

## 4 Kontrollexperimente

Die idealisierte Annahme im Theorieteil, daß zum Zeitnullpunkt durch eine Störung unmittelbar ein Teil des Grundzustandes in das K-Intermediat angehoben wird, ist experimentell schwer zu realisieren, da der Laserpuls eine nicht verschwindende zeitliche Breite von einigen ns hat (siehe Abschnitt 2.5). Während dieser Zeit wird der angeregte Zustand  $bR^*$  erzeugt, der innerhalb einiger ps in das K-Intermediat zerfällt. Die Quanteneffizienz  $\Phi_{bR}$  für die Bildung von K beträgt etwa 0,64 (Govindjee et al., 1990). (Dieser Zerfall von  $bR^*$  zu K verläuft über ein noch kurzlebigeres Intermediat J, das jedoch innerhalb weniger ps in das K-Intermediat zerfällt und daher hier nicht betrachtet werden muß.) Weil das K-Intermediat jedoch photoreversibel ist, und weil der Anregungsblitz einige ns dauert, wird ein Teil der K-Besetzung durch den Anregungsblitz selbst wieder in den Ausgangszustand gebracht. Die Quanteneffizienz  $\Phi_K$  für die Bildung von Grundzustand durch die Photoreaktion von K beträgt etwa 1 (Bazhenov et al., 1992). Der thermische Zerfall von K in die Intermediate des Photozyklus geschieht erst nach etwa  $1 \mu s$ , daher beschränken sich die Ratengleichungen für bR und K während des Blitzes auf die folgende Form:

$$\frac{d[bR](t)}{dt} = -\frac{d[K](t)}{dt} = \left( -[bR](t) \sigma_{bR}(\lambda) \Phi_{bR} + [K](t) \sigma_K(\lambda) \Phi_K \right) \frac{I(t)}{\hbar\omega} \quad \text{Gl. 4.1}$$

Dabei sind die  $\sigma_i$  die Absorptionsquerschnitte der Intermediate bei der Anregungswellenlänge, und  $I$  ist die Anregungsintensität. Da keine anderen Reaktionen betrachtet werden, gilt zusätzlich die Konzentrationserhaltung:

$$[bR](t) + [K](t) = [bR](0) \quad \text{Gl. 4.2}$$

Unter der Annahme konstanter Blitzintensität  $I$  innerhalb der Blitzlänge  $\tau$ , erhält man damit für die Konzentration von K und damit auch für den Anteil der vom Blitz in den Photozyklus beförderten Moleküle:

$$[K] = [bR](0) \frac{\sigma_{bR} \Phi_{bR}}{\sigma_{bR} \Phi_{bR} + \sigma_K \Phi_K} 1 - e^{-\left(\sigma_{bR} \Phi_{bR} + \sigma_K \Phi_K\right) \frac{I}{\hbar\omega} \tau} \equiv K_{\text{sat}} (1 - e^{-cI}) \quad \text{Gl. 4.3}$$

Bei starker Blitzanregung geht die K-Konzentration somit gegen einen Sättigungswert, der durch die Absorptionsquerschnitte und die Quanteneffizienzen gegeben ist. Im folgenden Abschnitt werden zwei Verfahren mittels Absorptionsspektroskopie die Anregung zu ermitteln, verglichen. Danach folgt ein Abschnitt über elektrische Messungen bei hoher Anregung, der zeigt, daß auch die Annahme eines linearen Differentialgleichungssystems zumindest bei dem elektrischen Meßsystem nicht zutrifft.

### 4.1 Bestimmung der Anregungsstärke

Eine gebräuchliche Methode zur Abschätzung der Anregung besteht bei optischen Messungen darin, das zeitaufgelöste Absorptionssignal bei 570 nm (Abb. 4.1) zu benutzen, da hier der Grundzustand sein Absorptionsmaximum besitzt, und damit dessen Konzentration am besten zu verfolgen ist. Unter der Annahme, daß zum Zeitpunkt des größten negativen transienten Signals bei etwa 1 ms, alle angeregten Moleküle sich im M-Zustand befinden und damit nicht bei 570 nm absorbieren, ergibt diese Amplitude in Beziehung zur Absorption vor der Anregung den Bruchteil der angeregten Moleküle, hier 28%. Dies ist natürlich nur eine vereinfachte Annahme, weil einige Moleküle sich noch im Vorgänger- und einige sich schon im Folgezustand von M befinden. Mit der Annahme einer unverzweigten, linearen Reaktionskette ohne Rückreaktion läßt sich dieser Effekt etwas besser berücksichtigen, denn dann ist die Absorptionszeitspur mit einer Summe von Exponentialfunktionen zu beschreiben, deren Anzahl gleich der der Intermediate ist. Die zugehörigen Zeitkonstanten beschreiben die

Kinetiken für den Aufbau und den Zerfall der Intermediate. Eine solche Anpassung mit einer Summe von sechs Exponentialfunktionen wurde durchgeführt, und davon wurde die Summe der ersten vier Exponentialfunktionen, die den Aufbau von M beschreiben, in Abb. 4.1 eingezeichnet. Der für den Aufbau von M erreichte Endwert beträgt 295 mOD. Damit erhält man dann eine etwas größere Anregung von 30%. Aber auch dieses Verfahren versagt, wenn die Modellannahme falsch ist, z.B. wenn es einen Reaktionsweg an M vorbei gibt, oder wenn der Grundzustand eine Teilbevölkerung aufweist, die zwar absorbiert, aber nicht am Zyklus teilnimmt. In jedem Fall ist die so abgeschätzte Anregung zu niedrig.

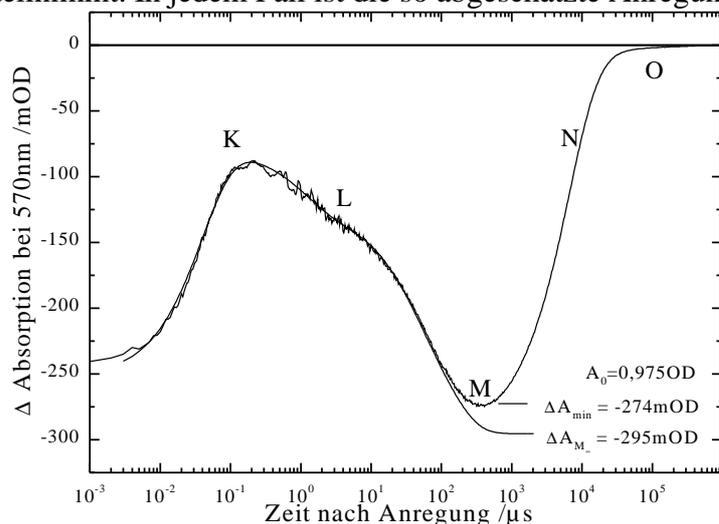


Abb. 4.1 Absorptionszeitspur einer Gelprobe von bR bei 570 nm nach Anregung durch den Nd:YAG-Laser. Die Buchstaben markieren die Zeitbereiche, in denen die Intermediate auftreten. Die Absorption der Probe vor Lichtanregung betrug 975 mOD. Mit dem Absorptionsminimum während M von 274 mOD erhält man eine Anregung von 28%. Das Signal im Zeitbereich kleiner als 100 ns ist ein Artefakt aufgrund von Streu- und Fluoreszenzlicht der Blitzanregung.

Zur Kontrolle der Anregung, die für die Auswertung der Doppelblitzexperimente eine wichtige Rolle spielt, wurden an derselben Probe Doppelblitzexperimente bei einer Meßlichtwellenlänge von 635 nm durchgeführt. Dabei wurde die Justierung des Nd:YAG-Lasers nicht gegenüber der Messung bei 570 nm verändert. Der zweite Blitz bei einer Wellenlänge von 580 nm wurde vom Farbstofflaser erzeugt. Als Meßlicht wurde der Diodenlaser bei 635 nm benutzt. Dadurch wird der Artefakt des Streu- und Fluoreszenzlichtes unterdrückt, denn man benötigt jetzt nur eine so geringe Spannung des Photomultipliers, daß die Artefakte nicht mehr detektiert werden. Dabei wurde darauf geachtet, daß die Anregung durch das Meßlicht selbst keine signifikante Abweichung hervorruft (kleiner 3 %).

