

# **Polarisationsdatenspeicherung in Bakteriorhodopsin-Schichten**

## **Dissertation**

zur Erlangung des Doktorgrades der Naturwissenschaften

(Dr. rer. nat.)

dem

Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

**Martin Imhof**

aus Biedenkopf

Marburg/Lahn 2012

Vom Fachbereich Chemie

der Philipps-Universität Marburg (Hochschulkenziffer: 1180)

als Dissertation am 16.11.2012 angenommen.

Erstgutachter: Prof. Dr. N. Hampp

Zweitgutachter: Prof. Dr. L.-O. Essen

Tag der Disputation: 14.12.2012

Die vorliegende Dissertation wurde in der Zeit von November 2008 bis Juli 2012 am Fachbereich Chemie der Philipps-Universität Marburg unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. Norbert Hampp angefertigt.

### Erklärung

gemäß § 10, Abs. 1 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 28.04.2010

Ich versichere, dass ich meine Dissertation „Polarisationsdatenspeicherung in Bakteriorhodopsin-Schichten“ selbstständig, ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen und Hilfen bedient, sowie alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate als solche gekennzeichnet habe.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 16.11.2012

---

Martin Imhof

Teile der vorliegenden Arbeit wurden bereits publiziert:

Publikationen:

- Daniel Rhinow, Martin Imhof, Ivan Chizhik, Roelf-Peter Baumann, Norbert Hampf, Structural Changes in Bacteriorhodopsin Caused by Two-Photon-Induced Photobleaching, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116 (25), 7455–7462. DOI: 10.1021/jp2112846
- Martin Imhof, Jens Pudewills, Daniel Rhinow, Ivan Chizik, Norbert Hampf, Stability of Purple Membranes from Halobacterium Salinarum towards Surfactants – Inkjet Printing of a Retinal Protein, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, 116 (32), 9727–9731. DOI: 10.1021/jp3057459
- Martin Imhof, Uwe Linne, Daniel Rhinow, Norbert Hampf, Two-Photon-Induced Selective Decarboxylation of Aspartic Acids D85 and D212 in Bacteriorhodopsin, *J. Phys. Chem. Lett.*, **2012**, 3, 2991–2994. DOI: 10.1021/jz301292n



Teilnahmen an Tagungen, internationalen Konferenzen und Symposien:

- International EL.B.A Nanoforum XXI, Nanotechnology and Nanobioelectronics, in Genua (Italien), vom 06-08.05.2009.
- PepCon-2011 BIT Life Sciences in Peking (China), vom 22.-25.03.2011.
- Sino-German Biomaterials Development & Application Symposiums in Ningbo (China), am 28.03.2011.
- International Symposium on Biomaterials & Regenerative Medicine and Translation in Ophthalmology in Wenzhou (China), vom 29-31.03.2011.
- International EL.B.A Nanoforum XXVII, Nanomaterials, in Marburg am 06.09.2011.
- 502. WE-Heraeus Seminar, Harvesting Light, in Bad Honnef, vom 02-04.04.2012.

# Lebenslauf

Kurzfassung des wissenschaftlichen Werdegangs des Verfassers nach § 17, Abs. 2 der Promotionsordnung der Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fachbereiche und des Medizinischen Fachbereichs für seine mathematisch-naturwissenschaftlichen Fächer der Philipps-Universität Marburg vom 28.04.2010

- |                            |  |
|----------------------------|--|
| Seit November 2008         | Wissenschaftlicher Mitarbeiter mit dem Ziel der Promotion<br>Thema: „Polarisationsdatenspeicherung in<br>Bakteriorhodopsin-Schichten“<br>AG Hampp, Physikalische Chemie, Philipps-Universität<br>Marburg |
| Januar - September 2008    | Diplomarbeit „Photomechanische Strukturierung von<br>Bakteriorhodopsin-Schichten als mikroskalige Template“<br>AG Hampp, Physikalische Chemie, Philipps-Universität<br>Marburg                           |
| Oktober - November 2007    | mündliche Diplomprüfungen  |
| August 2006 - Februar 2007 | Auslandssemester an der Universität Uppsala, Schweden<br>Abteilung Organische Chemie / Biochemie im<br>Biomedizinischen Zentrum bei Prof. A. Gogoll  |
| Oktober 2002               | Beginn des Chemiestudiums an der Philipps-Universität<br>Marburg   |

## Summary

The distribution of knowledge, rules and laws in the form of stored information has begun with simple stone tablets and papyrus rolls. It developed printed media and nowadays the use of computers for data storage is common. Magnetic hard drives can store a few terabits. The optical information storage with CDs (compact discs) and DVDs (digital versatile discs) is widespread. However the number of pits and flats is limited and a regular CD can only store up to 700 MB. By decreasing the laser spot size and using other wavelengths the capacity volume for storage expands up to 50 GB in a blue ray disc. But still the limits of data storage are not yet exhausted. The optical data storage can be extended into five dimensions, including the spatial resolution in XYZ-direction of the storage medium and the readout wavelength for different dyes. Furthermore the polarization state of light provides an additional degree of freedom to increase capacity. Optical polarization data storage is also possible with Bakteriorhodopsin (BR). Research on BR has been done since its discovery in the 1970s. In recent years more and more possibilities for technical applications of this biomolecule have been discussed. BR has an enormous stability against thermal and chemical stress, therefore it is ideal for technical applications.

The combination of existing techniques with BR is an important requirement for the market introduction of products containing BR. These products include for example photochromic security inks using molecular effects of BR, inspired by the proton pump mechanism of this protein in nature. BR also has a huge potential in the application as optical polarization-encrypted data storage. Therefore, the already known technique of data storage in BR has to be investigated with regard to the writing and reading mechanism. Moreover, the molecular effect, which leads to a macroscopic measurable polarisation change of incident light has to be devised. A combination of UV-Vis-spectroscopy, CD-spectroscopy and atomic force microscopy of laser irradiated samples was able to show the structural changes on the molecular level. Together with MS-analyses the irreversible reaction of laser induced two photon photo-bleaching has been solved in this work.

In this PhD thesis techniques and procedures were combined to produce polarization data storage containing BR. The effect of polarisation storage was analyzed and described employing the Stokes formula. The capacity of data storage increases enormously by using a polarisation system.

## Kurzfassung

Die Weitergabe von Wissen, Regeln und Gesetzen in Form von gespeicherten Informationen hat mit einfachen Steintafeln begonnen und sich über Papyrusrollen, dem Buchdruck bis hin zur Verwendung von Computern zur Datenspeicherung entwickelt. Magnetische Festplatten kommen heute bis auf einige Terabits Speichervolumen. Die optische Informationsspeicherung in Form von CDs (Compact Discs) und DVDs (Digital Versatile Discs) ist weit verbreitet. Die Nummer der Pits and Lands ist limitiert und eine normale CD erlaubt eine Speicherung von bis zu 700 MB. Durch kleinere Laserspots, anderen Wellenlängen zum Auslesen und engere Beschreibung der Datendiscs wurde bei Blue Rays das Datenvolumen bis auf 50 GB erweitert. Auf diesem Wege sind die Grenzen der Datenspeicherung noch nicht ausgereizt. Die optische Datenspeicherung lässt sich in fünf Dimensionen ausweiten, dazu gehören neben der Ortsauflösung in XYZ-Richtung des Speichermediums noch die Auslesewellenlänge für verschiedene Farbstoffe sowie die Polarisationsrichtung des Lichts. Optische Datenspeicherung ist auch mit Bakteriorhodopsin (BR) möglich. Seit der Erforschung des BR in den 70ern wurden bis heute verschiedene technische Anwendungen des Biomoleküles diskutiert. So sind photochrome Sicherheitstinten, die den Protonpumpmechanismus des Proteins nutzen, von Interesse. Ein anderes großes Potential ist die Polarisationsdatenspeicherung. Das Ziel dieser Dissertation ist es, die Veränderungen aufzuzeigen, die bei der Polarisationsdatenspeicherung eintreten, beginnend im molekularen bis hin zum makroskopisch messbaren Effekt. Der für die Datenspeicherung von *Fischer* und *Mastay* postulierte Zustand  $P_{360}$  wurde bereits früher schon UV-Vis spektroskopisch untersucht. In dieser Arbeit werden mit CD-Spektroskopie, AFM und SAXS strukturelle Veränderungen auf der mikroskopischen Ebene diesen Zustand nach Bestrahlung mittels Pulslaser aufklären. Ergänzt durch massenspektrometrische Messungen kann die Ursache der Irreversibilität des Schreibvorgangs aufgeklärt werden.

Im zweiten Teil werden die externen Einflüsse auf das Datenspeichern aufgezeigt. Der makroskopisch messbare Effekt des Datenspeicherns wird mittels Polarimetrie untersucht. Mit einer mathematischen Beschreibung durch den Stokes-Formalismus wird der Effekt der Polarisationsdatenspeicherung beschrieben. Die Speicherkapazität eines Polarisationsdatenspeichers übersteigt herkömmliche Datenspeicher um ein vielfaches.

# Inhaltsverzeichnis

	<b>Summary</b>	<b>I</b>
	<b>Kurzfassung</b>	<b>II</b>
	<b>Inhaltsverzeichnis</b>	<b>III</b>
<b>1</b>	<b>Bakteriorhodopsin</b>	
1.1	Halobacterium salinarum	1
1.2	Struktur und Aufbau des Bakteriorhodopsins	1
1.3	Purpurmembra	2
1.4	Protonentransport durch das Bakteriorhodopsin	3
1.5	Gentechnisch modifizierte Mutanten des Bakteriorhodopsins	5
1.6	Verwendungspotential von BR als Sicherheitsmerkmal	6
<b>2</b>	<b>Optische Beschreibung der Polarisation mittels Stokes-Formalismus</b>	
2.1	Stokes-Formalismus	8
2.2	Matrizendarstellung von idealen optischen Bauelementen	12
<b>3</b>	<b>Methoden</b>	
3.1	Beschichtungsverfahren	15
3.2	Laser	16
3.3	Mikroskopie	18
3.4	Spektroskopische Verfahren	19
3.5	Massenspektrometrie	24
3.6	Weitere Methoden	25
<b>4</b>	<b>Ergebnisse und Diskussion</b>	
4.1	Probenvorbereitung	26
4.2	Speicherprozess auf supramolekularer Ebene - Untersuchung der durch die Zweiphotonenabsorption verursachten strukturellen und molekularen Veränderungen in der PM und BR	28
4.3	Externe Einflüsse auf den Zweiphotonen Speicherprozess und seine spektrale Analyse an BR-Schichten	46
4.4	Speicherprozess auf makromolekularer Ebene	56
4.5	Der optische Datenträger	84
4.6	Entwicklung eines Auslesegerätes für Polarisationsdatenspeicher	100
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung und Ausblick</b>	109
<b>6</b>	<b>Danksagung</b>	110
<b>7</b>	<b>Literatur</b>	111



# 1 Bakteriorhodopsin

## 1.1 Halobacterium salinarum

Das Retinalprotein Bakteriorhodopsin (BR) des extremophilen *Halobacterium salinarum*<sup>[1]</sup> wurde 1971 von *Oesterhelt* und *Stoeckenius* isoliert und charakterisiert.<sup>[2]</sup> Das BR liegt in der Zelloberfläche des *H. salinarum* in Form der Purpurmembran (PM) vor. BR dient als Lichtenergiekonverter, da es als lichtgetriebene Protonenpumpe einen Protonengradienten zwischen dem inner- und extrazellulären Bereich der Zelle herstellt. Dieser entstehende Protonengradient, der über die Zellmembran generiert wird, dient der membrangebundenen ATP-Synthase zur ATP-Synthese aus ADP, bei der die Protonen wieder in das Zellinnere diffundieren. Somit bleibt der Stoffwechsel auch unter anaeroben Bedingungen erhalten.<sup>[3-5]</sup> In der Zellmembran des *H. salinarum* befinden sich neben dem BR noch drei weitere photoempfindliche Proteine. Das *Halorhodopsin* (HR) wirkt als eine nach innen gerichtete Chloridpumpe. Dadurch lädt sich die Membran negativ auf, die Gegenionen wandern passiv über Ionenkanäle ein und der osmotische Druck der Umgebung kann ausgeglichen werden.<sup>[5]</sup> Mit Hilfe des Flagellarmotors und der Sensorproteine SR I und SR II als Lichtsensoren ist *H. salinarum* in der Lage optimale Standorte für phototropes Wachstum aufzusuchen.<sup>[6-7]</sup> *H. salinarum* gehört zu den halophilen Archaea, die zum Überleben extreme Salzkonzentrationen von mindestens 1,5 mol/l NaCl (9%) benötigen. Optimale Lebensbedingungen liegen zwischen 3,5-4,5 mol/l NaCl.<sup>[8]</sup>

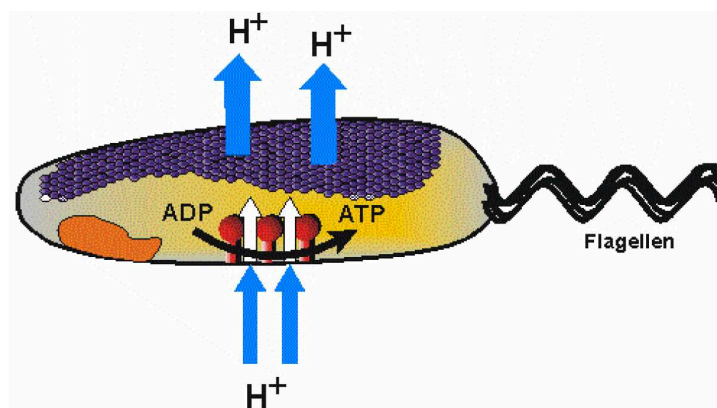
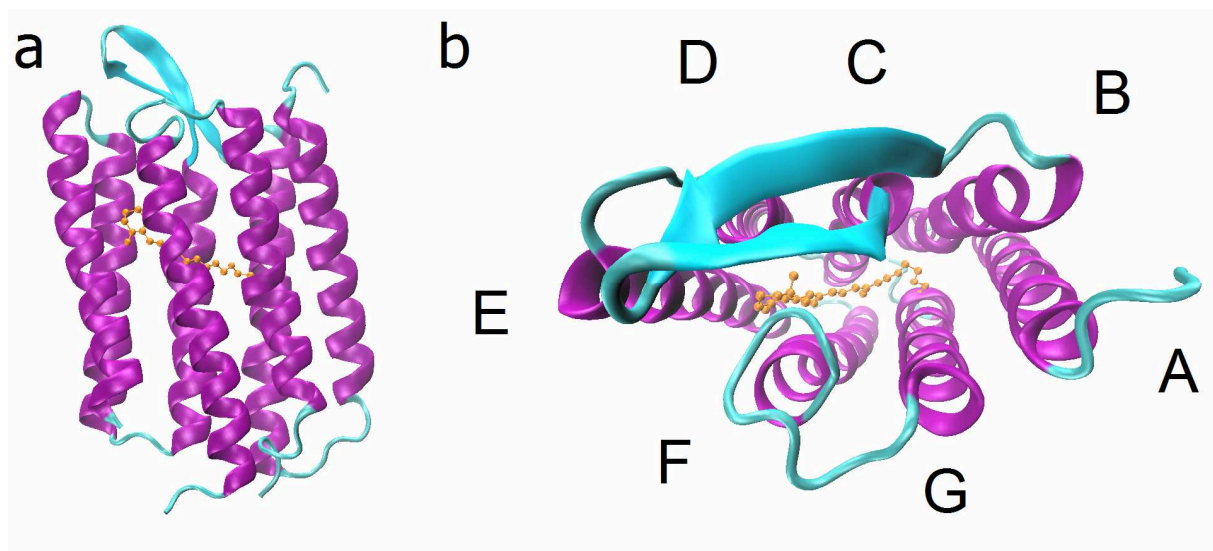


Abb. 1: Skizze von *Halobacterium salinarum* mit Flagellen und Energiegewinnung durch Protonentransport.<sup>[9]</sup>

## 1.2 Struktur und Aufbau des Bakteriorhodopsins

Bakteriorhodopsin besteht aus einer Polypeptidkette mit 248 Aminosäuren mit einem Molekulargewicht von 26 kDa in Form von sieben annähernd parallelen  $\alpha$ -Helices und einem

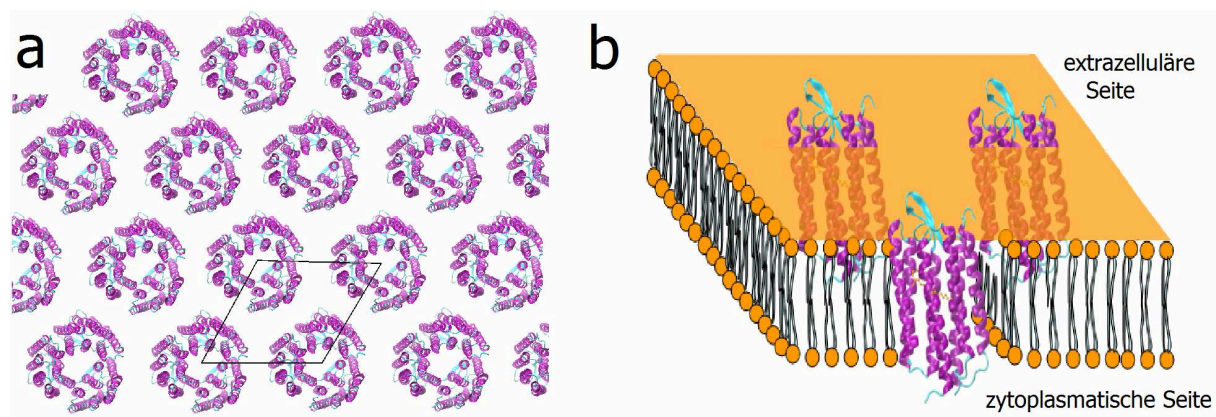
$\beta$ -Faltblattbereich in der Schleife zwischen den Helices B und C (siehe Abb. 2). Im Inneren der Helices befindet sich das Retinal, das an die  $\epsilon$ -Aminogruppe des Lysins-216 als Imin (*Schiff*'sche Base) gebunden ist. Das Retinal trennt das Transmembranprotein in einen zytoplasmatischen und einen extrazellulären Teil. Das konjugierte Doppelbindungssystem des Retinals wird durch eine Proteintasche stabilisiert, dabei sind vor allem die Tryptophanreste (W86, W182 und W189) beteiligt.<sup>[10-11]</sup> Dies führt zu einer bathochromen Verschiebung der Absorption zu 570 nm. Freies Retinal hat hingegen eine Absorptionsbande bei 380 nm. Desweiteren sind um die Retinalbindungsstelle mehrere Wassermoleküle (401, 402 und 406) gefunden worden, die stabilisierende Wasserstoffbrückenbindungen zwischen den positiven Ladungen am Stickstoff der *Schiff*'schen Base und der endständigen Aminogruppe des Arg82 und den negativen Carboxylatgruppen von Asp-212 und Asp-85 ausbilden.<sup>[12-13]</sup> Bereits 1975 wurde die Struktur des BRs mit Elektronenbeugung aufgelöst.<sup>[14]</sup> Im Laufe der Jahre wurde die Struktur in höherer Auflösung (1,8-2,0 Å),<sup>[10]</sup> weiterhin mit Elektronenkristallographie<sup>[15-17]</sup> und Röntgenstrukturanalyse untersucht, dadurch konnte der Protonenweg aufgeklärt werden.<sup>[18-19]</sup> Zur Bestimmung der Lage und Orientierung des Retinals wurden Neutronenstreuexperimente mit selektiv deuterierten Retinalen durchgeführt. Der Winkel der Polyenkette bezüglich der Membrannormalen wurde auf  $70,03^\circ \pm 0,4$  zu der extrazellulären Seite abgeschätzt.



**Abb. 2:** Schematische Darstellung eines BR-Monomers erstellt aus PDB-Eintrag 13CW. Die 7  $\alpha$ -Helices (A bis G) sind violett dargestellt, die interhelikalen Loops cyan, das Retinal gelb. (a) Seitenansicht (b) Ansicht von der extrazellulären Seite.

### 1.3 Purpurmembran

Bakteriorhodopsin bildet Trimere aus, die in der Purpurmembran (PM) als ein hexagonaler zweidimensionaler Kristall angeordnet sind. Die zweidimensionalen Proteinkristalle sind gegenüber chemischen und physikalischen Einflüssen wie Temperatur<sup>[20]</sup>, Solvens<sup>[21]</sup>, pH-Wert, hoher Salzkonzentration und Trocknungsgrad enorm stabil. Für die regelmäßige Anordnung der PM sind spezielle Aminosäureseitenketten des BRs gegenüber einzelner Glycerinethergruppen der Lipiddoppelschicht verantwortlich. Die Purpurmembran besteht aus BR und ungefähr 10 Lipidmolekülen pro BR.<sup>[22]</sup> In Abb. 3 ist schematisch die Einbettung in die natürliche Lipidumgebung gezeigt. Die Trimere (purpur) ordnen sich in einem hexagonalen 2D-Kristall an. Der Gitterabstand von Trimermitte zu nächster Trimermitte beträgt 6,2 nm. Ein einzelner PM-Patch ist etwa 5 nm dick und hat eine Breite von wenigen  $\mu\text{m}$ .

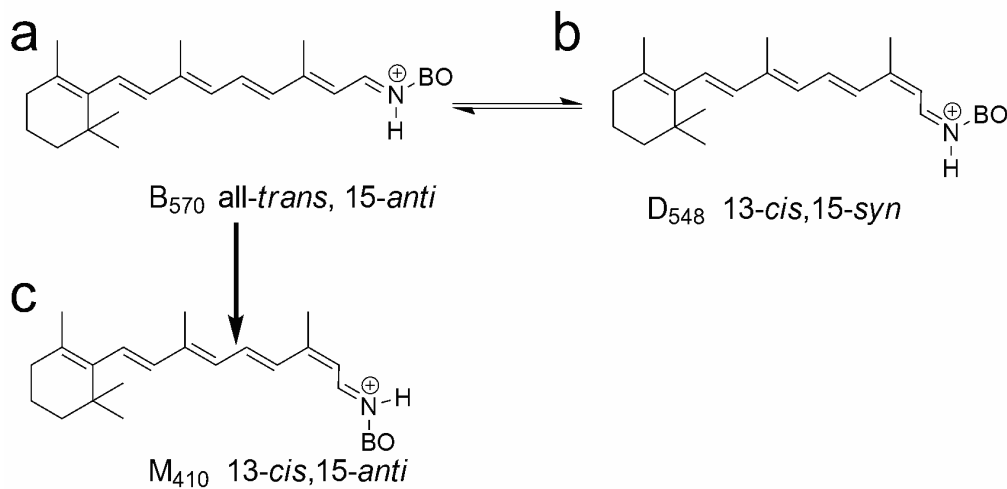


**Abb. 3:** (a) Hexagonale Anordnung der BR-Trimere. (b) Einbettung der BR-Trimere in die Lipiddoppelschicht.<sup>[23-24]</sup> Das Gitter hat einen Abstand der Trimere von 6,2 nm (Darstellung der BR-Trimere nach PDB-Eintrag 1BRR, Darstellung der Monomere nach PDB 13CW)

### 1.4 Der Protonentransport durch das Bakteriorhodopsin

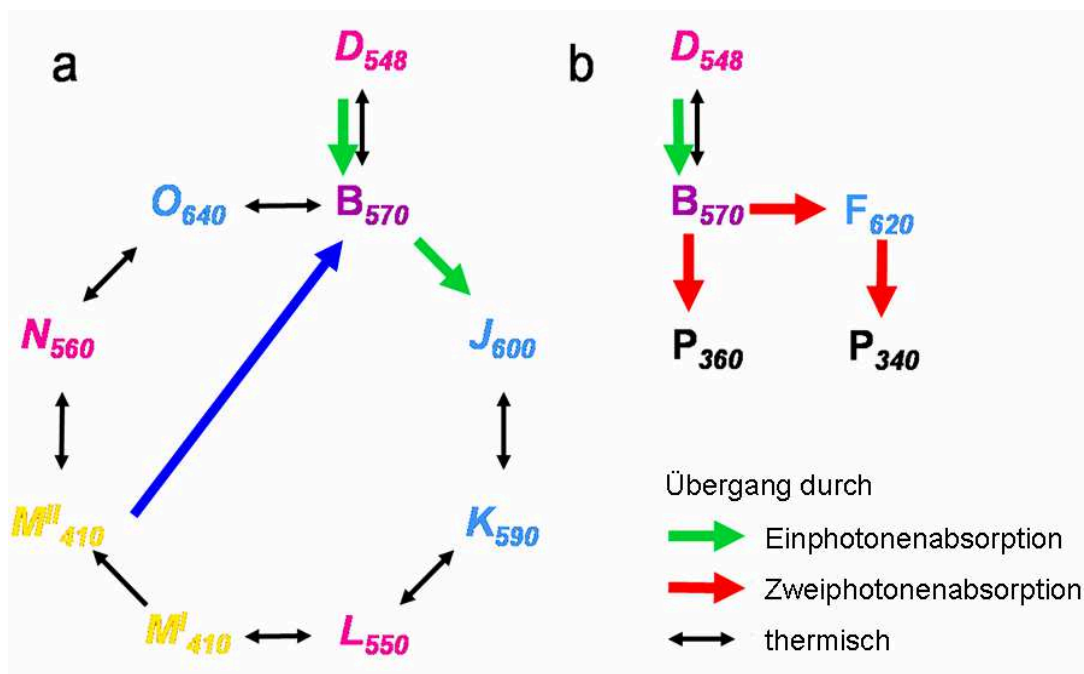
Durch die Absorption eines Photons durchläuft das BR einen Photozyklus. Dieser wird mit dem IST-Modell beschrieben. Dabei steht I für die Isomerisierung des Retinals, S (*switch*) für die Änderung der Zugänglichkeit und T für den Transport von Ionen.<sup>[25]</sup> Im Detail wird nach Lichtabsorption eine Photoisomerisierung des an Lysin-216 gebundenen Retinals von *all-trans* nach *13-cis* induziert (siehe Abb. 4). Dies löst die Abgabe des Protons am Stickstoff der *Schiff*'schen Base an Aspartat-85 aus und führt zu einer Übertragung eines an Asparaginsäure-96 gebundenen Protons auf den Stickstoff der *Schiff*'schen Base. Anschließend kommt es zu einer Rückisomerisierung des Retinals in die *all-trans*

Konfiguration. Die Wiederherstellung des Ausgangszustandes erfolgt durch Reprotonierung des Aspartat-96 von der zytoplasmatischen Seite und die Protonenabgabe der Asparaginsäure 85 an die extrazelluläre Seite. BR kann dadurch wieder photochemisch angeregt werden.<sup>[26]</sup>



**Abb. 4:** Darstellung der photoinduzierten Isomerisierung des Retinals. (a) all-*trans*-Retinal, (b) 13-*cis*-Retinal.

In Abb. 5 ist der nach Varo und Lanyi beschriebene Photozyklus gezeigt.<sup>[27]</sup> Die verschiedenen Photointermediate werden mit Großbuchstaben bezeichnet, deren Indizes die entsprechenden Wellenlängen der Absorptionsmaxima angeben.

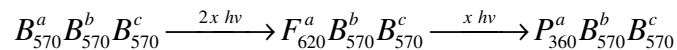


**Abb. 5:** Der Photozyklus von Bakteriorhodopsin.<sup>[25,28]</sup>

Die Konfiguration des Retinals ist bei fast allen Zuständen 13-*cis*, bei den Zuständen  $B_{570}$  und  $O_{640}$  ist sie hingegen all-*trans*.<sup>[14]</sup> Es existiert ein irreversibler Übergang  $M'_{410} \rightarrow M''_{410}$

innerhalb des Photozyklus. Im Dunkeln relaxiert BR zum dunkeladaptierten BR. Es ist eine Mischung von 6:4 D<sub>548</sub> (13-*cis*-Retinal) und B<sub>570</sub> (all-*trans*-Retinal). Durch Belichtung mit Tageslicht wird BR fast quantitativ in den B<sub>570</sub>-Zustand transferiert.

Für die Verwendung von BR als optischer Datenspeicher sind vor allem die Zustände außerhalb des Photozyklus von Interesse. Mittels Pulslaser der Wellenlänge  $\lambda = 532$  nm wird BR durch Zweiphotonenabsorption vom B<sub>570</sub>-Zustand in den F<sub>620</sub>-Zustand überführt. Dieses hat eine Farbänderung von purpur nach blau zur Folge, die bei weiterer Bestrahlung in den gelblichen P<sub>360</sub>-Zustand wechselt. Das so erhaltene photochemisch erzeugte Material wird laserinduzierte blaue Membran (LIBM) genannt.<sup>[29]</sup> Nach dem Modell von *Fischer* führt die Absorption eines Photons zunächst zu einem angeregten Zustand B/B<sub>schnell</sub>, der in den J<sub>625</sub>-Zustand übergeht und somit dem normalen Photozyklus folgt. Ein zweites Photon kann von einem der frühen Zuständen B/B<sub>schnell</sub>, J<sub>625</sub> und K<sub>590</sub> absorbiert werden, dabei entsteht der F<sub>620</sub>-Zustand. Dieser kann durch Photonenabsorption in den P<sub>360</sub>-Zustand überführt werden. Diesem Modell entsprechend ist der P<sub>360</sub>-Zustand das Produkt zweier aufeinander folgender photochemischer Prozesse (siehe Abb. 6).



**Abb. 6:** Bildung des P<sub>360</sub>-Zustands nach dem Modell von *Fischer*.

Die Indices *a*, *b*, *c* stehen hierbei für die jeweiligen BR-Monomere im Trimer. Durch die irreversible Erzeugung des P<sub>360</sub>-Zustandes eines BR-Moleküls im Trimer entsteht optische Anisotropie, auf die im Kap. 4.4.3 eingegangen wird. Im Allgemeinen werden die durch einen Zweiphotonenprozess bzw. eine Zweiphotonenabsorption (TPA - *two photons absorption*) geblichene Membran auch als TPP-Produkt bezeichnet (TPP - *two photon photobleaching*) unabhängig davon, ob es sich um den P<sub>360</sub> oder P<sub>340</sub> Zustand handelt.

## 1.5 Gentechnisch produzierte Mutanten des Bakteriorhodopsins

Durch Punktmutation einzelner Aminosäuren können spezielle Eigenschaften erzielt werden, die gerade im Hinblick auf die technische Anwendung interessant sind. Die am häufigsten verwendete Mutante neben dem BR-WT ist BR-D96N. Durch Austausch eines Aspartatrestes (D) mit einem Asparaginrest (N) kann die Reprotonierung nur direkt von der zytoplasmatischen Seite erfolgen und eine Erhöhung der Population des M-Intermediates wird erreicht.

Die Punktmutation von BR-WT am Aspartat 85 führt zu den Mutanten D85T oder D85S, dadurch wird die Protonenpumpe BR in eine lichtgetriebene Anionenpumpe konvertiert. Durch den Austausch des Aspartats (Asp, D) zu Threonin (Thr, T) bei der D85T-Mutante ergeben sich strukturelle Veränderungen und eine Rotverschiebung des BR-Absorptionsmaximums von  $\lambda_{\max} = 567 \text{ nm}$  nach ca. 615 nm tritt auf.<sup>[30-33]</sup>

Darüber hinaus kann in der Nähe der *Schiff*'schen Base ein Anion gebunden werden und es kommt dann zu einer Blauverschiebung des Absorptionsmaximums in Abhängigkeit des Anions. Dabei bewirkt ein Chloridion die stärkste Verschiebung (Chloridion > Azidion > Bromidion > Nitration > Perchloration > Sulfation).<sup>[34]</sup>

## 1.6 Verwendungspotential von BR als Sicherheitsmerkmal

In der Vergangenheit wurden bereits die Vorzüge von PM für verschiedene Anwendungen postuliert und exemplarisch gezeigt. BR in der Verwendung als neues Sicherheitsmerkmal für Dokumente, Ausweise oder auch Eintrittskarten bietet mehrere Stufen der Kontrolle. So ist BR ein:

- Photochromes Material:
  - optisch leicht zu testen, nicht fotokopierbar
  - verdruckbar (Inkjetdruck, Siebdruck) und vergießbar
- Optischer Datenspeicher:
  - bei hoher OD als Guss, Druck oder Beschichtung auf Papier, Folie, etc. als beschreibbarer Speicher nutzbar
  - durch Zweiphotonenprozess sehr präzise Adressierung möglich
  - Mehr Informationsgehalt als bei klassischen optischen Datenträgern durch Nutzen der Polarisierung möglich
- Rückverfolgbares Material:
  - Sequenzmodifizierung zur Identifikation des Herstellers / Verwenders in Kooperation mit dem MPI München

In dieser Arbeit liegt der Schwerpunkt auf der Verwendung von BR als optischer Datenspeicher. Die molekulare Aufklärung des Prinzips der Datenspeicherung sowie die makroskopische Beschreibung der Polarisationsänderung beim Beschreiben von BR-Filmen

werden gezeigt. Darüber hinaus wird das Datenauslesen mit einem entwickelten optischen Speicherlesegerät vorgestellt. Die bisherigen Kenntnisse in den einzelnen Forschungsschwerpunkten werden zum Beginn der jeweiligen Hauptkapitel aufgegriffen. Im nächsten Kapitel folgt zum besseren Verständnis der Polarisationsdatenspeicherung ein Exkurs in die Optik über die Eigenschaften von Licht, insbesondere der mathematischen Beschreibung von polarisiertem Licht.

## 2 Optische Beschreibung der Polarisation mittels *Stokes-Formalismus*

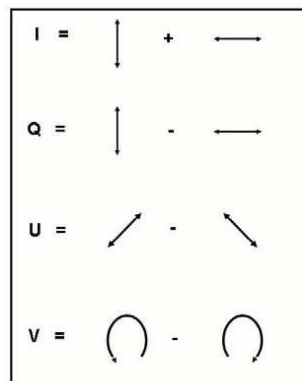
Da zum Verständnis der Polarisations-eigenschaften von Licht häufig *Stokes*-Vektoren verwendet werden, werden diese hier kurz erläutert. Mit den *Stokes*-Vektoren können im Gegensatz zu den *Jones*-Matrizen auch nicht vollständig polarisierte Wellen beschrieben werden.

### 2.1 Herleitung der *Stokes*-Parameter

Zur Bestimmung der Polarisation von Licht wird mit einem Polarimeter die Intensität des Lichtes detektiert und in Form der vier *Stokes*-Parameter ( $S_0, S_1, S_2, S_3$ ) bzw. als I, Q, U, und V angegeben. In Gleichung (1) ist der *Stokes*-Vektor als einspaltige Matrix dargestellt.

$$\vec{S} = \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} E_{0,x}^2 + E_{0,y}^2 \\ E_{0,x}^2 - E_{0,y}^2 \\ 2E_{0,x}E_{0,y} \cos \delta \\ 2E_{0,x}E_{0,y} \sin \delta \end{pmatrix} \quad (1)$$

Dabei beschreibt I die gesamte Intensität des Lichtes, Q den Anteil des linear polarisierten Lichtes in horizontaler ( $0^\circ$ ) bzw. vertikaler Richtung ( $+90^\circ$  bzw.  $-90^\circ$ ), U ebenfalls den Anteil des linear polarisierten Lichtes, jedoch in  $+45^\circ$  bzw.  $-45^\circ$ -Richtung und V den Anteil des rechts- bzw. linkszirkular polarisierten Lichtes. Abb. 7 zeigt anschaulich die Erfassung der verschiedenen Polarisierungen als vektorielle Stokesgröße.



**Abb. 7:** Graphische Darstellung der *Stokes*-Parameter als Differenz von verschiedenen polarisierten Lichtarten (vertikal, horizontal,  $+45^\circ$ ,  $-45^\circ$  und rechts- und linkszirkular).<sup>[35]</sup>



Im Allgemeinen wird der *Stokes*-Vektor aus (1) normiert:

$$\vec{S}_N = \frac{1}{S_0} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} \quad (2)$$

Im Folgenden wird ausschließlich der normierte *Stokes*-Vektor benutzt, auf den Zusatz „normiert“ bzw. den Index „N“ wird verzichtet. Der Polarisationsgrad  $\Pi$ , DOP (*degree of polarisation*), des Lichtes lässt sich mit den *Stokes*-Parameter über (3) berechnen:

$$\Pi = \frac{1}{S_0} \sqrt{S_1^2 + S_2^2 + S_3^2} \quad (3)$$

Ist  $\Pi = 1$  bedeutet dies, dass das Licht vollständig polarisiert ist. Liegt nur eine partielle Polarisation vor, ist  $\Pi < 1$ . Ein teilpolarisierter Lichtstrahl kann als Überlagerung eines polarisierten und eines unpolarisierten Lichtstrahls aufgefasst werden:

$$\begin{pmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} \Pi I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} + \begin{pmatrix} (1-\Pi)I \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (4)$$

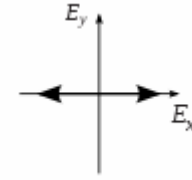
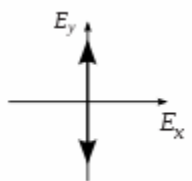
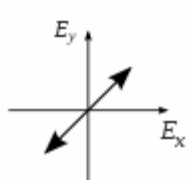
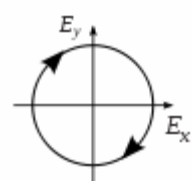
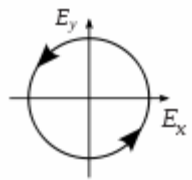
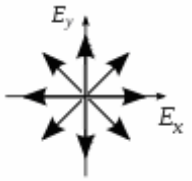
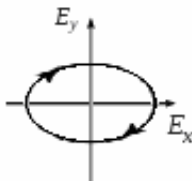
Die Phasendifferenz wird über (5) aus den *Stokes*-Parametern berechnet:

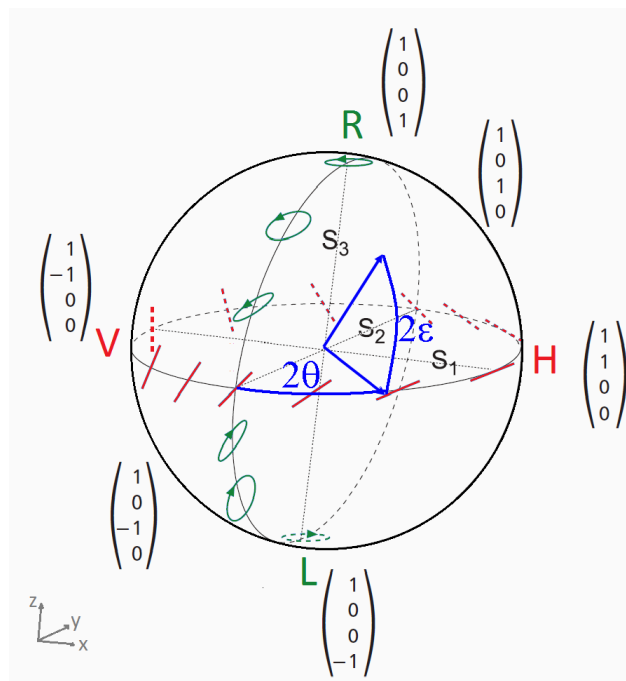
$$\delta = \arctan\left(\frac{S_3}{S_2}\right) \quad (5)$$

Zur Darstellung der *Stokes*-Vektoren wird die *Poincaré*-Kugel genutzt (siehe Abb. 8). Der Radius der Kugel ist durch den Parameter  $S_0$  bestimmt, durch die Normierung der *Stokes*-Vektoren wird immer eine Kugel mit dem Radius 1 erhalten. Die 2.-4. Zeile des *Stokes*-Vektors, mit den *Stokes*-Parametern  $S_1$ ,  $S_2$  und  $S_3$  stellen somit einen Punkt auf der Kugeloberfläche dar. Ist das Licht rechtselliptisch polarisiert ( $S_3 > 0$ ), wird der Punkt auf der oberen Halbkugel dargestellt. Rechtszirkular polarisiertes Licht ( $S_3 = 1$ ) wird als „Nordpol“ der Kugel angegeben. Linear polarisiertes Licht ( $S_3 = 0$ ) wird durch Punkte in der Äquatorebene dargestellt. Die untere Halbkugel stellt entsprechend linkselliptisch bzw. linkszirkular polarisiertes Licht dar ( $S_3 < 0$ ).

In Tab. 1 sind verschiedene *Stokes*-Vektoren  $\vec{S}_i$  dargestellt. So steht z.B.  $\vec{S}_h$  für vollständig horizontales polarisiertes Licht, da  $S_1 = 1$  und gleichzeitig  $S_2, S_3 = 0$ . Es ist vollständig polarisiert, da  $\Pi = 1$  beträgt.<sup>[36-37]</sup>

**Tab. 1:** Übersicht über *Stokes*-Parameter und Beispiele für Polarisationen von Licht.

linear, horizontal	$\vec{S}_h = \begin{pmatrix} 1 \\ 1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$	
linear, vertikal	$\vec{S}_v = \begin{pmatrix} 1 \\ -1 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$	
linear, +45°	$\vec{S}_{+45^\circ} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 1 \\ 0 \end{pmatrix}$	
rechts-zirkular	$\vec{S}_{rechts} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 1 \end{pmatrix}$	
links-zirkular	$\vec{S}_{links} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ -1 \end{pmatrix}$	
unpolarisiert	$\vec{S}_{unpolarisiert} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ 0 \\ 0 \end{pmatrix}$	
elliptisch	$\vec{S}_e = \begin{pmatrix} 1 \\ 0,9 \\ 0 \\ 0,8 \end{pmatrix}$	



**Abb. 8:** Darstellung der Polarisation auf der *Poincaré*-Kugeloberfläche. Beispielphaft sind einige lineare Polarisationsrichtungen in rot dargestellt, elliptische und zirkulare Polarisationen in grün. Vollständig unpolarisiertes Licht entspricht einem Punkt in der Mitte der Kugel.

Eine weitere Methode die Polarisation auf der *Poincaré*-Kugeloberfläche zu beschreiben, ist die Angabe des Elliptizitätswinkels  $\varepsilon$  (als Breitengrad) und des Azimutwinkels  $\theta$  (als Längengrad). Diese geometrische Lage ist in Abb. 8 blau eingezeichnet. Eine Übersicht der verschiedenen Bezugssysteme zur Beschreibung von Polarisationen ist in Tab. 2 dargestellt.

**Tab. 2:** Stokes-Parameter in anderen Bezugssystemen.

Bezugsgröße	$S_0$	$S_1$	$S_2$	$S_3$
Lichtintensität	$I_x + I_y$	$I_x - I_y$	$I_{+45^\circ} + I_{-45^\circ}$	$I_R - I_L$
$\varepsilon$ - $\theta$ -System	1	$\cos 2\varepsilon \cdot \cos 2\theta$	$\cos 2\varepsilon \cdot \sin 2\theta$	$\sin 2\varepsilon$
$\psi$ - $\Delta$ -System	1	$-\cos 2\psi$	$\sin 2\psi \cdot \cos \Delta$	$-\sin 2\psi \cdot \sin \Delta$

## 2.2 Matrizendarstellung von idealen optischen Bauelementen

Optisch transparente Bauelemente, die den Polarisationszustand des Lichtes ändern, werden Polarisatoren genannt. Es wird zwischen folgenden Typen unterschieden:

- Linearpolarisator: Im Idealfall werden beim Linearpolarisator (Polfilter) alle Schwingungen des  $\vec{E}$ -Vektors  $\vec{E} = \begin{pmatrix} E_{0,x} e^{i\delta_x} \\ E_{0,y} e^{i\delta_y} \end{pmatrix}$  in einer gegebenen Richtung unterdrückt

und in der dazu orthogonalen Richtung komplett durchgelassen. Je nach Winkel des Lichtes zur Transmissionsachse des Polarisators wird Licht absorbiert. Folglich ändert sich bei bereits polarisiertem Licht die Intensität des so erzeugten linear polarisierten Lichts. Dieses ist als das *Malus'sche* Gesetz bekannt:

$$I(\theta) = I_0 \cos^2 \theta \quad (6)$$

- Phasenverzögerer: Die Phasenverzögerung beruht auf Doppelbrechung. Dabei kommt es zur einer Phasendifferenz für verschiedene Polarisierungen  $\vec{E}_x$  und  $\vec{E}_y$  des Lichts durch unterschiedliche Ausbreitungsgeschwindigkeiten bzw. unterschiedliche Brechungsindizes in der x- und y-Ebene. Beträgt die Phasendifferenz  $\delta = 90$  bzw.  $\delta = \pi/2$  so handelt es sich um eine  $\lambda/4$ -Platte. Bei einer  $\lambda/2$ -Platte ist die Phasendifferenz  $\delta = 180$  bzw.  $\delta = \pi$ .
- Isotroper Absorber: Dabei wird nur die Intensität des Messsignals abgeschwächt. Es kommt zu keiner Veränderung der Polarisationsrichtung. Als Beispiel ist ein Graufilter zu nennen.
- Depolarisator: Dieser Grenzfall beschreibt ein Objekt, das aus polarisiertem Licht vollständig unpolarisiertes Licht erzeugt. Typisches Bauelement ist eine Streuplatte.

Einen Überblick über die *Müller*-Matrizen für typische optische Bauelemente unter verschiedenen Ausrichtungen ist in der Tab. 3 zu finden. Dabei sind diese als idealisierte Größen dargestellt. Für die Beschreibung komplexer Systeme ist eine allgemeine Darstellung notwendig.

**Tab. 3:** Übersicht von *Müller*-Matrizen für Polarisatoren und Verzögerungsplatten.<sup>[38]</sup>

Linearpolarisator			
Horizontale Transmission	Vertikale Transmission	+45° Transmission	-45° Transmission
$\frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 1 & 0 & 0 \\ 1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & -1 & 0 & 0 \\ -1 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ -1 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$
Verzögerungsplatte			
$\lambda/4$ (schnelle Achse, vertikal)	$\lambda/4$ (schnelle Achse, horizontal)	$\lambda/2$ (schnelle Achse, vertikal)	
$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \end{pmatrix}$	
Abschwächungsfilter (25% Transmission)	Isotroper Absorber		
$\frac{1}{4} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} p & 0 & 0 & 0 \\ 0 & p & 0 & 0 \\ 0 & 0 & p & 0 \\ 0 & 0 & 0 & p \end{pmatrix}$ mit $p = \sqrt{\frac{I}{I_0}}$		
Depolarisator	Depolarisator	<u>Grenzfall 1:</u>	<u>Grenzfall 2:</u>
$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix}$	$\begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & a & 0 & 0 \\ 0 & 0 & b & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c \end{pmatrix}$	$a = b = c = 1$ Einheitsmatrix, unveränderte Polarisation	$a = b = c = 0$ vollständige Depolarisation

Mit Hilfe von den beschriebenen *Müller*-Matrizen kann der *Stokes*-Vektor in verschiedene Polarisationszustände transformiert werden. Die *Müller*-Matrix, eine 4x4-Matrix, charakterisiert das optische Element mit dem polarisiertes Licht (die Lichtwelle) wechselwirkt und beschreibt die Änderung der Intensität und des Polarisationszustandes bei Reflexion an einem Spiegel, bei Brechung oder Transmission durch ein Material. Dazu wird der *Stokes*-Vektor  $\vec{S}_{in}$ , des einfallenden Lichts, mit der entsprechenden Matrix  $M_i$  multipliziert und ein

$\vec{S}_{aus}$ -Vektor erhalten. Wird ein aus mehreren Komponenten bestehendes System beschrieben, erfolgt die schrittweise Multiplikation des *Stokes*-Vektors mit den entsprechenden *Müller*-Matrizen des jeweiligen Bauelements.

$$\vec{S}_{aus} = M_3 M_2 M_1 \vec{S}_{ein} \quad (7)$$

Für eine Beschreibung der Polarisationsdatenspeicherung in BR-Schichten muss für den BR-Film eine *Müller*-Matix aufgestellt werden. Dies ist für einen unbeschriebenen Film noch einfach wird aber bei der Polarisationsdatenspeicherung kompliziert. Das Messverfahren und die dazu entwickelte Modellumschreibung wird im Kap. 3.4.3 und Kap. 4.4.5 vorgestellt.

