Stanovení proteinů v mořských a sladkovodních řasách

Bc. Martina Pastyříková

Diplomová práce

2011

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně
Fakulta technologická
Ústav technologie tuků, tenzidů a kosmetiky
akademický rok: 2010/2011

ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení:	**Bc. Martina PASTYŘÍKOVÁ**
Osobní číslo:	**T09585**
Studijní program:	**N 2901 Chemie a technologie potravin**
Studijní obor:	**Technologie a ekonomika výroby tuků, detergentů a kosmetiky**
Téma práce:	**Stanovení proteinů v mořských a sladkovodních řasách**

Zásady pro vypracování:

I. Teoretická část

1. **Charakterizujte proteiny obsažené v mořských a sladkovodních řasách.**
2. **Popište metody na stanovení proteinů.**
3. **Vyberte vhodnou metodu pro stanovení proteinů v řasách.**

II. Praktická část

1. **Metodika stanovení proteinů v mořských a sladkovodních řasách.**
2. **Stanovení proteinů ve vybraných vzorcích mořských a sladkovodních řas.**

Rozsah diplomové práce:

Rozsah příloh:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

[1] BECKER, E., W. Micro-algae as a source of protein. Biotechnology Advances, 2007, 25, 207-210.
[2] ROUXEL, C.,BONNABEZE, E., DANIEL, A. Identification by SDS PAGE of green seaweeds (Ulva and Enteromorpha)used in the food industry. Journal of Applied Phycology, 2001, 13, 215-219.
[3] CHRONAKIS, I. S., GALATANU, A. S., NYLANDER, T., LINDMAN, J. The behaviour of protein preparations from blue-green algae (Spirulina platensis strain Pacifica) at the air:water interface. Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects, 2000, 173, 181-192.
[4] CHIU, Tsai-hsin, CHEN, Ming-lun, CHANG, Hung-chia. Comparisons of emulsifying properties of Maillard reaction products conjugated by green, red seaweeds and various commercial proteins. Food Hydrocolloids, 2009, 23, 2270-2277.

Vedoucí diplomové práce: **Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D.**
Ústav technologie a mikrobiologie potravin

Datum zadání diplomové práce: **25. února 2011**

Termín odevzdání diplomové práce: **20. května 2011**

Ve Zlíně dne 25. února 2011

doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.
děkan

UNIVERZITA TOMÁŠE BATI VE ZLÍNĚ
Fakulta technologická
L.S.

doc. Ing. Rahula Janiš, CSc.
ředitel ústavu

Příjmení a jméno: PASTYŘÍKOVÁ MARTINA Obor: TEXTDK

PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

- beru na vědomí, že odevzdáním diplomové/bakalářské práce souhlasím se zveřejněním své práce podle zákona č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, bez ohledu na výsledek obhajoby [1)];
- beru na vědomí, že diplomová/bakalářská práce bude uložena v elektronické podobě v univerzitním informačním systému dostupná k nahlédnutí, že jeden výtisk diplomové/bakalářské práce bude uložen na příslušném ústavu Fakulty technologické UTB ve Zlíně a jeden výtisk bude uložen u vedoucího práce;
- byl/a jsem seznámen/a s tím, že na moji diplomovou/bakalářskou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, zejm. § 35 odst. 3 [2)];
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 1 autorského zákona má UTB ve Zlíně právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla v rozsahu § 12 odst. 4 autorského zákona;
- beru na vědomí, že podle § 60 [3)] odst. 2 a 3 mohu užít své dílo – diplomovou/bakalářskou práci nebo poskytnout licenci k jejímu využití jen s předchozím písemným souhlasem Univerzity Tomáše Bati ve Zlíně, která je oprávněna v takovém případě ode mne požadovat přiměřený příspěvek na úhradu nákladů, které byly Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně na vytvoření díla vynaloženy (až do jejich skutečné výše);
- beru na vědomí, že pokud bylo k vypracování diplomové/bakalářské práce využito softwaru poskytnutého Univerzitou Tomáše Bati ve Zlíně nebo jinými subjekty pouze ke studijním a výzkumným účelům (tedy pouze k nekomerčnímu využití), nelze výsledky diplomové/bakalářské práce využít ke komerčním účelům;
- beru na vědomí, že pokud je výstupem diplomové/bakalářské práce jakýkoliv softwarový produkt, považují se za součást práce rovněž i zdrojové kódy, popř. soubory, ze kterých se projekt skládá. Neodevzdání této součásti může být důvodem k neobhájení práce.

Ve Zlíně 16.5.2011

Pastyříková

[1)] zákon č. 111/1998 Sb. o vysokých školách a o změně a doplnění dalších zákonů (zákon o vysokých školách), ve znění pozdějších právních předpisů, § 47 Zveřejňování závěrečných prací:

(1) Vysoká škola nevýdělečně zveřejňuje disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce, u kterých proběhla obhajoba, včetně posudků oponentů a výsledku obhajoby prostřednictvím databáze kvalifikačních prací, kterou spravuje. Způsob zveřejnění stanoví vnitřní předpis vysoké školy.

(2) Disertační, diplomové, bakalářské a rigorózní práce odevzdané uchazečem k obhajobě musí být též nejméně pět pracovních dnů před konáním obhajoby zveřejněny k nahlížení veřejnosti v místě určeném vnitřním předpisem vysoké školy nebo není-li tak určeno, v místě pracoviště vysoké školy, kde se má konat obhajoba práce. Každý si může ze zveřejněné práce pořizovat na své náklady výpisy, opisy nebo rozmnoženiny.

(3) Platí, že odevzdáním práce autor souhlasí se zveřejněním své práce podle tohoto zákona, bez ohledu na výsledek obhajoby.

[2)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 35 odst. 3:

(3) Do práva autorského také nezasahuje škola nebo školské či vzdělávací zařízení, užije-li nikoli za účelem přímého nebo nepřímého hospodářského nebo obchodního prospěchu k výuce nebo k vlastní potřebě dílo vytvořené žákem nebo studentem ke splnění školních nebo studijních povinností vyplývajících z jeho právního vztahu ke škole nebo školskému či vzdělávacího zařízení (školní dílo).

[3)] zákon č. 121/2000 Sb. o právu autorském, o právech souvisejících s právem autorským a o změně některých zákonů (autorský zákon) ve znění pozdějších právních předpisů, § 60 Školní dílo:

(1) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení mají za obvyklých podmínek právo na uzavření licenční smlouvy o užití školního díla (§ 35 odst. 3). Odpírá-li autor takového díla udělit svolení bez vážného důvodu, mohou se tyto osoby domáhat nahrazení chybějícího projevu jeho vůle u soudu. Ustanovení § 35 odst. 3 zůstává nedotčeno.

(2) Není-li sjednáno jinak, může autor školního díla své dílo užít či poskytnout jinému licenci, není-li to v rozporu s oprávněnými zájmy školy nebo školského či vzdělávacího zařízení.

(3) Škola nebo školské či vzdělávací zařízení jsou oprávněny požadovat, aby jim autor školního díla z výdělku jím dosaženého v souvislosti s užitím díla či poskytnutím licence podle odstavce 2 přiměřeně přispěl na úhradu nákladů, které na vytvoření díla vynaložily, a to podle okolností až do jejich skutečné výše; přitom se přihlédne k výši výdělku dosaženého školou nebo školským či vzdělávacím zařízením z užití školního díla podle odstavce 1.

ABSTRAKT

Mořské i sladkovodní řasy jsou významným zdrojem vlákniny, minerálních látek, proteinů a vitamínů. Diplomová práce byla zaměřena na stanovení proteinů v mořských a sladkovodních řasách elektroforetickou metodou SDS-PAGE.

Klíčová slova: mořské a sladkovodní řasy, proteiny, SDS-PAGE

ABSTRACT

Marine and freshwater algae are an important source of fiber, minerals, proteins and vitamins. This diploma thesis is based on determination of proteins in the marine and freshwater algae by electrophoretic SDS-PAGE.

Keywords: marine and freshwater algae, proteins, SDS-PAGE

Ráda bych na tomto místě srdečně poděkovala Ing. Ladislavě Mišurcové, PhD. za poskytnuté materiály, cenné připomínky, ochotu a trpělivost při odborném vedení mé diplomové práce. Touto cestou bych ráda poděkovala Ing. Dušanovi Samkovi za jeho ochotu a pomoc.
Tímto bych také chtěla poděkovat Bc. Ludmile Zálešákové, Dis. za ochotu a pomoc v laboratoři při měření praktické části diplomové práce.
Děkuji také mé rodině a mému příteli za podporu a pomoc po celou dobu mého studia.

Prohlašuji, že odevzdaná verze diplomové práce a verze elektronická nahraná do IS/STAG jsou totožné.

OBSAH

ÚVOD **11**

I TEORETICKÁ ČÁST **12**

1 ŘASY A SINICE **13**

1.1 SYSTEMATICKÉ ZAŘAZENÍ VYBRANÝCH DRUHŮ ŘAS A SINIC 13

1.2 SINICE (*CYANOPHYTA*) 14

1.3 NIŽŠÍ ROSTLINY – ŘASY (*THALLOBIONTA*) 15

1.3.1 Charakteristika vybraných druhů řas 17

1.3.1.1 Červená vývojová větev 17

1.3.1.2 Hnědá vývojová větev 18

1.3.1.3 Zelená vývojová větev 20

2 BIOAKTIVNÍ LÁTKY V ŘASÁCH **21**

2.1 PROTEINY 21

2.1.1 Fotosyntetická barviva 22

2.2 MINERÁLNÍ LÁTKY 22

2.3 VITAMÍNY 23

2.4 LIPIDY 23

2.4.1 Polynenasycené mastné kyseliny 24

2.5 SACHARIDY 24

2.5.1 Agar 25

2.5.2 Kyselina alginová a algináty 25

2.5.3 Karagenany 26

3 VYUŽITÍ PROTEINŮ V KOSMETICE **27**

3.1 KOLAGEN 27

3.2 ELASTIN 27

3.3 CHLOROFYL 27

4 VYUŽITÍ ŘAS V KOSMETICE **28**

4.1 KOSMETICKÉ VÝROBKY S MOŘSKÝMI A SLADKOVODNÍMI ŘASAMI 29

4.1.1 URTEKRAM - Šampón s mořskými řasami 29

4.1.2 RYOR – Noční regenerační krém s mořskými řasami 30

4.1.3 ORIFLAME - Zeštíhlující gelový krém Swedish Spa 30

4.1.4 AFRODITÉ - Hydratační krém s mořskými řasami 31

4.1.5 KANU nature – Peeling Limetka s mořskými řasami 31

4.1.6 MINERAL COSMETIC – Mýdlo s mořskými řasami 32

4.1.7 CHLORELLA COSMETIC – Regenerační krém 32

5 METODY STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK **33**

5.1 STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK KJELDAHLOVOU METODOU 33
5.2 STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK METODOU PODLE CONWAYE 33
5.3 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK PO REAKCI S NESSLEROVÝM ČINIDLEM 33
5.4 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK BIURETOVOU REAKCÍ 34
5.5 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK V UV OBLASTI SPEKTRA 34
5.6 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK PODLE FOLINA – CIOCALTEUA 34
5.7 SPEKTROFOTOMETRICKÉ STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK ORGANICKÝM BARVIVEM ORANŽ G 34
5.8 TITRAČNÍ METODY BEZ MINERALIZACE 35
5.9 DUMASOVA METODA 35
5.10 STANOVENÍ PROTEINŮ ELEKTROFORETICKOU METODOU SDS- PAGE 35
II PRAKTICKÁ ČÁST 37
6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE 38
7 METODIKA PRÁCE 39
7.1 MATERIÁL 39
7.2 METODY PŘÍPRAVY VZORKŮ PRO SDS-PAGE 39
7.2.1 Metoda I 40
7.2.2 Metoda II 41
7.2.3 Metoda III 42
7.2.4 Metoda IV 43
7.2.5 Metoda V 44
7.2.6 Metoda VI 45
7.2.7 Metoda VII 47
7.2.8 Metoda VIII 48
7.2.9 Metoda IX 49
7.2.10 Metoda X 50
7.3 STANOVENÍ PROTEINŮ ELEKTROFORETICKOU METODOU SDS-PAGE 51
7.3.1 Konečná úprava vzorků pro SDS-PAGE 53
7.3.2 Sestavení aparatury a příprava gelů 53
7.3.3 Nanášení vzorků a vlastní elektroforéza 54
VÝSLEDKY A DISKUZE 56
7.4 STANOVENÍ PROTEINŮ 56
7.4.1 Stanoveni proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou I 56
7.4.2 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou II 56
7.4.3 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou III 57
7.4.4 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodami IV až VIII 58
7.4.5 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou IXa 59

7.4.6 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou IXb 60
7.4.7 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou X..... 61
7.4.8 Stanovení proteinových profilů vzorků *Spirulina platensis* připravených různými extrakčními metodami 63
ZÁVĚR..... 66
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY..... 69
SEZNAM OBRÁZKŮ..... 73
SEZNAM TABULEK..... 74
SEZNAM PŘÍLOH..... 75

ÚVOD

Řasy jsou jednobuněčné (mikrořasy, např. rody *Scenedesmus, Chlorella*) nebo vícebuněčné, většinou vodní organizmy, mořské nebo sladkovodní. Jsou zdrojem bílkovin, hydrokoloidů, vitamínů (A, C, E a B_{12}), celé řady minerálních látek, stopových prvků a dalších bioaktivních látek.

Největší praktický význam mají hnědé řasy (*Chromophyta,* např. druhy Kombu a Wakame), dále červené řasy (*Rhodophyta,* např. Nori) a druhově nejrozšířenější zelené řasy (*Chlorophyta*). Některé připomínají zeleninu či byliny, a také se podobně konzumují buď v čerstvé, nebo v sušené formě.

V zemích jihovýchodní Asie jsou tradiční složkou stravy, v ostatních oblastech světa se jejich využívání v různé míře rozšiřuje. Konzumují se buď jako součásti pokrmů (polévky, saláty, sushi, součást chleba ve Skotsku aj.), nebo jsou z nich funkční složky extrahovány a přidávány do jiných potravin a doplňků.

Vzhledem k obsahu bioaktivních látek a rozpustné vlákniny, která podmiňuje hydratační vlastnosti řasových produktů, jsou řasy perspektivní surovinou pro kosmetický průmysl.

Využívají se přirozeně rostoucí řasy i produkty pěstované v akvakulturách, a s tím souvisí určité rozdíly v chemickém složení.

Ve své diplomové práci jsem se zabývala stanovením proteinů v mořských a sladkovodních řasách.

Teoretická část se zabývá charakteristikou jednotlivých druhů řas a jejich chemickým složením. Dále jsem se zabývala využitím proteinů a řas v kosmetice. V poslední části jsou popsány metody stanovení proteinů.

Praktická část popisuje použité materiály, chemikálie a postupy při stanovení proteinů elektroforetickou metodou SDS-PAGE.

I. TEORETICKÁ ČÁST

1 ŘASY A SINICE

Řasy jsou důležitou složkou mnoha ekosystémů, od mořských a sladkovodních prostředí, pouštních písků, přes horké prameny, po sníh a led. Řasy mají širokospektrální využití, jak v průmyslu potravinářském a kosmetickém, tak i jako hnojiva nebo přísady do krmných směsí. Celková roční hodnota produkce je odhadována na 6 miliard amerických dolarů. Ročně se spotřebuje přibližně 8 milionů tun mořských řas. Řasy jsou získávány z volné přírody, ale stále více se uplatňují umělé kultivace. Používání mořských řas jako potraviny má silné kořeny v asijských zemích, jako je Čína, Japonsko a Korejská republika, ale poptávka po mořských řasách se nyní rozšířila i do Severní a Jižní Ameriky a Evropy. Největším producentem řas je Čína, následuje Korejská republika a Japonsko. [1, 2]

1.1 Systematické zařazení vybraných druhů řas a sinic

Oddělení *(Divisio)*: **Sinice** *(Cyanophyta)*

Řád: Oscillatoriales

Rod: *Spirulina*

Podříše *(Subregnum)*: **Nižší rostliny** *(Protobionta)*

Oddělení: Rhodophyta

Třída: Bangiophycideae

Řád: Bangiales

Rod: *Porphyra*

Rod: *Palmaria*

Oddělení: Chromophyta

Třída: Phaeophyceae

Řád: Laminariales

Rod: *Laminaria*

Oddělení: Chlorophyta

Třída: Trebouxiophyceae

Rod: *Chlorella* [3, 4, 5]

1.2 Sinice (*Cyanophyta*)

Sinice jsou autotrofní prokaryotické organizmy. Většina druhů sinic jsou jednobuněčné organizmy. Některé druhy tvoří kolonie. Jsou zřejmě nejstaršími autotrofními organizmy, které fotosyntézou uvolňují do atmosféry kyslík. Sinice jsou spolu s bakteriemi nejstaršími organizmy na Zemi.