Bei dieser Meßlichtwellenlänge zeigt die Absorptionszeitspur (Abb. 4.2 oberes Teilbild) im Bereich kleiner 1  $\mu$ s eine große positive Absorptionsänderung, die vom K-Intermediat herrührt und schnell wieder zerfällt. Die übrigen langsameren Intermediate tragen nur zu relativ kleinen Absorptionsänderungen bei. Daher weist bei einem Doppelblitzexperiment mit 532/580 nm Anregung und mit einem solch großen Zeitabstand (500  $\mu$ s), daß K bereits zerfallen ist, die Anregung des zweiten Blitz eine K-Amplitude auf, die proportional zum vorhandenen Grundzustand ist, denn ein eventuell überlagertes Rückschießen aus einem der Intermediate (außer K) liefert keinen wesentlichen Beitrag bei dieser Wellenlänge. Die zusätzliche K-Amplitude des zweiten Blitzes, relativ zur Amplitude ohne Vorblitz, ist dann der Anteil des zur Zeit des zweiten Blitz vorhandenen Grundzustands  $f_1$ . Diese Amplituden lassen sich wieder durch Anpassen mit Exponentialfunktionen genauer bestimmen. Der erhaltene Wert für  $f_1$  beträgt  $0,62 \pm 0,03$ . Da die Summe des Grundzustandanteils und des Anteils angeregter Moleküle 1 ergibt (solange man von einem homogenen Ausgangszustand in bR ausgeht), erhält man damit für den Anteil angeregter Moleküle  $1 - f_1 = 0,38$ . Dieser Wert liegt etwas über dem aus der Zeitspur bei 570 nm erhaltenen Wert von 30%. Daher liegt die Vermutung nahe, daß die Voraussetzungen für die Abschätzung bei 570 nm nicht erfüllt sind. Das ist ein Hinweis darauf, daß es entweder einen Reaktionsweg an M vorbei gibt (Eisfeld et al., 1993) oder, daß ein gewisser Teil der Grundzustandsmoleküle nicht am Photozyklus

teilnimmt, etwa weil ein kleiner Teil davon im „blauen Zustand“ ist (Balashov et al., 1996). Für beide Erklärungen gibt es also bereits Hinweise in der Literatur.

In späteren Messungen bei der Untersuchung der Photoreaktionen der Intermediate spielt der Faktor  $f_1$  eine wichtige Rolle. Da aufgrund des Justieraufwands nicht jedesmal eine zusätzliche Messung mit dem Diodenlaser zur Bestimmung der Anregung möglich ist, wird dann trotzdem das transiente Signal bei 570 nm zur Abschätzung der Anregung benutzt, jedoch dann um den hier festgestellten Faktor von  $38/28=1,4$  hochskaliert.

Durch Variation der Blitzlichtintensität des Anregungslasers von 200  $\mu\text{J}$  bis 20 mJ wurde eine Sättigungsreihe des Absorptionssignals bei einer Meßlichtwellenlänge von 570 nm durchgeführt. Die Anpassung an eine Sättigungsgleichung der Form von Gl. 4.3 zeigte, daß die Sättigung bei der verwendeten Anregungs-Geometrie nur zu etwa 90% erreicht wird (Daten nicht gezeigt). Berücksichtigt man, daß die Sättigung nicht voll erreicht wird, so kann man einen Sättigungswert von  $42\pm 3\%$  abschätzen. Der Wert der Anregung liegt innerhalb der Fehlergrenzen im Rahmen der Literaturwerte, die mit einem gütegeschalteten Nd:YAG-Laser in Sättigung erzielt wurden von 30-40% (Bazhenov et al., 1992). Bei den elektrischen Messungen wird ein ähnlich hoher Wert erreicht (siehe unten). Mit den Extinktionskoeffizienten für bR und K bei 532 nm und der Quanteneffizienz für den Vorwärtsschritt von 0,64 läßt sich die Quanteneffizienz für die K-Rückreaktion aus Gl. 4.3 berechnen. Mit dem Extinktionsverhältnis bei 532 nm von  $\frac{\sigma_{bR}}{\sigma_K} = \frac{\epsilon_{bR}}{\epsilon_K} = 1,54$  (aus Nagle et al., 1995) erhält man

jedoch eine zu große und damit unphysikalische Quanteneffizienz von  $\Phi_K=1,36$  für die Rückreaktion von K. Tendenziell ist aber richtig, daß diese Quanteneffizienz für die Rückreaktion größer ist als in der Vorwärtsrichtung (Literaturwert 1, Bazhenov et al., 1992).

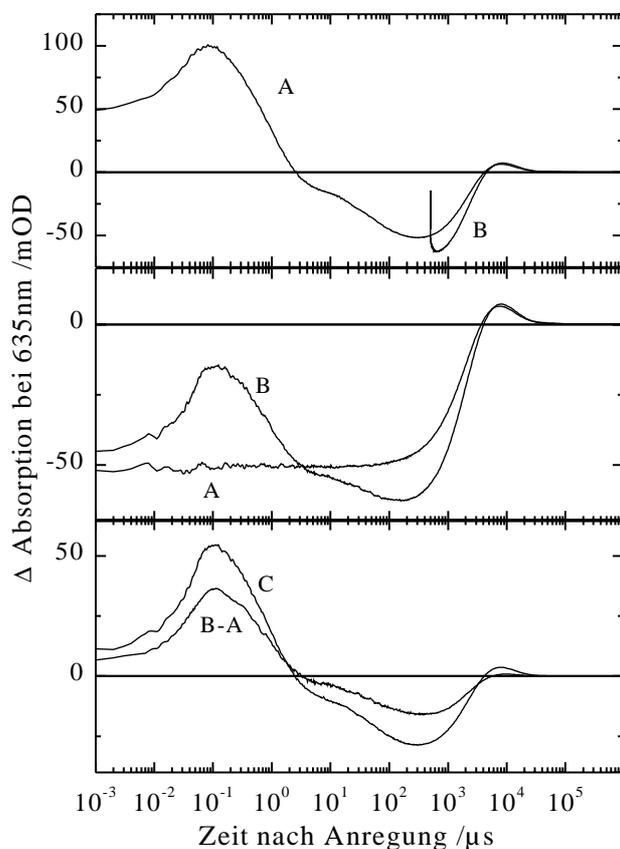


Abb. 4.2 Doppelblitzexperiment bei 635 nm. Oberes Teilbild: A: Anregung nur mit dem Nd:YAG-Laser. B: Zusätzliche Anregung mit dem Farbstofflaser (580 nm) 500  $\mu\text{s}$  nach dem Nd:YAG-Laser.

Mittleres Teilbild: Zeitspuren A und B aus oberem Teilbild, jedoch erfolgt die Datenaufnahme um 500  $\mu\text{s}$  verzögert.

Unteres Teilbild: B-A ist die Differenz der beiden Zeitspuren des mittleren Teilbildes, C ist die Zeitspur bei Anregung durch den Farbstofflaser ohne vorherigen Blitz.

Zur Kontrolle sieht man außerdem, daß die Differenz im unteren Teilbild (Abb. 4.2) wieder dieselbe Zeitspur wie der Blitz alleine liefert. Das spricht für eine lineare

Überlagerung der Signale (bei  $\Delta t = 500 \mu\text{s}$ ). Eine kleine Abweichung besteht in der reduzierten O-Amplitude in der Differenz. Das deutet darauf hin, daß eventuell doch noch eine Photoreaktion aus einem der Intermediate überlagert ist. Im Gegensatz zu diesen optischen Doppelblitzexperimenten ist bei analogen elektrischen Messungen die lineare Überlagerung der Zeitspuren nicht mehr möglich (siehe unten). Die Bestimmung der Anregungsstärke ist dort wesentlich schwieriger, da hier prinzipiell immer alle Intermediate zum Signal beitragen, und auch die elektrische K-Amplitude sehr klein ist, und deshalb diese Methode für elektrische Messungen nicht geeignet ist.

Im folgenden Experiment wurde der Zeitabstand zwischen den beiden Blitzen von  $1,8 \mu\text{s}$  bis  $20 \text{ ms}$  variiert, um zu überprüfen, wie sich die Anregung während des Photozyklus verhält (siehe Abb. 4.3). Dazu wurden bei jedem Zeitabstand die beiden Zeitspuren aus dem mittleren Teilbild von Abb. 4.2 gemessen und die Differenz daraus gebildet. Um die K-Amplituden dieser Differenz-Zeitspuren möglichst genau zu ermitteln, wurden diese Zeitspuren bei allen Zeitabständen zusammen mit der Zeitspur für den zweiten Blitz alleine an jeweils eine Summe von 5 Exponentialfunktionen global angepaßt (mit dem Programm „mupw7“, siehe Auswertemethoden). Für jeden Zeitabstand wird dann die K-Zerfallsamplitude relativ zur K-Amplitude des Farbstofflasers alleine gebildet. In Abb. 4.3 erkennt man im ms-Bereich die Rückkehr der Moleküle in den Grundzustand. Bei Zeitabständen kleiner als  $10 \mu\text{s}$  kommen die Meßpunkte von oben, was aber nicht heißen muß, daß hier mehr Moleküle angeregt sind, sondern vermutlich ist das ein Effekt der Photorückreaktion des K-Intermediates. Im langen Bereich  $10 \mu\text{s}$ - $2 \text{ ms}$  ist ein Plateau der Anregung bei etwa 40%. Dieser konstante Wert zeigt, daß verzweigte Reaktionswege von den Intermediaten in diesem Zeitbereich zum Ausgangszustand nicht stattfinden. Dies ist natürlich eine Grundvoraussetzung für einen effizienten Pumpmechanismus. Genau betrachtet ist auf dem Plateau die Anregung im Bereich  $10$ - $100 \mu\text{s}$  etwas höher als im Bereich  $100 \mu\text{s}$ - $1 \text{ ms}$ . Das läßt sich durch ein  $K \leftrightarrow L$  Gleichgewicht erklären, das weitgehend bei L liegt, der kleine Anteil von K jedoch der Photorückreaktion des zweiten Blitzes unterworfen ist.

