

Univerzita Karlova  
Pedagogická fakulta  
Katedra chemie a didaktiky chemie

## BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Izolace a identifikace fucoxanthinu a dalších biologicky významných  
karotenoidů ve vybraných kmenech řas  
Isolation and identification of fucoxanthin and other biologically important  
carotenoids in selected algal strains

Tereza Kvapilová

Vedoucí práce: Ing. Hana Vodičková, Ph. D.  
Studijní program: Specializace v pedagogice  
Studijní obor: Biologie, geologie a environmentalistika se zaměřením na vzdělávání –  
Chemie se zaměřením na vzdělávání

Odevzdáním této bakalářské práce na téma Izolace a identifikace fucoxanthinu a dalších biologicky významných karotenoidů ve vybraných kmenech řas potvrzuji, že jsem ji vypracovala pod vedením vedoucího práce samostatně za použití v práci uvedených pramenů a literatury. Dále potvrzuji, že tato práce nebyla využita k získání jiného nebo stejného titulu.

V Praze 19. 4. 2021

Ráda bych na tomto místě poděkovala vedoucí mé bakalářské práce Ing. Haně Vodičkové, Ph.D. za čas, který mi věnovala, trpělivost, vstřícný přístup a cenné připomínky.

Rovněž děkuji Ing. Jiřímu Kopeckému z MBÚ v Třeboni za možnost vyzkoušet si experimentální činnost na pracovišti ve výzkumném ústavu, spolupráci při získávání údajů pro experimentální část práce a další konzultace k řešené problematice.

## ABSTRAKT

Bakalářská práce se zabývá izolací a identifikací fucoxanthinu a dalších biologicky významných karotenoidů z vybraných kmenů řas a následného zpracování této tematiky pro účely edukace. Cílem práce je experimentálně ověřit růst vybraných kmenů řas, optimalizovat izolační postupy fucoxanthinu, identifikovat fucoxanthin a další biologicky významné karotenoidy ve vybraných kmenech řas. Poznatky z experimentální práce jsou použity k vytvoření návrhu studijního materiálu, který má za úkol zprostředkovat žákům a studentům přírodovědných gymnázií a vyšších odborných škol poznatky ze současného výzkumu řešeného v rámci projektu č. TN01000048 *Modifikace řasových kmenů za účelem zvýšení obsahu mastných kyselin a karotenoidů a vývoj metod pro jejich efektivní izolaci z biomasy* v MBÚ Třeboň. Literárně přehledová část se zabývá teoretickými východisky týkajícími se problematiky mikrořas a pigmentů, které obsahují ve své struktuře. Rešerše je doplněna o způsoby kultivace řas v biotechnologiích a využití analytických metod stanovení karotenoidů, které řasy obsahují. Experimentální část této práce se zaměřuje na řasovou biotechnologii při kultivaci a zpracování řasové biomasy a následného využití analytických metod při izolaci karotenoidů z vypěstované řasové kultury a identifikace jednotlivých zástupců této skupiny organických látek pomocí chromatografických metod a spektrofotometrie. Kromě fucoxanthinu jsou v biomase identifikovány další významné karotenoidy – diadinoxanthin, diatoxanthin, chlorofyl *a*, beta-karoten. Největší množství fucoxanthinu ve své struktuře vykazuje kmen *Prymnesium parvum*, naopak nejmenší množství je naměřeno v kmenu *Pseudopedinella* a *Amphidinium*. Z literární rešerše je vytvořen návrh studijního materiálu pro žáky a studenty, který slouží jako základ k pochopení této tematiky. Následně jsou tyto teoretické poznatky uplatněny v návrhu praktického cvičení, který je pro žáky vytvořen z experimentální části bakalářské práce. Návrh studijního materiálu je podkladem pro následné rozpracování.

## KLÍČOVÁ SLOVA

Fucoxanthin, karotenoidy, řasy, izolace, identifikace, studijní materiál

## **ABSTRACT**

The B.A. thesis deals with the isolation and identification of fucoxanthin and other biologically important carotenoids from selected algal strains and the subsequent processing of this topic for educational purposes. The aim of this work is to experimentally verify the growth of selected algal strains, optimize the isolation procedures of fucoxanthin, identify fucoxanthin and other biologically important carotenoids in selected algae strains. The results from the experimental part are used to create a draft of study material, which aims to provide knowledge from current research in the project No. TN01000048 Modification of algal strains to increase fatty acids and carotenoids and development methods for their effective isolation from biomass in MBÚ Třeboň to students of science grammar schools and colleges. The literature review part deals with the theoretical basis concerning the issue of microalgae and pigments, which they contain in their structure. The research is supplemented by methods of algae cultivation in biotechnologies and the use of analytical methods for the determination of carotenoids. The experimental part of this work focuses on algal biotechnology in the cultivation and processing of algal biomass and the subsequent use of analytical methods in the isolation of carotenoids from cultivated algal culture and identification of individual representatives of this group of organic substances using chromatographic methods and spectrophotometry. There are even other important carotenoids identified in biomass except of fucoxanthin – diadinoxanthin, diatoxanthin, chlorophyll *a*, beta-carotene. The largest amount of fucoxanthin is found in the structure of the strain *Prymnesium parvum*, while the smallest amount is measured in the strain *Pseudopedinella* and *Amphidinium*. A draft of study material for pupils and students is created from the literary reseach, it serves a basis for understanding this topic. Subsequently, these theoretical findings are applied in the draft of practical exercises, which is created for students from the experimental part of the B.A. thesis. The draft of the study material is the basis for subsequent elaboration.

## **KEYWORDS**

Fucoxanthin, carotenoids, algae, isolation, identification, study material

## **Obsah**

<b>Úvod</b> .....	<b>7</b>
<b>Cíle</b> .....	<b>9</b>
<b>1 Teoretická část</b> .....	<b>10</b>
1.1 Řasy .....	10
1.1.1 Klasifikace .....	11
1.1.2 Vybrané kmeny řas .....	13
1.2 Karotenoidy .....	16
1.2.1 Syntéza.....	16
1.2.2 Struktura a klasifikace .....	17
1.2.3 Výskyt a význam .....	18
1.2.4 Fucoxanthin .....	19
1.3 Řasová biotechnologie .....	21
1.3.1 Způsoby kultivace.....	21
1.4 Analytické metody stanovení karotenoidů a fucoxanthinu .....	24
<b>2 Experimentální část</b> .....	<b>26</b>
2.1 Kultivace řasové biomasy .....	26
2.1.1 Metodika kultivace .....	26
2.1.2 Metodika izolace a identifikace fucoxanthinu .....	28
<b>3 Výsledky</b> .....	<b>30</b>
<b>4 Diskuse</b> .....	<b>38</b>
<b>5 Didaktická část</b> .....	<b>39</b>
5.1 Mezioborové vztahy .....	40
5.2 Návrh výukového materiálu .....	41
<b>Závěr</b> .....	<b>53</b>
<b>Seznam použitých informačních zdrojů</b> .....	<b>54</b>

## Úvod

Tato bakalářské práce se zabývá poznatky získanými při spoluúčasti na jednom z výzkumů řešeného v rámci projektu č. *TN01000048 Modifikace řasových kmenů za účelem zvýšení obsahu mastných kyselin a karotenoidů a vývoj metod pro jejich efektivní izolaci z biomasy* v MBÚ v Třeboni. Publikace, zveřejněné v rámci projektu s podobnou tematikou jsou například Bárcenas-Peréz et al. (2021) a Jehlička et al. (2020).

Práce obsahuje poznatky ze tří částí – teoretické, experimentální a didaktické. První část vychází z teoretických poznatků odborných publikací. Obsahuje základní informace o mikroskopických řasách, biotechnologiích, rostlinných pigmentech karotenoidech a analytických metodách, pomocí kterých se karotenoidy stanovují. Experimentální část obsahuje dílčí výsledky výzkumu, který se zabývá obsahem fucoxanthinu a dalších karotenoidů ve vybraných kmenech řas a jejich stanovení z řasové biomasy. Teoretické poznatky a výsledky výzkumné části jsou následně použity k vytvoření návrhu teoretického sdělení a praktického cvičení pro žáky a studenty přírodovědných gymnázií a vyšších odborných škol. V návrhu studijního materiálu dochází k propojení mezioborových vztahů přírodních věd a pomáhá žákům a studentům nahlédnout do současných výzkumů v této oblasti, konkrétně biotechnologii. Návrh studijního materiálu je podkladem pro následné rozpracování v diplomové práci. Didaktická část byla vytvořena v návaznosti na získané výsledky z výzkumu s ohledem na otázku integrované výuky, kterou řeší mnoho zemí světa, tedy určité propojenosti přírodovědných oborů a jednotného pohledu na přírodu. Mnoho z nich (např. USA, Německo, Velká Británie) tento styl výuky na školách již zavedlo. V České republice je možné v posledních letech také pozorovat určité změny ve vzdělávacích programech, které usilují o jakési propojení těchto předmětů a možná budoucí vytvoření uceleného předmětu „Science“ jako tomu je v zahraničí (v případě českého školství se jedná o jednotnou vzdělávací oblast *Člověk a příroda*). Budoucí učitelé jsou však i nadále vzdělávání se zaměřením na jednotlivé předměty a poté při přechodu do praxe je při edukaci žáků nic zásadního k vytváření mezioborových vztahů nevybízí. Pokud tedy učitel záměrně nevytváří takové úkoly a podněty ve výuce, které by vedly k propojení poznatků z více oborů, žákům uniká celkový smysl učiva a dochází k určité izolovanosti, kdy získané znalosti nejsou schopni propojit a dále použít v praxi. Praktické použití získaných znalostí není pro žáky problematické pouze kvůli nedostatku návaznosti jednotlivých předmětů, ale také kvůli nedostatečnému zařazování

praktických cvičení do výuky. Žáci a studenti často nejsou schopni využít své teoretické znalosti v praxi, protože k tomu zkrátka nemají dostatek zkušeností. V přírodních vědách, jejichž studiem jsou objekty a děje obklopující denně každého z nás, je více než žádoucí umět uplatnit získané znalosti v každodenním životě.

Z poznatků je zřejmé, že je nutné do výuky zařazovat kromě teoretického výkladu a samostudia také praktické úkoly, při nichž se žáci a studenti naučí uplatnit vědomosti (i z jiných učebních předmětů). Kromě témat vycházejících ze vzdělávacích programů je žádoucí výuku přírodních věd obohatit o základní informace o současně probíhajících výzkumech a poskytnout tak žákům a studentům náhled do aktuálně řešené problematiky.

## Cíle

- Zpracovat odbornou literaturu na dané téma z dostupných databází
- Experimentálně ověřit růst vybraných kmenů řas
- Optimalizovat izolační postupy fucoxanthinu
- Identifikovat fucoxanthin a další biologicky významné karotenoidy ve vybraných kmenech řas
- Z teoretické části vytvořit návrh teoretického sdělení pro žáky gymnázií s přírodovědným zaměřením a studenty vyšších odborných škol
- Z výsledků získaných v experimentální části vytvořit návrh praktického cvičení pro žáky a studenty

# 1 Teoretická část

## 1.1 Řasy

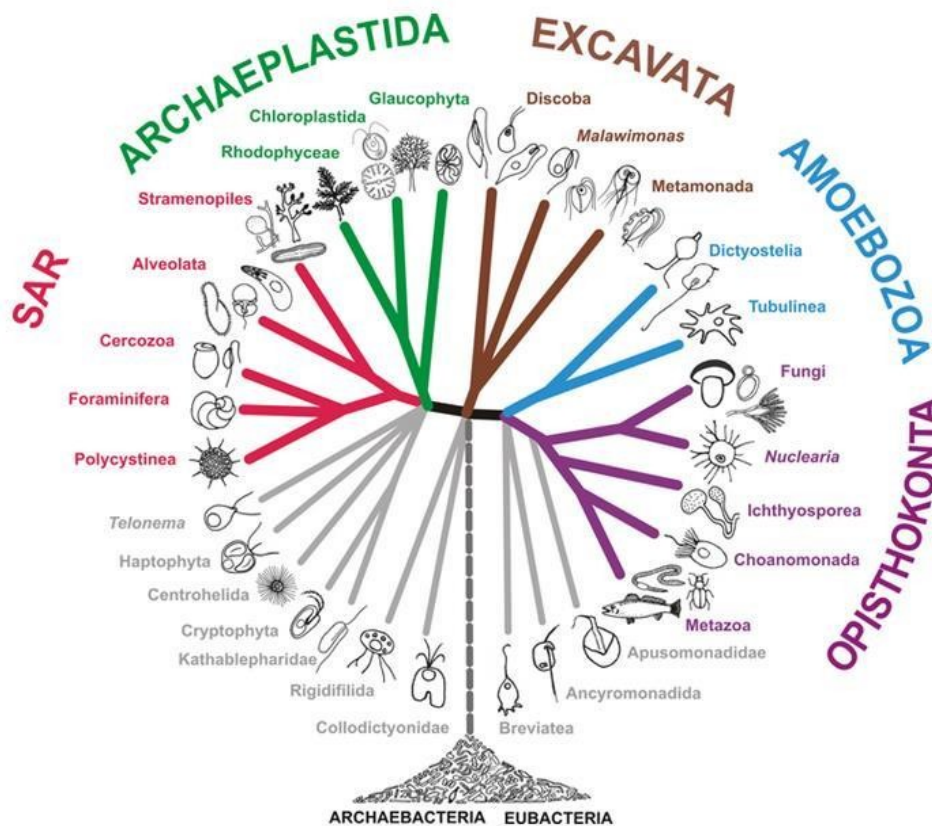
Řasy jsou z hlediska ekologie velmi významné organismy. Řadí se mezi fotosyntetizující eukaryota jednobuněčného i mnohobuněčného charakteru. Jedná se převážně o organismy vyskytující se ve vodním prostředí jako součást planktonu a bentosu. Lze na ně však narazit i v půdě, ve formě edafonu nebo na povrchu kmenů stromů a skal, kde společně s houbami vytváří symbiotická společenství zvané lišejníky. Řasy produkují více než polovinu kyslíku na Zemi a stojí na začátku potravního řetězce (Dostál 2006).

Dříve byly tyto organismy řazeny mezi tzv. nižší rostliny, společně s dalšími stélkatými bezcévnými rostlinami. Na první pohled se může zdát, že jsou z hlediska morfologie některé druhy řas rostlinám více než podobné (včetně schopnosti fotosyntézy). Není tedy divu, že byly zařazeny do stejné skupiny. Dosud zjištěné fylogenetické vztahy mezi jednotlivými zástupci této skupiny však odhalují jasnou vnitřní heterogenitu, která nepochází ani ze stejného předka. Ve skutečnosti jsou řasy pouze uskupením nepříbuzných skupin organismů a jejich společné označení nepoukazuje na žádnou taxonomii (Dostál 2006). Jejich uspořádání do jedné skupiny nestojí tedy na základech taxonomie, nýbrž ekologie. I přes nepříbuznost mají tyto organismy společnou ekologickou niku, tedy souhrn životních podmínek, které jsou určovány faktory prostředí, ve kterém se řasy nacházejí (Pocheville 2015).

Společným znakem těchto skupin je tělo, které je tvořeno stélkou (*thallus*). Ta se nediferencuje na další pravé orgány, jako tomu je u cévnatých rostlin, avšak někdy k určité diferenciaci těla dochází a vytvářejí se tak struktury, které tyto orgány zastupují (fyloidy, rhizoidy apod.). Oproti cévnatým rostlinám jsou tu také odlišnosti v oblasti reprodukčního systému. Spory a gamety řas vznikají v jednobuněčných orgánech bez jakékoliv ochrany v podobě sterilních buněk. Zygota, která vzniká oplozením, se nikdy nevyvíjí v embryo (Dostál 2006).

