Oesterhelt [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2000. - Vol. 1460. - P. 27 - 38.

40. Bacteriorhodopsin as a high-resolution, high-capacity buffer for digital holographic measurements / D. H. Barnhart, W. D. Koek, T. Juchem, N. Hampp // *Meas. Sci. Technol.* - 2004. - Vol. 15. - P. 639–646.

41. High-speed integrated optical logic based on the protein bacteriorhodopsin / A. Mathesz, L. Fabian, S. Valkai, [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2013. - Vol. 46. - P. 48–52.

42. Sharma P. Photonic spectral modulation in bacteriorhodopsin molecules and optimization of signal wavelength / P. Sharma // *Optik*. - 2013. - Vol. 124. - P. 7003 – 7006.

43. Sharma P. Enhancement of speed of digital operation in bacteriorhodopsin based photonic switch / P. Sharma // *Optik*. - 2010. - Vol. 121. - P. 384–388.

44. All-optical continuous-tunable image switch based on nonlinear photoinduced anisotropy in bacteriorhodopsin film / G. Chena, X. Shanga, G. Yang, [et al.] // *Optik*. - 2009. - Vol. 120. - P. 721–725.

45. Chu L. Bacteriorhodopsin-based photo-electrochemical cell // L. Chu, C. Yen, M. A. El-Sayed // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2010. - Vol. 26. - P. 620–626.

46. Downie J. D. Optical Processing of Speckle Images with Bacteriorhodopsin for Pattern Recognition / J. D. Downie // *Optics and Lasers in Engineering*. - 1995. - Vol. 23. - P. 121-136

47. Вплив штаму галобактерій та методики очистки на оптичні характеристики плівок бактеріородопсину / І. І. Трикур, І. І. Сакалош, З. І. Баторі-Тарці, [та інші] // *Науковий вісник УжНУ, серія Фізика*. - 2013. - Випуск 34. - С. 68-71.

48. Плівкові структури фотохромного матеріалу бактеріородопсину (ФХМБР). ТУ У 02070832.008 – 97. від 25.12.1997.

49. Одержання та структурні особливості нанокмпозитних плівок фотохромний бактеріородопсин - квантові точки CdSe/ZnS - мікропориста золь-гельна матриця / Шаркань Й.П., Рамсен Дж.Дж., Сакалош І.І., Січка М.Ю., Корпош С.О., Трикур І.І. // Фізика і технологія тонких плівок і наносистем. Матеріали МКФТТПН-ХІІ: У 2т., Ворохта, Україна, 18-23 травня 2009 р., – Т.1, с. 346-347., – Івано-Франківськ: Плай, 2009.– 484с.

50. Quantum Dots as a Source of Actinic Radiation in Sensor Based on Bacteriorhodopsin / Trikur I.I., Sakalosh I.I., Horvat G.T., Sichka M.Y., Korposh S.O., Sharkany J.P., Rizak V.M. // International Meeting Cluster and Nanostructured Materials (CNM-3), Ukraine, Uzhhorod - Vodohraj 14-17 October, 2012, p. 50.

51. Одержання плівок бактеріородопсину в органічних та неорганічних матрицях на торці оптичного волокна / Сакалош, І. І. Трикур, Й. П. Шаркань, [та інші] // Науковий вісник УжНУ, серія Фізика. - 2013. - Випуск 34. - С. 230-235.

52. Одержання та структурні особливості нанокмпозитних плівок бактеріородопсин - квантові точки CdSe/ZnS – мікропориста золь-гельна матриця / Й. П. Шаркань, Дж. Дж. Рамсен, І. І. Трикур, [та інші] // Фізика і хімія твердого тіла. - 2010. - Т. 11/1. - С. 170-175.

53. Bathori-Tarsi Z. The effect of chemical additives on the bacteriorhodopsin photocycle / Z. Bathori-Tarsi, K. Ludmann, G. Varo // J. Photochem. Photobiol. B: Biol. - 1999. - Vol. 49. - P. 192-197.

54. Modification of properties of light-sensitive bacteriorhodopsin layers / Z. Bathori-Tarczy, O. I. Korposh, N. P. Frolova, V. V. Jarosh // International workshop on advanced Technologies of multicomponent solid films and structures. - Uzhgorod. - 1994. - P. 53-54.

55. Фотохромний матеріал на основі бактеріородопсину (ФХМБР). ТУ У 02070832.007-97. від 25.12. 1997.

56. Bakteriorodopszin-alapanyagú fotochrom retegek / Z. Bathori-Tarczy, J. Sarkany, I. Bandrovszkaja, [et al.] // Tudományos talalkozó. Budapest. - 1992. - P. 110-112.

57. Вплив параметрів навколишнього середовища на характеристики нанокompозитних плівкових структур золь-гельна SiO₂ матриця – бактеріородопсин – квантові точки CdSe/ZnS / І. І. Трикур, І. І. Сакалош, Г. Т. Горват, [та інші] // Науковий вісник УжНУ, серія Фізика. - 2012. - Випуск 31. - С. 211-219.

58. Denaturation of bacteriorhodopsin by organic solvents / S. Mitaku, K. Ikuta, H. Itoh, [et al.] // Biophys Chem. - 1988. - Vol. 30/1. - P. 69-79.

59. Ингибирование актериородопсина формалином и лантаном / Л. В. Хитрина, Л. А. Драчев, А. Д. Каулен, Л. Н. Чекулаева // Биохимия. - 1982. - Т.47. - С. 1763-1772.

60. Соли поливалентных металлов как ингибиторы фотохимических превращений бактерiorодопсина / Л. А. Драчев, А. Д. Каулен, Л. В. Хитрина // Биохимия. - 1988. - Т. 53 - С. 663-667.

61. Вплив вологості на фотоіндуковані процеси у плівках бактеріородопсину / І. І. Трикур, О. І. Корпош, Н. П. Фролова, В. М. Різак // Науковий вісник УжНУ, серія Фізика. - 2006. - Випуск 19. - С. 68-74.

62. Трикур І. І. Вплив вологості на дифракційну ефективність голограм, записаних на плівках бактеріородопсину з домішкою ТЕА / І. І. Трикур, М. М. Бурикін, В. М. Різак // Науковий вісник УжНУ, серія Фізика. - 2008. - Випуск 20. - С. 69-73.

63. 14-Fluorine bacteriorhodopsin gelatin films: performance at different relative humidities / A. B. Druzhko, S. K. Pirutin, A. R. de Lera, [et al.] // Journal of Biological Physics and Chemistry. - 2004. - Vol. 4. - P. 11-16.

64. Dyukova T. V. Dehydration effects on D96N bacteriorhodopsin films / T. V. Dyukova, E. P. Lukashev // Thin Solid Films. - 1996. - Vol. 283. - P. 1- 4.

65. The quantitative analysis of three action modes of volatile anesthetics on purple membrane / Nakagawa, T., Hamanaka, T., Nishimura, [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 2000. - Vol. 1467. - P. 1390–149.

66. Electrokinetic charge of the anesthetic-induced bR480 and bR380 spectral forms of bacteriorhodopsin / S. G. Taneva, J. M. M. Caaveiro, I. B. Petkanchin, F. M. Goni // *Biochimica et Biophysica Acta*. - 1995. - Vol. 1236. P. 331-337.

67. Volatile anesthetics cause conformational changes of bacteriorhodopsin in purple membrane / S. Nishimura, T. Mashimo, K. Hiraki, [et al.] // *Biochem. Biophys. Acta*. - 1985. - Vol. 818/3. - P. 421-426.

68. Effects of volatile anesthetics on bacteriorhodopsin in purple membrane, *Halobacterium halobium* cells and reconstituted vesicles / T. Uruga, T. Hamanaka, Y. Kito, [et al.] // *Biophys Chem*. - 1991. - Vol. 41/2. - P. 157-168.

69. Bacteriorhodopsin thin film as a sensitive layer for an anaesthetic sensor / E. Maccioni, G. Radicchi, V. Erokhin, [et al.] // *Thin Solid Films*. - 1996. -Vol. 284. - P. 898–900.

70. Біосенсори анестетиків з чутливим елементом на основі фотохромних біомолекулярних нанокompозитних оптичних структур / Шаркань Й.П., Потапчук А.М., Січка М.Ю., Маляр Н.М., Трикур І.І., Сакалош І.І., Мельничук Д.В. // Український Міжнародний конгрес «Стоматологічна імплантација. Остеоінтеграція». Тези доповідей , Київ, Україна, 28-29 квітня 2012 р., с. 260-262.

71. A. Potapchuk, M. Sichka, I. Sakalosh, I. Trikur, I. Shevchuk, D. Melnichuk, V. Rizak Sensing elements based on photochromic nanocomposite film structures of the bacteriorhodopsin for biosensors of anesthetics. *INTER Medical Journal*, Vol 1/2014, p. 115-120.

