

Ing. Dušan Samek

**VLIV ZPŮSOBU KULTIVACE A DEZINTEGRACE ŘASOVÉ
BIOMASY NA OBSAH A VÝTĚŽNOST NUTRIČNÍCH
FAKTORŮ**

**INFLUENCE OF CULTIVATION AND DISINTEGRATION METHODS
OF ALGAL BIOMASS ON CONTENTS AND YIELDS
OF NUTRITIONAL FACTORS**

DISERTAČNÍ PRÁCE

Obor: 2901V013 Technologie potravin

Školitel: doc. Ing. Miroslav Fišera, CSc.

Konzultant: Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D.

Zlín, 2013

Poděkování:

Touto cestou bych rád poděkoval školiteli doc. Ing. Miroslavu Fišerovi, CSc. a konzultantce Ing. Ladislavě Mišurcové, Ph.D. za odborné vedení, cenné rady, připomínky a náměty, které mně poskytovali během celého doktorského studia. Za poskytnutí vzorků mikrořas z různých metod kultivací patří poděkování následujícím institucím: Akademii věd České republiky, Ústav mikrobiologie, Sekce fototrofních mikroorganismů, Třeboň, Česká republika a Akademickému a Univerzitnímu Centru Nové Hradky, Ústav fyzikální biologie, Nové Hradky, Česká republika, kde byla uskutečněna laboratorní kultivace mikrořas. Zvláštní poděkování patří Ing. Magdě Sergejevové, Ph.D., za konzultace v oblasti řasové biotechnologie. Také děkuji své rodině a blízkým za podporu během celého studia. Mé poděkování dále patří všem, kteří se jakýmkoliv způsobem podíleli na realizaci a vzniku této disertační práce.

ABSTRAKT

Cílem disertační práce bylo sledovat vliv způsobu kultivace vybraných zelených sladkovodních mikrořas a sinice a také různého mechanismu dezintegrace řasové biomasy na obsah nutričních složek v jejich biomase. V práci byly použity zelené sladkovodní mikrořasy rodů *Chlorella*, *Scenedesmus* a sinice rodu *Spirulina*, která je označována jako modro-zelená mikrořasa, jež byly kultivovány při autotrofních i heterotrofních podmínkách. V jejich biomase byly stanoveny obsahy sušiny, popela, dusíkatých látek, minerálních prvků, chlorofylů *a* i *b*, karotenoidů a aminokyselinové, proteinové a lipidové profily. Byla stanovena stravitelnost vyšetřovaných řas *in vitro* enzymaticko-gravimetrickou filtrační metodou s využitím inkubátoru Daisy po 24 hodinové enzymatické hydrolýze pepsinem, pankreatinem a kombinované hydrolýze obou enzymů. Bylo provedeno mechanické a enzymatické pokultivační rozrušení řasové biomasy s cílem sledovat, zda tyto způsoby ošetření biomasy vedou ke změně výtěžnosti obsažených nutričních složek či ovlivňují její stravitelnost. Byly srovnány účinky dvou metod enzymatického způsobu ošetření řasové biomasy s využitím čistého enzymu celulasy a komerčně dostupného celulasového produktu Celluclast 1,5L na stravitelnost řas.

V řasové biomase byly stanoveny její základní chemické charakteristiky; obsah sušiny v rozmezí 83,6 – 96,0 %, obsah popela v rozmezí 4,8 – 17,8 %, obsah dusíkatých látek byl v intervalu od 22,7 – 55,6 %. Mikrořasy byly ohodnoceny jako dobrý zdroj esenciálních, neesenciálních a sirných aminokyselin. Bylo pozorováno, že mikrořasy kultivované autotrofně v solárním fotobioreaktoru a při autotrofním režimu ve venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádáním obsahovaly vyšší množství aminokyselin ve srovnání se vzorky kultivovanými pod autotrofním laboratorním či heterotrofním režimem. Společným znakem pro vyšetřované druhy mikrořas byla přítomnost proteinů o molekulových hmotnostech

v rozmezí 14,3 až 27 kDa a 70 až 116 kDa. Heterogenita mezi proteinovými profily mikrořas byla pozorována v oblasti mezi 30 až 70 kDa. Nejvíce lipidů bylo obsaženo v mikrořase *Scenedesmus quadricauda*, predominantně zastoupené mastné kyseliny ve všech vzorcích mikrořas byly nasycená mastná kyselina – palmitová; monoenové mastné kyseliny – palmitolejová a olejová; dienová mastná kyselina – linolová a polyenové mastné kyseliny – γ -linolenová a α -linolenová. Mechanické pokultivační ošetření řasové biomasy mělo pozitivní vliv na zvýšení výtěžnosti lipidů a γ -linolenové kyseliny. Ve vyšetřovaných mikrořasách byly stanoveny chlorofyly a karotenoidy a bylo zjištěno, že heterotrofně kultivovaná řasová biomasa obsahovala výrazně méně pigmentů ve srovnání s autotrofně kultivovanou mikrořasou. Dále bylo zjištěno, že vyšetřované mikrořasy jsou dobrým zdrojem minerálních prvků především draslíku, fosforu a železa. Nejméně stravitelnou mikrořasou při všech typech provedených hydrolýz byl *Scenedesmus quadricauda*, jehož stravitelnost byla třikrát nižší ve srovnání se sinicí *Spirulina platensis*, která vykazovala nejvyšší hodnoty stravitelnosti. Mechanické a enzymatické pokultivační ošetření biomasy zelených sladkovodních mikrořas mělo významný vliv na zvýšení hodnot stravitelnosti.

Klíčová slova: zelené sladkovodní mikrořasy; sinice; kultivace; pokultivační ošetření; aminokyseliny; proteiny; minerální prvky; mastné kyseliny; stravitelnost.

ABSTRACT

The aim of this work was to investigate the influence of cultivation methods of green freshwater micro-algae and cyanobacterium and their dezintegration on contents of nutritional factors in their biomass. In the study, green freshwater micro-algae from genus *Chlorella*, *Scenedesmus* and cyanobacterium (blue-green micro-alga) *Spirulina* that were cultivated under autotrophic and heterotrophic regime were used. In their algal biomass contents of dry matter, ash, crude protein, mineral elements, chlorophyll *a* and *b*, carotenoids were determined and sequentially their amino acid, protein and lipid profiles were assessed. Digestibility by enzymatically gravimetric filter *in vitro* method using the incubator Daisy after 24 hours of enzymatic hydrolysis with pepsin, pancreatin and combined hydrolysis by both enzymes in investigated algae was also assessed. Further, it was performed mechanical and enzymatic post-harvesting treatment of algal biomass to monitor whether this way of treatment may change yields of nutritional factors or may influence the digestibility. Thus, the effects of two methods of enzymatic post-harvesting treatment of algal biomass using pure enzyme cellulase and a commercially available cellulase product Celluclast 1.5 L on the digestibility of algae were compared.

In the algal biomass, its basic chemical characteristics were determined, dry matter and ash contents in micro-algae ranged from 83.6 to 96.0% and from 4.8 to 17.8% respectively, crude protein content was in the interval of 22.7 – 55.6%. Micro-algae have been evaluated as a good source of essential, non-essential and sulphur amino acids. It was observed, that micro-algae autotrophically cultivated in solar photobioreactor and in open outdoor cultivation with a cascade type contained higher amounts of amino acids compared with algal samples originated from laboratory or heterotrophic regimes. Investigated micro-algal species together contained

proteins of molecular weight in the range of 14.3 to 27 kDa and from 70 to 116 kDa. Significant heterogeneity between the protein profiles of micro-algae was observed in the area between 30 and 70 kDa. The richest source of lipids was micro-alga *Scenedesmus quadricauda*; in all algal samples, predominantly represented fatty acids were: saturated fatty acid - palmitic; monounsaturated fatty acids – palmitoleic and oleic; diene fatty acid – linoleic and polyunsaturated fatty acids – γ -linolenic and α -linolenic. Mechanical post-harvesting treatment of algal biomass had a positive effect on increasing the yield of lipids and γ -linolenic acid. The contents of chlorophylls and carotenoids in investigated micro-algae were mostly higher in comparison with literary sources; it was also observed, that heterotrophically cultivated algal biomass contained significantly less amount of pigments with comparison to autotrophically cultivated algae. It was evaluated that the investigated micro-algae are a good source of mineral elements especially potassium, phosphorus and iron. *Scenedesmus quadricauda* was the poorest digestible micro-alga in all types of hydrolysis, while *Spirulina platensis* was very digestible micro-alga. Mechanical and enzymatic post-harvesting treatment of algal biomass of green freshwater micro-algae led to a significant effect on the increase in digestibility.

Keywords: green freshwater micro-algae; cyanobacterium; cultivation; post-harvesting treatment; amino acids; proteins; mineral elements; fatty acids; digestibility.

OBSAH

SEZNAM ILUSTRACÍ	10
SEZNAM TABULEK.....	13
SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK	15
1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	17
1.1 Charakteristika a taxonomie zelených sladkovodních mikrořas a sinic ...	18
1.2 Chemické složení řasové biomasy	21
1.2.1. Proteiny a aminokyseliny.....	22
1.2.2. Lipidy a mastné kyseliny	22
1.2.3. Sacharidy.....	24
1.2.4. Pigmenty	26
1.2.5. Vitaminy	27
1.2.6. Minerální látky.....	28
1.3 Kultivace řasové biomasy	28
1.3.1. Parametry kultivace	29
1.3.2. Dělení kultivačních metod	31
1.3.4 Vývoj biotechnologie mikrořas v České republice.....	37
1.4 Stravitelnost.....	39
1.5 Dezintegrace řasové biomasy	41
2. CÍL PRÁCE.....	43
3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ	45
3.1. Vyšetřované vzorky mikrořas a sinice	45
3.1.1 Autotrofní kultivace v laboratorních podmínkách.....	46
3.1.2 Autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru (PBR).....	47
3.1.3 Autotrofní kultivace v otevřeném venkovním kaskádovém kultivačním systému na tenké vrstvě	47
3.1.4 Heterotrofní kultivace ve fermentoru	47
3.2. Pokultivační ošetření řasové biomasy.....	48
3.2.1 Dezintegrace oscilačním kulovým mlýnem.....	48
3.2.2 Dezintegrace pomocí skleněných mikrokuliček balotina B7	49
3.2.3 Enzymatická dezintegrace	49
3.3. Zvolené metody stanovení	50
3.3.1 Základní chemické analýzy řasové biomasy	50
3.3.2 Stanovení aminokyselin	50
3.3.3 Stanovení proteinového profilu mikrořas	51
3.3.4 Stanovení lipidového profilu mikrořas	52
3.3.5 Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů.....	53
3.3.6 Stanovení minerálních prvků	55
3.3.7 Stanovení <i>in vitro</i> stravitelnosti	56
4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE.....	60
4.1. Základní chemické charakteristiky vyšetřovaných mikrořas a sinice	60
4.2. Dezintegrace řasové biomasy	61

4.3. Obsah aminokyselin v mikrořasách	62
4.4. Proteinové profily mikrořas.....	67
4.5. Obsah lipidů a mastných kyselin.....	69
4.6. Obsah chlorofylů a karotenoidů v mikrořasách	76
4.6.1 Stabilita pigmentových extraktů.....	77
4.7. Obsah minerálních látek	78
4.8. Stravitelnost řas	79
4.8.1 Vliv enzymu a pokultivačního ošetření řasové biomasy na.....	80
její stravitelnost.....	80
4.8.2 Vliv kultivace na stravitelnost.....	84
4.8.3 Vliv použití Celluclastu 1,5L na stravitelnost.....	84
5. DISKUSE	87
6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI.....	106
ZÁVĚR.....	108
SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	111
PŘÍLOHY	123
SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA.....	124
STÁŽE.....	125
CURRICULUM VITAE.....	126

SEZNAM ILUSTRACÍ

Obr. 1	<i>Chlorella kessleri</i> (vlevo), <i>Scenedesmus quadricauda</i> (vpravo).....	19
Obr. 2	<i>Spirulina platensis</i>	20
Obr. 3	Venkovní otevřené kultivační zařízení na tenké vrstvě s kaskádovitým uspořádáním pro kultivaci mikrořas v areálu Opatovického mlýna v Třeboni.....	38
Obr. 4	Pozorování vyšetřovaných vzorků mikrořas a účinku mechanické dezintegrace pod mikroskopem. Vzorek řasy: 1- <i>Chlorella</i> sp.; 2- <i>Chlorella kessleri</i> ; 3- <i>Scenedesmus quadricauda</i> ; 4- <i>Spirulina platensis</i> . Pokultivační ošetření řasové biomasy: A-nedezintegrováný vzorek; B-řasová biomasa po ošetření skleněnými mikrokuličkami balotina B7; C-řasová biomasa po ošetření kulovým oscilačním mlýnem.....	62
Obr. 5	Obsahy celkových (ΣAK), esenciálních (ΣEAK), neesenciálních ($\Sigma NEAK$) a siřných ($\Sigma Met+Cys$) aminokyselin ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas (Sp- <i>Spirulina platensis</i> ; ChK- <i>Chlorella kessleri</i> ; Sc- <i>Scenedesmus quadricauda</i> ; Ch- <i>Chlorella</i> sp.) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), autotrofní laboratorní kultivaci (AL), venkovní otevřené autotrofní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO) a heterotrofní kultivaci ve fermentoru (HF) v $g \cdot 16 g^{-1} N$	63

- Obr. 6 Proteinové profily *Spirulina platensis*-Sp, *Chlorella kessleri*-ChK, *Scenedesmus quadricauda*-Sc a *Chlorella* sp.-Ch po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), autotrofní otevřené venkovní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO) a po ošetření oscilačním kulovým mlýnem (M), balotinou B7 (B) v kDa. Standard je označen jako S..... 67
- Obr. 7 Dendrogram homologií proteinových profilů sinice (Sp-*Spirulina platensis*) a mikrořas (ChK-*Chlorella kessleri*; Sc-*Scenedesmus quadricauda*; Ch-*Chlorella* sp.) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), venkovní otevřené autotrofní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO), heterotrofní kultivaci ve fermentoru (HF) a po ošetření oscilačním kulovým mlýnem (M), balotinou (B)..... 68
- Obr. 8 Zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin ve vyšetřovaných vzorcích sinice (Sp-*Spirulina platensis*) a mikrořas (Sc-*Scenedesmus quadricauda*; ChK-*Chlorella kessleri*; Ch-*Chlorella* sp.) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), venkovní otevřené autotrofní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO), heterotrofní kultivaci ve fermentoru (HF) a po ošetření oscilačním kulovým mlýnem (M)..... 75

Obr. 9 Hodnoty stravitelnosti sušiny DMD (%) a organické hmoty OMD (%) po hydrolýze pepsinem PE, pankreatim PA a kombinované hydrolýze PE+PA v zelených sladkovodních mikrořasách (Sc-*Scenedesmus quadricauda*; ChK-*Chlorella kessleri*; Ch-*Chlorella* sp.) a v sinici (Sp-*Spirulina platensis*) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP) a venkovní otevřené autotrofní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO). Hydrolýzy uskutečněné s řasovou biomasou ošetřenou enzymaticky celulasou jsou označeny CE, hydrolýzy provedené s pokultivačně ošetřenou řasovou biomasou oscilačním kulovým mlýnem jsou označeny M a hydrolýzy s řasovou biomasou pokultivačně ošetřenou enzymaticky celulasou a mechanicky oscilačním kulovým mlýnem jsou označeny CE+M..... 83

SEZNAM TABULEK

Tab. 1	Základní chemické složení biomasy u vybraných druhů mikrořas.....	21
Tab. 2	Zobecněné kultivační podmínky pro mikrořasy.....	29
Tab. 3	Charakteristika vyšetřovaných vzorků mikrořas.....	46
Tab. 4	Podmínky chromatografického stanovení.....	53
Tab. 5	Charakteristiky stanovení minerálních prvků.....	56
Tab. 6	Základní chemické charakteristiky vyšetřovaných mikrořas (%; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka).....	60
Tab. 7	Obsahy jednotlivých aminokyselin ($\text{g} \cdot 16\text{g}^{-1}\text{N}$) v mikrořasách (<i>Spirulina platensis</i> -Sp; <i>Chlorella kessleri</i> -ChK; <i>Scenedesmus quadricauda</i> -Sc; <i>Chlorella sp.</i> -Ch) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), autotrofní laboratorní kultivaci (AL), autotrofní venkovní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO) a heterotrofní kultivaci ve fermentoru (HF); (n = 8, průměr ± směrodatná odchylka).....	66
Tab. 8	Obsah lipidů v mikrořasách (%; n = 3, průměr ± směrodatná odchylka).....	70
Tab. 9	Zastoupení mastných kyselin ve vyšetřovaných mikrořasách a sinici (% z celkových MK; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka) za použití rozpouštědlové soustavy methanol/chloroform/voda (1 : 2 : 1).....	73
Tab. 10	Zastoupení mastných kyselin ve vyšetřovaných mikrořasách (% z celkových MK; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka) s použitím hexanu.....	74