### 1.1.1 Klasifikace

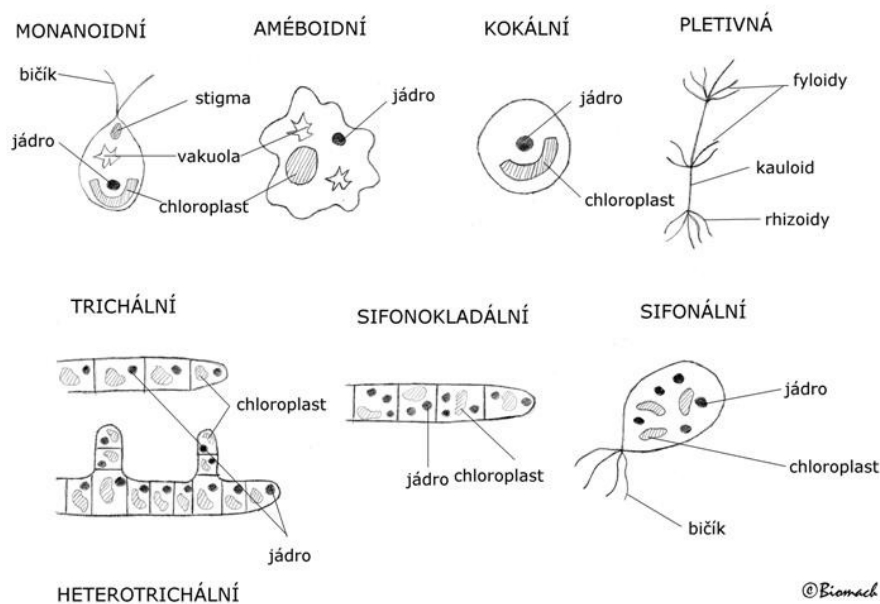
Ještě do nedávna byly řasy řazeny mezi nižší rostliny. Dnes je již známo, že řasy tvoří jednotnou systematickou skupinu a většina z nich není vůbec příbuzná rostlinám. Dřívější systematika byla zaměřena především na morfologické znaky, pomocí kterých rozdělila řasy na zelené, hnědé a červené podle převažujícího barviva. Nedávno však prošla klasifikace všech eukaryotických organismů důkladnou revizí, čímž došlo k velkým změnám v systematice. Tato revize stojí na fylogenetických studiích, které pomohly objasnit vzájemné vztahy mezi jednotlivými taxony a následně byl vytvořen zcela nový klasifikační systém. Tento systém, jenž popsali Adl et al. (2012), pracuje pouze s monofyletickými taxony, klade důraz na podobnost sekvencí nukleotidů v nukleových kyselinách a díky rozvoji elektronové mikroskopie je možno se dívat na znaky na úrovni buněčné ultrastruktury, které jsou v těchto případech klíčové. Tato klasifikace spočívá v rozdělení organismů do tzv. superskupin, které postrádají další tradiční dělení na kmeny, oddělení, řády apod. Tato systematika se však neustále vyvíjí a upřesňuje, je tedy poněkud komplikované jí dále prezentovat. V současné době rozeznáváme pět těchto superskupin (obr. 1) (Macháček et al. 2016):



Obr. 1: Systém klasifikace eukaryot 2012 (Adl et al. 2012)

Starší polyfyletické dělení nižších rostlin obsahovalo šest dalších oddělení – *Rhodophyta* (ruduchy), *Dinophyta* (obrněnky), *Crypophyta* (skrytěnky), *Chromophyta* (hnědé řasy), *Euglenophyta* (krásnoočka), *Chlorophyta* (zelené řasy). Červené řasy neboli ruduchy byly zařazeny do skupiny *Archeplastida*. Hnědé řasy na konci 20. století rozdělil Thomas Cavalier Smith do vlastní říše *Chromista*. I přesto, že se tento model do dnes využívá na většině středních škol, ukázalo se, že tato klasifikace není přirozená a organismy z říše Chromist byly rozděleny do tří skupin – *SAR*, *Cryptophyta* a *Haptophyta*. Změna se týkala i zelených řas. Byly rozřazeny do dvou skupin – *Chlorophyta*, kam patří pouze zelené řasy a *Streptophyta*, kam se řadí i vyšší rostliny (Kaštovský a Hauer 2017).

Jedním z dalších významných kritérií při klasifikaci řas je morfologický stupeň vývoje stélky (obr. 2). Dostál (2006) uvádí celkem devět vývojových stupňů. *Monanoidní* neboli bičíkatá stélka je stélka tvořena pouze jednou buňkou které slouží k pohybu bičík. Dalším typem jednobuněčné stélky, která se pohybuje pomocí bičíků je *sifonální* (trubicovitá), která je oproti *monanoidní* mnohojaderná. *Améboidní* (*rhizopodiální*, měňavkovitá) stélka má měňavkový tvar a pohybuje se pomocí panožek (*pseudopodií*). Dále rozlišujeme nepohyblivé stélky kokální a kapsální a stélky mnohobuněčné – *trichální*, *heterotrichální* a *sifonkladální*. *Trichální* stélka je tvořena vlákny, stejně tak i *heterotrichální*, na rozdíl od *trichální* má však postranní a osní rozlišená vlákna. *Sifonkladální* stélka je velmi podobná *trichální* obsahuje však více jader ve své buněčné struktuře. Nejvyvinutějším typem stélky je pletivná, která má již částečně diferenciovaná pletiva a některé orgány.



Obr. 2: Typy stélek (Macháček 2005)

### 1.1.2 Vybrané kmeny řas

Na základě literatury bylo vybráno šest kmenů řas, které by ve své struktuře měly obsahovat karotenoid fucoxanthin. Jedná se o kmeny *Isochrysis galbana*, *Pseudopedinella*, *Prymnesium parvum*, *Phaeodactylum triconutum* a *Ampidinium* a *Emiliana huxleyi*.

#### **Isochrysis galbana**

*Isochrysis galbana* je druh organismu ze skupiny *Haptophyta*. Dříve byla tato skupina součástí třídy *Chrysophyceae* (český název zlativky), později se však přišlo na jisté odlišnosti v morfologii a části sekvence DNA, což vedlo k jejímu vyjmutí a vytvoření samostatné skupiny jako je tomu nyní.

Jeden z hlavních znaků skupiny *Haptophyta* a zároveň hlavní morfologický rozdíl od *Chrysophyceae* je přítomnost tzv. haptonema. Jedná se o orgán na první pohled podobný bičíku, ale submikroskopickou stavbou se tyto dvě struktury liší. Haptonema je složeno z pěti až sedmi mikrotubulů, mezi nimiž a povrchem haptonematu se nachází dutina sekundárně vzniklá z endoplazmatického retikula (Pienaar 1994). V buňce je uloženo ve štěrbině mezi bičíky. Podle Inouye a Kawachi (1994) má haptonema potravní funkci. Může také sloužit k rychlým změnám směru pohybu nebo k přichycení k substrátu.

Kmen *Isochrysis* je kvůli vysokému obsahu lipidů často využíván pro výrobu biopaliv. Obsahuje také poměrně velké množství kyseliny dokosahexanové (DHA), důležité látky ze skupiny omega-3 mastných kyselin (Feng et al. 2011). DHA má velmi pozitivní účinky na lidský mozek a zdraví obecně. Pro své účinky se často využívá jako aditivum mléčných výrobků a při léčbě Alzheimerovi choroby, hypertenze nebo kardiovaskulárních chorob (Calder 2013). *Isochrysis* a další ze skupiny *Haptophyta* obsahují v chloroplastech jeden z xanthofylů – fucoxanthin, který překrývá zelený chlorofyl a zapříčiňuje tak zlatavou nebo žlutohnědou barvu buněk. Právě z důvodu obsahu důležitých kyselin a fucoxanthinu se kmen *Isochrysis* nabízí k pěstování. Například Gilbert-López et al. (2015) a Delbrut et al. (2018) publikovali jednoduchý návod k extrakci látek jako fucoxanthin z organismů rodu *Isochrysis*.

Jedním z recentních výzkumů obsahu fucoxanthinu v zástupcích kmene *Isochrysis* se zabývali Sun et al. (2019). Z šestnácti vybraných zástupců všechny obsahovaly nějaké množství fucoxanthinu, některé více, některé méně. Konkrétní zástupce s největším obsahem xanthofylu fucoxanthinu byl právě *Isochrysis galbana*.

## **Pseudopedinella**

Buňky organismů z kmene *Pseudopedinella* jsou radiálně symetrické s jedním bičíkem s tripartitními chloupky. Jedním z hlavních rysů tohoto kmene je přítomnost triád mikrotubulů, které jsou ukotveny v jaderné membráně a končí v cytoplazmatické membráně nebo pokračují až za hranici buňky a tvoří tzv. chapadlo. Kromě bičíku jsou součástí buňky také kořenovité panožky. Převážně je k vidění jedna panožka, může jich být však více. *Pseudopedinelly* patří mezi heterotrofy (Thomsen 1988). Jejich buňky obsahují 6 chloroplastů zlatavé barvy, které zaplňují přibližně dvě třetiny vnitřního prostoru buňky. V zadní části buňky se nachází průsvitný váček se zásobní látkou chrysolaminaranem.

Jedni z autorů, kteří uvádí přítomnost fucoxanthinu v buněčné struktuře kmene *Pseudopedinella* jsou například Engström-öst et al. (2002).

## **Prymnesium parvum**

Buňky kmene *Prymnesium* patří mezi *Haptophyta* (*Prymnesiophyta*). Jedná se o početně malou skupinku organismů, kterou tvoří především ekologicky významní mořští zástupci. Skupinka byla dříve součástí *Chrysophyceae*, ale z několika důvodů byla vyčleněna jako samostatná. Na rozdíl od *Chrysophyceae* mají tyto organismy dva bičíky a haptonema (viz kap. 1.1.2), jiné krytí povrchu buňky, odlišné sekvence SSU rDNA a v chloroplastu jim chybí věncová lamela (Kaštovský a Hauer 2017).

Ve většině případů se jedná o mořské jednobuněčné bičíkovce, kteří mají schopnost fotosyntézy. Bičíky mají ve své struktuře dva a k tomu navíc haptonema, které vzhledově připomíná třetí bičík, avšak jeho submikroskopická struktura se od bičíku liší. Uvnitř bičíků se nachází axonema (svazek mikrotubulů), kterou haptonema postrádá (Rosypal 2003).

Jak uvádí Carvalho a Granéli (2010), buňky organismu *Prymnesium parvum* obsahují velké množství fucoxanthinu.

## **Phaeodactylum tricornutum**

*Phaeodactylum tricornutum* je jediným druhem rodu *Phaeodactylum*. Patří do superskupiny SAR, mezi organismy zvané rozsivky (diatomy). Tělo těchto organismů je tvořeno dvojdílnou křemičitou schránkou. Oproti dalším ze zástupců rozsivek má *Phaeodactylum* schopnost měnit svůj tvar na základně změny prostředí. Aby tento organismus správně prospíval, potřebuje ke svému životu křemík, který je potřeba přidávat také do

kultivačního média v případě laboratorní kultivace této řasy. Tento organismus však dokáže přežít i bez přítomnosti křemíku, a proto je často využíván k experimentálním průzkumům v nanotechnologiích pro výrobu materiálů na bázi křemíku (Martino et al. 2007).

*Phaeodactylum tricornutum* je podle Kim et al. (2012) bohatý zdroj fucoxanthinu.

### **Amphidinium**

Organismy kmenu *Amphidinium* tvoří velkou část bentických dinoflagelátů, žijících v písku. Jejich buňky jsou typické malou velikostí horní části frustuly – epitéky, která tvoří méně než jednu třetinu těla (Jørgensen 2004).

Přítomnost fucoxanthinu v buněčné struktuře kmenu *Amphidinium* uvádí například Doi et al. (1995).

### **Emiliana huxleyi**

Jeden z nejpočetněji zastoupených organismů v planktonu mořských vod (Kaštovský a Hauer 2017). Mckew et al. (2013) uvádí schopnost této mikroskopické řasy vytvářet rozsáhlé vodní květy na hladinách, které jsou pozorovatelné z vesmírných družic.

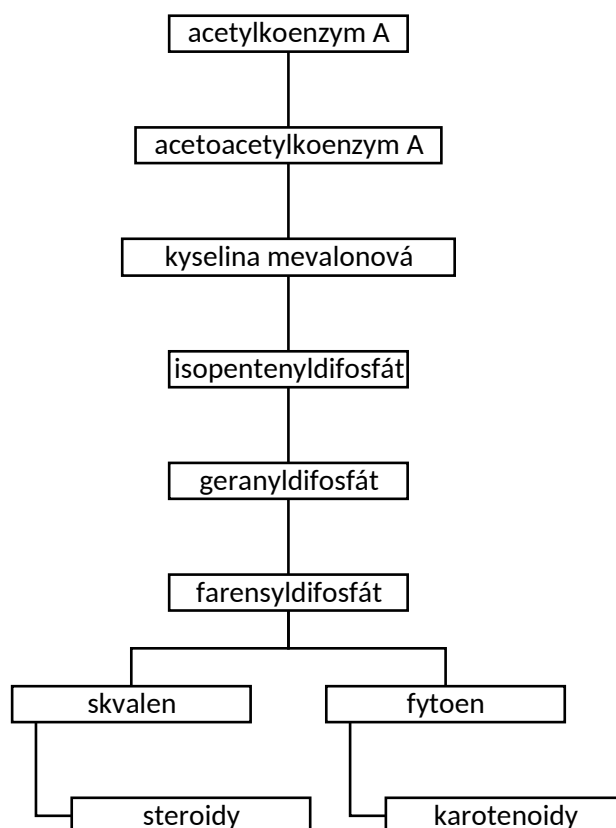
*Emiliana huxleyi* ve své struktuře obsahuje velké množství fucoxanthinu (Mckew et al. 2013; Wright a Jeffrey 1987).

## 1.2 Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty převážně lipofilní povahy, žluté nebo oranžové barvy, které umí syntetizovat některé organismy jako jsou rostliny, houby, řasy a fotosyntetické bakterie. Ostatní živočichové nemají pro syntézu enzymy, musí tedy karotenoidy získávat z potravy. Jedná se o třídu, která obsahuje více než 600 sekundárních metabolitů (Yamaguchi 2012).

### 1.2.1 Syntéza

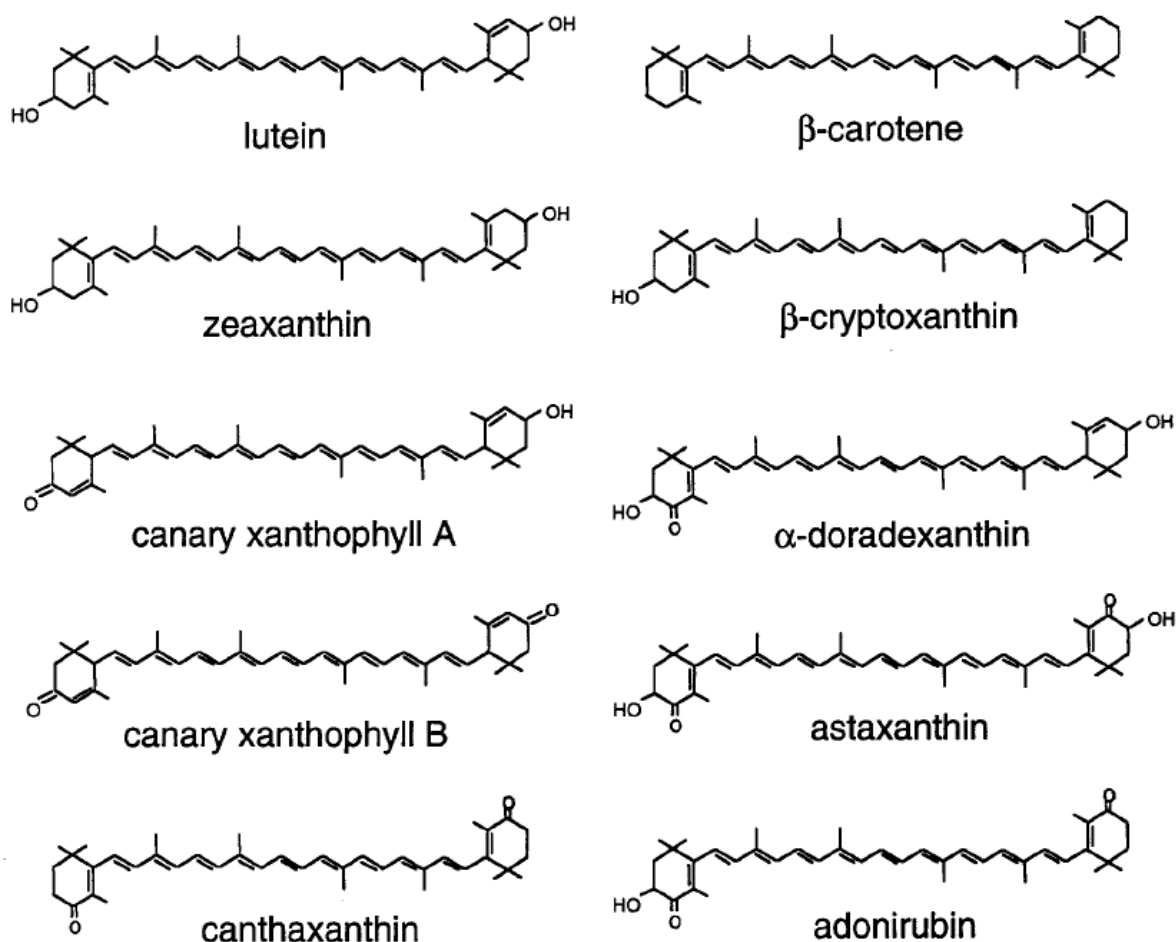
Průběh syntézy karotenoidů uvádí například Šivel et al. (2013). Jeho základní podoba je schematicky znázorněna na obr. 2. Základ syntézy karotenoidů začíná acetylkoenzymem A, což je aktivní forma kyseliny octové. Kondenzací vzniká acetoacetylkoenzym A, následnou redukcí kyselina mevalonová, která je fosforylována a dekarboxylována za vzniku isopentenylidifosfátu. Ten vytváří isoprenoidní jednotku, která tvoří základ karotenoidu. Spojením dvou těchto jednotek vzniká geranyl-difosfát a poté farnesyl-difosfát. Zde dochází k rozvětvení děje na dvě dráhy – z jedné vznikají steroidy a z druhé základní prekurzor karotenoidů – fytoen.



