

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích**  
**Přírodovědecká fakulta**

**Izolace fykobilinů ze sinice *Synechocystis* a možnost jejich  
následné esterifikace**

Bakalářská práce

Milan Kalkuš

Vedoucí práce: RNDr. Radek Litvín, Ph.D  
(Ústav chemie a Biochemie)

České Budějovice 2018

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.

### **Anotace**

Tato práce se v rešeršní části zabývá popisem fykobilinů, jejich biosyntézou, vlastnostmi a funkcí během fotosyntézy. Díky nim by jejich estery mohly být využity k výrobě umělých světlosběrných antén. Je zde obsažen i popis pigmentů podobné struktury (tetrapyroly).

V experimentální části práce obsahuje izolaci fykobilinů kyselou hydrolyzou z buněk sinice *Synechocystis*, analýzu získaných pigmentů metodami TLC a HPLC a popis esterifikace izolovaných fykobilinů butan-1-olem.

This thesis describes phycobilins, their biosynthesis, properties and functions during photosynthesis. Their esters could be used to produce artificial self-assembling light-harvesting antennae. Pigments with similar structures (tetrapyroles) are also described.

The experimental part describes the isolation of phycobilins from the cyanobacterium *Synechocystis* by cleavage with hydrochloric acid, the analysis of obtained pigments by TLC and HPLC methods and esterification of purified phycobilins with butan-1-ol.

## **Prohlášení**

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracoval samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s § 47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích 17.4.2018

.....

## **Poděkování**

Velký dík patří vedoucímu mé bakalářské práce RNDr. Radku Litvínovi, Ph.D. a jeho kolegovi RNDr. Davidu Bínovi, Ph.D. za cenné rady a připomínky při práci v laboratoři a během vzniku písemné části práce.

Dále bych rád poděkoval celému kolektivu laboratoře oddělení fotosyntézy za ochotu a vstřícný přístup.

Mé velké poděkování patří i celé rodině, bez jejíž podpory bych nemohl nikdy studovat a psát tuto práci.

## Obsah

<b>1. Úvod.....</b>	<b>3</b>
<b>1.1 Fotosyntetická barviva .....</b>	<b>3</b>
<b>1.2 Tetrapyroly .....</b>	<b>3</b>
<b>1.3 Chlorofyly a Bakteriochlorofyly .....</b>	<b>5</b>
<b>1.4 Fykobiliny .....</b>	<b>5</b>
<b>1.5 Fykobilizomy .....</b>	<b>7</b>
<b>1.6 Biosyntéza fykobilinů .....</b>	<b>8</b>
<b>1.7 Bilirubiny .....</b>	<b>9</b>
<b>1.8 Samoorganizující agregáty.....</b>	<b>10</b>
<b>1.9 Esterifikace .....</b>	<b>10</b>
<b>1.10 Fischerova Esterifikace .....</b>	<b>11</b>
<b>2. Cíle práce .....</b>	<b>13</b>
<b>3. Materiál a metody .....</b>	<b>14</b>
<b>3.1 Příprava fykobilinů ze sinice Synechocystis .....</b>	<b>14</b>
<b>3.2 HPLC .....</b>	<b>17</b>
<b>3.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....</b>	<b>18</b>
<b>3.4 UV-VIS absorpční spektrometrie.....</b>	<b>19</b>
<b>3.5 Fischerova esterifikace .....</b>	<b>20</b>
<b>4. Výsledky .....</b>	<b>21</b>
<b>4.1 Izolace fykobilinů .....</b>	<b>21</b>
<b>4.2 HPLC .....</b>	<b>26</b>
<b>4.3 TLC .....</b>	<b>29</b>
<b>4.4 Esterifikace .....</b>	<b>30</b>
<b>4.5 TLC po esterifikaci .....</b>	<b>31</b>
<b>5. Diskuze .....</b>	<b>33</b>

<b>6. Závěr.....</b>	<b>35</b>
<b>7. Zdroje a literatura.....</b>	<b>36</b>
<b>8. Příloha .....</b>	<b>40</b>

## 1. Úvod

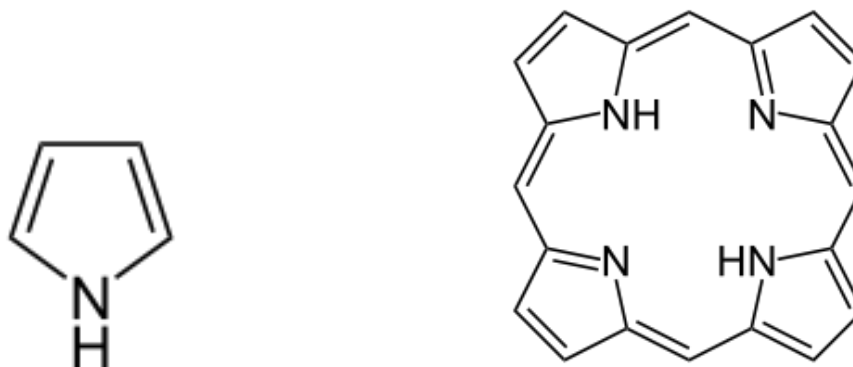
### 1.1 Fotosyntetická barviva

Fotosyntetická barviva mají ve fotosyntetickém ústrojí tři funkce. První funkcí je samotná fotochemická přeměna v reakčních centrech. Druhou funkcí je zachycení fotonů a přenos excitace molekulami barviv do reakčních center. Třetí funkcí je ochrana fotosyntetického ústrojí před nežádoucími tripletními stavy chlorofylu, které vedou k produkci singletního kyslíku, nebo před nadměrnou excitací při vystavení vysoké ozáření. Ochrannou funkci mají zejména karotenoidy. Všechny tyto funkce mají barviva vázaná k molekulám bílkovin, které tvoří světlosběrné antény či reakční centra. Tyto pigmentproteiny obsahují (bakterio)chlorofyly, fykobiliny a karotenoidy. Z tohoto důvodu rozdělujeme antény na (bakterio)chlorofylové a fykobilinové. Fykobilinové antény se od ostatních typů liší mimo jiné kovalentní vazbou pigmentů na protein. Ve výjimečných případech může světlosběrnou funkci tvořit anténa tvořená pouze pigmenty, bez proteinové složky. Základní stavební jednotkou (bakterio)chlorofylů a fykobilinů je tetrapyrrol (Šetlík et al., 1998; Pavlová, 2006).

### 1.2 Tetrapyroly

**Pyrol** je pětičlenný N-heterocyklický kruh, který snadno podléhá oxidaci vzdušným kyslíkem, čímž vznikají radikály, ze kterých pak dále vznikají polypyroly. V přírodě se sloučeniny s tímto kruhem vyskytují například právě v pigmentech, které obsahují tetrapyrrol a jsou to například chlorofyly, bakteriochlorofyly, hemy, bilirubiny a fykobiliny.

**Tetrapyroly (porfyriny)** jsou velmi rozšířená přírodní barviva odvozená od porfinu. Porfín je makrocycklus čtyř pyrolů spojený můstky jednoho uhlíku. Z porfinového kruhu jsou poté odvozeny hemy. Chlorofyly a bakteriochlorofyly jsou odvozeny z chlorinu (dihydroporfin) a bakteriochlorinu (tetrahydroporfin).

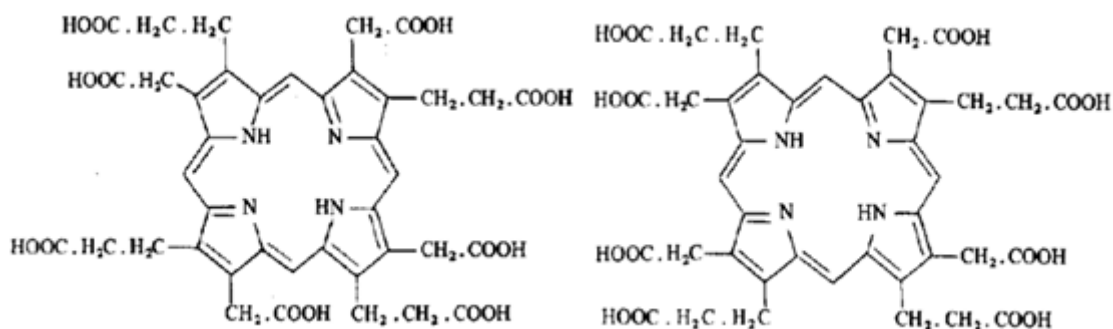


**Obr. 1.1:** Vlevo Pyrol, vpravo Porfin

Zdroj obr.: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Pyrrrol#/media/File:Pyrrrol2.svg>

Zdroj obr.: <https://cs.wikipedia.org/wiki/Porfin#/media/File:Porphin.svg>

Tetrapyrrol s uzavřeným kruhem vzniká při biosyntéze porfinů, jejichž každý pyrrolový kruh má dva substituenty, zbytek kyseliny octové a zbytek kyseliny propionové. Naprostá většina těchto tetrapyrrolů má uspořádání substituentů označené typem III (Uroporfyrin III) a jen velmi zřídka se vyskytuje typ I (Uroporfyrin I)



**Obr. 1.2:** Vlevo Uroporfyrin I, vpravo Uroporfyrin III

Zdroj obr.: (Šetlík et al.,1998)

Tetrapyrrolový kruh je planární a obsahuje soustavu silně konjugovaných vazeb, čímž dochází k delokalizaci elektronů v celém kruhu a tím pádem i k aromatickému charakteru tetrapyrrolu. Důsledkem snadné excitace elektronů pak mají tyto látky velmi silné absorpční pásy mezi 360 až 700 nm přičemž charakteristický je tzv. Soretův pás který se nachází v modré oblasti spektra mezi 350 až 450 nm, za který může rozložení čtyř pyrrolových dusíků. (Šetlík et al.,1998)

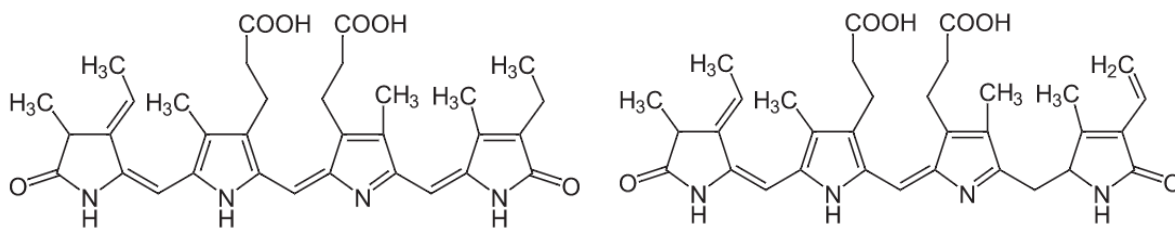


### 1.3 Chlorofyly a Bakteriochlorofyly

Chlorofyly jsou zelené pigmenty, které se v přírodě vyskytují v rostlinách, sinicích a řasách. V buňkách je najdeme v thylakoidních membránách, které jsou umístěny v organelách – chloroplastech. Chlorofyly *a*, *b* a *d* jsou tvořeny forbinem, což je chlorin s dalším isocyklickým kruhem. Chlorofyl *c* má základní tetrapyrrolový kruh. Podobný chlorinový základ mají bakteriochlorofyly *c*, *d* a *e*. Bakteriochlorofyly *a* a *b* jsou tvořeny bakterioforbinem, odvozeným od bakteriochlorinu. Chlorofyly a bakteriochlorofyly se dále liší v substituentech navázaných na polycyklické jádro. Chlorofyl *a* je jako jediný nezbytný pro přeměnu energie ve fotosyntéze, ostatní chlorofyly energii pouze absorbují a předávají ji na chlorofyl *a*. To samé platí i pro bakteriochlorofyl *a*. Bakteriochlorofyly tvoří základ fotosyntézy anoxygenních bakterií, všechny fotosyntetické organismy vyvíjející kyslík používají chlorofyly. (Procházka, 1998; Scheer, 2003)