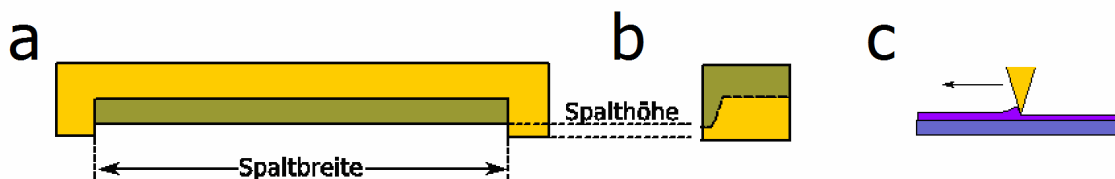
## 3 Methoden

### 3.1 Beschichtungsverfahren

Zur Herstellung von optischen Datenträgern auf Basis von BR werden BR-Gelatinefilme im Gießverfahren angefertigt und diese bei Bedarf im PVD-Verfahren mit Metallen bedampft.

#### 3.1.1 BR aus Gießverfahren Rakeln

Die Herstellung von homogenen BR-Gelatinefilmen kann durch Auftragen einer viskosen Suspension auf eine Oberfläche geschehen. Die Schichtdicke wird durch das Abziehen mit einer Rakel, die eine definierte Spalthöhe besitzt, eingestellt. Die optische Dichte des Films ist somit lediglich von der Konzentration der Suspension sowie von der Spalthöhe der Rakel abhängig. Für eine hohe Oberflächengüte ist es besonders wichtig, dass die Rakel mit gleichmäßiger Geschwindigkeit über das Substrat geführt wird. Dies kann durch einen Filmapplikator (Fa. *Gardner*) gewährleistet werden. Als Rakel werden bis zu 15 cm lange und 2 cm breite Metallprofile mit einer Spalthöhe von 0,05-0,4 mm verwendet. Die Abb. 9 zeigt die Form einer Rakel und deren Anwendung.



**Abb. 9:** Skizze einer Rakel (a) Frontansicht, (b) Querschnitt, (c) Schematische Darstellung des Rakelns, überflüssige Suspension wird vor der Rakel weggedrückt, dahinter hat die Suspension eine konstante Höhe.<sup>[39]</sup>

Rakeln wird in industriellen Prozessen meist invers zu der hier beschriebenen Methode angewendet, d.h. mit stehender Rakel und kontinuierlich bewegtem Substrat. Als Beispiel sind die Papierindustrie und die Textilbeschichtung zu nennen.<sup>[36]</sup> Im Gießverfahren wurden für diese Arbeit hauptsächlich BR-Gelatinefilme auf Glas hergestellt.

#### 3.1.2 PVD - Physical Vapour Deposition

PVD ermöglicht das Beschichten von Substraten, wie z.B. einen BR-Film mit Metallen und Legierungen. Das Aufdampfmaterial, das Target, besteht zum Beispiel aus Chrom, Silber oder Gold. In einer evakuierten Kammer wird beim thermischen Verdampfen das Target aus einem Schiffchen, das durch Stromdurchfluss erhitzt wird, verdampft. Trifft der Materialdampf auf

das kühlere Substrat, kondensiert er als dünne Schicht. Das Schiffchen besteht oft aus Molybdän oder Wolfram. Bei der Abscheidung von Legierungen werden meist Einzelkomponenten aus separaten Quellen mit unterschiedlichen Temperaturen verdampft. Die Schichtdickenmessung erfolgt über einen Schwingquarz.

## 3.2 Laser

In den nachfolgenden Unterkapiteln werden die jeweils verwendeten Lasertypen und die verwendeten Lasersysteme kurz vorgestellt.

### 3.2.1 He-Ne-Laser

Der Helium-Neon-Laser (*1133P*, 20 mW, Fa. *Coherent*) ist ein elektrisch gepumpter Laser. Das aktive Medium besteht aus einem Gasgemisch aus ca. fünf Teilen Helium und einem Teil Neon bei einem Druck von 400 Pa. Zum Pumpen wird eine Glimmentladung in der Röhre genutzt. Das Helium wird durch Elektronenstöße auf ein bestimmtes Niveau angeregt. Die Energie wird sehr schnell auf ein neutrales Neonatom, das ein Energieniveau knapp unter dem des Heliumatoms besitzt, übertragen. Das ist das obere Laserniveau. Der wichtigste Laserübergang findet bei 632,8 nm statt.<sup>[40]</sup> Der He-Ne-Laser wird vor allem für die Messungen mit dem Polarimeter verwendet.

### 3.2.2 Infrarot-Laser

Der hier verwendete IR-Laser ist ein wassergekühlter CO<sub>2</sub>-Gaslaser (*Skylaser 9060*, Fa. *Pfeifer Technology + Innovation*). Die Wellenlänge eines CO<sub>2</sub>-Lasers liegt mit 10,6 µm weit außerhalb des optisch transparenten Bereichs von Gläsern und wird von vielen organischen und anorganischen Materialien (Kunststoffen, Holz, Metallen, usw.) absorbiert. Somit ist passgenaues Schneiden, Gravieren und Perforieren möglich. Im Rahmen der Doktorarbeit wird der CO<sub>2</sub>-Laser z.B. für das passgenaue Zuschneiden von Folien und Substraten für ID-Karten eingesetzt.

### 3.2.3 Nd:YAG-Festkörperlaser

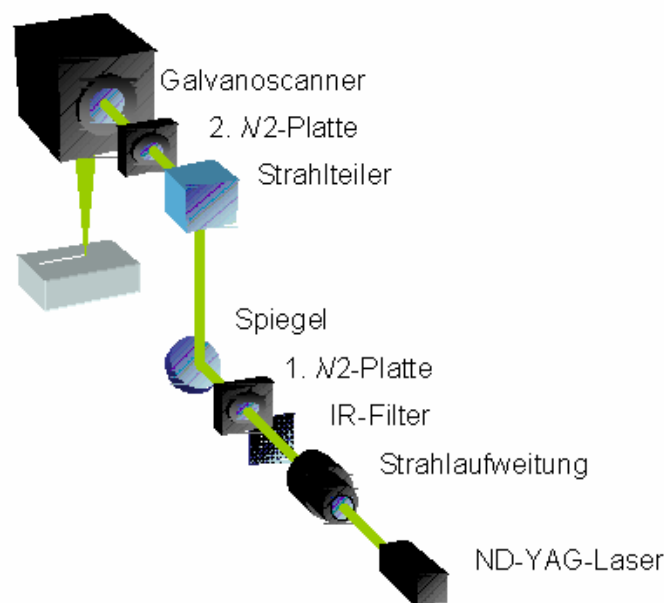
Für das Beschreiben von BR-Filmen kommen frequenzverdoppelte diodengepumpte Nd:YAG-Festkörperlaser zum Einsatz. Die Bezeichnung Nd:YAG steht für einen mit Neodym dotierten Yttrium-Aluminium-Granat-Kristall (Y<sub>3</sub>Al<sub>5</sub>O<sub>12</sub>). Dabei sind etwa 1% der Y<sup>+3</sup>-Gitterplätze mit Nd<sup>+3</sup> besetzt. Daraus resultiert ein Vier-Niveau Energieschema, mit dem intensivsten Laserübergang bei 1064 nm. Durch Frequenzvervielfachung mittels BBO-



Kristall ( $\beta$ -BaB<sub>2</sub>O<sub>4</sub>) wird eine intensive Emission bei 532 nm, 355 nm und 266 nm erhalten. Der IR-Anteil von 1064 nm kann mit einem IR-Filter geblockt werden.<sup>[41]</sup> Für die Bestrahlung von BR Suspension wird der *Infinity 40-100* (Fa. *Coherent*) verwendet. BR beschichtete Substrate sind sowohl mit dem *Infinity* bestrahlt als auch ortsauflöst mit einem Galvano-Scannersystem (*SCANgine*® 14, Fa. *Scanlab*) zusammen mit einem Nd:YAG Puls-Laser (*Vector 532-1000-20*, Fa. *Coherent* bzw. *Explorer XP 532*, Fa. *Spectra-Physics*) verwendet worden. Für eine höhere Ortsauflösung ist das *QuikLaze 50ST2 / TriLite-System* (Fa. *NewWave Research*) zum Einsatz gekommen.

### 3.2.3.1 Galvanoscannersystems für Vector 532 und Explorer XP 532

Eine schematische Darstellung des Aufbaus zeigt Abb. 10. Der Strahl wird aufgeweitet und mit einem IR-Filter wird der Strahlungsanteil von 1064 nm vollständig absorbiert. Durch die Kombination einer drehbaren  $\lambda/2$ -Platte und eines polarisierenden Strahlteilerwürfels kann die Laserleistung durch die Winkelstellung der  $\lambda/2$ -Platte reguliert werden. Danach gelangt der Strahl durch eine zweite  $\lambda/2$ -Platte, um die Polarisationssebene des Lichts variieren zu können. Anschließend erreicht der Strahl über ein Spiegelsystem den Galvanoscanner (*SCANgine*® 14, Fa. *Scanlab*) und wird von diesem auf das Substrat fokussiert. Die genaue Fokuseinstellung wird je nach Substrathöhe am Verstelltisch eingestellt. Mit Hilfe der Software (*SAM2D*, Version 2.7.0, Fa. *SCAPS GmbH*) werden der Galvanoscanner und der Laser angesteuert.



**Abb. 10:** Optischer Aufbau des Lasersystems zum Beschreiben von BR-Filmen.

Strukturen können auf Grund der niedrigen Repetiertrate mit dem *Vector*-Laser mit Geschwindigkeiten zwischen 20-300 mm/s geschrieben werden. Durch die höhere Ausgangsleistung und höherer Repetiersrate des *Explorers* sind deutlich höhere Schreibgeschwindigkeiten bis 3000 mm/s möglich.

### 3.2.3.2 *QuikLaze 50ST2 / TriLite-System*

Das Lasersystem (*QuikLaze 50ST2 / TriLite*, Fa. *NewWave Research*) besteht aus einem Nd:YAG-Laser, bei dem durch Frequenzverdopplung und Frequenzverdreifung zwischen den Wellenlängen (1064 nm, 532 nm, 355 nm) gewählt werden kann. Der Laserkopf ist auf einem Mikroskop (*PS-888L, Seiwa*) montiert, somit kann zum einen die Probe während des Laserprozesses beobachtet werden. Zum anderen ermöglicht der Aufbau eine starke Fokussierung des Laserstrahls durch ein Objektiv (wahlweise 20- bzw. 50-fache Vergrößerung). Zusammen mit der Software (*StageLaze System*, Fa. *NewWave Research*) und einem xy-gesteuerten Probenstisch können mikrometerkleine Strukturen präzise belichtet werden. Die Repetiersrate kann zwischen 1 bis 50 Hz variiert werden, die Pulslänge beträgt 3-4 ns. Eine variable rechteckige Lochblende im Strahlengang ermöglicht es, den belichten Bereich zu ändern, so dass Laserspots bis zur einer minimalen Strukturgröße von 1  $\mu\text{m}^2$  auf dem Substrat belichtet werden können. In Kap. 4.2.4 werden die mit nur 1  $\mu\text{m}$  breitem Strahl belichteten PM-Proben vorgestellt.

## 3.3 Mikroskopie

Mikroskopische Methoden und bildgebende Verfahren werden zur Qualitätskontrolle der bestrahlten BR-Filme und Substrate eingesetzt. Zum Einsatz kommt in der Regel die Durchlichtmikroskopie. Beim Durchlichtmikroskop wird das Licht mittels Kondensorlinse auf das zu untersuchende Objekt gelenkt. Das darauf folgende Objektiv erzeugt von einem kleinen Objekt ein vergrößertes Zwischenbild, das von einem Okular erneut vergrößert wird. Die Vergrößerung des Mikroskops  $V_M$  ist gleich dem Produkt aus dem Abbildungsmaßstab  $A$  des Objektivs und der Vergrößerung des Okulars  $V_O$ , die jeweils auf diesen angegeben sind.

$$V_M = A \cdot V_O \quad (8)$$

Mikroskopieaufnahmen sind mit einem Lichtmikroskop (*H600*, Fa. *Hund*) und einer Digitalkamera (*DXM 1200*, Fa. *Nikon*) gemacht worden. Für Proben, die eine Reflexionsschicht besitzen, kommt die Auflichtmikroskopie zum Einsatz. Zur Untersuchung von photoinduzierter Anisotropie in den BR-Filmen sind zwei Polarisationsfilter in den

Strahlengang des Mikroskops eingebaut worden. Damit ist eine schnelle Beurteilung der geschriebenen Polarisationsrichtungen in einem BR-Film möglich.

Zur Oberflächenanalyse und zur Bestimmung der Schichtdicke von BR-Filmen wird das konfokale Laser-Scanning Mikroskop (*LSM 5 PASCAL*, Fa. *Zeiss*) oder das Weißlichtinterferometer (*CyberScan CT100*, Fa. *CyberTechnologies*) verwendet. Mit beiden Methoden können Höhenänderungen, Materialstrukturierungen und Schichtdicken berührungslos erfasst werden.<sup>[42]</sup>

## 3.4 Spektroskopische Verfahren

### 3.4.1 UV-Vis-Spektroskopie

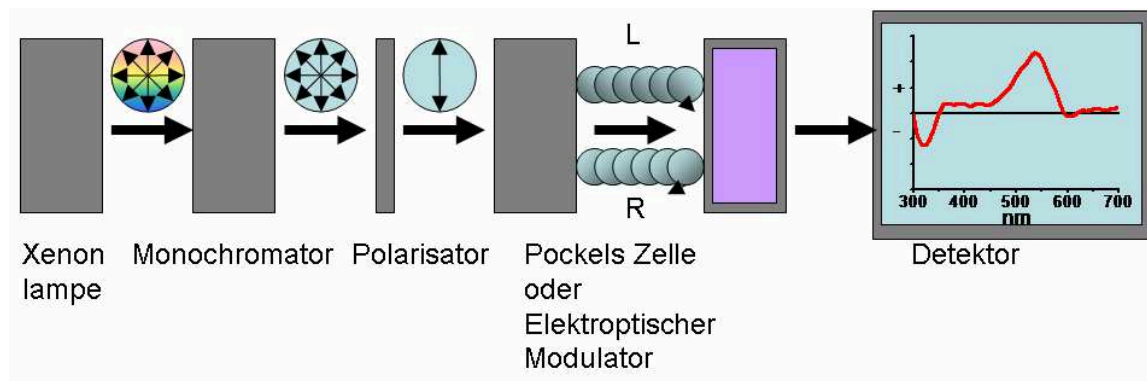
Änderungen der Absorptionseigenschaften von BR-Gelatinefilmen werden mittels Zweistrahlphotometer (*Lambda 35*, Fa. *Perkin Elmer*) bestimmt, das zur Untersuchung den Wellenlängenbereich von 180-900 nm abdeckt. Da ein UV-Vis-Spektrum stoffspezifisch ist, dient es z.B. zur Identifizierung von Photointermediaten des BRs. Die UV-Vis-Spektroskopie findet eine analytische Anwendung in niedrigen Konzentrationsbereichen, bei denen das *Lambert-Beer'sche* Gesetz gilt.

$$E = OD = -\log\left(\frac{I}{I_0}\right) = -\log(T) = \varepsilon \cdot c \cdot d \quad (9)$$

Wobei  $E$  die Extinktion,  $c$  die Konzentration,  $I_0$  die Anfangsintensität,  $I$  die durch Absorption abgeschwächte Intensität,  $\varepsilon$  der molare, dekadische Extinktionskoeffizient,  $d$  die Schichtdicke,  $T$  die Transmission und  $OD$  die optische Dichte ist.

### 3.4.2 CD-Spektroskopie

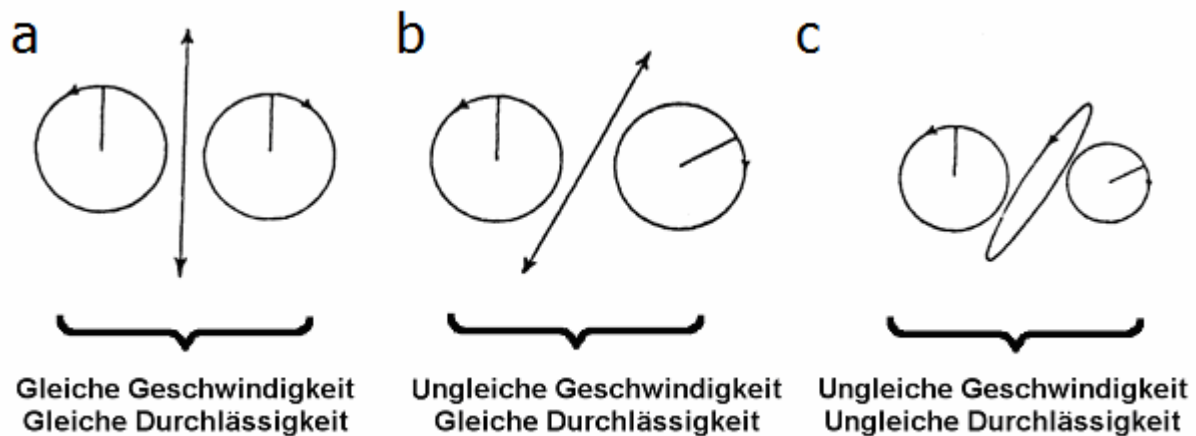
Die Charakterisierung eines optisch aktiven Materials erfolgt mit Hilfe der CD-Spektroskopie. Alle CD-Spektren werden mit einem *J-810* Spektrometer (Fa. *Jasco*) aufgenommen. In Abb. 11 ist der Aufbau eines CD-Spektrometers gezeigt. Durch Akkumulation (Mehrfachaufnahme) wird das Signal/Rausch-Verhältnis einer CD-Messung verbessert.



**Abb. 11:** Schematischer Aufbau eines CD-Spektrometers. Das unpolarisierte Licht wird zunächst monochromatisiert, dann linear polarisiert und durch einen elektrooptischen Modulator zirkular polarisiert. Die Differenz des so modulierten Lichtstrahls nach Durchlaufen des Mediums wird detektiert.

Zur Funktion des CD-Spektrometers wird das wellenlängenabhängige Verhalten eines linear polarisierten Lichtstrahls beim Durchlaufen des zu untersuchenden Materials betrachtet. Ein linear polarisierter Lichtstrahl, der durch ein nicht absorbierendes optisch aktives Material geleitet wird, erfährt eine Drehung der Polarisationssebene (Schwingungsebene des elektrischen Vektors  $\vec{E}$ ). Dieses Verhalten ist wellenlängenabhängig und wird als optische Rotationsdispersion ORD bezeichnet. Beim Zirkulardichroismus ist das optisch aktive Material absorbierend und es kommt nicht nur zur Drehung, sondern auch zu unterschiedlicher Absorption des rechts- und linkszirkularen Anteils des linear polarisierten Lichtstrahls. Infolgedessen entsteht elliptisch polarisiertes Licht.

Das linear polarisierte Licht, das sich in z-Richtung ausbreitet, kann vor dem Eintritt in ein optisch aktives Medium durch zwei entgegengesetzte zirkulare Wellen beschrieben werden (siehe Abb. 12). Die Vektoren des links- und rechtszirkularpolarisierten Lichtes  $\vec{E}_L$  und  $\vec{E}_R$  rotieren entgegengesetzt mit gleicher Phasengeschwindigkeit. Beim Durchlaufen des optisch aktiven Mediums sind die Phasengeschwindigkeiten verschieden groß und diese Differenz äußert sich als elliptische Verzerrung.<sup>[43]</sup>



**Abb. 12:** (a) Linear polarisiertes Licht als Superposition von zirkular polarisiertem Licht mit gleicher Phase und entgegengesetzter Rotation. (b) Durch unterschiedliche Brechungsindizes ändert sich die Geschwindigkeit einer Komponente und damit die Polarisationsrichtung. (c) Bei unterschiedlicher Absorption von links- und rechtszirkular polarisiertem Licht ergibt sich elliptisches Licht.<sup>[44]</sup>

Die unterschiedlichen Intensitäten  $I_R$ ,  $I_L$  des Messstrahls nach Durchlaufen eines optisch aktiven Mediums werden wie im *Lambert-Beer*'schen Gesetz als Extinktionskoeffizienten  $\epsilon_{R,L}$  eingesetzt. Näherungsweise gilt für Elliptizitäten  $\psi$ :

$$\psi = \ln 10 \cdot \frac{180^\circ}{4\pi} \cdot (\epsilon_L - \epsilon_R) \cdot c \cdot d \quad (10)$$

Ein CD-Spektrometer ist in der Lage diese sehr geringen Absorptionsdifferenzen ( $10^{-4}$  bis  $10^{-6}$ ) zwischen links- und rechtszirkular polarisiertem Licht trotz hoher Absorption von z.B. OD=1,0 zu detektieren. Die Angabe der Absorptionsunterschiede erfolgt in CD-Spektren in Form der molaren Elliptizität  $\Theta$  oder im Falle von Aminosäuren durch die mittlere molare Elliptizität pro Aminosäure des Proteins  $\Theta_{MRW}$  (*Mean Residue Weight*).

$$\Theta_{MRW} = \frac{\Theta \cdot 100 \cdot M}{N_{AS} \cdot c \cdot d} \approx 3300 \cdot \Delta\epsilon = \left[ \frac{\text{deg} \cdot \text{cm}^2}{\text{dmol}} \right] \quad (11)$$

Mit  $\Delta\epsilon$  = Differenz des molaren zirkulardichroitischen Extinktionskoeffizienten,  $\Theta_{MRW}$  Mittlere molare Elliptizität,  $\Theta$  = Elliptizität [mdeg],  $M$  = Molmasse [g/mol],  $c$  = Konzentration und  $N_{AS}$  = Anzahl der Aminosäuren des Proteins.

CD-Signale treten bei Molekülen mit einer Asymmetrie der Ladungsverschiebung auf. Dadurch ergibt sich eine unterschiedliche Absorption von linkszirkular bzw. rechtszirkular polarisiertem Licht. Die Asymmetrie kann durch den Chromophor selbst bedingt sein (intrinsisch) oder durch eine excitonische Kopplung (gegenseitige Beeinflussung der Übergangsdipole) von Chromophoren in molekularen Komplexen induziert werden. Chirale

Moleküle weisen eine intrinsische Asymmetrie auf. Auch durch sterische Änderungen des Moleküls oder durch Wechselwirkungen mit z.B. Aminosäure-Seitenketten kann Chiralität induziert werden.<sup>[45]</sup>

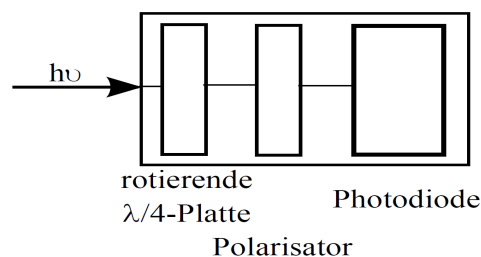
Excitonische Interaktionen von mehreren Chromophoren innerhalb eines Komplexes zeigen sich in Form von asymmetrischen CD-Spektren, deren CD-Banden entgegengesetzte Vorzeichen aufweisen und einen Nulldurchgang an der Stelle des Absorptionsmaximums des Chromophors haben.

Im UV-Bereich lassen sich die Sekundärstrukturen ( $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblatt und Zufallsknäuel) unterscheiden. Bei einem Peptid mit  $\alpha$ -Helix sieht man eine positive Bande bei 190 nm und zwei negative Banden bei 205 nm und bei 220 nm. Das Spektrum eines Proteins wird additiv aus der Summe seiner Sekundärstrukturen zusammengesetzt. Bei der Berechnung der Strukturmotivanteile  $f_i$  wird durch die Linearkombination von normierten CD-Spektren der reinen Sekundärstrukturelemente  $\alpha$ -Helix,  $\beta$ -Faltblätter (*sheet*), Schleifen (*turn*) und Zufallsknäuel (*random coil*) ein an das gemessene CD-Spektrum angepasstes CD-Spektrum berechnet.<sup>[46]</sup>

$$[\psi(\lambda)]_m = \sum f_{Helix} [\psi(\lambda)]_{Helix} + f_{sheet} [\psi(\lambda)]_{sheet} + f_{turn} [\psi(\lambda)]_{turn} + f_{random} [\psi(\lambda)]_{random} \quad (12)$$

### 3.4.3 Polarimeter

Die Bestimmung der Polarisationsänderung in BR-Filmen nach Bestrahlung erfolgt mit dem Polarimeter (*PAX5720VIS-T*, Fa. *Thorlabs*). Dieses beschreibt das Licht durch die *Stokes*-Vektoren (siehe auch Kap. 2.1). Im Handel gibt es zwei gängige Arten von Polarimetern: zum einen das Vier-Detektor-Polarimeter und zum anderen das rotierende  $\lambda/4$ -Platte-Polarimeter. Letzteres findet Einsatz im hier verwendeten Polarimeter. Hierbei besteht der Aufbau aus einer drehbaren  $\lambda/4$ -Platte, einem linearen Polarisator und einer Photodiode (siehe Abb. 13).



**Abb. 13:** Polarisationsdetektion im Polarimeter.

### 3.4.4 Beschreibung der Polarisationsdetektion mit einem Polarimeter

Die Polarisation des einfallenden Lichtes wird abhängig vom Winkel  $\beta$  einer  $\lambda/4$ -Platte verändert. Fällt zum Beispiel linear polarisiertes Licht auf eine  $\lambda/4$ -Platte, deren schnelle Achse parallel zum linear polarisierten Licht steht, findet keine Änderung der Polarisation statt. Wird die  $\lambda/4$ -Platte jedoch um  $45^\circ$  gedreht, wird das vormals linear polarisierte Licht rechtszirkular. Nach weiteren  $45^\circ$  steht die langsame Achse der  $\lambda/4$ -Platte parallel zum einfallenden Licht und die lineare Polarisation wird nicht beeinflusst. Eine Drehung um  $135^\circ$  ergibt eine linkszirkulare Polarisation. Nach einer  $180^\circ$ -Drehung wird wieder die Ausgangssituation erhalten.

Mittels des Polarisators erfolgt die Transformation von einer Polarisationsmodulation in eine Amplitudenmodulation, da, wie oben beschrieben, nur parallel zur Transmissionsachse polarisiertes Licht durchgelassen wird. Die Photodiode erzeugt daher einen Photostrom der proportional zur Lichtintensität und proportional zum Quadrat der Intensität des elektrischen Feldes ist. Der Photostrom besteht aus drei Anteilen, einem Gleichstromanteil, einem Anteil aus der doppelten Drehfrequenz der  $\lambda/4$ -Platte und einem Anteil aus der vierfachen Drehfrequenz der  $\lambda/4$ -Platte inklusive einer Phasenverzögerung. Werden diese drei Anteile aufsummiert, ergibt sich für die gemessene Intensität  $I'(\beta)$  des einfallenden Lichts auf der Photodiode in Abhängigkeit des Drehwinkels  $\beta$  der  $\lambda/4$ -Platte des Polarimeters:

$$I'(\beta) = \frac{1}{2} \left[ \left( I + \frac{Q}{2} \right) - V \sin(2\beta) + \frac{\sqrt{Q^2 + U^2}}{2} \cos \left( 4\beta - \arctan \frac{U}{Q} \right) \right] \quad (13)$$

Somit kann lineares, zirkulares oder elliptisch polarisiertes Licht detektiert werden.<sup>[47-49]</sup>

Durch Bestimmen der Verhältnisse des konstanten Anteils zu den  $2\beta$ - und  $4\beta$ -Anteilen wird der *Stokes*-Vektor ermittelt. Dieser besteht aus den Komponenten I, Q, U, V.

$$\vec{S}_N = \frac{1}{S_0} \begin{pmatrix} S_0 \\ S_1 \\ S_2 \\ S_3 \end{pmatrix} = \begin{pmatrix} I \\ Q \\ U \\ V \end{pmatrix} \quad (14)$$

Dieser *Stokes*-Vektor kann auf der *Poincaré*-Kugel dargestellt werden. Weitere Erläuterungen zur *Poincaré*-Kugel sowie den *Stokes*-Vektoren, die diese Kugel aufspannen, sind bereits im Kap. 2.2 vorgestellt worden.

### 3.4.5 Infrarotthermografie (IR Kamera)

Grundlage für die Thermografie ist die Erkenntnis, dass Körper bei RT im infraroten Bereich des elektromagnetischen Spektrums strahlen. Als ideales Modell wird ein schwarzer Strahler angesehen. Dies ist ein Körper, der alle auf ihn fallende Strahlung absorbiert, an ihm treten weder Reflexion noch Transmission auf. Ein schwarzer Strahler strahlt bei jeder Wellenlänge die maximal mögliche Energie ab. Beim idealen Strahler ist der Emissionskoeffizient  $\varepsilon=1$ . Die Wellenlänge bei der das ausgestrahlte Licht ein Maximum erreicht, ist durch das *Wien'sche Verschiebungsgesetz* gegeben.

$$\lambda_{\max} = \frac{2898 \mu\text{m} \cdot \text{K}}{T} \quad (15)$$

So ergibt sich bei 20°C ein Maximum der Wellenlänge bei 10,17  $\mu\text{m}$ . Dabei ist die Intensität  $I$  des Signals nach dem *Stefan-Boltzmann* Gesetz:

$$I = \varepsilon \cdot \sigma \cdot T^4 \quad (16)$$

Reale Proben werden als grauer Strahler bezeichnet und unterscheiden sich vom schwarzen Strahler in einem Emissionskoeffizient zwischen 0 und 1. Die berührungslose Messung von Temperaturen auf Objekten ist mit einer Infrarotkamera (*VarioCAM® HR*, Fa. *Infratec*) möglich. Diese arbeitet mit ungekühlten *focal plane* Mikrobolometerdetektoren aus Vanadiumoxid ( $\text{VO}_x$ ) oder amorphen Silizium. Diese Bolometer ändern ihren Widerstand bei Absorption von Wärmestrahlung. Die verwendete IR-Kamera deckt den Spektralbereich von 7,5 bis 14  $\mu\text{m}$  ab und eignet sich somit für Temperaturen zwischen -40°C und 1200 °C. Dabei ist die thermische Auflösung  $<0,03 \text{ K}$ .<sup>[49]</sup>

## 3.5 Massenspektrometrie

Um Bakteriorhodopsin unfragmentiert massenspektrometrisch zu untersuchen, wird das etwa 26 kDa schwere Molekül delipidisiert. Durch einen Verdau können Proteine in kleinere Fragmente unterteilt werden. Dazu kommt für BR der Bromcyanverdau zum Einsatz.

Über Kopplung mit einem chromatographischen Verfahren LC/MS können solch komplexe Proben aufgetrennt werden und in das Massenspektrometer injiziert werden. So können z.B. Proteinfragmente aufgrund ihrer unterschiedlichen Hydrophilität und Größe getrennt werden.

Als Ionisierungsmethode wird für Proteine wie BR die Elektrospray-Ionisation (ESI) oder die "*matrix-assisted laser desorption ionization*" (MALDI) verwendet. Dadurch entstehen gasförmige Ionen, die aufgrund ihres Masse zu Ladungsverhältnisses ( $m/z$ ) innerhalb des Massenspektrometers unterschiedlich beschleunigt und dadurch getrennt detektierbar sind.



Durch eine Ionenfalle sind MS-MS-Messungen möglich. Bei der Orbitrap handelt es sich um ein Ionenfallenmassenspektrometer mit einer zentralen spindelförmigen Elektrode. Aufgrund elektrostatischer Anziehungen bewegen sich die radial eingeschossenen Ionen auf Kreisbahnen (Orbits) um die Elektrode. Mittels Fouriertransformation wird die Frequenz der schwingenden Ionen in  $m/z$ -Verhältnisse umgewandelt. Die Messungen werden mit der *Orbitrap Velos Pro* (Fa. *Thermo Fischer Scientific*) und *QStar-Pulsar i* (Fa. *ABSciex*) durchgeführt.

### 3.6 Weitere Methoden

Die folgenden zwei vorgestellten Methoden wurden in enger Zusammenarbeit mit anderen Doktoranden der Philipps-Universität Marburg angewendet und werden hier nur kurz vorgestellt, weiterführende Informationen sind der Dissertation *Baumann* und den Arbeiten von *Chizik* zu entnehmen.

#### 3.6.1 Kleinwinkelstreuung (in Zusammenarbeit mit Ivan Chizik)

Mit Hilfe von SAXS (*small angle X-ray scattering*) mit einem Röntgengenerator vom Typ PW1830 (Fa. *Philips*) und einer *Kratky*-Kamera vom Typ KKK (Fa. *Anton-Paar*) wurde im Abstand zur Probe von 200 mm PM-Suspensionen und PM-Filme jeweils nach Bestrahlung gemessen. Die Röntgenkleinwinkelstreuung ermöglicht die Unterscheidung zwischen kristallinen (im Falle der PM hexagonalen) und unkristallinen Bereichen.

#### 3.6.2 AFM-Messungen (in Zusammenarbeit mit Peter Baumann)

Mit einem Nanoscope IV AFM (*atomic force microscopy*) mit Multimode-Controller (Fa. *Bruker*) wurden PM im Tapping-Modus an Luft analysiert. Die Einzelmolekül Kraftspektroskopie wird verwendet, um zwischen der zytoplasmatischen und extrazellulären Seite der PM zu differenzieren.

## 4 Ergebnisse und Diskussion

Im Ergebnisteil dieser Dissertation werden die durch die Zweiphotonenabsorption im BR bedingten strukturellen, supramolekularen und molekularen Veränderungen behandelt. Im nachfolgenden Kapitel werden die externen Einflüsse auf das Beschreiben von BR berücksichtigt. Schließlich wird der makroskopisch messbare Effekt der optischen Anisotropie vorgestellt, der zur Polarisationsdatenspeicherung verwendet werden kann. Die Charakterisierung dieser Anisotropie mündet in einem für die Polarisationsdatenspeicherung neu entwickelten Modell zur Datenspeicherung. In diesem Zusammenhang werden auch die Anforderung an das Substrat, die Fertigung von Datenträgern und der Ausleseprozess erläutert. Anschließend wird anhand der entwickelten Prototypen das maschinelle Auslesen von Polarisationsdaten vorgestellt.

### 4.1 Probenvorbereitung

#### 4.1.1 Verwendete Chemikalien und Materialien

Bakteriorhodopsin Wildtyp (BR<sub>WT</sub>) und die Mutanten (D96N und D85T-D96N) kommen in Form von gefriergetrockneter PM zum Einsatz. Alle weiteren Chemikalien werden von den Firmen *Gelita*, *Fluka*, *Sigma-Aldrich* und *Dow Corning* bezogen. Entionisiertes Wasser sowie Reinstwasser sind der universitären Anlage entnommen.

#### 4.1.2 Filmerzeugung auf Glas

Es werden 200 mg BR<sub>WT</sub> bzw. der BR-Mutante und 1 g Gelatine (*Typ 67 373*, Fa. *Gelita*) in einem Schraubdeckelglas eingewogen und mit 10 ml Reinstwasser aufgeschlämmt. Bei 55 °C wird die Suspension 30 Minuten gerührt, danach 30 Minuten im Ultraschallbad behandelt. Anschließend 10 Minuten bei 55 °C gerührt und zur weiteren Homogenisierung mittels einer Ultraschallsonde beschallt (300 Pulse von je 1 s mit jeweils 5 s Pause bei einer Amplitude von 10%). Nach dreimaliger Wiederholung wird die Suspension 10 Minuten bei 55 °C erwärmt und durch einen Spritzenfilter mit einer Porengröße von 5 µm filtriert. Danach wird die Suspension am Membranpumpenvakuum entgast. Diese Umlösung wird vor jeder Verwendung erneut aufgewärmt und gerührt. Um Filme mit verschiedenen OD-Werten herzustellen, wird zusätzlich eine Gelatinelösung angesetzt. Hierfür werden 2 g Gelatine in 30 ml Reinstwasser bei 55 °C gelöst und anschließend 30 min am Membranvakuum entgast. Durch Kombination

der Stammlösung mit der Gelatinelösung werden so verschiedene Konzentrationsverhältnisse angesetzt. Die Glassubstrate werden mit aufgekochter Agarlösung umrandet. Die Herstellung der Filme erfolgt mit dem im Methodenteil beschriebenen Rakelverfahren. Die Spalthöhe der Rakel beträgt 1 mm und überschüssiges Material wird mit einer Rakelgeschwindigkeit von 15 mm/s abgezogen. Nach zwei Tagen sind die Filme getrocknet und deren OD-Werte können mittels UV/VIS-Spektroskopie bestimmt werden. Schichtdicken werden mittels Weißlichtinterferometrie oder LSM bestimmt.

#### **4.1.3** Bestrahlung von Filmen und Suspensionen

Mit dem in Kapitel 3.2.3.1 vorgestellten Lasersystem wird die Laserstabilität von Substraten geprüft und das orts aufgelöste Beschreiben von BR-Filmen sowie die Erzeugung von Polarisationsmuster vorgenommen. Aufgrund von Reflexionen an den im Strahlengang verbauten optischen Bauteilen kommt es zur Reduzierung der eingestellten Laserausgangsleistung. Deshalb wird die Leistung mit einem thermoelektrischen Messkopf (LM-3, Fa. *Coherent*) und einer Digitalanzeige (*Fieldmaster II*, Fa. *Coherent*) bestimmt.

Für das Beschreiben mit dem Galvanoscanner und dem Vektorsystem werden Felder mit Geschwindigkeiten von 100-600 mm/s mit einer Frequenz von 20 kHz geschrieben. Durch die Fokussierung des Laserstrahls auf den BR-Film wird ein Schreibdurchmesser von ca. 30  $\mu\text{m}$  erzielt. Optimale Schreibbindungen für BR-Filme liegen im Bereich von 0,1-0,3 W. Die Energie pro Puls beträgt dabei zwischen 5-15  $\mu\text{J}$ . Bezogen auf die Fläche des fokussierten Punktes ergeben sich für die Energie pro Fläche 0,67  $\text{J}/\text{cm}^2$  und 2  $\text{J}/\text{cm}^2$ . Bei höheren Pulsenergien kommt es zur starken Strukturierung und schließlich zur Verbrennungen des Filmmaterials.

Das Beschreiben mit dem Explorer 532 nm bietet neben der höheren Ausgangsleistung (bis zu 5 W), vor allem eine höhere Repetiertrate (80-300 kHz), wodurch deutlich höhere Schreibgeschwindigkeiten möglich werden. Zum Beschreiben des BR-Films muss die Ausgangsleistung des Lasers durch zusätzliche Strahlteiler reduziert werden, so dass auch hier die durchschnittliche Pulsenergie bei 10-14  $\mu\text{J}$  liegt. Es können mit Schreibgeschwindigkeiten von bis 3000 mm/s, aufgrund der höheren Reptiertrate von 80 kHz, BR-Filme ausgeblen werden.

Während mit dem verwendeten Galvanoscanner Auflösungen von bis zu einer minimalen Pixelgröße von 30  $\mu\text{m}$  realisierbar sind, können mit dem Trilitesystem kleinere Pixel in der Größe von einem 1  $\mu\text{m}$  erzielt werden (siehe Polka-Dot-Experiment in Kap 4.2.4).

Zur Erzeugung der durch Zweiphotonenabsorption entstehenden Photoprodukte in BR-haltigen Suspensionen wird ein frequenzverdoppelter Nd:YAG-Laser (*Infinity 40-100*, Fa. *Coherent*) der Wellenlänge 532 nm verwendet. Die BR-Suspensionen werden in einer Quarzglasküvette unter Rühren mit Laserpulsen (15 mJ / Puls) mit einer Frequenz von 20 Hz bestrahlt. Die Leistung wird mit einem *FieldMaster GS* (Fa. *Coherent*) mit Thermomesskopf überprüft.

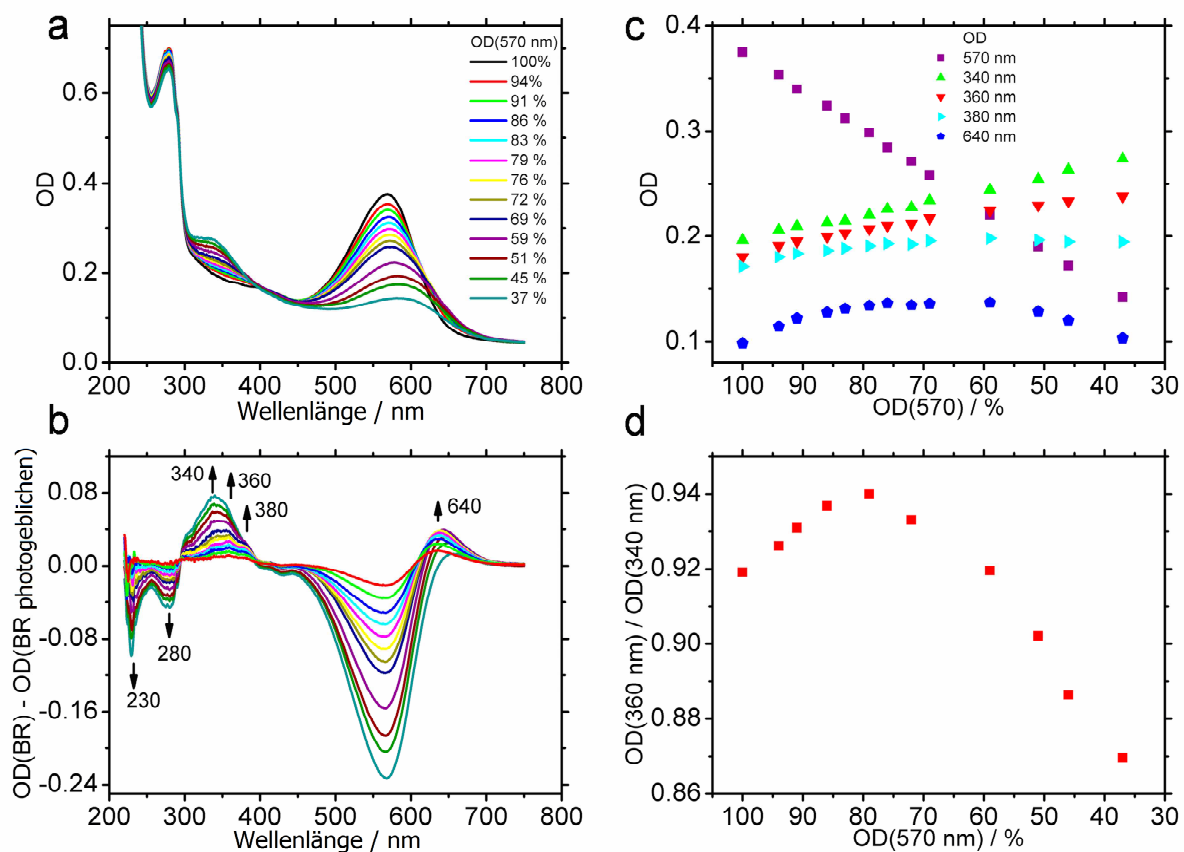
## 4.2 Speicherprozess auf supramolekularer Ebene - Untersuchung der durch die Zweiphotonenabsorption verursachten strukturellen und molekularen Veränderungen in der PM und BR

Im Gegensatz zu vielen an BR durchgeführten spektroskopischen Untersuchungen, die bei niedrigen Lichtintensitäten die einzelnen Photozyklusintermediate aufgeklärt haben, geht es in diesem Teil um hohe Lichtintensitäten, wie sie für die Zweiphotonenabsorption benötigt werden. BR hat einen außerordentlich hohen molaren Extinktionskoeffizienten. Das Retinal erfährt durch die Lage in der Bindungstasche zwischen den Aminosäuren einen Opsinshift, der zu einer starken Absorptionsbande um 570 nm führt.<sup>[50]</sup> Zudem hat BR einen extrem hohen Zweiphotonenquerschnitt.<sup>[51]</sup> Die Zweiphotonenabsorption von BR führt zur Bildung von Photoprodukten außerhalb des klassischen Photozyklus und kann für die Zweiphotonen-Datenspeicherung verwendet werden.<sup>[28,52-54]</sup> Dabei kommt es mit intensiven Laserpulsen erst zur Rotverschiebung der Absorptionsbande in den  $F_{620}$ -Zustand. Die Kinetik der teilnehmenden Zweiphotonenreaktionen wurden bereits von *Masthay* und *Fischer* untersucht.<sup>[28,55]</sup>

In den folgenden Kapiteln dieser Arbeit werden die molekularen und supramolekularen Veränderungen beim permanenten Bleichen von BR mittels Zweiphotonenabsorption untersucht. Aufgeklärt wird das TPP-Produkt mit Hilfe von UV-Vis-Spektroskopie, Kleinwinkelstreuung, Rasterkraftmikroskopie sowie durch CD-Spektroskopie. Da für optimale Messbedingungen der nachfolgenden durchgeführten Charakterisierungsmethoden unterschiedliche Konzentrationen der PM benötigt werden, wird zur Vergleichbarkeit der Photoprodukte eine prozentuale Ausbleichrate verwendet, die sich aus der OD der belichteten Probe relativ zur Anfangs-OD ergibt.

#### 4.2.1 Spektrale Veränderungen im UV-VIS-Bereich - Änderung am Chromophor

Die Bestrahlung von BR-Filmen und BR-Suspensionen mit intensiven Laserpulsen mit einer Wellenlänge von 532 nm führt zur Bildung von unterscheidbaren Photoprodukten, die durch UV-Vis-Spektroskopie analysiert werden. Dabei kommt es im Laufe des Ausbleichens zu einem rotverschobenen Photoprodukt (dem  $F_{620}$ -Zustand) sowie blauverschobenen Photoprodukten, die um 340 nm, 360 nm und 380 nm absorbieren. Das Absorptionsmaximum bei 570 nm sinkt (siehe Abb. 14). Der rotverschobene  $F_{620}$ -Zustand wird im Laufe der Bestrahlung weiter photolysiert. Die Veränderungen der optischen Dichte bei ausgewählten Wellenlängen ist in Abb. 14 c dargestellt. Das bei 360 nm geformte Photoprodukt  $BR_{360}^{TPP}$  entsteht parallel zu dem F-Zustand. Weitere Bestrahlung führt zu einer Zunahme des Photoprodukts  $BR_{340}^{TPP}$ . Dieser Zusammenhang ist in Abb. 14 d als Verhältnis der  $OD(360\text{ nm})/OD(340\text{ nm})$  zu erkennen.

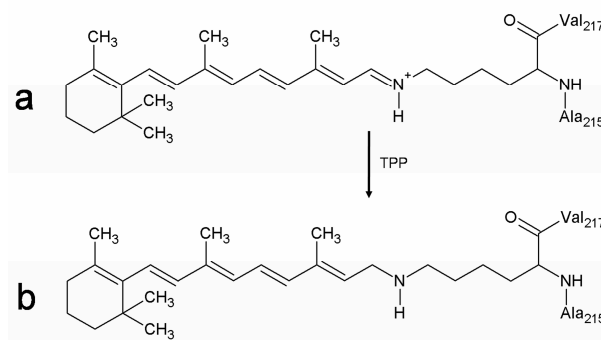


**Abb. 14:** Spektrale Veränderungen beim Bestrahlen von BR. Als Maß für den Fortschritt des Zweiphotonen-Photobleichens wird die dosisabhängige OD bei 570 nm mit ihrem Anfangswert verglichen. (a) Dosisabhängige UV/Vis-Spektren. (b) Das Differenz-Spektrum zeigt die Entstehung von Photoprodukten bei 640 nm und 360 nm. Die Intensitätsverluste der aromatischen Aminosäuren bei 280 nm und 230 nm, insbesondere von Tryptophan und Tyrosin, treten wegen sinkender Wechselwirkungen mit dem Retinal auf. (c) Verlauf der OD-

Veränderungen bei ausgewählten Wellenlängen. (d) Der Plot des Verhältnisses OD (360 nm) / OD (340 nm) durchläuft ein Maximum.