Obr. 3: Schéma syntézy karotenoidů (upraveno podle Šivel et al. 2013)

## 1.2.2 Struktura a klasifikace

Většina látek ze skupiny karotenoidů ve své struktuře obsahuje čtyři isoprenoidní jednotky a tím se řadí mezi tzv. tetraterpeny (Šivel et al. 2013). Podle Veliška (2009) je barevnost těchto látek způsobena řetězcí konjugovaných dvojných vazeb, které se mohou vykytovat v různých kombinacích, čímž vytvářejí mnoho odstínů barev.



Obr. 4: Struktura některých vybraných karotenoidů (Mcgraw et al. 2001)

Karotenoidy lze na základě jejich struktury formálně rozdělit na dvě hlavní skupiny. Tyto strukturální rozdíly jsou příčinou odlišných vlastností obou skupin. V prvním případě se jedná o skupinu karotenů, které obsahují uhlovodíky a liší se polohou dvojných vazeb (např. lykopen, karoten). Tyto látky jsou nepolární a rozpustné v tucích. Druhou skupinou jsou kyslíkaté deriváty (např. alkoholy, ketony, aldehydy atd.) vzniklé oxidací karotenů, které se

nazývají xanthofyly. Ty jsou oproti karotenům polárnější, a to díky obsahu kyslíku ve své struktuře (Velíšek 2009). Xanthofyly můžeme rozdělit do dvou skupin podle typu kyslíkové skupiny na hydroxykarotenoidy a oxokarotenoidy. Hydroxykarotenoidy obsahují hydroxylovou skupinu a řadí se mezi ně například lutein. Oxokarotenoidy neboli ketokarotenoidy obsahují ketony, do této skupiny se řadí například astaxanthin. Xanthofyly nevykazují provitaminovou aktivitu, ale v porovnání s karoteny jsou barevnější. Hydroxykarotenoidy způsobují hlavně odstíny žluté barvy a ketokarotenoidy odstíny barvy červené (Mortensen a Skibsted 1997).

Na základě struktury uhlovodíků lze karotenoidy rozdělit na karotenoidy s acyklickou strukturou, mezi které patří například lykopen. Karotenoidy s monocyklickou strukturou jako například  $\delta$ -karoten a  $\gamma$ -karoten a karotenoidy s dicyklickou strukturou jako  $\alpha$ -karoten a  $\beta$ -karoten (Šivel et al. 2013).

Již Davies (1985) popisuje karotenoidy jako poměrně nestabilní látky, které se snadno štěpí, a to z důvodu přítomnosti dlouhých řetězců. Vzniká tak spousta štěpných produktů například při trávení. Mezi tyto látky se řadí například apokarotenoidy a norkarotenoidy, kterým ve struktuře chybí uhlík.

### 1.2.3 Výskyt a význam

Karotenoidy jsou fotoaktivní pigmenty, které jsou v tělech fotosyntetizujících organismů důležitými přenašeči energie (Štípek 2000). Jsou důvodem barevnosti některých částí rostlin od žluté barvy po červenou (Armstrong a Hearst 1996; Britton 1995). Sytost barvy určuje jejich struktura, konkrétně počet dvojných vazeb – čím více dvojných vazeb karotenoid obsahuje, tím je jeho barva tmavší a sytější (Hill et al. 2002).

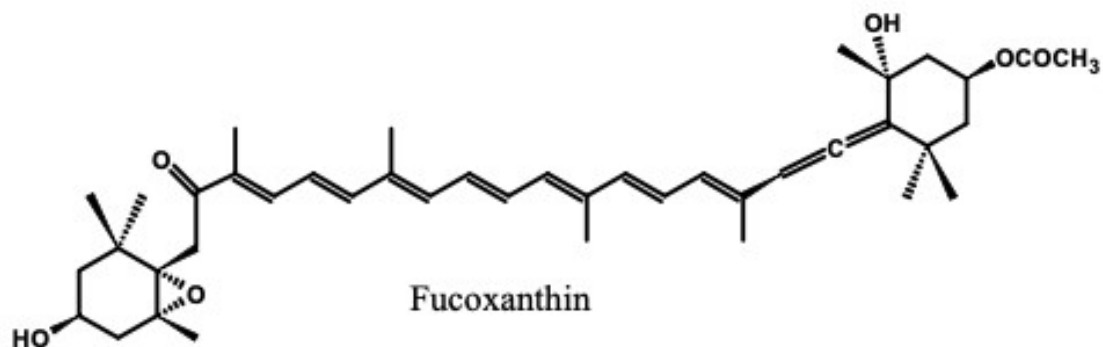
Karotenoidy jsou významné antioxidanty. Mají schopnost chránit organismy před volnými radikály, které vznikají například u rostlin při fotosyntéze vlivem působení světla. Mají mnoho pozitivních účinků také na lidský organismus. Jako antioxidanty pomáhají při léčbě a prevenci nádorových nebo kardiovaskulárních onemocnění (Britton et al. 1995). Tyto účinky lze částečně vysvětlit schopností karotenoidů potlačit negativní vlivy volných radikálů (Krinsky 1990). Jedni z autorů, píšících o pozitivních účincích některých z karotenoidů na lidský organismus, jsou například Gammone a D'Orazio (2015), kteří popsali kromě těch antioxidačních, protizánětlivých a protinádorových i účinky antiobezitní.

### 1.2.4 Fucoxanthin

Fucoxanthin je karotenoid patřící mezi xanthofyly. Jedná se o významný xanthofyl z řad karotenoidů, který byl objeven jako součást chloroplastů hnědých řas.

#### Struktura

Struktura fucoxanthinu úzce souvisí právě s jeho účinky na lidský organismus. Strukturou se podobá například neoxanthinu nebo dinoxanthinu, avšak obsahuje neobvyklé struktury, jako žádný jiný objevený karotenoid (Aman et al. 2005). Englert et al. (1990) jeho jedinečnou molekulární strukturu s velmi neobvyklou alenovou vazbou objevili. Tato vazba nebyla nalezena u žádného jiného karotenoidu, pouze u fucoxanthinu. Nevýhodou této vazby je její nestabilita. Snadno ji naruší vyšší teplota či osvětlení. Strukturní vlastnosti fucoxanthinu zkoumali např. Zhang et al. (2015). Fucoxanthin dále obsahuje epoxidovou skupinu a konjugovanou karbonylovou skupinu v polyenu (Hu et al. 2010).



Obr. 5: Struktura fucoxanthinu (Peng et al. 2011)

Právě díky této struktuře vykazuje fucoxanthin velkou biologickou aktivitu. Jedná se o významný antioxidant s mnoha pozitivními účinky na lidský organismus – protizánětlivé, antiobezitní účinky, snižuje pravděpodobnost a příznaky cukrovky, nádorových onemocnění apod. (Sangeetha et al. 2009).

#### Výskyt a význam

Jedná se o jeden z nejrozšířenějších karotenoidů. Maeda et al. (2009) odhadují, že fucoxanthin tvoří více než 10 % celkové přirozené produkce karotenoidů v přírodě. Tento karotenoid ze skupiny xanthofylů je nejběžněji k nalezení ve struktuře těl mořských řas. Země

jihovýchodní Asie využívají některé mořské řasy obsahující fucoxanthin jako častý zdroj potravy. Sangeetha et al. (2009) popisují ve svém výzkumu antiobezitní účinky fucoxanthinu, tedy vlastnosti podporující redukci hmotnosti. Maeda et al. (2009) prováděli výzkum působení fucoxanthinu na těle myší. Myším, kterým byl v tomto výzkumu fucoxanthin dlouhodobě podávám, skutečně klesla hmotnost. Jaswir et al. (2011) uvádějí ve své práci pozitivní účinky fucoxanthinu na karcinogenní onemocnění. Jeho pozitivní účinky byly dokázány například při léčbě adenokarcinomu (Das et al. 2005), hepatokarcinomu (Das et al. 2008) a leukémie (Hosokawa et al. 1999). Zhang et al. (2015) uvádí výsledky studií působení fucoxanthinu na zvířatech, podle kterých má potenciální hodnotu při prevenci a léčbě chorob souvisejících se životním stylem jako je obezita, cukrovka, rakovina, kardiovaskulární onemocnění a další chronická onemocnění. Zároveň nejsou prokázány žádné vedlejší účinky jeho působení na organismus.

### 1.3 Řasová biotechnologie

Řasová biotechnologie se zabývá kultivací mikrořas, vyhledávání obsahových látek v nich a zpracováním řasové biomasy. Získané teoretické znalosti lze využít v dalších oborech jako například potravinářství, farmacie, medicína apod.

První kultivovanou řasou byla koncem 19. století *Chlorella*. Významným obdobím pro řasové biotechnologie byla druhá světová válka. Z důvodu nedostatku potravin, bylo klíčové získávat živiny z jakýchkoliv zdrojů. K velkému rozvoji tedy došlo v kultivaci řas, které byly cenným zdrojem bílkovin. Později byla pozornost směřována více na strukturu a výzkum významných látek řasové buňky, což vedlo například k objevu penicilinu. Od osmdesátých let se začaly vyrábět doplňky stravy z těchto organismů (Kopecký et al. 2017).

#### 1.3.1 Způsoby kultivace

Na základě nároků jednotlivých druhů řas se ke kultivaci využívají různá média s různými živinami. Kromě média existují však další kultivační parametry, které vyžadují řasy ke svému růstu. Mezi ně patří teplota, světlo, hodnota pH, promíchávání média. I přesto, že každý druh organismu vyžaduje jiné kultivační parametry, lze uvést zobecněné podmínky (tab. I) (Kaufnerová 2014).

Tab. I: Přehled kultivačních parametrů upravena podle Samek (2009)

Parametr	Rozsah	Optimální hodnoty
Teplota (°C)	16–27	18-24
Obsah solí (g.l <sup>-1</sup> )	12–40	20-24
Světelná intenzita (μE sec <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	až 2000	100-200
Fotoperioda (světlo:tma)	16:8–24:0	12:12
Hodnota pH	7-9	8,2-8,7

Dobrá a Bučková (2013) uvádějí důkazy o fenotypové plasticitě některých druhů. Na základě změny podmínek kultivace (teplota, pH, přítomnost predátora apod.) jsou tyto organismy schopny měnit svůj vnější vzhled. Některé druhy takto však dlouhodobě ztrácí svou typickou morfologii, protože pro ně již není výhodná.

Prvním důležitým parametrem podle Barsanti a Gualtieri (2006) je teplota. Optimální teplota je pro každý druh specifická a závisí také na složení kultivačního média. Obecně lze říct, že mikrořasám vyhovuje teplota mezi 16 a 27 °C. Při teplotách pod 16 °C dochází k rapidnímu snížení rychlosti růstu, a tedy i rozmnožování, naopak teploty nad 35 °C mají na většinu mikrořas smrtící účinky. Aby teplota zůstávala konstantní, využívají se při kultivaci inkubátory.

Světlo je nedílnou součástí životního cyklu řas. Stejně jako u rostlin, je zdrojem energie, která je potřebná k fotosyntéze. Při kultivaci je nutné zoptimalizovat světelné podmínky jako jsou fotoperioda, intenzita světla nebo jeho spektrální kvalita. Důležitá je intenzita světla, která se mění v závislosti na hloubce nádoby. Je důležité nepřekračovat doporučené rozmezí světelné intenzity, které se pohybuje od 100 do 200  $\mu\text{E s}^{-1}\text{m}^{-2}$ . V případě velké intenzity světla může dojít až k fotoinhibici buněk biomasy. V laboratorních podmínkách se využívá převážně umělá světla ve formě zářivek, které mohou emitovat různá spektra světelného záření. Některé řasy vyžadují k růstu střídání fotoperiody a nerostou při konstantním osvětlení. Nejčastěji se využívá fotoperioda 12:12 v poměru světlo ku tmě. Aby světlo prostupovalo rovnoměrně celým médiem a dostalo se tak dostatek živin všem buňkám, je nutné médium promíchávat. Proces promíchávání pomůže také od vytváření sedimentů buněk a správnému průběhu výměny plynů mezi kulturou a okolím. Promíchávání lze provádět ručně, provzdušňováním, pumpami apod. (Barsanti a Gualtieri 2006).

Obecně lze říct, že obsah solí v kultivačním médiu by měl být o něco menší než v běžném prostředí. Rozmezí optima se pohybuje mezi 20 a 24  $\text{g.l}^{-1}$  (Vonshak 1997).

Samek (2009) uvádí optimální pH kultivačního média pro většinu mikrořas mezi 8,2 až 8,7. Opět se jedná o individuální záležitost pro každý druh. Některé mikrořasy vyžadují spíše kyslejší pH některé spíše zásaditější. Rozsah pH se často uvádí mezi 7 a 9. Udržení stálého pH při kultivaci není jednoduché a často bývá letální příčinou pro celou biomasu (Barsanti a Gualtieri 2006).

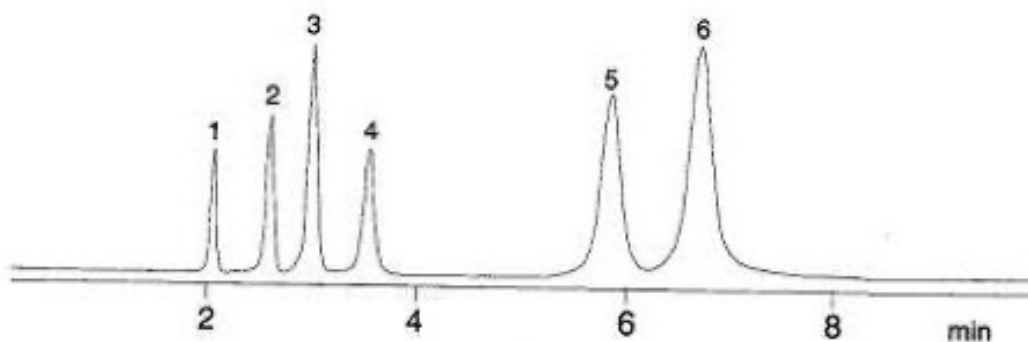
Existuje mnoho kultivačních metod, které se rozdělují podle mnoha faktorů. Na základě technického uspořádání rozlišujeme kultivace na vsádkové, kontinuální a seminkontinuální. Vsádkové kultivace jsou nejčastěji využívaným systémem. Na začátku kultivace proběhne dávkování složek média společně s řasovou kulturou. Vše je následně uzavřeno a ponecháno k růstu, který by měl probíhat podle růstové křivky. Růst kultury je konstantní až do vyčerpání

o vyčerpání některé z životně důležitých zásob. Tato metoda je využívána především díky své jednoduchosti a flexibilitě. Její nevýhoda však spočívá v možnosti kontaminace, které je potřeba předcházet. Pokud dojde ke kontaminaci buněčné kultury, nastane její znehodnocení. Častým problémem je, že nežádoucí kontaminující organismy přerostou žádoucí kulturu řas (Barsanti a Gualtieri 2006). Oproti tomu při kontinuální kultivaci je obsah živin v médiu téměř nevyčerpatelný, protože dochází k neustálému doplňování a řasová kultura se tak udržuje v maximální růstové rychlosti. Čerstvé médium je přiváděno do nádoby a zároveň část starého média včetně biomasy je odpuštěno do sběrného tanku. Nevýhodou je však finanční a provozní náročnost metody (Borowitzka 1999). Při semikontinuální metodě kultivace je médium s živinami doplněno pouze jednou. Poté je řasová kultura ponechána 24 hodin k růstu a následně se sklídí.

