

**Univerzita Karlova
Přírodovědecká fakulta**

Studijní program: Klinická a toxikologická analýza



Terezie Fajfrová

Metody stanovení karotenoidů a lipidů u zelené řasy *Chromochloris zofingiensis*
(Sphaeropleales, Chlorophyceae)

Methods for extraction and analysis of carotenoids and lipids in green alga
Chromochloris zofingiensis (Sphaeropleales, Chlorophyceae)

Bakalářská práce

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

Konzultant: RNDr. Eliška Nováková, Ph.D.

Praha, 2019

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.

Jsem si vědom toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 12. srpna 2019.

Podpis

Poděkování

Především bych chtěla poděkovat své školitelce Yvonne Němcové za její pomoc, připomínky a trpělivost, a také za umožnění psát bakalářskou práci na katedře botaniky. Dále bych chtěla poděkovat své konzultantce Elišce Novákové za poskytnutí mnoha užitečných rad a odbornou kritiku. Ráda bych také poděkovala své rodině, která mne ve studiu vždy podporovala.

Abstrakt

Tato bakalářská práce se zabývá mikroskopickou zelenou řasou *Chromochloris zofingiensis*, jejím životním cyklem a morfologií. *Chromochloris zofingiensis* je zelená jednobuněčná řasa, která dokáže akumulovat velké množství karotenoidů a lipidů, proto se ukazuje jako zajímavá alternativa nynějších zdrojů těchto látek. Karotenoidy, především pak sekundární karotenoidy, jsou významné pro svoje silné antioxidační účinky a uplatňují se v akvakultuře, chovu drůbeže i farmacii. Akumulace lipidů, zejména neutrálních lipidů, značí potenciál pro výrobu biopaliv. Práce shrnuje využívanou metodiku pro stanovování karotenoidů a lipidů a různé způsoby kultivace pro maximalizaci jejich výtěžku. Zároveň se práce zabývá strukturou daných látek a jejich komerčním využitím. Ačkoliv se *Chromochloris zofingiensis* zatím komerčně nepěstuje, práce se snaží nastínit potenciální přednosti této řasy jako alternativního přírodního zdroje astaxanthinu, luteinu, canthaxanthinu a neutrálních lipidů.

Klíčová slova: *Chromochloris zofingiensis*, *Chlorella zofingiensis*, metody stanovení, *Muriella zofingiensis*, *Mychonastes zofingiensis*, karotenoidy, lipidy

Obsah

1. ÚVOD	1
2. FYLOGENETICKÉ VZTAHY	1
3. MORFOLOGIE, VÝSKYT A ŽIVOTNÍ CYKLUS	3
4. PRODUKOVANÉ LÁTKY	5
4.1. Karotenoidy	5
4.1.1. Primární karotenoidy.....	6
4.1.1.1. Lutein.....	7
4.1.2. Sekundární karotenoidy.....	8
4.1.2.1. Astaxanthin	8
4.1.2.2. Canthaxanthin	10
4.2. Lipidy	10
5. STANOVENÍ KAROTENOIDŮ	13
5.1. HPLC	14
5.1.1. NP-HPLC	14
5.1.2. RP-HPLC	15
5.1.3. Způsoby detekce.....	16
5.2. Tenkovrstvá chromatografie	18
5.3. Konkrétní metody pro stanovení astaxanthinu, luteinu a canthaxanthinu	19
5.3.1. Metoda M. Isabel Minguez-Mosquera	20
5.3.2. Metoda José A. Del Campo.....	20
5.3.3. Metoda Jin Liu	20
5.3.4. Metoda Kim J. M. Mulders	20
6. STANOVENÍ LIPIDŮ	21
6.1. Tenkovrstvá chromatografie	21
6.2. Plynová chromatografie	22
6.2.1. GC – FID.....	23
6.2.2. GC – MS	23
7. ZPŮSOBY KULTIVACE	24
7.1. Batch kultivace	25
7.2. Fed-batch kultivace	25

7.3. Kontinuální a semi-kontinuální kultivace.....	25
7.4. Nutriční faktory.....	26
7.5. Fyzikální faktory	28
8. ZÁVĚR.....	30
9. LITERATURA.....	31

1. Úvod

V současnosti se stále více zvyšuje zájem o přírodní zdroje a využívání biotechnologií, což vede k intenzivním snahám nalézt organismy vhodné pro pěstování za účelem získání významných látek. Jedním z těchto zajímavých organismů je právě mikroskopická řasa *Chromochloris zofingiensis*. Jakožto producent lipidů i karotenoidů může být potenciálně využita pro produkci biopaliv a astaxanthinu.

Astaxanthin je v dnešní době velmi významný produkt užívaný v mnoha průmyslových odvětvích, od zemědělství přes farmacie až ke kosmetice. Momentálně se vyrábí synteticky či získává z jiné mikroskopické řasy – *Haematococcus pluvialis*. Syntetický astaxanthin je sice výrazně levnější, ovšem nespĺňuje kvality přírodního.

Biopaliva jsou v současnosti získávána pěstováním vysoce energetických plodin, kupříkladu řepky. Nevýhodu tohoto způsobu je mimo jiné zabránění velkého množství zemědělské půdy, což by mohla řešit právě velkoplošná kultivace řas produkujících lipidy. Kultivace řas je bohužel stále velmi finančně náročná, hledají se proto ideální způsoby kultivace, které by nároky snížily, ale zároveň zachovaly, či jen nepatrně ovlivnily výnos žádoucích látek. *Chromochloris zofingiensis* je zelená řasa, která se dokáže přizpůsobit velké škále kultivačních podmínek, a proto je ideálním kandidátem pro nalezení vhodné kultivační strategie, která by dokázala konkurovat dnes využívaným zdrojům. Musí však být zohledněno, že se *Chromochloris zofingiensis* kultivuje ve velmi malých měřítcích a aplikace na průmyslové měřítko prozatím nebyla uskutečněna.

Cílem této bakalářské práce je přehledně shrnout dosavadní znalosti o řase *Chromochloris zofingiensis* se zaměřením na její životní cyklus a odpovědi na změnu vnějších podmínek při kultivaci. Dále se práce snaží obsáhnout informace ohledně metod používaných pro stanovování karotenoidů a lipidů, obecné informace o těchto významných látkách i jejich možnosti využití. Posledním cílem práce je teoretické stanovení optimálních podmínek pro kultivaci se zaměřením na faktory ovlivňující tvorbu žádaných metabolitů.

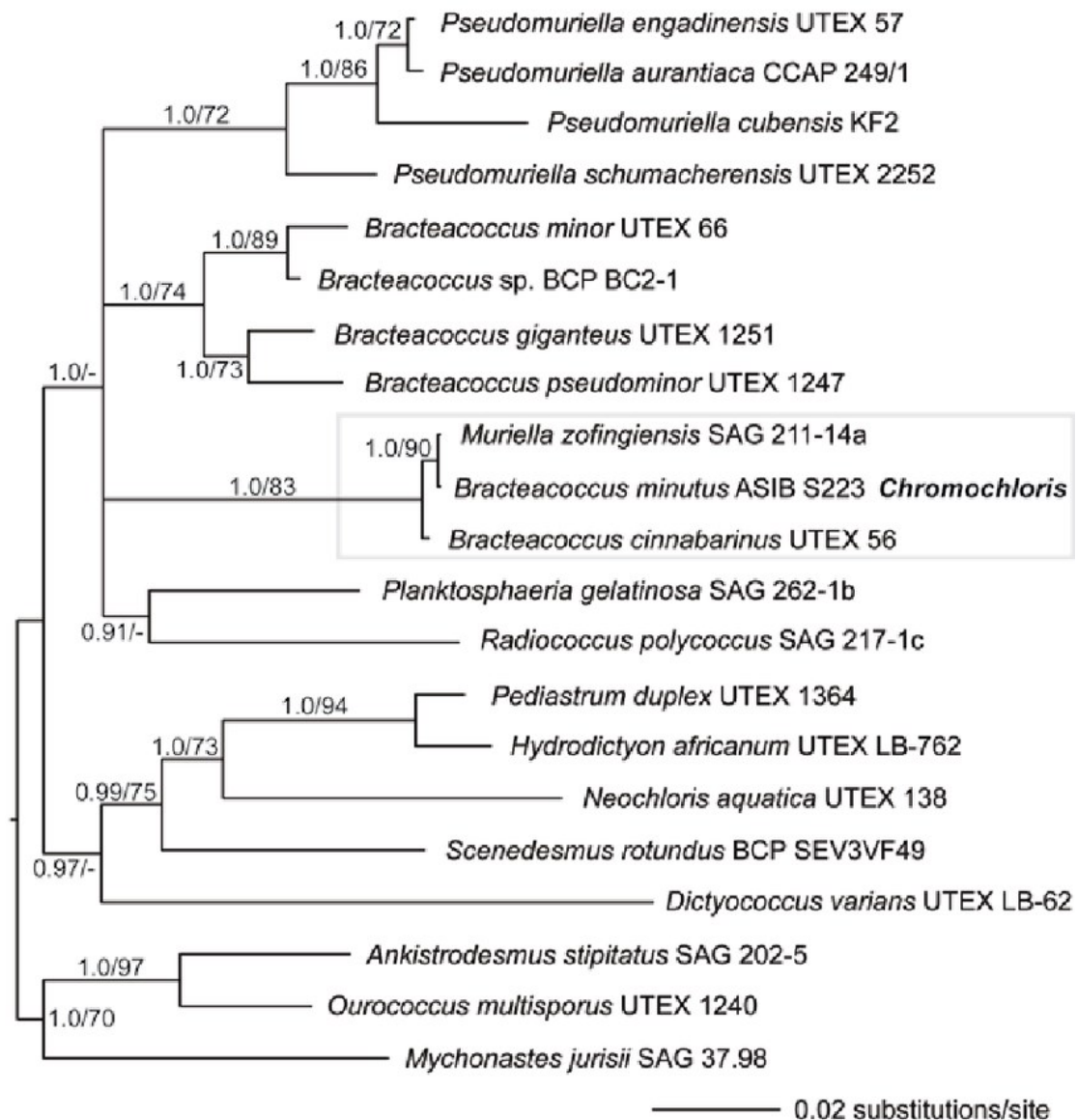
2. Fylogenetické vztahy

Chromochloris zofingiensis je zelená řasa patřící do řádu Sphaeropleales ve třídě Chlorophyceae. Před svým momentálním zařazením si prošla mnoha změnami při snaze správně ji taxonomicky zařadit s čímž souvisí velké množství synonymních názvů (*Chlorella*

zofingiensis, *Muriella zofingiensis*, *Mychonastes zofingiensis*, později se zjistilo, že je geneticky téměř shodná i s *Bracteacoccus cinnabarinus* a *Bracteacoccus minutus*). Tato kokální řasa byla nejprve zařazena do rodu *Chlorella* (Dönnz 1934), zejména na základě pozorování, při kterém se předpokládalo, že obsahuje pouze jeden chloroplast. Po dalším pozorování byla na základě významných rozdílů přesunuta do rodu *Muriella* (Hindák, 1982). Mezi tyto rozdíly patřila absence pyrenoidu a škrobu, naopak společné znaky s *Muriella aurantiaca*, která byla využita pro porovnání, byly mimo jiné produkce sekundárních karotenoidů v cytoplazmě či větší počet chloroplastů [1, 2].

Následně byl tento druh přesunut do rodu *Mychonastes* (Kalina & Punčochářová, 1987), kdy autoři předpokládali existenci pouze jednoho výrazně členěného plastidu na základě pozorování transmisním elektronovým mikroskopem. Dalším argumentem pro přesun byla také skutečnost, že na rozdíl od *Muriella aurantica*, která se rozmnožuje i pomocí zoospor, se *Chromochloris zofingiensis* množí produkcí autospor. [3]

Ke konečnému zařazení řasy do rodu *Chromochloris* došlo teprve v nedávné době za pomoci molekulární fylogenetické analýzy a pozorování světelným mikroskopem. Výsledky ukázaly výrazný rozdíl mezi mladými a dospělými buňkami, kdy mladé obsahovaly jeden parietální chloroplast a pouze jedno jádro, čímž se liší od dospělých, které obsahují více jader i chloroplastů. Fylogenetická analýza pak prokázala absenci příbuznosti k jakémukoliv jinému podobnému rodu, proto byl znovuzaveden rod *Chromochloris*, jehož zástupci se vyznačují produkcí sekundárních karotenoidů, rozdílným počtem chloroplastů a jader mladých a dospělých buněk, absencí pyrenoidu a výrazně červenou barvu starších buněk. Společně s *Ch. zofingiensis* byly pozorovány i řasy *Bracteacoccus minutus* a *Bracteacoccus cinnabarinus*, které se také staly součástí rodu *Chromochloris*. Všechny řasy jsou geneticky téměř identické, došlo tedy k jejich sloučení do jednoho druhu, *Chromochloris zofingiensis*. [2]

