

**Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta**

Chemické modifikace bilinových barviv

Bakalářská práce

Hana Vomáčková

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

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

České Budějovice 2022

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.

Anotace:

Tato práce se zabývá izolací fykocyanobilinu ze sinice *Thermosynechococcus elongatus* a jeho purifikací pomocí TLC. Purifikovaný fykocyanobilin byl esterifikován metodou Fischerovy esterifikace. Metoda esterifikace byla v této práci modifikována za použití dichlormetanu jako rozpouštědla. Výsledky byly analyzovány na HPLC. Byly provedeny pilotní experimenty směřující k zabudování esterifikovaných fykobilinů do samoorganizujících agregátů bakteriochlorofylu *c*.

Annotation:

This thesis deals with isolation of phycocyanobilin from cyanobacteria *Thermosynechococcus elongatus* and its purification with TLC. Purified phycocyanobilin was esterified using Fischer esterification method. The esterification method in this thesis was modified by using dichlormethan as solvent. The results were analysed by HPLC method. Pilot experiments dealing with insertion of esterified phycobilins into self-organized aggregates of bacteriochlorophyll *c* were carried out.

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. 2022

.....

Hana Vomáčková

Klíčová slova

Esterifikace, Fischerova esterifikace, biliny, fykocyanobilin, HPLC, TLC, agregáty bakteriochlorofylu

Key words

Esterification, Fischer esterification, bilins, phycocyanobilin, HPLC, TLC, bacteriochlorophyll aggregates

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala vedoucímu své bakalářské 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.

Dále bych chtěla poděkovat doc. RNDr. Jakubovi Pšenčíkovi, Ph.D. a Mgr. Tomáši Malinovi za pomoc a rady, a také poskytnutý materiál potřebný pro přípravu samoorganizujících agregátů.

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

OBSAH

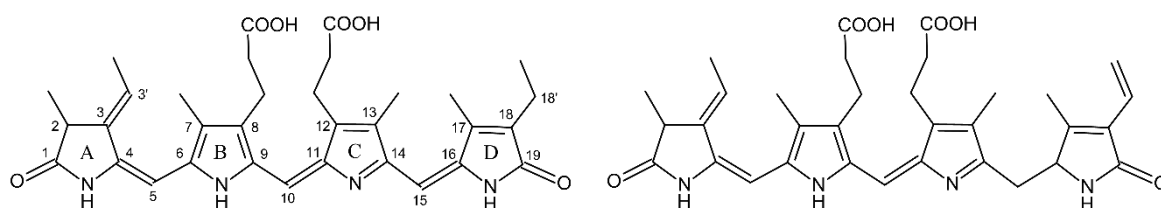
1. TEORETICKÁ ČÁST	- 1 -
1.1. Fykobiliny a fykobiliproteiny	- 1 -
1.2. Fykobilizomy.....	- 3 -
1.3. Využití fykocyaninů a fykobilinů.....	- 4 -
1.4. Samoorganizující agregáty	- 5 -
1.5. Analytické a preparativní metody	- 5 -
1.5.1. Chromatografie	- 5 -
1.5.1.1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC).....	- 6 -
1.5.1.2. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)	- 7 -
1.6. Esterifikace	- 8 -
2. CÍLE PRÁCE.....	- 12 -
3. MATERIÁL A METODY	- 13 -
3.1. Použité chemikálie a činidla.....	- 13 -
3.2. Metody.....	- 14 -
3.2.1. Izolace fykocyanobilinů	- 14 -
3.2.2. Přečištění fykobilinů (TLC)	- 15 -
3.2.3. Absorpční spektrometrie	- 15 -
3.2.4. Fischerova esterifikace.....	- 15 -
3.2.4.1. Příprava 1-butylesteru a 1-hexylesteru fykocyanobilinu	- 15 -
3.2.4.2. Příprava 1-hexylesteru a 1-dodecylesteru s DCM	- 16 -
3.2.5. HPLC analýza složení vzorků.....	- 16 -
3.2.6. Samoorganizující agregáty	- 17 -
4. VÝSLEDKY	- 18 -
4.1. Purifikace.....	- 18 -
4.2. Omývání po hydrolýze	- 21 -
4.3. Esterifikace – butylester	- 23 -
4.4. Změna metody esterifikace – hexylester a dodecylester	- 25 -
4.5. Samoorganizující agregáty	- 30 -

5.	DISKUZE.....	- 33 -
5.1.	Omytí po extrakci	- 33 -
5.2.	Přečištění fykobilinů.....	- 33 -
5.3.	Omytí po esterifikaci	- 34 -
5.4.	Modifikace esterifikace použitím DCM.....	- 35 -
5.5.	Agregáty	- 36 -
6.	ZÁVĚR	- 37 -
7.	CITOVANÁ LITERATURA.....	- 38 -
8.	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	- 46 -
9.	PŘÍLOHY	- 47 -

1. TEORETICKÁ ČÁST

1.1. Fykobiliny a fykobiliproteiny

Fykobiliny jsou fotosyntetická barviva v buňkách sinic a některých řas. Jsou to lineární tetrapyrrolové chromofory fykobiliproteinů, schopné světlosběrné funkce v oblasti viditelného světla. Namísto uzavřeného cyklu, jako mají příbuzné hemy a chlorofyly, jsou u fykobilinů čtyři pyrrolové kruhy, značené A až D. Ty jsou uspořádány do otevřeného řetězce, a neobsahují centrální kovový ligand (Scheer, 2003). Prekurzorem pro syntézu všech fykobilinů i chlorofylů je protoporphyrin (Beale, 1993). Celkem existují čtyři známé typy fykobilinů, lišící se svou strukturou – fykocyanobilin, fykoerytrobilin (Obr. 1), fykourobilin a fykviolobilin, což je izomer fykocyanobilinu (Scheer *et al.*, 2008, Ikeuchi *et al.*, 2008).

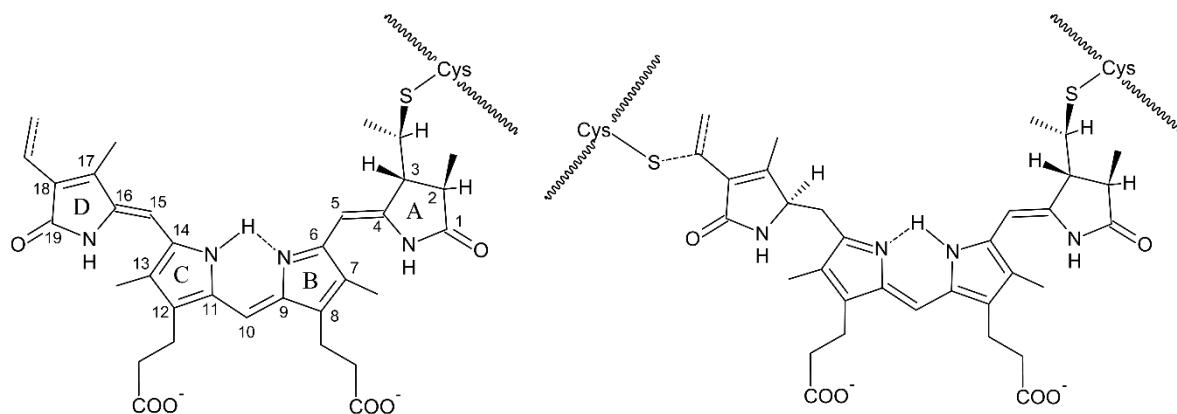


Obr. 1: Struktura fykobilinů: vlevo fykocyanobilin a vpravo fykoerytrobilin (upraveno v ChemSketch podle Zhao *et al.*, 2012).

Fykobiliny jsou kovalentně vázány s proteiny do světlosběrných komplexů, fykobiliproteinů, pomocí thioéterové vazby, která je tvořena mezi prvním uhlovodíkem vinylového substituentu na pyrrolovém kruhu A a cysteinovým zbytkem v molekule bílkoviny (Obr. 2) (Scheer, 2003). Podle Killilea *et al.* (1979) je fykobilin vázán s proteiny pomocí dvou vazeb, již zmíněné thioéterové vazby s cysteinovým zbytkem a esterové vazby mezi serinovým zbytkem a karboxylátovým aniontem na kruhu C. Existuje více možností uvolnění fykobilinů z fykobiliproteinu. Často používanou metodou je metanolová extrakce použitá v O'Carra *et al.* (1966), která je však nevhodná, jelikož dochází k velkým odlišnostem ve spektrech extrahovaných fykobilinů od fykobilinů vázaných na protein. Jako účinnější metoda bylo prokázáno uvolnění fykobilinů za použití kyseliny, kdy byly ve spektru uchovány charakteristické znaky nativních pigmentů (Killilea *et al.*, 1979).

Fykobiliproteiny jsou polární látky, jsou tedy dobře rozpustné ve vodě. Dělí se do čtyř skupin, lišících se svými spektroskopickými vlastnostmi, tedy polohou absorpčních maxim (Pagels, 2019). Fykocyanobilin je kofaktorem fykobiliproteinů fykocyaninu a allofykocyaninu, fykviolobilin s fykocyanobiliinem jsou kofaktory fykoerytrocytaninu a fykourobilin se společně s fykoerythrobiliinem vyskytuje v různých typech fykoerytrinu. Absorpční maxima zmíněných fykobiliproteinů jsou upřesněna v tabulce (Tab. 1) (Frank & Cogdell, 2012, Kirilovsky & Büchel, 2019).

Tato rozmanitost absorpčních vlastností je dána zejména vzájemným působením s bílkovinou, na niž jsou fykobiliny vázány, spíše než drobnými rozdíly ve struktuře molekul fykobilinů. V proteinech může po navázání docházet k různým deformacím fykobilinů, ať už kovalentními vazbami na koncích tetrapyrolu nebo nekovalentními interakcemi s molekulou proteinu (Šetlík, 1998). Nejvíce, co se počtu týče, je v buňkách sinic zastoupen fykocyanin, následovaný fykoerytrinem a allofykocyaninem (Wildman & Bowen, 1974).



Obr. 2: Vazba fykobilinů na protein thioéterovou vazbou: vlevo fykocyanobilin a vpravo fykoerytrobilin (upraveno v ChemSketch podle Zhao *et al.*, 2012).

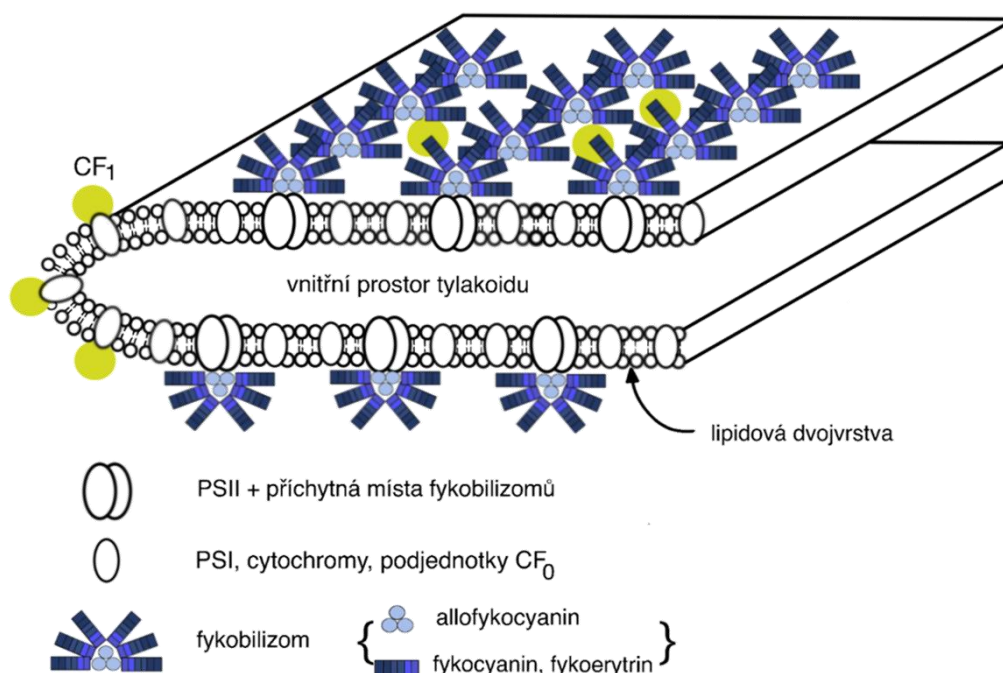
Tab. 1: Fykobiliproteiny a jejich polohy absorpčních maxim (Pagels *et al.*, 2019)

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

Struktura fykobiliproteinů sestává ze dvou odlišných polypeptidů značených jako α a β , z nichž každý nese alespoň jeden fykobilin. Ve většině případů se heterodimery z α a β podjednotek nachází v podobě trimerů nebo hexamerů, které jsou poté propojeny pomocí specifických proteinů (Schluchter *et al.*, 2010, Pagels, 2019).

1.2. Fykobilizomy

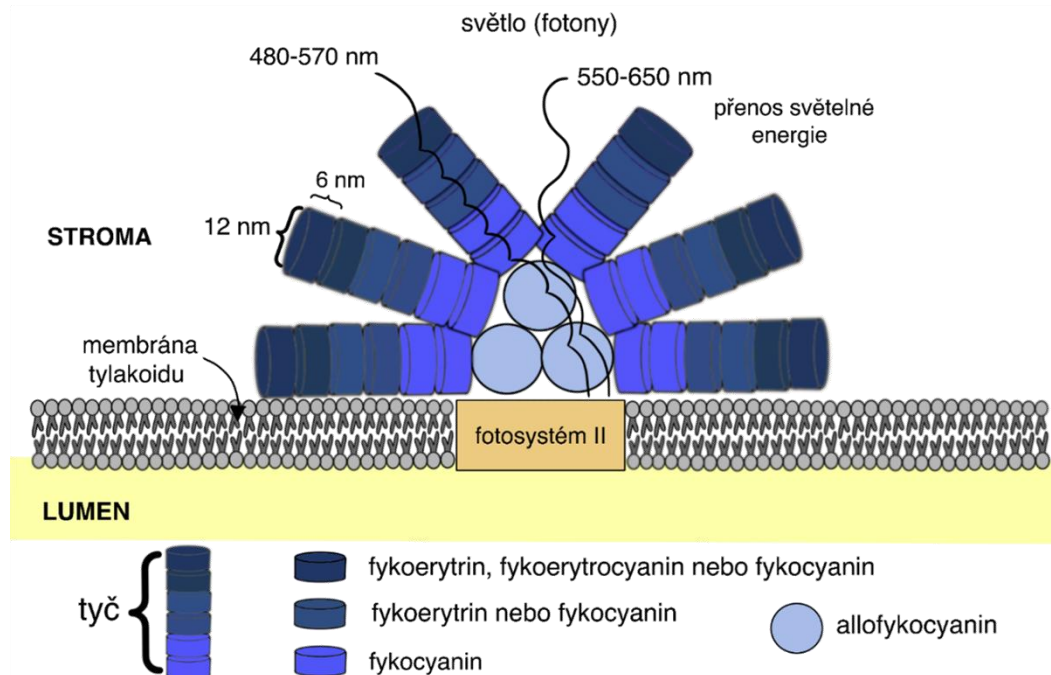
Fykobilizomy jsou světlosběrné antény, které společně s jednotlivými fotosystémy tvoří hlavní součásti fotosyntetického aparátu sinic (Masojídek *et al.*, 2013, Pagels *et al.*, 2019), ruduch a skrytének (Beale & Cornejo, 1991, Bryant *et al.*, 1979). Jsou to proteinové komplexy, tvořené fykobiliproteiny, umístěné na vnější straně membrány tylakoidů (Obr. 3) (Pagels *et al.*, 2019, MacColl, 1998), což jsou ploché váčky, umožňující fotosyntézu u sinic.



Obr. 3: Schéma fykobilizomů umístěných na tylakoidu (upraveno podle Dumay *et al.*, 2014)

Na kulovité jádro fykobilizomu, tvořené trimery allofykocyaninu, nasedají tyče tvořené fykoerythrinem a fykocyaninem (Obr. 4). Na rozdíl od jádra jsou tyče tvořeny hexamery (Scheer, 2003, Scheer, 2012, Pagels, 2019).

Od fotosystému nejvzdálenější fykobiliproteiny jsou fykoerythrin a fykoerythrocyanin. Energie je dále přenesena přes fykocyanin k allofykocyaninu, který slouží jako mediátor k přenosu energie na fotosystémy (Dumay & Morancais, 2016, Glazer, 1994). Tím je vytvořen řetězec přenosu energie mezi jednotlivými fykobiliproteiny (Bryant *et al.*, 1979).



Obr. 4: Schéma fykobilizomu (upraveno podle Dumay *et al.*, 2014).

1.3. Využití fykocyaninů a fykobilinů

Fykoviolobilin umožňuje přežití organismů ve větších hloubkách, jelikož je schopný absorpce světla o kratší vlnové délce (Bishop *et al.*, 1987, Ishizuka *et al.*, 2007). To samé umožňuje organismům také fykourobilin, který je obsažen ve fykoerytrinu, ve kterém má funkci donoru elektronu (Swanson *et al.*, 1991, Pagels, 2019).

Fykocyanin je významnou součástí přírodního potravinářského barviva známého pod názvem Spirulina, kterému dodává barvu¹. Podle Hirata *et al.* (2000) má fykocyanobilin velký potenciál jako antioxidant, jelikož účinnost fykobilinů je srovnatelná s účinností jiných známých antioxidantů. U fykocyaninu byly již prokázány jisté antioxidantní a protizánětlivé vlastnosti *in vitro* (Hirata *et al.*, 1999, Gonzalez *et al.*, 1999).

Oxidativní stres může vést k poškození DNA a tím k apoptóze či mutagenězi. Bhat & Masyastha (2001) ukázali, že fykocyanin i fykocyanobilin jsou schopny vychytávat peroxynitrit, což je látka schopná inaktivovat důležité buněčné molekuly a poškozovat DNA. Jsou tedy schopny inhibovat látky poškozující DNA. Antioxidativní schopnost fykocyaninu je vyšší než u samotného fykocyanobilinu. Dle Wan *et al.* (2017) lze fykocyanin také použít k ničení nádorových buněk díky fotodynamické aktivitě, která vzniká při konjugaci s ftalocyaninem zinečnatým. Také samotný fykocyanin je toxický vůči rakovinným buňkám (Jiang *et al.*, 2017, Ravi *et al.*, 2015).