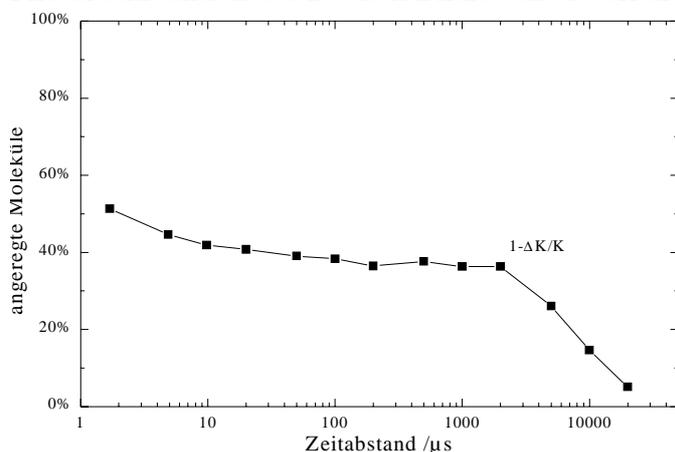


Abb. 4.3 Abhängigkeit des Anteils der angeregten Moleküle vom Zeitabstand der zwei grünen Blitze. Dieser Verlauf spiegelt die Rückkehr der Moleküle in den Ausgangszustand bR nach etwa  $10 \text{ ms}$  wider. Diese Zeit ist in guter Übereinstimmung mit der Zeit zum Durchlaufen des Photozyklus.

## 4.2 Einfluß hoher Intensität auf das elektrische Signal

Nach der vorhergehenden Betrachtung über die Anregung bei optischen Messungen ist es naheliegend, ein ähnliches Doppelblitzverfahren bei den elektrischen Messungen anzuwenden. Dabei ergaben sich jedoch einige Probleme, daher folgt zunächst eine Untersuchung der Intensitätsabhängigkeit des elektrischen Signals bei Anregung durch nur einen Blitz.

Zur Untersuchung des Einflusses der Lichtstärke wurde die Intensität des Nd:YAG-Lasers mit Hilfe von Neutralglasfiltern über einen Bereich von  $120 \mu\text{J}$  bis  $3,4 \text{ mJ}$  variiert.

Dabei wurde ein Foliensystem mit 5 mm Durchmesser benutzt und der Laserstrahl auf ca. 10 mm Durchmesser aufgeweitet, um über den Bereich der Folie eine möglichst homogene Ausleuchtung zu erhalten. Die Leistungsdichte kann daher nur grob abgeschätzt werden. Abb. 4.4 zeigt die beiden Zeitspuren bei minimaler und maximaler Intensität. Die Zeitspuren lassen sich offenbar nicht aufeinander skalieren, die Abweichungen erstrecken sich über den gesamten Zeitbereich, sogar die Systementladung ist beeinflusst.

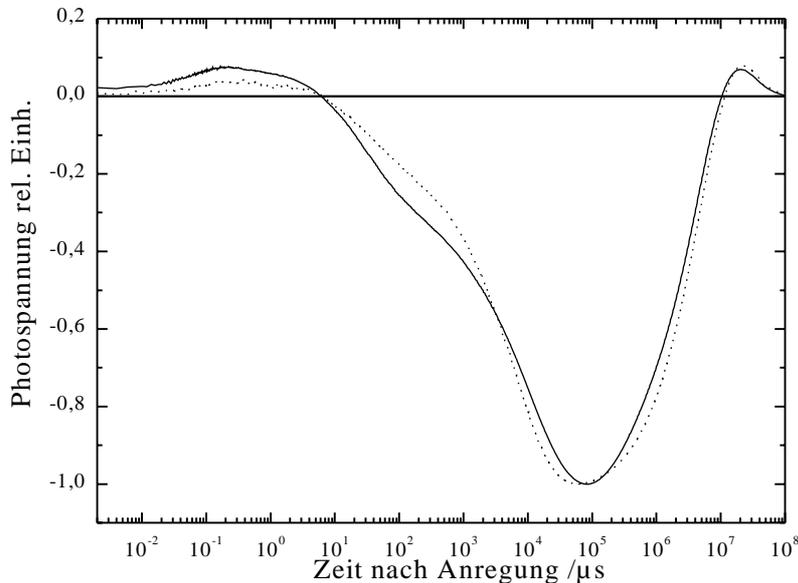


Abb. 4.4 zeigt die Zeitspuren von elektrischen Messungen bei 120  $\mu\text{J}$  (gepunktete Linie) und bei 3,4 mJ (ausgezogene Linie) normiert auf gleiche Amplitude. Die absoluten Amplituden sind 3,3 mV bei 120  $\mu\text{J}$  und 19,4 mV bei 3,4 mJ. Auffällig ist die Änderung der aktiven Signalform, und auch die Veränderung der Systementladung. Bedingungen: 150 mM  $\text{K}_2\text{SO}_4$ , pH 6,0, Standardpuffer.

Die Signalanalyse dieser Meßreihe erfolgt zunächst mit zwei Gauß-verteilten Kinetiken (siehe Materialien) für  $u_1$  und  $u_3$  und einer Exponentialfunktionen für  $u_2$ . (Eine weitere Exponentialfunktion für den Systemanstieg und drei weitere für die Systementladung sind nicht dargestellt.) Die Zeitkonstanten  $\tau_1$  und  $\tau_2$  (Abb. 4.5 oben) zeigen keine systematischen Energieabhängigkeiten, jedoch wird  $\tau_3$  zunehmend langsamer (von 7,8 ms bei 120  $\mu\text{J}$  bis 14 ms bei 3,4 mJ) und die zugehörige Normalverteilung breiter. Eine ähnliche Tendenz, ist bereits in den Daten von Holz (1990) zu erkennen, und ebenfalls wurde eine Aufladung der Membran vermutet. Die absoluten Amplituden (Abb. 4.5 mittleres Teilbild) zeigen starkes Sättigungsverhalten. Jedoch lassen sie sich nur schlecht mit exponentiellem Sättigungsverhalten (siehe Vorbemerkung zu Kap.4, Gl. 4.3) anpassen. Abweichungen gibt es bei kleinen und bei großen Intensitäten, vermutlich weil trotz des kleinen Foliendurchmessers und Strahlaufweitung immer noch Inhomogenitäten der Beleuchtung zu Abweichungen führen. Aber nicht nur die absoluten Amplituden zeigen Sättigungsverhalten, sondern auch die Amplitudenverhältnisse relativ zu  $u_1$ , (Abb. 4.5 unten). Während  $u_2/u_1$  keine systematische Energieabhängigkeit zeigt, ändert sich  $u_3/u_1$  von 3:1 bei schwacher Anregung zu 2:1 bei starker. Das ist zunächst merkwürdig, da immer die ganze Membran durchwandert werden sollte, und daher die Amplitudenverhältnisse, die den Verhältnissen im Verschiebeweg entsprechen, immer gleich bleiben sollten. Zieht man nun die  $\tau_3$  Änderung von  $u_3$  mit in Betracht, so kann man vermuten, daß Prozeß 3 so stark verlangsamt wird, daß dessen Amplitude teilweise in der Systementladung verschwindet, und deshalb das Verhältnis  $u_3/u_1$  kleiner wird. Dieser Effekt ist eine klare Abweichung vom einfachen Reaktionsmodell erster Ordnung und wird im Folgenden durch die Aufladung der Membran erklärt.