Neben der Bildung der bereits beschriebenen Photoprodukte kommt es zu einem Verlust der Absorption bei 280 nm und 230 nm. Da bereits ähnliche Beobachtungen bei chemischer Reduktion der *Schiff*'schen Base gemacht worden sind, kann diese Abnahme der OD auf geschwächte Wechselwirkungen zwischen dem Retinal und den Tryptophan- bzw. Tyrosin-Resten in der Bindungstasche zugeordnet werden. Mit Ausnahme der zunächst starken Ausprägung des rotverschoben  $F_{620}$ -Zustands sind die Photoprodukte identisch mit den wichtigsten Produkten einer Reduzierung von BR mit  $\text{NaBH}_4$ . Bei der chemischen Reduzierung entstehen Produkte des Typs  $BR_{340}^{red}$ ,  $BR_{360}^{red}$  und  $BR_{380}^{red}$ . Ähnliche Photoprodukte werden beim Bestrahlen von PM-Suspensionen mit kurzen Elektronen-Pulsen beobachtet.<sup>[56]</sup> Dabei zeigte sich, dass Wasserstoffradikale für die Reduktion der *Schiff*'schen Base und die Bildung des N-Retinyll-Bacterioopsin verantwortlich sind.<sup>[57]</sup>

Durch das Auftreten vergleichbarer Produkte im UV-Vis-Spektrum liegt der Schluss nahe, dass es auch bei der Zweiphotonabsorption zu einer Reduktion der *Schiff*'schen Base kommt, wie es in Abb. 15 schematisch dargestellt ist. Wahrscheinlich geschieht dies über Wasserstoffradikale. Das kovalent an die *Schiff*'schen Base gebundene Chromophor bildet ein strukturiertes Spektrum mit Absorptionsmaxima bei 340, 360 und 380 nm aus.



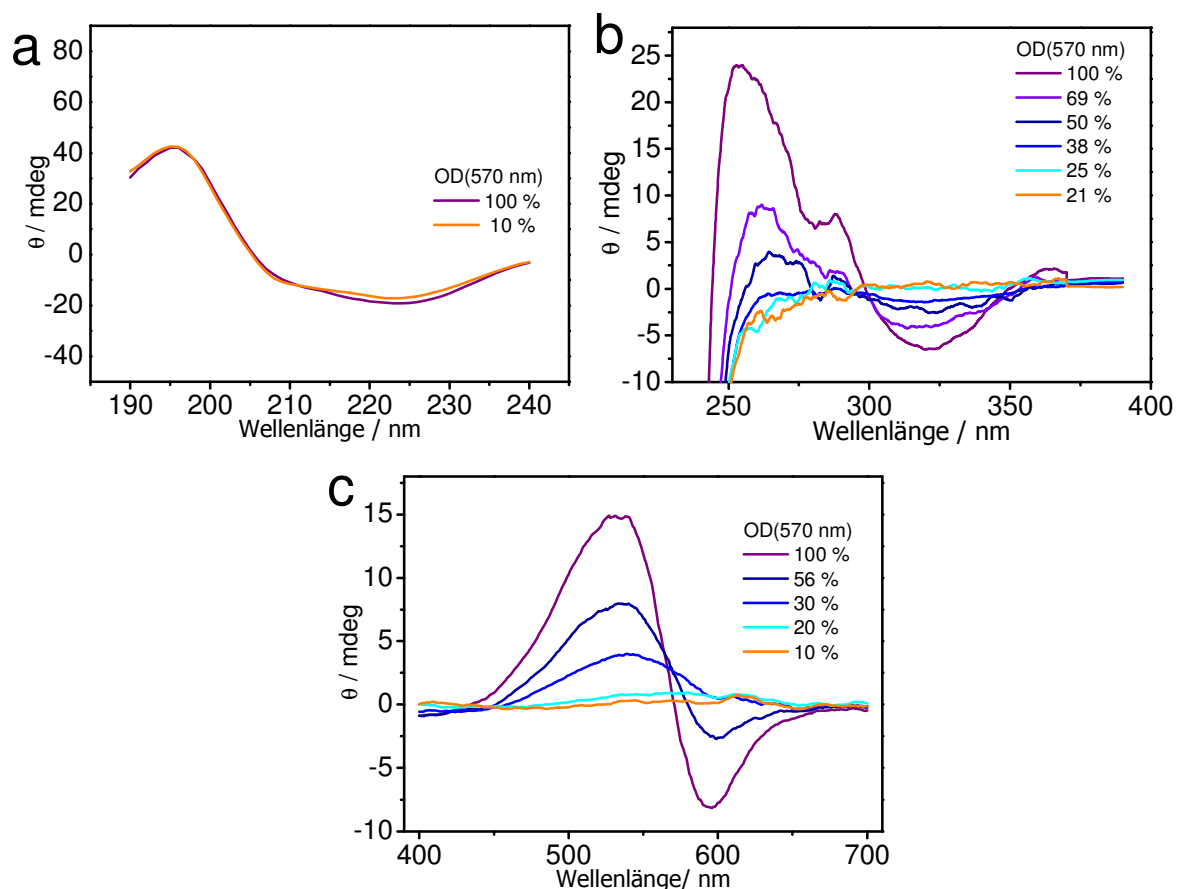
**Abb. 15:** Reduzierung der Retinal-*Schiff*'schen Base im BR durch Zweiphotonenabsorption induziertes Photobleichen (a) Struktur des Retinals in der Bindungstasche von BR gebunden am Lysin-216. (b) Struktur der N-Retinyll-Spezies, die sich durch das Zweiphotonen induzierte Photobleichen, im BR ausbildet.

#### 4.2.2 CD-Spektroskopie

In dieser Arbeit werden erstmals die durch TPA induzierten Photointermediate mittels CD-Spektroskopie untersucht. BR besteht zum Großteil aus  $\alpha$ -Helices, diese sind verbunden über

einige Loops bzw. Turns und zwei kurzen Beta-Motiven (jeweils vier Aminosäuren lang). Die Protein-Sekundärstruktur wird mittels  $CD_{UV}$ -Spektren überprüft. Aufgrund des dominierenden  $\alpha$ -Helix-Charakter des Proteins sind zwei tiefe Minima in der Nähe von 212 nm und 222 nm in Abb. 16a zu sehen. Das ist typisch für eine  $\alpha$ -Helix-Struktur und beruht auf  $\pi$ - $\pi^*$ - und  $n$ - $\pi^*$ -Übergänge. Nach dem TPP-Prozess ist kein Verlust der Sekundärstruktur feststellbar. Sogar nach dem Bleichen auf 10% der Anfangs-OD kann keine signifikante Veränderung der Sekundärstruktur beobachtet werden. Dies zeigt die enorme Selektivität der Bestrahlung, da es nicht zu einer Entfaltung des Proteins kommt und der hohe Anteil an  $\alpha$ -Helices erhalten bleibt.

Bei den untersuchten BR Blindproben wird ein  $\alpha$ -Helix-Anteil von  $73,5 \pm 0,6\%$  mit der *Yang*-Methode<sup>[46]</sup> errechnet, während die belaserten BR-Proben um 0,5%-Punkte erhöhte Werte von  $74,0 \pm 0,9\%$  aufweisen. Bei den Kalkulationen kommt es nicht zu einer Erhöhung des *Random-Coil*-Anteils. Im Vergleich zu dem hier ermittelten Wert nach der *Yang*-Methode hat *Long* für BR mittels CD-Spektroskopie einen  $\alpha$ -Helix-Anteil von 75% ermittelt.<sup>[58]</sup> Die Abweichung von 1,5% ist wahrscheinlich auf andere Referenzspektren bei der Berechnung zurückzuführen.



**Abb. 16:** Analyse des CD-Spektrums im (a) Fern-UV, (b) Nah-UV und (c) im sichtbaren Bereich.

Erstaunlicherweise zeigen die im UV-Bereich bei 360 nm entstehenden Spezies keine ausgeprägte CD-Aktivität. Im Gegensatz dazu zeigen die in der Literatur durch chemische Reduktion der *Schiff*'schen Base erzeugten Intermediate starke CD-Signale um 360 nm. Das Fehlen dieser CD-Aktivität deutet auf eine Lockerung der Retinalkonformation in der Bindungstasche hin. Gerade diese konformative Freiheit des Retinals würde auch die abnehmende CD-Aktivität des Tryptophans bei 260 nm erklären. Die in Abb. 16 b und c gezeigten Banden bei 320 nm und 500-650 nm werden durch die optische Aktivität des an dem Protein gebundenen Retinals verursacht.<sup>[59]</sup> Sie wird nach *Masthay* als elektrisch verbotener, aber magnetisch erlaubter Dipolübergang beschrieben.<sup>[60]</sup> Die Abnahme dieses Signals ist ebenfalls als Nachweis für das Nachlassen der konformativen Einschränkung des Retinals in der Bindungstasche zu werten.

Im sichtbaren Teil des Spektrums ist das aus früheren Untersuchungen bereits bekannte biphasige CD-Signal für die unbestrahlte Probe detektiert worden.<sup>[61]</sup> Auf der einen Seite gibt es eine breite positive Bande bei ca. 535 nm mit einem Nulldurchgang bei etwa 565 nm und auf der anderen Seite eine schwächere negative Bande bei ca. 590 nm. Durch die Zweiphotonenabsorption ändert sich das biphasige Signal zu einem schwächeren monophasigen CD-Signal. Dies ist in Übereinstimmung mit den Vorgängen einer chemischen Reduktion von BR. Allerdings ist diese Abnahme auch als nachlassende Trimer-Trimer-Wechselwirkung in der Literatur diskutiert, wie sie bei der Monomerisierung von BR durch Tenside bekannt ist. Es kommt also zu einer Auflockerung des Trimerverbands, wie es auch mit SAXS-Messungen bestätigt werden kann. Die weitere Abnahme des monophasigen Signals kann zudem auf die Abnahme der Absorptionsbande bei 570 nm im UV-Vis-Spektrum zurückgeführt werden.

#### **4.2.2.1** *Excitonenkopplungs- und Heterogenitätsmodell – biphasiges CD-Signal von BR*

In der Literatur finden sich mehrere Modellvorstellung zur Entstehung des biphasigen CD-Spektrums von BR. Dieses biphasige CD-Signal wird je nach Modell durch die excitonische Kopplung der Chromophore in den BR-Trimeren oder durch die heterogene Proteinumgebung verursacht.<sup>[60-62]</sup>

Das Excitonenmodell nach *Dollinger* beschreibt die Entstehung des biphasigen CD-Spektrums folgendermaßen: Zwei Chromophore können über eine Dipol-Dipol-Kopplung miteinander wechselwirken, so dass ihre lokalen, angeregten Zustände eine delokalisierte Anregung (Excitation) produzieren. Voraussetzung dafür ist eine relativ starre Anordnung der



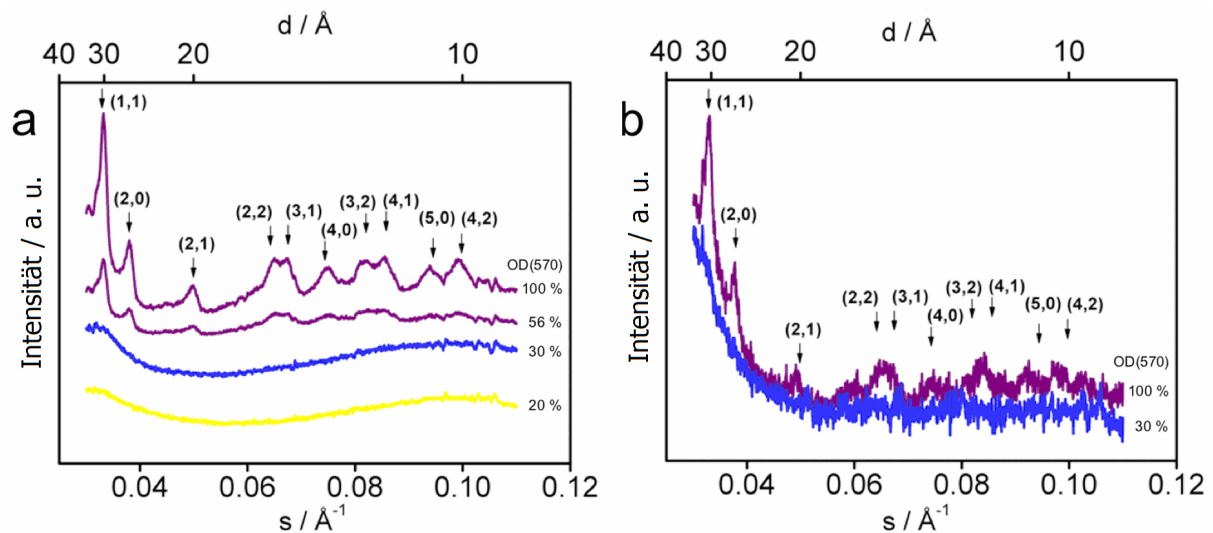
Chromophore, ein großes Übergangsdipolmoment, intensive  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergänge, und eine nicht zu große Distanz untereinander. Für das Chromophor im BR-Molekül ist im Falle der BR-Trimere eine starre Anordnung mit P3-Symmetrie in einem hexagonalen 2D-Gitter gegeben. Die langwellige Absorption des BRs aus  $\pi$ - $\pi^*$ -Übergängen spricht auch für ein großes Übergangsdipolmoment. Auch die Distanz der Chromophore untereinander lässt eine excitonische Kopplung zu. Die Entfernung innerhalb des Trimers liegt bei 260 nm und zwischen zwei Trimeren bei 380 nm.<sup>[63]</sup>

Ein anderes Modell, die so genannte Heterogenitätstheorie nach *El-Sayed* besagt, dass das Retinal aufgrund der chiralen Umgebung in der Proteintasche des Proteins eine chirale Diskriminierung erfährt. Zudem ist das Retinal aufgrund der Verdrillung des  $\beta$ -Iononenringes um die C6-C7-Bindung chiral. Das CD-Spektrum ist als Summe von verschiedenen Chromophoren unter heterogener Proteinumgebung zu interpretieren. So ändert sich bei den verschiedenen Photointermediaten die Proteinumgebung des Chromophors und somit können diese als verschiedene Chromophore aufgefasst werden. Dadurch werden die Absorptionsspektren verbreitert und das unsymmetrische biphasige CD-Spektrum erzeugt.<sup>[64]</sup>

Unabhängig von der Modellvorstellung wird das Anzeigen der Biphasigkeit und die negative Bande bei 600 nm als Indikator für die Intaktheit des Chromophors und der Trimeranordnung gewertet.<sup>[65]</sup> Der Verlust dieser Bande und der Übergang zu einem monophasigen CD-Signal wird als Monomerisierung der PM in BR-Moleküle angesehen.<sup>[66]</sup>

#### **4.2.3 Strukturelle Änderungen in der Kristallinität der PM**

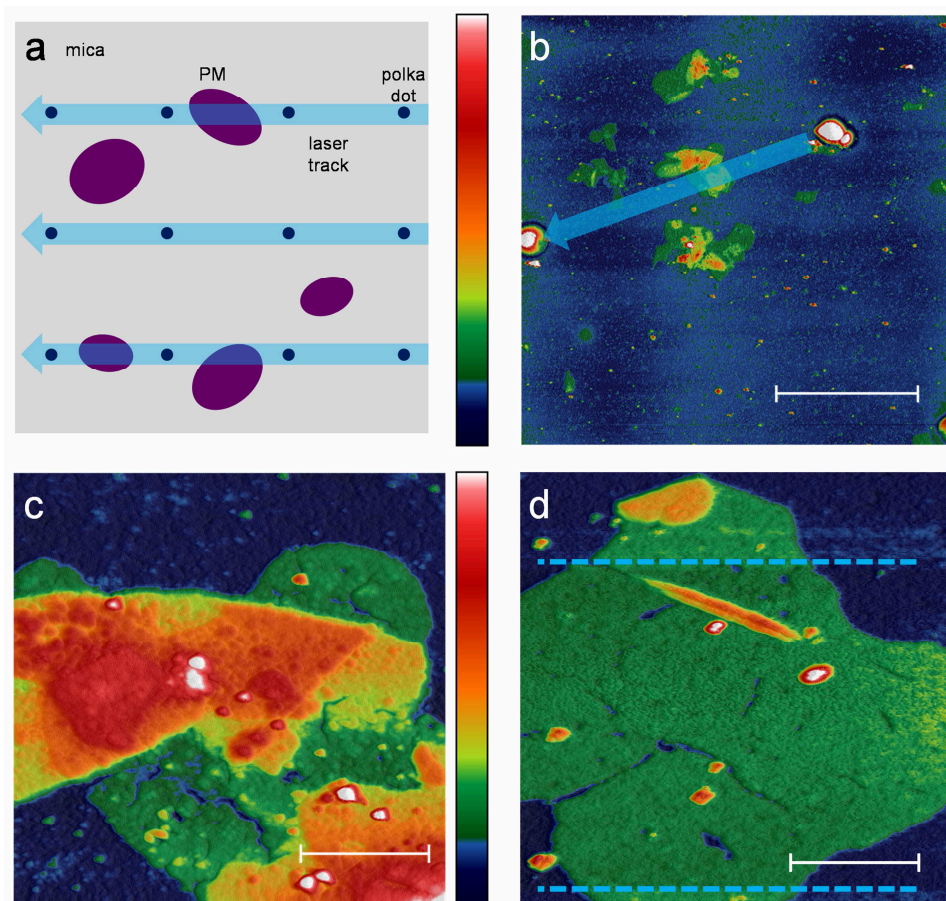
Durch Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) konnten die Änderungen in der Kristallinität sowohl von bestrahlten PM-Suspensionen als auch von bestrahlten PM-Filmen untersucht werden. Die Abb. 17 zeigt den progressiven Verlust der zweidimensionalen Kristallinität mit zunehmender Bleichrate der PMs. Sobald die OD bei 570 nm unterhalb von ~30% des Anfangswert für eine unbelichtete PM fällt, ist keine normale Streukurve für eine hexagonale Anordnung des BRs mehr zu detektieren. Durch den Vergleich von PM-Suspension und PM-Filmen kann ausgeschlossen werden, dass es sich bei diesen Änderungen um Trocknungsartefakte handelt (vgl. Abb. 17). Neben dem Verlust der Kristallinität tritt auch eine Dickenänderung der PMs auf. Für unbestrahlte PMs (100% OD<sub>570</sub>) liegt der Abstand bei 46,5 Å während sich der Abstand für bestrahlte PM (20% OD<sub>570</sub>) auf 45,5 Å reduziert.



**Abb. 17:** Kleinwinkelröntgenstreuung (SAXS) von photogeblichen PMs. (a) Streuprofile von getrockneten photogeblichen PM-Filmen. Der 100%-Wert bezieht sich auf die anfängliche Absorption bei 570 nm, die durch das Bleichen abnimmt. Gleichmaßen geht die hexagonale Kristallinität der PM verloren. (b) Streuprofile von PM-Suspension.

#### 4.2.4 Topologieänderung nach Laserbestrahlung Untersuchung mit AFM und Polka-Dot-Experiment

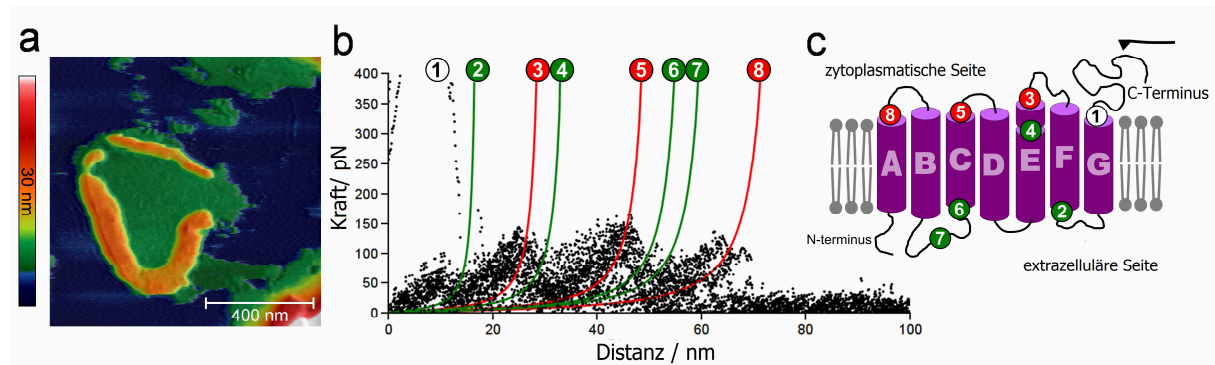
Abweichend zur bisherigen Probenvorbereitung wird zur AFM-Messung 20  $\mu\text{l}$  einer PM-Suspension ( $BR_{570}^{\text{initial}} 0.3$ ) auf frisch gespaltenem Glimmer gegossen und für 10 Minuten inkubiert. Anschließend wird die Probe mit Reinstwasser gewaschen und an Luft angetrocknet. Die Laserbestrahlung der PMs erfolgt mit einem *QuikLaze 50ST2 / Trilite* (Fa. *New Wave Research*) Lasersystem, mit 532 nm, einer Wiederholrate von 50 Hz und einer Pulsdauer von 4 ns. Der Fokusbereich beträgt 1  $\mu\text{m}$  und ist in der Größenordnung einzelner PMs. Die Laserbestrahlung wird in einem regelmäßigen Punktrastermuster (Polka-Dots) auf dem Glimmer durchgeführt. Dabei werden die PMs mit mehreren 1  $\mu\text{m}$  breiten Linien im Abstand von 2  $\mu\text{m}$  auf der Glimmerfläche belastet. Durch das Einbrennen von Referenzpunkten, im Abstand von 10  $\mu\text{m}$  in den Glimmer, können unter dem AFM beschriebene PMs von unbeschriebenen unterschieden werden. Die AFM-Messungen sind im „Tapping mode“ mit einem Nanoscope IV mit Multimode controller (Fa. *Bruker*) durchgeführt worden. Abb. 18 illustriert die Vorgehensweise des Polka-Dot-Experiments und zeigt die Topologieänderungen der bestrahlten PM. Im Bereich des Laserstrahls kommt es zu Rissen und Fehlordnungen.



**Abb. 18:** Polka-Dot-Experiment und Rasterkraftmikroskopie (AFM) von belasteten PMs. (a) Schematischer Ablauf des Polka-Dot-Experimentes. PMs werden auf Glimmer inkubiert, luftgetrocknet, in regelmäßigen Abständen (blaue Linie) mit dem Laser bestrahlt. Zusätzliche Polka-Dots, die das Substrat beschädigen, dienen zur Orientierung bei anschließender AFM-Untersuchung. (b) Die Bahn des Laserstrahls wird durch den Pfeil angedeutet. An den beiden Enden des Pfeils sind die Lasermarkierungen am Substrat zu erkennen. Die Höhenskala beträgt 50 nm und der Maßstab ist 5 µm. (c) Nahaufnahme der laserbestrahlten PM, die in (b) gezeigt ist. Im bestrahlten Bereich zeigen die PMs Risse als Reaktion auf den intensiven Laserstrahl. Die Höhenskala beträgt 25 nm und der Maßstab ist 500 nm. (d) In der Mitte (zwischen den gestrichelten Linien) der großen einzelnen PM sind Risse und Fehlordnungen als Folge der Laserbestrahlung zu erkennen. Die Höhenskala beträgt auch hier 25 nm und der Maßstab ist 500 nm.

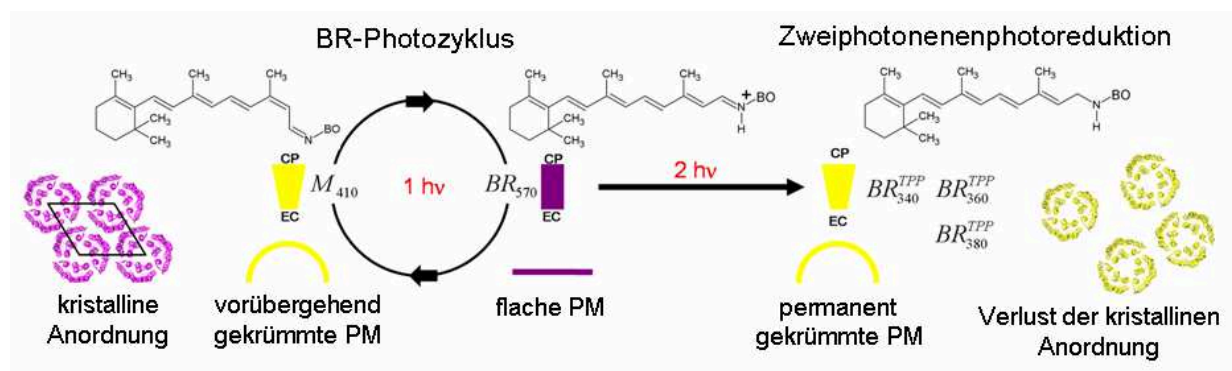
In bestrahlten PM-Suspensionen werden gekrümmte PMs gefunden. Zur Unterscheidung der Krümmungsrichtung der PMs ist Kraftspektroskopie von bestrahlten PM-Suspensionen durchgeführt worden. Durch die Signalposition der Kraftkurven kann mit dem *Worm-like chain*-Modell zwischen der zytoplasmatischen und extrazellulären Seite unterschieden werden. Abb. 19 zeigt die Kraftkurven für eine aufgerollte PMs. Das angepasste *Worm-like chain*-Modell zeigt, dass dies die zytoplasmatische Seite ist. Dementsprechend krümmen sich die PMs in Richtung der extrazellulären Seite während sie das TPP-Produkt formen. Diese

Krümmung tritt auch bei PMs auf, die mit geringer Intensität belichtet und in den reversiblen M-Zustand gebracht werden.



**Abb. 19:** (a) AFM-Bild einer in den Randbereichen gekrümmten und sich einrollenden PM nach Zwei-Photonen-Absorption. (b) Die Kraftspektroskopie auf diesen erhöhten Bereichen mit Zuordnung der einzelnen Helices ergibt die zytoplasmatische Seite. (c) Zuordnung der Kraftkurven.

Die Abb. 20 zeigt die strukturellen Veränderungen beim reversiblen Übergang vom  $B_{570}$ - zum  $M_{410}$ -Zustand im Vergleich zur Zweiphotonenabsorption und der damit verbundenen Bildung der TPP-Produkte.

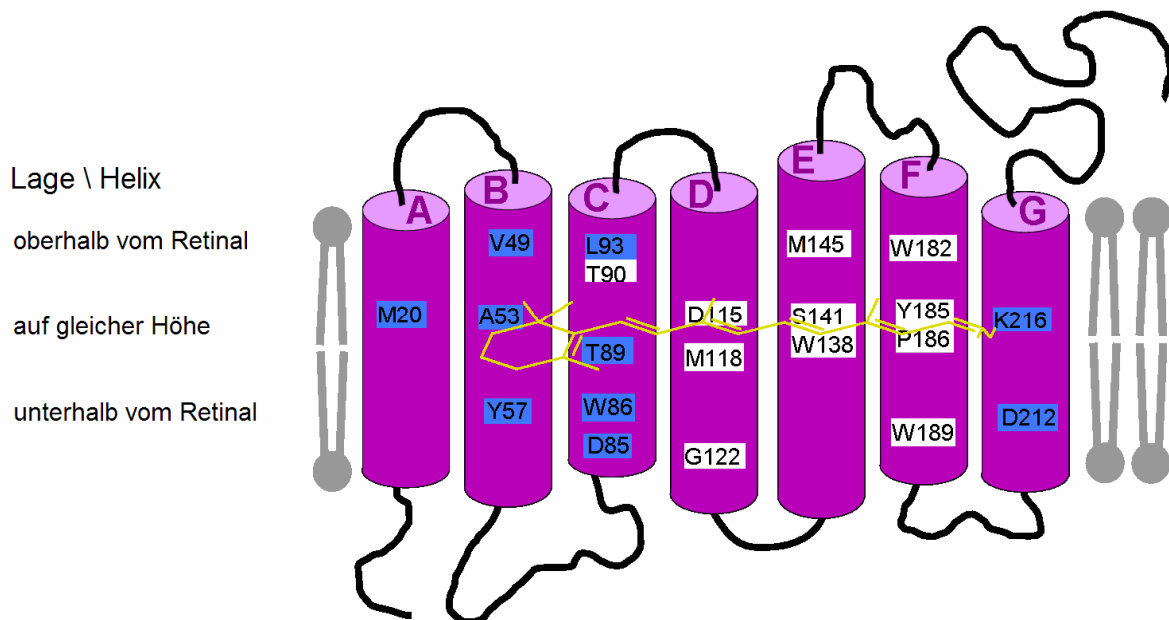


**Abb. 20:** Vergleich zwischen den strukturellen Veränderungen beim Durchlaufen des Photozyklus und bei der Zweiphotonen induzierten Photoreduktion. Während es bei der Einphotonenabsorption nur zu einer vorübergehenden Krümmung der PM kommt, bewirkt die permanent gekrümmte PM nach Zweiphotonenabsorption einen Verlust der kristallinen Anordnung.

Nachdem die beim TPP-Prozess resultierende Änderungen der Form, die geänderte Kristallinität, die nachlassende Trimerwechselwirkung und die Änderungen am Chromophor gezeigt worden sind, werden im folgenden Kapitel die Änderungen in der Aminosäuresequenz beim Bestrahlen beschrieben.

#### 4.2.5 Massenspektrometrische Untersuchung - Laserinduzierte Modifikationen in der Aminosäuresequenz des Bakteriorhodopsins

Die in diesem Kapitel in der Primärstruktur des Peptids vorgestellten irreversiblen Veränderungen an bestimmten Aminosäuren liefern die Erklärung für die Irreversibilität der makroskopischen Farbänderung der Zweiphotonenabsorption. Das Chromophor Retinal ist über eine *Schiff'schen* Base an K216 gebunden (wie in Abb. 21 gezeigt). Sie zeigt alle Aminosäuren, die im *Van-der-Waals*-Kontakt zum Retinal stehen. Besonders hervorgehoben (blau) sind die Aminosäuren, die am Protonenkanal liegen und somit für das Durchlaufen des Photozyklus notwendig sind. Gerade für die am Photozyklus beteiligten Aminosäuren ist eine Änderung zu erwarten.



**Abb. 21:** Aminosäuren, die im *Van-der-Waals*-Kontakt zum Retinal (gebunden an K216) liegen. Blau hervorgehoben Aminosäuren, die am Protonenkanal liegen.

Massenspektrometrie an bestrahlten PMs wurde bisher nicht im Detail durchgeführt. Um die TPP-Produkte zu analysieren, sind kleine Fragmente der riesigen BR-Moleküle (26783 Da) notwendig. Die Delipidisierung der stufenweise laserbestrahlten BR-Stammlösung erfolgt nach einem Protokoll nach *Hufnagel*, wodurch es bei unbelichtetem BR zu einem hydrolysebedingten Bindungsbruch zwischen Protein und Chromophor kommt.<sup>[67]</sup> Um Änderungen auf molekularer Ebene zu detektieren, wird ein Bromcyanverdaul mit Trifluoressigsäure durchgeführt, der 10 Fragmente von BR erzeugt.<sup>[68-70]</sup> Dieser spaltet Peptide jeweils nach der Aminosäure Methionin (M). Dabei wird ein Homoserinlacton gebildet. Eine Übersicht über die 10 Fragmente gibt Tab. 4.<sup>[69,70]</sup>

**Tab. 4:** Fragmente nach dem BrCN-Verdau von BR-WT [Mw (mittlere Masse): 26801,56 / Mw (monoisotopische Masse): 26784,13] und für D85T [Mw (mittlere Masse): 26788,56 / Mw (monoisotopische Masse): 26771,14] berechnet mit *PeptideMass*.<sup>[71]</sup>

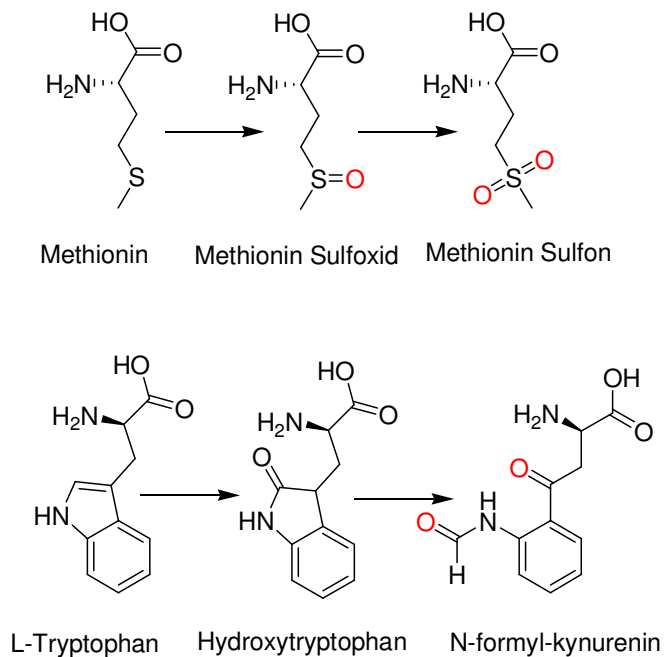
Fragment	Masse	Amino- säure Nr.	Helix	Aminosäuresequenz
1	<b>2208,181<sup>**♦</sup></b>	1-20	A	EAQITGRPEWIWLALGTALM
2	<b>1250,714</b>	21-32	A	GLGTYFLVKGM
3	<b>2508,338</b>	33-56	B	GVSDPDAKKFYAITTLVPAI AFTM
4	<b>465,234</b>	57-60	B	YLSM
5	<b>819,461</b>	61-68	Turn-	LLGYGLTM
6 Für WT:	<b>5397,845<sup>#</sup></b>	69-118	C	VFPGGEQNPIYWARYADWLF TTPLLLLDLALLVDADEGTI LALVGADGIM
6 Für D85T- D96N	<b>5383,849<sup>#</sup></b>	69-118	C	VFPGGEQNPIYWARYATWLF TTPLLLLDLALLVDADEGTILALVGADGIM
7	<b>2913,566</b>	119-145	D, E	IGTGLVGALTKVYSYRFVWW AISTAAM
8	<b>2081,099</b>	146-163	E	LYILYVLFVFGFTSKAESM
9	<b>5036,802</b>	164-209	F	RPEVASTFKVLRNVTVVLWS AYPVVWLIGSEGAGIVPLNI ETLLEFM
10	<b>3843,029<sup>#**</sup></b>	210-248	G	VLDVSAKVGFGFLILLRSRAI FGAEAEPEPSAGDGAAATS

<sup>#</sup>Die Masse der decarboxylierten Asparaginsäure ist um - 43,989830 Da kleiner. <sup>\*\*</sup>Alternativ je nach Sequenzanfang Fragment 1 für WT (**QAQITGRPEWIWLALGTALM**) mit 2207,197 m/z und für Fragment 10 (VLDVSAKVGFGFLILLRSRAI **FGAEAEPEPSAGDGAAATSD**) mit 3958,055 m/z. <sup>♦</sup>als Pyroglutamat 2190 m/z.

Zur Massenanalyse von BR werden zwei verschiedene Methoden verwendet: HPLC-gekoppelte ESI-MS (Elektrosprayionisationsmassenspektrometrie) und MALDI-MS (*matrix assisted laser desorption ionization mass spectrometry*). Mit beiden Methoden ist es möglich, Modifikationen des Peptids zu charakterisieren. MALDI-MS bietet den Vorteil, dass die schweren hydrophoben Fragmente detektierbar sind, während bei der LC-ESI-MS die leichten Fragmente in hoher Übereinstimmung mit den berechneten Massenwerten zuzuordnen sind. Das Auftreten von mehrfach geladenen Teilchen lässt eine eindeutige Zuordnung der Signale zum jeweiligen Fragment zu. Somit eignet sich die ESI-MS-MS-Kopplung besser zur Unterscheidung von BR-Mutanten und Modifikationen in den Peptiden nach Bestrahlung. Als Trennsäule ist eine *Phenomenex* C18 Säule und ein Isopropanol/Acetonitril/Wasser-Gemisch verwendet worden. Durch den Vergleich der relativen Intensitäten ist eine Quantifizierung der Photoprodukte vorgenommen worden.

#### 4.2.5.1 Bekannte Aminosäure Modifikationen

Durch Modifikation einiger Aminosäuren werden physikalische und chemische Eigenschaften des Proteins geändert. In der Literatur für Proteinanalytik sind Oxidationen von Methionin (Met), Cysteinin (Cys), Tryptophan (Trp), Histidin (His) und Tyrosin (Tyr) bekannt. Oft treten diese Artefakte bei der Probenpräparation auf, z.B. durch Ammoniumpersulfat bei der Gelelektrophorese. Eine oxidierte Methioningruppe tritt nicht durch chemische Spaltung mit Bromcyan (BrCN) auf, sondern nur, wenn molekularer Sauerstoff Methionin oxidiert.



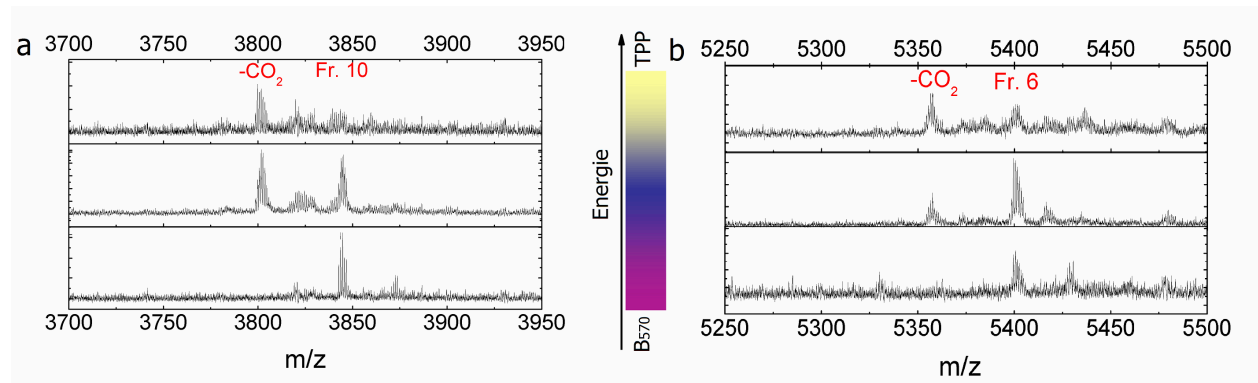
**Abb. 22:** Bekannte Oxidationsreaktionen an Methionin und Tryptophan.

Auch Tryptophan reagiert mit molekularem Sauerstoff. Zunächst zum Hydroxytryptophan und weiter zum N-Formylkynurenin. Dabei steigt die Masse um 15,9949 Da bzw. 31,9898 Da. Die hier vorgestellten Oxidationsaddukte werden aber für eine Laserbestrahlung nicht gefunden und bestätigen die Unversehrtheit der Tryptophane. Stattdessen treten Decarboxylierungen an spezifischen Stellen auf.

#### 4.2.5.2 MALDI-MS-Ergebnisse:

Alle Fragmente mit einer Masse größer als 850 m/z sind mittels MALDI-Massenspektrometrie in der unbestrahlten Referenzprobe identifiziert worden. Die Fragmente 4 (465,2344 m/z, Aminosäuren: YLSM) und 5 (819,4611 m/z, Aminosäuren: LLGYGLTM) werden nicht gefunden. Bei zwei Fragmenten 6 und 10, werden

Massenänderungen mit zunehmender Bestrahlungsdosis festgestellt (siehe Abb. 23). Diese Änderungen werden im Folgenden genauer betrachtet.



**Abb. 23:** Decarboxylierung ( $-\text{CO}_2 = 43,99$ ) (a) an Fragment 10 (Aminosäuren 210-248) mit einer Masse von 3843,02 m/z und (b) an Fragment 6 mit einer Masse von 5397,8 zu 5353,8 m/z.

Beim Fragment 10 des BrCN-verdauten Bakteriorhodopsins tritt im MALDI-Massenspektrum eine Umverteilung des Peaks bei 3842,8 m/z zu einem kleineren Massenpeak bei 3798,8 m/z mit zunehmender Bestrahlung auf. Das abgegebene Fragment entspricht einer  $\text{CO}_2$ -Einheit. Die Massenverhältnisse der beiden Peaks ändern sich mit zunehmender Bestrahlungsdosis bis zu einer Decarboxylierung von 66%. In dem Fragment gibt es zwei Aspartatreste D212 und D242, die für eine Decarboxylierung in Frage kommen. Weitere  $\text{CO}_2$ -Abgangsgruppen liegen in diesem Fragment nicht vor. Aufgrund der räumlichen Nähe des D212 zum Retinal liegt der Verdacht nahe, dass dort die Decarboxylierung stattfindet. Der Nachweis dafür wird mittels ESI-MS-MS erbracht. Ebenfalls ist bei Fragment 6 eine Abnahme um 44 Masseneinheiten von 5397,8 m/z zu 5353,8 m/z festzustellen. Gerade dieses Ergebnis ist interessant, da in der Helix C das D85 sitzt. Somit kann der blaue Übergangszustand erklärt werden, der beim Lasern auftritt bevor die Probe gelb-weißlich ausbleicht. Stützend für diese These ist, dass von gentechnischen Modifikationen von D85X-Mutanten bekannt ist, dass sie im Gegensatz zum purpurnen WT blau sind. Durch Vergleich mit einer bestrahlten D85T-Mutante, die anschließend ebenfalls mit einem Bromcyan verdaut worden ist, kann die Decarboxylierung an D85 für WT bestätigt werden, da bei dem Fragment 6 für die D85T-Mutante im MALDI-MS keine leichtere Spezies festgestellt werden kann.

#### 4.2.5.3 ESI-MS-MS-Ergebnisse

Die mittels MALDI-MS bereits gezeigte photochemisch induzierte Decarboxylierung an Helix G wird speziell am Fragment 10 mit der Sequenz

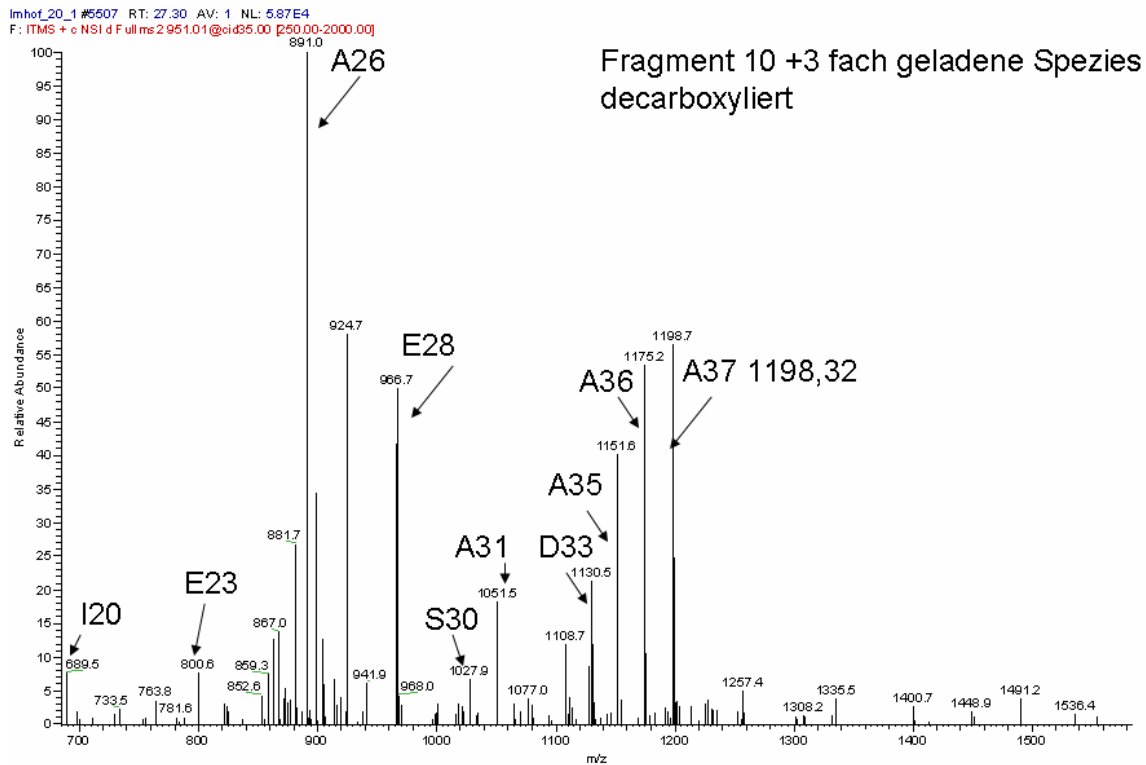


„VLDVSAKVGFGILLRSRAIFGEAEAPEPSAGDGAATS“ weiter untersucht, um zu klären, welche der beiden Asparaginsäuren (D) decarboxyliert wird.

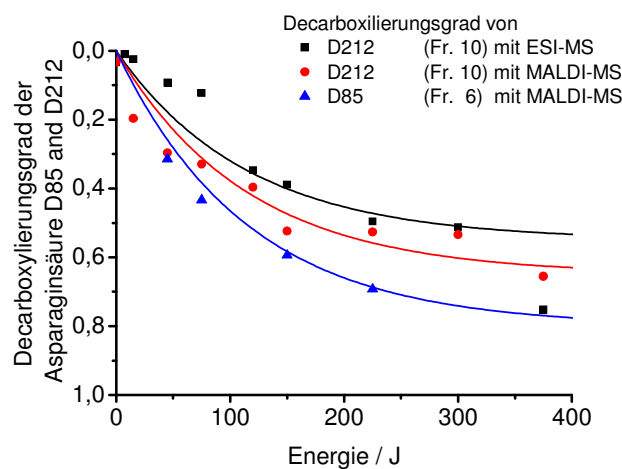
Im Folgenden wird der Nachweis erbracht, dass lediglich an der Stelle D212, die im *Van-der-Waals*-Kontakt zum Retinal steht, eine Decarboxylierung auftritt und nicht auch an einem weiter entfernten Aspartatrest wie D242, der im gleichen Fragment liegt. Mit Hilfe des *Fragment Ion Calculator*<sup>[72]</sup> können verschiedene Massenfragmente berechnet werden, die für eine laserinduzierte Decarboxylierung (monoisotopische Masse von CO<sub>2</sub>: 43,989830) in der Helix G sprechen. Die Zuordnung der Aminosäuresequenzen des Fragments gelingt nur für die an 3. Stelle decarboxylierte Aminosäure D212. Es können sowohl Fragmente von der N- als auch von der C-Terminalen-Seite identifiziert werden, die jeweils bis auf die D212 Stelle unverändert sind. Das gemessene Spektrum (Abb. 24) zeigt keine Übereinstimmung mit einer berechneten decarboxyliertem D242-Spezies oder eine Kombination von decarboxyliertem D242 und D212. Somit tritt die Decarboxylierung nur an einer spezifischen Stelle, dem Aspartat D212 innerhalb dieses Fragments auf. Mit höherer Bestrahlungsdosis steigt der Anteil von decarboxyliertem Aspartat D212 im Fragment 10 an.

Im Gegensatz zu den bisher gezeigten Decarboxylierungen an den Aspartatstellen D85 und D212, die in der Nähe des Retinals liegen, kann in Helix D an der Stelle D115 keine Decarboxylierung festgestellt werden. Diese Aminosäure liegt zwar auf gleicher Höhe wie das Retinal ist aber nicht am Protonentransport beteiligt. Neben den hier gezeigten Veränderungen beim Lasern sind Reaktionen an anderen Stellen denkbar, können aber nicht identifiziert werden. So konnte z.B. eine Oxidationsreaktion der Tryptophane nicht festgestellt werden.

Obwohl keine Anbindung des Retinals festgestellt werden kann, wie es bei den strukturellen Veränderungen in Bakteriorhodopsin postuliert wird,<sup>[73]</sup> zeigen die Ergebnisse eindeutig einen Zusammenhang zwischen dem Zweiphotonen induzierten Photobleichen des BRs und molekularen Veränderungen innerhalb einzelner Peptidfragmente. Die Decarboxylierung führt zu einer Abgabe von Kohlenstoffdioxid und erklärt somit den irreversiblen geblichenen Schreibzustand. Somit ist ein Protonentransport über die nicht mehr vorhandenen Carbonsäuregruppen nicht möglich. D85 kann nicht mehr die Protonierung / Deprotonierung der *Schiff*'schen Base unterstützen. Infolgedessen kann BR den Photozyklus nicht mehr durchlaufen. Somit gibt es keine Photochromie mehr. Die Abb. 25 zeigt die Verhältnisse der Signalintensitäten eines MALDI-Spektrums zwischen intaktem und decarboxyliertem BR an der Stelle D85 im BrCN-Verdau-Fragment Nr. 6. und an Fragment 10 für D212.



**Abb. 24:** Fragment 10 als dreifach geladene Spezies im ESI-MS. Die Zuordnung gelingt für die decarboxylierte 3. Aminosäurestelle (entspricht D212 in BR).



