

**Univerzita Karlova**  
**Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Biologie

Studijní obor: Botanika



**Bc. Terezie Očadlíková**

Vliv stresových faktorů na tvorbu karotenoidů v izolovaných kmenech půdních  
řas

Effect of stress factors on carotenoid production in isolated soil algae strains

Diplomová práce

Školitel: doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Konzultant: RNDr. Eliška Nováková, Ph.D.

Praha, 2021

**Prohlášení:**

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 8. 2021

Podpis

## **Poděkování**

Především bych chtěla poděkovat své školitelce Yvonne Němcové, za její pomoc, trpělivost a rady při vypracovávání této práce. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Elišce Novákové za poskytnutí odborné kritiky a mnoha užitečných připomínek. Ráda bych také poděkovala členům své rodiny, a to především manželovi, protože mne ve studiu vždy podporovali.

## Abstrakt

Mikroskopické zelené řasy produkují celou řadu prospěšných látek. Mezi komerčně využívané patří hlavně pigmenty především pak sekundární karotenoidy. Zatímco primární karotenoidy jsou součástí fotosyntetického aparátu, sekundární karotenoidy jsou produkovány pouze za určitých specifických podmínek (např. vysoký osvit, nedostatek dusíku). Sekundární karotenoidy mají antioxidační schopnosti, které chrání buňku před nepříznivými vlivy. Komerčně využívané kmeny a kmeny, které se testují pro potencionální využití, pochází téměř výhradně z řasových sbírek, proto je tato diplomová práce zaměřena na kmeny izolované z přírody.

Byly nalezeny a vyizolovány dva kmeny aeroterestrických zelených jednobuněčných řas, které projevíly potenciál produkovat karotenoidy. Tyto kmeny byly určeny jako *Tetracystis pulchra* (clade *Dunaliellinia*) a *Tetracystis* sp., kmen příbuzný *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80, patřící do cladu *Stephanosphaerinia*. Pro kmen *T. pulchra* byly následně optimalizovány kultivační podmínky a poté byla kultura podrobena sérii experimentů zkoumajících vliv stresových faktorů na tvorbu a akumulaci karotenoidů. Konkrétně byl testován efekt dusíkového hladovění, intenzity osvit, teploty a UVA záření. Bylo prokázáno, že zejména intenzita osvit a limitace dusíkem ve velké míře ovlivňují biomasu i tvorbu karotenoidů.

Experimentálně bylo zjištěno, že nejzastoupenějším karotenoidem v *T. pulchra* je  $\beta$ -karoten, dále se ve vyšších množstvích v této řase vyskytoval lutein, zeaxanthin a echinenon. Celkové množství karotenoidů v *T. pulchra* bohužel nedosáhlo dostatečně vysokých hodnot, aby tento kmen mohl konkurovat momentálně využívaným řasám. To však nic nemění na faktu, že půdní řasy získané z přírody mohou mít velký potenciál v oblasti biotechnologie. Pro stanovení celkového množství karotenoidů byla optimalizována metoda dle Lichtenthaler and Buschmann, (2001) a pro identifikaci jednotlivých karotenoidů a zjištění jejich zastoupení ve vzorku byla modifikována metoda podle Liu et al., (2010). V kombinaci tyto dvě metody tvoří ideální postup pro relativně levné a rychlé stanovení karotenoidů.

**Klíčová slova:** astaxanthin,  $\beta$ -karoten, Chlorophyceae, echinenon, karotenoidy, lutein, mikrořasy, N-deficience, růstová rychlost, stresové faktory, světelná intenzita

## Abstract

Microscopic green algae produce a number of beneficial substances. The commercially used ones include mainly pigments, especially secondary carotenoids. While primary carotenoids are part of the photosynthetic apparatus, secondary carotenoids are produced only under certain specific conditions (e.g. high exposure to light, nitrogen deficiency). Secondary carotenoids have antioxidant properties that protect the cell from adverse effects. The strains currently in commercial use and the strains that are tested for potential use come almost exclusively from algal collections, so this thesis focuses on strains isolated from nature.

Two strains of aeroterrestrial green unicellular algae, which showed potential of producing carotenoids, were found and isolated. These strains were identified as *Tetracystis pulchra* (clade *Dunaliellinia*) and *Tetracystis* sp., a strain related to *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80, belonging to the clade *Stephanosphaerinia*. The culture conditions for *T. pulchra* were subsequently optimized and then the culture was subjected to a series of experiments, examining the effect of stress factors on carotenoid formation and accumulation. Specifically, the effect of nitrogen starvation, light intensity, temperature and UVA radiation was tested. It has been shown that especially the light intensity and nitrogen starvation greatly affect biomass and the formation of carotenoids.

From the data obtained,  $\beta$ -carotene was found to be the most abundant carotenoid in *T. pulchra*, followed by lutein, zeaxanthin and echinenone in higher amounts in this alga. Unfortunately, the total amount of carotenoids in *T. pulchra* did not reach high enough values for this strain to compete with currently used algae. However, this does not change the fact that soil algae obtained from nature can have great potential in the field of biotechnology. The method according to Lichtenthaler and Buschmann, (2001) was optimized for the determination of the total amount of carotenoids and the method according to Liu et al., (2010) was modified for the identification of individual carotenoids and their determination in the sample. In combination, these two methods form an ideal procedure for the relatively inexpensive and rapid determination of carotenoids.

**Keywords:** asthaxanthin,  $\beta$ -carotene, Chlorophyceae, echinenone, carotenoids, lutein, microalgae, N-depletion, growth rate, stress factors, light intensity

# Obsah

1. Úvod.....	8
1.1. Karotenoidy.....	8
1.2. Vliv stresových faktorů na produkci karotenoidů u zelených řas.....	11
1.2.1. Limitace dusíkem .....	11
1.2.2. Vysoká míra ozáření.....	13
1.2.3. Vystavení UVA .....	15
1.2.4. Teplota.....	16
1.2.5. Salinita a pH .....	17
1.3. Biotechnologicky významné zelené řasy produkující karotenoidy .....	18
1.4. Polyfyletický rod <i>Tetracystis</i> .....	22
1.5. Cíle práce.....	25
2. Metodika.....	25
2.1. Odběr vzorků.....	25
2.2. Kultivace vzorků .....	26
2.3. Morfologická charakterizace .....	27
2.4. Genetická charakterizace.....	28
2.4.1. Izolace DNA, PCR a sekvenování.....	28
2.4.2. Fylogenetická analýza .....	29
2.5. Pilotní teplotní pokus.....	30
2.6. Experimenty navozující stresové podmínky.....	30
2.6.1. Vliv světelné intenzity a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů.....	31
2.6.2. Dvoufázová kultivace.....	33
2.6.3. Vliv teploty, UVA a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů.....	33
2.7. Stanovení karotenoidů.....	35
2.7.1. Použité chemikálie.....	35
2.7.2. Extrakce.....	35
2.7.3. Kvantitativní stanovení celkových karotenoidů podle Lichtenthalera .....	35
2.7.4. Kvantitativní a kvalitativní stanovení karotenoidů pomocí HPLC.....	36
3. Výsledky.....	38
3.1. Fylogenetické postavení zkoumaných kmenů.....	38
3.2. Morfologie.....	40
3.2.1. <i>Tetracystis pulchra</i> , Kmen C.....	40
3.2.2. Kmen F .....	43
3.3. Pilotní teplotní pokus.....	45
3.4. Experimenty navozující stresové podmínky.....	48
3.4.1. Vliv světelné intenzity a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů.....	48

3.4.2.	Dvoufázová kultivace.....	53
3.4.3.	Vliv teploty, UVA a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů.....	57
4.	Diskuze.....	61
4.1.	Shrnutí a porovnání výsledků.....	61
4.2.	Optimalizace metody pro kvantitativní a kvalitativní stanovení karotenoidů.....	66
4.3.	Nalezení optimálních podmínek pro kultivaci <i>T. pulchra</i> .....	67
4.4.	Určení kmenů.....	69
4.5.	Problematika získávání nových kmenů z přírody.....	70
5.	Závěr.....	71
6.	Seznam použité literatury.....	73

# 1. Úvod

Karotenoidy jsou významné přírodní látky s velkým potenciálem, kterým se v poslední době věnuje stále více pozornosti. Mikroskopické řasy jsou již nyní využívaným zdrojem těchto látek, ale stále se hledají nové způsoby kultivace a optimalizace tvorby, akumulace a následného zpracování získávaných látek. Mezi nejvýznamnější zástupce biotechnologicky využívaných řas patří mimo jiné *Haematococcus pluvialis*, jakožto zdroj sekundárního karotenoidu astaxanthin a *Dunaliella salina*, kultivovaná pro získání  $\beta$ -karotenu (Egeland, 2016). Kromě pokroku s těmito již dříve zavedenými řasovými zdroji karotenoidů se hledají také nové, či méně známé kmeny řas, které by mohly mít v této oblasti potenciál. Kmeny získané z přírody jsou stále nedostatečně prozkoumanou možností, která by mohla poskytovat nové příležitosti. Mezi řasy, které mají potenciál pro tvorbu karotenoidů patří i aeroterestrické půdní řasy, jimž se ve své práci věnuji.

## 1.1. Karotenoidy

Karotenoidy jsou lipofilní barevné látky, pohybující se od žluté až po červenou, ačkoliv se vzácně mohou vyskytovat i fialové či bezbarvé (Britton *et al.*, 2004). Ačkoliv se tyto přírodní pigmenty vyskytují i v lidech a zvířatech, tělo si je nedokáže syntetizovat a musejí být dodávány v potravě. Na rozdíl od toho mikroorganismy, rostliny a některé houby tyto látky syntetizovat mohou (Pallett and Young, 2017). Přestože v buňkách se jedná o látky stabilní, když se ocitnou mimo buňku, stávají se nestabilními a rychle se rozkládají, především pak na vzduchu v přítomnosti kyslíku, na světle a v pokojové teplotě. Práce s nimi je tedy značně náročná a vyžaduje přípravu a specifické vybavení (Egeland, 2016; Pallett and Young, 2017).

Základní struktura karotenoidů je tvořena 40 uhlíky, jedná se tedy o tetraterpeny tvořené 8 isoprenovými jednotkami. Jakožto výrazné pigmenty jsou karotenoidy syntetizovány v plastidu, kde postupným připojováním difosfátových podjednotek k jednotce isoprenu (3-methylbut-3-enyl difosfát) vzniká 20 uhlíkatý prekursor geranygeranyl difosfát – GGPP (3,7,11,15-tetramethylhexadeca-2,6,10,14-tetraenyl difosfát). Spojením dvou molekul GGPP vzniká první karotenoid biosyntetické dráhy karotenoidů – bezbarvý fytoen (15-cis-fytoen). Izomerací a desaturací této látky vzniká lykopen ( $\psi,\psi$ -karoten), základní stavební kámen všech dalších karotenoidů (Britton and Goodwin, 1971; Britton, 1986; Egeland, 2016; Pallett and Young, 2017).



Další klasifikace karotenoidů je dále založená buď na jejich chemické struktuře, či na jejich funkci. Podle struktury se dělí na karoteny, látky sestávající pouze z uhlovodíkového řetězce a na xantofyly, jejichž struktura obsahuje jednu či více kyslíkatých funkčních skupin (Gong and Bassi, 2016; Pallett and Young, 2017). Dle funkce jsou karotenoidy rozděleny na primární a sekundární. Primární karotenoidy jsou trvalou součástí fotosystému. Fungují jako přídavné světlosběrné pigmenty přímo ve fotosyntetickém aparátu a hrají tedy roli ve fotosyntéze. Karotenoidy fungují jako přídavné pigmenty v podobě světlosběrných antén či v případě  $\beta$ -karotenu se fotosyntézy účastní přímo v reakčním centru. Díky svým konjugovaným dvojným vazbám dokáží absorbovat světlo v oblasti 400-500 nm a rozšiřují tak spektrum využitelného světla, čímž přispívají k vyšší efektivitě fotosyntézy (Frank and Cogdell, 1996; Britton, 2008; Egeland, 2016). Na rozdíl od primárních, sekundární karotenoidy jsou v buňce tvořeny pouze po vystavení řasy specifickým podmínkám, které také tvorbu a akumulaci sekundárních karotenoidů výrazně zvyšují. Jejich hlavní funkcí je ochrana buňky, především před vysokým ozářením, což je také jedna z vnějších podmínek podporujících tvorbu karotenoidů ve vysokých koncentracích. Tyto látky se v buňce vyskytují mimo fotosyntetický aparát v lipidových kapénkách (Britton, 2008; Begum *et al.*, 2016; Egeland, 2016; Gong and Bassi, 2016).

Ačkoliv již výše zmíněná účast ve fotosyntéze, je jednou z hlavních funkcí karotenoidů, mají tyto látky další funkce přímo spojené s přítomností světla. Předpokládalo se, že u řas bude mít příspěvek karotenoidů do fotosyntézy větší váhu než u vyšších rostlin, ukázalo se však, že ne vždy tomu tak je. U zelených řas je efektivita využití světla absorbovaného karotenoidy zhruba na stejné úrovni jako u vyšších rostlin, tedy něco okolo 50 % (Goodwin, 1980a; Britton, 2008). Karotenoidy také slouží jako fotoreceptory, konkrétně fotoreceptory modrého světla – absorpční maximum karotenoidů totiž leží mezi 400-500 nm. Zaznamenání modrého světla poté vede k fototropii či fototaxi, karotenoidy zaznamenávající modré světlo tedy tyto procesy spouští. Významnou roli zde hraje především  $\beta$ -karoten a zeaxanthin (Goodwin, 1980a; Young and Britton, 1993; Britton, 2008). Další důležitou funkcí karotenoidů je ochrana buňky před přílišným ozářením, které by mohlo buňku poškodit až usmrtit. Slouží jako filtr, zabraňující vnikání poškozujících vlnových délek světla do citlivých tkání a chrání tak buňku před světelným stresem (Britton, 2008). Při fotoinhibici a vytvoření nebezpečného singletového kyslíku dokáží karotenoidy velmi efektivně tyto nebezpečné molekuly disipovat za pomoci xantofylového cyklu (Goodwin, 1980a; Egeland, 2016). Díky své elektronově bohaté struktuře jsou karotenoidy látky náchylné k oxidaci a k interakci s volnými radikály –

to je dělá velmi efektivními antioxidanty. Chrání buňky proti lipidové peroxidaci a tvorbě radikálů. Především astaxanthin a actinioerythrol se ukázaly být výbornými antioxidanty. Beta-karoten a lykopen sice také fungují jako silné antioxidanty, bohužel však v procesu degradují. Obecně jsou ale karotenoidy přijímány jako účinné přírodní antioxidanty, mohou se totiž v určitých podmínkách obnovovat a dále tuto funkci plnit (Young and Britton, 1993; Britton, 2008; Jackson *et al.*, 2008).

Vzhledem ke své lipofilní povaze mají karotenoidy svou roli i v membránách. Jejich struktura jim umožňuje stát se součástí lipidové dvojvrstvy, kde ovlivňují vlastnosti membrán, jako jejich rigiditu nebo propustnost. Dále také samozřejmě chrání lipidové membrány proti oxidačnímu poškození. Tato vlastnost je velmi silně ovlivněná umístěním jednotlivých karotenoidů ve dvojvrstvě. Karoteny jako lykopen nebo  $\beta$ -karoten jsou lokalizovány v silně hydrofobním jádře dvojvrstvy a chrání tedy pouze v těchto místech, zatímco xantofyly jako zeaxanthin jsou rozmístěné v polárnější části, na povrchu dvojvrstvy, a dokáží tak chránit membrány i zvenčí (Britton, 2008; Solovchenko, 2012).

Jak již bylo zmíněno, karotenoidy jsou fotoreceptory, je tedy nasnadě, že mají své funkční místo i v oblasti zraku. Nepřímo jsou skrz metabolit retinal součástí zrakových pigmentů, retinal, jakožto látka odvozená od vitamínu A (retinol), je v komplexu s proteiny opsinu základem fotoreceptorů a tedy i zraku všech zvířat (Britton, 2008; Dartnall, 2019). Přímo jsou karotenoidy zastoupeny v makulárních pigmentech, žlutá skvrna v oku obsahuje vysoké koncentrace xantofylů, které fungují jako obrana před přílišným ozářením. Karotenoidy také slouží jako prevence proti zrakovým defektům spojeným se stárnutím organismu, především pak  $\beta$ -karoten se jeví jako významný v boji proti makulární degeneraci (Frank *et al.*, 1999; Britton, 2008).

Barva je v přírodě velmi významná, může sloužit jako varování, nebo naopak jako lákadlo. Není tedy divu, že barevné pigmenty, potažmo karotenoidy jsou v této oblasti jedny z nejzásadnějších látek. Většina barev v rostlinách i mikroorganismech je založena na pigmentech a mnoho pigmentů se vyskytuje i ve zvířecí říši. Karotenoidy jakožto látky schopné pohlcovat a odrážet světlo o specifické vlnové délce pak udávají výslednou barvu daného organismu nebo jeho části, drží tedy význačné místo mezi přírodními pigmenty (Britton, 1983, 2008). Výrazné zbarvení karotenoidů, které je v listech překryto zelenými chlorofyly, je nejlépe vidět v květech a ovoci, kde se karotenoidy vyskytují ve všech jejich částech. Důvodem tohoto umístění je pravděpodobně zvýšení atraktivity květů pro opylovače, což znamená lepší šanci na opylení rostliny a stejně tak větší přitažlivost ovoce pro ptáky,

kteří se dále starají o rozšíření semen (Goodwin, 1980b; Cohen, 2002; Britton, 2008). Co se týče zvířat, karotenoidy jsou zodpovědné za většinu žlutých, oranžových a červených barev v rybách, ptácích, hmyzu a mořských bezobratlých. Dále jsou spojovány také s neobvyklejšími barvami jako fialová, zelená či modrá, což je způsobeno změnou jejich absorpčních vlastností v důsledku vytvoření komplexu s proteiny. Funkce karotenoidů jakožto barevných pigmentů se velmi různí od navýšení atraktivity, přes kamufláž až k ochraně proti příliš intenzivnímu záření či plnění funkce fotoreceptorů. Na rozdíl od rostlin a mikroorganismů však zvířata nedokážou karotenoidy tvořit, musejí je přijímat z potravy a ukládat je. Proto je zásadní v některých odvětvích jako chov ryb či drůbeže karotenoidy ve stravě dodávat, pro udržení intenzity barvy masa nebo žloutků (Fox, 1979; Britton, 1983, 2008; Begum *et al.*, 2016).

## **1.2. Vliv stresových faktorů na produkci karotenoidů u zelených řas**

Mikroskopické řasy jsou organismy schopné přežít i v prostředích obecně považovaných za nehostinné, vystavené různým nepříznivým podmínkám a biotickým i abiotickým stresům, jako teplotní extrémy, vysoká salinita, sucho, vysoká míra ozáření, nedostatek živin a jiné. Velké množství zelených řas je za určitých podmínek schopno tvořit a akumulovat karotenoidy a v odpovědi na tyto nepříznivé růstové podmínky pak tyto látky mohou tvořit v mnohonásobně větší míře. Již bylo dokázáno, že produkce karotenoidů je u zelených řas do značné míry ovlivněna právě stresovými faktory (Guedes *et al.*, 2011; Egeland, 2016).

Stresové faktory se obecně mohou dělit na nutriční a fyzikální. Nutriční faktory zpravidla ovlivňují kompozici média, jako limitace nebo kompletní absence dusíků. Za fyzikální stresory se naopak považují změny podmínek kultivace jako například změna míry ozáření, teplota či vystavení kultury UVA ozařování (Benavente-Valdés *et al.*, 2016).

### **1.2.1. Limitace dusíkem**

Využívání média s nedostatkem dusíku či kultivace za úplné absence dusíku a pozorování efektu tohoto stresového faktoru na růstovou schopnost kultury a na tvorbu a akumulaci karotenoidů je jedním z nejčastějších experimentů vykonávaných za účelem nalezení vhodných kandidátů pro produkci karotenoidů ve větším měřítku. Experimenty s dusíkem lze vykonávat více způsoby. Při limitaci dusíkem je do média neustále dodáváno nedostatečné množství dusíku, zatímco při dusíkovém vyčerpání je kultura pěstována v médiu bez zdroje dusíku (Benavente-Valdés *et al.*, 2016).

Dusík je jedním z nejdůležitějších prvků v buňce, jelikož je obsažen v proteinech, genetickém materiálu nebo enzymech. Jeho obsah v médiu je zásadní pro úspěšné buněčné dělení, proto při jeho úplné absenci, nebo při jeho vyčerpání dochází k zástavě dělení buněk (Begum *et al.*, 2016; Faraloni and Torzillo, 2017). Dále pak nastává fáze, kdy přestává dobře fungovat fotosyntéza, jelikož se zastavuje tvorba chlorofylu a dochází k jeho postupné ztrátě. Je však postupně nahrazován nově vytvořenými pigmenty karotenoidů, které ve své molekule dusík neobsahují a mohou sloužit jako fotosběrné antény, například lutein. Tímto způsobem si buňka nahrazuje nedostatečné množství chlorofylu, který pro svou molekulární stavbu obsahující 4 atomy dusíku, slouží v situaci kdy je buňka ve stavu dusíkového hladovění jako nouzová zásobárna dusíku (Boussiba *et al.*, 1999; Benavente-Valdés *et al.*, 2016). Dalším důvodem, proč se dusíkové hladovění často ukazuje jako vhodný způsob navýšení karotenoidové produkce, je skutečnost, že při nedostatku dusíku dochází ke zvýšené tvorbě volných radikálů, buňka má tedy potřebu se před nimi chránit tvorbou  $\beta$ -karotenu (Begum *et al.*, 2016).

Obecně lze tedy říci, že limitace přísunu dusíku omezí primární metabolismus buňky a může podpořit sekundární metabolismus v podobě zvýšené syntézy sekundárních karotenoidů jako je astaxanthin (Ip and Chen, 2005). Dusíkové hladovění je všeobecně považováno za efektivní způsob navýšení tvorby a akumulace karotenoidů, ne vždy je však podrobně zjišťováno, jaké karotenoidy jsou ve výsledných vzorcích obsaženy ve vyšších koncentracích (Paes *et al.*, 2016). V několika studiích se však ukázalo, že nízké koncentrace dusíku vedou ke snížené tvorbě nejen chlorofylu, ale také primárních karotenoidů, jako jsou lutein nebo  $\beta$ -karoten (Del Campo *et al.*, 2004). Také je nutno podotknout, že vzhledem k významně omezenému fungování fotosyntézy kvůli nedostatku chlorofylu v kombinaci s omezeným dělením buněk, může být i přes navýšení produkce karotenoidů výsledný výtěžek produktu nižší, než by byl při aplikaci optimálních podmínek pro kultivaci. Je nutné hledat kompromis, kdy růst kultury nebude natolik omezen, aby zvýšená tvorba a akumulace karotenoidů měla žádaný efekt, tedy více získaných karotenoidů (Boussiba *et al.*, 1999; Del Campo *et al.*, 2004). Pro správné nalezení takových podmínek je zásadní předem určit, jaké karotenoidy mají být z mikrořasové kultury získávány, jelikož efekt dusíkové limitace se může pro různé specifické karotenoidy velmi lišit.

Pro získávání astaxanthinu je dusíkové hladovění, zdá se, vhodná strategie, v kombinaci s vhodně zvolenou metodikou, jako je např. dvoufázová kultivace se navíc významně snižuje problematika sníženého růstu kultury. Dochází tedy nejprve k exponenciálnímu růstu kultury

při optimálních podmínkách, tzv. zelená fáze a následné vyčerpání dusíku způsobí rapidní nárůst sekundárních karotenoidů, především pak astaxanthinu, tzv. červená fáze. I bez aplikace takovéto metody však limitace dusíkem působí na tvorbu a akumulaci astaxanthinu vesměs kladně (Young, 1993; Del Campo *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2016).

Na rozdíl od produkce astaxanthinu se pro získávání luteinu dusíkové hladovění neukazuje jako vhodný způsob kultivace. Vzhledem k tomu, že lutein a astaxanthin vznikají ze stejného prekurzoru, je tento závěr vcelku logický, nelze získávat obě tyto látky současně. Bylo zjištěno, že v některých případech může limitace dusíkem vést ke snížení obsahu luteinu (Del Campo *et al.*, 2000).

Co se týče  $\beta$ -karotenu jsou reakce kultur na dusíkové hladovění různé, záleží tedy zřejmě i na dalších faktorech. U komerčně pěstované řasy *Dunaliella salina* bylo však prokázáno, že limitace dusíkem vede k zvýšení koncentrace  $\beta$ -karotenu v buňce (Lamers *et al.*, 2012).

Pro úspěšnou kultivaci hraje roli i forma, v jaké je dusík v médiu přítomný. V laboratorním měřítku se jako zdroj dusíku nejčastěji využívá dusičnan, konkrétně  $\text{NaNO}_3$ , ačkoliv preferovaný zdroj dusíku z pohledu řas je amoniak, který je navíc výrazně levnější alternativa. Amoniak však významně snižuje pH média, není tedy vhodný pro využívání v experimentech, jelikož zejména v nepufrovaných médiích může způsobit až úplné zastavení růstu kultury (Collos and Harrison, 2014; Liu *et al.*, 2014).

### 1.2.2. Vysoká míra ozáření

Světlo nebo míra ozáření je pravděpodobně nejdůležitějším faktorem pro úspěšnou kultivaci zelených řas. Pro běh fotosyntézy a růst kultury je dostatek světla zcela zásadní, a ačkoliv je možné některé řasy pěstovat heterotrofně ve tmě, autotrofní kultivace stále převládají. Míra ozáření má dvě hranice – spodní, kdy nízké osvětlení již podstatně snižuje rychlost růstu a horní, kdy při dosažení světelné saturace při vysokých mírách ozáření dochází k fotoinhibici, což ve výsledku opět inhibuje růst a může vést až k smrti buněk. Vysoká míra ozáření může vést k fotooxidaci a následné tvorbě reaktivních forem kyslíku (Reactive Oxygen Species, ROS), singletových kyslíků ( $^1\text{O}_2$ ) či jiných radikálů. Zvýšená syntéza karotenoidů je odpovědí buňky na přítomnost ROS, antioxidantní vlastnosti karotenoidů, především pak astaxanthin totiž slouží jako účinná cesta, jak se proti radikálům bránit (Liu *et al.*, 2014).

Obecně se ukazuje, že vysoká míra ozáření (obvykle mezi  $150\text{--}400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ve většině případů přispívá značnou mírou k vyšším koncentracím různých karotenoidů bez významného negativního vlivu na růst kultury. Naopak do jisté míry vyšší intenzita světla pozitivně

ovlivňuje růstovou rychlost, a tedy navyšuje hustotu biomasy. Problémem je, že dodávání takto vysokých intenzit světla je velmi finančně náročné a dá se tedy provozovat jen za laboratorních podmínek (Lamers *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2014; Benavente-Valdés *et al.*, 2016; Egeland, 2016).

Na některých přírodních stanovištích je tvorba a akumulace karotenoidů nutná pro přežití, zejména tedy v habitatech s velmi vysokou mírou ozáření jako jsou polární oblasti. Zde žijící sněžné řasy jsou vystaveny extrémním podmínkám, mezi které patří právě i vysoký osvit často v kombinaci s nedostatkem dusíku. Bylo zjištěno, že právě snížení rychlosti růstu v důsledku vyčerpání dusíku spouští rapidní nárůst karotenoidů (astaxanthin, canthaxanthin, echinenon,  $\beta$ -karoten), které následně slouží jako pasivní ochrana proti ozáření, v podstatě ochranný filtr. V takovém případě dojde k rychlé změně zbarvení celé kultury ze zelené na červenou (Bidigare *et al.*, 1993). Takovéto rychlé změny barvy lze pozorovat i při aplikování dvoufázové kultivace zelených řas, kdy dojde ke změně z optimálních růstových podmínek na suboptimální s přítomností stresového faktoru v podobě vysokého ozáření. Karotenoidy jako ochranu proti nadměrnému množství světla totiž běžně využívají zelené řasy obsahující violaxanthin. Ten je skrz xantofylový cyklus deepoxidován na zeaxanthin, karotenoid, který řase slouží jako sluneční filtr. Při absenci stresového faktoru se zeaxanthin opět epoxiduje na violaxanthin. Dá se tedy tvrdit, že zeaxanthin se povětšinou vyskytuje v nejvyšší míře při vysokém ozáření, ovšem violaxanthin nedosahuje svého maxima při nedostatku světla (Egeland, 2016).

Jak již bylo řečeno koncentrace zeaxanthinu dosahuje nejvyšších hodnot při vysoké míře ozáření, obzvláště pak v kombinaci s jinými stresovými faktory jako zvýšení salinity či nedostatek dusíku. Obecně se ale pro tento karotenoid potvrdilo, že samotná vysoká ozářenost značně přispívá k jeho zvýšené tvorbě a akumulaci. Jako výhoda se jeví fakt, že vyšší ozářenost také přispívá k vyšší růstové rychlosti kultury, tedy potenciálně i k vyššímu výtěžku (Solovchenko *et al.*, 2008; Li *et al.*, 2009; Egeland, 2016).

Astaxanthin, jako jeden z nejvýznamnějších a nejefektivnějších antioxidantních karotenoidů reaguje na vysokou míru ozáření také vyšší koncentrací v buňce. V mnoha studiích bylo prokázáno, že vysoká intenzita světla je ideální způsob navýšení tvorby a akumulace této látky. Ačkoliv stresový faktor v podobě silného ozáření sám o sobě dokáže nastartovat syntézu astaxanthinu i jiných karotenoidů jako obrannou reakci, nejslibnější výsledky byly pozorovány, když byl tento faktor aplikován v kombinaci s některým dalším stresovým faktorem. Velmi dobrých výsledků bylo dosaženo při kultivaci s vysokým ozářením spolu

s dusíkovým hladověním, nebo kombinace ozáření s vysokou koncentrací NaCl (Li *et al.*, 2009; Egeland, 2016; Liu *et al.*, 2016).

Vysoká míra ozáření má pozitivní efekt i na tvorbu a akumulaci významných karotenoidů jako lutein a  $\beta$ -karoten, kdy bylo dokázáno, že výběrem vhodného světelného programu lze získat mnohonásobně větší výtěžky žádaných látek. Konkrétně pro lutein i  $\beta$ -karoten se tedy míra ozáření jeví jako hlavní faktor ovlivňující jejich koncentraci v buňce (Lamers *et al.*, 2010; Ho *et al.*, 2014).

### 1.2.3. Vystavení UVA

Fyzikálním stresovým faktorem, který má vliv na metabolismus řas je UV záření. UV záření způsobuje mutace v buněčné DNA a může vést k významnému zpomalení růstu až k buněčné smrti. Ukázalo se však, že konkrétně UVA (315–400 nm) záření může nejen výrazně zvýšit nárůst biomasy, ale také zásadně přispět ke tvorbě a akumulaci karotenoidů. Karotenoidy jako astaxanthin, zeaxanthin nebo fucoxanthin jsou významné látky s antioxidačními vlastnostmi a při vhodné aplikaci UVA záření může jejich obsah v buňce výrazně narůst (Huang *et al.*, 2018).