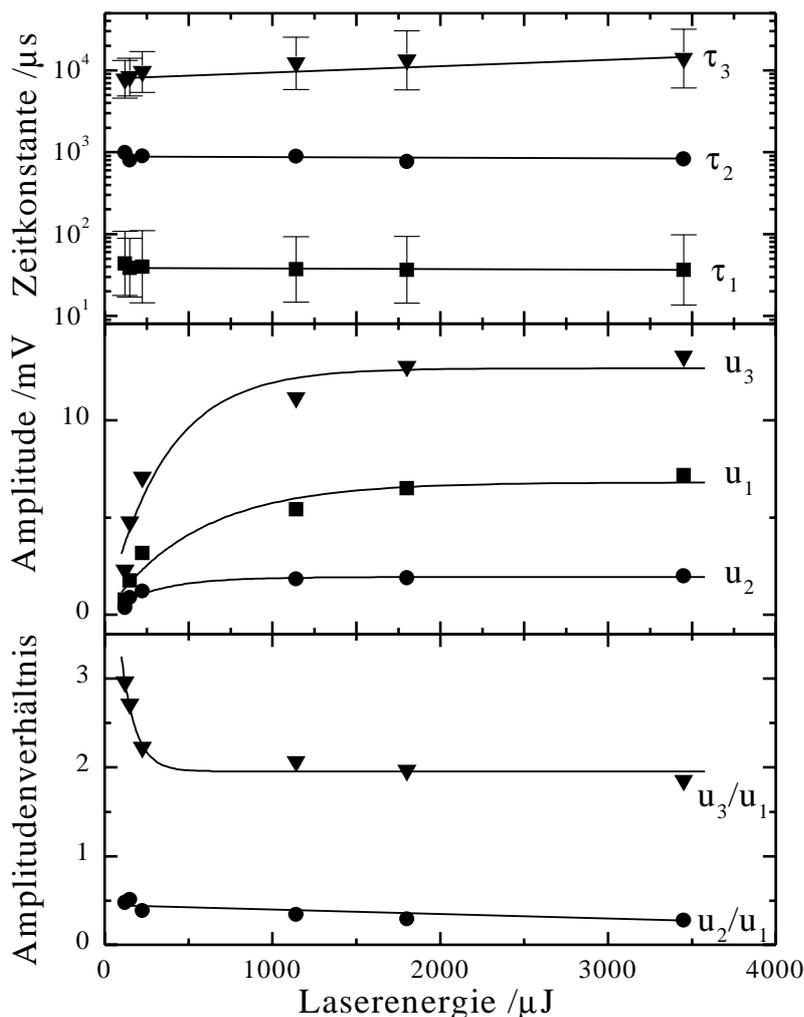


Abb. 4.5: Analyse der Sättigungsreihe mit zwei Gauß-verteilter Kinetiken ( $u_1$  und  $u_3$ ) und einer Exponentialfunktion ( $u_2$ ). Die Balken im oberen Teilbild mit den Zeitkonstanten entsprechen den Halbwertsbreiten der Gauß-Verteilung (siehe Kap. 2.9). Im mittleren Teilbild wurde eine exponentielle Sättigungsgleichung von der Form von Gl. 4.3 an die Amplituden angepaßt. Dabei ergeben sich bei  $u_1$ ,  $u_2$  und  $u_3$  Sättigungsintensitäten von 28, 14 und  $18 \mu\text{J}/\text{mm}^2$  (die Laserenergien wurden hier auf die Folienfläche normiert, um die Werte mit denen von M. Holz vergleichen zu können). Im unteren Teilbild sind die Amplituden  $u_3$  und  $u_2$  relativ zu  $u_1$  aufgetragen. Die Fehler der angepaßten Parameter sind in der Größenordnung der Symbole oder kleiner.

Bedingungen wie in Abb. 4.4.

Nach der Ratentheorie (Läuger, 1984) gilt für die Rate eines Übergangs, der mit der Verschiebung einer Ladung  $Ze$  von  $x=a$  nach  $x=b$  verbunden ist (siehe Abb. 4.6):

$$k = k_0 e^{\frac{Ze(V(a)-V(b))}{2k_B T}} \quad \text{Gl. 4.4}$$

Dabei ist  $V$  das Potential eines von außen angelegten Feldes, und  $k_0$  die intrinsische Rate einer einzigen isolierten Ionenpumpe ohne zusätzliches Potential ( $V(a)=V(b)=0$ ). In der Membran sind die Pumpen jedoch dicht benachbart (Gitterkonstante 6,3 nm), so daß die Wechselwirkung zwischen diesen berücksichtigt werden muß. In Nieto-Frausto et al., 1992, wird berechnet, wie sich zwei benachbarte Ionenpumpen beeinflussen. Dabei wird durch aufsummieren von Spiegelladungen das Potential an den Orten  $a$  und  $b$  berechnet, einmal für den Fall, daß die aktive Ladung der Nachbarpumpe sich noch am Ausgangsort befindet und ein zweites mal, wenn sie den Verschiebungsschritt bereits beendet hat. Daraus erhält man dann mit Gl. 4.4 die Rate der einen Pumpe wenn die Nachbarpumpe den Schritt schon durchgeführt hat. Der Nachteil dieser Methode ist, daß diese Spiegelladungsmethode nur numerisch durchgeführt werden kann und keine analytische Beschreibung liefert. Aber man erhält ein qualitatives Verständnis wie die geometrischen Parameter in die Potentialdifferenz der Nachbarpumpe eingehen. So nimmt zum Beispiel die gegenseitige Beeinflussung der Ionenpumpen zu, wenn der betrachtete Schritt einen großen Verschiebeweg ausmacht, wenn die Dielektrizitätskonstante der Schicht zwischen  $a$  und  $b$  klein, und wenn der Abstand der Pumpen klein ist. Da sich nur die Pumpen gegenseitig beeinflussen, die auch durch Licht

aktiviert wurden, ist der Pumpenabstand der aktivierten Pumpen experimentell durch die Veränderung der Anregungsintensität variabel. Die anderen geometrischen Parameter wie Verschiebeweg und Dielektrizitätskonstante sind durch das Purpurmembransystem gegeben.

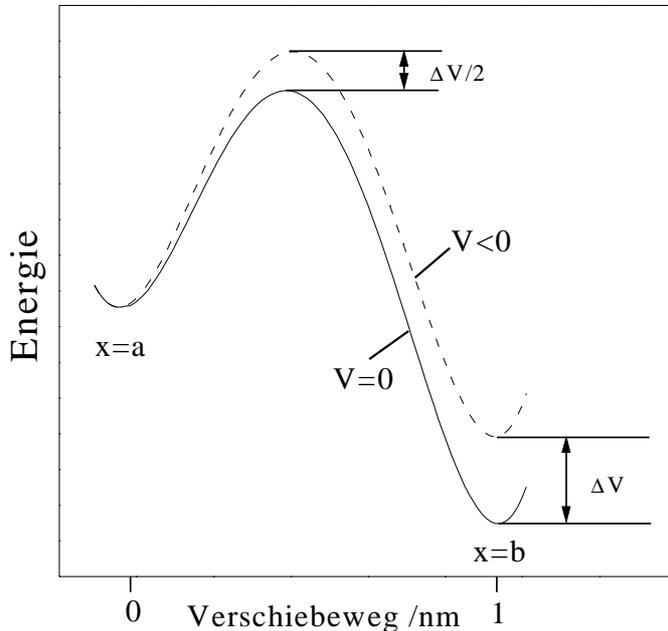


Abb. 4.6 dient zur Erklärung von Gl. 4.4 und zeigt das Energieprofil eines Reaktionsprozesses, der mit einer Ladungsverschiebung verbunden ist. Wählt man den Verschiebeweg als Reaktionskoordinate, so kann ein äußeres linear mit dem Weg ansteigendes Potential hinzuaddiert werden. Bei symmetrischer Energiebarriere erhöht sich dann die Aktivierungsenergie um  $\Delta V/2$ . (nach Läger, 1984)

Zur Beschreibung der experimentellen Ergebnisse sei einer makroskopischen Darstellung von Kleinschmidt und Hess (1990) nachgegangen. Die Rate für eine gegebene Pumpe ist dadurch, daß sich über dem Verschiebeweg eine Spannung  $\Delta V(t)$  aufbaut, selbst zeitabhängig. Sie geht gegen einen Endwert, der durch die über dem Verschiebeweg erreichten Spannung  $\Delta V_\infty$  gegeben ist:

$$\text{Zeitabhängige Rate: } k(t) = k_0 e^{\frac{ze \Delta V(t)}{2k_B T}}, \text{ Endwert der Rate: } k_\infty = k_0 e^{\frac{ze \Delta V_\infty}{2k_B T}} \quad \text{Gl. 4.5}$$

oder beide Gleichungen kombiniert:

$$k(t) = k_0 \frac{k_\infty}{k_0} \left| \frac{\Delta V(t)}{\Delta V_\infty} \right| \equiv k_0 R^{\frac{\Delta V(t)}{\Delta V_\infty}} \quad \text{Gl. 4.6}$$

Für den Wert  $R$ , der eine Aussage über die kinetische Auswirkung der Aufladung macht, läßt sich aus den geometrischen Parametern eine Abschätzung machen: Bei einer Gitterkonstante  $d$  von 6,3 nm, einer Anregung von  $1/3$  der Moleküle, einem Verschiebeweg  $x$  von  $1/4$  der Membran (etwa 1 nm), und einer Dielektrizitätskonstanten  $\epsilon_r=3$  erhält man eine Spannung von  $\frac{ex}{\epsilon_0 \epsilon_r d^2} = -150 \text{ mV}$  über dem Verschiebeweg. Mit Gl. 4.5 erhält man damit

bei Raumtemperatur einen Wert für  $R \approx 1/20$ , d.h. die letzten Pumpen sind 20 mal langsamer als die ersten.