Kolem plazmatické membrány na povrchu buněk sinic je čtyřvrstevná buněčná stěna. Fylogeneticky starší jsou jednobuněčné sinice, jejichž buněčná stěna často vylučuje sliz, který způsobuje, že nové buňky vzniklé dělením zůstávají pohromadě ve slizovém pouzdru. Vývojově mladší sinice se rovněž rozmnožují dělením, ale nové buňky jsou seřazené za sebou a vytvářejí vlákna. Sousední buňky vlákna jsou navzájem propojené póry (plazmodezmy) v buněčné stěně. Vývojově mladší sinice vytvářejí vláknité kolonie.

Cytoplazma sinic je rozlišená na vnitřní nukleoplazmu a vnější chromatoplazmu. V nukleoplazmě je soustředěná DNA, ribozómy a zásobní látky v podobě inkluzí obsahujících sinicový škrob. V chromatoplazmě jsou tylakoidy vzniklé vchlípením a odškrcením plazmatické membrány. Tylakoidy obsahují barviva: zelený chlorofyl *a*, červený ß-karoten, modrý fykokyanin, který sinicím dodává modrozelenou (sinou) barvu. Některé druhy sinic navíc obsahují červený fykoerytrin. Pro vlastní fotosyntézu je nezbytný jen chlorofyl. Ostatní barviva jsou doplňková a umožňují organizmům využívat širší část světelného spektra. Chlorofyl *a* a ß-karoten jsou barviva společná prokaryotickým a eukaryotickým autotrofním organizmům, což svědčí o jejich společném původu ve fylogenetickém vývoji.

Sinice jsou v přírodě velmi rozšířené. Podobně jako bakterie žijí i v podmínkách, které jsou nepřijatelné pro jiné organizmy. Sinice jsou první organizmy, které osidlují nově vzniklé vulkanické ostrovy, obnažené skály v lomech apod. To proto, že některé sinice dovedou využívat vzdušný dusík a jsou neobyčejně termorezistentní – žijí v horkých

pramenech i v povrchové vrstvě sněhu ve vysokohorských podmínkách. Mnoho sinic žije ve vodě jako součást planktonu. Tyto druhy sinic mají v buňkách plynné vakuoly, které snižují hustotu buněk a napomáhají vznášení kolonií při hladině, kde je dostatek světla pro fotosyntézu. Vodní sinice se přemnožují ve vodách bohatých na organické látky. V rybnících a jezerech se někdy rozmnoží tak, že zbarvují hladinu vody modrozeleně až olivově zeleně a vytvářejí na hladině tzv. „vodní květ“, viditelný pouhým okem. Do vody vylučují jedovaté látky způsobující záněty pokožky. Nejrozšířenější vodní sinice jsou jednobuněčná *Microcystis* nebo vláknité *Anabaena* a *Oscillatoria* (drkalka). Sinice rodu *Trichodesmium* způsobují červenou barvu Rudého moře. Některé druhy sinic žijící v symbióze s houbami tvoří složku lišejníků. [3]

Třída Cyanophyceae je rozdělena do čtyř řádů. Dělení probíhá na základě stavby stélek jednotlivých řádů a přítomnosti specializovaných buněk. [5]

Řád: Oscilatoriales

Typické pro tento řád je, že u nich nenajdeme žádné specializované buňky (heterocyty, akinety). Stélka je vláknitá a nevětvená. Nejvýznamnější rody jsou *Arthrospira, Spirulina, Planktothrix, Oscillatoria, Phormidium*. Pro kosmetický průmysl jsou nejvýznamnější sinice rodu *Spirulina.* [5,6]

Spirulina je modrozelená, sladkovodní, vláknitá sinice. Její název je odvozen od jejího spirálovitého tvaru. Roste v teplých a hlavně neznečištěných jezerech. *Spirulina* je více, než z 60 % tvořena proteiny, které jsou v organizmu lehce stravitelné. Dále obsahuje 20 % sacharidů, 5 % lipidů a 9 % minerálů, kyselinu gama linolenovou, sulfolipidy a vitamín B_{12}. Tmavou barvu *Spiruliny* způsobují přírodní barviva – karotenoidy, chlorofyl a fykokyanin. Buněčná stěna je tvořena mukopolysacharidy. [7]

1.3 Nižší rostliny – řasy (*Thallobionta*)

Nižší rostliny mají několik společných znaků:

- jsou jednobuněčné i mnohobuněčné,
- tělo jednobuněčných i mnohobuněčných se nazývá stélka (thallus),
- buňky mnohobuněčných nižších rostlin nejsou tvarově a funkčně diferencované v pletiva,
- jejich chloroplasty obsahují vždy dva druhy chlorofylu, z nichž jeden je vždy chlorofyl *a*.

Ve fylogenetickém vývoji se nižší rostliny vyvíjeli ve třech paralelních vývojových větvích lišících se druhy chlorofylů v chloroplastech:

- zelená vývojová větev (v chloroplastech jsou chlorofyly *a*, *b*),

- hnědá vývojová větev (v chloroplastech jsou chlorofyly *a*, *c*),

- červená vývojová větev (v chloroplastech jsou chlorofyly *a*, *d*).

Chloroplasty řas jsou velké, často v buňkách bývá jen jeden velký chloroplast rozmanitého tvaru. V chloroplastech řas jsou často kulatá bílkovinná tělíska dobře pozorovatelná optickým mikroskopem. Nazývají se pyrenoidy.

V každé vývojové větvi vzniklo fylogenetickým vývojem postupně několik vývojových stupňů stélky. Nejčastější vývojové stupně stélky jsou:

1. Nejjednodušší vývojový stupeň charakteristický pro nejstarší nižší rostliny je bičíkatý (monadoidní) vývojový stupeň stélky. Stélka na tomto stupni je jednobuněčná. Buňka je opatřena bičíkem umožňujícím aktivní pohyb. Příkladem řas na tomto vývojovém stupni jsou např. krásnoočka a pláštěnka v zelené vývojové větvi.

2. Vyšší vývojový stupeň je kokální vývojový stupeň stélky. Vznikl ztrátou bičíku. Buňka na tomto vývojovém stupni je aktivně nepohyblivá. Stélka je jednobuněčná. Příkladem jsou zelenivka v zelené vývojové větvi a rozsivky v hnědé vývojové větvi.

3. Podobný kokálnímu vývojovému stupni je měňavkovitý (rhizopodální) vývojový stupeň stélky. Stélka je jednobuněčná. Aktivní pohyb buňky umožňují panožky. Tento typ stélky se vyskytuje hlavně ve třídě zlativek hnědé vývojové větve.

4. Složitější vývojový stupeň je vláknitý (trichální) vývojový stupeň stélky. Stélka je mnohobuněčná s jednojadernými buňkami tvaru nevětveného nebo rozvětveného vlákna. Příkladem jsou zrněnka nebo kadeřnatka v zelené vývojové větvi.

5. Ještě složitější je trubicovitý (sifonokladální) vývojový stupeň stélky. Stélka je mnohobuněčná s vícejadernými buňkami. Příkladem je žabí vlas v zelené vývojové větvi. Některé druhy řas mají stélku tvořenu jedinou velkou mnohojadernou buňkou (tzv. sifonální stélka).

6. Nejsložitější je pletivný vývojový stupeň stélky. Stélka je mnohobuněčná a její buňky se vyznačují tvarovou a funkční diferenciací. Touto diferenciací vznikají příchytná vlákna (rhizoidy), která připevňují stélku k podkladu, lodyžka (kauloid) a postranní lodyžky. Diferenciace se také na tomto stupni projevuje tím, že růst rostliny zabezpečuje jediná buňka na vrcholu stélky, která má schopnost se dělit. Ostatní buňky stélky dělivou schopnost nemají. Diferenciace buněk však nevede ke vzniku skutečných pletiv. Pletivným vývojovým stupněm se vyznačují ruduchy v červené vývojové větvi, parožnatky v zelené vývojové větvi a chaluhy v hnědé vývojové větvi. [3]

1.3.1 Charakteristika vybraných druhů řas

1.3.1.1 Červená vývojová větev

Do červené vývojové větve patří asi 4 000 druhů převážně mořských řas. Jejich společným znakem je přítomnost chlorofylů *a*, *d* v chloroplastech. Zelená barva bývá překryta červenou barvou ß-karotenu a fykoerytrinu a namodralou barvou fykokyanu. Červená barviva umožňují zachytit a využít pro fotosyntézu krátkovlnné světlo blízké ultrafialovému záření, které již chlorofyl zachytit nemůže. Protože toto krátkovlnné světlo proniká do značné mořské hloubky (až 200 m), vyskytují se tyto řasy jako jediné hluboko pod hladinou. Obsahem fykokyanu a fykoerytrinu se řasy červené vývojové větve shodují se sinicemi. Proto někteří biologové předpokládají vznik těchto řas přímo ze sinic a nikoliv z prochlorofyt. Od zbývajících vývojových větví se také liší tím, že jejich buňky nemají bičík. Neexistuje u nich bičíkatý vývojový stupeň stélky. Tato vývojová větev zahrnuje jediné oddělení – ruduchy. [3, 6]

Oddělení: ruduchy (*Rhodophyta*, asi 4 000 druhů).

Třída: Bangiophyceae
Třída zahrnuje zástupce s jednodušší stavbou stélky. Stélka bývá většinou jednobuněčná, plošně listová nebo vláknitá. Buňky jsou jednojaderné, u některých je přítomen hvězdicovitý chloroplast obsahující pyrenoid, u menšího množství druhů jsou chloroplasty ve větším počtu. Rozmnožování probíhá dělením buněk nebo produkcí jednobuněčných monospór, pohlavně prostřednictvím oogamie. [5]
Řád: Bangiales

Nejznámější zástupci tohoto řádu jsou rody *Bangia, Porphyra, Porphyridium a Palmaria.*

Druhy rodu *Porphyra* mají z červených řas nejvýznamnější uplatnění v potravinářském průmyslu. *Porphyra* jsou známy pod komerčním názvem Nori. Nejčastější použití je v japonské kuchyni na přípravu sushi. *Porphyra* byla pěstována v Japonsku a Korejské republice již od sedmnáctého století. [8]

Rod *Palmaria*

Dulse (*Palmaria palmata*, dříve *Rhodymenia palmata*) je další červená mořská řasa používaná jako potravina, ale v menším rozsahu. Většinou ji spotřebovávají lidé z pobřežních států. Obvykle je sušená, jedena bez vaření, nebo ve formě prášku, který se používá jako koření. Roste v chladných vodách v Irsku, na Islandu a východním pobřeží Kanady. [9]

1.3.1.2 Hnědá vývojová větev

Do hnědé vývojové větve patří asi 8 800 druhů řas. Jejich společným znakem je přítomnost chlorofylů *a*, *c* v chloroplastech. Zelená barva bývá překryta hnědou barvou fukoxantinu. Fukoxantin má podobný význam jako fykoerytrin a fykokyan u ruduch. Není však tak účinný, a proto se tyto řasy nevyskytují v takových hloubkách jako ruduchy. Často jsou v plastidech obsažené xantofyly a ß-karoten. Všechny řasy hnědé vývojové větve jsou zařazené do oddělení *Chromophyta* a rozděleny do šesti tříd. Nejznámější zástupci jsou ve třídách zlativky, rozsivky a chaluhy.

Oddělení: *Chromophyta*, asi 8 000 druhů

Třída: chaluhy *(Phaeophyceae)*

Většina druhů chaluh dosáhla pletivného vývojového stupně stélky. Stélka je rozlišená na osovou část lodyžku (kauloid), která je často rozvětvená. Z lodyžky vyrůstají ploché lístky (fyloidy). Ke dnu bývají některé druhy přichycené příchytnými vlákny (rhizoidy). Chaluhy jsou ze všech řas největší. Některé druhy mořských chaluh mají stélky dlouhé až 70 metrů o hmotnosti až 100 kg. V chladnějších mořích roste chaluha bublinatá *(Fucus vesiculosus)*, v teplejších mořích hroznovice *(Sargassum)*. Ohromná množství stélek této řasy volně plave na hladině Atlantského oceánu východně od karibského souostroví. Tato oblast se nazývá Sargasové moře. Chaluhy vyvržené na břeh se po usušení (a spálení na popel) používají jako hnojivo, palivo a surovina pro získání jódu. V současné době jsou chaluhy cenným zdrojem sacharidů, které jsou obsažené v buněčné stěně chaluh. [3,5]

Řád: Laminariales

Nejvýznamnější řád hnědých řas. Životní cyklus je diplohaplontní a heteromorfní, značně se u nich liší stélka gametofytu a sporofytu. Gametofyt dosahuje pouze mikroskopických rozměrů v podobě vlákénka, makroskopický sporofyt je členěn na rhizoid, kauloid a fyloidy. Sporofyty některých druhů patří k největším řasovým stélkám vůbec. Druhy rodu *Laminaria* dosahují 1 – 2,5 metru a vytváří tzv. laminárioví lesy. [5]

Rod *Laminaria*

Do rodu *Laminaria* patří druhy *L. longissima, L. japonica, L. angustata, L. coriacea a L. ochotensis.* Vyskytují se na severním ostrově Hokkaidó a na severním pobřeží ostrova Honšú. První tři, z výše uvedených, jsou nejvýznamnější. Řasy rostou na skalách a útesech v klidných vodách s teplotou 3 až 20 °C. [5, 10]

Haidai je čínský název pro *Laminaria japonica*, mořskou řasu, která byla přivezena do Číny z Japonska v roce 1920. Řasa obvykle dosahuje délky 2 − 5 m, ale při vhodné teplotě vody do 20 °C může dorůst až do 10 m. [11]

Rod *Undaria*

Druh *Undaria pinnatifida*

Undaria pinnatifida se vyskytuje na skalnatém pobřeží v mírných pásmech Japonska, Korejské republiky a Číny. Roste na skalách a útesech. Největších přírůstků dosahuje při teplotě vody mezi 5 až 15 °C. Pokud teplota vody překročí 25 °C, její růst se zastaví. [12]

Rod *Hizikia*

Druh *Hizikia fusiformis*

Hizikia fusiformis je hnědá řasa s vějířovitou strukturou. Vyskytuje se na jižním pobřeží ostrova Hokkaidó, Honšú, kolem korejského poloostrova a na většině pobřeží Číny. Asi 90 % z korejské produkce je zpracováno a vyváženo do Japonska. [13]

Rod *Eisenia*

Druh *Eisenia bycyclis*

Tato řasa patří podobně jako druhy rodu *Laminaria* mezi chaluhy. Je velmi oblíbená v Japonsku, odkud také pochází její světoznámý název Arame. Má dlouhou stélku tmavě zelené barvy. Stélka této řasy má vějířovité až 30 cm dlouhé listy. [14]

1.3.1.3 Zelená vývojová větev

Do zelené vývojové větve patří asi 7 800 druhů řas. Jejich společným znakem je přítomnost chlorofylů *a*, *b* v chloroplastech. Rozdělují se do dvou oddělení – krásnoočka a zelené řasy.

Oddělení: zelené řasy (*Chlorophyta*, asi 7 000 druhů).