Tab. 11	Obsahy chlorofylu <i>a</i> , chlorofylu <i>b</i> a celkových karotenoidů v mikrořasách (mg.g ⁻¹ řasy; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka).....	76
Tab. 12	Stabilita pigmentových extraktů OD435/OD415 (%; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka).....	77
Tab. 13	Obsahy minerálních látek v mikrořasách (g.kg ⁻¹ řasy, mg.kg ⁻¹ řasy; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka).....	79
Tab. 14	Hodnoty DMD a OMD v mikrořase <i>Chlorella</i> sp. kultivované heterotrofně ve fermentoru a při autotrofní kultivaci (%; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka).....	84
Tab. 15	Hodnoty DMD a OMD v mikrořasách stanovené po předchozí dezintegraci řasové biomasy enzymatickým způsobem pomocí enzymu celulasy a komerčně dostupným celulasovým produktem Celluclast 1,5L; (%; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka).....	86

SEZNAM ZKRATEK A ZNAČEK

AA	kyselina arachidonová
Ala	alanin
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
BG11	kultivační médium pro mikrořasy
CC	kolonová chromatografie
CE	celulasa
Cys	cystein
DHA	kyselina dokosahexaenová
DMD	stravitelnost sušiny (dry matter digestibility)
EDTA	kyselina ethylendiamintetraoctová
EPA	kyselina eikosapentaenová
FAMES	metylestery mastných kyselin
FID	plamenově ionizační detektor
Glu	kyselina glutamová
Gly	glycin
His	histidin
HPLC	vysokoúčinná kapalinová chromatografie
Ile	isoleucin
Leu	leucin
Lys	lysin
M	Řasová biomasa dezintegrovaná kulovým mlýnem
Met	methionin
OMD	stravitelnost organické hmoty (organic matter digestibility)
PA	pankreatin
PE	pepsin
PBR	solární fotobioreaktor
PC	papírová chromatografie
Phe	fenylalanin
Pro	prolin

PUFAs	polynenasycené mastné kyseliny
SDS-PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu v přítomnosti dodecylsíranu sodného
Ser	serin
Thr	threonin
TLC	chromatografie na tenké vrstvě
Tyr	tyrosin
Val	valin
Σ AK	suma aminokyselin
Σ EAK	suma esenciálních aminokyselin
Σ Met+Cys	suma sirných aminokyselin
Σ NEAK	suma neesenciálních aminokyselin

1. SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

Mikrořasy jsou používány lidskou populací po stovky let jako potravina, krmivo, terapeutika či hnojivo [1, 2]. Přibližně před dvěma tisíci lety původní obyvatelstvo v Číně využívalo mikrořasy jako potravinu k přežití během hladomorů, naproti tomu první zmínky využívání mikrořas evropskou populací jsou datovány přibližně o tisíc let později [1, 2]. Řasová biomasa obsahuje široké spektrum nutričních složek (faktorů), jako jsou proteiny (aminokyseliny), sacharidy, lipidy (mastné kyseliny), vitaminy (A, B₁, B₂, B₆, B₁₂, C, E), pigmenty (chlorofyly, karotenoidy), minerální látky, a další bioaktivní složky (vláknina, volné aminokyseliny, fenoly, florotaniny) [1-10]. Z tohoto důvodu se řasová biomasa jeví jako vhodný zdroj pro zvyšování nutriční hodnoty potravin, k výrobě potravních doplňků, potravin a produktů prospěšných pro zdraví tzv. nutraceutik, k výrobě kosmetiky a léčiv, či k výrobě krmiv s řasovou biomasou, která zastupuje roli aditivní složky [1-8]. Vysoký obsah proteinů se zastoupením esenciálních aminokyselin může být považován jako jeden z hlavních důvodů pro využití mikrořas jako netradičního zdroje výživy. Limitujícím faktorem pro jejich využití v lidské výživě je složení jejich buněčných stěn, jejichž podstatnou část tvoří celulóza, která je pro člověka, z důvodu absence enzymu celulasy, nestravitelná [2, 4, 6, 7]. Může tedy docházet ke snižování využitelnosti a stravitelnosti nutričních složek obsažených v řasové biomase [4]. Z tohoto důvodu jsou vyvíjeny různé posklizňové metody sloužící k efektivnímu rozrušení celulótické buněčné stěny řas pro zvýšení využitelnosti nutričních složek obsažených v řasové biomase [4]. V současné době vzrůstá zájem o využívání zelených sladkovodních mikrořas z oddělení Chlorophyta, zejména pak rodů *Chlorella* a *Scenedesmus*, a dále sinice rodu *Spirulina* jako alternativního zdroje aminokyselin, proteinů, minerálních prvků, mastných kyselin a dalších nutričních složek pro lidskou výživu [2, 4, 7]. Obsahy těchto látek jsou však velmi proměnlivé a závislé na faktorech jako jsou geografická oblast, druh

mikrořasy, environmentální podmínky a převážně na metodě a podmínkách kultivace [1, 11-14].

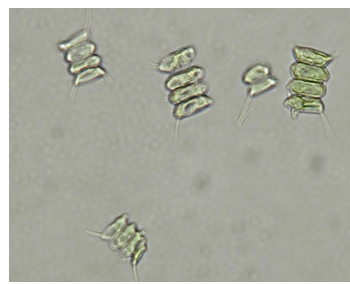
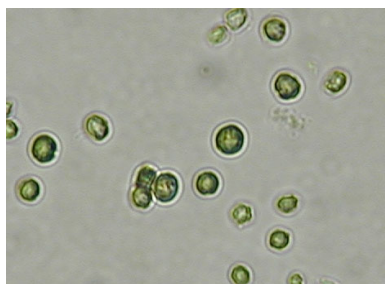
V České republice je spotřeba mikrořas, a produktů z nich vyrobených, relativně malá, tento stav může být zapříčiněn omezeným sortimentem jejich nabídky, relativně vysokou cenou řasových produktů a také malou distribuční sítí prodejen s těmito výrobky. Nejčastěji jsou mikrořasy a produkty z nich distribuovány v sušeném stavu, či ve formě tablet.

V odborné literatuře je dokumentováno nutriční složení některých zelených sladkovodních mikrořas a modro-zelené mikrořasy (sinice) *Spirulina platensis*, avšak stále malá pozornost je věnována stanovení stravitelnosti a možnostem jejího zvýšení zavedením vhodných pokultivačních metod ošetření řasové biomasy.

1.1 Charakteristika a taxonomie zelených sladkovodních mikrořas a sinic

Zelené sladkovodní mikrořasy jsou řazeny mezi eukaryotické organismy, které jsou v přírodě hojně rozšířeny. Patří mezi druhově nejbohatší skupinu. Jsou významné z fylogenetického hlediska, neboť stojí na počátku vývojové linie zelených rostlin a jsou tudíž dokladem vývojového vztahu k vyšším rostlinám, s nimiž mají některé společné znaky, jako je stejná kombinace fotosyntetických barviv, stejný zásobní polysacharid – škrob a zpravidla i vícevrstevnatá celulosní buněčná stěna. Fotosyntetická barviva u zelených mikrořas jsou tvořena chlorofylem *a*, chlorofylem *b*, β -karotenem a xantofyly. Tato kombinace barviv je podobná jako u vyšších rostlin. Bičíky pohyblivých buněk jsou stejně dlouhé a na povrchu zpravidla hladké.

Zástupci zelených sladkovodních mikrořas *Chlorella kessleri* a *Scenedesmus quadricauda* jsou znázorněni na Obr. 1.



Obr. 1: *Chlorella kessleri* (vlevo), *Scenedesmus quadricauda* (vpravo)

Chlorella je sférická jednobuněčná mikrořasa, jejíž buňky mají v průměru 5 – 10 μm . Buňky mikrořasy *Scenedesmus* jsou agregovány nejčastěji do čtyřbuněčných kolonií [4, 6, 7].

Sinice jsou autotrofní prokaryotické organismy s jednobuněčnou nebo vláknitou stélkou, jejichž sdružováním mohou vznikat kolonie. Sinice jsou řazeny mezi gramnegativní bakterie. Na povrchu vytváří řada sinic slizové obaly nebo pochvy, které nejsou součástí buněčné stěny a neúčastní se buněčného dělení. Slizový obal některých sinic obsahuje malé množství CaCO_3 (1 až 2 %). U sinic je DNA uložena v nukleoplazmatické oblasti zvané centroplazma, kde tvoří uzavřený kruh. Dělení buněk probíhá prostým zaškrcením, přepážka vzniká vchlípením plazmatické membrány a vzápětí se vytváří i buněčná stěna, dochází k postupnému uzavření a oddělení protoplastů. Mezi zásobní látky sinic se řadí sinicový škrob (α -1,4-glukan), volutin, což jsou polyfosfátové granule, které se hromadí při dostatku fosforečnanů v prostředí, a cyanofycinová zrna (zásobní polypeptidy), která jsou specifická zejména pro sinice. Výživa sinic není vždy čistě fotoautotrofní, některé sinice jsou auxotrofní (potřeba zdroje vitaminů), ftoheterotrofní (rostou na organickém substrátu, ale pouze za světla) nebo fakultativně chemoheterotrofní (za světla jsou fotoautotrofní, ve tmě rostou jen na organickém substrátu). Na Obr. 2. je znázorněna sinice, pro kterou se i ve vědeckých kruzích vžilo pojmenování *Spirulina platensis*, i když její správné taxonomické označení je *Arthrospira*. *Spirulina* je oxygenní

fotosyntetická vláknitá bakterie spirálovitého tvaru, která bývá často označována jako modro-zelená mikrořasa [2, 9, 11, 15-22].



Obr. 2: *Spirulina platensis*

Jako každý vědní obor, tak i taxonomie prochází svým vývojem. Na základě nových informací a poznatků je zpřesňována a doplňována. V taxonomii mikrořas jsou zaznamenávány změny zařazení do jednotlivých taxonů v souvislosti s novými poznatky a výzkumy molekulární biologie.

Taxonomie vyšetřovaných druhů mikrořas:

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Rostliny (Plantae)

Oddělení: Chlorophyta

Třída: Trebouxiophyceae

Řád: Chlorellales

Rod: *Chlorella*

Druh: *Ch. kessleri*

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Rostliny (Plantae)

Oddělení: Chlorophyta

Třída: Chlorophyceae

Řád: Chlorococcales

Rod: *Scenedesmus*

Druh: *Sc. quadricauda*

Doména: Prokarya (Procarya)

Říše: Bakterie (Bacteria)

Oddělení: Sinice - Cyanobacteria (Cyanophyta)

Třída: Cyanophyceae

Řád: Oscillatoriales

Rod: *Arthrospira (Spirulina)*

Druh: *Sp. platensis*

1.2 Chemické složení řasové biomasy

Základní chemické složení řasové biomasy zelených sladkovodních mikrořas a modro-zelené mikrořasy *Spirulina maxima* je uvedeno v Tab. 1. Chemické složení řasové biomasy se u jednotlivých druhů mikrořas liší a je také ovlivněno zvoleným typem kultivace a jeho podmínkami [1, 11-14].

Tab. 1: Základní chemické složení biomasy u vybraných druhů mikrořas

mikrořasa	obsah proteinů v sušině (%)	obsah sacharidů v sušině (%)	obsah lipidů v sušině (%)
<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-32
<i>Dunaliella salina</i>	57	32	6
<i>Scenedesmus obliquus</i>	50-56	10-17	12-14
<i>Spirulina maxima</i>	60-71	13-16	6-7

[upraveno podle 2, 4, 19, 25]

1.2.1. Proteiny a aminokyseliny

Mikrořasy jsou považovány za bohatý zdroj proteinů, aminokyselin a dusíkatých látek [1, 2, 4, 7]. Neproteinový dusík je v řasové biomase tvořen volnými aminokyselinami, chlorofyly, anorganickým dusíkem (dusičnany, dusitany, amoniak), nukleovými kyselinami, aminy, a materiálem buněčných stěn obsahujícím dusík [4, 23]. Obsah neproteinového dusíku z celkového obsahu dusíkatých látek v zelených mikrořasách *Scenedesmus obliquus* tvoří přibližně 12 %, v mikrořase *Dunaliella* 6 % a v modro-zelené mikrořase *Spirulina maxima* přibližně 11,5 % [4]. Pro výpočet obsahu dusíkatých látek v mikrořasách je používán přepočítávací faktor v hodnotě 6,25, i když je používání tohoto tradičního faktoru zvažováno vzhledem k přítomnosti většího množství neproteinového dusíku [23]. Nové hodnoty přepočítávacích faktorů pro mikrořasy jsou však stále na úrovni doporučení, a proto je i nadále používána hodnota faktoru 6,25.

Vysoký obsah proteinů může u zelené mikrořasy *Chlorella* a modro-zelené mikrořasy *Spirulina* tvořit až 70 % sušiny [2, 4]. Tato skutečnost je hlavním důvodem jejich využití jako nekonvenčního zdroje proteinů [2, 4, 6, 7]. Buňky mikrořas jsou schopny syntetizovat aminokyseliny, které jsou esenciální pro lidskou výživu [2]. U mikrořas je nejčastější limitující aminokyselinou tryptofan [12]. Pro poskytnutí kompletní charakteristiky proteinů mikrořas jako celku by mělo být zkoumáno jejich aminokyselinové složení a dále by měly být prohlubovány znalosti o výživové hodnotě proteinů včetně jejich využitelnosti a poměrovém zastoupení jednotlivých aminokyselin [2, 4].

1.2.2. Lipidy a mastné kyseliny

Lipidy jsou heterogenní skupinou sloučenin biologického původu lišící se strukturou, které jsou rozpustné v organických rozpouštědlech. Do této skupiny přírodních molekul patří například mastné kyseliny, vosky, steroly,

vitaminy rozpustné v tucích (A, D, E, K), mono-, di- a triacylglyceroly, fosfolipidy a další sloučeniny [3]. Průměrný obsah lipidů v buňkách mikrořas se pohybuje v rozmezí 1 až 70 % v sušině, ve výjimečných případech pod kontrolovanou kultivací může jeho obsah dosahovat až 90 % v sušině [2]. Zelená sladkovodní mikrořasa *Chlorella* obsahuje v sušině až 30 % lipidů, kdežto v mikrořase *Scenedesmus* je přítomno přibližně poloviční množství lipidů. U modro-zelené mikrořasy *Spirulina* je udáváno množství lipidů v sušině ve výši 7 %. Celkový obsah lipidů a také zastoupení jednotlivých mastných kyselin v řasové biomase může být ovlivněno výživovými, environmentálními faktory a způsobem jejich kultivace [2, 3, 25, 26]. Lipidy v mikrořasách jsou složeny převážně z glycerolu a obsahují nasycené či nenasycené mastné kyseliny o počtu uhlíků C12 – C22 [2, 9, 10, 19, 21, 24-27]. Zelená sladkovodní mikrořasa *Chlorella* se vyznačuje vysokým zastoupením α -linolenové kyseliny (ω -3; C18:3, cis-9,12,15), jejíž podíl tvoří až 40 % z celkového obsahu lipidů, dále je přítomna esenciální mastná kyselina linolová (ω -6; C18:2, cis-9,12), která může tvořit až 20 % z celkových lipidů. Z nasycených mastných kyselin se vyskytuje převážně kyselina palmitová C16:0 (přibližně 18 % z celkových lipidů) [10, 27]. V lipidovém profilu modro-zelené mikrořasy *Sp. platensis* má nejvyšší zastoupení kyselina palmitová C16:0 (až 45 % z celkových lipidů), dále jsou významné nenasycené mastné kyseliny γ -linolenová (ω -6; C18:3, cis-6,9,12) a linolová (ω -6; C18:2, cis-9,12), jejichž obsahy mohou dosahovat příslušných hodnot 25 % a 20 % z celkových lipidů [9, 19, 21]. V řasové biomase zelených sladkovodních mikrořas a modro-zelené mikrořasy jsou dále přítomny polynenasycené mastné kyseliny (PUFAs) arachidonová (AA, ω -6; C20:4, cis-5,8,11,14), eikosapentaenová (EPA, ω -3; C20:5, cis-5,8,11,14,17) a dokosaheptaenová (DHA, ω -3; C22:6, cis-4,7,10,13,16,19), avšak jejich procentuální podíl na celkovém obsahu lipidů je malý. Z hlediska nutričního a zdravotního má velký význam obsah ω -3 a ω -6 mastných

kyselin. Tyto mastné kyseliny jsou významnými složkami buněčných membrán. Esenciální mastná kyselina AA je prekurzorem prostaglandinů a leukotrienů (souhrnný název ikosanoidy), které působí protizánětlivě a účastní se řady buněčných procesů [24, 28-30]. Polynenasycené mastné kyseliny efektivně redukuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, rakoviny, osteoporózy a diabetu [24, 28]. Ze zdravotního hlediska je důležitým ukazatelem poměr přijímaných ω -3 a ω -6 mastných kyselin. Tento poměr by měl být 1:2 až 1:4, avšak v současnosti se poměr ω -3 a ω -6 mastných kyselin v České republice je přibližně 1:20 [29]. Nevyvážený příjem ω -3 a ω -6 mastných kyselin významně ovlivňuje možnost vzniku alergických, autoimunitních poruch a nádorových onemocnění [27, 29]. Podíl tuků na celkovém energetickém příjmu by měl tvořit přibližně 25 až 35 %. Optimální poměr nenasycených mastných kyselin k nasyceným je uváděn 3:1, z toho by ω -6 PUFAs měly tvořit 5 % a ω -3 PUFAs 1 %, z kterých by EPA a DHA měly tvořit 0,5 % [29].