### 1.4 Fykobiliny

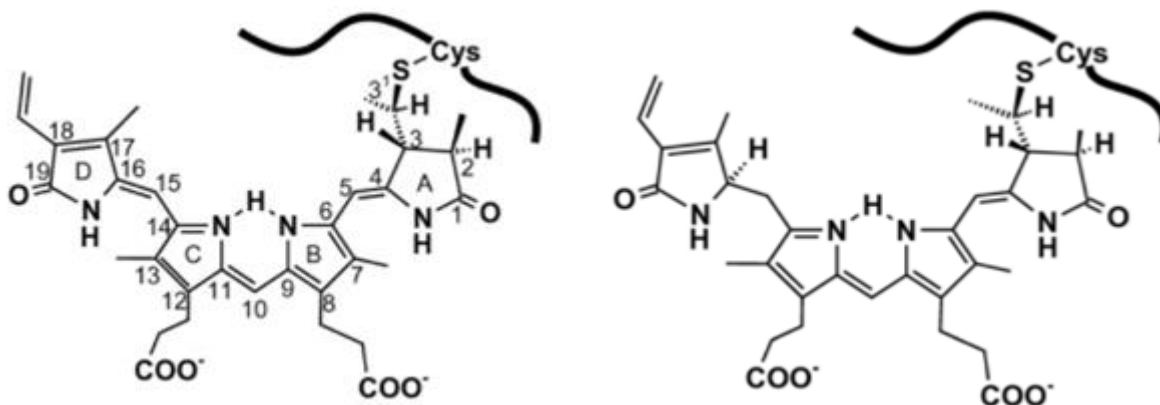
Fykobiliny jsou lineární (otevřené) tetrapyroly, které jsou vázány na proteiny a tvoří tak fykobiliproteiny. Fykobiliproteiny jsou hydrofilní polypeptidy a v buňce jsou umístěny na povrchu thylakoidů. U ruduch a sinic vytvářejí fykobiliproteiny složité anténní útvary, které se nazývají fykobilizomy. Tak, jako vznikají u živočichů biliny rozkladem hemu, které jsou pak známy jako žlučová barviva (bilirubiny), vznikají fykobiliny u sinic a řas oxidačním otevřením porfyrinového kruhu. Uhlíkové můstky mezi jednotlivými pyrrolovými jádry mohou mít obě vazby jednoduché a nebo jednu jednoduchou a jednu dvojnou. Podle počtu nenasycených můstků je označujeme jako bilany, bileny, bilidieny a bilitrieny. Bilan je například urobilinogen, ten má všechny uhlíkové můstky nasycené. Bilen s jedním nenasycením můstkem je např. fykourobilin. Bilidien se dvěma nenasycenými můstky je např. fykoerythobilin a bilitrien se všemi třemi nenasycenými můstky je např. fykocyanobilin (Šetlík et al., 1998).



**Obr. 1.3:** Vlevo Fykocyanobilin, vpravo Fykoerythrobilin

Zdroj obr.: <https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/5/5f/Phycocyanobilin2.svg>

Fykobiliny jsou k proteinu vázány kovalentní thioéterovou vazbou mezi prvním uhlíkem vinylového substituentu na A pyrolovém kruhu fykobilinu a cysteinovým zbytkem na proteinu. Tímto způsobem jsou vázány na protein všechny fykobiliny. Některé fykoerythrobiliny a fykourobiliny mají ještě druhou takovou vazbu na kruhu D (Šetlík et al., 1998; Scheer, 2003).



**Obr. 1.4:** Vazba fykobilinů na protein, vlevo fykocyanobilin, vpravo fykoerythrobilin

Zdroj obr.: (Zhao et al., 2007)

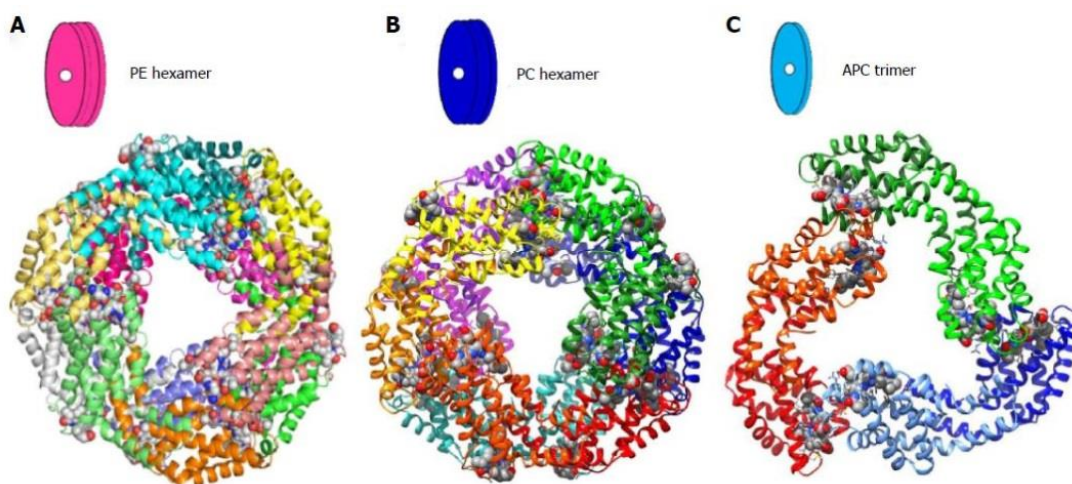
Fykobiliproteiny mají také velice rozmanitá absorpční spektra, lišící se polohou absorpčních maxim. Fykoerytrin má absorpční maximum mezi 545 a 565 nm a allofykocyanin mezi 650 a 680 nm. Mezi těmito dvěma extrémami mají absorpční maxima ostatní fykobiliny. Tato rozmanitost absorpčních spekter je dána především vzájemným působením fykobilinů s molekulou proteinu a ne rozdíly ve struktuře samotných tetrapyrrolů (Scheer, 2003).

Fykobiliny sice nazýváme lineální tetrapyroly a i tak kreslíme jejich strukturu, avšak jejich molekula má tvar přeštipnutého prstence což je přirozené uspořádání tetrapyrrolových molekul. Ve fykobiliproteinech jsou molekuly fykobilinů různě natahovány buď kovalentní

vazbou na obou koncích tetrapyrolu a nebo molekulovými interakcemi ke zbytku molekuly proteinu. Takové deformace mění jejich absorpční vlastnosti (Šetlík et al.,1998).

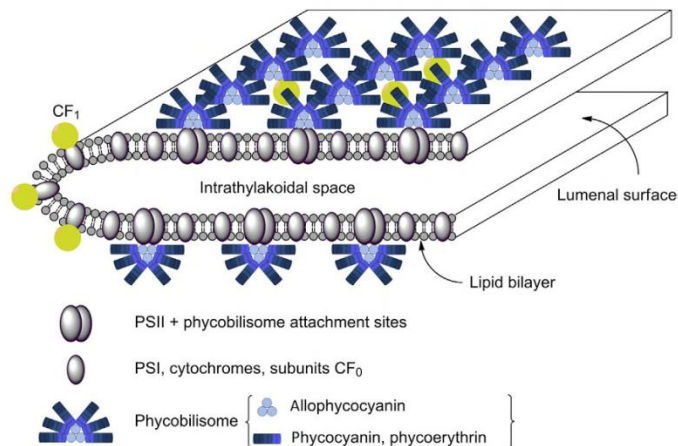
## 1.5 Fykobilizomy

Fykobilizomy jsou složité světlosběrné antény, které se nachází na povrchu thylakoidních membrán u sinic a ruduch. Tyto antény jsou tvořeny kulovitým jádrem, které je z allofykocyaninů (trimery) a tyčemi které jsou z fykocyanobilinů a fykoerytrobinů (hexamery). Tyto trimery a hexamery mají formu jakýchsi terčů s otvorem uprostřed. Přenos excitace jde od fykoerytrinů přes fykocyaniny až k allofykocianinům. To znamená od pigmentů s maximem absorpce při kratší vlnové délce až po pigmenty s maximem absorpce při delší vlnové délce. Toto uspořádání pomáhá usměřňovat tok energie směrem k reakčním centrům (Scheer, 2003)



**Obr. 1.5:** Fykobiliproteiny – stavební jednotky fykobilizomů

Zdroj obr.: (Sonani et al., 2016)

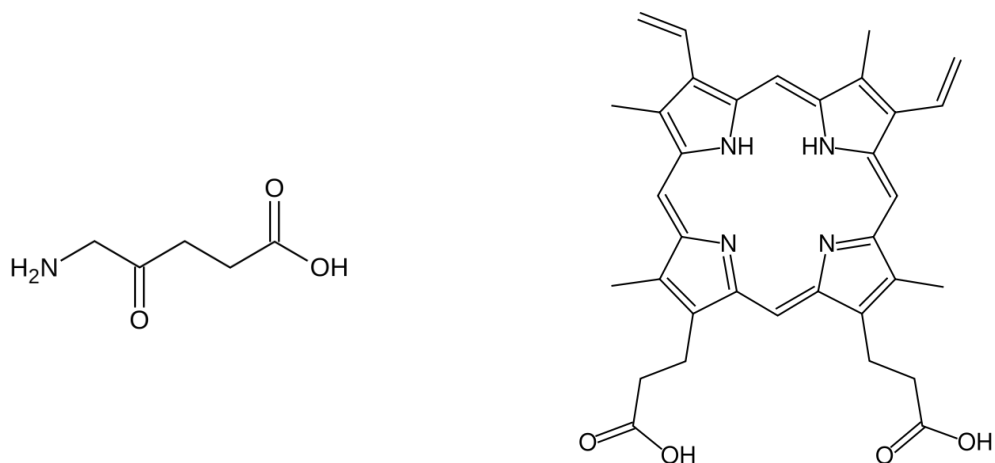


**Obr.: 1.6:** Schéma fykobilizomů na thylakoidní membráně

Zdroj obr.: (Dumay et al., 2014)

## 1.6 Biosyntéza fykobilinů

Biosyntéza fykobilinů je stejná jako biosyntéza všech ostatních tetrapyrólů až po protoporfyrin IX. Prvním krokem celé syntézy je kondenzace dvou molekul kyseliny  $\delta$ -aminolevulové, ze které vznikne molekula porfobiligenu. Kyselina  $\delta$ -aminolevulová vzniká ve fotosyntetizujících organismech transaminací a redukcí z glutamátu. U některých fotosyntetizujících bakterií a v rostlinách může vznikat ze sukcinyl-koenzymu A a glycinu. Následnou kondenzací čtyř porfobilinogenů vzniká molekula uroporfyrinogenu III. Z uroporfyrinogenu III pak následnými úpravami postranních řetězců vzniká koproporfyrinogen III a z něj poté protoporfyrinogen IX, který se mění na protoporfyrin IX s kruhem konjugovaných jader. Naváže-li se do protopofyrinu IX  $\text{Fe}^{2+}$  vznikne základ hemu (protohem). Pokud se do protoporfyrinu IX navaže  $\text{Mg}^{2+}$  vznikne magnesium protoporfyrin IX a ten je základem chlorofylů. Hem oxygenáza z protohemu odstraní atom železa a následně otevře porfyrinový kruh, čímž vznikne biliverdin. Z biliverdinu se biliverdin reduktázou stane dihydrobiliverdin a reduktázou dihydrobiliverdinu vzniká fykoerytrobilin. Fykocyanobilin vzniká fykocyanobilin izomerázou (Cornejo a Beale, 1997; Terry, 2002).



**Obr. 1.7:** Vlevo kyselina  $\delta$ -aminolevulová, vpravo protoporphyrin IX

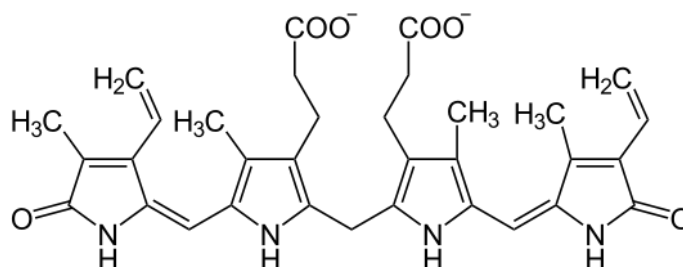
Zdroj obr. : [https://www.wikiskripta.eu/w/Kyselina\\_5-](https://www.wikiskripta.eu/w/Kyselina_5-aminolevulov%C3%A1#/media/File:Aminolevulinic_acid.svg)

aminolevulov%**C3%A1**#/media/File:Aminolevulinic\_acid.svg

Zdroj obr.: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e2/Protoporphyrin\\_IX.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/e/e2/Protoporphyrin_IX.svg)

## 1.7 Bilirubiny

Bilirubiny jsou pigmenty tvořené podobně jako fykobiliny otevřeným tetrapyrolelem. Jejich roztoky mají žlutou až žlutooranžovou barvu. Jsou odpadním produktem všech placentálních živočichů. Vznikají z hemoglobinu v játrech. Zde je z hemoglobinu uvolněn hem a následně z hemu oxidačním otevřením porfyrinového kruhu hemoxygenázou vzniká biliverdin, z kterého pak biliverdinreduktázou vznikají bilirubiny.