72. Saturable and unsaturable binding of a volatile anaesthetic enflurane with model lipid vesicle membranes / T. Yoshida, H. Okabayashi, H. Kamaya, I. Ueda // *Biochim. Biophys. Acta*. - 1989. - Vol. 979. - P. 287-293.

73. Дослідження впливу аміаку на чутливі елементи на торці Y-подібного волоконно-оптичного розгалужувача / І. І. Сакалош, І. І. Трикур,

Й. П. Шаркань, [та інші] // Науковий вісник УжНУ, серія Фізика. - 2014. - Випуск 35. - С. 79-83.

74. Bacteriorhodopsin-based biochromic films for chemical sensors / J. P. Sharkany, S. O. Korposh, Z. I. Batori-Garci, I. I. Trikur, [et al.] // Sensors Actuators B. - 2005. - Vol. 107. - P. 70-81.

75. Sensitive elements based on bacteriorhodopsin for fiber-optics sensors of chemical components / J. P. Sharkany, I. I. Trikur, S.O. Korposh, J. J. Ramsden // Proc. SPIE. - 2005. - Vol. 5855. - P. 411-414.

76. Multisensor fiber-optic system with bionanocomposite sensitive elements / Sharkan Y.P., Ramsden J.J., Kokenyesi S.S., Sakalosh I.I., Sichka M.Y., Trikur I.I. // Materials of The 2nd International Meeting on Clusters and Nanostructured Materials (CNM-2)., Uzhgorod, Ukraine, 27 September – 30 September, 2009, p. 165.

77. Sensitive elements for luminescent chemical sensors based on nanocomposite structures bacteriorhodopsin-semiconductor quantum dots CdSe/ZnS / Y.P. Sharkany, I.I. Trikur, I.I. Sakalosh, , J.J. Ramsden // Proc. of ICOOPMA 2010., Budapest, Hungary, August 15 – 20, 2010, p. 207.

78. Modification of sensitive elements of chemical sensors on the base of bacteriorhodopsin in inorganic sol-gel matrices / I.I. Trikur, J.P. Sharkan, O.I. Korposh, J.J. Ramsden // Proc. of Mediterranean-East-Europe Meeting Multifunctional nanomaterials: NanoEuroMed 2011, Uzhgorod, Ukraine 12-14 May, 2011., p. 127-128.

79. Biochromic films based on the bacteriorhodopsin for chemical sensors / J.P. Sharkany, S.A. Korposh, J.J. Ramsden, I.I. Trikur // Proc. of VII Europt(R)ode, Madrid, Spain April 4-7, 2004, p. 13.

80. Sensitive elements based on bacteriorhodopsin for fiber-optics sensors of chemical components / J.P. Sharkany, I.I. Trikur, S.O. Korposh, J.J. Ramsden // 17th International Conference on Optical Fibre Sensors, Bruges, Belgium, May 23-27, 2005.

81. Патент на корисну модель 98455 Україна, МПК В 01 D 21/32 (2006/01). Волоконно-оптичний пристрій для дослідження мікрооб'ємів фізіологічних розчинів / Сакалош І. І., Шаркань І. Й., СічкаМ. Ю., Трикур І. І., Різак В. М.; заявник і власник ДВНЗ "УжНУ" - № у 2014 12698; заявл. 26.11.2014; опубл. 27.04.2015, Бюл. №8.

82. Ahmadi M. Fabrication and characterization of a radiation sensor based on bacteriorhodopsin / M. Ahmadi, J. T. W. Yeowa // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2011. - Vol. 26. - P. 2171–2176.

83. Ahmadi M. Bacteriorhodopsin for superficial X-ray sensing / M. Ahmadi, E. K. Osei, J. T. W. Yeow // *Sensors and Actuators B*. - 2012. - Vol. 166. - P. 177–183.

84. Hong F. T. Molecular Sensors based on the photovoltaic effect of bacteriorhodopsin: origin of differential responsivity / F. T. Hong // *Material Science and Engineering C*. - 1997. - Vol. 4. - P. 267-285.

85. Pandey P. C. Dependence of M, N and O states decay kinetics of D96N bacteriorhodopsin on amine and amino compounds and its application in chemical sensing / P. C. Pandey, B. C. Upadhyay, C. M. D. Pandey, H. C. Pathak // *Sensors & Actuators B: Chemical*. - 1998. - Vol. 46. - P. 80–86.

86. Sakalosh I. I. Threshold integral-optic chemical sensor with sensitivity controlled by external illumination / I. I. Sakalosh, Y. P. Sharkany, J. J. Ramsden, N. B. Zhitov // *Phys. Status Solid C*. - 2011. - Vol. 8/9. - P. 2950–2952.

87. Kikineshy A. Materials and devices for fiber optic sensors / A. Kikineshy, Z. Bathori-Tarczy, Y. Sharkany // *NATO ASI Series. High Technology*. - 1995. - Vol. 3. - P. 181-184.

88. Mesostructured materials for optical applications: from low-k dielectrics to sensors and lasers / G. Wirnsberger, P. Yang, B.J. Scott // *Spectrochimica Acta Part A*. - 2001. - Vol. 57. - P. 2049–2060.

89. X-ray-Radiation-Induced Changes in Bacteriorhodopsin Structure / V.I. Borshchevskiy, E.S. Round, A.N. Popov, [et al.] // *J. Mol. Biol.* - 2011. - Vol. 409. - P. 813–825.

90. A Transporter Converted into a Sensor, a Phototaxis Signaling Mutant of Bacteriorhodopsin at 3.0 Å / E.N. Spudich, G. Ozorowski, E.V. Schow, [et al.] // J. Mol. Biol. - 2012. - Vol. 415. - P. 455–463.

91. Ueda I. Molecular mechanisms of anesthesia / I. Ueda, H. Kamaya // Anesth Analg. - 1984. - Vol. 63(10). - P. 929–945.

92. Скануюча електронна мікроскопія і рентгеноспектральний мікроаналіз [Електронний ресурс] / Ю. Дацюк // Наукові дослідження. - 2010. - Режим доступу: http://www.lnu.edu.ua/faculty/geology/phis_geo/Datsyuk/SEM.html.

93. The S-5200 Ultra-High Resolution FE SEM [Електронний ресурс] // Hitachi High Technologies America, Inc. - 2001. Vol. 98. - Режим доступу: http://hitachi-hta.com/sites/default/files/technotes/Hitachi_5200.pdf

94. Атомно-силовая микроскопия [Електронний ресурс] / М. О. Галлямов, И. В. Яминский // Учебно-научный центр Бионаноскопия при СУНЦ МГУ. - 2014. - Режим доступу: <http://www.nanoscopy.org/tutorial/afm/afm.htm>

95. Russell P. SEM and AFM: Complementary techniques for surface investigations / P. Russell, D. Batchelor // Microscopy and Analysis. - 2001. - Vol. 15/4. - P. 9-12.

96. Surface Analysis Facility. CE Instruments Sorptomatic 1990 [Електронний ресурс] // Department of Chemistry - University of Oxford. - 2014. - Режим доступу: <http://saf.chem.ox.ac.uk/surface-area-analysis.aspx>

97. International Union of Pure and Applied Chemistry (IUPAC) Reporting physisorption data for gas/solid system // Pure and Applied Chemistry. - 1985. - Vol. 57. - P. 603-619.

98. Basic operating principles of the Sorptomatic 1990. [Електронний ресурс] // Department of Chemistry - University of Oxford. - 2014. - Режим доступу: <http://saf.chem.ox.ac.uk/Instruments/BET/sorptoptprin.html>

99. Brunauer S. Adsorption of gases in multimolecular layers / S. Brunauer, P. H. Emmet, E. Teller // *Journal of the American Chemical Society*. - 1938. - Vol. 60. - P. 309-319.

100. Barrett E. P. The determination of pore volume and area distributions in porous substances. Computations from Nitrogen Isotherms / E. P. Barrett, L. G. Joyner, P. P. Halenda // *Journal of the American Chemical Society*. - 1951. - Vol. 73. - P. 373-380.

101. USB4000 Miniature Fiber Optic Spectrometer [Електронний ресурс] // Ocean Optics, Inc. - 2012. - Режим доступу: <http://www.oceanoptics.com/products/usb4000.asp>

102. Korchemskaya E. Dynamic Holography for Study of Nonlinear Optical Processes in Biological Photoreceptor Molecule / E. Korchemskaya, D. Stepanchikov, S. Bugaychuk, N. Burykin // *NATO Security through Science Series*. - 2005. - P. 431-450.