Karotenoidy jsou jedním z ochranných mechanismů proti fotooxidativnímu stresu způsobenému vystavením buněk UVA záření. Efektivně vychytávají singletový kyslík i peroxidové radikály vzniklé působením ROS na buněčné struktury. Jejich zhášecí mechanismus funguje na základě přenosu energie ze singletového kyslíku na karotenoid. Ve výsledku se vytvoří jedna molekula kyslíku a přebytečná energie nyní excitovaného karotenoidu je poté vyzářena v podobě tepla bez poškození okolních struktur. Karotenoidy tento proces mohou opakovat a jsou tedy efektivní v boji proti fotooxidativnímu stresu. V různých modelech bylo zjištěno, že ačkoliv se  $\beta$ -karoten a lykopen zdají být nejefektivnější ve zhášení, v některých případech s vysokým kyslíkovým tlakem v kombinaci s vysokou koncentrací  $\beta$ -karotenu, může mít  $\beta$ -karoten prooxidativní účinek. Takové situace však nastávají vzácně a obecně je  $\beta$ -karoten považován za vhodný prostředek pro obranu proti škodlivému záření, obzvláště pak v kombinaci s vitamínem E. Na rozdíl od  $\beta$ -karotenu se astaxanthin ukázal jako účinný fotoprotektivní karotenoid v boji proti účinkům UVA záření (Lyons and O'Brien, 2002; Spirt *et al.*, 2010).

Vystavení řasových kultur UVA záření mělo v mnoha případech za následek výrazné zvýšení akumulace karotenoidů a při nižších intenzitách ani nesnižuje růstovou rychlost. Slibná strategie se zdá být i kombinace UVA záření s dostatečně silným fotosynteticky aktivním

zářením (PAR), jelikož dle výsledků pak nedochází k poškození chlorofylu a inhibici fotosyntézy. Je tedy zachována růstová rychlost a dochází i ke znásobení množství karotenoidů v buňce (Jahnke, 1999).

Další nadějná kombinace je pak vystavení kultury UVA záření, zatímco prochází dusíkovým hladověním. Ačkoliv samotné UVA je schopno výrazně pozitivně ovlivnit tvorbu a akumulaci karotenoidů, v kombinaci s limitací dusíkem jsou výsledky ještě výrazně lepší. Absence dostatečného množství dusíku v médiu sice zpomaluje nárůst biomasy, ale právě při souběžném UVA ozařování je výsledná biomasa stále natolik velká, že velikost výtěžku karotenoidů stále překoná ty získané při aplikaci pouze jednoho z těchto dvou stresorů či velikost výtěžku kontrolní kultury (Mogedas *et al.*, 2009).

Režim UVA ozařování se v různých studiích značně liší, jak intenzitou (320-400 nm), tak časem vystavení kultury stresoru. Může se jednat o exponování kultury nízké intenzitě UVA záření v řádu několika hodin až dní, byly však provedeny i experimenty s dlouhodobým vystavením řasových kultur UVA záření. Krátkodobé vystavení UVA (352 nm) záření může v kultuře způsobit šok a dojde pak k zastavení produkce chlorofylu a k inhibici fotosyntézy, což má za následek zpomalení nebo úplné zastavení růstu. Taková situace se dá zvrátit uložením kultury zelených řas do tlumeného světla nebo do tmy a po určitém čase dojde k navrácení do normálu. Při dlouhodobém vystavení řasových společenstev UVA záření dochází postupně k adaptování řas na danou situaci a po nějakém čase již daná intenzita UVA záření nemá na růstovou rychlost vliv (Kim and Watanabe, 1994).

#### **1.2.4. Teplota**

Optimální teplota pro kultivaci je pro různé zelené řasy velmi odlišná a nalézt ji často vyžaduje experimentální zjištění. Zelené řasy pěstované za účelem získávání karotenoidů jsou nejčastěji kultivované v teplotách okolo 20-30 °C, pro mnoho řas ovšem tyto teploty mohou znamenat stresové podmínky. Optimální teplota pro růst však nemusí nutně znamenat i optimální teplotu pro tvorbu a akumulaci karotenoidů. Bylo prokázáno, že pro získání nejvyšší možné koncentrace karotenoidů je ideální kultivovat kulturu ve vyšších teplotách, než je její optimum. Například *Chromochloris zofingiensis* obsahuje nejvyšší množství astaxanthinu při teplotě okolo 35 °C, zatímco optimální růstová teplota řasy je 20-30 °C (Liu *et al.*, 2014).

Je tedy zřejmé, že manipulací teploty lze dosáhnout různých výsledků v oblasti získávání karotenoidů. Podobně jako u jiných stresových faktorů, vysoká teplota nejvíce pozitivně ovlivňuje tvorbu karotenoidů, pokud je zkombinována s jiným stresovým faktorem, jako je



například dusíkové hladovění. I samostatně však může mít velký vliv na kultivaci, například lutein se tvoří ve větších koncentracích za vyšších teplot, teplota však nesmí dosáhnout takové výšky, aby negativně ovlivňovala růst kultury (Guedes *et al.*, 2011; Brennan and Collins, 2015).

Při experimentování s *Haematococcus pluvialis* bylo zjištěno, že při kultivaci za zvýšené teploty (30-33 °C) byl obsah astaxanthinu třikrát vyšší než při kultivaci za běžných podmínek (20 °C). Tvorba karotenoidů zde byla zřejmě odpovědí na zvýšenou tvorbu ROS jako následek vysoké teploty. Došlo tedy ke zvýšení koncentrace karotenoidů, ale zároveň nastalo zpomalení vegetativního růstu buněk, které přešly do stavu červených velkých cyst plných astaxanthinu. Je ovšem nutné podotknout, že když byla kultura vystavena ještě vyšší teplotě (35 °C), došlo již k lyzi buněk, je tedy nutné vždy znát možnosti řasy, se kterou jsou experimenty vykonávány (Tjahjono *et al.*, 1994).

Jak již bylo zmíněno, vyšší teplota vede ke vzniku ROS, což má za následek zvýšení karotenogeneze. Dalším důležitým faktem však je, že teplota také může zásadně ovlivnit zastoupení jednotlivých karotenoidů v řase. Ukázalo se, že teplota pravděpodobně ovlivňuje enzymy ovládající syntetické dráhy, v nižších teplotách bývají dominantně zastoupené látky bez hydroxylových skupin jako  $\beta$ -karoten, echinenon nebo canthaxanthin, zatímco se zvyšující se teplotou jejich obsah klesal ve prospěch hydroxylovaných karotenoidů jako astaxanthin (Liu and Lee, 2000).

### 1.2.5. Salinita a pH

Salinita jako stresový faktor ovlivňující produkci karotenoidů a nárůst biomasy se jeví jako vhodná alternativa stresového faktoru vysokého ozáření. Vliv salinity na produkci karotenoidů u sladkovodních řas je však sporný. Bylo dokázáno, že při kultivaci řas v médiu obsahujícím dostatečné množství NaCl pro navození stresových podmínek, došlo ke zvýšené produkci a celkovému obsahu karotenoidů. Tento efekt byl ještě umocněn, byla-li salinita v kombinaci s jiným stresovým faktorem, jako dusíkové hladovění. V takovém případě byly výtěžky karotenoidů totožné výtěžkům získaných v kultivacích s vysokým ozářením spolu s dusíkovým hladověním. Rozdílem však je, že vyšší salinita obecně přispívá především k tvorbě canthaxanthinu, na rozdíl od astaxanthinu. Negativním faktem ovšem zůstává to, že bylo mnohokrát prokázáno, že vyšší koncentrace soli v médiu snižuje efektivitu fotosyntézy a růstovou rychlost a tím nepříznivě ovlivňuje celkovou biomasu (Li *et al.*, 2009; Benavente-Valdés *et al.*, 2016). V některých případech, jako *Ch. zoofingensis* nebo *H. pluvialis* je však

výsledná koncentrace karotenoidů, konkrétně astaxanthinu o tolik vyšší, že snížení biomasy ve výsledku nehraje tak velkou roli (Liu *et al.*, 2014). Vhodným řešením by mohla být adaptace řasy na nízké koncentrace NaCl, kdy po určité době vyšší salinita média podporovala tvorbu karotenoidů i biomasy (Rao *et al.*, 2007). Na druhou stranu byly zaznamenány studie, kdy nárazové šokové zvýšení salinity vedlo k lag fázi v růstu, jejíž délka závisela na koncentraci NaCl. Po časové odmlce také došlo ke zvýšení obsahu karotenoidů, především  $\beta$ -karotenu. Obsah luteinu byl ve výsledném vzorku procentuálně nižší než za běžných podmínek, naopak obsah zeaxanthinu byl vyšší. Z takových studií lze vyvozovat, že některé syntetické dráhy jsou citlivější na osmotický stres než jiné a salinita jako stresový faktor pravděpodobně ovlivňuje výsledné složení karotenoidů v kultuře (Borowitzka *et al.*, 1990).

Dalším lehce sporným stresovým faktorem je pH. Řada řas je schopna přežít a růst v široké škále pH, pokud je pH mimo optimum, byl mnohokrát pozorován nárůst akumulace karotenoidů. Vliv tohoto stresového faktoru se velmi liší mezi jednotlivými řasovými zástupci, v některých případech celkově vyšší koncentraci karotenoidů přispívá nízké pH, v jiných naopak. Jediné, co je zřejmé, je fakt, že pH ovlivňuje karotenogenezí. Ukázalo se však, že při dlouhodobé kontinuální kultivaci má lepší celkové výsledky médium s optimálním pH. Jelikož pH ovlivňuje dostupnost CO<sub>2</sub>, je tento faktor v mikrořasových kulturách velmi důležitý a je nutné ho přizpůsobovat dle specifických požadavků řasy (Liu and Lee, 2000; Khalil *et al.*, 2010; Guedes *et al.*, 2011; Liu *et al.*, 2014).

### **1.3. Biotechnologicky významné zelené řasy produkující karotenoidy**

Zelené řasy (třída Chlorophyceae) produkují vesměs stejné hlavní karotenoidy jako vyšší rostliny, jmenovitě především pak  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, lutein, violaxanthin a neoxanthin. Pokud je při růstu kultura vystavena některým z výše zmíněných stresových faktorů, může dojít k tomu, že se začnou tvořit některé další sekundární karotenoidy, například astaxanthin, canthaxanthin nebo echinenon ve vyšší míře. Tyto látky jsou komerčně velmi cenné, je tedy žádoucí efekty jednotlivých typů stresu zkoumat do hloubky (Orosa *et al.*, 2000). V porovnání s cévnatými rostlinami mají mikroskopické řasy výrazně rychlejší růst, což je jedna z největších výhod jejich pěstování za účelem získávání karotenoidů (Lin *et al.*, 2015). Navíc jsou schopné přežít, adaptovat se a úspěšně růst v poměrně široké škále podmínek, jako různé pH, snášejí změny teploty nebo salinity. V kombinaci s možností pro kultivaci využívat i odpadní vodu vytváří jasnou výhodu oproti pěstování cévnatých rostlin (Gong and Bassi, 2016). Další výhodou je fakt, že mikrořasy obsahují obecně větší množství specifických

karotenoidů (mg/g) než jiné přírodní zdroje, jako například makrořasy či afrikány (*Tagetes erecta*), momentálně pěstované pro získávání luteinu (Kim *et al.*, 2012; Ho *et al.*, 2014; Lin *et al.*, 2015; Gómez-Loredo *et al.*, 2016). Naopak nevýhodou a stále ještě existujícím problémem využívání mikroskopických řas jako přírodního zdroje karotenoidů je skutečnost, že proces sklizení řas a následná extrakce žádaných produktů je natolik finančně náročná, že momentálně se ve velkém objemu kultivuje pouze *Dunaliella salina* a *Haematococcus pluvialis* (Gong and Bassi, 2016). Možnost sklizení řas v průběhu celého roku, je naopak skutečností, která do určité míry zlevňuje celkovou cenu produkce, protože není nutné řešit logistiku uskladňování, aby nedocházelo k degradaci produktů (Göçer *et al.*, 2006).

Vzhledem ke stále populárnějšímu trendu moderní doby ustupovat od „syntetických produktů“ a nacházet či se navracet k jejich přírodním alternativám je logické, že je stále velký zájem o spolehlivého producenta karotenoidů, a tím mohou být v mnoha případech právě mikroskopické řasy. Přírodním karotenoidům nelze upřít jisté benefity, především pak astaxanthinu. Ačkoliv se astaxanthin dá plně syntetizovat, a tedy i relativně levně vyrábět, není vhodný pro lidskou konzumaci. Přírodní forma astaxanthinu je vhodnější, díky své specifické stereochemii a má totiž mnohonásobně silnější antioxidační účinky (Roth *et al.*, 2017). Průmyslově syntetizovaný astaxanthin není vhodný pro využívání jako potravinový doplněk pro člověka, protože kvůli své konformační komplexitě je problém syntetizovat čistou formu obsahující jen žádaný izomer. Astaxanthin se v přírodě vyskytuje v několika formách – 3S,3'S, 3R,3'R, tvořící pár enantiomerů a 3S,3'R s 3R,3'S představující zrcadlové meso-formy. Jedná se tedy o 3 konformační izomery, jejichž poměry se liší podle zdroje. Nejčastěji se však vyskytuje právě ve formě 3S,3'S s lepšími antioxidačními vlastnostmi a velkou výhodou v podobě dobré rozpustitelnosti ve vodě (Jackson *et al.*, 2008; Liu *et al.*, 2014).

Kromě astaxanthinu se syntetizují i další karotenoidy jako lykopen,  $\beta$ -karoten, canthaxanthin a zeaxanthin. Žádný z nich však nemá natolik složitou konfiguraci, aby představoval problém s čistotou pro lidskou konzumaci (Bart and MacGillavry, 1968; Li *et al.*, 2006; Jackson *et al.*, 2008).

*Dunaliella salina* je jedním z hlavních přírodních zdrojů  $\beta$ -karotenu, jelikož dokáže akumulovat masivní množství této látky a v reakci na různé stresové faktory dokáže toto množství ještě znásobit (Pisal and Lele, 2005). Jako jedna z biotechnologicky nejvýznamnějších řas má známý kultivační proces, ačkoliv metody aplikované od kultivace k výslednému produktu se v různých komerčních subjektech mohou lišit. *D. salina* je vysoce

tolerantní vůči vysoké salinitě i vysokému ozáření. Ovšem pro vývoj účinného kultivačního postupu bylo nutné nalézt kompromis v kultivačních podmínkách, jelikož optimum pro růst kultury a pro maximální obsah karotenoidů se nepřekrývalo. Hlavní problém tvořila salinita, jelikož pro růst je vhodná nízká koncentrace NaCl a pro akumulaci  $\beta$ -karotenu je vhodná vysoká koncentrace. Původní návrhy dvoufázové kultivace nebyly z mnoha důvodů úspěšné, přešlo se tedy k semi-kontinuální kultivaci se středně vysokou koncentrací NaCl, tak aby byla podpořena tvorba  $\beta$ -karotenu. Dalším faktorem pro kultivaci je typ vodní nádrže, kde je hned několik možností, mohou být promíchávané či často využívané levnější „přírodní“. S tím souvisí i další aspekt – lokalita, na které je řasa pěstována. Vzhledem k tomu, že otevřené vodní nádrže pro kultivaci jsou pod širým nebem, mělo by se jednat o lokalitu se stabilním počasím a vhodným klimatem. Zároveň by oblast měla být chráněna od možností znečištění. Po úspěšné kultivaci přichází na řadu sklizení řasy, což je jedním z nejvíce finančně náročných kroků v procesu získávání výsledného produktu a stále se hledají nové efektivnější a levnější varianty tohoto kroku. Po úspěšném sklizení řasy následuje zpracování získaného materiálu na finální produkt, povětšinou se *D. salina* suší na řasový prášek, nebo se pokračuje chemickým procesem extrakce a získává se čistý  $\beta$ -karoten (Borowitzka and Borowitzka, 1990).

Nové studie poukazující na nevhodnost syntetického beta karotenu stále zvyšují poptávku po přírodních zdrojích  $\beta$ -karotenu, jako je *D. salina*. To neustále vede k vylepšování stávajících metodiky pěstování a zpracování této řasy, a i k vytváření nových kultivačních center v různých zemích světa (Hosseini Tafreshi and Shariati, 2009).

Vývoj biotechnologií zabývajících se mikroskopickými řasami se v posledních desetiletích výrazně posunul. Jedním z příkladů je produkce astaxanthinu z *Haematococcus pluvialis*, i zde je ale stále ještě prostor pro zlepšení. Momentálně využívané procesy se různí v mnoha ohledech, od kultivačních metod, přes prostředí, využívané kultivační nádrže a fotobioreaktory. Z toho je jasné, že i cena produkce se v jednotlivých případech značně liší, jedno má však společné – stále je výrazně vyšší než cena syntetického astaxanthinu. Vysoká cena je důvod, proč se ustavičně hledají nové způsoby, jak zdokonalit kultivační proces. Ukazuje se však, že zřejmě nebude stačit jen nalézt vhodnější způsoby kultivace. Ačkoliv se v tomto směru dosáhlo velkých pokroků, například za pomoci aplikace různých stresových faktorů, zdá se, že by se výzkum měl zaměřit i jiným směrem. Velké množství studií se zaměřuje na optimalizaci ideální kultivační nádrže či fotobioreaktoru, škálování z laboratorního měřítka do průmyslového však bývá problematické. K celkové ceně velkou

měrou přispívá i finanční náročnost extrakce astaxanthinu, vývoj metody pro zlevnění a zjednodušení tohoto kroku je tedy zajímavou cestou. Další z možností by mohlo být nalezení vhodnějšího kmene, případně jeho genetická modifikace (Suh *et al.*, 2006; Li *et al.*, 2020). S rostoucím zájmem o přírodní astaxanthin roste i potřeba jeho produkci v *H. pluvialis* zvýšit, s čímž souvisí i snaha manipulovat s jeho biosyntézou v řase. Komplexita syntetické dráhy sekundárních karotenoidů tento cíl značně ztěžuje, přesto je však díky znalosti biosyntetických drah regulace karotenogeneze možná. Genetické inženýrství s sebou však nese i mnoho výzev, jako nutnost podrobně znát syntetické dráhy a funkce a umístění jednotlivých enzymů. Jedná se tedy o slibnou cestu (Jin *et al.*, 2006; Le-Feuvre *et al.*, 2020).

Momentálně využívaný proces pro produkci astaxanthinu je dvoufázová kultivace. Nejprve se *H. pluvialis* kultivuje v optimálních podmínkách vhodných pro růst a buněčné dělení, čemuž se říká zelená fáze. Poté nastává červená fáze, kdy v médiu chybí potřebné živiny a kultura je vystavena různým stresovým faktorům, což vede k encystování buněk a akumulaci velkého množství astaxanthinu. Obě tyto fáze mohou probíhat v jiných kultivačních zařízeních, zelená je obvykle ve fotobioreaktoru a červená v nádržích nebo větších fotobioreaktorech, dochází tedy k transferu kultury. Po encystaci je *H. pluvialis* dále zpracováván, biomasa sklizena a astaxanthin vyextrahován (Li *et al.*, 2020).

Je otázkou, zda je možné cenu přírodního astaxanthinu natolik snížit, aby se vyplatil více než jeho syntetická alternativa. Bylo dokázáno, že při využití vhodných metod by se cena měla dát minimalizovat, stále však závisí i na mnoha faktorech jako dostupné prostředky a náklady na pracovní sílu (Li *et al.*, 2011).

Jak již bylo zmíněno, momentálně se mikroskopické řasy v biotechnologii využívají jen jako zdroje astaxanthinu a  $\beta$ -karotenu, navíc se jedná pouze o dva zástupce, tedy výše zmíněné *Dunaliella salina* a *Haematococcus pluvialis*. I přesto je většina komerčně používaného  $\beta$ -karotenu syntetického původu. Díky zvyšující se poptávce po přírodních zdrojích se však zvažuje průmyslová kultivace mikroskopických řas za účelem získávání i dalších karotenoidů jako lutein nebo zeaxanthin (Jin and Melis, 2003).

Karotenoidy jsou momentálně průmyslově využívané v široké škále odvětví a mikrořasy využívají karotenoidy při fototaxi, jako přídatné pigmenty při fotosyntéze, součást světlosběrných komplexů i jako fotoprotektivní látky. I přes všeobecně známý potenciál řas však není příliš dat o jejich možném využití v komerční sféře. Proto je nutné se více zaměřit

na slibné kmeny produkující karotenoidy, aby byl možný posun v oblasti přírodních zdrojů těchto významných látek (Del Campo *et al.*, 2000).

#### 1.4. Polyfyletický rod *Tetracystis*

Rod *Tetracystis* byl poprvé popsán v Brown and Bold, (1964), kde bylo sledováno několik kultur zelených jednobuněčných řas, jež se běžně vyskytovaly v aeroterestrických podmínkách. Bylo zjištěno, že se nepadobají dosud popsaným rodům.

Pro popis nového rodu byly vzorky řas nejprve zkoumány morfologicky, tedy pozorovány jak světelným, tak transmisním elektronovým mikroskopem. Následně byly jednotlivé předpokládané druhy podrobeny testování, při kterém byly pozorovány reakce na změnu fyziologických podmínek, zejména pak jejich schopnost růst s přidavkem různých cukrů či na různých typech médií. Na závěr byly vzorky testovány i serologicky. Výsledkem těchto testování a pozorování bylo tedy zavedení nového rodu, popsání osmi nových druhů a následné přeřazení tří již existujících druhů do rodu *Tetracystis*, spolu s čímž byl vytvořen i klíč k určování těchto zástupců

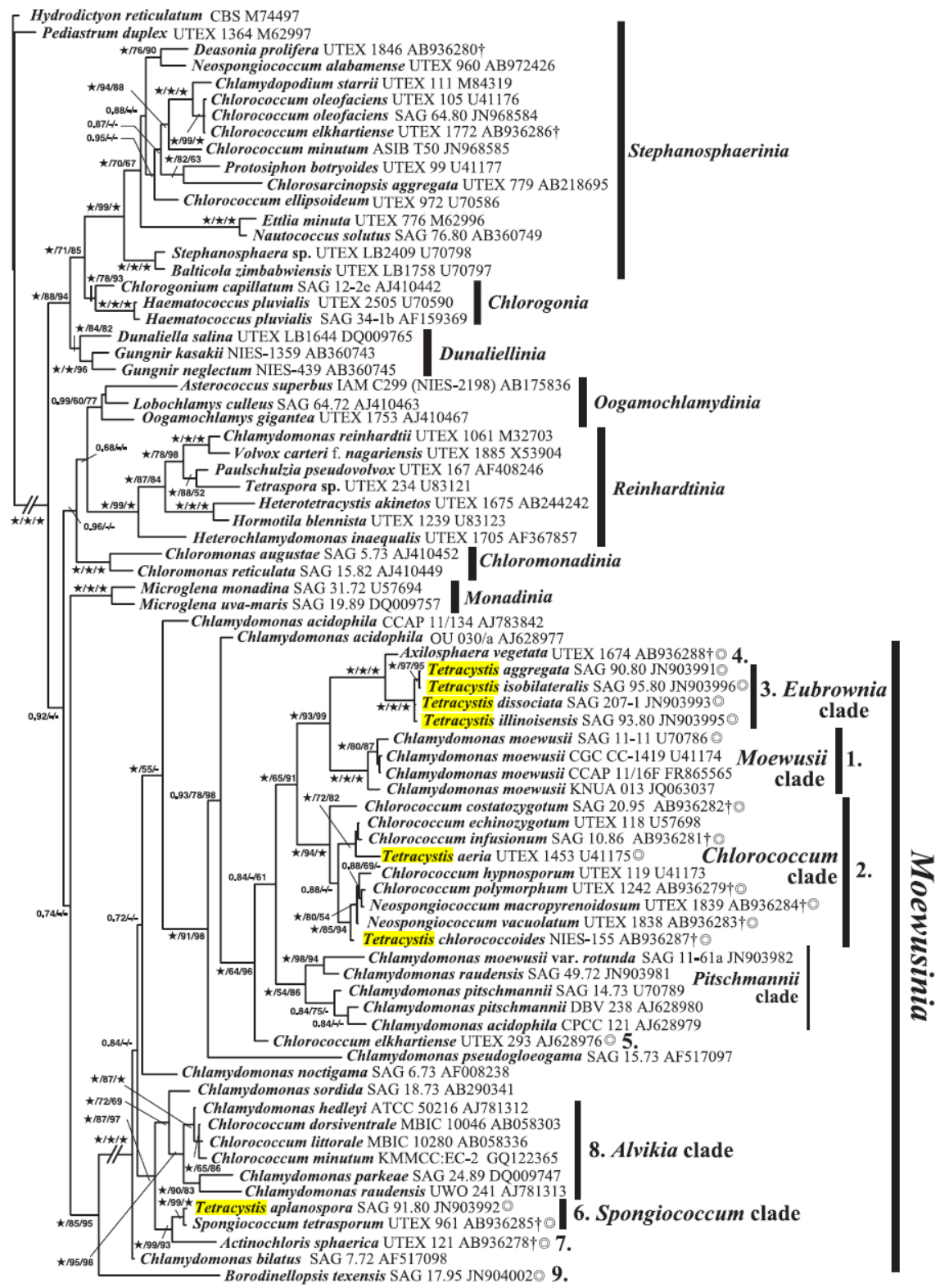
Za pomoci elektronové mikroskopie bylo zjištěno, že jednotlivé druhy se od sebe dají dobře taxonomicky odlišit. Hlavní odlišnosti, a tedy i určovací znaky, sestávají z různého uspořádání chloroplastu, pyrenoidu, mitochondrie, Golgiho aparátu i buněčné stěny. Navíc díky těmto pozorováním byl podhalen mechanismus dělení pyrenoidu při vegetativním dělení buňky i při tvorbě zoospor. Konkrétně u *Tetracystis pulchra*, s níž jsme se v mé práci setkala, byly popsány jasné určovací znaky jako polární či bipolární ztlustliny buněčné stěny, tenký parietální chloroplast nebo oválný pyrenoid obklopený dvěma škrobovými zrny. Pyrenoid hrál při rozlišování jednotlivých zástupců obzvlášť významnou roli a byl považován za spolehlivou odlišovací vlastnost. Již při popisování jednotlivých druhů však bylo nasnadě, že mezi zástupci je určitá variabilita, žádný z morfologických znaků tedy nedává stoprocentní jistotu při určování. Věc se dále komplikuje i z toho důvodu, že *T. pulchra* je morfologicky velmi podobná *T. intermedium* a ultrastrukturou buňky je nerozlišitelná od *T. texensis*, *T. intermedium* a *T. excentrica*. Již zde je tedy jasné, že bez využití dalších metod, například serologických, nebo nyní již modernějších postupů nelze spolehlivě tento druh určit (Brown and Bold, 1964).

Právě s příchodem molekulárních metod se ukázalo, že nejen, že se jednotlivé druhy od sebe nedají snadno rozeznat, ale že celý rod *Tetracystis* je polyfyletický. Fylogenetika jednobuněčných zelených řas vyskytujících se v půdě, slané i sladké vodě je obecně poměrně

problematická, ovšem u třídy Chlorophyceae je taxonomické postavení jednotlivých rodů někdy skutečný oříšek. Tak tomu je právě i u rodu *Tetracystis*, jež stále prochází značnými úpravami.

Fylogenetická analýza skupiny Volvocales, založená na 18S rRNA genových sekvencích vedla ke změně pohledu na diverzitu této skupiny. Do té doby byla systematická klasifikace této skupiny nekonzistentní a často neodpovídala skutečným fylogenetickým vztahům, bylo tedy nutné její přepracování. V mnoha pojednáních autoři neuváděli jednotné a přesné názvy skupiny, pouze využívali pracovní názvy, které ne vždy nutně odpovídali realitě. Problematické je také využívání názvosloví založeného na tradiční klasifikaci, kdy jsou řasy určovány pouze dle jejich morfologických znaků za využívání světelného mikroskopu, což často nekoresponduje s molekulární fylogenezí. Z takových důvodů je mnoho zástupců řádu Chlorococcales či Chlamydomonadales špatně zařazeno. I přes únavnou a rozsáhlou analýzu však nebyla celková diverzita Volvocales zcela pojata, nicméně podařilo se fylogeneticky zařadit hlavní kmeny Volvocales, kam byl toho času zařazen i rod *Tetracystis*, a došlo i k přesunu mnoha zástupců z řádu Chlorococcales. Takovéto analýzy pak slouží dále jako stavební kameny v dalších studiích zaměřených na fylogenezi (Nakada *et al.*, 2008).

Jak už bylo řečeno, rozeznávat některé linie na základě morfologických znaků je v podstatě nemožné. Je tomu tak právě i v případě fyloskupiny *Moewusinia* a jí příbuzných rodů. Většina morfologických znaků získaných pozorováním světelným mikroskopem jsou homoplazie a jen některé znaky pozorované elektronovým mikroskopem jsou dostatečně unikátní, aby se daly považovat za spolehlivé pro determinaci. Ideální pro určení jednobuněčných zelených řas produkujících zoospory je tedy kombinovat molekulární metody s podrobným pozorováním fenotypu. Vzhledem k nesouladu mezi tradiční taxonomií a moderním fylogenetickým přístupem není divu, že se některé rody ukázaly být polyfyletické, mezi nimi právě i rod *Tetracystis*. Ačkoliv jednotliví zástupci obsahují skupiny dobře rozeznatelných určovacích znaků, ukázalo se, že mimo jiné spadají hned pod několik kladů ve skupině *Moewusinia*, jak je vyobrazeno na fylogenetickém stromě. Konkrétně *T. pulchra* spadá pod skupinu označenou jako *Dunaliellinia*, příbuznou skupiny *Moewusinia*. Tyto informace spolu se skutečností, že typový druh *T. aeria* byl přesunut a přejmenován jako *Chlorococcum aerium*, vedly k poznatku, že rod *Tetracystis* jako takový není dobře podpořený a potřeboval by taxonomicky přepracovat (Watanabe and Lewis, 2017; Mikhailiyuk *et al.*, 2019).



Obr. č. 1: Bayesiánský fylogenetický strom 18S rDNA ze 74 taxonů, včetně 39 zástupců *Moewusinia*, *Borodinellopsis texensis* and 34 zástupců skupin *Stephanosphaerina*, *Reinhardtinia* a jiných. Žlutě je označen rod *Tetracystis* pro přiblížení jeho polyfyletické povahy (Watanabe and Lewis, 2017).