**Obr. 1.8:** Bilirubin (izomer IX $\alpha$ )

Zdroj obr.: <https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Bilirubin.svg>

## 1.8 Samoorganizující agregáty

Samoorganizující agregáty jsou složeny pouze z pigmentů, to znamená, že nejde o typické pigment-proteinové antény. Takovéto agregáty tvoří bakteriochlorofyly *c*, *d* a také *e*, které jsou složeny z porfyriu jakožto polární části agregátu a nepolárního alifatického řetězce. Schopnost agregace je u těchto bakteriochlorofylů dána hořčíkem uvnitř tetrapyrolového kruhu a dále také unikátní polohou některých substituentů na tetrapyrolovém kruhu. Je to OH skupina na uhlíku 3 a ketoskupiny na uhlíku 13 (Smith, 1983). Tyto agregáty tvoří světlosběrné struktury v buňkách některých fotosyntetických bakterií, kde může být v jednom agregátu až 100 000 molekul bakteriochlorofylu (Pšenčík et al., 2004). Bakteriochlorofyly mohou tvořit agregáty i mimo buňku, to znamená, že se dají využít při výrobě umělých světlosběrných antén (Furumaki et al., 2014). Podle polaritě prostředí se bakteriochlorofyly vyskytují v roztoku jako monomery, dimery a nebo agregáty. To ovlivňuje i přítomnost nepolárních látek jako jsou například karotenoidy. V nepolárním prostředí se tvoří agregáty (Zupcanova, 2013). Agregáty bakteriochlorofylu *c* mají jednu oblast absorpce mezi 420 až 470 nm a druhou okolo 720 až 760 nm. Fykobiliny mají absorpční maxima mezi 550 až 650 nm a kdyby se povedlo do agregátů vpravit estery fykobilinů, zvětšil by se tak absorpční rozsah agregátů. (Zupcanova et al., 2008)

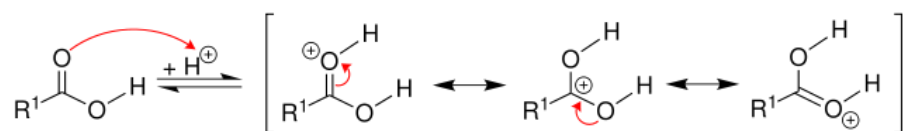
## 1.9 Esterifikace

Estery mohou vznikat mnoha způsoby, jako třeba reakcí karboxylátového aniontu s primárním alkylhalogenidem a nebo reakcí alkoholů s acylchloridy za přítomnosti pyridinu. Ovšem nejčastější a nejnámější cestou vzniku esterů je nukleofilní acylová substituce karboxylových kyselin a alkoholů. Estery jsou tedy deriváty karboxylových kyselin, u nichž je atom vodíku zaměněn za zbytek alkoholu. Oproti karboxylovým kyselinám mají z nich odvozené jednoduché étery nižší bod varu, což je způsobené změnou interakcí mezi jednotlivými molekulami. U karboxylových kyselin jsou to vodíkové můstky, které jsou nejsilnější ne vazebnou interakcí (až 40 kJ/mol) a u esterů to jsou řádově slabší interakce dipól-dipól. Jednoduché estery jsou rozpustné ve vodě, ovšem s rostoucí délkou

alifatického řetězce tuto schopnost ztrácejí. Ohledně reaktivity jsou na tom estery prakticky stejně jako ostatní funkční deriváty karboxylových kyselin. Hydrolýza esterů za přítomnosti bází je nazývána saponifikace (zmýdelnění). Tuky obsahují esterové vazby a při reakcích s hydroxidy ve vodném prostředí vznikají mýdla. Hydrolýza za přítomnosti kyseliny (kyselá katalyzovaná hydrolýza) je opakem Fischerovy esterifikace. (McMurry, 2007)

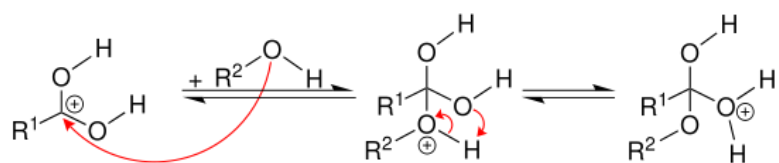
## 1.10 Fischerova Esterifikace

Vznik esterů zahříváním karboxylových kyselin v přebytku alkoholu za katalýzy silné kyseliny objevil chemik Emil Fischer v roce 1895. Jedná se o hojně používanou esterifikaci kvůli jejím dobrým výtěžkům. Tato metoda je omezena pouze na vznik methyl-, ethyl-, propyl-, a butylesterů kvůli nutnosti použití velkého přebytku alkoholu. Esterifikace za použití delších alkoholů proběhne jen s malými výtěžky nebo neprobíhá vůbec. Schéma Fisherovy esterifikace je stručně popsáno na obr. 1.9, 1.10 a 1.11.



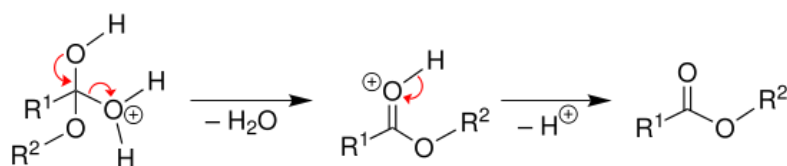
**Obr. 1.9:** První krok reakce je protonace karboxylu za vzniku mezomerně stabilního kationtu.

Zdroj obr.: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Fischer-Veresterung\\_3.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/c/c5/Fischer-Veresterung_3.svg)



**Obr. 1.10:** V druhém kroku se mezomerně stabilní kation chytne volného elektronového páru hydroxylové skupiny. Atom vodíku z alkoholu vytvoří vodíkové můstky s atomy kyslíku karboxylové skupiny, se kterými nakonec vytvoří vazbu.

Zdroj obr.: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/88/Fischer-Veresterung\\_4.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/8/88/Fischer-Veresterung_4.svg)



**Obr. 1.11:** Ve třetím kroku se odštěpí oxoniový kation jako molekula vody a nakonec deprotonizuje vzniklý ester.

Zdroj obr.: [https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f6/Fischer-Veresterung\\_5.svg](https://upload.wikimedia.org/wikipedia/commons/f/f6/Fischer-Veresterung_5.svg)

Tato reakce je nukleofilní substituce na hydroxylové skupině. Během reakce vzniká voda, která může zvrátit chod reakce, ta bývá odstraňována sušením či destilací, aby rovnováha reakce byla posunuta co nejvíce ve prospěch esteru.

Celý mechanismus reakce byl dokázán izotopovým označením kyslíku  $^{18}\text{O}$ . Voda, která na konci reakce vzniká, obsahuje atom kyslíku z karboxylové kyseliny a ne z alkoholu. Je tedy zřejmé, že v alkoholu odštěpí vodík (RO-H) a v karboxylové skupině dojde k odštěpení hydroxylového aniontu (CO-OH). (McMurry, 2007)



## 2. Cíle práce

Izolovat fykobiliproteiny ze sinice *Synechocystis*

Z fykobiliproteinů izolovat fykobiliny

Analyzovat získané fykobiliny metodami TLC nebo HPLC

Pokusit se esterifikovat izolované fykobiliny různě dlouhými alkoholy

### 3. Materiál a metody

#### 3.1 Příprava fykobilinů ze sinice *Synechocystis*

Výchozí materiál pro izolaci byly napěstované sinice *Synechocystis* PCC6803 v růstovém médiu BG-11 (Stanier et al., 1971) o objemu 4 l. Celý objem média byl zcentrifugován (7 min, 8000 g) na centrifuze Avanti J-25 (Beckman Coulter, USA), s rotorem J-10. Vzniklý pelet byl rozdělen na čtyři díly a jeden z dílů byl velmi důkladně resuspendován v 10 ml pufru pro izolaci (0,3M  $\text{KH}_2\text{PO}_4$  ; 0,2M Na-EDTA ; 1mM  $\text{NaN}_3$  ; pH = 7). Zbylé tři díly byly zmrazeny v tekutém dusíku a uskladněny při  $-81^\circ\text{C}$  až do budoucího použití. Suspenze buněk byla rozbíjena na disruptoru EmulsiFlex C5 (Avestin, Kanada) při tlaku 15000 psi po dobu 5 min a poté zcentrifugována (5 min, 6000 g) na centrifuze Sigma 3K30 (Sigma Laboratory Centrifuges, Německo) s rotorem Nr.12159 pro větší kyvety.



**Obr. 3.1:** Vlevo pelet buněk po stočení média, vpravo disruptor na rozbíjení buněk

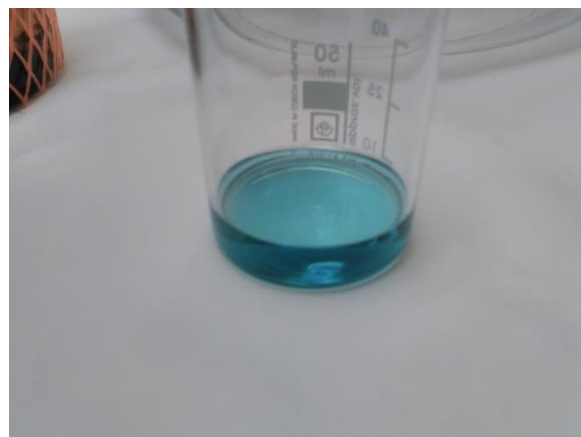
Vzniklý supernatant byl zcentrifugován (30 min, 25000 g) na centrifuze Sigma 3-30KS s rotorem Nr.12158 pro menší kyvety, které jsou odolné vysokým otáčkám. Po centrifugaci u něho bylo změřeno absorpční spektrum na UV spektrofotometru Shimadzu UV-2600 (detaily viz níže). Supernatant po této centrifugaci byl smíchan s acetonem v poměru aceton : supernatant (10 : 1) za vzniku modré sraženiny. Aceton byl v čistotě p.a.

Směs supernatantu a acetonu byla důkladně promíchána a následně zcentrifugována (5 min, 6000 g), po centrifugaci bylo opět změřeno absorpční spektrum. Vzniklá sraženina byla v temnu vysušena, poté ve zkumavce zcela rozpuštěna koncentrovanou HCl v čistotě p.a. a umístěna do vodní lázně nastavené na topné plotýnce na 100°C.



**Obr. 3.2:** Vlevo sraženina, vpravo průběh kyselý hydrolyzy

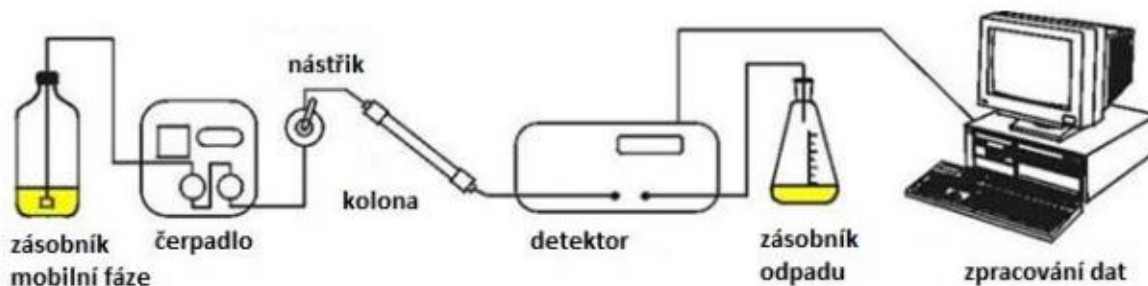
Zhruba po 90 minutách došlo k barevné změně roztoku z tmavě modré do tmavě fialové. Po zahřívání byl hydrolyzát převeden do destilované vody, aby takto naředěný roztok měl objem 50 ml. Následně byl roztok zcentrifugován (Sigma 3-30KS, 10 min, 25000 g). Supernatant byl po centrifugaci 3× vytřepán do chloroformu v dělicí nálevce v objemovém poměru supernatant : chloroform (10 : 1). Chloroform byl v čistotě p.a. Po vytřepání byla fáze s chloroformem, v níž byly fykobiliny, převedena do zkumavky a vysušena proudem dusíku. Vysušené pigmenty pak byly rozpuštěny v mobilních fázích podle použití. Dobře se rozpouštějí například v metanolu, ve směsi acetonitril : voda (60 : 40), anebo v chloroformu.