Perez-Garcia (2011) používá dělení metod kultivace podle zdroje uhlíku a světla na autotrofní, heterotrofní a mixotrofní. Autotrofní metody kultivace je většina laboratorních metod, při kterých je do systému přiváděn oxid uhličitý, který slouží jako zdroj uhlíku a využívá se umělého osvětlení v podobě zářivek. Této metody lze však využít i při venkovních otevřených kultivacích. Heterotrofní kultivace probíhá bez přístupu světla ve fermentorech. Jako zdroj uhlíku slouží organická látka obvykle nějaký sacharid. Růstu v těchto podmínkách jsou schopny pouze některé druhy řas. Mixotrofní kultivace stojí na pomezí heterotrofní a autotrofní. Tato metoda využívá přítomnosti světla a jako zdroj uhlíku je do systému přidáván oxid uhličitý nebo organická látka.

## 1.4 Analytické metody stanovení karotenoidů a fucoxanthinu

K analytickému stanovení karotenoidů se nejčastěji využívají různé druhy chromatografie. Principem této metody je rozdílná rychlost pohybu složek vzorky mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází. Vzorek je unášen mobilní fází rychlostí a dochází k separaci složek podle jejich afinit k stacionární fázi. Ta část, která se váže ke stacionární fázi nejvíce, ta je unášena mobilní fází nejpomaleji. Výsledkem chromatografie je graf, tzv. chromatogram, z něhož lze určit retardační faktor nebo retenční čas, který je pro každou látku jedinečný. Chromatogram znázorňuje různě velké píky pro jednotlivé složky. Podle toho, v jakém místě se pík objeví, tedy jaký je retenční čas dané složky, můžeme látku identifikovat (kvalitativní analýza). Plocha každého píku ukazuje koncentraci dané látky ve vzorku (kvantitativní analýza) (Koplík nedatováno).



Obr. 6: Ukázka chromatogramu, vodorovná osa značí retenční čas (2, 4, 6, 8 min) jednotlivých píků (1-6), zdroj: Chromatografie. [vyuka-data.lf3.cuni.cz](http://vyuka-data.lf3.cuni.cz) 2004. Dostupné z: [http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie\(4f9a8942587af\).pdf](http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie(4f9a8942587af).pdf)

Jak uvádí Klouda (2003) z důvodu velkého množství chromatografických metod se rozdělují do určitých skupin. Podle skupenství mobilní fáze se rozlišuje chromatografie plynová a kapalinová. Další metody jsou rozděleny podle uspořádání stacionární fáze na kolonovou chromatografii (stacionární fáze umístěna v koloně), papírovou (stacionární fáze na chromatografickém papíru), tenkovrstvá (stacionární fáze na pevném podkladu). Podle druhu reakce, která převládá při separaci látek se rozlišuje rozdělovací chromatografie (principem je odlišná rozpustnost látek), dále chromatografie adsorpční (principem je rozdílná přilnavost složek k stacionární fázi), iontově-výměnná (složky se rozdělují na základě různě velké

elektrostatické síly působící mezi funkčními skupinami nosiče a ionty vzorku), gelová (separace složek mezi póry stacionární fáze podle velikosti) a afinitní (určité složky se váží na stacionární fázi na základě afinity).

Velmi často využívaným druhem chromatografie je metoda HPLC – High Performance Liquid Chromatography neboli vysokoúčinná kapalinová chromatografie. K identifikaci karotenoidů se využívá mnoho metod HPLC jak popisuje Jeffrey et al. (1997). Obecně se u HPLC jedná o metodu kolonové chromatografie, která využívá mobilní fáze v podobě kapaliny a vysokotlaké pumpy, což zajišťuje vysokou účinnost separace. Při této metodě jsou využívány různé detektory, nejčastěji fotometrická detekce, která stanovuje absorbanci mobilní fáze po tom, co vyjde z kolony (Bidigare et al. 2005). Často využívaným detektorem je v dnešní době i například hmotnostní spektrometr (Klouda 2003).

K identifikaci pigmentů a kvantitativním analýzám se využívá metoda UV-VIS absorpční spektrometrie. Jedná se o nejčastěji používaný detektor pro HPLC. Tato metoda pracuje na principu měření energie, kterou vzorek pohltí při průchodu zářením v rozmezí 200-800 nm. V chvíli, kdy molekula pohltí záření (určité kvantum fotonů), dochází k přechodu ze základního stavu do excitovaného. Výsledkem je spektrum, které je typické pro každou látku. U UV VIS spektra lze odvodit základní strukturu látky – přítomnost dvojně vazby, alifatický či aromatický charakter (Perkampus 2013).

V kvantitativní analýze se podle Kloudy (2003) metoda UV-VIS spektrometrie často používá k určení koncentrace látek s chromofory, nejčastěji ve formě detektoru při různých separačních metodách např. kapalinové chromatografie a kapilární elektroforézy. Při kvalitativní analýze se tato metoda užívá spíše doplňkově k identifikaci neznámých organických látek a při zjišťování základní struktury neznámé látky pomocí porovnání jejího naměřeného spektra se spektrem látky známé.

## 2 Experimentální část

### 2.1 Kultivace řasové biomasy

Vzorky mikrořas v lyofilizované podobě byly produkovány na pracovišti Akademie věd České republiky, Ústavu mikrobiologie, Laboratoře řasové biotechnologie, Třeboň, Česká republika. Jednalo se o řasové kmeny *Isochrysis galbana*, *Prymnesium parvum*, *Pseudopedinella*, *Phaeodactylum tricornutum*, *Amphidinium* a *Emilliana huxleyii*. Tyto kmeny byly vybrány na základě literatury, která uvádí důkazy o výskytu fucoxanthinu v buněčné struktuře těchto organismů (Kim et al. 2012; Sun et al. 2019; Engstöröm-Öst et al. 2002) viz kap. 1.1.2.

#### 2.1.1 Metodika kultivace

Všechny uvedené kmeny řas byly kultivovány za stejných podmínek. Kultivační teplota byla 24 °C, světelná intenzita  $\mu\text{E sec}^{-1} \text{m}^{-2}$  a suspenze byla probublávána směsí vzduchu s 1% oxidem uhličitým. Bylo udržováno stálé pH 8. Kultivační médium bylo pro všechny kmeny stejné, jeho složení je uvedeno v tab. II, pouze při kultivaci kmene *Phaeodactylum* byl přidán navíc křemičitan sodný, který ostatní kmeny k životu nepotřebují. Všechny komponenty byly smíchány s deionizovanou vodou a ponechány ke sterilizaci v autoklávu. Roztok s mikroživinami byl všem řasovým kulturám podáván ve stejném složení (tab. III). Pro kultivaci řas byl použit systém sestavený v laboratoři MBÚ v Třeboni ve válečcích o průměru 4 cm a výšce 50 cm (obr. 7).



Obr. 7: Kultivační válečky v laboratoři MBÚ Třeboň

Tab. II: Složení kultivačního média

<b>Komponent média</b>	<b>Množství komponentu</b>
Mořská sůl (bez jódu)	35 000 mg.l <sup>-1</sup>
KNO <sub>3</sub>	2 021 mg.l <sup>-1</sup>
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	340 mg.l <sup>-1</sup>
MgSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	988 mg.l <sup>-1</sup>
CaCl <sub>2</sub>	5,6 mg.l <sup>-1</sup>
FeNaEDTA	18 mg.l <sup>-1</sup>
Na <sub>2</sub> SiO <sub>3</sub> .5H <sub>2</sub> O (pouze u kmene <i>Phaeodactylum</i> )	21,2 mg.l <sup>-1</sup>
Roztok s mikroživinami	1 ml.l <sup>-1</sup>
NaOH (1M)	1,8 ml.l <sup>-1</sup>

Tab. III: Složení roztoku s mikroživinami pro kultivaci řas

<b>Komponent roztoku</b>	<b>Množství komponentu (mg.l<sup>-1</sup>)</b>
H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	3000
MnSO <sub>4</sub> .4H <sub>2</sub> O	1200
(NH <sub>4</sub> ) <sub>6</sub> Mo <sub>7</sub> O <sub>24</sub> .4H <sub>2</sub> O	1840
ZnSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1430
CoSO <sub>4</sub> .7H <sub>2</sub> O	1400
CuSO <sub>4</sub> .5H <sub>2</sub> O	1240

## 2.1.2 Metodika izolace a identifikace fucoxanthinu

### Metodika izolace

Navážka lyofilizované biomasy 5mg byla rozetřena v třecí misce a ponechána 30 min k extrakci v 1ml etanolu při pokojové teplotě. Následně byl homogenát protřepáván na Vortex V-1 (BioSan) a extrahován dvakrát při pokojové teplotě 100% metanolem po dobu 15 min. Spojené extrakty byly přefiltrovány přes 0.2  $\mu$ m nylonové filtry (Micro-spin centrifuge filter, Alltech, Deerfield, IL, USA). Buňky řas byly odstředěny na centrifuze Universal 320 (Hettich) po dobu 10 min, 4.500 $\times$ g.

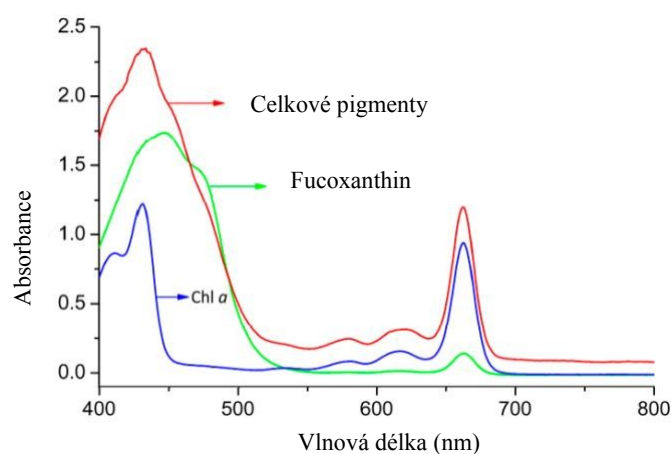
### Metodika identifikace

#### UV-VIS spektrofotometrie

Všechny supernatanty byly jednotlivě měřeny pomocí UV-Vis spektrofotometrie. Při spektrofotometrii bylo využíváno Shimadzu UV-2600 spektrofotometru. Metoda stanovení fucoxanthinu byla převzata podle metodiky výpočtu Wang et al. (2018):

$$\text{Fucoxanthin } (\mu\text{g/ml}) = 6.39 \times A(445) - 5.18 \times A(663) + 0.312 \times A(750) - 5.27$$

Wang et al. (2018) změřili pomocí spektrofotometru spektra celkových pigmentů, v extraktu fucoxanthinu a chlorofylu *a* (obr. 8).



Obr. 8: Spektra celkových pigmentů, fucoxanthinu chlorofylu *a* (Wang et al. 2018)

Metoda stanovení fucoxanthinu podle Carreto a Catoggio (1977):

$$\text{Fucoxanthin } (\mu\text{g/ml}) = [99.50 - 23.99 \times A_t(480)/A_t(663)] \times 10^{-2} \times A_{tc}(480) \times 13.79$$

$$A_{tc}(480) = A_t(480) - 0.0012 \times C_{\text{Chl.a}} - 0.0047 \times C_{\text{Chl.c}}$$

### Kapalinová chromatografie (HPLC)

Při chromatografii byl použit HPLC systém Agilent 1100 Series (Agilent Technologies Inc., Palo Alto, CA, USA), který lze vidět na obr. 9. Detekce proběhla pomocí UV–VIS detektoru s diodovým polem (Agilent DAD 61315B). Pigmenty byly rozděleny pomocí upravené metody podle Van Heukelem a Thomas (2001) na termostatované (35 °C) koloně Phenomenex Luna 3 $\mu$  C8(2) 100 A s dvousložkovým systémem rozpouštědel. Eluce binárním gradientem (0 min 100% A, 20 min 100% B, 25 min 100% B, 27 min 100% A, 30 min 100% A; A: 80% metanol/voda, B: 100% metanol), nástřik 20  $\mu$ l, průtok mobilní fáze 0,8 ml/min. Jako standard fucoxanthinu byl vybrán standard firmy Sigma-Aldrich (C<sub>42</sub>H<sub>58</sub>O<sub>6</sub>, Mr = 658,91, č. 3351-86-8).

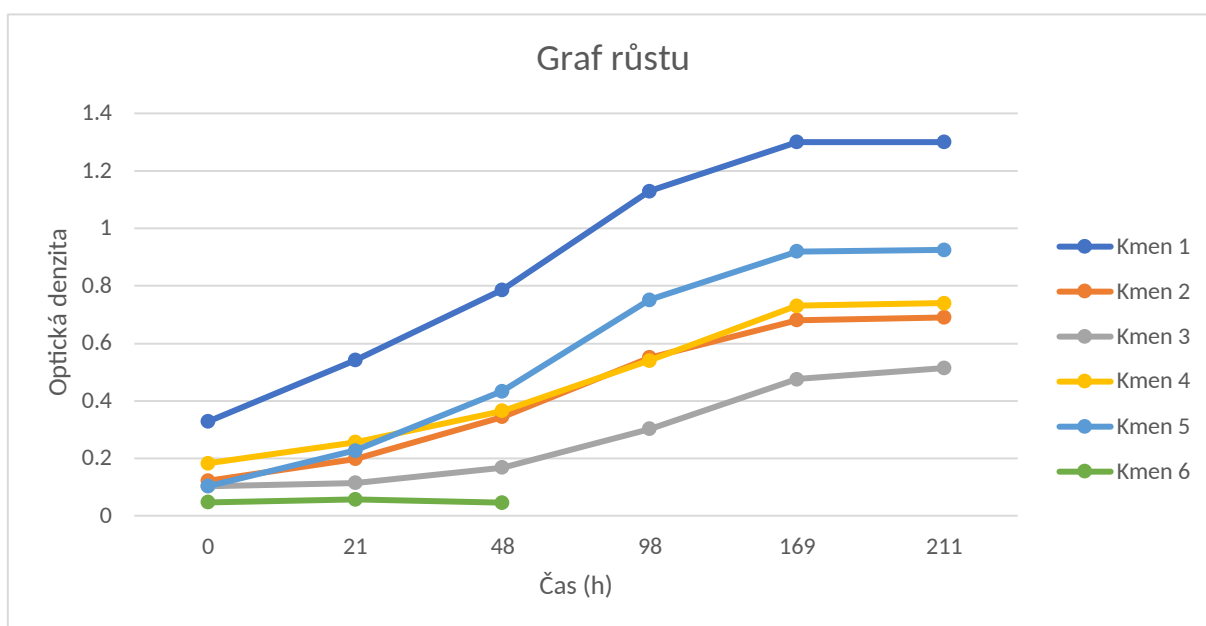


Obr. 9: Systém HPLC Agilent 1100 v MBÚ v Třeboni

### 3 Výsledky

#### Kultivace

Růst biomasy lze určit jako závislost optické denzity na čase. Čím větší je optická denzita, tím menší je rychlost šíření světla v daném prostředí, tedy tím větší je koncentrace buněk. Z grafu na obr. 10 lze vyčíst, že nejlepšími růstovými hodnotami za daných podmínek dosahoval kmen 1, tedy *Isochrysis galbana*. Naopak nejméně se dařilo kmenu 6 *Emiliana huxleyi*, který nevykazoval žádné známky růstu, a proto byla jeho kultivace předčasně ukončena.



Obr. 10: Růst řasových kultur

Kmen 1 *Isochrysis Galbana*

Kmen 2 *Pseudopedinella*

Kmen 3 *Prymnesium parvum*

Kmen 4 *Phaeodactylum triconutum*

Kmen 5 *Amphidinium*

Kmen 6 *Emiliana huxleyi*

## Identifikace spektrofotometrickou metodou

Porovnávání výsledků metod stanovení fucoxanthinu podle Wang (2018) a Carreta (1977) proběhlo na šesti vzorcích (tab. IV). Vzorky homogenizované na vortexu byly analyzovány ve třech opakováních, stejně tak vzorky homogenizované za použití mořského písku. Z tab. IV je patrné, že lepších výsledků dosahuje metoda stanovení při homogenizaci za použití mořského písku, kterou v roce 1977 provedl Carreto a následně zopakovali a potvrdili ve své práci také Wang et al. (2018).

Z výsledků získaných spektrofotometrickou metodou, při níž byly vzorky homogenizovány metodou podle Carreta (1977) za použití mořského písku byl zjištěn obsah 30 $\mu$ g fucoxanthinu na 3ml, což odpovídá asi 0,60 % celkového obsahu fucoxanthinu ve vzorku. V porovnání s výtěžností postupu, při kterém byl vzorek homogenizován na vortexu je patrné, že metoda použití mořského písku měla větší úspěšnost. Výchozí hodnoty jsou uvedeny v tab. IV.