Im Folgenden wird die Wahrscheinlichkeit  $P(t)$  dafür benötigt, daß sich eine gegebene durch Licht aktivierte Pumpe noch im Ausgangszustand befindet. Mithilfe der zeitabhängigen Rate  $k(t)$  läßt sich die DGl. für einen Zerfallsprozeß erweitern zu:

$$\frac{dP(t)}{dt} = -k(t)P(t) \quad \text{Gl. 4.7}$$

Diese DGL. wird nun in eine Gleichung für die Spannung  $U$ , die über dem Membransystem gemessen wird, transformiert. Weil  $U(t)$  mit der Menge der verschobenen Ladungen linear anwächst, gilt  $U(t)=U_\infty(1-P(t))$ .  $U_\infty$  ist dabei die Spannung, die gemessen wird, wenn alle Ladungen verschoben sind. Damit gilt für  $U(t)$  folgende DGL.:

$$\frac{dU(t)}{dt} = k(t)(U_\infty - U(t)) \stackrel{\text{Gl. 4.6}}{=} k_0 \frac{k_\infty}{k_0} \left| \frac{\Delta V(t)}{\Delta V_\infty} \right| (U_\infty - U(t)) \quad \text{Gl. 4.8}$$

Da nun die Meßgröße  $U(t)$  proportional zur der Potentialdifferenz über dem Verschiebeweg  $\Delta V(t)$  ist, kann im Exponenten von Gl. 4.8  $\Delta V$  durch  $U$  ersetzt werden. Damit ergibt sich eine DGL. für die gemessene Spannung mit entsprechenden Randbedingungen:

$$\frac{dU(t)}{dt} = k_0 \frac{k_\infty}{k_0} \left| \frac{U(t)}{U_\infty} \right| (U_\infty - U(t)), \quad U(0)=0, \quad U(\infty)=U_\infty \quad \text{Gl. 4.9}$$

Die formale Lösung dieser Gleichung ist gegeben durch:

$$U(t) = U_\infty \left( 1 - \frac{1}{\ln R} \text{Ei}^{-1}(\text{Ei}(\ln R) - k_0 R t) \right) \quad \text{mit } R \equiv \frac{k_\infty}{k_0} \quad \text{Gl. 4.10}$$

Dabei ist Ei die Exponentialintegralfunktion, die folgendermaßen definiert ist:

$$\text{Ei}(x) = - \int_{-x}^{\infty} \frac{e^{-t}}{t} dt \quad \text{Gl. 4.11}$$

Entgegen der üblichen Definition der Ei-Funktion ist hier jedoch der benötigte Definitionsbereich  $x < 0$ . Die Ei-Funktion ist fortsetzbar auf  $x < 0$  und zwar gilt  $\text{Ei}(x) = -E_1(-x) \forall x < 0$  (Press et al., 1992).  $E_1$  wird ebenfalls als Exponentialintegralfunktion bezeichnet, obwohl diese anders definiert ist. Für negative  $x$  ist  $\text{Ei}(x)$  streng monoton fallend und somit  $\text{Ei}^{-1}$  eindeutig bestimmt und kann etwa durch eine Wertetabelle konstruiert werden. In Abb. 4.7 ist die Funktion  $U$  aus Gl. 4.10 für verschiedene Werte von  $R$  graphisch aufgetragen. Man sieht deutlich, daß die Aufladung der Membran dazu führt, daß der Spannungsverlauf einen im Vergleich zur Exponentialfunktion noch langsamer abklingenden Schwanz erhält. Solche Zeitspuren sind auch in Nieto-Frausto et al. (1992) abgebildet, jedoch wurden diese durch numerische Integration der DGL. erhalten.

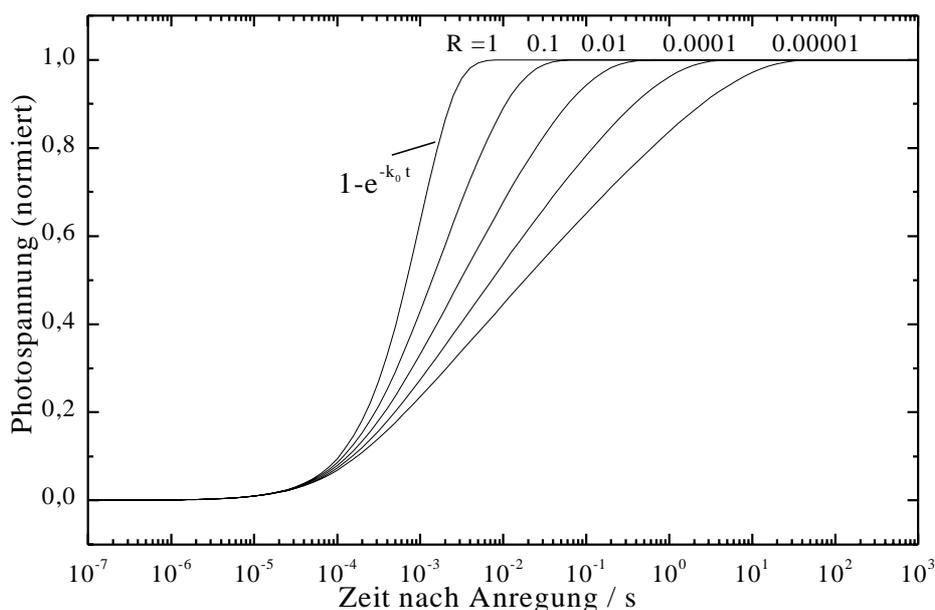


Abb. 4.7 zeigt die Lösung der DGL. 4.8 für verschiedene  $R$ -Werte im Vergleich mit einer einfachen Exponentialfunktion ohne Aufladungseffekte. Die ungestörte Rate  $k_0$  beträgt für alle Zeitspuren 1 ms.

Bisher wurde der Aufladungseffekt auf die Kinetik eines einzelnen Schrittes mit der Rate  $k_0$  betrachtet. Im Photozyklus von bR treten jedoch mehrere aufeinanderfolgende Prozesse auf. Die von einem Prozeß erzeugte Spannung könnte nun die Kinetik eines anderen Prozesses beeinflussen. Wenn nun die eine Ladungsverschiebung in einem Bereich der Membran stattfindet, ist nicht bekannt, welchen Spannungsabfall dies über dem Verschiebeweg des anderen Prozesses in einem anderen Bereich der Membran hervorruft. Jedoch wird der Aufladungseffekt durch die eigene Ladungsverschiebung des Prozesses gegenüber der entfernten Ladungsverschiebung des anderen Prozesses dominieren. Daher wird im Folgenden die gegenseitige Beeinflussung unterschiedlicher Prozesse nicht betrachtet. Das bedeutet, daß für jeden Schritt in der Zeitabhängigkeit der Rate

$k(t) = k_0 e^{\frac{Ze \Delta V(t)}{2k_B T}}$  nur das von dem Schritt selbst erzeugte Potential  $\Delta V(t)$  berücksichtigt wird. Wenn ein viel schnellerer Prozeß bereits ein Potential erzeugt hat (also  $\Delta V(0) \neq 0$ ), so ist dessen Effekt auf die Kinetik in der Konstante  $k_0$  verborgen.

Da hier die Lösung in analytischer Form vorliegt, kann damit eine Anpassung an die experimentellen Daten erfolgen. Dazu wurde ein kurzes Rechnerprogramm entwickelt, das einige Funktionen aus Press et al. (1992) benutzt: Die Funktion *expint* zur Erzeugung der Ei-Funktion, die Funktion *locate* zur Konstruktion der inversen Ei-Funktion mit Hilfe einer Wertetabelle und die Funktion *amoeba* zur Anpassung der Parameter  $k_{0,i}$ ,  $R_i$  und  $U_{\infty,i}$  an die Funktion:

$$U(t) = \sum_{i=1}^{n_{\text{exp}}} U_i e^{-k_i t} + \sum_{i=1}^{n_{\text{ei}}} U(k_{0,i}, R_i, U_{\infty,i}, t) + U_0 \quad \text{Gl. 4.12}$$

Die erste Summe berücksichtigt Prozesse, die spannungsunabhängig sind und Prozesse, die eine kleine Amplitude haben. Die zweite Summe beschreibt die spannungsabhängigen Schritte, wobei die Funktion  $U(k_{0,i}, R_i, U_{\infty,i}, t)$  durch Gl. 4.10 definiert ist.

Mithilfe dieses Programmes wird die Sättigungsreihe von Abb. 4.5 noch einmal ausgewertet, wobei anstelle der zwei Gauß-verteilten Kinetiken  $u_1$  und  $u_3$  zwei inverse Exponentialintegralfunktionen nach Gl. 4.10 benutzt wurden. Der Prozeß  $u_2$  wird wieder durch eine reine Exponentialfunktion beschrieben (und wieder kommen noch eine Exponentialfunktion für den Systemanstieg und drei weitere für die Systementladung hinzu, die nicht weiter betrachtet werden). Die Anpassung mit den beiden Funktionen nach Gl. 4.10 gelingt mit vergleichbar gutem Signal Rausch Verhältnis, wie für die entsprechenden Anpassungen mit den beiden Gauß-verteilten Kinetiken. Da anstelle der drei Parameter der Gauß-Verteilung ( $k_i$ ,  $\sigma_i$ ,  $U_i$ ) nun die Parameter  $k_{0,i}$ ,  $R_i$  und  $U_{\infty,i}$  benötigt werden, bringt diese Beschreibung zwar keine Vereinfachung, aber eine andere Interpretation. Die Amplituden der Analyse zeigen ähnliches Sättigungsverhalten wie in der Auswertung mit den Gauß-verteilten Kinetiken (siehe Abb. 4.8). Jedoch hat  $u_3$  eine deutlich größere Amplitude. Im unteren Bild ist das Verhältnis  $u_3/u_1$  bei geringen Intensitäten bis zu 7:1 verglichen mit 3:1 bei den Anpassungen mit Gauß-verteilter Kinetik. Auch hier ändert sich das Amplitudenverhältnis immer noch mit der Intensität, d.h. auch dieses Modell beschreibt die Kinetik nicht korrekt.