V oddělení zelených řas jsou druhy na různých vývojových stupních stélky. Některé druhy na bičíkatém vývojovém stupni vytvářejí různě složité kolonie. Nejsložitější a největší (až s 20 000 buňkami) tvoří váleč koulivý. Zelené řasy jsou převážně sladkovodní, jen asi 10 % druhů žije v mořích. Taxonomicky jsou zelené řasy rozděleny do pěti tříd. [3]

Třída: *Trebouxiophyceae*
Řasy této třídy jsou jednobuněčné, vláknité a žijí ve sladkých vodách. Do této třídy patří řády *Trebouxiales*, *Oocytales*, *Microthamiales*, *Prasiolales* a řád *Chlorellales* s významnými zástupci *Chlorella vulgaris* a *Chlorella pyrenoidosa*. [5]

Druh *Chllorella pyrenoidosa*
Chlorella pyrenoidosa je jednobuněčná sladkovodní řasa s kulovitými či eliptickými buňkami a s miskovitými chloroplasty. Systematicky se řadí mezi zelené řasy (oddělení *Chlorophyta*). Evolučně je *Chlorella* geneticky velmi stabilní díky vynikajícím reparačním mechanizmům DNA. Tyto řasy žijí v čistých vodách, ale i na souši a mají velmi rychlý životní cyklus. [3]

2 BIOAKTIVNÍ LÁTKY V ŘASÁCH

Mořské a sladkovodní řasy, které našly uplatnění v potravinářském, farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, obsahují velké množství významných bioaktivních látek.

2.1 Proteiny

Proteiny jsou polymery složené z L-aminokyselin, které vznikly procesem proteosyntézy. Ve své molekule obsahují více než 100 aminokyselin vzájemně spojených peptidovou vazbou. Kromě peptidových vazeb se na utváření struktury proteinů podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové (-S-S-), esterové a amidové (umožňuje spojení serinu, treoninu, argininu nebo lyzinu prostřednictvím kyseliny fosforečné). Pořadí (sekvence) a počet jednotlivých aminokyselinových zbytků v řetězci jsou pro každý protein specifické, determinované genovou výbavou buněk. Všechny proteiny v naší biosféře mají stejnou základní stavbu a liší se jen pořadím převážně 20 kódovaných aminokyselin jako stavebních jednotek. [15]
Proteiny určené pro lidskou výživu jsou děleny podle původu příslušné potraviny na živočišné, rostlinné a mikrobiální. [16, 17, 18]

Některé řasy (většinou zelené a modro-zelené) obsahují velmi významné množství proteinů, mnohem vyšší než v mnoha, na proteiny bohatých, suchozemských rostlinách.

Spirulina má vysoký obsah proteinů 60 – 70 %. [19]

Červená řasa *Porphyra tenera* obsahuje 30 - 50 % proteinů, které jsou ze 75 % stravitelné. [2]

Druhy rodu *Laminaria* obsahují přibližně 10 % proteinů. [2]

Přes vysoký obsah proteinů, nezískaly sušené řasy rodu *Spirullina, Scenedesmus* a *Dunaliella* zásadní význam jako potravina. Mezi hlavní překážky patří prášková konzistence sušené biomasy a její tmavě zelená barva, která omezuje začlenění řas do běžných potravin. Byly provedeny experimenty, které kombinovaly řasy se známými potravinami, a to použitím různých metod, jako je pečení nebo míchání. Řasy byly vmíchány do chlebového nebo nudlového těsta. Nicméně i malé procento přidané řasy učinilo chléb po upečení nepožívatelný a barva uvařených nudlí se změnila na neatraktivní hnědou. V neposlední řadě jsou výrobní náklady dost vysoké, aby mohly konkurovat tradičním zdrojům bílkovin. [20]

Velké množství nutričních a toxikologických hodnocení prokázala vhodnost řasy jako hodnotný krmný doplněk nebo náhrada konvenčních zdrojů bílkovin (sojová moučka, rybí moučka, rýžové otruby, atd.) pro zvířata. Dále se řasy využívají v akvaristice. [20]

2.1.1 Fotosyntetická barviva

Chlorofyl

Chlorofyl patří do skupiny tzv. dusíkatých barviv, vyskytujících se v zelených částech rostlin.

Chemicky jde o komplexní sloučeninu pyrolových jader, hořčíku a estericky vázaného alkoholu. Vlivem vyšších teplot se mění na žlutozelené barvivo feofytin, který místo původního hořčíku obsahuje vodík. [21]

Mezi hlavní charakteristiky zelených řas patří kombinace fotosyntetických barviv, kterou tvoří chlorofyl *a* a chlorofyl *b*. Uvedená barviva jsou uložena v chloroplastech, které mají jasně zelenou barvu. Nabývají různých tvarů, ale vždy mají na povrchu dvojici biomembrán a uvnitř obsahují tylakoidy srůstající do lamel. Většinou se v chloroplastech nachází pyrenoid a u bičíkatých stádií také stigma. Pyrenoid je oválné bílkovinné tělísko, obsahující četné enzymy. Na jeho povrchu bývá škrob tvořící často souvislý obal. Škrob je uložen v podobě zrn uvnitř chloroplastu.[4, 22]

Karotenoidy

Karotenoidy tvoří širokou skupinu látek, patří stejně jako chlorofyly mezi rostlinná barviva a tvoří je všechny rostliny, u nichž probíhá fotosyntéza. Lidské tělo dokáže zpracovat pouze šest těchto barviv jako ß-karoten, α-karoten, kryptoxantin, lykopen, lutein, zeaxantin. ß-karoten byl nalezen u sinic, hnědých, červených i zelených řas. K němu se u červených a zelených řas přidává ještě zeaxantin a lutein. Karotenoidy působí v lidském těle jako antioxidanty, stejně tak působí i polyfenoly. Ty chrání buňky před stárnutím, některé látky, které jsou součástí polyfenolů, ovlivňují ukládání cholesterolu a tím napomáhají zabránit vzniku určitých srdečních onemocnění. [23]

2.2 Minerální látky

Pojmem minerální látky nebo také popeloviny se rozumí soubor prvků a sloučenin, který zůstává po spálení a vyžíhání vzorku potravin. Minerální látky jsou v potravinářských surovinách a produktech zastoupeny v iontové formě, vázané na mnoho organických

složek nebo na složité komplexní sloučeniny. Jen výjimečně se vyskytují ve volné formě. Mají význam jako důležité výživové složky pro nižší i vyšší organizmy. Minerální látky si organizmy na rozdíl od mnoha organických látek nedokáží syntetizovat. Zúčastňují se mnoha biochemických reakcí v organizmu, hlavně regulačních, oxidoredukčních a skeletotvorných funkcí. [21]

Kromě vysokého obsahu proteinů spočívá hlavní nutriční hodnota mořských řas v obsahu minerálních látek. Jsou v nich obsaženy všechny prvky, které lidské tělo potřebuje. Vynikají vysokým obsahem vápníku a fosforu, hořčíku, zinku, mědi a samozřejmě jódu. Vzhledem k vysokému obsahu jódu je ale nezbytné konzumovat mořské řasy s mírou. Opatrnost je na místě i u osob se zvýšeným krevním tlakem, neboť mořské řasy obsahují i velké množství sodíku a draslíku. Vápník a železo jsou akumulovány v řasách (*Palmaria palmata*) v mnohem větší míře než v běžně konzumované zelenině. [24, 25]

2.3 Vitamíny

Vitamíny patří mezi významné biokatalyzátory biochemických reakcí, které probíhají v živém organizmu. Pro organizmy, které si nejsou schopny tyto látky samy syntetizovat, jsou vitamíny nepostradatelné a jejich nedostatek může způsobovat vážné zdravotní poruchy. O zatřídění látek mezi vitamíny rozhodují hlavně jejich biologické vlastnosti, které jsou podmíněné určitou konfigurací molekuly. Často však látky s podobnou biologickou účinností jsou chemicky velmi odlišné, např. skupina vitamínů B. Při klasifikaci vitamínů podle biologických vlastností je zažité třídění podle fyzikálně-chemických vlastností, hlavně podle polarity. Z tohoto hlediska se vitamíny rozdělují na dvě velké skupiny a to na vitamíny rozpustné ve vodě a vitamíny rozpustné v tucích. [21]

Červená řasa *Porphyra* má významný obsah vitamínů A, C, niacinu a kyseliny listové. [26]

Hnědá řasa *Undaria pinnatifida* má vysoký obsah vitamínů skupiny B, zejména niacinu. [27]

2.4 Lipidy

Lipidy jsou látky biologického původu rozpustné v organických rozpouštědlech, jako jsou chloroform, ether, benzen aj. Jsou jen částečně rozpustné nebo úplně nerozpustné ve vodě. Lipidy jsou látky chemicky velmi nesourodé, lišící se svojí strukturou. Jediným jejich společným znakem je převaha dlouhých nepolárních uhlovodíkových řetězců, které dodávají lipidům hydrofóbní olejovou nebo voskovou povahu a činí je ve vodě

nerozpustnými. Lipidy patří k významným složkám potravin a ve výživě člověka tvoří jednu z hlavních živin nezbytnou pro zdravý vývoj organizmu. Většinou se v praxi za lipidy považují také netěkavé lipofilní sloučeniny, které v přírodních i v průmyslových produktech doprovázejí vlastní lipidy. Nazývají se proto doprovodné látky lipidů. [15]

2.4.1 Polynenasycené mastné kyseliny

V současné době je produkce polynenasycených mastných kyselin $PUFA_S$ v mořských a sladkovodních řasách předmětem intenzivního výzkumu. Rybí olej je hlavním zdrojem těchto mastných kyselin, ale jelikož roste poptávka po čištěné PUFA jsou některé alternativní zdroje žádány. Navíc kvalita rybího tuku závisí na druhu ryb, sezóně, klimatu, zeměpisné poloze a kvalitě konzumované potravy. [1]

Některé druhy sladkovodních a mořských řas obsahují velké množství vysoce kvalitních $PUFA_S$ a jsou v současné době široce používány v akvaristice. Řasy mohou růst na levných organických substrátech a bez osvětlení. Za důležité jsou považovány následující strategie (výběr „olejnatých“ druhů řas, optimalizace kultivačních podmínek, rozvoj efektivních způsobů pěstování, zlepšení vlastností kmenů pomocí genetické modifikace), které by zvýšily využití řas pro komerční účely. [1]

Hnědá řasa *Hizikia fusiformis* má nízký obsah tuku, přibližně 1,5 %. Z mastných kyselin je nejvíce zastoupena kyselina eikosapentaenová (20 - 25 %). [13]

2.5 Sacharidy

Sacharidy jsou základními složkami všech živých organizmů, biologicky aktivními molekulami a nejrozšířenějšími organickými sloučeninami v biosféře. U fotoautotrofních organizmů je glukóza syntetizována z oxidu uhličitého a vody fotosyntézou a ukládána ve formě škrobu, nebo přeměňována na celulózu rostlinného pletiva. Heterotrofní organizmy získávají potřebné sacharidy z organizmů autotrofních nebo z nesacharidových substrátů jako jsou některé hydroxykyseliny, aminokyseliny, glycerol apod. Tomuto ději se říká glukoneogeneze. Většina monosacharidů a oligosacharidů má sladkou chuť, protože vyvolávají konformační změny chuťových receptorů. Tato konformační změna se projeví právě vjemem sladké chuti. [15]

2.5.1 Agar

Agar je sušený sliz, získávaný vyvářením předem usušených a na slunci vybělených stélek. Ochlazením extrakt tuhne na gel. Na trh se dostává ve formě bezbarvých, šedobílých nebo slabě nažloutlých průsvitných lesklých proužků nebo čtyřbokých hranolů, případně může tvořit vločky. Za sucha je agar lámavý, po navlhčení vodou je ohebný. Je prakticky nerozpustný ve vodě, pouze bobtná. V horké vodě se rozpouští. Při mikroskopování jsou patrny schránky rozsivek. Agar obsahuje zejména slizy, jejichž podstatou je směs různých polysacharidů, zejména agarózy (70 %), polysacharidu, který obsahuje β-D-galaktózové jednotky, pospojované s 3,6-anhydro-α-L-galaktózovými jednotkami 1-4 vazbou. Obsahuje též disacharidy agarobiózu a neoagarobiózu. Dále je přítomen agaropektin, složený z molekul β-D-galaktózy, spojených vazbou 1,3 a částečně esterifikovaných v poloze 6 kyselinou sírovou.

Agar se používá jako zahušťovací prostředek k výrobě lékových forem – jako spojovací materiál při výrobě tablet a pilulek. Dále se využívá jako chirurgický materiál pro výrobu vstřebatelných nití. V mikrobiologii se užívá jako živná půda pro kultivaci mikroorganizmů. [3,28]

Agar se většinou získává ze dvou rodů červených řas, *Gelidium* a *Gracilaria*. Asi 90 % vyrobeného agaru je použito v potravinářství, zbývajících 10 % v mikrobiologii a jiných biotechnologiích. [29]

2.5.2 Kyselina alginová a algináty

Kyselina alginová je hlavní polysacharid v hnědých řasách. Je to polyuronát tvořený dvěma kyselinami D-mannuronovou a L-guluronovou kyselinou. Podíl kyseliny alginové v řasách je mezi 10 až 40 % sušiny řas. Různé části stélky řas obsahují různé podíly obou kyselin. [30]

Algináty jsou soli alginové kyseliny. Jsou přítomny v buněčných stěnách hnědých mořských řas a jsou částečně zodpovědné za pružnost řas. V důsledku toho mají hnědé mořské řasy rostoucí v neklidných vodách obvykle vyšší obsah alginátů než řasy rostoucí v klidných vodách. Struktura alginátu v řasách se liší v závislosti na druhu. Alginát se získává z těchto rodů hnědých řas: *Ascophyllum, Durvillaea, Ecklonia, Laminaria, Lessonia, Macrocystis* a *Hizikia*. Použití rodu *Hizikia* je velmi omezené, z důvodu nedostatečné kvality a nízké výtěžnosti. [31]

Algináty se používají jako zahušťovadla, gelotvorné a filmotvorné látky. [31]

2.5.3 Karagenany

Karagenany jsou gumy z čeledi Rhodophyceae. Obsahují D-galaktózosulfáty a bisulfáty, anhydro-D-galaktózu a její sulfát. [32]

Karagenany se získávají z těchto druhů řas: *Kappaphycus alvarezii*, *Eucheuma denticulatum*, *Betaphycus gelatinum, Chondrus crispus, Sarcothalia crispata* a *Gigartina skottsbergii*.

Největší uplatnění našly karagenany v potravinářském průmyslu, především v mléčných výrobcích. [33]

3 VYUŽITÍ PROTEINŮ V KOSMETICE

Proteiny se v kosmetice nejčastěji používají jako hydrofilní filmotvorné látky, které jsou schopné vytvářet v přítomnosti vody gely.

3.1 Kolagen

Kolagen je základní složkou extracelulární matrice pojivových tkání a nejrozšířenější protein v živočišné říši. Hraje významnou roli při stavbě kůže, šlach, buněčných membrán a dalších orgánů.

Pro kosmetické účely se kolagen získává nejčastěji z telecích, méně často hovězích kůží, případně z krátkých hovězích šlach. Používá se jako hydratant v pleťových maskách. Jako hydratanty se používají i hydrolyzáty kolagenu, hydrolyzované do různého stupně. [34]

3.2 Elastin

Elastin je vláknitý protein obsažený v pojivových tkáních. Ve spojení s glykoproteiny tvoří v pojivových tkáních pružná vlákna, odpovědná za jejich elasticitu. Elastin se získává z kůže, tkání, aorty, ale nejčastěji z dlouhých hovězích šlach, které obsahují až 70 % elastinu. Při izolaci se získává tzv. nízkomolekulární a vysokomolekulární elastin.