Tab. IV: Porovnání výtěžností metod stanovení podle Wang (2018) a Carreta (1977) za použití mořského písku nebo vortexu

Vzorek (5 mg)	Objem extrakčního čínidla, ml	Obsah fucoxanthinu, $\mu$ g/ml	
		Wang, 2018	Carreto, 1977
A <sub>1</sub>	1	17.49	15.61
A <sub>2</sub>	1	5.63	4.73
A <sub>3</sub>	1	2.07	1.62
B <sub>1</sub>	1	23.43	21.80
B <sub>2</sub>	1	7.87	6.91
B <sub>3</sub>	1	1.85	1.25

A: Vzorky připravené homogenizací na vortexu

B: Vzorky připravené homogenizací s mořským pískem

## Identifikace chromatografickou metodou

Při sečtení výsledných výtěžků chromatografie za použití mořského písku při homogenizaci vzorku bylo zjištěno 17,66  $\mu\text{g}$  fucoxanthinu na 3 ml, což po výpočtu činí 0,35 % obsahu fucoxanthinu ve vzorku. Výchozí hodnoty jsou uvedeny v tab. V.

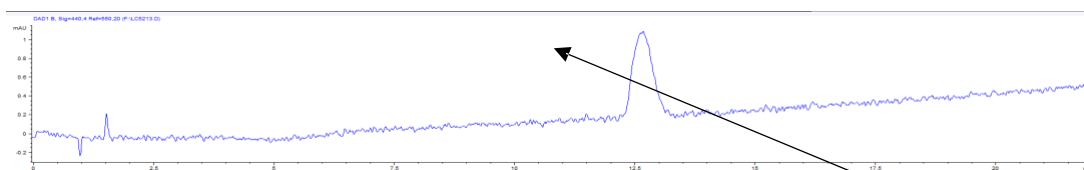
Tab. V: Stanovení fucoxanthinu v řasovém extraktu připraveného homogenizací na vortexu nebo s mořským pískem metodou HPLC

Vzorek (5 mg)	Objem extrakčního činidla, ml	Plocha píku při 440 nm	Obsah fucoxanthinu $\mu\text{g/ml}$
A <sub>1</sub>	1	1744.3	9.93
A <sub>2</sub>	1	524.4	3.44
A <sub>3</sub>	1	164.8	1.52
B <sub>1</sub>	1	2058.0	11.60
B <sub>2</sub>	1	685.5	4.29
B <sub>3</sub>	1	210.0	1.77

A: Vzorky připravené homogenizací na vortexu

B: Vzorky připravené homogenizací s mořským pískem

Byl změřen retenční čas standardu fucoxanthinu, tedy doba od nástřiku vzorku do zaznamenání látky detektorem, při vlnové délce 450nm  $t_R = 12,6$  min (obr. 11). Pokud se na chromatogramu analyzovaného extraktu objeví pík v oblasti třinácté minuty, jedná se o fucoxanthin. Velikost píku poté ukazuje koncentraci dané látky ve vzorku.

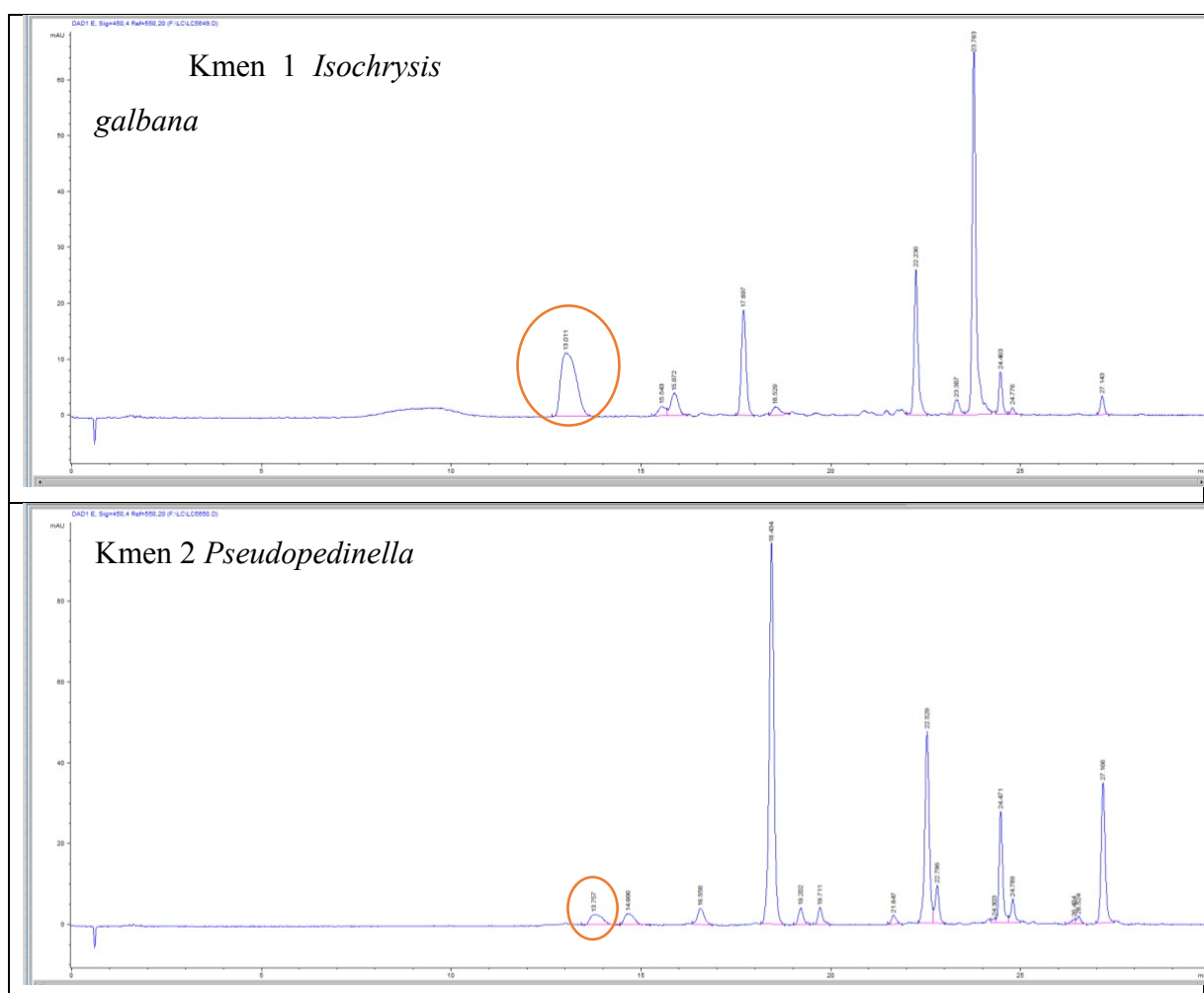


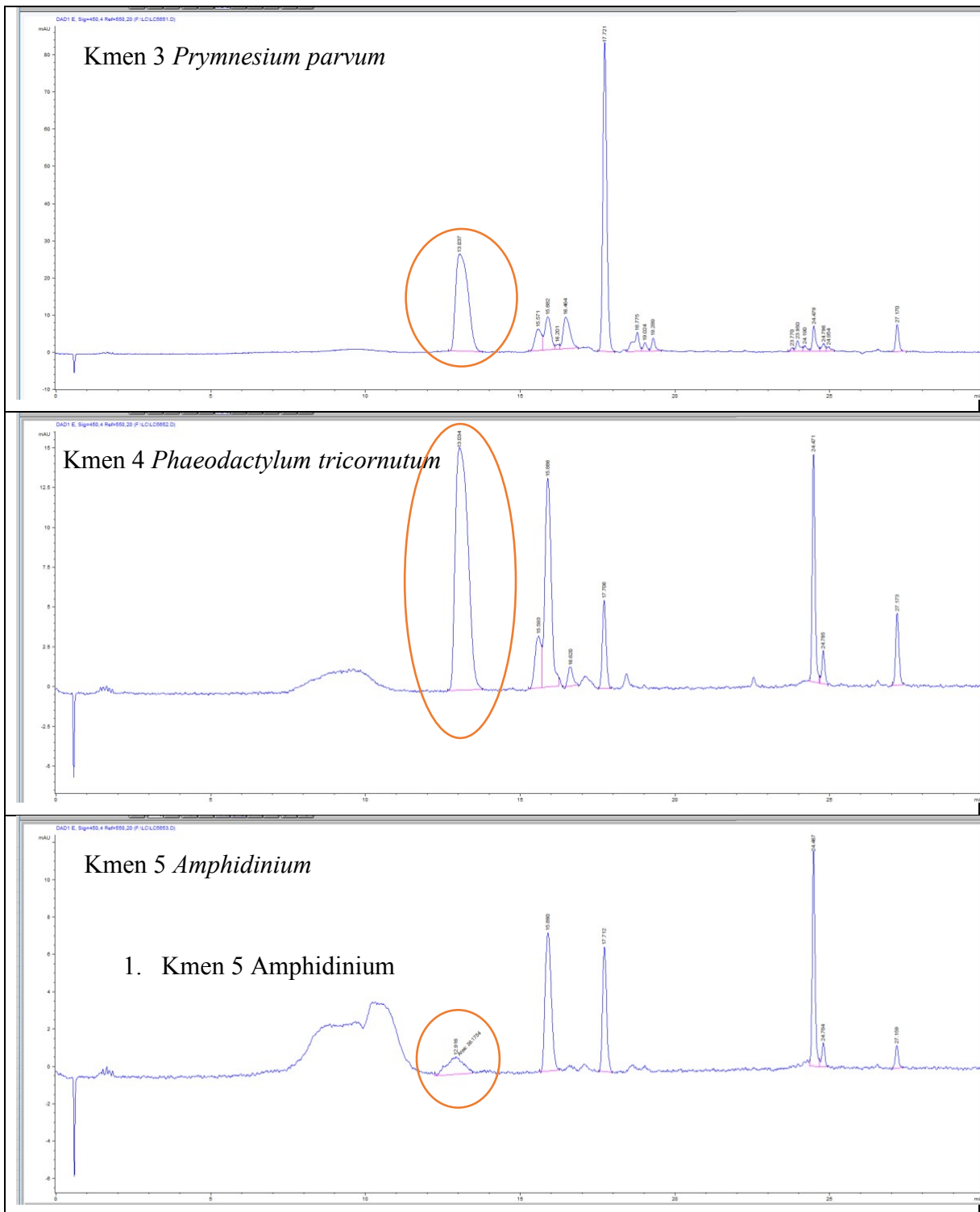
Obr. 11: Chromatografický záznam standardu fucoxanthinu

$t_R = 12,6$  min

Vyhodnocení chromatogramu může být kvalitativní nebo kvantitativní. Při kvalitativní analýze je cílem identifikace dané látky, tedy zjistit přesně o jakou látku se jedná. V tomto případě se zjistí z chromatogramu vzorku retenční čas píku pro dané látky (místo výskytu na vodorovné ose x) a ten je porovnáván s retenčními časy standardů. Cílem kvantitativní analýzy je zjištění koncentrace látky ve vzorku. Vyhodnocuje se pomocí plochy píku – čím větší je plocha, tím vyšší koncentrace. K vyhodnocení lze využít také výšku píku, kterou je snadné změřit, ale výsledek nemusí být tak přesný (Klouda 2003).

V níže uvedených chromatogramech na obr. 12 lze pozorovat retenční čas fucoxanthinu (zakroužkováno oranžově), v intervalu  $t_R=12,9-13,7$  min (tab. VI).





Obr. 12: Chromatogramy řasových extraktů vybraných kmenů řas, řez vlnovou délkou 450nm

V tab. VI jsou shrnuty základní údaje naměřené chromatografickou metodou. Na základě těchto hodnot bylo vypočítáno množství fucoxanthinu obsaženého v jednotlivých kmenech. Obsah fucoxanthinu byl ve dvou opakováních vypočítán pomocí vzorce:

$$C_{\text{fuco}} = \frac{(A_{450\text{nm}} + 287,2)}{214}$$

Z naměřených hodnot je patrné, že největší množství fucoxanthinu ve své struktuře obsahuje kmen 3 *Prymnesium Parvum* a to 4,74 ug/ml. Kmen 1 *Isochrysis galbana* obsahuje 2,84 ug/ml a kmen 4 *Phaeodactylum tricornutum* 3,36 ug/ml. Z důvodu velmi malé plochy píku zobrazeného na chromatogramu nebyly další hodnoty kmene 2 *Pseudopedinella* a kmene 5 *Amphidinium* dopočítávány.

Tab. VI: Retenční čas, plocha píku, obsah fucoxanthinu z chromatogramu řasových extraktů vybraných kmenů, procentuální vyjádření celkového obsahu fucoxanthinu, vlnová délka 450nm

Kmen	Navážka (mg)	Objem extraktu (ml)	Retenční čas (fucoxanthin)	Plocha píku	Obsah fucoxanthinu ug/ml	%
<i>Isochrysis galbana</i>	5	3	13,0	321	2,84	0,2
<i>Pseudopedinella</i>	5	3	13,8	-	-	-
<i>Prymnesium parvum</i>	5	3	13,0	726,4	4,74	0,3
<i>Phaeoactylum tricornutum</i>	5	3	13,0	432,3	3,36	0,2
<i>Amphidinium</i>	5	3	12,9	-	-	-

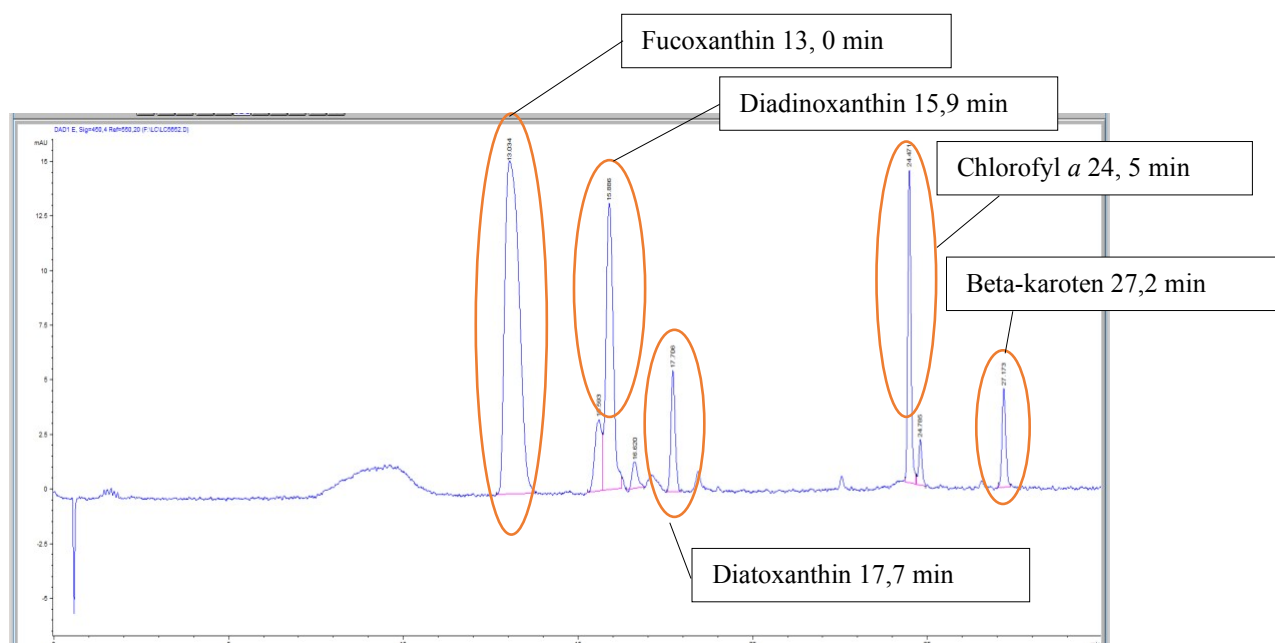
Na základě literárních údajů (Sun et al. 2019; Kim et al. 2012), byly vybrány kmeny řas, kde byla prokázána přítomnost karotenoidů. Standardní látky karotenoidů byly chromatograficky změřeny následně porovnávány retenční časy píků standardů s chromatogramy jednotlivých řasových kmenů. Na základě podobnosti retenčních časů a tvarů píků byly identifikovány karotenoidy v analyzovaných vzorcích řasové biomasy (tab. VII).

Nejkratší retenční čas u většiny vybraných kmenů měl fucoxanthin  $t_R = 12,6$  min, následoval diadinoxanthin  $t_R = 15,9$  min, diatoxanthin  $t_R = 17,9$  min, chlorofyl *a*  $t_R = 24,4$  min a jako poslední beta-karoten  $t_R = 27,1$  min. Získané chromatogramy všech analyzovaných extraktů kmenů řas jsou identické. Retenční časy píků standardů sledovaných karotenoidů z vybraného kmene *Phaeodactylum* byly přeneseny do přehledné tab. VII.