¹ Code of Federal Regulations USA, 78 FR 49120

1.4. Samoorganizující agregáty

Samoorganizující agregáty jsou tvořeny některými bakteriochlorofyly (BChl) (Alster *et al.*, 2010), konkrétně BChl *c*, *d* a *e*. Jsou schopny zachytávat světlo a zajistit energii potřebnou pro biochemické reakce ve fotosyntéze (Smith *et al.*, 1982). Lze je najít v chlorozomech, což jsou hlavní světlosběrné komplexy zelených fotosyntetických bakterií (Zupcanova *et al.*, 2008). Agregáty jsou složeny pouze z pigmentů a nejedná se tedy o běžné pigment-proteinové antény (Pšenčík *et al.*, 2004).

Agregáty mohou být tvořeny až 200 000 molekulami BChl. Jejich velikost a struktura umožňuje zachycení a využití světla v širokém spektrálním rozsahu dosahujícímu až k oblasti blízkého infračerveného záření. Molekuly jsou v agregátech vzájemně propojeny pomocí vodíkových můstků, koordinačních vazeb a patrových interakcí, což je typ nekovalentní interakce mezi aromatickými molekulami (Furumaki *et al.*, 2014). Konkrétně k agregaci dochází vytvořením vodíkového můstku mezi atomem kovu jedné molekuly, což je v tomto případě hořčík, a keto skupinou na kruhu druhé molekuly (Smith, 1983, Zupcanova, 2008).

Díky schopnostem tvořit agregáty i mimo buňku se staly BChl objektem zájmu v umělé syntéze fotosyntetizujících antén. Podmínkou pro umělé vytvoření agregátů s podobnými optickými vlastnostmi jako mají přírodní systémy jsou nepolární sloučeniny, jako jsou karotenoidy nebo lipidy (Furumaki, 2014). Agregáty lze tedy vytvořit jak v nepolárních rozpouštědlech, tak ve vodních pufoch za přítomnosti lipidů (Klinger *et al.*, 2004).

Důkazem vytvoření agregátů je posun maxima absorpce BChl směrem k delším vlnovým délkám (angl. red shift). Přírodní i uměle vytvořené agregáty málo absorbují světlo v oblasti 550 – 620 nm (Alster, 2010). Tento nedostatek by bylo možné doplnit fykobiliny, pokud by se podařilo změnit jejich strukturu tak, aby se zabudovaly do agregátů. Tato myšlenka je i motivací pro tuto práci.

1.5. Analytické a preparativní metody

1.5.1. Chromatografie

Prvním krokem k identifikaci složky vzorku je potřeba získat tuto složku v čisté formě. K tomu lze použít některou z chromatografických metod. Základním principem metod chromatografie je ustalování rovnováhy rozpuštěného vzorku mezi dvěma vzájemně nemísitelnými fázemi, z nichž jedna je zakotvená (stacionární) a druhá je pohyblivá (mobilní). Vzorek do systému vstupuje společně s mobilní fází a dělí se na základě afinity jednotlivých látek ke stacionární fázi (Prosser *et al.*, 1989).

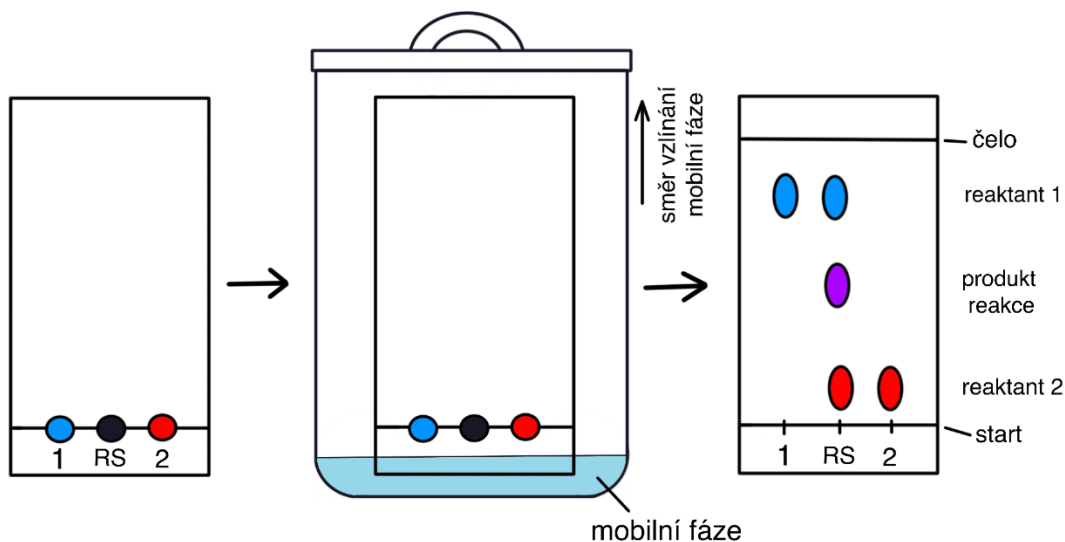
Molekuly dělených složek vnikají do obou fází a interagují s nimi, ale každá složka v nich setrvává různě dlouho. Právě tyto interakce umožňují rozdělení jednotlivých složek. Složky, které nevnikají do stacionární fáze se pohybují po povrchu stejnou rychlostí jako mobilní fáze, kdežto složky zachytávající se na stacionární fázi se pohybují pomaleji (Hoffman, 2004).

Existuje mnoho typů chromatografie, jako například plynová, gelová nebo kapalinová chromatografie. V této práci bylo využito kapalinové chromatografie, konkrétně chromatografie na tenké vrstvě a vysokoúčinné kapalinové chromatografie.

1.5.1.1. Tenkovrstvá chromatografie (TLC)

K přečištění fykobilinů byla použita metoda tenkovrstvé chromatografie (TLC), která je rozšířením papírové chromatografie. Oproti papírové chromatografii je TLC rychlejší, kdy trvá pouze několik minut oproti hodinám, a také přesnější s lépe zřetelnými skvrnami (Prosser *et al.*, 1989). Právě díky nízké časové náročnosti, vysoké citlivosti, a také dobré reprodukovatelnosti patří tato metoda mezi nejuniverzálnější a nejužívanější metody (Wall, 2005). TLC umožňuje kontrolu složení daného vzorku v průběhu chemických reakcí nebo dělicích postupů při izolaci pigmentů (Prosser *et al.*, 1989).

TLC spočívá v procesu rozdílné migrace jednotlivých látek mezi mobilní a stacionární fází o opačných polaritách. Na stacionární fázi, tvořenou sorbentem ukotveném na pevném podkladu, je nanesen vzorek a destička je vložena do vývojové nádoby, kde je přítomna mobilní fáze tak, aby nanesený vzorek nebyl ponořen. Vývojová nádoba je po celou dobu procesu těsně uzavřena, aby bylo zabráněno úniku par, což může vést ke špatnému průběhu chromatografie (Churáček *et al.*, 1993). Mobilní fáze, kterou je ve většině případů organické rozpouštědlo o vhodné polaritě, poté spolu se vzorkem vzlíná nahoru po TLC destičce pomocí kapilárních jevů. Vzorek se v procesu dělí na jednotlivé složky na základě síly interakce dipól-dipól mezi dělenou látkou a stacionární fází (Wall, 2005). Schéma TLC je na obrázku (Obr. 5).



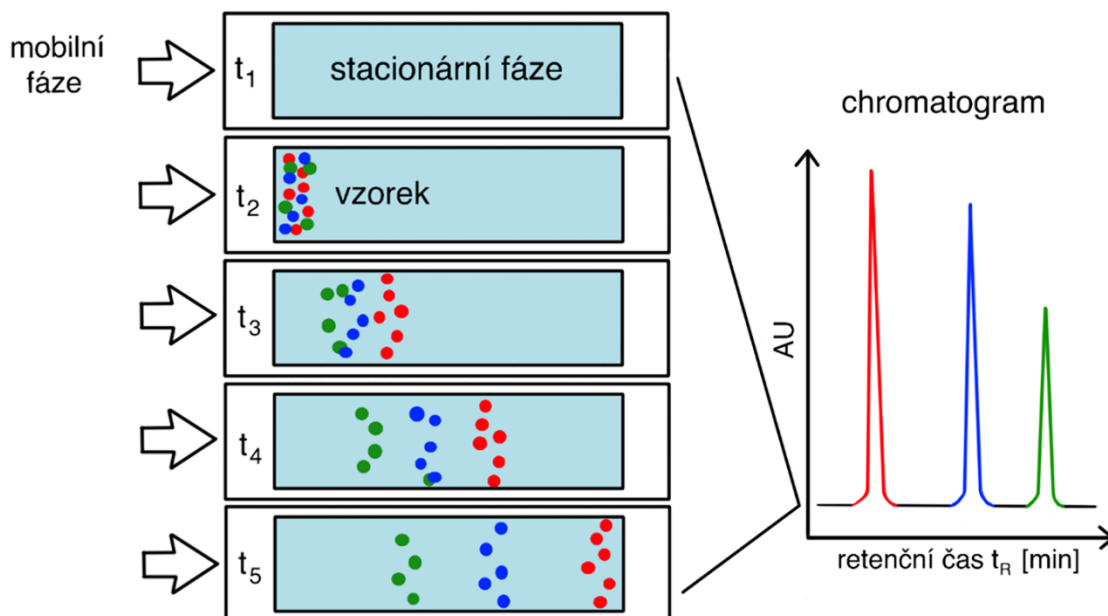
Obr. 5: Schéma tenkovrstvé chromatografie, 1 – reaktant 1, 2 – reaktant 2, RS – reakční směs (Upraveno podle Priyadarshini, 2016).

1.5.1.2. HPLC (High-Performance Liquid Chromatography)

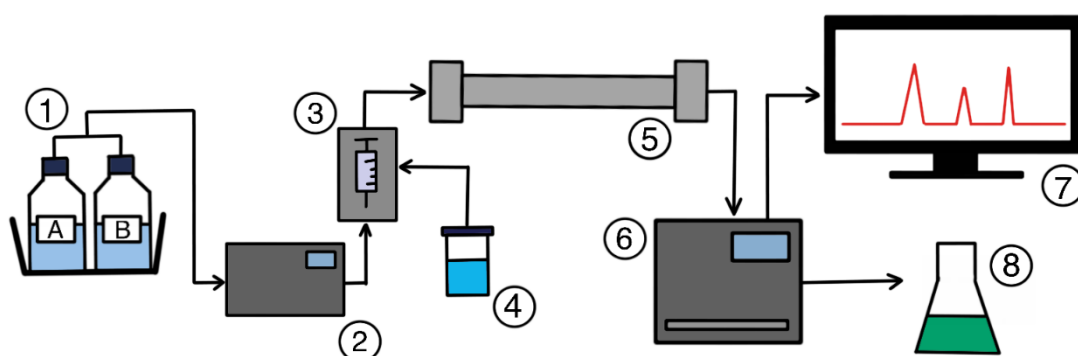
Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) je jednou z nejpoužívanějších analytických separačních metod, které jsou založené na distribuci látek mezi dvěma fázemi. Stacionární fáze je ukotvena v koloně v podobě sorbentu. Druhá fáze je mobilní a protéká sorbentem, skrz který unáší vzorek.

Při analýze dochází k interakci mezi složkami vzorku a sorbentem, čímž dochází k retenci jednotlivých složek, a tedy jejich separaci. Složky méně interagující se sorbentem jsou eluovány jako první, následované více interagujícími složkami (Obr. 6). Separace a eluce jsou ovlivněny povahou fází, kdy může probíhat isokratická eluce (konstantní mobilní fáze) nebo gradientová eluce, při které dochází k programované změně složení mobilní fáze během měření. Tím dochází ke zvyšování eluční síly, což je výhodné při separaci látek s výrazně odlišnými fyzikálně-chemickými vlastnostmi. V takovém případě by isokratická eluce zabrala více času.

Jednotlivé složky opouštějící kolonu jsou zaznamenávány detektorem, který převede signál do chromatografického záznamu – chromatogramu. Schéma celé aparatury je na obrázku (Obr. 7). Existuje více typů detektorů na základě detekované veličiny – spektrofotometrické, refraktometrické či fluorimetrické (Drbal & Křížek, 1999, Nováková *et al.*, 2021).



Obr. 6: Rozdělení směsi látek v koloně HPLC v čase a výsledný chromatogram (upraveno podle Nováková *et al.*, 2021).



Obr. 7: Schéma HPLC. 1 – zásobníky mobilních fází, 2 – vysokotlaké čerpadlo, 3 automatický dávkovač vzorku, 4 – vzorek, 5 – chromatografická kolona, 6 – detektor, 7 – datová stanice, 8 – nádoba na sběr odpadu (upraveno podle Blum *et al.*, 2014 a Nováková *et al.*, 2021).

1.6. Esterifikace

Estery jsou funkční deriváty karboxylových kyselin, vznikající nahrazením OH skupiny karboxylu za alkoxy skupinu. Vznikají nejčastěji kondenzací karboxylové skupiny s hydroxylem. Jsou jedny z nejrozšířenějších přírodních látek, často známé pro svou ovocnou vůni (Clayden, 2012, McMurry, 2007).

Esterifikace je jednou z nejstarších a nejpoužívanějších metod v organické syntéze. Má široké uplatnění především v chemickém průmyslu, ale také ve zdravotnictví, potravinářství a kosmetickém průmyslu včetně výroby parfémů (Gilles *et al.*, 2015).

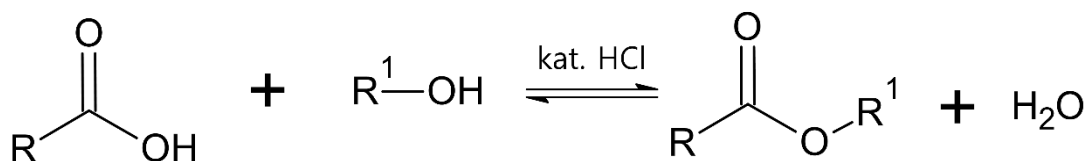
V potravinářství jsou významná betalainová barviva, jejichž estery jsou používány jako indikátory kvality potravin (Williams *et al.*, 2006). Při detekci nezdravé úrovně produktů, vznikajících rozkladnými procesy balených potravin, dochází k barevné změně indikátoru. Takto lze detekovat např. bakterie, plísň či houby (Tuwalska *et al.*, 2014).

Estery lze nalézt také ve fermentovaných nápojích, jako je pivo a víno. Často se v jednom nápoji vyskytují různé estery fungující jako synergisté a ovlivňující příchuť. Např. vínu dodávají často ovocné aroma (Sumbly *et al.*, 2006). Ve víně vznikají estery dvojím způsobem – enzymaticky, díky látkám uvolněným potravinářskými mikroorganismy (Sumbly *et al.*, 2006), nebo esterifikací alkoholu a kyselin kvůli nízkému pH během zrání vína (Margalit, 1997).

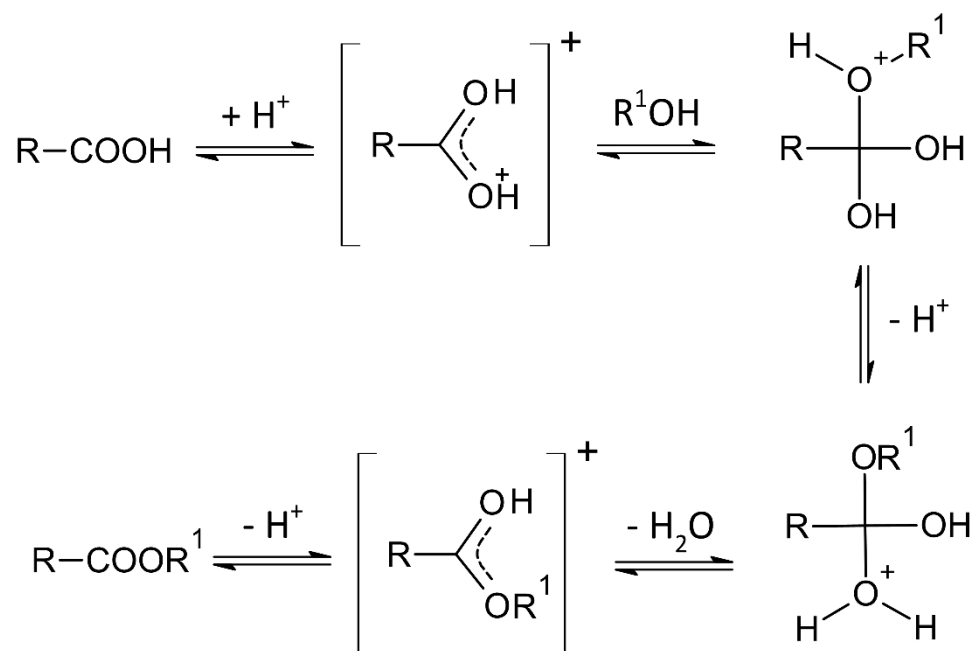
Další významnou látkou je inositol hexanikotinát, připravený esterifikací inositolu a kyseliny nikotinové, známé také jako vitamín B₃. V doplňcích stravy představuje zdroj niacinu s pomalým uvolňováním, kdy se molekula rozpadá na inositol a šest molekul niacinu. Pomalým uvolňováním je předcházeno zarudnutí pokožky v oblasti obličeje s pocitem pálení a brnění (Aguilar *et al.*, 2009).

Nejčastěji používanou metodou pro přípravu esterů je pro svou jednoduchost, rychlost a velmi dobrou výtěžnost Fischerova esterifikace (McMurry, 2007). Jedná se o kyselé katalyzovanou nukleofilní substituci hydroxyly na acylové skupině karboxyly. Karboxylová skupina je esterifikována za zvýšené teploty v nadbytku alkoholu za přítomnosti silné kyseliny jako katalyzátoru (McMurry, 2007, Fischer & Speier, 1895).

Karboxylové kyseliny v roztoku běžně deprotonují za vzniku karboxylátu, což je slabý elektrofil. Tomu je nutné zabránit použitím silné kyseliny, která karboxylovou skupinu protonuje a dává vzniku oxoniového kationtu. Ten je následně atakován nukleofilním kyslíkem alkoholu, čímž dochází k vytvoření tetraedrického meziprojektu, ve kterém dochází k přesunu protonu z oxoniového kationtu na kyslík alkoholu. Tím se stává hydroxylová skupina snadno odštěpitelnou. Nakonec dochází k odštěpení vody a deprotonizaci za regenerace kyselého katalyzátoru a vzniku finálního esteru (McMurry, 2007, Clayden 2012). Na obrázcích je zobrazen zjednodušený (Obr. 8) a podrobný (Obr. 9) mechanismus reakce.