**Abb. 25:** Decarboxylierungsrate in Abhängigkeit der für die Laserbestrahlung eingebrachten Energie.

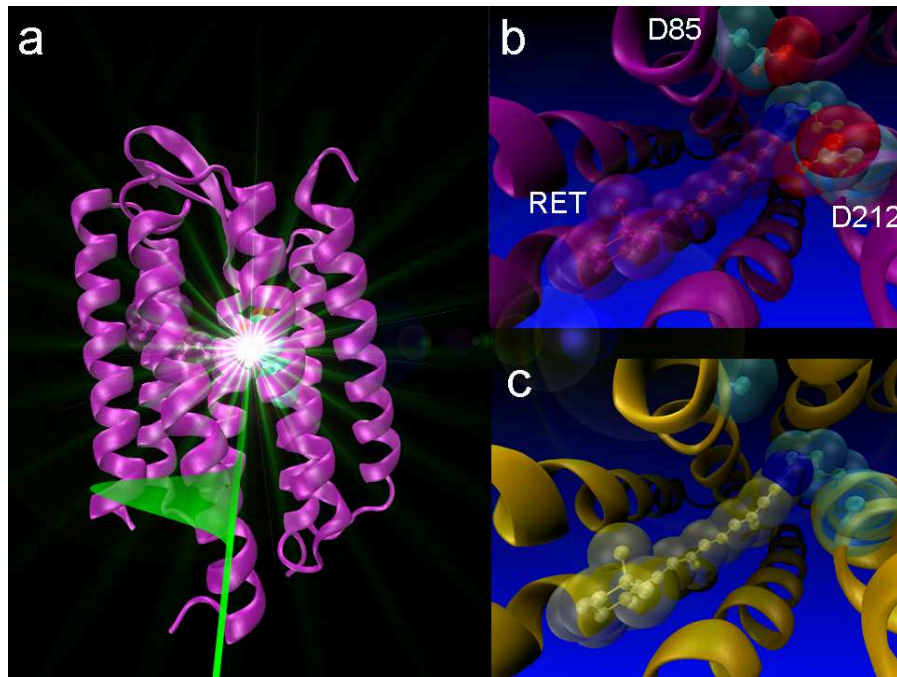
Sowohl mit MALDI-MS als auch mit ESI-MS kann eine Decarboxylierung für D212 festgestellt werden. Aufgrund der Größe von Fragment 6 ist die Position D85 nur mittels MALDI-MS verfolgbar. Die Decarboxylierung an D85 erfolgt schneller als an D212. Es handelt sich also um die labilere Carbonsäuregruppe. Eine Zunahme der Decarboxylierung bis zu etwa 75% kann beobachtet werden, dann ist die bestrahlte BR-Probe entfärbt. Bereits bei der Blaufärbung der bestrahlten Probe sind etwa 50% aller gemessenen D85 und 32% der D212 decarboxyliert. Aufgrund der Tatsache, dass die Decarboxylierungsrate nicht gegen

100%-Umsatz verlaufen und an D85 schneller auftritt bzw. der Decarboxylierungsgrad größer ist als an D212 sind für die Decarboxylierung zwei Modellabläufe postulierbar:

**Modell 1:** Die Retroretinalbildung führt zur gleichwahrscheinlichen Decarboxylierung von D85 oder D212, da sie beide in räumlicher Nähe zum Retinal liegen. Das heißt, dass immer nur eine von beiden Aminosäuren decarboxyliert wäre. Somit wären bei vollständiger Bleichung des BRs statistisch 50% aller D85 und D212 noch vorhanden. Gegen diese Theorie spricht allerdings, dass die Decarboxylierungsraten bei weiterer Bestrahlung bis auf etwa 75% ansteigen und auch die Blaufärbung der bestrahlten BR-Probe kann so nicht erklärt werden.

**Modell 2:**

Die Retroretinalbildung und Decarboxylierung an D85 geschehen gleichzeitig und in einem zweiten Schritt tritt die Decarboxylierung an D212 auf. Der Vorteil bei Verwendung der D85T-Mutante ist dementsprechend, dass keine Decarboxylierung an T85 stattfinden kann und somit der zweite Decarboxylierungsschritt an D212 bereits bei geringeren Energien passieren wird. In der Literatur ist bereits bekannt, dass eine Decarboxylierung an Aspartaten, wie D85, auch bei zu hohen Intensitäten durch Röntgenstrahlung auftritt.<sup>[74]</sup> Dabei verliert BR seine photochemische Aktivität.<sup>[74]</sup> Gegenüber einer thermischen unselektiven Decarboxylierung von Aminosäuren ist die Zweiphotonen induzierte Decarboxylierung sehr selektiv und zudem gegenüber dem gesamten BR-Molekül relativ mild. Die anderen Carbonsäuregruppen in anderen Fragmenten, die nicht in der Nähe des Chromophors liegen, weisen keine Decarboxylierung auf. Nur die Aspartatsäurereste, die am Protonenkanal liegen und in unmittelbarer Nähe zum Chromophor liegen, sind gegenüber der Laserbestrahlung anfällig. Dies beruht auf dem geringen Abstand zwischen dem durch Lichtabsorption angeregten Chromophor und den beiden genannten Aminosäuren. Dieser innermolekulare Mechanismus der Decarboxylierung ist wahrscheinlich auf andere Lichtantennen in Proteinen übertragbar. In Abb. 26 ist die räumliche Nähe der Carbonsäuregruppen des D85 und D212 zum Retinal dargestellt sowie die durch Zweiphotonabsorption bedingte Decarboxylierungsreaktion. Durch die gleichzeitige Retroretinalbildung verliert BR seine purpurne Farbe.



**Abb. 26:** Schematische Darstellung der durch TPP induzierten Decarboxylierung am Bakteriorhodopsin. (a) Zweiphotonabsorption des BR-Moleküls hier als gepulster grüner Laserstrahl dargestellt, führt zur irreversiblen Freisetzung von  $\text{CO}_2$ . (b) Räumliche Nähe der Aspartate D85 und D212 zum Chromophor Retinal (RET) vor der Bestrahlung. (c) Die Decarboxylierung führt zu einer Farbänderung von purpur nach gelblich.

#### 4.2.6 Zusammenfassung der Veränderungen auf molekularer Ebene

Eine Zweiphotonenabsorption von BR führt zur Bildung von im UV absorbierenden N-Retinyln-Bacterioopsin Arten, die zudem durch den Verlust der hexagonalen Kristallinität begleitet wird. Die photochemische Reduktion der Retinal-*Schiff*'schen Base am Lysin-216 in BR nach erfolgter Zweiphotonenabsorption erfolgt wahrscheinlich durch Wasserstoffradikale. Dadurch kommt es zu kleineren strukturellen Veränderungen in BR, die eine permanente asymmetrische Formänderung bewirken. Die Purpurmembranen krümmen sich ähnlich, wie es beim Durchlaufen des Photozyklus geschieht. Sie rollen sich in Richtung der extrazellulären Seite auf und die hexagonale Kristallinität geht verloren. Mittels Massenspektrometrie konnte eine irreversible Decarboxylierung zweier Aminosäuren, D85 und D212, in unmittelbarer Nähe zum Retinal in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis festgestellt werden. Diese Aminosäuren liegen zudem am Protonenkanal. Darüber hinaus ist aus früheren Untersuchungen bereits bekannt, dass eine Mutation an dieser Stelle den Protontransfer durch die PM beeinflusst. Zusammen mit der Reduktion der *Schiff*'schen Base ist somit die Ursache des Zweiphotonen induzierten permanenten Photobleichens aufgeklärt worden. Die Tab. 5 fasst alle festgestellten Veränderungen zusammen, die beim Bestrahlen von PM mit hohen Intensitäten, wie sie für einen TPP-Prozess nötig sind, auftreten.

**Tab. 5:** Überblick über die durch TPP-induzierte irreversible Veränderungen in der PM.

Strukturmotiv	Analytische Methode	Detektierte Veränderung
Chromophor	UV-VIS	Reduktion der <i>Schiff</i> 'schen Base und Bildung des N-Retinylo-Bacterioopsin → Maximale Absorptionsbande bei 570 nm sinkt. Entstehung des $F_{620}$ - und der $BR_{360}^{TPP}$ -, $BR_{340}^{TPP}$ -Produkte
Aminosäuresequenz	MS	Bestrahlungsdosis abhängige irreversible Decarboxylierung an D85 und D212
Sekundärstruktur	CD-UV	ca. 74% $\alpha$ -Helix Konformation bleibt erhalten
Trimer-Wechselwirkungen	CD-VIS	Übergang vom biphasigen CD in ein monophasiges Spektrum und schließlich Verlust des Signals in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis
Tertiärstruktur	SAXS	typische Streukurve für eine hexagonale Anordnung geht verloren
Form der PM	AFM	Krümmung in Richtung extrazellulären Seite

### 4.3 Externe Einflüsse auf den Zweiphotonen Speicherprozess und seine spektrale Analyse an BR-Schichten

Nachdem im vorherigen Kapitel die molekularen Prozesse und Strukturänderung des permanenten Ausbleichens durch Zweiphotonenreduktion erklärt worden sind, soll in diesem Kapitel die Anwendung des Datenspeicherns und das dafür benötigte Tuning des Speicherprozesses durch externe Einflüsse geklärt werden. Dabei werden exemplarisch die Möglichkeiten der Beeinflussung des Speicherprozesses durch pH-Wert, Temperatur, Salz und Mutantwahl diskutiert.

#### 4.3.1 Mutanteneignung für die Bestrahlung

In der Tab. 6 sind die Charakteristiken einiger BR-Mutanten miteinander verglichen. So ist beispielsweise der WT eine auswärts gerichtete Protonenpumpe. Durch Mutation an der Stelle D212 kann die Protonenpumpfähigkeit unterdrückt werden bzw. können statt Protonen Chloridionen im Falle der D85T-Mutante gepumpt werden. Eine andere technisch interessante Mutante, die D96N-Mutante, ist als pH-abhängige Protonenpumpe bekannt. In dieser Arbeit ist mit den Mutanten D85T, D96N und dem WT gearbeitet worden. Ein Vergleich der Mutanten D96N und D85T wird im Folgenden unter dem Aspekt des pH-Werts berücksichtigt. Der Einfluss des Salzgehaltes wird für D85T exemplarisch gezeigt.

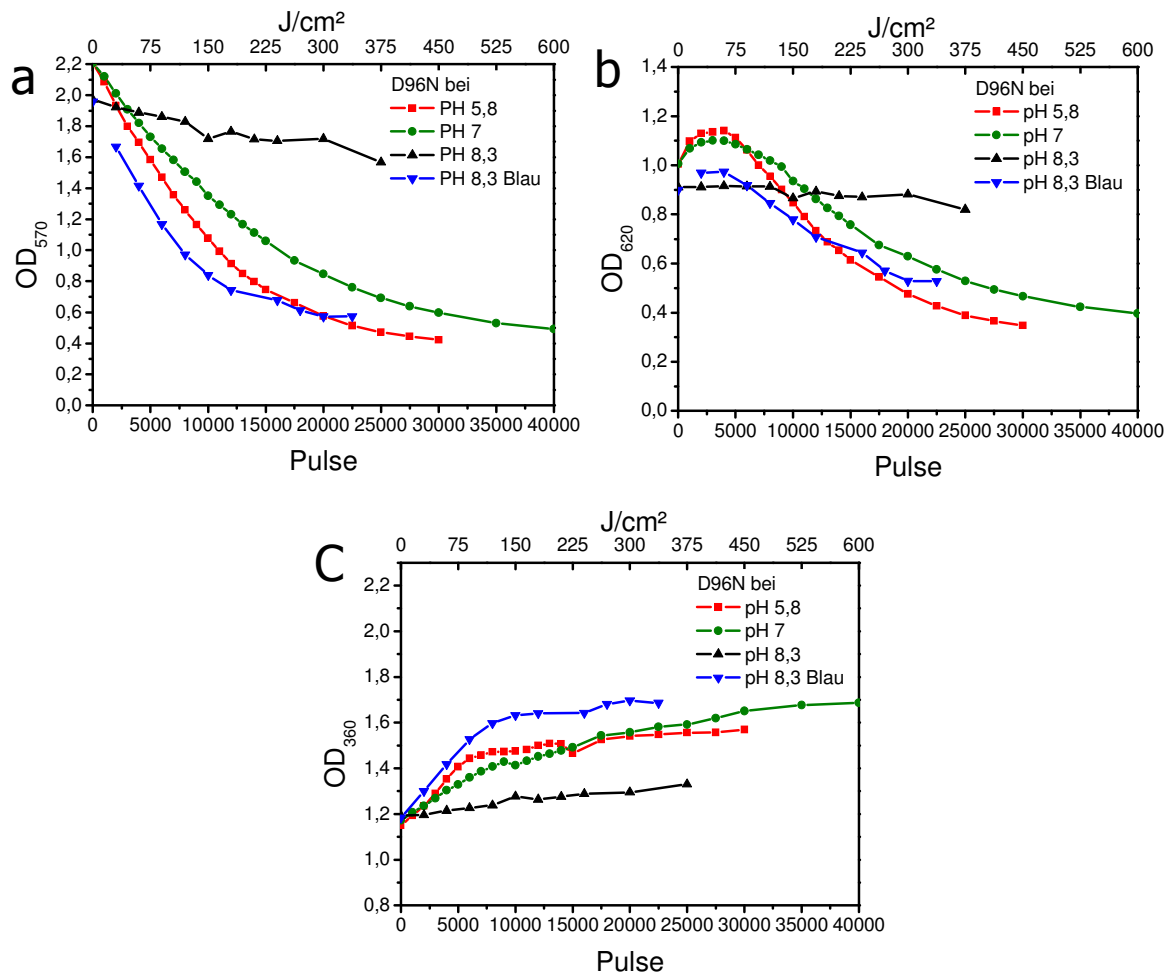
**Tab. 6:** Eigenschaften von Bakteriorhoopsin-Mutanten.

Mutante	Eigenschaft
WT bo	Auswärtsgerichtete H <sup>+</sup> -Pumpe
D85A	Inaktiv
D85T	Inwärts gerichtete Cl <sup>-</sup> -Pumpe
D212A	Inaktiv
D212E	Schwache H <sup>+</sup> -Pumpe (6%)
K216A	Keine Retinalanbindung
D96N	pH abhängige H <sup>+</sup> -Pumpe

#### 4.3.2 Einfluss des pH-Werts

Bei der Mutante D96N führt zusätzliche Belichtung während des Bestrahleins mit dem Laser zu einer Akkumulation des M-Zustands in Abhängigkeit des pH-Werts. Alleine das Streulicht sowie der erste Puls einer Pulsfolge reichen aus, um den M-Zustand stark zu populieren. Damit ist ein permanentes Ausbleichen in den P<sub>360</sub>-Zustand erschwert. In Abb. 27 ist die

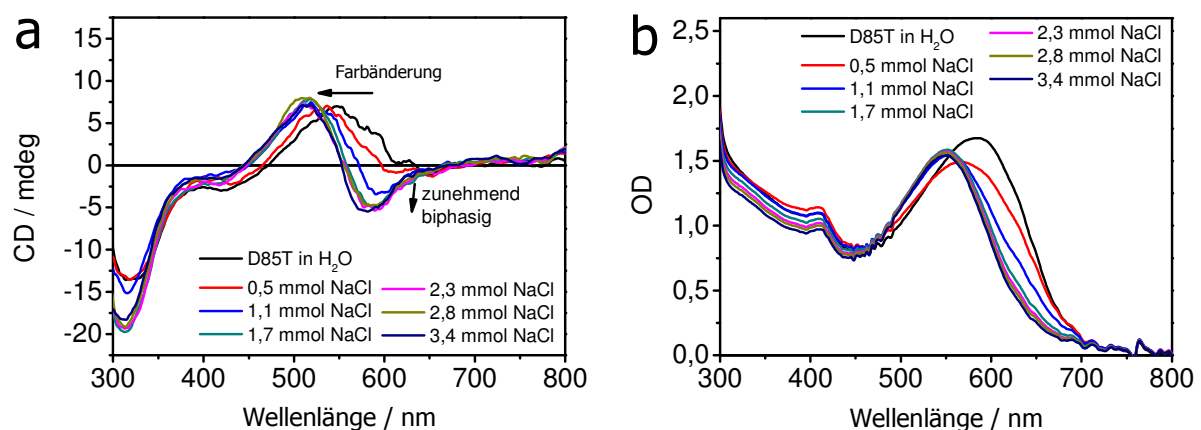
Entstehung der Photoprodukte für verschiedene pH-Werte (0,2 molare Pufferlösungen) gezeigt. Die Bestrahlung von D96N bei pH 8,3 (schwarze Linie) führt im Vergleich zur sauren Lösung bei pH 5,8 nur zu einer geringen Entstehung des gewünschten Photoprodukts bei 360 nm. Durch zusätzliche Blaubeleuchtung bei gleichem pH-Wert kann dieser Nachteil behoben werden. Durch die Wahl des richtigen pH-Werts, möglichst sauer, oder durch Blaubeleuchtung kommt BR aus dem M-Zustand zurück und lässt sich dann permanent ausbleichen.



**Abb. 27:** Der pH-Wert-Einfluss auf die Bildung der TPP-Produkte. (a) Abnahme der OD bei 570 nm mit steigender Pulszahl für verschiedene pH-Werte. (b) Durchlaufen des F<sub>620</sub>-Zustandes mit steigender Pulszahl für verschiedene pH-Werte als OD bei 620 nm. (c) Zunahme der OD bei 360 nm mit steigender Pulszahl für verschiedene pH-Werte.

### 4.3.3 Einfluss des Salzgehalts und Untersuchung der Kristallinität von D85T mit CD-Spektroskopie

Die unkristalline Punktmutante PM-D85T formt kristalline Domänen sobald die tertiäre Struktur durch Chloridionen stabilisiert wird. Dann bildet die Chloridpumpe D85T hexagonale Kristalle in p3-Symmetrie aus, wie sie auch beim Wildtyp vorliegt. Dieser Nachweis wurde bisher mittels SAXS, TEM und AFM-Messungen erbracht.<sup>[75]</sup> Eine wesentlich schnellere Analysenmethode zum Nachweis, dass die Chloridionen einen starken Einfluss auf die Kristallinität haben, ist die Beobachtung, dass sich die Trimere zusammenlagern und ein biphasiges CD-Spektrum aufweisen. Im Gegensatz zu den bisher bekannten Verfahren, die alle einen hohen präparativen Aufwand erfordern, ist die hier vorgestellte CD-Analytik „quasi live“ möglich. Somit kann der Einfluss eines steigenden Chloridgehalts an ein und derselben Lösung beobachtet werden (siehe Abb. 28). Dazu ist der Salzgehalt einer wässrigen D85T-Lösung (OD 2) sechsmal um jeweils 100 mg NaCl von 0,5 mmol bis 3,4 mmol erhöht worden. Es kommt zu dem bereits von UV-Vis-spektroskopischen Messungen bekannten Verschieben der Absorptionsbande. An D85N wurde bereits 1993 von *Katoka* CD-Messungen durchgeführt und von monophasigen Spektren für D85N berichtet. Der Salzgehalt blieb dabei unberücksichtigt.<sup>[76]</sup> Im hier vorgestellten Experiment ist erstmals der Übergang vom monophasigen zum biphasigen CD-Spektrum an D85T in Abhängigkeit der zugesetzten Salzkonzentration gezeigt.

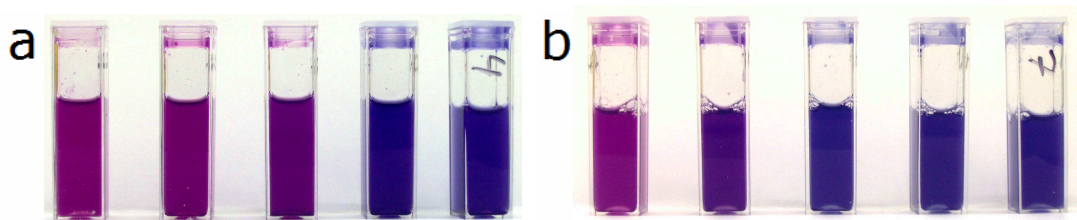


**Abb. 28:** (a) Änderung des monophasigen zum biphasigen CD-Signals. (b) UV-Vis-Spektrum in Abhängigkeit der Chloridionenkonzentration.

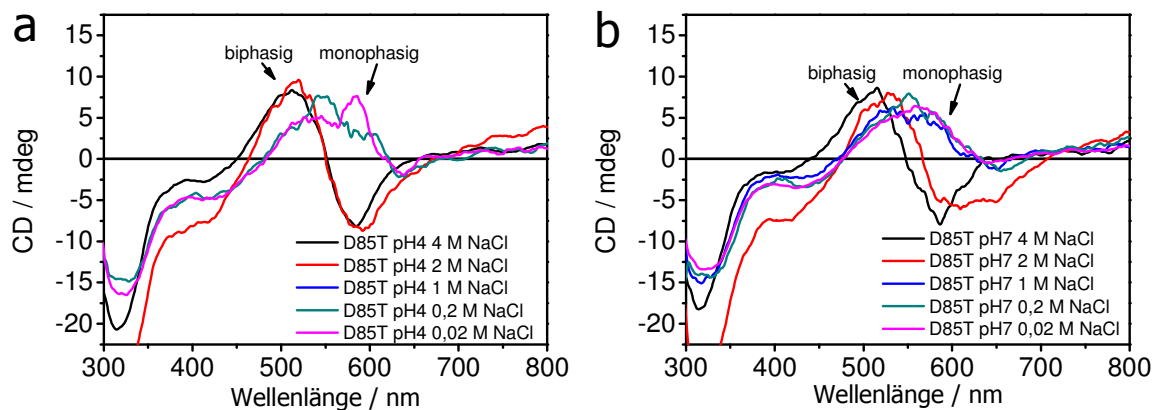
In einem weiteren Experiment ist der zusätzliche Einfluss verschiedener pH-Werte untersucht worden. Dazu sind Pufferlösungen angesetzt worden: Ein 0,1 M Citrat/HCl Puffer mit pH-Wert 4 und ein 0,1 M Phosphatpuffer mit pH-Wert 7 sowie eine gesättigte NaCl-Lösung (72 g auf 200 ml H<sub>2</sub>O). Aus diesen Stammlösungen sind für jeden pH-Wert eine 4 M, 2 M, 1 M,



0,2 M und 0,02 M NaCl-haltige Salzlösungen mit einer D85T-Mutante hergestellt worden ( $OD=2$ ). Ab einer bestimmten Salzkonzentration wird das blaue D85T wieder purpurfarben, das Absorptionsmaximum verschiebt sich um 25-30 nm bathochrom (siehe auch Abb. 34). Im CD-Spektrum verändert sich das monophasige zu einem biphasigen Signal. Dies geschieht im sauren Puffer bereits bei niedrigeren Salzkonzentrationen als im neutralen Puffer. Der Verlauf des CD-Signals ist exemplarisch für pH 4 und pH 7 in Abb. 30 dargestellt.



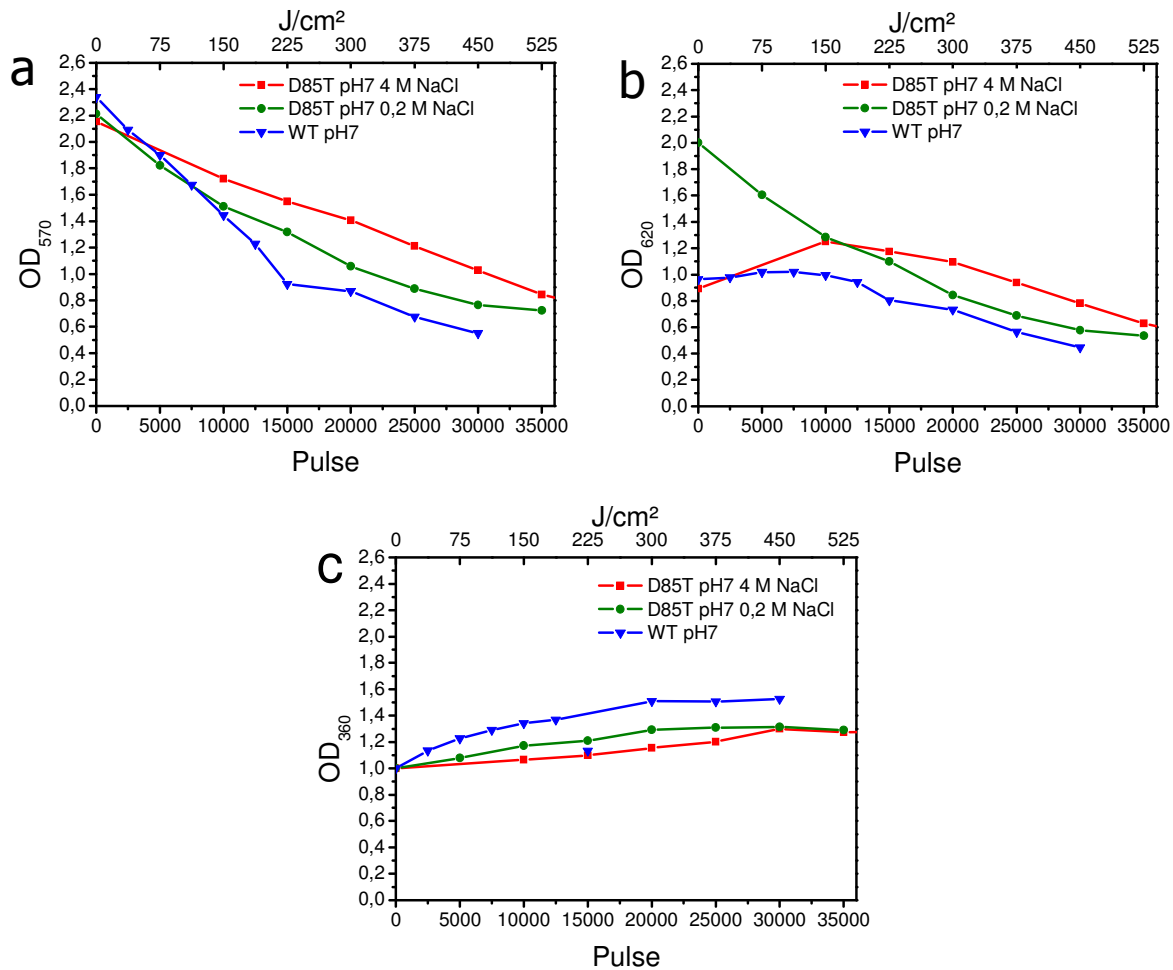
**Abb. 29:** D85T in Puffer mit (a) pH 4 und (b) pH 7 für verschiedene NaCl-Konzentration von links nach rechts abnehmend.



**Abb. 30:** D85T in Puffer mit (a) pH 4 und (b) pH 7 für verschiedene NaCl-Konzentrationen. Übergang vom monophasigen CD-Signal zu einem biphasigen CD-Signal. Die regelmäßige Anordnung der Trimere wird mit höherer Salzkonzentration wieder hergestellt.

Im Vergleich fällt auf, dass die CD-Aktivität der unkristallinen D85T-Variante im Vergleich zu D96N und WT eine geringe CD-Aktivität bei gleicher OD aufweist. Die Elliptizität beträgt weniger als 10 mdeg gegenüber ca. 15 mdeg für WT und D96N. Des Weiteren ist gerade die D85T-Mutante insofern interessant, weil sie einen Blauton aufweist, der ähnlich dem von nicht vollständig permanent gelblichen WT und D96N Proben ist. Bei zunehmender Belaserung tritt zunächst der Übergang vom biphasigen zum monophasigen CD-Signal auf, was als eine Monomerisierung bzw. Aufweitung des hexagonalen Gitters interpretierbar ist. Dies ist ein Hinweis gewesen bei der massenspektrometrischen Messung der TPP-Produkte auf die D85-Stelle zu achten.

Erwartungsgemäß sollte die beim TPP-Prozess für WT beobachtete Decarboxylierung an D85 bei einer D85T-Mutante keine zusätzliche Energie benötigen. Folglich sollte eine geringere Bestrahlungsdosis ausreichen um das TPP-Produkt zu erzeugen. Dazu ist die Bestrahlung der salzhaltigen D85T-Mutante in Lösung (OD=2) in zwei extremen Bedingungen mit 0,02 M NaCl und 4 M NaCl bei pH 7 durchgeführt worden. Auch hier wieder mit einer Energie von 15 mJ pro Puls. In Abb. 31 sind Suspensionen von WT und D85T bei pH 7 miteinander verglichen.



**Abb. 31:** Salzeinfluss auf die Bildung der TPP-Produkte bei D85T im Vergleich mit D96N und WT. (a) Abnahme der OD bei 570 nm, (b) Durchlaufen des  $F_{620}$ -Zustandes als OD bei 620 nm. Die hohe Salzkonzentration führt zu einem höheren Anfangssignal für D85T bei 620 nm, (c) Zunahme der OD bei 360 nm mit steigender Pulszahl.

Für D85T reichen bereits geringe Salzkonzentrationen (NaCl), um eine Verbesserung gegenüber dem WT zu erzielen. Auffällig ist, dass bei hohen Salzkonzentrationen für D85T das Maximum bei OD<sub>620</sub> später erreicht wird als bei den anderen gemessenen Proben, während bei niedriger Salzkonzentration gar kein Maximum auftritt. Unter Berücksichtigung,

dass bei hohen Salzkonzentrationen die CD-Spektren biphasig sind und bei niedrigen Salzkonzentration nicht, kann für die Bildung von den TPP-Intermediaten ( $P_{360}$  und  $P_{340}$ ) postuliert werden, dass die aufgelockerten Wechselwirkungen der BR-Trimere, die ein monophasiges CD-Signal aufweisen, die photochemische Reaktion  $B_{570}$  zu den TPP-Produkten unterstützen. Bei hohen Salzkonzentrationen ist dieser Vorgang für D85T erschwert. Das Auftreten eines monophasigen CD-Spektrums einer BR-Mutante ist möglicherweise ein Indikator für eine niedrigere Energiebarriere für die photochemische Umwandlung in die TPP-Intermediate.

Festzuhalten ist, dass der WT prinzipiell sehr gut für die Datenspeicherung geeignet ist. Für die Verwendung von D85T und D96N müssen zudem der pH-Wert und Salzgehalt kontrolliert werden. Bei D85X Mutanten können durch die Wahl des pH-Werts extreme Änderungen des Absorptionsspektrums erzeugt werden. So dominiert bei pH 7 bereits der blaue O-Zustand und bei basischeren pH-Werten der M-Zustand. D96N eignet sich neben Datenspeicherung auch für einen zweiten technisch nutzbaren Effekt, nämlich der Photochromie. Diese Photochromie kann aufgrund der pH-Wert-Abhängigkeit der Protonenpumpfähigkeit bei Belichtung variabel eingestellt werden.

#### 4.3.4 Einfluss der Temperatur

*Neebe* hat bereits das thermochrome Verhalten von BR gezeigt, dabei kommt es zu einer hypsochromen Verschiebung beim Erhitzen auf  $77^\circ\text{C}$ .<sup>[77]</sup> Das Absorptionsmaximum wandert von 562 nm zu 515 nm. Gleichzeitig sinkt aber die Absorption (siehe Abb. 32).

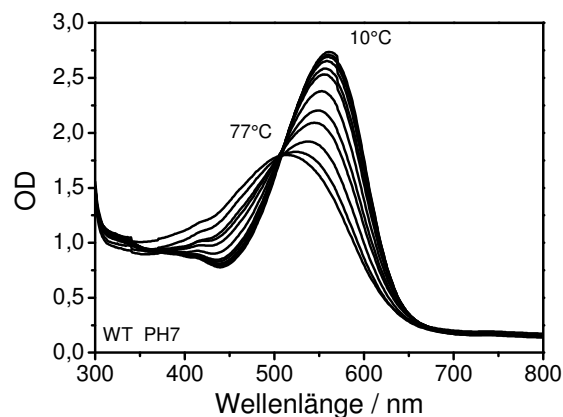
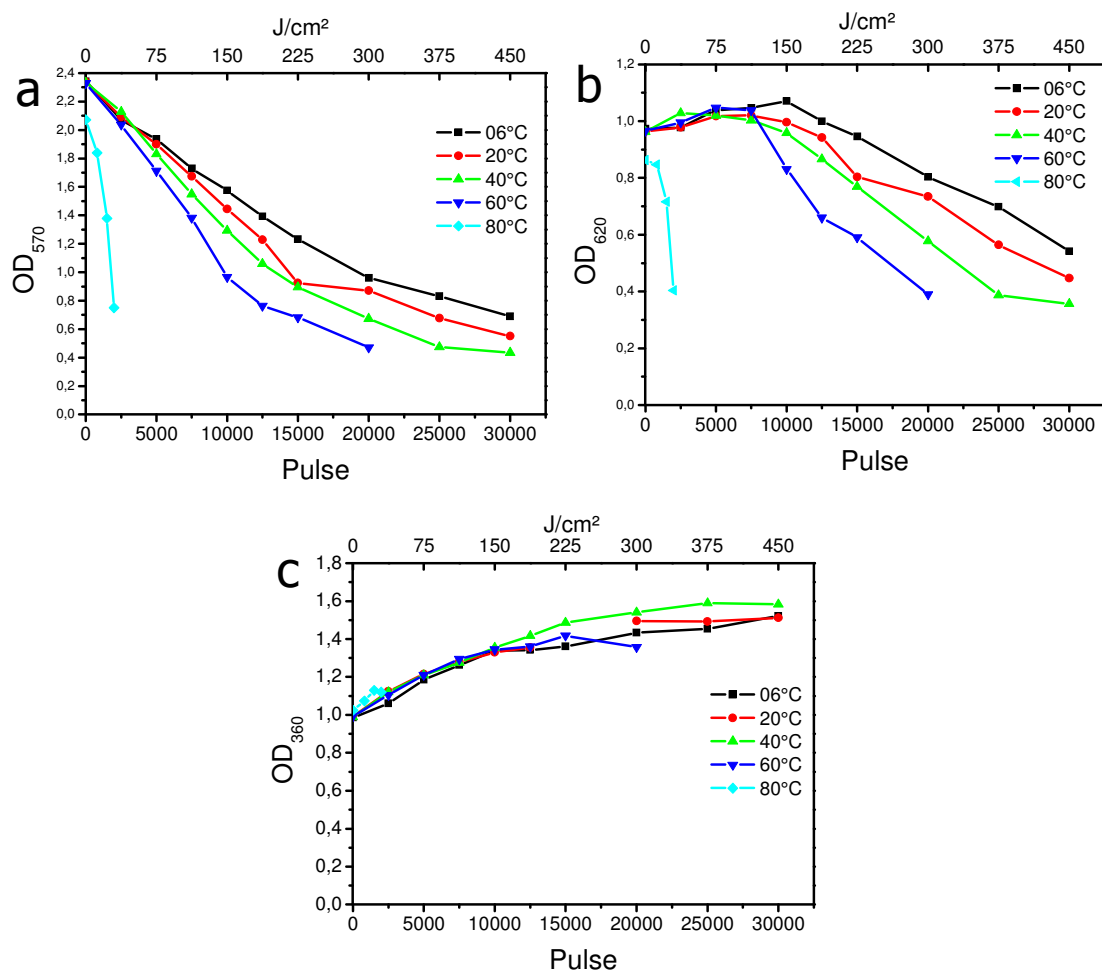


Abb. 32: Thermochrome Verhalten von BR nach *Neebe*.<sup>[77]</sup>

Eine leichte thermische Anregung des BRs bringt also die Absorptionsbande näher in die Emissionswellenlänge des Lasers von 532 nm. Im folgenden Experiment soll der Einfluss einer thermischen Anregung für den Schreibprozess untersucht werden. Es werden WT-Suspensionen bei verschiedenen Temperaturen zwischen 6°C und 80°C bestrahlt und über Nacht relaxieren gelassen. Die bei 80°C bestrahlte Probe bleicht bereits nach wenigen Pulsen aus. Im Folgenden sind die Absorptionen bei spezifischen Wellenlängen für die charakteristischen Zustände B<sub>570</sub>, F<sub>620</sub> und P<sub>360</sub> bei unterschiedlichen Temperaturen miteinander verglichen.



**Abb. 33:** Vergleich der OD (a) bei 570 nm (B-Zustand), (b) 620 nm (F-Zustand) und (c) 360 nm (P-Zustand) in Abhängigkeit der Bestrahlungsdosis.

Für zunehmende Temperaturen ist eine Abnahme der OD bei 570 nm stärker. Da es sich bei diesen Spektren um bereits auf RT abgekühlte Proben handelt, kann diese Abnahme nur auf das Bestrahlen bei erhöhter Temperatur zurückgeführt werden. Für die Zwischenspezies F<sub>620</sub> kann das Erreichen eines Maximums bei höheren Temperaturen mit immer weniger Pulsen erreicht werden. So werden bei Temperaturen von 6°C ca. 10000 Pulse benötigt bei 20°C etwa 7500 und bei 60°C noch etwa 5000 Pulse. Bei 80°C kommt es hingegen sofort zu einer

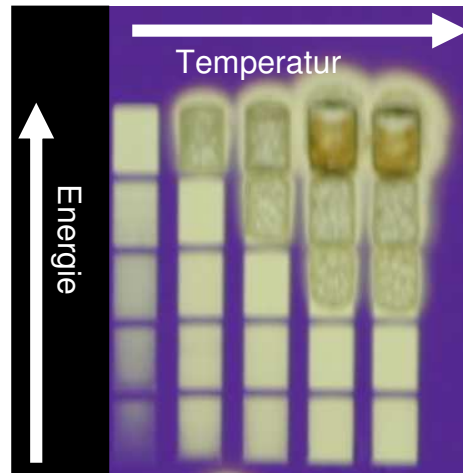
Abnahme der OD bei 570 nm und bei 620 nm. Ein Optimum wird bei 40°C mit 2500 Pulsen für den  $F_{620}$ -Zustand erreicht. Da der  $P_{360}$ -Zustand aus dem  $F_{620}$ -Zustand entsteht, ist auch für das Bilden der  $P_{360}$ -Spezies bei 40°C der maximale Umsatz erreicht.

#### **4.3.4.1** *Untersuchung des Temperatureinflusses auf das Beschreiben von BR-Filmen*

Neben dem bereits vorgestellten Temperatureinfluss auf BR in Suspension ist für die Datenspeicherung noch der Temperatureinfluss auf die Matrix in der BR fixiert (also den Gelatinefilm) als auch das Substrat zu berücksichtigen. Dazu wird Infrarotthermografie an BR-Filmen durchgeführt. Gerade beim orts aufgelösten, fokussierten Bestrahlen von BR-Filmen zur Datenspeicherung ist die lokale Temperatur sehr hoch. Durch zuviel Hitze kann sich die Gelatinematrix oder das Substrat erweichen bzw. aufschmelzen.

Wie bereits in Lösung gezeigt, spielt die Temperatur für das permanente Bleichen eine wichtige Rolle. Da in Lösung bereits die hohen Temperaturen untersucht worden sind, wird an BR-Filmen zunächst die Untersuchung bei extrem niedrigen Temperaturen durchgeführt. Dazu wird der BR-Film in Flüssigstickstoff getaucht und auf -70°C gekühlt. Bei diesen tiefen Temperaturen reicht die Intensität des Lasers nicht aus, um einen BR-Film vollständig permanent auszubleichen. Im Gegensatz dazu reichen die gleichen Laserparameter bei Raumtemperatur sogar aus, um das Substrat beim Beschreiben von BR zu beschädigen bzw. zu verbrennen. Dieser Effekt, des unbeschreibbaren BR-Films, kann durch den Photozyklus des BRs erklärt werden. Durch das Streulicht beim Lasern werden bereits viele BR-Moleküle, die zunächst im B-Zustand vorliegen, über den J, K und L- Zustand in den M-Zustand gebracht. Da die Relaxation in den B-Zustand einige ms benötigt, kommt es zur Akkumulation des M-Zustands bei niedrigen Temperaturen. Dadurch, dass vermehrt BR-Moleküle im M-Zustand als im B-Zustand vorliegen, trifft der Laserstrahl auf weniger stark absorbierende BR-Moleküle und kann diese nicht in den zu erzielenden permanenten  $P_{360}$ -Zustand bringen. In Abb. 34 ist eine BR-Triacetatfolie gezeigt, die direkt nach dem Abkühlen in Flüssigstickstoff bestrahlt worden ist. In der ersten Spalte betragen die Substrattemperaturen ca. -70°C. In den nächsten Spalten erwärmt sich der BR-Film sowie das Substrat auf ca. -30°C, 0°C, +12°C und schließlich bis auf RT. Auffällig ist, dass das Ausbleichen des Feldes unten links unvollständig ist. Bei Erhöhung der eingestrahnten Energie pro Fläche, erzielt durch einen dünneren Linienabstand, wird umliegendes BR bereits erwärmt und ein Ausbleichen ist möglich (oben links). Durch die Erhöhung der

Substrattemperatur (vgl. Spalten von links nach rechts) wird schon bei niedrigen Schreibenergien ein Ausbleichen erreicht.

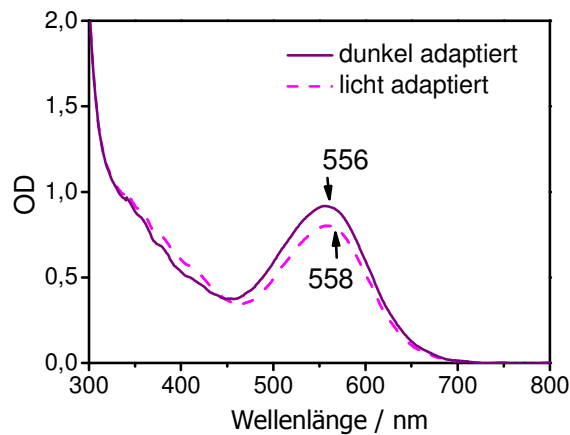


**Abb. 34:** Eine mit BR beschichtete Triacetatfolie wird bei verschiedenen Temperaturen mit 3-9 J/cm<sup>2</sup> bestrahlt. Von links nach rechts: Probe direkt aus Flüssigstickstoff herausgeholt und bestrahlt mit einer Oberflächentemperatur von (-70°C, -30°C, 0°C, 12°C und RT). Bei tiefen Temperaturen wird durch die Anreicherung des M-Zustands ein vollständiges Beschreiben verhindert. Umso höher die Probentemperatur, desto geringere Schreibenergien sind nötig, um Verbrennungen des BR-Films zu erreichen.

Da eine gleichmäßige Temperierung eines BR-Films im Labormaßstab unpraktikabel ist, werden bei allen weiteren Versuchen die Filme bei RT bestrahlt. Während in diesem Kapitel das Bleichverhalten bei verschiedenen Substrattemperaturen beobachtet worden ist, wird in Kap. 4.5.4.3 speziell auf das durch den Laserstrahl bedingte Aufheizen beim Schreiben von Polarisationsdaten eingegangen. Entstehen bei dem Schreibvorgang mit dem Laser zu hohe Temperaturen im BR-Film, sinkt der Polarisationskontrast zwischen zwei orthogonal zueinander geschriebenen Informationen.

#### **4.3.5** Einfluss der Licht-Dunkeladaption

Das Gleichgewicht zwischen dem B<sub>570</sub>- und dem D<sub>550</sub>-Zustand kann durch zusätzliche Beleuchtung oder das Lagern des Films und Lasern im Dunkeln beeinflusst werden. In Abb. 35 ist das Verhalten von BR-Filmen, die im Licht oder im Dunkeln gelagert worden sind, gezeigt.



**Abb. 35:** Vergleich der Absorptionsspektren eines lichtadaptierten (mit Diaprojektorlicht) und dunkeladaptierten (mindestens 3 h im Dunklen gelagerten) BR-Films.

Durch Belichtung ist das Absorptionsspektrum geringfügig hypsochrom verschoben und die maximale Absorption sinkt durch Belichtung. Dieses Verhalten wird im Kap. 4.4.4.9 als Einfluss der Licht-Dunkeladaption auf die optische Datenspeicherung untersucht.

#### **4.3.6** Zusammenfassung der externen Einflüsse auf das Beschreiben von BR-Filmen

Die Tab. 7 stellt die untersuchten Parameter im Hinblick auf die Erzeugung von TPP-Produkten für die Datenspeicherung zusammengefasst dar.

**Tab. 7:** Externe Einflüsse auf das Beschreiben von BR-Filmen und ihre Relevanz für die Datenspeicherung.

Einfluss	für die Datenspeicherung	ungewünschte Nebenprodukte
der eingestrahnten Energie	Bildung der TPP-Produkte	bei geringer Energie: M-Zustand bei hoher Energie: Verkohlung
des pH-Werts	relevant für D96N sauere Bedingung gut	M-Akkumulation im basischen bei D96N
des Salzgehalts	relevant für D85T niedriger Salzgehalt gut	veränderte Absorption
der Temperatur	20-40°C gut	thermochromes Verhalten
der Licht-Dunkeladaption	nach 1. Puls zu vernachlässigen	veränderte Absorption

## 4.4 Speicherprozess auf makromolekularer Ebene

Nachdem bereits die Optimierung des Ausbleichens von PMs gezeigt worden ist, geht es in diesem Kapitel um die Charakterisierung der optischen Polarisationsdatenspeicherung in BR-Schichten. Dazu wird die photoinduzierte permanente Anisotropie im BR-Film mittels Polarimeter untersucht und ein mathematisches Modell entwickelt, das die Eigenschaften des Films beschreibt.

### 4.4.1 Schichtdickenbestimmung mittels LSM und Weißlichtinterferometer

Die Schichtdickenbestimmung der BR-Filme erfolgt mit dem Weißlichtinterferometer oder mittels LSM. Die Schichtdicke aller selbst gerakelten BR-Filme liegt bei 36–40  $\mu\text{m}$ . Mittels Weißlichtinterferometer und LSM sind die Schichtdicken der Filme nach Bestrahlung überprüft worden. In den bestrahlten etwa 5 mm Durchmesser großen Bereichen blieben die Schichtdicken aufgrund des unfokussierten Flat-Top-Profiles des Laserstrahls konstant.

### 4.4.2 Bleichen von BR-Schichten

Die BR-Schichten weisen nach Bestrahlung mit energiereichen Laserpulsen einen permanenten Farbwechsel auf. Dieser Farbwechsel nach der Zweiphotonenabsorption ist bedingt durch die auf molekularer Ebene gezeigten Änderungen am Bakteriorhodopsin. Während die unbeschriebene Stelle bei Tageslicht violett (D96N, WT) oder blau (D85T) aussieht, ist die beschriebene Stelle gelblich transparent. Mit zunehmender Schreibintensität werden diese Bereiche farblos. Mit Hilfe dieser Farbänderung kann BR als optischer WORM-Speicher genutzt werden. Entsprechend einer Information 0 als violetter Zustand und einer 1 als farbloser Zustand. Diese Art der Datenspeicherung ist schon lange bekannt.<sup>[78]</sup>

Der wesentliche Vorteil von BR ist, dass neben der oben genannten Speichertechnik auch die Speicherung von mehreren Informationen 0,1,2,... an einer Stelle im BR-Film möglich ist. Grundlage für eine solche Mehrfachspeicherung von Daten ist die photoinduzierte Anisotropie.

### 4.4.3 Die photoinduzierte Anisotropie in BR-Schichten

Optische Anisotropie eines Mediums kann einerseits durch richtungsabhängige verschiedene Brechungsindices (Doppelbrechung) oder durch unterschiedliche Absorptionseigenschaften



(Dichroismus) bedingt sein. Eine Änderung der Anisotropie in Abhängigkeit einer äußeren Einflussgröße ist zum Beispiel als Spannungsdoppelbrechung bei Materialien bekannt.

Für die Verwendung von BR als Polarisationsdatenspeicher müssen neben dem ortselektiven Ausbleichen weitere Bedingungen erfüllt sein:

- Alle BR-Moleküle müssen fixiert werden (als Film mit Matrixmaterial).
- Der Lichtabsorber Retinal ist annähernd isotrop in dem PM-Film verteilt.
- Der photochemische Prozess ist richtungsabhängig (anisotrop). Dazu muss der verwendete Puls laser linear polarisiert sein.

Die verschiedenen Datensätze werden in unterschiedlichen Polarisationsrichtungen des Schreibstrahls in den Film geschrieben. Dabei ist zu berücksichtigen, dass der Winkel für das Beschreiben mit der Anzahl der zu speichernden Informationen einhergeht. Für das Speichern von 2 verschlüsselten Daten in einen BR-Film kommen die Polarisierung  $0^\circ$  und  $90^\circ$  zum Einsatz. Für das Speichern von 3 verschlüsselten Daten in einem BR-Film werden die Polarisierungen  $0^\circ$ ,  $60^\circ$ ,  $120^\circ$  verwendet. Durch diese Winkelfestlegung ist das Ausleseprozedere bereits vorgegeben. Im Folgenden wird lediglich das Speichern von zwei orthogonal zueinander liegenden Polarisierungen beschrieben.