103. Особливості спектрів поглинання лізатів галофільних бактерій різних штамів / Ю.В. Андрашко, І.І. Трикур, І.І. Цьома, [та інші] // *Науковий вісник УжНУ. Серія Фізика*. - 2002. - Випуск 11. - С. 25-28.

104. Вплив освітлення на продуктивність бактеріородопсину *Halobacterium Salinarium* / Й.П. Шаркань, М.Ю. Січка, В.В. Ярош [та інші] // *Науковий вісник УжНУ, серія Фізика*. - 2008. - Випуск 22. - С. 60-63.

105. Facile isolation of purple membrane from *Halobacterium salinarum* via aqueous-two-phase system / P. J. Shiu, Y. H. Ju, H. M. Chen, C. K. Lee // *Protein Expression and Purification*. - 2013. - Vol. 89. P. 219–224.

106. Shiu P. One-step purification of delipidated Bacteriorhodopsin by aqueous-three-phase system from purple membrane of *Halobacterium* / P. Shiu, H. Chen, C. Lee // *Food and bioproducts processing*. - 2014. - Vol. 474. - P. 1-7.

107. Oesterhelt D. Isolation of the cell membrane of *halobacterium halobium* and its fractionation into red and purple membrane / D. Oesterhelt, W. Stoeckenius // *Method Enzimol*. - 1974. - Vol. 31. - P. 667 - 678.

108. Optimization of bacteriorhodopsin production by *Halobacterium salinarium* PTCC 1685 / M.F. Ghasemi, A. Shodjai-Arani, N. Moazami // *Process Biochemistry*. - 2008. - Vol. 43. - P. 1077–1082.

109. Genji T. Efficient production and purification of functional bacteriorhodopsin with a wheat-germ cell-free system and a combination of Foscholine and CHAPS detergents / T. Genji, A. Nozawa, Y. Tozawa // *Biochemical and Biophysical Research Communications*. - 2010. - Vol. 400. - P. 638–642.

110. Bacteriorhodopsin Encapsulated in Transparent Sol-Gel Glass: A New Biomaterial / S. Wu, L. M. Ellerby, J. S. Cohan // *Chem. Mater.* - 1993. - Vol. 5. - P. 115-120.

111. Ikonen M. Bacteriorhodopsin in Langmuir-Blodgett films preparation, structure and photoinduced optical and electrical properties / M. Ikonen // *Commentat. Physico-Mat. Chemico-Med.* - 1993. - Vol. 149. - P. 1–27.

112. Dave B. C. Encapsulation of Proteins in Bulk and Thin Film Sol-Gel Matrices / B. C. Dave, J. M. Miller, B. Dunn. // *Journal of Sol-Gel Science and Technology*. - 1997. - Vol. 8. - P. 629-634.

113. Weetall H. H. Retention of bacteriorhodopsin activity in dried sol-gel glass / H. H. Weetall // *Biosensors & Bioelectronics*. - 1996. - Vol. 11/3. - P. 327-333.

114. Wang B. Silica sol-gel composite film as an encapsulation matrix for the construction of an amperometric tyrosinase-based biosensor / B. Wang, J. Zhang, S. Dong // *Biosensors & Bioelectronics*. - 2000. - Vol. 15. - P. 397-402.

115. Rao A. V. Synthesis and physical properties of TEOS-based silica aerogels prepared by two step (acid-base) sol-gel process / A. V. Rao, S. D. Bhagat // *Solid State Sciences*. - 2004. - Vol. 6. - P. 945-952.

116. Bottcher H. Bioactive Sol-Gel Coatings / H. Bottcher // *J. Prakt. Chem.* - 2000. - Vol. 342/5. - P. 427-435.

117. Gupta R. Effect of ethanol variation on the internal environment of sol-gel bulk and thin films with aging / R. Gupta, S. Mozumdar, N. K. Chaunhury // *Biosensors & Bioelectronics*. - 2005. - Vol. 68. - P. 124-129.

118. Reisfeld R. Porous glasses as a matrix for incorporation of photonic materials. Pore determination by positron annihilation lifetime spectroscopy / R. Reisfeld, T. Saraidarov, B. Jasinska // *Opt. Mater.* - 2004. - Vol. 26. - P. 181–189.
119. Takahashi M. Synthesis and Fabrication of Inorganic Porous Materials: From Nanometer to Millimeter Sizes / M. Takahashi, M. Fuji // *KONA.* - 2002. - Vol. 20. - P. 84-97.
120. Synthesis and characterization of polymetalate based photochromic inorganic–organic nanocomposites / T.R. Zhang, W. Feng , R. Lu // *Thin Solid Films.* - 2002. - Vol. 402. - P. 237–241.
121. Aqueous Sol-Gel Process for Protein Encapsulation / R.B. Bhatia, C.J. Brinker, A.K. Gupta, [et al.] // *Chem. Mater.* - 2000. - Vol. 12. - P. 2434-2441.
122. Films based on bacteriorhodopsin in sol-gel matrices / S. O. Korposh, M. Y. Sichka, I. I. Trikur, [et al.] // *Proc. SPIE.* - 2005. - Vol. 5956. - P. 312-320.
123. Organically modified sol-gel sensors / O. Lev, M. Tsionsky, L. Rabinovich, V. Glezer, [et al.] // *Analyt. Chem.* - 1995. - Vol. 67. - P. 22–30.
124. Podbielska H. Sol-gel technology for biomedical engineering / H. Podbielska, A. Ulatowska-Jarza // *Bulletin of the polish academy of sciences.* - 2005. - Vol. 53(3). - P. 261-271
125. Special photochrome material on the base of bacteriorhodopsin / I. K. Bandrovskaja, Y. D. Shershun, Z. I. Batori-Tartsi // *SPIE – The International Society for Optical Engineering. International Conference on Optical Storage, Imaging, and Transmission of Information.* - Kiev. - 1996. - P. 91-94.
126. Русанова Т. Ю. Золь-гель материалы с иммобилизованными красителями трифенилметанового ряда как чувствительные элементы оптических сенсоров pH / Т. Ю. Русанова, Н. А. Левина, С. Н. Штыков // *Известия Саратовского университета. Серия Химия. Биология. Экология.* - 2009. - Том. 9. - С. 7–12.
127. Immuno-Atomic Force Microscopy of Purple Membran / D. J. Muller, C. Schoenenberger, G. Buldt // *Biophys. Journ.* - 1996. - Vol. 70. - P. 19-26.

128. From Images to Interactions: High-Resolution Phase Imaging in Tapping-Mode Atomic Force Microscopy / M. Stark, C. Muller, D. J. Muller, R. Guckenberger // *Biophysical Journal*. - 2001. - Vol. 80. - P. 3009–3018.

129. Грег С. Адсорбция. Удельная поверхность. Пористость / С. Грег, К. Синг // - М. : Наука. - 1984. - С. 220.

130. Hyeon-Lee J. Aero-Sol-Gel Synthesis of Nanostructured Silica Powders / J. Hyeon-Lee, G. Beaucage, S. E. Pratsinis // *Chem. Mater.* - 1997. - Vol. 9. - P. 2400-2403

131. Zarezba-Grodz I. Synthesis and properties of an inorganic–organic hybrid prepared by the sol–gel method / I. Zarezba-Grodz, W. Mista, W. Strezk [et al.] // *Optical Materials*. - 2004. - Vol. 26. - P. 207–211.

132. Spectroscopic behavior of hybrid materials obtained by the sol–gel technique / J. Sokolnicki, R. Wiglusz, S. Radzki, [et al.] // *Optical Materials*. - 2004. - Vol. 26. - P. 199-206.

133. Composite materials with photochromic component and semiconductors quantum dots for sensors elements / J. P. Sharkany, J. J. Ramsden, N. B. Zhitov // *Clusters and nanostructured materials (CNM-2006)*. 2006.- Uzhgorod, "Karpaty", Ukraine october 9 - 12, 2006.

134. Quantum dot enhancement of bacteriorhodopsin-based electrodes // M. H. Griepa, K. A. Walczaka, E. M. Winderb, [et al.] // *Biosensors and Bioelectronics*. - 2010. - Vol. 25. - P. 1493–1497.

135. Water molecules and exchangeable hydrogen ions at the active centre of bacteriorhodopsin localized by neutron diffraction. Elements of the proton pathway? / G. Papadopoulos, N. A. Dencher, G Zaccai, G Büldt // *J. Mol. Biol.* - 1990. - Vol. 214/1. - P. 15–19.

136. Rogan P. K. Hydration in purple membrane as a function of relative humidity/ P. K. Rogan, G. Zaccai // *J. Mol. Biol.* - 1981. - Vol. 145/1. - P. 281–284.

137. Varo G. Distortions in the photocycle of bacteriorhodopsin at moderate dehydration / G. Varo, J. K. Lanyi // *Biophys. J.* - 1991. - Vol. 59. - P. 313-322.