**Obr. 3.3:** Vlevo vytřepávání do chloroformu, vpravo fykobiliny v chloroformu.

## 3.2 HPLC

HPLC ( High-Performance Liquid Chromatography), vysoce účinná kapalinová chromatografie, je analytická separační metoda založená na principu dělení mezi dvěma fázemi. Mezi kapalnou (mobilní) fází a mezi pevnou (stacionární) fází. Mobilní fáze unáší vzorek do kolony, kde přijde do styku se stacionární fází a v ideálním případě se na ni zachytí a na začátku kolony se vytvoří zóna všech složek daného vzorku. V tuto chvíli začíná dělení mezi dvěma fázemi. Vzorek kolonou pomalu prochází a postupně se začne dělit na jednotlivé frakce podle interakcí frakcí vzorku s materiálem kolony a rozpouštědlem. Kolonu poté opouští každá frakce v jinou dobu. Čas, v kterém látka kolonu opouští, se nazývá eluční čas. Jednotlivé frakce jsou následně zaznamenávány detektorem. Na detektor jsou kladeny celkem specifické požadavky, měl by mít co nejmenší vnitřní objem (pro eliminaci rozmytí elučních křivek), jeho signál by měl být pokud možno co nejstabilnější a reprodukovatelný. Měl by mít lineární závislost na koncentraci vzorku v co možná největším rozsahu, jeho citlivost by měla být větší než mez detekce a měl by mít co nejmenší šum. Používají se tyto druhy detektorů: spektrofotometrické, fluorimetrické, refraktometrické a také elektrochemické. Dále se využívá detekce hmotnostní spektrometrií (Drbal a Křížek 1999).



**Obr. 3.4:** Schéma HPLC

Zdroj obr. : (Kamišová, 2013)

V této práci byla využita spektrofotometrická detekce, která je rovněž nejpoužívanější pro HPLC analýzu z důvodu jednoduchosti, spolehlivosti a také kvůli schopnosti detekce velkého počtu látek. Mnohokanálový diodový detektor Waters 2707 zaznamenává chromatogram (absorbce při jedné vlnové délce) a zároveň i absorpční spektrum detekované látky. Systém HPLC byl použit Waters 600, kolona SunFire C8: 4,6

mm × 250 mm, 5 μm, která využívá principu reverzní fáze pro dělení polárních látek. Kolona je vhodná pro používání v nižším pH (2-8). Sorbentem je silikagel a na něho jsou navázány oktylové alifatické řetězce. Velikost nástřiku byla 100 μl, průtok 1 ml.min<sup>-1</sup>. Software pro komunikaci PC s HPLC byl použit Millennium 31 (Waters, USA). Zaznamenané chromatogramy byly exportovány při vlnové délce 580 nm a dále zpracovány v tabulkovém procesoru Excel. Použitá metoda byla isokratická eluce za použití mobilní fáze acetonitril : voda (60 : 40) (Bermejo et al., 1997). Acetonitril (J.T.Backer, USA) i voda (VWR Chemicals, USA) byly v HPLC čistotě.

### 3.3 Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

TLC (Thin Layer Chromatography), tenkovrstvá chromatografie, je separační metoda založená podobně jako HPLC na principu dělení mezi dvěma fázemi. Mezi kapalnou (mobilní) fází a mezi pevnou stacionární fází. Vzorek je zde nanášen přímo na stacionární fázi (hliníková destička se silikagelovým povrchem), kterou se pak nechá vzlínat mobilní fáze, čímž dojde k rozdělení vzorku na frakce. Jednotlivé frakce se pak mohou z destičky vyškrábat, a převést do kapalné fáze k další analýze.

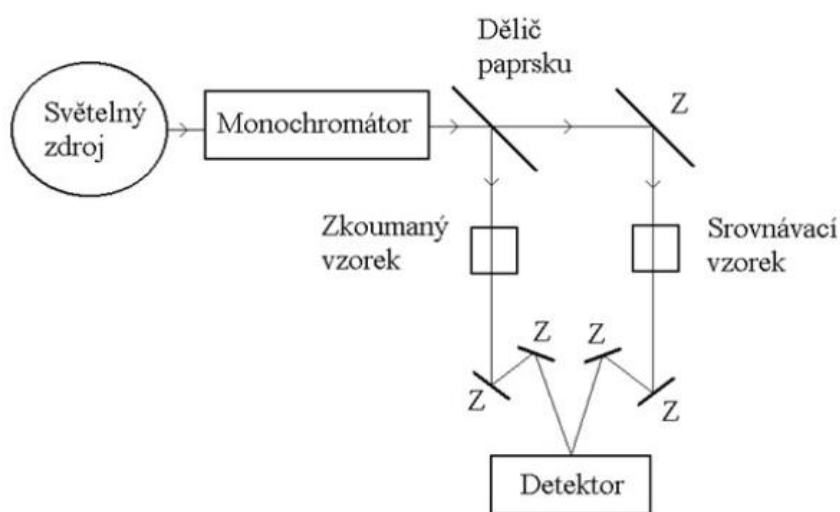
Destičky byly použity hliníkové se silikagelovou stacionární fází (Sigma-Aldrich) o rozměru 5 × 10 cm. Jako nejvhodnější mobilní fáze byla po mnoha předchozích pokusech zvolena směs chloroform : metanol : hexan, v poměru (17 : 4 : 1) Ta je modifikací metody vyhledané v literatuře pro dělení látek podobné povahy (Glick, 1974). Všechna tato rozpouštědla byla v čistotě p.a. Při použití jiných mobilních fází docházelo k neuspokojivému dělení.

Na TLC destičku bylo nanášeno 20 μl vzorku, který byl připraven rozpuštěním suchého izolátu v 1 ml metanolu. Do úzké 400 ml kádinky byla připravena mobilní fáze o objemu 22 ml a do ní vložena destička s nanášeným vzorkem. Zhruba po dvaceti minutách byl vzorek rozdělen. Jednotlivé frakce byly z destičky vyškrabány a ze silikagelu převedeny do metanolu a byly na nich měřena absorpční spektra na UV-VIS spektrometru.

### 3.4 UV-VIS absorpční spektrometrie

UV-VIS spektrometrie - je elektromagnetická spektroskopická metoda analytické chemie založená na průchodu světla vzorkem a následném měření intenzity světla podle Lambert-Beerova zákona. Je-li znám molární absorpční koeficient, jsme schopni snadno vypočítat koncentraci látky v roztoku. Při proměření celého spektra pak dostaneme absorpční spektrum vzorku. Na základě tohoto spektra jsme schopni odhadnout, jaké máme látky ve vzorku nebo jaký je poměr mezi jednotlivými složkami (Drbal a Křížek 1999).

Pro tuto práci byl použit UV-VIS spektrofotometr Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Japonsko). Spektra byla měřena v rozsahu 350 – 800 nm v kroku 1 nm se spektrální šířkou štěrbin 2 nm. Kapalné vzorky byly měřeny ve vhodných skleněných kyvetách pro měření vzorků s nižším objemem.



**Obr. 3.5:** Schéma dvoupráskového absorpčního spektrofotometru

### 3.5 Fischerova esterifikace

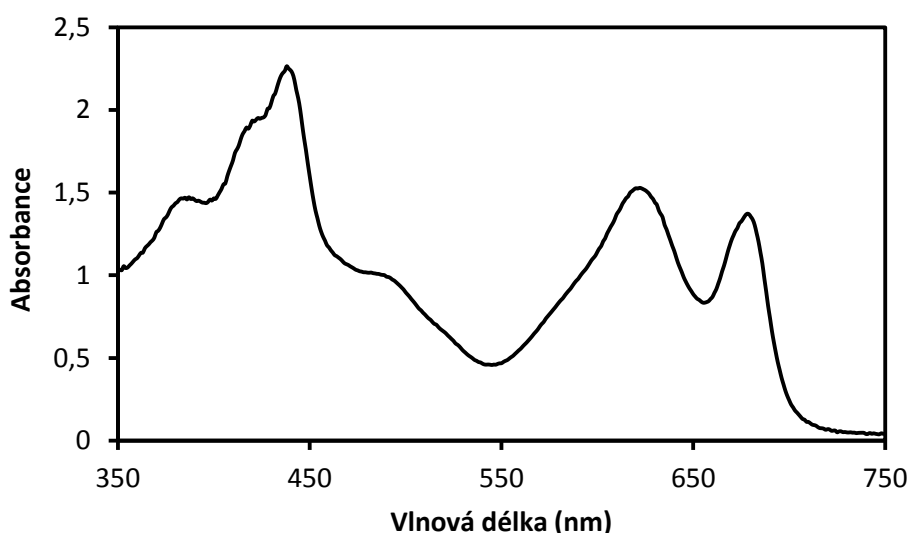
Fischerova esterifikace byla zvolena kvůli dobrým výtěžkům a také kvůli tomu, že je celkem dobře a nenáročně proveditelná. Vzorek pigmentu, který byl původně vytřepán v dělicí nálevce z reakční směsi do chloroformu a následně vysušen dusíkem, byl rozpuštěn v 500  $\mu\text{l}$  butan-1-olu v čistotě p.a. (Sigma-Aldrich). 500  $\mu\text{l}$  roztoku bylo rozděleno po 250  $\mu\text{l}$  do dvou mikrozkušavek. První se ponechala bez změny v temnu pro další analýzu a bylo změřeno absorpční spektrum roztoku na spektrofotometru Shimadzu. Do druhé mikrozkušavky bylo přidáno 5  $\mu\text{l}$  kyseliny sírové, p.a. a byla ponechána v temnu po dobu tří hodin. Takto byly připraveny estery fykobilinů. Po uplynutí tří hodin bylo změřeno absorpční spektrum směsi na spektrofotometru Shimadzu a do obou zkumavek bylo přidáno 500  $\mu\text{l}$  diethyletheru a 500  $\mu\text{l}$  redestilované vody. Směs byla promíchána a následně stočena na stolní centrifuze Eppendorf MiniSpin (1 min, 14 RPM). Organická fáze obsahující v první mikrozkušavce fykobiliny a v druhé estery fykobilinů byla opatrně odpipetována a oba dva roztoky byly vysušeny dusíkem. Následovala analýza TLC. Vysušené vzorky byly rozpuštěny ve 100  $\mu\text{l}$  metanolu a pak nanášeny na destičku.



## 4. Výsledky

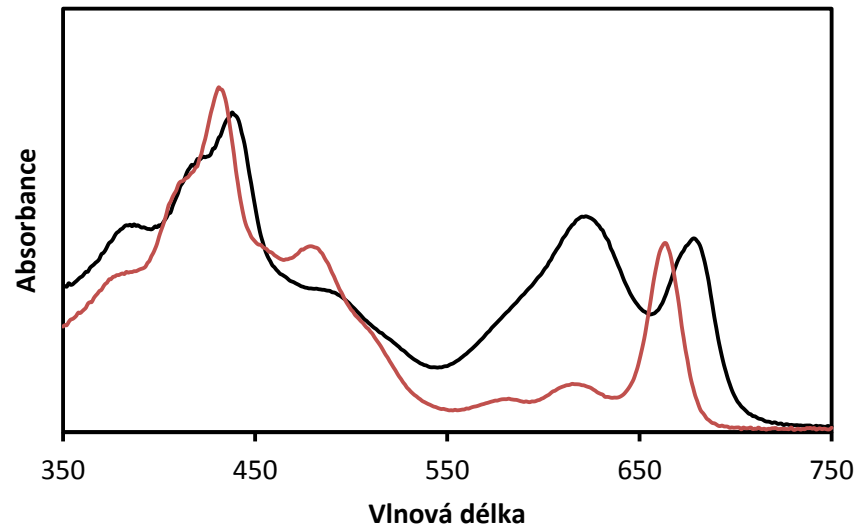
### 4.1 Izolace fykobilinů

Během izolace bylo nutné postupně hlídat produkty jednotlivých kroků. Prvním zkoumaným meziproduktem byl supernatant po disrupci buněk a jejich následném zcentrifugování. Byl to sytě zelený roztok s modrým nádechem. Absorpční spektrum supernatantu je v obr. 4.1. Spektrum bylo měřeno ve vodném prostředí pufru použitého během disrupce. Ve spektru jsou vidět charakteristické absorpční pásy chlorofylu u 440 a 680 nm, karotenoidů kolem 480 nm a fykobiliproteinů v oblasti 570-650 nm.