#### 4.4.3.1 Das Vektorenmodell nach Yang für den Schreibvorgang

Die richtungsabhängige, photochemische Reaktion bzw. das photochemische Bleichen ist nur möglich, wenn das Chromophor parallel orientiert zu dem E-Vektor des Lasers liegt. In einer PM liegt das Retinal in grober Näherung senkrecht zu der PM-Normalen. Das Verhältnis zwischen Länge und Breite des Retinals liegt bei ungefähr 20:1 Die Intensität des Lasers beim photochemischem Bleichen unter einer definierten Polarisationsrichtung muss durch die effektive Intensität ersetzt werden. Allgemein ist die Intensität proportional zum Quadrat der Amplitude der Welle, daraus ergibt sich für die effektive Intensität des Lasers  $I_{\text{eff}}$ :

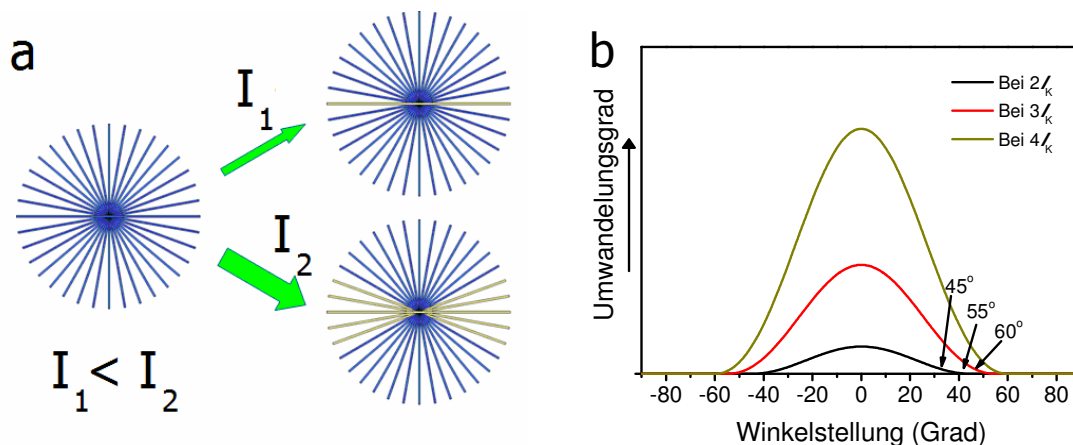
$$I_{\text{eff}} = I_0 \cdot \cos^2 \theta \quad (\text{Malus-Gesetz}) \quad (17)$$

Mit  $I_0$ : Intensität des Lasers,  $\theta$ : der Winkel zwischen dem originalen E-Vektor und der Längsachse des Retinals. Folglich ist auch eine photochemische Anregung von BR-Molekülen, deren Retinal nicht parallel zum E-Vektor des Lasers liegt, möglich. Da es sich bei der irreversiblen Erzeugung des P-Zustandes aber um eine Zweiphotonenabsorption ( $\sim I^2$ ) handelt, muss für die Winkelabhängigkeit mit  $\cos^4 \theta$  gerechnet werden.<sup>[41]</sup>

$$I_{\text{eff}} = I_0 \cdot \cos^4 \theta \quad (\text{Malus-Gesetz für Zweiphotonenabsorption}) \quad (18)$$

Für die Datenspeicherung sind folglich nur die BR-Moleküle interessant, die vorwiegend parallel zum Laserlicht liegen bzw. genügend Intensität für die photochemische Umwandlung erhalten. Nicht angeregte Moleküle, die senkrecht zur Polarisationsrichtung des Lasers stehen, erhalten nur eine Intensität von 0.

Wird die für die Zweiphotonenabsorption benötigte Grenzintensität nicht erreicht, wird BR aus dem B-Zustand nicht in den permanenten beschriebenen Zustand überführt. Lediglich eine reversible Populierung des M-Zustandes ist möglich. Nur bei hoher Intensität des Schreibstrahls können die BR-Moleküle, die einen relativ kleinen Winkel zu dem Schreibstrahl besitzen, irreversibel umgewandelt werden. In Abb. 36 ist ein BR-Chromophoren-Modell gezeigt, bei dem alle Orientierungen der Chromophore im Film als Vektoren eine Kreisprojektion darstellen. Der Film ist zunächst isotrop und die Summe der Vektoren ist gleich 0.



**Abb. 36:** (a) Schematische Darstellung des Schreibens mit polarisiertem Licht bei niedriger und hoher Intensität. Mit zunehmender Intensität werden mehr BR-Moleküle in den F- bzw. P-Zustand umgewandelt, auch wenn sie nicht exakt parallel zur Polarisierung des Lasers liegen. (b) Umwandlungsgrad in Abhängigkeit von der absoluten Winkelstellung der BR-Moleküle zum Schreibstrahls.<sup>[41]</sup>

Yang hat für den Umwandlungsgrad für diese Zweiphotonenreaktion die Gleichung

$$U_G \propto (I_0 \cdot \cos^2 \theta - I_K)^2 \quad (19)$$

aufgestellt. Mit dem Umwandlungsgrad  $U_G$  und  $I_K$  der Grenzintensität für die Reaktion  $B_{570} \rightarrow F_{620}$ . Wenn  $I_0 \cdot \cos^2 \theta - I_K < 0$ , dann ist  $U_G = 0$ . Bei zu hoher Intensität des Schreibstrahls schwächt sich zunächst der Effekt der photoinduzierten Anisotropie ab, da zunehmend Moleküle angeregt werden, die nicht parallel zum Schreibstrahl des Lasers stehen. Bei noch höherer Intensität können die parallel stehenden BR-Moleküle schließlich verkohlt

werden und eine Datenspeicherung ist nicht mehr möglich. Der Datenträger ist beschädigt. Für die hier durchgeführte Untersuchung der Polarisationsdatenspeicherung werden nur Intensitäten unterhalb von  $I_K$  verwendet.

#### 4.4.3.2 *Der Auslesevorgang*

Während für das Schreiben von BR-Filmen mit dem  $\cos^4 \theta$  gerechnet werden muss, ist für das Auslesen nur eine  $\cos^2 \theta$ -Abhängigkeit gegeben, da es sich um eine Einphotonenabsorption handelt.

Beim Auslesen wird die Polarisationssebene des Messlichts auf  $0^\circ$  und  $90^\circ$  gestellt, um die Informationen getrennt voneinander zu lesen. Dazu gibt es zwei Möglichkeiten:

- a) mit einem Polarisator (unter Ausnutzung der anisotropen Absorption von BR als eigener Polarisator)
- b) mit Polarisator und Analysator (nach der Methode von *Yang*)

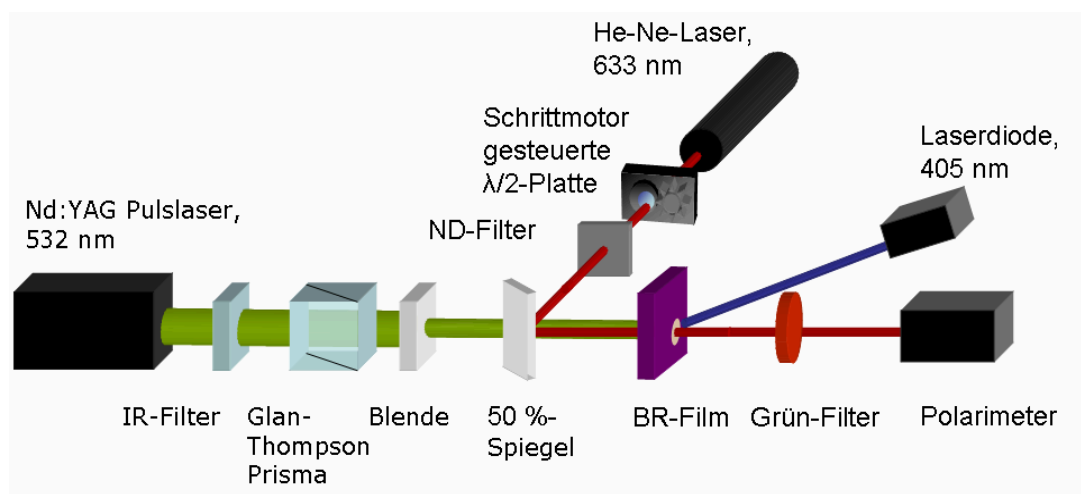
Die Datenspeicherung nach a) ist im Vergleich zu b) eine kontrastarme Methode. Die Datenspeicherung von bis zu 3 Informationen in einem PM-Film ist in Durchlicht bereits von *Yang* gezeigt worden. Zur Beschreibung der induzierten Anisotropie kommt hier die polarimetrischer Messung zum Einsatz..

#### 4.4.4 Beobachtung der Polarisationsänderungen im BR-Film mittels Polarimeter

Grundlage für eine Polarisationsänderung ist eine Form von photoinduzierter Asymmetrie. Da die BR-Moleküle an sich isotrop in der Matrix eingebettet sind, ist für einen unbeschriebenen BR-Film mit dem Polarimeter keine Änderung der Polarisation zu erkennen. Lediglich aufgrund der Absorption des BR-Films ist eine Signaldämpfung aufgetreten.

Durch Beschreiben mit linear polarisiertem Licht kann eine optische Anisotropie im BR-Film erzeugt werden. Der Brechungsindex wird richtungsabhängig, das heißt das Messlicht breitet sich beim Ausleseprozess entlang der x- und y-Richtung mit verschiedenen Lichtgeschwindigkeiten aus. Dabei breitet sich die Lichtwelle bei niedrigeren Brechungsindizes schneller aus als bei hohem Brechungsindex und es kommt zu einer Verzerrung des eingestrahlt Lichts zu einem Rotationsellipsoid. Der beschriebene BR-Film ist folglich als doppelbrechendes und dichroitische Material aufzufassen. Zur Beschreibung dieser Eigenschaften sind die Polarisationszustände bestrahlungsdosisabhängig gemessen

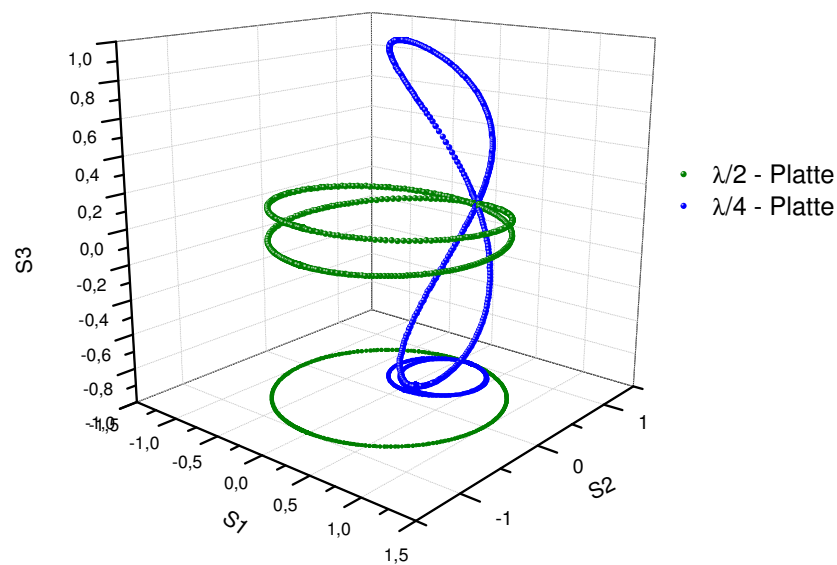
worden. Die Abb. 37 stellt den kombinierten Versuchsaufbau zum Beschreiben und Auslesen der BR-Filme dar. Vorteil dieses Aufbaus ist, dass ein Bewegen des Films zwischen Beschreiben und Auslesen entfällt und somit keine aufwändige Probenpositionierung und Ausrichtung notwendig ist. Zum Beschreiben wird ein Nd:YAG-Pulslaser mit einer Emissionswellenlänge von 532 nm und einem Flat-Top-Profil verwendet. Der Lichtstrahl passiert zunächst einen IR-Filter, um Strahlungsanteile von 1064 nm zu filtern. Mit Hilfe eines *Glan-Thompson-Prismas* wird der bereits horizontale Laserstrahl nochmals besser horizontal polarisiert um geringfügige Depolarisation zu entfernen. Ein Teil des Strahls wird an einer Lochblende mit einem Durchmesser von 0,5 cm bzw. der Fläche 0,20 cm<sup>2</sup> ausgeblendet, durchläuft einen halbdurchlässigen Spiegel und trifft auf den BR-Film. Die gemessene Energie pro Puls beträgt 7 mJ bei einer Frequenz von 20 Hz. Mit Hilfe eines Strahlblockers wird der Strahl vor dem Polarimeter beim Beschreiben des BR-Films absorbiert. Des Weiteren ist das Polarimeter mit einem Grünfilter vor Streulicht anderer Lasersysteme geschützt. Mit Hilfe einer zusätzlichen blauen Laserdiode mit 405 nm kann die Nebenreaktion von dem B<sub>570</sub>-Zustand in den M<sub>410</sub>-Zustand unterdrückt werden. Zum Auslesen der in den BR-Film geschriebenen Bereiche wird ein He-Ne-Laser mit einer drehmotorisierten  $\lambda/2$ -Platte verwendet. Dadurch kann eine beliebige, lineare Polarisationsrichtung des Messlichts angesteuert werden. Die Intensität des He-Ne-Lasers wird mit einem Graufilter (OD=1,34) vermindert. Die Polarisationsänderungen im BR-Film werden mit dem Polarimeter (*PAX5720VIS-T*, Fa. *Thorlabs*) detektiert. Die polarisationswinkelabhängigen Messdaten werden mit einem in *LABVIEW 8.2* (Fa. *National Instruments*) erstellten Programm aufgenommen.



**Abb. 37:** Versuchsaufbau zum Beschreiben der BR-Filme mittels Nd:YAG-Pulslaser und anschließendem Lesen der belaserten BR-Filme mittels He-Ne-Laser ohne Probenbewegung.

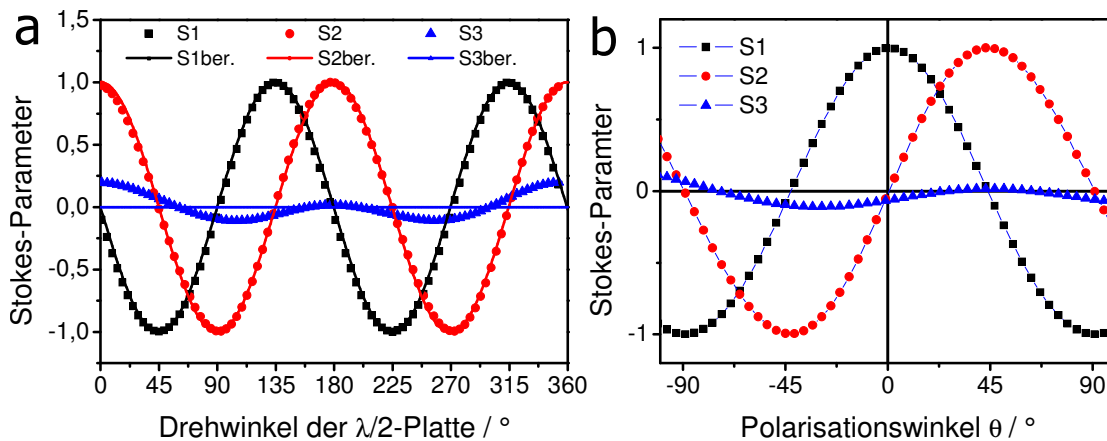
#### 4.4.4.1 Kalibrierung des polarimetrischen Messverfahrens

Zunächst wird durch Kontrollexperimente der Aufbau überprüft. Dazu werden in den Strahlengang wahlweise eine  $\lambda/2$ -Platte, eine  $\lambda/4$ -Platte, ein Polfilter oder ein isotroper Graufilter eingebaut. Die Darstellung eines charakteristischen Verlaufs des Messsignals auf der *Poincaré*-Kugel für eine  $\lambda/4$ - und  $\lambda/2$ -Platte ist in Abb. 38 zu sehen. Die erzeugte Abweichung von einer idealen Kreisbahn der  $\lambda/2$ -Platte ist darauf zurückzuführen, dass die als Referenzprobe gemessene  $\lambda/2$ -Platte nicht exakt positioniert und für 532 nm statt 633 nm ausgelegt ist.



**Abb. 38:** Beispiel für die Winkelabhängigkeit einer  $\lambda/4$ - und  $\lambda/2$ -Platte gemessen mit dem Polarisationsmessaufbau für eine volle Umdrehung der Platte. Die Schwankungen in  $S_3$  für die  $\lambda/2$ -Platte sind durch den leicht schrägen Einbau bedingt, theoretisch sollte sich ein Kreis ergeben.

Der Kurvenlauf für eine ideale  $\lambda/2$ -Platte weist für die *Stokes*-Parameter  $S_1$  einen cosinus- bzw. für  $S_2$  sinusförmigen Verlauf auf. Die gemessenen *Stokes*-Parameter stimmen mit den für  $S_1$  und  $S_2$  berechneten Werten überein. Allerdings kommt es für  $S_3$  aufgrund einer leichten Elliptizität zu geringfügig abweichenden Werten. Der Vergleich zwischen berechnetem und gemessenem Verlauf ist in Abb. 39 zu sehen. Der *Stokes*-Vektor für ideal polarisiertes Licht enthält für  $S_3$  den Wert 0, da theoretisch die Differenz von  $I_L$  und  $I_R$  gleich groß ist. Da der He-Ne-Laser so aufgebaut wird, dass er eine Polarisation von  $-45^\circ$  besitzt und die  $\lambda/2$ -Platte gegenüber der Winkelskala der  $\lambda/2$ -Platte-Halterung einen Versatz von etwa  $2^\circ$  besitzt, wird eine Anpassung der Messwinkel zur realen Polarisationsrichtung vorgenommen. Das Bezugssystem ist so gewählt, das  $0^\circ$  und  $180^\circ$  für horizontale Polarisation und  $90^\circ$  und  $270^\circ$  für vertikale Polarisation stehen.



**Abb. 39:** Auftragung der *Stokes-Parameter* gegen die Polarisation des Messlichts für den Durchgang einer  $\lambda/2$ -Platte. Das eingehende Licht ist  $45^\circ$  polarisiert. Dementsprechend ist der *Stokes-Parameter*  $S_1 = 0$  und  $S_2 = 1$  für den Drehwinkel  $0^\circ$ . Beim Drehen der  $\lambda/2$ -Platte um weitere  $+45^\circ$  verändert sich die Polarisation zunächst in Richtung vertikales Licht, die *Stokes-Parameter* laufen zu den Werten  $S_1 = -1$  und  $S_2 = 0$ .

Ein streuendes Objekt führt zu einer stark fluktuierenden Messkurve. Durch das Einbringen eines isotrop absorbierenden Graufilters ändert sich nicht die Polarisationsrichtung des Lichtes, somit bleiben  $S_1$  bis  $S_3$  konstant. Es sinkt ausschließlich die Intensität des gemessenen Signals. Gleiches gilt für isotrop absorbierende BR-Filme vor der Bestrahlung.

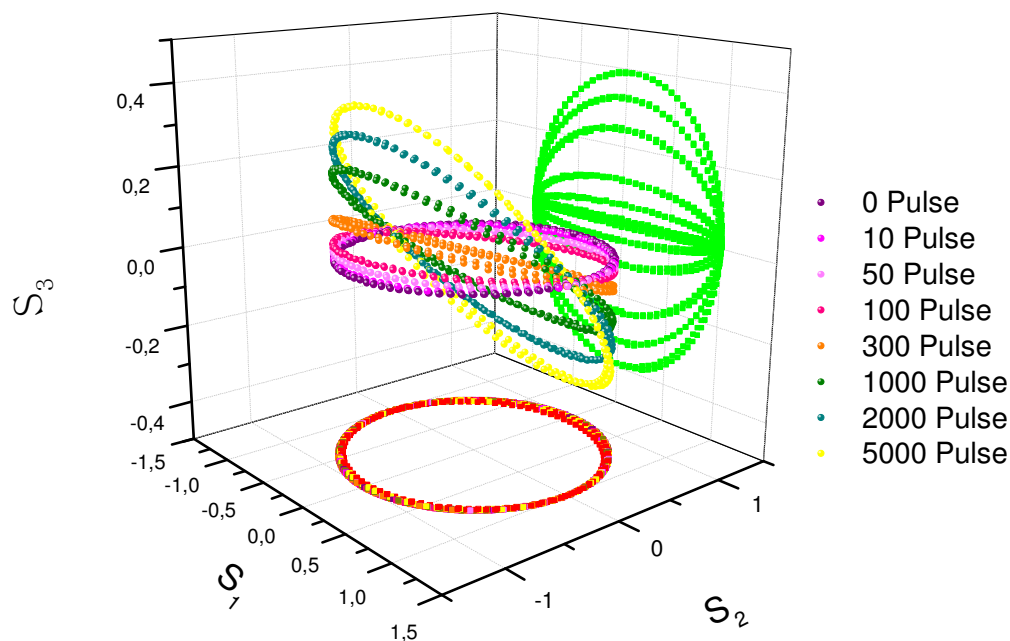
#### 4.4.4.2 Versuchsdurchführung

Zunächst wird jeweils eine Blindmessung durchgeführt, ohne dass optische Bauteile in den Strahlengang eingebaut sind. Nach der Kalibrierung kann der BR-Film gemessen werden. Dieser zunächst noch optisch isotrope Film mit der Bezeichnung „Messung 0 Pulse“ zeigt keine Änderung der *Stokes-Parameter* unter verschiedenen Messwinkeln. Es wird ein kreisförmiger Verlauf mit  $S_3 = 0$  erhalten. Lediglich eine Intensitätsabnahme aufgrund der OD ist zu detektieren. Da bereits eine leichte Verkippung der zu messenden Probe zu einer erhöhten Elliptizität ( $S_3$ -Auslenkung) führt, wird der BR-Film nach Montage im Mess- und Belichtungsaufbau nicht mehr bewegt. Dadurch sind die Veränderungen der Polarisation nur auf das Belasern des Films zurückzuführen. Beim Vergleich von verschiedenen Filmen unterschiedlicher OD muss auf die korrekte Ausrichtung der Probe geachtet werden. (Dies gelingt durch Vergleich der Hintergrundmessung ohne BR-Film mit dem isotropen BR-Film vor der Belichtung). Um nur die BR-Eigenschaften zu charakterisieren, wird eine Korrektur des Messsignals durchgeführt. Dazu wird eine Messung eines Gelatinefilms ohne Farbstoff gleicher Dicke vorgenommen. Die zur Auswertung verwendeten Daten werden um diesen Blindwert korrigiert.

#### 4.4.4.3 Ergebnisse der Polarisationsmessungen – Veränderungen der Stokes-Vektoren

Für einen unbestrahlten BR-Film ergibt sich auf der *Poincaré*-Kugel beim Auslesen mit allen möglichen Polarisationsrichtungen ein äquatorialer Kreis (siehe Abb. 40). Der Film ist isotrop absorbierend und verändert nicht die Polarisation des Messlichts. Wird mit horizontal polarisiertem Licht der BR-Film permanent geblichen, so ist die Zunahme der Elliptizität als Verkippung dieses Kreises sichtbar.

In der Projektion auf der  $S_1$ - $S_3$ -Ebene wird die Hauptveränderung, die beim Beschreiben mit horizontal polarisiertem Licht auftritt, beim Durchlaufen verschiedener Messpolarisationen sehr gut beschrieben. Die anfänglich gerade Linie auf der  $S_1$ - $S_3$  Ebene wird zunehmend elliptisch. Hingegen zeigt die Projektion auf der  $S_1$ - $S_2$ -Ebene einen Kreis. Für den  $S_1$ -Wert kann keine Veränderung beim Schreiben festgestellt werden. Die Veränderungen von  $S_2$  sind vernachlässigbar klein gegenüber den Veränderungen an  $S_3$ .

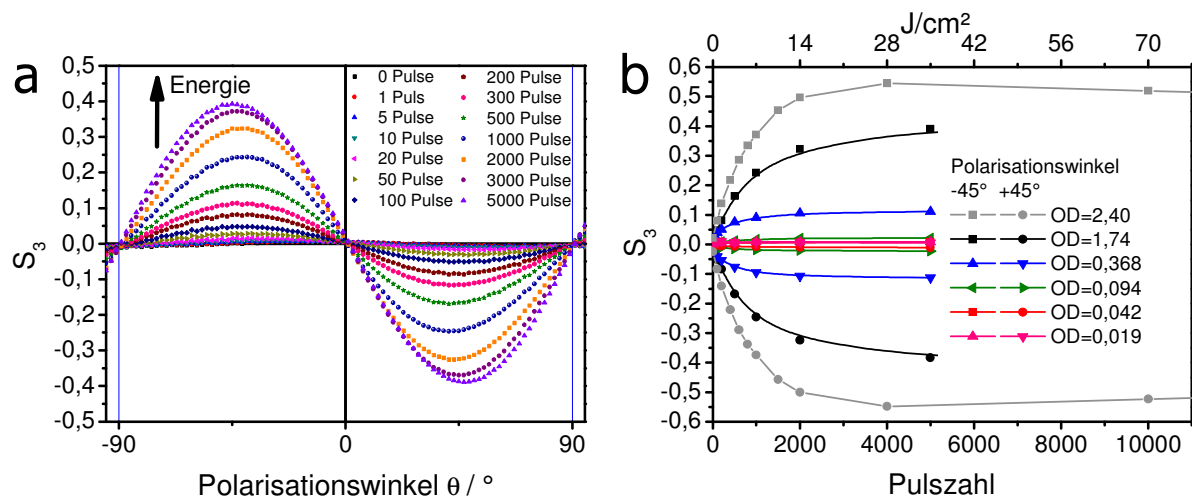


**Abb. 40:** *Poincaré*-Darstellung für die bestrahlungsabhängige Veränderungen der Polarisation eines BR-Films. Die zusätzlichen Projektionen auf der  $S_1$ - $S_2$ -Ebene ergeben einen Kreis und auf der  $S_1$ - $S_3$ -Ebene eine elliptische Verzerrung in Abhängigkeit der eingestrahnten Intensität (bzw. der Pulzzahl).

Die bestrahlungsintensitätsabhängigen Veränderungen beim Beschreiben von BR-Filmen werden mit den Änderungen des  $S_3$ -Vektors gut beschrieben. Dieses ist in Abb. 41 a für verschiedene Polarisationswinkel des Messlichts dargestellt. Festzustellen ist, dass mit zunehmender Pulzzahl bzw. Energie die Amplitude des  $S_3$ -Vektors ansteigt. Maxima und Minima treten bei linear polarisiertem Messlicht unter  $\Theta = -45^\circ$  bzw.  $\Theta = +45^\circ$  auf.

Mit einer höheren OD des Filmes bei gleicher Pulzahl bzw. Energie treten größere Anisotropieveränderungen als mit geringer OD auf. Dieses ist in Abb. 41 b als Zunahme des  $S_3$ -Werts für verschiedene ODs dargestellt. Die oberen Kurven sind für einen Messwinkel von  $-45^\circ$  und der untere Teil der Kurven für  $+45^\circ$  der eingehenden Polarisation dargestellt.

Am Beispiel eines BR-Films mit  $OD=2,4$  ist zu sehen, dass der  $S_3$ -Parameter genauso wie bei den niedrigeren ODs zunächst ansteigt und nach Erreichen des Maximums bei ca. 5000 Pulsen sehr langsam wieder abnimmt. Bei weiterer Bestrahlung fällt auf, dass die Abnahme der Anisotropie sehr viel langsamer abläuft, da die senkrecht zur Polarisationsschreibrichtung des Lasers liegenden BR-Moleküle viel unwahrscheinlicher mit dem Licht wechselwirken.



**Abb. 41:** (a) Verlauf des  $S_3$ -Vektors für verschiedene Polarisationen des Messlichts in Abhängigkeit der Bestrahlungsintensität. Gezeigt sind die Änderungen für einen BR-WT –Film mit einer  $OD = 1,74$ .

(b) Änderungen von  $S_3$  für verschiedene OD.  $S_3$  ist immer positiv (negativ), wenn der Polarisationswinkel des Ausleselichts  $-45^\circ$  ( $+45^\circ$ ) beträgt. Umso höher die OD des BR-Films, desto höhere Veränderungen von  $S_3$  können erreicht werden. Bei ca. 5000 Pulsen ( $3,5 \text{ MWcm}^{-2}$ ) wird ein Maximum für den Film mit einer OD von 2,4 erreicht.

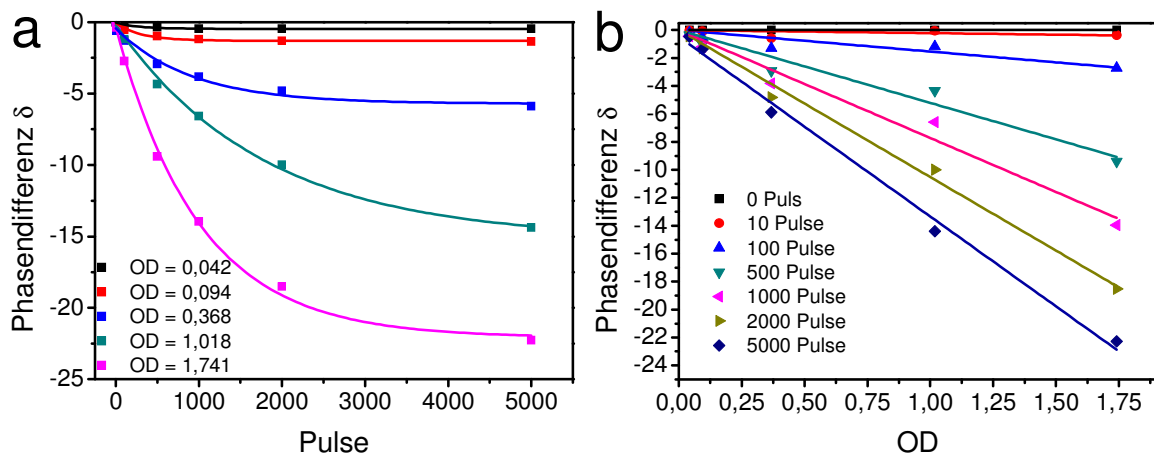
#### 4.4.4.4 Veränderungen der Phasendifferenz $\delta$

Bisher sind die Veränderung des *Stokes*-Parameter  $S_3$  beim Beschreiben eines BR-Films gezeigt worden. Diese Änderungen könnten im Rahmen einer Datenspeicherung auch später in einem BR-Datenspeicher in Form einer Phasendifferenz eines beschriebenen Feldes ausgelesen werden. Da sich neben  $S_3$  aber auch  $S_2$  geringfügig ändert, während  $S_1$  konstant bleibt, wird die Phasendifferenz  $\delta$  über (24) berechnet:

$$\delta = \arctan\left(\frac{S_3}{S_2}\right) \quad (20)$$



Für die Grenzfälle horizontal polarisiertes ( $\theta = 0^\circ$ ) und vertikal polarisiertes Messlicht ( $\theta = 90^\circ$ ) ist die Phasendifferenz nicht definiert, da einer der beiden elektrischen Feldvektoren  $E_x$  bzw.  $E_y$  gleich 0 ist, während der andere maximal wird. Für einen beschriebenen Film liegt unter beliebigen Polarisationsauslesewinkeln, zwischen den zuvor benannten Winkeln, immer eine Phasenverschiebung vor. Wird die Phasendifferenz  $\delta$  gegen die Pulszahl aufgetragen, ist ein exponentieller Abfall dieser ersichtlich (siehe Abb. 42 a). Außerdem ist zu erkennen, dass eine höhere OD zu größeren Beträgen der Phasendifferenz  $\delta$  führt. Je mehr Chromophore zum Ausbleichen zu Verfügung stehen, desto stärker ist der erreichbare photoinduzierte Effekt der Phasendifferenzänderung, bedingt durch den Brechungsindexunterschied des ungeblichenen und geblichenen BRs (vgl. Abb. 42 b).



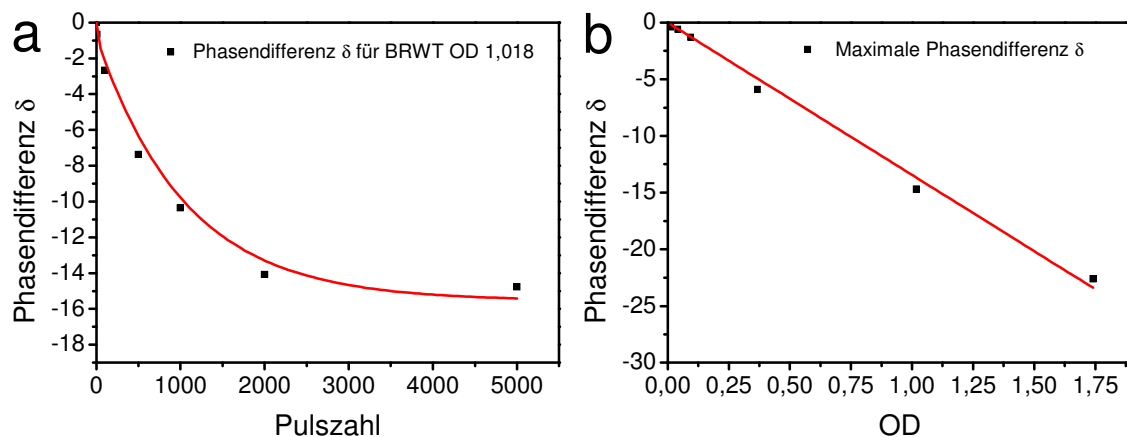
**Abb. 42:** (a) Exponentieller Verlauf der Phasendifferenz  $\delta$  bei steigender Schreibenergie in Form mehrerer Pulse. Jeweils für verschiedene OD-Werte gezeigt. Je höher der OD-Wert ist, desto höher ist der Betrag der Phasendifferenz  $\delta$  bei gleicher Pulszahl. (b) Auftragung der maximalen Phasendifferenz  $\delta$  gegen die OD des jeweiligen BR-Films. Mit zunehmender OD erhöht sich linear der Betrag der erzielbaren Phasendifferenz  $\delta$ .

#### 4.4.4.5 Minimaler OD-Wert für die optische Datenspeicherung

Um die Kosten für einen BR-Datenspeicher niedrig zu halten, ist es wünschenswert bei minimalen BR-Konzentrationen unterscheidbare Signale eines Polarisationsdatenspeichers zu erhalten. Dazu ist die Phasendifferenz  $\delta$  von bestrahlten Filmen in Abhängigkeit der ODs von BR-Filmen untersucht worden. Die maximale Phasendifferenz ist aus den Messungen nach 5000 Pulsen bei Filmen mit einer OD größer als 0,042 ermittelt worden. Prinzipiell ist auch bei Filmen, die eine geringere OD aufweisen noch eine Phasendifferenz vorhanden. Allerdings liegen die dabei ermittelten Werte für  $S_3$  bei einem Film (OD 0,012) mit einer maximalen Amplitude von 0,006 an der Grenze der Messgenauigkeit des Polarimeters von 0,005.<sup>[48]</sup> Ausgehend von dieser messtechnischen Einschränkung kann nur eine

Phasendifferenzänderung bis  $0,29^\circ$  detektiert werden. Die durch Laserbeschreiben erzielbare Änderung eines Films mit  $OD = 0,012$  liegt bereits bei  $-0,38^\circ$ .

In Abb. 43 ist die maximal erreichbare Phasendifferenz für verschiedene ODs angegeben. Es ergibt sich ein linearer Zusammenhang. Mit zunehmender OD erhöht sich die erzielbare Phasendifferenz. Es ist davon auszugehen, dass selbst bis zu einer Monolage von BR (entspricht  $OD=0,002$ ) eine optische Datenspeicherung mit einer erzeugten Phasendifferenz ( $0,03$ ) zu erhalten ist, allerdings sind diese geringen Phasendifferenzen nicht mit handelsüblichen Messsystemen zu detektieren.

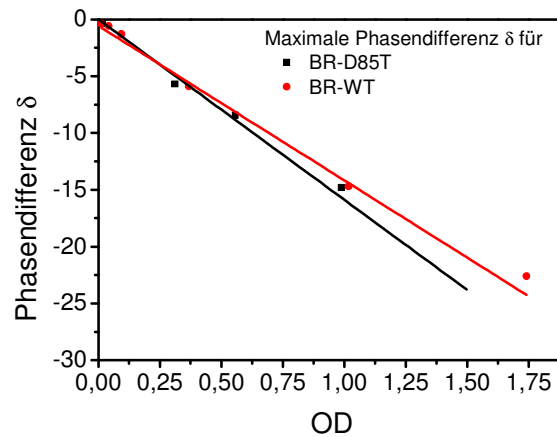


**Abb. 43:** Auftragung der maximalen durch TPP induzierten Phasendifferenz in Abhängigkeit von (a) der Pulszahl (b) von der OD der Filme.

#### 4.4.4.6 Vergleich zwischen dem BR-WT und der BR-D85T-Mutante auf die erzielbare Phasendifferenz

Durch die Wahl einer BR-Mutante werden Vorzüge bei der Polarisationsdatenspeicherung erwartet. Die BR-D96N-Mutante ist aufgrund ihrer leichter anregbaren M-Population zu vermeiden. Demzufolge wird hier nur der WT gegenüber der D85T-Mutante verglichen. Yang konnte durch Verwenden der D85T-Mutante bei gleich bleibender Schreibintensität eine größere Polarisationsänderung im Vergleich zu BR-D96N erzeugen. Wird die Phasendifferenz  $\delta$  gegen die OD aufgetragen, so wird eine lineare Abhängigkeit der Phasendifferenz erhalten. Im Vergleich mit BR-WT ist der Betrag der Steigung der Ausgleichsgeraden von BR-D85T ( $m_{D85T} = -15,88$ ) um den Faktor 1,13 größer als die von BR-WT ( $m_{WT} = -13,64$ ). Das bedeutet, dass bei gleicher OD und Schreibintensität durch das Verwenden der D85T-Mutante eine betragsmäßig höhere Phasendifferenz erhalten wird. Dieses führt zu einem besseren Auslesekontrast zweier orthogonal polarisiert geschriebener

Informationen. Somit ist der Vorteil der D85T-Mutante gegenüber dem WT für die Polarisationsdatenspeicherung nachgewiesen.



**Abb. 44:** Erzielbare Phasendifferenz bei verschiedenen Mutanten. Der Betrag der Steigung der Ausgleichsgeraden von BR-D85T ist leicht größer als die von BR-WT.

#### 4.4.4.7 Brechungsindexänderung

Aus der erzielten Phasendifferenzänderung  $\delta$  kann über die Änderung des Brechungsindex  $\Delta n$  berechnet werden.

$$\Delta n = \frac{\lambda \cdot \delta}{2\pi \cdot d} \quad (21)$$

Für einen BR-WT -Film (OD = 1,74) ergibt sich bei einer Schichtdicke  $d$  von  $40 \mu\text{m}$  und einer Bestrahlung mit 5000 Pulsen ( $3,5 \text{ MWcm}^{-2}$ ) ein Brechungsindexänderung von:

$$\Delta n_{OD=1,74} = \frac{633 \text{ nm} \cdot (-22,6)^\circ}{2\pi \cdot 40 \mu\text{m}} = -0,99 \times 10^{-4} \quad (22)$$

Der Brechungsindex des TPP-Produkts ist kleiner als die des unbeschriebenen BR-Films. Das Vorzeichen der Brechungsindexänderung und die Größenordnung ( $10^{-4}$ ) stimmt mit vorherigen Ergebnissen überein.<sup>[79]</sup> Aufgrund der linearen Beziehung zwischen Phasendifferenz  $\delta$  und Brechungsindexänderung  $\Delta n$  ergibt sich folgender Graph (Abb. 45).

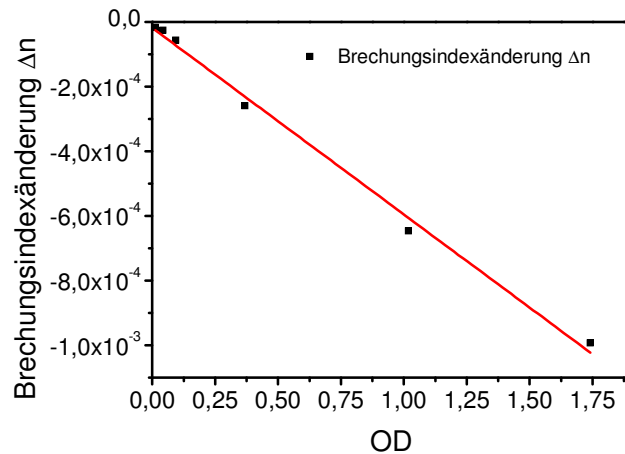


Abb. 45: Auftragung der maximalen Brechungsindexänderung  $\Delta n$  gegen die OD des jeweiligen BR-Films.

#### 4.4.4.8 Frequenzabhängigkeit des Beschreibens

An dieser Stelle wird exemplarisch für zwei Frequenzen ein Vergleich für die induzierbare Anisotropie angestellt. Eine Verdopplung der Schreibfrequenz von 20 Hz auf 40 Hz bringt keine Veränderungen bei der Messung des *Stokes*-Parameter  $S_3$  (siehe Abb. 46). Die Kurven für die gleiche Anzahl an Pulsen liegen nahezu übereinander. Lediglich ein Versatz um 0,01 auf der  $S_3$ -Achse ist zu erkennen. Dieses kann aber auf die Neupositionierung der Probe zurückgeführt werden. Auch bei höheren Frequenzen von bis zu 20 kHz sind BR-Filme mit unterschiedlichen Polarisationsseigenschaften erzeugt worden.

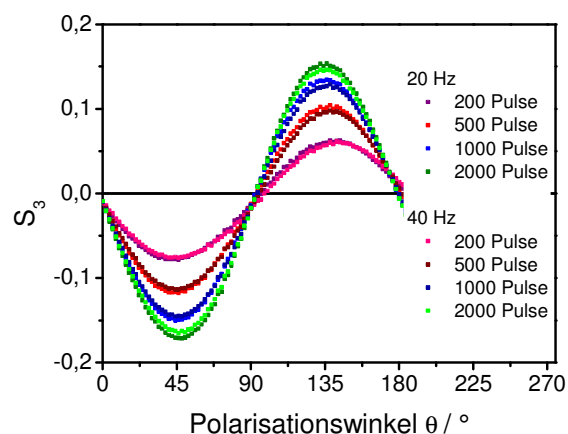
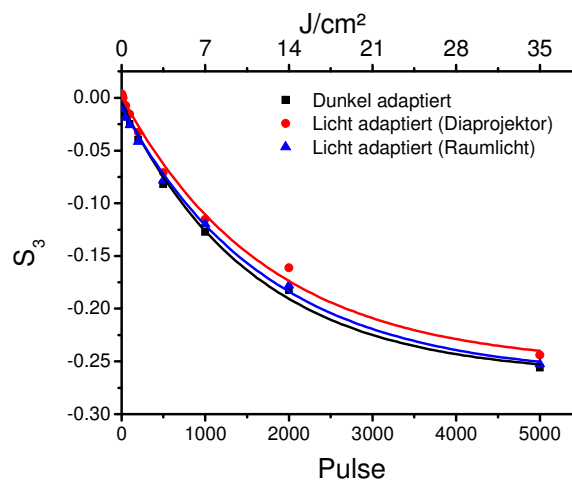


Abb. 46: Frequenzabhängige Bestrahlung eines D85T-Films mit OD 0,6. Es ist kein Unterschied zwischen den verschiedenen Schreibfrequenzen für die Polarisationsdatenspeicherung festzustellen.

#### 4.4.4.9 Einfluss der Licht-Dunkeladaption auf die optische Datenspeicherung

Die Licht-Dunkeladaption von BR wird auf ihren Einfluss auf die optische Datenspeicherung untersucht. Dazu wird ein BR-Film einmal bei Standardbeleuchtung im Laserlabor, in

Dunkelheit und im Lichtschein einer Diaprojektorlampe im Abstand von 60 cm mittels Puls laser horizontal beschrieben und anschließend mit dem oben beschriebenen Aufbau gemessen. Für die Dunkeladaptation wird der Film ungefähr 2 h vor der Messung im Dunkeln gelagert bzw. für die Diaprojektorbeleuchtung 30 min vorher beleuchtet. In Abb. 47 ist die Änderung des  $S_3$ -Parameters in Abhängigkeit der Pulszahl und der gewählten Bedingung gezeigt. Auffällig ist, dass die lichtadaptierte Probe weniger starke Änderungen des  $S_3$ -Parameters erfährt. Dies lässt sich auf das geringere Absorptionsverhalten bei der Schreibwellenlänge zurückführen und kann durch Beschreiben mit einer höheren Pulsanzahl ausglichen werden. Insofern kann dieser Einfluss für die Polarisationsdatenspeicherung vernachlässigt werden. Für BR-Schichten wird deshalb von einem geringen Einfluss der Licht-Dunkeladaptation auf den Schreib- und Leseprozess ausgegangen.



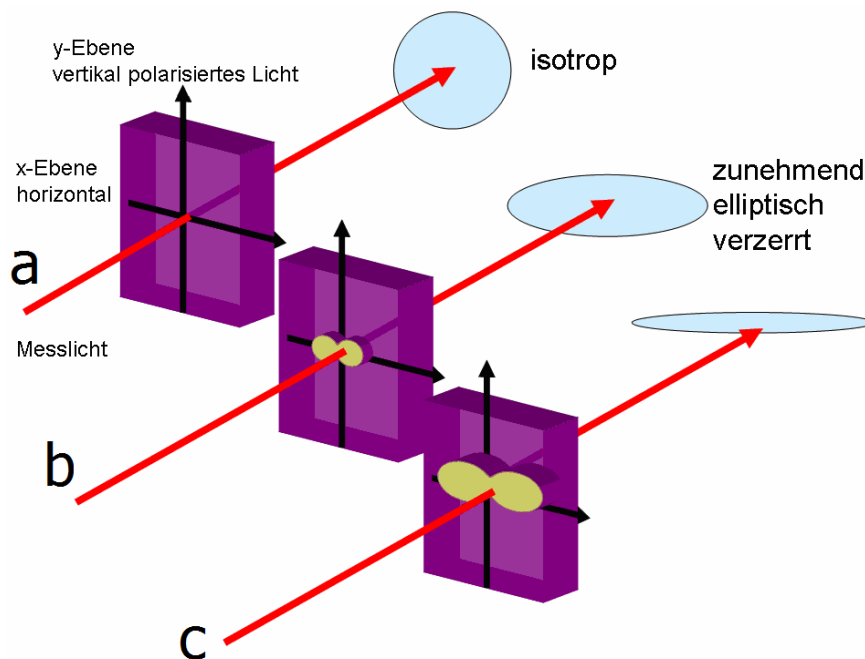
**Abb. 47:** Licht-Dunkeladaptation und ihr Einfluss auf die optische Datenspeicherung in BR-Schichten.

#### 4.4.5 Das mathematische Modell zur Beschreibung der Polarisationsänderungen

In den vorherigen Kapiteln sind die Änderungen der Polarisation beim Beschreiben mittels Puls lasers vorgestellt worden. Die Polarisationsdatenspeicherung im BR-Film lässt sich mathematisch durch den Polarisationszustand des Lichts beim Durchlaufen eines optisch anisotropen Mediums beschreiben. Grundlage dafür ist die Betrachtung einer monochromatischen Lichtwelle, die sich in z-Richtung ausbreitet, wie in Abb. 48 dargestellt ist. Der elektrische Vektor  $\vec{E}$  der Welle liegt somit in der x,y-Ebene und wird mit

$$\vec{E}(\vec{r}, t) = \begin{pmatrix} \vec{x} E_{0x} \cos(k \cdot \vec{r} - \omega t + \delta_x) \\ \vec{y} E_{0y} \cos(k \cdot \vec{r} - \omega t + \delta_y) \end{pmatrix} \quad (23)$$

beschrieben. Die im einführenden Kapitel 2.2 vorgestellten idealen optischen Bauteile können die Polarisationsänderung von Licht bei nicht absorbierenden Medien ändern. Ihre Wirkung auf den Polarisationszustand eines Lichtstrahls kann durch Transmissionsmatrizen beschrieben werden. Im Rahmen dieser Arbeit werden die bereits bekannten *Müller*-Matrizen der optischen Bauteile so modifiziert, dass sie die Anisotropieänderungen eines Films für zunehmende Bestrahlung darstellen.