Nízkomolekulární elastin se v kosmetice používá za účelem stimulace biosyntézy elastinu, vysokomolekulární se používá především jako hydratant, respektive jako ochranná látka vlasu před vnějšími vlivy (barvení, bělení, žehlení vlasů). [34]

3.3 Chlorofyl

Dříve se chlorofyl používal do výrobků pro ústní hygienu, kde odstraňoval nepříjemný zápach z úst. Nyní se používá v kosmetice do deodorantů a peodorantů. [35]

4 VYUŽITÍ ŘAS V KOSMETICE

Pro kosmetické účely využívali mořské řasy již starověcí Egypťané, Řekové a Římané. Opravdový rozkvět ale nastal v sedmdesátých letech minulého století. Tehdy se mořské řasy začaly přidávat i do běžných kosmetických výrobků. Nejžádanější jsou řasy z francouzské Bretaně. Mají výživné, hydratační, revitalizační a zjemňující účinky a využívají se při léčbě akné, padání vlasů a vyhlazování vrásek. [36]

Řasy se používají v kosmetických přípravcích jako zahušťovadla, pojiva a antioxidanty. Mezi řasy, které jsou používány při výrobě kosmetických přípravků, patří *Ulva lactuca, Ascophyllum, Laminaria longicruris, Laminaria saccharina, Laminaria digitata, Alaria esculenta, Chondrus crispus a Mastocarpus stellatus.* [37]

Bylo zjištěno, že extrakt z mořských řas z jihovýchodní Asie zlepšuje ochrannou funkci kůže a zvyšuje v kůži vlhkost. Krém, který obsahoval 0,2 % extraktu, byl mazán dvakrát denně na pokožku. Při pravidelném mazání pokožky se již po týdnu zvýšila její vlhkost. [38]

Čistící olej, který obsahuje extrakt z mořských řas a mrkve dostatečně odstraňuje zbytky make-upu, řasenky, rtěnky a zbytky keratinu a nahromaděného mazu, který blokuje kožní póry. [38]

Alguronová kyselina, která je obsažena v mořských řasách zvyšuje regeneraci buněk a syntézu elastinu. Bylo rovněž prokázáno, že kyselina chrání buňky před poškozením ultrafialovým zářením a inhibuje enzymy, které štěpí elastin. [39]

Velmi populární je talasoterapie neboli léčba koupelemi v mořské vodě, do níž se přidávají různé látky a mimo jiné i mořské řasy. Bahenní zábaly s přídavkem mořských řas se používají k tišení bolesti svalů a kloubů. Bahno s přídavkem mořských řas podporuje krevní oběh a má uklidňující účinky. Masáž mořskými řasami působí jako peeling a zjemňuje pleť. [36]

4.1 Kosmetické výrobky s mořskými a sladkovodními řasami

Přehled kosmetických výrobků s mořskými a sladkovodními řasami na českém trhu.

4.1.1 URTEKRAM - Šampón s mořskými řasami

Vodný extrakt z mořských řas *Undaria pinnatifida*, *Porphyra tenera*, *Eisenia bicyclis*, *Hizikia fusiformis* a *Laminaria japonica*, mýdlo z kokosu a kukuřičného cukru, mořská sůl a kyselina citrónová.

Obr. 1. Šampon s mořskými řasami

4.1.2 RYOR – Noční regenerační krém s mořskými řasami

Krém s obsahem vitamínu E a extraktu z mořských řas (blíže nespecifikováno).

Obr. 2. Krém s mořskými řasami

4.1.3 ORIFLAME - Zeštíhlující gelový krém Swedish Spa

Krém s extraktem z řas *Asparagopsis armata* a *Chondrus crispus.*

Obr. 3. Gelový krém s mořskými řasami

4.1.4 AFRODITÉ - Hydratační krém s mořskými řasami

Hydratační krém s obsahem oleje jojoba a extraktem z mořských řas (blíže nespecifikováno).

Obr. 4. Krém s mořskými řasami

4.1.5 KANU nature – Peeling Limetka s mořskými řasami

Peeling s extraktem z limetky a mořské řasy *Chondrus crispus*.

Obr. 5. Peeling s extraktem z mořské řasy

4.1.6 MINERAL COSMETIC – Mýdlo s mořskými řasami

Mýdlo z výtažků z červených mořských řas (blíže nespecifikováno).

Obr. 6. Mýdlo s extraktem z červených řas

4.1.7 CHLORELLA COSMETIC – Regenerační krém

Regenerační krém s extraktem ze zelené řasy *Chlorella pyrenoidosa*.

Obr. 7. Regenerační krém s extraktem ze zelené řasy

5 METODY STANOVENÍ DUSÍKATÝCH LÁTEK

5.1 Stanovení dusíkatých látek Kjeldahlovou metodou

Kjeldahlovou metodou lze určit celkový dusík (suma bílkovinného a nebílkovinného dusíku) a tím i přibližný obsah bílkovin. Pro výpočet se využívá empirického faktoru 6,25, což je hodnota, která vychází z faktu, že vzorky obsahují protein s 16 % dusíku a nevýznamné množství neproteinového dusíku. Vzhledem k tomu, že rostlinné proteiny, včetně proteinů řas, obsahují určité množství neproteinového dusíku (dusitany, dusičnany, chlorofyl, volné aminokyseliny), musí být tento přepočtový faktor upraven s ohledem na množství neproteinového dusíku. Byly proto zjištěny faktory např. pro obiloviny, mouku, chléb, těstoviny 5,70, pro sušené mléko 6,38 nebo pro ořechy 5,30. Pro řasy byly také navrženy různé přepočtové faktory a to 4,95 pro červené řasy, 5,13 pro zelené řasy a 5,38 pro hnědé řasy. [21, 40, 42]

Organická dusíkatá látka se varem s konc. kyselinou sírovou zmineralizuje. Dusík přítomný ve formě aminových a některých jiných funkčních skupin (kromě nitro-, nitrozo-, azo-, hydrazo-skupin) se převede na amoniak, který zůstane vázán ve formě síranu amonného. Alkalizací mineralizovaného vzorku se uvolní amoniak, který se kvantitativně předestiluje s vodní parou do předlohy, kde se určí titračně. [41]

5.2 Stanovení dusíkatých látek metodou podle Conwaye

Vzorek se zmineralizuje podle Kjeldahla. Roztok amonné soli ve vnějším prostoru Conwayovy nádobky se alkalizuje nasyceným roztokem uhličitanu draselného nebo 50 % roztokem hydroxidu draselného. Uvolněný amoniak se absorbuje v kyselině borité umístěné ve vnitřním prostoru nádobky. Obsah dusíku se vypočítá podle spotřeby odměrného roztoku HCl o c = 0,01 mol l^{-1} při titraci na indikátor methylčerveň do červeného zbarvení (1 ml 0,01 M HCl odpovídá 0,14 mg dusíku). [21]

5.3 Spektrofotometrické stanovení dusíkatých látek po reakci s Nesslerovým činidlem

Dusík v bílkovinách se mineralizací s kyselinou sírovou (katalyzátor H_2O_2) převede na $(NH_4)_2SO_4$, který se stanoví spektrofotometricky po reakci s Nesslerovým činidlem v alkalickém prostředí:

$$NH_3 + KOH + K_2[HgI_4] \rightarrow Hg(NH_2)I + 3\ KI + H_2O$$

Intenzita zbarvení se měří na spektrofotometru při λ = 450 nm proti vodě. Obsah dusíku se odečte z kalibrační křivky a přepočte na navážku. Vynásobením faktorem 6,25 se získá obsah celkových dusíkatých látek.

Toto stanovení se používá při stanovení bílkovin v potravinářských materiálech s menším obsahem dusíku. [21]

5.4 Spektrofotometrické stanovení dusíkatých látek biuretovou reakcí

Po odstranění nízkomolekulárních sloučenin odstředěním s kyselinou trichloroctovou se k sedlině přidá biuretovo činidlo (roztok hydroxidu měďnatého). V alkalickém prostředí vznikají modře zbarvené komplexní sloučeniny mědi, jejichž barevná intenzita je úměrná koncentraci bílkovin. Zbarvení se proměřuje při λ = 546 nm proti slepému vzorku. Jedná se o metodu rychlou (přímá metoda stanovení bez mineralizace), ale méně citlivou, která slouží k orientačnímu stanovení bílkovin. [21]

5.5 Spektrofotometrické stanovení dusíkatých látek v UV oblasti spektra

Ke stanovení bílkovin se využívá absorpce některých aminokyselin vázaných v molekule bílkoviny (aromatické a heterocyklické aminokyseliny tryptofan, tyrozin, fenylalanin) v ultrafialovém světle. Roztok bílkovin se zředí fyziologickým roztokem a peptidové vazby se proměřují při λ = 180 – 220 nm. Aromatické a heterocyklické aminokyseliny při 280 nm. Je to metoda rychlá, snadno proveditelná, vhodná pro sledování průběhu separace bílkovin sloupcovou chromatografií. Není však univerzální a pro některé bílkoviny ji nelze použít. [21]

5.6 Spektrofotometrické stanovení dusíkatých látek podle Folina – Ciocalteua

Folin – Ciocalteua činidlo je směs kyseliny fosfomolybdenové a fosfowolframové. Redukuje se bílkovinami za vzniku komplexů molybdenové modři v alkalickém prostředí. Intenzita vzniklého zbarvení je úměrná obsahu aminokyselin tryptofan a tyrozin v bílkovině. Metoda je vhodná pro potraviny s vysokým i nízkým obsahem dusíku. [22]

5.7 Spektrofotometrické stanovení dusíkatých látek organickým barvivem oranž G

Bílkoviny vážou z pufrovaného roztoku barvivo oranž G, z jehož úbytku, zjištěného spektrofotometricky proměřením intenzity zbarvení roztoku při λ = 480 nm, se na základě

empiricky zjištěného vztahu určí jejich množství ve vzorku. Lze použít i jiná barviva, např. amidočerň 10 B. Jedná se o rychlou metodu pro rostlinné materiály (obiloviny, luštěniny, olejniny, mouka). Má široké uplatnění i při stanovení bílkovin v mléce. [21]

5.8 Titrační metody bez mineralizace

• Přímá alkalimetrická titrace (stanovení dusíku amidů aminokyselin)

Amidy aminokyselin lze přímo stanovit alkalimetrickou titrací.

• Formolová titrace (stanovení dusíku α-aminokyselin)

Po neutralizaci vzorku odměrným roztokem hydroxidu sodného na fenolftalein se přídavkem formaldehydu blokuje působnost volných aminoskupin.

Volné karboxylové skupiny lze stanovit druhou alkalimetrickou titrací, která je přímo úměrná obsahu bílkovinného dusíku. [21]

5.9 Dumasova metoda

Navážka vzorku látky se zahřívá s oxidem hořečnatým v křemenné trubici v proudu CO_2 a rozkladné produkty se vedou vrstvou rozžhaveného CuO. Organická látka je úplně oxidována na oxid uhličitý, vodu, elementární dusík a oxidy dusíku, které jsou redukovány na N_2 na vrstvě rozžhavené mědi. Vznikající dusík se spolu s ostatními plynnými produkty vede do plynoměrné byrety (azotometru) naplněné 40 % roztokem hydroxidu draselného. V něm jsou absorbovány všechny kyselé produkty oxidace a objem vzniklého dusíku se změří na stupnici. [21]

5.10 Stanovení proteinů elektroforetickou metodou SDS- PAGE

SDS-PAGE (sodium dodecylsulfát polyakrylamidová gelová elektroforéza) je separační metoda ke stanovení proteinů na základě odlišné molekulové hmotnosti, při které se uplatňuje elektrické pole. Elektrické pole zajišťuje migraci nabité částice v tekutém prostředí a její oddělení na gelové matrici podle molekulové hmotnosti.

Podstatou této separace je přítomnost aniontového detergentu dodecylsulfátu sodného (SDS), který se shodně váže na všechny bílkoviny v poměru 1,4 g SDS / 1 g bílkoviny. Navázáním SDS mění proteiny svoji konformaci. K této změně může dojít až po rozštěpení disulfidických můstků v molekule proteinu, což zajišťuje např. merkaptoetanol. K dokonalému navázání SDS je nutné vystavit vzorky vysoké teplotě.

Výsledný komplex SDS-bílkovina získá záporný náboj a umožní pohyb všech molekul vzorku v elektrickém poli stejným směrem. Jako porézní matrice slouží polyakrylamidový gel, který se připravuje kopolymerací akrylamidu a *N,N´*-methylen-bisakrylamidu. Polymerací monomerů akrylamidu vnikají lineární řetězce, které jsou propojeny bisakrylamidovými můstky do trojrozměrné sítě. Na poměru mezi akrylamidem a bisakrylamidem závisí velikost pórů gelu a tím i rozsah molekulových hmotností, v němž se bude uplatňovat tzv. síťovací efekt. Pro analýzu vzorků se gely barví a vyhodnocují příslušnými metodami a postupy. [43]

II. PRAKTICKÁ ČÁST

6 CÍL DIPLOMOVÉ PRÁCE

Cílem diplomové práce bylo stanovení proteinů ve vybraných druzích mořských a sladkovodních řas.

Byly vyzkoušeny různé extrakční postupy vzorků mořských i sladkovodních řas pro stanovení proteinů.

Proteiny byly stanoveny elektroforetickou metodou SDS-PAGE.

7 METODIKA PRÁCE

7.1 Materiál

Pro stanovení proteinů bylo použito devět vzorků mořských a sladkovodních řas a sinic. Jejich charakteristika je uvedena v tabulce 1.

Tab. 1. Charakteristika zkoumaných mořských a sladkovodních řas

Řasy	Druh	Produkt	Označení vzorku	Země
Zelené	*Chlorella pyrenoi-dosa*	Chlorella Tabs	C	Taiwan
Modro-zelené	*Spirulina platensis*	Spirulina Bio	S_B	Indie
Červené	*Palmaria palmata*	Dulse flakes Bio	D	USA
	Porphyra tenera	Nori flakes	N_V	Japonsko
Hnědé	*Eisenia bicyclis*	Arame	A	Japonsko
	Hizikia fusiformis	Hijiky	H	Japonsko
	Laminaria japonica	Kombu	K	Japonsko
	Undaria pinnatifida	Wakame	W	Japonsko
	Undaria pinnatifida	Wakame-instant	W_i	Japonsko

7.2 Metody přípravy vzorků pro SDS-PAGE

Pro stanovení proteinů elektroforetickou metodou SDS-PAGE je nutné vyizolovat proteiny z řasových produktů. Vzhledem k vysokému obsahu různých polysacharidů, není snadné proteiny z řas vyizolovat. Bylo vyzkoušeno celkem deset různých extrakčních metod.

7.2.1 Metoda I

Vzorky řas byly hydrolyzovány destilovanou vodou, zásaditým pufrem o pH 7,5 a pepsinem v kyselém prostředí o pH 2,2.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

termoblok EVATERM
vařič ETA, ČR
odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

Materiál:
Pro metodu I byly použity řasy *P. palmata* (D) a *L. japonica* (K).

Použité chemikálie a roztoky:
pepsin (z vepřové žaludeční sliznice, 0,7 FIP–U/g, Merck KGaA, Německo)
kyselina chlorovodíková (35% w/w) (SIGMA, ALDRICH, Německo)
dihydrogen fosforečnan draselný (SIGMA, ALDRICH, Německo)
hydrogen fosforečnan disodný (SIGMA, ALDRICH, Německo)

Postup úpravy vzorků
Byly připraveny dva pufry, jejichž hodnota pH byla 2,2 (8,9 ml HCl do 1l destilované vody) a 7,5 (3,63g KH_2PO_4 a 38,22g Na_2HPO_4 do 2l destilované vody). Od každého vzorku bylo naváženo na analytických vahách třikrát 1 g. Vzorek byl kvantitativně převeden do 250 ml kádinky. K první sadě vzorků od každé řasy bylo přidáno 100 ml destilované vody, k druhé sadě vzorků 100 ml pufru o pH 7,5 a ke třetí sadě vzorků 100 ml pufru o pH 2,2 a 0,5 g pepsinu, viz Tab. 2.

Tab. 2. Schéma přípravy vzorků řas P. palmata (D) a L. japonica (K) – metoda I

vzorek řasy	Hmot. vzorku [g]	destil. voda [ml]	pufr pH 7,5 [ml]	pufr pH 2,2 [ml]	pepsin [g]
D	1,00	100			
D	1,00		100		
D	1,00			100	0,5
K	1,00	100			
K	1,00		100		
K	1,00			100	0,5

Vzorky bez pepsinu byly vařeny na vařiči po dobu 30 minut, vzorky s pepsinem byly dány do termoboxu a uchovány po dobu 24 hodin při teplotě 40 °C.