138. Волоконно-оптичний пристрій для оцінки параметрів мікродоз фізіологічних розчинів / І. І. Сакалош, Й. П. Шаркань, Н. Б. Житов [та інші.] // Науковий вісник УжНУ. Серія Фізика. - 2011 - Випуск 30. – С. 139-143.

139. Hildebrandt P. Role of Water in Bacteriorhodopsin's Chromophore: Resonance Raman Study / P. Hildebrandt, M. Stockburger // Biochemistry. - 1984. - Vol. 23. - P. 5539-5548.

140. Weetall H. H. Optical and electrical properties of bacteriorhodopsin Langmuir-Blodgett films / H. H. Weetall, L. A. Samuelson // Thin Solid Films. - 1998. - Vol. 312. - P. 306-312.

141. Wanga Z. The effect of charged lipids on bacteriorhodopsin membrane reconstitution and its photochemical activities / Z. Wanga, J. Bai, Y. Xu // Biochem. and Biophys. Research. - 2008. - Vol. 371. - P. 814–817.

142. The pH-dependence of photochemical intermediates of O and P in bacteriorhodopsin by continuous light / L. Wang, Z. Shen, J. Wang, [et al.] // Biochemical and Biophysical Research. - 2006. -Vol. 343. P. 899–903.

143. Fabrication of oriented poly-L-lysine/bacteriorhodopsin-embedded purple membrane multilayer structure for enhanced photoelectric response / R. Li, X. Cui, W. Hu, [et al.] // Journal of Colloid and Interface Science. - 2010. - Vol. 344. - P. 150–157.

144. Lanyi J. K. Mechanism of ion transport across membranes / J. K. Lanyi // The Journal of Biological Chemistry. - 1997. - Vol. 272(50). - P. 13-25.

145. Brown L. Relationship of proton release at the extracellular surface to deprotonation of the schiff base in the bacteriorhodopsin photocycle / L. S. Brown, L. Bonet, R. Needleman, J. K. Lanyi // Biophys. J. - 1993. - Vol. 65. - P. 124-130.

146. Functional significance of a protein conformation change at the cytoplasmic end of helix F during the bacteriorhodopsin photocycle / L. Zimanyi, G. Varo, M. Chang, [et al.] // Biochemistry. - 1992. - Vol. 31. - P. 1518-1530.

147. The two consecutive M substates in the photocycle of bacteriorhodopsin are affected specifically by the D85N and D96N residue

replacements / L. Zimanyi, Y. Cao, M. Chang [et al.] // *Photochemistry and photobiology*. - 1992. - Vol. 56(6). - P. 1049-1055.

148. General concept for ion translocation by halobacterial retinal proteins: the isomerization/switch/transfer (IST) model / U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, D. Oesterhelt // *Biochemistry*. - 1997. - Vol. 36. - P 2-7.

149. Michel H. Three-dimensional crystals of membrane proteins: bacteriorhodopsin / H. Michel, D. Oesterhelt // *Biochemistry*. - 1980. - Vol. 19. - P. 4615-4619

150. Renthall R. R. Water and Carboxyl Group Environments in the Dehydration Blueshift of Bacteriorhodopsin / R. R. Renthall, N. Gracia, R. Regalado // *Photochemistry and Photobiology*. - 2000. - Vol. 74(5). - P. 714-718.

151. Humidity-dependent open-circuit photovoltage from a bacteriorhodopsin-indium tin oxide bioelectronic heterostructure / S. Crittenden, S. Howell, R. Reifenberger, [et al.] // *Nanotechnology*. -2003. - Vol. 14. - P. 562-565.

152. Thermal Motions in Bacteriorhodopsin at Different Hydration Levels Studied by Neutron Scattering: Correlation with Kinetics and Light-Induced Conformational Changes / U. Lehnert, V. Reat, M. Weik, [et al.] // *Biophysical Journal*. - 1998. - Vol. 75. - P.1945–1952.

153. Pandey, P. C., Upadhyay, S., Upadhyay, B. C. Photoelectrochemistry of ormosil sandwiched D-96N bacteriorhodopsin. *Journal of Sol-Gel Science and Technology*, 33, 2005, p. 51–58.

154. Баторі-Тарці З. І. Модифікація оптичних властивостей плівкових структур на базі бактеріородопсину: дис. кандидата фіз.-мат. наук : 16.06.02 / Баторі-Тарці Зіта Іштванівна. - Ужгород, 2002. - 132 с.

155. Dencher N. A. Preparation and properties of monomeric bacteriorhodopsin / N. A. Dencher, Heyn M. P, // *Methods in Enzymology*. - 1982. - Vol. 88. - P. 18-24.

ДОДАТКИ

Додаток А

Методика культивування галобактерій та очистки бактеріородопсину

Технологія вирощування *Halobacterium salinarium* різних штамів була налагоджена за відомою методикою у лабораторії біотехнології УжНУ на базі кліматичної шафи промислового виробництва ШКШ-1.5 (рис. А.1).

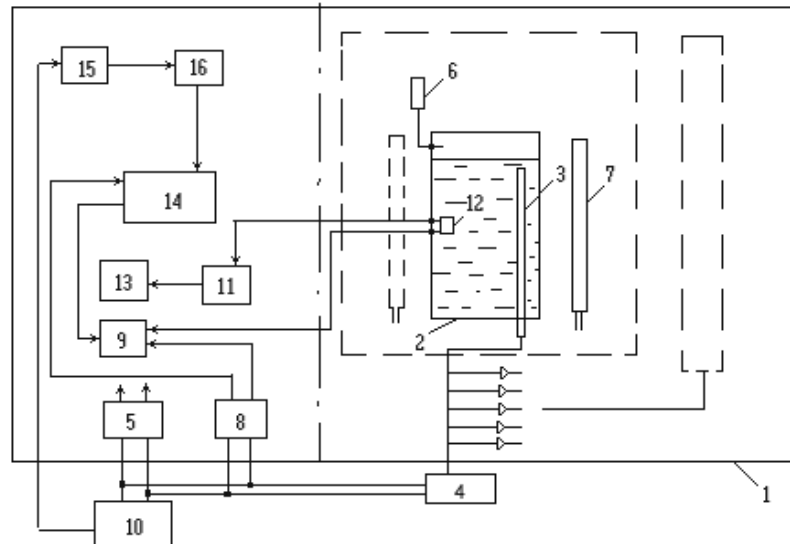


Рис. А.1. Блок-схема культиватора ШКШ-1.5: 1 – кліматична шафа; 2 – кювети ферментери з оргскла; 3 – система барботерів; 4 – блок подачі та очистки повітря; 5 – блок освітлення ферментерів; 6 – холодильник для повернення конденсату; 7 – люмінесцентні лампи; 8 - таймер; 9 – регулятор температури; 10 – електрощит; 11 – регістратор температури; 12 – датчик температури; 13 – самописець; 14–елементи ручного управління; 15 - захисний пристрій; 16 – пристрій управління та сигналізації [105] .

Культивування бактерій проводили в десятилітрових кюветах виготовлених з оргскла при температурі 311 - 313 К, аерації та постійному освітленні. Поживне середовище готували розчиненням 0.25 кг NaCl, 0.02 кг MgSO₄·7H₂O, 0.002 кг KCl, 0.002 кг NH₄NO₃, 0.003 кг цитрату Na, 0.01 кг пептону та 0.015 кг дріжджового екстракту в одному літрі дистильованої води, рН якого доводили до 7.2 - 7.4. Кювети попередньо стерилізували 3% розчином перекису водню, промивали дистильованою водою та висушували.

Для засіву кювет використовували 100 мл інокуляту на 1 літр поживного середовища. Інокулят готували при вищезгаданих умовах змиванням 4-5 добової культури *Halobacterium salinarium* з косяків у колбу з 200 см³ поживного середовища. Культивування у колбі проводили до досягнення оптичної густини 0.3 - 0.4. Аерацію поживного середовища проводили продуванням очищеного та підігрітого до 308 К повітря у кількості 0.06 м³/с у перші 48 годин, а пізніше у кількості 0.018 м³/с на 10⁻³ м³ поживного середовища. Висока концентрація повітря на початковому етапі сприяє нарощуванню біомаси, а низька концентрація повітря та інтенсивне освітлення на другому етапі культивування - нарощуванню світлочутливих пляшок ПМ на поверхні мембран клітини *Halobacterium salinarium*.