## 1.5. Cíle práce

Cílem této práce je především upozornit na velký a nepříliš využívaný potenciál přírodních kmenů řas. Přestože již existují zaběhnuté postupy získávání přírodních karotenoidů a konkurovat velikánům řasové biotechnologie, jako je *Haematococcus pluvialis* či *Dunaliella salina*, by bylo značně obtížné, je důležité se neustále dívat po nových možnostech a alternativních zdrojích těchto významných látek. Právě kvůli tomu je mým cílem nalézt a vyizolovat slibné kmeny produkující značné množství karotenoidů přímo z přírodní lokality.

Dalším milníkem v mé práci je úspěšně morfologicky i geneticky charakterizovat izolované kmeny za využití moderních postupů, včetně transmisní elektronové mikroskopie. Pro úspěšné pěstování daných kmenů je také nutné nalézt optimální podmínky pro jejich růst a pro tvorbu a akumulaci karotenoidů. Nalézt optimální podmínky pěstování je tedy také další z cílů, jimiž se ve své práci zabývám.

Nakonec je pro tuto práci zásadní spolehlivě určit množství karotenoidů v řase, čehož je možné dosáhnout pouze, pokud se optimalizuje metoda stanovení karotenoidů, a to jak kvantitativní, tak kvalitativní. S tím souvisí i poslední cíl práce, zjistit, jaké změny podmínek ovlivňují tvorbu a akumulaci karotenoidů, konkrétně jaké stresové faktory a jakou mírou působí na izolované kmeny řas v oblasti produkce karotenoidů.

Konkrétně jsou mé cíle v této práci tedy:

1. Nalézt, vyizolovat a určit vhodné přírodní kmeny řas produkujících karotenoidy
2. Optimalizovat kultivační podmínky pro tyto kmeny
3. Kvantitativně a kvalitativně stanovit karotenoidy
4. Zjistit efekt stresových faktorů na růst a akumulaci karotenoidů

## 2. Metodika

### 2.1. Odběr vzorků

Pro odběr vzorků byla zvolena slunná lokalita s vysokým ozářením v Barceloně ve Španělsku. V parku v oblasti Canyelles v rozloze cca 1 km<sup>2</sup> bylo vytipováno celkem 6 míst vhodných pro odběr aeroterestrických půdních řas. Vzorek materiálu z půdy byl odebrán z vrchní vrstvy asi 0 až 0,5 cm a jednotlivá místa odběru byla od sebe vzdálena minimálně 50 metrů. Meteorologická data jsou vztažena pro Barcelona, Fabra. Roční průměrná teplota v oblasti je 15,5 °C a srážky 621 mm. Průměrná teplota a srážky v červenci jsou 23,8 °C a 24 mm,

v lednu pak 8,2 °C a 5,3 mm. Ročně je v oblasti 64,5 slunných dní, s 304 hodinami slunečního záření v červenci a 166 hodinami v lednu (*State Meteorological Agency - AEMET - Spanish Government*, no date). Po zpracování všech vzorků byly vybrány dva slibné kmeny pro následnou práci – pracovně označené jako C a F.

Místo odběru vzorku obsahujícího kmen C bylo jihovýchodně orientované a slunné. 15. října 2019 byla odebrána červená zemina ve stráni u cesty. Souřadnice odběrového místa jsou 41.44753, 2.16061.

Kmen F byl získán ze vzorku odebraného na polostinné stráni orientované severovýchodně. Půda byla v dané lokalitě výrazně kamenitá, v okolí místa odběru vyrůstala drobná vegetace. Odběr byl proveden 15. října 2019 na souřadnicích 41.44529, 2.16102.

Materiál byl uchováván v 2ml mikrozkuvkách s víčkem (Eppendorf) až do doby zpracování vzorků.

## **2.2. Kultivace vzorků**

Pro zpracování vzorku a následné získání vhodných kmenů byla použita metoda kultivace vzorků na agarových plotnách s využitím živného média Bold's Basal Medium – BBM (Brown and BOLD, 1964). Z půdních vzorků bylo odebráno 0,5 g půdy a přelito 50 ml destilované vody. Získaná suspenze byla po dobu 15 minut míchána na magnetické míchačce (Polamed, typ MM6) a následně z ní byl odebrán 1 ml roztoku, který byl spolu s malým objemem destilované vody rozetřen na agarových plotnách v Petriho miskách o průměru 9–12 cm (Škaloud, 2004). Kultivace probíhala za laboratorní teploty (cca 20 °C) při kontinuálním osvitě 25–35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Mikrokolonie půdních řas a sinic bylo možné na plotnách pozorovat po dvou týdnech.

Jednotlivé mikrokolonie byly pozorovány pod světelným mikroskopem, vypíchnuty jehlou a přeneseny na nové agarové plotny, kde byly rozetřeny spolu s malým objemem destilované vody. Takto vzniklé kolonie byly přenášeny zhruba každé dva týdny na nové Petriho misky a přečišťovány dvěma způsoby. Prvním způsobem bylo přenesení mikrokolonie do kapky sterilního média BBM a následné rozetření dané kapky na agarové plotně. Druhým typem přečišťování bylo přímé přenášení mikrokolonií na agar pomocí povrchových rovných vrypů jehlou s vypíchnutou mikrokolonií.

Kultivace jednotlivých izolovaných kolonií probíhala paralelně na dvou místech. Ve skleněných Petriho miskách při teplotě cca 22 °C a osvitě 25–35  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a

v plastových Petriho miskách při teplotě cca 20 °C a kontinuálním svícení UVB lampou po dobu 10 měsíců (UVA i UVB světlo; Repti Glo, Reptile 200, 15.0 UVB 25 W). Intenzita osvitů byla měřena pomocí měřiče světla ULM-500, WALZ.

Po 5 měsících od sběru vzorků byly vytipovány dva slibné, karotenoidy produkující kmeny, pracovníčně označené C a F. Řasové kolonie byly selektovány a přečišťovány zhruba 10 měsíců. Červenající kultury byly poprvé pozorovány pod UVB lampou a nadále dlouhodobě uchovávány na šikmých BBM agarech ve zkumavkách pod konstantním osvětlením a pravidelně přeočkovávány.

### **2.3. Morfologická charakterizace**

Světelná mikroskopie: Kmeny C a F byly pozorovány v mikroskopu Olympus BX51s diferenciálním interferenčním kontrastem. Mikrofotografie byly pořízeny digitálním fotoaparátem Olympus Z5060.

Elektronová mikroskopie: Vzorky kmenů C a F byly připraveny ze zelených kultur v exponenciální fázi růstu a starších červených kultur obsahujících karotenoidy. Byl využit modifikovaný postup podle (Wayama *et al.*, 2013)). Nejprve byly kultury převedeny do sterilního BBM a stočeny na centrifuze (3 minuty, 4000 rpm). Poté byly vzorky fixovány přidáním glutaraldehydu do média s konečnou koncentrací 2 % a ponechány 1 hodinu v teplotě 4 °C. Následně byly třikrát promyty stabilizačním 0,05M kakodylátovým pufrem a fixovány po dobu 2 hodin roztokem 1% OsO<sub>4</sub> v kakodylátovém pufru. Dále byly vzorky dvakrát promyty 0,05M kakodylátovým pufrem a dvakrát promyty destilovanou vodou. Poté byly vzorky centrifugovány (9 minut, 4000 rpm), byl odsán supernatant a buňky byly převrstveny 1,5% roztokem agarózy o teplotě 45 °C. Roztok byl promíchán pipetou a kapka přenesena na předchlazené podložní sklíčko. Sklíčko i s peletkou obsahující buňky bylo vloženo do lednice, aby došlo ke ztuhnutí agarózy. Po zatuhnutí byla peletka nakrájena na drobné kousky, přibližně tvaru krychle o straně 1 mm. Následovalo odvodnění za pomoci ethanolu, vzorky byly nejprve umístěny do 70% ethanolu na dobu 15 minut, dále přemístěny na 20 minut do 96% ethanolu a nakonec na 60 minut do 100% ethanolu (odvodněného pomocí CuSO<sub>4</sub>). 100% ethanol byl poté vyměněn a vzorky tak byly ponechány dalších 15 minut. Dále byly vzorky inkubovány vždy po dobu 20 minut ve směsích 100% ethanolu a 100% butanolu v poměrech 3:1, poté 1:1 a 1:3. Inkubace vzorků byla zakončena po 30 minutách ve 100% butanolu a následovalo převedení vzorků do pryskyřice. Převedení do pryskyřice probíhalo postupným sycením vzorku Spurr médiem (Spurr, 1969) v butanolu a to

vzestupnými koncentracemi tohoto roztoku. Koncentrace se postupně zvyšovala od 5%, 10%, 25%, 50%, 75%, 90% až do 100% Spurr média. Vzorek byl vždy v každém roztoku ponechán 20 minut. Nakonec byl roztok vyměněn za čerstvé 100% Spurr médium a vzorek zanechán v médiu po dobu 12 hodin za pomalého míchání. Následně byl Spurr dvakrát vyměněn za Spurr obsahující 2% dimethylaminoethanol (DMAE), akcelerátor způsobující tvrdnutí pryskyřice. Roztok se vzorkem byl pomalu míchán po dobu 6 hodin. Agarové bločky byly umístěny po dvou do speciální silikonové formy a sušeny po dobu 3 dnů při 60 °C.

Ultratenké řezy silné 60–70 nm byly získány řezáním diamantovým nožem na mikrotomu Ultracut E. Řezy na měděné síťce pokryté formvarovou blankou byly kontrastovány roztokem citronanu olovnatého.

Vzorky byly pozorovány na transmisním elektronovém mikroskopu JEOL JEM-1011 s CCD kamerou Veleta a s akvizičním softwarem Olympus Soft Imaging Solution GmbH.

## **2.4. Genetická charakterizace**

### **2.4.1. Izolace DNA, PCR a sekvenování**

Vzorky kultur kmene C i F byly pro izolaci DNA přeneseny do 2 ml mikrozkušavek (Eppendorf), zcentrifugovány (Centrifuge 5415D, Eppendorf) a médiem tvořený supernatant byl odebrán. K takto připravenému vzorku bylo přidáno 200 µl InstaGene matrix (BioRad) a nadále bylo postupováno dle pokynů od výrobce. Homogenizace byla provedena za pomoci 2 wolframových kuliček vložených do mikrozkušavek při maximální rychlosti po dobu tří minut. Po zhomogenizování vzorku byly mikrozkušavky umístěny do termobloku (Eppendorf Thermomixer® Comfort) a inkubovány při 56 °C a s frekvencí míchání 700 rpm po dobu 30 minut. Dále byly vzorky 10 sekund vortexovány a opět vloženy do termobloku, tentokrát s teplotou 100 °C na 8 minut. Pak byly vzorky znovu vortexovány a následně centrifugovány při 12 000 rpm po dobu 3 minut. Vzorky byly před dalším zpracováním uloženy v mrazáku (-20 °C).

Pro amplifikaci genu pro 18S rDNA byly použity primery Chryso\_SSU\_F2 (TGTCTCAAAGATTAAGCCAT ) a Chryso\_SSU\_R2 (CTACGGAAACCTTGTTACGA) (Pusztai and Škaloud, 2019) a polymeráza MyTaq™ DNA Polymerase (Bioline). Složení reakční směsi (Master Mix) je uvedeno v Tab č. 1, směs byla smíchána ve větším objemu odpovídajícímu počtu vzorků a poté rozpipetována do jednotlivých mikrozkušavek. Získané DNA vzorku bylo ke směsi přidáváno jako poslední, mikrozkušavky byly krátce

zvortexovány a následně umístěny do cykleru (Mastercycler<sup>®</sup> pro, Eppendorf), ve kterém proběhla PCR dle protokolu v Tab. č. 2.

<b>Master Mix</b>	
<b>složka</b>	<b>objem [μl]</b>
primer 1	0,3
primer 2	0,3
pufř	4
ddH <sub>2</sub> O	14,2
MyTaq polymeráza	0,2
vzorek DNA	0,1

Tab. č. 1: Složení reakční směsi pro PCR.

<b>PCR protokol</b>		
<b>teplota [C°]</b>	<b>čas [min]</b>	<b>opakování</b>
95	2	35x
95	1	35x
52	1	35x
72	1	35x
72	7	1x

Tab. č. 2: PCR protokol

Délka, čistota a množství PCR produktů byly zkontrolovány pomocí elektroforézy (Scie-plas: HU6, SHU6, HU13, V20-CDC se zdrojem napětí Consort E132) na 1% agarózovém gelu nabarveném ethidium bromidem. Výsledky elektroforézy byly vizualizovány v Gel Logic 100 (UV filter, SYBR Green filter a UVlight transilluminator; Heterolab UVT-20M), délka PCR produktů byla porovnána se standardem O'Gene 100 bp Plus DNA Ladder, ready-to-use (Thermo Scientific).

Vzorky byly přečištěny pomocí SPRI (Solid Phase Reversible Immobilization) Bead technology (Beckman Coulter) podle pokynů výrobce. Sekvence byla provedena firmou Macrogen Inc.

#### **2.4.2. Fylogenetická analýza**

Ze získaných sekvencí byl v programu Bioedit (Hall, 2017) sestaven contig, který byl v programu MEGAX (Kumar *et al.*, 1993) přidán k publikovanému alignmentu ze studie

(Watanabe & Lewis, 2017). Tak byl získán alignment, který byl dále upravován v programu MAFFT (Kato *et al.*, 2018), vyexportován a následně za pomoci RAxML (Kozlov *et al.*, 2019) z něj byl vypočítán fylogenetický strom s bootstrapovými hodnotami. Z vytvořeného souboru byl zhotoven a upraven finální fylogenetický strom v softwaru FigTree (Rambaut, 2018). Na výsledném stromě byly pro lepší přehlednost spojeny sekvence patřící do cladu *Moewusinia*.

## 2.5. Pilotní teplotní pokus

Pro stanovení optimální teploty růstu C byl naplánován teplotní pokus. Husté inokulum (smyté z 10 dobře narostlých šikmých agarů) bylo přeneseno do sterilního BBM média. Kultivace probíhala v 5 serologických destičkách s 6 komůrkami, kde komůrky 1–3 obsahovaly jako médium 5 ml tekutého BBM a komůrky 4–6 obsahovaly tenkou vrstvu BBM s přídatkem agaru. Do takto připravených komůrek byly přidány 2 ml připraveného inokula. Jednotlivé destičky byly umístěny do teplotních komor z plexiskla ovládaných termostatem, v lednici byly umístěny komory s teplotami 10, 15, 20 a 25 °C a mimo lednici byla umístěna komora s teplotou 30°C. Všechny destičky byly kultivovány pod konstantní osvětlením s intenzitou 20-25  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Celkově tedy bylo testováno 5 hladin teploty, vhodnost média (tekuté versus pevný agar), a to vždy po třech opakováních. Fyziologické změny stavu vzorků na destičkách byly pravidelně každé 3 dny měřeny za pomoci PAM (pulse amplitude modulation) fluorometrie (FluorCam, Photon System Instruments), konkrétně byla měřena fluorescence chlorofylu ( $F_0$ ) a maximální kvantový výtěžek ( $QY_{\text{max}}$ ) každé jednotlivé komůrky. Před jednotlivými měřeními byla každá destička 10 minut zatmívána. Růstová rychlost byla stanovena podle vzorce:

$$\text{Růstová rychlost } (\mu) = \frac{\ln(F_{0_2}) - \ln(F_{0_1})}{t_2 - t_1},$$

kde  $F_{0_1}$  představuje fluorescenci chlorofylu v čase  $t_1$  (počátečním dni) a  $F_{0_2}$  představuje fluorescenci chlorofylu v čase  $t_2$  (konečném dni). Růstová rychlost byla vypočítávána pro celkovou dobu trvání experimentu i pro časovou oblast exponenciální fáze růstu. Měření probíhalo podle přiloženého protokolu. Celý experiment probíhal po dobu 22 dní.

## 2.6. Experimenty navozující stresové podmínky

Vzhledem k obtížnosti práce s kmenem F, zejména pak při jeho extrakci, byly všechny experimenty prováděny pouze pro kmen C.

### 2.6.1. Vliv světelné intenzity a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů

Multikultivátor (PSI, Drásov) byl kalibrován na odpovídající média podle pokynů od výrobce. Pro tento experiment byla totiž připravena dvě kultivační média – BBM s obsahem dusíku a BBM bez obsahu dusíku, tedy bez přídavku  $\text{NaNO}_3$ . Kultura pro kultivaci byla připravena v 500 ml Erlenmeyerově baňce obsahující BBM s dusíkem, stejně tak byla připravena i kultura pro kultivaci bez dusíku, s tím rozdílem, že BBM v baňce bylo bez přídavku dusíku. V obou případech inokulum obsahovalo stejně hustou biomasu, dostatečnou k rychlému zahájení růstu. Inokulum bylo zaočkováno do osmi zkumavek o objemu 80 ml. Zkumavky s lichým označením (L1, L3, L5, L7) obsahovaly médium s dusíkem, zkumavky se sudým označením (L2, L4, L6, L8) obsahovaly médium bez dusíku. Kultivace probíhala ve  $22\text{ }^\circ\text{C}$  s fázovým osvětlením s intenzitou  $200\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , kdy světelná fáze odpovídala 14 hodinám a temnostní 10 hodinám. Všechny kultury byly kontinuálně probublávány, aby docházelo k dostatečnému míchání a přísunu  $\text{CO}_2$ . Každý druhý den byly všechny zkumavky mechanicky promíchány a byla změřena jejich optická denzita. Měření probíhalo při vlnové délce 680 nm, což souvisí s absorpcí chlorofylu a dá se tedy díky těmto informacím odhadnout jeho koncentrace. Dále se měřilo při vlnové délce 720 nm, kdy se světlo odráží od přítomných částic v médiu a tento údaj se dá použít jako proxy k odhadu biomasy (*Multi-Cultivators | Photobioreactors*, no date). Takto experiment probíhal po dobu 7 dní, aby došlo k dostatečnému zvýšení objemu biomasy. Následně byla změněna míra ozáření na 80, 200, 350 a  $420\text{ }\mu\text{mol m}^{-2}\text{ s}^{-1}$ , vždy tak, aby pár zkumavek s dusíkem i bez dusíku sdílel stejnou míru ozáření. Kultury v dusíkatém médiu byly sklizeny o uplynutí dalších 14 dní, kultury v bezdusíkatém médiu po 10 dnech. Celý experiment pro dusíkaté médium trval 22 dní a pro bezdusíkaté 17 dní. Zpracování kultur spočívalo v převedení obsahu každé zkumavky do dvou plastových 50 ml centrifugačních zkumavek a následné centrifugaci po dobu 4 minut na 4500 rpm. Pak byl odebrán supernatant a nahrazen 2 ml destilované vody. Zkumavky byly protřepány a vzorek převeden do 2 ml mikrozkušavek (Eppendorf). Mikrozkušavky byly opět stočeny (4 minuty, 4500 rpm), supernatant odebrán a znovu byly přidány 2 ml destilované vody. Následovalo další stočení a odebrání supernatantu. Takto upravené vzorky byly poté v mikrozkušavkách vloženy na několik minut do tekutého dusíku. Po důkladném zmražení vzorků byly otevřené mikrozkušavky na stojánku vloženy do lyofilizátoru (Heto PowerDry LL3000, Thermo Electron Corporation). Po 12 hodinách byly vysušené zmražené vzorky v zavřených mikrozkušavkách vloženy do sáčků se silikagelem a uloženy do mrazáku s teplotou  $-86\text{ }^\circ\text{C}$ .

<b>Složka</b>	<b>Zásobní roztok s dH<sub>2</sub>O [g/l]</b>	<b>BBM s dusíkem s dH<sub>2</sub>O [ml/l]</b>	<b>BBM bez dusíku s dH<sub>2</sub>O [ml/l]</b>
NaNO <sub>3</sub>	25,00	10	0
CaCl <sub>2</sub> ×2H <sub>2</sub> O	2,50	10	10
MgSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	7,50	10	10
K <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub>	7,50	10	10
KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	17,50	10	10
NaCl	2,50	10	10
Roztok EDTA	viz Tab. č. 4	1	1
Roztok FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	viz Tab. č. 5	1	1
Roztok H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>	11,42	1	1
Roztok stopových prvků	viz Tab. č. 6	1	1

Tab. č. 3: Složení jednotlivých zásobních roztoků využitých pro přípravu BBM s dusíkem a bez dusíku (Brown and Bold, 1964).

<b>Složka</b>	<b>Zásobní roztok s dH<sub>2</sub>O [g/l]</b>
EDTA	50,00
KOH	31,00

Tab. č. 4: Složení zásobního roztoku EDTA (Brown and Bold, 1964).

<b>Složka</b>	<b>Zásobní roztok s dH<sub>2</sub>O (na 100 ml)</b>
FeSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	0,498 g
H <sub>2</sub> SO <sub>4</sub> (96%)	0,1 ml

Tab. č. 5: Složení zásobního roztoku síranu železnatého (Brown and Bold, 1964).

<b>Složka</b>	<b>Zásobní roztok s dH<sub>2</sub>O [g/l]</b>
ZnSO <sub>4</sub> ×7H <sub>2</sub> O	8,82
MnCl <sub>2</sub> ×4H <sub>2</sub> O	1,44
MoO <sub>3</sub>	0,71
Co(NO <sub>3</sub> ) <sub>2</sub> ×6H <sub>2</sub> O	0,49
CuSO <sub>4</sub> ×5H <sub>2</sub> O	1,57

Tab. č. 6: Složení roztoku stopových prvků (Brown and Bold, 1964).



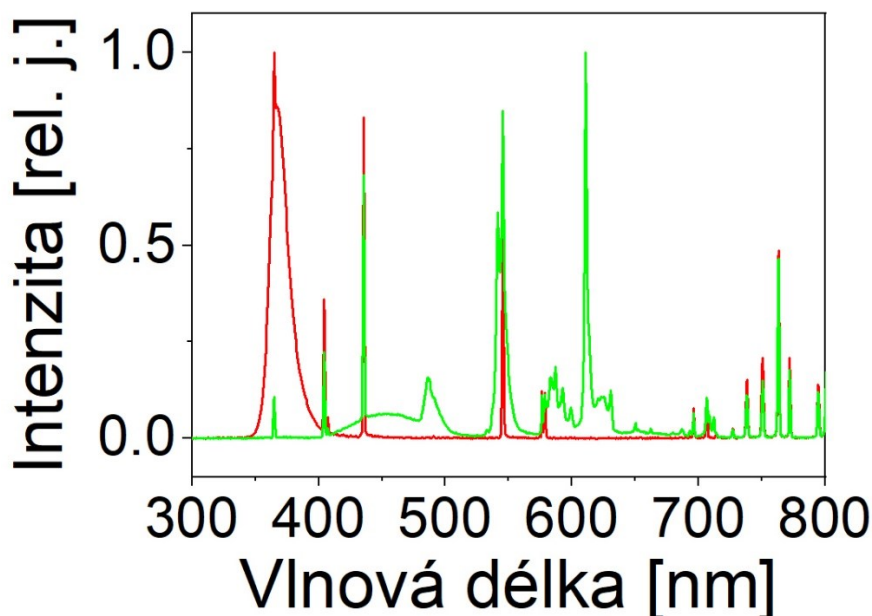
### 2.6.2. Dvoufázová kultivace

Dalším experimentem probíhajícím v multikultivátoru bylo otestování dvoufázové kultivace. Do čtyř 80 ml zkumavek (L2, L4, L6, L8) bylo rozděleno dostatečně husté inokulum, obsahující kultury v tekutém BBM. Kultivace probíhala opět za konstantního probublávání, teploty 22 °C a střídání světelné fáze (14 hodin) a fáze temnotní (10 hodin), kdy intenzita světla odpovídala  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Po celé trvání experimentu byla každé dva dny byla měřena optická denzita a kultury ve zkumavce mechanicky promíchány. Po 14 dnech a navýšení biomasy kultur byla změněna intenzita ozáření – byla spuštěna druhá fáze kultivace. Dvě zkumavky (L2, L4) byly ozařovány světlem s intenzitou  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a zbylé dvě (L6, L8) s intenzitou  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Takto byly kultury kultivovány dalších 9 dní. Následně byly sklizeny a vzorky zpracovány stejným způsobem, jako byl uveden v předchozím experimentu, s jediným rozdílem, před vložení do lyofilizátoru byly na 15 hodin uloženy do mrazáku o teplotě -86 °C.

### 2.6.3. Vliv teploty, UVA a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů

Poslední experiment využíval teplotního gradientu v kombinaci s UVA a PAR (fotosynteticky aktivní záření) a obsahu dusíku v BBM. Cílem bylo zjistit vliv těchto kombinovaných faktorů na tvorbu a akumulaci karotenoidů. Byla vytvořena dvě různá inokula o stejné hustotě biomasy z kultur na šikmých BBM agarech. Kultury byly smyty do dvou 500 ml Erlenmeyerových baněk, jedna obsahující klasické BBM a druhá BBM bez dusíku. Dohromady tak bylo vytvořeno 108 ml inokula s dusíkatým médiem a stejný objem inokula v médiu bez dusíku. Pro kultivaci bylo využito 6 serologických destiček o 6 komůrkách. Komůrky s označením 1–3 vždy obsahovaly 5 ml inokula s klasickým BBM, komůrky označeny 4–6 vždy obsahovaly 5 ml inokula s BBM bez dusíku.

Kultivace probíhala na teplotním gradientu (Labio, Česká republika), konkrétně v teplotě 10, 22 a 30 °C. Pro lepší teplotní vodivost bylo pod destičky vloženo několik vrstev buničiny a gázy, které byly pravidelně polévány destilovanou vodou. Destičky byly ozařovány konstantně fotosynteticky aktivním zářením s intenzitou  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a zároveň UVA zářivkou s vrcholem záření při 368 nm o intenzitě 0,7 mW. Spektrální složení použitého světla znázorňuje Obr. č. 2 a bylo studováno pomocí spektrografu (Ocean Optics, model USB2000+). Intenzita osvětlení byla změřena pomocí měřky výkonu (Thorlabs, monitor PM100A s detekční hlavou S120VC).



Obr. č. 2: Chromatogram znázorňující intenzitu záření v závislosti na vlnové délce. UVA záření je zaznamenáno červeně (tedy maximum záření při 368 nm) a PAR je zaznamenáno zeleně. Jak je vidět zasahuje záření UVA zářivek i do viditelného spektra. Celková intenzita PAR tedy zahrnuje i vliv UVA zářivek.

Destičky byly rozděleny do párů, kdy jedna představovala vzorek a druhá kontrolu. Kontrolní destičky byly překryty folií (Archivní ochranná fólie proti UV záření 20218, Ceiba s.r.o.) zabraňující propouštění UVA záření. Mezi jednotlivými páry byly vytvořeny přepážky znemožňující násobení intenzity UVA záření. Kontrolní destičky byly do experimentu přidány až 2 dny po zahájení experimentu, proto jejich data obsahují o jedno měření méně.

Destičky byly každý den otáčeny o 180°, aby se dosáhlo rovnoměrného osvětlení všech komůrek. Zároveň byly minimálně jednou za dva dny měřeny za pomoci PAM fluorometrie, především za účelem zjištění  $F_0$ . Postup byl stejný jako v pilotním pokusu. Kvůli vyššímu odparu a nutnosti otírat víčko destiček před měřením bylo podle potřeby doplňováno vždy odpovídající médium do komůrek destiček pěstovaných ve 22 a 30 °C. Takto byly kultury kultivovány po dobu 34 dní.

Poslední den byly kultury naposledy změřeny a vzorky převedeny postupnou centrifugací (3 minuty, 4500 rpm) a odebíráním supernatantu do 2 ml mikrozkupek. Po převedení celého vzorku do mikrozkupek byly vždy přidány 2 ml destilované vody, vzorek znovu stočen (4 minuty, 4500 rpm) a supernatant odebrán. Připravené vzorky byly poté vloženy na několik minut do tekutého dusíku, aby došlo k rychlému zmrazení buněk. Nakonec byly vzorky uloženy do mrazáku s teplotou -86 °C a po 12 hodinách lyofilizovány. Po vysušení

mrazem byly uskladněny v uzavřených mikrozkušavkách v sáčku se silikagelem opět v mrazáku (-86 °C).

## 2.7. Stanovení karotenoidů

### 2.7.1. Použité chemikálie

Acetone G.R., ISO REAGENT, Lach-Ner, s. r. o., Česká republika

Acetonitril HPLC Gradient Grade, Fisher Chemical, USA

Methanol Chromasolv® for HPLC, čistota  $\geq 99,9$  %, Sigma-Aldrich, Německo

2,6-Di-tert-butyl-4-methylphenol, čistota  $\geq 99,9$  % (GC), Sigma-Aldrich, Německo

Ethylacetát pro HPLC, Supelco, USA

Tris(hydroxymethyl)-aminomethan hydrochlorid, p.a., Merck, Německo

### 2.7.2. Extrakce

Zlyofilizované vzorky byly nejprve zváženy (Analytické váhy Sartorius; Sartalex, spol. s.r.o.) a poté extrahovány 2 ml acetonu s obsahem 0,1% BHT (butylhydroxytoluen), který slouží jako antioxidační činidlo. Vzorky byly homogenizovány pomocí skleněné kuličky umístěné ve zkumavce na vortexu (Vortex-Genie 2, Scientific Industries) po dobu 2 minut. Následovala centrifugace (Centrifuga Chirana) po dobu 4 minut na 900 rpm (40% výkon centrifugy), po které se odebral supernatant, jež byl uložen v čisté zkumavce pro další postup. Extrakce byly opakovány, dokud nedošlo k odbarvení supernatantu. Odebrané spojené supernatanty byly přefiltrovány přes stříkačkový filtr (FP 30/0.2 PTFE-S Whatman™) s velikostí pórů 0,2  $\mu\text{m}$  (Weber *et al.*, 2007).