1.2.3. Sacharidy

Sacharidy v zelených sladkovodních mikrořasách tvoří 10 až 30 % sušiny [2, 4, 24]. V modro-zelené mikrořase *Sp. platensis* je obsaženo 8 až 14 % sacharidů v sušině [2, 4, 18, 19, 24]. V řasové biomase se sacharidy vyskytují ve formě monosacharidů (např. glukosa, mannosy, galaktosa), zásobních polysacharidů a strukturních polysacharidů, které jsou zastoupeny v zelených mikrořasách převážně celulosou a hemicelulosami, které mají funkci vlákniny a jsou složkami buněčných stěn [31-34]. *Ch. pyrenoidosa* může ve své buněčné stěně obsahovat přibližně 15 % celulosy a 31 % hemicelulós [35]. Zastoupení jednotlivých sacharidových složek v řasové biomase je rozdílné v závislosti na druhu mikrořasy. Sacharidy obsažené v řasové biomase vykazují vysokou stravitelnost na rozdíl od celulosy, která je pro člověka nestravitelná [2].

Některé polysacharidy vyextrahované z mikrořasy *Ch. pyrenoidosa* vykazují imunostimulační a protinádorové účinky, avšak přesná struktura těchto molekul nebyla dosud popsána [36-41]. Polysacharidy tvořící slizový obal sinic jsou předmětem zkoumání z hlediska určení jejich struktury a možných aplikací [42, 43].

Struktura buněčné stěny zelených řas a sinice

Buněčná stěna zelených mikrořas je složena ze dvou odlišných složek, z organizované mikrofibrilární struktury, která je začleněna do souvislé základní hmoty [35]. Odolnost řasové buněčné stěny může být podpořena přítomností dalších složek jako je například sporopolenin, což je odolný nedusíkatý biopolymer. Chemické složení a struktura buněčné stěny zelených mikrořas jí uděluje silnou odolnost k chemické degradaci či k enzymatické digesci [44].

Mikrofibrily, ležící ve dvou směrech přibližně kolmých na sebe, tvoří souvislou nepravidelnou síť buněčné stěny v celé její tloušťce. Chemické složení této části se podobá α -celulose, je tvořena polysacharidy, které jsou složeny z monosacharidů galaktosy, arabinosy, mannosy, xylosy a rhamnosy [34, 35].

Základní hmota se jeví jako souvislá zrnitá struktura, která obklopuje celý buněčný povrch. Je složena z hemicelulós, proteinů, amino cukrů a popřípadě lipidů [35, 36]. Proteiny mohou být přítomny ve formě glykoproteinů, které jsou spojeny s hemicelulosou a tvoří tak větší část souvislé základní hmoty [35].

Buněčná stěna sinic je tvořena čtyřmi vrstvami, které neobsahují celulosu. Vrstvy buněčné stěny jsou převážně složeny z peptidoglykanu, druhá vrstva obsahuje β -(1-2)-glukan, který tvoří nestravitelnou složku buněčné stěny sinic pro lidský organismus [45].

1.2.4. Pigmenty

Chlorofyly jsou v tuku rozpustné zelené pigmenty zabezpečující fotosyntézu a nachází se v mikrořasách, vyšších rostlinách či v sinicích [3, 46]. Chlorofyl *a* je nezbytnou součástí reakčního centra tylakoidu, v kterém probíhá vlastní fotosyntéza [3, 46]. V zelených mikrořasách je obsažen chlorofyl *a* i *b*, kdežto v sinicích (respektive v modro-zelené mikrořase *Spirulina*) se nachází pouze chlorofyl *a* [24]. Chlorofyly *a* i *b* jsou lehce transformovány slabými kyselinami na jejich bezhořečnaté deriváty feofytin *a* a *b*. Chlorofyl *a* podléhá transformaci na feofytin snáze než chlorofyl *b* [46]. Tato transformace může probíhat také při mechanickém zpracování řasové biomasy či v trávicím traktu člověka [3, 46]. Chlorofyly a jejich deriváty vykazují antimutagenní účinky a hrají významnou roli při prevenci nádorových onemocnění [3, 47, 48].

Zelené mikrořasy třídy *Chlorophyceae* obsahují α , β -karoteny a xantofyly: lutein, zeaxanthin, violaxanthin a neoxanthin. Beta-karoten je prekurzorem xantofylů – zeaxanthinu a violaxanthinu [25, 46]. Tato sloučenina hraje významnou roli při ochraně chlorofylu, protože jej chrání před fotooxidací, dále vykazuje aktivitu provitaminu A [3, 30, 46]. Strava bohatá na obsah karotenoidů je prevencí proti vzniku kardiovaskulárních a nádorových onemocnění a dále proti vzniku onemocnění zrakového aparátu [3, 30, 47, 48]. Modro-zelená mikrořasa *Sp. platensis* je významným zdrojem modrého fotosyntetického pigmentu phykocyaninu, který patří mezi phykobiliproteiny a je hojně využíván v potravinářství a kosmetickém průmyslu jako přírodní barvivo [2, 25].

Obsah pigmentů v řasové biomase je proměnlivý v závislosti na růstových, environmentálních podmínkách a na způsobu kultivace [3, 46]. Chlorofyly jsou v řasové biomase zastoupeny v rozmezí 0,5 až 1 % v sušině, karotenoidy jsou přítomny v množství 0,1 až 0,2 % v sušině. Významným zdrojem

β -karotenu je mikrořasa *Dunaliella salina*, která ho může obsahovat až 14 % v sušině [2, 24].

Chlorofyly a karotenoidy jsou používány jako přírodní potravinářská barviva nahrazující syntetické pigmenty, dále pak jako přísady do krmiv. Řasové pigmenty jsou dále využívány v kosmetickém a farmaceutickém průmyslu [2, 3, 24, 25].

Stanovení pigmentů se provádí pomocí chromatografických metod, jako jsou kolonová chromatografie (CC), papírová chromatografie (PC), chromatografie na tenké vrstvě (TLC), vysokoúčinná kapalinová chromatografie (HPLC) či spektrálními metodami [46]. Spektrální metody pro stanovení pigmentů prošly mnoha zdokonaleními během svého vývoje. V současnosti je pro určení zastoupení pigmentů v řasové biomase hojně využívána spektrofotometrická metoda, kvůli její rychlosti, relativní snadnosti a cenové dostupnosti [46, 49-53].

1.2.5. Vitaminy

Řasová biomasa je zdrojem řady vitaminů, zejména řady B (B_1 , B_2 , B_5 , B_6 , B_9 , B_{12}), vitaminu C, biotinu a lipofilních vitaminů A a E [2, 11]. Zelené mikrořasy se vyznačují poměrně vysokým zastoupením vitaminu C, jehož množství je srovnatelné s některými druhy ovoce a zeleniny. Vitamin C je uplatňován při ochraně proti oxidačním procesům, regeneraci vitaminu E, dále redukuje železo z potravy a zvyšuje tak jeho intestinální absorpci, také zvyšuje obranyschopnost organismu a chrání membrány před oxidačními procesy, které vedou k jejich poškození. Nejbohatším zdrojem vitaminu B_{12} mezi modro-zelenými mikrořasami je *Sp. platensis*, jehož množství se pohybuje na úrovni 11 mg vitaminu v 1 kg sušiny [2, 11]. Vitamin B_{12} je nezbytný činitel pro krvetvorbu, správný vývoj a funkci nervového systému. Avitaminosa tohoto vitaminu se projevuje anémií.

1.2.6. Minerální látky

Minerální prvky jsou v mikrořasách přítomny v rozdílných koncentracích, které mohou být stopové či až v řádu g/100g sušiny například u draslíku a fosforu [11, 54]. Mikrořasy jsou zdrojem makrobiogenních – Na, K, Mg, Ca, P, oligobiogenních – Fe, Zn, Cu, Mn a mikrobiogenních – Cr, B prvků [1, 11, 54, 56, 57]. *Spirulina* je bohatým zdrojem draslíku, sodíku, vápníku, fosforu a hořčíku, další minerální prvky v uvedeném pořadí: železo, mangan, zinek, měď, selen a chrom jsou přítomny s klesající koncentrací [54]. Zelená mikrořasa *Chlorella* obsahuje převážně fosfor, sodík, draslík, vápník, hořčík, železo a síru, ostatní minerální látky (mangan, zinek, selen, měď, chrom) jsou zastoupeny v nižším množství [54, 56].

Buňky mikrořas a sinic mají velkou schopnost vázat těžké kovy [11]. Mikrořasy *Chlorella*, *Spirulina* a *Scenedesmus* jsou využívány k odstranění těžkých kovů ze substrátů. Například alginát a polyakrylamid s imobilizovanou mikrořasou *Ch. vulgaris* a *Sp. platensis* jsou používány k odstranění těžkých kovů, jako jsou Pb, Cd a Hg [11]. Řasy se vyznačují schopností akumulovat těžké kovy, z tohoto důvodu jsou hodnoty obsahů těchto kovů v řasové biomase kontrolovány a sledovány, případně jsou mikrořasy využívány jako bioindikátory průmyslového znečištění vodních toků či nádrží [2, 11, 24].

1.3 Kultivace řasové biomasy

Při kultivaci řasové biomasy jsou rozhodující tři komponenty a to kultivační médium, které je umístěno ve vhodné kultivační nádobě; řasové buňky rostoucí v médiu; vzduch, který dovoluje výměnu oxidu uhličitého mezi kultivačním médiem a atmosférou [1, 11]. Autotrofní mikrořasy potřebují ke svému růstu světlo, oxid uhličitý, živiny a stopové prvky. Pouze malé množství druhů mikrořas vyžaduje ke svému růstu další biochemické složky, jako jsou například vitaminy. Nejdůležitější parametry

regulující růst řasových buněk jsou kvalita živin, kvalita světla, hodnota pH kultivačního média, turbulence kultivačního média, obsah solí v médiu a teplota kultivace [1, 2, 9, 11, 18, 58-60].

1.3.1. Parametry kultivace

Mezi kultivační parametry patří teplota, světlo, hodnota pH kultivačního média, obsah solí v kultivačním médiu, promíchávání kultivačního média, dále jsou zde řazeny i kultivační nádoby [1, 11, 58]. Avšak každý druh mikrořasy vyžaduje ke svému růstu své specifické kultivační podmínky [1, 9, 18, 58, 61, 62]. V Tab. 2 jsou uvedeny zobecněné podmínky pro kultivaci mikrořas.

Tab. 2: Zobecněné kultivační podmínky pro mikrořasy

parametr	rozsah	optimální hodnota
teplota (°C)	16-27	18-24
obsah solí (g.l ⁻¹)	12-40	20-24
intenzita světla (μE sec ⁻¹ m ⁻²)	až 2000	100-200
fotoperioda (h) - světlo : tma	16:8 (minimum) 24:0 (maximum)	12:12
hodnota pH	7-9	8,2-8,7

[upraveno podle 1, 9, 11, 18, 58, 59, 61, 62]

Kultivační teplota

Mikrořasy tolerují teploty v rozmezí 16 až 27 °C, avšak optimální hodnota teploty při kultivaci se liší v závislosti na složení média a druhu řasy [1, 9, 11, 18, 58, 61, 62]. Pro udržení konstantní kultivační teploty jsou používány inkubátory. Některé kultivační modely však dovolují měnit teplotu v cyklech [60]. Při teplotách nižších než 16 °C dochází k rapidnímu snížení růstu řasových buněk. Teploty vyšší než 35 °C mají naopak letální účinky pro mnoho druhů řas.

Světlo

Světlo je zdrojem energie pro fotosyntetické reakce v mikrořasách. Při kultivaci řasové biomasy musí být optimalizovány parametry světla, jako jsou jeho intenzita, spektrální kvalita a fotoperioda. Světelná intenzita hraje důležitou roli, ale požadavky na ni se mění v závislosti na hloubce kultivační nádoby a hustotě kultivované biomasy řas. Ve větších hloubkách a buněčných koncentracích jsou požadavky na intenzitu světla vyšší z důvodu rovnoměrné intenzity světelného záření pro všechny buňky kultury [1, 11]. Avšak velká světelná intenzita může vyvolat fotoinhibici růstu buněk, proto se její doporučená hodnota pohybuje v rozmezí 100 až 200 $\mu\text{E sec}^{-1}\text{m}^{-2}$. Zdroj světla může být přírodní nebo umělý ve formě fluorescenčních zářivek, které emitují modré a červené spektrum světla, které se nejvíce podílí na fotosyntéze [1, 11]. Intenzita světla i jeho kvalita jsou upravovány pomocí filtrů. Některé druhy mikrořas nerostou pod konstantním osvětlením, ale vyžadují střídání světelné a tmavé fáze (tzv. fotoperioda), nejčastěji je používán poměr světla a tmy v hodinách 14:10 nebo 12:12.

Hodnota pH kultivačního média

Rozsah pH kultivačních médií se pohybuje mezi hodnotami 7 a 9, avšak média o pH 8,2 až 8,7 jsou optimální pro kultivaci většiny mikrořas. Některé druhy mikrořas vyžadují ke svému růstu více kyselé či zásadité prostředí [1, 11, 18, 58, 59]. Nejčastější příčinou celkového zničení kultury je právě selhání udržení vhodného pH kultivačního média [1].

Obsah solí v kultivačním médiu

Většina druhů mikrořas je tolerantní ke změnám obsahu solí v kultivačním médiu. Obvykle vykazují optimální růst při obsahu solí, jejichž hodnoty jsou o něco málo nižší než v jejich přirozeném prostředí. Optimální obsah solí v kultivačním médiu se pohybuje v rozmezí 20 až 24 g.l^{-1} [1, 11].

Promíchávání kultivačního média

Promíchávání média je nezbytné k zamezení sedimentace řasových buněk, k zajištění rovnoměrného přístupu světla a živin pro všechny řasové buňky a k zamezení teplotního rozvrstvení kultury a ke zlepšení výměny plynů mezi kulturou a okolním vzduchem. Promíchávání kultury by mělo být jemné, jelikož mnoho druhů mikrořas není tolerantní k razantnímu způsobu provedení. V závislosti na kultivačním systému může být tento proces uskutečněn ručně, provzdušňováním, lopatkovými pádly nebo tryskovými pumpami [1, 11, 64].

Kultivační nádoby

Kultivační nádoby by měly být vyrobeny z netoxických a chemicky inertních materiálů s dobrou propustností světla, snadno čistitelné a sterilizovatelné. Některé materiály, které by mohly být potenciálně použity pro výrobu kultivačních nádob, mohou uvolňovat chemikálie, které mají škodlivý účinek na růst řasové biomasy. Proto je důležité, aby kultivační nádoby byly z inertního materiálu. Doporučovanými materiály jsou teflon, polykarbonát, polystyren a borokřemičitanové sklo [1].