Вирощену культуру мікроорганізмів осаджували центрифугуванням при 100 об/с на центрифугі ОС-6 М до досягнення оптичної густини надосадової рідини менше 0,01. Біомасу обробляли 0.001% розчином ДНК-ази при постійному перемішуванні на протязі 1.5 - 2.0 годин. При пониженні концентрації NaCl до 2М глікопротеїнова клітинна стінка галобактерій втрачає жорсткість, а при 1М – руйнується і відбувається лізис клітин. Великодисперсні частинки видаляли центрифугуванням лізату на центрифугі ОС-6М. Осадження пурпурних мембран здійснювали на ультрацентрифугі (УЦП-50) при 284 об/с. Промивання пурпурних мембран проводили послідовно 25.5% - ним розчином NaCl і дистильованою водою до появи чіткого максимуму в області 570 нм у спектрі поглинання суспензії ПМ, яка містить єдиний білок – бактеріородопсин.

Додаток Б

Методи отримання плівок на основі бактеріородопсину

Для отримання плівок з підготованої плівкоутворюючої суміші застосовуються різні методи нанесення. Як підкладку в більшості випадків використовують очищені скляні пластинки різної товщини. Також є методики нанесення плівок на торці оптичних волокон. В залежності від потрібної товщини та характеристик плівок, для нанесення найчастіше використовують методи поливу, формування та центрифугування.

Метод поливу полягає в нанесенні плівкоутворюючої суміші на очищену скляну підкладку, що попередньо встановлена в строго горизонтальному положенні (рис. Б.1). Даний метод технологічно простий і в той же час дозволяє отримати однорідні плівки з високою оптичною якістю. Висушування плівок проводиться у ексікаторі над шаром силікагелю протягом 24 годин. Товщину осадженої плівки можна контролювати об'ємом краплі, яку наносять на скляну підкладку. Наприклад, при нанесенні на $6,25 \text{ см}^2$ скляної підкладки $0,225 \text{ мл}$ плівкоутворюючого розчину утворюється плівка товщиною $\sim 20 \text{ мкм}$. Аналогічно при нанесенні 10 мкл на торець волокна діаметром 200 мкм утворюється плівка тієї ж товщини. Взагалі товщина плівок БР, виготовлених даним методом, варіюється у діапазоні $20\text{--}40 \text{ мкм}$, а оптична густина складає $\sim 1.0 - 2.0$. Товщину індивідуальних плівок можна точно визначити, використовуючи скануючий електронний мікроскоп та оптичний інтерферометричний метод. Концентрація БР у сухих плівках складає $12\text{--}20\%$ по вазі.

Нанесення плівок БР з допомогою **методу формування** виконується шляхом введення нагрітого (до 30°C) плівкоутворюючого розчину в проміжок між двох скляних пластин, розділених незначним зазором. Зазор задається з допомогою двох металічних стержнів відомого діаметру. Поверхня однієї з скляних пластин гідрофобізується шляхом витримання в 50% розчині диметилдихлорсилану в бензолі та висушування при 100°C протягом 1 год. Це робиться для того щоб плівкоутворюючий розчин не

прилипає до скляної пластини з гідрофобною поверхнею. Нагрітий плівкоутворюючий розчин легко заповнює простір між пластинами завдяки капілярному ефекту. Після висушування протягом 1 год верхню скляну пластинку з гідрофобною поверхнею знімають, після чого плівку сушать в ексикаторі протягом 24 годин при кімнатній температурі.

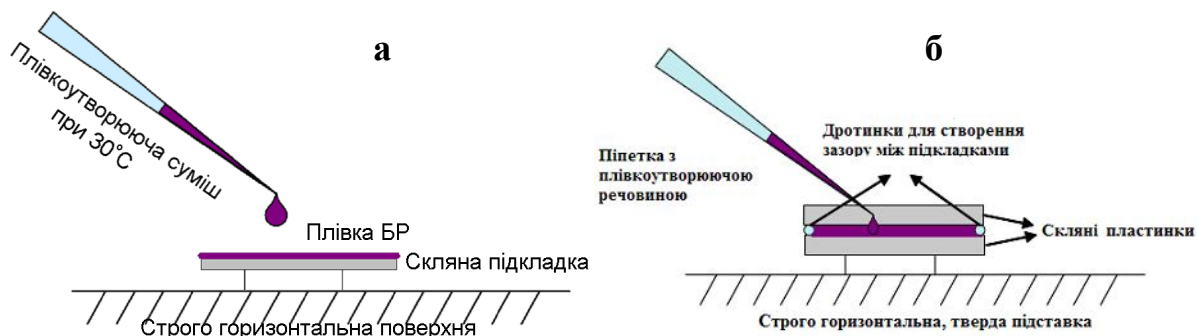


Рис. Б.1. Схематичне зображення виготовлення плівки БР методом поливу (а) та формування (б).

Товщина плівок БР, одержаних даним методом, складає 50-100 мкм і залежить від діаметра металічних стержнів, які використовуються для розділення скляних пластин. З допомогою описаного методу отримують однорідні та гладкі плівки БР з добре контрольованою товщиною та високою оптичною якістю.

Метод центрифугування є альтернативним та універсальним методом для отримання тонких плівок з товщиною в межах одного мікрметра. Товщина плівки, яка наноситься методом центрифугування залежить від швидкості обертання підкладки, в'язкості та об'єму плівкоутворюючого розчину. Отримання плівок методом центрифугування починається з нанесення невеликої краплі розчину в центр підкладки, після чого підкладка обертається з розчином на високій швидкості (рис. Б.2).

Зазвичай плівки БР даним методом отримують у результаті нанесення 10 мкл підготовленого плівкоутворюючого розчину на скляну підкладку та обертанням її при різних швидкостях. Для отримання плівок різної товщини використовували частоти обертання 750, 1000 та 1500 об/хв. Товщина плівок,

отриманих при однакових умовах нанесення і різних частотах, визначена за допомогою РЕМ, дослідженням поперечного перерізу плівки становила 619 нм, 538 нм та 524 нм відповідно.

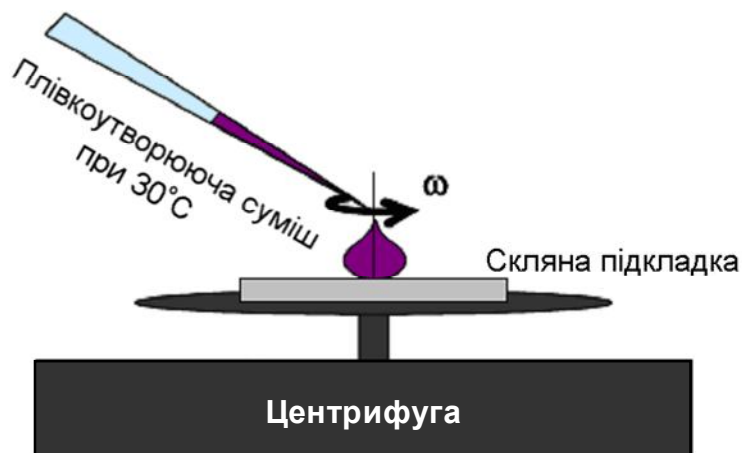


Рис. Б.2. Схема нанесення плівки БР на скляну підкладку методом центрифугування.

Використання методів поливу та формування, як описано в даному розділі, дозволяє отримати плівки з однорідним розподілом товщини по всій поверхні зразка. Тонкі плівки БР одержані з допомогою методу центрифугування мають трохи більшу товщину на краях підкладки, але цією неоднорідністю по товщині можна знехтувати при оптичних вимірюваннях, оскільки діаметр пучка збуджуючого випромінювання менше ніж площа неоднорідності товщини.

Додаток В

Методика дослідження впливу вологості

Дослідження впливу вологості на характеристики плівок БР та динаміку проходження фотоциклу в них досліджували для желатинових та золь-гельних матриць. Плівкові структури на основі БР у золь-гельних та желатинових матрицях отримували згідно методик описаних у розділі 2.2.

Дослідження оптичних параметрів плівок проводились за допомогою установки, розробленої на основі спектрофотометра СФ-46. Під час вимірювань зразок знаходився у кюветному відділенні, що дозволило проводити дослідження з точністю, гарантованою технічними характеристиками приладу. Збуджуюче випромінювання було спрямоване на зразок з допомогою регулярного оптичного світловоду.

Блок засвітки зразка складається з лампи КГМ 24-250 зі стабілізованим джерелом живлення, електромагнітної шторки, системи лінз та касети світлофільтрів, які формують та вводять збуджуюче випромінювання з заданими амплітудними та спектральними характеристиками у світловод. Для обробки та калібрування вихідного сигналу використовувався 8-розрядний аналого-цифровий перетворювач Ecotest-120, сигнал з якого подається на комп'ютер, що дозволяє проводити реєстрацію фотоіндукованих змін досліджуваних об'єктів у режимі реального часу. Блок-схема установки наведена на Рис. В.1.