**Obr. 4.1:** Absorpční spektrum supernatantu po disrupci (před srážení acetonem)

V dalším kroku jsme sráželi rozpustné proteiny acetonem pro získání vstupního materiálu pro extrakci fykobilinů. U supernatantu po srážení acetonem bylo také změřeno absorpční spektrum jako negativní zkouška, viz obr. 4.2. Ze srovnání absorpčních spekter supernatantu po disrupci a acetonu po srážení je zjevné, co se ze supernatantu po srážení vyloučilo. Spektrum bylo měřeno v prostředí acetonu a vody (10 : 1). Prostředí je tudíž jiné než u křivky při měření prvního supernatantu. Z toho plynou mírné rozdíly mezi oběma křivkami, zejména posuny absorpčních maxim chlorofylu, který je acetonem vymyt z proteinů. Vyloučení fykobiliproteinů z roztoku je zde naprosto zjevné.

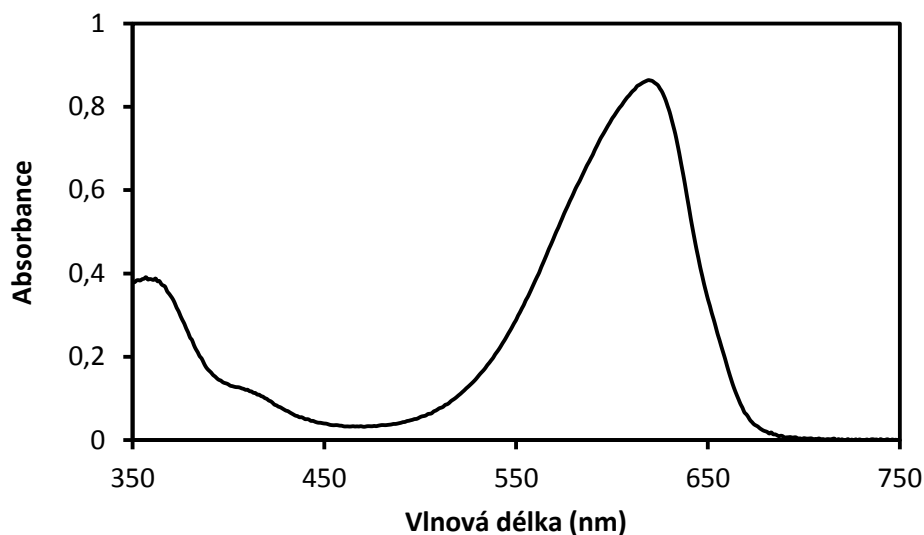


**Obr. 4.2:** Černá křivka zobrazuje stejné spektrum jako v předchozím grafu, červená křivka zobrazuje absorpční spektrum supernatantu po srážení proteinů acetonem. Křivka je normalizována v oblasti mezi 660 a 670 nm.

Modrá sraženina (obr. 4.3) složená ze směsi mnoha proteinů a obsahující i fykobiliproteiny byla rozpuštěna ve vodě a její absorpční spektrum je na obr. 4.4. Je zjevné, že absorpční spektrum sraženiny je doplňkem k spektru supernatantu z obr. 2 a jeho tvar odpovídá obvyklé absorpci fykobiliproteinů (O'Carra et al., 1980).

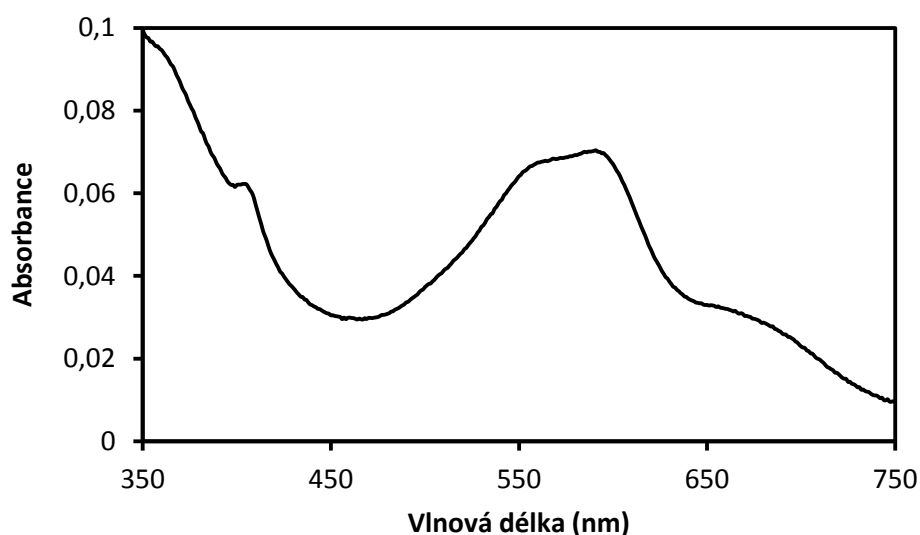


**Obr. 4.3 :** Modrá sraženina získaná po srážení acetonem.

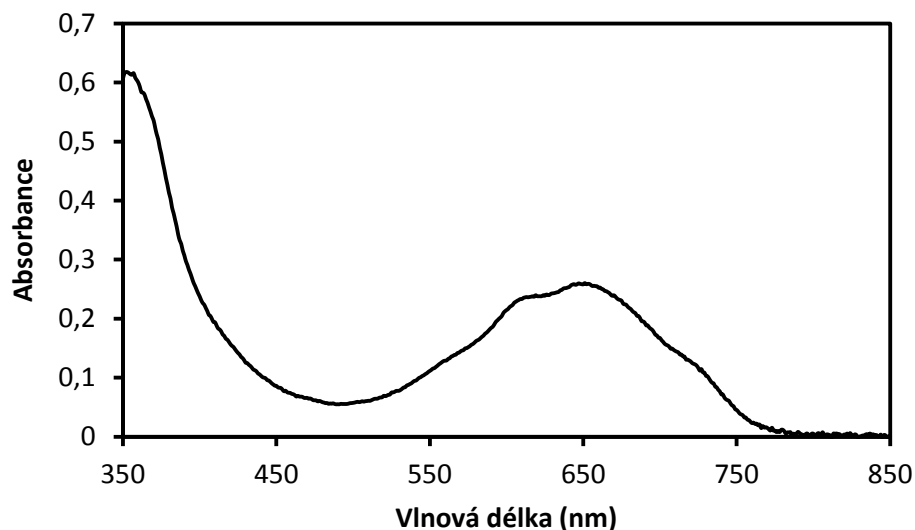


**Obr. 4.4:** Absorpční spektrum sraženiny obsahující fykobiliproteiny

Dalším krokem izolace fykobilinů byla kyselá hydrolýza, abychom uvolnili pigment z kovalentní vazby na protein. Absorpční spektrum naředěného hydrolyzátu v poměru hydrolyzát : voda (1 : 4) je na obr. 4.5. U spektra je zjevný posun absorpčního maxima o 30 nm do modré oblasti a zjevný rozklad původně relativně homogenního pásu v obr. 4.4 do nejméně tří pásů s maximy cca 560, 590 a 680 nm. To bylo zapříčiněno odštěpením fykobilinů z fykobiliproteinů a ukazuje to heterogenitu vzorku pigmentů.

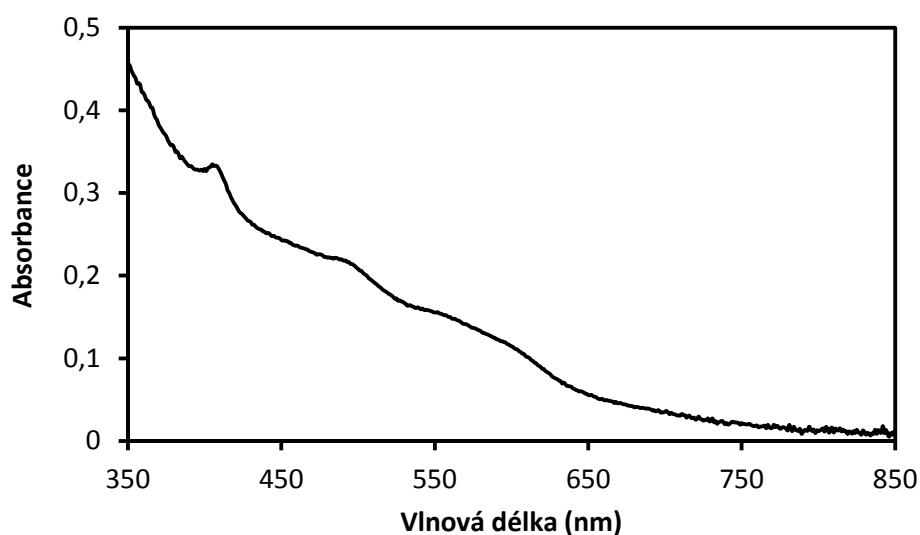


**Obr. 4.5:** Absorpční spektrum hydrolyzátu



**Obr. 4.6:** Absorbance fykobilinů po vytřepání do chloroformu

Uvolněný pigment jsme z hydrolyzační směsi získali vytřepáním do chloroformu (obr. 4.6). Jeho absorpční spektrum ukazuje rozdíly oproti spektru v obr. 4.5, což je dáno z větší části rozdílnými vlastnostmi pigmentů v jiném rozpouštědle. Stále jsou vidět nejméně tři maxima v červené oblasti spektra.



**Obr. 4.7:** Absorpční spektrum vodné fáze po vytřepání fykobilinů do chloroformu.

Jako negativní zkouška bylo změřeno i absorpční spektrum vodné fáze po vytřepání fykobilinů do chloroformu (obr. 4.7). Spektrum je dominováno rozptylem, který roste v modré a UV oblasti. Přesto je zřejmé, že vodná fáze neobsahovala větší množství fykobilinů.

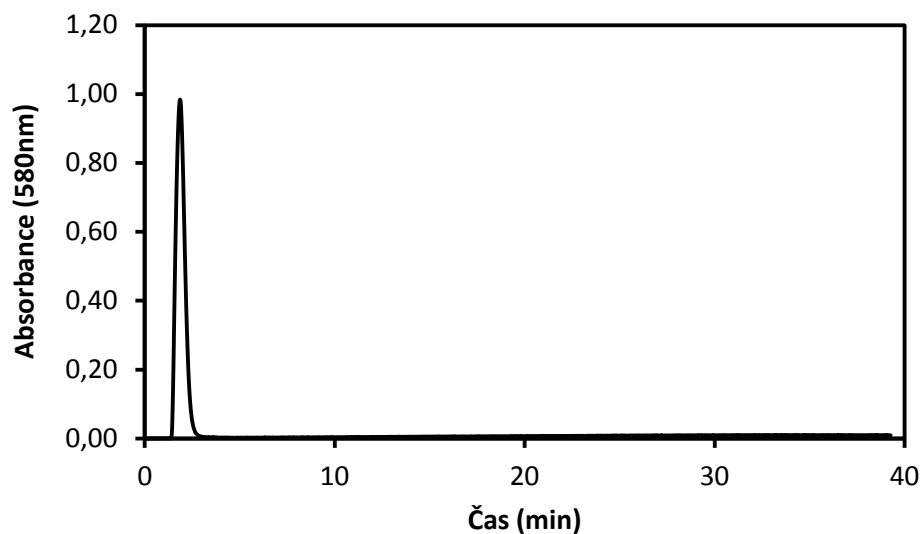


**Obr. 4.8:** Dělicí nálevka po vytřepávání

Výtěžek izolace byl přepočítán z absorpce pomocí Lambert-Beerova zákona. Molární absorpční koeficient pro fykocyanobilin je  $17000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$  při 663 nm a  $M_r=586 \text{ g/mol}$  (Glazer a Fang, 1973; Glazer a Hixson, 1975; Scheer, 2003). Směsný vzorek neumožňuje přesnou kvantifikaci, ale lze alespoň odhadnout množství např. použitím hodnot pro fykocyanobilin. Získali jsme 1 ml vzorku s  $A(663\text{nm})=0,25$ . Po přepočtení byl výtěžek fykocyanobilinu cca 8,6  $\mu\text{g}$ . Vstupní surovina (pelet buněk po stočení z média) vážila 1,35 g.