Aber  $(R_3)^{-1} = \frac{k_{0,3}}{k_{\infty,3}}$  zeigt die erwartete Zunahme bei hoher Anregung, denn durch die

zunehmende Aufladung wird  $k_{\infty,3}$  immer kleiner. Dabei bleibt  $\tau_3 = (k_{0,3})^{-1}$  deutlich konstanter über die Intensität (8,5 ms bei 120  $\mu\text{J}$  und 11,3 ms bei 3,4 mJ) als bei den Gauß-verteilten Kinetiken. Das läßt sich besser mit der Vorstellung vereinbaren, daß  $k_{0,3}$  die intrinsische Rate ist. Auch der aus der Anpassung erhaltene Wert von 1/9 für  $R_3$  bei 3,4 mJ liegt in der Größenordnung, die zuvor abgeschätzt wurde. Daß sich das Amplitudenverhältnis  $u_3/u_1$

trotzdem ändert, kann wiederum daran liegen, daß bei hoher Anregung  $u_3$  zum Teil in die Systementladung geschoben wird.

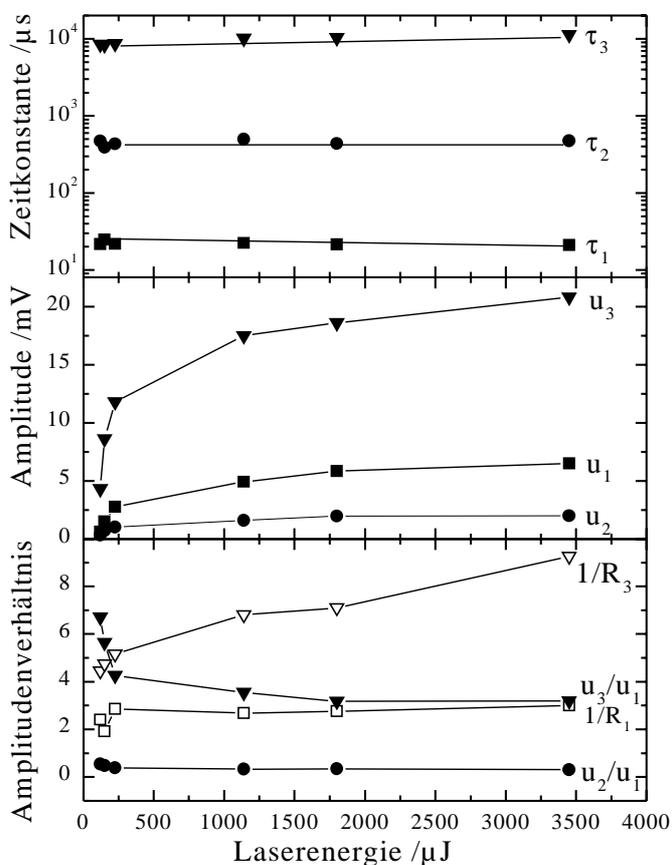


Abb. 4.8 Analyse der Sättigungsreihe mit zwei inversen Exponentialintegraltermen nach Gl. 4.10 ( $u_1$  und  $u_3$ ) und einer Exponentialfunktion ( $u_2$ ). Die Zeitkonstanten bzw. die Amplituden sind im oberen bzw. im mittleren Teilbild dargestellt. Im unteren Teilbild sind wieder die Verhältnisse  $u_3/u_1$  und  $u_2/u_1$  aufgetragen und außerdem die inversen R-Werte für Prozeß 1 und 3.

Dagegen zeigt  $(R_1)^{-1}$  kaum Abhängigkeit von der Intensität. Daraus folgt, daß dieser Prozeß  $u_1$  nicht spannungsabhängig ist. Die Beschreibung mit der Gauß-verteilten Kinetik ist hier ebenso gerechtfertigt. Auch das Verhältnis  $u_2/u_1$  zeigt keinen signifikanten Effekt innerhalb der Schwankungsbreite. Dies spricht dafür, daß auch dieser Prozeß nicht so stark durch die Aufladung beeinflusst wird. Offenbar sind die Prozesse 1 und 2 mit der kleinen Amplitude weniger von der Aufladung beeinflusst, als Prozeß 3 mit dem großen Verschiebeweg. Auffällig ist außerdem, daß bei dieser Auswertung  $\tau_2$  zweimal schneller ist als bei der Auswertung mit Gauß-verteilten Kinetiken.

Noch deutlicher werden diese Aufladungseffekte bei Doppelblitzexperimenten, die zur noch stärkeren Anregung führen. Außerdem stellen diese Doppelblitzexperimente eine Kontrolle für die Experimente mit zweitem blauen Blitz für das M-Rückschießen dar (siehe Kap 5.3). Bei diesen Doppelblitzexperimenten wird zunächst vom ersten Blitz bei 532 nm (Nd:YAG-Laser) der Grundzustand angeregt. Der zweite Blitz mit 580 nm (Farbstofflaser mit R6G) folgt in einem Zeitabstand von 200  $\mu$ s. Zu diesem Zeitpunkt ist der überwiegende Anteil der vom ersten Blitz angeregten Moleküle bereits im M-Zustand, der bei 410 nm absorbiert, bei 580 nm aber nicht mehr. Daher kann der zweite Blitz ausschließlich den zu diesem Zeitpunkt noch vorhandenen Grundzustand anregen. Die durch den zweiten Blitz angeregten Moleküle sind bereits der Spannung ausgesetzt, die von den durch den ersten Blitz angeregten Molekülen erzeugt wurde. Die Kinetik der vom zweiten Blitz zusätzlich angeregten Moleküle unterscheidet sich nun von der Kinetik ohne ersten Blitz, wie in Abb. 4.9 zu sehen ist. Dazu wird im unteren Teilbild die Differenz B-A der beiden Meßkurven vom mittleren Teilbild gebildet. Diese Differenz ist das Spannungssignal der zusätzlich angeregten

bR Moleküle, weil der zweite Blitz nur die Grundzustandsmoleküle anregen kann, die M-Moleküle jedoch nicht.

Zunächst fällt auf, daß das Zusatzsignal D nur wenig zusätzliche Spannungsamplitude liefert, verglichen mit Meßsignal C und dem Vorwissen aus dem vorhergehenden Abschnitt, daß noch etwa 60-70% der Grundzustandsmoleküle vorhanden sein sollten. Die Vergrößerung von D zeigt außerdem starke Änderungen in der Kinetik verglichen mit C. Zwar ist die  $\mu$ s-Komponente deutlich zu sehen, aber die 10 ms Komponente ist stark reduziert in der Amplitude und außerdem auch langsamer. Das bekräftigt die Vermutung vom vorhergehenden Absatz über die Sättigungsreihe. Die  $u_1$  Komponente ist wenig von der Aufladung der Membran durch den ersten Blitz beeinflusst, die  $u_3$  Komponente dagegen stark.

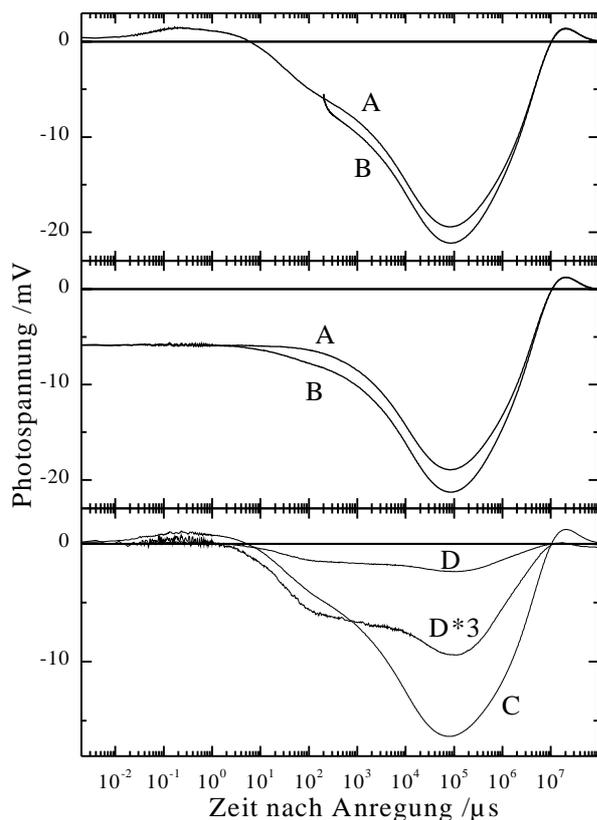


Abb. 4.9: Elektrisches Doppelblitzexperiment: Im oberen Teilbild startet die Datenaufnahme auf Einsetzen des ersten Blitzes. Zeitspur A ist vom ersten Blitz bei 532 nm alleine, bei B folgt ein zweiter Blitz mit 580 nm nach 200  $\mu$ s und liefert eine zusätzliche Spannungsamplitude. Im mittleren Teilbild ist dasselbe Experiment durchgeführt wie im oberen Teilbild, jedoch setzt hier die Datenaufnahme auf Eintreffen des zweiten Blitzes ein. Im unteren Teilbild ist D die Differenz der Zeitspuren B und A aus dem mittleren Teilbild. Meßkurve C ist das Signal des zweiten Blitzes ohne Vorblitz. Die Differenzzeitspur D wurde 3-fach vergrößert, um eine ähnlich große Amplitude der  $\mu$ s Komponente wie C zu erhalten. Dann zeigt die Vergrößerung von D starke Abweichungen zu C im ms Zeitbereich.