Po dovaření byly vzorky zchlazeny pod tekoucí vodou a centrifugovány ve 20 ml centrifugačních zkumavkách při 6000 ot./min. po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do eppendorfek a uchován v lednici. Druhý den byly vzorky s pepsinem vytaženy z termoboxu, následně byly centrifugovány při 6000 ot./min. po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do eppendorfek a uchován v chladničce s ostatními vzorky k analýze.

7.2.2 Metoda II

Vzorky řas byly hydrolyzovány lyzovým pufrem.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

vařič ETA, ČR

odstředivka MIKRO 200R, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

kulový mlýn MM 301, Retch, Německo

Materiál:

Pro metodu II byly použity všechny vzorky řas uvedené v tabulce 1.

Použité chemikálie a roztoky:

tris – hydroxymethyl aminomethane (SERVA)

ethylen diamine – tetraacetic acid (SIGMA, ALDRICH, Německo)

chlorid sodný (SERVA)

triton X-100 (0,5% w/w) (Lach-Ner)

lyzový pufr (31,25 ml 50 mM tris – hydroxymethyl aminomethane, 6,25 ml 10 mM ethylen diamine – tetraacetic acid, 62,5 ml 100 mM chloridu sodného a 50 µl tritonu X-100)

Postup úpravy vzorků

V kulovém mlýně bylo dezintegrováno 6 g vzorku při frekvenci 20 kmitů za sekundu po dobu 6 minut. Na analytických vahách bylo naváženo 0,01 – 0,03 g vzorku do eppendorfek. K vzorkům bylo přidáno 100 µl lyzového pufru. Vzorky byly vařeny na vařiči v kádince s alobalem, do kterého byly eppendorfky zapíchnuty. Po uplynutí 10 minut byly vzorky zchlazeny v chladničce a následně centrifugovány při 15000 ot./min. po dobu 10 minut. Po centrifugaci byly vzorky uchovány v chladničce k analýze.

7.2.3 Metoda III

Vzorky řas byly hydrolyzovány lyzovým pufrem a následně byly z hydrolyzátu vysráženy proteiny 80%-ním síranem amonným.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

odstředivka MIKRO 200R, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

laboratorní třepačka LT2

hlubokomrazící box MDF-U3286S, SANYO, prodejce Schoeller instruments, ČR, Praha

lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc

Materiál:

Pro metodu III byly použity všechny vzorky řas uvedené v tabulce 1.

Použité chemikálie a roztoky:

tris – hydroxymethyl aminomethane (SERVA)

ethylen diamine – tetraacetic acid (SIGMA, ALDRICH, Německo)

chlorid sodný (SERVA)

triton X-100 (0,5% w/w) (Lach-Ner)

síran amonný (80%-ní) (SIGMA, ALDRICH, Německo)

lyzový pufr (31,25 ml 50 mM tris – hydroxymethyl aminomethane, 6,25 ml 10 mM ethylen diamine – tetraacetic acid, 62,5 ml 100 mM chloridu sodného a 50 µl tritonu X-100)

Postup úpravy vzorků

Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku. Ke vzorkům bylo přidáno 10 ml lyzového pufru. Vzorky byly inkubovány při pokojové teplotě 2 dny. Následně byly vzorky centrifugovány při 15000 ot. /min. 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do 15 ml centrifugačních zkumavek a byl k němu přidán 80%-ní roztok síranu amonného. Po vysrážení proteinů byly vzorky umístěny na 60 minut na třepačku. Poté byly centrifugovány při 15000 ot./min. po dobu 15 minut. Sraženina proteinů byla lyofilizována. Po lyofilizaci byly vzorky uchovány v mrazničce k analýze.

7.2.4 Metoda IV

Vzorky řas byly hydrolyzovány celulázou ve slabě kyselém prostředí o pH 5,5.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

termoblok EVATERM

odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

Materiál:

Pro metodu IV byly použity řasy *P. palmata* (D) a *L. japonica* (K).

Použité chemikálie a roztoky:

kyselina citronová (SIGMA, ALDRICH, Německo)

citran sodný (SIGMA, ALDRICH, Německo)

celuláza (SERVA)

citranový pufr o pH 5,5 (0,21 g kyseliny citronové v 10 ml destilované vody a 0,29 g citranu sodného v 10 ml destilované vody, následně se odebere 1,48 ml roztoku kyseliny citronové a 3,52 ml roztoku citranu sodného a doplní se destilovanou vodou do 10 ml)

Postup úpravy vzorků:

Na analytických vahách bylo od každého vzorku naváženo čtyřikrát 0,5 g. Byl připraven citranový pufr s pH 5,5. Ke dvěma vzorkům od každé řasy bylo přidáno 0,01 g celulázy, k dalším dvěma 0,02 g celulázy. Dále bylo k vzorkům přidáno 5 ml citranového pufru. Vzorky byly protřepány a vloženy do termoboxu při 40 °C. Dva vzorky od každé řasy s 0,01 g a 0,02 g celulázy byly uchovány po dobu 6 hodin, zbylé dva vzorky po dobu 24 hodin, viz Tab. 3.

Tab. 3. Schéma přípravy vzorků řas P. palmata (D) a L. japonica (K) – metoda IV

vzorek řasy	hmot. vzorku [g]	citranový pufr pH 5,5 [ml]	celuláza [g]	doba inkubace [hod.]
D	0,5	5,00	0,01	6
D	0,5	5,00	0,01	24
D	0,5	5,00	0,02	6
D	0,5	5,00	0,02	24
K	0,5	5,00	0,01	6
K	0,5	5,00	0,01	24
K	0,5	5,00	0,02	6
K	0,5	5,00	0,02	24

Po inkubaci byly vzorky centrifugovány při 6000 ot /min. po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do 15 ml centrifugačních zkumavek a uchován v chladničce k analýze.

7.2.5 Metoda V

Vzorky řas byly hydrolyzovány destilovanou vodou.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

vařič ETA, ČR

chladnička GORENJE, Coorvatsko

odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

Materiál:

Pro metodu V byly použity všechny vzorky řas uvedené v tabulce 1.

Postup úpravy vzorků:

Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku a kvantitativně převeden do 200 ml kádinky. K vzorku bylo přidáno 150 ml destilované vody. Vzorky byly přikryty alobalem a nechány v laboratoři při pokojové teplotě do druhého dne. Druhý den byly vzorky vařeny na vařiči po dobu jedné hodiny. Po uplynutí doby byly vzorky zchlazeny pod tekoucí vodou, přelity do 20 ml centrifugačních zkumavek a centrifugovány při 6000 ot./min. po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do 15 ml centrifugačních zkumavek a uchován v chladničce k analýze.

7.2.6 Metoda VI

Vzorky řas byly hydrolyzovány roztoky neutrálního a kyselého detergentu a roztokem hydroxidu sodného.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

termoblok EVATERM

odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

mineralizátor – Selecta, Bloc Digest 12 (O. K. SERVIS BioPro, Praha)

Materiál:

Pro metodu VI byly použity řasy *P. palmata* a *L. japonica.*

Použité chemikálie a roztoky:

neutral detergent solution (NDF) (SIGMA, ALDRICH, Německo)

acid detergent solution (ADF) (SIGMA, ALDRICH, Německo)

triethylene glycol (TEG) (SIGMA, ALDRICH, Německo)

amyláza (SERVA)

siřičitan sodný (SIGMA, ALDRICH, Německo)

hydroxid sodný (1%-ní) (SIGMA, ALDRICH, Německo)

kyselina sírová (konc.) (SIGMA, ALDRICH, Německo)

pracovní roztok NDF (6 g NDF ve 100 ml destil. vody s 1 ml TEG a 1 g Na_2SO_3)

pracovní roztok NDF s amylázou (6 g NDF ve 100 ml destil. vody s 1 ml TEG, 1 g Na_2SO_3 a 0,2 ml amylázy)

pracovní roztok ADF (2 g ADF ve 100 ml destil. s 2,8 ml H_2SO_4)

Postup úpravy vzorků:

Na analytických vahách byl od každého vzorku navážen čtyřikrát 1 g. Vzorek byl kvantitativně převeden do mineralizační zkumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 25 ml připraveného roztoku, viz Tab. 4.

Tab. 4. Schéma přípravy vzorků řas P. palmata (D) a L. japonica (K) - metoda VI

vzorek řasy	hmot. vzorku [g]	NDF [ml]	NDF + amylóza [ml]	ADF [ml]	NaOH [ml]
D	1,00	25,0			
D	1,00		25,0		
D	1,00			25,0	
D	1,00				25,0
K	1,00	25,0			
K	1,00		25,0		
K	1,00			25,0	
K	1,00				25,0

Poté byly mineralizační zkumavky umístěny do mineralizátoru s nastavenou teplotou ohřevu 100 °C. Mineralizace probíhala 60 minut. Po mineralizaci byly vzorky zchlazeny a

přelity do 20 ml centrifugacích zkumavek. Vzorky s amylázou byly dány do termoboxu na 60 minut při teplotě 40 °C. Následně byly vzorky centrifugovány při 3904 ot./min. po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do 15 ml centrifugačních zkumavek a uchován v chladničce k analýze.

7.2.7 Metoda VII

Vzorky řas byly hydrolyzovány roztokem neutrálního detergentu. Mineralizace vzorků byla provedena při vyšší teplotě než u metody VI.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

mineralizátor – Selecta, Bloc Digest 12 (O.K. SERVIS BioPro, Praha)

hlubokomrazící box MDF-U3286S, SANYO, prodejce Schoeller instruments, ČR, Prah

lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc

Materiál:

Pro metodu VII byly použity všechny vzorky řas uvedené v tabulce 1.

Použité chemikálie a roztoky:

neutral detergent solution (NDF) (SIGMA, ALDRICH, Německo)
triethylene glycol (TEG) (SIGMA, ALDRICH, Německo)
siřičitan sodný (SIGMA, ALDRICH, Německo)
pracovní roztok NDF (15 g NDF ve 250 ml destilované vody s 2,5 ml TEG a 2,5 g siřičitanu sodného)

Postup úpravy vzorků:

Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku. Vzorek byl kvantitativně převeden do mineralizační zkumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 25 ml pracovního roztoku

NDF. Poté byly mineralizační zkumavky umístěny do mineralizátoru s nastavenou teplotou ohřevu 125°C. Mineralizace probíhala 60 minut. Po mineralizaci byly vzorky zchlazeny a přelity do 20 ml centrifugacích zkumavek. Vzorky byly centrifugovány při 3904 ot./min. po dobu 10 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do dvou 15 ml centrifugačních zkumavek. Polovina vzorku byla uchována v chladničce k analýze, druhá polovina byla lyofilizována. Po lyofilizaci byly vzorky uchovány v mrazničce k analýze.

7.2.8 Metoda VIII

Vzorky řas byly hydrolyzovány deionizovanou vodou.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

laboratorní třepačka LT2

odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

hlubokomrazící box MDF-U3286S, SANYO, prodejce Schoeller instruments, ČR, Praha

lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc

Materiál:

Pro metodu VIII byly použity všechny vzorky řas uvedené v tabulce 1.

Postup úpravy vzorků:

Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku. Vzorek byl kvantitativně převeden do 15 ml centrifugační zkumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml deionizované vody. Vzorky byly umístěny na třepačku a třepány při pokojové teplotě do druhého dne. Druhý den byly vzorky centrifugovány při 6000 ot. /min. po dobu 60 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit do 15 ml centrifugační zkumavky a lyofilizován. Po lyofilizaci byly vzorky umístěny do mrazničky a uchovány k analýze.

7.2.9 Metoda IX

Vzorky řas byly hydrolyzovány v destilované vodě v ultrazvukové lázni. Z hydrolyzátu byly následně proteiny vysráženy 80%-ním síranem amonným.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

kulový mlýn MM 301, Retch, Německo

odstředivka MIKRO 200R, MIKRO 200 R, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

hlubokomrazící box MDF-U3286S, SANYO, prodejce Schoeller instruments, ČR, Praha

lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc

ultrazvuková lázeň TESLA, Československo

laboratorní třepačka LT2

Materiál:

Pro metodu IX byly použity všechny vzorky řas uvedené v tabulce 1.

Použité chemikálie a roztoky:

síran amonný (80%-ní) (SIGMA, ALDRICH, Německo)

Postup úpravy vzorků:

V kulovém mlýně byly dezintegrovány 3 g vzorku při frekvenci 30 kmitů za sekundu po dobu 6 minut.

Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku a převeden do 15 ml centrifugační zkumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml destilované vody a vzorky byly umístěny na 60 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí doby byly vzorky umístěny na třepačku a třepány do druhého dne při pokojové teplotě. Druhý den byly vzorky centrifugovány při 3904 ot./min. po dobu 30 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit a

uchován v lednici. K peletu, který zůstal po centrifugaci na dně zkumavky bylo přidáno 10 ml destilované doby a byl umístěn na 60 minut do ultrazvukové lázně. Poté byly vzorky umístěny na třepačku a třepány do druhého dne při pokojové teplotě. Následující den byly vzorky centrifugovány při 3904 ot./min. po dobu 30 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit k prvnímu supernatantu z předchozího dne. K polovině supernatantu byl přidán 80%-ní síran amonný, druhá polovina byla uchována v chladničce k lyofilizaci, a vzorky byly umístěny na 60 minut na třepačku. Po uplynutí doby byly vzorky centrifugovány při 10000 ot./min. po dobu 60 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit a ke sraženině proteinů bylo přidáno 150 µl destilované vody a vzorky byly umístěny na třepačku a třepány do druhého dne při pokojové teplotě. Druhý den byly všechny vzorky lyofilizovány. Po lyofilizaci byly umístěny do mrazničky a uchovány k analýze.

7.2.10 Metoda X

Vzorky řas byly hydrolyzovány v destilované vodě v ultrazvukové lázni.

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

kulový mlýn MM 301, Retch, Německo

odstředivka MIKRO 200R, MIKRO 200 R, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

odstředivka EBA 21, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

lyofilizátor ALPHA 1-4 LSC, CHRIST, prodejce LABICOM s.r.o., ČR, Olomouc

ultrazvuková lázeň TESLA, Československo

laboratorní třepačka LT2

Materiál:

Pro metodu X byly použity všechny vzorky řas uvedené v tabulce 1.

Postup úpravy vzorků:

V kulovém mlýně byly dezintegrovány 3 g vzorku při frekvenci 30 kmitů za sekundu po dobu 6 minut.

Na analytických vahách byl navážen 1 g vzorku a převeden do 15 ml centrifugační zkumavky. Ke každému vzorku bylo přidáno 10 ml destilované vody a vzorky byly umístěny na 120 minut do ultrazvukové lázně. Po uplynutí doby byly vzorky umístěny na třepačku a třepány do druhého dne při pokojové teplotě. Druhý den byly vzorky centrifugovány při 3904 ot./min. po dobu 30 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit a uchován v lednici. K peletu, který zůstal po centrifugaci na dně zkumavky bylo přidáno 10 ml destilované doby a byl umístěn na 120 minut do ultrazvukové lázně. Poté byly vzorky umístěny na třepačku a třepány do druhého dne při pokojové teplotě. Následující den byly vzorky centrifugovány při 3904 ot./min. po dobu 30 minut. Po centrifugaci byl supernatant slit k prvnímu supernatantu z předchozího dne. Následně byly vzorky lyofilizovány. Po lyofilizaci byly umístěny do mrazničky a uchovány k analýze.

7.3 Stanovení proteinů elektroforetickou metodou SDS-PAGE

Použité přístroje a pomůcky:

běžné laboratorní sklo a pomůcky

analytické váhy A&D GH-200 EC

chladnička GORENJE, Chorvatsko

odstředivka MIKRO 200R, Hettich ZENTRIFUGEN, Tuttlingen, Germany

třepačka Orbita multi shaker, Biosan

zařízení vertikální elektroforézy, BioRad

inkubátor INCU-LINE, BioTech a.s., Praha

Materiál:

Pro stanovení proteinů pomocí SDS-PAGE byly použity vzorky zpracované podle výše uvedených extrakčních postupů.