**Abb. 48:** Lage des Bezugssystems und Veränderungen durch das anisotrope Bleichen des BR-Films. Änderungen des Messlichts nach Durchlaufen eines BR-Films. Ein (a) unbestrahlter Film ergibt isotropes Verhalten, (b) und (c) bestrahlter Film ergeben zunehmend elliptisch verzerrtes Ausleselicht.

#### 4.4.5.1 Allgemeine Grundlagen und Voraussetzungen zur Erstellung eines Modells

Um die Eigenschaften des Mediums (BR-Film und Trägersubstrat) durch eine *Müller*-Matrix zu beschreiben, werden folgende Annahmen und Voraussetzungen zur Modellbeschreibung getroffen:

##### 1. Apparative Annahmen

- Aufgrund des senkrechten Einfallswinkels des Schreib- als auch des Messlichtes auf den BR-Film wird nach der *Fresnel*-Gleichung ein Minimum des Reflexionsgrades und ein Maximum des Transmissionsgrades erreicht.<sup>[80]</sup> So kann die Brechung bei senkrechtem Einfall des Messlichts auf die Probe vernachlässigt werden.
- Die Absorption des Messlasers (He-Ne) kann vernachlässigt werden, da dieser für die Polarisationsdetektion durch Normierung der *Stokes*-Vektoren entfällt.

##### 2. Filmbezogene Annahmen

- Das Substrat, auf dem der BR-Film aufgebracht ist, ist optisch isotrop und absorbiert nicht.
- Vor dem Belaserungsvorgang ist der BR-Film isotrop aufgrund der zufällig angeordneten BR-Moleküle im Film. Da die BR-Moleküle in einer Polymermatrix gebunden sind, wird eine Diffusion und Rotation der BR-Moleküle vernachlässigt.
- Die Intensitäten für den Schreibprozess folgen *Malus*-ähnlichen Funktion, wie bereits *Yang* beschrieben hat.

#### 4.4.5.2 Grenzfälle

Zunächst werden die Grenzfälle vor dem Beschreiben, das Beschreiben mit zirkular polarisiertem Licht und das Beschreiben mit zu hohen Intensitäten vorgestellt.

##### Unbeschriebener BR-Film, verschiedene ODs

Im Falle der Lichtabschwächung durch den purpurnen BR-Film vor dem Bleichen gilt das Modell des isotropen Absorbers. Dieser muss mit den *Stokes*-Vektoren für das einfallende Messlicht multipliziert werden. Wird der Skalar separiert, gilt:

$$M_{\text{unbeschrieben}} = \sqrt{\frac{I}{I_0}} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (24)$$

Dieser Vorfaktor ist von der OD des BR-Films vor dem Bleichen abhängig. Mit *Lambert-Beer* ergibt sich für  $\frac{I}{I_0} = 10^{-OD}$ .

#### Verbrannter Film:

Sind die gewählten Schreibbedingungen so energiereich, dass es zur Verbrennung oder Verkohlung des BR-Films kommt, ist das Modell eines Depolarisator anzuwenden:

$$M_{\text{Depolarisator}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & a & 0 & 0 \\ 0 & 0 & b & 0 \\ 0 & 0 & 0 & c \end{pmatrix} \quad (25)$$

In einem realen System werden in der Diagonalen verschiedene Stärken für a, b und c erwartet. Im Falle einer vollständigen Depolarisation ist a=b=c=0.

#### Bleichen mit ideal zirkular polarisiertem Licht:

Mit zunehmender Bestrahlung wird sich im Fall von zirkular polarisiertem Licht die OD in alle Raumrichtungen gleichermaßen verringern. Somit steigt die Intensität des transmittierten Lichts gegenüber dem Anfangswert. Aus  $10^{-OD}$  wird für einen Bleichschritt bis zur  $OD_E$  also der Faktor  $10^{-(OD_A-OD_E)}$  eingeführt. Der Skalar ist separierbar und es ergibt sich isotropes Verhalten.

$$M_{\text{zirkular beschrieben}} = \sqrt{10^{-(OD_A-OD_E)}} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (26)$$



#### 4.4.5.3 Das Modell zur Beschreibung des Schreib- und Lesevorganges

##### Bleichen mit linear polarisiertem Licht:

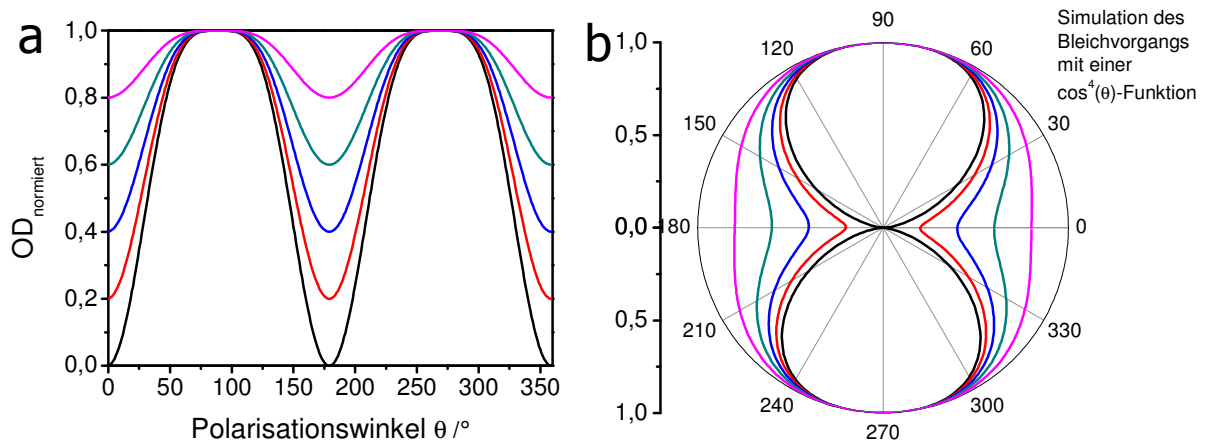
Nachdem die Grenzfälle des isotropen Beschreibens bekannt sind, wird ein System vorgestellt, das die Parameter beim Beschreiben mit linear polarisiertem Licht berücksichtigt. Dazu muss der Ausdruck  $10^{-(OD_A - OD_E)}$ , der für zirkular polarisiertes Licht eingeführt wurde, durch einen neuen Ausdruck,  $10^{-(OD_A - (z \cdot OD_{x,i}))}$  ersetzt werden. Dadurch wird die unterschiedliche Absorption entlang der x- und y-Achse berücksichtigt. Dabei ist  $i$  die infinitesimale Schicht im Modell und  $z$  die Anzahl der vollständig umgewandelten Schichten. Für einen vollständig horizontal geblichenen Film, entlang der x-Achse, ist  $i = z$ . Wird der BR-Film als dichroitischer Polarisator aufgefasst, schwächt er das Licht, dessen  $\vec{E}$ -Vektor senkrecht zu der Transmissionsachse schwingt. Yang hat gezeigt, dass die Photokonversionswahrscheinlichkeit proportional zum  $\cos^4$  des Winkels ist, der zwischen dem linear polarisierten Laserstrahl und dem Chromophor liegt. Für eine vollständig horizontal beschriebene infinitesimale dünne Schicht, in der keine BR-Moleküle hintereinander vorliegen, ergibt sich der photochemisch umgewandelte Anteil als OD durch den Ausdruck:

$$OD_{x,i} = \frac{OD_A}{i} \cdot \cos^4 \theta \quad (27)$$

Somit kann für einen beliebigen optisch dichten Film die Matrix  $M_{OD\text{-Abnahme}}$  aufgestellt werden:

$$M_{OD\text{ Abnahme}} = \sqrt{10^{-(OD_A - (z \cdot \frac{OD_A}{i} \cdot \cos^4 \theta))}} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (28)$$

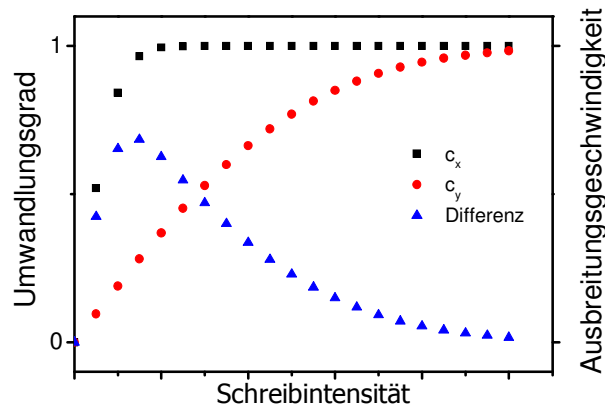
In Abb. 49 ist diese Veränderung der Absorptionseigenschaften in Abhängigkeit des Winkels dargestellt. Die zunächst isotrope Absorption des Films ändert sich mit zunehmender Bestrahlung und wird richtungsabhängig. Zudem weist der umgewandelte Teil an BR-Molekülen einen niedrigeren Brechungsindex als die unbeschriebenen BR-Moleküle auf.



**Abb. 49:** Änderungen der Absorptionseigenschaften durch Beschreiben mit linear polarisiertem Licht als  $\cos^4\theta$ -Funktion, (a) als Liniendiagramm und (b) als Polardiagramm.

Im Folgenden werden zwei Richtungen des Dipolmoments des BR-Moleküls bezüglich der Polarisationsrichtung betrachtet. Zum einen die  $0^\circ$ -Richtung, in der das Dipolmoment der BR-Moleküle entlang der x-Achse liegt, zum anderen die  $90^\circ$ -Richtung, in der das Dipolmoment der BR-Moleküle entlang der y-Achse liegt. Alle anderen Dipolmomente befinden sich zwischen diesen Richtungen und können als Superpositionen beider Richtungen mit unterschiedlichem Betragsvektor der Richtung berechnet werden. Daraus folgt, dass die BR-Moleküle entlang der x-Achse bei zunehmender Schreibintensität vermehrt in den  $P_{360}$ -Zustand gelangen als entlang der y-Achse. Somit steigt die Ausbreitungsgeschwindigkeit entlang der x-Achse ( $c_x$ ) schneller als entlang der y-Achse ( $c_y$ ). In Abb. 50 ist der erwartete Verlauf der Ausbreitungsgeschwindigkeiten für beide Achsen gezeigt. Die Ausbreitungsgeschwindigkeiten entlang dieser optischen Achsen verändern sich während des Beschreibens unterschiedlich stark, dadurch kommt es zur Phasenverschiebung. Sobald alle BR-Moleküle in x-Richtung in den TPP-Zustand umgewandelt worden sind, ist aufgrund der verringerten Absorption keine weitere Reaktion zu erwarten,  $c_x$  wird konstant. Ist die Schreibintensität zu hoch gewählt, bleichen einzelne BR-Moleküle in y-Richtung ebenfalls aus (mit sehr geringer Wahrscheinlichkeit). Das Maximum wird von  $c_x$  wesentlich früher erreicht als das von  $c_y$  (ob dieses erreicht wird, hängt von der Intensität des Schreibprozesses ab). Aufgrund des anisotropen Brechungsindex kommt es zur Veränderung der Elliptizität beim Durchlaufen eines anisotrop beschriebenen BR-Films.

Je höher die OD des Films, desto mehr Chromophore stehen zum Ausbleichen zur Verfügung und desto stärker ist der Effekt der Phasendifferenzänderung beim Beschreiben. Es liegt Doppelbrechung vor, aufgrund des erzielbaren Brechungsindexunterschiedes zwischen  $n_x$  und  $n_y$ .



**Abb. 50:** Verlauf der Ausbreitungsgeschwindigkeiten in x- und y-Richtung bei zunehmender Schreibintensität.

In der simulierten Kurve (Abb. 50) ist der Umwandlungsgrad vom B- zum TPP-Zustand mit zunehmender Schreibintensität gezeigt, infolgedessen kommt es zu Änderung des Brechungsindex und der Ausbreitungsgeschwindigkeit des Messlichts entlang der x- und y-Achse. Die Grenzwerte auf der y-Achse der simulierten hyperbolischen Funktion sind 0 und 1. Diese würden keiner (= 0) und vollständiger (= 1) Zustandsänderung von B nach TPP entsprechen. Für die Phasendifferenz ergibt sich ein Maximum in Abhängigkeit der Intensität, der OD und Schichtdicke des Films.

$$\delta(OD, d, I) \quad (29)$$

Im Modell wird die Dicke  $d$  als konstant gesetzt, da die gerakelten Filme mit einer konstanten Schichtdicke erzeugt worden sind. Aus der graphischen Interpolation für eine feste  $OD=1,74$  ergibt sich z.B. eine von der Pulszahl  $z$  abhängige Funktion der Form:

$$\delta_{1,74} = 21 \cdot e^{-\left(\frac{z}{1002}\right)} - 21 \quad (30)$$

Für die Abnahme der OD ergibt sich somit bei  $z$ -facher-Belaserung die Müller-Matrix  $M_{OD \text{ Abnahme}}$ . Dabei ist  $i$  die Pulszahl, bei der das Maximum an erzeugter Phasenverzögerung auftritt.

$$M_{OD \text{ Abnahme}} = \sqrt{10^{-\left(OD_A - \left(z \cdot \frac{OD_A}{i} \cdot \cos^4 \theta\right)\right)}} \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \quad (31)$$

Aufgrund der Ergebnisse aus den vorherigen Unterkapiteln wird der BR-Film als beliebig regulierbarer Phasenverzögerer aufgefasst. Da der BR-Film nicht selbst gedreht wird, ist nur

die Phasendifferenz zu berücksichtigen. Es ergibt sich die Verzögerungsmatrix für einen BR-Film des Typs:

$$M_{\text{Verzögerung}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & \sin(\delta) \\ 0 & 0 & \sin(\delta) & \cos(\delta) \end{pmatrix} \quad (32)$$

Die Gesamtmatrix für einen BR-Film besteht folglich aus zwei Komponenten einerseits zur Berücksichtigung der Absorptionsänderung und andererseits der Phasenänderung. Somit enthält die Müller-Matrix  $M_{\text{BR}}$  folgende Matrixelemente:

$$M_{\text{BR}} = M_{\text{OD Abnahme}} M_{\text{Verzögerung}} \quad (33)$$

$$M_{\text{BR}} = \sqrt{10^{-\left(OD_A - \left(z \cdot \frac{OD_A}{i} \cdot \cos^4 \theta\right)\right)}} \cdot \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & 1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 1 \end{pmatrix} \cdot \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -\sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & \sin(\delta) \\ 0 & 0 & \sin(\delta) & \cos(\delta) \end{pmatrix}$$

Die hier vorgestellte Modellvorstellung ermöglicht eine Aussage über die Phasenverzögerung der Lichtwelle beim Durchlaufen einer photoinduzierten Bleichung zu beschreiben. Durch Vergleich der erhaltenen Messdaten mit Simulationen verschiedener Matrizen kann das Modell überprüft werden. Für Filme, bei denen die OD und die Schreibparameter vergleichbar sind, kann so eine Abschätzung getroffen werden, welche Phasenänderung erwartet werden kann.

In allgemeiner Form kann das Auslesen in Transmission wie folgt beschrieben werden:

$$\vec{S}_{\text{Transmission}} = M_{\text{BR}} \cdot M_{\text{Polarisator}} \cdot \vec{S}_{\text{ein}} \quad (34)$$

Für ein Auslesen in Reflexion muss eine weitere Matrix für den Spiegel eingeführt werden

$$M_{\text{Spiegel}} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & 1 & 0 & 0 \\ 0 & 0 & -1 & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} \quad (35)$$

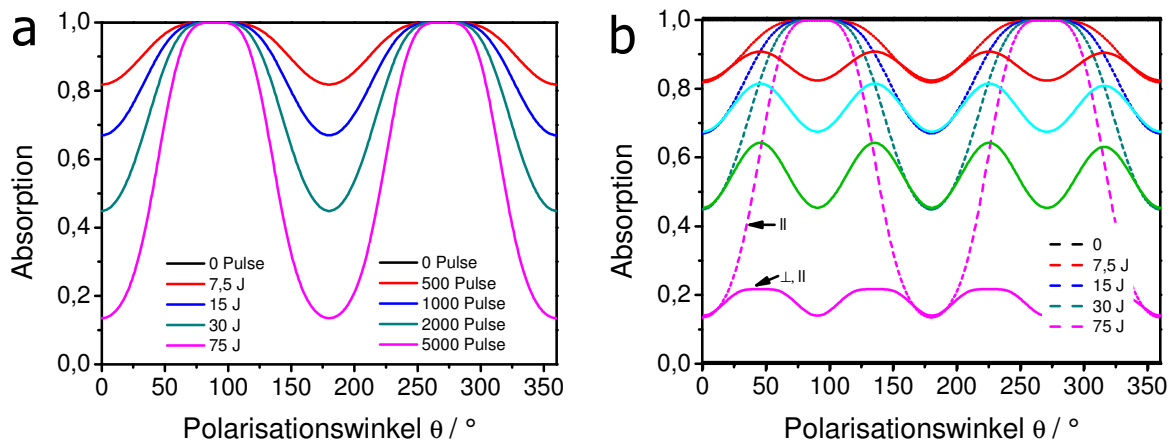
und die BR-Matrix ein zweites Mal durchlaufen werden:

$$\vec{S}_{\text{Reflexion}} = M_{BR} \cdot M_{\text{Spiegel}} \cdot M_{BR} \cdot \vec{S}_{\text{ein}} \quad (36)$$

Um das Auslesen bei verschiedenen Polarisierungen zu betrachten, wird als  $\vec{S}_{\text{ein}}$ -Vektor, z.B. eine unpolarisierte Lichtquelle eingesetzt und diese mit einem frei drehbaren Polarisator moduliert. Die allgemeine Müller-Matrix eines idealen Polarisators ist:

$$M_{\text{Polarisator}} = \frac{1}{2} \begin{pmatrix} 1 & \cos(2\theta) & \sin(2\theta) & 0 \\ \cos(2\theta) & \cos^2(2\theta) & \cos(2\theta)\sin(2\theta) & 0 \\ \sin(2\theta) & \cos(2\theta)\sin(2\theta) & \sin^2(2\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & 0 \end{pmatrix} \quad (37)$$

Für das Auslesen zweier orthogonal zueinander gespeicherten Polarisationsdaten mit einem Polarisator ergibt sich der in Abb. 51 dargestellte Verlauf der Absorption unter verschiedenen Polarisationswinkeln. Die durchgezogene Linie zeigt das Absorptionsverhalten der beiden Informationen an. Die gestrichelte Kurve zeigt das Absorptionsverhalten einer Information alleine. Soll die Unterscheidung der Daten mit einem Polfilter erfolgen, darf der Film nicht vollständig ausgeblencht werden. Der Kontrast für den Beobachter zwischen den Informationen ist schwach. Durch verwenden eines zweiten Polfilters als Analysator (in orthogonaler Stellung zum ersten Polarisator) können die gespeicherten Polarisationsdaten sehr gut erkannt werden.



**Abb. 51:** (a) Änderung der Absorption beim Auslesen eines BR-Datenspeichers mittels einem Polarisationsfilters unter Berücksichtigung der Absorptionseigenschaften des BR-Films und der Phasenverzögerung bei einer Information. (b) Vergleich der Absorption bei zwei gespeicherten Informationen und Auslesen mit einem Polfilter.

Um das Auslesen des Polarisationsdatenspeichers mit dem hier beschriebenen Messaufbau und der aufgestellten *Müller*-Matrix für BR zu überprüfen, wird die Ausgangspolarisation des He-Ne-Lasers ( $-45^\circ$ ) eingesetzt:

$$\vec{S}_{\text{ein}(-45^\circ)} = \begin{pmatrix} 1 \\ 0 \\ -1 \\ 0 \end{pmatrix} \quad (38)$$

Dieser kann durch die  $\lambda/2$ -Platte in beliebige Polarisationen gedreht werden. Dazu muss eine *Müller*-Matrix für eine  $\lambda/2$ -Platte ( $\theta$  winkelabhängig) angewendet werden. Dabei ist die Phasendifferenz der Verzögerungsplatte gleich  $\pi$ .

$$M_{\lambda/2} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(4\theta)\sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & \sin(4\theta)\sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & \sin(2\theta)\sin^2(\delta) \\ 0 & \sin(4\theta)\sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & -\cos(4\theta)\sin^2\left(\frac{\delta}{2}\right) + \cos^2\left(\frac{\delta}{2}\right) & -\cos(2\theta)\sin(\delta) \\ 0 & -\sin(2\theta)\sin(\delta) & \cos(2\theta)\sin(\delta) & \cos(\delta) \end{pmatrix} \quad (39)$$

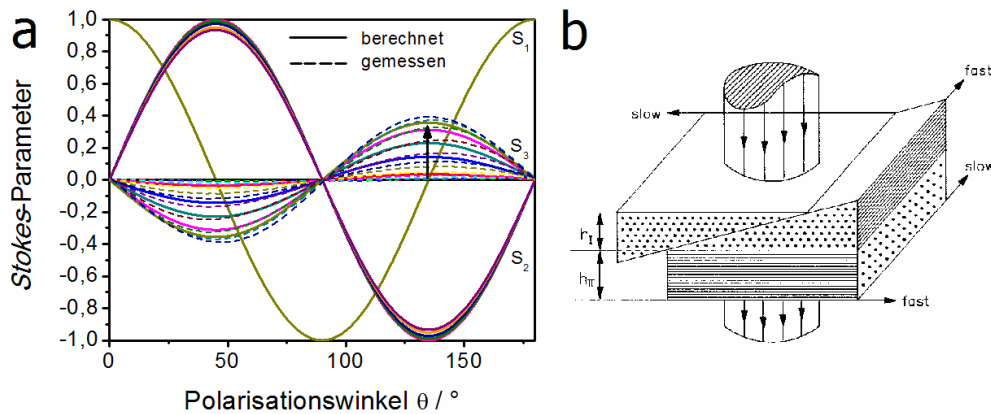
Somit vereinfacht sich die allgemeine Matrize einer  $\lambda/2$ -Verzögerungsplatte auf:

$$M_{\lambda/2} = \begin{pmatrix} 1 & 0 & 0 & 0 \\ 0 & \cos(4\theta) & -\sin(4\theta) & 0 \\ 0 & \sin(4\theta) & \cos(4\theta) & 0 \\ 0 & 0 & 0 & -1 \end{pmatrix} \quad (40)$$

Die Polarisationsrichtung, die auf den BR-Film trifft, ist:

$$\vec{S}_{\text{ein}} = M_{\lambda/2} \cdot \vec{S}_{\text{ein}(-45^\circ)} \quad (41)$$

Infolgedessen werden für jeden Abfragewinkel der Polarisation die einzelnen Matrixelemente berechnet und dann auf die Matrix des BR-Films angewandt. Mit der aufgestellten *Müller*-Matrix  $M_{\text{BR}}$  aus Gleichung (37) und der empirisch ermittelnden Phasenverschiebung  $\delta$  kann der Kurvenverlauf aller *Stokes*-Parameter für beliebige Bleichschritte berechnet werden. Die Abb. 52 zeigt exemplarisch den Kurvenverlauf von experimentellen und berechneten *Stokes*-Parametern. Die polarimetrisch erfassten Änderungen können mit dem hier vorgestellten Modell gut beschrieben werden. Die leichten Verschiebungen im Kurvenverlauf zwischen gemessenen und berechneten Daten können durch einen nicht exakt senkrecht stehenden BR-Film bezüglich der Ausbreitungsrichtung des Messlichts bedingt sein und durch Rundungsfehler bei der Berechnung.



**Abb. 52:** (a) Vergleich der gemessenen *Stokes-Parameter* und die mit der Matrix  $M_{Br}$  simulierten *Stokes-Vektoren*. Die  $S_3$ -Änderungen können in guter Übereinstimmung beschrieben werden. (b) *Soleil-Babinet-Kompensator* mit schneller und langsamer Achse beruhend auf dem Verschieben von zwei keilförmigen Medien mit unterschiedlichen Brechungsindices.

#### 4.4.5.4 Vergleich des BR-Film-Modells mit einem optischen Bauteil, dem *Soleil-Babinet-Kompensator*

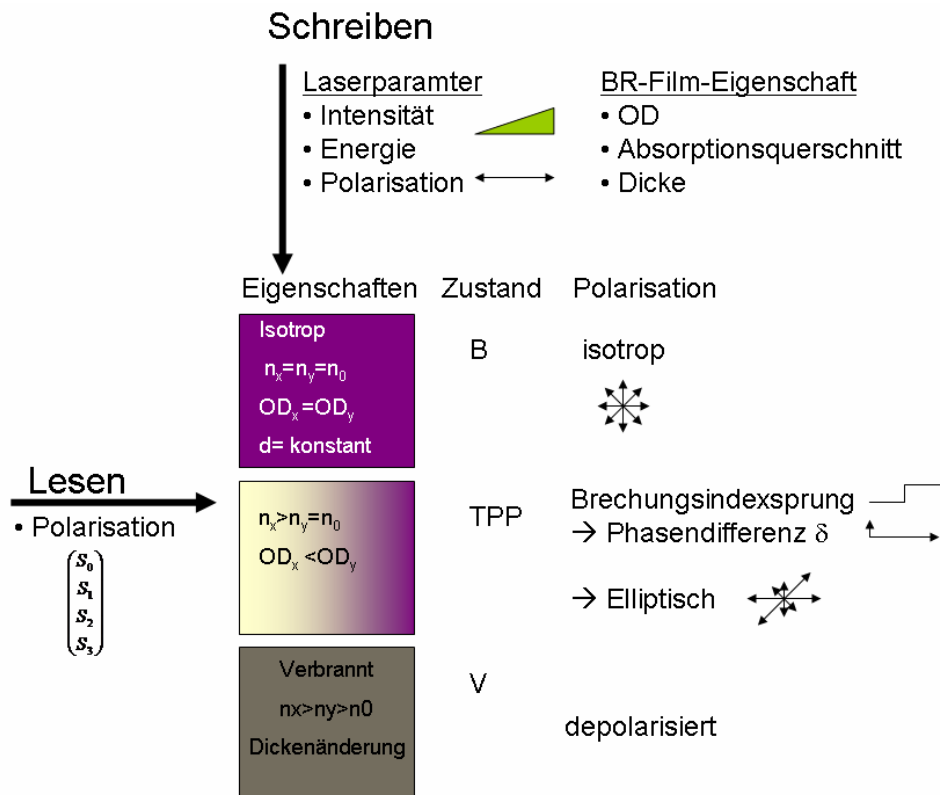
Die erstellte mathematische Matrix ermöglicht es einen BR-Film als eine Art *Soleil-Babinet-Kompensator* zu beschreiben. In Abb. 52 b ist eine Skizze eines *Soleil-Babinet-Kompensator* abgebildet. Ein *Soleil-Babinet-Kompensator* (SBK) erzeugt elliptisch polarisiertes Licht, dessen Phase kontinuierlich verändert werden kann. Ein solcher Kompensator besteht aus zwei doppelbrechenden Quarzkeilen, die zusammen eine planparallele Platte der Dicke  $d$  bilden. Beim Durchlaufen der beiden Quarzkeile wird die vertikal linear polarisierte Komponente des Lichts gegenüber der horizontalen verzögert. Durch Verschieben der Quarzkeile kann die Dicke  $d$  und somit die Verzögerung variiert werden.<sup>[37,80]</sup> Der lineare Zusammenhang ergibt sich wie folgt:

$$\delta_{SBK} = (n_y - n_x)(d_2 - d_1) \quad (42)$$

Im Vergleich dazu wird eine Verzögerung beim BR-Film durch das Ausbleichen der x- bzw. y-Richtung und der damit verbundenen Brechungsindexänderung erzielt. Eine Erhöhung der Bestrahlungsenergie führt zu einer Erhöhung der Phasenverzögerung. Wird der BR-Film als Kompensator betrachtet, kann dieser abhängig vom Umwandlungsgrad zwischen B- und P-Zustand auf jede beliebige Phasenverschiebung zwischen  $-180^\circ$  und  $180^\circ$  mittels der verwendeten Schreibenergie in Form der Pulszahl und der Intensität eingestellt werden, sofern dies bei der zu Verfügung stehenden OD möglich ist. Der Zusammenhang ist dabei nicht linear wie beim Verschieben einer der Keile des SBK, sondern folgt wie bereits gezeigt einer

exponentiellen Funktion. Zudem ist das Maximum der Phasenverschiebung durch die Filmdicke und Anzahl der Chromophore (OD) bestimmt. Die Phasenverschiebung ist proportional zu der eingestrahlten Energie im photochemischen Bereich.

In Abb. 53 sind zusammenfassend schematisch die Abhängigkeiten des Schreib- und Lesevorgangs auf einen zunächst isotropen BR-Film in Hinblick auf Polarisation und Absorption dargestellt. Das Bindeglied zwischen Schreib- und Lesevorgang stellt die photoinduzierbare Phasendifferenz, durch den geänderten Brechungsindex dar. Diese wird durch die Laserparameter beim Schreibvorgang im BR-Film „eingestellt“ und ist für die Polarisationsänderung des Lichts im Lesevorgang verantwortlich. Eine große Phasendifferenz kann nur bei hinreichend großer OD des Films erreicht werden. Da eine polarimetrische Untersuchung sehr aufwändig ist, wird in den meisten Fällen mit einem Polarisationsmikroskop die Qualität des beschriebenen Films visuell beurteilt. Für die weiteren Versuche werden die gewonnenen Erkenntnisse an Musterproben angewandt. Für die Erzeugung von polarisationssensitiven Mustern ist eine homogene Verteilung und hohe OD des BR-Films nötig, damit der Kontrast beim Auslesen zum Unterscheiden der beiden Informationen möglichst hoch ist.



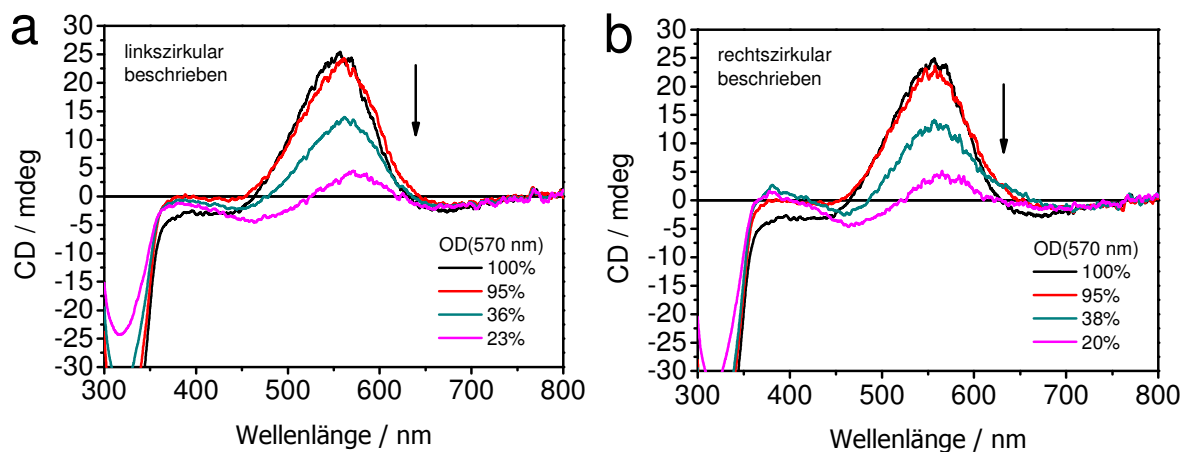
**Abb. 53:** Veranschaulichte Darstellung des Schreibeinflusses und der dadurch verursachten Änderungen im BR-Film die beim Auslesen zu Änderungen der Polarisation und Absorption führen.



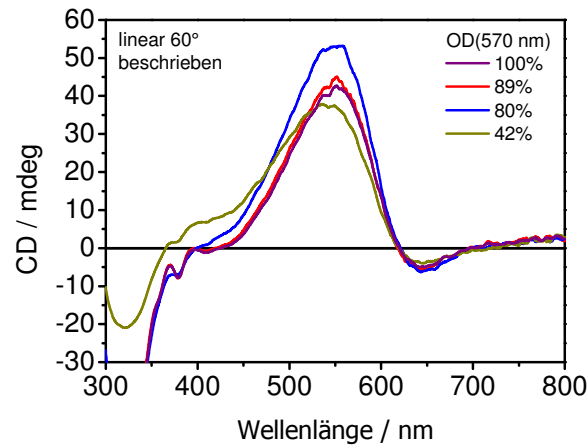
#### 4.4.6 Untersuchung von Polarisationsdatenspeichern mit dem CD-Spektrometer

##### 4.4.6.1 CD-Messungen an zirkular und linear polarisiert beschriebenen BR-Filmen

Der TPP-Prozess kann mit dem CD-Spektrometer an BR-Molekülen als PM-Suspension, fixiert als Film, und resolvtisiert untersucht werden. Während für bestrahlte PM-Suspensionen das biphasige CD-Signal im sichtbaren Teil des Spektrums abnimmt, ändert sich im Film, also PM fixiert in einer Matrix, das CD-Signal in Abhängigkeit der Polarisation des Lasers, der zum Belichten der Probe verwendet wird. Dazu werden BR-Filme auf Küvettenfenster aus Quarzglas oder auf Triacetatfolie gerakelt und anschließend mit einem Puls laser (532 nm) bestrahlt. Anschließend werden die Substrate präzise im CD-Spektrometer ausgerichtet und gemessen. Es ist festzustellen, dass die BR-Filme eine schwächer ausgeprägte negative Bande als die BR-Moleküle in Suspension aufweisen. In Abhängigkeit des Bleichungsgrad, hier als %-Angabe relativ zur Anfangs-OD, ergeben sich die in Abb. 54 gezeigten CD-Spektren. Es kann kein Unterschied für rechts- und linkszirkular beschriebene Filme festgestellt werden. Die Intensität der positiven CD-Bande nimmt mit zunehmendem Bleichungsgrad ab. Ein zirkular bestrahlter Film verhält sich insofern genauso wie die in Kap. 4.2.2 gezeigten Beobachtungen an PM-Suspensionen.



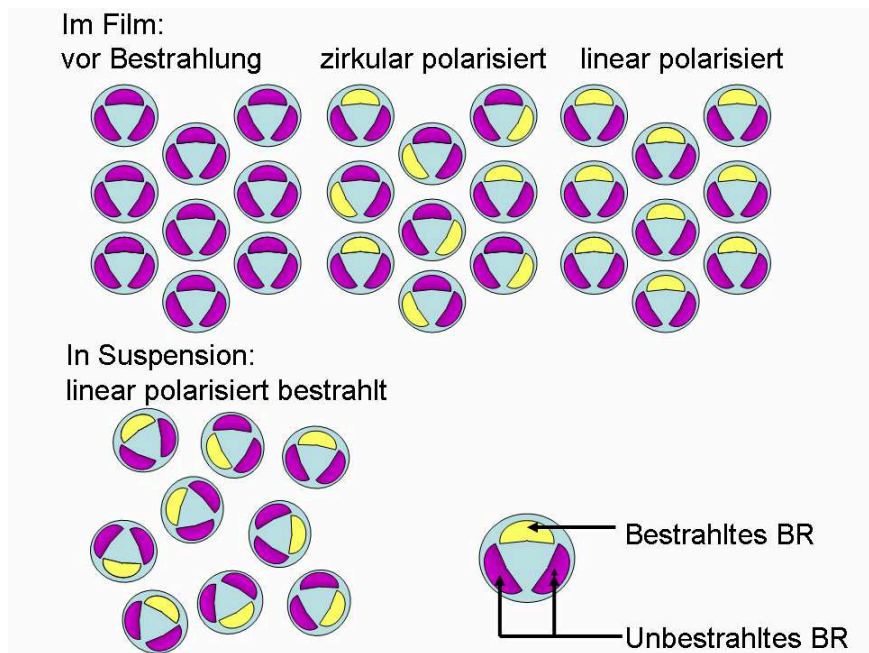
**Abb. 54:** Die zirkular permanent geblichenen Filme zeigen nur eine Abnahme der Bande im sichtbaren Teil des Spektrums.



**Abb. 55:** Für einen linear polarisiert geblichenen Film steigt das CD-Signal zunächst an und sinkt dann wieder unterhalb des Anfangs-CD-Signals.

Anders sieht es hingegen für einen linear polarisiert geschriebenen Film aus. Das CD-Signal ist dann sehr empfindlich gegenüber der Polarisationsrichtung des Schreibens und der Rotation der Probe. In Abhängigkeit der Bestrahlungsintensität kommt es bei linear polarisiertem Licht zunächst zu einer Zunahme der Elliptizität (siehe Abb. 55) und nach dem Durchlaufen eines Maximums wieder zu einer Abnahme. Dieses ist auf das selektive Ausbleichen einzelner BR-Trimere zurückzuführen. Nur die parallel zum Schreibstrahl liegenden BR-Trimere werden angeregt und weisen ein geändertes CD-Signal auf. Somit kommt es beim Ausbleichen des ersten Trimers zu einer CD-Signal Verstärkung. Mit höherer Intensität bestrahlte BR-Filme folgen wieder dem bei Suspensionen gezeigten Verlauf, da nun mehrere Trimere gleichzeitig ausgebleicht werden können.

In Abb. 56 ist zum besseren Verständnis ein Schema für beliebig viele PM-Ausrichtungen dargestellt. Vereinfacht präsentiert ein BR-Trimer eine Vielzahl an BR-Molekülen innerhalb einer PM, da diese periodisch als hexagonaler 2D-Kristall angeordnet sind. Im Film sind diese PMs zunächst gleichmäßig verteilt. Durch den TPP-Prozess werden bei linear polarisiertem Licht selektiv BR-Moleküle im Film ausgebleicht, die parallel dazu orientiert sind. Im Falle von zirkular polarisiertem Licht gibt es diese Selektivität nicht, ebenso geht die Selektivität beim Bestrahlen mit polarisiertem Licht in gerührten Suspensionen verloren. Da sich die PMs in wässriger Suspension durchmischen und rotieren, werden innerhalb einer PM verschiedene BR-Moleküle ausgebleicht. Infolgedessen ist das detektierte CD-Signal einer Lösung die Summe vieler unterschiedlich ausgebleichener PMs. Auch das Ausbleichen zweier BR-Moleküle innerhalb eines Trimers ist in Lösung trotz linear polarisiertem Licht wahrscheinlicher als bei im Film fixierten.



**Abb. 56:** Schematische Darstellung des Bestrahleens von BR in Filmen und in Suspension. Im Mittel sind sowohl beim zirkular bestrahlten BR-Film als auch beim linear polarisierten Bleichen in Suspension gleich viele BR-Moleküle in allen Raumrichtungen photochemisch umgewandelt worden.

Eine Beurteilung der CD-Spektren im UV-Bereich ist aufgrund der hohen OD der Filme nicht direkt möglich. Des Weiteren absorbiert das verwendete Substrat, die Triacetatfolie, im UV-Bereich. Werden die fixierten BR-Moleküle mit Wasser aus der Filmmatrix resuspendiert, kann durch mehrfaches abzentrifugieren der Gelatine (beginnend bei 3000 rpm für 10 min, Überstand verwerfen, resuspendieren und erneut abzentrifugieren bis 10.000 rpm), das BR soweit wieder aufgereinigt werden, dass eine Aufnahme eines CD-Spektrums im UV-Bereich möglich ist. Dieses unterscheidet sich qualitativ nicht von den für bestrahlte Suspension gezeigten CD-Spektren aus Kap. 4.2.2. Somit kann davon ausgegangen werden, dass im Film die gleichen photochemischen Prozesse wie in PM-Suspension auftreten.

## 4.5 Der optische Datenträger

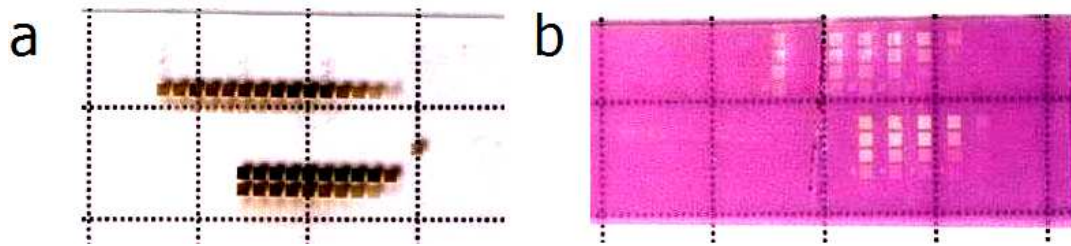
### 4.5.1 Lichtinduzierte Änderung am Substrat und der BR-Schicht

In diesem Kapitel geht es zum einen um die Erzeugung eines optischen Datenträgers mit BR als *low density data storage* und zum anderen als *high density data storage*. Dazu werden zunächst die Anforderungen an das Substrat diskutiert, auf dem das BR aufgetragen bzw. mit dem BR beschichtet wird. Diese sind in Tab. 8 zusammengefasst. Mittels Laser können auf dem Substrat Markierungen vorgenommen werden, diese geschehen durch Verkohlung oder Verbrennung des Substrats, Bleichen von Farbbestandteilen im Substrat oder Laserablation, z.B. im Fall von Metallen. Für die Anwendung als Datenspeicher darf das Substrat keine Wechselwirkung mit dem Schreiblaserlicht eingehen. Soll das Substrat für die Anwendung als Polarisationsdatenspeicher eingesetzt werden, muss es zudem optisch isotrop sein. Im Falle des Auslesens in Reflexion müssen zudem der Erhalt der Polarisation und eine genügend hohe Reflexion des Substrats gewährleistet werden.

**Tab. 8:** Substratanforderungen für verschiedene Anwendungen.

Anwendung als	Markierung	Datenspeicher (nur Bleichen)	Polarisations- datenspeicher zum Auslesen in Transmission	Polarisations- datenspeicher zum Auslesen in Reflexion
Substrat-Eigenschaft				
Reaktivität des Substrats bei Absorption des Laserlichts	Ja (Entfärben, Verbrennen, Schmelzen)	Nein	Nein	Nein
BR-Verträglichkeit	Nein	Ja	Ja	Ja
Transparent	Egal	Egal	Ja	Nein
Optisch Isotrop	Nein	Nein	Ja	Ja
Reflektierend	Egal	Egal	Nein	Ja

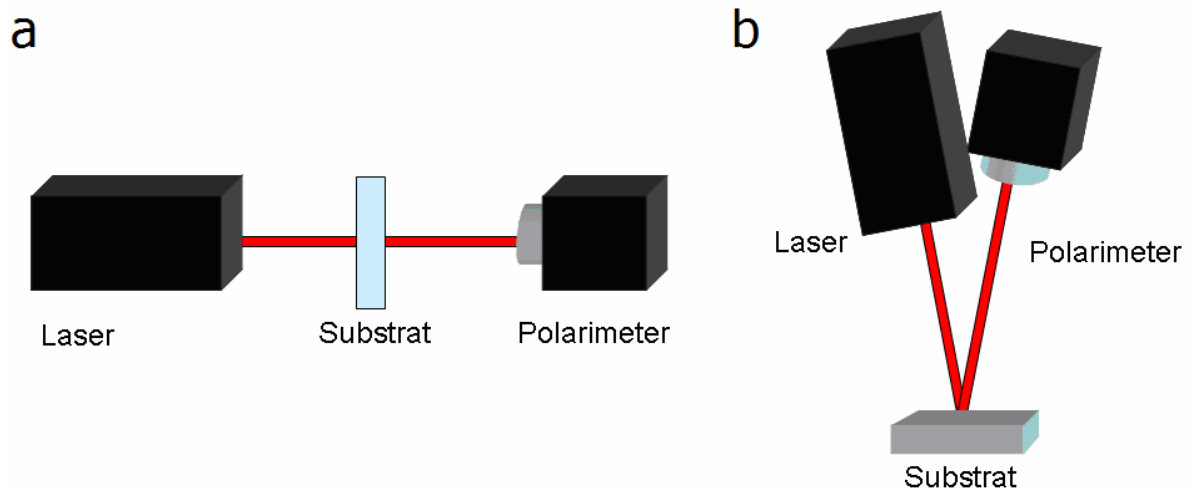
Es sind verschiedene Foliensubstrate auf ihre Wechselwirkung mit dem Puls laser getestet worden. In Abb. 57 ist exemplarisch eine Lasermarkierung auf einem Substrat gezeigt, das für die optische Polarisationsdatenspeicherung ungeeignet ist, weil es zur Substratbeschädigung kommt.



**Abb. 57:** (a) Laserleistungsabhängiges Beschreiben eines Foliensubstrates. (b) Selektives Beschreiben von BR ohne Substratbeschädigung.

#### 4.5.2 Polarimetrische Untersuchung von Substraten

Polarisationserhaltende Eigenschaften der Substrate werden vor und nach der Laserbeschreibung qualitativ mittels Lichtmikroskop und quantitativ mittels Polarimeter (siehe Abb. 58) untersucht. Nur Substrate, die vor und nach der Laserbeschriftung polarisationserhaltend sind, eignen sich als Substrat für einen optischen Polarisationsdatenspeicher.



**Abb. 58:** Aufbau zur Untersuchung der Polarisationserhaltung von Substraten (a) in Transmission und (b) in Reflexion.

Selbst wenn diese Bedingung nicht erfüllt ist, kann das Substrat noch als bleichbarer BR-Datenträger, allerdings ohne den Effekt der Polarisationsdatenspeicherung, verwendet werden.

##### 4.5.2.1 Transparente Substrate

Viele der industriell erhältlichen Foliensubstrate (PMMA, PET, PP) sind nicht optisch isotrop, da sie aus Polymerblöcken gewalzt worden sind (kalandriert), extrudiert oder als Folien

geblasen werden. So verträgt z.B. Polyethylen (PE) zwar die für das Bleichen von BR benötigte Energie, ist aber nicht isotrop und somit nicht als Substrat geeignet. Von den untersuchten transparenten Substraten zeigen Glas, gegossenes Polycarbonat (PC) und die Triacetatfolie polarisationserhaltende Eigenschaften vor und nach der Laserbeschreibung. Diese werden für nachfolgende Experimente verwendet.

#### 4.5.2.2 *Reflektive Substrate*

Für das Auslesen in Reflexion werden reflektive Schichten untersucht. Dabei darf es nicht zur Depolarisation kommen. Auch weiß beschichtete Foliensubstrate und Papiersubstrate eignen sich prinzipiell zur Anwendung als Datenspeicher, sofern es um das selektive Bleichen geht. Allerdings geht die an weiß bedruckten Polyethylenterephthalat (PET)-Substrate beobachtete teilweise polarisationserhaltende Reflexion beim Lasern verloren. Die Laserbeschreibung führt zu einer starken Depolarisation und Abnahme der Reflektivität, da bei den für das Bleichen von BR benötigten Energien das Substrat erste Farbveränderungen aufweist.

Für die optische Polarisationsdatenspeicherung muss das Substrat das Leselicht polarisationserhaltend reflektieren. Dies wird am besten durch einen hohen Brechungsindexsprung zwischen BR und dem Substrat gewährleistet. Bei den polarisationserhaltenden reflektiven Schichten sind insbesondere die mit Metall (Au, Ag, Cr) bedampften Substrate sehr gut geeignet. Etwas schlechtere aber dennoch akzeptable Resultate werden mit selbstklebenden Spiegelfolien erzielt. Gerade im Hinblick auf die Prozessierbarkeit in der Industrie bieten zuschneidbare und laminierbare Spiegelschichten von der Rolle enorme Vorteile, da ein kontinuierlicher Prozess möglich ist. Im Gegensatz dazu ist eine PVD-Beschichtung (mit Metallen im Vakuum oder HRI-Materialien (*high reflective index*)) äußerst aufwendig.