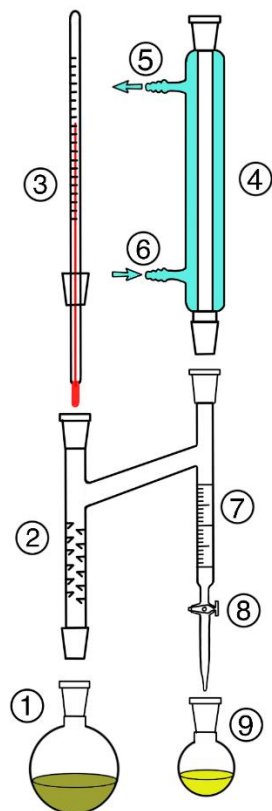
Obr. 8: Zkrácené schéma Fischerovy esterifikace (upraveno v Chemscketch podle Zimmermann *et al.*, 1965).



Obr. 9: Mechanismus Fischerovy esterifikace (upraveno v Chemskech podle Zimmermann *et al.*, 1965).

Každý krok reakce je reverzibilní a poloha rovnováhy může být volbou reakčních podmínek řízena oběma směry. V případě použití alkoholu jako rozpouštědla je upřednostňována tvorba esterů, avšak jako vedlejší produkt vzniká voda, která podporuje tvorbu karboxylové kyseliny. Pro zvýšení produkce esteru je tedy potřeba odebírat vznikající vodu, což lze provést destilací (Hoffman, 2004, Wang, 2010).

Jednou z možností, jak zvýšit výtěžnost esterifikace ve prospěch esteru, je oddestilování vody pomocí Dean-Starkovy aparatury (Obr. 10), kde dochází k destilaci azeotropické směsi. Existují dva typy, první pro rozpouštědla s nižší hustotou než voda a druhý pro rozpouštědla s vyšší hustotou. Reakční směs je zahřívána v reakční baňce, odkud se vypařuje do zpětného chladiče. Odtud reakční složka a voda odkapávají do destilačního lapače a oddělují se do nemísitelných vrstev. Jakmile horní vrstva dosáhne úrovně bočního ramene, začne proudit zpět do reakční baňky, zatímco spodní vrstva zůstává. Tu je však potřeba odpuštit, aby se kapaliny nemísily. Tato metoda je vhodná především při oddělení vody od toluenu (Puterbaugh *et al.*, 1963, Greber, 1991).



Obr. 10: Schéma Dean-Starkovy aparatury. 1- varná baňka se směsí, 2 – frakční sloupec, 3 – teploměr, 4 – kondenzátor, 5 – odtok vody, 6 – přítok vody, 7 – byreta, 8 – kohoutek, 9 – sběrná baňka (upraveno podle Bu, 2016).

2. CÍLE PRÁCE

- Zvládnout metody purifikace a analýzy fykobilinů z buněk termofilní sinice *Thermosynechococcus elongatus*
- Esterifikovat získané fykobiliny alkoholy s různě dlouhými řetězci
- Pokusit se vytvořit agregáty bakteriochlorofylu a modifikovaných fykobilinů

3. MATERIÁL A METODY

3.1. Použité chemikálie a činidla

- aceton (čistota $\geq 99\%$, Sigma-Aldrich)
- butan-1-ol (čistota p.a., 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)

3.2. Metody

3.2.1. Izolace fykocyanobilinů

Výchozím materiálem pro izolaci byly buňky sinice *Thermosynechococcus elongatus*. Buňky byly pěstovány v médiu WC (Guillard, 1972) při teplotě 48 °C na světle o intenzitě 50 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. Buňky byly z média získány centrifugací (7 min, 8000 $\times$ g) na centrifuze Avanti J-25 (Beckman, Coulter, USA) a před dalším použitím skladovány při -80 °C. Pro izolaci fykobilinů byly z buněk odstraněny membránové systémy a buněčné stěny a použita byla zbylá vodná fáze. Postup izolace vodné fáze byl použit podle Kalkuše (2018) a Malinové (2020). Ve stručnosti byly buňky disruptovány přístrojem Emulsi Flex (Avestin, Kanada) při tlaku 15 000 psi po dobu 5 minut. Krátkou centrifugací (5 min, 6000 $\times$ g) na centrifuze Sigma 3-30 KS (Sigma Laboratory Centrifuges, Německo) byl odstraněn nerozbitný materiál a buněčné stěny a poté byly dlouhou ultracentrifugací (30 min, 25000 $\times$ g) rozděleny membránové systémy od vodné fáze (supernatantu).

Získaný supernatant byl dále využit jako zdroj pigmentů. Supernatant byl smíchán s acetonem v poměru supernatant : aceton (1 : 5, v/v) za vzniku modré sraženiny. Směs byla odstředěna na centrifuze (5 min, 6500 $\times$ g). Po odstranění supernatantu byl pelet obsahující fykobiliny vysušen v temnu za sníženého tlaku.

Fykobiliny byly uvolněny ze sražených proteinů pomalou kyselou hydrolyzou (Malinová, 2020). K vysušenému peletu o průměrné hmotnosti 1,06 g $\pm$ 0,45 bylo přidáno 45 ml 35% HCl (ÓhEocha, 1958). Směs byla inkubována při pokojové teplotě po dobu jednoho týdne v temnu, pravidelně promíchávána a následně odstředěna (10 min, 7500 $\times$ g). Supernatant byl oddělen a hydrolyza byla ukončena přidáním vody do supernatantu v poměru hydrolyzát : H₂O (1 : 4, v/v).

Supernatant byl opakovaně vytřepán do chloroformu (chloroform : supernatant, 1 : 10), dokud se do chloroformu nepřestal přenášet pigment. Po extrakci pigmentu do chloroformu byly provedeny čtyři způsoby omývání. První vzorek byl omyt destilovanou vodou v poměru chloroform : voda (1 : 10, v/v). Druhý vzorek byl nejprve omyt 5% HCl podle (ÓhEocha, 1963) v poměru chloroform : HCl (1 : 2,5, v/v) a poté byl omyt destilovanou vodou ve stejném poměru jako první vzorek. Třetí vzorek byl omyt 5 M NaCl v poměru chloroform : NaCl (1 : 3,5, v/v) a následně byl opět promyt vodou. Čtvrtý vzorek nebyl po extrakci do chloroformu promýván a sloužil jako kontrola (viz kapitola 4.2).

Chloroformová fáze o velkém objemu byla v další fázi vysušena na vakuové rotační odparce (RV 10 control, IKA, Německo). Jakmile zbývalo malé množství (cca 2 ml), vzorek byl převeden do zkumavky a dosušen proudem plynného dusíku a následně uchován v uzavřené nádobce při -18 °C.

3.2.2. Přechištění fykobilinů (TLC)

Pro přechištění byla směs pigmentů rozpuštěna v chloroformu a nanесena na polyesterovou TLC destičku (Polygram Sil G, Macherey-Nagel, Německo) o rozměru 10 × 20 cm se silikagelovou stacionární fází. Pro vývoj vzorku byla použita mobilní fáze chloroform : metanol : hexan v poměru 17 : 4 : 1 (v/v) (Kalkuš, 2018). Po 15 minutách, kdy bylo rozdělení jednotlivých látek dokončeno, byla TLC destička v temnu vysušena. Na TLC destičce byly viditelné 2 modré pruhy, které byly přeneseny do oddělených zkumavek.

Silikagel s absorbovanými barvivy byl rozpuštěn v 1 ml metanolu, promíchán pomocí vortexu a odstředěn na stolní centrifuze (2 min, 14000 × g) pro oddělení pigmentu od pevných částic silikagelu. Supernatant byl pomocí pipety přenesen do zásobní nádoby a extrakční krok byl 5× opakován, dokud nebyl všechen modrý pigment z pevné fáze převeden do metanolu. Metanolvý extrakt byl poté vysušen v temnu za sníženého tlaku.

3.2.3. Absorpční spektrometrie

Absorpční spektra byla měřena v rozsahu 300 – 800 nm v křemenných kyvetách na UV-VIS spektrofotometru Shimadzu UV-2600 (Shimadzu, Japonsko). Analyt byl rozpuštěn v chloroformu, pro výpočet koncentrace fykobilinů byl použit molární extinkční koeficient $\varepsilon = 38\,000\text{ dm}^3\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ (640 nm) (Glazer & Hixson, 1975, Bishop *et al.*, 1987).

3.2.4. Fischerova esterifikace

3.2.4.1. Příprava 1-butylesteru a 1-hexylesteru fykocyanobilinu

Při syntéze butylesteru byl fykobilin připravený v předchozích krocích rozpuštěn v butanolu o výsledné koncentraci $24,29\text{ }\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1} \pm 14,19$. Pro reakci bylo použito 4 × 250 μl roztoku. Jedna mikrozkušavka sloužila jako kontrola (K), do zbylých 3 mikrozkušavek bylo přidáno 5 μl koncentrované H_2SO_4 . Vzorky byly esterifikovány po dobu 3 hodin při teplotě 90 °C v termobloku. Reakce byla ukončena přidáním 1 ml deionizované vody a pigment byl následně extrahován z reakční směsi přidáním 500 μl diethyletheru. Směs byla promísena pomocí vortexu a poté odstředěna na stolní centrifuze (2 min, 14000 × g). Spodní fáze byla odstraněna a horní fáze s pigmenty byla neutralizována různým počtem omytí přidáním 1 ml vody (viz kapitola 4.3). Nakonec byla odebrána vrchní fáze, která byla vysušena za sníženého tlaku. Jako nejvhodnější se ukázalo 5ti násobné omytí, které jsme následně používali při standardních esterifikacích.

Téměř identickým postupem byl připraven 1-hexylester, kdy jako rozpouštědlo byl místo butanolu použit hexanol. Pro reakci bylo v tomto případě použito $4 \times 300 \mu\text{l}$ roztoku o průměrné koncentraci $24,29 \mu\text{mol.l}^{-1}$. Vzorky byly po ukončení esterifikace $5\times$ omyty vodou a při posledním omytí byla odpipetována vrchní fáze obsahující pigment, která byla za sníženého tlaku vysušena. Ani po 3 dnech sušení nebyl vzorek zcela suchý z důvodu nízké tenze par hexanolu a bylo ho nutno dosušit pomocí proudu plynného dusíku 4.0.

3.2.4.2. Příprava 1-hexylesteru a 1-dodecylesteru s DCM

Hexylester fykobilinů byl také syntetizován s využitím dichlormetanu (DCM) jako rozpouštědla. Bilin rozpuštěný v chloroformu byl rozdělen stejným dílem do 4 mikrozkušavek a chloroform byl poté vysušen pomocí plynného dusíku. Do každé mikrozkušavky bylo po vysušení přidáno $300 \mu\text{l}$ DCM a $10000\times$ větší množství 1-hexanolu (mol/mol), než byl obsah bilinu. (Pro informaci je zde nutné doplnit, že původní koncentrace hexanolu pro esterifikace byla zvolena pouze $2000\times$ vyšší, nicméně tato koncentrace byla použita jen v první sérii pokusů a poté změněna na $10000\times$ násobek.) Jedna zkumavka byla použita jako kontrola a do zbylých mikrozkušavek bylo přidáno $5 \mu\text{l}$ koncentrované H_2SO_4 . Vzorky byly esterifikovány v termobloku při teplotě 30°C , kvůli nízké teplotě varu DCM, po dobu 30, 90 a 180 minut. Kontrola byla zahřívána po dobu 180 minut společně s posledním vzorkem.

Reakce byla stejně jako u 1-butanolu a 1-hexanolu ukončena přidáním 1 ml vody a pigment byl vyextrahován přidáním $500 \mu\text{l}$ diethyletheru. Směs byla protřepána pomocí vortexu a poté odstředěna na stolní centrifuze (2 min, $14000 \times g$). Vzorky byly $5\times$ omyty vodou a při posledním omytí byla odpipetována vrchní fáze obsahující pigment, která byla vysušena za sníženého tlaku.

Dodecylester byl připraven identickým postupem jako hexylester s DCM s $10000\times$ násobným množstvím dodecylalkoholu s dobou esterifikace prodlouženou na 27 hod.

3.2.5. 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 byla použita reverzní fáze (Nova-Pak C18 Column, $60\text{\AA}$, $4 \mu\text{m}$, $3.9 \text{ mm} \times 300 \text{ mm}$), složení mobilní fáze je uvedeno 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 (0,2 μl). Nastříknutý objem byl 100 μl , průtok mobilní fáze byl nastaven na 1 $\text{ml}\cdot\text{min}^{-1}$. Jednotlivé fáze gradientu použitých mobilních fází jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3) (Jeffrey *et al.*, 2005). 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

3.2.6. Samoorganizující agregáty

Agregáty BChl byly připraveny takzvanou rychlou metodou podle Malina *et al.* (2021). Práce probíhala pod vedením doc. RNDr. Jakuba Pšenčíka, Ph.D. ve spolupráci s Mgr. Tomášem Malinou. Vzorky bakteriochlorofylu *c* (BChl *c*) a monogalaktozydylglycerolu (MGDG) byly připraveny v laboratoři doc. RNDr. Jakuba Pšenčíka, Ph.D. na MFF UK. Při práci byly použity zásobní roztoky BChl rozpuštěného v metanolu a β -karotenu rozpuštěného v nestabilizovaném tetrahydrofuranu (THF). Byla změřena spektra obou zásobních roztoků, ze kterých byly pomocí Lambert-Beerova zákona vypočteny jejich koncentrace.

Zásobní roztoky byly napipetovány do mikrozkušavky v poměru BChl *c* : β -karoten (1 : 0,4; mol/mol). Finální koncentrace BChl *c* byla 15 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$. Vzorek byl promísen pomocí vortexu. Během promíchávání byl do vzorku přidán pufr. Pro kontrolu tvorby agregátů byla změřena sekvence absorpčních spekter vzorku v čase.

Pro testování vlivu přítomnosti fykocyanobilinu byl do vzorků před přidáním pufru přidán přečištěný fykocyanobilin bez dalších modifikací nebo hexylester fykocyanobilinu o výsledné koncentraci 6 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ společně s monogalaktozydylglycerolem (MGDG) s finální koncentrací 40 $\mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ (Klinger *et al.*, 2004).

4. VÝSLEDKY

4.1. Purifikace

První část práce byla zaměřena na izolaci fykobilinů z fykobilizomů sinice *Thermosynechococcus elongatus*. Protein fykocyanin byl z vodné fáze po rozbití buněk precipitován pomocí acetonu a vysušen za sníženého tlaku. V průběhu celé práce bylo získáno 20,04 g suchého peletu, v průměru 1,06 g na jednu zkumavku (Tab. 4.1).

Tab. 4.1: Hmotnosti získaného suchého peletu z vodné fáze po rozbití buněk s průměrnou hodnotou a směrodatnou odchylkou.

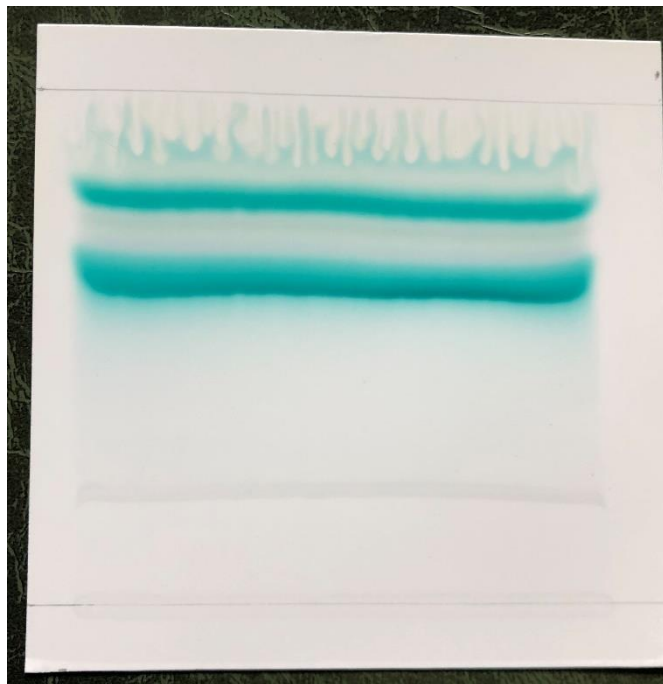
Zkumavka	Suchý pelet (g)	Zkumavka	Suchý pelet (g)
1	1,16	11	1,99
2	1,03	12	0,59
3	0,98	13	0,64
4	1,36	14	0,71
5	0,71	15	0,85
6	1,11	16	0,80
7	1,30	17	0,72
8	0,61	18	0,98
9	1,18	19	0,97
10	2,35		
Průměrná hodnota: 1,06 g ± 0.45			

Pelet byl dále podroben kyselé hydrolýze za studena po dobu 7 dní v temnu při pokojové teplotě. Po hydrolýze byla do chloroformu extrahována směs pigmentů (Obr. 4.1), která byla přečištěna s pomocí TLC (Obr. 4.2).

Na rozdíl od předchozí práce (Malinová, 2020) došlo během separace k oddělení dvou hlavních modrých pruhů. Pigmenty z obou rozdělených pruhů byly extrahovány do metanolu a dále zpracovány.



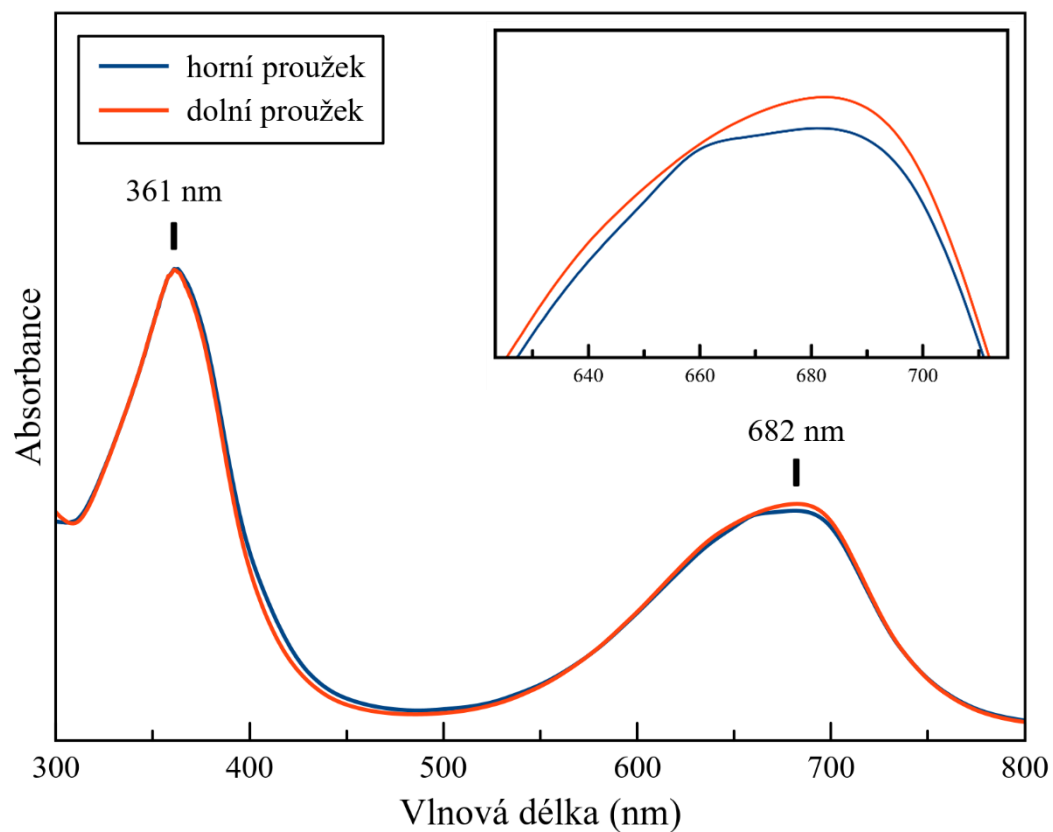
Obr. 4.1: Průběh extrakce pigmentu do chloroformu.