Tab. VII: Porovnání retenčních časů píků v chromatogramu analyzovaného extraktu kmene *Phaeodactylum* s retenčními časy píků standardů vybraných karotenoidů.

<b>Pigment</b>	<b>Retenční čas naměřený (min)</b>	<b>Retenční čas standardu (min)</b>
Fucoxanthin	13,0	12,6
Diadinoxanthin	15,9	15,9
Diatoxanthin	17,7	17,9
Chlorofyl <i>a</i>	24,5	24,4
Beta-karoten	27,2	27,1

Na obr. 13 jsou výše zmíněné karotenoidy znázorněny ve vybraném chromatogramu kmene *Phaeodactylum*. Na chromatogramu jsou popsány píky sledovaných karotenoidů, nepopsané píky jsou ve většině případů izomery zmíněných karotenoidů.



Obr. 13: Chromatogram kmene *Phaeodactylum* s popisem jednotlivých píků

## 4 Diskuse

Problematickým kmenem při kultivaci byl *Emiliana huxleyi*, který musel být z výzkumu odstraněn z důvodu zastavení růstu při kultivaci. Jakob et al. (2018) uvádí problémy při kultivaci kmenu *Emiliana huxleyi*, ke kterým dochází pravděpodobně z důvodu vyčerpání hlavních složek – fosforu. Z tohoto důvodu byl fosfor přidán do média ve vyšší koncentraci v podobě  $\text{PO}_4^{3-}$ . K jeho vyčerpání při kultivaci došlo sedmý den a od té se růst kultury výrazně zpomalil, nejvyšší koncentrace buněk dosáhla kultura desátý den ( $4.2 \cdot 10^6 / \text{ml}^{-1}$ ). Naopak nejlepší růstových hodnot dosáhl kmen *Isochrysis galbana*. Alkhamis a Qin (2013) se zabývali kultivací kmene *Isochrysis* a porovnávali kultivaci ve fototrofních, mixotrofních a heterotrofních podmínkách. Nejlepších výsledků růstu dosáhl tento kmen při kultivaci v mixotrofních podmínkách s přidáním 50mmol glycerolu a slanosti roztoku 35‰.

Ke stanovení fucoxanthinu byla využita spektrofotometrická metoda a metoda HPLC. Wang et al. (2018) uvádí spektrofotometrickou metodu ke stanovení fucoxanthinu z časových důvodů a nákladů na analýzy vhodnější než vysoce účinnou kapalinovou chromatografii (HPLC). Metoda spektrofotometrie byla v jejich práci popsána jako snadnější a přesnější oproti HPLC. Autoři uvádí standardní chybu ve srovnání s HPLC menší než 5 %.

K extrakci fucoxanthinu bylo vybráno extrakční činidlo ethanol, při jehož použití došli Kim et al. (2012) k nejlepšímu výtěžku. V jejich práci se obsah fucoxanthinu v extraktech řasy *Phaeodactylum tricornutum* vytvořených za použití různých metod pohyboval kolem 16mg/g lyofilizované hmotnosti vzorku. Výrazný nárůst obsahu fucoxanthinu byl zaznamenán v extraktech obsahujících větší procento ethanolu ve vodě.

Gilbert-Lopéz et al. (2015), Delbrut et al. (2018) a Sun et al. (2019) uvádí pravděpodobnost přítomnosti fucoxanthinu v kmenu *Isochrysis galbana*. Tato informace byla experimentálně potvrzena i ve výzkumu v této bakalářské práci, kde tento kmen obsahoval 2,84 ug/ml. Kmeny *Amphidnium* a *Pseudoedinella* uvádí Doi et al. (1995) a Engström-öst et al. (2002) jako bohatý zdroj fucoxanthinu. Tyto informace nebyly v této bakalářské práci potvrzeny. Chromatografickou metodou za výše uvedených podmínek (viz kap. 2.1.2) bylo u těchto dvou kmenů detekováno velmi malé množství, proto celkový obsah fucoxanthinu v jejich biomase nebyl dále doložen.

## 5 Didaktická část

Didaktická část vychází z teoretických poznatků převzatých z literatury a z experimentální činnosti k danému tématu řešenému v rámci projektu č. TN0100004 v MBÚ v Třeboni.

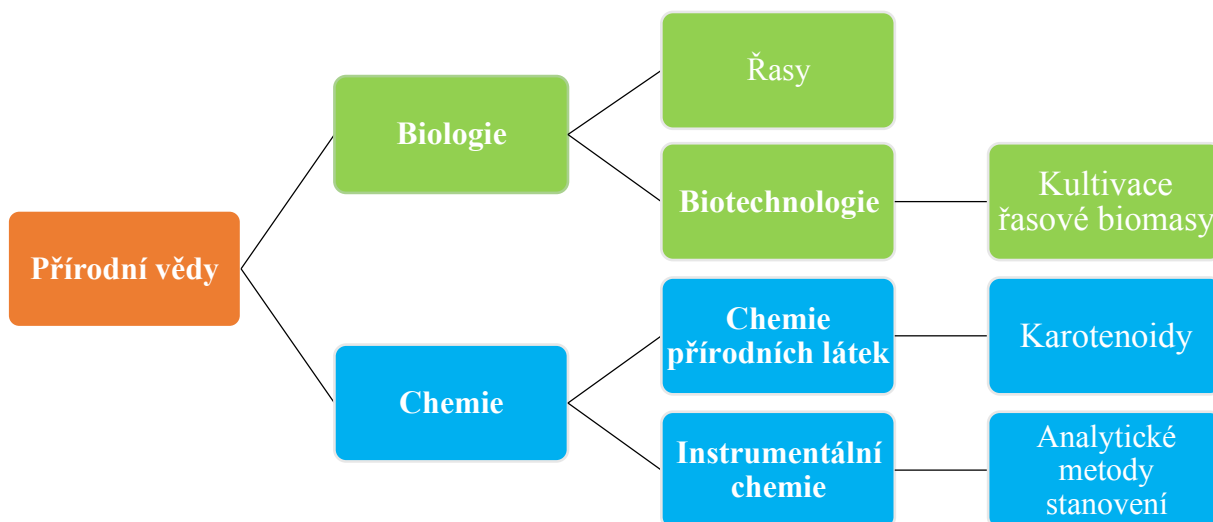
Obsah a charakter učiva přírodních věd je velmi podobný, a proto, jak uvádí Čadílek a Loveček (2005), je potřeba vytvářet mezioborové vztahy a návaznost mezi znalostmi z jednotlivých oborů. Cílem je odstranění izolovanosti ve výuce, a naopak vytvoření spojení mezi znalostmi žáků z různých odvětví. Bez vytváření mezioborových vztahů mají žáci často mnoho výborných znalostí, které však nejsou schopni použít v praxi a chybí jim celkové pochopení smyslu učiva.

I přesto, že dnešní vzdělávací programy jsou uspořádány do vzdělávacích oblastí (v případě přírodních věd se jedná o oblast Člověk a příroda), pro jejichž obory jsou definovány společné cíle, učitelé jsou i nadále jednostranně zaměřeni pouze na jednotlivé předměty. Podle Ruska a Starého (2019) je nutné určitými didaktickými postupy, které slouží k budování mezioborových vztahů, cíleně vytvářet výukové materiály, které se stanou součástí výuky. Bílek a Hrubý (2014) ve své práci uvádí příklad badatelsky orientované výuky, jejíž cílem je zapojení žáků a studentů do objevování přírodních zákonitostí a propojování znalostí z různých vědních oborů. Při této metodě edukace se využívají takové činnosti, při kterých dojde k aktivnímu zapojení žáků namísto memorování faktů. Podle Bílka a Hrubého (2014) však není cílem vytěsnění teoreticko – deduktivního poznávání, pouze je třeba do výuky zařadit i takové úkoly, při kterých žáci zapojí i empiricko – induktivní poznávání.

Mezinárodní výzkum PISA (Programme for International Student Assessment), který pořádá Organizace pro hospodářskou spolupráci a rozvoj (OECD), v roce 2015 uvedl základní kompetence, které by měl žák s rozvinutou přírodovědnou gramotností používat. Takový žák by měl být schopný vysvětlit přírodní jevy a technologie pomocí vědeckých pojmů, vytvářet a analyzovat vědecká zkoumání, využívat data a důkazy k vědecké interpretaci. Je patrné, že důraz je kladen na osvojení základních pojmů a jejich následnou aplikaci v podobě praktického a experimentálního zkoumání. Pomocí tohoto postupu mohou žáci lépe porozumět souvislostem.

## 5.1 Mezioborové vztahy

Studijní materiál je zpracován s ohledem na propojení mezioborových vztahů v přírodních vědách, které tvoří dvě hlavní části chemickou a biologickou (obr. 14). V úvodním teoretickém sdělení je nutné si osvojit základní pojmy. V biologické části se jedná o problematiku řas, jejíž znalost je následně využita v praktické části v rámci biotechnologií při kultivaci řasové biomasy. K tomu je zapotřebí mít základní představu o struktuře těla mikrořas a podmínky, ve kterých dané řasy žijí, případně které podmínky potřebují k životu. Následuje část chemická, jejíž základní pilíře tvoří znalost struktury a výskytu karotenoidů, které se poté izolují a identifikují za pomoci analytických metod, konkrétně chromatografie a spektrofotometrie, v návrhu praktického cvičení.



Obr. 14: Schéma mezioborových vztahů

V této práci byla sepsána doporučení k doporučení k vytvoření studijního materiálu, který se skládá z nastudování teoretických poznatků daného tématu a následného použití těchto znalostí v praktickém cvičení. Tento návrh umožňuje nahlédnout žákům a studentům do jednoho z řešených projektů řasové biotechnologie, který nachází využití v potravinářském a farmaceutickém průmyslu. Obsahová náplň studijního materiálu vychází z teoretické rešerše této práce (viz kap. 1).

## 5.2 Návrh výukového materiálu

Návrh výukového materiálu vychází z předpokladu, že se žáci nejdříve seznámí v rámci předmětu biologie s tématem mikrořas (viz kap. 1.1). Následně tyto znalosti uplatní při kultivaci řasové biomasy v laboratorních podmínkách školy. Poté si v rámci předmětu chemie za použití literatury osvojí téma řasových pigmentů (viz kap. 1.2) a v návaznosti budou při laboratorním cvičení tyto pigmenty izolovat a identifikovat za využití vybraných analytických metod.

Pro pozorování v podmínkách školního prostředí jsou proto vhodné fytoplanktonní zelené řasy, které mají zajímavou morfologii (Kaufnerová 2014). Například zástupci rodů *Pediastrum*, *Scenedesmus*, *Desmodesmus* apod. Vhodným postupem je izolace vlastních kultur a jejich následné dlouhodobé udržování i v době vegetačního období. Při kultivaci je nutné dodržovat vhodné podmínky pro růst řas (viz kap. 1.3.1). Výrazné odchylky od výchozích hodnot mohou vést ke zpomalení růstu nebo smrti řasové kultury. V případě, že je žádoucí růst zpomalit a udržet kulturu v klidu, je možné využít nižších teplot.

Při kultivaci v laboratorních podmínkách bohužel však dochází k odstranění faktorů, které v přirozeném prostředí způsobují vznik zajímavých struktur těl (ostny, výběžky apod.) mikroorganismů. Buňky takto ztrácí známé morfologie, které jsou žádoucí pro ukázkou při edukaci žáků. Pokud chceme tyto struktury pozorovat i v námi vytvořené kultuře, je za potřebí vybrat vhodné druhy řas a zajistit určité podmínky, například pravidelným promícháváním kultury apod. (Dobrá 2013; Bučková 2013).

V chemické části, po sdělení teoretických poznatků o karotenoidech a separačních metodách, je navržen praktický úkol, ve kterém budou extrahovány karotenoidy a vybraní zástupci budou identifikovány pomocí chromatografické metody.

## Návrh teoretického sdělení

### Obsah sdělení

- Teorie k tématu – řasy, karotenoidy, biotechnologie, analytické metody
- Podklady k praktickému cvičení – kultivace řasové biomasy, izolace a identifikace karotenoidů (fucoxanthinu)

### Řasy

#### Úvod

- Eukaryotní organismy jednobuněčného i mnohobuněčného charakteru
- Schopnost fotosyntézy
- Produkují více než polovinu kyslíku na Zemi
- Součástí bentosu a planktonu

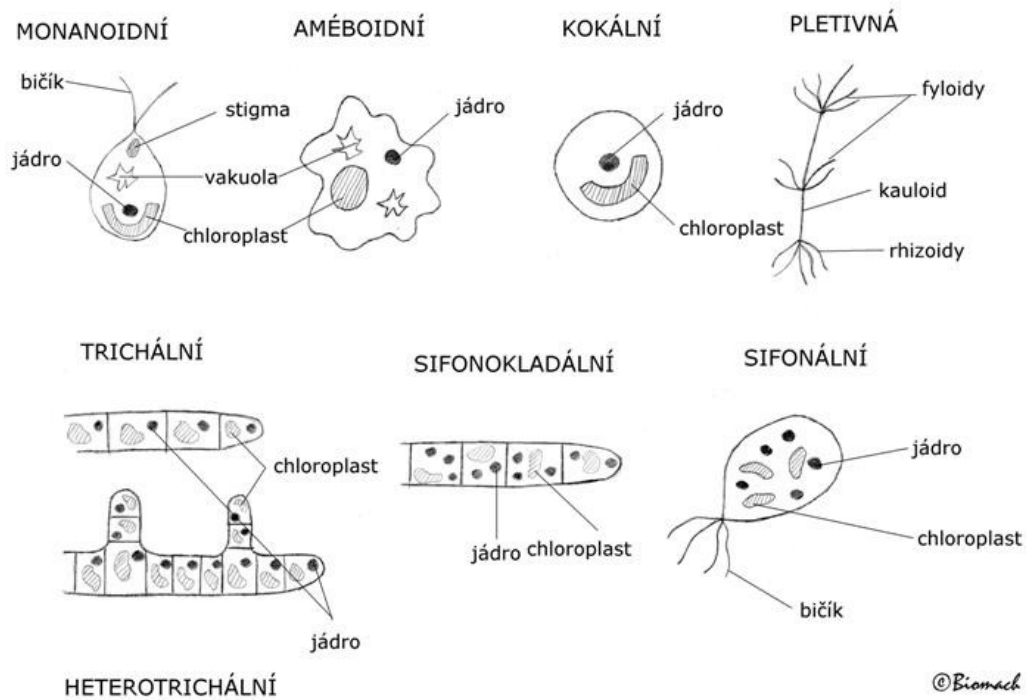
#### Morfologie a fyziologie těla

- Tělo tvoří stélka (thallus)
- Nemají pravé orgány
- U vyšších někdy orgány zastupující pravé (rhizoidy, fyloidy)
- Spory a gamety vznikají v jednobuněčných orgánech bez ochrany sterilních buněk
- Zygota se nikdy nevyvíjí v embryo

#### Klasifikace

- Dříve patřily řasy mezi nižší rostliny, které obsahovaly šest oddělení:
  - Rhodophyta (ruduchy)
  - Dinophyta (obrněnky)
  - Cryptophyta (skrytěnky)
  - Chromophyta (hnědé řasy)
  - Euglenophyta (krásnoočka)
  - Chlorophyta (zelené řasy)
- Nedávno revize systému pět superskupin:
  - SAR
  - Archeplastida
  - Excavata

- Amoebozoa
- Ophistokonta
- Klasifikace podle vývoje stélky:
  - Monanoidní (bičíkatá) – jedna buňka s bičíkem
  - Sifonální (trubicovitá) – jednobuněčná, mnohojaderná
  - Améboidní (rhizopodiální, měňavkovitá) – měňavkový tvar, panožky (pseudopodia)
  - Kokální, kapsální – nepohyblivé
  - Trichální – vláknitá
  - Heterotrichální – vláknitá s rozlišenými postranními a osními vlákny
  - Sifonokladální – vláknitá, mnohojaderná
  - Pletivná – nejvyvinutější, diferenciovaná pletiva a některé orgány