1.3.2. Dělení kultivačních metod

Mikrořasy jsou produkovány různými kultivačními metodami od uzavřených kontrolovaných laboratorních metod až po venkovní otevřené metody v kultivačních tancích [1, 11, 64]. Při vnitřní kultivaci je kontrolováno osvětlení, teplota, množství živin, kontaminace kultury konkurenčními mikrořasami. Venkovní kultivační systémy jako jsou nezakryté rybníky či nádrže jsou levnější, avšak kultivovaná biomasa mikrořas podléhá rychlejší kontaminaci ve srovnání s uzavřeným kultivačním systémem.

Dle technického uspořádání se kultivace dělí na vsádkové, kontinuální a semikontinuální [1, 11].

Podle zdroje uhlíku a přítomnosti světla je rozlišována kultivace autotrofní, heterotrofní a mixotrofní [1, 11, 25, 65-68].

Kultivační metody dle technického uspořádání

Vsádková kultivace

Vsádková kultivace je nejvíce používaný kultivační systém kvůli své jednoduchosti a cenové dostupnosti. Jedná se o uzavřený kultivační systém, jehož objem je limitován. V průběhu kultivace se ze systému nic neodpouští a nic se do něj nepřidává. Proběhne nadávkování složek do kultivačního systému spolu s inokulem řasových buněk a ten je následně uzavřen. Řasová buněčná hmota zvyšuje svoji hustotu konstantně až do vyčerpání některého limitujícího faktoru. Pro její další růst je nutné médium nahradit novým s obsahem všech potřebných živin.

Vsádkový kultivační systém je vysoce dynamický. Po inokulaci média se řasové buňky nejdříve přizpůsobují novému prostředí a až poté se začínají dělit a růst. Při tomto způsobu kultivace by řasová kultura měla teoreticky procházet klasickou růstovou křivkou [1]. Řasové buňky jsou sklizeny těsně před vstupem kultury do stacionární fáze, kdy je dosahováno maximálních hodnot specifického růstu kultury. Kvalitu získaných buněk nelze při tomto způsobu kultivace předvídat, jelikož souvisí s růstovou fází buněk, v které jsou sklizeny. Významnou výhodou vsádkové kultivace je její provozní jednoduchost, proto je tento kultivační systém hojně používán. Další nespornou výhodou vsádkové kultivace je její flexibilita, avšak nejedná se o nejúčinnější kultivační metodu. Nevýhoda tohoto systému spočívá v potřebě prevence vůči kontaminaci, jelikož kontaminované inokulum by mohlo zapříčinit znehodnocení kultury v tom smyslu, že kontaminující organismy by mohly přerůst požadovanou kulturu řas [1].

Kontinuální kultivace

Při kontinuální kultivaci jsou zdroje živin potenciálně nevyčerpatelné, jelikož kultura je udržována ve vybraném bodě růstové křivky regulací přídatku čerstvého kultivačního média. V praxi je objem čerstvého kultivačního média přiváděn automaticky v poměru úměrném k rychlosti růstu kultury řas, zatímco stejný objem kultury je odpouštěn [1, 64]. Tato metoda kultivace dovoluje udržovat kulturu striktně v maximální růstové rychlosti, jelikož kultura nikdy nevyčerpá živiny z média. Čerstvé kultivační médium je uskladněno ve velkých nádobách a je čerpáno za pomoci tlaku vzduchu přes uzavíratelnou přepážku do kultivační nádoby. Jakmile je čerstvé kultivační médium nadávkováno, část starého média s kulturou je odpuštěna z kultivační nádoby do sběrného tanku. Kontinuální kultivační systém je široce využíván pro průmyslové a výzkumné účely. Kontinuální a vsádková kultivace se liší v tom, že při kontinuálním způsobu jsou živiny dodávány buňkám v konstantním poměru po celou dobu kultivace [1, 64].

Kontinuální kultivační systém se dělí do dvou kategorií na turbidostat a chemostat [1]. Turbidostat je charakteristický tím, že čerstvé médium je přivedeno pouze v případě, kdy hustota buněk v kultuře dosáhne předdefinované hodnoty. Jakmile kultura této hodnoty dosáhne, je nadávkován přídatek čerstvého kultivačního média a stejný objem stávající kultury je odpuštěn. Zředěná kultura dále pokračuje v růstu do dosažení předem stanovené hustoty a proces se periodicky opakuje. Chemostat kultivace pracuje na principu dosažení určité hladiny limitující živiny (nejčastěji dusičnanu). Čerstvé kultivační médium je přivedeno do kultury v okamžiku, kdy úroveň vybrané limitující živiny poklesne na předem určenou hladinu.

Nevýhodou kontinuální kultivace je její relativně vysoká cena a provozní složitost. Požadavky na konstantní osvětlení a teplotu omezují použití

systemu do vnitřních prostor. Největší výhodou tohoto kultivačního způsobu je poskytování řasové biomasy o konstantní kvalitě [1].

Semi-kontinuální kultivace

Při semi-kontinuální kultivaci je do kultivační nádoby přiváděno čerstvé médium pouze jednou pomocí přítokového ventilu na přiváděcím potrubí. Vyčerpané kultivační médium s kulturou je shromažďováno ve sběrné nádobě. Jakmile je čerstvé médium přivedeno do kultivační nádoby, ventil se uzavře, kultura roste po dobu 24 hodin a následně je sklizena. Tato procedura se cyklicky opakuje [1]. Semi-kontinuální kultivace mohou být vnitřní i venkovní. Při tomto způsobu kultivace se řasová biomasa může kontaminovat, a proto je tato kultura nevhodná pro použití jako inokulum. Ve srovnání se vsádkovou kultivací poskytuje semi-kontinuální způsob kultivace vyšší výnosy řasové biomasy.

Kultivační metody podle zdroje uhlíku a světla

Autotrofní kultivace

Za autotrofní kultivaci je považována každá kultivace, při které se kultura pěstuje pod přírodním či umělým osvětlením a jako zdroj uhlíku slouží oxid uhličitý [1, 11, 25, 65, 66, 68]. Čili za autotrofní kultivaci lze označit laboratorní kultivaci řas pod umělým osvětlením s přiváděným CO₂ do kultivačního systému, dále venkovní otevřené kultivace s různým způsobem uspořádání, či uzavřené kultivace ve fotobioreaktorech.

Heterotrofní kultivace

Při heterotrofní kultivaci roste řasová biomasa bez přítomnosti světla v zařízeních zvaných fermentory. Zdrojem uhlíku bývá nejčastěji organická látka např. sacharid (glukosa) či kyselina octová [25, 65-67]. Tento způsob kultivace je považován za alternativu k autotrofnímu způsobu kultivace ve fotobioreaktorech [25]. Heterotrofního způsobu kultivace jsou však schopny pouze některé druhy řas, nejčastěji jsou používány řasy z rodu

Chlorella, které rostou při teplotě 35 až 37 °C ve tmě [67]. Při tomto způsobu kultivace je nutné striktně používat axenickou kulturu. Základ kultivačního média pro heterotrofní kultivaci je podobný jako pro autotrofní kultivaci s tím rozdílem, že je do něj přidán organický zdroj uhlíku [14, 25]. Pro heterotrofní kultivaci jsou důležité kultivační parametry: kultivační teplota, hodnota pH, kyslíková koncentrace a míchání kultury v průběhu kultivace [64, 65]. Je však nutno uvést, že kultivace heterotrofním způsobem není doposud podrobně popsána a nejsou k dispozici standardizované podmínky pro její průběh.

Mixotrofní kultivace

Mixotrofní kultivace řas je kombinací autotrofního a heterotrofního způsobu. V tomto kultivačním systému je řasová kultura pěstována pod umělým či přírodním osvětlením a jako zdroj uhlíku slouží anorganická (oxid uhličitý) i organická sloučenina (cukr, např. glukosa) [1, 11, 25, 65, 66, 68].

Komerční kultivační systémy

Produkce řasové biomasy je prováděna v komerčních kultivačních systémech, jejichž objemy jsou v rozmezí 10^3 l až 10^9 l. Převládajícími typy komerčních kultivací jsou rozlehlé otevřené nádrže, nádrže se zařízením na míchání kultury, nádrže ve tvaru dráhy či velké objemné kultivační vaky [1, 2, 11, 64]. Do komerčních kultivačních systémů jsou také řazeny fotobioreaktory, které slouží pro efektivní kultivaci řasové biomasy [1, 11, 19, 20, 68, 69].

Komerčně jsou nejvíce pěstovány mikrořasy *Chlorella*, *Spirulina* a *Dunaliella* [1, 2]. Tyto druhy mikrořas vyžadují specifické podmínky k růstu, které eliminují jejich kontaminaci, a proto mohou být kultivovány v otevřených venkovních systémech. *Chlorella* vykazuje rychlý růst v médiu bohatém na živiny, *Spirulina* vyžaduje vysokou hodnotu pH a uhličitanu

sodného a *Dunaliella* roste při vysokém obsahu solí v kultivačním médiu [1, 2, 9, 11, 18, 59]. Druhy mikrořas, které nevykazují zvláštní požadavky na růst, musí být kultivovány v uzavřených systémech z důvodu možné kontaminace kultury.

Venkovní nádrže

Pro kultivaci mikrořas jsou používány venkovní nádrže lišící se tvarem, materiálem použitým na jejich konstrukci a míchacím zařízením. Velké venkovní nádrže mají většinou přírodní dno, případně může být obloženo umělým materiálem. Nevýhodou nádrží s přírodním dnem je však přítomnost naplaveninové suspenze, prosakování a silná kontaminace, proto je jejich užití vhodné jen pro malý počet řasových druhů [1, 11, 64]. Přírodní systémy, jako malé přírodní nádrže, jsou využívány pro produkci řas, pokud poskytují vhodné klimatické podmínky a dostatečnou hladinu živin.

Uměle vybudované nádrže ve tvaru dráhy jsou používány pro kultivaci mikrořas *Spirulina*, *Haematococcus* a *Dunaliella* [1, 11, 64]. Produkce mikrořas ve venkovních nádržích je poměrně nenákladná, avšak je vhodná pouze pro několik druhů mikrořas jako je *Chlorella*, *Spirulina*, *Haematococcus* a *Dunaliella*, které jsou využívány pro produkci karotenoidů, pigmentů, proteinů a vitaminů [1, 2, 11, 64].

Fotobioreaktory

Produkce řasové biomasy ve fotobioreaktorech představuje alternativu ke kultivaci řas v otevřených nádržích. Termín fotobioreaktor je používán pro označení uzavřeného kultivačního systému, který nedovoluje přímou výměnu plynů nebo kontaminantů mezi řasovou kulturou a atmosférou [1, 11]. Toto kultivační zařízení poskytuje chráněné životní prostředí pro kultivované mikrořasy. Kultivace je prostá kontaminujících mikroorganismů a kultivační parametry jako je hodnota pH, koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého a kultivační teplota jsou kontrolovány a udržovány na požadovaných úrovních. Tyto kultivační systémy jsou nákladnější

na vybudování i provoz než nádrže, jelikož potřebují chlazení a přísnou kontrolu akumulace kyslíku. Fotobioreaktory jsou často využívány pro produkci řasové biomasy, ze které se získávají vysoce hodnotné sloučeniny. Jsou známy různé kategorie a druhy fotobioreaktorů jako jsou trubicovité nebo ploché fotobioreaktory; horizontální, vertikální, spirálovité či šikmé fotobioreaktory; mnohonásobné či vlnité fotobioreaktory; jednofázové či dvoufázové fotobioreaktory [1, 19, 20, 68-70]. Tato kultivační zařízení se začala používat ve 40. letech minulého století a od té doby prošla mnohými zdokonaleními a zásadním vývojem. Například dvoustupňový fotobioreaktor pro kultivaci mikrořas byl zkonstruován Centrem pro biotechnologii v Nových Hradech. Tento kultivační systém má objem 450 l a je založen na zkoncentrování světelného záření pomocí čoček dopadajícího na povrch skleněných kultivačních trubic [14, 71].

1.3.4 Vývoj biotechnologie mikrořas v České republice

V bývalém Československu se biotechnologie mikrořas začala rozvíjet v 60. letech minulého století. Jejím výsledkem byl vznik jedinečného kultivačního systému, který je stále používán pro kultivaci řasové biomasy [14, 71].

V polovině 50. let minulého století se zrodila myšlenka koncepce otevřeného venkovního kultivačního systému pro mikrořasy. Na konci 50. let minulého století byly pod vedením doktora Ivana Šetlíka ze Slovenské Akademie Věd v Košicích sestrojeny první modely venkovních kultivací [14]. S asistencí profesora Ivana Málka byla v lednu roku 1960 v Třeboni založena Algologická laboratoř pod Ústavem biologie, kde doktor Šetlík se svým pracovním týmem vyvinul četné kultivační modely pro produkci mikrořas spolu s jejich kultivačními postupy [14]. Brzy poté byl řasový výzkum přesunut do nových laboratorních prostor Opatovického mlýna (Obr. 4). V letech 1962 až 1963 byly postaveny jedinečné venkovní kultivační systémy,

jejichž originalita spočívala v konstrukci produkčních jednotek, které měly základ v kaskádovitém uspořádání nakloněných ploch [14]. Principem kultivace mikrořas bylo udržovat turbulentní tok relativně tenké vrstvy užitím vlnitého povrchu nebo rovinného povrchu vybaveného přepážkami. Později v 60. a 70. letech minulého století byly kaskádovité kultivační jednotky na tenké vrstvě konstruovány také v Polsku, Kubě, Bulharsku a Itálii pro srovnání kultivací provedených v různých klimatických podmínkách [14]. V 80. letech minulého století byl systém zdokonalen o čerpadlo, které zajišťovalo cirkulaci a tím bylo dosaženo vyšší produktivity růstu řasové biomasy. Na začátku 90. let minulého století byla představena třetí generace venkovní kultivační jednotky s kaskádovým uspořádáním pro kultivaci mikrořas, která byla postavena v Třeboni [14]. Oproti předchozím generacím, které byly používány v 60. letech minulého století, disponovala nejnovější kultivační jednotka velmi tenkou kultivační vrstvou pouze asi 10 mm silnou. Tato kultivační jednotka byla postupem času zdokonalována a v současnosti je optimalizována pro účinnou kultivaci řasové biomasy v objemu 2200 l a je znázorněna na Obr. 3 [14, 60, 72].



Obr. 3: Venkovní otevřené kultivační zařízení na tenké vrstvě s kaskádovitým uspořádáním pro kultivaci mikrořas v areálu Opatovického mlýna v Třeboni

1.4 Stravitelnost

Při hodnocení nutriční kvality potravin je velmi důležitá informace o jejich stravitelnosti [73]. Obecně je stravitelnost definována jako část přijaté stravy, kterou organismus dokáže využít, což znamená tu část stravy, kterou organismus umí rozložit, vstřebat a následně zabudovat do svých struktur. Stravitelnost je často určována jako stravitelnost proteinů, přičemž se vychází z hypotézy, že pokud je stravitelný protein v potravíně, tak jsou stravitelné i ostatní živiny [75]. Stravitelnost proteinů je obvykle definována jako rozdíl množství dusíkatých látek, které organismus přijal a dusíkatých látek, které byly vyloučeny z organismu [75]. Proteiny jsou pro lidský organismus zdrojem esenciálních aminokyselin, z tohoto důvodu se určuje kvalita proteinu, která je vyjadřována pomocí aminokyselinového skóre a indexem esenciálních aminokyselin [75].

Není jednoduché určit jednotnou metodu pro stanovení stravitelnosti biologických materiálů s ohledem na velký rozsah přítomných živin, z tohoto důvodu je poměrně problematické srovnávání výsledků navzájem pocházejících z různých metod stanovení stravitelnosti [75]. Stravitelnost je možné stanovit metodami *in vivo*, *in situ* či *in vitro*.

Metodami *in vivo* se stravitelnost zkoumá prováděním pokusů přímo na živém organismu, při této metodě je stravitelnost určena jako množství přijatého dusíku ve vztahu k absorbovanému a vyloučenému dusíku z organismu. [73-75].

Stravitelnost určená metodou *in situ* využívá enzymatický systém laboratorních zvířat. Principem této metody je vložení sáčku se vzorkem přímo do zvířecího střeva či dvanáctníku. Po uplynutí stanoveného času je sáček vyjmut a stravitelnost je určena jako absorbovaný dusík, který je vypočten z rozdílu obsahu dusíku ve vzorku vytaženého ze zvířecího traktu a původního vzorku [75].

