

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Vazba iontů kovů na fykocyanobilin a jeho estery

Diplomová práce

Bc. Hana Vomáčková

Vedoucí práce: RNDr. Radek Litvín, Ph.D.

Konzultant: Prof. RNDr. František Vácha, Ph.D.

České Budějovice 2024

Vomáčková, H., 2024: Vazba iontů kovů na fykocyanobilin a jeho estery. [Binding of metal ions to phycocyanobilin and its esters. Mgr. Thesis, in Czech.] 46 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

Zbarvení živých organismů je způsobeno přítomností mnoha různých druhů organických barviv (pigmentů). V rostlinách patří mezi nejdůležitější barviva karotenoidy, antokyany a chlorofyly. V sinicích se vyskytují lineární tetrapyrroly fykobilinů. Tato práce se věnuje možnostem chemické modifikace lineárních tetrapyrrolů esterifikací a jejich schopnosti vázat kovy, analogicky s cyklickými tetrapyrroly. Ke sledování reakcí byly využity zejména metody absorpční spektroskopie a HPLC.

Annotation:

The coloring of living organisms is caused by the presence of many different types of organic dyes (pigments). The most important pigments in plants include carotenoids, anthocyanins and chlorophylls. Linear tetrapyrroles phycobilins are found in cyanobacteria. This thesis deals with the possibilities of chemical modification of linear tetrapyrroles by esterification and their ability to bind metals, by analogy with cyclic tetrapyrroles. Absorption spectroscopy and HPLC were used to follow the reactions.

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem autorem této kvalifikační práce a že jsem ji vypracovala pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu použitých zdrojů.

České Budějovice, 10. 4. 2024

.....

Hana Vomáčková

Klíčová slova

Tetrapyroly, biliny, fykocyanobilin, barviva, metal-bilin, esterifikace, HPLC

Key words

Tetrapyrroles, bilins, phycocyanobilin, pigments, metal-bilin, esterification, HPLC

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své diplomové práce RNDr. Radku Litvínovi, Ph.D., svému konzultantovi Prof. RNDr. Františku Váchovi a RNDr. Davidu Bínovi, Ph.D. za jejich trpělivost, cenné rady a odborné vedení, jak při práci v laboratoři, tak během vzniku písemné části práce, a především za jejich ochotu kdykoliv pomoci.

Také bych chtěla poděkovat své rodině a přátelům za jejich podporu a trpělivost.

OBSAH

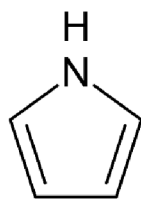
1. TEORETICKÁ ČÁST	- 1 -
1.1. Tetrapyrolové pigmenty	- 1 -
1.2. Fykobiliny	- 4 -
1.3. Fytochromy – receptory světla v rostlinách	- 6 -
1.4. Rychlost chemických reakcí	- 7 -
2. CÍLE PRÁCE	- 9 -
3. MATERIÁL A METODY	- 10 -
3.1. Použité chemikálie a činidla	- 10 -
3.2. Metody	- 11 -
3.2.1. Izolace fykocyanobilinů	- 11 -
3.2.2. Přečištění fykobilinů (TLC)	- 11 -
3.2.3. Fischerova esterifikace	- 12 -
3.2.4. HPLC analýza složení vzorků	- 12 -
3.2.5. Vazba iontů kovů na bilin a bilinester	- 13 -
3.2.6. Kinetika reakcí s dvojmocnými kovy	- 14 -
4. VÝSLEDKY	- 15 -
4.1. Purifikace fykocyaninu a fykocyanobilinu	- 15 -
4.2. Optimalizace esterifikace	- 15 -
4.3. Vazba kovu na fykocyanobilin a jeho ester	- 17 -
4.3.1. Vazba kovů na fykocyanobilin	- 18 -
4.3.1.1. Zinek	- 18 -
4.3.1.2. Kobalt	- 20 -
4.3.1.3. Měď	- 21 -
4.3.1.4. Nikl	- 23 -
4.3.2. Kinetika reakcí s dvojmocnými ionty	- 25 -
4.3.3. Vazba kovu na ester fykocyanobilinu	- 27 -
4.3.3.1. Hexylester a zinek	- 28 -
4.3.3.2. Hexylester a kobalt	- 29 -
4.3.3.3. Hexylester a měď	- 30 -
4.3.3.4. Hexylester a nikli	- 31 -
4.3.4. Kinetika reakcí esterů s dvojmocnými kovy	- 32 -
4.3.5. HPLC analýza esterů fykocyanobilinu s navázaným kovem	- 32 -
5. DISKUZE	- 33 -
5.1. Izolace fykocyanobilinů	- 33 -
5.2. Esterifikace	- 33 -
5.3. Vazba iontů kovů na fykocyanobilin a jeho ester	- 34 -
5.4. Kinetika reakcí s dvojmocnými kovy	- 36 -
6. ZÁVĚR	- 37 -

7. CITOVANÁ LITERATURA.....	- 38 -
8. PŘÍLOHY	- 45 -

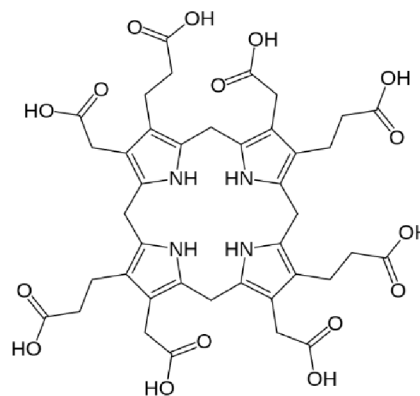
1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Tetrapyrolové pigmenty

Jak již z názvu vyplývá, tetrapyroly jsou tvořeny čtyřmi pyrolovými kruhy, což jsou N-heterocyklické sloučeniny (obr. 1). Všechny modifikované molekuly tetrapyrolových barviv jsou odvozeny od uroporphyrinogenu III (obr. 2), který je v rostlinách syntetizován z glutamové kyseliny v několika krocích (Scheer, 2003). Podle struktury molekuly se tetrapyroly dělí na cyklické a lineární. Jednotlivé molekuly jsou modifikované – liší se v postranních řetězcích, oxidačním stavu cyklické molekuly a výskytu a typu centrálního kovového iontu. Rozdílné struktury tetrapyrolů mají vliv na jejich fyzikálně-chemické a také biologické vlastnosti. (Bryant *et al.*, 2020). Všechny tetrapyroly obsahují rozsáhlé systémy konjugovaných dvojných vazeb, což jim dává schopnost absorbovat světlo ve viditelné oblasti spektra. Jsou široce používány jako barviva v mnoha průmyslových odvětvích, z čehož nejznámější je potravinové (Silva *et al.*, 2020).



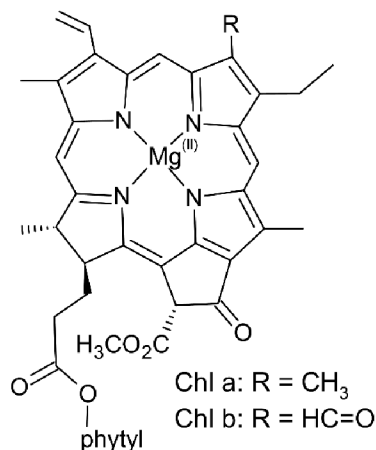
Obr. 1: Struktura pyrolu (upraveno v ChemSketch podle PubChem).



Obr. 2: Struktura uroporphyrinogenu III (upraveno v ChemSketch podle MetaNetX).

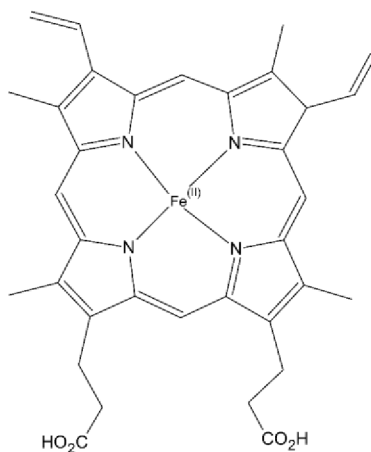
Tetrapyroly se podílejí na mnoha esenciálních procesech umožňujících život na Zemi a patří proto mezi jedny z nejdůležitějších molekul produkovaných buňkami (Battersby, 2000). Nejběžnějšími tetrapyrolovými barvivy jsou chlorofyly (Chl), zelené pigmenty používané rostlinami při fotosyntéze. Jedná se o cyklické tetrapyroly s navázaným centrálním atomem dvojmocného hořčíku, esterifikované dlouhým nepolárním vedlejším řetězcem (obr. 3). Chlorofylů a příbuzných bakteriochlorofylů se v přírodě vyskytuje mnoho typů. Nejznámější a nejčastější jsou chlorofyly *a*, *b* a *c* (Scheer, 2003). Chlorofyly se podílejí na oxygenní fotosyntéze, při které vzniká kyslík jako vedlejší odpadní produkt. Jejich absorpční spektra mají maxima 400–500 nm v modré oblasti (tzv. Soretův pás) a 650–680 nm v červené oblasti (tzv. pás Q).

Bakteriochlorofyly (BChl) jsou kofaktory v anoxygenní fotosyntéze, při které nedochází k produkci kyslíku. Absorpční spektra BChl dosahují maxima v infračervené oblasti cca 800 – 1040 nm (Singh *et al.*, 2020). Ve fotosyntetickém aparátu *Acidiphilium rubrum* se v BChl namísto Mg^{2+} vyskytuje Zn^{2+} (Lockhart *et al.*, 1996, Wakao, 1996, Bryant *et al.*, 2020).



Obr. 3: Obecná struktura chlorofylu (upraveno v ChemSketch podle Karg *et al.*, 2021).

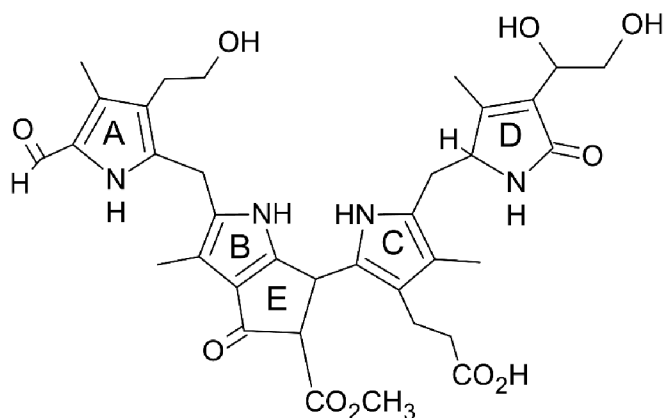
Dalším známým zástupcem cyklických tetrapyrrolů je hem (obr. 4), což je prostetická skupina hemoproteinů, která má ve své struktuře navázaný Fe^{2+} . Obecně se jedná o kofaktory podílející se na přenosu elektronů v mitochondriích a chloroplastech. V přírodě se vyskytuje několik druhů molekul obsahujících hem, přičemž mezi nejznámější patří hemoglobin a myoglobin, které se přirozeně syntetizují v těle živočichů včetně lidského, kde zajišťují přenos a uskladňování kyslíku. Tyto molekuly jsou zároveň největší zásobárnou železa v těle. Díky silné absorpci světla v modré a fialové oblasti (tzv. Soretův pás) mají hemy obvykle červenou barvu, ale mohou se jevit i jako hnědé nebo dokonce zelené. Naopak jejich absorpce v oblasti pásu Q je velmi slabá. (Smith *et al.*, 1970, Murray, 2009, Contreras *et al.*, 2014)



Obr. 4: Struktura hemu (upraveno v ChemSketch podle Poulos, 2014).

Výše uvedení zástupci tetrapyrolů mají uzavřený cyklus, v jehož středu najdeme navázaný kov. Při uvolnění z navázaných proteinů se některé tetrapyroly stávají toxickými, konkrétně hem a chlorofyl (Apel & Hirt, 2004). Je tedy potřeba, aby došlo k jejich bezpečnému odbourání. Tím vznikají jejich rozpadové produkty, také známé pod názvem biliny, lineární tetrapyroly bez navázaného centrálního kovu.

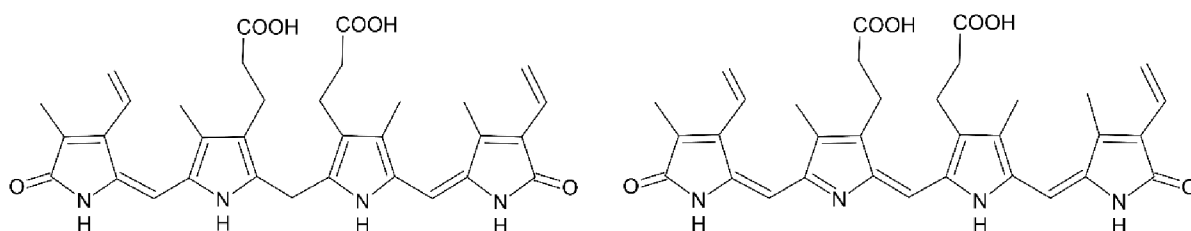
Rozpadovým produktem chlorofylu je fylobilin, lineární tetrapyrol, který se shromažďuje v nezelených listech a ve zrajících plodech. Bylo popsáno několik druhů fylobilinů, které se liší strukturou. Všechny obsahují pět kruhů (A-E), které jsou vyznačeny na obr. 5, ale liší se např. složením koncových kruhů A a D, stereochemickou konfigurací nebo substituenty. Také se liší ve schopnosti absorbovat světlo od bezbarvých až po barevné (Kräutler, 2016, Karg *et al.*, 2023), přičemž bezbarvé fylobiliny převažují (Oberhuber & Kräutler, 2002). U fylobilinů byly zjištěny silné antioxidační a protizánětlivé účinky, a také antiproliferativní účinky na rakovinné buňky. Tyto účinky dosahují významných hodnot, díky kterým je lze považovat za cenné mikroživiny ve stravě. Navíc by mohly vysvětlovat účinky některých léčiv obsahujících bylinné příměsi a výtažky (Karg *et al.*, 2019, Karg *et al.*, 2021).



Obr. 5: Struktura fylobilinu (upraveno podle Kräutler, 2014).

Hemoglobin se v lidském těle rozpadá na globin a hem. Hem je enzymaticky přeměněn na zelený lineární tetrapyrol biliverdin pomocí hemoxygenázy, kdy dojde k odštěpení centrálního kovu a rozpojení řetězce. Biliverdin je dále pomocí biliverdin reduktázy přeměněn na bilirubin, což je finální produkt rozpadu hemu. Bilirubin je žluté tetrapyrolové barvivo známé také jako tzv. žlučové barvivo. Jeho přítomnosti si lze všimnout například při onemocnění žloutenkou, která se projevuje zbarvením kůže a očního bělma dožluta. Bilirubin je dále transportován do jater, kde dochází k jeho odbourávání (Vítek & Schwertner, 2007, Murray, 2009).

V těle člověka vznikne 250 – 350 mg bilirubinu denně. Při výskytu koncentrací vyšších než 106 $\mu\text{mol/l}$ u dospělého člověka bylo prokázáno potenciální nevratné poškození nervového systému. Byly však zjištěny i pozitivní dopady bilirubinu. Jedná se o látku s antioxidantní a protizánětlivou schopností (Jensen & Daiber, 2012, McDonnell & Mohiuddin, 2023). Silnou schopnost bilirubinu absorbovat světlo lze využít při fototerapii. Konkrétně se používá při léčení hyperbilirubinemie u novorozenců, kdy dochází ke zvýšení hladiny bilirubinu v krvi nad 25 $\mu\text{mol/l}$. Po absorpci modrého světla o vlnové délce 400 – 490 nm dochází k jeho přeměně na fotobilirubin, který lze snadno vyloučit močí (Pratesi *et al.*, 1985, Wegiel & Otterbein, 2012).

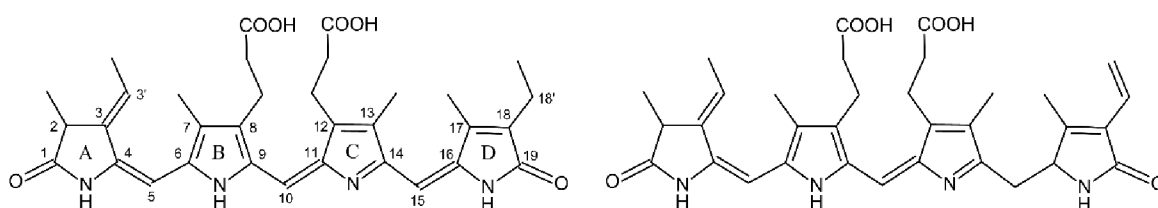


Obr. 6: Struktura rozpadových produktů hemu: vlevo bilirubin (upraveno v ChemSketch podle Laskar *et al.*, 2016) a vpravo biliverdin (upraveno v ChemSketch podle Lamparter *et al.*, 2002).

1.2. Fykobiliny

Fykobiliny jsou lineární tetrapyroly vyskytující se v buňkách sinic a některých řas. Jsou to fotosyntetická barviva schopná světlosběrné funkce v oblasti viditelného světla. Jsou kovalentně vázány pomocí thioéterové vazby mezi prvním uhlíkem vinylového substituentu na pyrolovém kruhu A do fykobiliproteinů (Scheer, 2003). Ty jsou polární, a tedy dobře rozpustné ve vodě. Jejich využití výrazně roste, jelikož na rozdíl od některých syntetických pigmentů, nejsou zdraví škodlivé. Jsou využívány především v chemickém a potravinářském průmyslu, ale i v textilním průmyslu. Díky jejich silné fluorescenci jsou také využívány v biomedicíně jako fluorescenční značky (Sudhakar, 2015, Qiang, 2021). Fykobiliproteiny jsou dále vázány do fykobilizomů, což jsou světlosběrné antény, které jsou součástí fotosyntetického aparátu sinic (Masojídek *et al.*, 2013, Pagels *et al.*, 2019), ruduch a skrytěnek (Bryant *et al.*, 1979, Beale & Cornejo, 1991).