### 2.7.3. Kvantitativní stanovení celkových karotenoidů podle Lichtenthalera

Vzorkům získaným postupnou extrakcí byla změřena absorbance za pomoci spektrometru (UV-Vis spektrometr SPECORD 210 PLUS) a skleněných kyvet. Měření probíhalo v rozmezí vlnových délek od 400–700 nm se specificky hledanými maximy absorbance chlorofylu *a* (661,6 nm), chlorofylu *b* (644,8 nm) a předpokládaným maximem absorbance celkových karotenoidů (470 nm). Zjištěné hodnoty byly následně využity v rovnicích pro výpočet celkového množství karotenoidů:

$$c_a(\mu\text{g/ml}) = 11,24A_{661,6} - 2,04A_{644,8}$$

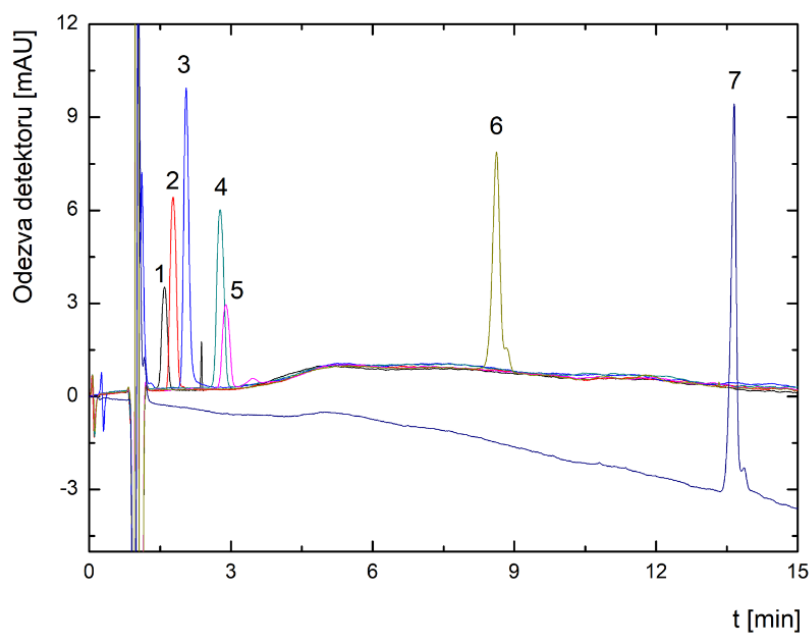
$$c_b(\mu\text{g/ml}) = 20,13A_{644,8} - 4,19A_{661,6}$$

$$c_{(x+c)}(\mu\text{g/ml}) = (1000A_{470} - 1,90c_a - 63,14c_b)/214$$

Dle těchto rovnic, kde  $c_a$  se rovná koncentraci chlorofylu  $a$ ,  $c_b$  se rovná koncentraci chlorofylu  $b$  a  $c_{(x+c)}$  se rovná celkové koncentraci karotenoidů, bylo přibližně zjištěno, jaké vzorky obsahují větší množství karotenoidů, tudíž jsou vhodné pro podrobnější analýzu pomocí HPLC (Lichtenthaler and Buschmann, 2001).

#### 2.7.4. Kvantitativní a kvalitativní stanovení karotenoidů pomocí HPLC

Pro HPLC separaci byla vybrána a optimalizována metoda dle Jin Liu, která poskytovala velké množství dobře separovaných signálů (Liu *et al.*, 2010). Pro využití této metody bylo optimalizované složení mobilních fází a průtoková rychlost a také byl brán v potaz vliv teploty kolony na tvar signálů. Před samotnou aplikací metody na získané vzorky proběhlo měření standardů a kalibrace, za optimalizovaných podmínek byly tedy jednotlivé standardy karotenoidů zanalyzovány (*all-trans*-astaxanthin, zeaxanthin,  $\beta$ -karoten (Sigma-Aldrich); lutein, *9'-cis*-neoxanthin, violaxanthin, echinenon (DHI Dánsko), každý o koncentraci 0,1 mg/l (Obr. č. 3). Také bylo provedeno měření směšného vzorku všech standardů, jejichž výskyt je ve vzorcích předpokládán. To bylo provedeno pro snadnou identifikaci píků v reálném vzorku řas, která byla prováděna porovnáváním retenčních časů standardů s retenčními časy píků ve vzorcích. Bylo zjištěno, že vzorky řas neobsahují volný *all-trans*-astaxanthin, dále se s ním tedy nepracovalo.



Obr. č. 3: Porovnání chromatogramů standardů *9'-cis*-neoxanthinu (1), violaxanthinu (2), *all-trans*-astaxanthinu (3), luteinu (4), zeaxanthinu (5), echinenonu (6) a  $\beta$ -karotenu (7)

Pro separaci byly připraveny mobilní fáze, pufr a kalibrační roztoky. Mobilní fáze A byla směs ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr (pH = 8,0) v poměru 94/2/4, jako mobilní fáze B byla použita směs MeOH/EtOAc v poměru 68/32. Míchání složek mobilních fází bylo prováděno on-line automatickým směšovačem, který je součástí kapalinového chromatografu. Příprava pufru proběhla ručně, hodnota pH byla upravena pomocí pH-metru (pH metr Adwa AD1000, Maďarsko) a přidavků 0,5M NaOH na hodnotu 8,0. Jednotlivé kalibrační roztoky standardů byly připraveny ředěním jejich zásobních roztoků o koncentraci 1 mg/l mobilní fází A na koncentraci 0,1 mg/l. Také byl připraven směsný vzorek obsahující  $\beta$ -karoten, lutein, zeaxanthin, echinenon, 9'-cis-neoxanthin a violaxanthin, tak, aby koncentrace každého standardu v tomto směsném vzorku byla 0,1 mg/l.

Vzorky pro HPLC separaci byly připraveny smícháním extrahovaného vzorku a příslušné mobilní fáze A v poměru 1:2 (vzorek/mobilní fáze A). Separace karotenoidů probíhala v reverzním módu vysokoúčinné kapalinové chromatografie. V kolonovém termostatu byla nastavena teplota 28 °C a v autosampleru 16 °C. Měření bylo prováděno za podmínek gradientové eluce. Průtok mobilní fáze byl optimalizován na 0,25 ml min<sup>-1</sup>. Dávkovaný objem vzorků byl 20  $\mu$ l a vlnová délka pro detekci byla zvolena 470 nm.

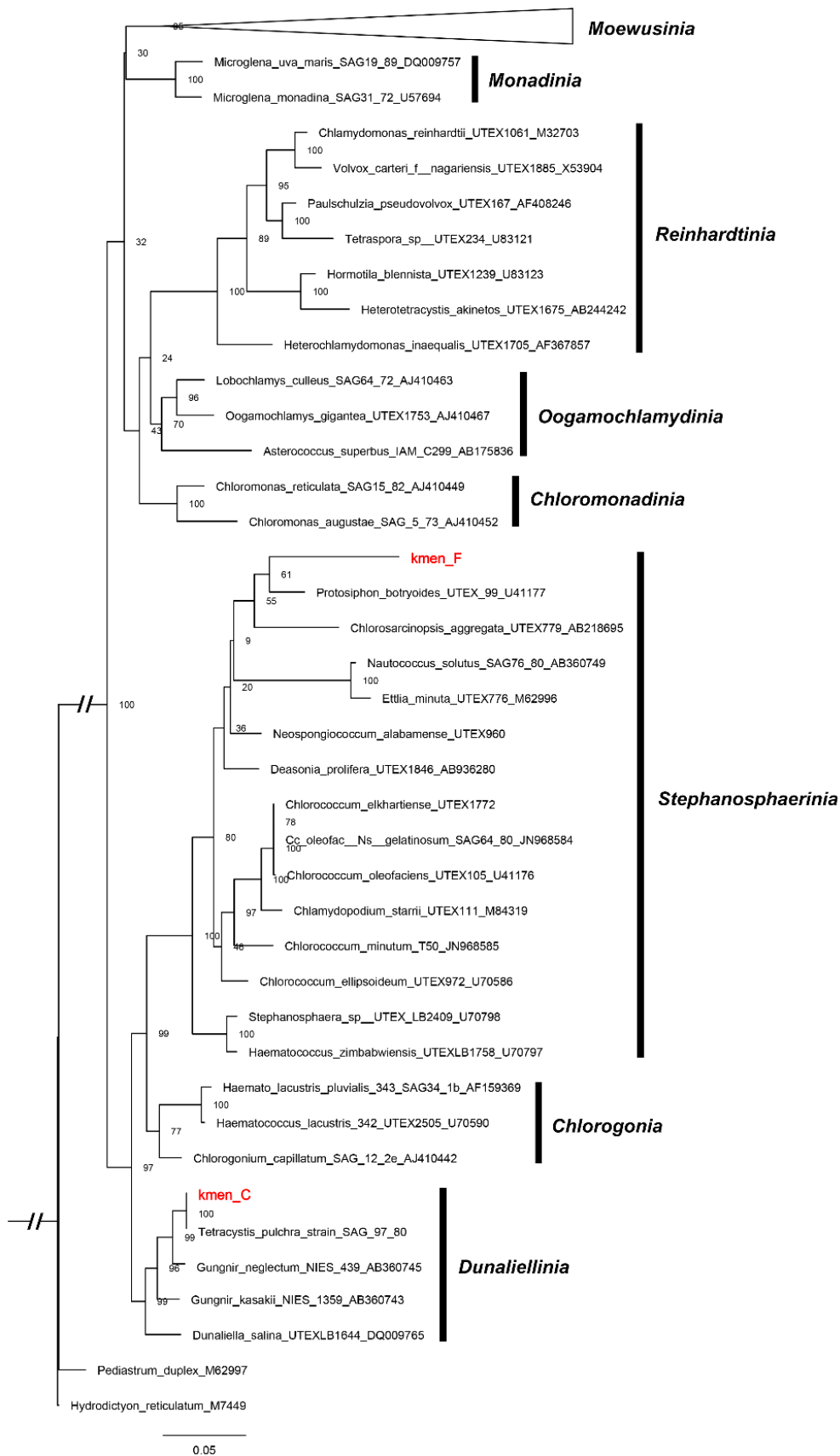
Pro separaci při gradientové eluci byl použit systém HPLC UltiMate 3000 od firmy Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA USA. Systém byl složen z pumpy Dionex UltiMate 3000 RS Pump, dávkovače Dionex UltiMate 3000 RS autosampler, Dionex UltiMate 3000 RS Column Compartment a detektoru Dionex UltiMate 3000 Diode Array Detector. Pro separaci byla využita kolona Kinetex C18 o rozměrech 100  $\times$  2,1 mm, velikost částic 2,6  $\mu$ m od firmy Phenomenex, USA. Data byla zpracována počítačovým programem Chromeleon Dionex Software verze 7.2. (Thermo Fisher Scientific Inc.).

### 3. Výsledky

#### 3.1. Fylogenetické postavení zkoumaných kmenů

Z Maximum likelihood analýzy 18S rDNA sekvencí vyplývá, že kmen C je identický s kmenem SAG 97.80 uloženým ve Sbírce kultur řas University v Göttingenu (SAG), kde byl identifikován jako *Tetracystis pulchra*. Zástupce polyfyletického rodu *Tetracystis* (*Tetracystis pulchra*) se tedy objevuje na novém (dalším) místě fylogenetického stromu v rámci cladu *Dunaliellinia*, kde je součástí linie již popsaneho rodu *Gungnir* (Nakada *et al.*, 2008). Je tedy nasnadě, že by měla vzniknout studie zabývající se morfologickým a molekulárním srovnáním *Tetracystis pulchra* SAG 97.80 (případně mého kmene C) se zástupci rodu *Gungnir*, která by případně vyústila v převedení *T. pulchra* do rodu *Gungnir*. Tato studie však přesahuje rámec zadání mé diplomové práce. V následujícím textu tedy pojednávám o kmenu C jako o *T. pulchra*, s plným vědomím jeho fylogenetické pozice v rámci cladu *Dunaliellinia*.

Pro kmen F Maximum likelihood analýzou 18S rDNA sekvencí nebyla nalezena identická shoda. Nejvyšší dosažená shoda (94,9 %) byla s *Protosiphon botryoides* a s *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80. Na fylogenetickém stromě (Obr. č. 4) je kmenu F *P. botryoides* nejbližší, ale jejich morfologická podobnost není vysoká. Sekvence z *T. tetraspora* bohužel nebyly v molekulární analýze použity. Na základě morfologického pozorování bylo kmenu F přiřazeno jméno *Tetracystis* sp., patřícímu do cladu *Stephanosphaerina*. Kmen F je tedy příbuzný *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80, kterému se podobá.



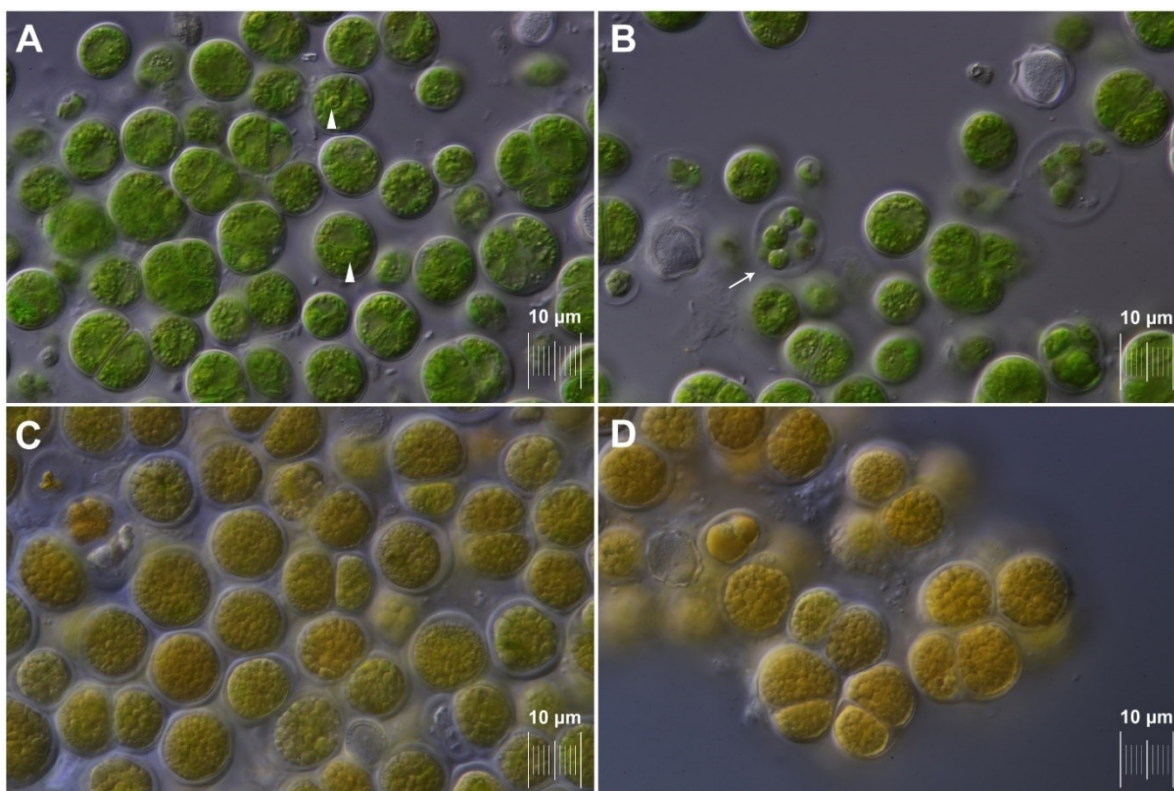
Obr. č. 4: Maximum likelihood fylogenetický strom založený na 18S rDNA zobrazující příbuznost sekvencí kmenů C a F se sekvencemi použitými ve studii (Watanabe and Lewis, 2017). Čísla na nodech jednotlivých větvení udávají bootstrapovou hodnotu (100 opakování). Úsečka odpovídá počtu substitucí na pozici.

## 3.2. Morfologie

### 3.2.1. *Tetracystis pulchra*, Kmen C

Nárůst buněk *T. pulchra* tvoří na agaru homogenní až slabě zrnité filmy a makroskopicky se zdají být suché. Některé solitérní mikrokolonie tvoří 1–3 mm velké vystouplé terčíky. Zelenou barvu si kolonie udržují po dobu 2–3 týdnů, poté postupně žloutnou a následně přejdou do oranžové až červené barvy. Ve světelném mikroskopu bylo pozorováno, že buňky tvoří tetrády, mají jasně viditelný pyrenoid, velikostně se autospory pohybují v rozmezí 4,5–5,0  $\mu\text{m}$ , vegetativní buňky 13  $\mu\text{m}$  a autosporangia 17,5–18,0  $\mu\text{m}$ .

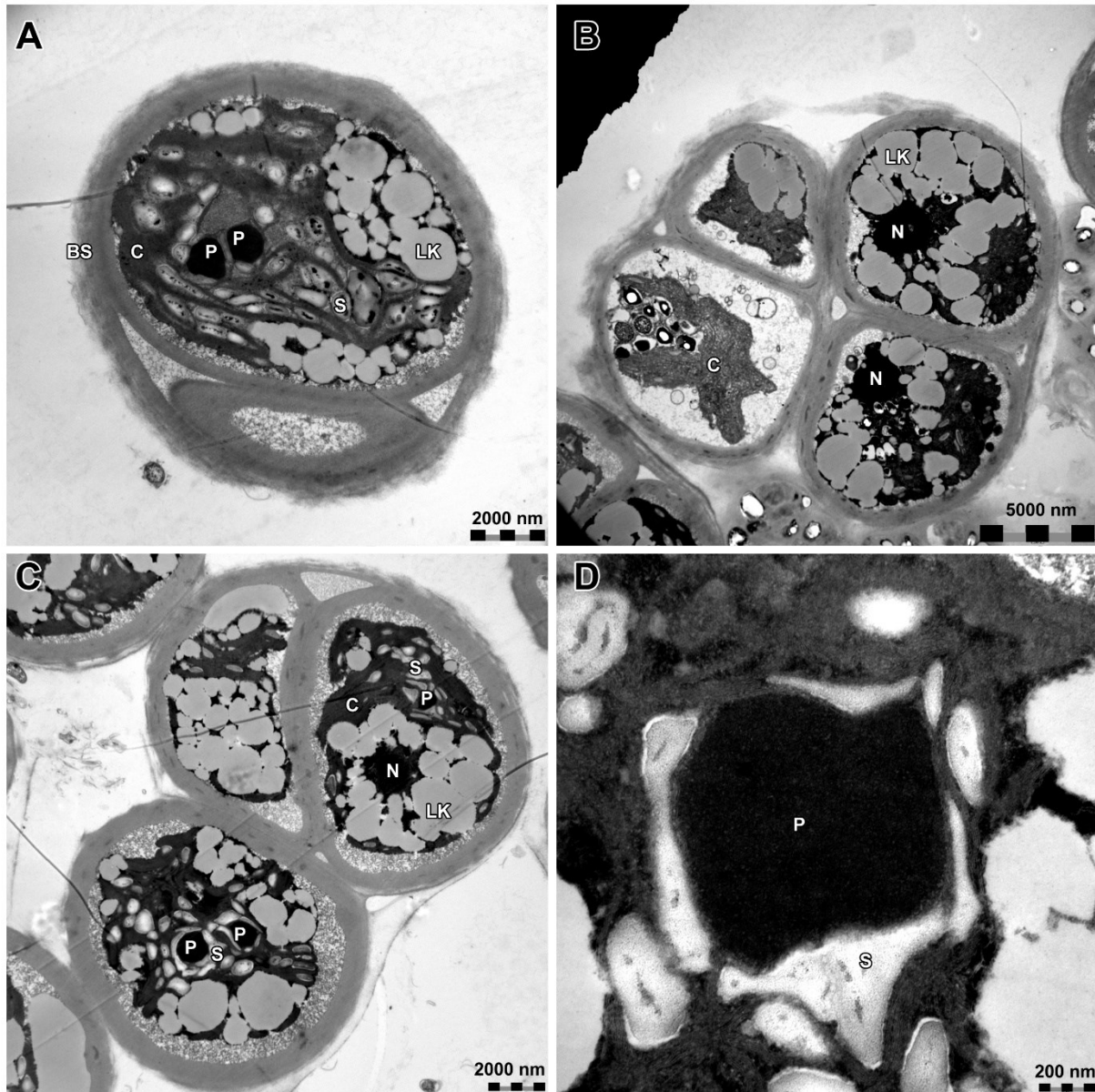
Mladé buňky (cca 10 dní po přeočkování) jsou kulaté až oválné, 12,0–13,5  $\mu\text{m}$  v průměru. Některé jsou solitérní, některé tvoří dyády, triády nebo tetrády. Takovéto balíčky buněk se často shlukují do velkých komplexů. Buňky mají parietální, většinou miskovitý, chloroplast. Chloroplast nese viditelný pyrenoid obklopený škrobovými zrny (Obr. č. 5: A, B). Zoospory nebyly pozorovány jen autospory. Starší kolonie mají oranžovou barvu, buňky jsou 14,5–15,5  $\mu\text{m}$  velké, obsahují karotenoidy v lipidových kapénkách. Staré buňky nejčastěji tvoří dyády, uspořádané do velkých shluků buněk (Obr. č. 5: C, D).



Obr. č. 5: *T. pulchra* (kmen C) – pozorování světelným mikroskopem: **A** – mladé, zelené, jednojaderné buňky s viditelnými pyrenoidy (označeno trojúhelníky); **B** – autosporangium s autosporami (označeno šipkou); **C** – starší, oranžová kultura, buňky plné lipidových kapének, silná buněčná stěna; **D** – oranžovo-červené buňky tvořící dyády.

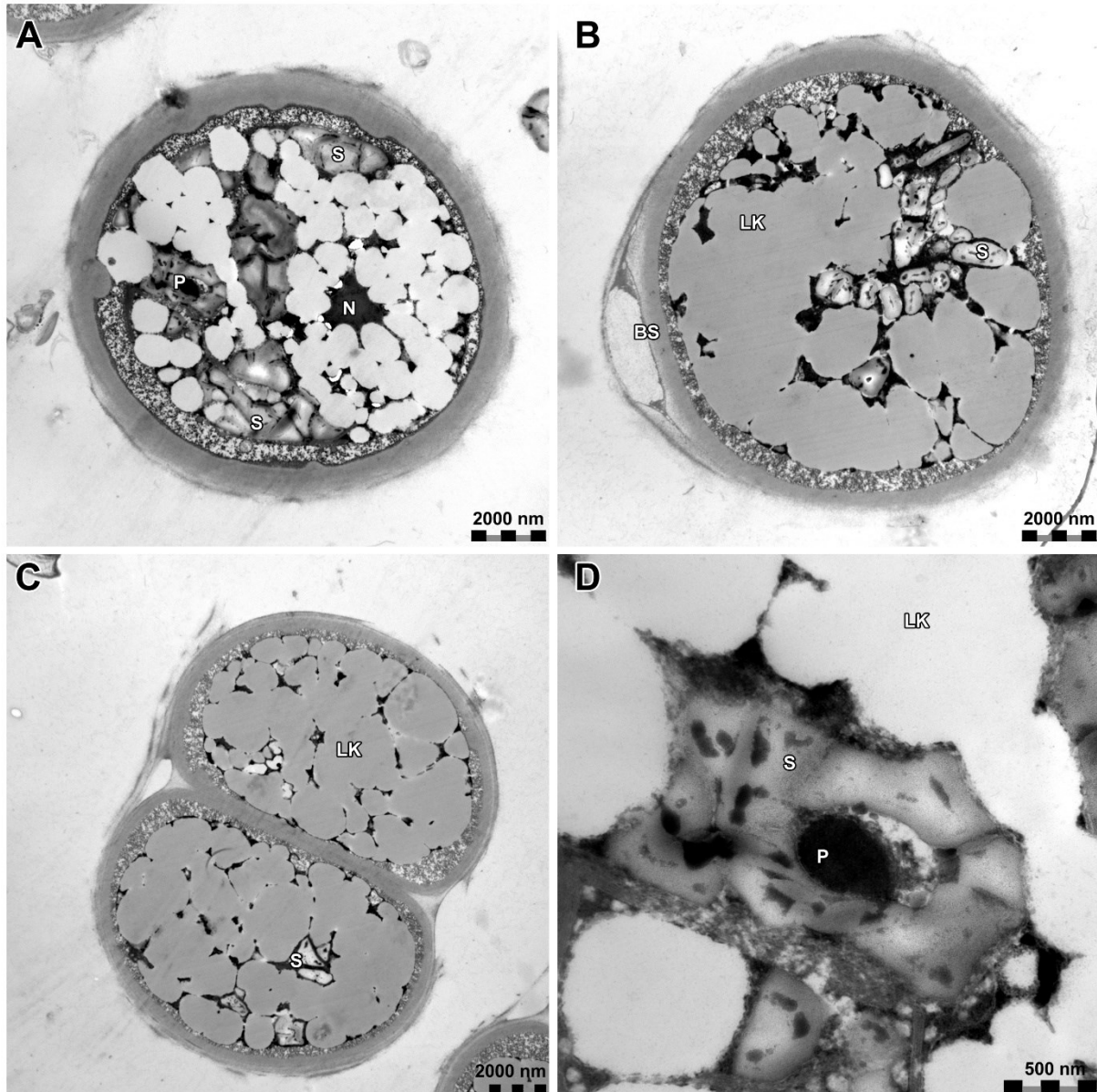


Pozorování v TEM ukázalo, že zelené, mladé buňky *T. pulchra* mají silnou buněčnou stěnu a obsahují jedno jádro (Obr. č. 6: A–C). Pyrenoid má fragmentovanou škrobovou pochvu a matrix pyrenoidu není penetrována thylakoidy (Obr. č. 6: C, D). Elipsoidní škrobová zrna se vykytují i volně v chloroplastu. Lipidové kapénky se hojně vyskytují v cytoplazmě (Obr. č. 6: B, C).



Obr. č. 6: Mladé vegetativní buňky *T. pulchra* (kmenu C) pozorované v TEM: **A** – buňka obsahující 2 pyrenoidy; **B** – tetráda mladých buněk s dobře viditelným chloroplastem a jádrem; **C** – buňka obsahující 2 pyrenoidy obklopené škrobovými zrny; **D** – detail pyrenoidu s fragmentovanou škrobovou pochvou; matrix není penetrována thylakoidy. BS – buněčná stěna; C – chloroplast; P – pyrenoid; S – škrobová zrna; LK – lipidové kapénky; N – jádro.

Starší, červené buňky mají silnou buněčnou stěnu a téměř celý obsah buňky zabírají lipidové kapénky obsahující karotenoidy (Obr. č. 7: B, C). Chloroplasty také obsahují velké množství škrobových zrn, někdy se sotva viditelným pyrenoidem (Obr. č. 7: D).



Obr. č. 7: Starší vegetativní buňky *T. pulchra* (kmen C) v TEM: **A** – buňka s viditelným jádrem, chloroplast plný škrobových zrn s pyrenoidem; **B** – buňka se ztlustlou buněčnou stěnou, plná lipidových kapének; **C** – dyáda buněk s velkým množstvím lipidových kapének; **D** – detail pyrenoidu obklopeného fragmentovanou škrobovou pochvou. BS – buněčná stěna; P – pyrenoid; S – škrobová zrna; LK – lipidové kapénky; N – jádro.

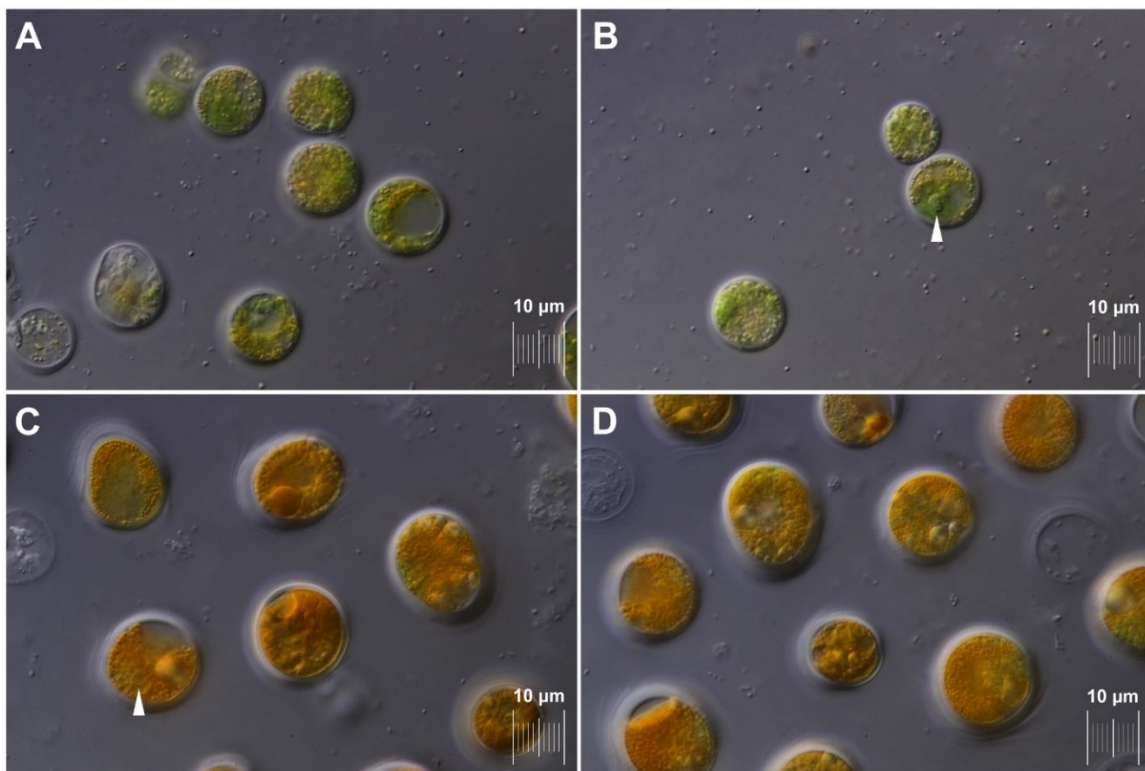
Na základě pozorování světelným mikroskopem a TEM a v souladu s molekulárními daty, byl kmen C určen jako *Tetracystis pulchra* (Brown and Bold, 1964), a to na základě těchto morfologických znaků. Kulaté až oválné buňky se velikostně pohybují od 12,0 do 13,5  $\mu\text{m}$ , obsahují parietální chloroplast, jedno jádro a pyrenoid obklopený škrobovými zrny. U starších

buněk (2 týdny) dochází k ztloustnutí buněčné stěny a ke změně barvy ze zelené na oranžovou až červenou. Nebylo pozorováno sexuální rozmnožování a vegetativní rozmnožování vedlo ke vzniku především tetrad, které dohromady tvořily velké komplexy. Na BBM agaru pěstované kultury se okem jeví homogenní, hladké a suché (Brown and Bold, 1964).