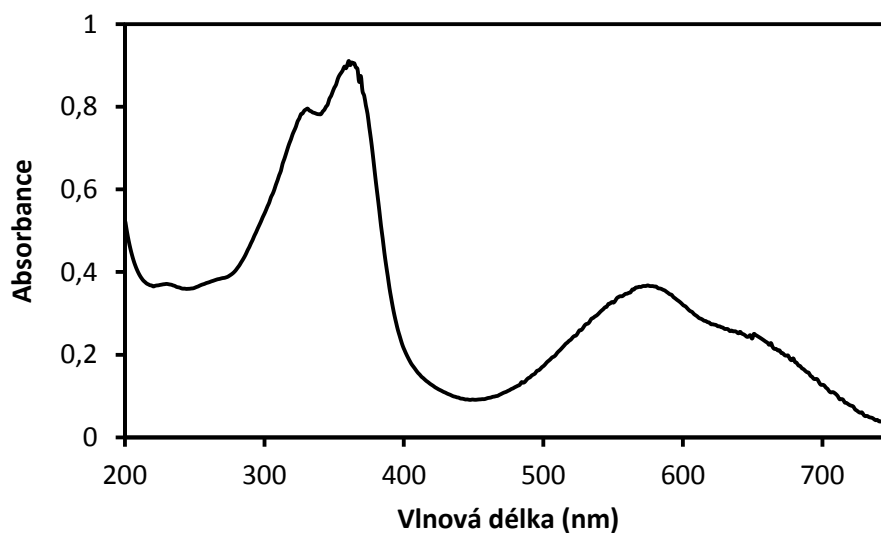
Pro další práci je vhodné, aby zdrojový materiál obsahoval pokud možno jen jeden druh fykobilinů. Vzhledem k použitým buňkám jsem očekával, že v extraktu jsou nejméně dva druhy pigmentů – fykocyanobilin a fykoerytrobilin. Pokusil jsem se tedy extrakt přečistit a jednotlivé pigmenty oddělit. První volbou pro separaci pigmentů byla HPLC.

## 4.2 HPLC



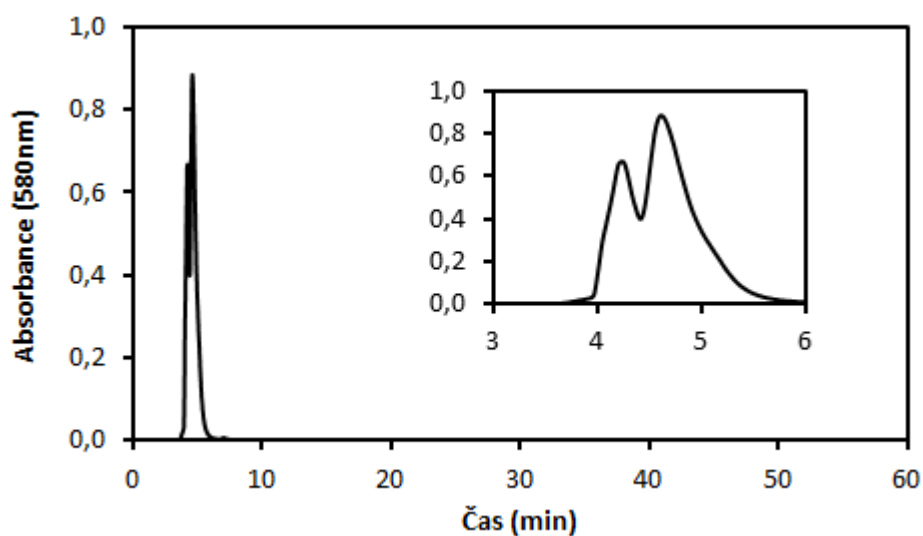
**Obr. 4.9:** Izokratická eluce směsí acetonitril : voda (60 : 40) na normální fázi. Osa y normalizována  $\times 2,5$ .

Protože jsou fykobiliny poměrně polární, naším prvním testem byla izokratická eluce směsí acetonitril : voda (60 : 40) na koloně s normální fází (Obr. 4.9). Vzorek pigmentů nebyl zdržen na koloně a vytekl v čele chromatogramu. Absorpční spektrum odečtené v HPLC při 1,9 min po nástřiku odpovídá spektru nerozdělené směsi pigmentů (Obr. 4.10).

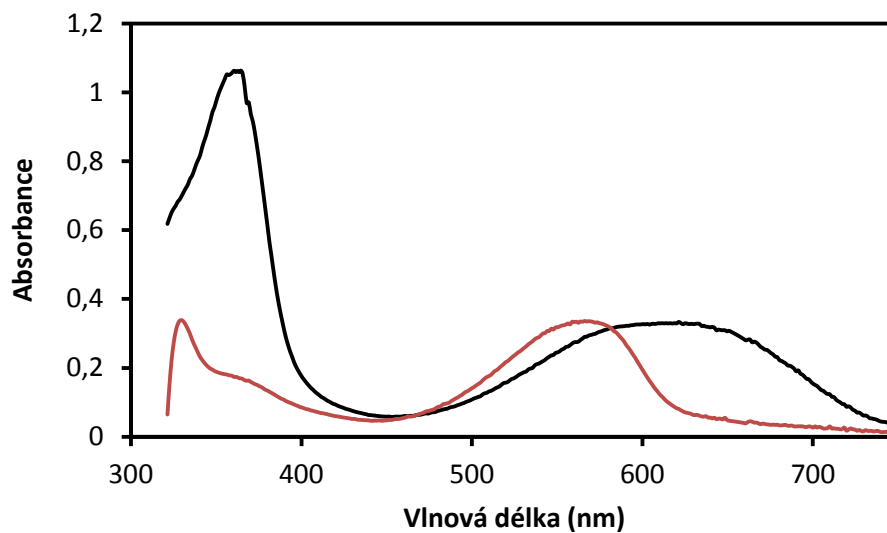


**Obr. 4.10:** Absorpční spektrum z HPLC chromatogramu, acetonitril : voda (60 : 40) na normální fázi (1,9 min)

Protože nedošlo k zadržení směsi pigmentů na koloně s normální fází, v druhém kroku jsme použili reverzní fází se stejnou mobilní fází. Zde došlo k jistému rozdělení směsi na dvě složky (píky), ale rozdělení nebylo dokonalé a obě frakce se objevily prakticky v čele (Obr. 3.11). Získaná absorpční spektra (Obr. 3.12) ale naznačují, že se nám alespoň částečně podařilo pigmenty oddělit. Lepší dělení by vyžadovalo další práci na HPLC metodě, na což nebyl prostor a nakonec jsme dali přednost dělení metodou TLC, na které jsme pracovali paralelně.



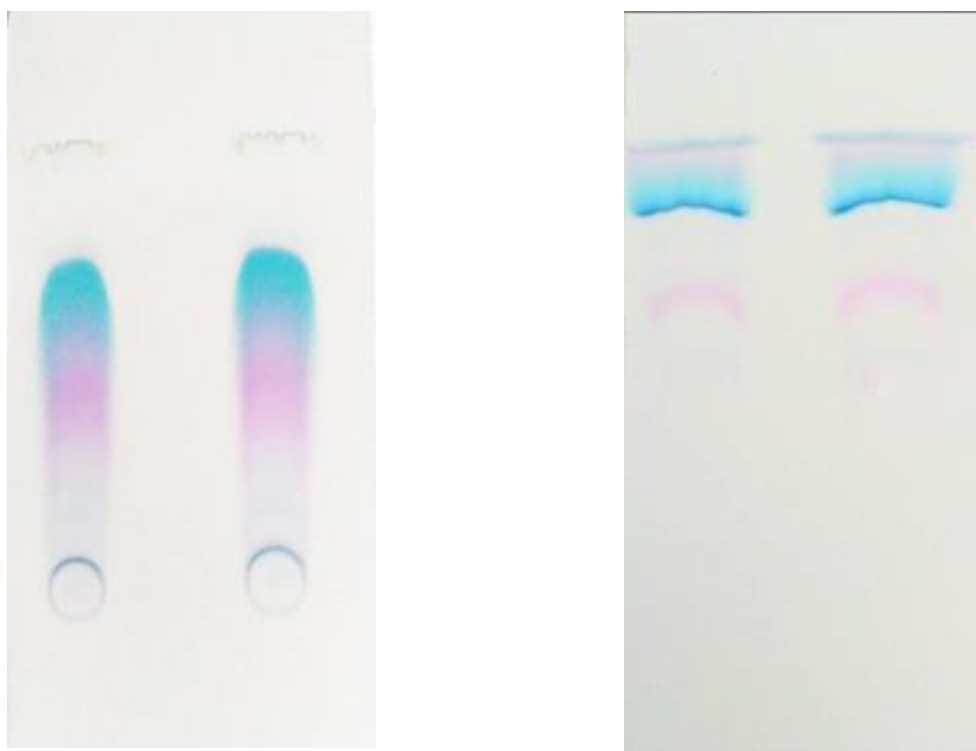
**Obr. 4.11:** Izokratická eluce směsi acetonitril : voda (60 : 40) na reverzní fází. Osa y normalizována  $\times 2,5$ . Vložený chromatogram je přiblížení píku na počátku chromatogramu.



**Obr. 4.12:** Absorpční spektra acetonitril : voda (60 : 40) na reverzní fázi. Červená křivka (4,2 min), normalizovaná 1,25× na oblast 570 a 620 nm. Černá křivka (4,7 min).

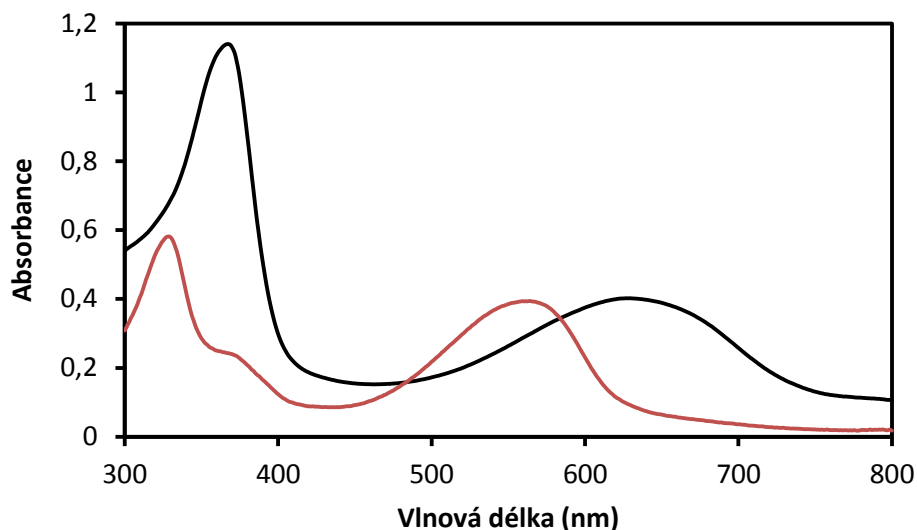


### 4.3 TLC



**Obr. 4.13:** TLC, vlevo mobilní fáze chloroform : metanol : hexan (17 : 4 : 1), vpravo mobilní fáze acetonitril : voda (60 : 40).

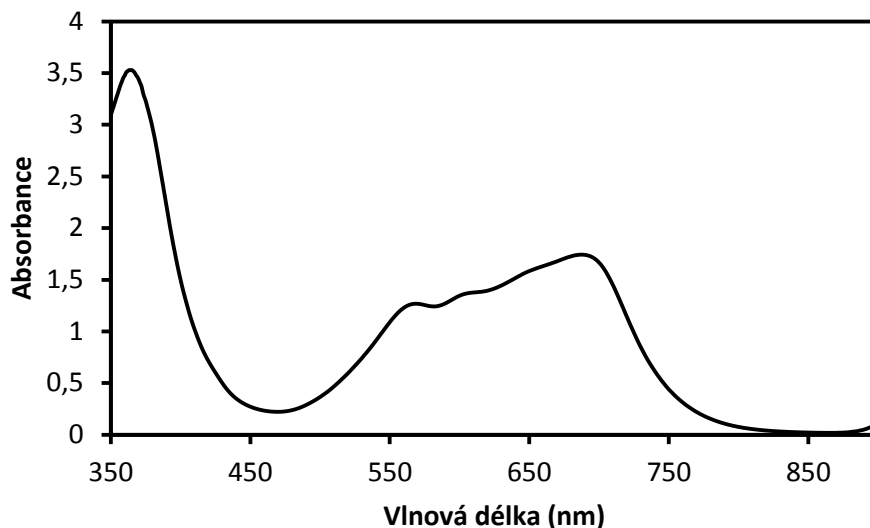
TLC byla provedena nanesením vzorku na destičku se silikagelem a umístěním destičky do kádinky s mobilní fází chloroform : metanol : hexan (17 : 4 : 1), která byla používána kvůli jejím stabilním výsledkům. Mobilní fáze acetonitril : voda (60 : 40) vykazuje na obr. 4.13 lepší dělení, ovšem metoda použita nebyla, protože téměř pokaždé vypadal výsledek jinak. V mnohých případech nedošlo k dělení vůbec. Na obr. 4.13 je vidět, že vzorek pigmentů obsahoval nejméně dvě barevné složky – modrou a fialovou. Srovnání TLC provedené s acetonitrem a s chloroformem pak naznačuje možnost přítomnosti více frakcí s podobnou či stejnou barvou. Mohlo by se jednat o pigmenty s různě dlouhými zbytky proteinu. Po vyškrabání jednotlivých zón z destičky a následném převedení pigmentů do metanolu byla změřena absorpční spektra obou hlavních frakcí (Obr. 4.14), která lze identifikovat jako fykoerytrobilin (fialová složka) a fykocyanobilin (modrá složka).