V přírodě najdeme celkem čtyři typy fykobilinů, které se vzájemně liší svou strukturou – fykocyanobilin (fcb), fykoerytrobilin (Obr. 7), fykourobilin a fykoviolobilin. Nejbližší svou strukturou je fykocyanobilin s fykoviolobilinem, jelikož se jedná o izomery (Ikeuchi *et al.*, 2008, Scheer *et al.*, 2008). Každý z typů je navázán do jiného proteinu a má jiné absorpční vlastnosti, které jsou upřesněny v tabulce (Tab. 1). Ty jsou dané zejména vzájemným působením vazby na protein, spíše než rozdílnými strukturami. Po navázání fykobilinů na protein může docházet k různým deformacím fykobilinů, což může ovlivnit jak kovalentní vazby na koncích tetrapyrrolů, tak nekovalentní interakce mezi molekulami (Šetlík, 1998, Mysliwa-Kurdziel & Solymosi, 2017).



Obr. 7: Struktura fykobilinů: vlevo fykocyanobilin a vpravo fykoerytrobilin (upraveno v ChemSketch podle Zhao *et al.*, 2012). Ve struktuře fykocyanobilinu je zobrazeno i označení jednotlivých pyrolových kruhů.

Tab. 1: Fykobiliproteiny a polohy jejich absorpčních maxim (Pagels *et al.*, 2019)

Fykobiliprotein	Absorpční maximum (nm)
Allophycocyanin	650 – 660
Fykocyanin	610 – 625
Fykoerytrin	490 – 570
Phycoerythrocyanin	560 – 600

Fykourobilin má žluté zbarvení a společně s fykoerytrobilinem se vyskytuje v různých typech fykoerytrinu, kde je energeticky nejvýše položeným pigmentem (Swanson *et al.*, 1991, Pagels, 2019). Fykoviolobilin má fialové zbarvení a společně s fykocyanobilinem je kofaktorem fykoerythrocyaninu. Díky jeho schopnosti absorbovat světlo o kratší vlnové délce umožňuje přežití organismů ve větších hloubkách, kde světlo delších vlnových délek chybí (Bishop *et al.*, 1987, Ishizuka *et al.*, 2007). Fykocyanobilin má modré zbarvení a je kofaktorem fykobiliproteinů fykocyaninu a allofykocyaninu (Frank & Cogdell, 2012, Kirilovsky & Büchel, 2019).

Fykocyanin a fykoerytrin jsou v přírodě nejvíce zastoupené fykobiliny. Fykocyanin je významnou složkou přírodního barviva Spiruliny, které dodává barvu¹. Podle Yamada & Kato (2004) jsou larvy martináče dubového (*Antheraea yamamai*) schopny generovat zelené kokony, přičemž zelená barva je způsobena přítomností modrého bilinu. K tomu dochází pouze při vysoké intenzitě světla (5 000 lux), v případě nízké intenzity světla mají kokony žlutou barvu.

Fykocyanin má také řadu významných vlastností, konkrétně antioxidační a protizánětlivé vlastnosti *in vitro* (Gonzalez *et al.*, 1999, Hirata *et al.*, 1999). Tato schopnost je vyšší u fykocyaninu než u samotného fykocyanobilinu, což je pravděpodobně způsobeno vazbou na protein (Bhat & Madyastha, 2001).

Dalším fykobilinem je fytochromobilin, který se vyskytuje v rostlinách jako chromoforový prekurzor pro fytochromy. Fytochromy tvoří hlavní třídu fotoreceptorů sloužících pro regulaci reakcí na změny vlnové délky, trvání a směru světla v rostlinách (Mukougawa *et al.*, 2006).

1.3. Fytochromy – receptory světla v rostlinách

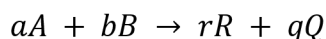
Všechny živé organismy mají schopnost vnímat světlo a reagovat na něj. Tato schopnost je zásadní pro fotosyntetické organismy, u nichž jsou do fotosenzorických drah zapojeny proteiny. Díky přítomnosti aromatických aminokyselin vykazují proteiny schopnost absorbovat světlo i v blízkosti UV záření. Pro rostliny jsou však významné proteiny, známé jako fytochromy, obsahující barevné kofaktory (Rockwell & Lagarias, 2010). Ty umožňují citlivost na konkrétní vlnovou délku v oblasti viditelného světla v oblasti 380 – 750 nm (Hangarter, 1992). Fytochromy regulují různé aspekty růstu, rozvoje a reprodukce rostlin, včetně klíčení semen. Poskytují rostlinám signály, které spouští biologické hodiny přizpůsobené i ročním obdobím.

Na proteinové jádro fytochromů je kovalentně navázaný tetrapyrolový chromofor fytochromobilin, který je syntetizován z hemu. Pokud se rostlina potýká s nedostatkem fytochromů, dochází k nepřirozenému růstu a vývoji (Wu *et al.*, 1997, Sharrock, 2008). Mechanismus reakce fytochromů spočívá ve schopnosti reverzibilního přepínání mezi dvěma stabilními konformery, tzv. Pr pro absorpci červeného světla (vlnová délka okolo 660 nm) a Pfr pro absorpci dalekého červeného světla (far-red, vlnová délka okolo 730 nm). Přepínání mezi konformery záleží na vystavení rostliny světlu, přičemž vystavení přímému slunci dochází k ustálení rovnováhy mezi oběma konformery. Pr forma je u rostlin biologicky neaktivní a Pfr forma je biologicky aktivní (Smith, 2000, Quail, 2010).

¹ Code of Federal Regulations USA, 78 FR 49120

1.4. Rychlost chemických reakcí

Studiu rychlosti chemických reakcí, způsobům jejich měření a interpretaci se věnuje chemická kinetika. Rychlost reakcí závisí obecně na koncentracích látek vystupujících v reakci a u většiny reakcí také na teplotě. Rychlost ovlivňuje mnoho faktorů, jako je stechiometrie chemických rovnic, množství souběžných reakcí a případné meziprodukty nebo vedlejší produkty. Základní informace kinetiky jsou koncentrace výchozích látek a produktů v různých časech reakce. Reakční rychlost lze jednoduše vyjádřit jako změnu koncentrace v čase. Vycházíme z obecné rovnice reakce



Pro každou chemickou reakci existuje rychlostní rovnice, která se zjišťuje experimentálně. Rychlostní rovnice popisuje závislost reakční rychlosti na koncentracích reaktantů a produktů. Změnu koncentrací látek v čase lze sledovat různými metodami. Pro studium kinetiky reakcí s rychlým průběhem se používá průtoková metoda, kdy dochází ke smíchání složek v míšící komoře. Nevýhodou této metody je potřeba velkého objemu reakční směsi, čemuž se dá předejít použitím metody zastaveného toku. Vedle rychlých reakcí máme i extrémně rychlé reakce, které je potřeba měřit pomocí zábleskové fotolýzy, při které je vzorek vystaven krátkému záblesku světla. Mezi další metody pro určování složení patří také plynová chromatografie, emisní a hmotnostní spektroskopie nebo magnetická a elektronová paramagnetická rezonance. V případě, že jedna ze složek vykazuje charakteristickou absorpci v oblasti viditelného světla, jako jsou například fotosyntetická barviva, je vhodné použít metodu měření absorpce záření (Schloder, 2009).

Rychlostní zákony jsou diferenciální rovnice, které mohou být integrovány tak, aby předpovídaly změnu koncentrací reaktantů v čase. Rychlostní rovnice se často vyjadřuje jako součin mocnin koncentrací reaktantů a rychlostní konstanty.

$$r = k[A]^x[B]^y$$

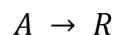
kde r je rychlost reakce, k je rychlostní konstanta, která charakterizuje rychlost reakce za daných podmínek, x je řád reakce vzhledem ke složce A a y je řád reakce vzhledem ke složce B. Součet exponentů jednotlivých reaktantů ($x + y$) se nazývá celkový řád reakce. To je číslo určující, jakým způsobem závisí rychlost na koncentraci. Určují se jak dílčí řády pro jednotlivé reaktanty a také celkový řád reakce, což je součet všech dílčích řádů. Dílčí řády reakce mohou být neceločíselné, což znamená, že závislost na koncentracích reaktantů je složitá. Většina reakcí je složitá, ale v některých případech jsou řády reakce celočíselné a v tom případě je možné z nich odhadnout průběh reakce a možnosti ovlivnit rychlost reakce změnou reakčních podmínek.

Často se popisují tři základní řády reakce, a to reakce nultého, prvního a druhého řádu. U reakce nultého řádu je spotřeba reaktantu v čase konstantní a kinetika reakce má tvar přímky. Rychlost reakce má v tomto případě jednoduchý výpočet

$$r = k[A]$$

kde k je rychlostní konstanta a $[A]$ je koncentrace látky A. Podmínkou je přítomnost reaktantu, kterým je v reakčním prostředí většinou nasycený katalyzátor.

U reakcí prvního řádu závisí rychlost na koncentraci jednoho reaktantu a jejich kinetika má tvar klesající exponenciely. Rovnici této reakce lze zapsat jako



kde A značí reaktant a R značí produkt reakce. Pro výpočet průběhu této reakce se používá

$$[A]_t = [A]_0 \times e^{-kt}$$

kde $[A]_t$ je koncentrace látky A v čase t , $[A]_0$ je počáteční koncentrace látky A, k je rychlostní konstanta a t je čas, ve kterém koncentraci měříme. Graf závislosti logaritmu podílu $[A]_t/[A]_0$ na čase je pro reakci prvního řádu přímka.

Oproti předchozím reakcím, u reakce druhého řádu je rychlost reakce závislá na dvou reaktantech prvního řádu, nebo jednoho reaktantu druhého řádu a jejich kinetika má tvar hyperboly (Novák *et al.*, 2008, Atkins, 2013).

2. CÍLE PRÁCE

- Optimalizovat metodu esterifikace fykocyanobilinu vyvinutou v předchozí bakalářské práci
- Zjistit schopnost fykocyanobilinu a jeho esterů vázat dvojmocné ionty kovů v analogii k vazbě kovů na chlorofyly

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Použité chemikálie a činidla

- aceton (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)
- chloroform (čistota p.a., Sigma-Aldrich)
- diethylether (bezvodý, 99,8%, Aldrich)
- kyselina chlorovodíková (čistota p.a., 35%, Lach-Ner)
- hexan (čistota pro HPLC, VWR)
- hexan-1-ol (bezvodý, $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)
- kyselina sírová (čistota p.a., 96%, Lach-Ner)
- metanol (čistota pro HPLC, VWR)
- deionizovaná voda (přístroj Water purification se systémem Smart2Pure, Thermo)
- dichlormetan (čistota p.a., Sigma-Aldrich)
- spirulina (Topnatur s. r. o.)
- acetylacetonát zinečnatý (čistota p.a., Sigma-Aldrich)
- acetylacetonát měďnatý (čistota $\geq 99,9\%$, Sigma-Aldrich)
- acetylacetonát kobaltnatý (čistota $\geq 99,0\%$, Sigma-Aldrich)
- acetylacetonát nikelnatý (čistota 95%, Sigma-Aldrich)

3.2. Metody

3.2.1. Izolace fykocyanobilinů

Východním materiálem pro izolaci fykocyanobilinu byly oproti předchozí práci (Vomáčková, 2022) tabletky spiruliny prodávané jako potravinový doplněk. Při izolaci byly na jednu dávku použity 2 g spiruliny, tedy 10 tabletek, které byly rozdrceny a získaný prášek byl poté smíchán s vodou. Směs byla řádně promíchána a následně odstředěna na centrifuze (5 min, 6500 × g), čímž byl získán supernatant obsahující ve vodě rozpustnou frakci s velkým množstvím modrého fykocyaninu. Stejně množství vody bylo přidáno k peletu po centrifugaci, který byl opět promíchán a znovu zcentrifugován. Tento krok byl zopakován celkem 3×, jelikož pátý. vzorek již obsahoval minimální množství fykocyaninu a převažoval chlorofyl. Pro kontrolu byla změřena absorpční spektra jednotlivých vzorků, než došlo k jejich smíchání.

Získaný modrý supernatant (fykocyanin) byl dále použit jako zdroj pigmentů. Další kroky izolace byly provedeny stejně jako u předchozí práce (Vomáčková, 2022). Supernatant byl smíchán s acetonem za vzniku modré sraženiny. Vzniklá směs byla odstředěna na centrifuze a pelet s fykobilibiliproteiny byl následně vysušen v temnu za sníženého tlaku.

Fykobiliny byly ze sražených proteinů uvolněny kyselou hydrolyzou (Malinová, 2020). K vysušenému peletu o průměrné hmotnosti $0,5 \text{ g} \pm 0,25$ bylo přidáno 45 ml 35% HCl (ÓhEocha, 1958). Směs byla inkubována v temnu při pokojové teplotě po dobu jednoho týdne, průběžně promíchávána a následně odstředěna. Supernatant byl oddělen a hydrolyza byla ukončena přidáním vody do supernatantu v poměru hydrolyzát : H₂O (1 : 4, v/v). Směs supernatantu s vodou byla opakovaně vytřepána do chloroformu a získaná chloroformová fáze byla odpařena v temnu za sníženého tlaku. V posledním kroku byl malý objem vzorku převeden do zkumavky, dosušen proudem plynného dusíku a následně uchován v uzavřené skleněné vialce při -18°C.

3.2.2. Přechištění fykobilinů (TLC)

Pro přechištění byla směs získaných pigmentů rozpuštěna v chloroformu a nanášena na polyesterovou TLC destičku se silikagelovou stacionární fází o rozměru 10 × 20 cm (Polygram Sil G, Macherey-Nagel, Německo). Pro vývoj vzorku byla použita mobilní fáze chloroform : metanol : hexan v poměru 17 : 4 : 1 (v/v) (Kalkuš, 2018). Fykocyanobilin se v použité metodě jeví jako modrý proužek s $R_f \sim 0,86$. Silikagel s adsorbovanými barvivou byl vyškrabán, rozpuštěn v metanolu a krátce zcentrifugován pro odstranění silikagelových částic. Metanolvý extrakt byl vysušen v temnu za sníženého tlaku.

Pro kvantifikaci získaného pigmentu a průběžnou kontrolu jeho čistoty byla změřena jeho absorpční spektra v rozsahu 300 – 800 nm. Analyt byl rozpuštěn v metanolu. Pro výpočet koncentrace fykobilinů byl použit molární absorpční koeficient $\epsilon = 38\,000\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ při vlnové délce 640 nm (Glazer & Hixson, 1975, Bishop *et al.*, 1987).

3.2.3. Fischerova esterifikace

Na základě předchozí práce (Vomáčková, 2022) byla pro další práci vybrána syntéza hexylesteru. Pro jeho přípravu byl bilin rozpuštěn v 250 μl DCM při koncentraci 27,56 μM a bylo přidáno 10 000 \times větší množství 1-hexanolu (mol/mol), než byl obsah bilinu. Kontrolní zkumavka obsahovala pouze bilin v DCM a hexanol, do ostatních bylo přidáno 5 μl koncentrované H_2SO_4 , jejíž H^+ iont katalyzuje reakci. Vzorky byly esterifikovány v termobloku při konstantní teplotě 30 $^\circ\text{C}$, kvůli nízké teplotě varu DCM.

Při optimalizaci metody esterifikace byla reakce prováděna po dobu 15, 30, 90, 180, 360 a 720 minut. Čas zahřívání kontroly byl 180 minut.

Po uběhnutí plánované doby byla reakce ukončena přidáním 1 ml vody a pigment byl vyextrahován přidáním 500 μl diethyletheru. Směs byla protřepána a poté odstředěna pro co nejpřesnější oddělení fází. Vzorky byly 5 \times omyty vodou a při posledním omytí byla vrchní fáze obsahující pigment odpipetována a vysušena za sníženého tlaku.

3.2.4. HPLC analýza složení vzorků

Složení vzorků bylo analyzováno pomocí vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC). Všechna měření byla provedena na sestavě Alliance HPLC (Waters, USA), která je složena ze separačního modulu Waters e2695 a detektoru Waters 2998 PDA. K rozdělení pigmentů byl použit systém s reverzními fázemi tvořený nepolární C18 kolonou (Nova-Pak C18 Column, 60Å, 4 μm , 3.9 mm \times 300 mm), a mobilními fázemi uvedenými v tabulce (Tab. 2).

Tab. 2: Složení mobilních fází použité metody (Jeffrey *et al.*, 2005)

Název mobilní fáze	Složení mobilní fáze
Mobilní fáze A	Metanol : 0,5 M octan amonný – 80 : 20, v/v, pH 7,2
Mobilní fáze C	Acetonitril : voda – 90 : 10, v/v
Mobilní fáze D	Ethyl acetát 100%

Vzorky pigmentů byly rozpuštěny v 250 µl metanolu a přefiltrovány přes PTFE filtr (průměr 13 mm, velikost pórů 0,2 µm, Agilent Technologies). Vzorek o objemu 100 µl byl nastříknut automatickým dávkovačem, průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 ml.min⁻¹. V tabulce (Tab. 3) jsou uvedeny jednotlivé fáze gradientu použitých mobilních fází (Jeffrey *et al.*, 2005). Detekce probíhala spektrofotometrickým detektorem v rozsahu 265 – 800 nm. Data byla načtena a vyhodnocena v softwaru Empower 3 (Waters, USA).