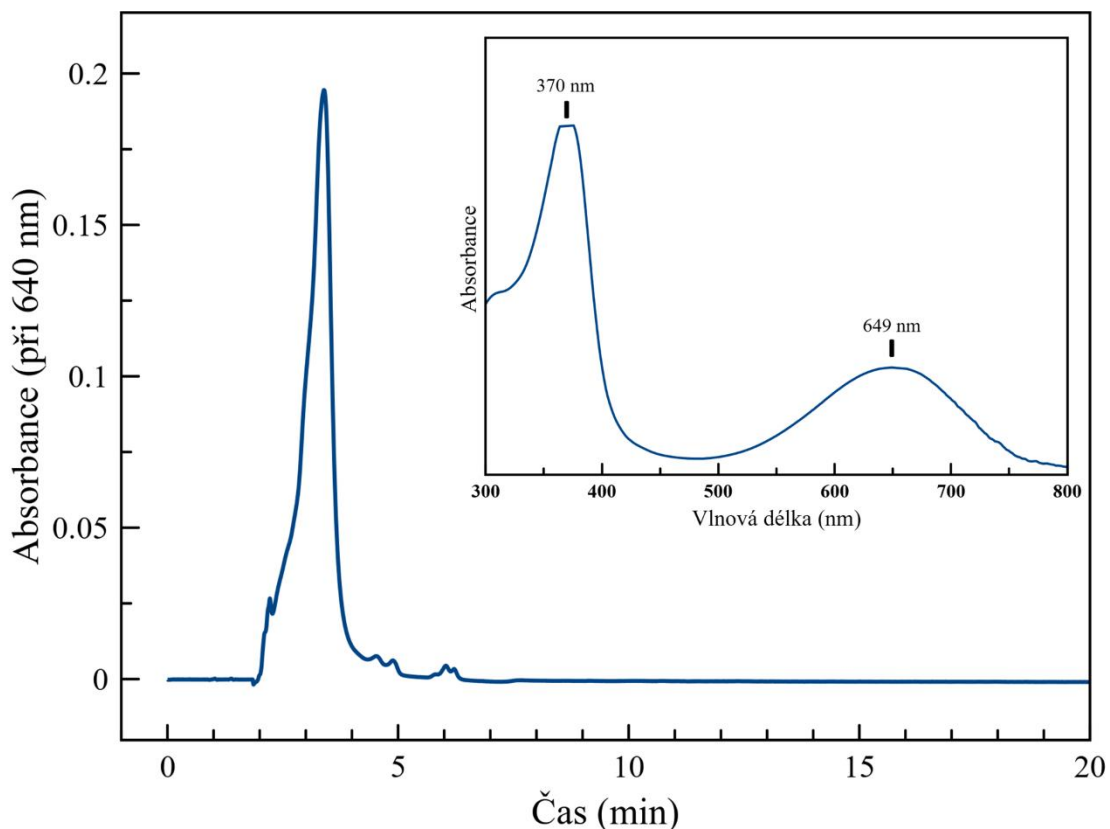
Obr. 4.2: Přečištěný bilin pomocí TLC, kde se pigment rozdělil na dva hlavní pruhy.

Absorpční spektra obou pruhů (Obr. 4.3) indikují, že oba vzorky obsahují fykocyanobilin. Spektra obou pruhů obsahují dvě hlavní maxima při 361 nm a 682 nm, což odpovídá známým absorpčním spektrům fykocyanobilinu O'Carra (1980). V oblasti horního pruhu je patrné mírné znečištění s absorpcí u 660 nm, jedná se pravděpodobně o feoforbid nebo jiný rozpadový produkt chlorofylu *a*. (Smith, 1983, Klinger *et al.*, 2004).

Vzorek spodního pruhu byl dále analyzován na HPLC jako kontrolní vzorek před dalšími modifikacemi (Obr. 4.4). V chromatogramu je jeden hlavní pík s elučním časem 3,37 min. Společně s chromatogramem bylo z HPLC získáno absorpční spektrum píku s hlavními maximy při 370 nm a 649 nm, přičemž v oblasti 370 nm je spektrum deformované kvůli vlastnostem detektoru. Spektrum získané z detektoru HPLC je oproti spektru na Obr. 4.3 v červené oblasti posunuté do modra cca o 30 nm, což je způsobené pravděpodobně použitím jiných rozpouštědel v mobilní fázi. Absorpční spektrum hlavního HPLC píku se v jeho profilu významně neměnilo, celý pík je tedy složen z fykocyanobilinu nebo jeho izomerů.



Obr. 4.3: Absorpční spektra horního a dolního modrého pruhu z TLC analýzy směsi bilinů *Thermosynechococcus elongatus*. Vzorky byly rozpuštěny v metanolu.



Obr. 4.4: Chromatogram HPLC analýzy dolního modrého pruhu z TLC a absorpční spektrum hlavního píku.

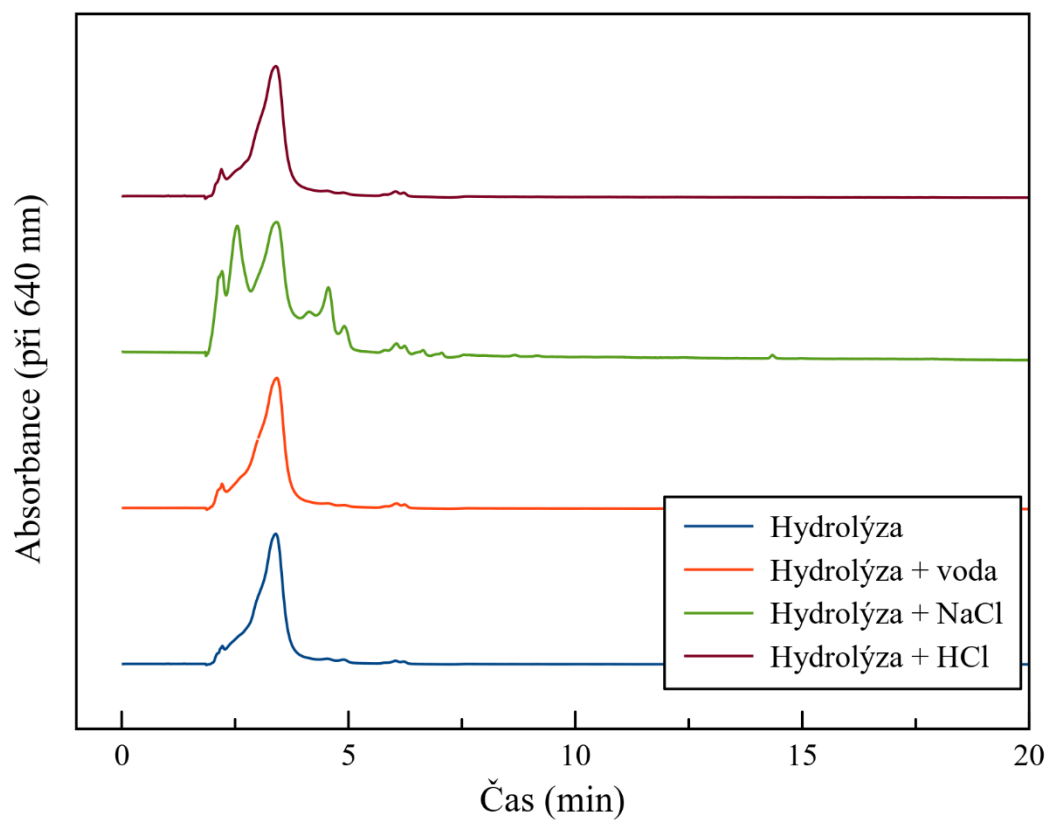
4.2. Omývání po hydrolýze

V předchozí práci (Malinová, 2020) byly zjištěny problémy se stabilitou produktů esterifikační reakce, proto byly v druhé části práce otestovány možnosti omývání extraktu pigmentů, aby bylo zaručeno neutrální pH purifikovaného bilinu. Celkem byly vyzkoušeny čtyři způsoby omývání chloroformové fáze.

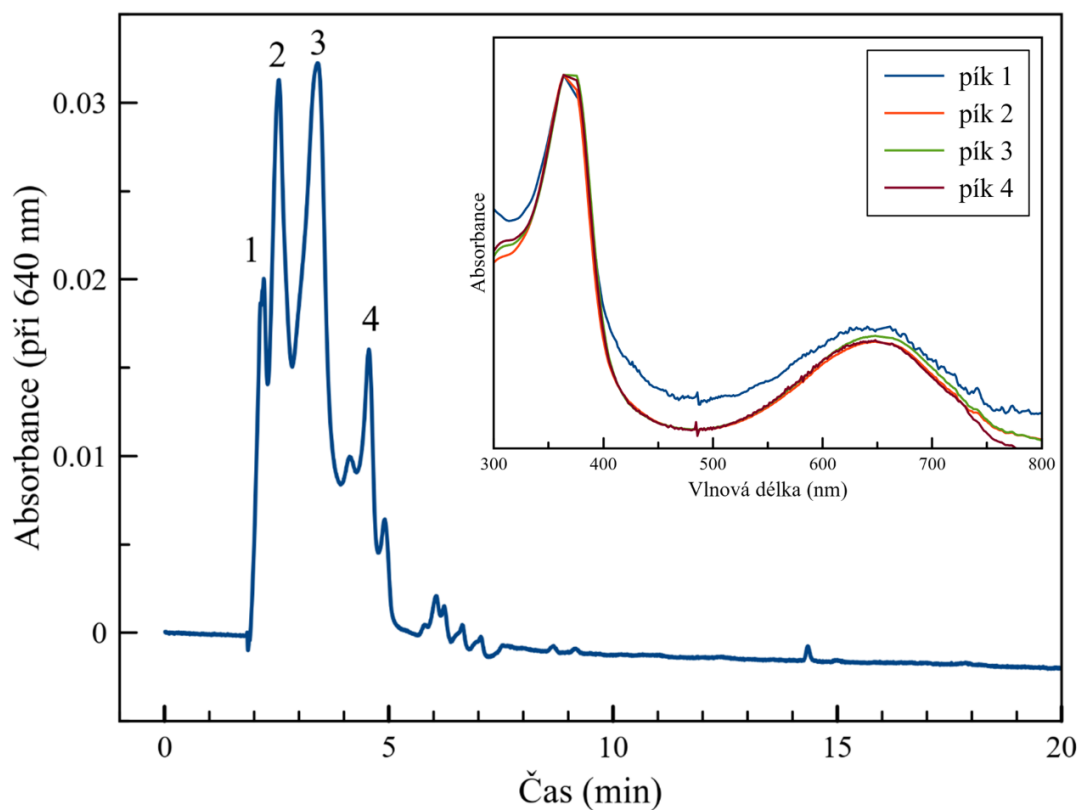
První způsob omývání zahrnoval pouze omývání destilovanou vodou. Vzorek byl omyt 3×, čímž bylo dosaženo pH 5,65 z původního pH 0. Druhý způsob omývání zahrnoval nejprve omytí 5% HCl, což mělo dopomoci oddělení zbytku proteinu z pigmentů, pokud se neodštěpily během hydrolýzy. Vzorek byl tedy nejprve 3× omyt 5% HCl a poté byl 4× promyt vodou podle (ÓhEocha, 1963). Tím bylo dosaženo pH 5,52 z původního pH 0. Třetí způsob zahrnoval omývání 5 M NaCl pro neutralizaci pH podle Kim *et al.* (2021). Vzorek byl omyt 3× a následně byl promyt 4× vodou kvůli vymytí soli ze vzorku. Poslední čtvrtý vzorek nebyl po vytřepání chloroformu promýván a sloužil jako kontrola.

Jednotlivé vzorky byly analyzovány na HPLC (Obr. 4.5), kde byla také porovnána spektra jednotlivých píků. Vzorky omývané vodou, HCl + vodou a bez omývání mají téměř identické chromatogramy s jedním hlavním píkem s elučním časem na 3,37 minutě. Na vzorku omývaném 5 M NaCl je patrné rozdělení na větší počet píků. Tento vzorek se rozdělil celkem na 4 píky, jejichž absorpční spektra (Obr. 4.6) odpovídají spektru fykocyanobilinu. Pravděpodobně došlo ke vzniku izomerů (Braslavsky, 1983), což mohlo být ovlivněno právě použitou solí.

Pro účely dalšího postupu v této práci byl zvolen poslední postup, tedy tuto část přípravy vzorků nemodifikovat, kvůli velkým ztrátám vzorku během omývání. S výjimkou postupu s omytím roztokem NaCl nebyl v této fázi pozorován rozdíl oproti původní metodě bez omývání.



Obr. 4.5: HPLC chromatogram fykocyanobilinu při testování různých metod omývání po hydrolýze.

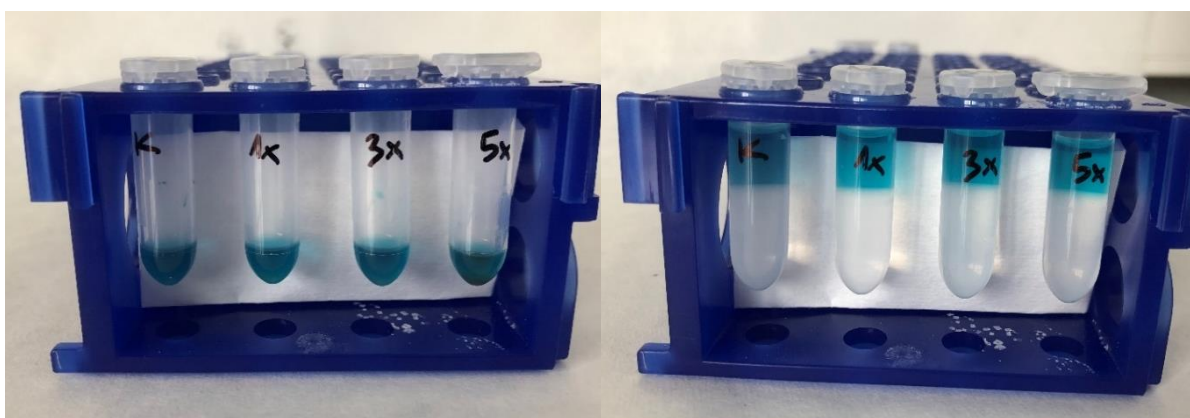


Obr. 4.6: HPLC chromatogram a absorpční spektra HPLC píků ze vzorku omývaného 5 M NaCl.

4.3. Esterifikace – butylester

Fykocyanobilin získaný v předchozích krocích byl v dalším postupu práce esterifikován alkoholem metodou Fischerovy esterifikace. V předchozí práci Malinová (2020) uvedla problém se stabilitou vzorků. Naznačila, že problém se stabilitou může být způsoben nedostatečnou neutralizací pH produktu esterifikace. Proto byl po esterifikaci otestován vliv různého počtu omytí vodou.

Přečištěný bilin byl rozpuštěn v butanolu a rozdělen stejným dílem do 4 zkumavek. Zkumavky byly značeny K (kontrola), 1, 3 a 5, podle plánovaného počtu omytí. Po esterifikaci byla reakce ukončena přidáním deionizované vody a pigment byl z reakční směsi extrahován přidáním dietyleru (Obr. 4.7).



Obr. 4.7: Omývání butylesteru po esterifikaci. (A) vzorky esterifikovaných pigmentů ihned po vyjmutí z termobloku, (B) vzorky po ukončení reakce přidáním vody a dimetyleru pro oddělení pigmentu od vody s kyselinou.

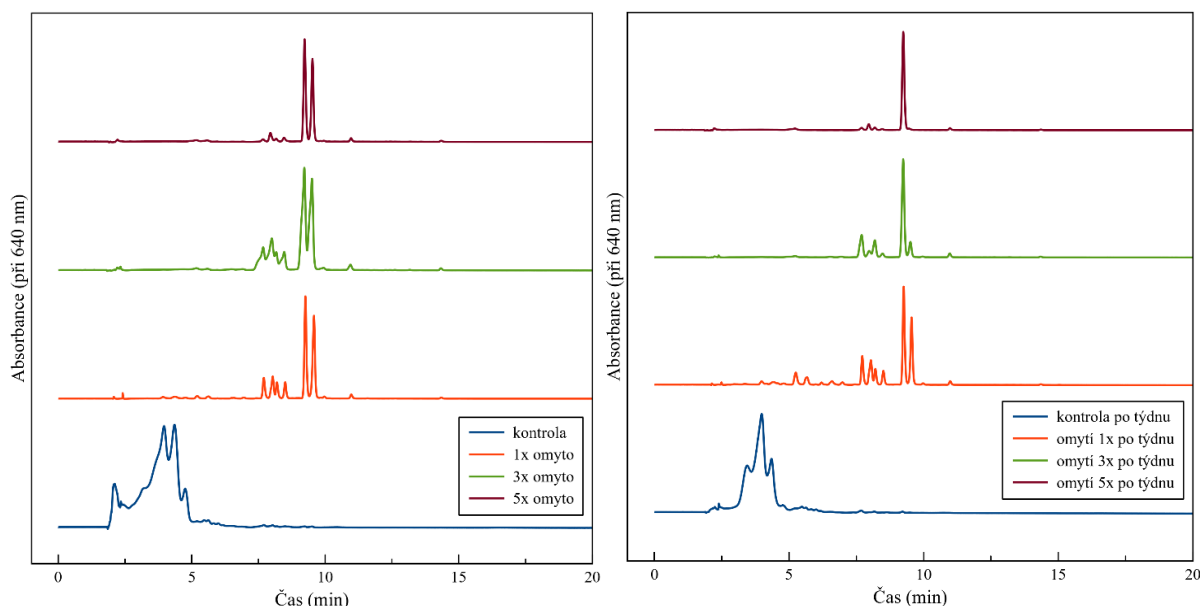
Ze zkumavky 1 byla odpipetována vrchní fáze obsahující pigment a byla vysušena pomocí dusíku. Z ostatních zkumavek byla odstraněna spodní vodní fáze a zbylý roztok esterifikovaného pigmentu byl následně promyt jedním nebo opakovaným přidáním 900 μ l vody. Po požadovaném počtu promytí byla vrchní fáze s pigmenty odebrána a vysušena. Byly tak získány vzorky s 1, 3 a 5ti násobným omytím. Omývání vodou bylo provedeno kvůli snížení pH a po každém omytí bylo změřeno pH vody pomocí papírového pH indikátoru (Tab. 4.2). Po změření pH vody po každém omytí bylo rozhodnuto, že omytí 5 $\times$ je vhodným postupem pro stabilizaci produktů, jelikož bylo dosaženo neutrálního pH.