Typy stélek

## Vybraní zástupci

- *Isochrysis galbana*
  - Přítomnost dvou bičíků a tzv. haptonema – orgán podobný bičíku, potravní a pohybová funkce
  - Využití při výrobě biopaliv
  - Obsahuje důležité omega-3 mastné kyseliny – pozitivní vliv na lidský mozek a zdraví obecně
  - Obsahuje fucoxanthin, který způsobuje zlatavou barvu buněk
- *Pseudopedinella*
  - Radiálně symetrické buňky s jedním bičíkem a tripartitními chloupky
  - Přítomnost triád mikrotubulů, někdy tvoří tzv. chapadlo
  - Kořenovité panožky
  - Heterotrofní způsob výživy
  - 6 chloroplastů zlatavé barvy (obsahují fucoxanthin)
  - Zásobní látka chrysolaminaran
- *Prymnesium parvum*
  - Ekologicky významné mořské organismy
  - Dva bičíky a haptonema
  - Obsahuje velké množství fucoxanthinu
- *Phaeodactylum tricorutum*
  - Tělo tvořenou dvojdílnou křemičitou schránkou
  - Schopnost měnit svůj tvar
  - Ke svému životu potřebuje křemík (nutno přidávat do kultivačního média)
  - Bohatý zdroj fucoxanthinu
- *Amphidinium*
  - Velká část bentosu žijícího v písku
  - Typické buňky frustruly složené z dvou částí epitéky a hypotéky (epitéka tvoří méně než jednu třetinu těla)
- *Emiliana huxleyi*
  - Jeden z nejpočetněji zastoupených organismů v planktonu mořských vod
  - Rozsáhlé vodní květy na hladinách (jsou pozorovatelné až z vesmírných družic)

## Karotenoidy

### Úvod

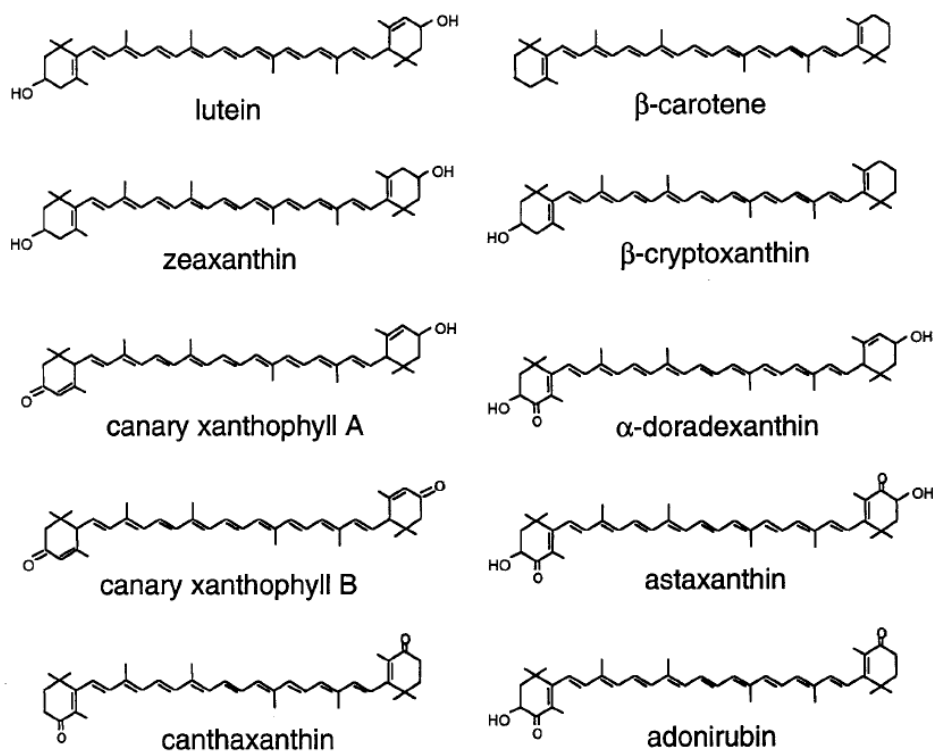
- Přírodní pigmenty žluté nebo oranžové barvy
- Některé organismy je umí syntetizovat – rostliny, houby, řasy, fotosyntetické bakterie

### Syntéza

- Vychází z acetylkoenzymu A (aktivní forma kyseliny octové)
- Postupnou přeměnou acetylkoenzymu A vzniká isoprenoidní jednotka (ta tvoří základ karotenoidu)
- Po spojení dvou těchto jednotek se syntéza rozděluje na dvě dráhy – z jedné vznikají steroidy a z druhé základní prekurzor karotenoidů (fytoen)

### Struktura a klasifikace

- Většina obsahuje čtyři isoprenoidní jednotky tetraterpeny (tetra = čtyři)
- Barevnost těchto látek způsobují řetězce konjugovaných dvojných vazeb
- Dlouhé řetězce způsobují nestabilitu látek (snadno se štěpí)
- Rozdělují se na dvě hlavní skupiny karoteny a xanthofyly
  - Karoteny
    - Obsahují uhlovodíky a liší se polohou dvojných vazeb
    - Nepolární sloučeniny rozpustné v tucích
    - Např.: lykopen, karoten
  - Xanthofyly
    - Kyslíkaté deriváty uhlovodíků
    - Vznik oxidací karotenů
    - Polárnější než karoteny
    - Podle typu kyslíkové skupiny rozlišujeme hydroxykarotenoidy (hydroxylová skupina, např. lutein) a oxokarotenoidy neboli ketokarotenoidy (ketoskupina, např. astaxanthin)
    - Barevnější než karoteny – hydroxykarotenoidy způsobují žluté barvy, ketokarotenoidy červené barvy



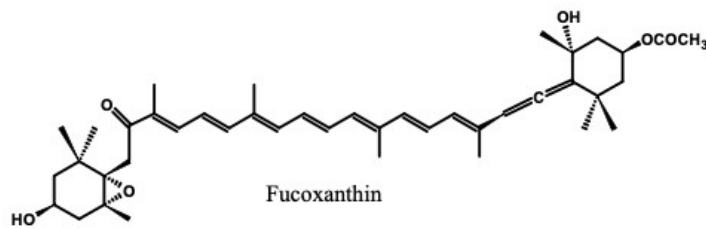
Struktura některých vybraných karotenoidů

#### Výskyt a význam

- Důležité přenašeče energie ve fotosyntetizujících organismech
- Způsobují barevnost rostlin od žluté po červenou (sytnost barvy určuje počet dvojných vazeb – čím více vazeb, tím sytější barva)
- Významné antioxidanty
- Chrání organismy před volnými radikály
- Mnoho pozitivních účinků na lidský organismus – využití při prevenci a léčbě nádorových a kardiovaskulárních onemocnění

## Fucoxanthin

- Xanthofyl
- Součást chloroplastů hnědých řas
- Struktura
  - Struktura úzce souvisí s jeho účinky na lidský organismus
  - Neobvyklé struktury jako žádný jiný karotenoid
  - Nestabilní



Struktura fucoxanthinu

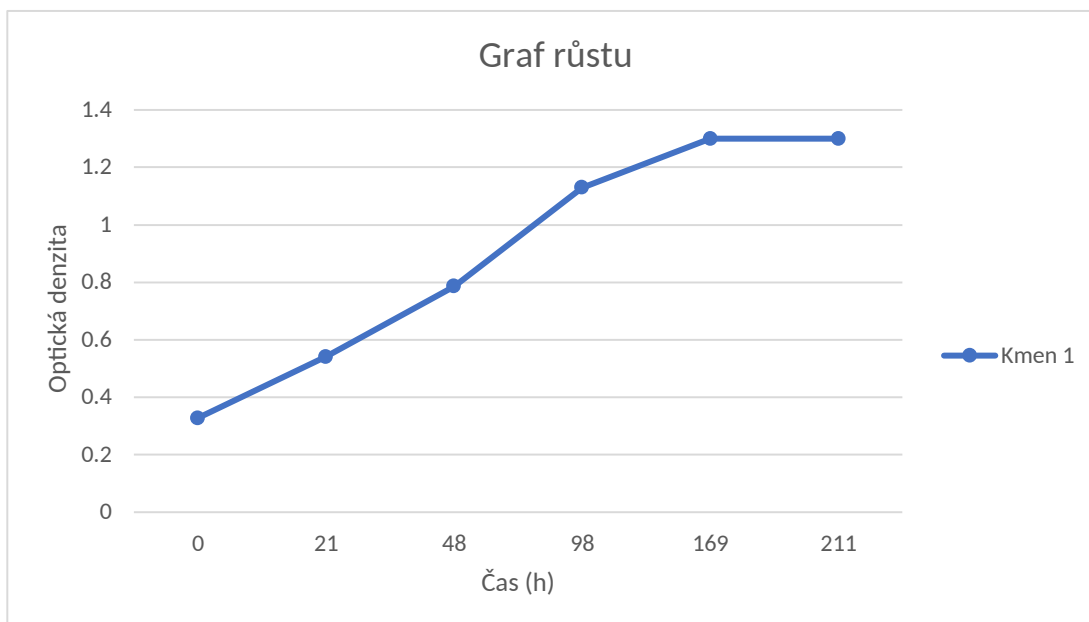
- Výskyt a význam
  - Jeden z nejrozšířenějších karotenoidů
  - Ve struktuře těl mořských řas – častý zdroj potravy
  - Antiobezitní účinky = podporuje redukci hmotnosti
  - Pozitivní účinky při léčbě karcinogenní onemocnění

## Biotechnologie

- Zabývá se kultivací řas, vyhledávání obsahových látek v nich a zpracování řasové biomasy
- Využití v potravinářství, farmacie, medicína apod.
- Způsoby kultivace:
  - Různá živná média přizpůsobená životním podmínkám dané řasy
  - Další parametry – teplota, světlo, hodnota pH, promíchávání média
  - Obecné parametry viz tabulka

Přehled kultivačních parametrů

Parametr	Rozsah	Optimální hodnoty
Teplota (°C)	16–27	18-24
Obsah solí (g.l <sup>-1</sup> )	12–40	20-24
Světelná intenzita (μE sec <sup>-1</sup> m <sup>-2</sup> )	až 2000	100-200
Fotoperioda (světlo:tma)	16:8–24:0	12:12
Hodnota pH	7-9	8,2-8,7



Růstová křivka růstu řasové kultury

## Analytické metody stanovení karotenoidů a fucoxanthinu

### o Nejčastěji chromatografie

Principem je rozdílná rychlost pohybu složek vzorky mezi mobilní (pohyblivou) a stacionární (nepohyblivou) fází

Vzorek je unášen mobilní fází a dochází k separaci složek podle jejich přilnavosti k stacionární fází

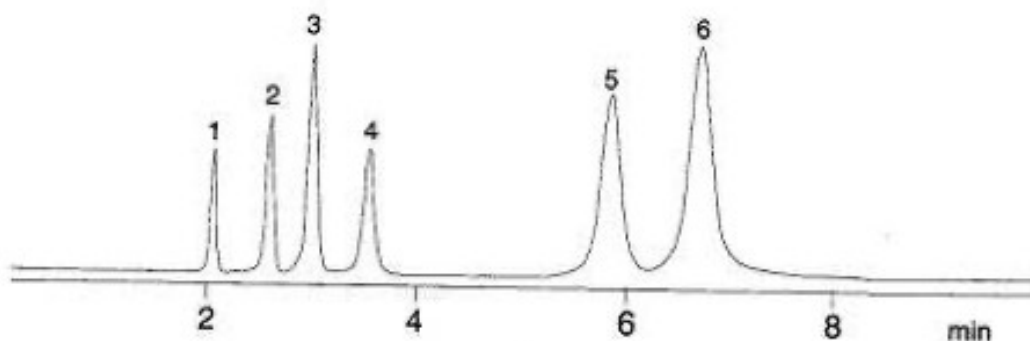
Ta část, která se váže ke stacionární fází nejvíce, ta je unášena mobilní fází nejpomaleji

Výsledkem je chromatogram, z něhož lze určit retenční faktor nebo retenční čas, který je pro každou látku jedinečný

Chromatogram znázorňuje různě velké píky pro jednotlivé složky

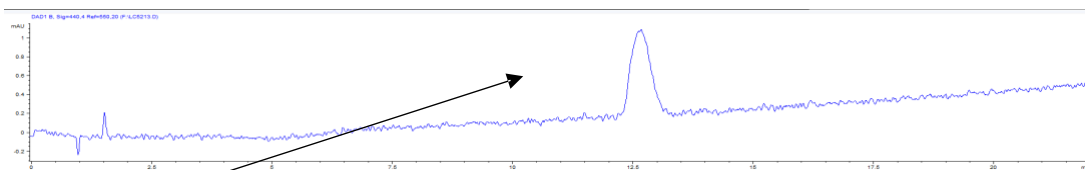
Podle toho, v jakém místě se pík objeví, tedy jaký je retenční čas dané složky, můžeme látku identifikovat (kvalitativní analýza)

Plocha každého píku ukazuje koncentraci dané látky ve vzorku (kvantitativní analýza)



Ukázka chromatogramu, vodorovná osa značí retenční čas (2, 4, 6, 8 min) jednotlivých píků (1-6), zdroj: Chromatografie. [vyuka-data.lf3.cuni.cz](http://vyuka-data.lf3.cuni.cz) 2004. Dostupné z:

[http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie\(4f9a8942587af\).pdf](http://vyuka-data.lf3.cuni.cz/CVSE1M0001/chromatografie(4f9a8942587af).pdf)



$t_R = 12,65 \text{ min}$

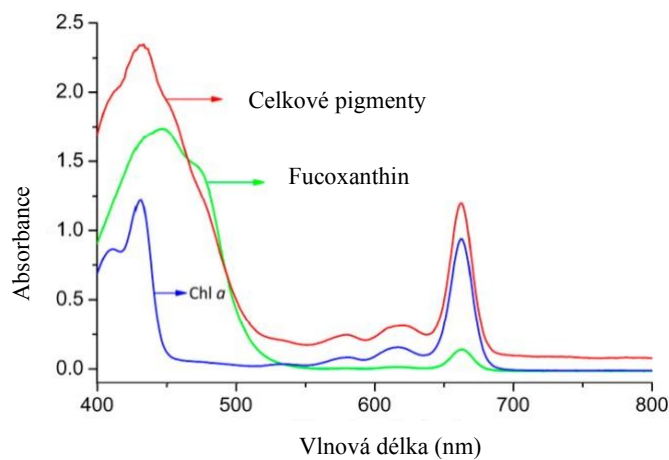
### Chromatografický záznam standardu fucoxanthinu

- K identifikaci pigmentů a kvantitativní analýze se využívá UV-VIS spektrometrie

Princip měření energie, kterou pohltí vzorek při průchodu záření v rozmezí 200-800 nm

Ve chvíli, kdy molekula pohltí záření (určité kvantum fotonů), dochází k přechodu ze základního stavu do excitovaného

Výsledkem je spektrum, které je typické pro každou látku



Spektra celkových pigmentů, fucoxanthinu a chlorofylu *a*, zdroj: Wang et al. 2018

## **Návrh praktického cvičení – izolace a identifikace fucoxanthinu z řasové biomasy**

### **A. Kultivace řasové biomasy:**

**Úkol:** Sledování růstové křivky řasové kultury

1. Příprava kultivačního média (viz kap. 2.1.1)
2. Sterilizace Erlenmayerových baněk a jejich následné naplnění živným roztokem, nádoby se přikryjí alobalem
3. Sterilizace média (nejlépe v autoklávu, případně lze použít tlakový hrnec)
4. Naočkování kultury do kultivačního média a umístění vzorků do světlého chladného místa
5. Při dlouhodobém udržování kultury je nutné přeočkování (po cca měsíci)
  - Pipetou se odebere vzorek biomasy a přenesse se do nové nádoby naplněné kultivačním médiem (postup sterilizace baněk a média je stejný jako v předchozích krocích)

### **B. Izolace karotenoidů (fucoxanthinu)**

**Úkol:** Příprava extraktu a proměření spekter karotenoidů (fucoxanthinu) pomocí UV-Vis spektrofotometrie

1. Navážka biomasy
2. Příprava extraktu (ethanol)
3. Rozetření biomasy s extraktem v třecí misce s pískem
4. Izolace pomocí separačních metod (centrifugace/filtrace)
5. Proměření spekter karotenoidů (fucoxanthinu) v řasovém extraktu pomocí UV-VIS spektrofotometrie

### **C. Identifikace karotenoidů (fucoxanthinu) pomocí chromatografických metod (HPLC)**

**Úkol:** Měření retenčních časů píků standardů vybraných karotenoidů (fucoxanthinu) za daných podmínek.

Analýza řasových extraktů a identifikace vybraných karotenoidů (fucoxanthinu) porovnáním retenčních časů píků z chromatogramu s retenčními časy standardů.

## Použitá literatura

Všechny použité obrázky pochází z teoretické části bakalářské práce, kde jsou očíslovány a uvedeny jejich zdroje. Stejně tak obsah teoretického sdělení. Kapitoly teoretického sdělení mají stejné názvy jako kapitoly v teoretické části práce, ze kterých poznatky vychází a u kterých jsou uvedeny odkazy na použitou literaturu.