Metody stravitelnosti *in vitro* simulují v maximální možné míře podmínky trávení probíhající v organismu, tyto metody jsou využívány pro stanovení stravitelnosti potravin. Proti metodám *in vivo* a *in situ* je stanovení stravitelnosti *in vitro* poměrně nenákladné a časově méně náročné. Stravitelnost stanovená metodou *in vitro* může být prováděna při různých testech, avšak je důležité vybrat vhodné podmínky stanovení. Stanovení stravitelnosti *in vitro* může být prováděno působením jednoho, dvou či více enzymů vzhledem k charakteru vyšetřovaného materiálu, také je důležitá délka enzymatického hydrolyzačního procesu [75]. Stravitelnost může být odhadnuta z rozdílu mezi obsahem dusíku před a po působení enzymatické hydrolýzy. Stravitelnost *in vitro* je možno zkoumat různými metodami a postupy, přičemž se může využít metody dialýzy buněk, měření pH při enzymatické hydrolýze (pH-stat či měření poklesu pH), gravimetrické a filtrační metody, měření produkce plynu či využitím kultivačního modelu buněk (tzv. metoda Caco-2) [75].

Při stanovení stravitelnosti *in vitro* enzymaticko-gravimetrickou filtrační metodou se využívá inkubátor Daisy, což je zařízení simulující procesy probíhající v žaludku při trávení bílkovin za účasti proteolytického enzymu v kyselém prostředí. *In vitro* metoda stanovení stravitelnosti uvedená v disertační práci vychází z Prováděcí metodiky na stanovení stravitelnosti sušiny a organické hmoty pepsin-celulasovou metodou užitím Daisy inkubátoru určenou pro krmiva, přičemž tato metoda byla vhodně modifikována pro stanovení stravitelnosti *in vitro* pro řasové vzorky dle Mišurcová (2008) [55]. Stravitelnost při tomto způsobu stanovení je vyjádřena jako stravitelnost sušiny DMD (%) a stravitelnost organické hmoty OMD (%) [75, 76]. Tato metoda stanovení stravitelnosti je relativně rychlá a nenákladná a tudíž může být široce využívána pro rutinní analýzy k určení stravitelnosti živin [75].

Hodnoty stravitelností jsou ovlivňovány mnohými faktory, ať již se jedná o velikost částic vyšetřovaného produktu, následně o látky obsažené ve vlastní analyzované surovině, které mohou zapříčinit snížení či zvýšení stravitelnosti, dále jsou hodnoty stravitelností ovlivněny zvolenou metodou stanovení spolu s jeho podmínkami a v neposlední řadě enzymovou specifitou a aktivitou [73]. Při stanovení stravitelnosti sušiny DMD (%) a organické hmoty OMD (%) v zelených sladkovodních mikrořasách rodů *Chlorella* a *Scenedesmus* a sinici *Spirulina platensis* enzymaticko-gravimetrickou filtrační metodou *in vitro* s využitím inkubátoru Daisy, jsou hodnoty stravitelností ovlivňovány především volbou enzymu, dobou enzymatické hydrolyzy, strukturou a chemickým složením buněčné stěny mikrořas, tvarem buněk a případným pokultivačním ošetřením řasové biomasy. V současné době stravitelnost zelených sladkovodních mikrořas a modro-zelené mikrořasy spolu s vlivem pokultivačních ošetření řasové biomasy na hodnoty stravitelnosti nejsou cíleně zkoumány a dokumentovány.

1.5 Dezintegrace řasové biomasy

Celulotická buněčná stěna mikrořas může reprezentovat až 10 % sušiny. Celulosa představuje problém v oblasti stravitelnosti a využitelnosti řasové biomasy pro lidskou populaci a monogastričné živočichy, jelikož jejich trávicí enzymy neobsahují enzym celulasu, která štěpí tuto složku buněčné stěny mikrořas [4]. Z tohoto důvodu jsou důležitá efektivní pokultivační ošetření řasové biomasy pro účinné rozrušení buněčných stěn mikrořas, aby obsažené nutriční složky v biomase byly přístupné trávicím enzymům [4].

Techniky rozrušení buněčných stěn mikrořas lze rozdělit podle mechanismu účinku na metody enzymatické, fyzikální, chemické či kombinované metody. Podstatou enzymatické metody je působení enzymu, celulasu, na buněčnou stěnu mikrořas. Všeobecně se uvádí, že celulasa vykazuje optimální aktivitu při pH 5 až 6 a teplotě v rozmezí 30 až 50 °C.

Mezi fyzikální způsoby narušení buněčných stěn mikrořas je možno řadit metody, při kterých se využívá působení ultrazvuku na buněčnou stěnu, náhlých změn teplot (sušení, střídavé zmrazování a rozmrazování), mechanického vlivu (pomocí kulového mlýna, perlového mlýna) a působení mikrovlnného záření. Do fyzikálních způsobů dezintegrace dále patří metody kombinující několik fyzikálních procesů. Jedná se o metodu X-press, jejímž principem je protlačování zmražené suspenze malým otvorem pod velkým tlakem a metodu French press, což je protlačování tekuté suspenze malým otvorem pod velkým tlakem asi 136 MPa.

Při působení ultrazvuku jsou rozhodujícími parametry kmitočet ultrazvuku (Hz), výkon ultrazvuku (W) a délka působení ultrazvuku. Vhodné nastavení těchto parametrů je určující pro rozrušení buněčné stěny. Publikované studie [15, 78-82] využívaly ultrazvuk k rozrušení buněčných stěn, avšak v každé práci bylo dosaženo rozrušení buněčné stěny při jiné kombinaci kmitočtu a výkonu ultrazvuku spolu s různou dobou jeho působení.

Podstata chemických metod spočívá v přidavku chemické látky například organického rozpouštědla (toluen, diethylether, chloroform) nebo přidavek kyselin, zásad a detergentů do suspenze mikrořas, která způsobí rozpad či narušení buněčné stěny. Tyto metody však následně limitují využití řasové biomasy pro potravinářské účely.

Dezintegrační metody se mohou navzájem kombinovat a doplňovat tak, aby bylo dosaženo co nejlepšího rozrušení celulótické buněčné stěny mikrořas.

2. CÍL PRÁCE

Cílem disertační práce bylo sledovat obsah vybraných nutričních složek jako aminokyselin, proteinů, lipidů, chlorofylů a minerálních látek v řasové biomase zelených sladkovodních mikrořas *Chlorella kessleri*, *Chlorella* sp., *Scenedesmus quaricauda* a v modro-zelené mikrořase (sinici) *Spirulina platensis* v závislosti na metodě jejich kultivace. Dalším cílem bylo sledovat vlivu pokultivačního ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem užitím oscilačního kulového mlýna a skleněných mikrokuliček balotina B7 na výtěžnost obsažených nutričních složek. Závěrečným cílem disertační práce bylo stanovit stravitelnost organické homoty OMD (%) a stravitelnost sušiny DMD (%) zelených sladkovodních mikrořas a sinice pomocí enzymaticko-gravimetrické filtrační metody *in vitro* s využitím inkubátoru Daisy II, a zjistit vliv pokultivačního ošetření řasové biomasy mechanickou cestou užitím oscilačního kulového mlýna a enzymatickým způsobem s využitím enzymu celulasy a komerčně dostupného celulasového preparátu Celluclast 1,5L na hodnotu stravitelnosti řasové biomasy.

Cíle disertační práce je možno rozdělit do pěti částí:

1. Provést kultivaci řasové biomasy zelených sladkovodních druhů mikrořas a sinice v laboratorních podmínkách.
2. Stanovit zastoupení vybraných nutričních složek řasové biomasy u vyšetřovaných druhů zelených sladkovodních mikrořas a sinice pocházející z různých kultivačních metod.
3. Podrobit řasovou biomasu pokultivační dezintegraci mechanickým způsobem za pomoci oscilačního kulového mlýna a skleněných mikrokuliček balotina B7.

4. Zhodnotit obsahy nutričních složek vzhledem ke způsobu kultivace a určit vliv pokultivační dezintegrace mechanickým způsobem na jejich výtěžnost z řasové biomasy.
5. Stanovit hodnoty stravitelnosti organické hmoty OMD (%) a sušiny DMD (%) ve vzorcích zelených sladkovodních mikrořas a sinice pomocí enzymaticko-gravimetrické filtrační metody *in vitro* s využitím inkubátoru Daisy II. Zhodnotit vliv pokultivačního ošetření řasové biomasy provedeného mechanickým a enzymatickým způsobem na hodnotu stravitelnosti řasové biomasy.

3. ZVOLENÉ METODY ZPRACOVÁNÍ

3.1. Vyšetřované vzorky mikrořas a sinice

Vzorky zelených sladkovodních mikrořas *Chlorella kessleri*, *Scenedesmus quadricauda* a modro-zelené mikrořasy *Spirulina platensis* pocházely z Akademického a Univerzitního Centra Nové Hrady, Ústav fyzikální biologie, Nové Hrady, Česká republika; mikrořasa *Chlorella* sp. pocházela z Akademie věd České republiky, Ústav mikrobiologie, Sekce fototrofních mikroorganismů, Třeboň, Česká republika. Vyšetřované mikrořasy byly v sušené formě.

Vzorky mikrořas *Ch. kessleri*, *Sc. quadricauda*, *Sp. platensis* z Ústavu fyzikální biologie v Nových Hradech byly kultivovány autotrofně v solárním fotobioreaktoru (PBR) a v rámci odborné stáže byla na tomto pracovišti provedena jejich autotrofní kultivace v laboratorních podmínkách. Mikrořasa *Chlorella* sp. byla získána z Akademie věd České republiky, Ústav mikrobiologie, Sekce fototrofních mikroorganismů, tato mikrořasa byla kultivována v otevřeném venkovním kaskádovém kultivačním systému na tenké vrstvě a ve fermentoru heterotrofním způsobem. Charakteristika vyšetřovaných vzorků mikrořas je uvedena v Tab. 3.

Tab. 3: Charakteristika vyšetřovaných vzorků mikrořas

označení vzorku	specifikace vzorku		mikrořasa
	kultivační médium	pokultivační ošetření	
SpAP	BG11	---	<i>Sp. platensis</i> ¹
SpAPM	BG11	oscilační kulový mlýn (M)	<i>Sp. platensis</i> ¹
SpAPB	BG11	balotina B7 (B)	<i>Sp. platensis</i> ¹
SpAL	Zarrouk	---	<i>Sp. platensis</i> ¹
ScAP	BG11	---	<i>Sc. quadricauda</i> ¹
ScAPM	BG11	oscilační kulový mlýn (M)	<i>Sc. quadricauda</i> ¹
ScAPB	BG11	balotina B7 (B)	<i>Sc. quadricauda</i> ¹
ScAL	Šetlík a Simmer	---	<i>Sc. quadricauda</i> ¹
ChKAP	BG11	---	<i>Ch. kessleri</i> ¹
ChKAPM	BG11	oscilační kulový mlýn (M)	<i>Ch. kessleri</i> ¹
ChKAPB	BG11	balotina B7 (B)	<i>Ch. kessleri</i> ¹
ChKAL	Šetlík a Simmer	---	<i>Ch. kessleri</i> ¹
ChAO	pro autotrofní kultivaci ^a	---	<i>Chlorella</i> sp. ²
ChAOM	pro autotrofní kultivaci ^a	oscilační kulový mlýn (M)	<i>Chlorella</i> sp. ²
ChAOB	pro autotrofní kultivaci ^a	balotina B7 (B)	<i>Chlorella</i> sp. ²
ChHF	pro heterotrofní kultivaci ^b	---	<i>Chlorella</i> sp. ²

¹ autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru (AP), autotrofní laboratorní kultivace (AL); Akademické a Univerzitní Centrum Nové Hradý, Ústav Fyzikální Biologie, Nové Hradý, Česká republika;

² autotrofní venkovní kultivace v otevřeném kaskádovém kultivačním systému na tenké vrstvě (AO), heterotrofní kultivace ve fermentoru (HF); Akademie věd České republiky, Ústav Mikrobiologie, Sekce fototrofních mikroorganismů, Třeboň, Česká republika;

^a Složení kultivačního média popsáno v podkapitole 3.1.3

^b Složení kultivačního média popsáno v podkapitole 3.1.4

3.1.1 Autotrofní kultivace v laboratorních podmínkách

Mikrořasy *Ch. kessleri*, *Sc. quadricauda*, *Sp. platensis* byly kultivovány ve skleněných kultivačních nádobách o objemu 1000 ml, probublávány směsí vzduchu a oxidu uhličitého (2,2 %) při teplotě 30 °C. Zdrojem světla byly fluorescenční zářivky (Philips, Osram Dulux L, 55W/12-950) s intenzitou světla 479 $\mu\text{mol}\cdot\text{s}^{-1}\cdot\text{m}^{-2}$. Modro-zelená mikrořasa byla kultivována v Zarrouk médiu [83], ostatní řasy byly kultivovány v Šetlík a Simmer médiu [84], obě média byla sterilována v autoklávu. Po kultivaci vzorků byla provedena

centrifugace (Hettich 200R centrifuga, Německo) řasové biomasy při 6000 otáčkách za min. a následně byla biomasa zlyofilizována (Alpha 1-4 LSC, Christ, Německo) a použita k analýzám.

3.1.2 Autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru (PBR)

V solárním fotobioreaktoru byly autotrofním způsobem kultivovány druhy mikrořas *Ch. kessleri*, *Sc. quadricauda*, *Sp. platensis* metodou popsanou ve studii [71]. Při tomto způsobu kultivace byly mikrořasy pěstovány v médiu BG11 [85], které bylo sterilováno v autoklávu. Po provedení kultivace byla řasová biomasa zcentrifugována a sprejově usušena.

3.1.3 Autotrofní kultivace v otevřeném venkovním kaskádovém kultivačním systému na tenké vrstvě

Kultivace řasové biomasa *Chlorella* sp. byla provedena Akademií věd České republiky, Ústav mikrobiologie, Sekce fototrofních mikroorganismů v Třeboni. Řasová biomasa byla autotrofně kultivována ve venkovním otevřeném kaskádovitým kultivačním zařízení na tenké vrstvě metodou popsanou ve studiích [14, 72]. Buňky byly pěstovány v kultivačním médiu o následujícím složení (na litr): 182 mg $(\text{NH}_2)_2\text{CO}$, 41 mg KH_2PO_4 , 29 mg $\text{MgSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 5,1 mg $\text{FeSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$; roztok stopových prvků I (na litr): 141 μg H_3BO_3 , 160 μg $\text{CuSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$, 559 μg $\text{MnCl}_2 \cdot 4\text{H}_2\text{O}$, 105 μg $\text{CoSO}_4 \cdot 7\text{H}_2\text{O}$, 455 μg $\text{ZnSO}_4 \cdot 5\text{H}_2\text{O}$; roztok stopových prvků II (na litr): 29,1 μg $(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24}$, 2,37 μg NH_4VO_3 . Kultivační médium bylo sterilováno v autoklávu. Po kultivaci byla řasová biomasa sklizena, sprejově usušena a použita k analýzám.

3.1.4 Heterotrofní kultivace ve fermentoru

Heterotrofní způsob kultivace byl proveden Akademií věd České republiky, Ústav mikrobiologie, Sekce fototrofních mikroorganismů v Třeboni. *Chlorella* sp. byla heterotrofně kultivována ve fermentoru v objemu 450 l při teplotě 35 až 37 °C ve tmě. Buňky mikrořas byly kultivovány v médiu, jehož

složení bylo následující (na litr): 77,8 g C₆H₁₂O₆, 7,11 g (NH₂)₂CO, 16,44 g KH₂PO₄, 1,22 g MgSO₄·7H₂O, 97,3 mg FeSO₄·7H₂O, 22,2 mg H₃BO₃, 6,22 mg CuSO₄·5H₂O, 8,66 mg ZnSO₄·7H₂O, 7,55 mg CoSO₄·7H₂O, 10,11 mg MnCl₂·4H₂O, 3,55 mg (NH₄)₆Mo₇O₂₄·4 H₂O, 54 mg CaCl₂. Kultivační médium bylo sterilováno v autoklávu. V průběhu kultivace bylo médium promícháváno míchadly a současně bylo provzdušňováno pomocí přetlakového vzduchu, který byl přiváděn přes průtokoměr a mikrobiální filtr dovnitř fermentoru. Po ukončení kultivace byla suspenze z fermentoru převedena do promývací nádrže, kde byla naředěna vodou a následně zahuštěna na talířové odstředivce. Zahuštěná suspenze byla během dalšího zpracování uchovávána v chladicí nádrži, odkud byla kontinuálně dopravována do sprejové sušárny.