У випадку дослідження характеристик плівок при заданому стаціонарному рівні вологості для встановлення бажаної вологості використовувалися насичені розчини відповідних солей (наприклад насичений розчин солі LiCl , MgCl_2 , $\text{Ca}(\text{NO}_3)_2$, CoCl_2 або KCl забезпечує встановлення вологості 0.12, 0.33, 0.5, 0.65 і 0.85 відповідно). Пробірка з розчином солі встановлювалася у герметичній кварцовій кюветі, в якій знаходилася досліджувана плівка. Для стабілізації вологості плівка витримувалася не менше 24 годин перед вимірюванням. Всі дослідження проводились при кімнатній температурі. Контрольний моніторинг вологості

проводили за допомогою малогабаритного цифрового термо-гігрометра Gemini Data Logger “Tinytalk” з ємнісним датчиком, яким можна визначити зміну відносної вологості в межах 0÷97 % з точністю ± 3 % при 25 °C і роздільною здатністю зчитування 0,5 %.

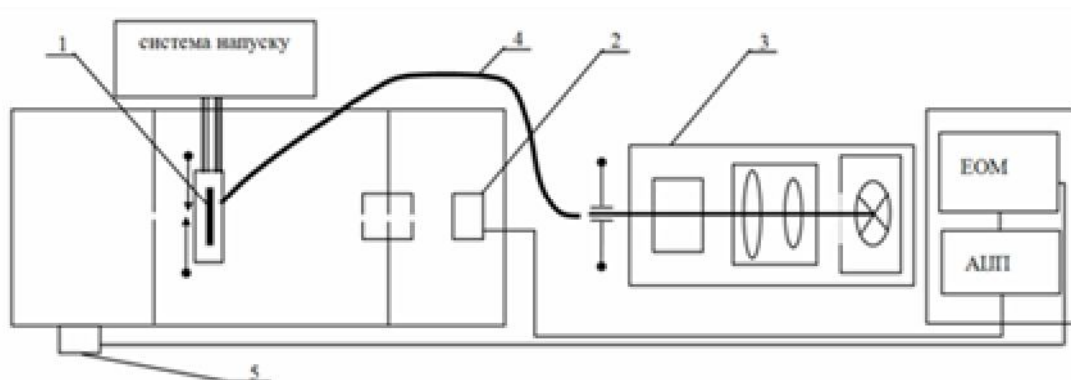


Рис. В.1. Блок-схема установки для дослідження впливу зміни відносної вологості на оптичні характеристики плівок БР на основі спектрофотометра СФ-46: 1 - зразок, 2 - фотоприймач, 3 - блок засвітки, 4 - оптичний світловод, 5 - кроковий двигун.

Крім дослідження змін спектру поглинання плівки БР, проводилися дослідження характеристик фотоциклу при різних значеннях вологості. Оскільки інтермедіат M_{412} є ключовим проміжним станом фотоциклу і характеризується максимальним часом життя та максимальним спектральним зсувом відносно основного стану молекули, зміни у протіканні фотоциклу найлегше відслідковувати досліджуючи процеси формування та розпаду M_{412} при різних умовах. Для оцінки впливу вологості на параметри фотоциклу обчислювались напівперіод життя інтермедіату M_{412} та фотоіндукована зміна пропускання ΔT на характеристичних довжинах хвиль 412 та 570 нм. Фотоіндукована зміна пропускання ΔT – зміна пропускання плівки (збільшення на 570 нм і зменшення на 412 нм) у присутності зовнішнього збуджуючого випромінювання. Напівперіод життя інтермедіату M_{412} – це час необхідний для зміни пропускання на 50% при знятті зовнішньої засвітки.

У випадку проведення досліджень динамічних змін пропускання плівки на характеристичних довжинах хвиль при неперервній зміні вологості в

режимі реального часу використовували установку на основі оптоволоконного спектрофотометру Ocean Optics 4000 (ОО 4000). Блок-схема установки наведена на рис. В.2.

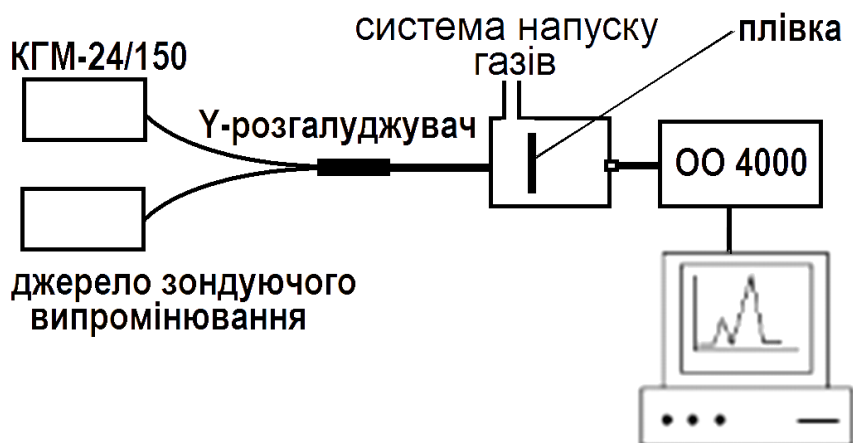


Рис. В.2. Блок-схема установки для дослідження впливу зміни відносної вологості на оптичні характеристики плівок БР на основі оптоволоконного спектрофотометра Ocean Optics 4000.

Вологість створювалася за допомогою розміщення у кюветі відкритої посудини з водою. Максимальна вологість отримана таким методом становила 97%. Для зменшення вологості збільшували повітряний обмін з навколишнім середовищем із завідомо меншою відотною вологістю, шляхом відкривання додаткових отворів у кюветі. Зниження вологості нижче вологості навколишнього середовища здійснювалося внесенням у бокс силікагелю. Для контролю вологості та температури використовували малогабаритний цифровий термо-гігрометр.

Додаток Г

Конструкція камери для дослідження впливу аміаку

Для дослідження впливу аміаку на параметри плівок БР фіксувалися зміни спектральних характеристик плівок та динаміки переходів між основним станом та інтермедіатом M_{412} при зовнішній засвітці. Зміни пропускання на довжинах хвиль 410 та 570 нм реєструвалися у режимі реального часу, крім того регулярно проводився запис загального спектру пропускання плівки. Для виключення похибки спричиненої можливими збоями у роботі приладів паралельно проводився моніторинг на 800 нм. Для проведення досліджень у лабораторії була спеціально розроблена і створена герметична сенсорна камера (рис. Г.1). Камера повністю виготовлена із оргскла, оскільки даний матеріал прозорий, що полегшує встановлення та юстування волокон, і не чутливий до агресивних середовищ. Склеювання конструкційних елементів камери проводилося хлороформом, що забезпечило надійні та герметичні шви. Знімна кришка та отвори для вводу і виводу оптичних волокон герметизувалися за допомогою технічного силіконового герметика та гумових прокладок. Клапани для напуску та відведення газів та рідин запаювалися в оргскло.

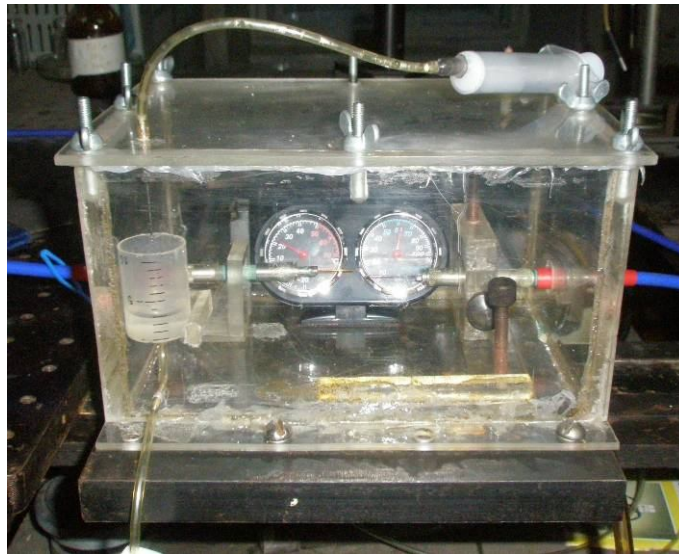


Рис. Г.1. Сенсорна камера для дослідження впливу різних газів на параметри плівок бактеріородопсину.

Для монтажу волокон передбачено два тримачі. Тримач для ”приймального” волокна, яке з’єднано із спектрофотометром, закріплений стаціонарно. Для ”предметного” тримача, на якому закріплено волокно з плівкою бактеріородопсину передбачена система подвижок, яка дозволяє рухати волокно у трьох координатах.