Tab. 3: Gradient mobilních fází použitý v HPLC (Jeffrey *et al.*, 2005).

Čas (min)	mobilní fáze A (%)	mobilní fáze C (%)	D mobilní fáze (%)
0	100	0	0
4	0	100	0
18	0	20	80
25	0	20	80

3.2.5. Vazba iontů kovů na bilin a bilinester

Nejprve byly připraveny zásobní roztoky jednotlivých kovů v metanolu o objemu 10 ml a koncentraci 6,3 mM.

Přečištěný pigment byl rovnoměrně rozdělen do pěti zkumavek, z čehož jedna sloužila jako kontrola. Z jednotlivých zásobních roztoků bylo odebráno 100 µl pro desetinasobné ředění. Desetkrát zředěné roztoky byly dále použity tak, aby výsledná koncentrace kovu ve směsi s pigmentem byla 10 ekvivalent koncentrace pigmentu.

Příprava a měření jednotlivých vzorků probíhaly postupně, z důvodu vyšší počáteční rychlosti reakcí. Měření absorpčních spekter po přípravě vzorků probíhalo ve dvouminutových rozestupech na spektrofotometru Shimadzu UV-1800 po celkovou dobu dvou hodin. Spektra byla měřena v rozsahu 300–850 nm, změření jednoho spektra trvalo cca 1 minutu. Reakce byly dále sledovány s větším časovým odstupem po 1 dni a 7 dnech. Po dobu reakce byly reakční směsi uloženy ve tmě za pokojové teploty.

3.2.6. Kinetika reakcí s dvojmocnými kovy

Na základě získaných absorpčních spekter byla vedoucím práce provedena základní analýza počáteční rychlosti vazby kovu na pigment. Kinetika chemických reakcí byla modelována soustavou exponenciálních funkcí ve tvaru

$$A(t) = y_0 + Ae^{-k_1 t}$$

kde $A(t)$ je časový průběh absorbance při reakci, y_0 je konstanta upravující polohu křivky (offset), A_1 je počáteční amplituda související s absorbancí a koncentrací pozorovaného analytu a t je čas reakce. Nejdůležitější je v tomto případě parametr k_1 , což je rychlostní konstanta reakce a jeho převrácená hodnota $\tau = 1/k$ je časová konstanta reakce. V mnoha případech bylo nutné použít více než jednu exponenciální funkci. V těchto případech je získáno více parametrů A_i a k_i , tedy více amplitud a rychlostních konstant. Hodnoty parametrů modelu byly získány fitováním metodou nejmenších čtverců. Kvalita fitu byla hodnocena podle tvaru reziduálů (odchylky modelu od naměřených dat) a hodnoty upraveného koeficientu determinace (adjusted R^2).

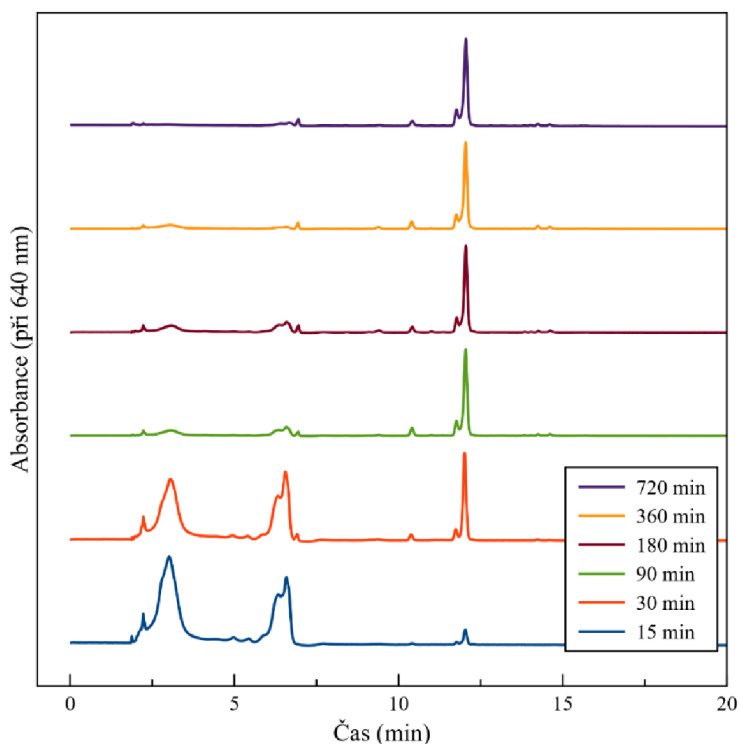
4. VÝSLEDKY

4.1. Purifikace fykocyaninu a fykocyanobilinu

Nově použitá metoda purifikace fykocyaninu z komerčních tablet spiruliny je jednoduchá a snadno proveditelná i bez složitých zařízení, a proto byla také adaptována do podoby vhodné pro výuku na středních školách a v praktikách na VŠ. Ve zjednodušeném postupu se po rozpuštění nadrcených tabletek ve vodě suspenze zfiltruje a výsledkem je čirý, výrazně modrý roztok se silnou červenou fluorescencí, která je pozorovatelná i okem. Silná fluorescence je důkazem toho, že získaný fykocyanin je blízko nativnímu stavu (Taylor, 2002). Metoda byla poprvé aplikována při projektu pro studenty středních škol organizovaným Jihočeskou univerzitou (projekt Studenti žákům, žáci sobě). Aktivita s fykocyaninem proběhla 7. února 2023. Pro tento účel byl připraven návod uvedený v příloze (kapitola 9).

4.2. Optimalizace esterifikace

V návaznosti na zavedení nové metody esterifikace v bakalářské práci (Vomáčková, 2022) byla metoda optimalizována. Cílem optimalizace bylo maximalizovat výtěžek diesteru a minimalizovat čas potřebný pro reakci. Na obrázku chromatogramů reakčních směsí inkubovaných různě dlouhou dobu (obr. 8) je vidět, že po 15 minutách reakce jsou v reakční směsi obsaženy monoestery ve velkém množství. Od času 30 minut výrazně přibývá diesterů, které po 6 hodinách reakce zcela převládají.



Obr. 8: Porovnání HPLC chromatogramů esterifikovaného bilinu po různě dlouhé době esterifikace.

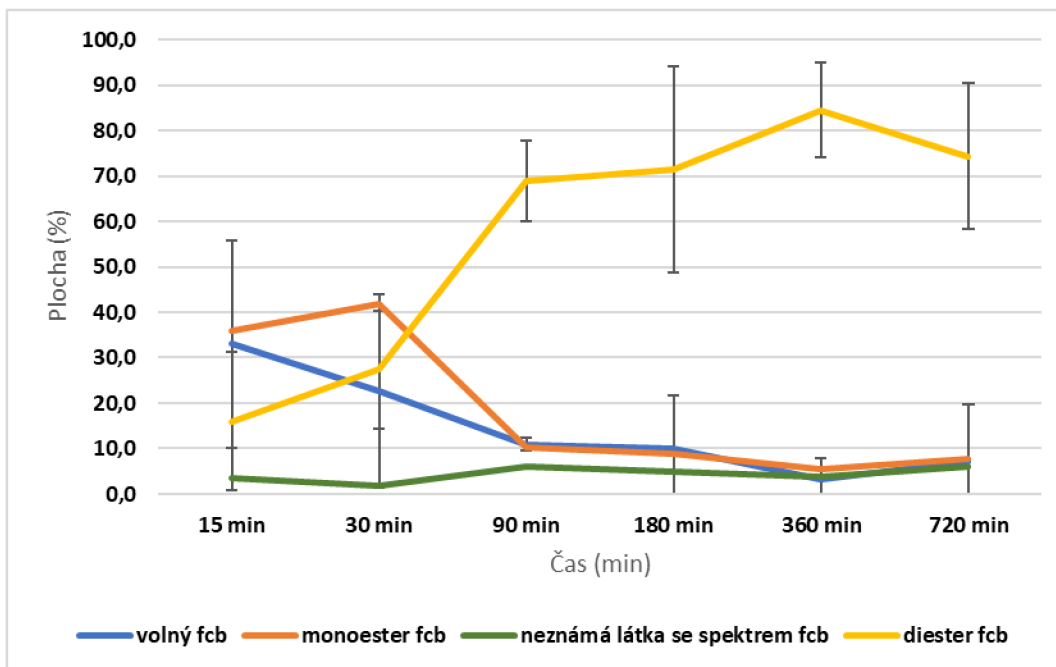
Píky z HPLC chromatogramů na obr 8. byly pro zjednodušení analýzy klasifikovány do čtyř skupin dle jejich retenčních časů a předběžně označeny jako: volný fykocyanobilin (3 min), monoester fykocyanobilinu (6,5 min), neznámá látka se spektrem fykocyanobilinu (10,4 min) a diester fykocyanobilinu (12 min). Časový vývoj reakce ze tří opakovaných měření byl kvantifikován z ploch jednotlivých píků v chromatogramu a je shrnut v tabulce (Tab. 4) a na obrázku (Obr. 9). V tabulce (Tab. 5) jsou uvedeny směrodatné odchylky změřených ploch píků v jednotlivých časech reakce pro každou měřenou skupinu.

Tab. 4: Průměrné hodnoty procent plochy jednotlivých skupin píků změřených na HPLC po esterifikaci, hodnoty ze tří samostatných experimentů.

	1. skupina	2. skupina	3. skupina	4. skupina
15 min	33,0	36,0	3,6	16,0
30 min	22,6	41,9	1,9	27,4
90 min	11,0	10,3	6,1	68,8
180 min	10,0	8,7	5,0	71,4
360 min	3,3	5,4	3,7	84,5
720 min	7,2	7,8	5,9	74,4

Tab. 5: Směrodatná odchylka ploch jednotlivých skupin v jednotlivých časech ze 3 měření.

	1. skupina	2. skupina	3. skupina	4. skupina
15 min	22,9	14,0	1,8	15,3
30 min	21,2	9,4	1,1	12,9
90 min	1,4	9,4	2,4	8,9
180 min	11,6	10,6	1,6	22,6
360 min	4,7	4,8	2,5	10,4
720 min	12,4	6,7	4,6	16,0



Obr. 9: Časový vývoj esterifikační reakce. Vyneseny jsou průměrné hodnoty ploch píků v HPLC chromatogramu ($n=3$, \pm směrodatná odchylka).

Ze získaných dat je patrný postupný nárůst koncentrace 4. skupiny píků (diesteru) a pokles ostatních skupin. Po 90. minutě je reakce pomalejší. Maximální plocha 4. skupiny píků, 85 %, byla dosažena po 360 minutách reakce. Při přípravě esterů fykocyanobilinu pro další experimenty byla proto použita metoda esterifikace s dobou reakce 6 hod (360 min).

4.3. Vazba kovu na fykocyanobilin a jeho ester

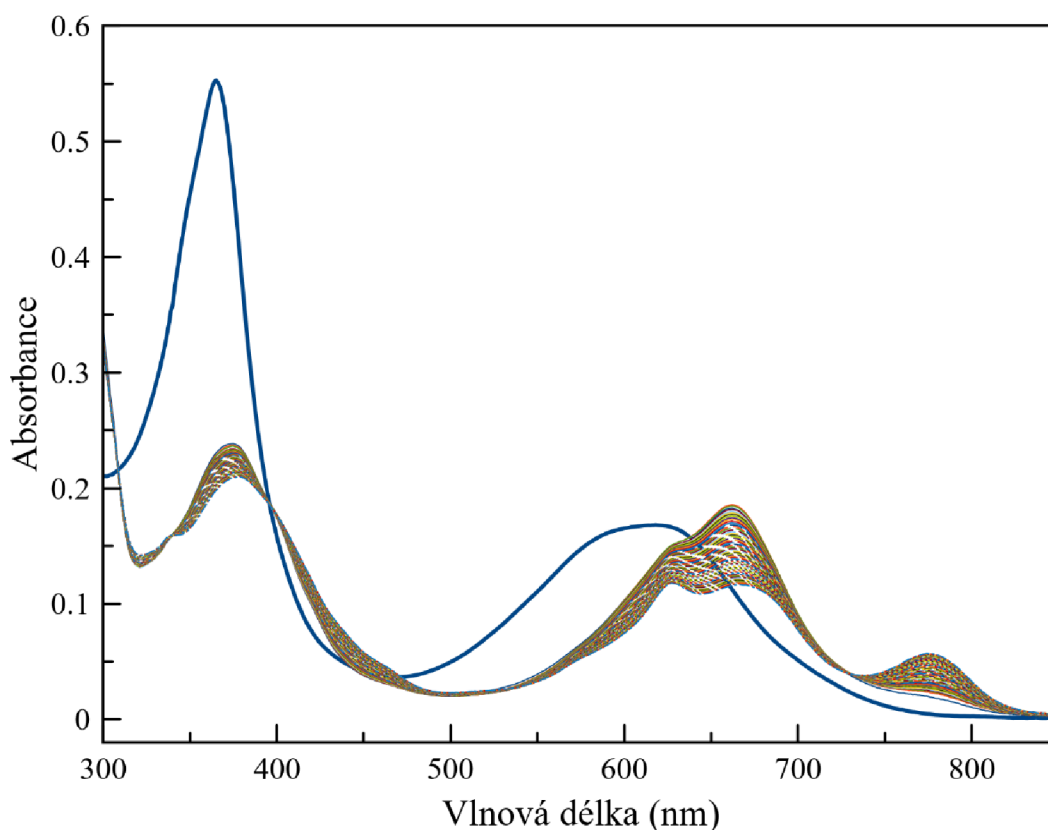
Kromě esterifikace je atraktivní možností modifikace vlastností pigmentů vazba kovů. Některé cyklické tetrapyroly jako chlorofyl, hem nebo kobalamin obsahují vázaný kov. Z literatury je známo, že některé lineární tetrapyroly dokáží také atom kovu navázat (Petrier *et al.*, 1979). Izolovaný fykocyanobilin, stejně jako jiné volné lineární tetrapyroly, nemá silnou fluorescenci. Naopak tetrapyroly vázané na protein (jako fykocyanin) nebo s centrálním atomem kovů (např. chlorofyl) jsou často silně fluorescenční. Případná silná fluorescence je tedy zajímavý doklad vazby kovu na pigment (Li *et al.*, 2014). Proto byla v této práci vyzkoušena vazba dvojmocných kovů na připravený fykocyanobilin. Pro tento pokus byly použity soli celkem čtyř dvojmocných kovů – konkrétně Zn, Co, Cu, a Ni.

4.3.1. Vazba kovů na fykocyanobilin

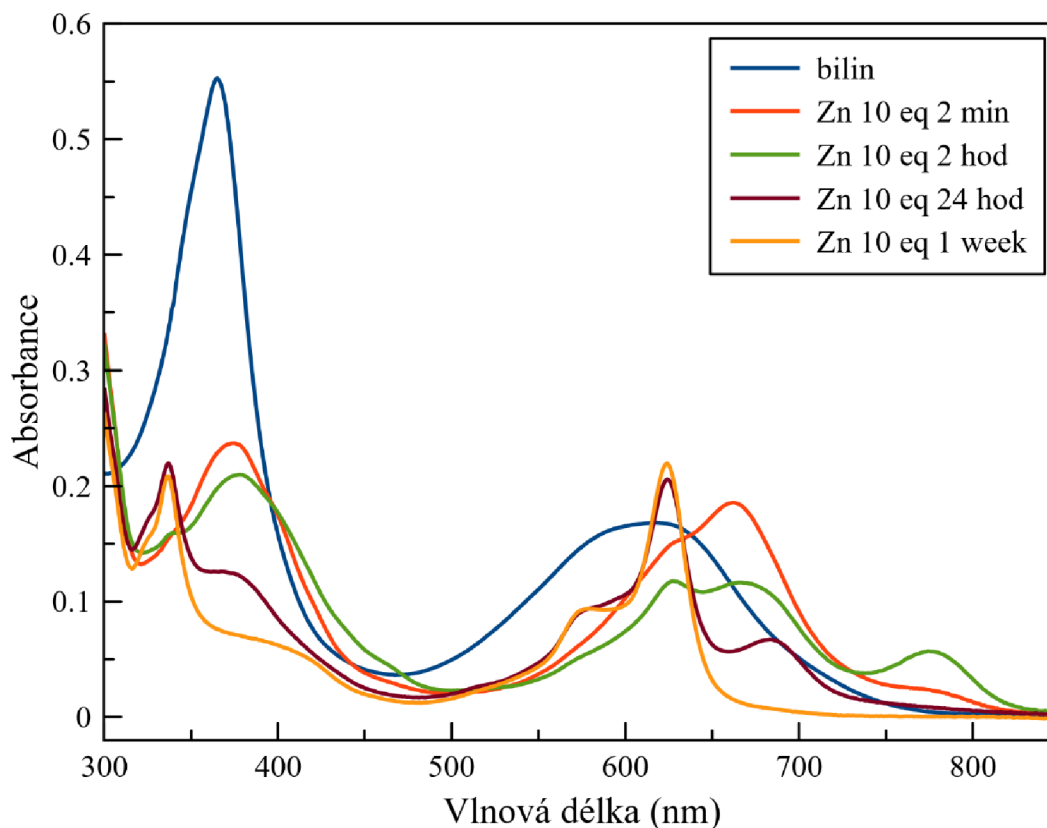
Reakce fykocyanobilinu po přidání solí kovů byly sledovány pomocí absorpční spektrometrie. Oproti počátečním předpokladům (Li *et al.*, 2014) byly reakce solí kovů s fykocyanobiliny poměrně pomalé a měly komplikovaný průběh. Výsledky budou prezentovány nejprve kvalitativně a poté kvantitativně.