3.2. Pokultivační ošetření řasové biomasy

Byly provedeny dvě metody pokultivačního ošetření řasové biomasy cestou mechanické dezintegrace užitím oscilačního kulového mlýna (MM 301, Retsch, Německo) a skleněných mikrokuliček balotina B7 o průměru 570 až 700 μm (Preciosa Ornela a.s., ČR) a dvě metody pokultivačního ošetření řasové biomasy cestou enzymatické dezintegrace s využitím enzymu celulasy (z *Trichoderma viride*; 3-10 U/mg; Sigma Aldrich, USA) a komerčně dostupného celulasového produktu Celluclast 1,5L (deklarovaná aktivita celulasy 700 EGU/g; Novozymes A/S, Dánsko).

3.2.1 Dezintegrace oscilačním kulovým mlýnem

Pokultivační ošetření řasové biomasy mechanickou cestou užitím oscilačního kulového mlýna bylo provedeno po dobu sedmi minut při frekvenci 15 s⁻¹. Dezintegrace řasové biomasy byla provedena pomocí kovové kuličky v mlecí kovové cele. Účinnost dezintegračního procesu byla pozorována mikroskopem (Nikon Eclipse 50i, Japonsko) v imerzním oleji při

největším zvětšení. Řasová biomasa ošetřená tímto způsobem byla použita k analýzám.

3.2.2 Dezintegrace pomocí skleněných mikrokuliček balotina B7

Řasová biomasa byla dezintegrována skleněnými mikrokuličkami balotina B7 v plastových zkumavkách, do kterých byly naváženy vzorky mikrořas a dále byla přidána balotina spolu s destilovanou vodou. Plastové zkumavky byly vloženy do modifikované kovové cely, která byla upevněna do oscilačního kulového mlýna. Dezintegrační proces probíhal třicet minut při frekvenci 30 s^{-1} . Následně byly skleněné mikrokuličky odstraněny z řasové biomasy, která byla zlyofilizována (Alpha 1-4 LSC, Christ, Německo). Stupeň dezintegrace řasové biomasy byl pozorován stejným způsobem, jak bylo popsáno v sekci 3.2.1.

3.2.3 Enzymatická dezintegrace

Enzymatické pokultivační ošetření řasové biomasy bylo provedeno s využitím filtračních sáčků F58 (ANKOM Technology, New York, USA), inkubátoru Daisy II (ANKOM Technology, New York, USA) a enzymu celulasy a dále pomocí komerčního celulasového produktu Celluclast 1,5L. Řasová biomasa byla enzymaticky ošetřena celulasou (0,168 g enzymu na 6 g vzorku řasy), komerčním produktem Celluclast 1,5L (1,4 ml preparátu na 6 g vzorku řasy) po dobu 24 hodin při teplotě $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ v acetátovém pufru (pH 4,6). Vzorky řas (0,25 g s přesností 0,0001 g) byly naváženy do filtračních sáčků, které byly zataveny a vloženy do inkubačních lahví obsahujících 1700 ml acetátového pufru vytemperovaného na teplotu $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$ s adekvátním množstvím celulasy či komerčního produktu Celluclast 1,5L. Jako korekce byl použit prázdný filtrační sáček. Inkubační láhve byly umístěny do inkubátoru Daisy II po dobu 24 hodin při teplotě $40 \text{ }^{\circ}\text{C}$. Po uplynutí inkubační doby byly filtrační sáčky jemně propláchnuty destilovanou vodou.

Filtrační sáčky obsahující řasovou biomasu ošetřenou popsáním postupem byly dále použity pro stanovení stravitelnosti.

3.3. Zvolené metody stanovení

3.3.1 Základní chemické analýzy řasové biomasy

Obsah vlhkosti, popela a celkový obsah dusíkatých látek byly v řasové biomase stanoveny dle Nařízení komise (ES) č. 152/2009 [86], kterým se stanovují metody odběru vzorků a laboratorního zkoušení pro úřední kontrolu krmiv. Obsah vlhkosti sloužil k výpočtu sušiny původní hmoty ve vyšetřovaných vzorcích a byla stanovena sušením mikrořas při teplotě 103 ± 2 °C do konstantního úbytku hmotnosti, obsah popela byl určen spálením vzorku při 550 °C po dobu 5 hodin v muflové peci, obsah dusíkatých látek byl proveden dle Kjeldahlovy metody s užitím automatické destilační jednotky Pro Nitro A (J. P. Selecta, Španělsko) a jako přepočítavací faktor byla použita hodnota 6,25. U každého vzorku mikrořasy bylo stanovení obsahu sušiny, popela a dusíkatých látek provedeno čtyřikrát.

3.3.2 Stanovení aminokyselin

Obsah sedmnácti aminokyselin: kyseliny asparagové (Asp), threoninu (Thr), serinu (Ser), kyseliny glutamové (Glu), prolinu (Pro), glycinu (Gly), alaninu (Ala), valinu (Val), isoleucinu (Ile), leucinu (Leu), fenylalaninu (Phe), tyrosinu (Tyr), histidinu (His), lysinu (Lys), argininu (Arg), methioninu (Met) a cysteinu (Cys) ve vzorcích mikrořas byl stanoven užitím iontoměničové chromatografie pomocí analyzátoru aminokyselin AAA400 (Ingos, Praha, ČR) po kyselé hydrolýze nebo předešlé oxidaci sirných aminokyselin cysteinu a methioninu [87]. Sirné aminokyseliny (Cys, Met) jsou částečně nebo kompletně zničeny během kyselé hydrolýzy, proto se u nich nejdříve provádí oxidace, kdy jsou převedeny na kyselinu cysteovou a methionin sulfon, které

jsou stabilní v průběhu kyselé hydrolyzy. Aminokyseliny glutamin a asparagin jsou pomocí kyseliny chlorovodíkové příslušně převedeny na kyselinu glutamovou a asparagovou [87]. Vzorke mikrořas (20 až 25 mg) byly podrobeny hydrolyzám po dobu 24 hodin, jejichž podmínky jsou popsány ve studii [87]. Chemikálie pro analýzu aminokyselin byly dodány ze společnosti Ingos (Praha, ČR).

3.3.3 Stanovení proteinového profilu mikrořas

Pro stanovení proteinových profilů mikrořas byla použita vertikální metoda sodium dodecyl sulfátové polyakrylamidové elektroforézy SDS-PAGE. Tato metoda byla provedena dle studie [88]. Přibližně 0,03 g každého vzorku mikrořasy bylo naváženo, následně k němu bylo přidáno 100 μ L lysového pufru (50 mM Tris–pufr, pH 8,0; 10 mM EDTA; 100 mM NaCl; 0,5% (v/v) Triton X-100) a 100 μ L SDS-PAGE barviva. Tato směs byla vařena po dobu 15 minut, následně byla zchlazena a centrifugována po dobu 10 minut při 15 000 otáčkách za min. Z každého supernatantu bylo odebráno 20 μ L pro separaci proteinů na 12 % SDS-PAGE polyakrylamidovém gelu. Separace probíhala při 30 mA po dobu 90 min. Posledním krokem stanovení bylo barvení gelu za pomoci coomassie modře R-250. Proteinový profil byl vyhodnocen užitím programu Bio.1D verze: 12.11 (Vilber Lourmat, Francie), dendrogramy byly vypočteny shlukovou metodou UPGMA užitím DICE korelačního koeficientu. Stanovení každého vzorku bylo provedeno třikrát. Pro stanovení proteinového profilu mikrořas byly chemikálie zakoupeny ze společnosti Sigma Aldrich, proteinový standard P7702L (New England Biolabs Inc., Anglie) s rozsahem 2 až 212 kDa obsahoval proteiny o definovaných molekulových hmotnostech 212; 158; 116; 97,2; 66,4; 55,6; 42,7; 34,6; 27; 20; 14,3; 6,5; 3,4 a 2,3 kDa.

3.3.4 Stanovení lipidového profilu mikrořas

Obsah lipidů a stanovení obsahu mastných kyselin ve vzorcích mikrořas a sinice bylo provedeno dle norem ČSN CEN ISO/TS 17764-1 a ČSN CEN ISO/TS 17764-2 [89, 90]. Obsah celkových lipidů a jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích byl stanoven použitím aparatury dle Soxhleta. Extrakce byla provedena s rozpouštědly hexanem a směsí metanol/chloroform/voda v poměru 1 : 2 : 1.

Celkové lipidy byly stanoveny gravimetricky po extrakci probíhající 4 hodiny v příslušných rozpouštědlech. Celkový obsah lipidů byl vypočten jako rozdíl mezi předem zvaženu prázdnou baňkou a baňkou s obsahem lipidů po extrakci, oddestilování příslušného rozpouštědla a následném dosušení odparku.

Po Soxhletově extrakci pod zpětným chladičem byly vyextrahované lipidy převedeny na metylestery mastných kyselin (FAMES) esterifikací metanolickým roztokem NaOH v přítomnosti kyselého katalyzátoru bortrifluoridu (BF₃).

Stanovení celkového obsahu lipidů a příprava metylesterů mastných kyselin byla provedena dle postupů uvedených ve výše zmíněných normách.

Metylestery mastných kyselin ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas a sinice byly stanoveny plynovou chromatografií s plamenově ionizačním detektorem (FID) na přístroji GC-2010 (Shimadzu, Japonsko) za použití vysoce polární chromatografické kolony HP-88 (Agilent Technologies, USA), která je určena pro identifikaci cis/trans metylesterů mastných kyselin. Podmínky chromatografického stanovení metylesterů mastných kyselin jsou uvedeny v Tab. 4.

Tab. 4: Podmínky chromatografického stanovení

plynový chromatograf	GC-2010
kolona	HP-88 (100m x 0,25 mm, film 0,2 µm)
nosný plyn	dusík
průtok nosného plynu	0,95 ml/min
objem nástřiku	1,0 µl
teplota nástřiku	250 °C
teplota kolony	250 °C
teplota detektoru	280 °C
detektor	FID
doba analýzy	90 min

Teplotní program byl zvolen následovně: první plató na teplotě 80 °C po dobu 5 min., zvýšení 14 °C.min.⁻¹ na teplotu 200 °C, druhé plató na teplotě 200 °C po dobu 30 min., zvýšení 25 °C.min.⁻¹ na 250 °C a poslední plató na teplotě 250 °C po dobu 15 min.

Kvalitativní vyhodnocení bylo provedeno na základě analýzy referenční standardní směsi za stejných operačních podmínek, které byly použity při analýze reálného zkušebního vzorku.

Kvantitativní vyhodnocení obsahu metylesterů mastných kyselin ve vzorcích bylo provedeno metodou vnitřní normalizace na obsah vnitřního standardu (metylester kyseliny undekanové). Zastoupení jednotlivých metylesterů mastných kyselin bylo přepočteno na % z celkového obsahu přítomných metylesterů.

Pro analýzu lipidového profilu vzorků zelených sladkovodních mikrořas a sinice byl použit standard mastných kyselin Supelco[®] 37 Components FAME Mix (Sigma-Aldrich, USA).

3.3.5 Stanovení obsahu chlorofylů a karotenoidů

Obsahy chlorofylu *a*, *b* a karotenoidů byly ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas stanoveny spektrofotometrickou metodou přístrojem UV/VIS Spektrometer, (Lambda 25, PerkinElmer, USA) s využitím 1 cm kyvet z optického skla. Pigmentové extrakty zelených sladkovodních mikrořas byly

připraveny v 80% acetonu, pigmentové extrakty sinice byly ve 100% metanolu. Při jejich přípravě bylo postupováno dle laboratorního postupu, který je používán v biotechnologické laboratoři Akademického a Univerzitního Centra v Nových Hradech.

Příprava 80% acetonového pigmentového extraktu ze zelených sladkovodních mikrořas byla taková, že k navážce vzorku (0,005 g s přesností 0,0001 g) ve skleněné centrifugační zkumavce byl přidán 1 ml destilované vody a následně bylo provedeno vortexování po dobu tří minut, obsah byl zcentrifugován při 3500 otáčkách za min. po dobu dvou minut při 4 °C, supernatant byl slit. K peletu byl přidán 1 ml balotiny B7 spolu s 1 ml acetonu, proběhlo vortexování po dobu tří minut. Následně bylo provedeno odstranění balotiny ze suspenze pomocí automatického dávkovače. Suspenze prostá balotiny byla zcentrifugována při 3500 otáčkách za minutu po dobu dvou minut při 4 °C. Supernatant byl opatrně odlit do odměrné baňky, která obsahovala vypočtené množství destilované vody tak, aby konečná koncentrace acetonu byla 80 %. Byly změřeny hodnoty absorbancí při vlnových délkách: 415, 435, 470, 646, 663 a 730 nm.

Při přípravě metanolového pigmentového extraktu z modro-zelené mikrořasy byl zvolen obdobný postup jako při přípravě acetonového extraktu, kdy k naváženému vzorku ve skleněné centrifugační zkumavce byly přidány 2 ml metanolu spolu s malým množstvím $MgCO_3$, tato směs byla zahřívána ve vodní lázni při 65 °C po dobu čtyř minut. Ke vzorku byl přidán 1 ml balotiny, následně proběhlo vortexování po dobu tří minut, poté byl přidán 1 ml metanolu a opět byla provedena vortexace. Dále bylo postupováno stejným způsobem jako u přípravy acetonového extraktu. Hodnoty absorbancí vzorků byly změřeny při vlnových délkách: 415, 435, 470, 666 a 730 nm.

Pigmentové extrakty byly uchovány v temnu a chladu při 4 °C. Bylo provedeno sledování stability pigmentových extraktů po dobu desetidenního skladování. Stabilita pigmentového extraktu se vyjadřuje jako poměr hodnot

absorbancí při vlnových délkách 435 a 415 (OD435/OD415), který je považován za parametr vyjadřující degradaci chlorofylu. Hodnota OD435/OD415 uvádí relativní poměr chlorofylu *a* ku feofytinu *a* [51]. Měření hodnoty OD435/OD415 proběhlo v čerstvě připraveném pigmentovém extraktu a následně v prvním, druhém, čtvrtém, sedmém a desátém dni jeho skladování.

Hodnoty obsahů chlorofylu *a*, *b* a celkových karotenoidů byly vypočteny dle níže uvedených rovnic (1) – (5) podle Dere *a kol.* [49] a Wellburn [51].

Pro pigmentové extrakty v 80 % acetonu:

$$a = 12,21.(Abs_{663} - Abs_{730}) - 2,81.(Abs_{646} - Abs_{730}) \quad (1)$$

$$b = 20,13.(Abs_{646} - Abs_{730}) - 5,03.(Abs_{663} - Abs_{730}) \quad (2)$$

$$k = 5,05.(Abs_{470} - Abs_{730}) - (0,0165.a) - (0,5252.b) \quad (3)$$

Pro pigmentové extrakty v methanolu:

$$a = 15,65.(Abs_{666} - Abs_{730}) \quad (4)$$

$$k = 4,52.(Abs_{470} - Abs_{730}) - 0,0129.a \quad (5)$$

a – obsah chlorofylu *a* ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)

b – obsah chlorofylu *b* ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)

k – obsah celkových karotenoidů ($\mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$)

Abs – absorbance při určité vlnové délce

3.3.6 Stanovení minerálních prvků

Minerální prvky ve vzorcích mikrořas byly stanoveny dle metody platné pro krmiva [91, 92]. Charakteristiky stanovení jednotlivých prvků jsou uvedeny v Tab. 5. Fosfor a bór byly stanoveny spektrofotometricky, fosfor při vlnové délce 430 nm po reakci s činidlem na bázi molybdenanu amonného a vanadičnanu amonného [91] a bór metodou podle Berger-Truoga

azometinem-H při vlnové délce 420 nm [92]. Ve všech vzorcích byla stanovena sušina a koncentrace jednotlivých kovů byly vyjádřeny v mg.kg^{-1} sušiny řasy nebo g.kg^{-1} sušiny mikrořasy. Stanovení minerálních prvků bylo provedeno v laboratoři Agrotest fyto, s.r.o. v Kroměříži.