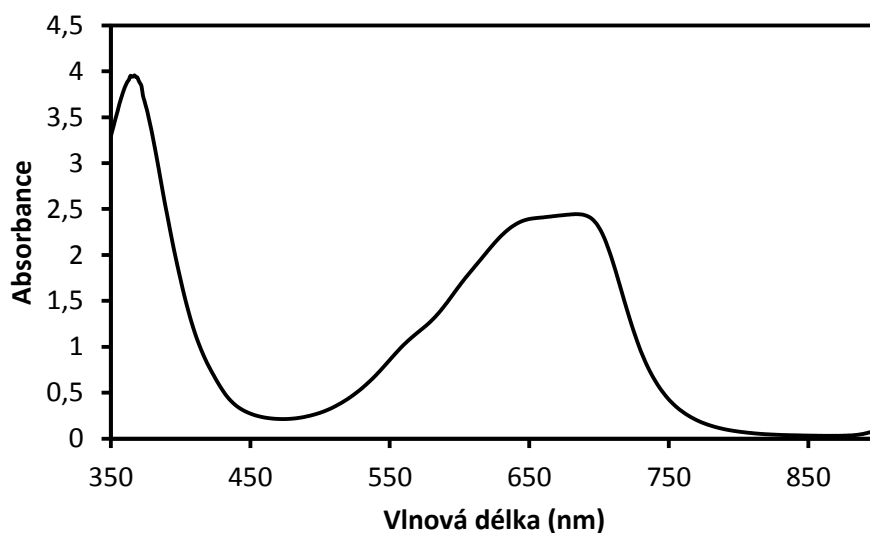
**Obr. 4.14:** Černá křivka je absorpční spektrum modré zóny a červená křivka je absorpční křivka růžové zóny, normalizovaná  $2,75\times$  na oblast 570 a 630 nm.

#### 4.4 Esterifikace

Před esterifikací byl vzorek rozpuštěn v butan-1-olu a rozdělen na dva díly. U prvního dílu bylo změřeno absorpční spektrum (obr. 4.15). Do druhého dílu byla přidána kyselina sírová a byl esterifikován po dobu 3 hodin. Po uplynutí 3 hodin bylo u vzorku změřeno absorpční spektrum (obr. 4.16). Zde je zjevné, že vzorek měl po reakci užší pás absorpce a zároveň došlo ke zvýšení absorpčního maxima. Spektra nenaznačují významnou destrukci pigmentů, která by se projevila snížením absorpce ve viditelné oblasti.



**Obr. 4.15:** Fykobiliny rozpuštěné v butanolu před esterifikací.

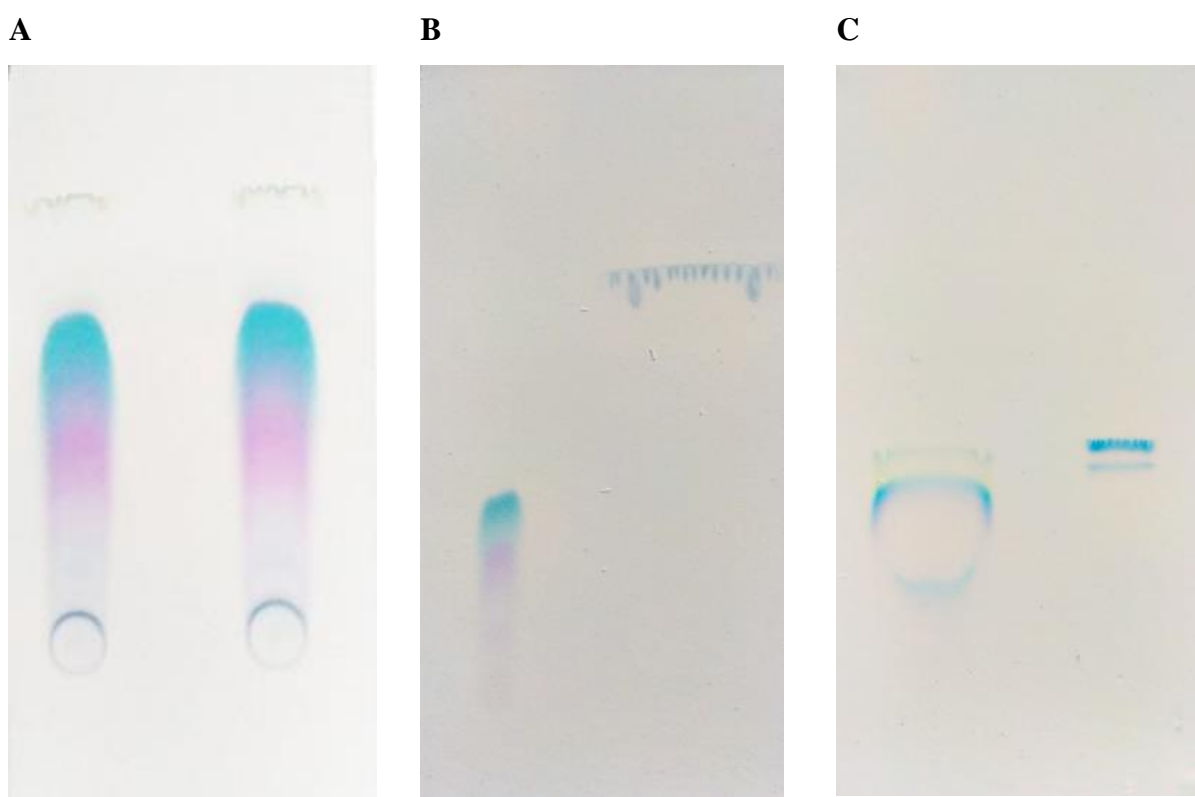


**Obr. 4.16:** Fykobiliny v butanolu po esterifikaci.

#### 4.5 TLC po esterifikaci

Následně bylo nutné analyzovat výsledek reakce. Výše je zmíněno absorpční spektrum, u kterého byla patrná jistá změna. Obr. 4.17 B ukazuje dělení fykobilinů a špatné dělení fykobilinů po esterifikaci. V tomto případě byla destička ponechána v mobilní fázi 15 min, jak tomu bylo i v předchozím případě viz (obr. 4.17) A. Zde je zřejmé, že u fykobilinů

docházelo opakovaně ke stejnému dělení. Fykobiliny po esterifikaci byly unášeny mobilní fází rychleji než samotné fykobiliny, proto bylo nutné pokus opakovat a destičku ponechat v mobilní fázi kratší dobu (6 min) viz obr. 4.17 C. Dělení fykobilinů zde neproběhlo, jak kvůli krátké době v mobilní fázi, tak proto, že byl vzorek zřejmě chybně nanesen a byl velmi zředěn. Na rozdíl od kontrolního vzorku proběhlo dělení fykobilinů po esterifikaci velmi dobře (obr. 4.17 C). Na chromatogramu vznikly dvě zóny, které byly odděleny zcela. Pigmentové frakce po esterifikaci mají v naší TLC metodě vyšší mobilitu než frakce z kontrolního vzorku. Předběžně můžeme odhadovat, že se esterifikace alespoň částečně zdařila.



**Obr. 4.17: A:** Kontrolní dělení fykobilinů – převzato pro srovnání z obr. 3.13. Mobilní fáze chloroform : metanol : hexan (17 : 4 : 1). 15 min v mobilní fázi.

**B:** Vlevo dělení fykobilinů, vpravo vzorek po esterifikaci. Mobilní fáze chloroform : metanol : hexan (17 : 4 : 1). 15 min v mobilní fázi.

**C:** Vlevo dělení fykobilinů, vpravo vzorek po esterifikaci. Mobilní fáze chloroform : metanol : hexan (17 : 4 : 1). 6 min v mobilní fázi.

## 5. Diskuze

Metoda izolace fykobilinů použitá v této práci byla založená na principu kyselé hydrolyzy proteinů (O'Carra et al., 1964). Tato metoda ovšem není jediná možná. Jednou z dalších metod je metoda zahřívání na 60°C v metanolu po dobu 30 min s přidavkem 1% kyseliny askorbové (Fujita a Hattori, 1962 a 1963). Metoda byla v minulosti dále upravována na zahřívání v metanolu na 60°C pod zpětným chladičem po dobu 8 hodin (O'Carra a Oh eOcha, 1966, Roda-Serrat et al., 2018) při čemž měla vysoké výtěžky, ale během extrakce docházelo k modifikacím fykobilinů a tvorbě derivátů (O'Carra et al., 1980). To také bylo jedním z důvodů, proč nebyla tato extrakce použita v této práci. Dalším důvodem bylo potenciální nebezpečí během zahřívání metanolu na 60°C pod zpětným chladičem po dobu osmi hodin či déle. Nedávno byla popsána moderní metoda s přípravou v metanolu při vyšším tlaku a s ohřevem mikrovlnami (Roda-Serrat et al., 2018), kterou jsme v této práci nemohli vyzkoušet.

Výtěžek fykobilinů byl po přepočítání přes molární absorpční koeficienty (Glazer a Fang, 1973; Glazer a Hixson, 1975; Scheer, 2003) a zprůměrování více měření stanoven na přibližně 6 µg fykobilinů z 1g buněčného peletu po stočení z média. Více fykobilinů by se dalo vyrobit z většího množství napěstovaných řas. Metodu totiž lze snadno adaptovat na přípravu většího množství materiálu. Tato metoda izolace z napěstovaných buněk je poměrně ekonomická, když vezmeme v potaz, že volné fykobiliny se koupit nedají a např. fykoerytrin (protein s navázanými pigmenty v , které by se musely dál izolovat) stojí cca 5000 Kč za 1 mg (ceník Sigma-Aldrich, duben 2018)

Velkou nevýhodou mého postupu izolace fykobilinů je, že výsledkem je směs pigmentů, které je potřeba dále čistit TLC nebo HPLC. Zde se nabízí nejméně dvě alternativy. Zaprvé je možné začít postup z již purifikovaného proteinu - fykoerythrinu nebo fykocyaninu. Zde je nevýhodou vyšší cena, pokud budeme proteiny nakupovat (viz výše) nebo delší práce a nižší výtěžek, pokud je budeme sami připravovat z napěstovaných buněk nějakou purifikační metodou (Boussiba a Richmond, 1979). Jinou cestou může být příprava pigmentů z kmenů nebo mutantů sinic, kteří jsou schopni syntetizovat jen jeden druh pigmentu. Tato poslední cesta se zdá být nejvhodnější, pokud je laboratoř schopna buněčný materiál získat.

Ačkoliv v sekci výsledků popisujeme jen dva typy pigmentu (modrý a fialový), jak je vidět z výsledků analýzy metodou TLC, vzorek zřejmě obsahoval více typů pigmentů, které

měly podobnou či stejnou barvu. Identitu těchto menších frakcí v tuto chvíli neznáme. Je možné, že jde o pigmenty s nedokonale odštěpenou proteinovou složkou. V tom případě by na pigmentu zůstala jedna nebo více aminokyselin z původní proteinové složky komplexu. Další variantou je, že jde o nějak modifikované pigmenty, vzniklé při purifikační proceduře. Jako v metanolové izolaci vznikají estery fykobilinů, tak i v kyselé hydrolýze mohou vznikat addukty HCl a fykobilinu (Beuhler et al., 1976). Lze předpokládat, že dokonalejší purifikační kroky, ať už TLC nebo HPLC, by byly schopny tyto kontaminace odstranit. Pro některé aplikace by dokonce tyto kontaminace nemusely vadit, pokud mají stejná absorpční spektra jako hlavní složka.