Mithilfe der Doppelblitzexperimente sollte es also näherungsweise möglich sein, Gl. 4.4 der Ratentheorie zu überprüfen. Mit dem ersten Blitz wird dazu eine Spannung über der Membran erzeugt, der zweite Blitz mißt die veränderte Kinetik aufgrund der vom ersten Blitz erzeugten Spannung. Über die Intensität des ersten Blitzes ist die Spannung über der Membran einstellbar. Zwar ist mit Hilfe des ersten Blitzes keine zeitlich konstante Spannung über der Membran einstellbar, da aber das Differenzsignal (Kurve D aus Abb. 4.9) i.a. noch langsamer ist als das Signal des ersten Blitzes, wird in erster Näherung die Summe der aktiven Komponenten des ersten Blitzes gebildet, und als Spannung über der Membran betrachtet. Das Ergebnis dieser Auswertung ist in Abb. 4.10 dargestellt. Hier sind die Zeitkonstanten  $\tau_3$  der Differenzsignale der Intensitätsdoppelblitzmeßreihe in Abhängigkeit der Endspannung des ersten Blitzes dargestellt. In dieser Auftragung liegen die ersten vier Meßpunkte gut auf einer exponentiell ansteigenden Kurve. Dies ist wie theoretisch erwartet, wenn in Gl. 4.4 eine konstante Potentialdifferenz  $\Delta V$  über dem Verschiebeweg angenommen

wird ( $k(\Delta V) = k_0 e^{\frac{e\Delta V}{2k_B T}}$ ), und die Endspannung des ersten Blitzes proportional zu dieser Potentialdifferenz ist. Die gestrichelte Linie ist die Fortsetzung einer Anpassung der ersten vier Meßpunkte an eine Exponentialfunktion. Diese Linie zeigt deutlich, daß die Meßwerte

bei hoher Spannung nicht mehr auf der theoretischen Kurve liegen. Wahrscheinlich liegt das daran, daß die Zeitkonstanten größer als 30 ms aufgrund der Systementladung nicht mehr korrekt meßbar sind (siehe Kap. 2.9).

Die Proportionalitätskonstante  $c$  zwischen der gemessenen Endspannung  $U$  und dem Potentialunterschied über dem Verschiebeweg  $\Delta V$  ( $\Delta V = cU$ ) läßt sich aus dem Exponentialfaktor der Anpassung an die ersten vier Meßpunkte bestimmen. Hieraus wurde ein Wert von  $c=3,7$  erhalten, d.h. bei einer über dem Membransystem gemessenen Spannung von 10 mV beträgt der Potentialunterschied über dem Verschiebeweg -37 mV. Dadurch erhöht sich die Aktivierungsenergie um 18,5 meV (Abb. 4.6), das entspricht 1,8 kJ/mol. Da die Aktivierungsenergie ohne zusätzliches Potential etwa 60 kJ/mol beträgt, ist die Erhöhung der Barriere durch die zusätzliche Spannung um 1,8 kJ/mol in einer Temperaturreihe nur schwer nachweisbar. Bei noch stärkerer Anregung des ersten Blitzes kann man die Barriere noch erhöhen, aber dann ist die Rate nicht mehr exakt bestimmbar, da dann die Systementladung die Messung verfälscht. Aus diesem Grund wurde auf eine Temperaturreihe verzichtet.

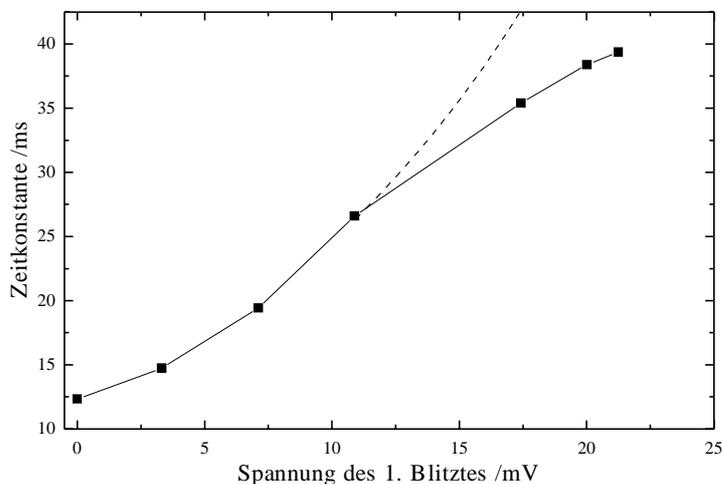


Abb. 4.10: Die Zeitkonstanten  $\tau_3$  der Gauß-verteilten Kinetiken der Differenzen nach Abb. 4.9 D, bei verschiedenen Intensitäten des ersten Blitzes. Die x-Werte sind die Endwerte der Spannungen eines Einzelblitzexperimentes bei entsprechender Intensität. Die gestrichelte Kurve deutet die aufgrund der ersten vier Meßpunkte und einem exponentiellen Verlauf gemäß  $k = k_0 e^{\frac{e\Delta V}{2k_B T}}$  erwartete Fortsetzung an.

Die Änderung der Kinetik der vom Grundzustand angeregten Moleküle bei überlagerten Spannungssignalen von mehreren Blitzen stellt ein Problem für die Auswertung der M-Photorückreaktionsexperimente dar. Die Korrektur für die Grundzustandsanregung ist daher durch einfache Subtraktion nicht (über den gesamten Zeitbereich) möglich.

In optischen Experimenten wurde die Änderung der M-Kinetik mit der Anregungsenergie bereits untersucht (Dancsházy und Tokaji, 1993). Dort ist tendenziell ähnliches Verhalten erkennbar. Bei einer Anpassung des M-Zerfalls mit zwei Komponenten (3 und 30 ms) nimmt mit stärkerer Anregung die langsamere M-Zerfallskomponente  $M_s$  relativ zur schnelleren  $M_f$  zu. Die Autoren benutzten ein kooperatives Modell zur Erklärung dieses Sättigungseffektes, ohne auf den Mechanismus dieses Modells einzugehen. Eine eventuelle Aufladung der Membran wird ebenfalls nicht betrachtet. Auf jeden Fall ist die Amplitude des Effektes bei diesen optischen Experimenten sehr viel kleiner als bei diesen elektrischen Messungen. Das liegt vermutlich daran, daß aufgrund der elektrisch isolierenden Verbindung der angelagerten Purpurmembra an die Stützfolie, die Entladung erst im Sekunden- bis Minutenbereich erfolgt, während bei optischen Messungen an Purpurmembrabruchstücken die Entladung bereits im Zeitbereich von 70  $\mu$ s über den Rand der Membran erfolgen kann (Moltke et al., 1995).

Die obige Feststellung, daß Prozeß 1 seine Kinetik bei Aufladung der Membran nicht oder nur wenig ändert, kann nun dazu benutzt werden, den Bruchteil  $f_1$  der Moleküle zu bestimmen, die nach der Anregung durch den ersten Blitz noch im Grundzustand verblieben sind. Bei Annahme eines homogenen Grundzustandes ist dann dadurch gleichzeitig die

Anregungsstärke  $1-f_1$  des ersten Blitz bestimmt. Dazu wird wie im vorherigen Abschnitt das Verhältnis zwischen zusätzlicher Amplitude  $\Delta u_1$  des zweiten Blitzes und der Amplitude  $u_1$  ohne Vorblitz gebildet. Dabei wird wieder ein Zeitabstand von  $200 \mu\text{s}$  zwischen erstem und zweitem Blitz gewählt, damit zur Zeit des zweiten Blitzes in erster Näherung nur Grundzustand und M-Intermediat vorliegt. Aufgrund der Wellenlänge des zweiten Blitzes ( $580 \text{ nm}$ ) kann dieser dann nur den Grundzustand anregen. In Abb. 4.11 ist zu sehen, wie die so erhaltenen Werte mit der Intensität des ersten Blitzes variieren.