Bekannt ist, dass Metalle durch Einphotonenabsorption ablatiert werden können.<sup>[81]</sup> Somit ist das Auftragen einer metallischen Spiegelschicht ausschließlich für bereits gelaserte BR-Proben geeignet. Ein nachträgliches Manipulieren der im BR-Film gespeicherten Information würde beim Beschreiben des BRs zum Ablatieren des Metalls und damit zur Beschädigung des Datenträgers führen. Deshalb sind Substrate mit HRI-Materialien sehr interessant, bei diesen ist ein nachträgliches Beschreiben des BRs möglich, ohne das Substrat zu beschädigen. Ein mit ZnS im PVD-Verfahren bedampfter BR-Film bleibt über Monate stabil und ist in Reflexion auslesbar. Das Aufbringen der Reflexionsschicht nach dem Datenspeichern mittels Laser erfolgt auf einer der drei Methoden:

- Bedampfen mit dem gewünschten Metall (z.B. Au, Ag, Cr) auf BR
- Zusammenkleben einer spiegelnden Fläche mit einem optisch transparenten Kleber auf BR
- Laminieren mit selbstklebender Spiegelfolie auf BR

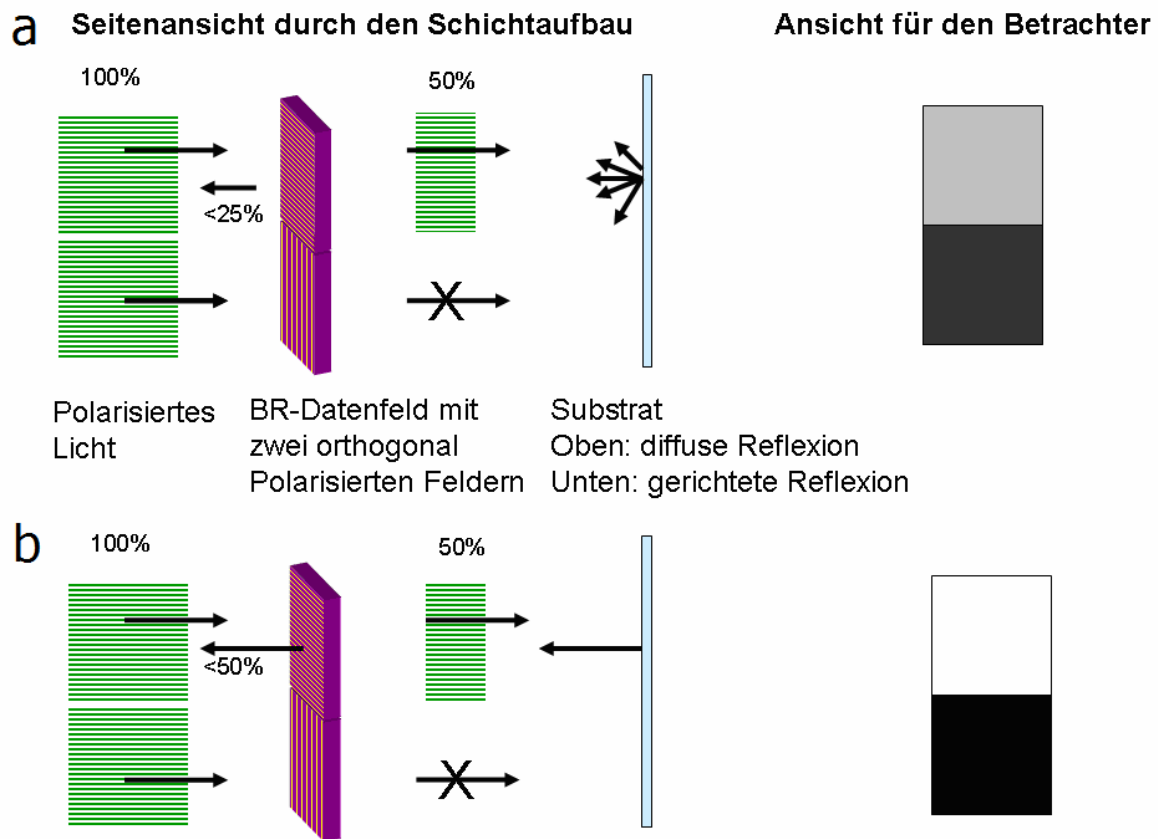
Neben der Substratabhängigkeit ist auch zwischen der Beschichtungsart zu unterscheiden. Im Druckverfahren (Flachsiebdruck oder Rotationssiebdruck) erzeugte BR-Drucke sind in ihrer Güte durch den Maschenabstand des Siebes begrenzt. Dies führt zur orts aufgelösten Benetzung des Substrats und zur Inhomogenität. Dementsprechend ist eine Datenspeicherung durch die lichte Maschenweite im Siebdruck in ihrer Auflösung auf 40  $\mu\text{m}$  begrenzt.<sup>[82]</sup> Eine Alternative sind Gussverfahren mit denen große Flächen homogen beschichtet werden.

### **4.5.3 Auslesen von Polarisationsdaten**

Für ein Auslesen in Transmission muss das Substrat transparent sein oder zumindest in dem Bereich des Datenspeichers transparent sein. Das Auslesen der polarisationsabhängig gespeicherten Informationen erfolgt mit polarisationsselektiven optischen Methoden. So kann bereits durch die Verwendung zweier Polfilter und einer Lichtquelle, die weit unterhalb der für die Speicherung verwendeten Intensität liegt, das Auslesen in Transmission realisiert werden. Somit wird linear polarisiertes Licht erhalten und die mittels photoinduzierter Anisotropie beschriebenen BR-Filme können ausgelesen werden. Für eine qualitative Beurteilung wird als Lichtquelle in der Regel Weißlicht eingesetzt. In Kap 4.6.2 wird insbesondere auf die Auswirkung von farbiger Beleuchtung eingegangen. Dabei hat sich grünes Licht experimentell als vorteilhaft zum Datenauslesen gezeigt. Wenn die Polarisation des Ausleselichts parallel zu dem Winkel des zuvor auf die Probe einwirkenden Schreibstrahls einer Information gewählt wird, dann erscheint diese Information als heller Bereich auf dem BR-Film. Wenn der Winkel senkrecht zu dem zuvor einwirkenden Schreibstrahls gewählt wird, erscheint die beschriebene Fläche dunkel bläulich und weist somit nur eine kleinere Absorptionsänderung vom violetten Ursprungszustand auf. Für ein Auslesen in Reflexion ist eine hohe Reflektanz des Hintergrundes wichtig. Ein Auslesen mit Licht innerhalb der Absorptionsbande von BR ermöglicht auch das Auslesen auf Substraten, an denen die Polarisation am reflektierenden Substrat ganz oder teilweise verloren gegangen ist (diffuse Reflexion). Dieses Verfahren ist äußerst kontrastarm. Eine Verbesserung der Reflexionseigenschaften des Substrats kann durch das Bedampfen der BR-

Datenspeicherschicht mit einer Metallschicht erreicht werden. Neben der höheren Reflektivität ist dabei auch eine Polarisationserhaltung gewährleistet. Dadurch ist der Kontrast zwischen zwei unterschiedlich polarisiert geschriebenen Feldern unter polarisierter Beleuchtung deutlich besser. Dieser Sachverhalt ist in Abb. 59 schematisch dargestellt. Die Seitenansicht zeigt den Verlust der Intensität des polarisierten Ausleselichts beim Durchlaufen zweier polarisiert geschriebener Felder und anschließender Reflexion. Im oberen Teil der Abb.59 wird durch diffuse Reflexion am Substrat des ID-Kartenkörper (z.B. weißes streuendes Substrat) der Polarisationsgrad vermindert. Das resultierende Streulicht ist gleichermaßen auf alle Polarisationswinkel verteilt und wird beim zweiten Durchlaufen, durch die BR-Schicht aufgrund der anisotropen Absorption des beschriebenen Feldes gefiltert. Somit würde ein Beobachter das Feld, das parallel zum Ausleselicht beschrieben worden ist, lediglich mit einem verminderten Kontrast vom senkrecht geschriebenen Feld unterscheiden können. Im unteren Teil der Abbildung ist der Strahlenverlauf der beiden Informationen an einem hochreflektiven Substrat gezeigt. Hierbei tritt anstelle der diffusen Reflexion eine polarisationserhaltende und gerichtete Reflexion auf. Diese erscheint wesentlich kontrastreicher und wird in den folgenden Experimenten weiter untersucht und optimiert. Mit zunehmender OD wird das Kontrastverhältnis zwischen den beiden Informationen deutlicher. Filme mit einer OD  $> 2$  sind sehr gut für die Datenspeicherung geeignet. Filme mit einer geringeren OD als 0,6 sind ungeeignet, um sie mit dem hier beschriebenen einfachen Messsystem auszulesen. Für das getrennte Auslesen mehrerer Informationen ist es notwendig, dass jeweils nur die gerade gewünschte Information sichtbar wird, während die anderen Informationen sich von einer unbeschriebenen Stelle kaum unterscheiden. Für zwei Informationen hat sich die Polarisationsrichtung beim Schreiben von  $0^\circ$  und  $90^\circ$  bewährt.





**Abb. 59:** Modell zur Erklärung der Substratanforderung polarisationserhaltender Reflexion für eine optimierte Lesbarkeit.

#### 4.5.4 „low density“-BR-Datenspeicher

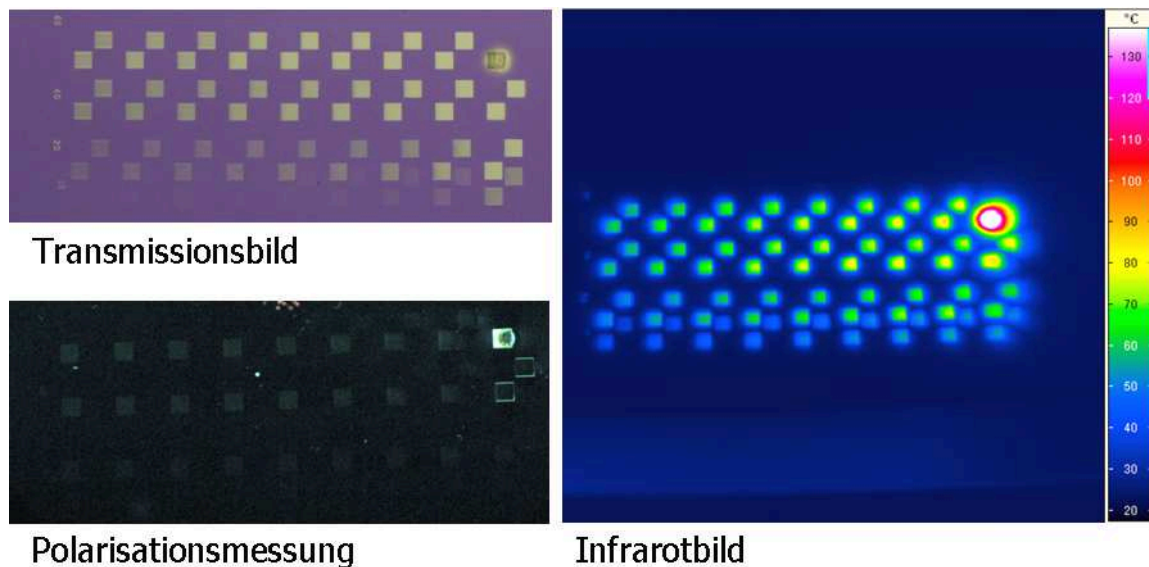
Mit dem Begriff „low-density“-BR-Datenspeicher sind optisch auslesbare Polarisationsdatenspeicher gemeint, die vergleichsweise geringe Datenmengen speichern. Bei diesen Speichern spielen Streuzentren und geringe Inhomogenitäten des BR-Auftrags, wie sie bei einem BR-Siebdruck vorkommen eine geringe Rolle. Dieses ist durch die verhältnismäßig großen Datenpixel im Bereich 25-30  $\mu\text{m}$  bei der Lasermarkierung bedingt. Das Auslesen solcher Speicher ist mit Hilfe einer Polarisationsoptik für einen geschulten Nutzer bzw. mit dem in Kap. 4.6 vorgestellten BR-Polarisationsdatenspeicher Auslesegerät möglich.

Gegossene Bakteriorhodopsin-Schichten auf optisch isotropen Materialien bieten die beste optische Güte. Die mit BR beschichteten Triacetatfolien erwiesen sich für die Polarisations-speicherung als geeignet und werden in folgendem verwendet.

##### 4.5.4.1 Erkenntnisse durch Infrarotthermografie

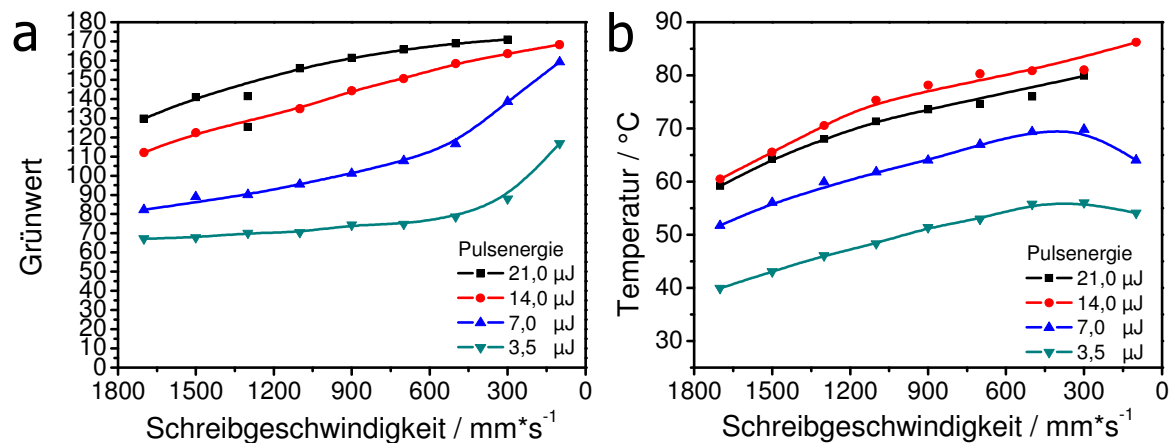
Mit Hilfe einer Infrarotthermografiekamera konnte die Temperaturentwicklung online für verschiedene Schreibparameter untersucht werden. Die optimalen Parameter für die

Polarisationsdatenspeicherung zeigen sich in einem maximalen Kontrast zwischen den orthogonal zueinander polarisiert geschriebenen Feldern, bei einer maximalen Temperatur unterhalb von 78 °C (BR macht einen reversiblen Phasenübergang bei 75 °C). Felder, die während des Beschreibens höhere Temperaturen aufweisen, sind zwar im Transmissionsbild transparenter, verlieren aber dafür an Polarisationskontrast und erscheinen schließlich in der Polarisationsmessung für zwei orthogonal zueinander geschriebene Felder gleich hell.



**Abb. 60:** Untersuchung von BR-Filmen mit der Infrarotkamera zeigen in Kombination mit den Transmissions- und den Polarisationsmessungen die optimalen Schreibbedingungen für einen optischen Polarisationsdatenspeicher mit BR an.

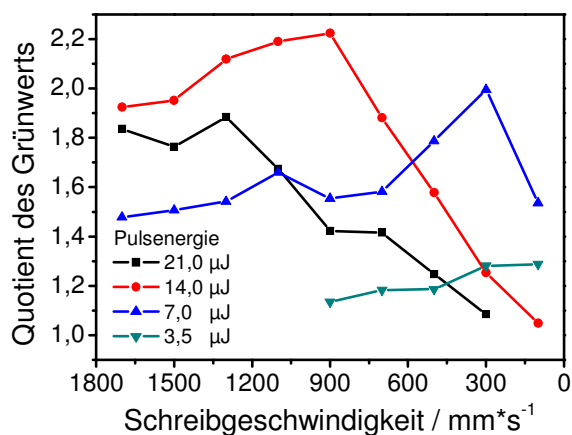
Die Abb. 60 zeigt die Aufnahme eines mit einem Kästchenmuster beschriebenen BR-Films. Dabei sind die jeweils aneinanderhängenden quadratischen gelblichen Flächen mit demselben Schreibparameter (Energie pro Puls, Schreibgeschwindigkeit) mit unterschiedlicher Polarisation ( $0^\circ$  und  $90^\circ$ ) geschrieben worden. Von links nach rechts sinkt die Schreibgeschwindigkeit, somit steigt die eingebrachte Energie pro Fläche während des Schreibvorgangs. Von unten nach oben (4 Doppelreihen) steigt die Pulsenergie und somit ebenfalls die Energie pro Fläche. Im Transmissionsbild steigt die Transparenz mit steigender Energie bis das Substrat schließlich schmilzt und verbrennt (rechts oben). Diese Erwärmung der Probe während des Schreibvorgangs mittels Lasers kann im Infrarotbild nachvollzogen werden, dargestellt sind die lokal erreichten Maximaltemperaturen. In Abb. 61 sind die Zunahme der Transparenz als Grünwert des Bildes dargestellt und die Zunahme der Temperatur für verschiedene Pulsenergien in Abhängigkeit der Schreibgeschwindigkeit aufgezeigt.



**Abb. 61:** (a) Mit zunehmender Schreibintensität (wahlweise durch niedrige Geschwindigkeiten des Galvanoscanners oder durch höhere Pulsenergie des Lasers) wird die maximale Helligkeit des Grünkanals für ein Probenfeld erreicht. (b) Gleichzeitig steigen die Temperaturen an.

Trotz der erhöhten Transparenz ist nicht der beste Polarisationskontrast der geblichenen Bereiche erreicht. Diese Information wird erst durch das Auswerten des Polarisationsbildes erhalten. Dazu wird eines der orthogonal polarisierten Quadrate eines Schreibparametersatzes mit Hilfe zweier gekreuzter Polfilter ausgeblendet. So ist zum Beispiel im Bereich von 0,20 W nur eine der Kästchenreihe zu erkennen.

In der oberen Doppelreihe (21 μJ/Puls) des Polarisationsmessungsbildes erscheint die untere Reihe zunächst heller, später genauso hell wie die obere Reihe. Das bedeutet, dass der Polarisationskontrast von links nach rechts immer schlechter wird. (Links für Polarisationspeicherung bedingt geeignet, rechts ungeeignet). In der zweiten Doppelreihe (14 μJ/Puls) ist zunächst nur die untere Reihe zu erkennen. Dies bedeutet, dass zunächst die eine Polarisation komplett ausgeblendet werden kann, während die andere gut sichtbar ist. Zum Ende der Reihe (nach rechts) gleichen sich beide an. Der linke Teil dieser Reihe ist für Polarisationsdatenspeicherung interessant, da er zeigt, dass die zweite Polarisation vollständig „ausgeblendet“ werden kann. Noch deutlicher wird dies in der 3. Doppelreihe (7 μJ/Puls) hier ist bis auf das letzte Kästchen das gelaserte Doppelpaar nicht zu erkennen. Um die Güte der Polarisationspeicherung zu bewerten, ist das Verhältnis des Grünwerts Polarisation1/Polarisation2 (untere Reihe/obere Reihe) ausgewertet worden. Umso größer der Quotient ist, desto mehr Polarisationskontrast weist die Probe auf. In Abb. 62 ist der Quotient in Abhängigkeit der Schreibgeschwindigkeit dargestellt.



**Abb. 62:** Der Quotient des Grünwerts für zwei orthogonal zueinander polarisiert geschriebenen Feldern gibt die besten Schreibbedingungen für einen Film an. Je nach Pulsenergie liegt das Maximum bei verschiedenen Schreibgeschwindigkeiten.

Während mit einer Pulsenergie von 3,5  $\mu\text{J}$  selbst bei niedrigen Geschwindigkeiten nicht alle BR-Moleküle parallel zur Polarisationsrichtung des Lasers ausbleichen, wird mit einer Pulsenergie von 7  $\mu\text{J}$  bereits ein Maximum bei ca. 300 mm/s erreicht. Bei weiterer Erhöhung der Pulsenergie muss die Schreibgeschwindigkeit weiter erhöht werden, damit die auf den Film treffende Intensität nicht dazu führt, dass auch BR-Moleküle, die nicht parallel zur Polarisationsrichtung des Schreiblasers liegen, angeregt werden und folglich beim Auslesen zu einem niedrigeren Wert des Quotienten des Grünwerts führen. Das hier ermittelte Optimum für einen Film ( $\text{OD} = 2$ ) liegt bei 900 mm/s und einer Pulsenergie von 14  $\mu\text{J}$ . Damit sind gute bis sehr gute Schreibbedingungen für die Polarisationsdatenspeicherung gefunden. Mit den optimierten Schreibparametern lassen sich dann, wie in Abb. 63 zu erkennen, zwei Informationen auf einer Stelle mit verschiedenen Polarisierungen speichern. Für das Auslesen in Transmission ist keine Beeinträchtigung durch das Substrat festzustellen.



**Abb. 63:** Optische Datenspeicherung von zwei Informationen auf einer Stelle (links) Information A, (rechts) Information B in (a) ist das Leselicht parallel zu Information A in (b) senkrecht dazu. Somit erscheint die jeweils komplementär gespeicherte Information.

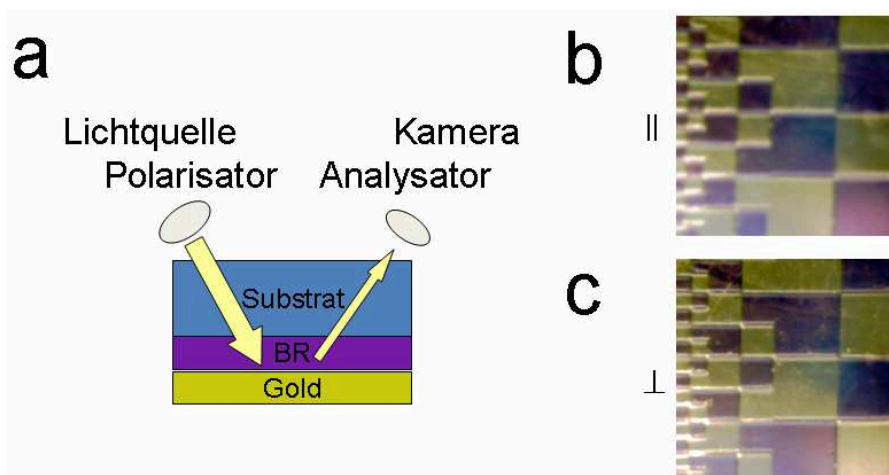
#### 4.5.4.2 Polarisationserhaltung

Weil die polarisationsselektiv in Bakteriorhodopsin gespeicherten Daten später auch in Reflexion ausgelesen werden sollen, ist es erforderlich, dass die verwendeten Substrate eingestrahktes Licht polarisationserhaltend reflektieren.

Eine ausreichende Reflektanz, die für das Auslesen der Polarisationsdaten in Reflexion nötig ist, kann nur mit dielektrischen Schichten (z.B. ZnS) oder nachträglich aufgedampften metallischen Schichten (z.B. Silber, Gold, Chrom) bzw. Spiegelfolien (CA23, SK13102, SK13103, Fa. Aslan) erreicht werden. Es konnte gezeigt werden, dass mit dielektrischen Schichten ein Beschreiben des BRs möglich ist, ohne die Reflexionseigenschaften zu zerstören. Mit Hilfe einer Spiegelfolie (Silberspiegel, Goldspiegel) können Proben erhalten werden, die mittels polarisierten Lichts in Reflexion auslesbar sind. Ein solcher Polarisationsdatenspeicherstreifen kann in ID-Cards oder Ausweisdokumenten eingebettet werden. Die Abb. 64 zeigt das Auslesen eines mit Goldspiegel versehenen Polarisationsdatenspeichers. In Tab. 9 ist der Kartenaufbau unter Berücksichtigung des Reflexionsauslesens von Polarisationsdaten dargestellt. In der letzten Spalte sind die für Kartenprototypen verwendeten Materialien aufgeführt.

**Tab. 9:** Substratanforderungen und verwendetes Material, das die Anforderung erfüllt.

Substratanforderung	Absorption	Reflexion	Polarisation	verwendetes Material
1. Grenzfläche		Soll: 0% / Ist 4 %		
Deckfolie	Soll: 0%		nicht beeinflussend	Triacetatfolie
2. Grenzfläche		Soll: 0% / Ist 4 %		
BR-Schicht	je höher, desto besser		speichernd	BR-Guss
3. Grenzfläche		Soll: 100%		max. 90% Reflexion an
Spiegelschicht	Soll: 0%		Erhaltend	HRI-Material/ Metall
4. Grenzfläche				
Hintergrund	100%			



**Abb. 64:** Mit Hilfe von polarisiertem Licht auslesbare Daten in einem BR-Polarisations-Reflexionsspeicher, bestehend aus einem BR-Guss auf Triacetat und einer Spiegelschicht aus Gold. In (a) ist die Skizze des Aufbaus dargestellt. In (b) ist das Leselicht parallel zu Information A, in (c) ist es senkrecht dazu und es erscheint die zweite Information B.

#### 4.5.5 „*high density*“-BR-Datenspeicher

Mit den bisher erzielten Erkenntnissen kann ein „*high density*“-BR-Datenspeicher entwickelt werden. Unter dem Begriff „*high-density*“-Speicher wird das enorme Potential eines BR-Polarisations-Datenspeichers verstanden, der eine hohe Datendichte aufweist. In diesem Bereich werden erste Modellsysteme entwickelt.

Das bisher mit zwei Informationen dargestellte Entschlüsselungsverfahren ist auf beliebige Datensätze erweiterbar. Ein BR-Datenträger wird in Abhängigkeit der Polarisation der Beleuchtung durch die optische Erfassung des entstehenden Lichtmusters ausgelesen. Eine Manipulation der Daten durch Hinzufügen weiterer Datenpunkte durch einen erneuten Schreibvorgang würde bei Schichten, die eine Reflexionsschicht aus Metallen oder als Cover eine nicht für die TPA geeignetes Substrat enthalten, sofort eine Beschädigung aufweisen und damit unlesbar werden. BR-Schichten, die mit HRI-Materialien ausgestattet sind, z. B. DVDs, können als Datenträger nachträglich beschrieben werden und weisen durch die Möglichkeit verschiedene Polarisationen zu speichern eine höhere Datendichte als konventionelle Datenträger auf.

Die Information in optischen Datenträgern ist in Form von Bits (*binary digit*) gespeichert. Ein Bit kann zum Beispiel den Wert 0 oder 1 annehmen, dieser wird durch zwei unterscheidbare Zustände des Datenträgers erzeugt. Werden acht solcher Bits zu einer Grundeinheit zusammengefasst, ergibt sich ein Byte (1 Byte = 8 Bit). Ein solches Byte deckt  $2^8=256$  unterscheidbare Kombinationen ab und kann z.B. als ein Buchstabe interpretiert werden. Bei optischen Datenträgern, wie DVDs, werden die Daten in Form von Vertiefungen (Pits) gespeichert. Gegenüber einer normalen DVD, bei der durch Vertiefungen ein Bit nur die Zustände 0 oder 1 darstellen kann, vermag eine BR-Datendisk die Informationen in verschiedenen Polarisationsrichtungen zu speichern. Dieses erlaubt entsprechend der eindeutig unterscheidbaren Polarisationsrichtungen eine Vielzahl an Speicherzuständen. Um die Anzahl der möglichen Speicherzustände eines BR-Polarisationsdatenspeichers mit einem binären Datenspeicher zu vergleichen, wird eine Auflösung von  $1^\circ$  angenommen. Damit ergeben sich 180 mögliche Zustände und somit für einen 2 Bit-BR-Polarisationsdatenspeicher  $180^2 = 32400$  unterscheidbare Zustände. Um diese mit einem binären System abzubilden müsste ein 15 Bit System mit  $2^{15} = 32768$  verschiedenen Zuständen verwendet werden. Somit ist prinzipiell das 7,5 fache an Kapazität nutzbar. Selbst wenn nur ein Bruchteil des 2-Bit-BR-Polarisationsdatenspeichers für z.B. ASCII-Zeichen verwendet werden würde, kann auf die gleiche Fläche das 4-fache an Informationen gespeichert werden. Die Abb. 65 stellt das Prinzip der Informationsdatenspeicherung dar.

## Informationsspeicherung im



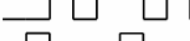
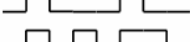
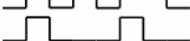

### Binäres System

- 1 Bit = 2 Zustände (0 oder 1)
- 1 Byte = 8 Bit =  $2^8 = 256$  unterscheidbare Zustände (reicht für ASCII-Textzeichen, bestehend aus Groß-/ Kleinbuchstaben, Zahlen, Sonderzeichen und Steuerzeichen)
- 15 Bit-System = 32768 Zustände

### BR-Polarisationsdatenspeicher

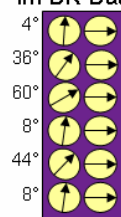
- 1 Bit = 180 Zustände (bei  $1^\circ$ -Schritten)
- 1 Byte = 2 Bit =  $180^2 = 32400$  unterscheidbare Zustände
- 7,5-fache Kapazität, wenn alle Zustände zur Datenspeicherung verwendet werden
- 4-fache Speicherkapazität bei gleicher Fläche (bei ASCII)

#### **Beispiel: ASCII-Datenspeicherung**

Text aus ASCII-Zeichen	Binäre Abfolge	Profil im Datenträger
B	01000010	
R	01010010	
-	00101101	
D	01000100	
V	01010110	
D	01000100	

**6 Byte = 48 Bit benötigt**

#### **Polarisation im BR-Datenträger**

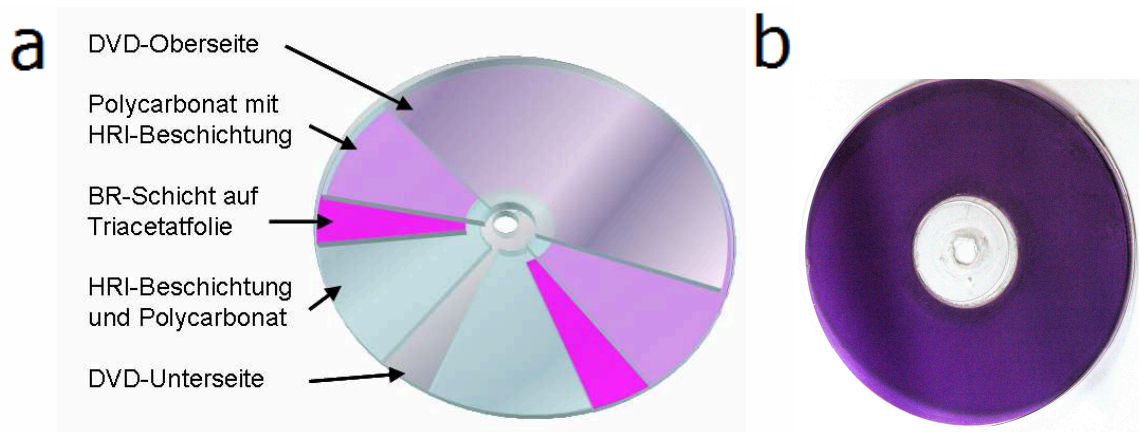


**6 Byte = 12 Bit benötigt**

**Abb. 65:** Vergleich der Informationsdatenspeicherung in einem klassischen optischen Datenträger, wie CD oder DVD, mit einem BR-Polarisationsdatenspeicher. Ein klassisches 8-Bit System reicht aus, um 256 Zustände zu unterscheiden und ASCII-Datensätze zu speichern.<sup>[83]</sup> Im Falle des BR-Polarisationsdatenspeichers würde bereits ein 2-Bit System ausreichen. Diese bietet 32400 unterscheidbare Zustände an. Somit könnte man zusätzliche Fehlerkorrekturen, Codes oder sogar ganze Wörter speichern.

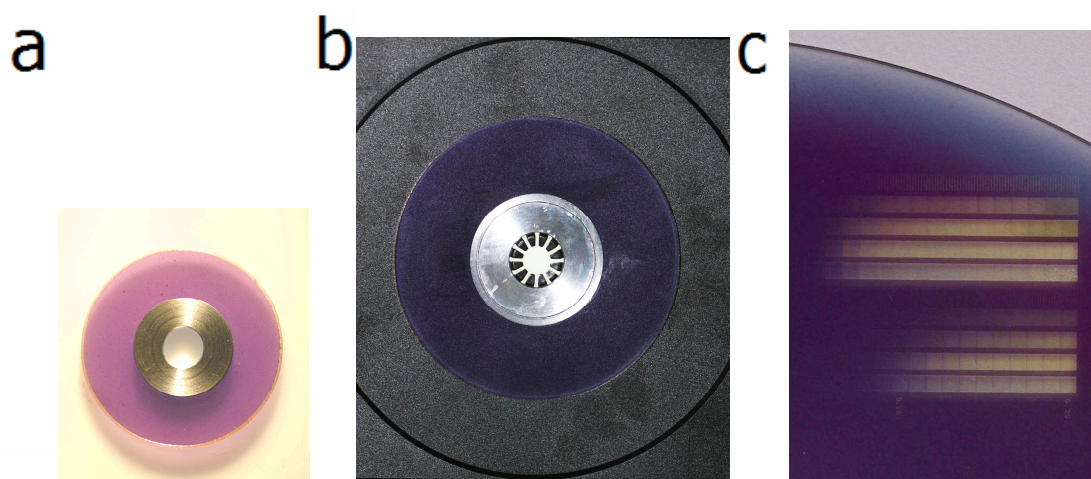
### **4.5.5.1** *Fertigung von optischen BR-Datendisks*

Zur Fertigung einer BR-Datendisk im handelsüblichen DVD-Format wird eine gegossene BR-Triacetatfolie mittels  $\text{CO}_2$ -Laser geschnitten. Durch Verkleben dieses BR-Triacetatfolienzuschnitts direkt auf die HRI-Schicht eines DVD-Polycarbonatrohrlings mit EPOTEK 301 wird mit einem temperierbaren Laminierwalzwerk ein DVD-Rohling in akzeptabler Qualität erhalten. Die Abb. 66 zeigt den schematischen Aufbau der BR-Datendisk sowie ein Foto der erzeugten BR-DVD. Des Weiteren werden BR-Mini-CDs ohne Reflexionsschicht zum Lesen in Transmission in einem ähnlichen Verfahren aus Foliensubstraten erstellt. Bis zu einem Durchmesser von 80 mm lassen sich so optische Datendisks mit BR verwirklichen, siehe Abb. 66.



**Abb. 66:** Optische Datendisks mit BR (a) Schematischer Aufbau der BR-DVD (b) Foto von einer realen BR-DVD.

In einem anderen Verfahren wird die HRI-Schicht (Indium-Zinnoxidschicht) eines DVD-Polycarbonatrohrlings mit wässriger BR-Gelatine-Suspension beschichtet und getrocknet. Dabei kommt es allerdings zu inhomogenen Schichtdicken. Die Beschichtung haftet gegenüber diversen Klimabedingungen (Temperatur 0-60 °C, unterschiedliche Luftfeuchtigkeiten) über Monate sehr gut. Durch den Zweiphotonenprozess ist eine sehr präzise Adressierung bei der Datenspeicherung möglich. Allerdings kann mit der verwendeten Optik nur eine Auflösung von 25  $\mu\text{m}$  erreicht werden. Dabei lässt sich das BR ohne Beeinträchtigung des Substrats auf der hergestellten DVD beschreiben. Erst bei sehr hohen Energien pro Feld (40 J/cm<sup>2</sup>) wird die Reflexionsschicht ablatiert und das Substrat verbrennt. Die Beschreibbarkeit dieser BR-CD-, BR-DVD-Modellsysteme, ist in Abb. 67 c gezeigt. Makroskopisch kann auch hier die Polarisationsdatenspeicherung gezeigt werden.



**Abb. 67:** (a) Mini-BR-CD, Durchmesser 30 mm (Metallring 15 mm). (b) 80 mm große BR-CD.

(c) beschichtete BR-DVD mit bestrahlten Feldern unterschiedlicher Intensität. Das Substrat ist für eine TPA-Belichtung geeignet.



Zum Auslesen eines solchen „*high density*“-Speichers müssen die in Kap 4.4.4 festgestellten Änderungen der Elliptizität für einen beschriebenen Bereich mit einem Messlaser detektiert werden. In Tab. 10 ist das Potential einer BR-Datendisk, deren Datenspeicherung auf Polarisation basiert, gezeigt. Zum Vergleich sind die Daten einer kommerziell erhältlichen DVD und CD mit 12 cm Durchmesser aufgeführt. Durch den Einsatz der Polarisation wird eine BR-DVD herkömmliche DVDs um ein vielfaches an Speicherkapazität übertreffen.

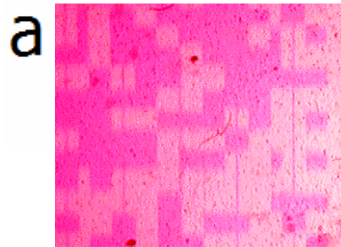
**Tab. 10:** Vergleich der Anforderungen der kommerziell erhältlichen optischen Datenträgern nach ECMA-279 und dem Potential einer BR-Datendisk.<sup>[84]</sup>

	DVD	CD	BR-CD /BR-DVD
Speicherkapazität	1,4 –4,7 GB Single Layer	640 – 700 MB	>35 GB Single Layer (bei gleicher Pixel-größe und 1° Winkelauflösung)
Linienabstand	0,74 µm	1,60 µm	<0,74 µm
Pit (Länge x Breite)	0,40-0,44 x 0,32 µm	0,83 x 0,60 µm	0,4 µm
Laser	635-650 nm	780-790 nm	532 nm
Rotationsgeschwindigkeit	570-1600 rpm	200-500 rpm	
Beschreibbarkeit	einseitig / zweiseitig	einseitig	
Scheibendurchmesser	8 cm / 12 cm	12 cm	8 cm / 12 cm
Gewicht	6-9 g / 13-20 g		14-18g
Brechungsindex des transparenten Substrats	Polycarbonat 1,55 +/- 0,1	Polycarbonat 1,55 +/- 0,1	Polycarbonat 1,55 +/- 0,1

#### **4.5.6** Optimierung des Schreibens auf Datenträgern mit verschiedenen Lasersystemen

Für das Beschreiben eines „*high-density*“-Speichers ist es wünschenswert die optische Größe eines Informationspixels zu verkleinern und gleichzeitig einen hohen Probendurchsatz zu ermöglichen. Für das Erzeugen von orts aufgelösten kleinsten Strukturen kommt vor allem das *TriLite*-System zum Einsatz. Das System besitzt gegenüber dem Galvanoscanneraufbau den Vorteil, dass es anstatt von runden etwa 30 µm großen Bildpunkten selbst in einer Auflösung von bis zu 1 µm quadratische Bildpunkte erzeugt. In Abb. 68 ist die Vergrößerung eines BR-Films mit quadratischen geblichenen Mustern gezeigt. Die Spotgröße beträgt dabei 7x7 µm<sup>2</sup>. Ein Nachteil des *TriLite*-Systems stellt allerdings die niedrige Pulsfrequenz dar, die zu einer viel längeren Bearbeitungszeit führt. Für die Mustererzeugung ist deswegen hauptsächlich das Galvanoscannersystem zum Einsatz gekommen, das höhere Pulsfrequenzen erlaubt, aber aufgrund der schlechteren Fokussierung nur Strukturen bis ca. 25 µm zulässt. Dieses System ist mit dem *Vector*-Laser bereits seit einigen Jahren in der Arbeitsgruppe etabliert. Durch den

neuen *Explorer XP* kann die Schreibgeschwindigkeit und damit der Durchsatz der Mustererzeugung erhöht werden. In Tab. 11 sind die Spezifikationen der einzelnen Systeme im Vergleich aufgeführt.



**Abb. 68:** (a) Detailausschnitt aus einem Barcode geschrieben mit dem TriLite-System. Die einzelnen Bildpunkte sind quadratisch mit einer Größe von  $7 \times 7 \mu\text{m}^2$ .

**Tab. 11:** Vergleich der Laser-Systeme zum Bestrahlen von BR.

	<i>Infinity</i>	<i>Explorer XP</i>	<i>Vector</i>	<i>TriLite-System</i>
Wellenlänge (nm)	1064, 532	532	532	1064, 532, 355
Pulsfrequenz (Hz)	1-50	60-300 k	20-60 k	1-50
Pulslänge (ns)	3	< 7 @60 kHz < 22 @ 300 kHz	6	3-4
Pulsprofil	Flat-Top	Gauß	Gauß	quadratisch
Leistungsbereich (W)	250 mJ/Puls	< 5 W	0,1-1 W	10 nW- 21 mW
besondere Eigenschaft		FPS		quadratische Blende
vorrangige Verwendung	Bestrahlung in Lösung	Mustererzeugung mit Auflösung >30 $\mu\text{m}$		Mustererzeugung mit Auflösung >1 $\mu\text{m}$

FPS: First Puls Suppression

#### 4.5.7 Verhalten von BR-Datenspeichern und BR-Schichten gegenüber Umwelteinflüssen

Für den Einsatz des BR-Datenspeichers müssen die möglichen Schäden durch Umwelteinflüsse (z.B. Temperatur, mechanische Beanspruchung) betrachtet werden. Für die Frage der Temperaturstabilität gilt es mehrere Aspekte zu beachten. Die maximal erreichbare Temperatur für einen BR-Datenspeicher auf wässriger Basis ist auf  $100 \text{ }^\circ\text{C}$  limitiert, da die Entstehung von Wasserdampf den Datenspeicher zerstören würde. Des Weiteren ist der erste Phasenübergang von BR zu beachten, somit sind Temperaturen über  $75 \text{ }^\circ\text{C}$  zu vermeiden. Sofern die Lagertemperaturen nicht über der Temperatur des Phasenübergangs von BR liegen, ist nicht mit einer irreversiblen Veränderung des unbeschriebenen BRs zu rechnen. Lediglich eine Rotfärbung des unbeschriebenen BRs wie es von Neebe<sup>[77]</sup> beschrieben ist, wird beim

Aufheizen eines BR-Datenspeichers beobachtet. Ein mit einem Polarisationsachsfeldmuster gelasener BR-Film ist über 3 Tage bei 60 °C beobachtet worden. Nach dem Abkühlen des BR-Films sind die Polarisationsdaten noch gut zu erkennen. Auch das kurzzeitige Aufheizen auf höhere Temperaturen (70-90 °C) für ca. 4 h lässt immer noch eine Beurteilung der verschiedenen Polarisationsinformationen zu, allerdings wird der Kontrast zwischen den beiden Informationen deutlich schlechter. Dies lässt sich zum einen auf die Erweichungstemperatur des Gelatinefilms zurückführen, zum anderen auf den ersten Phasenübergang von BR. Temperaturen weit über dem Phasenübergang von BR zerstören die gespeicherten Polarisationsinformationen.

Für die Langzeitdatenspeicherung in BR-Schichten kann z.B. die Wasserdampfdurchlässigkeit von Triacetatfolie ein Problem darstellen, da durch das Ausdiffundieren von Wasser aus einem Kartensystem, die BR-Schicht spröde werden kann. Celluloseacetat hat eine Wasserdampfdurchlässigkeit von 50 g/d\*m<sup>2</sup>.<sup>[83]</sup> Ebenso würde das Eindiffundieren von LM-Molekülen, wie z.B. Alkohol, das BR schädigen. Das Eindringen und Diffundieren von amphoteren, kleinen Molekülen muss unterbunden sein, um die Langzeitstabilität des BR-Datenspeichers zu gewährleisten. Um BR gegenüber ethanolschen Lösungsmittel, wie sie im industriellen Bereich vorkommen, besser zu schützen, wurde bereits an einer Verkapselung mit TEOS gearbeitet. Untersuchungen dazu finden sich bereits in den Arbeiten von *Schönafinger*.<sup>[85]</sup> Durch eine solche Verkapselung des BRs wird die Alkoholstabilität verbessert und kommt bereits für photochrome Schichten zum Einsatz.

Ein weiterer wichtiger Punkt im Alltagsgebrauch eines Datenträgers ist seine mechanische Stabilität. So stellt vor allem die hohe Kratzanfälligkeit der Triacetatfolie ein großes Problem für die Langzeitverwendung eines BR-Datenspeichers dar. Als Schutzschicht vor Kratzern ist bereits das auf dem Markt erhältliche, 30 µm dicke, biegsame *D 263™ T Thin Glass* (Fa. *Schott*) getestet worden. Eine Alternative sind sogenannte Displayschutzfolien, wie sie für Smartphones, etc. zum Einsatz kommen.

Bisher sind die Stabilitätstests jeweils an einzelnen Komponenten geprüft worden. Für einen komplexen Aufbau eines Datenträgers oder eines Kartensystems bestehend aus Deckfolie, BR-Schicht, Substratfolie, Reflexionsschicht, Kartengrundkörper und Kleber ist ein solcher Test bisher nicht durchgeführt worden. Ebenso ist zu berücksichtigen, dass im alltäglichen Einsatz bzw. in der Natur nicht einzelne Beanspruchungen auf die BR-Probe einwirken, sondern komplex miteinander kombiniert vorkommen.

## 4.6 Entwicklung eines Auslesegerätes für Polarisationsdatenspeicher

Die Entwicklung und Automatisierung von optischen Messsystemen ist für die Verbreitung von technischen Speichermedien zwingend notwendig. Ein Beispiel dafür ist, dass sich optische Datenspeicher wie CDs, DVDs und Bluerrays nur durch stetig verbesserte Schreib- und Leselaufwerke auf dem Markt durchsetzen konnten. Um BR als neues Zukunft trächtiges Produkt auf den Markt zu bringen, ist neben der visuellen Beurteilung von *low-density* BR-Polarisationsdatenspeichern ein automatisches Auslesen der Polarisationsdaten wichtig. So kann das entwickelte Auslesegerät zur Überprüfung der in den BR-Film geschriebenen Daten in einem Ausweisdokument verwendet werden. Die Kernkomponenten dieses Gerätes sind eine LED-Beleuchtung mit Diffuser, zwei bewegliche Polarisationsfilter und eine Kamera. Die Software zum Datenauslesen ist mittels *Labview 2009* (Fa. *National Instruments*), geschrieben worden. Zunächst werden die Baugruppen des Polarisationsdatenauslesesystems, deren Bedeutung und die grundlegende Technik betrachtet. Die Komponenten, die für die Bildverarbeitung berücksichtigt werden müssen, sind:

- der optische Polarisationsdatenspeicher als zu prüfendes Objekt
- die Beleuchtung
- die Optik
- der Sensor
- der Auswertalgorithmus
- die Kommunikation mit dem Benutzer

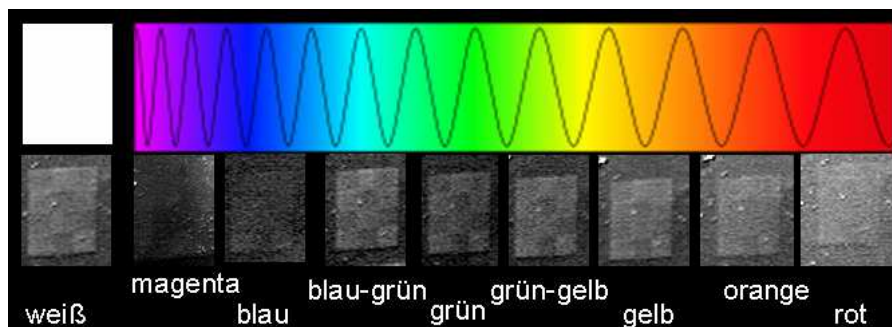
### 4.6.1 Objekt

Das zu prüfende Objekt wird mit dem in Kap. 3.2.3 gezeigten Schreibsystem erzeugt. Das Objekt kennzeichnet sich durch einen ausreichenden Kontrast zwischen den zwei gespeicherten Polarisationsdaten aus. Darüber hinaus hat es eine definierte Strukturgröße (z.B. 15 x 15 mm Transmission bzw. 8 x 8 mm Reflexion). Der kleinste Informationspixel ist  $>31 \mu\text{m}$ . Für ein gutes Signal-Rausch-Verhältnis der gespeicherten Polarisationsinformation zum Hintergrund ist im Moment noch eine hohe OD nötig. Problematisch sind Wölbungen der Musterproben, deswegen müssen die Muster aufgeklebt sein, in Karten laminiert werden oder zwischen Objektträgern gelagert sein.

#### 4.6.2 Beleuchtung und Polarisation in Transmission

Die Beleuchtung ist für das Auslesen der gespeicherten Daten ausschlaggebend, da durch gezielte Beleuchtung das relevante Messsignal verstärkt wird und der maximal erreichbare Kontrast der Information zum Hintergrund eine zuverlässige Signalprozessierung gewährleistet. Ein zu geringer Kontrast, zum Beispiel durch unsaubere Polarisation oder unscharfe Kanten der gelaserten Bereiche auf dem BR-Film können dazu führen, dass eine Maschine das Merkmal nicht lesen kann, während es für das menschliche Auge noch erkennbar ist. Deshalb sind die Wellenlänge, die Intensität, die Richtung und die Polarisation des Lichtes zu kontrollieren und die Wechselwirkungen mit der Probe im Bezug auf Brechung, Reflexion und Absorption zu optimieren.