4.3.1.1. Zinek

Směs bilinu a 10 ekvivalentu Zn^{2+} se zpočátku vyvíjela poměrně rychle, kdy již po dvou minutách byly vidět rozdíly oproti přečištěnému bilinu (Obr. 10).



Obr. 10: Absorpční spektra fcb s ionty zinku v metanolu měřeny každé 2 min po dobu 2 hod. Modře je znázorněno spektrum volného fykocyanobilinu před přidáním kovu.

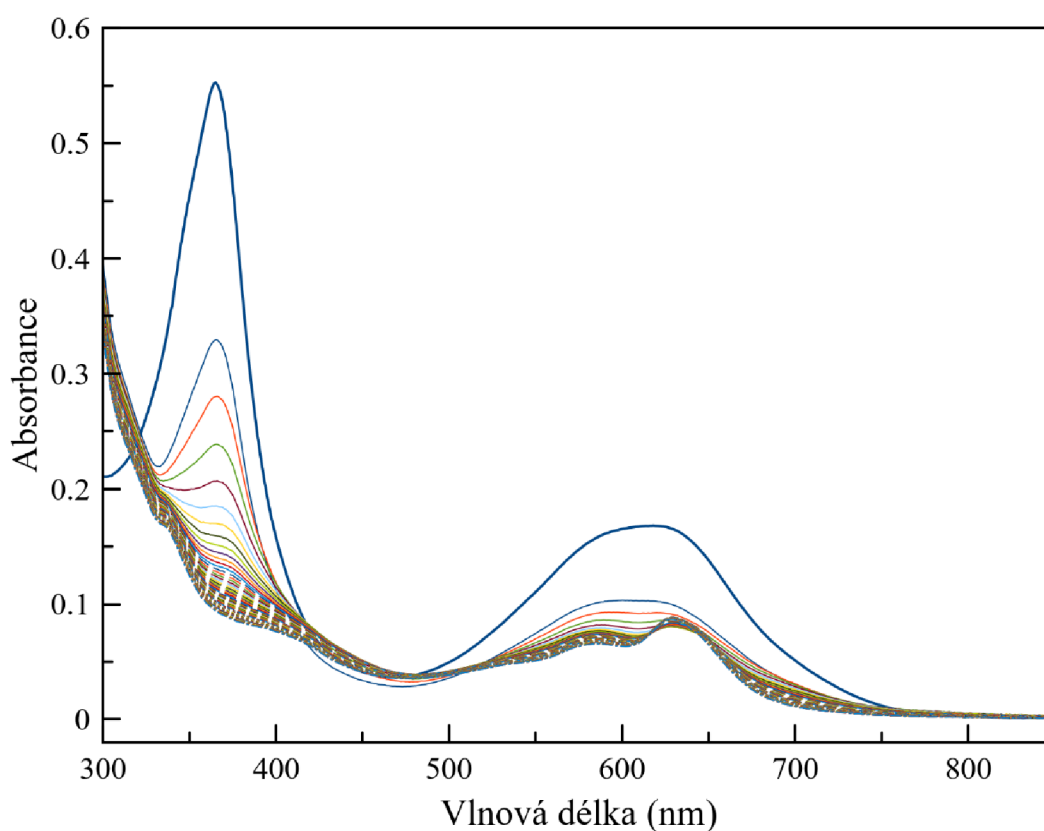


Obr. 11: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce fykocyanobilinu s ionty zinku. Časy reakce jsou uvedeny v legendě.

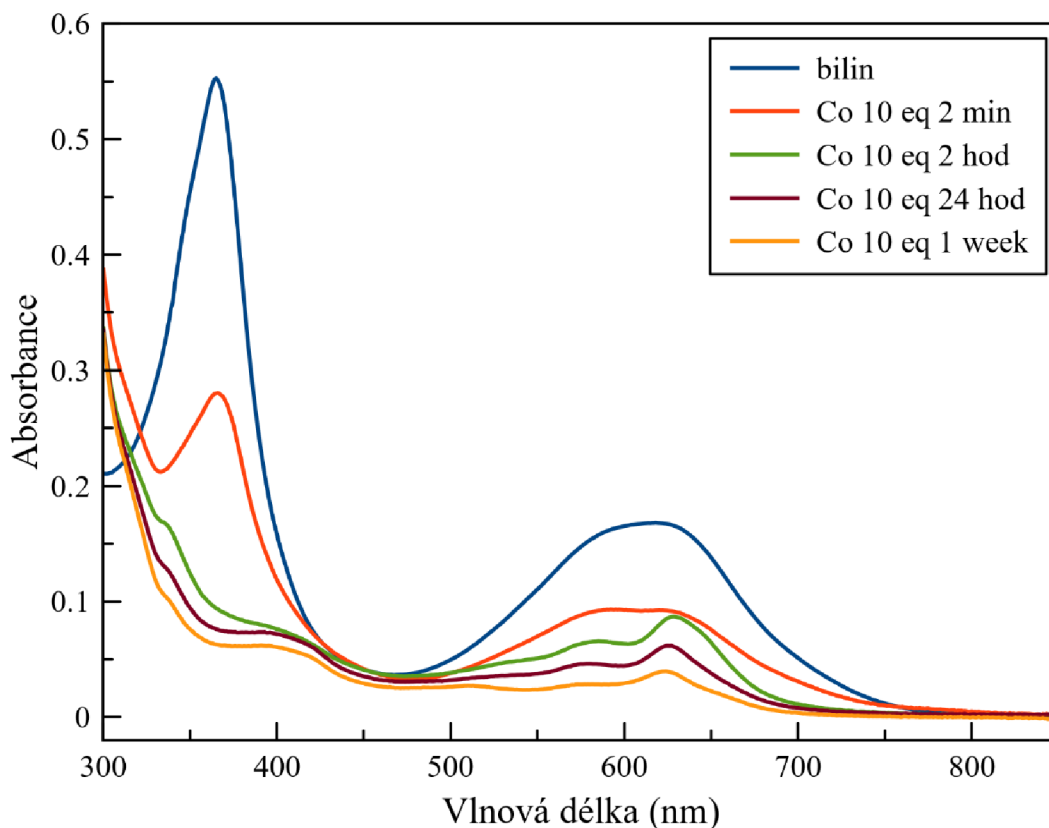
Ihned po přidání soli Zn došlo k poklesu absorbance v UV (300-400 nm) i viditelné oblasti (zejména 500-650 nm), kde zároveň došlo k zúžení absorpčního pásu Q. Po dvou hodinách byl pozorován nárůst absorbance a vznik nových píků, konkrétně došlo k rozpadu Q pásu do dvou užších pásů u 620 nm a 660 nm a vytvoření výrazného pásu v červené oblasti okolo 770 nm. Po 24 hodinách reakce došlo ke zmizení pásu u 770 nm, pás Q v oblasti 660 – 690 nm klesl a naopak pás Q u 620 nm výrazně vzrostl. Zároveň došlo ke zúžení Soretova pásu, který se posunul do UV oblasti na 340 nm. Po sedmi dnech došlo k naprostému vymizení pásu v oblasti 660 – 690 nm. Vzniklé spektrum tvořené píky u 340 nm a 620 nm připomíná absorpční spektrum chlorofylu *a* posunutého do modra (chlorofyl *a* má maxima u 435 nm a 664 nm, (Jeffrey *et al.*, 2005).

4.3.1.2. Kobalt

Reakční směs s kobaltem se vyvíjela výrazně rychleji než ostatní reakce. Vykazovala zejména pokles absorbance v celém spektru, oproti zinku nebyly pozorovány výraznější nárůsty absorpce v dlouhovlnné oblasti spektra (obr. 12). Po týdnu reakce bylo celkové absorpční spektrum výrazně nižší než u zinku (obr. 13). Výsledný produkt reakce měl maxima absorpce u cca 400 nm a 630 nm, byl tedy s výjimkou velmi nízké intenzity velmi podobný spektrům Zn-fykocyanobilinu. V případě kobaltu by bylo vhodné zvolit kratší časové rozpětí reakce než týden, protože mezi spektry změřenými po dvou hodinách a později již nejsou větší rozdíly.



Obr. 12: Absorpční spektra fcb s ionty kobaltu v metanolu měřeny každé 2 min po dobu 2 hod. Modře je znázorněno spektrum volného fykocyanobilinu před přidáním kovu.

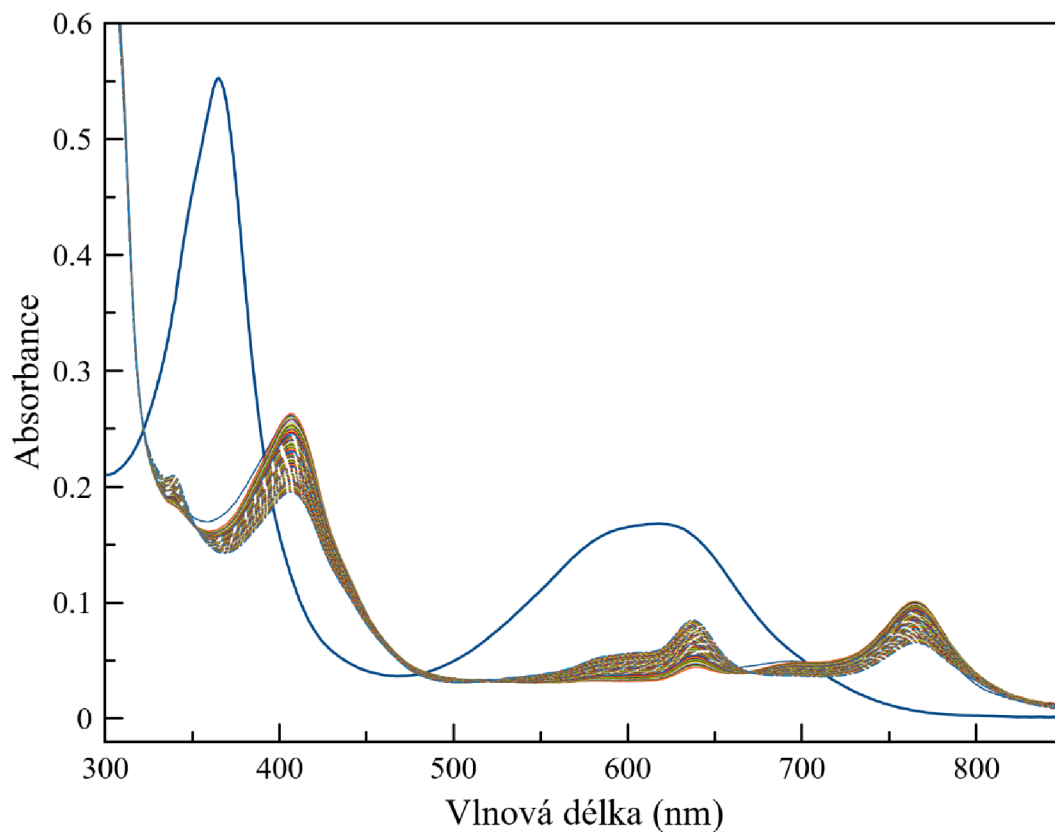


Obr. 13: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce fcb s ionty kobaltu v čase.

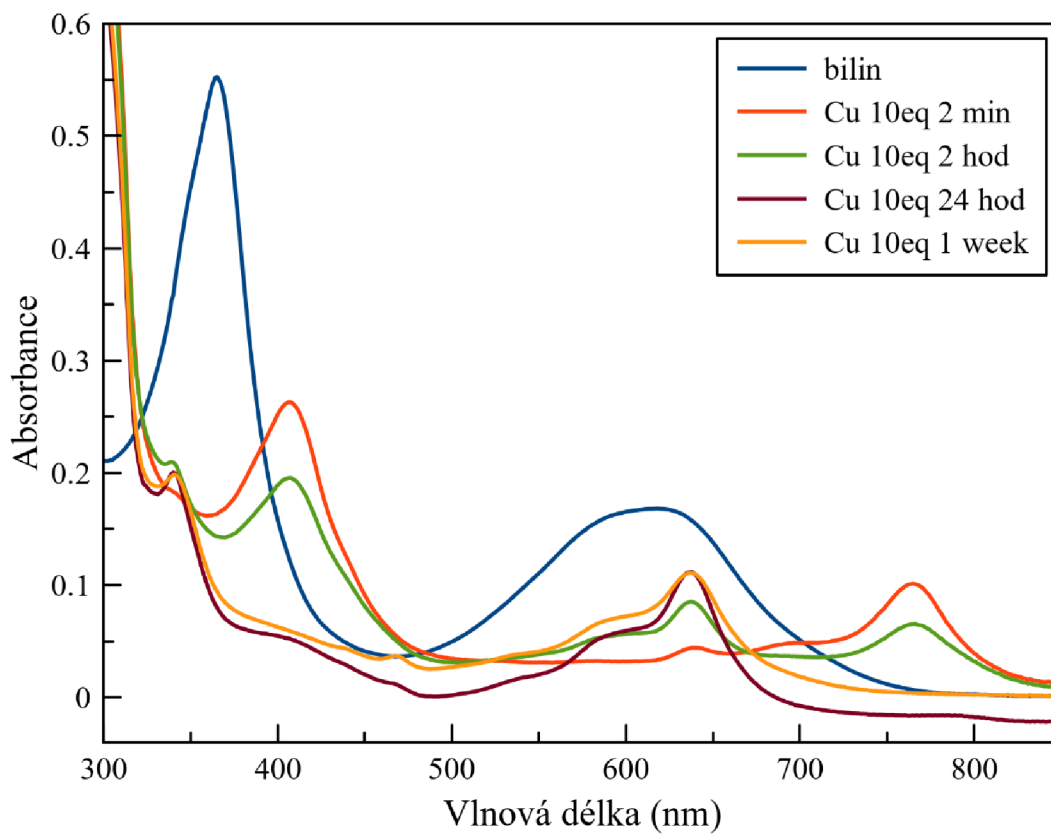
Zásobní roztok kobaltu při skladování pravděpodobně oxiduje z oxidačního čísla II na III, což je doprovázeno barevnou změnou. Čerstvě připravený roztok je světle růžový, zatímco starší roztok má zelenou barvu (viz. obr. 26).

4.3.1.3. Měď

Vývoj reakční směsi s Cu (Obr. 14) byl podobný situaci u Zn, jen rychlejší. Již po dvou minutách se objevil velmi výrazný dlouhovlnný pík u 770 nm, jehož pokles byl pozorovatelný již během prvních 2 hodin měření. Nebylo tedy možné měřit rychlost tvorby tohoto pásu. V prvních dvou hodinách reakce došlo k posunu Soretova pásu z 380 nm na 405 nm. Po jednom dni a po týdnu však tento pás zmizel a ve spektru zůstal v této oblasti jen malý pík u 350 nm. Spektrum Cu-fcb (Obr. 15) bylo po týdnu tvořeno zejména píkem u 638 nm a jeho ramenem u cca 590 nm.



Obr. 14: Absorpční spektra fcb s ionty mědi v metanolu měřeny každé 2 min po dobu 2 hod. Modře je znázorněno spektrum volného fycocyanobilinu před přidáním kovu.

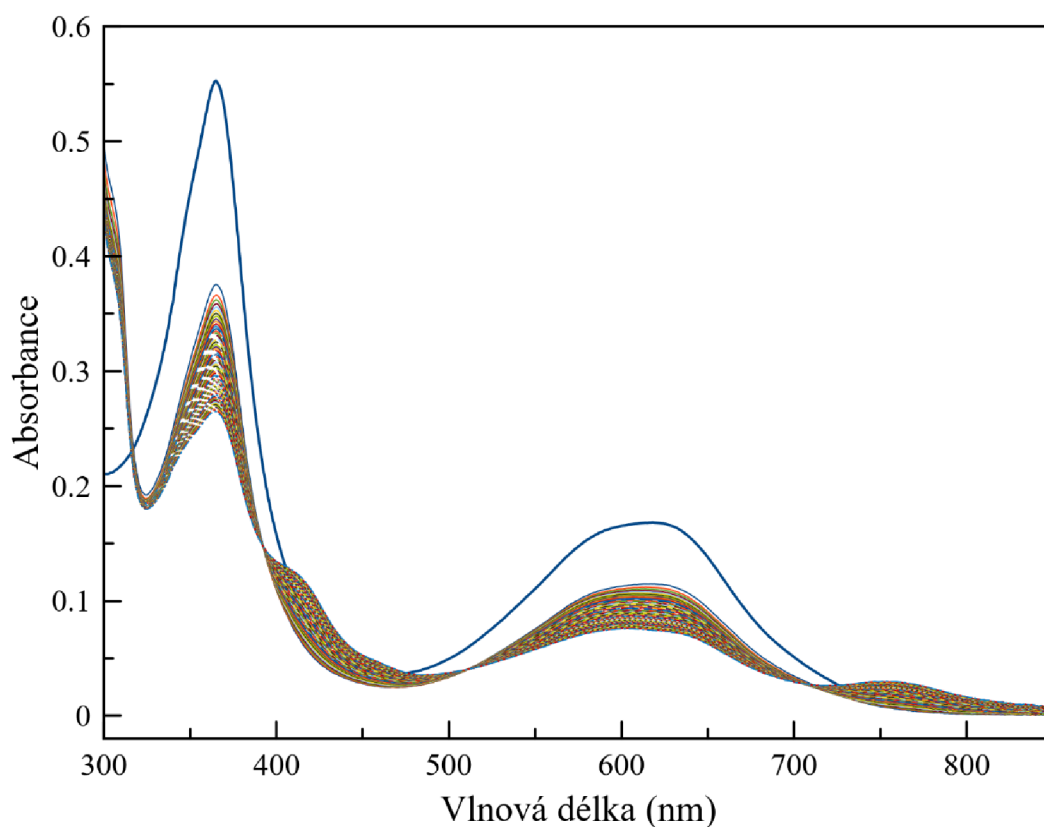


Obr. 15: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce fcb s ionty mědi v čase.