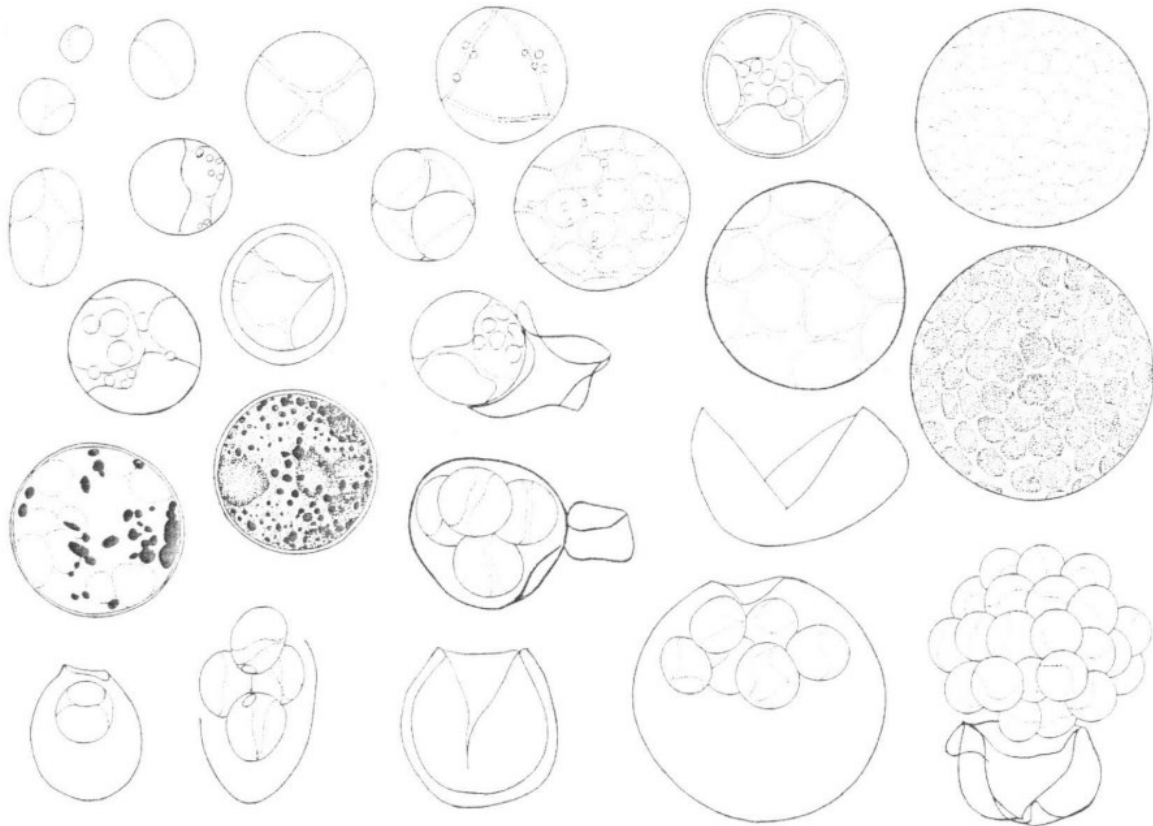


Obr. č. 1: Bayesovský fylogenetický strom sestavený na základě kombinované analýzy 18S a *rbcL* genů [2]

3. Morfologie, výskyt a životní cyklus

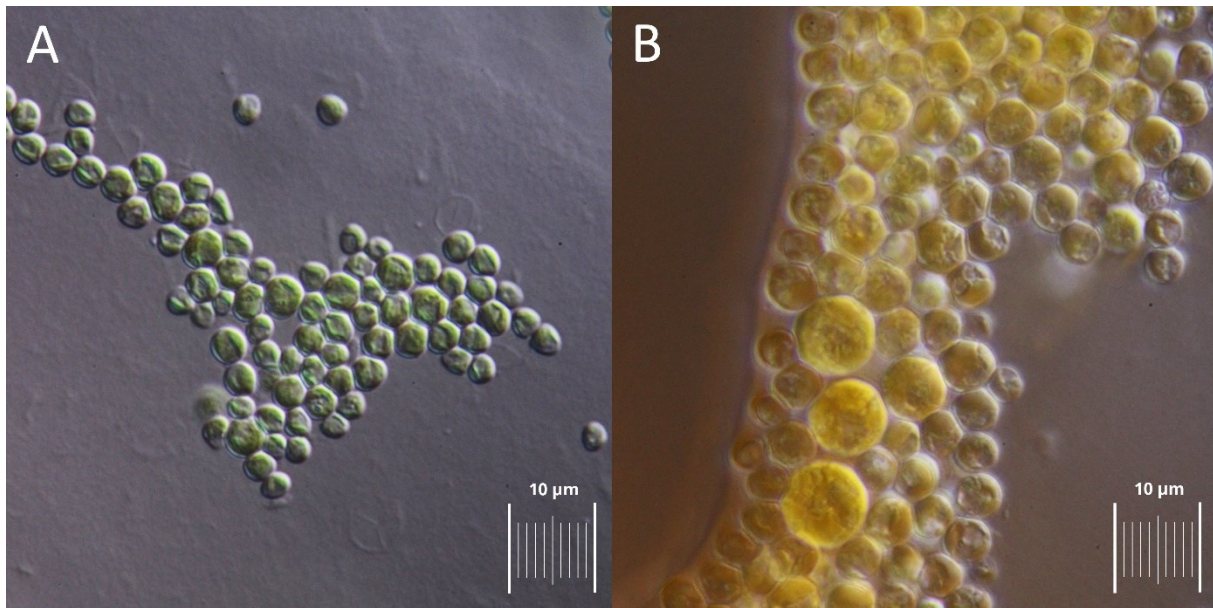
Chromochloris zofingiensis je zelená jednobuněčná haploidní kokální řasa žijící přírodě ve sladkých vodách, naleznout je jí možné ale i na kůře stromů, v půdě vlhkých lesů a litorálu sladkovodních těles. Dospělé buňky jsou sférické až oválné, velikosti se pohybují mezi 3,5 – 25 μm a obsahují větší počet chloroplastů a jader [1]. Momentálně se znovu objevují spekulace, že se nejedná o více chloroplastů, ale jeden velmi členitý zabírající přes 40% objemu buňky [4]. Starší buňky akumulují sekundární karotenoidy, což vede ke zbarvení celé buňky na cihlově červenou barvu a obsahují v cytoplazmě lipidové kapénky. Dospělé buňky se rozmnožují nepohlavně takzvanou sporulací, kdy uvnitř mateřské buňky vznikne větší množství autospor

(4-64), drobných dceřiných buněk bez bičíku. Autospory jsou následně uvolněny z mateřské buňky prasknutím buněčné stěny. Na rozdíl od starších buněk, mladé buňky a autospory jsou menší, okolo 3-7,5 μm , obsahují pouze jeden nerozdělený chloroplast a stejně tak jen jedno jádro [1–3].



Obr. č. 2: Životní cyklus *Chromochloris zoofingensis* [1].

V buňkách se nachází velké množství mitochondrií, které tvoří tubulární síť a většinou jsou úzce propojené buď s chloroplastem nebo s jádrem. Buňky nemají viditelný pyrenoid ani bičík a jejich chloroplast obsahuje škrobová zrna. Po osekvenování jaderného genomu *Ch. zoofingensis* se však ukazuje, že obsahuje většinu genů potřebných pro tvorbu bičíku. Tato řasa byla vždy považována za organismus asexuální bez schopnosti motility, genom však nevyklučuje, že by mohla mít doposud nepozorovaný sexuální cyklus, čemuž nasvědčuje přítomnost genů pro meiózu. Zároveň by mohla mít životní fázi, ve které se buňka dokáže pohybovat za pomoci bičíku. Je ovšem možné, že tyto geny představují pozůstatek funkčních genů a buňka tyto vlastnosti ztratila [4].



Obr. č. 3: Fotografie kmene *Chromochloris zofingiensis* H 6503 (Culture Collection of Algae of Charles University in Prague) pořízené na světelném mikroskopu Olympus BX51 s fotoaparátem Canon EOS 700D (Canon, Tokyo, Japan). A – mladé buňky (10 dní staré); B – starší dospělé buňky hromadící sekundární karotenoidy.

4. Produkované látky

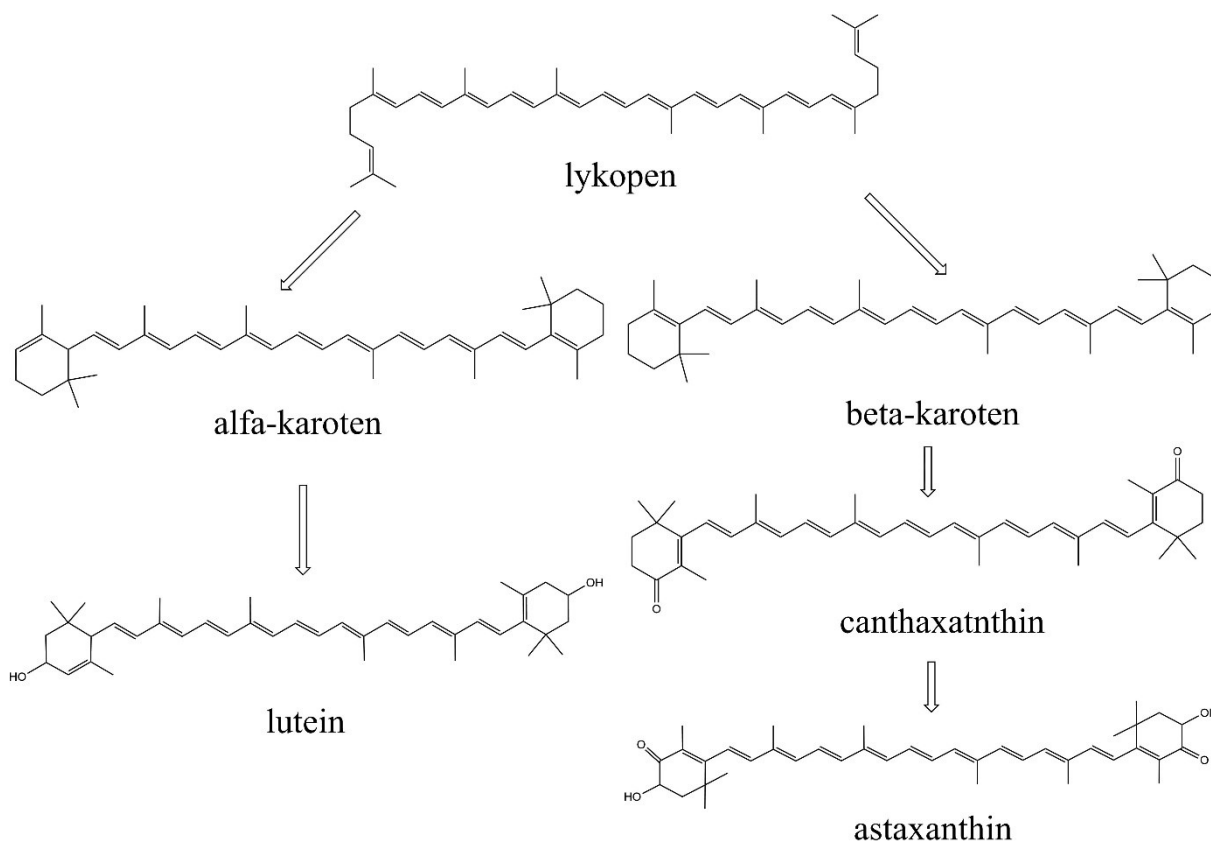
Tato řasa se stává v poslední době velmi komerčně zajímavou právě z toho důvodu, že produkuje průmyslově významné látky. Produkce karotenoidů, především pak astaxanthinu, dělá z *Chromochloris zofingiensis* zajímavou možnost alternativního zdroje tohoto významného karotenoidu. Pozornost si také získala jako možný producent biopaliv se svou schopností akumulace lipidů. Většinou se obsah karotenoidů v kultuře pohybuje v desítkách mg l⁻¹, obsah lipidů je výrazně závislý na kultivačních podmínkách, proto je obsažen v rozsahu od několika desítek mg l⁻¹ až po stovky mg l⁻¹ v kultuře [5, 6].

4.1. Karotenoidy

Karotenoidy jsou přírodní pigmenty obsažené v rostlinách, zvířatech a mikroorganismech. Jedná se o lipofilní výrazně barevné látky, konkrétně červené, žluté a oranžové. Většina karotenoidů má jako základ molekulu C40 složenou z izoprenových podjednotek, dá se tedy říci, že vycházejí z lykopenu. Karotenoidy se dají rozdělit dle funkce, a to na: primární, které slouží jako sekundární sběrné antény světla pro fotosyntézu a sekundární, které buňce poskytují ochranu. Dají se ovšem dělit i na základě své struktury na karoteny a xantofyly. Karoteny jsou složeny pouze z vodíku a uhlíku a jsou průmyslově méně významné. Xantofyly na rozdíl od nich obsahují 1 či více funkčních skupin obsahujících

heteroatomy, což jim mimo jiné umožňuje být mnohem efektivnější ve vázání volných radikálů [7]. V této práci se zabývám pouze xantofyly, konkrétně astaxanthinem, canthaxanthinem a luteinem. Všechny tyto látky dokáže při aplikaci vhodných podmínek *Ch. zoﬁngiensis* úspěšně vytvářet a akumulovat. Bohužel se ukazuje, že optimální podmínky pro získávání luteinu a astaxanthinu (případně canthaxanthinu) nejsou totožné, ba naopak, při aplikaci různých faktorů vznik luteinu a astaxanthinu sleduje opačný trend [8].

Pro člověka jsou karotenoidy významné především jako prekurzory pro vznik vitamínu A, dále jako antioxidační prostředky a prevence proti mnoha různým chorobám, jmenovitě například kardiovaskulární onemocnění, rakovina či Alzheimerova choroba. Průmyslově se karotenoidy používají zejména jako potravinové doplňky pro zvířata pro atraktivnější barvu výsledných produktů [9].



Obr. č. 4: Zjednodušené předpokládané schéma biosyntézy karotenoidů; vytvořeno v programu ChemDraw.

4.1.1. Primární karotenoidy

Tato skupina slouží jako doplňkové pigmenty pro pohlcování světelné energie a její přenos na chlorofyl. Jsou součástí vedlejších sběrných antén, jejichž absorpční spektrum je odlišné od chlorofylů, čímž rozšiřují využitelné spektrum pro sběr energie. Vyskytují se v

chloroplastech jako pevná součást fotosystému a mohou sloužit také jako ochrana před nadměrným zářením [7, 8]

4.1.1.1. Lutein

Lutein (β,ϵ -karoten-3,3'-diol) je xantofyl, ve své struktuře tedy obsahuje kyslíkaté funkční skupiny, konkrétně ketonové a hydroxylové, díky kterým má výborné antioxidační vlastnosti. Má tři chirální centra a nejčastěji se vyskytuje v (3R,3'R,6'R) formě. Díky své charakteristické struktuře pohlcuje modré světlo, což vede k jeho oranžovo-žluté barvě, a funguje tak jako ochrana sítnice před světelným poškozením. V potravinách se vyskytuje jak volný, tak v podobě mono-esteru i di-esteru. Momentálně se získává především extrakcí z okvětních plátků afrikánů, výtěžkem pak je směs esenciálních olejů s pryskyřicí s 5-50% obsahem luteinu ve formě di-esteru. Takto získaný lutein se dá dále purifikovat saponifikací, koncentrací s rekrystalizací. Dále je využit především k výrobě potravinových doplňků. V současnosti jsou snahy k nalezení alternativního zdroje luteinu, zejména proto, že proces získávání luteinu z květin je poměrně časově i finančně náročný. Synteticky se sice vyrobit dá, ale cenově umělá syntéza nemůže soupeřit s výrobou z afrikánů, další možností jsou tedy mikroskopické řasy [8, 10].