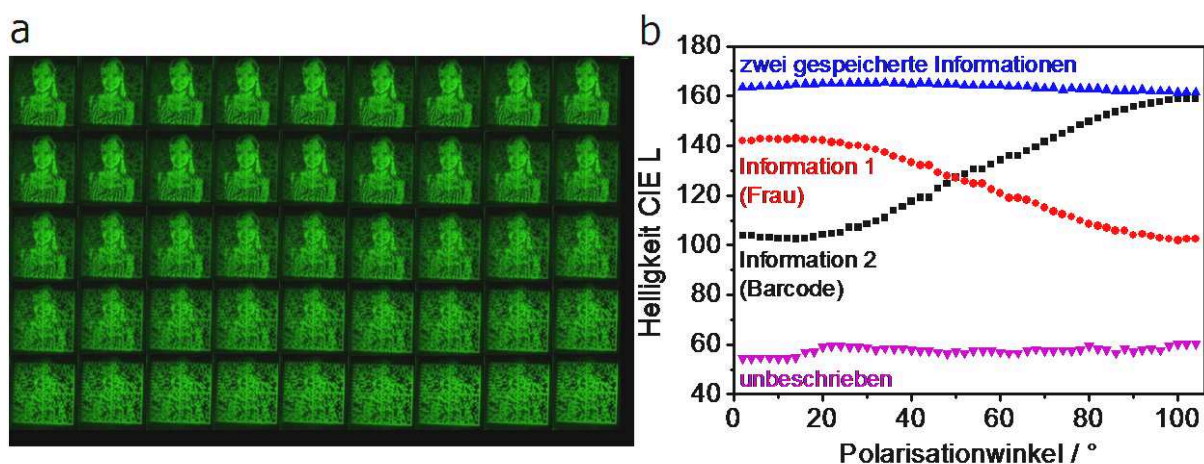
Zunächst ist mittels einem Farbfiltersatz und einer Weißlichtquelle die Lichtfarbe bestimmt worden, die ein kontraststarkes Bild liefert. Grünes Licht erweist sich als vorteilhaft. Abb. 69 zeigt den Einfluss von verschiedenen farbigen Beleuchtungen. Während zum Beispiel mit blauem und rotem Licht kaum ein Unterschied zwischen den Polarisationen des Schachbrettmusters zu erkennen ist, kann mit grünem Licht die Polarisation sichtbar gemacht werden.



**Abb. 69:** Einfluss von farbigen Beleuchtungen für das Auslesen eines Polarisationsdatenspeichers mit BR.

Grün ist die Komplementärfarbe des purpurfarbenen BRs. So kann ein beschriebener Bereich, durch die verminderte OD im grünen Messlicht erkannt werden. Ein Auslesen eines BR-Polarisationsdatenspeichers ist aber auch bei anderen Farbwellenlängen möglich. Anstelle einer Halogen-Weißlichtquelle und entsprechendem Farbfilter wird für die Miniaturisierung auf lichtstarke SMD-LEDs gesetzt (lichtemittierende Diode). Als Lichtquelle in den entwickelten Datenlesegeräten werden SMD-LEDs (*SMD-G01N-GS*, Fa. *Sloan AG*) mit einem Emissionsmaximum bei 525 nm eingebaut und einer Lichtstärke von 460 mcd. Nachdem die Lichtfarbe geklärt ist, stellt sich die korrekte Beleuchtung einer Probe als heikler Punkt bei der Entwicklung eines Auslesegerätes dar. Für das Datenlesen eines optischen Datenspeichers aus BR empfiehlt sich prinzipiell die Betrachtung der Datenpunkte

mit einer Hintergrundbeleuchtung bzw. im Durchlicht. Mit dem Laser beschriebene Bereiche erscheinen hell, unbeschriebene Bereiche sind dunkel. Das Auslesen von Daten, die unter verschiedenen Polarisierungen geschrieben worden sind, kann hier je nach Ausbleichungsgrad der umliegenden Felder durch einen Polfilter erfolgen. Der Polfilter ist entweder im Strahlengang zwischen Lichtquelle und BR-Datenspeicher oder zwischen BR-Datenspeicher und Detektor angebracht. Dies ist eine kontrastarme Methode. Kontrastreicher ist das Auslesen mit zwei Polfiltern, je einer zwischen Lichtquelle und Probe und einer zwischen Probe und Detektor. Sind die Polarisationsdatenfelder sehr intensiv (hoher Bleichungsgrad) beschrieben, empfiehlt es sich beide Polfilter zu verwenden. Durch die Verwendung von zwei Polfiltern kann jeweils eine Information, getrennt von einer zweiten Information ausgelesen werden, siehe Abb. 70. Deutlich ist der Übergang der 1. gespeicherten Polarisation (eine Frau im Streifenkleid) hin zu einem Datamatrixcode (2-dimensionaler Barcode) zu erkennen. Von Bild zu Bild wird die Polarisation um  $2^\circ$  weiter gedreht. Die Helligkeit des Bildes ändert sich je nachdem, welchen Bildbereich man betrachtet, wie folgt: Ein unbeschriebener Bereich hat bei der gewählten Beleuchtung und für den gemessenen Film einen Helligkeitswert  $L$  von 52-60. In einem Bereich, in dem nur eine Information gespeichert ist, variiert die Helligkeit von einem Minimum bei  $14^\circ$  (mit  $L=102$ ) zu einem Maximum bei  $104^\circ$  (mit  $L=159$ ). An einer Bildstelle, an der beide Informationen übereinander liegen, ist keine Intensitätsänderung ( $L=160-162$ ) festzustellen. Basierend auf diesen Erfahrungen konnte ein Auslesegerät für Transmission entwickelt werden. Der Aufbau und die Funktionen werden in den folgenden Kapiteln vorgestellt.

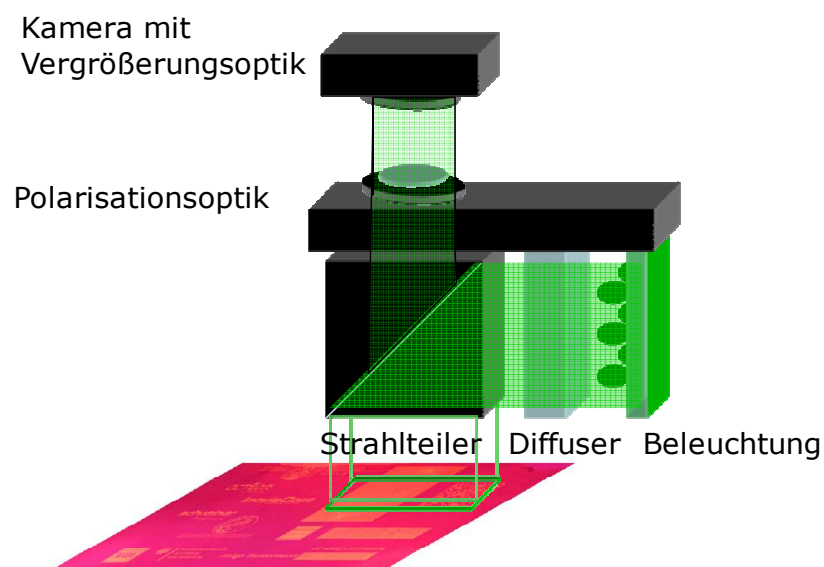


**Abb. 70:** (a) Aufgenommene Bilder nach jeweils  $2^\circ$  Verdrehung der Polfilter im Messaufbau. In der oberen Reihe ist die Information 1 (eine Frau) zu erkennen. Später tritt die Information 2 (Datamatrixcode) hervor. (b) Verlauf der Helligkeit für verschiedene Stellen des Bildes.

### 4.6.3 Beleuchtung und Polarisation in Reflexion

Für undurchsichtige Objekte, wie zum Beispiel ein Sicherheitsetikett, das an einem Objekt haftet oder auch einer ID-CARD, muss eine optimierte Beleuchtung zum Einsatz kommen. Dazu sind folgende Beleuchtungen für das Auslesen in Reflexion getestet worden: Punktlichtquelle, Ringbelichtung und axiale Belichtung.

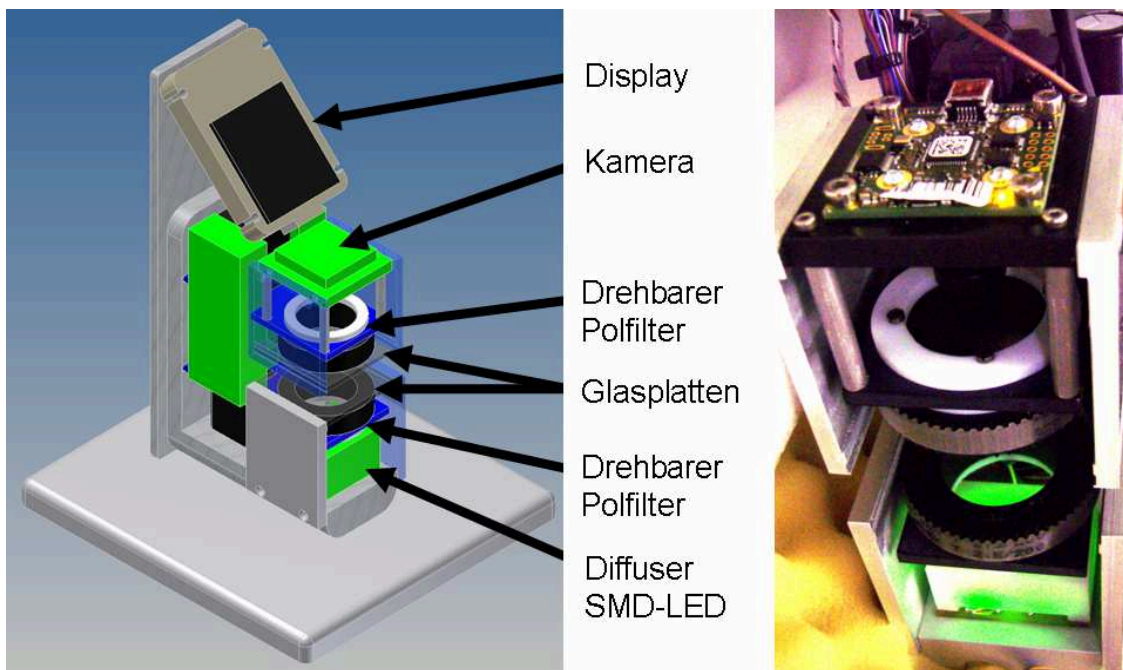
Die gerichtete Beleuchtung mit einer Punktlichtquelle aus einer Richtung oder mehreren Richtungen ist für eine Betrachtung des BR-Datenspeichers nur bedingt geeignet, da Glanz und Schattenbildung innerhalb der Probe auftreten und das Auslesen eines Speichers erschweren. Bei einem flachen Einfallswinkel tritt durch die Beleuchtung die Oberflächenstruktur stärker hervor. Somit werden im BR-Datenspeicher liegende Daten durch Kratzer, Fingerabdrücke etc. schlechter sichtbar. Durch Einsatz von einem Diffuser reduziert sich der Glanz. Eine ringförmig gerichtete Beleuchtung ermöglicht eine gleichmäßige Ausleuchtung von Proben. Für das Auslesen eines BR-Datenspeichers ist sie allerdings nicht geeignet, da an hochreflektierenden Oberflächen, Glanz auftritt und der Detektor nur die Reflexionen an der Oberfläche detektiert. Die richtige Wahl zum Beleuchten des reflektiven BR-Datenspeichers ist die diffuse axiale Beleuchtung mit zusätzlichem Polarisator. Die Verwendung eines Strahlteilerwürfels ist sinnvoll, weist aber hohe Kosten auf. Zudem kommt es zu Rückreflexionen am Strahlteilerwürfel sowie an dem umgebenden Halter, so dass die Bildqualität stark beeinträchtigt wird. Eine Strahlteilerplatte und ein abgeschrägter Diffuser, der den Teilstrahl, der an der Strahlteilerplatte von der Beleuchtung nicht zur Probe reflektiert wird, ausblendet, ist die richtige Lösung (Abb. 71).



**Abb. 71:** Diffuse axiale Beleuchtung mit zusätzlichem Polarisator zum Auslesen in Reflexion.

#### 4.6.4 Aufbau des Auslesegeräts

Der Aufbau in Transmission und Reflexion ist von den mechanischen Bauteilen und der Bildverarbeitung sehr ähnlich und unterscheidet sich lediglich in der Beleuchtung der Probe. Bei beiden Geräten wird der Einfluss von Fremdlicht durch die umschließende Hülle weitestgehend vermieden, zudem sind alle am Strahlengang befindlichen Teile schwarz eloxiert. Über ein Display wird mit dem Nutzer kommuniziert. Im Folgenden wird beispielhaft auf das BR-Datenspeicherauslesegerät in Transmission eingegangen. Die Kernkomponenten sind in Abb. 72 für den Aufbau in Transmission dargestellt. Die Ansteuerung und Bedienung erfolgt mittels selbst programmierten *Labview 2009* Programms. Zur Bilderfassung, Bildverarbeitung, Bildauswertung und Visualisierung sind die Module, *Vision Assistant 8.6*, *Vision Builder AI 3.6* und *NI-IMAQ* verwendet worden. Zur Steuerung der Schrittmotoren wird das *NI DAQmx* genutzt.



**Abb. 72:** Aufbau des BR-Polarisationsdatenauslesegeräts als technische Zeichnung und in real. Das Gerät ist in der Lage einen Polarisationsdatenspeicher in Transmission auszulesen. Auf dem Display des Auslesegeräts wird der Messfortschritt, sowie das Endergebnis angezeigt.

#### 4.6.5 Optik und Sensor

Für den Aufbau in Transmission werden in beide Zahnräder Polarisationsfilter eingeklebt. Das Drehen der Zahnräder wird über ein USB-Labview-Modul (*NI DAQmx USB-6501*) mit Schrittmotoren (*SMC 11*, *ST2818S1006A*, Fa. *Nanotec*) durchgeführt. Als Objektiv wird eine Linse des Typs *Lensagon BT8020N* mit einer numerischen Apertur von 2,0 und einer



Fokusslänge von 8 mm verwendet. Auf eine Nachjustierbarkeit der Linse wird verzichtet, da die selbst produzierten ID-Karten eine annähernd einheitliche Kartendicke haben. Als Sensoren für das einkommende Licht werden üblicherweise CCD-Chips (*charge coupled device*) oder CMOS-Chips (*complementary metal oxide semiconductor*) eingesetzt. In diesem Falle kommt ein 1/3" CMOS Sensor des Typs *USB-IDS UI-1226LE-C-HQ* (Fa. *IDS Imaging Development Systems GmbH*) zum Einsatz. Die Kameraauflösung beträgt 720x480 Pixel, der Sichtbereich der Kamera in Transmission beträgt 16x16 mm. Dies entspricht einer Pixelauflösung von 34  $\mu\text{m}$  für das Auslesen von Datenpunkten. Die Datenübertragung erfolgt per USB 2.0. Das Positionieren der Probe auf dem transparenten Glasmesstisch erfolgt durch den Benutzer, so dass das zu lesende Merkmal im Kamerabildfeld erscheint. Eine Ausrichtung ist nicht notwendig, da der Suchalgorithmus winkelunabhängig sucht. Eine weitere Glasscheibe schützt die Kamera vor Staub.

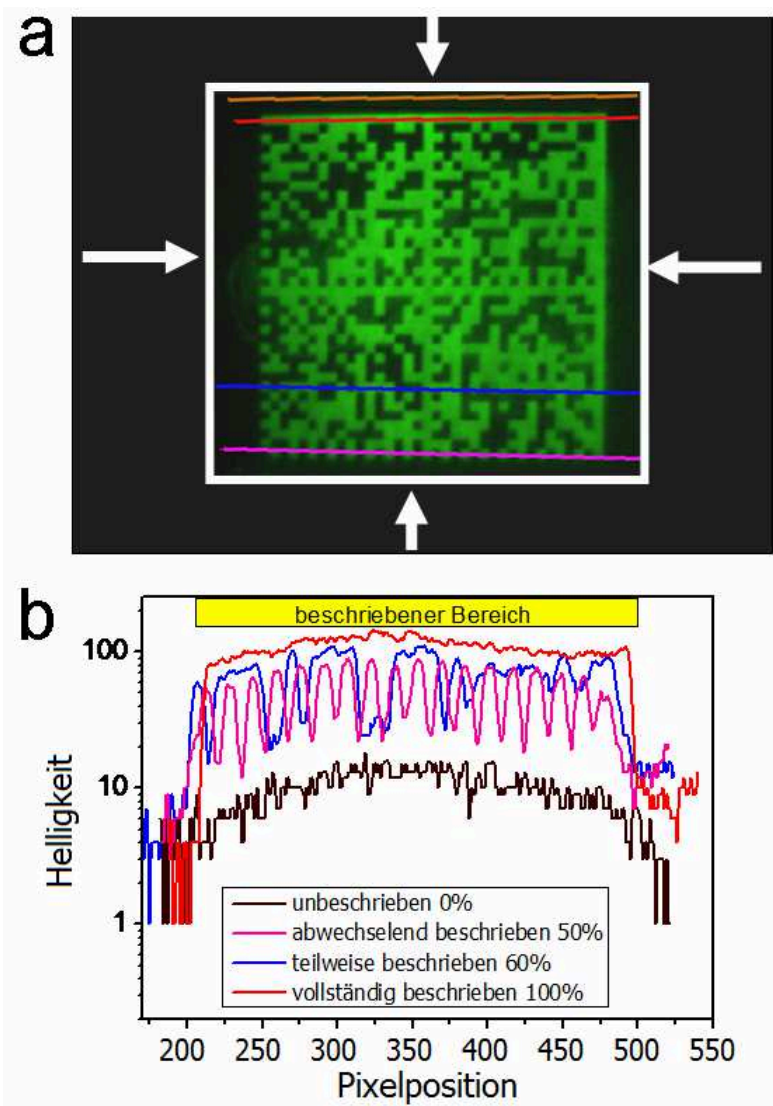
#### **4.6.6 Bildverarbeitung und Auswertung**

Zunächst werden beide Polarisationsfilter auf ihre Referenzposition gebracht, von der aus die Messung in verschiedenen großen Intervallen bis zum Ausleseendwinkel gefahren wird. Für jeden Intervallschritt, wird ein Bild zusammen mit seiner Winkelposition gespeichert. Die Intervallgröße beträgt z.B. 1°. Nach Aufnahme aller Bilder werden die Bilder bewertet und auf einen Datamatrixcode untersucht.

Doch bevor eine Auswertung des Bildes möglich ist, ist eine Bildoptimierung notwendig, um Störungen zu reduzieren. Zur Bildoptimierung zählen die Belichtungszeit, Kontrast und Helligkeitseinstellung sowie die Abtrennung einer bestimmten Farbkomponente. Von der Farbkamera wird ausschließlich der Grünkanal ausgewertet. Somit kann störendes Fremdlicht entfernt werden. Für die Erkennung des Barcodes sind nur Schwarzweißbilder auswertbar, infolgedessen wird das Originalbild in ein Schwarzweißbild umgewandelt. Zuvor wird das Bild durch einen Lowpassfilter geschickt, um kleine Störungen im Bild, wie Staubpartikel, die sich als lokale Helligkeitsunterschiede zeigen, zu reduzieren. Dem Nutzer wird das Originalbild angezeigt.

Um den beschriebenen Bereich einer BR-Probe automatisch zu erkennen, wird von allen vier Richtungen nach einer Kante mit hinreichendem Helligkeitskontrast des Objektes gesucht, siehe Abb. 73 a. Ein beschriebener Bereich unterscheidet sich immer von einem unbeschriebenen Bereich unabhängig von der Polarisation des Feldes. Da nur der Grünkanal, also ein Grauwertbild ausgewertet wird, entspricht eine Kante einem Helligkeitsunterschied

und kann somit durch das Überschreiten eines Schwellenwertes gefunden werden. Dieses Prinzip funktioniert nur für BR-Filme gleicher OD mit dem gleichen Schwellenwert. Eine bessere Alternative stellt die Suche nach einem Maximum in der ersten Ableitung einer Linie, die über die Kante gemessen wird, dar. In Abb. 73 b ist das Prinzip der Objekterkennung eines beschriebenen Datenfeldes im BR-Film am Beispiel eines Datamatrixcodes gezeigt. Die verschieden farbigen Linien im Bild sind getrennt als Histogramm dargestellt.



**Abb. 73:** Prinzip der Objekterkennung eines beschriebenes Datenfeldes im BR-Film am Beispiel eines Datamatrixcodes. (a) Unterschiedliche Bereiche des Barcodes sind als farbige Linien im Bild markiert und in (b) als Helligkeits-Histogramm für verschiedene Pixelpositionen dargestellt. An der Kante zwischen unbeschriebenen und beschriebenen Bereich nimmt die Helligkeit um eine 10-er Potenz zu. Somit ist eine zuverlässige Detektion des Datenfeldes möglich. Anschließend wird in diesem Bereich eine Mustererkennung durchgeführt.

Ein unbeschriebener BR-Film weist die niedrigste detektierte Helligkeit auf, da das Messlicht vom ungeblichenen BR absorbiert wird. In den Bereichen, in dem Informationen gespeichert worden sind, zeigt das Histogramm entsprechend der ausgeblendenen Pixel entlang einer der Testlinien entweder ein alternierendes Signal (violette und blaue Linie) oder eine konstant hohe Helligkeit (rote Linie).

Der durch die Bildhelligkeit erkannte relevante Datenbereich wird anschließend nach einem Muster, dem Datamatrixcode, untersucht. Die Mustererkennung eines Datamatrixcode als 2-DCode ist im Vergleich zu anderen Codes einfacher, da der Code bei allen Datamatrixcodes eine Startsequenz erhält, dies ist die L-Form und die alternierenden Pixel am Rand. Lediglich die Größe und Anzahl der Elemente variiert. Somit ist auch eine Erkennung unter verschiedenen Verdrehungen und Größenverhältnissen möglich. Ein weiterer Vorteil des in den 80er Jahren entwickelten Datamatrixcodes besteht in der Redundanz der Information, der bei dem heute üblichen Datamatrixcode (ECC 200, *error correction code*) auch bei starker Beschädigung (bis zu 25%) ein Auslesen ermöglicht.<sup>[86-87]</sup> Vor allem Oberflächenkratzer und Staubpartikel auf dem zu prüfenden Objekt stellen ein Problem für die optische Detektion der Polarisationsdaten dar, weil sie Teile des polarisationsverschlüsselten Datamatrixcodes überdecken und somit nicht erkannt werden.

#### **4.6.7** Kommunikation mit dem Benutzer

Nachdem die einzelnen Schritte der Bildverarbeitung gezeigt worden sind, soll das gesamte System sowie die Bedienung kurz vorgestellt werden. Das System besteht aus einem Einschub für den Polarisationsdatenspeicher, einem Taster und einem 3,5“ Display. Die Abb. 74 a zeigt die Außenansicht des Polarisationsdatenlesegerät. Im linken Teil des Bildes sind die beiden encodierten Informationen zu erkennen, die aus dem Musterausweis gelesen worden sind. In Abb. 74 b ist das Display gezeigt, mit dem der Nutzer diese Informationen vorgestellt bekommt.

Über das Display wird die Kommunikation zwischen System und Benutzer über die programmierte Software in einer graphisch schlichten *Labview*-Oberfläche gewährleistet (siehe Abb. 75). Drei Leuchtfelder in der oberen Zeile zeigen den Status des Systems an. Im darunter liegenden Feld werden während der Messung die aufgenommenen Bilder präsentiert. Im unteren Drittel werden die Anweisungen an den Nutzer und die decodierte Information des Datamatrixcodes dargestellt.



**Abb. 74:** (a) Polarisationsdatenlesegerät mit Ausweiskarte und ausgelesenen Polarisationsdaten in Form von zwei unterschiedlichen Bildern, einer Frau und einem Datamatrixcode. (b) Display und Bedienknopf.



**Abb. 75:** Programmierte *Labview* Benutzeroberfläche, die auf dem Gerätedisplay angezeigt wird.

#### 4.6.8 Zusammenfassung

Es ist ein neuartiges Polarisationsdatenauslesegerät entwickelt worden, mit dem die polarisationsverschlüsselten Daten in optischen Datenträgern auf BR-Basis entschlüsselt werden können. Durch Verwendung von grünem polarisiertem Licht kann der Dateninhalt in Transmission und Reflexion mit einem CMOS-Sensor detektiert werden. Die geschriebene Labview-Software steuert das Gerät an, zeichnet die Bilder auf, wertet diese aus und entschlüsselt den Datamatrixcode. Eine einfache Handhabung des Geräts ermöglicht auch ungeschulten Nutzern die Auslesung eines BR-Polarisationsdatenspeichers.

## 5 Zusammenfassung und Ausblick

Seit Entdeckung der vielfältigen Eigenschaften des Bakteriorhodopsin wird versucht diese technisch nutzbar umzusetzen. Diese Arbeit hat sich mit der technischen Verwendung von BR-Schichten als Polarisationsdatenspeicher befasst. Dabei sind zunächst die molekularen und strukturellen Veränderungen des BRs beobachtet worden.

Die Erzeugung von TPP-Produkten beruht auf einer durch hochenergetische Laserstrahlung hervorgerufenen photochemischen Reaktion (von B<sub>570</sub> zu P<sub>360</sub>), die an einem Farbwechsel des BRs von purpur nach gelb zu erkennen ist. Dabei kommt es zu einer Reduktion der Schiff'schen Base und der Bildung einer N-Retinyln-Spezies. Die Änderungen der Absorptionseigenschaften der erzeugten TPP-Produkte ist mit UV-Vis- und CD-Spektroskopie untersucht worden. Zudem treten strukturelle Änderungen bezüglich der Form der PM auf. Diese sind in Zusammenarbeit mit *Baumann* und *Chizik* am AFM und SAXS charakterisiert worden. Des Weiteren konnte mittels Massenspektrometrie die irreversible Freisetzung von CO<sub>2</sub>, durch Decarboxylierung zweier spezifischer Carbonsäurefunktionen des Proteins festgestellt werden.

Diese auf innermolekularer und supramolekularer Ebene bedingten Veränderungen sind makroskopisch in Form der Polarisationsdatenspeicherung nutzbar. Den Schwerpunkt dieser Arbeit bildet die Untersuchung der mittels Pulslasers erzeugten photoinduzierten Anisotropie im BR-Film bzw. die auf diese Weise erzeugte makroskopisch nutzbare Polarisationsdatenspeicherung. Die von der Bestrahlungsdosis abhängigen Polarisationsänderungen in BR-Filmen ist untersucht worden und kann anschaulich mittels Stokes-Vektoren gezeigt werden. Das erstellte Modell beschreibt diese Anisotropie mathematisch.

Durch die Verwendung der Polarisation steigert sich die Speicherkapazität auf optischen Datenträgern mühelos um das 4-fache der bisherigen Technologie, ohne dabei das gesamte Potential der Polarisationsdatenspeicherung bereits auszureizen. Die Polarisationsdatenspeicherung stellt neben der bereits bekannten Photochromie des BRs eine weitere technisch nutzbare Funktion dar, die mit dem biologischen Material erzielt werden kann.

## 6 Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. Hampp für das interessante und vielseitige Thema der Datenspeicherung in BR-Schichten. Die zahlreichen Kooperationen mit Industriepartnern im „Bsafe plus“-Projekt haben mir erlaubt neben dem wissenschaftlichen Thema sehr interdisziplinär zu agieren und im Bereich der Anwendungstechnik von BR Arbeiten und Entwicklungen voranzutreiben. Gerade durch den regen Kontakt mit der Feinmechanik und Elektronikwerkstatt konnten wissenschaftliche Erkenntnisse für eine industrielle Einsetzbarkeit von BR als Sicherheitsmerkmal und optischer Datenspeicher vorbereitet werden. Durch den Besuch einer Konferenz und eines Symposiums in China bin ich mit der asiatischen Kultur in Kontakt gekommen und konnte im Rahmen der PhD School of Nanobiotechnology den Kontakt mit Wissenschaftlern aus anderen Ländern wahrnehmen. Ich habe mich von dem internationalen Forschergeist motivieren lassen und internationale Erfahrungen sammeln können. Neben meinem Doktorvater möchte ich auch Herrn Prof. Dr. Essen für die freundliche Übernahme der Zweitkorrektur danken.

Ein weiterer Dank gebührt meinen Arbeitskollegen Hendrik Reinhardt und Philipp Behrendt, mit denen ich mich über fachliche Themen austauschen konnte.

Ebenso danke ich den Urgesteinen ☺ des AKs Frank Noll, Hee-Choel Kim und Nina Schneider für ihre stete Unterstützung. Des Weiteren bedanke ich mich für die Messungen am SAXS bei Ivan Chizik und für AFM-Messungen bei Peter Baumann, sowie für die erfolgreiche Kooperation mit Daniel Rhinow am MPI (Frankfurt).

Besonders möchte ich mich auch bei Uwe Linne bedanken insbesondere für seinen großen Einsatz für massenspektrometrischen Fragen. Dem Team der Massenspektrometrie-Abteilung danke ich ebenfalls herzlich für das Messen zahlreicher Proben. Des Weiteren möchte ich mich bei meiner Schwester Kathrin und meiner Freundin Mareike für ihre moralische Unterstützung und den vielen Tipps und Ratschläge zur Korrektur bedanken. Letztendlich möchte ich mich auch bei meinen Eltern und Freunden bedanken, die mich während des Studiums und der Promotion gefördert und begleitet haben.

## 7 Literatur

- [1] C. R. Woese, Archaeobakterien. *Sci. Am.* **1981**, 244, 94.
- [2] D. Oesterhelt, W. Stockenius, Rhodopsin-like protein from the purple membrane of *Halobacterium halobium*. *Nature, New Bio*, **1971**, 233, 149-152.
- [3] T. Tolxdorff, Bilder auf der Purpurmembraan - Technologien nach dem Vorbild der Natur. *PraxisComputer* **1991**, 6, 62-64.
- [4] D. Oesterhelt, J. Tittor, Two pumps, one principle: light-driven ion transport in halobacteria. *Trends Biochem. Sci.* **1989**, 14, 57-61.
- [5] U. Haupts, J. Tittor, D. Oesterhelt, Closing in on bacteriorhodopsin: Progress in Understanding the molecule. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **1999**, 28, 367-399.
- [6] T. Fischer, Photochemische und biochemische Modifikation von Bakteriorhodopsin. Optische Datenspeicherung in Hybridbio-Materialien, *Dissertation*, Philipps-Universität Marburg, **2005**.
- [7] J. Böttcher, Charakterisierung von stabilen biphotonisch induzierten Photoprodukten in Bakteriorhodopsin-Filmen, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2004**.
- [8] P. Zimmermann, F. Pfeifer, Salzliebende Mikroorganismen. *Biol. Unserer Zeit* **2004**, 34, 80-87.
- [9] N. Hampp, Bacteriorhodopsin as a Photochromic Retinal Protein for Optical Memories. *Chem. Rev.* **2000**, 100, 1755-1776.
- [10] H. Lücke, B. Schobert, H.-T. Richter, J.-P. Cartailier, J.K. Lanyi, Structural changes in bacteriorhodopsin during ion transport at 2 Ångström resolution. *Science* **1999**, 286, 255-260.
- [11] H. Houjou, K. Koyama, M. Wada, K. Sameshima, Y. Inoue, M. Sakurai, Effects of the protein electrostatic environment on the absorption maximum of bacteriorhodopsin. *Chem. Phys. Let.* **1998**, 294, 162-166.
- [12] M. Shibata, T. Tanimoto, H. Kandori, Water Molecules in the schiff base region of bacteriorhodopsin. *J. Am. Chem. Soc.* **2003**, 125, 13312-13313.
- [13] M. Shibata, H. Kandori, FTIR studies of internal water molecules in the schiff base region of bacteriorhodopsin. *Biochem.* **2005**, 44, 7406-7413.

- [14] R. Henderson, P. N. T. Unwin, Three-dimensional model of purple membrane obtained by electron microscopy. *Nature* **1975**, 257, 28-32.
- [15] R. Henderson, J.M. Baldwin, T. A. Ceska, F. Zemlin, E. Beckmann, K. H. Downing, Model for the structure of bacteriorhodopsin based on high-resolution electron cryo-microscopy. *J. Mol. Biol.* **1990**, 213, 899-929.
- [16] Y. Kimura, D. G. Vassilyev, A. Miyazawa, A. Kidera, M. Matsushima, K. Mitsuoka, K. Murata, T. Hirai, Y. Fujiyoshi, Surface of bacteriorhodopsin revealed by high-resolution electron crystallography. *Nature* **1997**, 389, 206-211.
- [17] N. Grigorieff, T. A. Ceska, K. H. Downing, J. M. Baldwin, R. Henderson, Electron-crystallographic Refinement of the Structure of Bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **1996**, 259, 393-421.
- [18] H. Luecke, H.-T. Richter, J. K. Lanyi, Proton Transfer Pathways in Bacteriorhodopsin at 2.3 Angstrom Resolution. *Science* **1998**, 280, 1934-1937.
- [19] L.-O. Essen, R. Siegert, W. D. Lehmann, D. Oesterhelt, Lipid patches in membrane protein oligomers: Crystal structure of the bacteriorhodopsin-lipid complex. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, 95, 11673-11678.
- [20] S. Mitaku, K. Ikuta, H. Itoh, R. Kataoka, M. Naka, M. Yamada, M. Suwa, Denaturation of bacteriorhodopsin by organic solvents. *Biophys. Chem.* **1988**, 30, 69-79.
- [21] C. G. Brouillette, D. D. Muccio, T. K. Finney, pH dependence of bacteriorhodopsin thermal unfolding. *Biochemistry* **1987**, 26, 7431-7438.
- [22] N. Hampp, Bacteriorhodopsin: mutating a biomaterial into an optoelectronic material. *Appl. Microbiol Biotechnol* **2000**, 53, 633-639.
- [23] J.-P. Cartailler, H. Luecke, X-Ray Crystallographic Analysis Of Lipid-Protein Interactions In The Bacteriorhodopsin Purple Membrane. *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* **2003**, 32, 285-310.
- [24] N. Hampp, A. Miller, Bakteriorhodopsin: Ein Biopolymer für die optische Informationsverarbeitung. *Werk + Wirken* **1989**, 6, 5-8.
- [25] U. Haupts, J. Tittor, E. Bamberg, D. Oesterhelt, General Concept for Ion Translocation by Halobacterial Retinal Proteins: The Isomerization/Switch/Transfer (IST) Model. *Biochemistry* **1997**, 36, 2-7.



- [26] W. Kühlbrandt, Bacteriorhodopsin - the movie. *Nature* **2000**, *406*, 569-570.
- [27] G. Varo, J. K. Lanyi, Pathways of the rise and decay of the M-photointermediate(s) of bacteriorhodopsin. *Biochemistry* **1990**, *29*, 2241-2250.
- [28] T. Fischer, N. Hampp, Two-Photon-Absorption of Bacteriorhodopsin: Formation of a red-shifted thermally stable photoproduct F<sub>620</sub>. *Biophys. J.* **2005**, *89*, 1175–1182.
- [29] M. B. Masthay, D.M. Sammeth, M.C. Helvenston, C. B. Buckman, W. Li, M. J Cde-Baca, J. T. Kofron, The laser-induced blue state of bacteriorhodopsin: mechanistic and color regulatory roles of protein-protein interactions, protein-lipid interactions, and metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3418-3430.
- [30] J. Tittor, U. Schweiger, D. Oesterhelt, E. Bamberg, Inversion of proton translocation in bacteriorhodopsin mutants D85N, D85T, and D85,96N. *Biophys. J.* **1994**, *67*, 1682-1690. 31, 33, 34, 48
- [31] J. Sasaki, L. S. Brown, Y.-S. Chon, H. Kandori, A. Maeda, R. Needleman, J. K. Lanyi, Conversion of Bacteriorhodopsin into a Chloride Ion Pump. *Science* **1995**, *269*,73-75.
- [32] T. Marti, S. J. Rosselet, H. Otto, M. P. Heyn, H. G. Khorana, The retinylidene Schiff base counterion in bacteriorhodopsin. *J. Biochem.* **1991**, *266*, 18674-18683.
- [33] G. J. Turner, L. J. W. Miercke, T. E. Thorgeirsson, D. S. Kliger, M. C. Betlach, R. M. Stroud, Bacteriorhodopsin D85N: Three spectroscopic species in equilibrium. *Biochemistry* **1993**, *32*, 1332-1337.
- [34] U. Schweiger, J. Tittor, D. Oesterhelt, Bacteriorhodopsin can function without a covalent linkage between retinal and protein. *Biochemistry* **1994**, *33*, 535-541.
- [35] E. Arnold, Gestaltung und Aufbau eines Versuchs im astronomischen Praktikum zur Messung des Magnetfeldes in Sonnenflecken. Staatsexamensarbeit, Albert-Ludwigs-Universität Freiburg, Freiburg, **2009**.
- [36] E. Hecht, *Optik*, 3. Aufl., Oldenbourg Verlag, München, **2001**, S. 544 ff.
- [37] F. Pedrotti, L. Pedrotti, W. Bausch, H. Schmidt, *Optik für Ingenieure*, 4. Aufl., Springer Verlag, Heidelberg, **2008**, S. 398 ff.
- [38] <http://de.goldenmap.com/M%C3%BCller-Matrix>, Abrufdatum: 12.1.2012.
- [39] S. Kirchberg, Photoinduzierte Schichtdickenmodifikation von Bakteriorhodopsinfilmen, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2007**.

- [40] M. Young, *Optik, Laser, Wellenleiter*, Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, **1997**, 243 ff.
- [41] Z. Yang, Photoinduzierte Mikrostrukturierung und Anisotropie in Bakteriorhodopsin-Filmen, Dissertation, Philipps-Universität Marburg, 2008.
- [42] Polytec GmbH, Handbuch - Grundlagen der Weißlicht-Interferometrie 2010. <http://www.polytec.com/de/loesungen/oberflaechenprofile-messen/grundlagen-der-weisslicht-interferometrie/>, Abrufdatum: 25.5.2012.
- [43] <http://www.photophysics.com/tutorials/circular-dichroism-cd-spectroscopy>, Abrufdatum: 26.11.2011.
- [44] [http://www.cup.uni-muenchen.de/oc/carell/teaching/stereochemie/kap%204\\_chiropische%20eigenschaften%20chiraler%20verbindungen.pdf](http://www.cup.uni-muenchen.de/oc/carell/teaching/stereochemie/kap%204_chiropische%20eigenschaften%20chiraler%20verbindungen.pdf), Abrufdatum: 07.04.2012.
- [45] R. Horn, Zeitaufgelöste Messung der Faltung und Pigmentbindung des Lichtsammelproteins LHCIIB anhand verschiedener spektroskopischer Monitore, *Dissertation*, Johannes Gutenberg-Universität Mainz, **2004**.
- [46] J. T. Yang, Protein Secondary Structure Estimation Programm, *Table III of Methods in Enzymology* **1986**, 130, 208-269.
- [47] F. Vewinger, Entwicklung und Test eines neuartigen Detektors zur Bestimmung des Polarisationszustands von Licht, *Diplomarbeit*, Universität Kaiserslautern, **2000**.
- [48] Thorlabs, Operation Manual: Thorlabs Instrumentation: Polarization Analyzing System, *PAX5710 / PAX5720*, **2008**.
- [49] <http://www.infratec.de/de/thermografie/waermebildkamas/variocamr-hr-research-600-serie.html>, Abrufdatum: 25.4.2012.
- [50] S. Hayashi, E. Tajkhorshid, E. Pebay-Peyroula, A. Royant, E. M. Landau, J. Navarro, K. Schulten, Structural determinants of spectral tuning in retinal protein – bacteriorhodopsin vs sensory rhodopsin II. *J. Phys. Chem. B* **2001**, 105, 10124-10131.
- [51] R. R. Birge, N.B. Gillespie, E. W. Izaguirre, A. Kusnetzow, A. F. Lawrence, D. Singh, W. Song, E. Schmidt, J. Stuart, S. Seetharaman, K. J. Wise, Biomolecular electronics: Protein-based associative processors and volumetric memories. *J. Phys. Chem. B* **1999**, 103, 10746-10766.

- [52] J. Czege, L. Rheinisch, Photodestruction of bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **1991**, *54*, 923.
- [53] B. H. Cumpston, S. P. Ananthavel, S. Barlow, D.L. Dyer, J. E. Ehrlich, L. Erskine, A. Heikal, S.M. Kuebler, I.-Y. S. Lee, D. McCord-Maughton, J. Qin, H. Röckel, M. Rumi, X.-L. Wu, S. R. Marder, J.W. Perry, Two-photon polymerization initiators for three-dimensional optical data storage and microfabrication. *Nature* **1999**, *398*, 51-54.
- [54] S. Kawata, Y. Kawata, Three-dimensional optical data storage using photochromic materials. *Chem. Rev.* **2000**, *100*, 1777-1778.
- [55] M. B. Masthay, D. M. Sammeth, M. C. Helvenston, C. B. Buckman, W. Li, M. J. Cde-Baca, J. T. Kofron, The laser-induced blue state of bacteriorhodopsin: mechanistic and color regulatory roles of protein-protein interactions, protein-lipid interactions, and metal ions. *J. Am. Chem. Soc.* **2002**, *124*, 3418-3430.
- [56] S. Druckmann, R. Renthal, M. Ottolenghi, W. Stoeckenius, The radiolytic reduction of the Schiff-base in bacteriorhodopsin. *Photochem. Photobiol.* **1984**, *40*, 647-651.
- [57] T. Schreckenbach, B. Walckhoff, D. Oesterhelt, Studies on the retinal-protein interaction in bacteriorhodopsin. *Eur. J. Biochem.* **1977**, *76*, 499-511.
- [58] M. M. Long, D. W. Urry, W. Stoeckenius, circular dichroism of biological membranes: purple membrane of halobacterium halobium. *biochemical and biophysical research communications* **1977**, *75*, 725-731.
- [59] B. Becher, J. Cassim, Effects of bleaching and regeneration on the purple membrane structure of Halobacterium halobium. *Biophys. J.* **1977**, *19*, 285-297.
- [60] S. Wu, M. A. El-Sayed, CD spectrum of bacteriorhodopsin: best evidence against exciton model. *Biophys. J.* **1991**, *60*, 190-197.
- [61] M. P. Heyn, P.J. Bauer, N.A. Dencher, A natural CD-label to probe the structure of the purple membrane from Halobacterium halobium by means of exciton coupling effect. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **1975**, *67*, 897-903.
- [62] M. A. El-Sayed, T. Lin, W.R. Mason, Is there an excitonic interaction or antenna system in bacteriorhodopsin? *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1989**, *86*, 5376-5377.
- [63] T. G. Ebrey, B. Becher, B. Mao, P. Kilbride, Exciton interactions and chromophore orientation in the purple membrane. *J. Mol. Biol.* **1977**, *112*, 377-397.

- [64] M. P. Dornbusch, Synthese von Fünfringheterocyclischen Retinoiden als chromophore für das Bacteriorhodopsin, *Dissertation*, Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf, **2001**.
- [65] E. Lam, L. Parker, Nonionic detergent effects on spectroscopic characteristics and the photocycle of bacteriorhodopsin in purple membranes. *Arch. Biochem. Biophys.* **1983**, *221*, 557–564.
- [66] C.G. Brouillette, R. B. McMichens, L. J. Stern, H. G. Khorana, Structure and Thermal Stability of Monomeric Bacteriorhodopsin in Mixed Phospholipid/Detergent Micelles. *PROTEINS, Structure, Function, and Genetics*, **1989**, *5*, 38-46.
- [67] P. Hufnagel, U. Schweiger, C. Eckerskorn, D. Oesterhelt, Electrospray Ionization Mass Spectrometry of Genetically and Chemically Modified Bacteriorhodopsins. *Analytical Biochemistry* **1996**, *243*, 46–54.
- [68] M. Dong, R. P. Oda, M. A. Strausbauch, P. J. Wettstein, J. P. Landers, L. J. Miller, Hydrophobic peptide mapping of clinically relevant heptathelical membrane proteins by capillary electrophoresis. *Electrophoresis* **1997**, *18*, 1767-1774.
- [69] L.E. Ball, J.E. Oatis, K. Dharmasiri, M. Busman, J. Wang, L.B. Cowden, A. Galijatovic, N. Chen, R.K. Crouch, D. R. Knapp DR. Mass spectrometric analysis of integral membrane proteins: application to complete mapping of bacteriorhodopsins and rhodopsin. *Protein. Sci.* **1998**, *3*, 758-64.
- [70] P. Kraft, J. Mills, E. Dratz., Mass spectrometric analysis of cyanogen bromide fragments of integral membrane proteins at the picomole level: application to rhodopsin. *Anal. Biochem.* **2001**, *292*, 76-86.
- [71] [http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide\\_mass/peptide-mass.pl](http://web.expasy.org/cgi-bin/peptide_mass/peptide-mass.pl), Abrufdatum: 12.01.2012.
- [72] <http://db.systemsbiology.net:8080/proteomicsToolkit/FragIonServlet.html>, Abrufdatum: 28.12.2011.
- [73] D. Rhinow, M. Imhof, I. Chizhik, R.P. Baumann, N. Hampp, Structural changes in bacteriorhodopsin caused by two-photon-induced photobleaching, *J. Phys. Chem. B*, **2012**, *116*, 7455–7462.
- [74] Y. Matsui, K. Sakai, M. Murakami, Y. Shiro, S. I. Adachi, H. Okumura, T. Kouyama, Specific damage induced by X-ray radiation and structural changes in the primary photoreaction of bacteriorhodopsin. *J. Mol. Biol.* **2002**, *324*, 469–481.

- [75] D. Rhinow, I. Chizhik, R.-P. Baumann, F. Noll, N. Hampp, Crystallinity of Purple Membranes Comprising the Chloride-Pumping Bacteriorhodopsin Variant D85T and its Modulation by pH and Salinity. *J. Phys. Chem. B*, **2010**, *114*, 15424-15428.
- [76] M. Kataoka, Trimeric mutant bacteriorhodopsin, D85N, shows a monophasic CD spectrum. *FEBS Lett.* **1993**, *333*, 111-113.
- [77] M. Neebe, D. Rhinow, N. Schromczyk, N. A. Hampp, Thermochromism of Bacteriorhodopsin and Its pH Dependence. *J. Phys. Chem. B* **2008**, *112*, 6946-6951.
- [78] T. Fischer, M. Neebe, T. Juchem, N. Hampp, Biomolecular optical data storage and data encryption. *IEEE Transactions on NanoBiosciences* **2003**, *2*, 1-5.
- [79] M. Imhof, Photoinduzierte Mikrostrukturierung von Bakteriorrhodopsinschichten als mikroskaliges Templat, *Diplomarbeit*, Philipps-Universität Marburg, **2008**.
- [80] K. Weber, Berman-Schaefer: Lehrbuch der Experimentalphysik - Optik, de Gruyter, Berlin, **2004**, 481-632.
- [81] [http://www.swissphotonics.net/libraries.files/Gillner\\_Vortrag-Ultrakurzpulslaser-Gillner1.pdf](http://www.swissphotonics.net/libraries.files/Gillner_Vortrag-Ultrakurzpulslaser-Gillner1.pdf), Abrufdatum: 19.03.2012.
- [82] <http://www.eickmeyer.com/Zubehoer/Inhalt/Siebdruckgewebe.pdf>, Abrufdatum: 15.01.2012.
- [83] <http://www.ascii-code.com>, Abrufdatum: 07.11.2012.
- [84] <http://www.ecma-international.org/publications/files/ECMA-ST/Ecma-279.pdf>, Abrufdatum: 25.02.2012.
- [85] A. Schönafinger, S. Müller, F. Noll, N. Hampp, Bioinspired Nanoencapsulation of Purple Membranes. *Soft Matter* **2008**, *4*, 1249-1254.
- [86] <http://www.csun.edu/~rd436460/Labview/IMAQ-Manual.pdf>, Abrufdatum: 26.11.2011.
- [87] <http://www.pearsonhighered.com/samplechapter/0130474150.pdf>, Abrufdatum: 19.12.2011.