Tab. 4.2: pH vodné fáze získané při omývání esterifikovaných vzorků fykocyanobilinu.

Počet omytí	pH po omytí				
	1×	2×	3×	4×	5×
1	0-1				
3	0-1	2-3	4-5		
5	0-1	2-3	4-5	6-7	7

Po odpaření éteru proudem plynného dusíku byly vzorky analyzovány na HPLC. Stabilita vzorků rozpuštěných v metanolu byla otestována po 7 dnech ve tmě při pokojové teplotě. Výsledek obou analýz je na obrázku (Obr. 4.8).

Pík samotného pigmentu v 2 min není patrný, většina pigmentu byla pozorována v oblasti 7 až 10 min. Hlavní dva píky s elučními časy 9,23 min a 9,53 min odpovídají butylesteru fykocyanobilinu (Malinová, 2020). Okolo 8 min byla zaznamenána skupina píků. Po týdnu nebyla pozorována významná změna, nebyl potvrzen výsledek předchozí práce (Malinová, 2020). U dvojpíku mezi 9 a 10 min došlo k významné změně poměru píků, kdy došlo ke snížení intenzity píku s delším retenčním časem. Tento efekt byl nejvýraznější u vzorku, který byl omyt 5×. Zřejmě zde dochází ke změně složení izomerů fykocyaninu, což lze pozorovat i na chromatogramu kontroly. Protože chromatogram 5× omytého vzorku naznačoval nejvyšší homogenitu, byl v další fázi práce použit jako standardní postup.



Obr. 4.8: HPLC chromatogramy butylesteru fykobilinů při testování vlivu omytí po esterifikaci na stabilitu esteru. (A) měření ihned po přípravě esteru, (B) měření stejných vzorků po 7 dnech uložených v temnu za pokojové teploty.

4.4. Změna metody esterifikace – hexylester a dodecylester

Stávající metoda esterifikace neumožňovala pracovat s delšími alkoholy, které se po reakci obtížně odstraňovaly z reakční směsi. Proto byl jako rozpouštědlo pro esterifikaci delšími alkoholy použit dichlormetan. V počáteční fázi byl přidán alkohol ve velkém nadbytku oproti fykocyanobilinu. Jak bylo již zmíněno v kapitole Materiál a metody, při esterifikaci za přítomnosti DCM byla použita dvě množství hexanolu v reakční směsi, a to v 2000× a 10000× nadbytku.

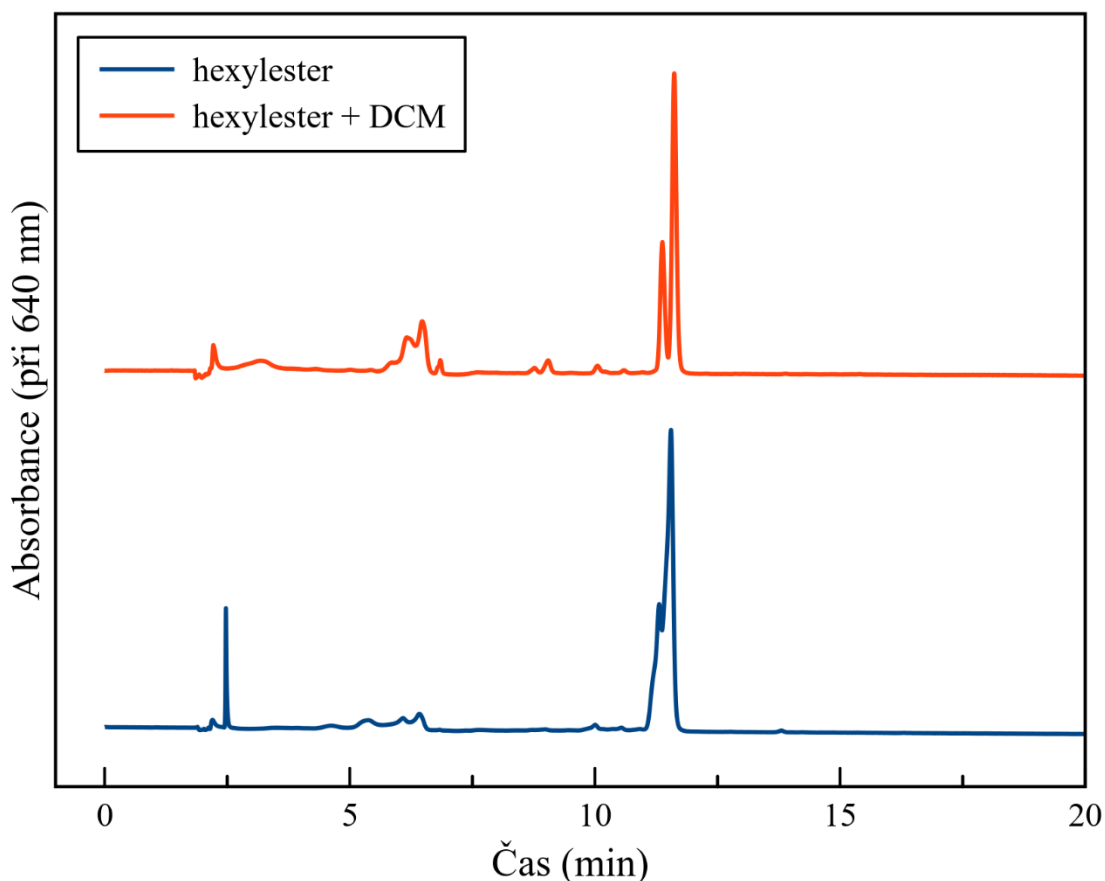
Kontrolní vzorek hexylesteru byl připraven identickým postupem, jako butylester v kapitole 4.3. Po esterifikaci již bylo použito omytí 5×. Zároveň byl připraven hexylester s DCM jako rozpouštědlem v 2000× nadbytku alkoholu (Obr. 4.9). Oba vzorky byly esterifikovány po dobu 3 hod a následně byly analyzovány na HPLC (Obr. 4.10).

V případě kontrolního hexylesteru se objevila nenápadná skupina píků okolo 6 min, což odpovídá času metylesteru fykocyanobilinu (Malinová, 2020). Hlavní dva píky s elučními časy 11,32 min a 11,55 min odpovídají hexylesteru fykocyanobilinu (Malinová, 2020) a obsahují většinu pigmentu. První pík obsahuje 24,43 % veškerého pigmentu, zatímco druhý pík obsahuje téměř trojnásobně více s 61,24 %.

U hexylesteru připravovaného s DCM v 2000× nadbytku hexanolu se také vyskytuje skupina píků okolo 6 minuty, která obsahuje oproti kontrolnímu hexylesteru více pigmentu. Hlavní dva píky hexylesteru s elučními časy 11,38 min a 11,62 min však obsahují většinu pigmentu. V prvním píku je obsaženo 19,48 % pigmentu, i v tomto případě obsahuje druhý pík větší množství pigmentu s hodnotou 43,14 %. Oproti kontrolnímu hexylesteru připravovaném původní metodou jsou oba píky více oddělené.



Obr. 4.9: Hexylester (vlevo) a hexylester s DCM (vpravo) po ukončení esterifikace a oddělení fází.



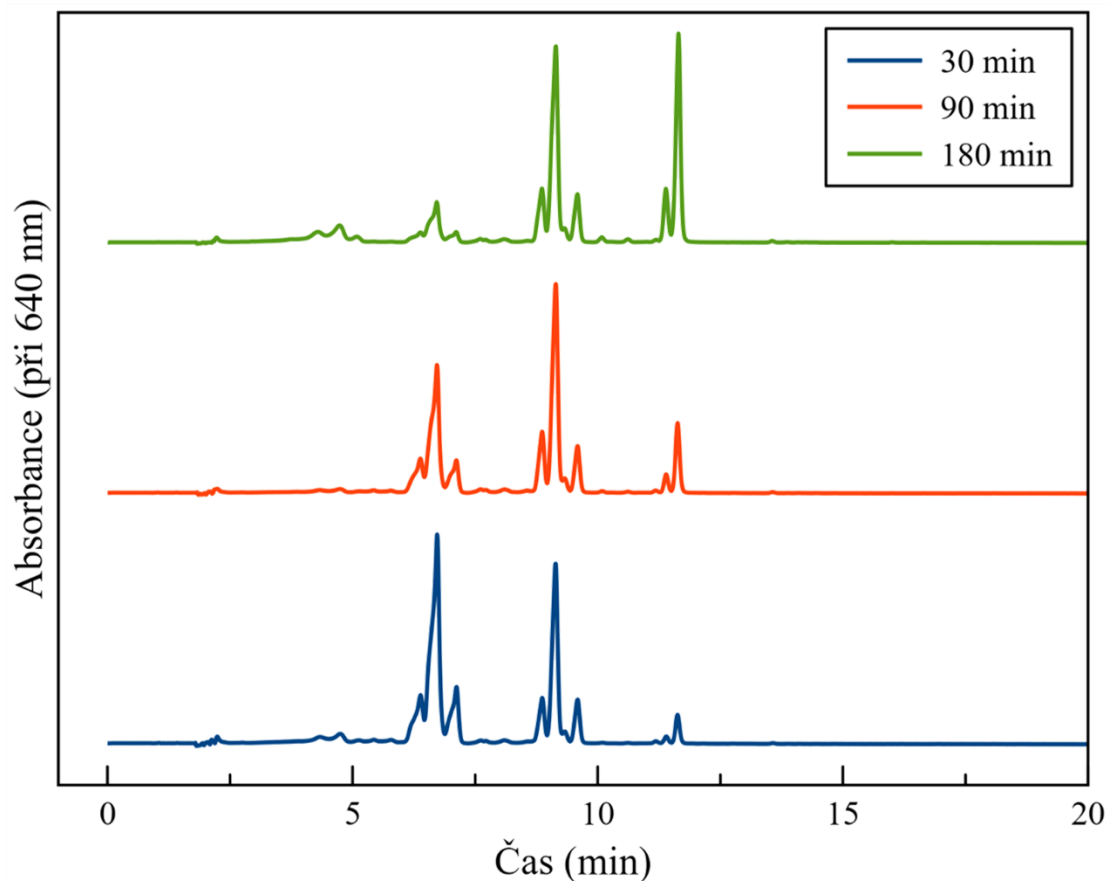
Obr. 4.10: Porovnání HPLC chromatogramů kontrolního vzorku hexylesteru připraveného původní procedurou a hexylesteru připraveného přidáním DCM s použitím 2000× nadbytku alkoholu.

V dalším kroku byly otestovány 3 časy esterifikace hexanolem – 30, 90 a 180 minut s DCM jako rozpouštědlem (Obr. 4.11). V tomto případě byl použit hexanol v 10000× nadbytku. Grafy se liší oproti první esterifikaci v 2000× nadbytku hexanolu, kde byly výrazné pouze dvě skupiny píků. V případě 10000× nadbytku hexanolu jsou jasně přítomné tři skupiny píků. První dvě skupiny jsou tvořeny třemi píky, poslední skupina sestává pouze ze dvou píků. První skupina píků okolo 6 až 7 min odpovídá metylesteru, druhá skupina okolo 9 min odpovídá butylesteru a poslední skupina s elučním časem mezi 11 a 12 min odpovídá hexylesteru (Malinová, 2020). V závislosti na čase docházelo ke změnám obsahu pigmentu v jednotlivých pících. První skupina píků se v čase zmenšovala z 59,51 % na 14,29 %. Vzhled druhé skupiny píků se neměnil, avšak obsah vzrostl za 180 min o 14,86 %. Obsah námi požadovaného hexylesteru vzrostl z 3,63 % na 33,99 % při čase 180 min.

Při esterifikačním čase 30 min zabírala první skupina píků 59,51 % celé plochy, z toho 66,86 % pigmentu se středním časem eluce 6,72 min bylo obsaženo v centrálním píku. Druhá skupina píků zabírala plochu 36,86 %, v centrálním píku se středním elučním časem 9,14 min bylo 69,50 % pigmentu. Poslední skupina píků zabírala nejméně plochy s pouhými 3,63 %, kde nejvyšší pík s elučním časem 11,63 min obsahoval 81,27 % pigmentu. Byla změřena absorpční spektra všech píků vzorku a bylo zjištěno, že se jedná o látku s identickým absorpčním spektrem. Na obrázku (Obr. 4.12a) je porovnání absorpčních spekter píků s největším obsahem pigmentu v jednotlivých skupinách píků, tedy centrální píky z první a druhé skupiny a druhý pík z poslední skupiny.

Při esterifikačním čase 90 min došlo k významné změně především u první skupiny píků, jejíž obsah celkové plochy se snížil na 40,55 %, obsah pigmentu v centrálním píku se prakticky nezměnil. U druhé skupiny píků došlo po 90 min k výraznému zvýšení obsahu plochy na 49,47 %. I v tomto případě zůstal obsah pigmentu v centrálním píku nezměněný. U třetí skupiny píků došlo k mírnému zvětšení plochy na 9,98 %. Porovnání absorpčních spekter centrálních píků je zobrazeno na obrázku (Obr. 4.12b).

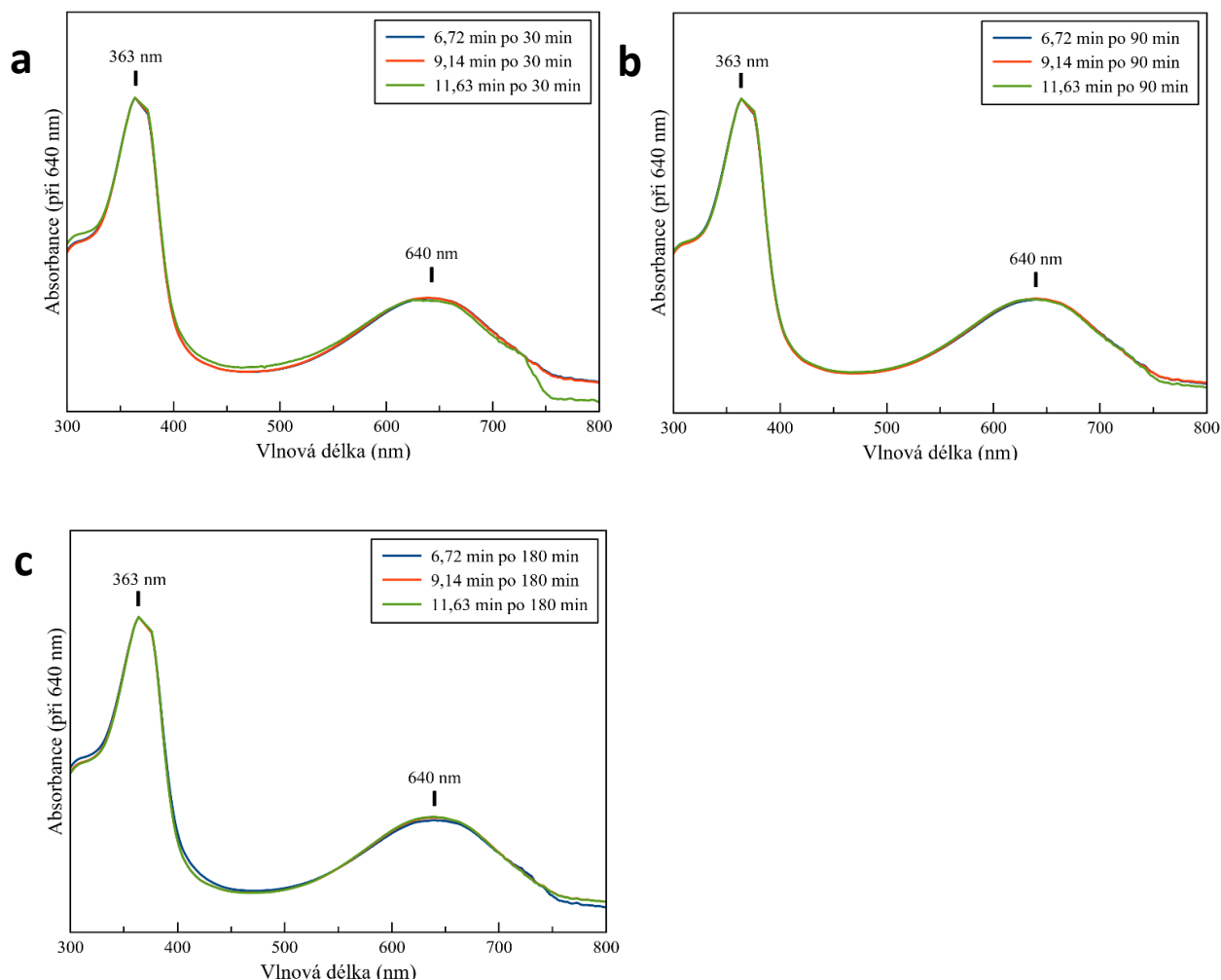
Při posledním testovaném esterifikačním čase 180 min došlo k výrazné změně oproti 30 min. V tomto případě téměř zmizela první skupina píků s pouhým obsahem plochy 14,29 %, zatímco třetí skupina píků vzrostla a zabírala celkový obsah plochy 33,99 %. Druhá skupina píků zabírá 51,72 % plochy, avšak při bližším zkoumání se její chromatogram prakticky neměnil. Největší změny probíhaly v první a třetí skupině píků. Absorpční spektra hlavních píků jsou zobrazena na obrázku (Obr. 4.12c). Absorpční spektra, která jsou prakticky identická, ukázala, že v jednotlivých pících je obsažen fykocyanobilin s maximy při 363 nm a 640 nm. Nejlepším časem esterifikace na hexylester s DCM se jeví nejdelší čas 180 min, kde byl z testovaných časů největší poměr hexylesteru.



Obr. 4.11: HPLC chromatogram hexylesteru s DCM esterifikovaném 30, 90 a 180 min v 10000× nadbytku alkoholu.