Právě *Chromochloris zofingiensis* se ukazuje jako vhodný kandidát, jelikož produkuje poměrně velké množství luteinu a při fototrofní kultivaci rychle navyšuje svou biomasu. V *Ch. zofingiensis* se lutein, jako jeden z hlavních karotenoidů, vyskytuje ve volné, neesterifikované formě a při změně podmínek jeho obsah v buňce sledoval stejný trend jako celková biomasa. Bohužel není možné kultivovat *Ch. zofingiensis* za účelem získávání luteinu i astaxanthinu zároveň, jelikož se ukázalo, že astaxanthin se vytváří na úkor primárních karotenoidů, kterým právě lutein je [8].

Tento antioxidant je jedním z nerozšířenějších rostlinných karotenoidů. Je obsažen v mnoha druzích ovoce i zeleniny, tudíž i běžnou součástí jídelníčku. Jelikož si ho lidské tělo nedokáže vytvářet, je nutné ho přijímat v potravě, není však esenciální, takže v případě jeho nedostatku nedochází v těle k přímým negativním následkům. Bylo však prokázáno, že lutein je velmi prospěšný pro lidský organismus, především pak v oblasti zraku, ale také v prevenci degenerativních chorob [10].

Spolu se zeaxanthinem je hlavní složkou makulárního pigmentu umístěného v sítnici, konkrétně pak lutein a další karotenoidy tvoří ukládáním žlutou skvrnu (macula lutea). Lutein dokáže filtrovat modré světlo nejlépe ze všech karotenoidů a svými antioxidačními vlastnostmi

brání peroxidaci mastných kyselin v lipidových membránách fotoreceptorů, čímž je chrání před poškozením. Bylo potvrzeno, že dostatečným příjmem luteinu v potravě (doporučená denní dávka je cca 6 mg) se dá předcházet věkem podmíněné degeneraci sítnice, dále se předpokládá, že by lutein mohl mít účinek i v prevenci šedého zákalu. Mezi další farmaceuticky významné vlastnosti luteinu patří protizánětlivý účinek a schopnost fungovat jako biomarker v klinické diagnostice [11].

4.1.2. Sekundární karotenoidy

Sekundární karotenoidy, jak již bylo zmíněno, nejsou součástí fotosyntézy, ale fungují jako ochrana buňky. Pokud se buňka dostane do stresové situace, jsou produkovány ve velkém množství a vytvoří ochrannou vrstvu, která řase dodává charakteristickou načervenalou barvu. Sekundární karotenoidy jsou antioxidanty, které pak řasu chrání před oxidativním stresem vychytáváním volných kyslíkatých radikálů. Na rozdíl od primárních karotenoidů jsou lokalizovány mimo chloroplast v lipidových kapénkách [7].

4.1.2.1. Astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β -karoten-4,4'-dion) se také řadí mezi xantofyly. Ve své stavbě obsahuje 2 chirální centra, která mu umožňují tvořit celkem 4 stereoizomery (3S,3'S; 3R,3'R; 3S,3'R a 3R,3'S), tedy pár enantiomerů a mesoizomerů. V přírodě se vyskytují všechny formy a poměry izomerů se druhově liší. Ačkoliv je astaxanthin jedním z karotenoidů, které se dají kompletně syntetizovat, pro farmaceutické využití je stále vhodnější jeho přírodní forma, jelikož uměle vyrobený astaxanthin často nesplňuje požadavky na čistotu látky. Přírodní astaxanthin má také až dvacetkrát lepší antioxidační účinky a na rozdíl od syntetického je určen i ke konzumaci člověkem [4]. Výhodou přírodního astaxanthinu je také to, že mikroskopické zelené řasy jako právě *Chromochloris zofingiensis* produkují astaxanthin ve formě (3S,3'S) izomeru, která je rozpustná ve vodě a má lepší antioxidační vlastnosti. Naproti tomu syntetizovaná alternativa obsahuje směs izomerů 3S,3'S:3S,3'R: 3R,3'R v poměru 1:2:1, nedosahuje tedy tak dobrého výsledku. Dalším pozitivem přírodní formy je fakt, že na rozdíl od syntetizovaného astaxanthinu, který je volný, se z řas získává astaxanthin jako mono-ester či di-ester, což mu ve výsledku významně prodlužuje životnost, jelikož jeho volná forma má výrazný sklon k oxidaci [12, 13].

Chromochloris zofingiensis by teoreticky mohla být skvělou alternativou pro získávání astaxanthinu přírodní cestou, má totiž na rozdíl od *Haematococcus pluvialis* rychlejší růst. Překážkou ovšem může být fakt, že doposud nejsou kompletně známy všechny kroky

biosyntézy astaxanthinu. Předpokládalo se, že probíhá stejným způsobem, jako u již zmíněné řasy *Haematococcus pluvialis*, totiž že biosyntéza probíhá částečně v chloroplastu a částečně v lipidových kapénkách, kde se postupně na β -karoten napojí dvě ketonové a dvě hydroxylové skupiny. V takovém případě astaxanthin vzniká z canthaxanthinu. V novějších studiích se ale ukázalo, že u *Ch. zoofingiensis* by hydroxylace mohla předcházet napojení ketonových skupin a astaxanthin by tak vznikal ze zeaxanthinu. V obou případech však výsledkem biosyntézy se astaxanthin uložený v lipidových kapénkách, kde následně řase slouží jako vnitřní ochrana proti přílišnému záření [4].

Své komerční využití nachází astaxanthin v mnoha odvětvích. V současné době se nejvíce využívá v aquakultuře a chovu drůbeže jako zdroj pigmentu v krmivu. U ryb napomáhá růžovo-oranžovému zbarvení masa a u drůbeže dodává i výraznější zbarvení žloutků, díky čemuž jsou výsledné produkty považovány za atraktivnější. U vodních živočichů je astaxanthin jedním z nejdůležitějších karotenoidů, mimo jiné má vliv na jejich reprodukci a růst [8, 13, 14].

Čím dál tím více si však získává pozornost i v oblasti farmaceutiky, zejména pro svoje mimořádně dobré antioxidační účinky. Předpokládá se, že by mohl sloužit jako prevence a podpůrná léčba mnoha lidských chorob, jako jsou různé typy rakoviny, kde zpomaluje růst tumorů, ateroskleróza, či neurodegenerativní onemocnění. Bylo dokázáno, že astaxanthin dokáže zabránit fotooxidaci lipidů způsobené UV zářením, čímž chrání části těla vystavené záření, především pak oči a kůži. Díky své schopnosti vychytávání volných kyslíkových radikálů a silným antioxidačním vlastnostem se dále může uplatnit při léčbě žaludečních vředů či dalších zánětlivých onemocnění a v kombinaci s nápomocí snižování LDL a zvyšování HDL cholesterolu v krvi pak může sloužit jako prevence arterosklerózy. Významný je i díky schopnosti bránit oxidační degradaci lipidů, které jsou obsažené v membránách, čímž buněčné membrány chrání a stabilizuje. Tímto prodlužuje životnost buněk, brání peroxidaci mitochondrií a spolu s napomáháním udržení iontové rovnováhy tak může bránit vzniku neurodegenerativním onemocněním jako je Parkinsonova choroba [14, 15].

Astaxanthin je významný přírodní antioxidant. Jeho síla se dá charakterizovat schopností zachytávat singletový kyslík (1O_2), inhibicí vzniku peroxidu a závislostí antioxidačních vlastností na parciálním tlaku vzdušného kyslíku. [12]

Singletový kyslík vzniká při přílišném ozáření – fotoreakcí a jakožto vysoce oxidační látka pak může oxidovat nukleové kyseliny, aminokyseliny i mastné kyseliny. Astaxanthin pak díky svým antioxidačním vlastnostem singletový kyslík zachytí a přebývajícím energii přemění

na teplo. Tato reakce molekulu astaxanthinu neovlivní a cyklus se tak může opakovat. Byly vneseny obavy, že silné antioxidanty jako astaxanthin mohou v některých případech fungovat jako pro-oxidanty, tedy látky přispívající ke vzniku oxidativního stresu. Tyto názory především zahrnovaly oblasti, kde byla tkáň ve velké míře vystavená kyslíku, konkrétně v plicích. Bylo však dokázáno, že prooxidační aktivita se u astaxanthinu objevila až při 100% kyslíku, v plicích, kde se obsah kyslíku pohybuje na 21%, tedy žádná prooxidační aktivita nehrozí. [16]

Díky své struktuře, karbonylové skupině na koncích základní karotenoidové kostry, jsou všechny xantofyly výborné ve vychytávání reaktivních forem kyslíku (ROS, Reactive Oxygen Species) a za pomoci ketonových skupin dokáží lépe stabilizovat radikály s uhlíkovým jádrem než karoteny. V mnoha studiích se ukázalo, že astaxanthin je výkonnějším antioxidantem než jiné karotenoidy a dokonce i lepší než vitamín E [12, 15].

4.1.2.2. **Canthaxanthin**

Canthaxanthin (β -karoten-4,4'-dion) je karotenoid, který, stejně jako astaxanthin a lutein, neslouží jako provitamin A, je však ceněn pro své antioxidační účinky. Jedná se o látku s účinky velmi podobnými účinkům astaxanthinu, nebylo jí ale věnováno tolik pozornosti. Obdobně jako astaxanthin má protizánětlivé účinky, urychluje totiž imunitní odezvu organismu, chrání membránové lipidy před peroxidací a vychytává singletový kyslík i volné kyslíkové radikály. Na rozdíl od astaxanthinu má konkrétní výsledky v oblasti prevence vzniku a zpomalení postupu rakoviny kůže. Prokázalo se, že dokáže organismus účinně bránit proti UV-B záření, což je jedna z možných příčin rakoviny kůže [17–19].

Poprvé byl izolován z houby *Cantharellus cinnabarinus*, dále se nachází v mořských rybách, zelenině či peří ptáků. Jako pigment se používá, podobně jako astaxanthin, v krmivu pro chov ryb či jako přírodní barvivo potravin. V dnešní době, kdy rostou obavy ze „syntetických potravin“ a hledají se vhodné přírodní alternativy, se je velká snaha najít ideálního producenta cantaxanthinu. Tím se v poslední době ukazují být právě mikroskopické řasy jako *Chromochloris zofingiensis*, které se dají pěstovat ve velkém bez potřeby přídavku ochranných látek jako herbicidy a pesticidy [20, 21].

4.2. Lipidy

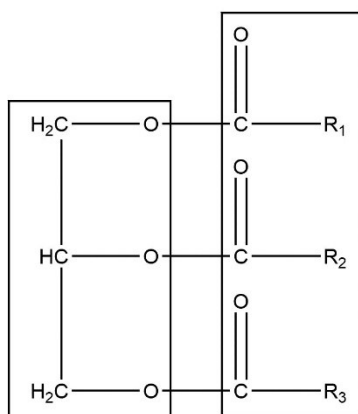
Lipidy jsou velmi široká a diverzifikovaná skupina přírodních látek, které se v přírodě vyskytují v mnoha formách. Jejich společným znakem je hydrofobicita, ačkoliv některé vykazují amfipatický charakter. Díky tomuto znaku jsou všechny lipidy dobře extrahovatelné

za pomoci organického nepolárního rozpouštědla. V řasách se obecně vyskytují jako důležité stavební jednotky membrán, zásobárny energie a signalizační molekuly. Na rozdíl od jiných organických látek nejsou lipidy striktně definovány svojí strukturou, ale rozpustností. [22]

U *Chromochloris zofingiensis* jsou výskytem nejdůležitější neutrální lipidy, především pak triacylglyceroly (TAG), dále se v poměrně velké míře vyskytují fosfolipidy a glykolipidy. Všechny tyto látky mají společný znak – esterové vazby, díky kterým mohou být hydrolyzovány. V menším množství se v buňce nachází i diacylglycerol a monoacylglycerol. Poměry množství těchto látek výrazně závisí na způsobu růstu řasy a je možné díky vhodnému způsobu pěstování tyto poměry upravovat dle preferencí pro výsledný produkt. Právě takto preferovaný produkt jsou lipidy ve formě TAG, jelikož fungují jako zásobárna uhlíku a energie. Na rozdíl od TAG jsou fosfolipidy stavební jednotkou buněčných membrán a glykolipidy fungují jako signalizační molekuly. Jak fosfolipidy, tak glykolipidy obsahují menší množství mastných kyselin, a ačkoliv se také dají využít k výrobě biopaliva, jsou pro to mnohem méně vhodné [23, 24].