Pokusy o separaci volných fykobilinů pomocí HPLC pro nás byly zklamáním. Je známo, že fykobiliny jsou díky své chemické struktuře velmi flexibilní molekuly. Důsledkem je mimo jiné malý výtěžek fluorescence volného pigmentu (Scheer, 2003). HPLC je značně komplikovaná metoda a pokud standardní metoda nefunguje, je pro její optimalizaci nutné zkoušet množství kolon v kombinaci s různými mobilními fázemi. Je možné, že ke slabému zadržení na koloně docházelo kvůli nevhodné volbě kolony nebo mobilní fáze. V literatuře se však uvádí že HPLC separace fykobilinů nevychází s použitím stejné kolony i mobilních fází pokaždé stejně. Někdy i mezi jednotlivými nástřiky v téže laboratoři a ve stejný den. Metody jsou velmi náchylné na změny teploty. Proto je nutné kolonu temperovat. Je potřeba použití drahých vnitřních standardů, neboť retenční časy se stále mění (Terry et al., 2002). První HPLC metodou, která byla aplikována, byla standardní metoda pro dělení chlorofylů a karotenoidů běžně používaná v naší laboratoři (Litvín et al., 2016). Další použitou metodou byla isokratická metoda se směsí acetonitril : voda (60 : 40) (Bermejo et al., 1997). Při použití této mobilní fáze na reverzní fázi docházelo k dělení (obr. 4.11), metoda by však potřebovala další úpravy.

Zvolená Fischerova metoda esterifikace byla vybrána kvůli jejím udávaným vysokým výtěžkům a snadné proveditelnosti (McMurry, 2007). Překvapením byla významná změna chromatogramu TLC (Obr. 3.18: B). Ten totiž nasvědčuje tomu, že reakce měla velmi dobrý průběh a že skutečně měla vysoký výtěžek. Naše původní očekávání bylo, že v TLC zůstanou původní reaktanty a k nim se objeví menší množství produktů. Jeden z našich prvních pokusů dokonce skončil úplnou degradací původních bilinů na neznámé oranžové produkty. Reakce jako taková se podařila zdárně provést až ke konci experimentální práce a proto nebylo možné dále v práci pokračovat. Zdá se však, že bude možným nastíněným postupem pro úpravy získat fykobiliny esterifikované alespoň kratšími alkoholy.

## 6. Závěr

Během této práce byly ze sinice *Synechocystis* PCC6803 získány fykobiliproteiny metodou srážení metanolem. Z izolovaných fykobiliproteinů byly následně úspěšně izolovány fykobilyny metodou kyselá hydrolyzy. Získané pigmenty jsou směsí fykobilylinů a bylo tedy nutné směs rozdělit.

Pigmenty byly nejprve rozdělovány metodou HPLC (vysoce účinná kapalinová chromatografie), ovšem s neuspokojivými výsledky. Po optimalizaci složení mobilní fáze bylo možné pigmenty rozdělit metodou TLC. Hlavními složkami směsi byly fykocyanobilylin a fykoerytrobylin.

Na úplný závěr praktické části této práce byla vyzkoušena metoda Fischerovy esterifikace. Směs fykobilylinů byla esterifikována butan-1-olem, rozdělena na TLC a porovnána s výchozí směsí pigmentů. Na chromatogramu bylo zjevné, že se mobilita pigmentů po reakci změnila a je tedy pravděpodobné, že se podařilo pigmenty esterifikovat.

## 7. Zdroje a literatura

Bermejo R., Talavera E. M., Alvarez-Pez J. M., Orte J. C., (1997) Chromatographic purification of biliproteins from *Spirulina plantesis* High-performance liquid chromatographic separation of their  $\alpha$  and  $\beta$  subunits. J. Chromatogr. A 778:441–450.

Beuhler R. J., Pierce R. C., Friedman L., Siegelman H. W., (1976) Cleavage of phycocyanobilin from C-Phycocyanin. Separation and mass spectral identification of the products. J. Biol. Chem. 251:2405-2411.

Boussiba S., Richmond A. E., (1979) Isolation and characterization of phycocyanins from the bluegreen alga spirulina platensis. Arch. Microbiol. 120:155-159.

Cornejo J., Beale S. I., (1997) Phycobilin biosynthetic reactions in extracts of cyanobacteria. Photosynth. Res. 51:223–230.

Drbal K., Křížek M., Analytická chemie. Jihočeská univerzita, Zemědělská fakulta, České Budějovice, 1999.

Dumay J., Morançais M., Munier M., Le Guillard C., Fleurence J., (2014) Phycoerythrins: valuable proteinic pigments in red seaweeds. Adv. Bot. Res. 71:322–343.

Fujita Y., Hattori A., (1963) Occurrence of a purple bile pigment in phycoerythrin-rich cells of the blue-green alga, *Tolypothrix tenuis*. J. Gen. Appl. Microbiol. 9:253-256.

Fujita Y., Hattori A., (1962) Preliminary note on a new phycobilin pigment isolated from blue-green algae. J. Biochem. 51:89-91.

Furumaki S., Vácha F., Hirata S., Vácha M., (2014) Bacteriochlorophyll aggregates self-assembled on functionalized gold nanorod cores as mimics of photosynthetic chlorosomal antennae: a single molecule study. ACS Nano. 8 (3):2176-82.



Glazer A. N., Fang S., (1973) Chromophore content of blue-green algal phycobiliproteins J. Biol. Chem. 248:659-662.

Glazer A. N., Hixson C. S., (1975) Characterization of R-phycoyanin. Chromophore content of R-phycoyanin and C-phycoerythrin. J. Biol. Chem. 250: 5487-5495

Heirwegh K. P. M., Fevery J., Meuwissen J. A. T. P., De Groote J., Compennolle F., Desmet V., Recent advances in the separation and analysis of diazo-positive bile pigments, kapitola v Glick D. (ed.), Methods of biochemical analysis, Stanford reserch institute California, 2006.

Kamišová T., (2013) Vývoj nové metody pro stanovení bilirubinu a jeho esterů, (Development of new method for the determination of bilirubin and its esters. Bc. Thesis, in Czech) – 22 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Litvín R., Bína D., Herbstová M., Gardian Z., (2016) Architecture of the light-harvesting apparatus of the eustigmatophyte alga *Nannochloropsis oceanica*. Photosynth. Res., 130:137-150.

McMurry J., Organická chemie. VUTIUM, Brno, 2007.

O'Carra P., Ó'Heocha C., Carroll D. M., (1964) Spectral properties of the phycobilins. II. Phycoerythrobilin. Biochemistry 3:1343-1350.

O'Carra P., O'hEocha C., (1966) Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. Phytochemistry 5:993-997.

O'Carra P., Murphy R. F., Killilea S. D., (1980) The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification. Biochem. J. 187:303-309.

Pavlová L., Fyziologie rostlin. Karolinum, Praha, 2006.

Procházka S., Fyziologie rostlin. Academia, Praha, 1998.

Pšenčík J., Ikonen T. P., Laurinmaki P., Merckel M. C., Butcher S. J., Serimaa R. E., Tůma R., (2004) Lamellar organization of pigments in chlorosomes, the light harvesting system of green bacteria. *Biophys. J.* 87:1165-1172.

Roda-Serrat M. C., Christensen K. V., El-Houri R. B., Fretté X., Christensen L. P., (2017) Fast cleavage of phycocyanobilin from phycocyanin for use in food colouring. *Food. Chem.* 240 (1):655-661.

Smith K. M., Kehres L. A., Fajer J., (1983) Aggregation of the bacteriochlorophylls *c*, *d*, and *e*. Models for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria. *J. Am. Chem. Soc.* 105:1387–1389.

Sonani R. R., Rastogi R. P., Patel R. and Madamwar D., (2016) Recent advances in production, purification and applications of phycobiliproteins. *World. J. Biol. Chem.* 7:100–109.

Stanier R. Y., Kunisawa R., Mandel M., Cohen-Bazire G., (1971) Purification and properties of unicellular blue-green algae *Order Chroococcales*. *Bacteriol. Rev.* 35:171-205.

Šetlík I., Seidlová F., Šantrůček J., *Fyziologie rostlin*. Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice, 1998.

Terry M. J., Biosynthesis and analysis of bilins, kapitola v Smith A. G., Witty M., (Eds.), *Heme, Chlorophyll, and Bilins, Methods and Protocols*. Humana Press Totowa, New Jersey, 2002.

Zhao K., Su P., Tu J., Wang X., Liu H., Plösch M., Eichacker L., Yang B., Zhou M., Scheer H., (2007) Phycobilin: cystein-84 biliprotein lyase, a near-universal lyase for cysteine-84-binding sites in cyanobacterial phycobiliproteins. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 104:14300-14305.

Zupcanova A., Arellano J. B., Bina D., Kopecky J., Psencik J., Vacha F., (2008) The length of esterifying alcohol affects the aggregation properties of chlorosomal bacteriochlorophylls. *Photochem. Photobiol.* 84 (5):1187-1194.

Zupcanova A., (2013) Samoagregácia bakteriochlorofylových molekúl, (Selfaggregation of bacteriochlorophyll molecules. Ph.D Thesis, in Slovak) – 113p., Série dizertačných prác, No. 8, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

## 8. Příloha

### IZOLACE FYKOBILINŮ

1. Napěstované sinice - 4 l v médiu BG-11 (Stanier et al., 1971) stočíme (7 min, 8000 g), vzniklý pelet rozdělíme na 4 díly, jeden díl použijeme pro izolaci, další tři dáme zamrazit na  $-81^{\circ}\text{C}$ .
2. Pelet resuspendujeme v 10 ml pufru ( $0,3\text{M KH}_2\text{PO}_4$  ;  $0,2\text{M EDTA Na}$  ;  $1\text{mM NaN}_3$  ;  $\text{pH}=7$ ) a důkladně homogenizujeme.
3. Hustou suspenzi rozbíjíme v disruptoru EmulsiFlex C5 (Avestin, Kanada), (5 min 15000 psi), poté stočíme na centrifuze (5 min, 6000 g). Supernatant uchováme v temnu.
4. Pelet resuspendujeme v pufru a opět rozbíjíme v disruptoru 5 minut, poté opět stočíme na centrifuze (5 min, 6000 g).
5. Oba dva vzniklé supernatanty smícháme a stočíme na centrifuze (30 min, 25000 g).
6. Supernatant smícháme s acetonem v poměru (supernatant : aceton, 1:10), dvě minuty vzniklou směs mícháme, poté stočíme na centrifuze (5 min, 6000 g). Vzniká modrá sraženina, kterou vysušíme a necháme v temnu vyschnout.
7. Suchou modrou sraženinu rozpustíme v kádince přikapáváním 10 ml koncentrované  $\text{HCl}$  (**od teď je nutné pracovat v digestoři!**), dokud se sraženina nerozpustí. Kádinku je dobré obalit alobalem kvůli zabránění přístupu světla.
8. Do kádinky s touto směsí umístíme míchadélko a kádinku dáme na topnou plotýnku s magnetickou míchačkou. Na plotýnce nastavíme  $100^{\circ}\text{C}$  a za stálého míchání směs zahříváme. Postupně je nutné kontrolovat barvu.

9. Dojde-li ke **změně barvy z tmavě modré na tmavě fialovou (zhruba za 60 až 90 min)**, ohřívání ukončíme a roztok nalijeme do destilované vody v objemovém poměru (hydrolyzát : voda, 1 : 4). Roztok stočíme na centrifuze (10 min 25000 g). Se vzniklým peletem můžeme celý proces hydrolýzy opakovat kvůli zvýšení výtěžku.
10. Supernatant vytřepeme v dělicí nálevce 3×do chloroformu v objemovém poměru (supernatant : chloroform, 10:1).
11. Ze získaného roztoku ve tmě vysušíme dusíkem chloroform. Vysušené pigmenty můžeme rozpustit v rozpouštědle vhodném pro další práci. Pigmenty se dobře rozpouští např. v metanolu, v butanolu nebo ve směsi chloroform : metanol : hexan (17 : 4 : 1)