Použité chemikálie a roztoky:

fixační roztok (etanol, 96% (Lach-Ner) 30 ml, kyselina octová (Lach-Ner) 10 ml, 60 ml neionizovaná voda

tris pufr pro separační gel, pH 8,8 (tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 18,15 g, 50 ml neionizované vody, upravit pH pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner)

tris pufr pro koncentrační gel, pH 6,8 (Tris(hydroxymethyl)aminomethane (Duchefa Biochemie) 6 g, 50 ml neionizované vody, upravit pH pomocí koncentrované HCl (Lach-Ner)

30%-ní roztok akrylamidu (Akrylamid (SERVA) 29,2 g a N,N´-metylen-bisakrylamid (SERVA) 0,8 g ve 100 ml destilované vody)

vzorkový pufr (0,062 M Tris-HCl (SERVA), 5%-ní merkaptoetanol (SERVA), 10%-ní glycerol (Lach-Ner), 0,01 g bromfenolová modři (SERVA))

elektrodový pufr dle Laemliho 10x koncentrovaný (SERVA) ředění 1:9

standard Protein test Mixture 6 (SERVA)

amonium persulfate (SERVA) (persíran)

odbarvovací roztok (25%-ní metanol (SERVA), 10%-ní kyselina octová (SERVA), 650 ml deionizované vody)

coomassie briliant blue (Coomassie briliant blue (SERVA) 0,1 g, etanol 96%-ní (Lachema) 50 ml, kyselina fosforečná (Lachema) 100 ml, neionizovaná voda 850 ml)

SDS (10%-ní) (SERVA)

SDS (20%-ní) (SERVA)

N, N, N´, N´- tetra-metylendiamin (TEMED) (SERVA)

merkaptoetanol (SERVA)

2,5%-ní uhličitan sodný (Lachema) v 0,02%-ním formaldehydu (SIGMA, ALDRICH)

0,05%-ní glutaraldehyd (SIGMA, ALDRICH, Německo), 0,01%-ní formaldehyd (SIGMA, ALDRICH, Německo), 40%-ní etanol (Lachema)

0,5%-ní Farmerův zeslabovač (150 mg ferrikyanid draselný (SIGMA, ALDRICH, Německo), 300 mg thiosíran sodný (SIGMA, ALDRICH, Německo), 50 mg uhličitan sodný, bezvodý (Lachema), deionizovaná voda do 100 ml)

2,5%-ní uhličitan sodný (Lachema)

0,1% dusičnan stříbrný (Lachema)

1%-ní kyselina octová (SERVA)

7.3.1 Konečná úprava vzorků pro SDS-PAGE

Pro stanovení proteinů metodou SDS-PAGE bylo ke 100 µl řasového extraktu u jednotlivých extrakčních metod přidáno 25µl 20%-ního SDS, 12,5µl merkaptoetanolu a 115 µl vzorkového pufru. Vzorky byly promíchány a inkubovány při 100 °C po dobu 10 minut. Poté byly zchlazeny a centrifugovány při 15000 ot./min. po dobu 10 minut.

7.3.2 Sestavení aparatury a příprava gelů

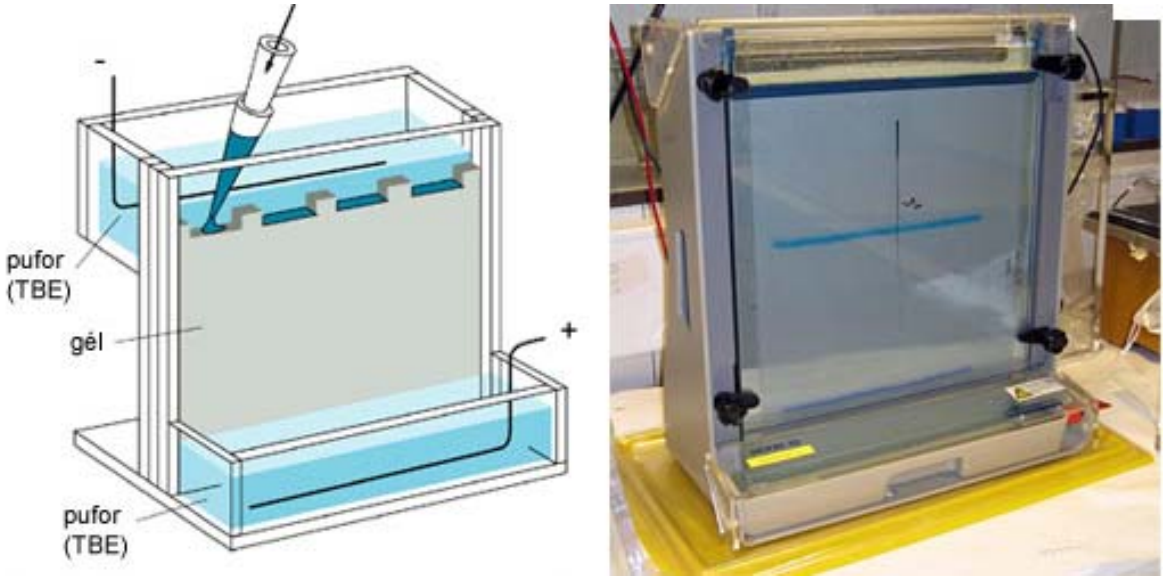
Vertikální elektroforetická aparatura, která se skládá z vlastní vany, víka, dvou tvarovaných skel v párovém uspořádání, teflonového mezerníku (těsnění) a hřebínku byla sestavena dle doporučení výrobce, viz Obr. 8.

Pro separaci proteinů byl připraven 10%-ní separační gel tloušťky 1,5 mm. Separační gel byl připraven z 1,61 ml 30%-ního roztoku akrylamidu, 1,1 ml Tris pufru o pH 8,8, 1,44 ml neionizované vody, 31,3 µl 10%-ního SDS, 16,7 µl 10%-ního persíranu amonného a 2,1 µl N, N, N´, N´- tetra-metylendiaminu. Roztok byl důkladně promíchán a ihned aplikován pomocí příslušné pipety mezi skla do výšky 3 cm od horního okraje tak, aby nedošlo ke vzniku bublin. Pro zamezení polymerace na vzduchu byl gel přelit vrstvou deionizované vody. Po 1 hodině byla voda vysušena filtračním papírem a byl aplikován 5%-ní koncentrační gel, který byl připraven z 250 µl 30%-ního roztoku akrylamidu, 375 µl Tris pufru o pH 6,8, 865 µl neionizované vody, 15 µl 10%-ního SDS, 15 µl 10%-ního persíranu amonného a 1,88 µl N, N, N´, N´- tetra-metylendiaminu. Roztok byl důkladně promíchán a nanesen příslušnou pipetou na separační gel až těsně pod horní okraj skla. Poté byl opatrně vsunut teflonový hřeben. Takto připravený gel i se stojanem byl vložen do vlhké komůrky a nechán polymerovat do druhého dne.

7.3.3 Nanášení vzorků a vlastní elektroforéza

Z gelu byl opatrně vyjmut hřebínek a odstraněn dolní mezerník. Do spodního prostoru aparatury byl nalit elektrodový pufr a spuštěno chlazení. Elektrodový pufr byl nalit i do horní části vany tak, aby došlo k převrstvení jamek. Připravené vzorky byly nanášeny v objemu 20 – 30 µl. Kromě vzorků byl nanesen také proteinový hmotnostní standard s šesti různými hmotnostními frakcemi. Po nanesení vzorků byla elektroforetická komora přikryta víkem a připojena ke zdroji stejnosměrného proudu. Díky svým vlastnostem vyžaduje každý gel odlišné podmínky. Pro koncentrační gel byla nastavena hodnota proudu na 20 mA. Po doputování čela elektroforézy k rozhraní koncentračního a separačního gelu byla hodnota proudu zvýšena na 30 mA. Po doputování čela elektroforézy ke spodní hranici separačního gelu byl dělicí proces ukončen. Elektroforéza probíhala 1 – 3 hodiny, v závislosti na povaze vzorku. Aparatura byla odpojena od proudu a skla byla vyndána z vany. Poté byla skla od sebe opatrně oddělena, gel vložen do plastové vaničky a přelit fixačním roztokem a fixován na třepačce po dobu 30 minut. Po odstranění fixačního roztoku byl gel opláchnut destilovanou vodou a byl přidán barvicí roztok coomassie briliant blue. Za stálého třepání byl gel barven 1 hodinu. Po odstranění barvicího roztoku byl opláchnut destilovanou vodou a přelit odbarvovacím roztokem. Po odbarvení byl gel vyfotografován. Ukázka fotografie gelu vzorků, připravených metodou II je uvedena v příloze I. Snímky byly analyzovány pomocí programu ULTRA CAM.

Při barvení gelů dusičnanem stříbrným byl zkrácen fixační čas na 10 minut. Po odstranění fixačního gelu byl přidán roztok 0,05%-ního glutaraldehydu, 0,01%-ního formaldehydu a 40%-ního etanolu na dobu 5 minut. Po uplynutí doby byl roztok slit a přidán 96%-ní etanol na 20 minut. Po slití etanolu byl gel promýván destilovanou vodou 20 minut. Následně byl přidán 0,5%-ní Farmerův zeslabovač na 2,5 minuty. Po slití zeslabovače byl gel opět proplachován destilovanou vodou po dobu 30 minut. Poté byl přidán 0,1%-ní roztok dusičnanu stříbrného na 20 minut. Po slití roztoku byl gel opláchnut destilovanou vodou a přidán 2,5%-ní uhličitan sodný na 5 minut. Po uplynutí doby byl gel opláchnut vodou a přidán roztok 2,5%-ního uhličitanu sodného v 0,02%-ním formaldehydu na dobu 7,5 minuty. Po slití roztoku byl gel opláchnut destilovanou vodou a přidán roztok 1%-ní kyseliny octové na dobu 5 minut. Následně byl roztok slit, gel opláchnut destilovanou vodou a fotografován.



Obr. 8. Nanášení vzorků a průběh elektroforéz

VÝSLEDKY A DISKUZE

7.4 Stanovení proteinů

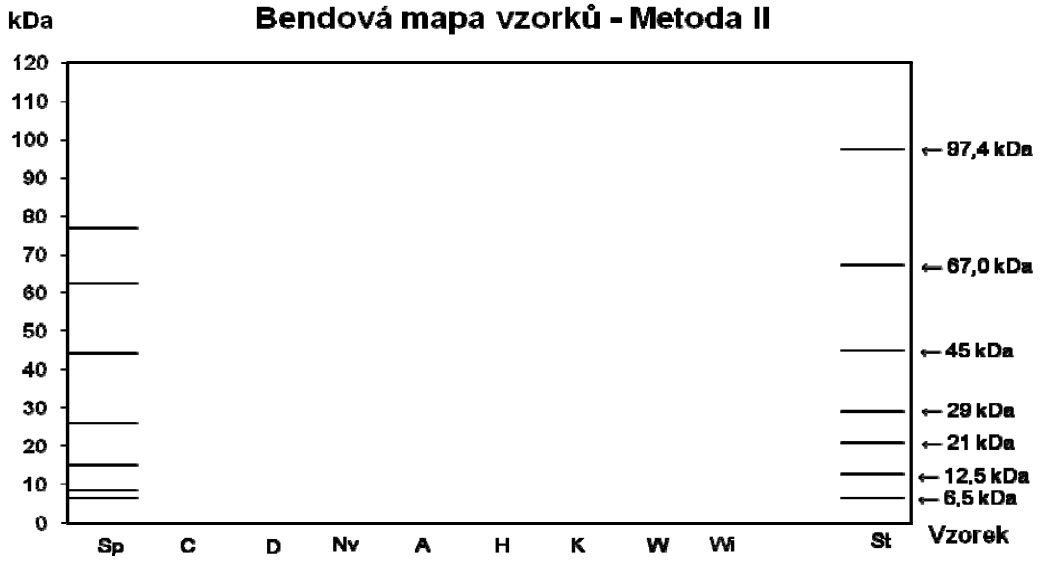
Pro elektroforézu bylo nutné upravit vzorky řas podle různých metodik, které jsou uvedeny v kapitole 7.1. Stanovení proteinů bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 7.2. Byly porovnávány vzorky řas a odlišné metodiky přípravy vzorků pro SDS-PAGE.

7.4.1 Stanoveni proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou I

Touto metodou, kdy byly vzorky hydrolyzovány destilovanou vodou, zásaditým pufrem o pH 7,5 a pepsinem v kyselém prostředí se nepodařilo vyextrahovat proteiny ze vzorků řas a výsledek SDS-PAGE byl negativní.

7.4.2 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou II

Na obrázku 9 je znázorněna bendová mapa vzorků, které byly zpracovány metodou II.



Obr. 9. I. Bendová mapa vzorků – Metodika II

Z bendové mapy vzorků řas, připravených metodou II je patrné, že proteiny byly identifikovány pouze u modro-zelené řasy *Spirulina platensis.*

V tabulce 5 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinových frakcí modro-zelené řasy *Spirulina platensis.*

Tab. 5. Vyhodnocení gelů Metodika II

Molekulová hmotnost proteinů v kDa	
Standard (St)	*Spirulina* (Sp)
97,4	76,8
67,0	62,5
45,0	44,3
29,0	26,0
21,0	15,1
12,5	8,4
6,5	6,6

Metodou II se podařilo izolovat 7 proteinových frakcí, jejichž molekulové hmotnosti se pohybovaly od 6,6 do 76,8 kDa.

7.4.3 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou III

Na obrázku 10 je znázorněna bendová mapa vzorků, které byly zpracovány metodou III.

Obr. 10. II. Bendová mapa vzorků – Metodika III

Bendová mapa zaznamenává proteinový profil dvou sladkovodních řas *Spirulina* a *Chlorella.*

V tabulce 6 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinových frakcí sladkovodních řas *Spirulina* a *Chlorella.*

Tab. 6. Vyhodnocení gelů Metodika III

Molekulová hmotnost proteinů v kDa		
Standard (St)	*Spirulina* (Sp)	*Chlorella* (C)
29,0	47,4	45,8
21,0	44,9	29,9
12,5	40,6	28,1
6,5	34,4	21,6
	29,0	16,3
	19,3	8,3
	8,4	7,1
	6,8	6,1
	6,1	

Metodou III se podařilo izolovat proteinové profily dvou sladkovodních řas *Spirulina platensis* a *Chlorella pyrenoidosa.* U řasy *Spirulina* bylo identifikováno 9 proteinových frakcí o molekulové hmotnosti 6,1 až 47,4 kDa. Vzorek řasy *Chlorella* obsahoval 8 proteinů o molekulové hmotnosti 6,1 až 45,8 kDa.

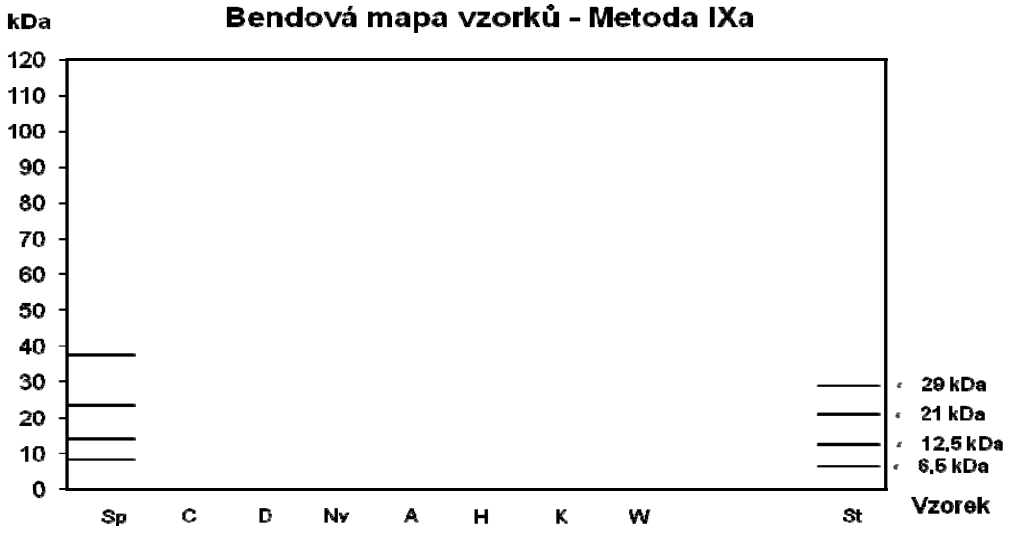
Při porovnání obou proteinových profilů řasy *Spirulina* je zřejmé, že předchozí proteinový profil obsahoval 2 proteiny o vyšší molekulové hmotnosti.