### 3.2.2. Kmen F

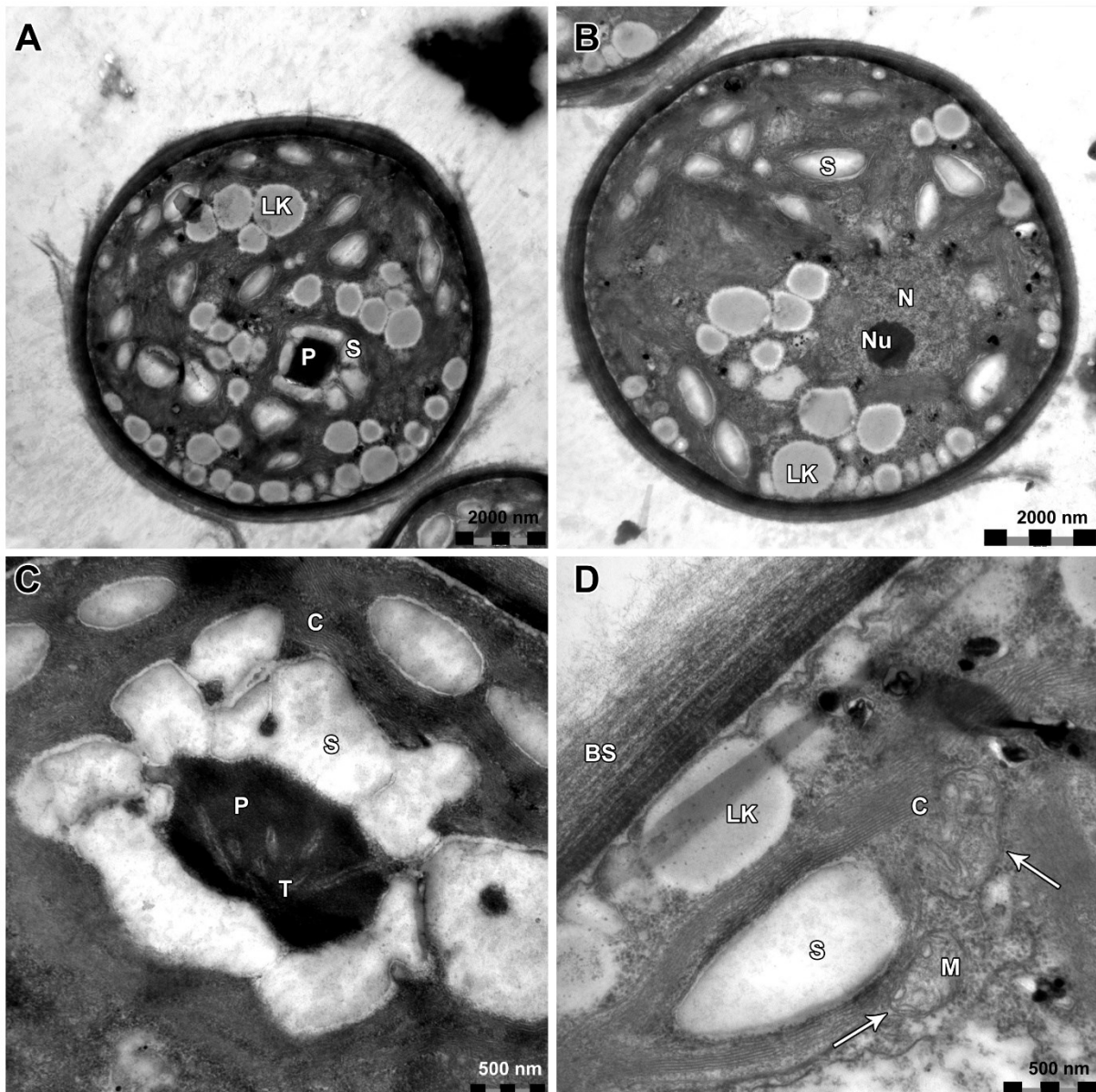
Buňky tvoří na agaru kolonie v podobě vystouplého filmu. Kolonie jsou po okrajích lemovány slizem a udržují si vlhký, lesklý vzhled. Solitérní mikrokolonie tvoří terčiky o velikosti 1–5 mm, kdy je celá kolonie převrstvena slizem do podoby malého dómu. Kultury jsou zelené po dobu 3–4 týdnů, poté pomalu přechází do červené barvy. Stejně jako u *T. pulchra* (kmen C) tvoří buňky tetrády. Ve srovnání s předešlým kmenem jsou však větší (mladé vegetativní buňky 16,0–16,5  $\mu\text{m}$ ; staré 19,0–19,5  $\mu\text{m}$ ).

Mladé vegetativní buňky (cca 3 týdny) netvoří balíčky. Kulovité buňky mají parietální chloroplast s pyrenoidem a škrobovými zrny (Obr. č. 8: A, B). Vegetativní buňky jsou 16,0–16,5  $\mu\text{m}$  velké. Starší kolonie mají oranžovou až načervenalou barvu a obsahují lipidové kapénky. V chloroplastu je někdy rozeznatelný pyrenoid. Tyto stárnoucí buňky jsou 19,0–19,5  $\mu\text{m}$  velké. Buňky jsou obklopeny bezbarvou slizovou vrstvou (Obr. č. 8: C, D).



Obr. č. 8: Kmen F pod světelným mikroskopem: **A** – samostatné zelené buňky; **B** – buňky s viditelným parietálním chloroplastem a pyrenoidem (označeno trojúhelníkem); **C** – starší červené buňky s pyrenoidem (označeno trojúhelníkem); **D** – slizem obalené buňky, plné lipidových kapének.

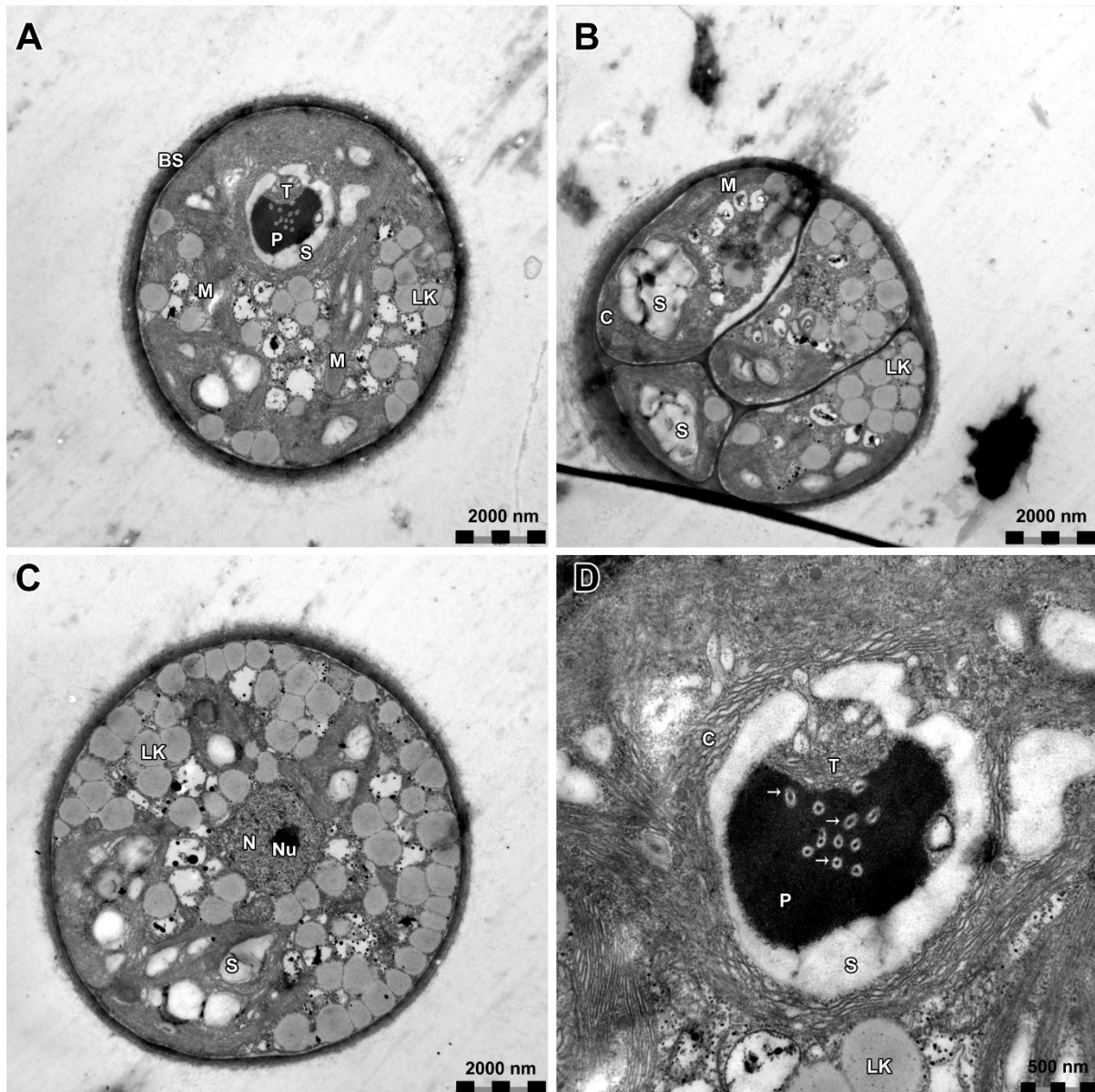
Při pozorování v TEM je patrné, že je buněčná stěna buněk složena z mikrofibril a má vrstevnatou strukturu (Obr. č. 9: D). Mladé buňky obsahují chloroplast s pyrenoidem, který je obklopený fragmentovanou škrobovou pochvou, další škrobová zrna jsou rozmístěna volně v chloroplastu (Obr. č. 9: A, C). Matrix pyrenoidu je penetrována četnými thylakoidy. Buňky obsahují drobné lipidové kapénky. Dále bylo pozorováno jedno poměrně velké jádro s jadérkem (Obr. č. 9: B) a mitochondrie (Obr. č. 9: D).



Obr. č. 9: Mladé vegetativní buňky (kmen F) pozorované v TEM: **A** – buňka s dobře viditelným pyrenoidem a škrobovými zrny; **B** – buňka obsahující jádro s jadérkem; **C** – detail pyrenoidu obklopeného fragmentovanou škrobovou pochvou; matrix penetrována thylakoidy; **D** – detail vrstevnaté buněčné stěny; mitochondrie (označeno šipkou). BS – buněčná stěna; P – pyrenoid; S – škrobová zrna; LK – lipidové kapénky; N – jádro; Nu – jadérko; C – chloroplast; T – thylakoidy; M – mitochondrie.



Buňky starších kultur obsahují výrazně větší množství drobných lipidových kapének ve srovnání s mladými buňkami (Obr. č. 10: A–C). Penetrace matrix pyrenoidu thylakoidy je výrazná (Obr. č. 10: A, D).

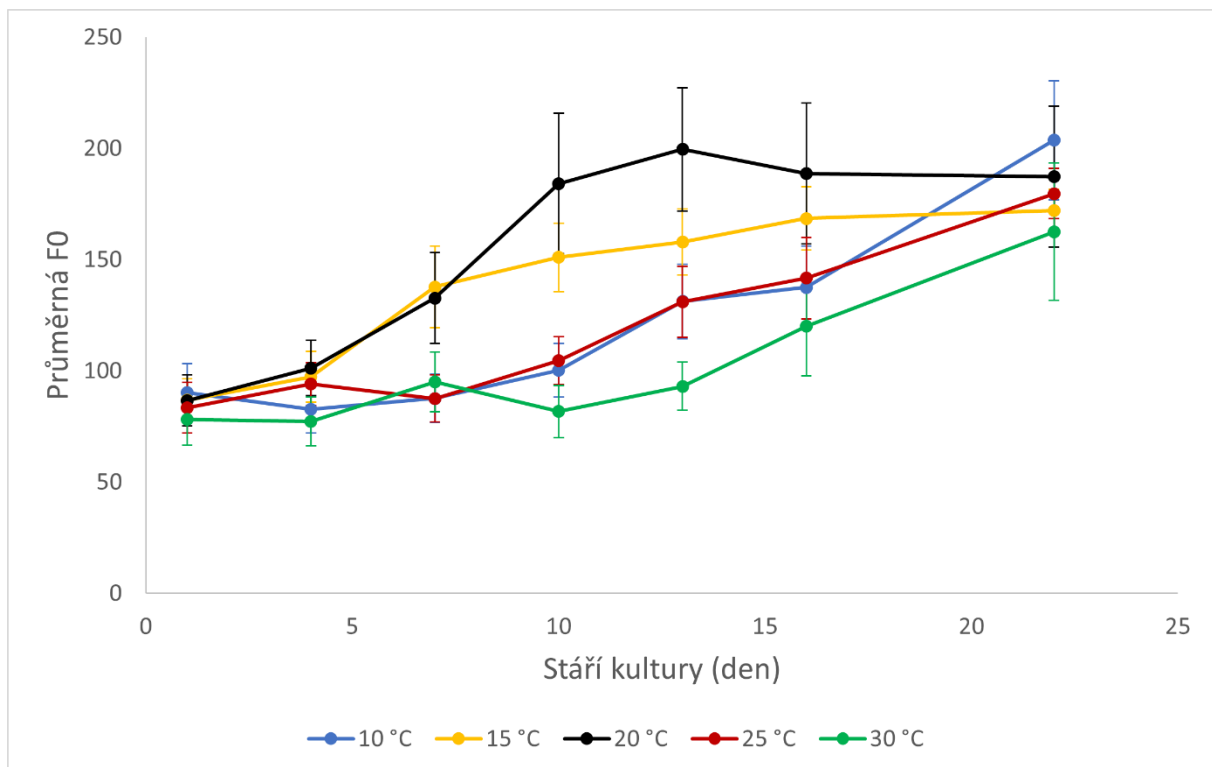


Obr. č. 10: Starší vegetativní buňky (kmen F) pozorované v TEM: **A** – buňka obsahující velký pyrenoid, jehož matrix je penetrována thylakoidy a viditelné mitochondrie; **B** – Autosporangium obsahující 4 autospory (tetrasporangium); **C** – buňka s mnoha lipidovými kapénkami, jádrem a jadérkem; **D** – detail pyrenoidu, jehož matrix je penetrována thylakoidy (označeno šipkami). BS – buněčná stěna; P – pyrenoid; S – škrobová zrna; LK – lipidové kapénky; N – jádro; Nu – jadérko; C – chloroplast; T – thylakoidy; M – mitochondrie.

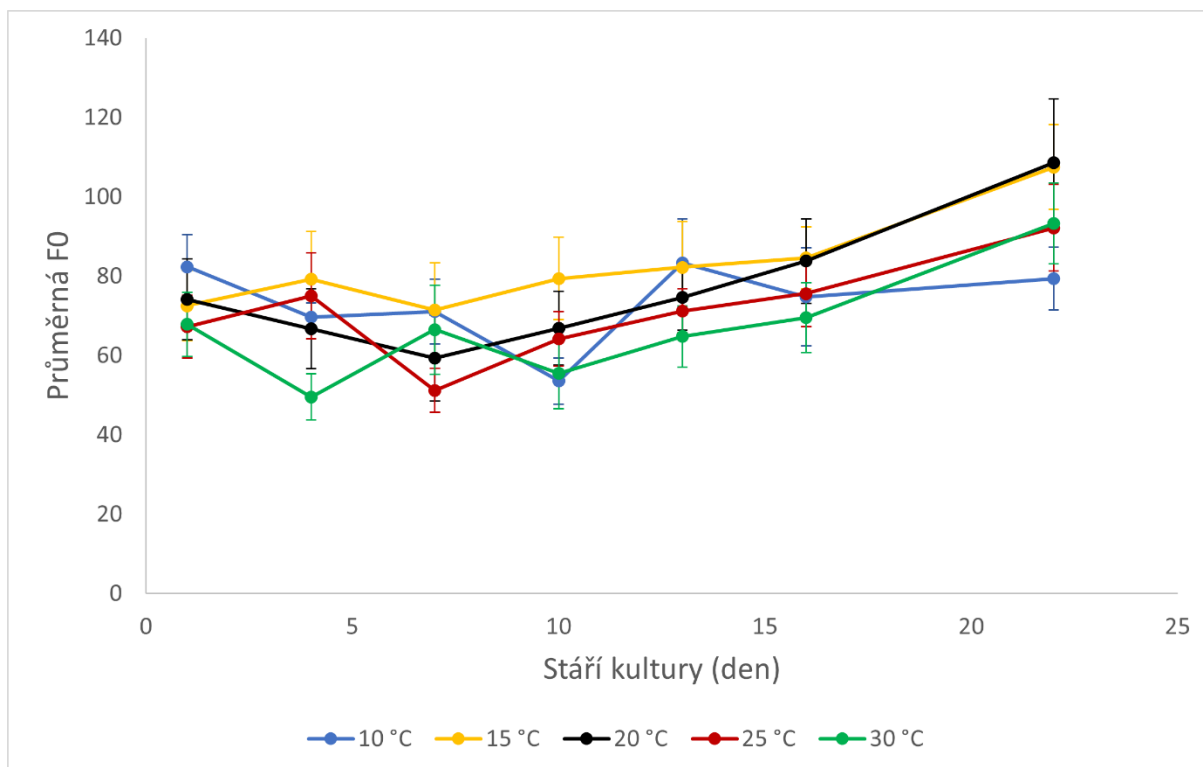
### 3.3. Pilotní teplotní pokus

Cílem bylo zjistit optimální teplotní podmínky pro kultivaci *Tetracystis pulchra* (kmen C), bylo tedy testováno 5 teplotních hladin (10, 15, 20, 25 a 30 °C). Pozornost byla věnována

nejen nárůstu biomasy, ale i tvorbě karotenoidů. Dále byl také zjišťován efekt typu média, BBM agar se projevil jako vhodnější médium, vzhledem k vyšší růstové rychlosti, ovšem jeho nevýhody v oblasti využití (nemožnost kultivace v multikultivátoru) převyšují jeho pozitivní přínos, bylo tedy rozhodnuto využít pro další experimenty tekuté BBM. Ze získaných hodnot růstových rychlostí (Tab. č. 7) byla nejvyšší hodnota (4,67) dosažena v tekutém BBM dosaženo při teplotě 20 °C. Pro zvolení optimální teploty byl brán v potaz i faktor zabarvení kultury, který potenciálně značil hromadění karotenoidů v buňkách. Kultury kultivované ve 25 °C se zdály být v této oblasti slibnější, byl tedy vytvořen kompromis. Ačkoliv tedy nejvyšší růstová rychlost byla zaznamenána při 20 °C, tak byla pro další postup zvolena teplota 22 °C, za účelem udržení dobré růstové rychlosti a potenciálně vyšší koncentrace karotenoidů.



Obr. č.11: Závislost velikosti průměrné  $F_0$  na čase. Jedná se o kultury pěstované na BBM agaru v odpovídající teplotě. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze tří naměřených hodnot.



Obr. č. 12: Závislost velikosti průměrné  $F_0$  na čase. Jedná se o kultury pěstované v tekutém BBM za odpovídající teploty. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze tří naměřených hodnot.

Jak je vidět na Obr. č. 11–12, exponenciální fáze růstu ve většině příkladů není příliš patrná, výjimkou by mohla být křivka získaná z dat vzorků kultivovaných ve 20 °C na BBM s agarem (Obr. č. 11) či křivka získaná z dat vzorků kultivovaných v 10 °C v tekutém BBM (Obr. č. 12). Výpočty růstové rychlosti však ukázaly ve všech případech jen minimální rozdíl mezi její hodnotou získanou zahrnutím celé doby trvání experimentu a její hodnotou získanou zahrnutím dat pouze z oblasti exponenciálního růstu. V Tab. č. 7 je tedy porovnávána průměrná hodnota růstové rychlosti z 22 dní, tj. celé doby trvání experimentu. Průměry získaných hodnot jsou vždy počítané s ohledem na teplotu kultivace a typ média, tedy z dat získaných měření fluorescence chlorofylu komůrek 1–3 a 4–6 v konkrétní teplotě.

Růstová rychlost		
Teplota kultivace [°C]	Tekuté BBM	BBM agar
10	4,36	5,30
15	4,66	5,14
20	4,67	5,21
25	4,51	5,18
30	4,52	5,06

Tab. č. 7: Průměrná růstová rychlost pro kultivaci v daných teplotách na BBM agaru a v tekutém BBM. Zeleně je označena nejvyšší zaznamenaná růstová rychlost kultury v tekutém BBM.

### 3.4. Experimenty navozující stresové podmínky

Tyto experimenty byly prováděny pouze na kmenu *T. pulchra* (kmen C). Od práce s kmenem F bylo z důvodů problematické kultivace v multikultivátoru a obtížné extrakce karotenoidů upuštěno.

#### 3.4.1. Vliv světelné intenzity a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů

Byl zjišťován vliv světelné intenzity (80, 200, 350 a 420  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) a obsahu dusíku v médiu (BBM médium bez dusíku vs. klasické BBM médium) na růst a hromadění karotenoidů u *T. pulchra* (kmen C). Již po zaočkování byl vidět výrazný rozdíl mezi kulturami v klasickém BBM a bezdusíkatém BBM médiu. Zatímco kultury s klasickým BBM tvořily homogenní hustou kulturu, tak kultury v bezdusíkatém BBM tvořily shluky buněk a usazovaly se na dně zkumavek či nad hladinou média v horní části zkumavek. Tento rozdíl byl s časem stále markantnější až do 13. dne kultivace, kdy hodnota optické denzity jedné kultury (označení L4, osvit 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) v bezdusíkatém BBM skokově převýšila ostatní. Tato událost je velmi dobře viditelná na Obr. č. 14. Ke změně zřejmě došlo mezi 10 a 13. dnem kultivace za konstantních podmínek. U této zkumavky (L4) byla při ukončení experimentu zaznamenána nejhustší biomasa ze všech přítomných vzorků.

Experiment ukázal, že kultury v klasickém BBM začínají měnit barvu, konkrétně z ostře zelené do nažloutlé zelené již po 7 dnech kultivace, což bylo také signálem pro ukončení kultivace biomasy a spuštění samotného experimentu. Došlo tedy ke změně intenzit světla z 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , na 80 pro L1 a L2, 350 pro L5 a L6 a 420  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pro L7 a L8. Zkumavky označené L3 a L4 byly dále beze změny kultivovány s intenzitou 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

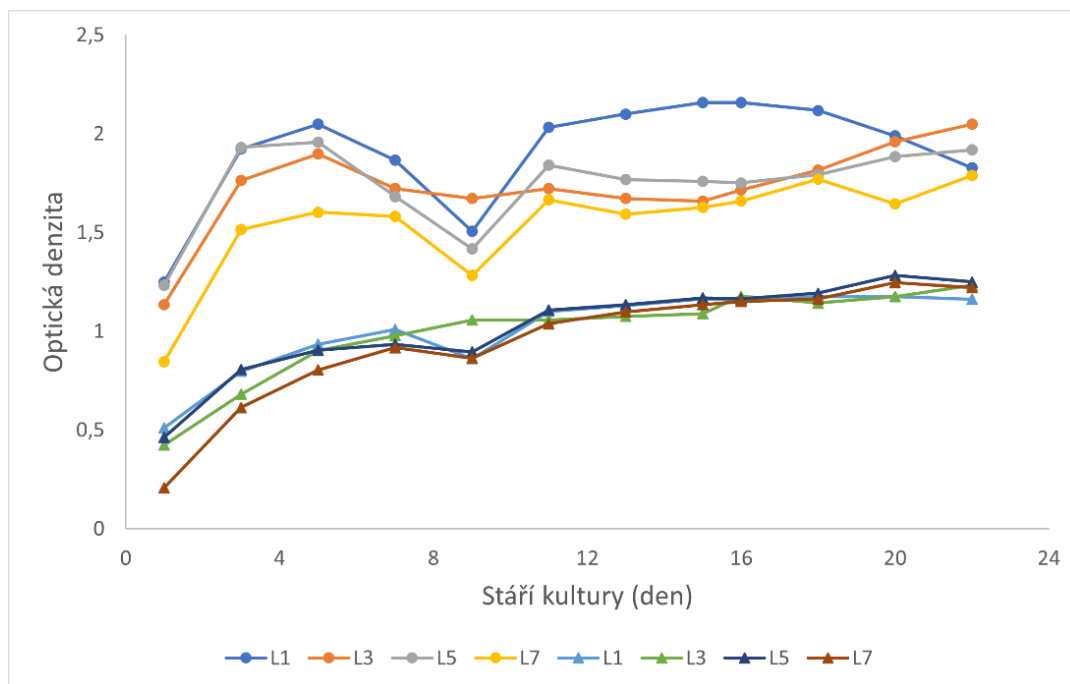


Jak je vidět na Obr. č. 13, změna podmínek způsobila v kulturách označených L1, L5 a L7 (kultivovaných v médiu s dusíkem) pokles optické denzity, který je markantnější při 680 nm, tedy došlo především k poklesu chlorofylu. Optická denzita naměřená při 720 nm, vypovídající o biomase kultury, také zaznamenala jistý pokles, ale zdaleka ne tak výrazný. Důvod, proč se tento efekt neprojevil u kultury L3 je ten, že pro tuto kulturu se nezměnila intenzita osvětlení, dále byla kultivována při intenzitě  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

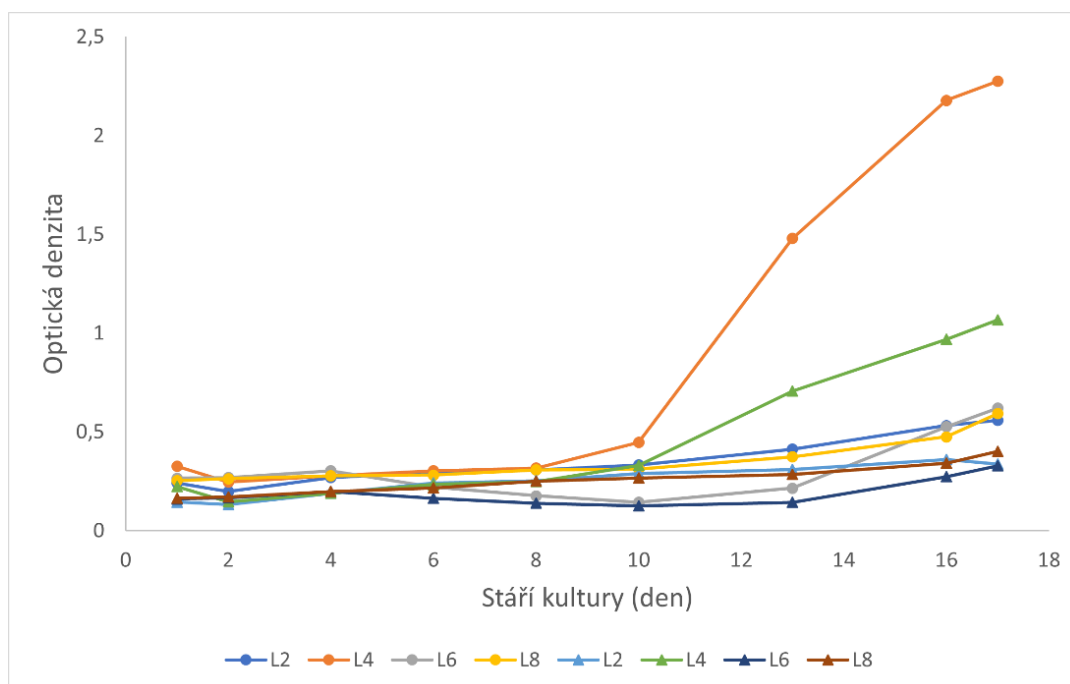
Na Obr. č. 14 lze vidět, že v kulturách kultivovaných v BBM bez dusíku nebyl pozorován pokles optické denzity. Ovšem zde byly hodnoty po celou dobu trvání experimentu (až na L4) velmi nízké, efekt se tedy nemusel v takto nízkých hodnotách projevit.

V den ukončení experimentu byly kultury pěstované v klasické BBM s obsahem dusíku výrazně hustší a celkem 3 byly sytě oranžové, konkrétně ty s osvětlením 200, 350 a  $420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Na rozdíl od nich kultury v BBM bez dusíku byly všechny až na jednu zelené, jediná, která byla slabě oranžová, byla zkumavka s osvětlením  $420 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Také kultury v bezdusíkatém BBM médiu, kromě L4, nevytvořily zdaleka tak velké množství biomasy. Tento fakt je zřejmý i při porovnávání Obr. č. 13 a 14, kdy optická denzita dosáhla u kultur v klasickém BBM v den ukončení experimentu i dvojnásobných hodnot. Například kultura označená L1 dosáhla hodnoty 1,827 (OD při 680 nm), tedy více než dvojnásobek kultury L2, která dosáhla pouhých 0,558 (OD při 680 nm). Obě kultury byly kultivované pod stejnou intenzitou osvětlení ( $80 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ).

Z pozorování Obr. č. 13 a 14 lze vyvodit, že ve výsledku intenzita světla neměla na růst buněk, tedy na množství chlorofylu a celkovou biomasu, příliš velký vliv, bylo totiž dosahováno velmi podobných hodnot. Jako zásadní se zde projevil obsah dusíku, kdy obecně kultury v BBM s obsahem dusíku dosahovali výrazně vyšších hodnot optické denzity, ergo vyšších hodnot biomasy.



Obr. č. 13: Znáznornění hustoty kultury vyjádřené jako OD (optickou denzita) v závislosti na stáří kultury. Jedná se o kultury pěstované v klasickém BBM s obsahem dusíku. Kolečka značí OD měřenou při vlnové délce 680 nm (proxy pro koncentraci chlorofylu), trojúhelníky OD při 720 nm (proxy pro odhad biomasy).



Obr. č. 14: Znáznornění hustoty kultury vyjádřené jako OD (optickou denzita) v závislosti na stáří kultury. Jedná se o kultury pěstované v BBM bez obsahu dusíku. Kolečka značí OD měřenou při vlnové délce 680 nm (proxy pro koncentraci chlorofylu), trojúhelníky OD při 720 nm (proxy pro odhad biomasy).

Dle získaných dat ze stanovení celkového obsahu karotenoidů podle Lichtenthalera bylo rozhodnuto, které vzorky budou podrobeny HPLC analýze a bude tak zjištěno jaké konkrétní látky a v jakém množství vzorky obsahují.

Nejvyšší obsah karotenoidů byl zaznamenán u vzorku L5, tedy vzorku kultivovanému v klasickém BBM médiu s intenzitou osvětlení  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Naopak nejnižší koncentraci karotenoidů měl vzorek L6 kultivovaný v BBM bez dusíku také s intenzitou osvětlení  $350 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Zde tedy efekt intenzity světla nebyl zcela jasný.

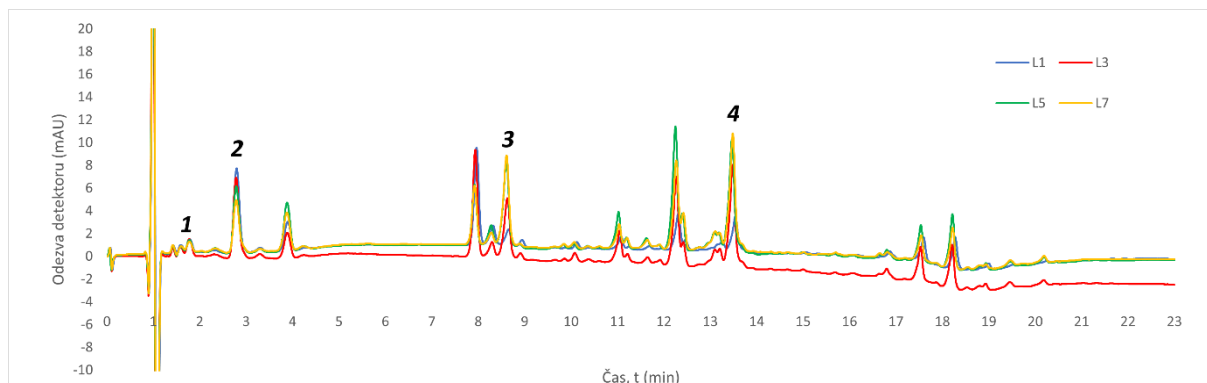
Vzhledem k relativně vysokým koncentracím karotenoidů ( $>2,000 \text{ mg/l}$ ) ve většině vzorků byly dále analyzovány všechny vzorky s výjimkou vzorku L6. Již z této prvotní analýzy bylo dobře čitelné, jak je znázorněno v Tab. č. 8, že vzorky kultivované v klasickém BBM (L1,3,5,7) obsahují větší množství karotenoidů než vzorky kultivované v bezdusíkatém BBM médiu (L2,4,6,8).