Důvodem, proč jsou lipidy žádanou komoditou, je jejich obsah mastných kyselin. Mastné kyseliny jsou součástí fosfolipidů, mono-, di-, a především triacylglycerolů. Jedná se o látky s povětšinou nevětveným uhlíkatým řetězcem obsahujícím 12-20 uhlíkových atomů [25]. V *Ch. zofingiensis* se nacházejí mononenasyčené (MUFA – *MonoUnsaturated Fatty Acid*), tedy obsahující jednu dvojnou vazbu ve svém řetězci, polynenasycené (PUFA – *PolyUnsaturated Fatty Acid*), se dvěma a více dvojnými vazbami i nasycené mastné kyseliny (SFA – *Saturated Fatty Acid*) [24]. Svou saturací mastné kyseliny udávají výsledné vlastnosti vyráběného paliva. SFA mají lepší oxidativní stabilitu a oktanové číslo, ovšem na úkor odolnosti vůči chladu. UFA poskytují řešení tohoto problému, avšak samy o sobě vykazují horší oxidativní stabilitu a oktanové číslo. Řešením tak může být kompromis – využití MUFA kyseliny olejové (cis-oktadec-9-enová kyselina), které poskytuje stabilitu při nižších teplotách a zároveň dobré oxidativní vlastnosti a oktanové číslo, je tedy ideální pro výrobu biodieselu [5]. Kromě této ideální mastné kyseliny jsou však součástí TAG i další jako kyselina palmitová, kyselina linolová či kyselina linolenová, ty však nejsou pro výrobu natolik vhodné. Z těchto důvodů vyplývá, že ideální by bylo najít způsob, aby docházelo především k vytváření a akumulaci TAG s vysokým obsahem kyseliny olejové [22, 23]. Přestože *Chromochloris zofingiensis* splňuje ideální předpoklady k tomu být zdroje lipidů pro výrobu biopaliva, je nutné brát v úvahu, že tyto vlastnosti vykazuje při kultivaci v malém měřítku za optimálních podmínek a momentálně není proveditelné ji využívat průmyslově.

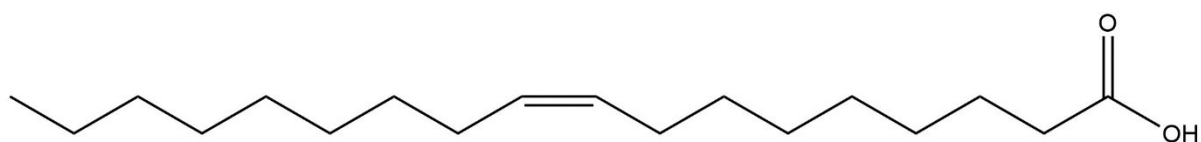
triacylglycerol



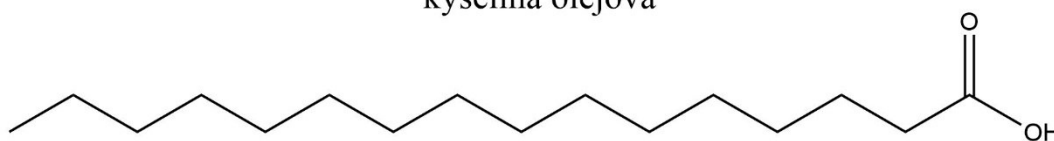
glycerol

3 mastné kyseliny

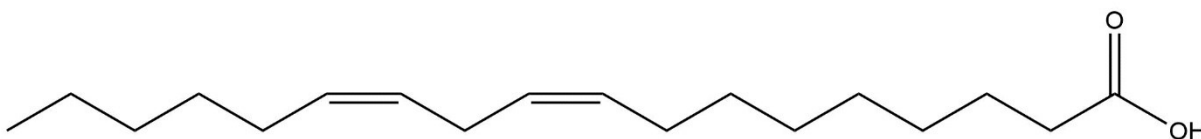
Obr. č. 5: Obecný vzorec triacylglycerolu, vytvořeno v ChemDraw



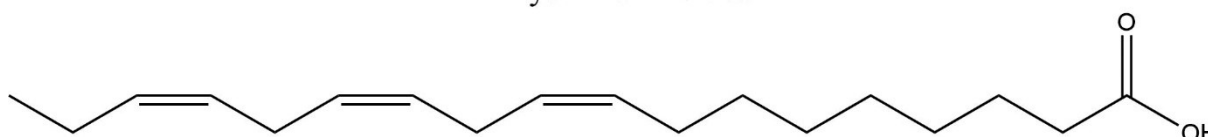
kyselina olejová



kyselina palmitová



kyselina linolová



kyselina linolenová

Obr. č. 6: Vzorce mastných kyselin vyskytujících se v TAG *Chromochloris zofingiensis*, vytvořeno v ChemDraw

Jako velká potenciální výhoda produkce biopaliva z řas oproti momentálně využívaným biopalivům z pěstovaných plodin je to, že při pěstování není nutné využití velkých ploch vhodných pro zemědělské účely a vysoké nároky na vodu se dají kompenzovat využíváním méně kvalitní vody, například slané či odpadní. Velkou výhodou fotoautotrofního růstu řas je využívání slunečního záření jako hlavního zdroje energie, což by ve výsledku mělo umožňovat

celkovou udržitelnost průmyslového pěstování [26]. Tato možnost ovšem není ideální, zejména kvůli nevhodnému složení výsledných lipidů. Nejvýnosnější metoda pěstování pro nejlepší výtěžek lipidů vhodných pro výrobu biodieselu se momentálně zdá být heterotrofní růst *Ch. zoofingiensis*, kdy zdrojem energie a uhlíku je glukóza. Tato varianta je značně finančně náročná [23]. Stále tedy probíhají snahy o nalezení varianty kultivace, při které by výnos u fotoautotrofního růstu byl srovnatelný s heterotrofním či nalezení jiného vhodného zdroje energie pro heterotrofní růst. Potenciální kompromis pro dobrý poměr ceny a výkonu je možnost mixotrofního pěstování, alternativním zdrojem energie pak může být melasa, jakožto odpadní produkt cukrovarů [27]. Obě varianty s sebou přináší snížení finanční náročnosti procesu, ani jedna z nich však není řešením, díky kterému by výroba biopaliv z řas ve velkém mohla konkurovat nyní využívaným způsobům jeho výroby [23, 25].

5. Stanovení karotenoidů

Pro stanovení karotenoidů se využívá především metody vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC) a to jak v normálním, tak v reverzním separačním módu. Pro detekci se většinou využívá detektoru s diodovým polem (DAD/PDA). V některých případech je detekce DAD spojena s hmotnostní spektrometrií (MS).

Karotenoidy se v základu skládají z osmi terpenových jednotek s konjugovaným systémem dvojných vazeb. Tato stavba hojně přispívá ke vzniku izomerů, což je ještě více podpořeno náchylností dvojných vazeb podléhat oxidaci a další izomeraci při vystavení změně podmínek (světlo, teplo, změna pH). V přírodě se karotenoidy nachází jak ve volné, tak v stabilnější esterifikované formě.

Takto složitá struktura je pak velmi náročná na analýzu, předchází ji tedy v některých případech saponifikace. Jedná se o úpravu, kdy dojde k odstranění mastných kyselin, lipidů a rozvolnění konjugovaných skupin přidávkem alkalického činidla. Saponifikací se také hydrolyzují esterifikované formy karotenoidů, které jsou poté ve své volné podobě, připraveny k analýze.

Saponifikace není užívána vždy, jelikož v některých případech může dojít k snížení signálu analytu, či strukturální změně. Záleží však i na jiných faktorech jako jsou: koncentrace alkalického činidla a délka jeho působení na vzorek. Karotenoidy se tedy analyzují jak ve své volné, tak esterifikované podobě.

Výsledné chromatogramy jsou následně poměrně složité, především kvůli výskytu izomerů, často také kvůli výskytu metabolitů. Pro určení konkrétních píků se užívá známých standardů, které však nejsou dostupné pro všechny známé formy karotenoidů. [28]

5.1. HPLC

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC, *High Performance Liquid Chromatography*) je v dnešní době jednou z nejčastěji používaných analytických metod. Jakožto separační metoda slouží nejen k separaci, ale i k izolaci či purifikaci složek vzorku. Technika je založena na rozdílné distribuci látek směsi mezi dvě nemísitelné fáze – mobilní a stacionární. Pro zajištění nemísitelnosti je stacionární fáze buď tuhou látkou, či kapalinou ukotvenou na pevném nosiči. Mobilní fáze pak za vysokého tlaku protéká kolonou naplněnou fází stacionární. Na separaci látek se tak podílejí obě fáze, ke kterým má analyt rozdílnou afinitu.

Dnes ve vysokoúčinné kapalinové chromatografii dominuje separační mód na opačných (obrácených) fázích (RP-HPLC, *Reverse Phase-HPLC*), která nahradila dříve objevenou chromatografii na normálních fázích (NP-HPLC, *Normal Phase-HPLC*). K tomu došlo mimo jiné z důvodu, že při NP-HPLC je větší množství nevýhod, jako práce s nevodnými a těkavými rozpouštědly. Stále se však užívá pro stanovení látek, které mají omezenou rozpustnost v jiných rozpouštědlech (lipofilní látky) a pro separaci izomerů.

5.1.1. NP-HPLC

U chromatografie s normálními fázemi je stacionární fáze polární a mobilní fáze nepolární, či méně polární než fáze stacionární. V principu pak lze říct, že čím více je látka polární, tím delší bude mít retenční čas. Retenční čas se zkracuje se zvyšující se polaritou mobilní fáze. Dále pak retence závisí na míře adsorpce, která je ovlivněna více faktory – polaritou látek, tvorbou vodíkových vazeb a sterickými efekty. U karotenoidů je obzvlášť významný rozdíl zadržování cis a trans izomerů, kdy větší funkční skupiny mohou zastiňovat polární skupinu a tím ve výsledku významně snížit retenci [29, 30].

Jako stacionární fáze se u NP-HPLC většinou používá čistý silikagel nebo na silikagel navázané polární fáze, které se liší svou polaritou. Mobilní fáze v normálním uspořádání se vybírá dle eluotropické řady rozpouštědel. Významnou roli zde hraje obsah vody v rozpouštědle, jelikož se mobilní fáze většinou skládá z binární směsi dvou rozpouštědel o různé eluční síle, tedy i rozdílné polaritě. Změnou koncentrace rozpouštědla tak lze snadno

měnit polaritu mobilní fáze, a tak i ovlivnit rozlišení či selektivitu dělení. Je tedy zřejmé, že se zvýšeným obsahem vody se snižují retenční objemy analytů a dochází ke snížení selektivity dělení v důsledku navazování vody na aktivní místa povrchu sorbentu. Z tohoto důvodu je ideální mobilní fáze s menším obsahem vody, čímž nastane rovnováha mezi vodou adsorbovanou a obsaženou v mobilní fázi. Při nedosažení rovnováhy se zhoršuje opakovatelnost experimentů [29, 30].

5.1.2. RP-HPLC

U chromatografie s opačnými fázemi je tomu s polaritou fází, jak již název napovídá, opačně. Mobilní fáze je zde polární a stacionární fáze má nepolární charakter. Narozdíl od NP-HPLC eluční síla mobilní fáze roste se snižující se polaritou organického rozpouštědla. Nejčastěji se tedy RP-HPLC používá k separaci nepolárních látek, ale dají se s její pomocí stanovovat i polární či nabitě látky. Velká výhoda RP-HPLC spočívá v její univerzálnosti a možnosti snadno tvořit gradientovou eluci změnou koncentrace organického rozpouštědla v mobilní fázi. Výhodná je v neposlední i řadě i nižší cena kolon [30, 31].

Stacionární fáze je složena ze dvou částí – nosiče a ligandu, kde nosič je tvořen silikagelem a ligand alkylovým či arylovým řetězcem. Nejčastěji se používá oktadecylový uhlíkatý řetězec (-C18) a oktylový uhlíkatý řetězec (-C8). Při stanovování karotenoidů však nejsou ideální, jelikož mají špatné rozlišení cis/trans izomerů. Jako vhodná alternativa je zde řetězec (-C30), který je vhodnější pro stanovování molekul s delším uhlíkatým řetězcem a nabízí výborné rozlišení geometrických izomerů, obzvláště pak u nepolárních látek. Tato práce se však v oblasti karotenoidů zabývá xantofyly (astaxanthin, canthaxanthin a lutein), které, jakožto polárnější látky, na -C30 koloně mají podobné rozlišení jako u kolony -C18, s tím rozdílem, že časy měření jsou mnohem delší [28, 30].

Jako mobilní fáze se u RP-HPLC používá roztok vody s organickým rozpouštědlem (methanol, acetonitril, tetrahydrofuran aj.). Pro karotenoidy se jako nejvhodnější rozpouštědla jeví acetonitril a methanol. Acetonitril vyniká svou nízkou viskozitou, malou absorpcí UV a obecně dobrým tvarem píku. Methanol je na druhou stranu levnější a méně toxická varianta, která jako bonus nabízí lepší zpětný výtěžek karotenoidů po odpaření rozpouštědla. Z těchto důvodů je ve většině mobilních fází užívaných v chromatografii karotenoidů alespoň jedna z těchto látek, často však mobilní fáze sestává i ze tří a více různých rozpouštědel. Samotná voda se nepoužívá, jelikož povrch stacionární fáze je hydrofobní. Přesto však práce s vodou, jako součástí mobilní fáze, významně snižuje cenu analýzy a předchází se problémům s nutností

kolony vysušovat. Složení mobilní fáze tak významně ovlivňuje účinnost dělení a retenci. Retence se zvyšuje s délkou uhlíkatého řetězce analytu, kdy delší řetězce a vyšší obsah objemných substituentů a aromatických jader mají retenci vyšší. Naopak ke snižování retence dochází při větším počtu iontových a polárních skupin, s narůstající polaritou pak snižování retence může dojít až bodu, kdy je eluční objem látky blízký mrtvému objemu kolony. Tomu se dá předejít potlačením disociace pomocí úpravy pH systému [28, 30, 32].

5.1.3. Způsoby detekce

Po úspěšné separaci je nutné jednotlivé karotenoidy určit a kvantifikovat. Toho se dá dosáhnout různými způsoby detekce. Zdaleka nejčastější je využití detektorů s diodovým polem (DAD, *Diode-Array Detector*; PDA, *Photodiode-Array Detector*) a UV-Vis detektorů, jež všechny spadají pod spektrofotometrické detektory. Bohužel u tak složitých látek jako jsou karotenoidy tento přístup často nestačí. Proto se chromatografie často doplňuje hmotnostní spektrometrickou detekcí (MS, *Mass Spectrometry*), která narozdíl od spektrofotometrických detektorů dokáže překonávat větší množství interferencí, dosahuje vyšší citlivosti a dodává informace o molekulární struktuře dané látky. Obzvláště pak pro xantofyly je MS významným detekčním postupem [28, 30, 33].