7.4.4 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodami IV až VIII

Metodou IV, kde byla použita k hydrolýze vzorků celuláza, metodami V a VIII, kde byla použita k hydrolýze vzorků deionizovaná voda a ani metodami VI a VII, kde byly použity k hydrolýze vzorků detergenty, se nepodařilo vyizolovat ze vzorků mořských a sladkovodních řas proteiny a jejich stanovení metodou SDS-PAGE bylo negativní.

7.4.5 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou IXa

Na obrázku 11 je znázorněna bendová mapa vzorků, které byly zpracovány metodou IXa.



Obr. 11. III. Bendová mapa vzorků – Metodika IXa

Podobně jako u první bendové mapy byly identifikovány proteinové frakce pouze u modro-zelené řasy *Spirulina*.

V tabulce 7 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinových frakcí u sladkovodní řasy *Spirulina platensis.*

Tab. 7. Vyhodnocení gelů Metodika IXa

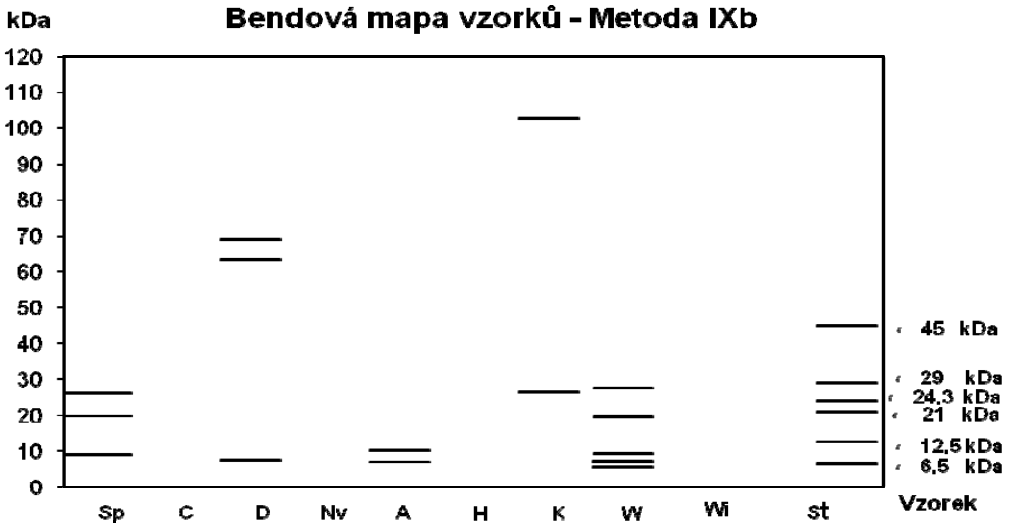
Molekulová hmotnost proteinů v kDa	
Standard (St)	*Spirulina* (Sp)
29,0	37,7
21,0	23,8
12,5	14,2
6,5	8,5

Molekulové hmotnosti 4 proteinů se pohybovaly v rozmezí 8,5 až 37,7 kDa. Při porovnání s proteinovým profilem řasy *Spirulina platensis*, kde byla použita metoda III, při které byly vzorky vysráženy 80%-ním síranem amonným, byla v metodě IXa navíc použita ultrazvuková lázeň. Dezintegrace řasové hmoty ultrazvukem probíhala 60 minut. Z dosažených

výsledků je patrné, že profil získaný ze vzorků zpracovaných metodou III, měl proteiny o vyšší molekulové hmotnosti.

7.4.6 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou IXb

Na obrázku 12 je znázorněna bendová mapa vzorků, které byly zpracovány metodou IXb.



Obr. 12. IV. Bendová mapa vzorků – Metodika IXb

Čtvrtá bendová mapa vzorků zaznamenává proteinový profil pěti vzorků řas, a to sladkovodní řasy *Spirulina platensis* (Sp) a čtyř mořských *Eisenia bicyclis* (A)*, Palmaria palmata* (D), *Laminaria japinica* (K) a *Undaria pinnatifida* (W). Proteinový profil nebyl izolován ze vzorků řas *Chlorella pyrenoidosa* (C), *Porphyra tenera* (N), *Hizikia fusiformis* (H) a *Undaria pinnatifida* (Wi).

V tabulce 8 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinových frakcí u pěti vzorků řas.

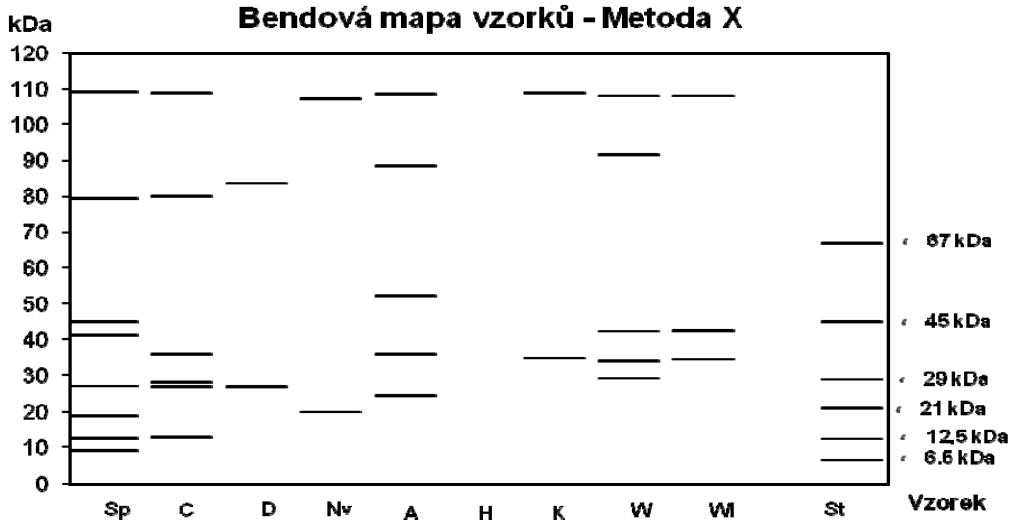
Tab. 8. Vyhodnocení gelů Metodika IXb

Molekulová hmotnost proteinů v kDa					
Standard (Sp)	*Spirulina* (Sp)	Dulse (D)	Arame (A)	Kombu (K)	Wakame (W)
45,0	26,4	69,2	10,3	103,0	27,6
29,0	20,0	63,5	7,1	26,5	19,7
24,3	9,2	7,6			9,4
21,0					7,3
12,5					5,8
6,5					

Molekulové hmotnosti 3 proteinů u řasy *Spirulina* se pohybovaly v rozmezí 9,2 až 26,4kDa. U Dulse byly identifikovány 3 proteiny o molekulové hmotnosti 7,6 až 69,2 kDa. U Arame i Kombu byly identifikovány 2 proteiny. U Arame o molekulové hmotnosti 7,1 a 10,3 kDa. U Kombu byly zjištěny molekulové hmotnosti proteinů 26,5 a 103,0 kDa. Poslední proteinový profil byl identifikován u vzorku Wakame. Molekulové hmotnosti 5 proteinů byly v rozmezí 5,8 až 27,6 kDa.

7.4.7 Stanovení proteinových profilů vzorků zpracovaných metodou X

Na obrázku 13 je znázorněna bendová mapa vzorků, které byly zpracovány metodou IXb.



Obr. 13. VI. Bendová mapa vzorků – Metodika X

Bendová mapa vzorků zaznamenává proteinový profil 8 vzorků řas.

V tabulce 9 jsou uvedeny molekulové hmotnosti proteinových profilů 8 vzorků řas, dvou sladkovodních *Spirulina platensis* (Sp) a *Chlorella pyrenoidosa* (C) a 6 mořských *Palmaria palmata* (D), *Porphyra tenera* (N), *Eisenia bycyclis* (A), *Laminaria japonica* (K) a *Undaria pinnatifida* (W, Wi).

Tab. 9. Vyhodnocení gelů Metodika X

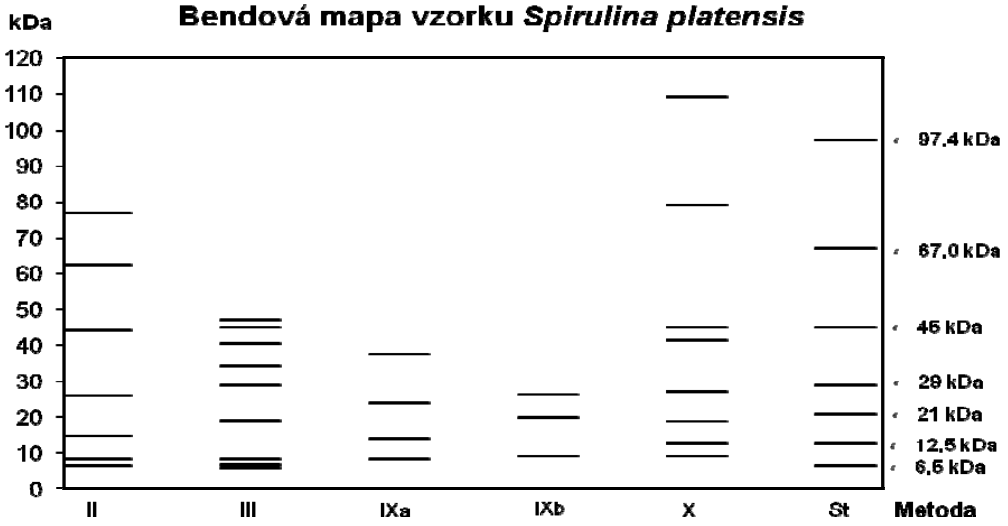
Molekulová hmotnost proteinů v kDa								
Standard (St)	*Spirulina* (Sp)	*Chlorella* (C)	Dulse (D)	Nori (N)	Arame (A)	Kombu (K)	Wakame (W)	Wakame instant (Wi)
67	109,1	108,8	83,5	107,1	108,5	108,8	108,1	108,0
45	79,2	80,2	26,7	20,0	88,4	35,0	91,7	42,8
29	45,1	36,1			52,5		42,6	34,8
21	41,5	28,1			36,1		34, 4	
12,5	27,1	27,0			24,5		29,3	
6,5	18,9	12,7						
	12,7							
	9,1							

U vzorku *Spirulina* bylo identifikováno 8 proteinů o molekulových hmotnostech 9,1 až 109,1 kDa. *Chlorella* obsahovala 6 proteinů o molekulových hmotnostech 12,7 až 108,8 kDa. U vzorků řas Dulse a Nori byly identifikovány 2 proteiny. U Dulse o molekulové hmotnosti 26,7 a 83,5 kDa. U řasy Nori byla molekulová hmotnost proteinů 20,0 a 107,1 kDa. U Arame bylo identifikováno 5 proteinů o molekulových hmotnostech 24,5 až 108,5 kDa. Řasa Kombu obsahovala 2 proteiny o molekulových hmotnostech 35,0 a 108,8 kDa. U Wakame bylo identifikováno 5 proteinů a u Wakame instant 3 proteiny. Molekulová hmotnost proteinů u Wakame se pohybovala mezi 29,3 až 108,1 kDa. U řasy Wakame instant byla molekulová hmotnost proteinů 34,8, 42,8 a 108,0 kDa.

U vzorků *Spirulina*, Dulse, Arame, Kombu a Wakame byly identifikovány proteiny o vyšších molekulových hmotnostech, než ve čtvrté bendové mapě, kde byla použita podobná metodika přípravy vzorků (IXb – 60 min. ultrazvukové lázně, X – 120 min. ultrazvukové lázně).

7.4.8 Stanovení proteinových profilů vzorků *Spirulina platensis* připravených různými extrakčními metodami

Na obrázku 14 je znázorněna bendová mapa proteinových profilů vzorku řasy *Spirulina,* který byl připraven různými extrakčními metodami.



Obr. 14. Bendová mapa vzorku Spirulina platensis

Z bendové mapy je patrné, že molekulové hmotnosti proteinů vzorků připravených podle metodik II a X jsou vyšší, než u vzorků řasy připravených podle metodik III, IXa a IXb.

Přípravy vzorků podle metodik IXb a X se liší délkou ultrazvuku (metoda IXb – 60 min., X – 120 min.) a velmi podobné jsou i jejich velikosti proteinů o nižších molekulových hmotnostech. Lze také říci, že molekulové hmotnosti proteinů, které byly upraveny metodou X jsou vyšší, než u vzorků upravených metodou IXb. Můžeme tedy říci, že delší doba ultrazvuku zapříčinila, že bylo možné ze vzorku řasy vyizolovat proteiny o vyšších molekulových hmotnostech.

V tabulce 10 jsou uvedeny proteinové profily vzorku sladkovodní řasy *Spirulina platensis,* který byl připraven různými metodikami.

Tab. 10. Srovnání různých metod u řasy Spirulina platensis

Molekulová hmotnost proteinů v kDa				
Metodika II	Metodika III	Metodika IXa	Metodika IXb	Metodika X
76,8	47,4	37,7	26,4	109,1
62,5	44,9	23,8	20,0	79,2
44,3	40,6	14,2	9,2	45,1
26,0	34,4	8,5		41,5
15,1	29,0			27,1
8,4	19,3			18,9
6,6	8,4			12,7
	6,8			9,1
	6,1			

Ve srovnání s Kjeldahlovou metodou, kdy byl obsah stanovených dusíkatých látek vyšší u sladkovodních řas *Spirulina* a *Chlorella* než u řas mořských, můžeme říci, že metodou SDS-PAGE bylo taktéž stanoveno více proteinových profilů u řas sladkovodních než mořských. Nejnižší množství dusíkatých látek bylo Kjeldahlovou metodou stanoveno u hnědé mořské řasy *Hizikia fusiformis.* Metodou SDS-PAGE se u této řasy nepodařilo proteiny ze vzorku vyizolovat. [44]

Spirulina jako fotosyntetizující sinice má buněčnou stěnu složenou z mukopolysacharidů s absencí celulózy. Její proteiny byly, na rozdíl od ostatních vzorků sladkovodních a mořských řas, které ve své buněčné stěně obsahují celulózu a významné množství dalších polysacharidů, snáze vyextrahovány a následně stanoveny metodou SDS-PAGE.

Bylo zjištěno, že největší množství vlákniny z analyzovaných vzorků řas obsahuje hnědá mořská řasa *Hizikia fusiformis.* Naopak nejmenší množství vlákniny obsahují sladkovodní

řasy *Spirulina* a *Chlorella.* Množství vlákniny u vzorku *Hizikia fusiformis* pravděpodobně způsobilo, že nebylo možné proteiny ze vzorku izolovat. [44]

ZÁVĚR

Z výsledků diplomové práce lze říci, že řasy jsou zdrojem proteinů, ale jejich využitelnost je omezena přítomností polysacharidů v buněčné stěně.

Cílem diplomové práce bylo stanovení proteinů v mořských a sladkovodních řasách elektroforetickou metodou SDS-PAGE. Bylo hodnoceno devět vzorků řas, a to dvě sladkovodní řasy *Chlorella pyrenoidosa* (C) a *Spirulina platensis* (Sp), dvě červené mořské řasy *Palmaria palmata* (D) a *Porphyra tenera* (N) a pět hnědých mořských řas *Laminaria japonica* (K), *Eisenia bicyclis* (A), *Hizikia fusiformis* (H) a *Undaria pinnatifida* (W, Wi).

Bylo vyzkoušeno deset různých metodik přípravy vzorků pro vlastní stanovení proteinů. Z výsledků je zřejmé, že nejvíce účinná byla metoda IXb a X, které se liší délkou působení ultrazvuku (IXb – 60 min., X – 120 min.).

Největší množství proteinů bylo identifikováno u vzorku řasy *Spirulina,* naopak žádnou metodou se nepodařilo získat proteiny ze vzorku hnědé mořské řasy *Hizikia fusiformis*.