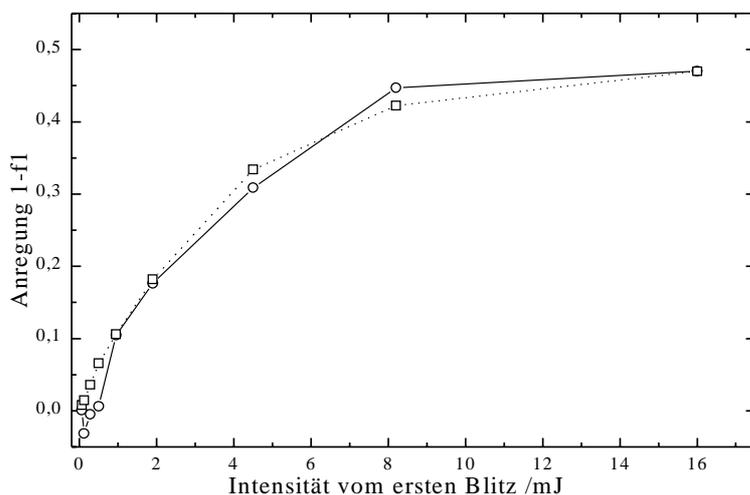


Abb. 4.11 Bruchteil der vom ersten Blitz angeregten Moleküle in Abhängigkeit von dessen Intensität.  $f_1$  wird aus dem Verhältnis Zusatzamplitude  $\Delta u_1$  des zweiten Blitzes nach  $\Delta t=200\mu\text{s}$  relativ zur Amplitude  $u_1$  ohne ersten Blitz erhalten (Kreise). Quadrate symbolisieren die Amplitude  $u_1$  des ersten Blitzes skaliert auf etwa gleiches Verhältnis wie bei starker Anregung (letzter Meßpunkt).

Bei sehr hoher Intensität des ersten Blitzes geht der Wert der noch im Grundzustand befindlichen Moleküle, im Folgenden immer  $f_1$  genannt, gegen einen Sättigungswert von 0,55. Dieser Wert entspricht einer Anregung von 45% und ist in guter Übereinstimmung mit dem entsprechenden Sättigungswert aus den optischen Messungen in Abschnitt 4.1. Dieser Befund spricht durchaus für die Vergleichbarkeit der Meßsysteme. Die Größe von  $f_1$  spielt bei der Auswertung der Photoreaktionen der Intermediate eine wichtige Größe, da dieser Wert für die Korrektur, daß der zweite Blitz immer noch den Grundzustand anregen kann, benötigt wird.

Da dieses Experiment indirekt die Anregungsstärke mißt, ist es naheliegend dieses Experiment für variierende Zeitabstände durchzuführen. Dazu wurde eine Meßreihe durchgeführt, bei der der erste Blitz sättigend war und der Zeitabstand zum zweiten Blitz von  $1.8 \mu\text{s}$ -1 s variiert wurde. Für jeden Zeitabstand wurde die Differenz aus der Doppelblitz- und der Einzelblitzzeitspur gebildet (analog zu Abb. 4.9 Zeitspur D), um die vom zweiten Blitz erzeugte Zusatzspannung zu erhalten. Exemplarisch sind für drei Zeitabstände die Differenzsignale in Abb. 4.12 dargestellt. Zunächst erkennt man wieder, daß das Verhältnis der  $u_3$  Komponente zur  $u_1$  Komponente im Vergleich zum Signal des Farbstofflasers alleine stark reduziert ist. Dies ist wieder mit dem oben diskutierten Aufladungseffekt zu erklären. Bei genauem Betrachten fällt auf, daß in dem Differenzsignal bei  $10 \mu\text{s}$  (A) die schnelle K-Amplitude fehlt und bei dem Differenzsignal bei 1 ms (B) wieder leicht auftaucht.

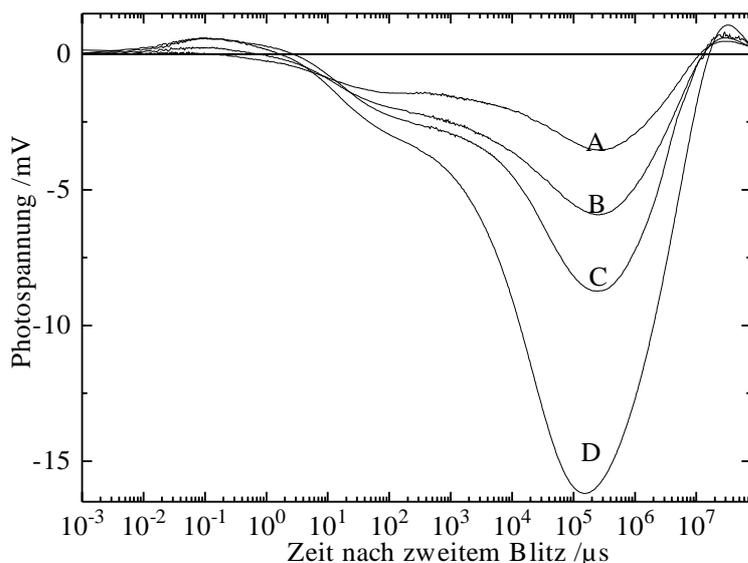


Abb. 4.12 Differenz aus Doppelblitzzeitpur (532/580nm Anregung) und Einzelblitzzeitpur (532nm Anregung verzögert) mit unterschiedlichem Zeitabstand, bei A: 10  $\mu$ s , B: 1 ms und C: 100 ms. Zum Vergleich D: die Zeitspur des Farbstofflasers alleine.

Das Differenzsignal wurde bei allen Zeitabständen dann wieder mit zwei Gauß-verteiltern Kinetiken und einer Exponentialfunktion analysiert. Die  $\mu$ s-Komponente ( $\Delta u_1$ ) im Differenzsignal relativ zur  $\mu$ s-Komponente im Signal des Farbstofflasers alleine ( $u_1$ ) ergibt wieder den Faktor  $f_1$  und die Anregung  $1-f_1$ . Das Verhalten der Anregung über dem Zeitabstand ist in Abb. 4.13 dargestellt. Verglichen mit der analogen optischen Messung Abb. 4.3, bei der die K-Amplitude zur Messung der Anregung benutzt wurde, zeigen sich jedoch einige Unterschiede. Im Zeitbereich kürzer als 100  $\mu$ s kommen die Meßwerte viel stärker von Werten hoher Anregung. Bei der optischen Messung wurde dies mit der Photorückreaktion von dem K-Intermediat erklärt. Hier reicht diese Tendenz jedoch bis in den Zeitbereich um 100  $\mu$ s hinein, in dem das K-Intermediat nicht mehr existiert. Zusammen mit der Beobachtung der fehlenden K-Amplitude bei einem Zeitabstand von 10  $\mu$ s legt dies die Vermutung einer Photorückreaktion aus dem L-Intermediat nahe, denn im L-Intermediat ist die Photospannung positiv und eine Photorückreaktion würde eine abnehmende Spannungsamplitude erzeugen, die der K-Amplitude des neu angeregten Grundzustandes entgegengesetzt ist. Im Zeitbereich um 1 ms stimmt diese Messung recht gut mit dem optischen Analogon überein, es gibt ein Plateau um einen Anregungswert von 0,4. Danach jedoch gibt es starke Abweichungen, so zerfällt das angeregte bR bei der elektrischen Meßreihe viel langsamer. Das wiederum unterstützt die obige Argumentation, daß die Aufladung der Membran bei elektrischen Messungen zu langsam zerfallenden Komponenten führt, die in der Systementladung verschwinden, hier jedoch indirekt detektiert werden können. Bei optischen Messungen tritt diese langsame Komponente nicht auf, da die Entladung über den Rand der Membranbruchstücke erfolgen kann.

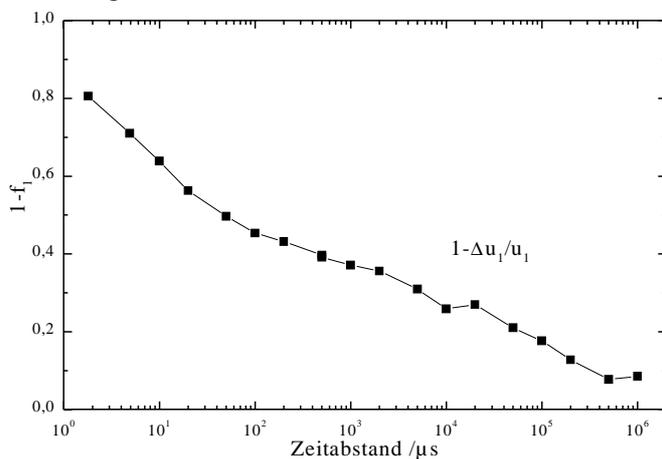


Abb. 4.13 Aus der Differenzzeitpur aus Doppelblitzexperiment und Einzelblitzexperiment berechnete Anregung bei elektrischen Messungen. Der erste Blitz ist dabei in Sättigung.

Für die Messung der Photorückreaktion aus dem M-Intermediat ergeben sich aus diesen Kontrollexperimenten drei Konsequenzen:

1. Aufgrund der elektrischen Aufladung der Membran läßt sich die Zeitspur des zweiten Blitzes nicht linear mit dem Signal des ersten Blitzes überlagern. Lediglich die  $u_1$  und  $u_2$  Komponenten sind linear überlagerbar, da diese nicht spannungsabhängig sind.
2. Bei Zeitabständen im  $\mu\text{s}$  Bereich ist vermutlich eine Photoreaktion aus dem L-Intermediat überlagert.
3. Kontrollexperimente bei 532/580 nm zur Bestimmung von  $f_1$  können nicht bei jedem 532/400 nm Experiment wiederholt werden. Deshalb wird in Sättigung des 532 nm Lasers gearbeitet, und damit werden immer  $f_1$  Werte im Bereich 0,55 bis 0,75 benutzt.