Důležitou roli ve stanovování karotenoidů hraje fakt, že tyto látky tvoří izomery. E/Z-izomery se významně liší ve svých fyzikálních i chemických vlastnostech, jmenovitě především polohou maxima absorpčního pásu. Tento problém se dá řešit dvěma způsoby. Je možné určovat a měřit pouze E-izomery, jakožto častější zástupce s výhodou, že většina standardů je právě v E-izomerickém uspořádání. Zde pak riskujeme podhodnocení celkového množství karotenoidů. Další možností je detekce s využitím isosbestického bodu. V isosbestickém bodě je absorpční koeficient všech stereoizomerů stejný, což umožňuje detekci totálního množství karotenoidů bez ohledu na jejich konformaci. Jedinou nevýhodou tohoto řešení je fakt, že vlnová délka isosbestického bodu je odlišná od vlnové délky maximální absorbance. Tím se riskuje snížená citlivost detekce [34].

Detektor diodového pole spadá mezi spektrometrické detektory a narozdíl od klasického UV-Vis spektrometru dokáže měřit celé spektrum vlnových délek nebo jeho zadaný výsek v reálném čase. Mezi další výhody patří možnost porovnávat výsledné spektrum s knihovnou spekter a detekovat látky při jakékoliv zvolené vlnové délce. Během jedné analýzy lze detekovat větší množství látek a pomocí porovnávání s knihovnou lze zjistit, zda v píku eluuje pouze jeden analyt či větší skupina nerozdělených látek. Jedná se o nedestruktivní typ

detektoru, nedochází zde tedy k chemické přeměně hledaných analytů, což umožňuje zařazení dalšího detektoru, nejčastěji MS, za DAD (PDA) [28, 32, 35].

Hmotnostně spektrometrická detekce se rozděluje na tři části. První je ionizace vzorku, následuje rozdělení iontů podle poměru m/z , kde „ m “ je hmotnost vzniklého iontu a „ z “ je jeho náboj, a jejich urychlení. Vše zakončuje detekce iontů spojená se zesílením signálů v detektoru.

K ionizaci vzorku se může využít velké množství ionizačních technik, bohužel žádná z nich není zcela univerzální. Jednotlivé ionizační techniky se dají rozdělit na měkké a tvrdé. Měkké ionizační techniky jsou šetrnější, při ionizaci dochází k vzniku protonovaných a deprotonovaných molekul a na rozdíl od tvrdých ionizačních technik se ve spektrech pozoruje minimum molekulových fragmentů. Mezi nepoužívanější měkké ionizační techniky s ohledem na stanovování karotenoidů, především pak xantofylů, jsou: MALDI (*Matrix Assisted Laser Desorption Ionization*), FAB (*Fast Atom Bombardment*), APCI (*Atmospheric pressure Chemical Ionization*), API-ESI (*Atmospheric Pressure Ionization-Electrospray Ionization*) a APPI (*Atmospheric Pressure Photoionization*). Zástupcem tvrdých ionizačních technik je EI (*Electron Ionization*), což je jediná technika, pro kterou existuje knihovna spekter. Elektronová ionizace pro svou aplikaci potřebuje těkavé látky, proto se používá především ve spojení s GC (*Gas Chromatography*). Dochází u ní k rozsáhlé fragmentaci a pro stanovování karotenoidů se v dnešní době příliš nepoužívá [28, 30].

MALDI a FAB fungují na velmi podobné principu. Obě techniky využívají matrici a vysokoenergetický paprsek částic k desorpci iontů z povrchu. MALDI jako ionizační zdroj využívá laser, zatímco FAB využívá paprsek atomů. Obě techniky se liší typem matrice a citlivostí, kdy MALDI je mnohonásobně citlivější a používá se k stanovování analytů z rostlin bez nutnosti předchozí úpravy (chromatografické separace). FAB je technika často využívaná pro sloučeniny s vysokou polaritou a nízkou těkavostí, které jsou tepelně a energeticky stálé. Prokázalo se, že FAB minimalizuje degradaci a změnu uspořádání karotenoidů [28, 36, 37].

Pravděpodobně jednou z nejužívanějších při detekci karotenoidů je ionizace za atmosférického tlaku, konkrétně pak ionizace elektrosprejem. Tato ionizační technika je jednoduchá, využitelná pro širokou oblast analytů, vysoce robustní a dá se použít i při vyšších průtocích mobilní fáze (nad 1 ml/min). Ionizace probíhá aplikací vysokého napětí na elektrodu, na jejímž hrotu se tvoří drobné nabitě kapičky analytu. Z tohoto aerosolu se proudem plynu o vysoké teplotě (okolo 300 °C) odpařuje rozpouštědlo a kapičky uvolňují ze svého povrchu ionty

analytu do plynné fáze. ESI je technika vhodná především pro látky s vyšší polaritou, při detekci látek slabě polárních se jako dobrá alternativa jeví APCI [28, 30, 35].

Chemická ionizace za atmosférického tlaku je nejvhodnější pro karotenoidy rozpustné v tucích, nedoporučuje se pro látky teplotně labilní. Pro svou schopnost tvořit pozitivně i negativně nabitě či protonované i deprotonované molekuly jak karotenů, tak xantofylů je velmi často používána při stanovování karotenoidů. Tato technika se zakládá na rozprašování mobilní fáze s analytem do vyhřívané komůrky, kde je plyn ionizován elektrony z koronového výboje. Vzniklé ionty kolidují s molekulami rozpouštědla, což vede ke vzniku sekundárních reakčních iontů, které následně ionizují molekuly analytu [28, 35].

Pro látky, které jsou velmi slabě polární nebo nepolární a nejsou dostatečně ionizovány předchozími metodami se používá APPI. Fotoionizace za atmosférického tlaku využívá UV záření, jehož fotony jsou pohlcovány molekulami analytu za vzniku iontů [28, 35].

Srdcem každého hmotnostního spektrometru je analyzátor. Zde dochází k separaci iontů na základě poměru m/z a jejich urychlení a fokusaci pro vstup do detektoru. Jedním z typů hmotnostních analyzátorů je kvadrupólový analyzátor, nejčastěji tvořen čtyřmi tyčemi s kruhovým průřezem připojenými na zdroj stejnosměrného i střídavého napětí. Průchod do detektoru je tak umožněn jen iontům o určitém poměru m/z , analyzátor tak funguje jako „hmotnostní filtr“. Další z možných analyzátorů je 3D a lineární iontová past (IT, *Ion Trap*). Iontová past v podstatě funguje na stejném principu jako kvadrupólový analyzátor, liší se ale svým uspořádáním. Na koncových elektrodách je vloženo napětí, které po nadávkování ionty uchovává a vypuzuje pomocí změny napětí na základě jejich poměru m/z . Dále se využívá průletový analyzátor (TOF, *Time Of Flight*), magnetický sektorový analyzátor či Orbitrap [38, 39].

5.2. Tenkovrstvá chromatografie

Tenkovrstvá chromatografie (TLC, *Thin Layer Chromatography*) patří do skupiny planárních technik. Jedná se o levnou a rychlou alternativu HPLC, vhodnou i pro detekci velmi zadržovaných složek, které by při vysokoúčinné kapalinové chromatografii mohly znehodnotit kolonu. Při stanovování karotenoidů se TLC využívá jako komplementární metoda pro HPLC, kde slouží jako předběžný test vzorku – udává tak hrubou představu o složení analyzované složky. Velkou výhodou zde hraje roli možnost paralelní analýzy vzorků, což s sebou nese velké časové úspory, kdy, na rozdíl od HPLC, celkový čas analýzy nezávisí na retenčním čase

nejvíce zadržované složky. Díky svým vlastnostem se TLC používá pro screeningové testy [29, 40].

Stacionární fáze u tenkovrstvé chromatografie je většinou tenká vrstva nanosená na skleněnou, plastovou či kovovou destičku. Mobilní fáze se pohybuje přes stacionární pomocí kapilárních sil, nebo za pomoci gravitace či rozdílu elektrických potenciálů.

Princip tenkovrstvé chromatografie spočívá v rozdílné afinitě analytů k stacionární fázi. Stejně jako u vysokoúčinné kapalinové chromatografie, retence může být ovlivněna složením mobilní fáze a dalšími vnějšími podmínkami, jako vlhkost vzduchu či teplota [40, 41].

Po aplikaci vzorků kapilárou na stacionární fázi je destička umístěna do uzavřené nádoby obsahující mobilní fázi – vyvíjecí roztok. Ten díky kapilárním silám vystoupá po destičce se stacionární fází a při své cestě s sebou stahuje i složky vzorku. Poté, co vyvíjecí roztok dojde zhruba do dvou třetin výšky stacionární fáze, je destička vyjmuta z nádoby a vývoj ukončen. Následuje detekce a celkové vyhodnocení vzniklého chromatogramu. Tomuto kroku může předcházet vizualizace. Vizualizace slouží k lokalizaci terčků analytu a existuje několik možností, jak ji dosáhnout. Jednou z nich je využití vlastní luminiscence vzorku, další možností je impregnace stacionární fáze fluorescenčním indikátorem. Analyt je následně lokalizován pod UV světlem. Pro lokalizaci organických látek lze využít silných nespecifických oxidantů (HNO_3 , KMnO_4 , H_2SO_4), které jsou sprejem nanoseny na destičku. Organické látky jsou určeny lokalizací vzniklých černých terčků. Lze využít i postřík destičky reagentem specifickým pro skupinu látek, či pro jednotlivé konkrétní látky. Často se využívá postřík ninhydrinem pro lokalizaci látek obsahujících ($-\text{NH}_2$) skupinu, nebo postřík komplexotvorným činidlem pro lokalizaci látek s ionty kovů [40].

5.3. Konkrétní metody pro stanovení astaxanthinu, luteinu a canthaxanthinu

Při stanovování karotenoidů v *Chromochloris zofingiensis* se často využívá již ověřených metod, které jsou podle potřeby upravovány. U analýzy pozorovaných látek zůstává vždy jedna věc stejná a tou je využití PDA detektoru. Vzhledem k faktu, že astaxanthin, canthaxanthin i lutein jsou barevné látky, jejichž určení lze nejlépe dosáhnout porovnáním výsledného chromatogramu s knihovnou spekter, je využití PDA detektoru naprosto logické. Maximum absorbance pro všechny tři zájmové látky se pohybuje okolo 470 nm, jen konkrétně lutein má další dvě oblasti maxim absorbancí a to okolo 420 a 450 nm. To usnadňuje volbu pásu spektrálních délek pro detekci [42].

5.3.1. Metoda M. Isabel Minguez-Mosquera

Tato metoda vychází z postupu uvedeném autory Mantoura a Levellyn v roce 1983 a ve své nynější podobě byla poprvé popsána v roce 1992. Jedná se o iontově párovou kapalinovou chromatografii na reverzních fázích s DAD detektorem. Tato technika využívá stejné mobilní i stacionární fáze s tím rozdílem, že v mobilní fázi je obsažené ion-párové činidlo. V případě metody, ze které vychází Minguez-Mosquera se ion-párové činidlo přidávalo i do vzorku. Metoda dle Minguez-Mosquera prokázala, že lze dosáhnout dobrých výsledků i bez tohoto přídatku. Eluční činidla sestávala zaprvé ze směsi vody, ion-párového činidla a methanolu v poměru 1:1:8 a zadruhé z roztoku methanolu s acetonem v poměru 1:1. Funkci ion-párového činidla plnily roztok acetátu amonného (1M) a tetrabutylamonných (TBA) kationtů (0,5M) ve vodě a gradientová eluce probíhala na koloně Spherisorb ODS-2 (25 cm × 4 mm, 5 μm) s průtokem 2 ml min⁻¹. Identifikace pak proběhla porovnáním retenčních časů a absorbních spekter s daty odpovídajících standardů [43, 44].

5.3.2. Metoda José A. Del Campo

José A. Del Campo vychází z metody M. Isabel Minguez-Mosquera, s tím rozdílem, že před vstříkem do chromatografu jsou vzorky centrifugovány. Dále pak využívá rozdílnou kolonu Nova-Pak C18 (3.9×150 mm, velikost částic 4 μm, velikost pórů 60 Å) a rozdílný průtok 1 ml/min [8, 45].

5.3.3. Metoda Jin Liu

Tato metoda je založena na metodě popsané Irene Baroli, stejně jako u předešlých metod zde však dochází k modifikaci. Chromatografie probíhá na Waters Spherisorb 5 μm ODS2 koloně (4,6 × 250 mm), rychlost průtoku je zde 1,2 ml/min, eluční gradient je lineární a přechází z roztoku acetonitrilu, methanolu a Tris-HCl v poměru 84:2:14 do roztoku methanolu s ethylacetátem v poměru 68:32. Při dosažení stoprocentní koncentrace druhého elučního činidla, chromatografie pokračuje 10 minut izokraticky. Stejně jako u předchozích metod jsou karotenoidy identifikovány porovnáním spekter se svými standardy [27, 46, 47].

5.3.4. Metoda Kim J. M. Mulders

Separace a indikace touto metodou je prováděna jako UHPLC (*Ultra High Performance Liquid Chromatography*) připojena, jako předchozí, k PDA detektoru, ale i k hmotnostnímu spektrometru s iontovou pastí vybavenému H-ESI (*Heated Electrospray Ionization*) sondou. Princip UHPLC leží v plnění kolon částicemi menšími než 2 μm, což vede k navýšení zpětného tlaku. Vysoký zpětný tlak v koloně (až 1000 bar oproti HPLC s 350 bar) sice vyžaduje speciální

instrumentaci, ale zato poskytuje výrazně lepší citlivost, vyšší účinnost separace, zkracuje dobu analýzy a vyžaduje menší objemy elučních činidel, čímž snižuje cenu analýzy. Uvedený typ hmotnostního spektrometru využívá k ionizaci elektrosprej a jako analyzátor má iontovou past. [30, 42].