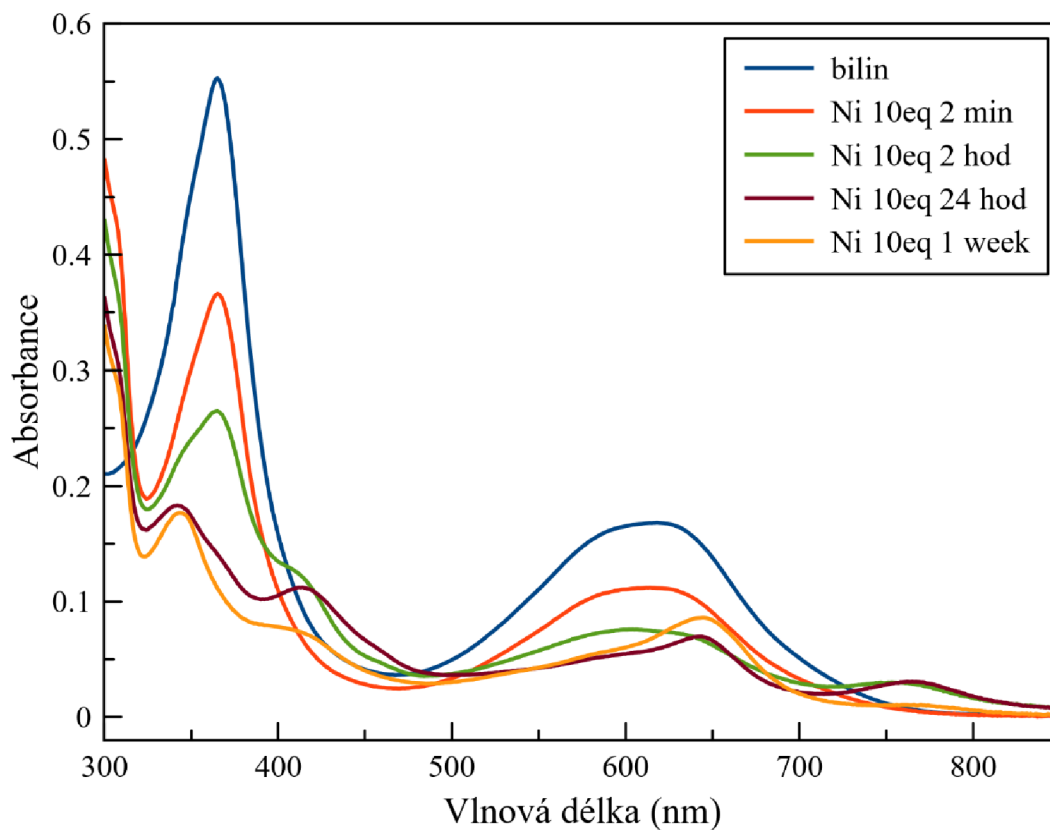
4.3.1.4. Nikl

Směs s Ni se také vyvíjela obdobně k Zn-fcb (obr.16). Znovu je zpočátku reakce vidět pík u 770 nm, který ale setrvává i po 24 h a mizí až ve spektru po 1 týdnu. Výsledné spektrum po 1 týdnu je tvořeno píkem u 645 nm a dvěma píky v UV oblasti u 350 nm a ~410 nm. Vývoj reakce s Ni byl zřejmě pomalejší než u ostatních kovů.

Během prvních dvou hodin měření bylo v grafu pozorováno hned několik izosbestických bodů, např. u 392, 512, 710 nm, což by odpovídalo relativně jednoduchému průběhu reakce. Analýza kinetiky této reakce (viz. kapitola 4.3.2.) však prokázala přítomnost nejméně dvou reakcí.

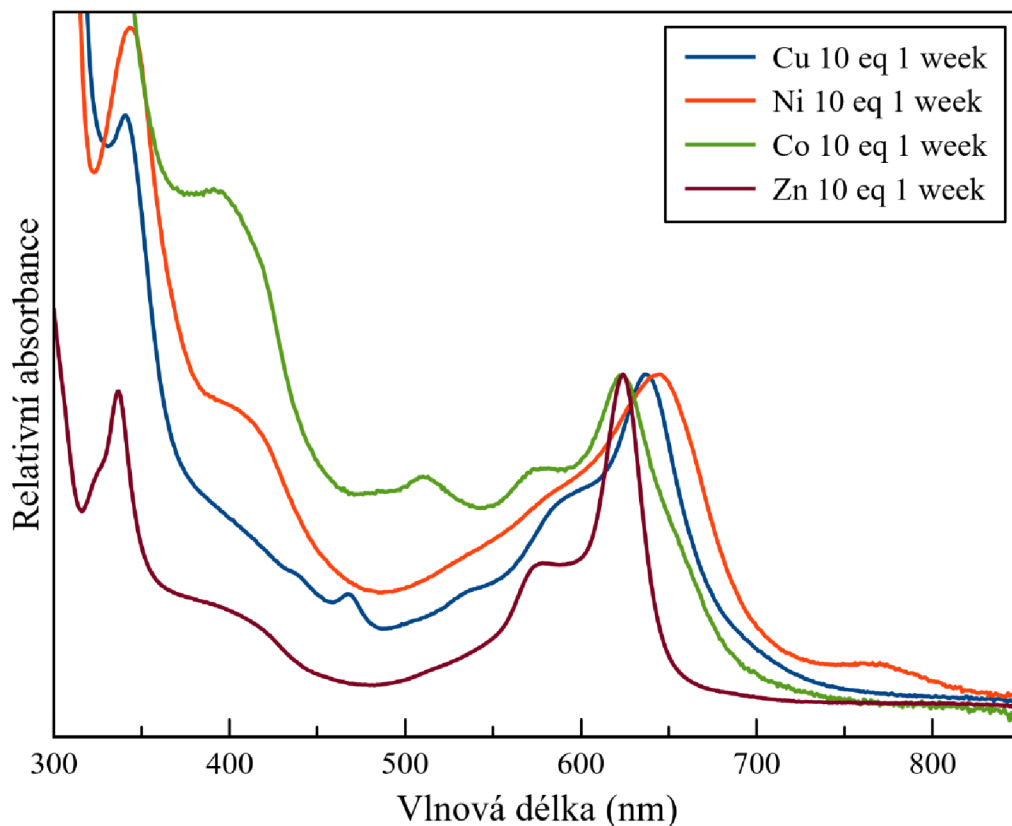


Obr. 16: Absorpční spektra fcb s ionty niklu v metanolu měřeny každé 2 min po dobu 2 hod. Modře je znázorněno spektrum volného fykocyanobilinu před přidáním kovu.



Obr. 17: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce fcb s ionty niklu v čase.

Souhrn absorpčních spekter reakcí fcb se všemi zkoušenými kovy po týdnu reakce je v obrázku (Obr. 18) dole. Ze čtyř vyzkoušených kovů jsou si polohou pásu v červené oblasti nejpodobnější Zn a Co. Komplex s Cu má tento pík posunutý do červena a s Ni ještě více, i když zde pravděpodobně po týdnu ještě reakce nedoběhla do rovnováhy (zůstává viditelný dlouhovlnný pík u 770 nm).

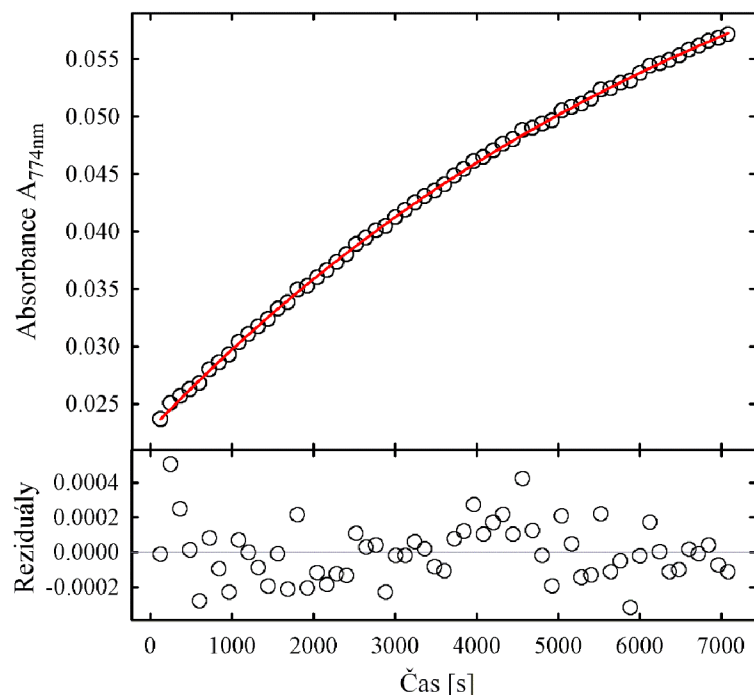


Obr. 18: Absorpční spektra fcb s ionty kovů v metanolu měřeny po týdnu.

4.3.2. Kinetika reakcí s dvojmocnými ionty

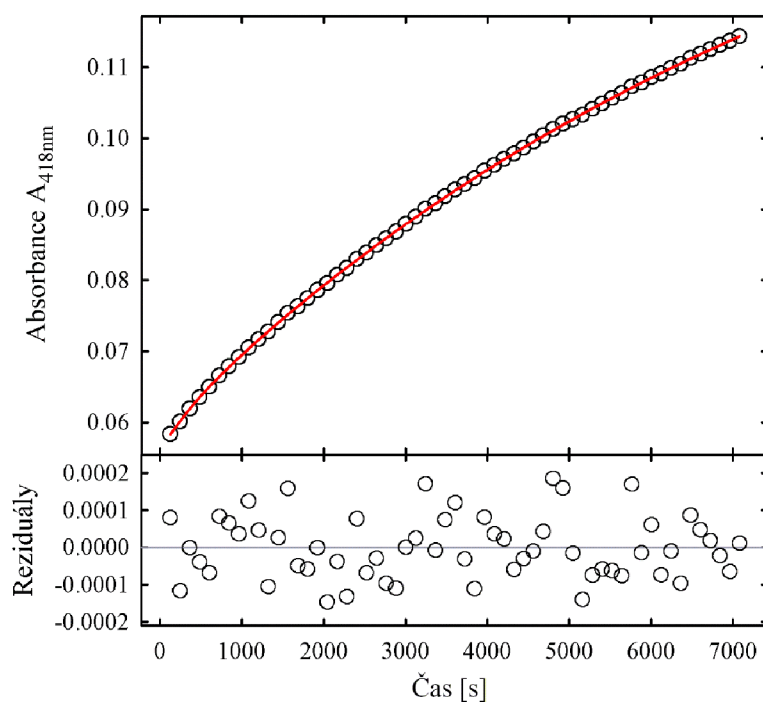
Počáteční průběh reakce byl detailně zaznamenáván po dobu prvních dvou hodin od přidání soli kovu. Z důvodu komplexního vývoje vzorku bylo pro popis průběhu této reakce zvoleno modelování vývoje vybraných píků v čase. Záznam absorbance u jedné vlnové délky byl modelován užitím jednoduché exponenciální funkce, případně součtem více těchto funkcí v případě komplikovanějšího průběhu reakce. Vzhledem k variabilitě pozorovaných reakcí nebylo možné využít pro analýzu jednotnou vlnovou délku pro všechny testované kovy. V závislosti na daných podmínkách byl analyzován průběh počátečních reakcí v oblasti dlouhovlnného píku (~ 770 nm), Soretova pásu (~ 400 nm) a pásu Q (~ 630 nm). V případě reakce s Co bylo možné použít jen oblast pásu Q. Konkrétní hodnoty jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6).

Z důvodu nedostatku času provedl analýzu rychlosti reakcí vedoucí práce. Zde jsou uvedeny jen dvě ukázky modelu dat a souhrnná tabulka výsledků. První ukázka vývoje reakce je pro případ Zn-fcb. Na obr.19 je vývoj dlouhovlnného píku u 774 nm v čase. Data byla dobře proložena modelem s jednou exponenciálou. Dle Atkins & De Paula (2003) by tato reakce odpovídala reakci prvního řádu. Získaná časová konstanta byla cca 7700 s, tj. přibližně 128 minut.



Obr. 19: Analýza rychlosti reakce Zn-fcb u 774 nm. Model (červeně) je jedna exponenciální funkce.

V mnoha případech bylo potřeba použít více než jednu exponenciálu. V takovém případě bylo získáno více časových konstant a také více amplitud složek. Např. na obrázku (Obr. 20) je kinetika reakce se solí niklu u 418 nm. Tato data vyžadovala dvě exponenciely s časovými konstantami 8700 s a 366 s, tj. přibližně 145 minut a 5,6 minut. I v tomto případě podle náhodného průběhu reziduálů model velmi dobře popisuje data.



Obr. 20: Analýza rychlosti reakce Ni-fcb u 418 nm. Model (červeně) je součet dvou exponenciálních funkcí.

Tab. 6: Spočtené rychlosti reakcí fcb s kovy. První sloupec indikuje kov a analyzovanou vlnovou délku. Adj. R² je upravený koeficient determinace, který zohledňuje i složitost použitého modelu.

	charakteristické časy [s]		relativní amplitudy složek [%]		Adj. R ²
	τ1	τ2	A1	A2	
Zn					
774 nm	7707		100,0	0,0	0,9997
375 nm	10766		100,0	0,0	0,9985
662 nm	9502		100,0	0,0	0,9999
Ni					
753 nm	7680		100,0	0,0	0,9994
616 nm	8828	319	95,0	5,0	1,0000
418 nm	8730	336	97,2	2,8	1,0000
365 nm	9802	335	96,0	4,0	1,0000
Cu					
407 nm	11541	361	96,6	3,4	1,0000
637 nm	10398	500	97,3	2,7	1,0000
766 nm	10918		100,0	0,0	0,9999
Co					
366 nm	2384	307	24,7	72,6	0,9999

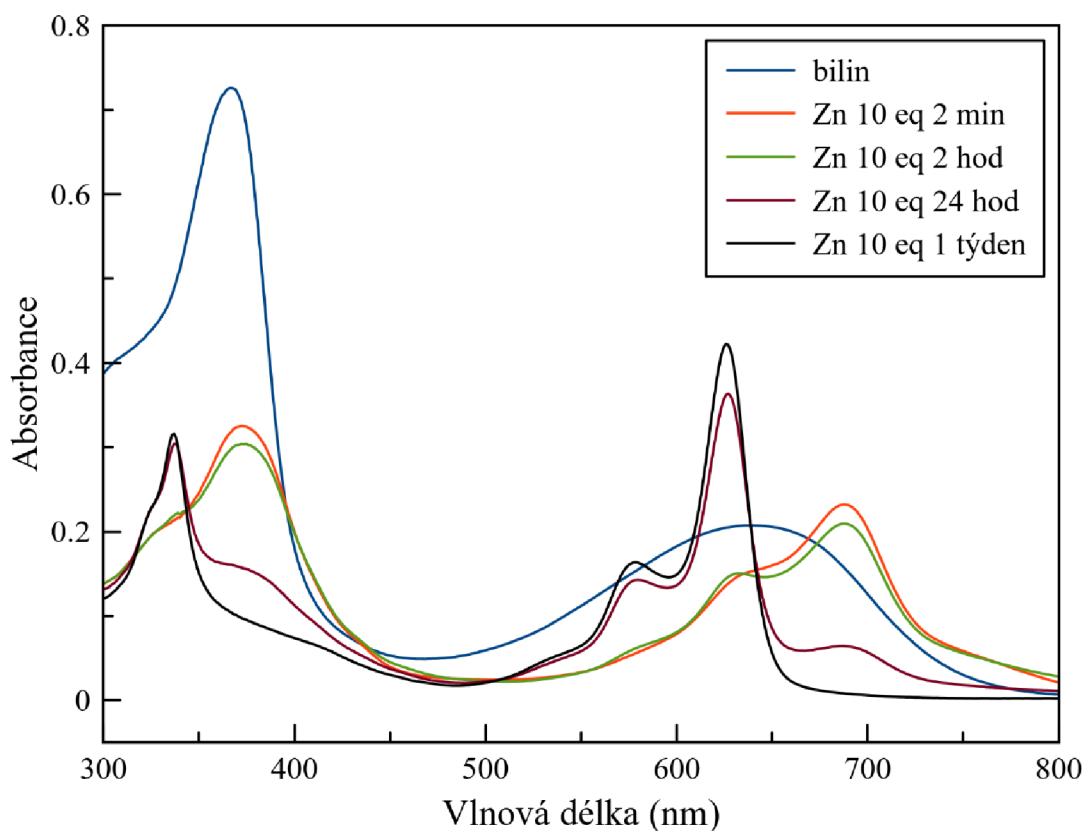
Získané rychlosti všech reakcí jsou uvedeny v tabulce (Tab. 6). Jak je vidět z hodnot upraveného koeficientu determinace (adjusted R²), všechna data měla malý šum a bylo možné je velmi dobře popsat exponenciálním modelem. Většina pozorovaných absorpčních změn v prvních dvou hodinách reakce se solí kovu byla způsobena pomalými reakcemi s charakteristickými časy okolo 9500 s, tj. 160 minut. Výjimkou byla reakce s kobaltem, kde byly až dvě třetiny pozorované absorpční změny způsobeny rychlou reakcí s charakteristickým časem zhruba 300 s, tj. 5 minut.