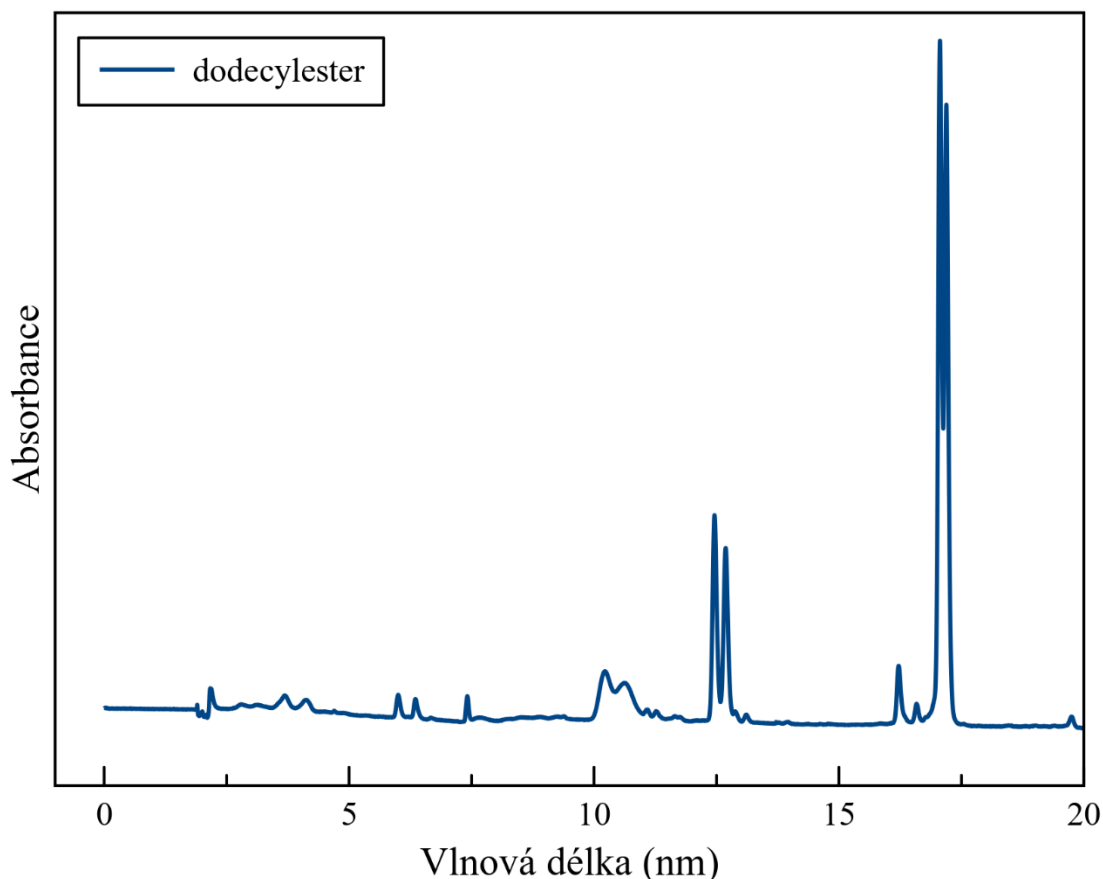
Tab. 4.3: Eluční časy a procenta plochy jednotlivých píků z HPLC po esterifikačním čase 30 min.

	Pík	Eluční čas (min)	Plocha po 30 min (%)	Plocha po 90 min (%)	Plocha po 180 min (%)
Skupina 1	1	6,38	9,56	7,11	2,30
	2	6,72	39,79	27,17	9,80
	3	7,12	10,16	6,27	2,19
Skupina 2	4	8,87	5,87	8,91	8,66
	5	9,14	25,62	34,23	36,01
	6	9,59	5,37	6,33	7,05
Skupina 3	7	11,40	0,68	1,99	6,45
	8	11,63	2,95	7,99	27,54



Obr. 4.12: Absorpční spektra nejvyšších píků z HPLC hexylesteru připraveného s 10000× nadbytkem hexanolu. a) Absorpční spektra hlavních píků z HPLC po 30 min esterifikace, b) absorpční spektra hlavních píků z HPLC po 90 min esterifikace, c) absorpční spektra hlavních píků z HPLC po 180 min esterifikace.

Bylo ukázáno, že metoda s DCM jako rozpouštědlem, je funkční a lze pokračovat v jejích dalších modifikacích. Pro ověření metody byl s DCM jako rozpouštědlem připraven 1-dodecylester s téměř stejným postupem přípravy, jako byl použit u 1-hexylesteru. Jediným rozdílem je doba esterifikace, kdy namísto 3 h bylo zvoleno 27 h z důvodu neznalosti potřebné délky esterifikace pro alkoholy delší, než je 1-hexanol. Na chromatogramu (Obr. 4.13) jsou viditelné hlavní 2 píky v časech 17,06 min a 17,20 min. Před hlavním dvojpíkem byl nižší dvojpík s elučními časy 12,46 min a 12,69 min a malá skupinka píků okolo 10 až 11 minuty.



Obr. 4.13: HPLC chromatogram dodecylesteru fykocyanobilinu.

4.5. Samoorganizující agregáty

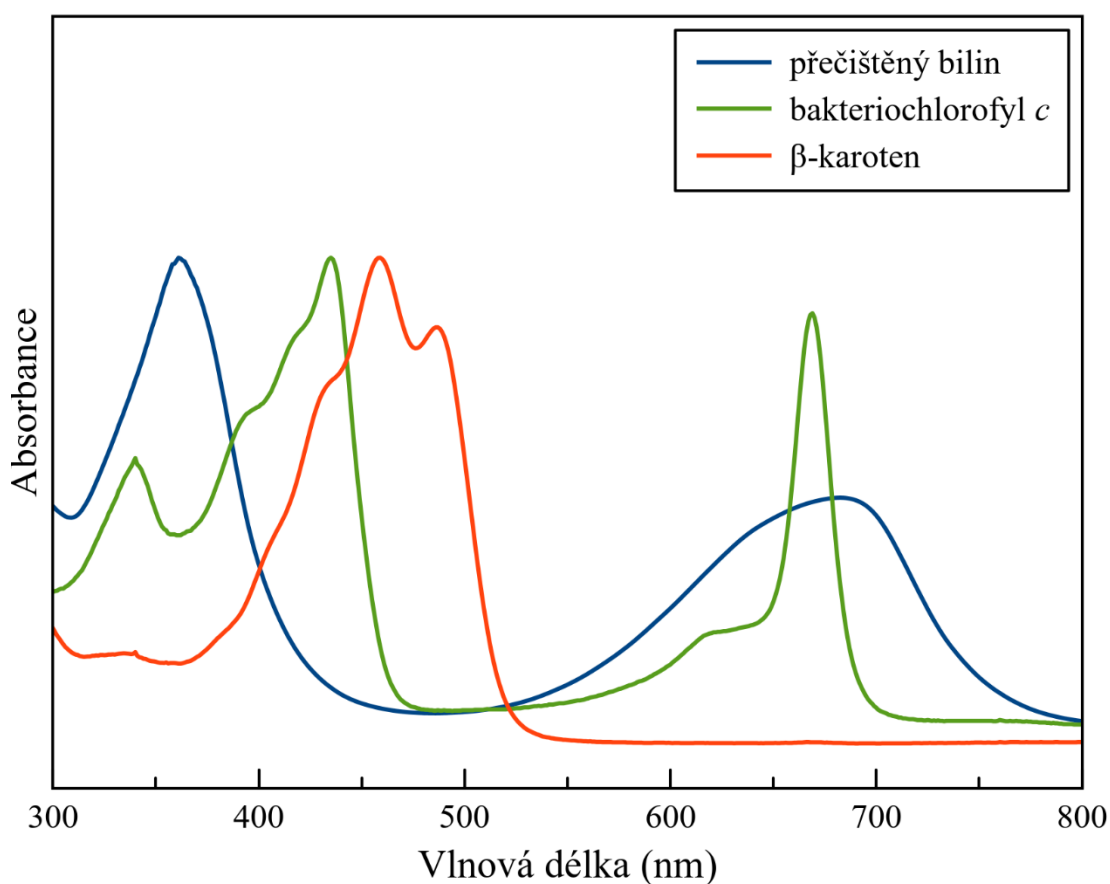
Poslední částí práce byla syntéza samoorganizujících agregátů za použití námi připravených fykobilinů pod odborným vedením doc. RNDr. Jakuba Pšenčíka, Ph.D. ve spolupráci s Mgr. Tomášem Malinou (z MFF UK v Praze), kterými byly poskytnuty vzorky BChl *c* a MGDG připravené v jejich laboratoři.

Pro kontrolu čistoty látek, používaných při tvorbě agregátů, a vypočtení jejich koncentrace pomocí Lambert-Beerova zákona, byla jako první změřena jejich absorpční spektra (Obr. 4.14). Zásobní roztok BChl *c* měl koncentraci $15 \mu\text{mol.l}^{-1}$, fykocyanobilin byl naředěn na výslednou koncentraci zhruba $6 \mu\text{mol.l}^{-1}$ a koncentrace β -karotenu rozpuštěného v nestabilizovaném THF, se kterým jsou běžně prováděny syntézy agregátů BChl *c*, byla $2 \mu\text{mol.l}^{-1}$.

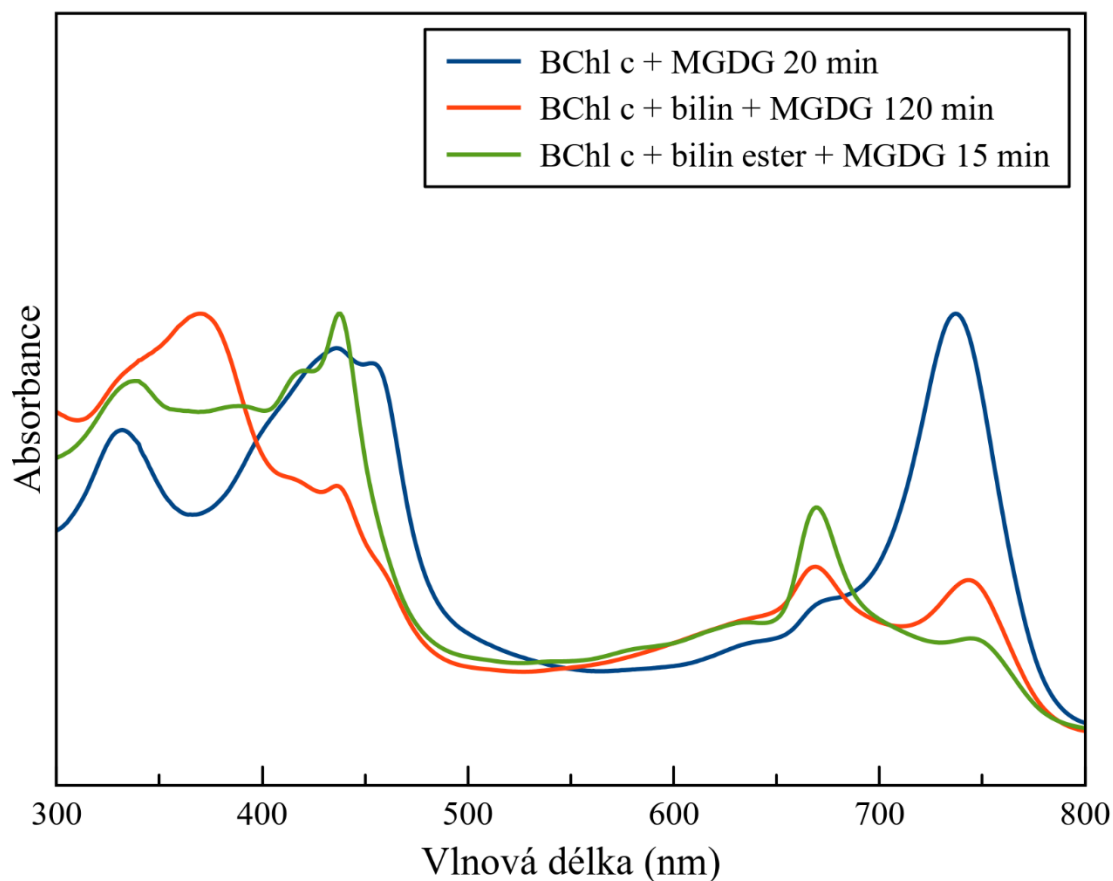
Pro zjištění kvality zásobního BChl *c* a jeho schopnosti tvořit agregáty byl proveden kontrolní pokus agregace BChl *c* v přítomnosti pouze MGDG, výsledek je znázorněn na obrázku (Obr. 4.15). Jako první byl tedy smíchán pouze BChl *c* s MGDG a pufrem. Vzorek byl promísen a po 20 min bylo měřeno absorpční spektrum. Na něm je vidět, že došlo k výraznému posunu absorpčního maxima BChl *c* o 68 nm do červené oblasti oproti čistému BChl *c*, což je důkazem tvorby agregátů.

Následně byla testována schopnost agregace BChl *c* s MGDG za přítomnosti čistého bilinu. Absorpční spektrum vzorku bylo měřeno po 120 min, kdy je ve spektru patrný nízký pík v červené oblasti tvorby agregátů BChl *c* se stále přítomným výrazným píkem v oblasti monomeru bakteriochlorofylu. Tato metoda tedy nefungovala tak dobře, jako při tvorbě agregátů ze samotného BChl *c* s MGDG.

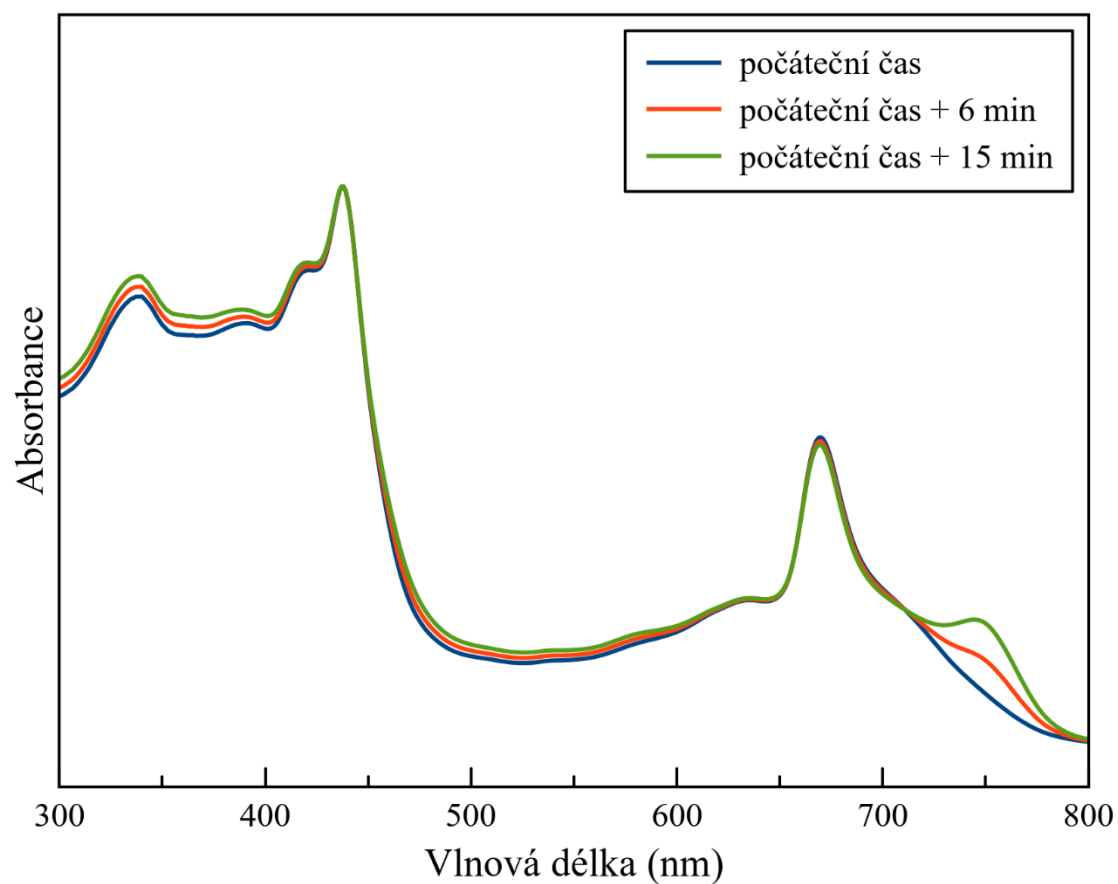
Jako poslední byl namísto přečištěného bilinu použit hexylester fykocyanobilinu. Absorpční spektrum tohoto vzorku bylo měřeno postupně i v čase (Obr. 4.16) pro názornou ukázkou vzniku agregátů. První měření proběhlo ihned po promíchání vzorku, druhé měření po 6 min a nakonec po 15 min. V červené oblasti tvorby BChl *c* agregátů lze pozorovat postupný vývoj píku s maximem při 745 nm.



Obr. 4.14: Absorpční spektra čistých látek použitých při tvorbě umělých agregátů.



Obr.4.15: Absorpční spektra reakčních směsí použitých při tvorbě BChl c agregátů.



Obr. 4.16: Absorpční spektrum vývoje tvorby agregátů při použití hexylesteru fykocyanobilinu, BChl c a MGDG s různými reakčními časy.

5. DISKUZE

5.1. Omytí po extrakci

V této práci byla použita sinice *Thermosynechococcus elongatus*, ze které byl fykocyanobilin izolován pomocí kyselé hydrolýzy podle O'Carra *et al.* (1964). Jednou z dalších možností izolace fykocyanobilinu je zahřívání v metanolu, což je podle Killilea, (1980) nevhodná metoda, jelikož uvolněný pigment má odlišné spektrum od původního fykocyanobilinu a jedná se tedy o jinou látku. Při kyselé hydrolýze k těmto modifikacím nedochází. V úvahu by bylo možné vzít i postup používaný při výrobě potravinářského barviva Spiruliny, vyrobené ze sušené biomasy sinic. Sušina je namáčena ve vodě, čímž jsou extrahovány ve vodě rozpustné proteiny, vodný extrakt je následně zfiltrován a stabilizován². Extrakt kromě fykocyaninu obsahuje nejspíš i další látky a není zřejmé, jaký by byl v tomto případě výtěžek fykobilinů.

Pro stabilizaci produktu po kyselé hydrolýze byly otestovány čtyři způsoby omývání, přičemž jedním ze způsobů bylo omývání 5 M NaCl podle Kim *et al.* (2021), které však podle analýzy HPLC (Obr. 4.5) nemělo očekávaný výsledek. Při omytí roztokem NaCl docházelo zjevně ke zvýšené izomerizaci fykocyanobilinu, což komplikuje analýzy, ale potenciálně by mohlo být využito pro získání konkrétního typu izomeru. V této fázi práce nebyly tedy nakonec při hydrolýze a purifikaci fykobilinů provedeny žádné modifikace a byl použit stejný postup jako v předchozí práci (Malinová, 2020).