Samotná kapalinová chromatografie probíhá na Aquity UPLC Shield C18 BEH koloně (2,1×150 mm, velikost částic 1,7 μm) s využitím předkolony pro zvýšení životnosti kolony za průtoku 300 μl/min. Všechny eluenty při této metodě obsahují 0,10% kyseliny mravenčí, jinak jsou odlišné. Využívá se 50% roztok acetonitrilu s demineralizovanou vodou, samotný acetonitril a samotný ethyl-acetát. Analýza proběhla s programem několika za sebou jdoucích lineárních gradientů s izokratickými fázemi. Výsledná data byla porovnána s daty standardů a látky byly určeny na základě retenčních časů, maxim absorbancí, hyperjemné struktury spekter atomů, hmotnosti a fragmentace [42, 48].

6. Stanovení lipidů

Pro stanovování lipidů se v podstatě vždy užívala tenkovrstvá kapalinová pro separaci neutrálních lipidů a následovala plynová chromatografie pro stanovení jednotlivých metylesterů mastných kyselin (FAME, *Fatty Acid Methyl Esther*). Před samotným stanovením FAME však muselo dojít k jejich vzniku. Toho se dosahovalo kyselou transesterifikací lyofilizovaných řasových buněk. Často se využívala metoda W.W. Christie, kdy se lyofilizované buňky přes noc inkubovaly se směsí toluenu a 1% kyseliny sírové v roztoku methanolu (1:2) za stálé teploty 50 °C. Vzniklé FAME byly poté extrahovány hexanem a připraveny k stanovení za pomoci plynové chromatografie [24].

6.1. Tenkovrstvá chromatografie

Pro stanovování lipidů se tenkovrstvá chromatografie používá výrazně častěji než pro stanovování karotenoidů. Zatímco u nich je používána pro určení konkrétních pigmentů ve vzorku, v případě lipidů se využívá téměř vždy pro základní separaci a identifikaci jednotlivých neutrálních lipidů. Výsledné neutrální lipidy byly identifikovány za pomoci co-chromatografie se standardy jednotlivých látek a v některých případech byly zjištěné triacylglyceroly recyklovány pro použití v dalším stanovení [5, 24].

6.2. Plynová chromatografie

Plynová chromatografie (GC, *Gas Chromatography*) je velmi často užívanou analytickou metodou pro separaci a stanovení organických sloučenin v složité matrici. Obzvláště nenahraditelná a ceněná je v případech stanovení těkavých látek a látek, které jsou schopny přejít do plynné fáze, aniž by došlo k degradaci jejich struktury. Mnohdy se užívá ve forenzních analýzách, zdravotnictví, potravinářství či právě pro účely výzkumu, jako je tomu v případě stanovení lipidů vyskytujících se v mikroskopických řasách. U *Ch. zofingiensis*, stejně jako u jiných řas, se rostlinné lipidy stanovují v podobě metylesterů mastných kyselin, které se připravují transesterifikací, transmetylací či saponifikací [49, 50].

Tato metoda je, stejně jako jiné typy chromatografie, separace složek mezi dvě rozdílné fáze na základě odlišné afinity stanovovaných složek ve směsi. Konkrétně se pak jedná o separaci plynů a par, které jsou unášeny za pomoci mobilní fáze kolonou obsahující stacionární fázi. V koloně se stacionární fázi dojde k rozdělení analytů a výstupem jsou jejich retenční časy vzorku, které by měly být v daném uspořádání shodné s retenčním časem jeho standardu. Za kolonou se vyskytuje detektor, který jednotlivé eluční zóny zaznamená a vytvoří výstup – chromatogram [41].

Na rozdíl od kapalinové chromatografie je mobilní fáze plynná, obvykle inertní či nereaktivní plyn, a stacionární fáze je kapalná. Kolony se stacionární fází se dále mohou dělit na náplňové a kapilární, kdy náplňové mají nižší separační schopnost. Náplňové kolony mají větší průměr (2–3 mm), ale jsou kratší (2–6 m), a jsou naplněny porézním inertním nosičem, tyto kolony jsou vyrobeny ze skla či kovu a naráz s nimi lze separovat okolo dvaceti složek vzorku. Oproti tomu kapilární kolony, tvořeny křemennou kapilárou, mají menší průměr (0,1 – 0,7 mm), jsou delší (10–100 m) a dále se dělí dle typu uchycení stacionární fáze na WCOT, *Wall-Coated Open Tubular* a SCOT, *Support-Coated Open Tubular*. WCOT, kolony s potaženou vnitřní stěnou mají stacionární fázi přichycenou a vnitřní stěně kapiláry a SCOT, mají na vnitřní stěně kapiláry tenkou vrstvu nosiče, na který je adsorbována stacionární fáze. Tyto kolony mají vyšší účinnost než náplňové kolony, obzvláště pak SCOT, díky které je možné analyzovat i více než 100 jednotlivých složek vzorku [41].

Dalším významným rozdílem od klasické kapalinové chromatografie je nutnost umístění GC kolony v termostatu, jelikož celá analýza významně závisí na teplotě, což vyplývá z faktu, že složky se zde nacházejí v plynném skupenství. Pro předcházení tepelné degradace vzorku je nutné před samotnou analýzou nejprve nastavit vhodný tepelný program. Průběh

stanovení může být izotermický, kdy se teplota nemění, dále pak je možné nastavení gradientového tepelného programu, kdy se teplota zvyšuje v průběhu celé analýzy, a nakonec i mnohastupňový program, kdy je teplota navyšována různě, v žádaných intervalech. Pro vzorek obsahující větší množství analytů je vhodné mít tepelný program, s průběžně se měnící teplotou [41, 50].

6.2.1. GC – FID

Stejně jako HPLC i GC má mnoho možností detekce. Jednou z nejvyžívanějších je právě plamenově ionizační detektor (FID, *Flame Ionization Detector*). Je to ideální způsob detekce látek obsahujících vazbu mezi uhlíkem a vodíkem, tudíž i ideálním způsobem detekce pro stanovení FAME. Principem je zavedení vzorku do plamene (obvykle směs vzduchu a vodíku) za pomoci nosného plynu. Nosný plyn musí být inertní a čistý, ideálně se jedná o helium, je však možné využívat i jiné, levnější varianty – dusík či argon. Při průchodu plamenem analyty tvoří ionty a elektrony, díky kterým začne mezi elektrodami se stejnosměrným napětím vést proud. Velikost proudu je proporcionálně úměrná množství spáleného analytu. U organických látek je pak signál v podstatě úměrný počtu atomů uhlíku [41, 50].

V případě stanovování lipidů v *Ch. zofingiensis* byl jako nosný plyn častěji použit dusík. Teplotní program na koloně byl nastaven na počáteční teplotu 170 °C a postupně se zvyšoval na 230 °C rychlostí 1 °C min⁻¹, jednalo se tedy o gradientový teplotní program. Při těchto stanoveních se využívali kapilární kolony. Samotné vyhodnocování výsledků probíhalo za pomoci porovnání vzniklých chromatogramů s autentickými standardy [23, 24, 27].

6.2.2. GC – MS

Jak již bylo řečeno, MS je velmi citlivá a vysoce selektivní metoda, obzvláště pak vhodná pro detekci nepolárních látek. Je to tedy jedna z nejlepších možností pro stanovování methyl-esterů mastných kyselin. Velkou výhodou je fakt, že na rozdíl od samotné plynové chromatografie, kde se látka identifikuje pouze dle retenčního času, hmotnostní spektrometrie podává informace o poměru m/z hledaného iontu. Jako vhodné kolony pro spojení s hmotnostní spektrometrií se obecně považují kapilární kolony, které mají oproti náplňovým výrazně menší průměr, spotřebovávají tedy menší množství mobilní fáze. Dále je pak upřednostňováno využívání helia jako mobilní fáze, nedochází totiž k její ionizaci [50, 51].

Jako interface je často využíváno otevřené rozhraní (Open-Split Interface), které je tvořeno T spojkou, tedy soustavou kapilár snižující průtok mobilní fáze a zároveň omezující vstup kyslíku do systému. Celý interface je vyhříván, aby nedocházelo ke kondenzaci látek. Další možnost je využití přímého rozhraní, tato technika se však dá použít pouze u dostatečně dlouhých kapilár. Kapilára je pak zavedená přímo do iontového zdroje, ale dané uspořádání je velmi náročné na výměnu kolony. [51] Alternativou může být i tryskový separátor, jehož výhoda spočívá ve zkoncentrování vzorku v mobilní fázi, pod podmínkou, že molární hmotnost stanovovaných látek je vyšší než molární hmotnost nosného plynu. Tato podmínka tedy podporuje využití helia jako nosného plynu [50].

Nejčastějším analyzátozem pro stanovení FAME se jeví kvadrupólový analyzátor, který má sice nižší rozlišení, ale zato je levnější a v kombinaci se separační technikou dosahuje dobrých výsledků. Jednotlivé FAME jsou identifikovány za pomoci knihovny spekter a kvantifikovány díky chromatogramu celkového iontového proudu. Kvantifikace s pomocí hmotnostní spektrometrie má přednost, nemusí totiž dojít k úplné separaci žádaných látek jako tomu musí být při kvantifikaci za použití pouze plynové chromatografie. Jedinou podmínkou je přítomnost alespoň jednoho charakteristického iontu, který se dá na chromatogramu sledovat [50].

7. Způsoby kultivace

Chromochloris zofingiensis stejně jako další mikroskopické řasy dokáže v určitých podmínkách akumulovat velké množství významných látek, jmenovitě karotenoidy a lipidy. Problémem komerčního pěstování této řasy však zůstává nepoměrně vysoká cena, která nemůže konkurovat dostupnějším či levnějším variantám pro získávání těchto látek. Proto je velká snaha nalézt způsob kultivace, který by jak snížil cenu průmyslového pěstování *Ch. zofingiensis*, tak navýšil výtěžky získávaných látek. Ačkoliv se touto problematikou zabývalo již mnoho studií, stále nebyl nalezen způsob, který by reálně umožňoval *Ch. zofingiensis* stát se alternativou nynějších zdrojů. Přestože mnoho výsledků se zdálo příznivých, je nutné brát v úvahu, že prováděné kultivace probíhaly v malých měřítcích. Aplikace takto získaných strategií na průmyslové měřítko doposud nebyla zavedena, zejména z finančních důvodů [52], [26].

Faktory ovlivňující výtěžky a celkovou biomasu se dají rozdělit na dva typy – nutriční a fyzikální. Mezi nutriční faktory se řadí limitace dusíkem či zdroj uhlíku, fyzikálními faktory

jsou pak salinita média nebo míra ozáření. Další významnou roli hraje strategie kultivace, kde nejčastěji jsou využívány batch kultivace, fed-batch kultivace a semi-kontinuální kultivace [52].

Vliv na růst kultury má také teplota a pH média, kdy ideální teplota pro kultivaci řas je 20–30 °C. *Chromochloris zofingiensis* je schopna snášet poměrně široké spektrum pH (5,5 – 8,5), nízké pH (5,5) dokonce přispívá, jakožto stresová situace, k tvorbě a akumulaci astaxanthinu [13].

7.1. Batch kultivace

Jedná se o nejběžnější způsob kultivace, kdy se řasové inokulum přenese do média s předem danou koncentrací živin bez dodatečného doplňování. Médium se nachází v nádobě, kterou bývá ve většině případů fotoreaktor představován skleněným sloupcem, stačí však i konická baňka. Médium je nutné provzdušňovat, aby byl udržen stálý přísun uhlíku pro fotosyntézu, čehož může být dosaženo probubláváním vzduchem s CO₂. Instrumentální jednoduchost, šetření médiem i živinami a možnost uchování části kultury pro další naočkování jsou velkými výhodami. Nevýhodou ovšem je s časem klesající koncentrace živin v médiu vedoucí ke snížení a postupně k úplné zastavení růstu [5, 53].

7.2. Fed-batch kultivace

Zde je v průběhu kultivace kontinuálně či střídavě přidáváno koncentrované médium, jsou tedy průběžně přidávány živiny. Tímto se eliminuje problém nedostatku živin, i zde však s postupem času dochází k zpomalení růstu z důvodu akumulace inhibičních látek. Objem média není během kultivace konstantní, závisí na koncentrovaných přídavcích. Tato strategie je nejčastěji průmyslově používaná a řasová kultura je sklízena na konci kultivačního cyklu [53].

7.3. Kontinuální a semi-kontinuální kultivace

Při kontinuální kultivaci je průběžně dodáváno čerstvé médium do kultury, zatímco stará kultura je odebírána. Tím se předchází akumulaci inhibičních látek a depleci látek nutných pro růst. Dá se tedy dosáhnout kontinuálního růstu, avšak na úkor větší spotřeby média. Semi-kontinuální kultivace se od kontinuální kultivace odlišuje diskrétním dodáváním čerstvého média. Na rozdíl od kontinuálního dodávání se zde čerstvé médium přivádí s časovými intervaly, ve kterých kultura roste. Umožní se tak periodické sklizení části vzrostlé kultury, kdy je zbylé kultuře opět dodáno čerstvé médium a cyklus se opakuje. Tato strategie nabízí vyšší

životnost kultur a ve výsledku vyšší výnosy než batch-kultivace, není však dlouhodobě udržitelná [52, 53].