4.3.3. Vazba kovu na ester fykocyanobilinu

Průběh reakcí esteru fcb s jednotlivými kovy probíhal velmi podobně jako reakce kovu s přečištěným fcb. I v tomto případě byly reakce měřeny nejprve po dobu prvních dvou hodin, po 24 hod a po týdnu.

4.3.3.1. Hexylester a zinek

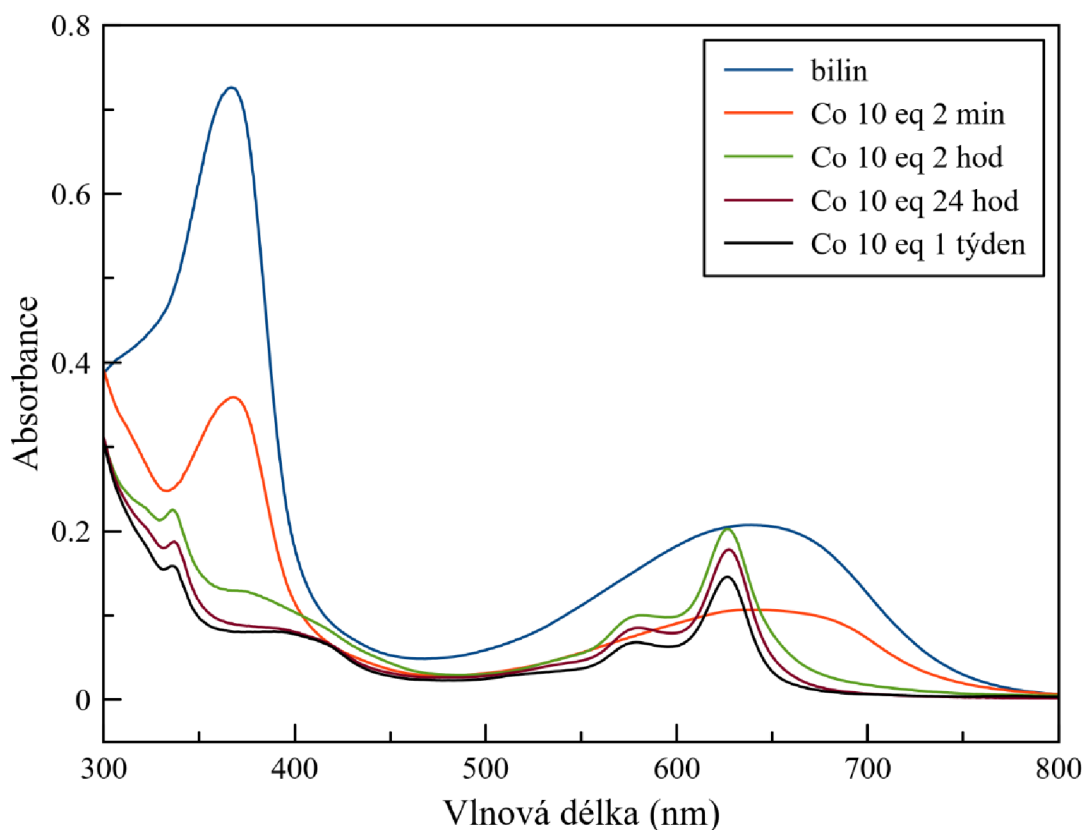
Průběh reakce esteru fcb se zinkem probíhal podobně, jako reakce kovu s fcb. I tady došlo k poklesu absorbance v UV i viditelné oblasti. U Q pásu je viditelné rozdělení na dva užší pásy u 630 nm a 690 nm, což vykazuje mírný posun do červené oblasti oproti směsi kovu s fcb. K tomuto rozdělení a posunu došlo již u spektra měřeného po dvou minutách. Nedošlo zde k vytvoření pásu okolo 770 nm, který u fcb s kovem po 24 hodinách reakce zmizel. Po 24 hodinách reakce došlo k výraznému snížení pásu Q u 690 nm a naopak výraznému vzrůstu pásu Q u 630 nm. Po týdnu došlo k úplnému poklesu pásu Q u 690 nm. Vzniklé spektrum s hlavními píky u 340 a 620 nm je velmi podobné s absorpčním spektrem fcb se zinkem po týdnu, pás Q je ale u esteru oproti Soretovu pásu vyšší.



Obr. 21: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce hexylesteru fcb s ionty zinku v čase.

4.3.3.2. Hexylester a kobalt

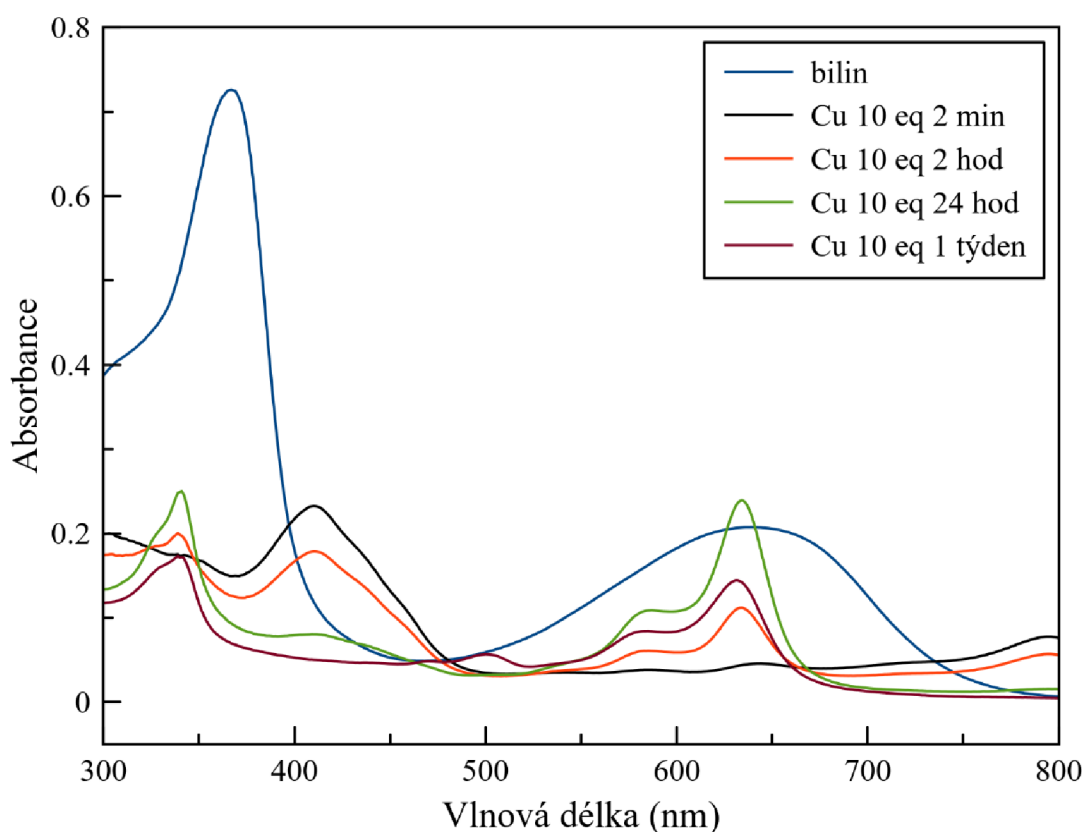
Obdobně jako u reakční směsi Co-fcb, tak i u reakční směsi esteru s kobaltem došlo na začátku reakce k poklesu absorpce v celém spektru. Po 2 hodinách došlo k poklesu absorpce v UV oblasti a nárůstu úzkého pásu u 630 nm, který i se zbytkem spektra během týdne už pouze klesal. Hlavním rozdílem byla vyšší stabilita komplexu kobaltu s esterem fcb oproti komplexu Co-fcb. Zatímco u komplexu Co-fcb měl pás Q po týdnu jen 22 % amplitudy absorpce původního fcb, pás Q u komplexu kobaltu s esterem fcb dosahoval amplitudy 68 % původní absorpce.



Obr. 22: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce hexylesteru fcb s ionty mědi v čase.

4.3.3.3. Hexylester a měď

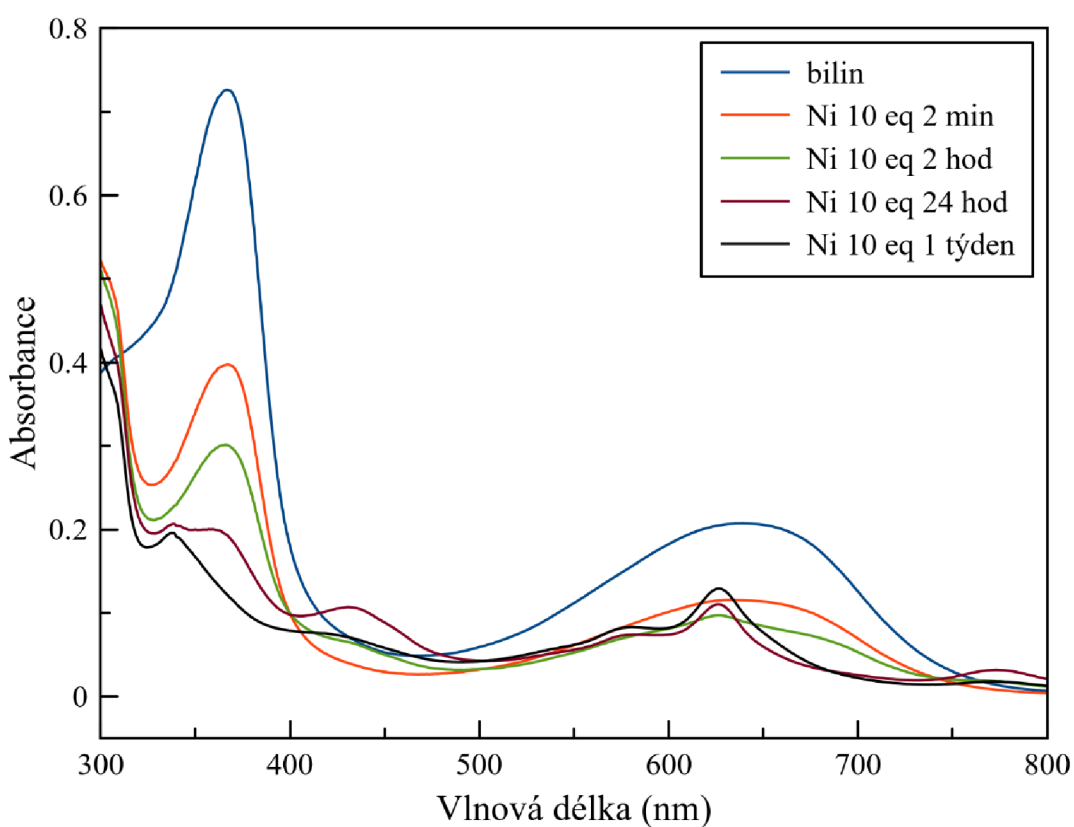
Během vývoje reakční směsi s mědí došlo na počátku reakce k úplnému poklesu absorbance v oblasti Q pásu a vzrůstu v infračervené oblasti (okolo 800 nm). Zároveň došlo k posunu Soretova pásu do červena do oblasti cca 410 nm oproti 365 nm u bilinu. Po týdnu však došlo k úplnému zmizení tohoto pásu a objevil se mnohem užší pás v UV oblasti na cca 340 nm. Výsledné spektrum po týdnu je zhruba o 40 % nižší v Q pásu než spektrum po 24 hodinách a objevil se v něm také nový malý pík u 500 nm. Ve srovnání s Cu-fcb jsou polohy Soretova i Q pásů podobné, rozdíl je především v jejich amplitudách, kdy v případě komplexu mědi s esterem fcb je amplituda u obou pásů vyšší. Největší rozdíl je však v poloze přechodného pásu, kdy u Cu-fcb je jeho maximum u 765 nm, zatímco u komplexu mědi s esterem fcb je u 800 nm.



Obr. 23: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce hexylesteru fcb s ionty mědi v čase.

4.3.3.4. Hexylester a nikli

Reakční směs esteru s niklem měla také obdobný vývoj jako reakce s Ni-fcb. Na začátku reakce došlo k poklesu celého absorpčního spektra. Po 24 hodinách došlo k vývoji píku u 770 nm, který po týdnu reakce zmizel. Obdobně je na tom také pík u 430 nm, který je nejvíc vidět po 24 hodinách. Ten byl oproti reakci Ni-fcb posunutý ze 413 nm k 432 nm. Po týdnu došlo k ustálení pásu v UV oblasti u 337 nm, můžeme tedy pozorovat posun pásu o 13 nm ke kratším vlnovým délkám oproti komplexu Ni-fcb (kapitola 4.3.1.4.). V porovnání s Ni-fcb došlo k posunu Q pásu z 645 nm na 625 nm, a zároveň jeho poměr je vzhledem k původnímu fcb vyšší než u Ni-fcb. U přechodného pásu došlo jen k mírnému posunu do červena. Vzhledem k rozdílným amplitudám je pravděpodobné, že komplex kovu s esterem fcb je stabilnější než Ni-fcb.



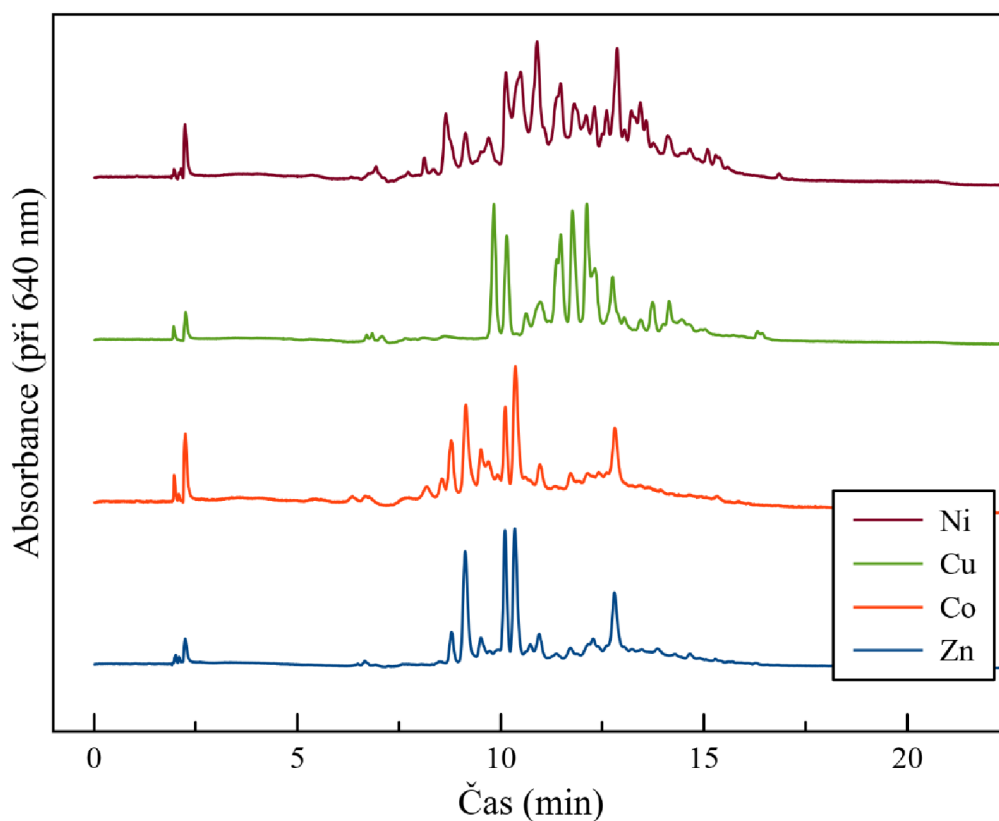
Obr. 24: Vybraná absorpční spektra z průběhu reakce hexylesteru fcb s ionty niklu v čase.

4.3.4. Kinetika reakcí esterů s dvojmocnými kovy

Data z vazby kovu na ester fcb nebyla dostatečně kvalitní pro vyhodnocení jako v případě fykocyanobilinu s kovem. S nižší kvalitou bylo možné zpracovat data z vazby Ni a Co na ester fcb. V případě Ni se podařilo modelovat data pomocí jedné exponenciely u vlnové délky 773 nm s časem 9 360 s a také u 432 nm s časem 11 130 s. V případě kobaltu byly charakteristické časy absorpční změny u 369 nm 3 590 s a 617 s. Vzhledem k delším časům, než byly u kinetiky fykocyanobilinu s kovem lze říct, že vazba kovu na esterifikovaný fykocyanobilin je pomalejší zhruba o 25 %.