Tab. 5: Charakteristiky stanovení minerálních prvků

prvek	rozklad vzorku	čínidlo	metodika stanovení	koncentrace standardu
P	min. mokrou cestou	$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$	spektrofotometrie	
^{40}Ca	min. mokrou cestou	$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$	AES acetylen - N_2O	$50,0 \text{ mg.l}^{-1}$
Mg	min. mokrou cestou	$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$	F-AAS acetylen - vzduch	$15,0 \text{ mg.l}^{-1}$
K	min. mokrou cestou	$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$	F-AAS acetylen - vzduch	$200,0 \text{ mg.l}^{-1}$
Na	min. mokrou cestou	$\text{H}_2\text{SO}_4 + \text{H}_2\text{O}_2$	F-AAS acetylen - vzduch	$20,0 \text{ mg.l}^{-1}$
Fe	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	F-AAS acetylen - vzduch	$10,0 \text{ mg.l}^{-1}$
Zn	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	F-AAS acetylen - vzduch	$2,0 \text{ mg.l}^{-1}$
Cu	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	F-AAS acetylen - vzduch	$2,5 \text{ mg.l}^{-1}$
Mn	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	F-AAS acetylen - vzduch	$2,5 \text{ mg.l}^{-1}$
^{51}Cr	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	ET-AAS	$10,0 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$
^{210}Pb	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	ET-AAS	$30,0 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$
^{109}Cd	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	ET-AAS	$2,0 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$
B	uzavřený mikrovlnný	$\text{HNO}_3 + \text{HCl}$	spektrofotometrie	
Hg	bez rozkladu		TMA-254	$0,5 \text{ } \mu\text{g.l}^{-1}$
Uvolňovací činidlo:			$^{139}\text{LaCl}_3 \cdot 5 \text{ H}_2\text{O}$	
Modifikátory pro termickou stabilizaci vzorků:			^{102}Pd	
			$^{31}\text{NH}_4\text{H}_2\text{PO}_4$	

3.3.7 Stanovení *in vitro* stravitelnosti

Analýze stravitelnosti organické hmoty OMD (%) a sušiny DMD (%) enzymaticko-gravimetrickou filtrační metodou *in vitro* s využitím inkubátoru Daisy II byly podrobeny jak pokultivačně neupravené vzorky zelených sladkovodních mikrořas a sinice, tak řasová biomasa, která byla pokultivačně ošetřena mechanickým (užitím oscilačního kulového mlýna) a enzymatickým způsobem (s využitím enzymu celulasy a komerčně dostupného celulasového produktu Celluclast 1,5L).

Stravitelnost organické hmoty OMD (%) a sušiny DMD (%) zelených sladkovodních mikrořas (*Ch. kessleri*, *Sc. quadricauda*, *Chlorella* sp.), modro-zelené mikrořasy (*Sp. platensis*) a pokultivačně ošetřené řasové biomasy mechanickým a enzymatickým způsobem byla stanovena enzymaticko-gravimetrickou filtrační metodou *in vitro* s využitím inkubátoru Daisy II a filtračních sáčků F58, přičemž bylo postupováno dle metod Mišurcová (2008) [55] a Mišurcová *a kol.* (2010) [77]. Vzorčky mikrořas (0,25 g) byly naváženy ve třech opakováních do filtračních sáčků F58, které byly následně zataveny a vloženy do inkubačních lahví. Pro korekci byl použit prázdný filtrační sáček. Stravitelnost organické hmoty OMD (%) a sušiny DMD (%) ve vzorcích mikrořas byla provedena pod různými podmínkami: po 24 hodinové hydrolýze pepsinem (z vepřové žaludeční sliznice; 0,7 FIP-U/g; Merck KGaA, Německo) v dávkování 3 g pepsinu na 6 g řasové biomasy; po 24 hodinové hydrolýze pankreatinem (z vepřové slinivky; proteázová aktivita 350 FIP-U/g, lipázová aktivita 6000 FIP-U/g, amylázová aktivita 7500 FIP-U/g; Merck KGaA, Německo) v použitém množství 3 g pankreatinu na 6 g řasové biomasy; a po kombinované hydrolýze pepsinem (24 hodin) a pankreatinem (24 hodin). Každé stanovení stravitelnosti bylo provedeno ve třech opakováních.

Hydrolýza pepsinem

Hydrolýza pepsinem byla provedena v 1700 ml 0,1M HCl vytemperované na 40 °C s příslušným množstvím pepsinu. Inkubační láhve byly vloženy do inkubátoru Daisy II po dobu 24 hodin při teplotě 40 °C. Po uplynutí inkubační doby byly filtrační sáčky propláchnuty destilovanou vodou a následně byly sušeny po dobu 24 hodin při teplotě 103 ± 2 °C, nakonec byly spáleny v muflové peci při 550 °C po dobu 5 hodin.

Hydrolýza pankreatinem

Enzymatická hydrolýza pankreatinem byla uskutečněna v 1700 ml fosfátového pufru (pH 7,45) vytemperovaného na 40 °C obsahujícího adekvátní množství pankreatinu. Následný postup byl identický jako v případě hydrolýzy pepsinem.

Kombinovaná hydrolýza pepsinem a pankreatinem

Při kombinované hydrolýze byla jako první provedena hydrolýza pepsinem, potom byly filtrační sáčky promyty destilovanou vodou a následně byla provedena hydrolýza pankreatinem. Další postup byl identický s postupem popsáním při hydrolýze pepsinem.

Výpočet stravitelnosti DMD (%) a OMD (%)

Stravitelnosti DMD a OMD byly vypočteny podle rovnic (6) – (9):

$$DMD = 100 - \frac{100 \cdot DMR}{m_2 \cdot DM} \quad [\%] \quad (6)$$

$$OMD = 100 - \frac{100 \cdot (DMR - AR)}{m_2 \cdot DM \cdot OM} \quad [\%] \quad (7)$$

$$DMR = m_3 - m_1 \cdot c_1 \quad [g] \quad (8)$$

$$AR = m_4 - m_1 \cdot c_2 \quad [g] \quad (9)$$

Kde *DMD* je stravitelnost sušiny (%), *OMD* je stravitelnost organické hmoty (%); *DMR* je hmotnost vzorku řasy po enzymatické hydrolýze a sušení (g), *DM* je sušina vzorku řasy (g/g), *AR* je hmotnost vzorku řasy po enzymatické hydrolýze, sušení a spálení (g), *OM* je obsah organické hmoty v sušině vzorku řasy (g/g), *m*₁ je hmotnost prázdného filtračního sáčku (g), *m*₂ je hmotnost naváženého vzorku řasy (g), *m*₃ je hmotnost filtračního sáčku obsahující vzorek řasy po enzymatické hydrolýze a sušení (g), *m*₄ je hmotnost filtračního sáčku se vzorkem řasy po enzymatické hydrolýze, sušení a spálení (g), *c*₁ a *c*₂ jsou korekční faktory vypočtené z prázdných (korekčních) sáčků:

$c_1 = m_x / m_1$ (m_x je hmotnost prázdného filtračního sáčku po enzymatické hydrolýze a sušení), $c_2 = m_y / m_1$ (m_y je hmotnost prázdného filtračního sáčku po enzymatické hydrolýze, sušení a spálení).

4. HLAVNÍ VÝSLEDKY PRÁCE

4.1. Základní chemické charakteristiky vyšetřovaných mikrořas a sinice

Obsahy sušiny, popela a dusíkatých látek vyšetřovaných vzorků zelených sladkovodních mikrořas a sinice jsou uvedeny v Tab. 6. Nejnižší hodnoty obsahů sušiny a dusíkatých látek byly zaznamenány ve vzorku sinice *Sp. platensis* (SpAL), která byla kultivována autotrofním způsobem v laboratorních podmínkách, na druhou stranu sinice kultivovaná autotrofně ve fotobioreaktoru (SpAP) vykazovala nejvyšší obsahy popela a dusíkatých látek mezi vyšetřovanými vzorky mikrořas. Nejvyšší obsah sušiny byl zaznamenán v mikrořase *Sc. quadricauda* (ScAP) pocházející z autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru, nejnižší obsah popela mezi všemi vyšetřovanými vzorky mikrořas byl stanoven v heterotrofně kultivované zelené mikrořase *Chlorella* sp. (ChHF).

Tab. 6: Základní chemické charakteristiky vyšetřovaných mikrořas (%; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka)

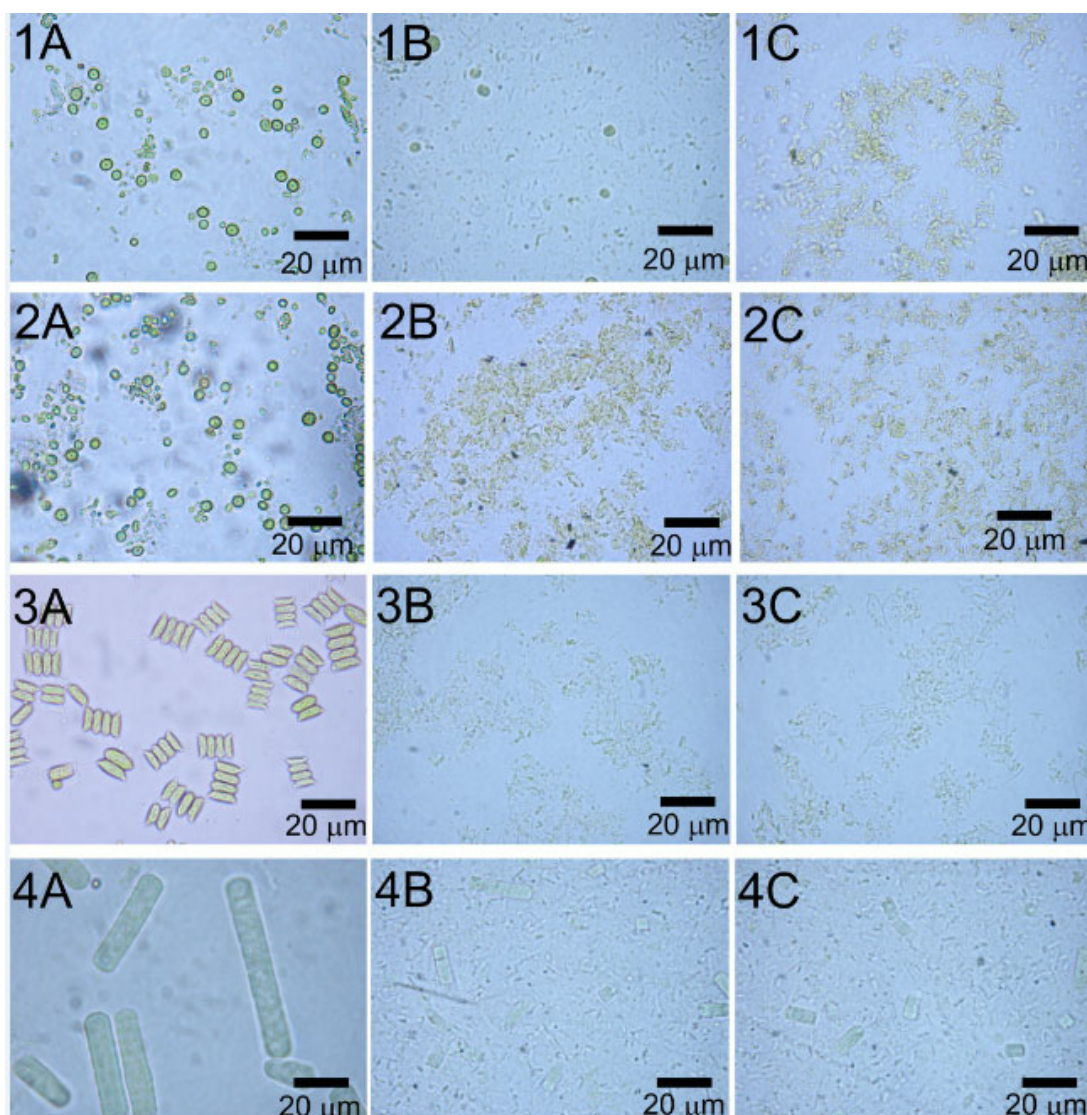
vzorek	obsah sušiny	obsah popela	dusíkaté látky
SpAP	91,5 ± 0,6 ^a	17,8 ± 0,4 ^a	55,6 ± 0,7 ^a
SpAL	83,6 ± 1,8 ^b	13,1 ± 0,9 ^b	22,7 ± 0,6 ^b
ScAP	96,0 ± 0,5 ^a	5,2 ± 0,1 ^a	43,4 ± 0,7 ^a
ScAL	92,9 ± 1,6 ^b	5,9 ± 0,1 ^b	52,5 ± 1,9 ^b
ChKAP	94,0 ± 0,1 ^a	6,7 ± 0,6 ^a	53,3 ± 0,7 ^a
ChKAL	93,5 ± 0,8 ^a	5,2 ± 0,4 ^b	49,5 ± 0,2 ^b
ChAO	93,8 ± 0,4 ^a	4,8 ± 0,3 ^a	54,9 ± 0,4 ^a
ChHF	94,7 ± 0,8 ^a	4,8 ± 0,3 ^a	31,6 ± 0,9 ^b

Statisticky významné rozdíly v obsahu sušiny, popela a dusíkatých látek mezi kultivacemi u jednotlivých řas (AP/AL, AO/HF) jsou označeny rozdílnými písmeny v horních indexech. Hodnoty uvedených parametrů u jednotlivých řas byly hodnoceny zvlášť a byly statisticky vyhodnoceny pomocí Wilcoxonova testu ($P < 0,05$). Pro výpočty byl využit software Unistat[®] verze 5.5 (Unistat, Londýn, Velká Británie).

Obsahy sušiny u druhů mikrořas *Chlorella* kultivovaných různými metodami se významně statisticky nelišily ($P < 0,05$). Podobně u obsahu popela ve vzorku mikrořasy *Chlorella* sp. pocházející z venkovní otevřené autotrofní kultivace s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě a z heterotrofní kultivace nebyly zaznamenány významné statistické rozdíly ($P < 0,05$). Avšak zbývající výsledky obsahů sušiny, popela a dusíkatých látek se významně statisticky lišily ($P < 0,05$) ve vzorcích mikrořas pocházejících z různých způsobů kultivací. Převážně vyšší obsahy zmíněných parametrů byly zaznamenány ve vzorcích mikrořas pocházejících z autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru, mimo vzorek *Sc. quadricauda*, který vykazoval při autotrofní kultivaci pod laboratorními podmínkami významně vyšší obsah dusíkatých látek než při autotrofní kultivaci ve fotobioreaktoru. Největší rozdíl v obsahu dusíkatých látek byl zaznamenán u sinice *Sp. platensis*. Statisticky významný rozdíl v obsahu dusíkatých látek byl zjištěn v mikrořase *Chlorella* sp., kdy autotrofně kultivovaná mikrořasa obsahovala o 40 % vyšší množství dusíkatých látek ve srovnání s heterotrofně kultivovaným vzorkem ve fermentoru. Tyto rozdíly mohou být způsobeny rozdílnou citlivostí různých řasových druhů ke kultivačním podmínkám v průběhu autotrofní či heterotrofní kultivace (koncentrace živin v kultivačním médiu, intenzita osvětlení, teplota v průběhu kultivace).