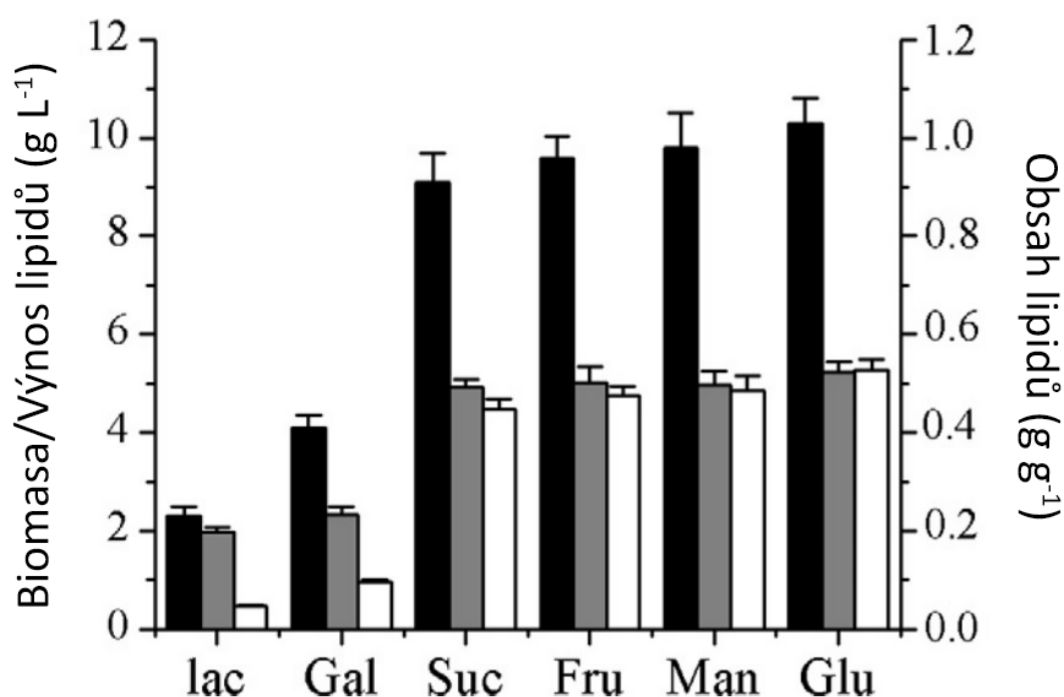
7.4. Nutriční faktory

Pravděpodobně nejvýznamnějším nutričním faktorem ovlivňujícím nárůst biomasy a výtěžek žádaných látek je limitace dusíkem. Běžnými zdroji dusíku jsou dusičnany, amoniak a močovina. Přirozeně je amoniak využíván řasami a sinicemi preferenčně, působí pak inhibičně na příjem a asimilaci dusičnanů. V optimálních koncentracích dokonce řasy využívající amoniak vykazují vyšší nárůst biomasy než řasy využívající dusičnany či močovinu. Ve vyšších koncentracích je však toxický a inhibuje růst kultury. Amoniak se ve studiích nevyužíval, jelikož v nepufrovaných systémech významně snižuje pH, což vede k inhibici růstu. Ke snížení pH dochází uvolňováním H^+ iontů při zužitkovávání amoniaku řasami. Naopak při využívání dusičnanu se pH média zvyšuje, jelikož jsou uvolňovány OH^- ionty. Při použití močoviny se pH významně nemění [54]. Nejvyužívanějším zdrojem dusíku ve studiích se zdají být dusičnany. Dusíková limitace až hladovění je jednou ze stresových situací, které napomáhají tvorbě a akumulaci sekundárních karotenoidů, především pak astaxanthinu a neutrálních lipidů. Problémem využití tohoto faktoru je významné snížení růstu po vyčerpání dusíku v médiu. Odpovědí na tento problém může být právě semi-kontinuální kultivace s omezeným přísunem dusíku [5, 13]. Naopak pro kultivaci *Ch. zofingiensis* za účelem získávání primárních karotenoidů, jmenovitě luteinu, je vhodné navýšení dusíku v médiu. Prokázalo se, že při vysokých koncentracích dusíku je dosahováno nejvyšších hladin luteinu v buňce. Z těchto závěrů vyplývá, že astaxanthin a lutein sledují v oblasti koncentrace dusíku opačný trend, není tedy možné souběžně kultivovat *Ch. zofingiensis* pro obě tyto látky [8].

S obsahem dusíku v médiu úzce souvisí další faktor výrazně ovlivňující sekundární karotenoidy a lipidy a tím je poměr C/N. Zdroj uhlíku v tomto poměru se liší dle způsobu růstu řasy. Při autotrofním růstu je jím vzdušný CO_2 , zatímco při heterotrofním růstu se většinou jedná o glukózu či acetát. Při podání vyšší koncentrace acetátu než 0.4 g l^{-1} však došlo k snížení růstu, není tedy vhodný pro kultivaci *Ch. zofingiensis*. Vliv C/N poměru byl pozorován při heterotrofním růstu, bez přístupu světla. Eliminace nutnosti dodávání umělého světla je zajímavou možností, protože by výrazně snížila finanční nároky. Obecně lze říci, že vyšší poměr C/N indukuje biosyntézu astaxanthinu. Předpokládá, že glukóza poskytuje velké množství energie a uhlíkový základ pro tvorbu sekundárních karotenoidů a nižší přísun dusíku způsobuje inhibici tvorby primárních pigmentů, a naopak nepřímo podporuje syntézu

sekundárních karotenoidů. Je tedy žádoucí v médiu při heterotrofním pěstování limitovat dusík a zároveň mít nadbytek zdroje uhlíku [6].

Zdrojem uhlíku při heterotrofním či mixotrofním způsobu kultivace je tedy, jak již bylo řečeno, glukóza. Jeví se jako nejvhodnější možnost, jelikož při pěstování ve tmě vykazuje nejvyšší nárůst biomasy, nejvyšší koncentraci lipidů v buňce i nejvyšší výtěžky. Tento zdroj je však příliš finančně náročný, aby bylo možné kultivaci takto provozovat, byly tedy snahy nalézt alternativní zdroje – jiné cukry. Vhodnými kandidáty pro kultivaci ve tmě jsou manóza, fruktóza a sacharóza. Využití těchto cukrů při kultivaci vyústilo v jen lehce sníženém růst buněk a nižším obsahu žádaných produktů. Jejich cena však není dostatečně nízká, aby posloužily jako samotné zdroje uhlíku [23].



Obr. č. 7: Buněčná biomasa (černý sloupec), obsah lipidů (šedý sloupec) a výtěžek lipidů (bílý sloupec) *Chromochloris zofingiensis* při batch-kultivaci s 50 g L⁻¹ různých cukrů. Lac, laktóza; Gal, galaktóza; Suc, sacharóza; Fru, fruktóza; Man, manóza; Glu, glukóza. Převzato a upraveno [23].

Řešením by mohlo být využití odpadního produktu z cukrovarů – melasy. Melasa ve velké míře obsahuje glukózu, sacharózu a fruktózu, cukry vhodné pro heterotrofní kultivaci, její nevýhodou je, že obsahuje i ionty kovů a nečistoty. Tyto nežádoucí příměsi způsobují snížený růst, dají se však odstranit úpravou iontově výměnným polymerem. Takto upravená melasa je již vysoce efektivní zdroj uhlíku, úprava však opět znamená finanční zátěž. Relativně

levná cesta k dosažení dobrých výsledků kultivace bez nutnosti předchozích úprav melasy je semi-kontinuální způsob kultivace. Bylo prokázáno, že při přidavcích nízké koncentrace surové melasy by se dalo dosáhnout optimálních výsledků. Není ovšem známo, jaký by využívání takto získávaného astaxanthinu mělo vliv při dlouhodobém užívání. Obecně melasa přispívá k vyšší koncentraci a výnosům astaxanthinu a neutrálních lipidů, především TAG, i k většímu nárůstu biomasy [27]. Problémem při pěstování na organických médiích je často kontaminace bakteriemi a plísněmi, jejichž růst není na anorganických médiích podporován [13].

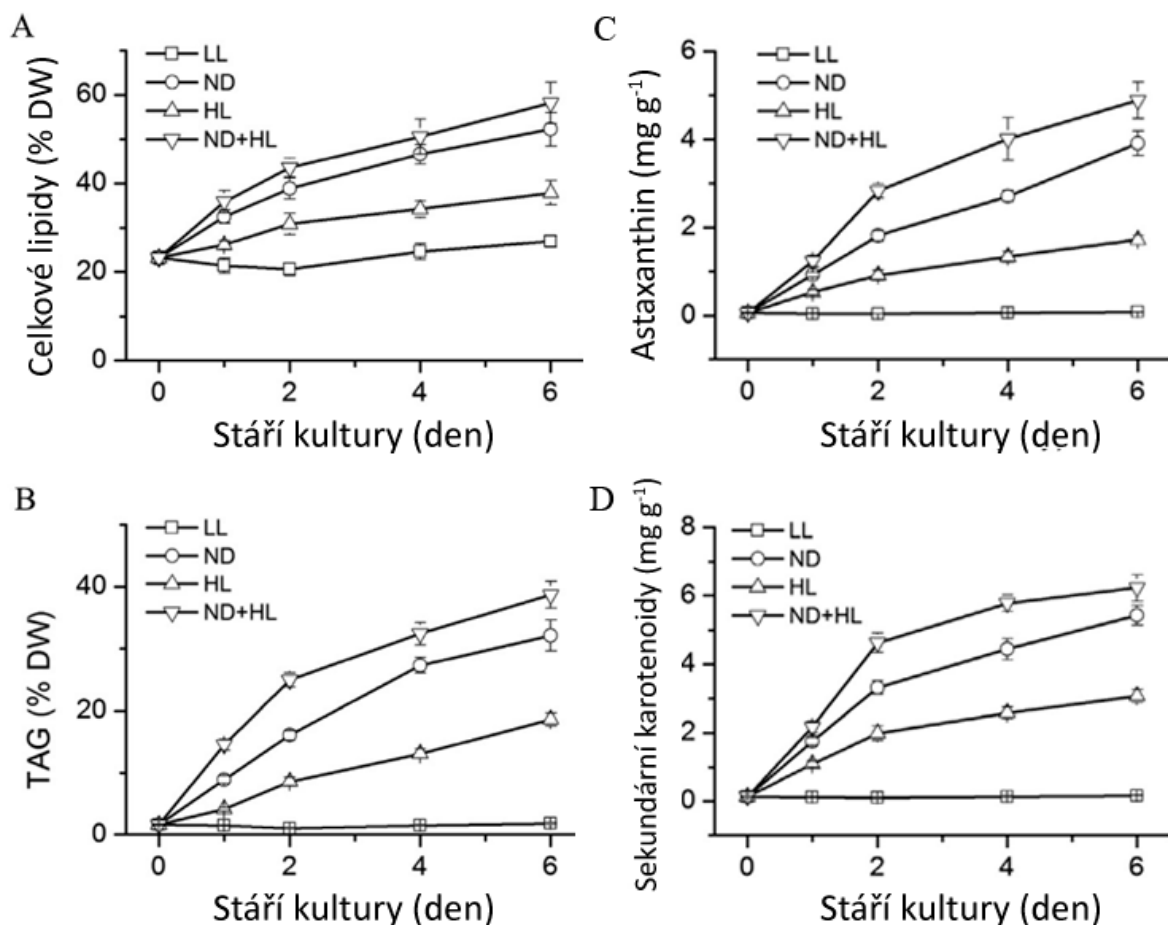
7.5. Fyzikální faktory

Nejvýznamnějším fyzikálním faktorem a zároveň jedním z nejvýznamnějších faktorů pro kultivaci obecně je míra ozáření kultury. Mnoho studií se zabývalo efektem, který světlo na kultivaci *Ch. zofingiensis* má. Ve snaze navýšit výtěžky astaxanthinu či lipidů byla tedy tato řasa pěstována heterotrofně ve tmě, jelikož se prokázalo, že heterotrofní růst je výnosnější než fotoautotrofní, při kterém buňky rostly pomaleji [5].

Nízká míra osvětlení je další ze stresových situací, které navozují vyšší akumulaci žádoucích metabolitů, stejně tak však může stres navodit i vysoká míra ozáření. Vystavení kultury silnému světlu vedlo k rychlejšímu růstu a podpoření biosyntézy astaxanthinu, který řase slouží jako ochrana před oxidativním stresem způsobeným příliš silným zářením. Nízké osvětlení utlumuje primární metabolismus a podpoří tvorbu sekundárních karotenoidů na úkor primárních [13].

Při zaměření kultivace pro získávání lipidů se má za to, že jsou vhodnější heterotrofní kultivace ve tmě, protože světlo podporuje proliferaci buněk a tím snižuje obsah lipidů v buňce. Na druhou stranu však světlo významně navyšuje biomasu a urychluje růst buněk, je tedy nutné v případné kultivaci najít kompromis [55].

Nejvhodnější způsob kultivace se momentálně zdá být kombinace vysokého ozáření a dusíkové limitace. Takto pěstovaná kultura pak představuje ideální kompromis, kdy je stále poměrně vysoké množství biomasy a zároveň je podpořena akumulace TAG a astaxanthinu. Tento závěr však pravděpodobně nikdy nebude aplikovatelný v průmyslu, ale zůstane jen v laboratorním měřítku, jelikož tato strategie je velmi finančně náročná. Předpokládá se, že pokud bude *Ch. zofingiensis* pěstována ve velkém, bude muset být odkázána na fotoautotrofní kultivaci s využitím vzdušného CO₂ jako zdroje uhlíku pro fotosyntézu [5, 26].



Obr. č. 8: Množství lipidů a karotenoidů za různých stresových podmínek. A, celkové množství lipidů; B, množství TAG; C, množství staxanthinu; D, množství sekundárních karotenoidů (LL, *Low Light* – nízké ozáření; ND, *Nitrogen Deprivation* – limitace dusíku; HL, *High Light* – vysoké ozáření; DW, *Dry Weight* – sušina). Převzato a upraveno [5].

Dalším poměrně významným fyzikálním faktorem je salinita. Prokázalo se, že stejně jako dusíkové hladovění je zvýšení salinity stresová situace přínosná pro akumulaci sekundárních karotenoidů a neutrálních lipidů. Při kultivaci s vyšší salinitou za nízkého osvětlení byly registrovány vyšší koncentrace canthaxanthinu, jehož produkce, jak se zdá, není závislá na světle. Hypoteticky by tedy bylo možné využít tuto vlastnost *Ch. zofingiensis* k získávání canthaxanthinu, jelikož využívání slané vody bez nutnosti dodávání světla je mnohem ekonomicky výhodnější. Problém opět nastává v oblasti růstu *Ch. zofingiensis* – se zvyšující se koncentrací soli (NaCl) dochází k poklesu růstu. Tento fenomén byl zaznamenán u několika různých řas [52].