Для створення вологості та атмосфери парів аміаку в камері розміщена кювета для рідини та клапани для напуску та зливу без порушення герметичності. Для створення атмосфери аміаку – в кювету напускали водний розчин аміаку заданої концентрації. По формулі (Г.1) при відомій концентрації водного розчину та температурі можна розрахувати рівноважну концентрацію газу в повітрі над розчином.

$$C_G = \frac{C_{MP} \cdot 10^{9,58 - \frac{1924}{T}}}{P_{атм}}, \quad (Г.1)$$

де C_G – об’ємна доля парів аміаку над розчином, C_{MP} – молярна концентрація розчину (моль/дм³), T – температура розчину (К), $P_{атм}$ - атмосферний тиск.

Зменшення концентрації парів аміаку у камері досягалося шляхом зливу розчину з кювети та продування камери повітрям.

Додаток Д

Конструкція камери для дослідження впливу водних розчинів аміаку на параметри плівок бактеріородопсину

Для дослідження можливості використання плівок БР для сенсорів водних розчинів, були проведені дослідження впливу водних розчинів аміаку на параметри плівок БР різного хімічного складу та технології отримання. Оскільки для волоконно-оптичних датчиків найбільш простою у технічній реалізації є схема в якій реєструються зміни відбивання від плівки нанесеної на торець волокна, ми поставили за мету дослідити зміни спектру відбивання плівки БР під дією різних концентрацій водного розчину аміаку. Для цього використовували 600-мікронний волоконно-оптичний Y-розгалужувач.

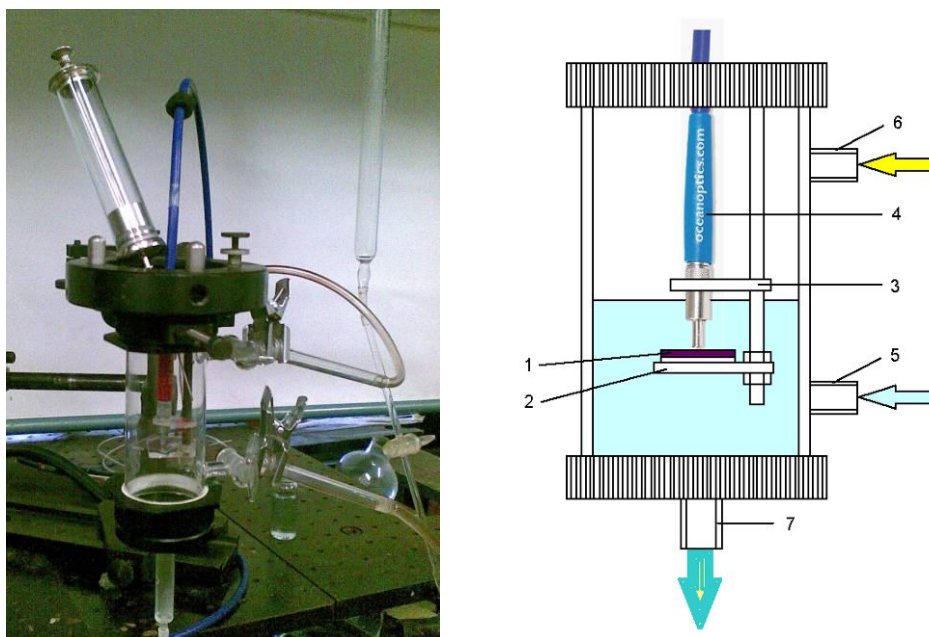


Рис. Д.1. Камера для дослідження впливу аміаку у водному розчині на параметри плівок бактеріородопсину. а) - загальний вигляд, б) - конструкція камери: 1- досліджуваний зразок; 2 - предметний столик; 3 – тримач; 4 – оптичне волокно; 5, 6, 7 - крани для подачі та зливу рідин.

Для проведення досліджень була сконструйована спеціальна камера (рис Д.1). За основу була взята комірка для газів, яка складається з скляного трубоподібного корпусу, в якому є два крани для напуску газу або рідини, і двох фланців на різьбовому з'єднанні в торцях. Для торцевих вікон були

вирізані пластини з оргскла. В нижній розмістили кран для зливу рідини, у верхній - герметичне вікно для вводу волокна. Для монтажу плівки та кріплення волокна використали спеціальний тримач, стаціонарно закріплений у верхній кришці камери. Верхня кришка стаціонарно закріплювалася у стандартному штативі. Для встановлення чи заміни зразка вся нижня частина камери знімалася, при чому розміщення волокна, закріпленого у верхній кришці і у тримачі, відносно поверхні підкладки залишалось незмінним. Крани використали для подачі води та водного розчину аміаку. Оскільки водний розчин аміаку є досить агресивним середовищем, наявність у конструкції камери елементів із заліза приводила до їх швидкого окислення. Тому практично всі елементи камери були виготовлені із скла, пластику або оргскла. Герметизація проводилася за допомогою гумових прокладок та силіконового герметика. За допомогою даної камери досліджувалися спектри відбивання плівок бактеріородопсину на скляних підкладках. Плівки були отримані з використанням різних матриць та технологій нанесення.

У процесі досліджень плівка 1 знаходилася на спеціальному предметному столику 2 закріпленому на тримачі 3. Волокно 4 закріплювалося у вертикальному положенні, перпендикулярно до площини столика. Досліджувана плівка розміщувалася між торцем волокна та предметним столиком. Дослідження спектрів відбивання плівки проводилося за допомогою Y-розгалуджувача. Спільний канал Y-розгалуджувача приводився у безпосередній контакт із плівкою. Сфокусоване світло від лампи подавалося в один канал, а відбите від плівки, через інший канал – реєструвалося спектрофотометром.

Вода подавалася у кювету через кран 5 за допомогою мірної мензурки, що дозволяло точно контролювати об'єм рідини. Концентрований водний розчин аміаку подавався через кран 6 за допомогою пластикового шприца. Злив рідин проводився через кран 7. Для зменшення концентрації аміаку у розчині використовувалося промивання камери дистильованою водою. Для

висушування плівки після проведення досліджень використовували продув камери повітрям.

Для використання плівок БР у якості чутливих елементів оптоволоконних датчиків водних розчинів, потрібно з'ясувати як плівки, виготовлені з використанням різних матриць, будуть поводитися у воді. Оскільки технологія нанесення плівок на скляні підкладки добре відпрацьована і простіша за технологію нанесення плівок на торці волокон, дані дослідження доцільно проводити спочатку на плівках бактеріородопсину нанесених на скляні підкладки.

Дана конструкція дає можливість проводити дослідження у двох інтерфейсах: торець-плівка-підкладка і торець-підкладка-плівка (рис. Д.2). Перший варіант забезпечує більшу величину ефективного сигналу. З рисунку видно що відбиті промені 3 і 4 проходять через плівку бактеріородопсину в обох напрямках, а промінь 2 – відбивається від поверхні плівки. Таким чином все відбите випромінювання яке потрапляє у приймальний канал Y-розгалуджувача має безпосередній контакт з плівкою і буде ефективно відображати зміни, які у ній відбуваються. В той же час в області прямого контакту торця волокна з поверхнею плівки обмежується доступ аналітів до бактеріородопсину, що негативно впливає на час відклику сенсора.

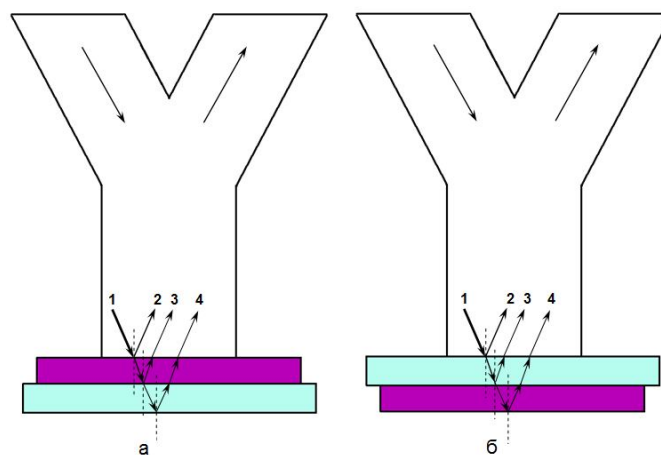


Рис. Д.2. Схематичне зображення варіантів розміщення плівки БР у процесі:

а – інтерфейс торець-плівка-підкладка; б – інтерфейс торець-підкладка-плівка.

У другому випадку моделюється ситуація з плівкою нанесеною на торець волокна, яка знаходиться у розчині і вільно контактує з ним усією поверхнею. Це, в свою чергу, полегшує доступ аналітів до молекул БР, що буде покращувати чутливість та зменшувати час відклику сенсора. В той же час, як видно з рис. Д.2, при такій конструкції через плівку проходить лише відбитий промінь 4, який має найменшу інтенсивність. Промінь 3 відбивається лише від поверхні плівки, а промінь 2, який буде мати найбільшу інтенсивність, взагалі відбивається від поверхні скляної підкладки і зміни, які відбуваються у плівці, відобразити не буде. У даному випадку він буде виступати в ролі фонової засвітки.