4.3.5. HPLC analýza esterů fykocyanobilinu s navázaným kovem

Získané směsi kovů s esterem byly po týdnu reakce analyzovány také pomocí HPLC, výsledné chromatogramy jsou na obrázku (Obr. 25). Oproti očekávání jsou chromatogramy velmi složité s vyšším množstvím píků. V chromatogramech je od nejméně 4 velkých píků u esteru Zn-fcb až přes 10 píků u esteru Ni-fcb. Dominantní pík u esteru fcb u 12 min (Obr. 25) v chromatogramu Zn a Co téměř chybí a v chromatogramu Zn a Cu se vyskytuje výrazný dvojpík okolo 10 minut. Z nedostatku času se práce podrobnější analýze těchto dat nevěnuje.



Obr. 25: Porovnání HPLC chromatogramů komplexů esterifikovaného fcb s ionty kovů.

5. DISKUZE

5.1. Izolace fykocyanobilinů

Z důvodu zjednodušení izolace fykocyanobilinů byla oproti předchozím pracem (Malinová, 2021, Vomáčková, 2022) zvolena purifikace z komerčně vyráběných tabletek, což se osvědčilo jako účinná metoda. Na základě jednoduchosti izolace v kombinaci se studiem oboru učitelství biologie a chemie pro SŠ byl v rámci programu „Studenti žákům, žáci sobě“ zvolen tento pokus, který by bylo možné využít ve výuce. Konkrétně ve výuce chemie lze demonstrovat rozpustnost polárních a nepolárních látek v rozpouštědlech (konkrétně vodě a etanolu) a také jejich přítomnost, kterou lze detekovat okem jako barvu roztoku. Pokus je vhodný také do hodin biologie při studiu botaniky, konkrétně algologie. Je možné identifikovat vzorky a názorně ukázat, že v tabletách spiruliny se nachází sinice obsahující fykobilizomy, zatímco např. v tabletce chlorelly se fykobilizomy obsahující fykocyanobilin nevyskytují a tím pádem neposkytnou modrý roztok. V pokročilé verzi či ve fyzice lze na vzorku demonstrovat použití spektroskopických metod k analýze složení vzorku pomocí fluorescenční spektroskopie. Nevýhodou může být nedostatečná vybavenost škol. Na obdobném vzorku byla již publikována metoda pro demonstraci analýzy denaturace proteinu (Heller, 2000, Taylor, 2002).

Limitujícím krokem práce je v danou chvíli pracná a nedostatečná purifikace fykocyanobilinu po hydrolýze, jejíž výtěžek je velmi malý. V průběhu práce byla otestována metoda přečištění pomocí HPLC, která by mohla být v budoucnu účinnější než dočasná purifikace. Z nedostatku času nebyla metoda řádně testována a nebyla tedy ani dále rozpracována.

5.2. Esterifikace

Při optimalizaci esterifikace bylo otestováno malé množství podmínek. Hlavním důvodem bylo relativně malé množství vzorku, které omezovalo možnost práce s vyššími koncentracemi fykobilinů. Za těchto podmínek bylo zjištěno, že optimální doba esterifikace při 10 000× nadbytku alkoholu je 6 hodin. I přes relativně dlouhou dobu reakce nebyly další experimenty výrazně ovlivněny.

Po získání vyšších koncentrací přečištěného fykobibilinu by bylo vhodné otestovat také alkoholy s delšími uhlíkatými řetězci a případně koncentrační řadu alkoholů, což by umožnilo získat i parciální řád reakce pro přidávaný alkohol. V předchozí práci (Vomáčková, 2022) byla testována reakce především s butanolem a hexanolem. Dalším otestovaným alkoholem byl dodecylalkohol, u kterého však nebyly testovány různé časy esterifikace.

I přes úpravu délky esterifikace jsou v chromatogramech z HPLC obsaženy kontaminující složky, nebo možná vedlejší produkty reakce, v množství přes 10 %. Pro získání čistšího produktu by bylo možné směs přečistit v HPLC, bylo by však zapotřebí získat větší množství vstupního fykocyanobilinu.

5.3. Vazba iontů kovů na fykocyanobilin a jeho ester

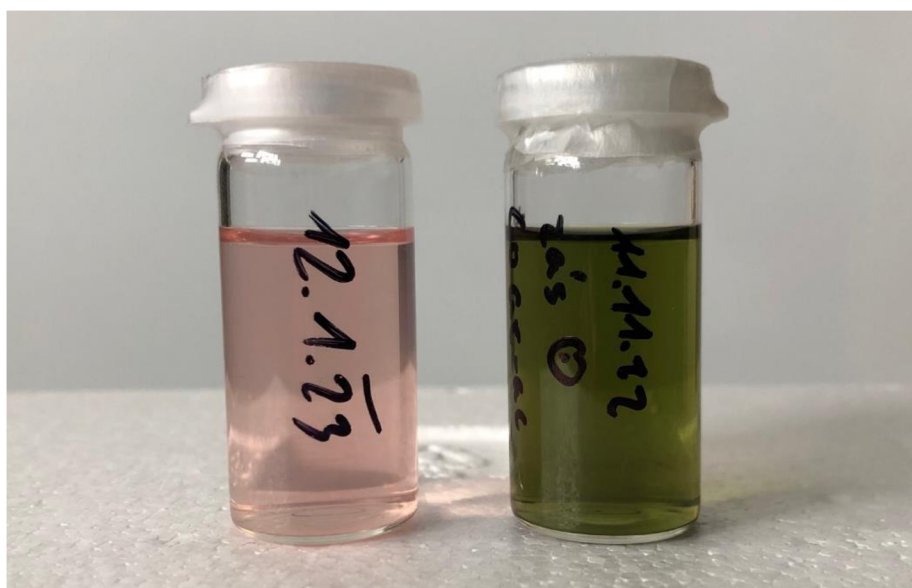
Motivem k této práci byly kromě analogií s cyklickými metaloporfyriny také dříve publikované práce o možnosti vazby kovu na biliverdin a fylobiliny vznikající při rozkladu chlorofylu v rostlinách (Velapoldi & Menis, 1971, Petrier *et al.*, 1979, Li *et al.*, 2014, Chen *et al.*, 2020). V této práci se podařilo prokázat, že všechny čtyři testované kovy způsobují významné změny absorpčních spekter. Ve všech případech došlo k výraznému zúžení absorpčního Q pásu, což interpretujeme jako důsledek omezení konformační flexibility molekuly fykocyanobilinu. Je velmi pravděpodobné, že došlo ke koordinaci atomu kovů na dusíky v pyrolových kruzích. Tato interakce byla dobře popsána u fylobilinu (Li *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2016).

Ve své práci Li *et al.* (2014) popisuje na fylobilinech poměrně rychlé koordinační reakce probíhající v řádu několika sekund až minut. Další z citovaných prací také uvádějí relativně jednoduché reakce s několika isosbestickými body ve spektrech. Konkrétně Velapoldi & Menis (1971), uvádí reakce biliverdinu s kovy s podobnými rychlostmi, jako jsou námi prováděné reakce, ale spektra opět ukazují přítomnost isosbestických bodů, což indikuje relativně jednoduchý průběh reakce.

V literatuře jsou po vazbě kovu popsány změny absorpčních spekter, kdy obvykle dochází k posunu Q pásu do červena (Petrier *et al.*, 1979, Li *et al.*, 2014, Li *et al.*, 2016, Chen *et al.*, 2020). Oproti literatuře naše data vykazují složitější reakce s několika pozorovanými mezistupni a výsledné absorpční maximum je jen mírně posunuté do červena. Například u reakce Zn-fcb se nejprve objevil pík okolo 770 nm, potom okolo 660 nm a nakonec se vzorek ustálil s píkem u 620 nm. Oproti tomu volný fykocyanobilin má absorpční maximum v oblasti 590 – 640 nm. Původ pozorovaných změn nelze bez dalších analýz spolehlivě vysvětlit. Je známo, že nepolární bakteriochlorofyly mají schopnost agregovat ve volném pufru, což je doprovázeno výrazným posunem absorpce do červena (Župčanová *et al.*, 2008). Je tedy možné, že první pozorovaný pík okolo 770 nm je způsoben vznikem agregátu více molekul fcb v prvních krocích reakce po přidání kovu. Li *et al.* (2016) také popisují existenci stabilního dimeru fylobilinu se zinkem a je možné, že podobný dimer může přechodně existovat i v našich vzorcích, kde se může projevit jako jeden z pozorovaných přechodných píků. Jelikož poloha Q pásu komplexu s kovy je blízká

poloze pásu Q volného fykocyanobilinu, lze předpokládat, že většina připravených vzorků je po týdnu reakce tvořena monomerními molekulami.

U vzorků obsahující kobalt byla pozorována malá stabilita vzniklého komplexu. To může být částečně způsobeno nestabilitou barviv a jejich komplexů na světle (Velapoldi & Menis, 1971). Větším faktorem v tomto případě bude nejspíš přítomnost kyslíku v reakční směsi a oxidace navázaného kovu. U zásobního roztoku kobaltu docházelo k viditelné změně zbarvení (obr. 26), což je s největší pravděpodobností způsobeno právě přítomností kyslíku. V budoucí práci by bylo vhodné provádět reakce bez přístupu kyslíku a s co nejmenším přístupem světla. Také by bylo možné charakterizovat stabilitu připravených komplexů na světle i ve tmě.



Obr. 26: Čerstvě připravený zásobní roztok kobaltu (vlevo) a dva měsíce starý zásobní roztok kobaltu (vpravo).

Reakce kovů s esterifikovaným bilinem byly úspěšné, opět docházelo u jednotlivých vzorků k významným absorpčním změnám. Ve srovnání s fykocyanobiliny docházelo u komplexů kovů s esterifikovaným fcb k pomalejším reakcím. Q pásy byly u esterů fcb po týdnu u všech kovů větší než v případě neesterifikovaného fykocyanobilinu. To by mohlo poukazovat na větší stabilitu produktů.

Porovnání HPLC analýzy esterifikovaného fykocyanobilinu a jeho komplexů s kovy bylo provedeno jen jednou na týden starých vzorcích. Ze získaných dat lze vidět, že reakční směs je po týdnu komplikovaná. Obsah směsi mohou tvořit různé izomery fykocyanobilinů s navázanými kovy, stabilní vedlejší produkty reakce i rozpadové produkty z důvodu nízké stability produktů. Bylo by vhodné začít analýzou komplexu Zn-fcb, který je spektroskopicky jednodušší a jeho chromatogram obsahuje jen čtyři hlavní píky.

5.4. Kinetika reakcí s dvojmocnými kovy

Pozorované rychlosti reakcí byly v řádu několika minut až hodin. V této práci byly použity nízké koncentrace kovů, 10 ekvivalent, vůči bilinům. Zvýšením koncentrací kovů by bylo možné reakci významně urychlit a zároveň testováním různých koncentrací kovů by bylo možné zjistit řád reakce ve vztahu ke koncentraci kovu. Další možností by bylo otestovat také další kovy, např. železo, kadmium nebo samarium (Velapoldi & Menis, 1971).

6. ZÁVĚR

V první části práce byla úspěšně otestována nová metoda izolace fykocyaninu z komerčně prodávané spiruliny. Vzhledem k jednoduchosti postupu byl připraven pokus vhodný pro hodiny biologie, chemie a popřípadě také fyziky. Pokus byl úspěšně otestován během projektu pořádaného Přírodovědeckou fakultou Jihočeské univerzity.

Dále byla optimalizována metoda esterifikace, kdy bylo zjištěno, že optimální doba pro esterifikaci fykocyanobilinu při nadbytku alkoholu (10 000×) byla 360 min. Reakce je stále pomalá a je tedy potřeba zvýšit koncentraci bilinu a tím urychlit reakci. Nižší nadbytky alkoholu nebyly testovány z nedostatku času, ale reakce velmi pravděpodobně poběží ještě mnohem pomaleji.

Byla také potvrzena možnost vazby všech zkoumaných kovů (Zn, Co, Cu a Ni) na fykocyanobilin. Průběh vazebných reakcí je však pomalý (probíhá v řádu několika hodin až dnů) a složitý a vyžaduje delší práci. Obdobná, jen pomalejší, je také vazba kovů na ester fykocyanobilinu. Po jejich podrobnější charakterizaci a přečištění by bylo možné uvažovat o jejich inkorporaci, namísto esterifikovaných fykocyanobilinů bez navázaného kovu, do nepolárních komplexů například s BChl.

Závěrem práce byla provedena HPLC analýza, která prokázala komplexní složení vzorků. Bylo by vhodné v budoucnu analyzovat stabilitu komplexů ve vztahu k podmínkám reakce a jejich skladování.

7. CITOVANÁ LITERATURA

1. ANGARTER, R. Tracking Phytochrome: Pigment of the Imagination. A History of Phytochrome Research. Linda C. Sage. Academic Press, San Diego, CA 1992. xx, 562 pp. 1992, roč. 257, č. 5074, s. 1292-1292. doi: 10.1126/science.257.5074.1292
2. APEL, K. a HIRT, H. Reactive oxygen species: Metabolism, Oxidative Stress, and Signal Transduction. *Annual Review of Plant Biology*. 2004, roč. 55, č. 1, s. 373-399. doi: 10.1146/annurev.arplant.55.031903.141701.
3. ATKINS, P. W. a DE PAULA, J. Fyzikální chemie. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2013. ISBN 978-80-7080-830-6.
4. BATTERSBY, A. R. Tetrapyrroles: the pigments of life. *Natural Product Reports*, 2000, 17(6), 507–526. doi:10.1039/b002635m
5. BEALE, S.I., CORNEJO, J. Biosynthesis of Phycobilins. *Chemical Reviews*. 1991;966(33): 22333-22340.
6. BHAT, V.B., MADYASTHA, K.M. Scavenging of Peroxynitrite by Phycocyanin and Phycocyanobilin from *Spirulina platensis*: Protection against Oxidative Damage to DNA. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 2001, **285**(2), 262-266. ISSN 0006291X. doi:10.1006/bbrc.2001.5195
7. BISHOP, J.E., RAPOPORT, H., KLOTZ, A.V., CHAN, C.F., GLAZER, A.N., FUEGLISTALLER, P., ZUBER, H. Chromopeptides from phycoerythrocyanin. Structure and linkage of the three bilin groups. *Journal of the American Chemical Society*. 1987, **109**(3), 875-881. doi:10.1021/ja00237a039
8. BRYANT, D.A., GUGLIELMI, G., DE MARSAC, N.T., CASTETS, A.M., COHEN-BAZIRE, G. The structure of cyanobacterial phycobilisomes: a model. *Archives of Microbiology*. 1979, **123**(2), 113-127. doi:10.1007/BF00446810
9. BRYANT, D. A.; HUNTER, C.N. a WARREN, M.J. Biosynthesis of the modified tetrapyrroles—the pigments of life. *Journal of Biological Chemistry*. 2020, roč. 295, č. 20, s. 6888-6925. doi: 10.1074/jbc.REV120.006194.
10. CONTRERAS, H., CHIM, N., CREDALI, A., GOULDING, C.W. Heme uptake in bacterial pathogens. *Current Opinion in Chemical Biology*. 2014, roč. 19, s. 34-41. ISSN 13675931. doi: 10.1016/j.cbpa.2013.12.014
11. FRANK, H.A., COGDELL, R.J. 8.6 Light Capture in Photosynthesis. *Comprehensive Biophysics*. Elsevier, 2012, s. 94-114. ISBN 9780080957180. doi:10.1016/B978-0-12-374920-8.00808-0

12. GLAZER, A.N., HIXSON, C.S. Characterization of R-phycoyanin. Chromophore content of R-phycoyanin and C-phycoerythrin. *Journal of Biological Chemistry*. 1975, **250**(14), 5487-5495. doi: 10.1016/S0021-9258(19)41208-8
13. GONZALEZ, R., RODRIGUEZ, S., ROMAY, C., ANCHETA, O., GONZALEZ, A., ARMESTO, J., REMIREZ, D., MERINO, N. Anti-inflammatory activity of phycoyanin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological research*, 1999, **39**(1), 55-59. doi: 10.1006/phrs.1998.0409
14. HIRATA, T., TANAKA, M., OOIKE, M., TSUNOMURA, T., NIIZEKI, N., SAKAGUCHI, M. Radical Scavenging Activity of Phycocyanobilin Prepared from the Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Fisheries science*. 1999, **65**(6), 971-972. ISSN 0919-9268. doi:10.2331/fishsci.65.971
15. HOANG, C., YANG-Yi, L., XIAO-XIAO, H., JIN-QUAN, C. Ultrafast excited state dynamics of biliverdin dimethyl ester coordinate with zinc ions. *Chin. J. Chem. Phys.* 1 February 2020; 33 (1): 69–74. doi: 10.1063/1674-0068/cjcp1911193)
16. IKEUCHI, M., ISHIZUKA, T. Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2008, **7**(10). doi:10.1039/b802660m
17. ISHIZUKA, T., NARIKAWA, R., KOHCHI, T., KATAYAMA, M., IKEUCHI, M. Cyanobacteriochrome TePixJ of *Thermosynechococcus elongatus* Harbors Phycoviolobin as a Chromophore. *Plant and Cell Physiology*. 2007, **48**(9), 1385-1390. ISSN 0032-0781. doi:10.1093/pcp/pcm106
18. JANSEN, T., DAIBER, A. Direct Antioxidant Properties of Bilirubin and Biliverdin. Is there a Role for Biliverdin Reductase? *Frontiers in Pharmacology*. 2012, roč. 3. ISSN 1663-9812. doi: 10.3389/fphar.2012.00030
19. KALKUŠ, M., (2018) Izolace fykobilinů ze sinice *Synechocystis* a možnost jejich následné esterifikace, (Isolation of phycobilins from the cyanobacterium *Synechocystis* and the possibility of their subsequent esterification). Bc. Thesis, in Czech, - 41p., Faculty of Science, University of the South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
20. KARG, C.A., DOPPLER, C., SCHILLING, C., JAKOBS, F., DAL COLLE, M.C.S. *et al.* A yellow chlorophyll catabolite in leaves of *Urtica dioica* L: An overlooked phytochemical that contributes to health benefits of stinging nettle. *Food Chemistry*. 2021, roč. 359. doi: 10.1016/j.foodchem.2021.129906