5.2. Přechištění fykobilinů

Přechištění extrahovaného vzorku směsi fykobilinů bylo prováděno metodou TLC. Ve srovnání s předchozí prací (Malinová, 2020) byl extrahovaný vzorek v analýze rozdělen do dvou spektrálně téměř totožných modrých pruhů (Obr. 4.2). Spodní pruh měl absorpční spektrum bez viditelného znečištění (Obr. 4.3), zatímco horní pruh vzorku byl nepatrně znečištěný pravděpodobně feoforbidem nebo jiným rozpadovým produktem chlorofylu *a* (Klinger *et al.*, 2004). Důvod existence dvou pruhů v TLC není zřejmý. Může se jednat o důsledek nedokonale proběhlé hydrolýzy, kdy část bilinů obsahuje navázaný krátký řetězec proteinů. Jiné vysvětlení je možná existence relativně stabilního izomeru fykocyanobilinu, který by za určitých okolností mohl mít odlišnou mobilitu v TLC. Pro získání čisté formy fykocyanobilinu by mohlo pomoci opakované přechištění horního pruhu na TLC. Bylo by také vhodné otestovat vliv opakované hydrolýzy na tyto dva pruhy.

Při přečišťování na TLC destičkách může docházet k rozdílné migraci složek vzorku podle použitého sorbentu. Největším rizikem při používání této metody je riziko poškození sorbentu, například při nanášení vzorku nebo při manipulaci s destičkou. Jako náhradu by bylo možné použít chromatografii na otevřené koloně. Další možnou modifikací přečišťování za použití TLC by byla modifikace mobilní fáze, kdy Rüdiger & O'Carra (1968) doporučují benzen, petroleum éter a metanol v poměru (50 : 10 : 6, v/v).

5.3. Omytí po esterifikaci

Vzorky esterů bilínů v předchozí práci (Malinová, 2020) nebyly stabilní a při uložení v metanolu docházelo k jejich přeměně na metylestery. V ÓhEocha (1963 a 1966) byl hydrolyzát několikrát omyt vodou a neutralizován octanem sodným. Zatímco v předchozí práci byly esterifikované vzorky omyty vodou pouze jedenkrát, v našem případě bylo provedeno testování různého počtu omytí. Podle HPLC analýzy (Obr. 4.8) nedocházelo již po důkladném omytí k přeměně vyšších esterů na metylester jako u Malinové (2020), což bylo v této práci způsobeno pravděpodobně nízkým pH a přítomností metanolu. S počtem omytí rostla také homogenita vzorku, snižoval se počet izomerů v HPLC. Ihned po esterifikaci byl pigment obsažen ve dvou hlavních píkách, které mohou představovat dva izomery fykocyanobilinu. Po týdnu v metanolu došlo v případě 5x omytého vzorku k úplné homogenizaci, kdy se pigment vyskytoval již jen v jednom hlavním píku. Z obrázku 4.8 je patrné, že nižší pH způsobuje tvorbu dvou izomerů esterifikovaného bilinu, které se udržují v rovnováze. U neutralizovaného vzorku dojde po určitém čase k tvorbě pouze jednoho stabilního izomeru. V literatuře je popsána řada izomerů bilínů, není však potvrzené, že na izomerizaci má vliv pH. Je však velmi pravděpodobné, že některé formy izomerace jsou závislé na teplotě (Braslavsky *et al.*, 1983). Zatímco vzorky v předchozí práci byly uloženy v temnu při 4 °C, v našem případě byly vzorky uloženy při pokojové teplotě. To by mohlo mít společně s pH vliv na izomeraci.

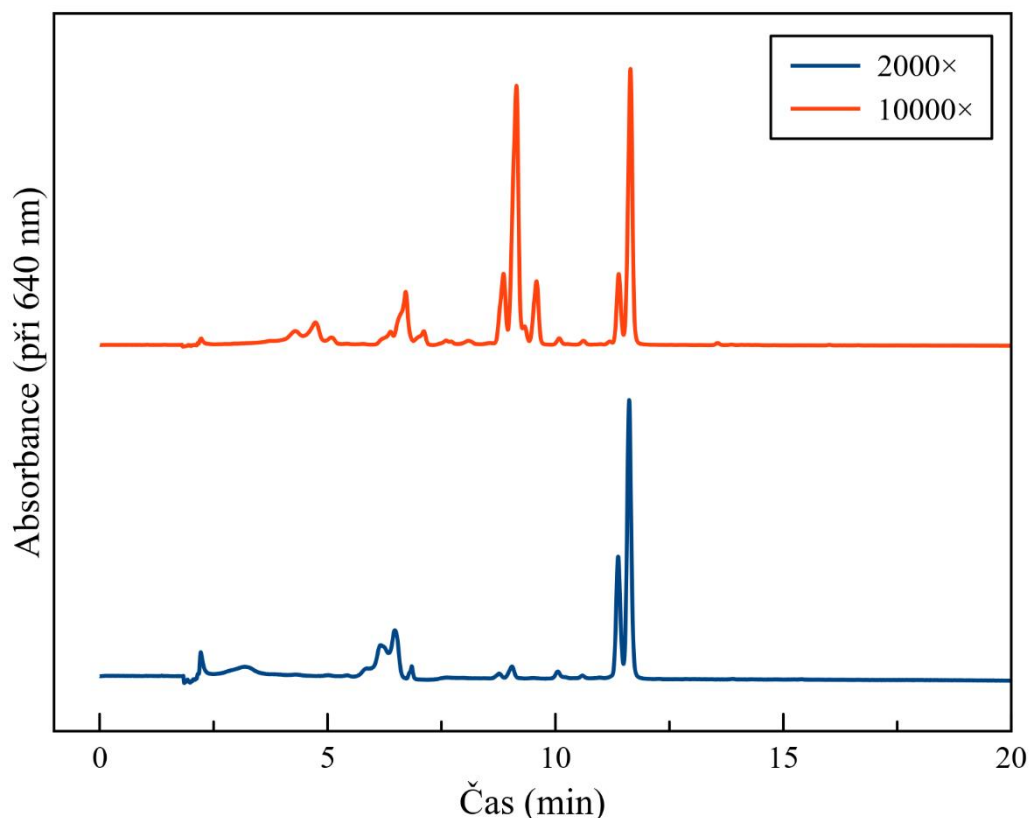
5.4. Modifikace esterifikace použitím DCM

Postup esterifikace v předešlé práci (Malinová, 2020) neumožňuje práci s delšími alkoholy z důvodu jejich dlouhého vypařování, kdy vypařování pod proudem plynného dusíku trvalo i déle než 40 min. Metodu jsme proto modifikovali využitím dichlormetanu jako rozpouštědla bilinu, ke kterému byl přidán vlastní vyšší alkohol a kyselina.

Výsledný HPLC chromatogram z prvního testu metod se výrazně lišil od dalších pokusů, kdy jsme testovali různě dlouhé časy esterifikace s DCM a hexanolem (Obr. 5.1). V těchto případech se v chromatogramu vyskytovaly kromě píků hexylesteru také píky v elučních časech odpovídajících metylesteru a butylesteru. V závislosti na délce inkubace se poměry jednotlivých píků měnily (Obr. 4.11). Stejně tak i v případě zkoušeného dodecylesteru (Obr. 4.13) došlo k výskytu většího počtu píků v elučních časech, které by odpovídaly hexylesteru a pravděpodobně oktylesteru. To by mohlo být způsobeno odlišnou čistotou nebo dokonce složením purifikovaných bilinů, které byly v této práci přechištěvány pouze metodou TLC. V další práci by bylo vhodné vyzkoušet přechištění pomocí HPLC (Beale & Cornejo, 1991) nebo jinou metodou. Dalším vysvětlením by mohlo být znečištění námi používaného 99% hexanolu nebo dodekanolu. Ty jsou průmyslově vyráběny oligomerizací z etylenu, při které jsou syntetizovány alkoholy se sudým počtem uhlíků. Požadovaný alkohol je pak získán destilací, kdy v této fázi může dojít ke znečištění nižšími alkoholy jejich nedostatečným oddělením (Noweck *et al.*, 2006).

V případě prvního testu esterifikace vyšším alkoholem bylo použito pouze 2000× více alkoholu, zatímco v dalších pokusech jsme používali 10000× více alkoholu. Lze předpokládat, že v případě většího nadbytku vyššího alkoholu s příměsí nižších alkoholů bude docházet k preferenční esterifikaci nižšími alkoholy. Jedním z možných vysvětlení by mohla být pouhá kinetika, kdy kratší alkoholy mají lepší pohyblivost v reakčním prostředí než dlouhé alkoholy a mohly by se tedy rychleji navázat na esterifikovaný bilin. Preferenční navazování kratších alkoholů by mohlo být způsobeno i přítomností DCM, kdy neznáme přesné reakční mechanismy esterifikace v přítomnosti DCM.

S delším esterifikačním časem se zvyšuje poměr vyšších esterů, kdy nadbytek vyšších alkoholů způsobí posunutí reakce k produkci vyšších esterů. V našem případě bylo nejdelším testovaným časem esterifikace 180 min, tedy 3 hodiny. V další práci by bylo vhodné otestovat delší esterifikační časy, např. 6, 8 nebo 12 hodin. Je vidět, že v případě delšího alkoholu, jako je dodecylalkohol, i po 27 hod trvající esterifikaci na dodecylester obsahuje vzorek i nižší estery. To by mohlo být způsobeno již zmíněným omezením rychlosti pohybu alkoholů s delšími uhlíkatými řetězci a potřeby delších časů pro dostatečnou esterifikaci bilinů vyššími alkoholy.



Obr. 5.1: Porovnání HPLC chromatogramů hexylesteru při použití rozdílného množství hexanolu (2000× resp. 10000×) v reakční směsi. Modrá – hexylester připravený s použitím 2000× množství hexanolu. Červená – hexylester připravený s použitím 10000× množství hexanolu. Vše esterifikováno po dobu 3 hodin.

5.5. Agregáty

Výsledky tvorby agregátů v této práci nebyly příliš uspokojivé, jelikož s přečištěným fykocyanobilinem agregáty vznikaly hůře než bez něj. S hexylesterem fykocyanobilinu, kde byla předpokládána vyšší účinnost, vznikaly agregáty ještě méně. Podle informací kolegů z MFF UK ale BChl c použitý v našich experimentech popsanych výše nebyl dostatečně kvalitní a netvořil agregáty ani v některých podmínkách, ve kterých běžně agregáty tvoří. Z důvodu vysoké citlivosti na hydrofobní interakce je kontaminace použitých složek reakční směsi častým problémem při tvorbě umělých agregátů (Klinger, 2004, Alster, 2010, Malina, 2021).

Použitý hexylester fykocyanobilinu byl připraven původní metodou z práce Malinové (2020), bez použití DCM jako rozpouštědla. Pro budoucí práce by bylo dobré otestovat estery, ve kterých bylo použito DCM jako rozpouštědlo. Zajímavé by bylo také testování tvorby agregátů s biliny s různě dlouhými esterifikovanými alkoholy.

6. ZÁVĚR

V první části práce byla otestována vhodnost používání omývání vzorku bezprostředně po izolaci a extrakci do chloroformu a po vlastní esterifikaci alkoholem. Omývání po extrakci do chloroformu způsobuje velké ztráty a není tedy vhodné jej do procesu izolace zařadit. Naproti tomu omývání směsi po esterifikaci zvýšilo stabilitu i čistotu vzorku esterifikovaných bilinů, kdy je nutné pro optimální výsledek provést 5× omytí vzorku deionizovanou vodou.

Dále byla otestována nová metoda esterifikace, která umožňuje získat estery delších alkoholů. Metoda spočívá ve využití dichlormetanu jako rozpouštědla, což eliminuje problém s odstraněním nezreagovaného alkoholu ze směsi produktů. Další práce by měla metodu optimalizovat, otestovat menší nadbytky alkoholů a zjistit možnosti získání mono- či di- esterů fykobilinů.

Závěrem byla vyzkoušena inkorporace fykocyanobilinu a jeho hexylesteru do agregátů BChl c. V rámci práce se sice podařilo získat malé množství agregátů obsahujících fykocyanobilin a jeho hexylester, nicméně testované postupy nevedly k potřebným vysokým výtěžkům.

7. CITOVANÁ LITERATURA

1. ALSTER, J., POLÍVKA, T., ARELLANO, J.B., CHÁBERA, P., VÁCHA F., PŠENČÍK J. B-Carotene to bacteriochlorophyll c energy transfer in self-assembled aggregates mimicking chlorosomes. *Chemical Physics*. 2010, 373(1-2), 90-97. ISSN 03010104. Dostupné z: doi:10.1016/j.chemphys.2010.02.006
2. BEALE, S.I. Biosynthesis of phycobilins. *Chemical Reviews*. 1993, 93(2), 785-802. ISSN 0009-2665. Dostupné z: doi:10.1021/cr00018a008
3. BEALE, S.I., CORNEJO, J. Biosynthesis of Phycobilins. *Chemical Reviews*. 1991;966(33): 22333-22340.
4. 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. Dostupné z: doi:10.1006/bbrc.2001.5195
5. 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. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00237a039
6. BLUM, F. High performance liquid chromatography. *British Journal of Hospital Medicine*. 2014, **75**(Sup2), C18-C21. ISSN 1750-8460. Dostupné z: doi:10.12968/hmed.2014.75.Sup2.C18
7. BRASLAVSKY, S.E., HOLZWARTH A.R., SCHAFFNER K. Solution Conformations, Photophysics, and Photochemistry of Bile Pigments; Bilirubin and Biliverdin, Dimethyl Esters and Related Linear Tetrapyrroles. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1983, **22**(9), 656-674. ISSN 0570-0833. Dostupné z: doi:10.1002/anie.198306561
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. ISSN 0302-8933. Dostupné z: doi:10.1007/BF00446810
9. BU, A. Correlating Core Analysis and Well Logging: The Stezyca Oil and Gas Field. *Oil & Gas Research*. 2016, **2**(2). ISSN 24720518. Dostupné z: doi:10.4172/2472-0518.1000113

10. CLAYDEN, J., GREEVES, N., WARREN S.G. *Organic chemistry*. 2nd ed. New York: Oxford University Press, c2012. ISBN 978-0-19-927029-3.
11. DRBAL, K., KŘÍŽEK, M. *Analytická chemie*. Č. Budějovice: ZF JU, 1999. ISBN 80-7040-352-7.
12. DUMAY, J., MORANÇAIS, M., MUNIER, M., LE GUILLARD, C., FLEURENCE, J. Phycoerythrins. *Sea Plants*. Elsevier, 2014, 2014, s. 321-343. *Advances in Botanical Research*. ISBN 9780124080621. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-408062-1.00011-1
13. DUMAY, J., MORANÇAIS, M. Proteins and Pigments. *Seaweed in Health and Disease Prevention*. Elsevier, 2016, 2016, s. 275-318. ISBN 9780128027721. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-802772-1.00009-9
14. FISCHER, E., SPEIER, A. Darstellung der Ester. *Berichte der deutschen chemischen Gesellschaft*. 1895, **28**(3), 3252-3258. ISSN 0365-9496. Dostupné z: doi:10.1002/cber.189502803176
15. FRANK, H.A., COGDELL, R.J. 8.6 Light Capture in Photosynthesis. *Comprehensive Biophysics*. Elsevier, 2012, s. 94-114. ISBN 9780080957180. Dostupné z: doi:10.1016/B978-0-12-374920-8.00808-0
16. FU, E, L FRIEDMAN a H W SIEGELMAN. Mass-spectral identification and purification of phycoerythrobilin and phycocyanobilin. *Biochemical Journal*. 1979, **179**(1), 1-6. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1790001
17. FURUMAKI, S., VACHA, F., HIRATA, S., VACHA, M. Bacteriochlorophyll Aggregates Self-Assembled on Functionalized Gold Nanorod Cores as Mimics of Photosynthetic Chlorosomal Antennae: A Single Molecule Study. *ACS Nano*. 2014, **8**(3), 2176-2182. ISSN 1936-0851. Dostupné z: doi:10.1021/nn500224v
18. GILLES, V., VIEIRA, M.A., LACERDA JR., V., CASTRO, E.V.R., SANTOS, R.B., ORESTES, E., CARNEIRO, J.W.M., GRECO, S.J. A New, Simple and Efficient Method of Steglich Esterification of Juglone with Long-Chain Fatty Acids: Synthesis of a New Class of Non-Polymeric Wax Deposition Inhibitors for Crude Oil. *Journal of the Brazilian Chemical Society*. 2015, Vol. 26, No. 1, 74-83. ISSN 0103-5053. Dostupné z: doi:10.5935/0103-5053.20140216
19. GLAZER, A.N. Phycobiliproteins — a family of valuable, widely used fluorophores. *Journal of Applied Phycology*. 1994, **6**(2), 105-112. ISSN 0921-8971. Dostupné z: doi:10.1007/BF02186064

20. GLAZER, A.N., HIXSON, C.S. Characterization of R-phycoerythrin. Chromophore content of R-phycoerythrin and C-phycoerythrin. *Journal of Biological Chemistry*. 1975, **250**(14), 5487-5495. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(19)41208-8
21. GONZALEZ, R., RODRIGUEZ, S., ROMAY, C., ANCHETA, O., GONZALEZ, A., ARMESTO, J., REMIREZ, D., MERINO, N. Anti-inflammatory activity of phycoerythrin extract in acetic acid-induced colitis in rats. *Pharmacological research*, 1999, **39**(1), 55-59. ISSN 10436618. Dostupné z: doi:10.1006/phrs.1998.0409
22. GREBER, G. Vogel's textbook of practical organic chemistry (5th ed.), revised by Brian S. Furniss, Antony J. Hannaford, Peter W. G. Smith, and Austin R. Tatchell, John Wiley & Sons, New York, 1514 pp. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry*. 1991, **29**(8), 1223-1223. ISSN 0887624X. Dostupné z: doi:10.1002/pola.1991.080290821
23. GUILLARD, R. R.L., LORENZEN, C.J. Yellow-Green algae with Chlorophyllide c 1,2. *Journal of Phycology*. 1972, **8**(1), 10-14. ISSN 00223646. Dostupné z: doi:10.1111/j.1529-8817.1972.tb03995.x
24. HIRATA, T., TANAKA, M., OOIKE, M., TSUNOMURA, T., NIIZEKI, N., SAKAGUCHI, M. Radical Scavenging Activity of Phycoerythrin Prepared from the Cyanobacterium, *Spirulina platensis*. *Fisheries science*. 1999, **65**(6), 971-972. ISSN 0919-9268. Dostupné z: doi:10.2331/fishsci.65.971
25. HIRATA, T., TANAKA, M., OOIKE, M., TSUNOMURA, T., SAKAGUCHI, M. *Journal of Applied Phycology*. 2000, **12**(3/5), 435-439. ISSN 09218971. Dostupné z: doi:10.1023/A:1008175217194
26. HOFFMAN, R.V. *Organic Chemistry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2004. ISBN 9780471648734. Dostupné z: doi:10.1002/0471648736
27. CHURÁČEK, J. *Nové trendy v teorii a instrumentaci vybraných analytických metod*. Vyd. 1. Praha: Academia, 1993
28. IKEUCHI, M., ISHIZUKA, T. Cyanobacteriochromes: a new superfamily of tetrapyrrole-binding photoreceptors in cyanobacteria. *Photochemical & Photobiological Sciences*. 2008, **7**(10). ISSN 1474-905X. Dostupné z: doi:10.1039/b802660m