Proteiny vzorku řasy *Spirulina* byly úspěšně izolovány, a následně identifikovány pomocí SDS-PAGE, pěti extrakčními metodami. Nejvíce účinná byla úprava vzorků metodou III, kdy byly proteiny ze vzorků vysráženy 80%-ním síranem amonným a metodou SDS-PAGE bylo identifikováno devět proteinových frakcí, následně pak metoda X, kdy byly vzorky dezintegrovány ultrazvukem po dobu 120 min. a metodou SDS-PAGE bylo identifikováno osm frakcí. Méně účinnou byla metoda II, kdy byly vzorky hydrolyzovány lyzovým pufrem a metodou SDS-PAGE bylo identifikováno sedm proteinových frakcí. Nejméně účinnými byly metody IXa, kdy byly vzorky dezintegrovány ultrazvukem po dobu 60 min. a proteiny následně vysráženy 80%-ním síranem amonným a metodu SDS-PAGE byly identifikovány čtyři proteinové frakce a metoda IXb, kdy byly vzorky dezintegrovány ultrazvukem po dobu 60 min. a metodou SDS-PAGE byly identifikovány tři frakce. Molekulové hmotnosti proteinových frakcí u vzorku řasy *Spirulina* se pohybovaly od 6,1 až 109,1 kDa.

Proteiny sladkovodní řasy *Chlorella pyrenoidosa* byly úspěšně izolovány pomocí dvou metod. Vzorky byly upraveny podle metody III a metody X. Každá z metod hydrolyzuje vzorky jinými chemikáliemi a postupy. Metodou III byly vzorky hydrolyzovány lyzovým pufrem a proteiny vysráženy 80%-ním síranem amonným a metodou X byly vzorky dezintegrovány ultrazvukem po dobu 120 min. Molekulová hmotnost proteinů u vzorku uprave-

ného metodou X byla vyšší než u vzorku upraveného metodou III. Molekulová hmotnost všech proteinových frakcí se u vzorku *Chlorella pyrenoidosa* pohybovala od 6,1 do 108,8 kDa.

U čtyř vzorků byly proteiny úspěšně izolovány pomocí dvou metod. Úprava vzorků byla podle metod IXb a X. Jak již bylo výše řečeno, přípravy vzorků podle obou metod se liší pouze délkou působení ultrazvuku. Molekulové hmotnosti proteinových frakcí byly u vzorků upravených metodou X vyšší, než proteinové frakce vzorku upraveného metodou IXb. Lze tedy říci, že delší doba působení ultrazvuku na řasovou hmotu zapříčinila, že bylo možné ze vzorků vyizolovat proteiny o vyšších molekulových hmotnostech. Molekulové hmotnosti proteinových frakcí hnědé mořské řasy *Undaria pinnatifida* v produktu Wakame se pohybovaly v rozmezí od 5,8 do 108,1 kDa. Molekulové hmotnosti všech proteinových frakcí se u vzorku červené mořské řasy *Palmaria palmata* (D) pohybovaly v rozmezí 7,6 až 83,5 kDa. U vzorku hnědé mořské řasy *Eisenia bicyclis* (A) se molekulové hmotnosti proteinů pohybovaly od 7,1 do 108,5 kDa. Posledním vzorkem, který byl identifikován na dvou gelech, byl vzorek hnědé mořské řasy *Laminaria japonica* (K). Molekulové hmotnosti proteinů byly od 26,5 do 108,8 kDa.

Zbylé dva vzorky řas byly identifikovány pouze na jediném gelu. Jednalo se červenou mořskou řasu *Porphyra tenera* (N) a hnědou mořskou řasu *Undaria pinnatifida* (Wi). Řasy byly upraveny metodou X. Molekulová hmotnost 2 proteinů byla u řasy *Porphyra tenera* 20,0 a 107,1 kDa. U řasy *Undaria pinnatifida* z produktu Wakame instant byla molekulová hmotnost proteinů 34,8, 42,8 a 108,0 kDa.

Mořské i sladkovodní řasy jsou významným zdrojem vlákniny, minerálních látek, proteinů a vitamínů. Jsou bezpečné pro konzumaci, ačkoliv u některých druhů je třeba dbát na vysoký obsah sodíku, jódu a těžkých kovů. Řasy našly uplatnění v mnoha odvětvích průmyslu. Největší uplatnění našly v průmyslu potravinářském, kde se používají ve formě agaru a karagenanů. V poslední době se stále více uplatňují v průmyslu kosmetickém, kde se používají jako zahušťovadla, pojiva a antioxidanty.

Řasy jsou v dnešní době nedílnou součástí mnoha průmyslových odvětví. Trh s kosmetickými výrobky je zahlcen produkty chemického průmyslu, které však nemusí vždy prospívat našemu zdraví či pokožce. Úskalí či určitou nadbytečnost používání syntetických přípravků si zároveň většina lidí uvědomuje.

V moderní společnosti lze jasně sledovat tendence návratu k přirozeným (přírodním) zdrojům látek cenných pro lidský organizmus a bylo by tedy vhodné věnovat řasám pozornost, zabývat se jejich dalším výzkumem a možností jejich širšího využití v kosmetickém průmyslu.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] GUSCHINA, I. A., HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in lipid research.* 2006, 45, 160-186.

[2] FLEURENCE, J.: Seaweed proteins: biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science and Technology*. 1999, 10, 25-28.

[3] CHEMIE A BIOLOGIE JIŘÍHO ROUBALA [online]. [cit. 2011-01-22]. Dostupný z WWW: <http://www.chemik.estranky.cz/clanky/biologie.html>.

[4] CYANOBACTERIA [online]. [cit. 2011-03-24]. Dostupný z WWW: <http://www.sinicearasy.cz/134/Cyanobacteria >.

[5] KALINA T., VÁŇA J. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Praha: Nakladatelství Karolinum, 2005. ISBN 80-246-1036-1.

[6] JANKOVSKÝ, L. *Viry*, *prokaryota*, *řasy*, *houby a lišejníky*. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 1997. 154 s. ISBN 80-210-1555-1.

[7] HRONEK M. *Preklinické a klinické studie*. Olomouc: Epava, 2005. 31 s.

[8] NEORI, A., SHPIGEL, M., BEN-EZRA, D.: A sustainable integrated system for culture of fish, seaweed and abalone. *Aquaculture.* 2000, 186, 279-291.

[9] KAPRAUN, D. F.: Red algal polysaccharide industry: economics and research status at the turn of the century. *Hydrobiologia*. 1999, 398, 7-14.

[10] KING, A. H.: Brown seaweed extracts (alginates). *Food hydrocolloids*. 1983, 2, 115-188.

[11] LOMBARDI, J. V., MARQUES, H.L.A., BARRETO, O.J.S.: Floating cages in open sea water: an alternative for promoting integrated aquaculture in Brazil. *World Aquaculture,* 2001. 47, 49-50.

[12] OHNO, M., MATSUOKA, M.: Undaria cultivation "wakame". *Ohno & Critchley.* 1993, 76, 41-56.

[13] NORAMBUENA, R.: Recent trends of seaweed production in Chile. *Hydrobiologia*. 1996, 326, 371-379.

[14] CROUCH, I. J., Staden, J.: Evidence for the presence of plant growth regulators in commercial seaweed products. *Plant Growth Regulation*. 1993, 13, 21-29.

[15] BIOCHEMIE [online]. [cit. 2011-03-24]. Dostupný z WWW: <http://utb-fles.cepac.cz/moduly/M0021_biochemie/distancni_text/M0021_biochemie_distancni_text.pdf>.

[16] PÁNEK, J., POKORNÝ, J., DOSTÁLOVÁ, J., KOHOUT, P. *Základy výživy*. 1. vyd. Praha: Svoboda Servis, 2002. 68 s. ISBN 80-86320-23-5.

[17] DOSTÁL, J., PAULOVÁ, H., SLANINA, J., TÁBORSKÁ, E. *Biochemie pro bakaláře*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerita v Brně, 2003. 174 s. ISBN 80-210-3232-4.

[18] DOSTÁL, J., KAPLAN, P. a kol. *Lékařská chemie II: bioorganická chemie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita v Brně, 2001. 223 s. ISBN 80-210-2731-2.

[19] CHRONAKIS, I. S., GALATANU, A. S., NYLANDER, T., LINDMAN, J.: The behaviour of protein preparations from blue-green algae (*Spirulina platensis* strain Pacifica) at the air:water interface. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects*. 2000, 173, 181-192.

[20] BECKER, E., W., Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*. 2007, 25, 207-210.

[21] ANALÝZA A HODNOCENÍ POTRAVIN [online]. [cit. 2011-01-24]. Dostupný z WWW: <http://utbfles.cepac.cz/moduly/M0032_analyza_a_hodnoceni_potravin/distancni_text/M0032_analyza_a_hodnoceni_potravin_distancni_text.pdf >.

[22] URBAN, Z., KALINA T. *Sinice, řasy, houby. Systém a vývoj*. Praha: Univerzita Karlova v Praze, 1977. 253 s.

[23] COHEN Z. : Chemicals from microalgae. *Taylor & Francis Ltd.* 1999, 419, 282-291.

[24] VALDMAN, E., LEITE, S.G.F.: Biosorption of Cd, Zn and Cu by Sargassum sp. waste biomass. *Bioprocess Engineering*. 2000, 22, 171-173.

[25] ŘASY MOŘSKÉ [online]. [cit. 2011-03-24]. Dostupný z WWW: <http://www.agronavigator.cz/az/vis.aspx?id=92409>.

[26] SOHN, C. H. Economic seaweed resources and cultivation in Korea. *World Aquaculture*. 1999, 32, 34-36.

[27] MAC ARTAIN P.: Nutritional value of edible seaweeds. *Nutrition Reviews*. 2007, 65, 535-543.

[28] SINICE A ŘASY [online]. [cit. 2011-01-24]. Dostupný z WWW: <http://www.biotox.cz/naturstoff/biologie/bi-sinicerasy.html>.

[29] McHUGH, D. J. Worldwide distribution of commercial resources of seaweeds Including Gelidium. *Hydrobiologia.* 1991, 221, 19-29.

[30] ANASTASAKIN, K., ROSS, A. B., JONES, J. M. Pyrolysis behaviour of the main carbohydrates of brown macro-algae. *Fuel.* 2011, 90, 598– 607.

[31] McHUGH, D. J., HERMANDÉZ-CARMONA, G., ARVIZU-HIGUERA, D. L., RODRIGUEZ-MONTESINOS, Y. E.: Pilot plant scale extraction of alginate from Macr ocystis pyrifera. Precipitation, bleaching and conversion of calcium alginate to alginic acid.

Journal of Applied Phycology. 2001, 13, 471-479.

[32] ŘEHOŘ, J. *Organická chemie*. Praha: SZN, 1973. 645 s. ISBN 07-021-73.

[33] BIXLER, H. J. Recent developments in manufacturing and marketing carrageenan. *Hydrobiologia*. 1996, 326, 35-57.

[34] LANGMAIER, F. *Základy kosmetických výrob.* UTB. 2001. 160s.

[35] SCHLOSSMAN, M. L.: *The chemistry and manufacture of cosmetics.* USA: Allured Publishing Corporation, 2002. 551s. ISBN 0-931710-77-4.

[36] DE ROECK-HOLTHAUSER, Y: Uses of seaweeds in cosmetics. *.In Guiry & Blunden*. 1991, 56, 83-94.

[37] Scharffetter K.: UVA irradiation induces collagenase in human dermal fibroblasts in vitro and in vivo. *Arch. Dermatology.* 1991, 283, 506-511.

[38] PACIFIC RESEARCH CONSULTING: Seaweed extract to improve rough skin. *Cosmetics$Toiletries$Household Products Marketing News in Japan.* 2002, 24, s. 1.

[39] LOUIS, S. C.: Alguronic Acid Star In Latest Skin Product. *The Leader.* 2011, 28. ISSN 01630288.

[40] DAVÍDEK J., a kol. *Laboratorní příručka analýzy potravin*. 1. vyd. Praha: SNTL/ALFA, 1981. 718s.

[41] KAŠ, J., KADLČEK, M. Laboratorní techniky biochemie 1. vyd. Praha: VŠCHT v Praze, 2006. ISBN 80-7080-586-2.

[42] LOURENÇO, S. O., BARBARINO, E., De-PAULA, J. C., OTÁVIO DA PEREIRA, L. S., MARQUEZ, U. M. L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*. 2002, 50, 233-241.

[43] BUŇKOVÁ, L. *Laboratoř z molekulární biologie.* UTB, FT. 2010.

[44] MIŠURCOVÁ, L., KRÁČMAR, S, KLEJDUS, B., VACEK, J. Nitrogen Contect, Dietrary Fiber, and Digestibility in Algal Food Products. *Czech J. Food Sci.* 2010, 28, 27-35.

SEZNAM OBRÁZKŮ

Obr. 1. Šampon s mořskými řasami 29
Obr. 2. Krém s mořskými řasami 30
Obr. 3. Gelový krém s mořskými řasami 30
Obr. 4. Krém s mořskými řasami 31
Obr. 5. Peeling s extraktem z mořské řasy 31
Obr. 6. Mýdlo s extraktem z červených řas 32
Obr. 7. Regenerační krém s extraktem ze zelené řasy 32
Obr. 8. Nanášení vzorků a průběh elektroforéz 55
Obr. 9. I. Bendová mapa vzorků – Metodika II 56
Obr. 10. II. Bendová mapa vzorků – Metodika III 57
Obr. 11. III. Bendová mapa vzorků – Metodika IXa 59
Obr. 12. IV. Bendová mapa vzorků – Metodika IXb 60
Obr. 13. VI. Bendová mapa vzorků – Metodika X 61
Obr. 14. Bendová mapa vzorku Spirulina platensis 63

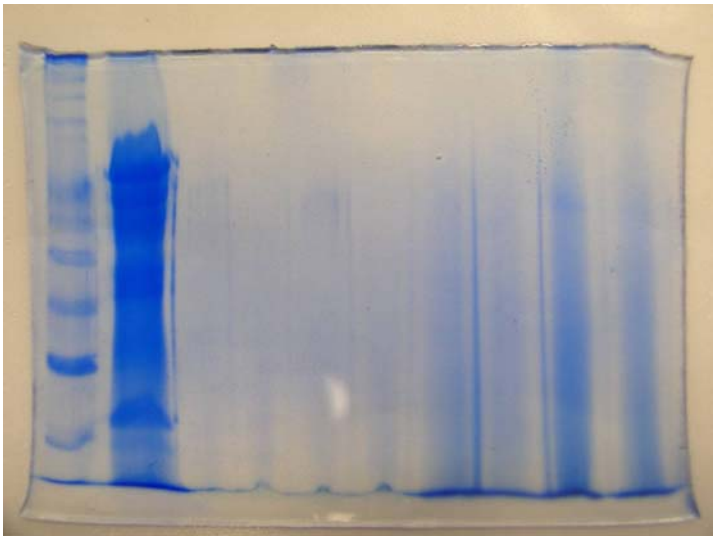
SEZNAM TABULEK

Tab. 1. Charakteristika zkoumaných mořských a sladkovodních řas 39
Tab. 2. Schéma přípravy vzorků řas P. palmata (D) a L. japonica (K) – metoda I 41
Tab. 3. Schéma přípravy vzorků řas P. palmata (D) a L. japonica (K) – metoda IV 44
Tab. 4. Schéma přípravy vzorků řas P. palmata (D) a L. japonica (K) - metoda VI 46
Tab. 5. Vyhodnocení gelů Metodika II 57
Tab. 6. Vyhodnocení gelů Metodika III 58
Tab. 7. Vyhodnocení gelů Metodika IXa 59
Tab. 8. Vyhodnocení gelů Metodika IXb 61
Tab. 9. Vyhodnocení gelů Metodika X 62
Tab. 10. Srovnání různých metod u řasy Spirulina platensis 64

SEZNAM PŘÍLOH

P I: Fotografie gelu vzorků připravených metodou III

PŘÍLOHA PI: FOTOGRAFIE GELU VZORKŮ PŘIPRAVENÝCH METODOU III



S	Sp	A	Wi	K	W	D	H	C	N