21. KARG, C.A., TANIGUCHI, M., LINDSEY, J.S., MOSER, S. Phyllobilins – Bioactive Natural Products Derived from Chlorophyll – Plant Origins, Structures, Absorption Spectra, and Biomedical Properties. *Planta Medica*. 2023, roč. 89, č. 06, s. 637-662. doi: 10.1055/a-1955-4624
22. KARG, C.A.; WANG, P., VOLLMAR, A.M., MOSER, S. Re-opening the stage for Echinacea research - Characterization of phylloxanthobilins as a novel anti-oxidative compound class in Echinacea purpurea. *Phytomedicine*. 2019, roč. 60. doi: 10.1016/j.phymed.2019.152969
23. KIRILOVSKY, D., BÜCHEL, C. Evolution and function of light-harvesting antenna in oxygenic photosynthesis. *Metabolism, Structure and Function of Plant Tetrapyrroles: Control Mechanisms of Chlorophyll Biosynthesis and Analysis of Chlorophyll-Binding Proteins*. Elsevier, 2019, s. 247-293. Advances in Botanical Research. ISBN 9780128199824. doi:10.1016/bs.abr.2019.01.002
24. KRÄUTLER, B. Breakdown of Chlorophyll in Higher Plants—Phyllobilins as Abundant, Yet Hardly Visible Signs of Ripening, Senescence, and Cell Death. *Angewandte Chemie International Edition*. 2016, roč. 55, č. 16, s. 4882-4907. ISSN 1433-7851. doi: 10.1002/anie.201508928
25. KRÄUTLER, B. Phyllobilins – the abundant bilin-type tetrapyrrolic catabolites of the green plant pigment chlorophyll. *Chem. Soc. Rev.* 2014, roč. 43, č. 17, s. 6227-6238. doi: 10.1039/C4CS00079J
26. LAMPARTER, T., MICHAEL, N., MITTMANN, F., ESTEBAN, B. Phytochrome from *Agrobacterium tumefaciens* has unusual spectral properties and reveals an N-terminal chromophore attachment site. *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2002, roč. 99, č. 18, s. 11628-11633. doi: 10.1073/pnas.152263999
27. LASKAR, A.A., KHAN, M.A., RAHMANI, A.H., FATIMA, S., YOUNUS, H. Thymoquinone, an active constituent of *Nigella sativa* seeds, binds with bilirubin and protects mice from hyperbilirubinemia and cyclophosphamide-induced hepatotoxicity. *Biochimie*. 2016, roč. 127, s. 205-213. doi: 10.1016/j.biochi.2016.05.020
28. LI, C., ULRICH, M., LIU, X., WURST, K., MÜLLER, T., KRÄUTLER, B. Blue transition metal complexes of a natural bilin-type chlorophyll catabolite. *Chem. Sci.*, 2014, 5, 3388-3395. doi: 10.1039/C4SC00348A

29. LI, C., ULRICH, M., LIU, X., WURST, K., MÜLLER, T. *et al.* Blue transition metal complexes of a natural bilin-type chlorophyll catabolite. *Chem. Sci.* 2014, roč. 5, č. 9, s. 3388-3395. ISSN 2041-6520. doi: 10.1039/C4SC00348A
30. LOCKHART, P.J., LARKUM, A.W., STEEL, M., WADDELL, P.J., PENNY, D. Evolution of chlorophyll and bacteriochlorophyll: the problem of invariant sites in sequence analysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 1996, roč. 93, č. 5, s. 1930-1934. doi: 10.1073/pnas.93.5.1930
31. SUDHAKAR, M.P., JAGATHEESAN, A., PERUMAL, K., ARUNKUMAR, K. Methods of phycobiliprotein extraction from *Gracilaria crassa* and its applications in food colourants. *Algal Research.* 2015, roč. 8, s. 115-120. doi: 10.1016/j.algal.2015.01.011
32. MASOJÍDEK, J., TORZILLO, G., KOBLÍŽEK, M. Photosynthesis in Microalgae. RICHMOND, Amos a Qiang HU, ed. *Handbook of Microalgal Culture.* Oxford, UK: John Wiley & Sons, 2013, 2013-04-12, s. 21-36. ISBN 9781118567166. doi: 10.1002/9781118567166.ch2
33. MUKOUGAWA, K., KANAMOTO, H., KOBAYASHI, T., YOKOTA, A., KOHCHI, T. Metabolic engineering to produce phytochromes with phytochromobilin, phycocyanobilin, or phycoerythrobilin chromophore in *Escherichia coli*. *FEBS Letters.* 2006, roč. 580, č. 5, s. 1333-1338. doi: 10.1016/j.febslet.2006.01.051
34. MURRAY, R.K. Harper's illustrated biochemistry. 28th ed. Lange medical book. New York: McGraw-Hill Medical, c2009. ISBN 978-0-07-179277-6.
35. MYSLIWA-KURDZIEL, B., SOLYMOSI, K. Phycobilins and Phycobiliproteins Used in Food Industry and Medicine. *Mini-Reviews in Medicinal Chemistry.* 2017, roč. 17, č. 13. doi: 10.2174/1389557516666160912180155
36. National Center for Biotechnology Information. *PubChem* Compound Summary for CID 8027, Pyrrole. <https://pubchem.ncbi.nlm.nih.gov/compound/Pyrrole>.
37. NOVÁK, J., BARTOVSKÁ, L., CIBULKA, I., DOHNAL, V., CHUCHVALEC, P., KOLAFKA, J., MALIJEVSKÝ, A., MATOUŠ, J., ŘEHÁK, K., SLAVÍČEK, P., ŠOBR, J. a VOŇKA, P. Fyzikální chemie – bakalářský a magisterský kurz. VŠCHT Praha, 2008.

38. OBERHUBER, M., KRÄUTLER, B. Breakdown of Chlorophyll: Electrochemical Bilin Reduction Provides Synthetic Access to Fluorescent Chlorophyll Catabolites. *ChemBioChem*, 2002, 3: 104-107. doi: 10.1002/1439-7633(20020104)3:1<104::AID-CBIC104>3.0.CO;2-R
39. PAGELS, F., GUEDES, A.C., AMARO, H.M., KIJJOA, A., VASCONCELOS, V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2019, **37**(3), 422-443. ISSN 07349750. doi: 10.1016/j.biotechadv.2019.02.010
40. PETRIER, C., DUPUY, C., JARDON, P., GAUTRON, R. Studies on tetrapyrrols pigments—I. absorption and fluorescence of biliverdin dimethyl esters of the IX series. *Photochemistry and Photobiology*. 1979, roč. 29, č. 2, s. 389-392. : doi: 10.1111/j.1751-1097.1979.tb07063.x
41. LI, C. & KRÄUTLER, B. Zn-complex of a natural yellow chlorophyll catabolite. *Journal of Porphyrins and Phthalocyanines*, 2016, 20, 388-396 doi: 10.1142/S1088424616500176
42. POULOS, T.L. Heme Enzyme Structure and Function. *Chemical Reviews*. 2014, roč. 114, č. 7, s. 3919-3962. doi: 10.1021/cr400415k
43. QIANG, X., WANG, L., NIU, J., GONG, X., WANG, G. Phycobiliprotein as fluorescent probe and photosensitizer: A systematic review. *International Journal of Biological Macromolecules*. 2021, roč. 193, s. 1910-1917. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.11.022
44. QUAIL, P.H. Phytochromes. *Current Biology*. 2010, roč. 20, č. 12, s. R504-R507. doi: 10.1016/j.cub.2010.04.014.
45. VELAPOLDI, R.A., MENIS, O. Formation and Stabilities of Free Bilirubin and Bilirubin Complexes with Transition and Rare-Earth Elements, *Clinical Chemistry*, Volume 17, Issue 12, 1 December 1971, Pages 1165–1170, doi: 10.1093/clinchem/17.12.1165
46. ROCKWELL, N.C., LAGARIAS, J. C. A Brief History of Phytochromes. *ChemPhysChem*. 2010, roč. 11, č. 6, s. 1172-1180. doi: /10.1002/cphc.200900894
47. SHARROCK, R.A. The phytochrome red/far-red photoreceptor superfamily. *Genome Biol* 2008, 9, 230. doi: 10.1186/gb-2008-9-8-230

48. SCHEER, H., ZHAO, K.H., Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Molecular Microbiology*. 2008, **68**(2), 263-276. ISSN 0950382X. doi: 10.1111/j.1365-2958.2008.06160.x
49. SCHEER, H. *The Pigments*. GREEN, B.R., PARSON, W.W. Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003, s. 29-81. ISBN 978-90-481-5468-5. doi: 10.1007/978-94-017-2087-8_2
50. SCHLODDER, E. Introduction to optical methods in photosynthesis. *Photosynthesis Research*. 2009, roč. 101, č. 2-3, s. 93-104. doi: 10.1007/s11120-009-9446-y
51. SILVA, S.C., FERREIRA, I.C., DIAS, M.M., BARREIRO, M.F. Microalgae-derived pigments: a 10-year bibliometric review and industry and market trend analysis. *Molecules* 2020, 25(15):3406.
52. SINGH, A.K., RANA, H.K., PANDEY, A.K. Analysis of chlorophylls. *Recent Advances in Natural Products Analysis*. Elsevier, 2020, s. 635-650. ISBN 9780128164556. doi: 10.1016/B978-0-12-816455-6.00019-6.
53. SMITH, D. W., WILLIAMS, R. J. P. The spectra of ferric haems and haemoproteins. *Structure and Bonding*. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1970, s. 1-45. ISBN 978-3-540-05022-3. doi: 10.1007/BFb0118898
54. SMITH, H. Phytochromes and light signal perception by plants—an emerging synthesis. *Nature*. 2000, roč. 407, č. 6804, s. 585-591. doi: 10.1038/35036500
55. SWANSON, R.V., ONG, L.J., WILBANKS, S.M., GLAZER, A.N. Phycoerythrins of marine unicellular cyanobacteria. II. Characterization of phycobiliproteins with unusually high phycourobilin content. *Journal of Biological Chemistry*. 1991, **266**(15), 9528-9534. doi: 10.1016/S0021-9258(18)92852-8
56. ŠETLÍK, I., SEIDLOVÁ, F., ŠANTRŮČEK, J. (2004): Fyziologie rostlin. *Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice*, 1998. www.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html
57. TAYLOR, A.T.S., FELLER, S.E. Structural Studies of Phycobiliproteins from *Spirulina*: Combining Spectroscopy, Thermodynamics, and Molecular Modeling in an Undergraduate Biochemistry Experiment. *Journal of Chemical Education*. 2002, roč. 79, č. 12. ISSN 0021-9584. doi: 10.1021/ed079p1467..

58. VOMÁČKOVÁ, H., (2022) Chemické modifikace bilinových barviv. [Chemical modification of bilin pigments. Bc. Thesis, in Czech.] – 48 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
59. WEGIEL, B., OTTERBEIN, L.E. Go Green: The Anti-Inflammatory Effects of Biliverdin Reductase. *Frontiers in Pharmacology*. 2012, roč. 3. doi: 10.3389/fphar.2012.00047..
60. WU, S., MCDOWELL, M.T., LAGARIAS, J. C. Phycocyanobilin Is the Natural Precursor of the Phytochrome Chromophore in the Green Alga *Mesotaenium caldariorum*. *Journal of Biological Chemistry*. 1997, roč. 272, č. 41, s. 25700-25705. doi: 10.1074/jbc.272.41.25700
61. YAMADA, H., KATO, Y. Green colouration of cocoons in *Antheraea yamamai* (Lepidoptera: Saturniidae). *Journal of Insect Physiology*. 2004, roč. 50, č. 5, s. 393-401. doi: 10.1016/j.jinsphys.2004.02.004
62. ZHAO, K.H., PORRA, R.J., SCHEER, H. Phycobiliproteins. KADISH, K.M., SMITH, K.M., GUILARD, R. *Handbook of Porphyrin Science (Volume 22)*. World Scientific Publishing Company, 2012, 2012-08-13, s. 1-66. Handbook of Porphyrin Science. ISBN 978-981-4397-63-6. doi 10.1142/9789814397605_0005
63. Župčanová *et al.* (2008) The Length of Esterifying Alcohol Affects the Aggregation Properties of Chlorosomal Bacteriochlorophylls. *Photochemistry and Photobiology* 84 (5):1187-1194.

8. PŘÍLOHY

Analýza fotosyntetických pigmentů ve Spirulině

Nádobí

- třecí miska s tloučkem, 4 kádinky + 1 odkládací kádinka, nálevka, 2 zkumavky, filtrační papír, nůžky, spektroskopické kyvety, odměrný válec (10 ml)

Chemikálie

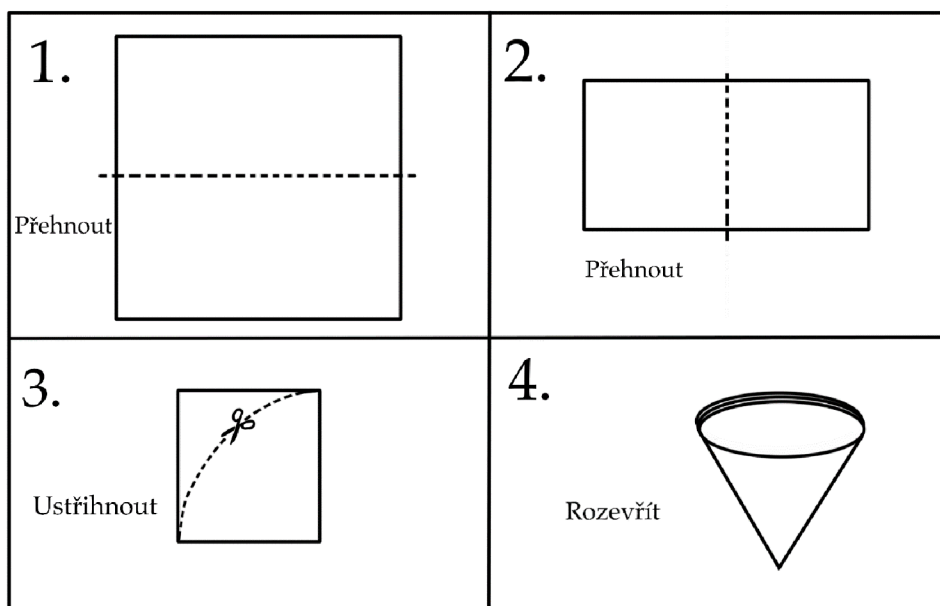
- destilovaná voda, etanol (denaturovaný), tablety sušené Spiruliny

Bezpečnost práce

- Budeme pracovat s denaturovaným etanolem, který není jedlý (bylo by vám po něm nevoľno), nechutnávejte ho, intenzivně k němu nečichejte. Nedívejte se do silných svazků světla, jako je třeba použitý laser. V případě nevoľnosti, zranění nebo jiných nebezpečí informujte ihned jednoho z vedoucích praktik.

Postup

1. Nadrťte 1 tabletu Spiruliny ($m = 200 \text{ mg}$) ve třecí misce.
2. Nadrčenou tabletu přesypte do 50 ml kádinky a rozpusťte v 10 ml destilované vody.
3. Z filtračního papíru si připravte jednoduchý filtr, vložte ho do nálevky a opatrně namočte destilovanou vodou.



4. Přefiltrujte alespoň 1 ml vzorku do kádinky.
5. Do pracovního listu si zaznamenejte barvu rozpuštěné nadrcené tabletky a porovnejte s barvou filtrátu. Zaznamenejte, co se stane při posvícení silným světlem (např. z mobilu) do filtrátu.

6. Filtrát přelijte do zkumavky a asi 5× naředte vodou. Naředěný filtrát přelijte do spektroskopické kyvety. Ujistěte se, že kyveta je z venku čistá a suchá, v případě potřeby ji očistěte čtverečkem buničiny.
7. Za pomoci vyučujícího změřte absorpční a fluorescenční spektrum vzorku.
8. Spektra si vyfoťte a zakreslete do připraveného grafu na pracovním listu. Poznamenejte si do pracovního listu i další vlastnosti vzorku.
9. Z papírového filtru si opatrně seškrábněte nezfiltrovaný materiál do čisté kádinky, zalijte 2 ml denaturovaného ethanolu a dobře promíchejte.
10. Zopakujte postup s druhým vzorkem (kroky 3 – 8). Namísto vody použijte etanol.