Hlavní zdroje literatury:

1. ŠIVEL, Miroslav, et al. Lutein–významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické listy*, 2013, 107.6: 456-463.
2. BARSANTI, Laura; GUALTIERI, Paolo. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. 2006.
3. DOSTÁL, Petr. *Evoluce a systém stélkatých organismů a cévnatých výtrusných rostlin*. Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2006.
4. KAUFNEROVÁ, Veronika. *Metody izolace a kultivace sinic a řas pro potřeby výuky na základních a středních školách*. 2014.

## Shrnutí

Žáci jsou seznámeni s teoretickými poznatky z biologie mikroskopických řas a jejich použití v biotechnologiích, z chemie karotenoidů a způsoby jejich izolace a identifikace pomocí vybraných analytických metod. Na teoretické sdělení navazuje praktický úkol, ve kterém si žáci ověří své teoretické znalosti v praxi při kultivaci vlastní řasové kultury a následného zpracování biomasy, za použití analytických metod izolují a identifikují karotenoidy (fucoxanthinu).

## Závěr

V bakalářské práci jsou shrnuty výsledky experimentu s cílem izolovat a identifikovat fucoxanthin a dalších biologicky významné karotenoidy z vybraných kmenů řas. V teoretické části jsou popsána teoretická východiska zabývající se biologií mikroskopických řas, včetně vybraných kmenů a jejich využití v biotechnologiích, chemii karotenoidů a jejich stanovením za využití vybraných analytických metod. Experimentální část obsahuje dílčí řešení výzkumu, který probíhal v rámci řešení projektu č. TN01000048 v MBÚ v Třeboni. Jeho hlavní cílem byla kultivace řasové kultury, její zpracování a následná izolace a identifikace fucoxanthinu a dalších biologicky významných karotenoidů z vybraných řasových kmenů. Největší množství fucoxanthinu bylo naměřeno v řasovém kmenu *Prymnesium parvum* a to 4,74 ug/ml. Kmen *Isochrysis galbana* obsahoval 2,84 ug/ml a kmen *Phaeodactylum tricorutum* 3,36 ug/ml. Naopak nejnižších hodnot dosáhl kmen *Pseudopedinella* a kmen *Amphidinium*. Kmen *Emiliana huxleyi* nebyl do experimentu zařazen, protože nevykazoval známky růstu při kultivaci. Kromě fucoxanthinu byly identifikovány další biologicky významné karotenoidy a to diadinoxanthin, diatoxanthin, chlorofyl *a*, beta-karoten.

V návaznosti na experimentální část této práce byla zařazena didaktická část, jejíž součástí je vytvoření návrhu studijního materiálu. Obsahem této části je návrh teoretické sdělení, který vychází z poznatků z teoretické části práce a návrh praktického cvičení, který vychází v návaznosti na experimentální část práce. Návrh studijního materiálu, ve kterém dochází k propojení mezioborových vztahů přírodních věd, má za úkol přiblížit současný výzkum žákům a studentům gymnázií se zaměřením na přírodní vědy a vyšších odborných škol.

## Seznam použitých informačních zdrojů

1. MACHÁČEK, T., et al. Proměny vyšší systematiky eukaryot a její odraz ve středoškolské biologii. *Živa*, 2016, s. 27-30
2. POCHEVILLE, Arnaud. The ecological niche: history and recent controversies. In: *Handbook of evolutionary thinking in the sciences*. Springer, Dordrecht, 2015. s. 547-586.
3. YAMAGUCHI, Masayoshi. *Carotenoids: Properties, Effects and Diseases*. Nova Science Publishers, Incorporated, 2012.
4. THOMSEN, Helge Abildhauge. Ultrastructural studies of the flagellate and cyst stages of *Pseudopedinella tricostata* (Pedinellales, Chrysophyceae). *British Phycological Journal*, 1988, 23.1: 1-16.
5. VELÍŠEK, J.; HAJŠLOVÁ, J. Chemie potravin II. 3. vyd. *Tábor: Osis*, 2009, 623.
6. KAUFNEROVÁ, Veronika. Metody izolace a kultivace sinic a řas pro potřeby výuky na základních a středních školách. 2014.
7. SAMEK, Dušan. Vliv způsobu kultivace a dezintegrace řasové biomasy na obsah a výtěžnost nutričních faktorů. 2009.
8. BUČKOVÁ, Michaela. Fenotypová plasticita zelené řasy *Desmodesmus communis* vyvolaná změnami pH, teploty a množstvím živin v prostředí. 2013.
9. DOBRÁ, Lenka. Fenotypová plasticita *Desmodesmus communis* vyvolaná turbulencemi a přítomností predátorů v prostředí. 2013.
10. PIENAAR, R. N. Ultrastructure and calcification of coccolithophores. *Coccolithophores*, 1994, 13-38.
11. FENG, Dina, et al. Increased lipid production of the marine oleaginous microalgae *Isochrysis zhangjiangensis* (Chrysophyta) by nitrogen supplement. *Bioresource Technology*, 2011, 102.12: 6710-6716.
12. KRINSKY, I. N. Carotenoids in medicine. In: *Carotenoids: Chemistry and Biology*. New York, Plenum Press 1990: 279-291.
13. DOSTÁL, Petr. *Evoluce a systém stélkatých organismů a cévnatých výtrusných rostlin*. Univerzita Karlova v Praze, Pedagogická fakulta, 2006.
14. ADL, Sina M., et al. The revised classification of eukaryotes. *Journal of eukaryotic microbiology*, 2012, 59.5: 429-514.

15. CALDER, Philip C. Omega-3 polyunsaturated fatty acids and inflammatory processes: nutrition or pharmacology?. *British journal of clinical pharmacology*, 2013, 75.3: 645-662.
16. SANGEETHA, R. K.; BHASKAR, N.; BASKARAN, V. Comparative effects of  $\beta$ -carotene and fucoxanthin on retinol deficiency induced oxidative stress in rats. *Molecular and cellular biochemistry*, 2009, 331.1: 59-67.
17. AMAN, Robert; SCHIEBER, Andeas; CARLE, Reinhold. Effects of heating and illumination on trans – cis isomerization and degradation of  $\beta$ -carotene and lutein in isolated spinach chloroplasts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 2005, 53.24: 9512-9518.
18. DOI, Yukiko, et al. Isolation of Apo-9'-fucoxanthinone from the Cultured Marine Dinoflagellate Amphidinium sp. *Journal of natural products*, 1995, 58.7: 1097-1099.
19. HU, Tingting, et al. Antioxidant activity of sulfated polysaccharide fractions extracted from *Undaria pinnatifida* in vitro. *International journal of biological macromolecules*, 2010, 46.2: 193-198.
20. ŠIVEL, Miroslav, et al. Lutein–významný karotenoid ve výživě člověka. *Chemické listy*, 2013, 107.6: 456-463.
21. SUN, Zheng; WANG, Xiaofei; LIU, Jin. Screening of Isochrysis strains for simultaneous production of docosahexaenoic acid and fucoxanthin. *Algal Research*, 2019, 41: 101545.
22. BARSANTI, Laura; GUALTIERI, Paolo. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology*. 2006.
23. GILBERT-LÓPEZ, Bienvenida, et al. Downstream processing of *Isochrysis galbana*: a step towards microalgal biorefinery. *Green Chemistry*, 2015, 17.9: 4599-4609.
24. DELBRUT, Antoine, et al. Fucoxanthin and polyunsaturated fatty acids co-extraction by a green process. *Molecules*, 2018, 23.4: 874.
25. KOPECKÝ, J., LHOTSKÝ, R., PAICHLOVÁ, J., *Aktivní látky mikrořas ve výživě*. Středisko společných činností AV ČR, 2017. ISBN 978-80-270-2247-2.
26. WRIGHT, Simon W.; JEFFREY, S. W. Fucoxanthin pigment markers of marine phytoplankton analysed by HPLC and HPTLC. *Marine Ecology Progress Series*, 1987, 259-266.
27. ŠTÍPEK, Stanislav. Anioxidanty a volné radikály ve zdraví av nemoci. Grada Publishing, 2000.

28. BRITTON, George; PFANDER, Hanspeter Pfander; LIAAEN-JENSEN, Synnøve Liaaen-Jensen (ed.). *Carotenoids: biosynthesis and metabolism*. Birkhäuser Verlag, 1995.
29. GAMMONE, Maria Alessandra; D'ORAZIO, Nicolantonio. Anti-obesity activity of the marine carotenoid fucoxanthin. *Marine drugs*, 2015, 13.4: 2196-2214.
30. JEFFREY, S. W. Qualitative and quantitative HPLC analysis of SCOR reference algal cultures. *Phytoplankton pigments in oceanography*, 1997, 343-360.
31. MCGRAW, Kevin J., et al. The influence of carotenoid acquisition and utilization on the maintenance of species-typical plumage pigmentation in male American goldfinches (*Carduelis tristis*) and northern cardinals (*Cardinalis cardinalis*). *Physiological and Biochemical Zoology*, 2001, 74.6: 843-852.
32. MACHÁČEK, T. *et al.* Biomach, výpisky z biologie [online]. 2005– [cit. 12-02-21]. Dostupné z: [www.biomach.cz](http://www.biomach.cz).
33. JØRGENSEN, Mårten Flø; MURRAY, Shauna; DAUGBJERG, Niels. AMPHIDINIUM REVISITED. I. REDEFINITION OF AMPHIDINIUM (DINOPHYCEAE) BASED ON CLADISTIC AND MOLECULAR PHYLOGENETIC ANALYSES 1. *Journal of Phycology*, 2004, 40.2: 351-365.
34. MCKEW, Boyd A., et al. The trade-off between the light-harvesting and photoprotective functions of fucoxanthin-chlorophyll proteins dominates light acclimation in *Emiliana huxleyi* (clone CCMP 1516). *New Phytologist*, 2013, 200.1: 74-85.
35. WANG, Li-Juan, et al. A rapid method for the determination of fucoxanthin in diatom. *Marine drugs*, 2018, 16.1: 33.
36. CARRETO, J. I.; CATOGGIO, J. A. An indirect method for the rapid estimation of carotenoid contents in *Phaeodactylum tricornutum*: Possible application to other marine algae. *Marine Biology*, 1977, 40.2: 109-116.
37. VONSHAK, Avigad (ed.). *Spirulina platensis arthrospira: physiology, cell-biology and biotechnology*. CRC press, 1997.
38. BOROWITZKA, Michael A. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, and fermenters. In: *Progress in industrial microbiology*. Elsevier, 1999. p. 313-321.
39. PEREZ-GARCIA, Octavio, et al. Heterotrophic cultures of microalgae: metabolism and potential products. *Water research*, 2011, 45.1: 11-36.

40. KAŠTOVSKÝ, J., HAUER, T. (2017). Sinice a řasy.cz. Dostupné z <http://www.sinicearasy.cz/>
41. PENG, Juan, et al. Fucoxanthin, a marine carotenoid present in brown seaweeds and diatoms: metabolism and bioactivities relevant to human health. *Marine drugs*, 2011, 9.10: 1806-1828.
42. KLOUDA, Pavel. *Moderní analytické metody*. Pavel Klouda, 2003.
43. BIDIGARE, Robert R.; VAN HEUKELEM, Laurie; TREES, Charles C. Analysis of algal pigments by high-performance liquid chromatography. *Algal culturing techniques*, 2005, 327-345.
44. PERKAMPUS, Heinz-Helmut. *UV-VIS Spectroscopy and its Applications*. Springer Science & Business Media, 2013.
45. KOPLÍK, Richard. *Základy analýzy potravin: Separační metody*. Dostupné z: [https://web.vscht.cz/~koplikr/ČástA6\\_1.pdf](https://web.vscht.cz/~koplikr/ČástA6_1.pdf)
46. MORTENSEN, Alan; SKIBSTED, Leif H. Importance of carotenoid structure in radical-scavenging reactions. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 1997, 45.8: 2970-2977.
47. ZHANG, Hui, et al. Fucoxanthin: A promising medicinal and nutritional ingredient. *Evidence-based complementary and alternative medicine*, 2015.
48. DAVIES, Brian H. Carotenoid metabolism in animals: a biochemist's view. *Pure and Applied Chemistry*, 1985, 57.5: 679-684.
49. ARMSTRONG, Gregory A.; HEARST, John E. Genetics and molecular biology of carotenoid pigment biosynthesis. *The FASEB journal*, 1996, 10.2: 228-237.
50. BRITTON, George. Structure and properties of carotenoids in relation to function. *The FASEB Journal*, 1995, 9.15: 1551-1558.
51. JAKOB, I.; WEGGENMANN, F.; POSTEN, C. Cultivation of *Emiliania huxleyi* for coccolith production. *Algal research*, 2018, 31: 47-59.
52. HILL, Geoffrey E.; INOUE, Caron Y.; MONTGOMERIE, Robert. Dietary carotenoids predict plumage coloration in wild house finches. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B: Biological Sciences*, 2002, 269.1496: 1119-1124.
53. ENGLERT, Gerhard; BJØRNLAND, Terje; LIAAEN-JENSEN, Synnøve. 1D and 2D NMR study of some allenic carotenoids of the fucoxanthin series. *Magnetic Resonance in Chemistry*, 1990, 28.6: 519-528.

54. HOSOKAWA, Masashi, et al. Apoptosis-inducing effect of fucoxanthin on human leukemia cell line HL-60. *Food Science and Technology Research*, 1999, 5.3: 243-246.
55. DAS, Swadesh K., et al. Fucoxanthin induces cell cycle arrest at G0/G1 phase in human colon carcinoma cells through up-regulation of p21WAF1/Cip1. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2005, 1726.3: 328-335.
56. DAS, Swadesh K.; HASHIMOTO, Takashi; KANAZAWA, Kazuki. Growth inhibition of human hepatic carcinoma HepG2 cells by fucoxanthin is associated with down-regulation of cyclin D. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-General Subjects*, 2008, 1780.4: 743-749.
57. MAEDA, Hayato, et al. Anti-obesity and anti-diabetic effects of fucoxanthin on diet-induced obesity conditions in a murine model. *Molecular Medicine Reports*, 2009, 2.6: 897-902.
58. JASWIR, Irwandi, et al. Isolation of fucoxanthin and fatty acids analysis of *Padina australis* and cytotoxic effect of fucoxanthin on human lung cancer (H1299) cell lines. *African Journal of Biotechnology*, 2011, 10.81: 18855-18862.
59. ENGSTRÖM-ÖST, Jonna, et al. Effects of toxic cyanobacteria on a plankton assemblage: community development during decay of *Nodularia spumigena*. *Marine Ecology Progress Series*, 2002, 232: 1-14.
60. VAN HEUKELEM, Laurie; THOMAS, Crystal S. Computer-assisted high-performance liquid chromatography method development with applications to the isolation and analysis of phytoplankton pigments. *Journal of Chromatography A*, 2001, 910.1: 31-49.
61. MARTINO, Alessandra De, et al. Genetic and phenotypic characterization of *Phaeodactylum tricorutum* (Bacillariophyceae) accessions 1. *Journal of Phycology*, 2007, 43.5: 992-1009.
62. KIM, Sang Min, et al. A potential commercial source of fucoxanthin extracted from the microalga *Phaeodactylum tricorutum*. *Applied biochemistry and biotechnology*, 2012, 166.7: 1843-1855.
63. CARVALHO, Wanderson F.; GRANÉLI, Edna. Contribution of phagotrophy versus autotrophy to *Prymnesium parvum* growth under nitrogen and phosphorus sufficiency and deficiency. *Harmful Algae*, 2010, 9.1: 105-115.
64. ROSYPAL, Stanislav. *Nový přehled biologie*. Scientia, 2003.

65. STARÝ, Karel; RUSEK, Martin. Rozvoj mezipředmětových vztahů ve škole. Pedagogická fakulta, Univerzita Karlova. 2019.
66. ČADÍLEK, Miroslav; LOVEČEK, Aleš. Didaktika odborných předmětů. *Účelové vydání pro DPS. Brno: PedF MU, 2005.*
67. BILEK, Martin; HRUBÝ, Jaroslav. Počítačem podporovaný školní chemický experiment jako prostředek badatelsky orientované výuky. *Retrieved from: <http://chemistrynetwork.pixelonline.org/data/SUE db/doc/56 Chemistry>, 2014.*
68. BÁRCENAS-PÉREZ, Daniela, et al. A biorefinery approach to obtain docosahexaenoic acid and docosapentaenoic acid n-6 from Schizochytrium using high performance countercurrent chromatography. *Algal Research*, 2021, 55: 102241.
69. JEHLIČKA, Jan; CULKA, Adam; MAREŠ, Jan. Raman spectroscopic screening of cyanobacterial chasmoliths from crystalline gypsum—The Messinian crisis sediments from Southern Sicily. *Journal of Raman Spectroscopy*, 2020, 51.9: 1802-1812.