8. Závěr

Předložená bakalářská práce shrnuje dostupné informace o fylogenezi, morfologii a životním cyklu řasy *Chromochloris zofingiensis*. Tento organismus by se dal potenciálně využívat jako producent biotechnologicky významných látek. První část práce proto popisuje jednotlivé produkované látky – karotenoidy (lutein, astaxanthin, canthaxanthin) a lipidy, kde se zabývá jejich významem, strukturou, výskytem a momentálním způsobem získávání. Práce se také pokouší nastínit výhody plynoucí z využití *Ch. zofingiensis* jakožto alternativního producenta těchto látek.

Další část práce je věnována metodice stanovování produkovaných metabolitů. V současné době nebyla ustanovena jednotná ideální metoda pro stanovování jednotlivých látek, práce tedy poskytuje stručné shrnutí nejvyužívanějších metod spolu se zaměřením na určité konkrétní postupy.

Poslední část se zabývá způsoby kultivace řas a faktory jež významně ovlivňují růst i produkci, akumulaci a výtěžek žádaných látek. Bylo prokázáno, že výsledky pěstování výrazně závisí na užitých kultivačních podmínkách, a tuto závislost je možné využít pro potenciální ovlivnění výtěžku karotenoidů či lipidů. Ačkoliv by se tedy dalo soudit, že lze dosáhnout optimálních podmínek pro kultivaci *Ch. zofingiensis*, je nutno brát v potaz, že aplikace takto získaných postupů na průmyslové měřítko je zatím finančně příliš náročná.

Tato situace by se dala řešit kompromisem, kdy se zvolí méně nákladný kultivační postup za cenu horšího výtěžku. Předpokládá se však, že pro reálné využití *Ch. zofingiensis* jako zdroje karotenoidů či lipidů by bylo nutné, aby se řasa kultivovala fotoautotrofně bez nutnosti umělého dodávání světla.

Osobně se domnívám, že by bylo vhodné se více zaměřit na možnost kultivovat *Ch. zofingiensis* za pomoci odpadních produktů jako je melasa a současně využívat vodu nižší kvality (s vyšší salinitou). Pokud by se našel způsob efektivního zužitkování nepotřebných produktů či odpadu pro pěstování této řasy, výrazně by to snížilo finanční nároky a potenciálně by bylo možné tak získávat biotechnologicky významné látky.

Ve své diplomové práci bych se ráda zabývala dalšími druhy mikroskopických řas, které mají potenciál v oblasti biotechnologií, zaměřit bych se chtěla především na mikroskopické řasy produkující sekundární karotenoidy a jejich reakce na změny kultivačního postupu.

9. Literatura

- [1] F. Hindák, “Taxonomic position of the chlorococcal alga *Chlorella zofingiensis*,” *Arch. Hydrobiol. Suppl. Algal. Stud.*, vol. 40, pp. 13–23, 1982.
- [2] K. Fučíková and L. A. Lewis, “Intersection of *Chlorella*, *Muriella* and *Bracteacoccus*: Resurrecting the genus *Chromochloris* Kol et Chodat (Chlorophyceae, Chlorophyta),” *Fottea*, vol. 12, no. 1, pp. 83–93, 2012.
- [3] T. Kalina and M. Punčochářová, “Taxonomy of the subfamily Scotielloccystoideae,” 1973.
- [4] M. S. Roth *et al.*, “Chromosome-level genome assembly and transcriptome of the green alga *Chromochloris zofingiensis* illuminates astaxanthin production,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 21, pp. E4296–E4305, 2017.
- [5] J. Liu, X. Mao, W. Zhou, and M. T. Guarnieri, “Simultaneous production of triacylglycerol and high-value carotenoids by the astaxanthin-producing oleaginous green microalga *Chlorella zofingiensis*,” *Bioresour. Technol.*, vol. 214, pp. 319–327, 2016.
- [6] P. F. Ip and F. Chen, “Production of astaxanthin by the green microalga *Chlorella zofingiensis* in the dark,” *Process Biochem.*, vol. 40, no. 2, pp. 733–738, 2005.
- [7] M. Gong and A. Bassi, “Carotenoids from microalgae: A review of recent developments,” *Biotechnology Advances*, vol. 34, no. 8, pp. 1396–1412, Dec-2016.
- [8] J. A. Del Campo, H. Rodríguez, J. Moreno, M. Á. Vargas, J. Rivas, and M. G. Guerrero, “Accumulation of astaxanthin and lutein in *Chlorella zofingiensis* (Chlorophyta),” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 64, no. 6, pp. 848–854, 2004.
- [9] K. E. Pallett and A. J. Young, *Carotenoids*. Elsevier Inc., 2017.
- [10] J. M. Fernández-Sevilla, F. G. Acién Fernández, and E. Molina Grima, “Biotechnological production of lutein and its applications,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 86, no. 1, pp. 27–40, 2010.
- [11] A. Kijlstra, Y. Tian, E. R. Kelly, and T. T. J. M. Berendschot, “Lutein: More than just a filter for blue light,” *Progress in Retinal and Eye Research*, vol. 31, no. 4, pp. 303–315, 2012.

- [12] H. Jackson, C. L. Braun, and H. Ernst, "The Chemistry of Novel Xanthophyll Carotenoids," *Am. J. Cardiol.*, vol. 101, no. 10 SUPPL., 2008.
- [13] J. Liu, Z. Sun, H. Gerken, Z. Liu, Y. Jiang, and F. Chen, "Chlorella zofingiensis as an alternative microalgal producer of astaxanthin: Biology and industrial potential," *Mar. Drugs*, vol. 12, no. 6, pp. 3487–3515, 2014.
- [14] M. Guerin, M. E. Huntley, and M. Olaizola, "Haematococcus astaxanthin: Applications for human health and nutrition," *Trends in Biotechnology*, vol. 21, no. 5, pp. 210–216, 2003.
- [15] K. C. Chan, M. C. Mong, and M. C. Yin, "Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells," *J. Food Sci.*, vol. 74, no. 7, pp. 225–231, 2009.
- [16] N. I. Krinsky, "The antioxidant and biological properties of the carotenoids," in *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1998, vol. 854, pp. 443–447.
- [17] M. M. Mathews-Roth, "Antitumor activity of β -carotene, canthaxanthin and phytoene," *Oncol.*, vol. 39, no. 1, pp. 33–37, 1982.
- [18] P. Palozza and N. I. Krinsky, "Astaxanthin and Canthaxanthin in a Membrane Model," *Arch. Biochem. Biophys.*, vol. 297, no. 2, pp. 291–295, 1992.
- [19] A. Bendich and S. S. Shapiro, "Effect of β -carotene and canthaxanthin on the immune responses of the rat," *J. Nutr.*, vol. 116, no. 11, pp. 2254–2262, 1986.
- [20] H. Bin Li, K. W. Fan, and F. Chen, "Isolation and purification of canthaxanthin from the microalga Chlorella zofingiensis by high-speed counter-current chromatography," *J. Sep. Sci.*, vol. 29, no. 5, pp. 699–703, 2006.
- [21] J. C. Bart and C. H. MacGillavry, "The crystal and molecular structure of canthaxanthin," *Acta Crystallogr. B.*, vol. 24, no. 12, pp. 1587–1606, 1968.
- [22] J. McMurry, *Organic Chemistry*, 9. edition. Cengage Learning, 2016.
- [23] J. Liu *et al.*, "Production potential of Chlorella zofingiensis as a feedstock for biodiesel," *Bioresour. Technol.*, vol. 101, no. 22, pp. 8658–8663, 2010.
- [24] J. Liu, J. Huang, Z. Sun, Y. Zhong, Y. Jiang, and F. Chen, "Differential lipid and fatty

- acid profiles of photoautotrophic and heterotrophic *Chlorella zofingiensis*: Assessment of algal oils for biodiesel production,” *Bioresour. Technol.*, vol. 102, no. 1, pp. 106–110, 2011.
- [25] P. Příbyl, V. Cepák, and V. Zachleder, “Production of lipids in 10 strains of *Chlorella* and *Parachlorella*, and enhanced lipid productivity in *Chlorella vulgaris*,” *Appl. Microbiol. Biotechnol.*, vol. 94, no. 2, pp. 549–561, 2012.
- [26] D. Ryan Georgianna and S. P. Mayfield, “Exploiting diversity and synthetic biology for the production of algal biofuels,” *Nature*, vol. 488, no. 7411, pp. 329–335, 2012.
- [27] J. Liu, J. Huang, Y. Jiang, and F. Chen, “Molasses-based growth and production of oil and astaxanthin by *Chlorella zofingiensis*,” 2012.
- [28] K. T. Amorim-Carrilho, A. Cepeda, C. Fente, and P. Regal, “Review of methods for analysis of carotenoids,” *TrAC - Trends in Analytical Chemistry*, vol. 56, pp. 49–73, 2014.
- [29] C. F. Poole and S. K. Poole, *Chromatography today*. Elsevier, 1991.
- [30] L. Nováková, M. Douša, and et al., *Moderní HPLC separace v teorii a praxi I.pdf*. Praha, 2013.
- [31] I. Molnar and C. Horvath, “Reverse phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high performance liquid chromatography,” *Clin. Chem.*, vol. 22, no. 9, pp. 1497–1502, 1976.
- [32] L. Nováková and M. Douša, *Moderní HPLC separace v teorii a praxi II*. Praha, 2013.
- [33] C. H. Azevedo-Meleiro and D. B. Rodriguez-Amaya, “Confirmation of the identity of the carotenoids of tropical fruits by HPLC-DAD and HPLC-MS,” *J. Food Compos. Anal.*, vol. 17, no. 3–4, pp. 385–396, 2004.
- [34] K. Mitrowska, U. Vincent, and C. von Holst, “Separation and quantification of 15 carotenoids by reversed phase high performance liquid chromatography coupled to diode array detection with isosbestic wavelength approach,” *J. Chromatogr. A*, vol. 1233, pp. 44–53, 2012.
- [35] R. P. . Scott, *Liquid Chromatography Detectors*. Amsterdam: Elsevier, 1986.

- [36] D. J. Harvey, “Matrix-assisted laser desorption/ionization mass spectrometry of carbohydrates.,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 18, no. 6, pp. 349–450.
- [37] K. L. Rinehart, “Fast atom bombardment mass spectrometry,” *Science (80-.)*, vol. 218, no. 4569, pp. 254–260, Apr. 1982.
- [38] J. M. Thompson, *Mass spectrometry*. Hoboken, NJ, USA: John Wiley & Sons, Inc., 2017.
- [39] R. E. March, “Ion Trap Mass Spectrometers,” in *Encyclopedia of Spectroscopy and Spectrometry*, Elsevier, 2016, pp. 330–337.
- [40] R. Kellner, J.-M. Mermet, M. Otto, M. Valcárcel, and H. M. Widmer, *Analytical Chemistry*, Second. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim.
- [41] K. Záruba *et al.*, *Analytická chemie (1. díl)*. Praha: VŠCHT, 2016.
- [42] D. E. Martens *et al.*, “Nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis* produces astaxanthin, ketolutein and their fatty acid esters: a carotenoid metabolism study,” *J. Appl. Phycol.*, vol. 27, no. 1, pp. 125–140, 2014.
- [43] M. Isabel Minguez-Mosquera, B. Gandul-Rojas, and M. Lourdes Gallardo-Guerrero, “Rapid Method of Quantification of Chlorophylls and Carotenoids in Virgin Olive Oil by High-Performance Liquid Chromatography,” 1992.
- [44] J. Ståhlberg, “CHROMATOGRAPHY: LIQUID | Ion Pair Liquid Chromatography,” in *Encyclopedia of Separation Science*, 2000.
- [45] J. A. Del Campo, J. Moreno, H. Rodríguez, M. A. Vargas, J. Rivas, and M. G. Guerrero, “Carotenoid content of chlorophycean microalgae: factors determining lutein accumulation in *Muriellopsis* sp. (Chlorophyta),” 2000.
- [46] I. Baroli *et al.*, “Photo-oxidative Stress in a Xanthophyll-deficient Mutant of *Chlamydomonas*,” *J. Biol. Chem.*, vol. 279, no. 8, pp. 6337–6344, 2004.
- [47] J. Liu, Y. Zhong, Z. Sun, J. Huang, G. Sandmann, and F. Chen, “One amino acid substitution in phytoene desaturase makes *Chlorella zofingiensis* resistant to norflurazon and enhances the biosynthesis of astaxanthin,” *Planta*, vol. 232, pp. 61–67, 2010.

- [48] K. J. M. Mulders, J. H. Janssen, D. E. Martens, R. H. Wijffels, and P. P. Lamers, “Effect of biomass concentration on secondary carotenoids and triacylglycerol (TAG) accumulation in nitrogen-depleted *Chlorella zofingiensis*,” *Algal Res.*, vol. 6, no. PA, pp. 8–16, 2014.
- [49] E. G. Bligh and W. J. Dyer, “A rapid method of total lipid extraction and purification,” *Can. J. Biochem. Physiol.*, vol. 37, no. 8, pp. 911–917, 1959.
- [50] O. D. Sparkman, Z. E. Penton, and F. G. Kitson, *Gas Chromatography and Mass Spectrometry*, Second. Academic Press, 2011.
- [51] K. Záruba, V. Král, O. Mestek, P. Řezanka, V. Setnička, and Š. Urban, *Analytická chemie (2. díl)*. Praha: VŠCHT, 2016.
- [52] J. R. Benavente-Valdés, C. Aguilar, J. C. Contreras-Esquivel, A. Méndez-Zavala, and J. Montañez, “Strategies to enhance the production of photosynthetic pigments and lipids in chlorophyceae species,” *Biotechnol. Reports*, vol. 10, pp. 117–125, 2016.
- [53] Richmond Amos, Ed., *Handbook of Microalgal Culture: Biotechnology and Applied Phycology*. Blackwell Publishing.
- [54] Y. Collos and P. J. Harrison, “Acclimation and toxicity of high ammonium concentrations to unicellular algae,” *Mar. Pollut. Bull.*, vol. 80, no. 1–2, pp. 8–23, 2014.
- [55] T. Chen *et al.*, “Light attenuates lipid accumulation while enhancing cell proliferation and starch synthesis in the glucose-fed oleaginous microalga *Chlorella zofingiensis*,” *Sci. Rep.*, vol. 5, no. October, pp. 1–10, 2015.