Název vzorku	Celkové množství karotenoidů [mg/l]
L1	4,266
L3	5,184
L5	5,264
L7	5,220
L2	3,033
L4	2,486
L6	1,777
L8	3,742

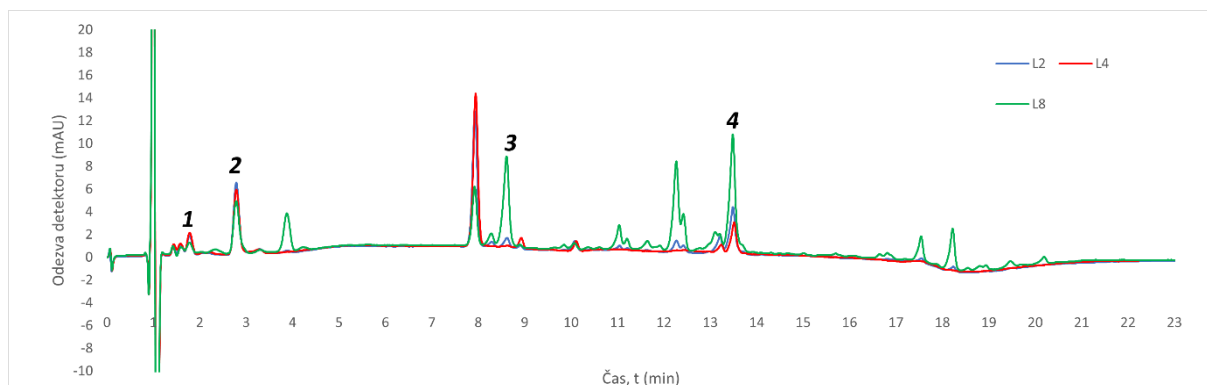
Tab. č. 8: Celkové množství karotenoidů ve vzorcích, stanoveno podle Lichtenthaler and Buschmann, (2001). Vzorky L1,3,5,7 byly kultivované v klasickém BBM s obsahem dusíku a vzorky L2,4,6,8 byly kultivované v BBM bez obsahu dusíku. Zeleně je vyznačena nejvyšší hodnota celkového množství karotenoidů a červeně je označena nejnižší získaná hodnota.

Pro identifikaci jednotlivých zastoupených karotenoidů a zjištění jejich koncentrace ve vzorcích byla optimalizována metoda Liu *et al.*, (2010) využívající HPLC analýzu. I přes optimalizaci metody nebylo však možné některé píky jednotlivých karotenoidů rozlišit. Nejvíce problematická byla kombinace izomerů zeaxanthinu a luteinu, kterou se nepodařilo v průběhu optimalizace rozseparovat, není tedy jasné, v jaké koncentraci jsou tyto dva karotenoidy ve vzorcích obsaženy samostatně. Na chromatogramu také částečně splývaly píky violaxanthinu a neoxanthinu, ty však bylo možné v nízkých koncentracích postačujících pro vyhodnocení jejich obsahů ve vzorcích rozlišit. Oba tyto jevy lze pozorovat na Obr. č. 15 a 16, které také dávají dobrou představu o rozdílech mezi jednotlivými vzorky v oblasti zastoupení karotenoidů. Ač na Obr. č. 15 jsou získané chromatogramy velmi podobné,

z Obr. č. 16 je patrné, že mezi L2, L4 a L8 jsou rozdíly v koncentracích jednotlivých karotenoidů, především echinenonu a  $\beta$ -karotenu.



Obr. č. 15: Porovnání chromatogramů vzorků L1,3,5,7, tedy vzorků kultivovaných v klasickém BBM médiu s obsahem dusíku s různou intenzitou ozáření. 1 – violaxanthin + neoxanthin; 2 – zeaxanthin + lutein; 3 – echinenon; 4 -  $\beta$ -karoten



Obr. č. 16: Porovnání chromatogramů vzorků L2,4,8, tedy vzorků kultivovaných v BBM médiu bez dusíku s různou intenzitou ozáření. 1 – violaxanthin + neoxanthin; 2 – zeaxanthin + lutein; 3 – echinenon; 4 -  $\beta$ -karoten

Z dat získaných HPLC analýzou byl vypočítán obsah jednotlivých identifikovaných karotenoidů ve všech vzorcích. V největším množství se ve vzorcích vyskytoval  $\beta$ -karoten a poté také kombinace luteinu a zeaxanthinu, jak je možné pozorovat v Tab. č. 9, kde jsou jejich hodnoty vyznačeny zeleně. Vzhledem k tomu, že se izomery lutein a zeaxanthin nepodařilo rozseparovat, není tedy známa jejich samostatná koncentrace, není jejich součet považován za nejvíce zastoupený karotenoid. Naopak v nejnižších koncentracích byl ve vzorcích zaznamenán neoxanthin, jež je v Tab. č. 9 označen červeně.

Název vzorku	Neoxanthin [µg/g]	Violaxanthin [µg/g]	Lutein + zeaxanthin [µg/g]	Echinenon [µg/g]	β-karoten [µg/g]
L1	4,104	4,270	50,296	3,845	26,083
L3	1,147	1,115	13,852	4,243	20,938
L5	0,770	0,914	9,630	5,145	20,656
L7	1,005	0,871	9,440	6,587	26,645
L2	3,001	4,072	27,439	1,471	22,520
L4	3,784	7,560	37,330	0,375	23,502
L8	2,263	3,629	26,393	2,770	30,633

Tab. č. 9: Získané hodnoty jednotlivých karotenoidů identifikovaných ve vzorcích. Vzorky L1,3,5,7 byly kultivované v klasickém BBM s obsahem dusíku a vzorky L2,4,8 byly kultivované v BBM bez obsahu dusíku. Zeleně jsou označeny nejvyšší získané hodnoty karotenoidů a červeně nejnižší získaná hodnota.

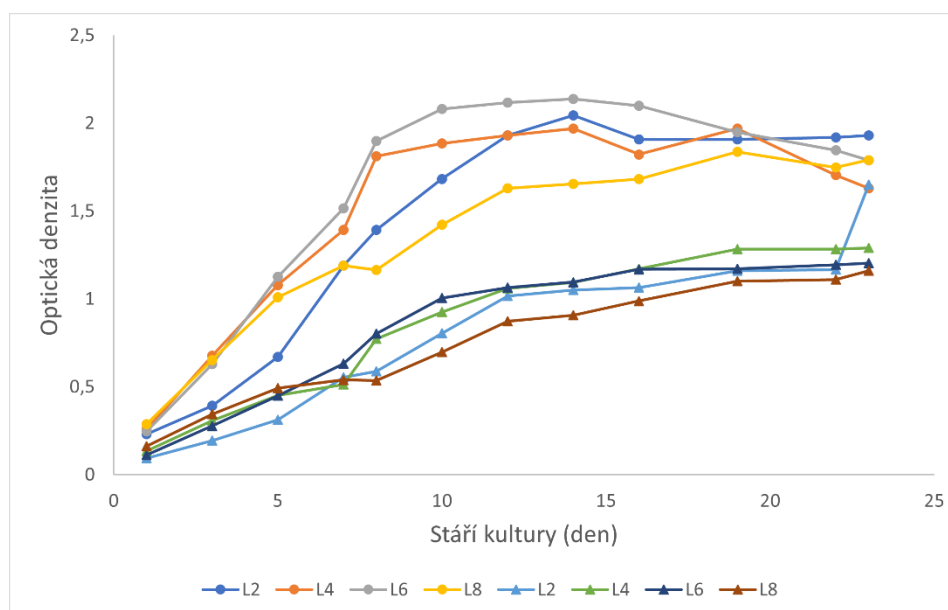
Nejvyššího celkového množství karotenoidů (5,264 mg/l) bylo dosaženo ve vzorku L5, který byl kultivován v médiu s obsahem dusíku při intenzitě osvitů 350 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> (Tab. č. 8). Dále bylo zjištěno, že v nejvyšší míře je v řase *T. pulchra* zastoupen karotenoid β-karoten, konkrétně nejvyšší vypočítaný obsah (30,633 µg/g) byl zaznamenán ve vzorku L8, jehož kultivace probíhala v bezdusíkatém médiu při intenzitě osvitů 400 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Kombinace luteinu a zeaxanthinu se také v řase vyskytovala ve zvýšené míře, nejvíce (50,296 µg/g) bylo zaznamenáno ve vzorku L1, kultivovanému v dusíkatém médiu s osvitěm 80 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup>. Tyto výsledky nevedly k jednotnému závěru ohledně vlivu intenzity osvitů a obsahu dusíku v médiu na obsah karotenoidů, dále jsou tedy výsledky rozebrány v diskuzi.

### 3.4.2. Dvoufázová kultivace

Byl zjišťován efekt využití metody dvoufázové kultivace, kdy byla po 14 dnech růstové fáze řas nárazově změněna intenzita osvitů z optimálních 200 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> na 900 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> pro zkumavky L2, L4 a na 640 µmol m<sup>-2</sup> s<sup>-1</sup> pro zkumavky L6, L8. Po zaočkování byl pozorován lineární nárůst biomasy a již po několika dnech obsahovaly zkumavky relativně hustou zelenou kulturu. Ve dvou zkumavkách (L4 a L6) byla kultura zcela homogenní a nevyžadovala mechanické míchání před měřením optické denzity, ve zbylých dvou (L2 a L8) docházelo k občasnému shlukování buněk na dnech zkumavek. Ve všech případech docházelo k hromadění buněk v horní části zkumavek nad hladinou média, kde buňky tvořily řasové nárosty. Tyto buňky byly pravidelně splachovány zpět do zkumavek.

Jak lze vidět na Obr. č. 17, růstová rychlost přestala u všech kultur stoupat 14. den od zahájení experimentu, což bylo signálem pro změnu intenzity osvitů. Změna osvitů (z  $200 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  na  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pro L2, L4 a  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  pro L6, L8) se na růstové rychlosti nijak zásadně neprojevila, pouze byl zaznamenán lehký pokles hodnot OD při 680 nm (proxy pro odhad množství chlorofylu) v kulturách označených L2 a L4. To může být vysvětleno tím, že dané kultury byly vystavené vyššímu ozáření než kultury označené L6 a L8. Na celkové biomase (podle OD při 720 nm) se změna osvitů neprojevila.

Po změně osvětlení bylo možné u zkumavek L2 a L4 s vyšší intenzitou osvitů ( $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) zaznamenat změnu barvy již po dvou dnech, tedy 16. den od začátku experimentu. U zkumavek L6 a L8 s nižší intenzitou ( $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) byla změna barvy zaznamenána až po 5 dnech, tedy 19. den od zahájení experimentu. Při sklizení biomasy byly zkumavky s vyšším osvitěním (L2, L4) výrazně červeno-oranžové, zatímco zkumavky s nižším osvitěním (L6, L8) jen žluté.



Obr. č. 17: Znárodnění hustoty kultury vyjádřené jako OD (optickou denzita) v závislosti na stáří kultury. Jedná se o kultury pěstované ve dvou fázích (14denní nárůst biomasy a následné vysoké osvětlení) v klasickém BBM. Kultury L2 a L4 byly po změně osvitů vystaveny intenzitě osvitů  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a kultury L6 a L8 byly po změně osvitů vystaveny intenzitě osvitů  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Kolečka značí OD měřenou při vlnové délce 680 nm (proxy pro koncentraci chlorofylu), trojúhelníky OD při 720 nm (proxy pro odhad biomasy).

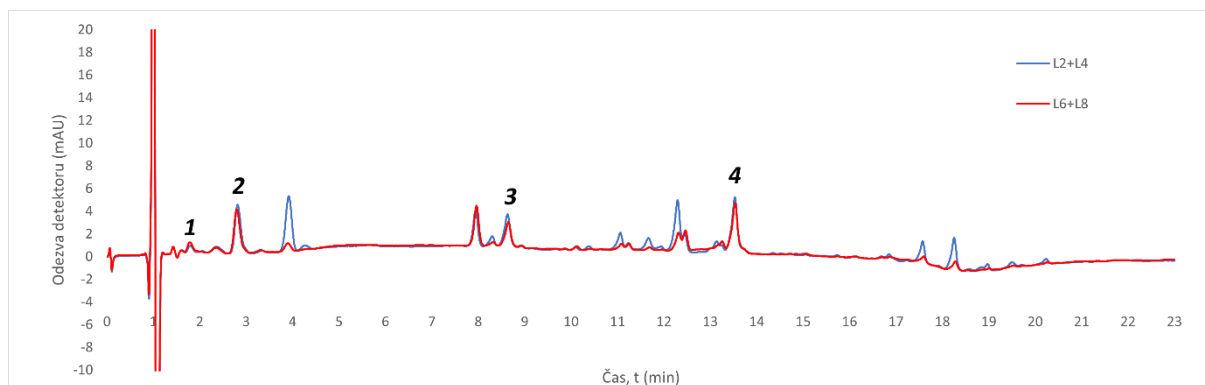
Dvoufázová kultivace se prokázala být vhodnou metodou pro nárůst biomasy, jak lze vyčíst z Obr. č. 17, hodnoty OD při 680 nm se pohybují v průměru okolo 1, 951 (v den změny osvitů). V den ukončení experimentu byly kultury označené L2 a L4 výrazně zabarvené do oranžova a kultury L6 a L8 do žluta, byl tedy předpokládán obsah karotenoidů.

Celkový obsah karotenoidů byl stanoven podle Lichtenthalera. Ukázalo se, že všechny vzorky z dvoufázové kultivace jsou vhodnými kandidáty na HPLC analýzu, jelikož všechny obsahují relativně vysoké množství karotenoidů ( $>2,500 \text{ mg/l}$ ). Nejvyšší obsah karotenoidů byl zaznamenán u vzorku L4, jež byl po změně osvitů vystaven intenzitě záření  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Naopak nejnižší obsah karotenoidů měl vzorek L6, jež byl po změně osvitů vystaven intenzitě  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Z výsledků bylo patrné, že kultury vystavené vyššímu osvitu ( $90 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) obsahují v průměru větší celkové množství karotenoidů, jak se dá vyčíst z Tab. č. 10. Pro snížení chybovosti a nákladů byly pro účely další analýzy spojeny vzorky L2 a L4 (osvit  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) a vzorky L6 a L8 (osvit  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ).

Název vzorku	Celkové množství karotenoidů [mg/l]
L2	3,176
L4	5,668
L6	2,938
L8	3,699

Tab. č. 10: Celkové množství karotenoidů ve vzorcích podle Lichtenthaler and Buschmann, (2001). Vzorky L2 a L4 byly kultivované s intenzitou osvitů  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$  a vzorky L6 a L8 s intenzitou osvitů  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Zeleně je vyznačena nejvyšší hodnota celkového množství karotenoidů a červeně je označena nejnižší získaná hodnota.

Jednotlivé karotenoidy byly identifikovány a jejich koncentrace spočítána pomocí modifikované metody Liu *et al.*, (2010) za využití HPLC analýzy. Bohužel stále přetrvával problém separace zeaxanthinu a luteinu. Tyto izomery tedy nadále zůstávají nerozseparované, není tedy známa jejich samostatná koncentrace ve vzorcích. Píky neoxanthinu a luteinu opět částečně splývaly, bylo však možné je pro vyhodnocení jejich obsahu ve vzorcích rozlišit. Na Obr. č. 18 lze pozorovat, že chromatogramy se od sebe v oblastech identifikovaných píků příliš neliší. Viditelné rozdíly mezi chromatogramy leží mimo identifikované oblasti, jsou však poměrně výrazné.



Obr. č. 18: Porovnání chromatogramů vzorků L2 + L4 a L6 + L8, tedy vzorků podrobených dvoufázové kultivaci. Vzorky L2+L4 byly po změně osvitů vystaveny intenzitě  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a vzorky L6+L8 intenzitě  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . 1 – violaxanthin + neoxanthin; 2 - zeaxanthin + lutein; 3 – echinenon; 4 -  $\beta$ -karoten

Výsledky získané pomocí HPLC analýzy ukázaly, že nejzastoupenějším karotenoidem v obou vzorcích byl  $\beta$ -karoten. Nejvyšší koncentraci měl  $\beta$ -karoten ve vzorku L2+L4, jak je možné vidět v Tab. č. 11, kde je jeho hodnota vyznačená zeleně. Oproti tomu karotenoid s nejnižší koncentrací byl pro každý vzorek jiný, pro vzorek L2 + L4 to byl violaxanthin a pro vzorek L6 + L8 neoxanthin, nejnižší koncentrace byla pak zaznamenána u neoxanthinu, což je v Tab. č. 11 označeno červeně.

Název vzorku	Neoxanthin [ $\mu\text{g/g}$ ]	Violaxanthin [ $\mu\text{g/g}$ ]	Lutein + zeaxanthin [ $\mu\text{g/g}$ ]	Echinenon [ $\mu\text{g/g}$ ]	$\beta$ -karoten [ $\mu\text{g/g}$ ]
L2 + L4	1,139	0,916	13, 272	3,650	19,418
L6 + L8	0,879	2,478	12, 793	3,174	18,554

Tab. č. 11: Získané hodnoty jednotlivých karotenoidů identifikovaných ve vzorcích. Vzorek L2 + L4 byl kultivován s intenzitou osvitů  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  a vzorek L6 + L8 byl kultivován s intenzitou osvitů  $640 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Zeleně je označena nejvyšší získaná hodnota karotenoidu a červeně nejnižší získaná hodnota.

Nejvyšší hodnota celkového množství karotenoidů ( $5,668 \text{ mg/l}$ ) byla zaznamenána ve vzorku L4, tedy vzorku vystavenému po změně osvitů intenzitě světla  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Tab. č. 10). Také bylo znovu potvrzeno, že v nejvyšší koncentraci ze všech identifikovaných karotenoidů se v řase *T. pulchra* vyskytuje  $\beta$ -karoten, konkrétně ve vzorku L2+L4 s vypočítaným obsahem  $19,418 \mu\text{g/g}$ . Vzorek L2+L4 byl kombinací dvou vzorků vystavených intenzitě osvitů  $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Z těchto výsledků se tedy dá vyvodit, že vyšší intenzita osvitů při dvoufázové kultivaci vede k většímu celkovému množství karotenoidů i k navýšení koncentrace jednotlivých identifikovaných karotenoidů, především  $\beta$ -karotenu, více je tato úvaha rozvedena v diskuzi.



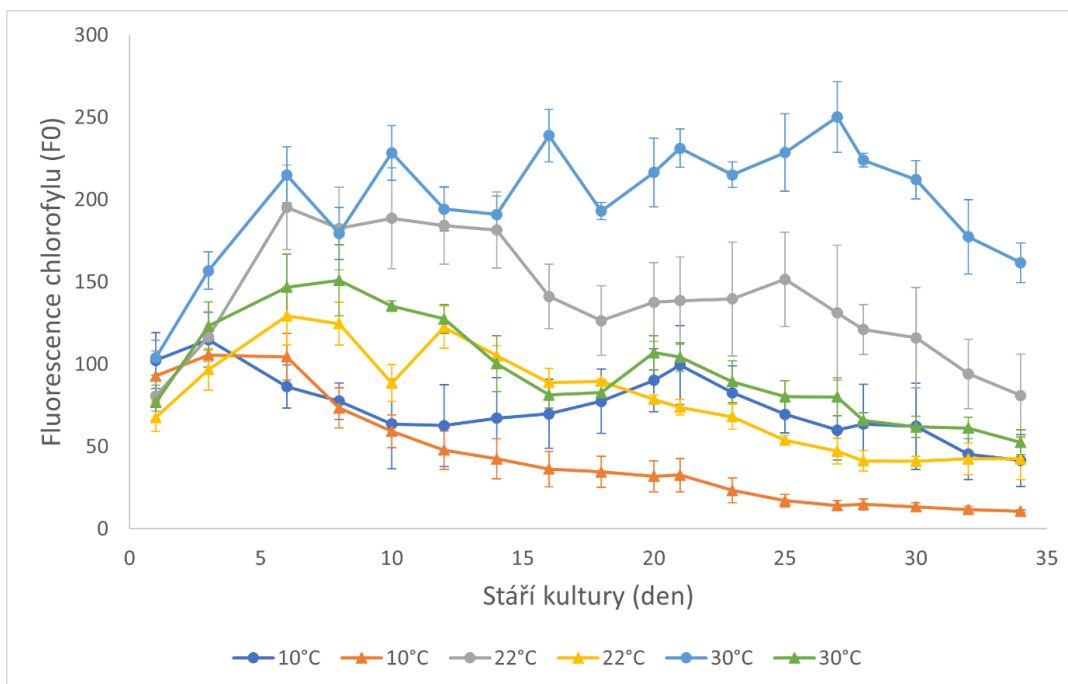
### 3.4.3. Vliv teploty, UVA a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů

V tomto experimentu byl zjišťován efekt teplotního gradientu v kombinaci s UVA zářením a obsahem dusíku v médiu (BBM médium bez dusíku vs. klasické BBM médium) na růst a hromadění karotenoidů u *T. pulchra* (kmen C). Z výsledků teplotního pokusu byly vybrány 3 teploty pro využití ve zkříženém gradientu teploty, UVA záření a obsahu dusíku. Konkrétně byla zvolena teplota minimální (10 °C), maximální (30 °C) a optimální (22 °C). Po 15 dnech kultivace bylo nutné doplnit do komůrek s kulturami pěstovanými ve 22 a 30 °C odpovídající médium. Experiment byl souběžně s experimentální skupinou vzorků (vystavených UVA záření) prováděn se skupinou vzorků sloužících jako kontrola, které nebyly vystaveny UVA záření.

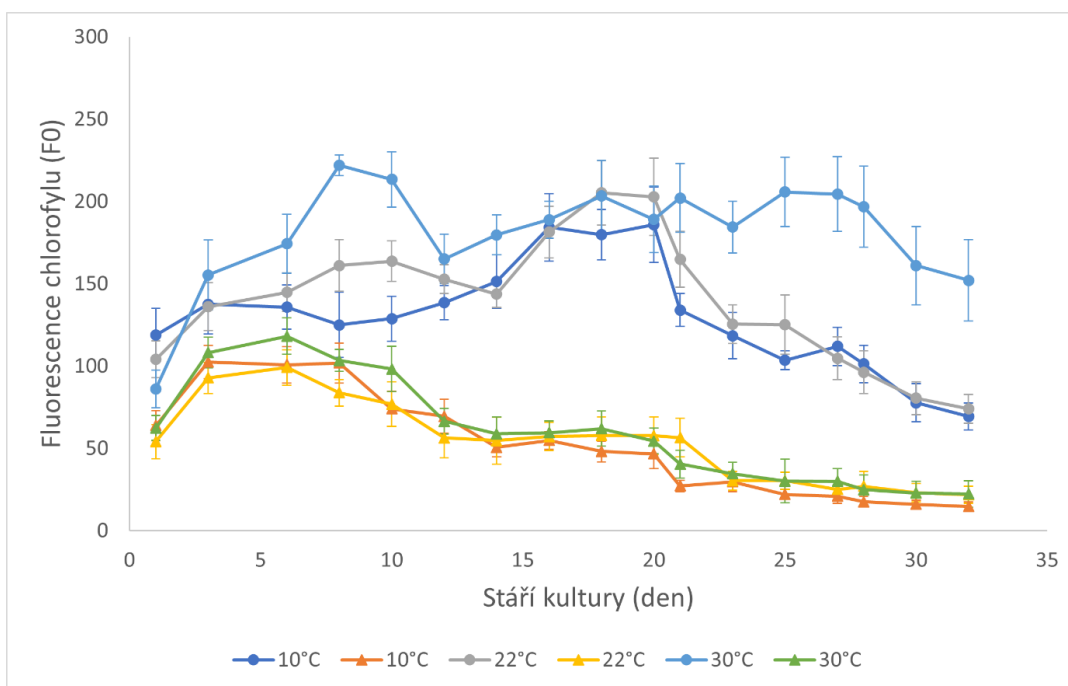
Po zaočkování byl očividný rozdíl mezi kulturami v klasickém BBM a BBM bez dusíku. Stejně jako v předchozích experimentech kultury v bezdusíkatém BBM tvořily shluky, zatímco kultury v klasickém BBM byly homogenní. Buňky v obou případech klesaly na dno komůrek, kde zůstávaly do doby, než byly mechanickými otřesy při otočení či měření promíchány.

Dusíkaté médium vedlo v obou případech (kontrola i UVA ozařované vzorky) k vyšší produkci biomasy, jak lze vypočítat z Obr. č. 19, 20 dle hodnoty  $F_0$ . U kontrolní skupiny byl rozdíl v biomase mezi kulturami v klasickém BBM a bezdusíkatém BBM výraznější než u skupiny vzorků ozařovaných UVA. Zdá se, že u vzorků vystavených UVA záření se více projevil efekt teploty (Obr. č. 19). V den ukončení experimentu nejvyšší biomasu, odhadnutou dle hodnoty  $F_0$  vykazovaly kultury v dusíkatém médiu kultivované ve 30 °C, a to jak kontrolní, tak ozařované. U vzorků vystavených UVA byla tato hodnota 161,70 (průměr z hodnot tří vzorků) a u kontrolních vzorků 152,05 (průměr z hodnot tří vzorků). Vzorky ozařované UVA, kultivované při 30 °C v klasickém BBM tedy v den ukončení experimentu vykazovaly nejvyšší zaznamenanou fluorescenci chlorofylu ( $F_0$ ).

Kultury *T. pulchra* v bezdusíkatém BBM médiu začaly o dva dny dříve projevovat známky tvorby karotenoidů. První oranžově zbarvené kultury se objevily v UVA ozařované destičce kultivované ve 22 °C, a to v klasickém i bezdusíkatém BBM, cca po 10 dnech od začátku experimentu. Tuto vlastnost projevily téměř všechny zbylé kultury během následujících 4 dnů. Jen kultury ozařované UVA v obou typech médií při 10 °C nejevily známky tvorby a akumulace karotenoidů, což se do konce experimentu nezměnilo. Na konci experimentu byly opticky „nejčervenější“ kultury ozařované UVA kultivované v dusíkatém médiu ve 22 °C.



Obr. č. 19: Závislost fluorescence chlorofylu ( $F_0$ ) na stáří kultury. Jedná se o kultury kultivované pod UVA zářením. Kolečka značí kultury v dusíkatém a trojúhelníky v bezdusíkatém médiu. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze tří naměřených hodnot.



Obr. č. 20: Graf se závislostí fluorescence chlorofylu ( $F_0$ ) na stáří kultury. Zde je vyobrazena kontrolní skupina kultur. Kolečka značí kultury v dusíkatém a trojúhelníky v bezdusíkatém médiu. Zobrazeny jsou průměry se směrodatnými odchylkami ze tří naměřených hodnot.

Vzhledem k malým množstvím výsledné biomasy, jelikož byly řasy kultivované v 5 ml média, byly pro potřeby analýzy spojeny vždy trojice vzorků sdílející stejné kultivační podmínky (komůrky 1–3 a 4–6).

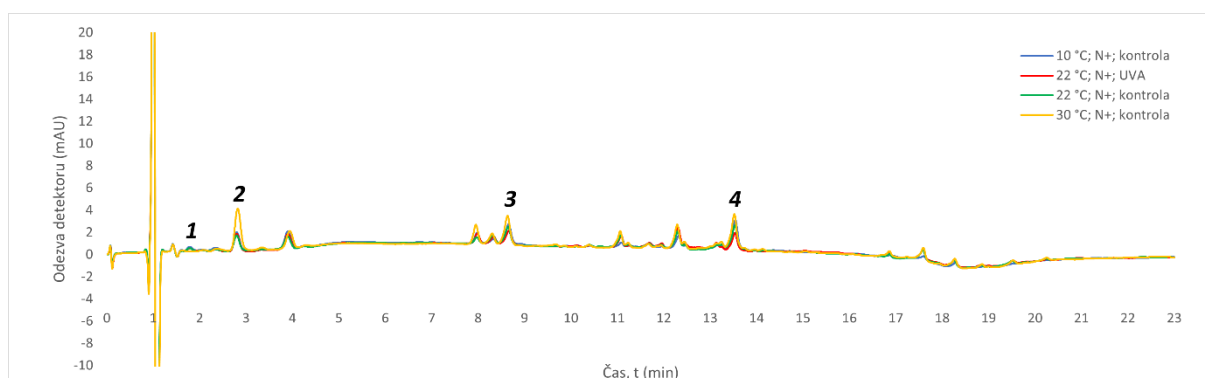
Stanovení celkového množství karotenoidů podle Lichtenthalera ukázalo, že výtěžnost ve většině vzorcích je natolik nízká, že provádět HPLC analýzu není vhodné. Byly vybrány pouze 4 vzorky (Tab. č. 12), které vykazovaly potenciál (celkové množství karotenoidů >2000 mg/l). Jednalo se o 3 kontrolní vzorky nevystavené UVA a 1 experimentální vzorek vystavený UVA. Z každé hladiny teploty (10, 22 a 30 °C) byl vybrán alespoň jeden vzorek pro další analýzu. Všechny tyto dále analyzované vzorky byly ty, které byly kultivované v klasickém BBM s obsahem dusíku.

Nejvyšší koncentrace karotenoidů dosáhl vzorek řas kultivovaných ve vyšší teplotě (30 °C) v klasickém BBM médiu bez UVA ozařování. Nejnižší obsah karotenoidů měl vzorek vystavený nižší teplotě (10 °C), kultivovaný v bezdusíkatém BBM médiu pod UVA ozařováním. Z těchto výsledků vyplývá, že UVA ozařování a limitace dusíkem zřejmě nejsou vhodný stresový faktor pro navýšení celkového obsahu karotenoidů. Efekt teploty nebyl zcela zřejmý.