На рис. Д.3 наведено спектри відбивання для плівки БР у желатиновій матриці при вимірюванні обома способами. Як видно з результатів, якщо плівка знаходиться у контакті з торцем волокна, на 570 нм чітко спостерігається смуга поглинання бактеріородопсину. В той же час, у випадку коли торець знаходиться у контакті зі скляною підкладкою чіткої смуги поглинання БР не спостерігається. Звідси можна зробити висновок, що для досліджень змін спектру відбивання плівок на основі бактеріородопсину більш прийнятним буде використання інтерфейсу торець-плівка-підкладка.

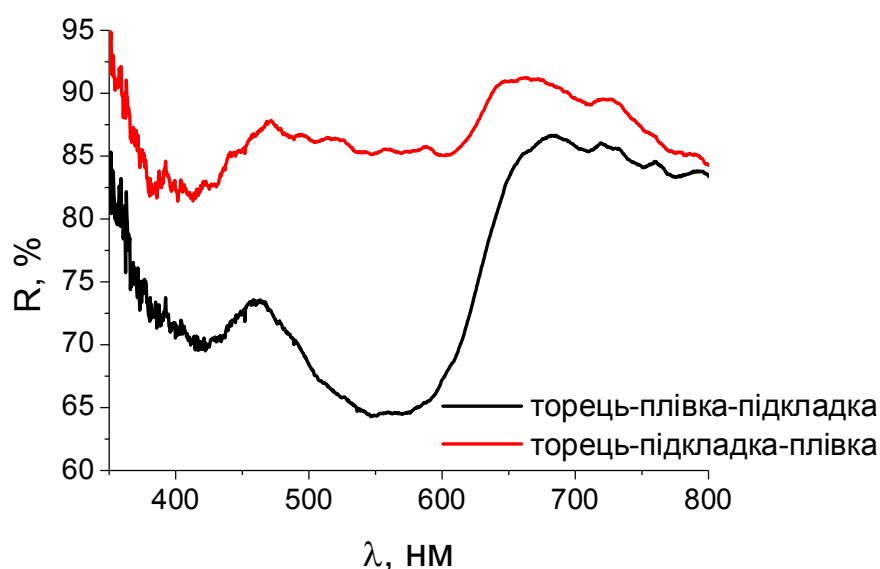


Рис. Д.3. Спектр відбивання плівки бактеріородопсину у желатиновій матриці при різних інтерфейсах вимірювань.

Для проведення досліджень впливу води та водних розчинів аміаку на параметри плівкових структур на базі БР з використанням різних типів матриць та різних технологій нанесення використовувалися плівки на скляних підкладках. Оскільки дослідження передбачали витримування плівок у середовищі водного розчину аміаку, ми провели дослідження впливу розчину аміаку на чисту скляну підкладку. Ніяких змін у процесі напуску, витримування та висихання не виявлено. Оскільки підкладка не чутлива до впливу аміаку, ми можемо бути впевнені що вона не буде вносити додаткову похибки у експеримент. Як і очікувалося, спектральні дослідження теж не зафіксували змін спектру відбивання скляної пластики до та після проведення експерименту, що свідчить про відсутність сторонніх хімічних речовин після висихання розчину аміаку на поверхні підложки.

Додаток Е

Конструкція камери для дослідження впливу аміаку на інтенсивність люмінесценції квантових точок у плівках бактеріородопсину

Використання квантових точок у якості джерела актинічного випромінювання, яке може запускати фотоцикл БР, дозволяє сконструювати принципово новий тип чутливих елементів на основі БР. Підібрані КТ мають максимум люмінесценції, який лежить у смузі поглинання основного стану. Таким чином відслідковуючи зміну інтенсивності люмінесценції КТ, внесених безпосередньо у плівку БР, ми можемо зробити висновок, як про співвідношення молекул у основному та проміжному стані, так і про зміну динаміки переходів фотоциклу. Тому була проведена серія досліджень спрямованих на визначення впливу зміни вологості та концентрації аміаку на люмінесценцію КТ у нанокompозитних структурах на основі БР. Для контролю інтенсивності та спектрального складу люмінесцентного випромінювання використовували оптоволоконний спектрофотометр ОО 4000. Як джерело світла для дослідження фотоіндукованих змін поглинання та збудження люмінесценції використовували Ocean Optics LS-450 Blue LED Pulsed Light Source з можливістю використання різних світлодіодів із спектральним максимумом на потрібних довжинах хвиль та вольфрамову галогенну лампу з набором відповідних пропускаючих та відрізаючих світлофільтрів. Для визначення впливу газів на оптичні властивості структур *золь-гельна SiO₂ матриця – БР – напівпровідникові квантові точки* була розроблена і створена спеціальна камера (рис. Е.1). Для досліджень використовували плівки БР у золь-гельній матриці з додаванням квантових точок, отримані згідно методик описаних у розділі 2. Введення і виведення випромінювання було реалізовано за допомогою мультимодових кварцових оптичних волокон (Ocean Optics, QP1000-2-UV-VIS) з діаметром серцевини – 1 мм. Оптичні волокна, що знаходилися всередині камери, джерело оптичного випромінювання та спектрофотометр, розміщені ззовні камери, з'єднувались через вакуумні вікна (Ocean Optics VFT-600-UV-275).

Для забезпечення відомих концентрацій аміаку всередині камери використовувались газові балони, які містять азот з відкаліброваними концентраціями аміаку (100 ppm, 1000 ppm, 0.1 % і 10 %). Для контролю потоку газу, що поступає в камеру використовувались датчики тиску. Отримання концентрацій аміаку менше ніж 100 ppm проводилося шляхом надлишкового постачання азотно-аміачної суміші в камеру. Контроль здійснювався за рахунок зростання тиску всередині камери, наприклад: надлишкове постачання газової суміші з концентрацією 100 ppm при збільшенні тиску на 0,1 атм задавало концентрацію в камері 10 ppm.

Зміни відносної вологості в межах 30÷90 % одержували шляхом розміщення відкритої ємності з водою всередині закритої камери. Контроль вологості всередині камери проводився в режимі реального часу за допомогою Gemini Data Logger “TINYtalk” з емнісним датчиком, яким можна визначити зміну відносної вологості в межах 0÷95 % з точністю $\pm 3\%$ при 25 °C і роздільною здатністю зчитування 0,5 %.

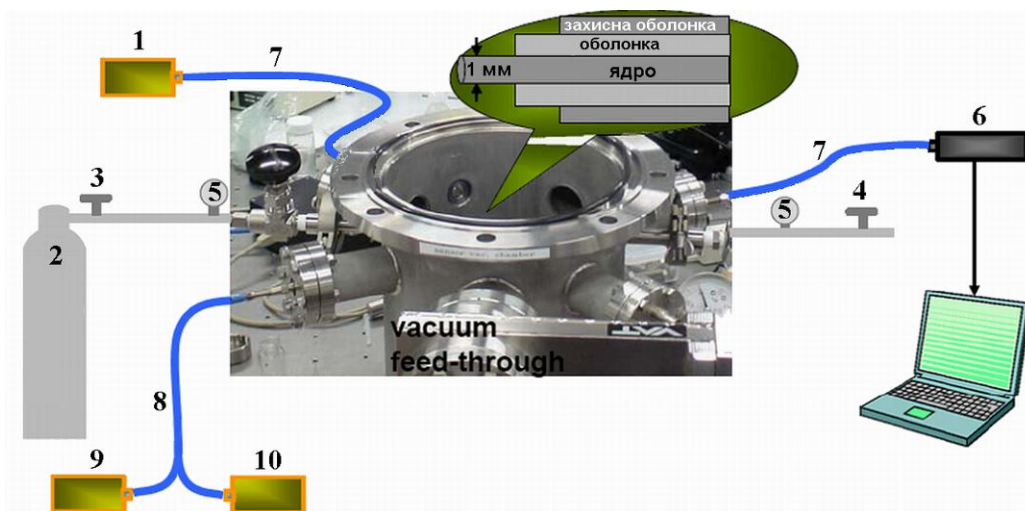


Рис. Е.1. Камера для дослідження впливу газових реагентів на параметри плівок: 1 – джерело актинічного випромінювання; 2 – балон з аміачно-азотною сумішшю; 3 – впускний клапан; 4 – випускний клапан; 5 – манометр; 6 – спектрофотометр; 7 – оптичне волокно; 8 – оптичне волокно з Y-подібним розгалужувачом; 9 - світлодіод; 10 – джерело оптичного випромінювання. На вкладці вказана структура оптичного волокна.