29. Inositol hexanicotinate (inositol hexaniacinate) as a source of niacin (vitamin B3) added for nutritional purposes in food supplements. *EFSA Journal*. 2009, 7(2). ISSN 18314732. Dostupné z: doi:10.2903/j.efsa.2009.949
30. ISHIZUKA, T., NARIKAWA, T.R., KOHCHI, 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. Dostupné z: doi:10.1093/pcp/pcm106
31. JEFFREY, S.W., WRIGHT, S.W.; MANTOURA, R.F.C. (ed.). *Phytoplankton pigments in oceanography: guidelines to modern methods*. Paris, France: Unesco Pub., 2005.
32. JIANG, L., WANG, Y., YIN, O., LIU, G., LIU, H., HUANG, Y., LI, B. Phycocyanin: A Potential Drug for Cancer Treatment. *Journal of Cancer*. 2017, **8**(17), 3416-3429. ISSN 1837-9664. Dostupné z: doi:10.7150/jca.21058
33. 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.
34. KILLILEA, S.D.; O'CARRA, P.; MURPHY, R.F. Structures and apoprotein linkages of phycoerythrobilin and phycocyanobilin. *Biochemical Journal*. 1979, **187**(2), 311-320. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1870311
35. KIM, W., KIM, M., HONG, M., PARK, W. Killing effect of deinoxanthins on cyanobloom-forming *Microcystis aeruginosa*: Eco-friendly production and specific activity of deinoxanthins. *Environmental Research*. 2021, **200**. ISSN 00139351. Dostupné z: doi:10.1016/j.envres.2021.111455
36. 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. Dostupné z: doi:10.1016/bs.abr.2019.01.002

37. KLINGER, P., ARELLANO, J.B., VÁCHA, F., HÁLA, J., PŠENČÍK, J. Effect of Carotenoids and Monogalactosyl Diglyceride on Bacteriochlorophyll c Aggregates in Aqueous Buffer: Implications for the Self-assembly of Chlorosomes¶. *Photochemistry and Photobiology*. 2004, **80**(3), 572-578. ISSN 00318655. Dostupné z: doi:10.1111/j.1751-1097.2004.tb00131.x
38. MACCOLL, Robert. Cyanobacterial Phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*. 1998, **124**(2-3), 311-334. ISSN 10478477. Dostupné z: doi:10.1006/jsbi.1998.4062
39. MALINA, T., KOEHORST, R., BÍNA, D., PŠENČÍK, J., VAN AMERONGEN, H. Superradiance of bacteriochlorophyll c aggregates in chlorosomes of green photosynthetic bacteria. *Scientific Reports*. 2021, **11**(1). ISSN 2045-2322. Dostupné z: doi:10.1038/s41598-021-87664-3
40. MALINOVÁ, K., 2020: Phycobilin pigments as building blocks of artificial light-harvesting structures. BSc. Thesis in English,- 41 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.
41. MARGALIT, Y., CRUM, J. *Concepts in Wine Chemistry*. San Francisco: Wine Appreciation Guild, 1997.
42. 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. Dostupné z: doi:10.1002/9781118567166.ch2
43. MCMURRY, J. *Organická chemie*. Přeložil Jaroslav JONAS. Brno: VUTIUM, c2007. Překlady vysokoškolských učebnic. ISBN 978-80-214-3291-8.
44. NOVÁKOVÁ, L., DOUŠA, M. ČESLA. P. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 2. přepracované a rozšířené vydání. Brno: Česká chromatografická škola, zapsaný spolek, 2021. ISBN 978-80-270-8559-0.
45. NOWECK, K., GRAFAHREND, W. (2006). *Fatty Alcohols*. *Ullmann's Encyclopedia of Industrial Chemistry*. Weinheim, Germany: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co., 2006, 14, s. 117-142. ISBN 3527306730. Dostupné z: doi:10.1002/14356007.a10_277.pub2
46. O'CARRA, P., ÓHEOCHA, C., CARROLL, D.M. Spectral Properties of the Phycobilins. II. Phycoerythrobilin *. *Biochemistry*. 1964, **3**(9), 1343-1350. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00897a026

47. O'CARRA, P, MURPHY, R.F., KILLILEA, S.D. The native forms of the phycobilin chromophores of algal biliproteins. A clarification. *Biochemical Journal*. 1980, **187**(2), 303-309. ISSN 0264-6021. Dostupné z: doi:10.1042/bj1870303
48. O'CARRA, P., ÓHEOCHA, C. Bilins released from algae and biliproteins by methanolic extraction. *Phytochemistry*. 1966, **5**(5), 993-997. ISSN 00319422. Dostupné z: doi:10.1016/S0031-9422(00)82796-X
49. ÓHEOCHA, C. Comparative biochemical studies of the phycobilins. *Archives of Biochemistry and Biophysics*. 1958, **73**(1), 207-219. ISSN 00039861. Dostupné z: doi:10.1016/0003-9861(58)90256-X
50. ÓHEOCHA, C. Spectral Properties of the Phycobilins. I. Phycocyanobilin *. *Biochemistry*. 1963, **2**(2), 375-382. ISSN 0006-2960. Dostupné z: doi:10.1021/bi00902a034
51. PAGELS, F., GUEDES, A.C., AMARO, H.M., KIJOA, A., VASCONCELOS, V. Phycobiliproteins from cyanobacteria: Chemistry and biotechnological applications. *Biotechnology Advances*. 2019, **37**(3), 422-443. ISSN 07349750. Dostupné z: doi:10.1016/j.biotechadv.2019.02.010
52. PRIYADARSHINI, R., RAJ, G., SHEWADE, D. Chromatography—The essence of bioanalysis. *Eur. J. Biomed. Pharm. Sci.* 2016, **3**, 366– 377.
53. PROSSER, V. *Experimentální metody biofyziky*. Praha: Academia, 1989. ISBN 80-200-0059-3
54. PŠENČÍK, J., IKONEN, T.P., LAURINMÄKI, P., MERCKEL, M.C., BUTCHER, S.J., SERIMAA, R.E., TUMA, R. Lamellar Organization of Pigments in Chlorosomes, the Light Harvesting Complexes of Green Photosynthetic Bacteria. *Biophysical Journal*. 2004, **87**(2), 1165-1172. ISSN 00063495. Dostupné z: doi:10.1529/biophysj.104.040956
55. PUTERBAUGH, W.H., VANSELOW, C.H., NELSON, K., SHRAWDER, E.J. Esterification for the introductory organic laboratory course: A modified Dean-Stark trap. *Journal of Chemical Education*. 1963, **40**(7). ISSN 0021-9584. Dostupné z: doi:10.1021/ed040p349
56. RAVI, M., TENTU, S., BASKAR, G., *et al.* Molecular mechanism of anti-cancer activity of phycocyanin in triple-negative breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2015, **15**(1). ISSN 1471-2407. Dostupné z: doi:10.1186/s12885-015-1784-x

57. RÜDIGER, W. a P. Ó CARRA. Studies on the Structures and Apoprotein Linkages of the Phycobilins. *European Journal of Biochemistry*. 1969, **7**(4), 509-516. ISSN 00142956. Dostupné z: doi:10.1111/j.1432-1033.1969.tb19637.x
58. SCHEER, H. Light-Harvesting in Photosynthesis. *Acta Physica Polonica A*. 2012, **122**(2), 247-251. ISSN 0587-4246. Dostupné z: doi:10.12693/APhysPolA.122.247
59. SCHEER, H. The Pigments. GREEN, B.R., PARSON, W.W., ed. *Light-Harvesting Antennas in Photosynthesis*. Dordrecht: Springer Netherlands, 2003, 2003, s. 29-81. *Advances in Photosynthesis and Respiration*. ISBN 978-90-481-5468-5. Dostupné z: doi:10.1007/978-94-017-2087-8_2
60. SCHEER, H., ZHAO, K.H., Biliprotein maturation: the chromophore attachment. *Molecular Microbiology*. 2008, **68**(2), 263-276. ISSN 0950382X. Dostupné z: doi:10.1111/j.1365-2958.2008.06160.x
61. SCHLUCHTER, W.M., SHEN, G., ALVEY, R.M., BISWAS, A., SAUNÉE, N.A., WILLIAMS, S.R., MILLE, C.A., BRYANT, D.A. Phycobiliprotein Biosynthesis in Cyanobacteria: Structure and Function of Enzymes Involved in Post-translational Modification. HALLENBECK, Patrick C., ed. *Recent Advances in Phototrophic Prokaryotes*. New York, NY: Springer New York, 2010, 2010-4-15, s. 211-228. *Advances in Experimental Medicine and Biology*. ISBN 978-1-4419-1527-6. Dostupné z: doi:10.1007/978-1-4419-1528-3_12
62. SMITH, K.M., KEHRES L.A., FAJER, J. Aggregation of the bacteriochlorophylls c, d, and e. Models for the antenna chlorophylls of green and brown photosynthetic bacteria. *Journal of the American Chemical Society*. 1983, **105**(5), 1387-1389. ISSN 0002-7863. Dostupné z: doi:10.1021/ja00343a062
63. SUMBY, K.M., GRBIN, P.R., JIRANEK, V. Microbial modulation of aromatic esters in wine: Current knowledge and future prospects. *Food Chemistry*. 2010, **121**(1), 1-16. ISSN 03088146. Dostupné z: doi:10.1016/j.foodchem.2009.12.004
64. 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. ISSN 00219258. Dostupné z: doi:10.1016/S0021-9258(18)92852-8

65. ŠETLÍK, I., SEIDLOVÁ, F., ŠANTRŮČEK, J. (2004): Fyziologie rostlin. *Jihočeská univerzita, Přírodovědecká fakulta, České Budějovice*, 1998. Dostupné z www.natur.cuni.cz/biochem/kucera/rostliny/is/fyzros.html
66. TUWALSKA, D., STARZAK, K., SZOT, D., WYBRANIEX, S., WINTERHALTER, P.; JERZ, G. Semi-synthesis of red beet betacyanin ethyl-esters by esterification. *Challenges of Modern Technology*. 2014, 5, 27–37.
67. WALL, P.E. *Thin-Layer Chromatography*. Cambridge: Royal Society of Chemistry, 2005. RSC Chromatography Monographs. ISBN 978-0-85404-535-8. Dostupné z: [doi:10.1039/9781847552464](https://doi.org/10.1039/9781847552464)
68. WAN, D.H., ZHENG, B.Y., KE, M.R., DUAN, K.Y., ZHENG, Y.Q., YEH, C.K., HUANG, J.D.C-Phycocyanin as a tumour-associated macrophage-targeted photosensitiser and a vehicle of phthalocyanine for enhanced photodynamic therapy. *Chemical Communications*. 2017, **53**(29), 4112-4115. ISSN 1359-7345. Dostupné z: [doi:10.1039/C6CC09541K](https://doi.org/10.1039/C6CC09541K)
69. WANG, Z. *Comprehensive Organic Name Reactions and Reagents*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, 2010. ISBN 9780470638859. Dostupné z: [doi:10.1002/9780470638859](https://doi.org/10.1002/9780470638859)
70. WILDMAN, R.B., BOWEN, C.C. Phycobilisomes in Blue-Green Algae. *Journal of Bacteriology*. 1974, **117**(2), 866-881. ISSN 0021-9193. Dostupné z: [doi:10.1128/jb.117.2.866-881.1974](https://doi.org/10.1128/jb.117.2.866-881.1974)
71. WILLIAMS, J.R., MYERS, K.E., OWENS, M.M., BONNE, M.A. “Food quality indicator”. Patent No. US 2006/00570022 A1.
72. 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. Dostupné z: [doi:10.1142/9789814397605_0005](https://doi.org/10.1142/9789814397605_0005)
73. ZIMMERMANN, H., RUDOLPH, J. Protonic States and the Mechanism of Acid-Catalysed Esterification. *Angewandte Chemie International Edition in English*. 1965, **4**(1), 40-49. ISSN 0570-0833. Dostupné z: [doi:10.1002/anie.196500401](https://doi.org/10.1002/anie.196500401)
74. ZUPCANOVA, A., ARELLANO, J.B., BINA, D., KOPECKY, J., PSENCIK, J., VACHA, F. The Length of Esterifying Alcohol Affects the Aggregation Properties of Chlorosomal Bacteriochlorophylls. *Photochemistry and Photobiology*. 2008, **84**(5), 1187-1194. ISSN 00318655. Dostupné z: [doi:10.1111/j.1751-1097.2008.00312.x](https://doi.org/10.1111/j.1751-1097.2008.00312.x)

8. SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

BChl <i>c</i>	bakteriochlorofyl <i>c</i>
DCM	dichlormetan
H ₂ O	voda
HCl	kyselina chlorovodíková
hexOH	hexanol
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
MGDG	monogalaktosyldiacylglycerol
NaCl	chlorid sodný
OH skupina	hydroxylová skupina
TLC	tenkovrstvá chromatografie

9. PŘÍLOHY

IZOLACE FYKOBILINŮ

přeloženo z Malinová (2020)

1. Sinice vypěstované ve WC médiu (zhruba 2 L) stočíme na centrifuze (7 min × 8000 g).
2. Vzniklý pelet rozdělíme na 4 díly, jeden díl použijeme pro izolaci, zbylé díly uložíme při teplotě -81 °C.
3. Pelet rozpustíme v 10 ml pufru (0,3 M KH₂PO₄; 0,2 M Na₂EDTA; pH = 7) a důkladně homogenizujeme.
4. Hustou suspenzi rozbíjíme v disruptoru EmulsiFlex C5 (Avestin, Canada), (5 min, 15 000 psi) a poté stočíme na centrifuze (5 min × 6000 g). Supernatant uchováváme před dalším použitím v temnu.
5. Supernatant stočíme na centrifuze (30 min × 25 000 g) a zlikvidujeme pelet.
6. Supernatant smícháme s acetonem v poměru supernatant : aceton (1 : 6). Dochází ke vzniku modré sraženiny, vzniklou směs rozlijeme do předem zvážených centrifugačních zkumavek a stočíme na centrifuze (5 min × 6000 g). Slijeme supernatant a zvážíme zkumavku s mokrou sraženinou. Po zvážení necháme sraženinu vyschnout v temnu a po vyschnutí opět zvážíme. Po vysušení získáme průměrně 1,06 ± 0.45 g fykobilinu.
7. Suchou sraženinu o průměrné váze 0,85 g rozpustíme v nadbytku (40-45 ml) 35% HCl. Tento krok provádíme v digestoři.
8. Roztok necháme po dobu jednoho týdne hydrolyzovat za pokojové teploty ve tmě. Během týdne můžeme vzorky promíchávat pro lepší promísení s HCl.
9. Po týdnu zastavíme reakci přidáním destilované vody (hydrolyzát : voda, 1 : 4) a stočíme na centrifuze (10 min × 7500 g). Se vzniklým peletem můžeme celý proces hydrolýzy opakovat pro zvýšení výtěžku.
10. Supernatant vytřepeme do chloroformu v dělicí nálevce (chloroform : supernatant, 1 : 10). Tento krok opakujeme až do doby, kdy do chloroformu již nepřechází pigmenty. Ze získaného roztoku v temnu vysušíme dusíkem chloroform.

FISCHEROVA ESTERIFIKACE FYKOBILINŮ 1-HEXANOLEM V DCM

1. Veškerá práce by měla být prováděna ve tmě nebo v přitmě. Nejprve si rozpustíme přečištěný bilin v metanolu. Množství metanolu závisí na množství vzorku, většinou v rozmezí 500 – 600 μl .
2. Odebereme vzorek do kyvety a změříme si spektrum. Ze spektra následně zjistíme absorpenci roztoku v jeho maximu, kolem 640 nm, která se pohybuje v hodnotách 0 – 1.
3. Následně vypočítáme koncentraci bilinů podle vzorce:

$$c = \frac{A}{38000 \times l}$$

kde c je koncentrace bilinů v mol.l^{-1} , A je absorbance měřeného vzorku, l je délka kyvety v cm. Hodnota 38000 je molární extinkční koeficient fykocyanobilinu při 640 nm v $\text{dm}^3.\text{mol}^{-1}.\text{cm}^{-1}$ (Glazer & Hixson, 1975, Bishop *et al.*, 1987).

Látkové množství bilinů zjistíme takto:

$$n = c \times V$$

kde n je počet mol bilinu a V je celkový objem vzorku v.

4. Po měření si vzorek převedeme do označené mikrozkušavky a necháme ve vakuu vysušit.
5. Pro přípravu hexylesteru s DCM přidáme do mikrozkušavky 300 μl DCM a 10000 $\times$ větší molární množství 1-hexanolu, v poměru k molárnímu množství bilinu.

Potřebné množství hexanolu bylo zjištěno následně:

$$V(\text{hexOH}) = \frac{M(\text{hexOH}) \times n(\text{bilin}) \times 10000}{\rho(\text{hexOH})}$$

kde M hexanolu = 102 g.mol^{-1} a hustota hexanolu ρ = 0,81 g.ml^{-1} .

6. Do zkumavky přidáme 5 μl 96% H_2SO_4 (pokud neslouží jako kontrola) esterifikujeme po dobu 3 hodin při teplotě 30 $^{\circ}\text{C}$. V případě použití alkoholu jako rozpouštědla lze esterifikovat při teplotě 90 $^{\circ}\text{C}$.
7. Reakci ukončíme přidáním 1 ml redestilované vody a poté přidáme 500 μl diethyletheru.
8. Vzorky stočíme na centrifuze při 14 000 rpm po dobu 2 minut.
9. Odstraníme spodní vodní fázi a vzorek opakovaně, celkem 4 $\times$, promyjeme 900 μl vody pro neutralizaci reakční směsi.
10. Nakonec odpipetujeme horní modrou fázi, obsahující ester bilinu, do nových mikrozkušavek a vysušíme dusíkem.