<b>Popis kultivačních podmínek vzorku</b>	<b>Celkové množství karotenoidů [mg/l]</b>	<b>HPLC analýza</b>
10 °C; N+; UVA	0,925	NE
10 °C; N0; UVA	0,390	NE
10 °C; N+; kontrola	2,059	ANO
10 °C; N0; kontrola	0,982	NE
22 °C; N+; UVA	2,33	ANO
22 °C; N0; UVA	1,278	NE
22 °C; N+; kontrola	2,358	ANO
22 °C; N0; kontrola	1,478	NE
30 °C; N+; UVA	1,764	NE
30 °C; N0; UVA	1,260	NE
30 °C; N+; kontrola	3,645	ANO
30 °C; N0; kontrola	1,281	NE

Tab. č. 12: Celkové množství karotenoidů ve vzorcích, stanoveno podle Lichtenthaler and Buschmann, (2001). Vzhledem k několika křížícím se testovaným hodnotám byly vzorky označeny dle jejich podmínek kultivace (teplota kultivace, přítomnost dusíku v médiu, ozařování UVA). V tabulce je uvedeno také, zda je vzorek vhodný pro HPLC analýzu. Zeleně je vyznačena nejvyšší hodnota celkového množství karotenoidů a červeně je označena nejnižší získaná hodnota.

Za pomoci HPLC analýzy dle metody Liu *et al.*, (2010) byly jednotlivé karotenoidy ve vzorcích identifikovány a bylo zjištěno jejich zastoupení. Jako v předchozích případech nebylo dosaženo separace zeaxanthinu a luteinu, nadále tedy není známa jejich samostatná koncentrace ve vzorcích. Na chromatogramu také částečně splývají píky violaxanthinu a neoxanthinu, ty se však podařilo rozlišit a díky tomu byly zjištěny i jejich samostatné koncentrace. Na Obr. č. 21 je možné pozorovat určité rozdíly mezi chromatogramy vzorků, nejvýraznější rozdíly jsou ve výškách píku neoxanthinu a violaxanthinu a píku zeaxanthinu a luteinu.



Obr. č. 21: Porovnání chromatogramů vzorků z experimentu kombinujícího několik stresových faktorů (dusíkové hladovění, teplota, UVA). 1 – violaxanthin + neoxanthin; 2 - zeaxanthin + lutein; 3 – echinenon; 4 -  $\beta$ -karoten

Za pomoci HPLC byly vypočítány koncentrace identifikovaných karotenoidů ve vzorcích. Z Tab. č. 13 lze vyčíst, že v nejvyšších koncentracích byl ve vzorcích zastoupen  $\beta$ -karoten (označen zeleně), naopak v nejmenším zastoupení se ve vzorcích vyskytoval violaxanthin (označen červeně).

Kultivační podmínky vzorku	Neoxanthin [µg/g]	Violaxanthin [µg/g]	Lutein + zeaxanthin [µg/g]	Echinenon [µg/g]	β-karoten [µg/g]
10 °C; N+; kontrola	0,842	0,624	5,562	2,771	12,262
22 °C; N+; UVA	1,849	0,722	9,822	3,022	12,996
22 °C; N+; kontrola	1,077	0,920	8,449	3,933	17,017
30 °C; N+; kontrola	1,555	0	17,890	5,310	19,915

Tab. č. 13: Získané hodnoty jednotlivých karotenoidů identifikovaných ve vzorcích. Vzhledem k několika křížícím se testovaným hodnotám byly vzorky označeny dle jejich podmínek kultivace (teplota kultivace, přítomnost dusíku, ozařování UVA).

Nejvyšší celkové množství karotenoidů (3,645 mg/l) bylo zaznamenáno ve vzorku řas *T. pulchra* kultivovaném při teplotě 30 °C v klasickém BBM bez UVA ozařování (Tab. č. 12). Také bylo potvrzeno, že nejvíce zastoupeným karotenoidem v *T. pulchra* je β-karoten, jehož nejvyšší hodnota v tomto experimentu dosáhla 19,915 µg/g, a to ve vzorku kultivovaném při teplotě 30 °C v klasickém BBM bez UVA ozařování. Tato zjištění vedou k závěru, že vyšší teplota (30 °C) je vhodným stresovým faktorem pro navýšení obsahu karotenoidů. Limitace dusíkem se zde ukázala jako nevhodná metoda pro navýšení karotenoidů v buňce, stejně jako ozařování UVA. Dopodrobna je vliv těchto stresových faktorů a jejich kombinací na *T. pulchra* probrán v diskuzi.

## 4. Diskuze

### 4.1. Shrnutí a porovnání výsledků

Nejvíce zastoupený karotenoid ve všech vzorcích *Tetracystis pulchra* (kmen C) byl β-karoten (až 30,633 µg/g sušiny), naopak karotenoidy obsažené ve vzorcích v nízkých koncentracích byly neoxanthin (0,770 – 4,104 µg/g) a violaxanthin (0–7,560 µg/g). Obsah těchto dvou karotenoidů byl zřejmě závislý na různých stresových faktorech aplikovaných na kultury, protože nesledoval jednotný trend. Problematické je porovnání obsahu luteinu a zeaxanthinu s ostatními identifikovanými karotenoidy, protože jejich píky nebyly rozlišené. To je pravděpodobně způsobeno skutečností, že se jedná o izomery a jejich separace bývá obtížná (Britton *et al.*, 2004). Nedá se tedy určit, jakou koncentraci by v buňce měly tyto látky

samostatně, ovšem jako dvojice dohromady dosáhly nejvyšší naměřené hodnoty karotenoidů v buňce ze všech testovaných vzorků, a to 50,296  $\mu\text{g/g}$ . Již z těchto údajů lze vyčíst, že zjištěné koncentrace těchto karotenoidů nejsou příliš vysoké, respektive se pohybují o tři řády níže, než je udáván obsah specifických karotenoidů ve známých mikroskopických řasách. Například *Dunaliella salina* obsahuje  $\beta$ -karoten v desítkách miligramů na gram sušiny (Kyriakopoulou *et al.*, 2015), dále obsah luteinu v *Chromochloris zofingiensis* je udáván v jednotkách miligramů na gram sušiny (Del Campo *et al.*, 2004).

V oblasti celkového obsahu všech karotenoidů v *T. pulchra*, jsou získané výsledky příznivější. Nejvyšší naměřená hodnota je 5,668 mg/l, což už minimálně řádově odpovídá výsledkům uváděným v literatuře (Del Campo *et al.*, 2004).

Co se týče jednotlivých stresových faktorů, ukázalo se, že při dusíkovém hladovění je dosahováno většího množství  $\beta$ -karotenu než při dostatečném přísunu dusíku, což koresponduje s tvrzeními v Del Campo *et al.*, (2000) a Faraloni and Torzillo, (2017), kde limitace dusíkem přispívá k navýšení koncentrace  $\beta$ -karotenu. Stejně tak souhlasí zjištění, že obsah luteinu (v kombinaci se zeaxanthinem) se při dusíkovém hladovění snížil (Del Campo *et al.*, 2000). Při stanovení celkových karotenoidů, bylo dosahováno výrazně vyšších hodnot u vzorků kultivovaných v klasickém BBM médiu s obsahem dusíku a vezme-li se v potaz množství získané biomasy v jednotlivých kultivacích, jeví se kultivace v klasickém BBM jako vhodnější. Dusíkové hladovění se tedy neukázalo být ideálním způsobem navýšení obsahu karotenoidů v tomto kmenu půdních řas, což může souviset s faktem, že je to stresový faktor nejčastěji využívaný pro zvýšení tvorby a akumulace volného astaxanthinu, který v daných vzorcích nebyl obsažen (Orosa *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2016).

U violaxanthinu, neoxanthinu a zeaxanthinu s luteinem byl pozorován trend, že při zvyšující se intenzitě ozáření obsah karotenoidů ve vzorcích kultivovaných v klasickém BBM médiu s dusíkem klesá. Pro lutein je toto tvrzení v rozporu s daty uvedenými pro řasu *Muriellopsis* sp. v Del Campo *et al.*, (2000), kdy v rozmezí mezi 180–460  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  obsah luteinu vzrůstal, zatímco dle dat získaných v této práci koncentrace luteinu s narůstající intenzitou osvitů klesá (rozmezí 80–400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ). Trend klesající koncentrace při zvýšeném osvitě u violaxanthinu je v souladu se známými fakty, že obsah violaxanthinu s rostoucí intenzitou světla klesá (je de-epoxidován na zeaxanthin) (Egeland, 2016). Zajímavé však je, že ve vzorcích kultivovaných v médiu bez dusíku je nejvyšších koncentrací těchto uvedených karotenoidů dosaženo při optimálních světelných podmínkách (200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) pro kultivaci *Tetracystis pulchra*.

Opačný trend sledoval echinenon, jehož obsah rostl se zvyšující se intenzitou ozařování ve vzorcích kultivovaných v médiu s dusíkem, kde byla jeho koncentrace obecně výrazně vyšší. Jeho nejvyšší získaná koncentrace (6,587  $\mu\text{g/g}$ ) je však stále velmi nízká oproti hodnotám udávaných např. v Matsuura *et al.*, (2012). Rostoucí koncentrace s narůstající intenzitou světla byla také zaznamenán u  $\beta$ -karotenu v kombinaci s kultivací vzorku v bezdusíkatém BBM médiu. Kombinace těchto dvou stresových faktorů je známou a často užívanou strategií pro navýšení tvorby a akumulace karotenoidů v řasách (Orosa *et al.*, 2000; Liu *et al.*, 2016). Zvyšující se obsah  $\beta$ -karotenu při zvýšeném osvětlení je velmi častý jev popisovaný například v Del Campo *et al.*, (2000) a García-González *et al.*, (2005).

Při dvoufázové kultivaci se vyšší intenzita ozařování ( $900 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) ukázala být faktorem přispívajícím k navýšení všech karotenoidů kromě violaxanthinu. To může být vysvětleno skutečností, že dle xantofylového cyklu violaxanthin koresponduje svým snížením zvýšením zeaxanthinu (Egeland, 2016). Oproti očekávání nebyla doufázová kultivace nejvýnosnější metodou pro získání karotenoidů, přestože subjektivně byly v tomto experimentu získány nejsilněji červeně zbarvené vzorky. To je možná způsobeno faktem, že různé karotenoidy mají různou barvu, a ne všechny karotenoidy byly v analýze identifikovány, mohlo tedy dojít k zbarvení vzorku některou neidentifikovanou látkou. Je ovšem možné, že optimalizace této metody by mohla vést k získání vyšších obsahů karotenoidů, jak je uváděno v Sui *et al.*, (2019) a Zhang *et al.*, (2017).

Efekt stresového faktoru teploty na obsah jednotlivých karotenoidů byl zjišťován pouze pro vzorky kultivované v dusíkatém médiu, jelikož jak již bylo řečeno, vzorky pro HPLC analýzu byly vybírány na základě celkového množství karotenoidů, které byly v experimentu s UVA zářením, teplotou a dusíkovou limitací obecně velmi nízké. Nelze tedy potvrdit zjištění, že navzdory faktu, že vzorky kultivované v BBM médiu s dusíkem obsahovaly vyšší celkové množství karotenoidů, byly jedny z nejlepších výsledků naměřeny ve vzorcích kultivovaných v BBM bez dusíku (Tab. č. 9). Nicméně bylo zjištěno, že podobně jako u ozařování ve dvoufázové kultivaci, s rostoucí teplotou rostl obsah všech karotenoidů kromě violaxanthinu. Vyšší teplota se tedy ukázala jako vhodný stresový faktor pro navýšení tvorby a akumulace karotenoidů, ovšem s výjimkou violaxanthinu, jež při vysoké teplotě ( $30 \text{ }^\circ\text{C}$ ) již nebyl vůbec ve vzorku obsažen. Tato pozorování souhlasí s výsledky získanými v mnoha člancích jako Gong and Bassi, (2016) nebo Campo *et al.*, (2000). Bylo potvrzeno, že nízké teploty zpomalují tvorbu a akumulaci karotenoidů (Gong and Bassi, 2016), ovšem při překročení vyšší stresové hranice (obvykle udáváno  $32 \text{ }^\circ\text{C}$ ) dochází k inhibici růstu nebo i

k snížení koncentrace karotenoidů (Del Campo *et al.*, 2004). Dle literatury je pro tvorbu karotenoidů ideální teplota okolo 24–28 °C, což koresponduje s výsledky v této práci (Del Campo *et al.*, 2004; Guedes *et al.*, 2011). Při dalším zkoumání teplotních hladin a jejich vlivu na *T. pulchra* by bylo vhodné tyto hladiny zvýšit (např. testovat 5 teplotních hladin od 20 do 36 °C, s rozestupy po 4 °C).

UVA ozařování (368 nm, intenzita 0,7 mW) natolik snižovalo celkový obsah karotenoidů, že byl nakonec analyzován jen jeden vzorek vystavený UVA, který ukázal, že při optimální teplotě (22 °C) UVA podporuje tvorbu neoxanthinu a zeaxanthinu s luteinem. Přesto však byly výtěžky těchto karotenoidů relativně nízké. Nárůst zeaxanthinu s luteinem ve vzorku vystavenému UVA záření koresponduje s výsledky pro kmen *Dunaliella bardawil* v Huang *et al.*, (2018), kde bylo zjištěno, že obsah luteinu i zeaxanthinu při vystavení vzorku UVA záření (320–400 nm, 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , 84 hod.) roste. Vzhledem k tomu, že se v této práci nepodařilo rozseparovat píky těchto dvou látek, nebylo bohužel možné stanovit jednotlivé koncentrace těchto karotenoidů, tedy blíže zkoumat efekt UVA záření na jejich obsah. Obecné tvrzení, že krátkodobé vystavené řas UVA záření vede k nárůstu karotenoidů v buňce, jak je uváděno v Huang *et al.*, (2018) však u *T. pulchra* (kmen C) nebylo potvrzeno. V této práci UVA záření působilo ve většině případů proti tvorbě a akumulaci karotenoidů, ovšem to může být i výsledkem toho, že vystavení UVA nebylo krátkodobé, ale dlouhodobé.

V souhrnu ze získaných výsledků vyplývá, že pro získání nejvyššího výtěžku  $\beta$ -karotenu by byly optimální kultivační podmínky vysoké ozáření (400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), BBM médium bez obsahu dusíku a pravděpodobně vyšší teplota (30 °C). Tento výsledek souhlasí s daty uvedenými v Faraloni and Torzillo, (2017) a Del Campo *et al.*, (2000) a z publikovaných prací obecně vychází, že vyšší teplota často přispívá k tvorbě karotenoidů, což by odpovídalo mnou získaným výsledkům (Liu and Lee, 2000). Ačkoliv se dusíkové hladovění setkala s úspěchem v oblasti akumulace karotenoidů, jeho negativní vliv na růst ho činí nevhodným pro kultivaci, i tento výsledek je v souladu s publikovanými údaji (Liu *et al.*, 2016).

Pro získání nejvyšší koncentrace zeaxanthinu s luteinem by optimální podmínky byly nízká intenzita osvětlení (80  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), klasické BBM médium a vyšší teplota (30 °C). Intenzita osvětlení podporující tvorbu těchto karotenoidů je v rozporu s daty uvedenými v Del Campo *et al.*, (2000), ovšem výhody klasického BBM a vyšších teplot jsou v souladu s publikacemi Gong and Bassi, (2016) a Del Campo *et al.*, (2000). V případě těchto karotenoidů ovšem mohou být moje výsledky zkreslené, vzhledem k nemožnosti určit jejich samostatné koncentrace.



Trend akumulace echinenonu byl dobře sledovatelný, jeho obsah v buňce roste se zvyšující se intenzitou záření, zvyšující se teplotou a v klasickém BBM médiu obsahujícím dusík. Kultivace řas za účelem získání echinenonu, by tedy tyto podmínky splňovat. Tyto výsledky nekorespondují s již zjištěnými fakty z Orosa *et al.*, (2005), kdy při experimentování s *Haematococcus pluvialis* byl obsah echinenonu nejvyšší při dusíkovém hladovění a s Liu and Lee, (2000), kdy obsah echinenonu v řase *Chlorococcum* sp. klesal se zvyšující se teplotou (od 20–35 °C). Obecně není příliš studií zabývajících se obsahem echinenonu v řasách, bylo by tedy vhodné tomuto karotenoidu věnovat větší pozornost.

Optimální podmínky pro získávání neoxanthinu a violaxanthinu nelze ze získaných dat stanovit, jelikož obě látky byly obsaženy jen ve velmi nízkých koncentracích a ačkoliv vykazovali jisté tendence sledovat určité trendy, jako pokles koncentrací s rostoucí intenzitou ozáření, což odpovídá informacím uvedeným v Egeland (2016), bylo by vhodné pro získání relevantních výsledků nalézt kmen, kde budou obsaženy ve vyšší míře a dále se věnovat optimalizaci podmínek pro jejich navýšení.

Pokud by bylo cílem kultivace získat co nejvyšší celkový obsah karotenoidů, optimální metoda pro kultivaci *T. pulchra* by bylo aplikování dvoufázové kultivace, kdy je využito klasické BBM médium. Při první, růstové fázi by kultury byly vystaveny intenzitě osvětlení 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  po dobu 14 dní a následně ve druhé fázi by byly vystaveny osvětlení 900  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Prospěšné by mohlo být zvýšení kultivační teploty, která v experimentu uváděném v této práci kolísá mezi 21–25 °C, na 24–28 °C, jak je uváděno v Del Campo *et al.*, (2004).

V porovnání s uváděnými výsledky v literatuře je získaný obsah karotenoidů ve všech experimentech výrazně nižší než momentálně získávané výtěžky z různých mikroskopických řas jako *Chromochloris zofingiensis*, *Dunaliella salina* a *Haematococcus pluvialis* (Zhang *et al.*, 2014). Přesto byly získány cenné informace o metodice kultivace za účelem získávání určitých karotenoidů a byla úspěšně optimalizována metoda jejich stanovení. Pokud bychom však chtěli znát nejvyšší dosaženou hodnotu mezi identifikovanými karotenoidy, pak by to byl  $\beta$ -karoten s 30,633  $\mu\text{g/g}$  sušiny při kultivaci v BBM bez dusíku za vysoké intenzity ozáření, 400  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Obecně nejlepších výsledků bylo dosaženo v experimentu kombinujícím stresové faktory intenzity ozáření a dusíkového hladovění.

## 4.2. Optimalizace metody pro kvantitativní a kvalitativní stanovení karotenoidů

Pro optimalizování extrakce je podstatné najít efektivní způsob, jak rozbít či oslabit buněčnou stěnu, je tedy důležité znát charakteristiku buněčné stěny vzorku. Po prvotních testech s oběma kmeny bylo dosaženo závěru, že *T. pulchra* (kmen C) je vhodný pro další experimenty a kmen F byl z další práce vyřazen. Toto rozhodnutí bylo založeno na faktu, že extrakce karotenoidů ze vzorku kmenu F zabrala dvakrát tolik času a bylo spotřebováno výrazně více extrakčního činidla než u extrakce ze vzorku *T. pulchra*. Extrakce byla pravděpodobně problematická z důvodu, že buňky kmenu F mají vrstvenou buněčnou stěnu složenou z mikrofibril, která významně znesnadňuje extrakční proces. Při komerčním pěstování řas je tedy nutné věnovat dostatečnou pozornost studii buněčných stěn a optimalizaci extrakčního procesu, jelikož extrakce může být jednou z největších finančních a časových zátěží celého procesu kultivace (Kim *et al.*, 2016).

Pro hrubé stanovení karotenoidů byla vybrána metoda podle Lichtenthaler and Buschmann, (2001) pro výpočet celkového množství obsažených karotenoidů ve vzorku za pomoci UV-Vis spektrometrie. Tento krok předcházel HPLC analýze, jelikož podával informace o tom, kolik karotenoidů vzorek obsahuje i s možností odhadu jaké látky by se ve vzorku mohly nacházet. Již díky této analýze bylo zjištěno, že řasové vzorky *T. pulchra* pravděpodobně neobsahují volný astaxanthin, naopak se předpokládal výskyt  $\beta$ -karotenu. Jedná se tedy o velmi zajímavou, relativně levnou a rychlou informativní metodu, která je ideální pro získání představy o obsahu karotenoidů ve vzorcích řas. Na základě získaných informací pak bylo rozhodnuto, zdali je vzorek vhodným kandidátem na obsáhlejší HPLC analýzu.

Identifikace jednotlivých karotenoidů a jejich zastoupení byla dalším krokem, pro který byla na základě literární rešerše vybrána metoda podle (Liu *et al.*, 2010), jelikož poskytovala velké množství dobře rozlišených signálů. Tato metoda byla dále modifikována, aby lépe odpovídala potřebám této práce. Byly testovány různé poměry acetonitrilu, methanolu a pufru v mobilní fázi, přičemž byly využity i informace z dalších testovaných metod jako (Marinova and Ribarova, 2007), kdy procentuální zastoupení acetonitrilu výrazně převyšuje zastoupení methanolu (95:5). Obsah pufru také velmi silně ovlivňuje výsledný chromatogram, byl tedy vytvořen kompromis, kdy bylo dosaženo dobrého rozlišení a retence za cenu jisté možnosti deformace píků ovšem bez risku, že se píky karotenoidů budou ve výsledném chromatogramu překrývat se signálem chlorofylu. Výsledný poměr látek v mobilní fázi využité v této práci

tedy byl 94/2/4 (ACN/MeOH/0,05M Tris-HCl pufr) oproti původní mobilní fázi v Liu *et al.*, (2014), která sestávala z ACN/MeOH/0,1M Tris-HCl pufr v poměru 84/2/14.

Ve výsledku tedy byla nalezena a optimalizována metoda, kdy za využití kombinace stanovení karotenoidů podle Lichtenthaler and Buschmann, (2001) a modifikované metody dle Liu *et al.*, (2010) je možné relativně rychle a levně identifikovat karotenoidy obsažené ve vzorku. Nutno podotknout, že vzhledem k omezeným finančním možnostem nebyly zakoupeny všechny standardy karotenoidů, jež se ve vzorcích mohly vyskytovat. Je tedy možné, že některé píky nebyly identifikovány z důvodu, že chyběl jejich standard. Tento problém by však při velkopřemyslových kultivacích neměl představovat zásadní překážku.

### **4.3. Nalezení optimálních podmínek pro kultivaci *T. pulchra***

Po vyizolování byly kolonie *Tetracystis pulchra* (kmen C), vzhledem k tomu, že se jedná o půdní řasu, kultivovány na agarových plotnách (Škaloud, 2004). Pro potřeby plánovaných experimentů však bylo nutné, aby řasové kultury dokázaly růst suspendované v tekutém médiu, což je zásadní i pro případ, že by měly být kultivovány ve velkém měřítku. Doposud totiž nebyla nalezena vhodná metoda kultivace aeroterestrických řas, která by nevyžadovala schopnost těchto řas růst suspendované v médiu (Katarzyna *et al.*, 2015). Jak se však ukázalo, buňky *T. pulchra* byly již při prvotních testech úspěšně kultivovány i v tekutém médiu, ačkoliv růst byl pomalejší.

Při kultivaci v multikultivátoru v malém měřítku docházelo k tvorbě sedimentů a shluků buněk. Tento problém byl následně vyřešen optimalizací aeračních tyčinek. Domnívám se, že dostatečné míchání média v nádržích opatřených promíchávacím ramenem nebo dostatečná průtoková rychlost ve fotobioreaktoru by problém tvoření shluků zcela eliminovala.

Vzhledem k průměrným teplotám v oblasti (*State Meteorological Agency - AEMET - Spanish Government*, no date), kde byly vzorky získány byly určeny testované teplotní hladiny s předpokladem, že 10 °C bude spodní stresová hranice a 30 °C bude horní stresová hranice. Bylo prokázáno, že nevhodné teploty zpomalují růst kultury, zejména pak vyšší teplota se ukázala být jako značný inhibitor růstu biomasy. Jako optimální teplota bylo ustanoveno 22 °C, což je relativně nižší, než optimální teploty využívané při kultivaci řas jako *Dunaliella salina* či *Haematococcus pluvialis*, kdy se ideální teplota pro kultivaci s nejvyšším ziskem biomasy i karotenoidů pohybuje okolo 25-30 °C (Brennan and Collins, 2015; Gong and Bassi, 2016).

Z teplotního experimentu bylo zjištěno, že buňky *T. pulchra* nejlépe rostly při teplotě 20 °C v tekutém médiu a překvapivě při 10 °C na agarových plotnách, ovšem i zde dosahovala teplota 20 °C velmi dobrých výsledků. Ačkoliv čistě pro růst biomasy by se tedy teplota 20 °C zdála jako optimální, konečným cílem zde bylo získat karotenoidy, které se dle subjektivního pozorování ve vyšší míře vyskytovaly ve vzorcích kultivovaných při teplotách 25 a 30 °C, což by odpovídalo teplotám ideálním pro tvorbu karotenoidů, jak je udáváno v Del Campo *et al.*, (2004). Byl tedy vytvořen kompromis a vzhledem k tomu, že další experimenty probíhaly v tekutém médiu, byla zvolena optimální teplota 22 °C.

Optimální intenzita světla pro růst se mezi různými zástupci mikrořas velmi liší, může se pohybovat kdekoli mezi 50–1250  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Gong and Bassi, 2016). Pro *T. pulchra* byla na základě pozorování při prvotních testech stanovena intenzita 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  jako ideální pro nárůst biomasy.

Dále bylo z experimentů vyzorováno, že kultura mnohem více prosperuje je-li kultivována v médiu s dusíkem a bez přítomnosti UVA záření (368 nm, intenzita 0,7 mW). Oba tyto závěry jsou logickým vyústěním faktů, že dusík je klíčovým prvkem pro úspěšné dělení buněk a UVA je obecně považováno za stresový faktor (Kim and Watanabe, 1994; Del Campo *et al.*, 2004).

Nejvýraznější byl rozdíl v biomase při experimentech s dusíkovou limitací, kdy kultury kultivované v médiu bez dusíku dosahovaly méně než polovičních hodnot OD oproti kulturám v médiu s dusíkem (Obr. č. 13, 14). Pozoruhodným úkazem byl vzorek s označením L4 (osvit 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , BBM bez dusíku), který výrazně předčil všechny zaznamenané hodnoty (OD při 680 nm mělo hodnotu 2,275). Jelikož k tomuto navýšení došlo skokově po několika dnech kultivace je možné, že došlo ke kontaminaci vzorku, kdy kontaminace mohla sloužit jako zdroj dusíku, ovšem tyto domněnky nebyly potvrzeny.

Vzorky vystavené UVA záření (368 nm, intenzita 0,7 mW) v oblasti hodnot koncentrace chlorofylu nesledovaly stejný trend jako kontrola. U vzorků vystavených UVA záření nebyl natolik zřejmý rozdíl mezi kulturami v médiu s dusíkem a bez dusíku, hlavní roli zde hrála teplota. Narozdíl od toho u kontrolní skupiny vzorků měly kultury v klasickém BBM výrazně vyšší přírůstky biomasy než kultury v BBM bez dusíku, kterým biomasa po prvotních přírůstcích postupně klesala. V obou případech však nejvyšší dosažená hodnota koncentrace chlorofylu byla získána ve vzorcích kultivovaných ve 30 °C. Tento výsledek je v rozporu s údaji v Brown and Bold, (1964) i s dříve získanými výsledky této práce.

UVA záření (368 nm, intenzita 0,7 mW) zřejmě ovlivnilo růst kultury, což je efekt, který se při dlouhodobém vystavení může objevit, jak bylo potvrzeno v Kim and Watanabe, (1994). Přítomnost UVA záření zřejmě částečně kompenzovala ztráty způsobené dusíkovým hladověním až do té míry, že bezdusíkaté kultury kultivované při teplotách 22 a 30 °C dosáhly stejné biomasy jako kultury kultivované v kontrolních podmínkách (bez UVA záření) za stejné teploty ovšem s obsahem dusíku. Jeho působení v kombinaci s dalšími stresovými faktory může být vysvětlením abnormálních výsledků získaných v tomto experimentu, ovšem tyto domněnky nejsou potvrzeny.

#### 4.4. Určení kmenů

Identifikace kmenu je kritická pro vyhledávání informací o řase a porovnávání získaných výsledků mezi jednotlivými studii. Zejména u aero-terestrických zelených řas však jejich úspěšná identifikace může znamenat určitou výzvu. V porovnání se sladkovodními a mořskými řasami jsou půdní řasy méně studované, což znamená, že i jejich taxonomie prošla menším vývojem. Systematika půdních řas je problematická, zejména zelených jednobuněčných řas, jejichž jednoduchá morfologie neposkytuje znaky pro rozlišení. Využití molekulárních metod odhalilo polyfyletičnost mnohých rodů a přineslo s sebou nutnost revize systému, která však ve většině případů zatím nebyla provedena (Andersen, 1992; Johansen and Shubert, 2001).

Mnoho linií jednobuněčných zelených řas neodpovídá současným taxonomickým kategoriím, jejich charakterizace je tedy značně náročná. Taxonomie některých skupin byla dříve založena čistě na morfologických znacích, ovšem výsledky moderních fylogenetických metod těmto tradičním zařazením často odporují. Nelze tedy spoléhat na morfologické znaky jako spolehlivý určovací nástroj. Jako pomocné poznávací znaky se dají považovat některé prvky ultrastruktury buněk, ale nejvhodnější pro určení je kombinace molekulárních a fenotypických znaků (Nakada *et al.*, 2008; Borowitzka, 2016; Watanabe and Lewis, 2017).

Na základě kombinace pozorování světelným i transmisním elektronovým mikroskopem, genetické charakterizace a fylogenetické analýzy byl kmen C a kmen F alespoň obecně zařazen do systému, polyfyletický rod *Tetracystis*, je právě jeden z těch, který vyžaduje rozsáhlou taxonomickou revizi (Watanabe and Lewis, 2017). Nicméně byly získány důležité informace o těchto kmenech, které mají vysokou výpovědní hodnotu.

Kmen C byl identifikován jako *Tetracystis pulchra* na základě pozorování a porovnávání s údaji v publikaci Brown and Bold, (1964) a za pomoci informací z Watanabe and Lewis,

(2017) a Nakada *et al.*, (2008). Nyní však *T. pulchra* čelí dalšímu problému, v současné době totiž celý rod *Tetracystis* podléhá značným změnám a je pravděpodobné, že zcela zanikne (Watanabe and Lewis, 2017). Jednotliví zástupci rodu tedy zřejmě budou přeřazeni na základě molekulárních dat a dále budou existovat pod jiným označením.

Kmen F nebyl identifikován do druhu, pouze bylo zjištěno, že je příbuzný s *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80 a patří do cladu *Stephanosphaerina*. Toto zařazení je podpořeno pozorováním podobností ultrastruktury pyrenoidu kmenu F a *Chlorococcum tetrasporum* (Brown, 1958) a na výsledcích molekulární analýzy, která udává 94,9% podobnost (v 18S rDNA, BLAST) s *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80. Stejně vysoká podobnost byla zaznamenána i s řasou *Protosiphon botryoides*, ten se však výrazně liší svou morfologií (Lewis and Trainor, 2012).

#### **4.5. Problematika získávání nových kmenů z přírody**

Mikroskopické řasy představují z velké části neprozkoumané a nevyužité obnovitelné přírodní zdroje mnoha významných látek. To zahrnuje i karotenoidy, látky využívané v mnoha průmyslových odvětvích, od akvakultur k farmacii (Jin and Melis, 2003; Egeland, 2016). V dnešní době roste poptávka spotřebitelů po přírodních alternativách uměle vyráběných karotenoidů. Tato skutečnost spolu s faktem, že byly prokázány pozitivní efekty přírodních karotenoidů na lidské zdraví vytváří potřebu a příležitost nalézt nové způsoby získávání těchto látek přírodní cestou (Zhang *et al.*, 2014). Velkými výhodami kultivace řas za účelem získávání karotenoidů je jejich vysoká růstová rychlost, relativně jednoduchá kultivace a možnost využití odpadních produktů jako médium. Navíc oproti jiným přírodním zdrojům vykazují mnohokrát vyšší výtěžnost (Jin and Melis, 2003; Liu *et al.*, 2012). I přes všechny tyto výhody a vysokou poptávku spotřebitelů však zatím průmyslové kultivace karotenoidů nejsou příliš časté. Problémem je vysoká cena, protože výtěžky z řas, ačkoliv relativně vysoké, nejsou dostatečné, aby dokázaly splnit požadavky pro průmyslové aplikace.

Půdní řasy jsou schopné přežít extrémní podmínky jako vysoká ozářenost, vysoké teploty a přítomnost UV záření, z velké části i proto, že mnoho z nich jako svůj obranný mechanismus tvoří a akumuluje karotenoidy. Ty je, jakožto antioxidanty, účinně chrání eliminací ROS vzniklých těmito stresovými faktory, proto se půdní řasy jeví jako vhodná volba při hledání nových zástupců, kteří by byli schopni tyto látky tvořit (Remias *et al.*, 2010; Karsten and Holzinger, 2014).

Z těchto důvodů byla pro sbírání vzorků zvolena vysoce osluněná lokalita ve Španělsku, kde je průměrná teplota v červenci 23,8 °C (*State Meteorological Agency - AEMET - Spanish Government*, no date) s nízkou mírou lidské disturbance.

Selekce vhodných kmenů pro účely studie tvorby karotenoidů probíhala za pomoci slabého UV ozařování (UVA i UVB světlo; Repti Glo, Reptile 200, 15.0 UVB 25 W). UVA a UVB poškozuje kultury, které se záření neodkází dostatečně aktivně bránit. Účinný obranný mechanismus je syntéza antioxidantů. UV záření působí na kultury, které ho dokáží vydržet tak, že významně zpomalí fotosyntézu a podpoří tvorbu a akumulaci karotenoidů. Při vystavení buněk UVA/UVB, dochází totiž ke vzniku ROS, které jsou antioxidanty eliminovány. Nedokáže-li si tedy buňka některé takové obranné látky vytvořit, kultura je eliminována (Remias *et al.*, 2010; Karsten and Holzinger, 2014). Toto slabé UV záření tedy mohlo podpořit červenání kolonií (tvorbu karotenoidů), to ovšem není potvrzené., jelikož ke změně barvy mohlo dojít vyčerpáním živin z média. Nicméně nezpomalovalo růst selektovaných kolonií.

## 5. Závěr

V rámci diplomové práce byly z přírody získány a vyizolovány dva kmeny (kmen C a F) půdních řas, u kterých se projevil potenciál pro produkci karotenoidů. Jejich selekce probíhala za využití ozařování velmi slabým UV zářením, které mohlo podpořit tvorbu karotenoidů. Kmen C byl identifikován jako *Tetracystis pulchra* (clade *Dunaliellinia*) a kmen F, ač bližší neidentifikován, byl zařazen do cladu *Stephanosphaerinia* s určitou příbuzností *Tetracystis tetraspora* SAG 98.80.

Nalezené kmeny byly následně podrobeny sérii pokusů určených k optimalizaci jejich kultivace, kde bylo zjištěno, že kmen F není vhodný pro další práci, jelikož nedokáže úspěšně růst suspendován v tekutém médiu. I přes aplikaci mechanického promíchávání tvořily buňky shluky a sedimentovaly na dně zkumavek. Práce s kmenem F tedy dále nepokračovala. Pro *T. pulchra* však byly nalezeny optimální podmínky pro kultivaci. Ideální pro nárůst biomasy je kultivace v klasickém BBM médiu při teplotě 22 °C a za intenzity osvětlení 200  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ .

Pro stanovení karotenoidů byla optimalizována metoda pro jednoduché a rychlé stanovení celkového množství karotenoidů následované podrobnou analýzou pro jejich identifikaci a kvantifikaci. Celkové množství karotenoidů se dá po extrahování vzorku určit spektrometricky podle Lichtenthaler and Buschmann, (2001), což poskytne informace o vhodnosti vzorku pro další analýzu a může i informovat o základním složení karotenoidů.

Identifikace jednotlivých karotenoidů a zjištění jejich obsahu ve vzorku bylo provedeno za pomoci modifikované metody dle Liu *et al.*, (2010). Ačkoliv je nutno brát v potaz, že metodika musí být přizpůsobena vlastnostem zkoumané řasy, zejména při extrakci, kombinace metod podle Lichtenthaler and Buschmann, (2001) a Liu *et al.*, (2010) je velmi užitečný postup pro získání představy o karotenoidech obsažených ve zkoumaném vzorku.

Byl studován vliv jednotlivých stresových faktorů a jejich kombinací na kvalitu i kvantitu karotenoidů. Celkové množství karotenoidů v *T. pulchra* se pohybuje v řádech jednotek mikrogramů na mililitr vzorku s nejvyšší dosaženou hodnotou 5,668 mg/l. Nejvíce zastoupeným karotenoidem v *T. pulchra* se ukázal být  $\beta$ -karoten, a naopak nebyla zjištěna přítomnost volného astaxanthinu. Výrazným vlivem na tvorbu karotenoidů se ukázal být stresový faktor intenzita světla, ale i dusíkové hladovění nebo teplota. Vliv UVA záření by měl být dále testován. Z výsledků jasně vyplývá, že pro úspěšné kultivování mikroskopických řas za účelem zisku určitého karotenoidu je nutné předem vědět jaký karotenoid má být z řasy získáván, jelikož různé stresové faktory se svým vlivem na produkci jednotlivých karotenoidů velmi liší, viz Tab. č. 14.

Nejvyšší zaznamenané hodnoty		
Experiment	Podmínky kultivace	Výsledek
Dvoufázová kultivace	klasické BBM 22 °C osvit 200, následně 900 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Celkové množství karotenoidů = 5,668 mg/l
Vliv světelné intenzity a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů	BBM bez dusíku 22 °C osvit 400 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Obsah $\beta$ -karotenu = 30,633 $\mu\text{g/g}$ sušiny
Vliv světelné intenzity a obsahu dusíku v médiu na růst a hromadění karotenoidů	klasické BBM 22 °C osvit 80 $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$	Obsah luteinu a zeaxanthinu = 50,296 $\mu\text{g/g}$ sušiny

Tab. č. 14: Nejvyšší zaznamenané hodnoty koncentrace karotenoidů napříč všemi experimenty doplněné o konkrétní podmínky, kdy byly tyto koncentrace dosaženy.

Tato práce vrhá světlo na téma potenciálu v přírodě se vyskytujících půdních řas v oblasti biotechnologie karotenoidů. V práci je zahrnut nový pohled na metodiku kultivace a stanovení karotenoidů stejně jako obsáhlé pozorování efektů různých stresových faktorů. Především však bylo dokázáno, že by v přírodě se vyskytujícím kmenům mělo být věnováno více pozornosti.



## 6. Seznam použité literatury

- Andersen, R. A. (1992) 'Diversity of eukaryotic algae', *Biodiversity and Conservation*, 1(4), pp. 267–292. doi: 10.1007/BF00693765.
- Bart, J. C. and MacGillavry, C. H. (1968) 'The crystal and molecular structure of canthaxanthin.', *Acta crystallographica. Section B: Structural crystallography and crystal chemistry*, 24(12), pp. 1587–1606. doi: 10.1107/S056774086800470X.
- Begum, H. *et al.* (2016) 'Availability and Utilization of Pigments from Microalgae', *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 56(13), pp. 2209–2222. doi: 10.1080/10408398.2013.764841.
- Benavente-Valdés, J. R. *et al.* (2016) 'Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species', *Biotechnology Reports*, 10, pp. 117–125. doi: 10.1016/j.btre.2016.04.001.
- Bidigare, R. R. *et al.* (1993) 'Evidence a Photoprotective for Secondary Carotenoids of Snow Algae', *Journal of Phycology*, 29(4), pp. 427–434. doi: 10.1111/j.1529-8817.1993.tb00143.x.
- Borowitzka, L. and Borowitzka, M. (1990) 'Commercial Production of  $\beta$ -Carotene by *Dunaliella Salina* in Open Ponds', *Bulletin of Marine Science*, 47(1), pp. 244–252.
- Borowitzka, M. A. (2016) 'The Physiology of Microalgae', in *The Physiology of Microalgae*, pp. 655–681. doi: 10.1007/978-3-319-24945-2.
- Borowitzka, M. A., Borowitzka, L. J. and Kessly, D. (1990) 'Effects of salinity increase on carotenoid accumulation in the green alga *Dunaliella salina*', *Journal of Applied Phycology*, 2(2), pp. 111–119. doi: 10.1007/BF00023372.
- Boussiba, S. *et al.* (1999) 'Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses', *Biotechnology Letters*, 21(7), pp. 601–604. doi: 10.1023/A:1005507514694.
- Brennan, G. and Collins, S. (2015) 'Growth responses of a green alga to multiple environmental drivers', *Nature Climate Change*, 5(9), pp. 892–897. doi: 10.1038/nclimate2682.
- Britton, G. (1983) *The Biochemistry of Natural Pigments*. Cambridge: Cambridge University Press.

- Britton, G. (1986) 'Carotenoids and Polyterpenoids', *Natural Product Reports*, 3.
- Britton, G. (2008) 'Functions of Intact Carotenoids', in *Carotenoids*, pp. 189–212. doi: 10.1007/978-3-7643-7499-0\_10.
- Britton, G. and Goodwin, T. W. (1971) 'Biosynthesis of Carotenoids', in *The Biochemistry of the Carotenoids*, pp. 654–701. doi: 10.1016/S0076-6879(71)18046-9.
- Britton, G., Liaaen-Jensen, S. and Pfander, H. (2004) *Carotenoids*. Birkhäuser Verlag. doi: 10.1007/978-3-0348-7836-4.
- Brown and BOLD, H. C. (1964) 'Comparative studies of the algae genera *Tetracystis* and *Chlorococcum*', *Phycol. Stud.*, 6417, pp. 8–9.
- Brown, M. (1958) 'Taxonomic criteria in classification of f', (5).
- Brown, R. M. J. and Bold, H. C. (1964) *Phycological Studies*.
- Del Campo, J. A. *et al.* (2000) *Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in Muriellopsis sp. (Chlorophyta)*, *Journal of Biotechnology*. Available at: [www.elsevier.com/locate/jbiotec](http://www.elsevier.com/locate/jbiotec).
- Del Campo, J. A. *et al.* (2004) 'Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta)', *Applied Microbiology and Biotechnology*, 64(6), pp. 848–854. doi: 10.1007/s00253-003-1510-5.
- Cohen, Z. (2002) *Chemicals from Microalgae, Chemicals from Microalgae*. doi: 10.1201/9781482295306.
- Collos, Y. and Harrison, P. J. (2014) 'Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae', *Marine Pollution Bulletin*, 80(1–2), pp. 8–23. doi: 10.1016/j.marpolbul.2014.01.006.
- Dartnall, H. J. A. (ed.) (2019) *Handbook of Sensory Physiology Vol. VII/1: Photochemistry of Vision*.
- Egeland, E. S. (2016) 'The Physiology of Microalgae', in Borowitzka, M. A., Beardall, J., and Raven, J. A. (eds) *The Physiology of Microalgae*, pp. 507–564. doi: 10.1007/978-3-319-24945-2.
- Faraloni, C. and Torzillo, G. (2017) 'Synthesis of Antioxidant Carotenoids in Microalgae in Response to Physiological Stress', in *Carotenoids*. InTech. doi:

10.1016/j.colsurfa.2011.12.014.

Fox, D. L. (1979) *Biochromy: Natural Coloration of Living Things*. Berkeley: University of California Press.

Frank, H. A. *et al.* (eds) (1999) *The Photochemistry of Carotenoids, Journal of Chemical Information and Modeling*. Kluwer Academic.

Frank, H. A. and Cogdell, R. J. (1996) 'Carotenoids in photosynthesis', *Photochemistry and Photobiology*, 63(3), pp. 257–264. doi: 10.1111/j.1751-1097.1996.tb03022.x.

García-González, M. *et al.* (2005) 'Production of *Dunaliella salina* biomass rich in 9-cis- $\beta$ -carotene and lutein in a closed tubular photobioreactor', *Journal of Biotechnology*, 115(1), pp. 81–90. doi: 10.1016/j.jbiotec.2004.07.010.

Göçer, M. *et al.* (2006) 'The effects of red pepper, marigold flower, and synthetic astaxanthin on pigmentation, growth, and proximate composition of *Penaeus semisulcatus*', *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*, 30(4), pp. 359–365.

Gómez-Loredo, A., Benavides, J. and Rito-Palomares, M. (2016) 'Growth kinetics and fucoxanthin production of *Phaeodactylum tricornutum* and *Isochrysis galbana* cultures at different light and agitation conditions', *Journal of Applied Phycology*, 28(2), pp. 849–860. doi: 10.1007/s10811-015-0635-0.

Gong, M. and Bassi, A. (2016) 'Carotenoids from microalgae: A review of recent developments', *Biotechnology Advances*, 34(8), pp. 1396–1412. doi: 10.1016/j.biotechadv.2016.10.005.

Goodwin, T. W. (1980a) 'Functions of Carotenoids', in *The Biochemistry of the Carotenoids*, pp. 77–95. doi: 10.1007/978-94-009-5860-9\_3.

Goodwin, T. W. (1980b) 'Plants', in *The Biochemistry of the Carotenoids*.

Guedes, A. C., Amaro, H. M. and Malcata, F. X. (2011) 'Microalgae as sources of carotenoids', *Marine Drugs*, 9(4), pp. 625–644. doi: 10.3390/md9040625.

Hall, T. (2017) *BioEdit*. Available at: <https://bioedit.software.informer.com/> (Accessed: 30 April 2021).

Ho, S. H. *et al.* (2014) 'Enhancing lutein productivity of an indigenous microalga *Scenedesmus obliquus* FSP-3 using light-related strategies', *Bioresource Technology*, 152,

pp. 275–282. doi: 10.1016/j.biortech.2013.11.031.

Hosseini Tafreshi, A. and Shariati, M. (2009) ‘Dunaliella biotechnology: Methods and applications’, *Journal of Applied Microbiology*, 107(1), pp. 14–35. doi: 10.1111/j.1365-2672.2009.04153.x.

Huang, J. J. *et al.* (2018) ‘Enhancement of the Production of Bioactive Microalgal Metabolites by Ultraviolet Radiation (UVA 365 nm)’, *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 66(39), pp. 10215–10224. doi: 10.1021/acs.jafc.8b03789.

Ip, P. F. and Chen, F. (2005) ‘Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark’, *Process Biochemistry*, 40(2), pp. 733–738. doi: 10.1016/j.procbio.2004.01.039.

Jackson, H., Braun, C. L. and Ernst, H. (2008) ‘The Chemistry of Novel Xanthophyll Carotenoids’, *American Journal of Cardiology*, 101(10 SUPPL.). doi: 10.1016/j.amjcard.2008.02.008.

Jahnke, L. S. (1999) ‘Massive carotenoid accumulation in *Dunaliella bardawil* induced by ultraviolet-A radiation’, *Journal of Photochemistry and Photobiology B: Biology*, 48(1), pp. 68–74. doi: 10.1016/S1011-1344(99)00012-3.

Jin, E., Lee, C. G. and Polle, J. E. W. (2006) ‘Secondary carotenoid accumulation in *Haematococcus* (chlorophyceae): Biosynthesis, regulation, and biotechnology’, *Journal of Microbiology and Biotechnology*, pp. 821–831.

Jin, E. S. and Melis, A. (2003) ‘Microalgal biotechnology: Carotenoid production by the green algae *Dunaliella salina*’, *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 8(6), pp. 331–337. doi: 10.1007/BF02949276.

Johansen, J. R. and Shubert, E. (2001) ‘Algae in soils’, *Nova Hedwigia*, (123), pp. 297–306. Available at: [https://www.researchgate.net/publication/282119755\\_Algae\\_in\\_soils](https://www.researchgate.net/publication/282119755_Algae_in_soils).

Karsten, U. and Holzinger, A. (2014) ‘Green algae in alpine biological soil crust communities: Acclimation strategies against ultraviolet radiation and dehydration’, *Biodiversity and Conservation*, 23(7), pp. 1845–1858. doi: 10.1007/s10531-014-0653-2.

Katarzyna, L., Sai, G. and Avijeet Singh, O. (2015) ‘Non-enclosure methods for non-suspended microalgae cultivation: Literature review and research needs’, *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 42, pp. 1418–1427. doi: 10.1016/j.rser.2014.11.029.

- Katoh, K., Rozewicki, J. and Yamada, K. D. (2018) 'MAFFT online service: Multiple sequence alignment, interactive sequence choice and visualization', *Briefings in Bioinformatics*, 20(4), pp. 1160–1166. doi: 10.1093/bib/bbx108.
- Khalil, Z. I. *et al.* (2010) 'Effect of pH on growth and biochemical responses of *Dunaliella bardawil* and *Chlorella ellipsoidea*', *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, 26(7), pp. 1225–1231. doi: 10.1007/s11274-009-0292-z.
- Kim, D. S. and Watanabe, Y. (1994) 'Inhibition of growth and photosynthesis of freshwater phytoplankton by ultraviolet A (UVA) radiation and subsequent recovery from stress', *Journal of Plankton Research*, 16(12), pp. 1645–1654. doi: 10.1093/plankt/16.12.1645.
- Kim, D. Y. *et al.* (2016) 'Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: *Chlorella* and *Haematococcus*', *Bioresource Technology*, 199, pp. 300–310. doi: 10.1016/j.biortech.2015.08.107.
- Kim, S. M. *et al.* (2012) 'Fucoxanthin as a major carotenoid in *Isochrysis aff. galbana*: Characterization of extraction for commercial application', *Journal of the Korean Society for Applied Biological Chemistry*, 55(4), pp. 477–483. doi: 10.1007/s13765-012-2108-3.
- Kozlov, A. M. *et al.* (2019) 'RAxML-NG: A fast, scalable and user-friendly tool for maximum likelihood phylogenetic inference', *Bioinformatics*, 35(21), pp. 4453–4455. doi: 10.1093/bioinformatics/btz305.
- Kumar, S., Tamura, K. and Nei, M. (1993) *Molecular Evolutionary Genetics Analysis*. Available at: [papers3://publication/uuid/4E7DFB8D-24CE-45A4-9FA8-DB0880733F35](https://papers3://publication/uuid/4E7DFB8D-24CE-45A4-9FA8-DB0880733F35).
- Kyriakopoulou, K., Papadaki, S. and Krokida, M. (2015) 'Life cycle analysis of  $\beta$ -carotene extraction techniques', *Journal of Food Engineering*, 167, pp. 51–58. doi: 10.1016/j.jfoodeng.2015.03.008.
- Lamers, P. P. *et al.* (2010) 'Carotenoid and fatty acid metabolism in light-stressed *Dunaliella salina*', *Biotechnology and Bioengineering*, 106(4), pp. 638–648. doi: 10.1002/bit.22725.
- Lamers, P. P. *et al.* (2012) 'Carotenoid and fatty acid metabolism in nitrogen-starved *Dunaliella salina*, a unicellular green microalga', *Journal of Biotechnology*, 162(1), pp. 21–27. doi: 10.1016/j.jbiotec.2012.04.018.
- Le-Feuvre, R. *et al.* (2020) 'Biotechnology applied to *Haematococcus pluvialis* Fotow: challenges and prospects for the enhancement of astaxanthin accumulation', *Journal of*

*Applied Phycology*, 32(6), pp. 3831–3852. doi: 10.1007/s10811-020-02231-z.

Lewis, L. A. and Trainor, F. R. (2012) ‘Survival of *Protosiphon botryoides* (Chlorophyceae, Chlorophyta) from a Connecticut soil dried for 43 years’, *Phycologia*, 51(6), pp. 662–665. doi: 10.2216/11-108.1.

Li, H. Bin, Fan, K. W. and Chen, F. (2006) ‘Isolation and purification of canthaxanthin from the microalga *Chlorella zofingiensis* by high-speed counter-current chromatography’, *Journal of Separation Science*, 29(5), pp. 699–703. doi: 10.1002/jssc.200500365.

Li, J. *et al.* (2011) ‘An economic assessment of astaxanthin production by large scale cultivation of *Haematococcus pluvialis*’, *Biotechnology Advances*, 29(6), pp. 568–574. doi: 10.1016/j.biotechadv.2011.04.001.

Li, X. *et al.* (2020) ‘Biotechnological production of astaxanthin from the microalga *Haematococcus pluvialis*’, *Biotechnology Advances*, 43(July 2020), p. 107602. doi: 10.1016/j.biotechadv.2020.107602.

Li, Y. *et al.* (2009) ‘High-light and sodium chloride stress differentially regulate the biosynthesis of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyceae)’, *Journal of Phycology*, 45(3), pp. 635–641. doi: 10.1111/j.1529-8817.2009.00689.x.

Lichtenthaler, H. K. and Buschmann, C. (2001) ‘Chlorophylls and Carotenoids: Measurement and Characterization by UV-VIS Spectroscopy’, *Current Protocols in Food Analytical Chemistry*, 1(1), p. F4.3.1-F4.3.8. doi: 10.1002/0471142913.faf0403s01.

Lin, J. H., Lee, D. J. and Chang, J. S. (2015) ‘Lutein production from biomass: Marigold flowers versus microalgae’, *Bioresour. Technology*, 184, pp. 421–428. doi: 10.1016/j.biortech.2014.09.099.

Liu, B. H. and Lee, Y. K. (2000) ‘Secondary carotenoids formation by the green alga *Chlorococcum* sp’, *Journal of Applied Phycology*, 12(3–5), pp. 301–307. doi: 10.1023/a:1008185212724.

Liu, J. *et al.* (2010) ‘One amino acid substitution in phytoene desaturase makes *Chlorella zofingiensis* resistant to norflurazon and enhances the biosynthesis of astaxanthin’, *Planta*, 232, pp. 61–67. doi: 10.1007/s00425-010-1132-y.

Liu, J. *et al.* (2012) ‘Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*’. doi: 10.1016/j.biortech.2011.12.047.

- Liu, J. *et al.* (2014) 'Chlorella zofingiensis as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential', *Marine Drugs*, 12(6), pp. 3487–3515. doi: 10.3390/md12063487.
- Liu, J. *et al.* (2016) 'Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga Chlorella zofingiensis', *Bioresource Technology*, 214, pp. 319–327. doi: 10.1016/j.biortech.2016.04.112.
- Lyons, N. M. and O'Brien, N. M. (2002) 'Modulatory effects of an algal extract containing astaxanthin on UVA-irradiated cells in culture', *Journal of Dermatological Science*, 30(1), pp. 73–84. doi: 10.1016/S0923-1811(02)00063-4.
- Marinova, D. and Ribarova, F. (2007) 'HPLC determination of carotenoids in Bulgarian berries', *Journal of Food Composition and Analysis*, 20(5), pp. 370–374. doi: 10.1016/j.jfca.2006.09.007.
- Matsuura, H., Watanabe, M. M. and Kaya, K. (2012) 'Echinenone production of a dark red-coloured strain of Botryococcus braunii', *Journal of Applied Phycology*, 24(4), pp. 973–977. doi: 10.1007/s10811-011-9719-7.
- Mikhailyuk, T. *et al.* (2019) 'Composition of biological soil crusts from sand dunes of the Baltic Sea coast in the context of an integrative approach to the taxonomy of microalgae and cyanobacteria', *European Journal of Phycology*, 54(3), pp. 263–290. doi: 10.1080/09670262.2018.1557257.
- Mogedas, B. *et al.* (2009) 'β-Carotene production enhancement by UV-A radiation in Dunaliella bardawil cultivated in laboratory reactors', *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 108(1), pp. 47–51. doi: 10.1016/j.jbiosc.2009.02.022.
- Multi-Cultivators | Photobioreactors* (no date). Available at: <http://photo-bioreactors.com/products/multi-cultivators/#details> (Accessed: 12 March 2021).
- Nakada, T., Misawa, K. and Nozaki, H. (2008) 'Molecular systematics of Volvocales (Chlorophyceae, Chlorophyta) based on exhaustive 18S rRNA phylogenetic analyses', *Molecular Phylogenetics and Evolution*, 48(1), pp. 281–291. doi: 10.1016/j.ympev.2008.03.016.
- Orosa, M. *et al.* (2000) 'Production and analysis of secondary carotenoids in green algae', *Journal of Applied ...*, 12(3/5), pp. 553–556. doi: 10.1023/a:1008173807143.

- Orosa, M. *et al.* (2005) 'Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*', *Bioresource Technology*, 96(3), pp. 373–378. doi: 10.1016/j.biortech.2004.04.006.
- Paes, C. R. P. S. *et al.* (2016) 'Growth, nutrient uptake and chemical composition of *Chlorella* sp. and *Nannochloropsis oculata* under nitrogen starvation', *Latin American Journal of Aquatic Research*, 44(2), pp. 275–292. doi: 10.3856/vol44-issue2-fulltext-9.
- Pallett, K. E. and Young, A. J. (2017) *Carotenoids, Antioxidants in Higher Plants*. Elsevier Inc. doi: 10.1201/9781315149899.
- Pisal, D. S. and Lele, S. S. (2005) 'Carotenoid production from microalga, *Dunaliella salina*', *Indian Journal of Biotechnology*, 4(4), pp. 476–483.
- Pusztai, M. and Škaloud, P. (2019) 'Elucidating the evolution and diversity of Uroglena-like colonial flagellates (Chrysophyceae): polyphyletic origin of the morphotype', *European Journal of Phycology*, 54(3), pp. 404–416. doi: 10.1080/09670262.2019.1574030.
- Rambaut, A. (2018) *FigTree, ver 1.4.4*. Available at: <http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/> (Accessed: 30 April 2021).
- Rao, A. R. *et al.* (2007) 'Effect of salinity on growth of green alga *Botryococcus braunii* and its constituents', *Bioresource Technology*, 98(3), pp. 560–564. doi: 10.1016/j.biortech.2006.02.007.
- Remias, D., Albert, A. and Lütz, C. (2010) 'Effects of realistically simulated, elevated UV irradiation on photosynthesis and pigment composition of the alpine snow alga *Chlamydomonas nivalis* and the arctic soil alga *Tetracystis* sp. (Chlorophyceae)', *Photosynthetica*, 48(2), pp. 269–277. doi: 10.1007/s11099-010-0033-4.
- Roth, M. S. *et al.* (2017) 'Chromosome-level genome assembly and transcriptome of the green alga *Chromochloris zofingiensis* illuminates astaxanthin production', *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 114(21), pp. E4296–E4305. doi: 10.1073/pnas.1619928114.
- Škaloud, P. (2004) *Aero-terestrické sinice a řasy ventarol NPP Borečský vrch*.
- Solovchenko, A. E. *et al.* (2008) 'Effects of light and nitrogen starvation on the content and composition of carotenoids of the green microalga *Parietochloris incisa*', *Russian Journal of Plant Physiology*, 55(4), pp. 455–462. doi: 10.1134/S1021443708040043.



Solovchenko, A. E. (2012) 'Physiological role of neutral lipid accumulation in eukaryotic microalgae under stresses', *Russian Journal of Plant Physiology*, 59(2), pp. 167–176. doi: 10.1134/S1021443712020161.

Spirit, S., Lutter, K. and Stahl, W. (2010) 'Carotenoids in Photooxidative Stress', *Current Nutrition & Food Science*, 6(1), pp. 36–43. doi: 10.2174/157340110790909572.

Spurr, A. R. (1969) 'A Low-Viscosity Epoxy Resin Embedding Medium for Electron Microscopy ARTHUR', 26, pp. 31–43. doi: 10.1115/IMECE2010-38790.

State Meteorological Agency - AEMET - Spanish Government (no date). Available at: <http://www.aemet.es/en/portada>.

Suh, I. S., Joo, H. N. and Lee, C. G. (2006) 'A novel double-layered photobioreactor for simultaneous Haematococcus pluvialis cell growth and astaxanthin accumulation', *Journal of Biotechnology*, 125(4), pp. 540–546. doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.03.027.

Sui, Y. *et al.* (2019) 'Enhancement of co-production of nutritional protein and carotenoids in Dunaliella salina using a two-phase cultivation assisted by nitrogen level and light intensity', *Bioresource Technology*, 287(March 2019), p. 121398. doi: 10.1016/j.biortech.2019.121398.

Tjahjono, A. E. *et al.* (1994) 'Hyper-accumulation of astaxanthin in green alga Haematococcus pluvialis at elevated temperatures', *Biotechnology Letters*, 16(2), pp. 133–138.

Watanabe, S. and Lewis, L. A. (2017) 'Phylogenetic interpretation of light and electron microscopic features of selected members of the phylogroup Moewusinia (Chlorophyceae), with new generic taxonomy', *Phycologia*, 56(3), pp. 329–353. doi: 10.2216/16-64.1.

Wayama, M. *et al.* (2013) 'Three-Dimensional Ultrastructural Study of Oil and Astaxanthin Accumulation during Encystment in the Green Alga Haematococcus pluvialis', *PLoS ONE*, 8(1), pp. 1–9. doi: 10.1371/journal.pone.0053618.

Weber, R. W. S., Anke, H. and Davoli, P. (2007) 'Simple method for the extraction and reversed-phase high-performance liquid chromatographic analysis of carotenoid pigments from red yeasts (Basidiomycota, Fungi)', *Journal of Chromatography A*, 1145(1–2), pp. 118–122. doi: 10.1016/j.chroma.2007.01.052.

Young, A. and Britton, G. (1993) *Carotenoids in Photosynthesis*, *Journal of Chemical Information and Modeling*.

Young, A. J. (1993) 'Factors that affect the carotenoid composition of higher plants and algae', in *Carotenoids in Photosynthesis*, pp. 160–205. doi: 10.1007/978-94-011-2124-8\_6.

Zhang, J. *et al.* (2014) 'Microalgal carotenoids: Beneficial effects and potential in human health', *Food and Function*, 5(3), pp. 413–425. doi: 10.1039/c3fo60607d.

Zhang, Z. *et al.* (2017) 'Two-step cultivation for production of astaxanthin in *Chlorella zofingiensis* using a patented energy-free rotating floating photobioreactor (RFP)', *Bioresource Technology*, 224, pp. 515–522. doi: 10.1016/j.biortech.2016.10.081.