4.2. Dezintegrace řasové biomasy

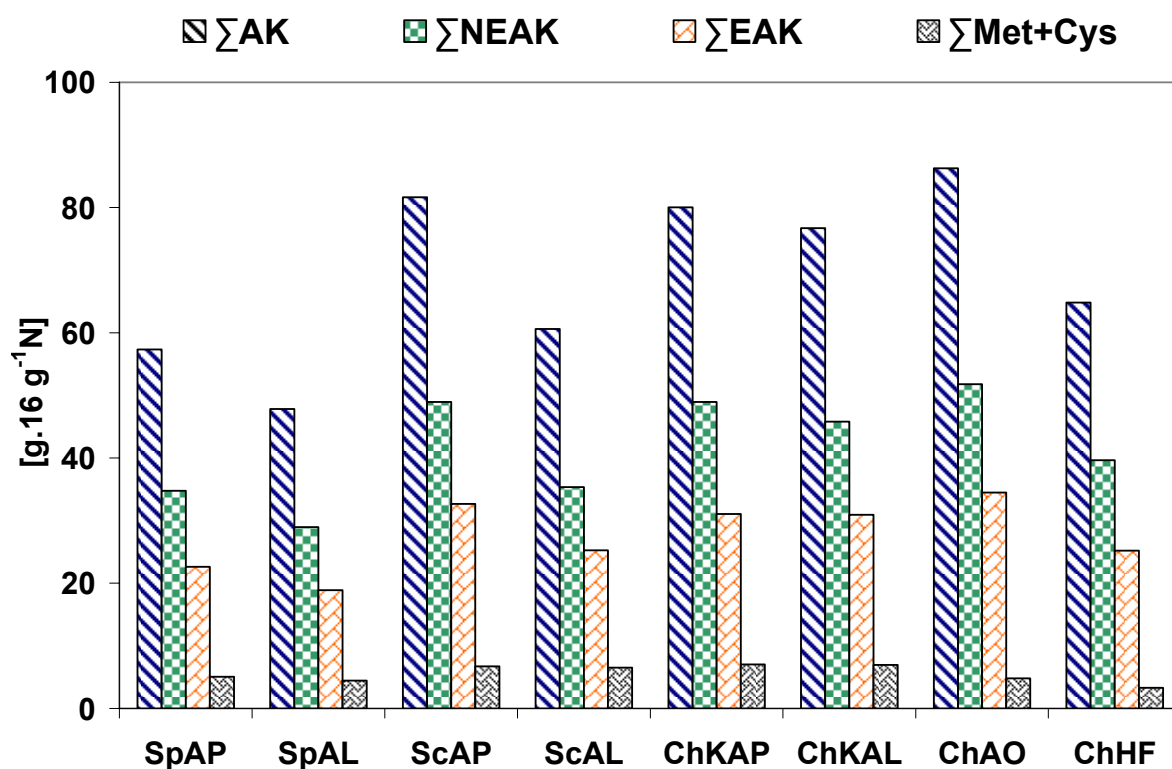
Řasová biomasa byla podrobena pokultivační dezintegraci, která byla provedena mechanickým způsobem pomocí oscilačního kulového mlýna a skleněných mikrokuliček balotina B7 dle postupu uvedeného v sekcích 3.2.1 a 3.2.2. Výsledek dezintegrace buněk mikrořas je ilustrován na obr. 4. Řasová biomasa a vliv dezintegrace byly pozorovány mikroskopem v imerzním oleji při největším zvětšení.



Obr. 4: Pozorování vyšetřovaných mikrořas a účinku mechanické dezintegrace pod mikroskopem. Vzorek řasy: 1-*Chlorella* sp.; 2-*Chlorella kessleri*; 3-*Scenedesmus quadricauda*; 4-*Spirulina platensis*. Pokultivační ošetření řasové biomasy: A-nedezintegrováný vzorek; B-řasová biomasa po ošetření skleněnými mikrokuličkami balotina B7; C-řasová biomasa po ošetření oscilačním kulovým mlýnem.

4.3. Obsah aminokyselin v mikrořasách

Celkové obsahy aminokyselin (Σ AK), esenciálních aminokyselin (Σ EAK), neesenciálních aminokyselin (Σ NEAK) a siřných aminokyselin (Σ Met+Cys) ve vzorcích zelených sladkovodních mikrořas a sinici jsou vyjádřeny v g.16g⁻¹N a jsou znázorněny na Obr. 5.



Obr. 5: Obsahy celkových (ΣAK), esenciálních (ΣEAK), neesenciálních ($\Sigma NEAK$) a siřných ($\Sigma Met+Cys$) aminokyselin ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas (*Sp-Spirulina platensis*; *ChK-Chlorella kessleri*; *Sc-Scenedesmus quadricauda*; *Ch-Chlorella sp.*) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), autotrofní laboratorní kultivaci (AL), venkovní otevřené autotrofní kultivaci s kaskádovým uspořádaním na tenké vrstvě (AO) a heterotrofní kultivaci ve fermentoru (HF) v g.16 g⁻¹N.

Z obrázku 5 jsou patrné rozdíly v aminokyselinovém složení jednotlivých druhů mikrořas a sinice, ale také rozdíly v obsahu aminokyselin v závislosti na způsobu jejich kultivace. Sladkovodní zelené mikrořasy všech zkoumaných vzorků obsahovaly vyšší koncentrace aminokyselin než vzorek sinice. Nejvyšší hodnoty celkových aminokyselin ΣAK – 86,30 g.16g⁻¹N, celkových esenciálních aminokyselin ΣEAK – 34,48 g.16g⁻¹N a celkových neesenciálních aminokyselin $\Sigma NEAK$ – 51,79 g.16g⁻¹N byly stanoveny v mikrořase *Chlorella sp.* (ChAO) kultivované pod autotrofním režimem ve venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádaním na tenké vrstvě. Vyšší hodnoty obsahů ΣAK – 80,01 g.16g⁻¹N (ChKAP); 81,62 g.16g⁻¹N (ScAP), ΣEAK – 31,07 g.16g⁻¹N (ChKAP); 32,67 g.16g⁻¹N (ScAP)

a Σ NEAK – 48,96 g.16g⁻¹N (ChKAP); 48,90 g.16g⁻¹N (ScAP) byly stanoveny v mikrořasách *Ch. kessleri* (ChKAP) a *Sc. quadricauda* (ScAP), které byly autotrofně kultivovány v solárním fotobioreaktoru. Modro-zelená mikrořasa *Sp. platensis* se zdá být velmi citlivá vůči kultivačním podmínkám, sinice (SpAL) kultivovaná autotrofně v laboratorních podmínkách obsahovala nejnižší množství aminokyselin ze všech vyšetřovaných vzorků řas, Σ AK 47,83 g.16g⁻¹N, Σ EAK 18,88 g.16g⁻¹N a Σ NEAK 28,95 g.16g⁻¹N.

Byly zjištěny také rozdíly v aminokyselinovém složení řasové biomasy u vzorku mikrořasy *Chlorella* sp. pocházející z heterotrofní (ChHF) a autotrofní (ChAO) kultivace. Mikrořasa pocházející z venkovní otevřené autotrofní kultivace s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě obsahovala více Σ AK, Σ EAK a Σ NEAK a to o 24, 27 a 23 % v příslušném pořadí, než heterotrofně kultivovaná mikrořasa ve fermentoru. Nejbohatším zdrojem sirných aminokyselin (Σ Met+Cys) mezi vyšetřovanými vzorky byla mikrořasa *Ch. kessleri* (ChKAP), která byla kultivována autotrofně v solárním fotobioreaktoru, ve své biomase jich obsahovala 7,02 g.16g⁻¹N. Přibližně poloviční množství sirných aminokyselin bylo stanoveno v heterotrofně kultivované *Chlorella* sp. (ChHF) ve srovnání s autotrofně kultivovaným vzorkem řasy (ChAO) při venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě. Z uvedených hodnot je patrná tendence, že mikrořasy kultivované autotrofně v solárním fotobioreaktoru obsahují vyšší množství aminokyselin ve srovnání se vzorky kultivovanými pod laboratorním režimem.

V Tab. 7 jsou uvedeny hodnoty obsahů jednotlivých aminokyselin ve vyšetřovaných mikrořasách v g.16g⁻¹N v závislosti na způsobu jejich kultivace. Neesenciální aminokyseliny Asp a Glu byly přítomny v nejvyšších množstvích ve všech vyšetřovaných mikrořasách, naopak aminokyseliny Tyr a Cys byly detekovány v nižších množstvích.

Nejhojněji se vyskytující esenciální aminokyselinou byl ve většině zkoumaných mikrořas Leu s výjimkou řasy *Sc. quadricauda* (ScAP) autotrofně kultivované v solárním fotobioreaktoru a *Chlorella* sp. (ChHF) pocházející z heterotrofní kultivace, ve kterých byl Lys vyhodnocen jako nejvíce zastoupená esenciální aminokyselina. Na druhé straně, ze skupiny esenciálních aminokyselin byly stanoveny v nejnižších koncentracích Thr a His ve všech vzorcích mikrořas. Semiesenciální aminokyselina pro děti, Arg, byl ve vyšetřovaných mikrořasách poměrně hojně zastoupen u zelených sladkovodních mikrořas rodu *Chlorella*, jeho nejvyšší množství bylo stanoveno v *Ch. kessleri* (ChKAP), která byla kultivována autotrofně v solárním fotobioreaktoru, ve své biomase ho obsahovala 8,32 g.16g⁻¹N.

Mikrořasa *Chlorella* sp. (ChAO) autotrofně kultivovaná na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním byla ohodnocena jako nejbohatší zdroj esenciálních (Val, Leu, Phe a Thr) a neesenciálních (Asp, Gly, Ala a Tyr) aminokyselin mezi všemi vyšetřovanými vzorky mikrořas. V heterotrofně kultivované *Chlorella* sp. byly jednotlivé aminokyseliny přítomny ve významně nižších množstvích ve srovnání s autotrofně kultivovaným vzorkem na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním.

Tab. 7: Obsahy jednotlivých aminokyselin (g.16g⁻¹N) v mikrořasách (*Spirulina platensis*-Sp; *Chlorella kessleri*-ChK; *Scenedesmus quadricauda*-Sc; *Chlorella* sp.-Ch) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), autotrofní laboratorní kultivaci (AL), autotrofní venkovní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO) a heterotrofní kultivaci ve fermentoru (HF); (n = 8, průměr ± směrodatná odchylka)

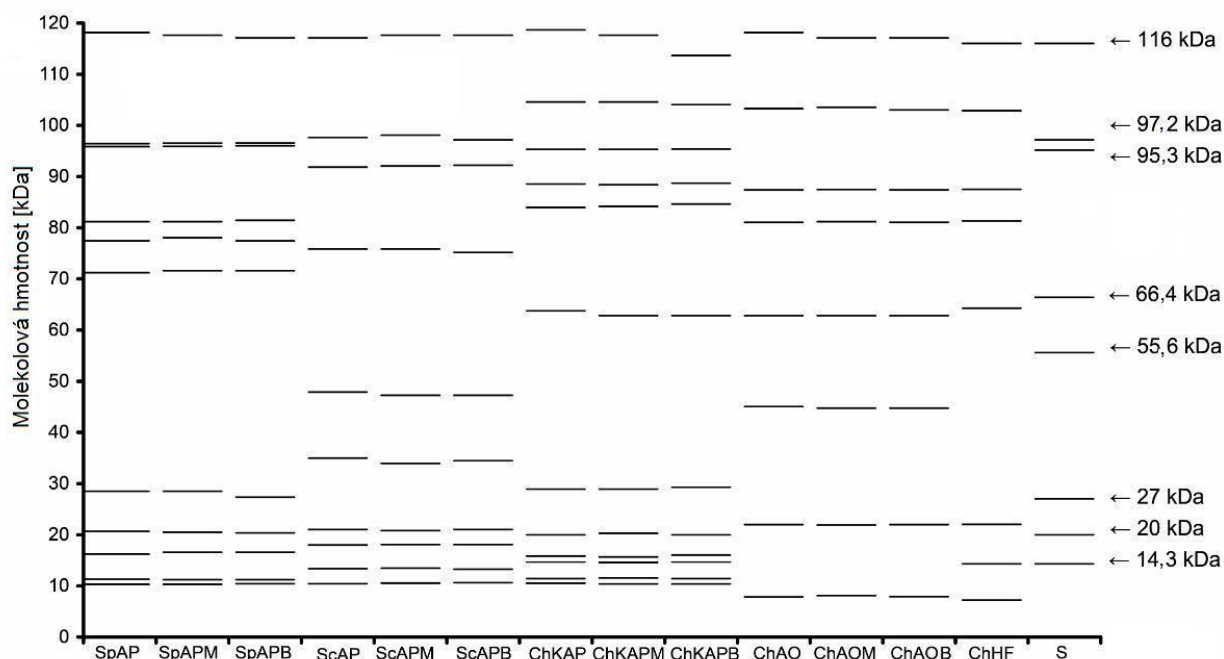
	SpAP	SpAL	ScAP	ScAL	ChKAP	ChKAL	ChAO	ChHF
EAK								
Val	3,26 ± 0,20	3,06 ± 0,09	4,68 ± 0,22*	3,11 ± 0,13*	4,19 ± 0,18	4,28 ± 0,15	4,82 ± 0,29*	3,46 ± 0,14*
Ile	2,48 ± 0,11*	2,90 ± 0,12*	2,84 ± 0,17*	2,00 ± 0,13*	3,45 ± 0,16	3,35 ± 0,13	3,07 ± 0,10*	2,07 ± 0,09*
Leu	4,03 ± 0,26*	4,74 ± 0,07*	5,89 ± 0,50*	4,72 ± 0,20*	6,32 ± 0,40	6,43 ± 0,25	7,69 ± 0,21*	5,28 ± 0,32*
Phe	3,17 ± 0,24*	1,70 ± 0,05*	4,32 ± 0,19*	2,99 ± 0,12*	3,89 ± 0,19	3,88 ± 0,09	4,72 ± 0,22*	2,74 ± 0,09*
Lys	3,61 ± 0,13*	2,38 ± 0,09*	6,07 ± 0,16*	4,34 ± 0,19*	4,29 ± 0,22	4,39 ± 0,09	5,13 ± 0,14*	5,74 ± 0,24*
Met	2,49 ± 0,14*	1,66 ± 0,07*	4,06 ± 0,33	3,94 ± 0,11	3,72 ± 0,16	3,74 ± 0,23	2,81 ± 0,16*	1,50 ± 0,05*
Thr	2,28 ± 0,08*	1,56 ± 0,04*	2,93 ± 0,21	2,83 ± 0,13	3,67 ± 0,18	3,22 ± 0,26	4,40 ± 0,21*	2,96 ± 0,13*
His	1,28 ± 0,08*	0,88 ± 0,06*	1,88 ± 0,01*	1,32 ± 0,09*	1,54 ± 0,05	1,62 ± 0,02	1,84 ± 0,06*	1,44 ± 0,03*
NEAK								
Asp	5,14 ± 0,19*	3,91 ± 0,16*	8,36 ± 0,36*	6,01 ± 0,38*	7,42 ± 0,38	6,57 ± 0,75	9,85 ± 0,64*	6,21 ± 0,19*
Ser	4,22 ± 0,27*	1,20 ± 0,06*	2,53 ± 0,15	2,64 ± 0,08	3,53 ± 0,16	3,28 ± 0,16	3,83 ± 0,18*	2,73 ± 0,11*
Glu	5,33 ± 0,18*	7,05 ± 0,20*	9,85 ± 0,52*	6,75 ± 0,30*	8,52 ± 0,42	7,84 ± 0,72	9,49 ± 0,50*	7,29 ± 0,27*
Pro	3,98 ± 0,25*	1,89 ± 0,12*	5,77 ± 0,23*	3,44 ± 0,04*	5,26 ± 0,29	5,39 ± 0,40	4,37 ± 0,16*	3,62 ± 0,19*
Gly	3,29 ± 0,20*	2,67 ± 0,11*	5,21 ± 0,44*	3,80 ± 0,20*	4,35 ± 0,21	4,43 ± 0,14	5,04 ± 0,42*	3,60 ± 0,19*
Ala	3,69 ± 0,19	3,96 ± 0,17	6,42 ± 0,51*	4,55 ± 0,22*	5,55 ± 0,24	6,01 ± 0,47	6,97 ± 0,50	6,91 ± 0,25
Tyr	2,18 ± 0,11*	1,70 ± 0,04*	3,29 ± 0,25*	1,89 ± 0,01*	2,71 ± 0,15	2,89 ± 0,05	3,55 ± 0,27*	2,32 ± 0,11*
Cys	2,56 ± 0,08*	2,78 ± 0,12*	2,65 ± 0,08	2,57 ± 0,18	3,30 ± 0,21	3,21 ± 0,15	2,00 ± 0,05*	1,77 ± 0,08*
Arg	4,35 ± 0,17*	3,79 ± 0,10*	4,88 ± 0,38*	3,70 ± 0,09*	8,32 ± 0,49*	6,19 ± 0,21*	6,69 ± 0,31*	5,19 ± 0,05*

*hodnoty vykazující významný rozdíl mezi obsahy aminokyselin v řasách kultivovaných různými metodami

Hodnoty byly statisticky vyhodnoceny pomocí Wilcoxonova testu, ($P < 0,05$; jednotlivé řasy a každá aminokyselina byly vyhodnoceny samostatně). Pro výpočty byl využit software Unistat[®] verze 5.5 (Unistat, Londýn, Velká Británie).

4.4. Proteinové profily mikrořas

Proteinové profily vyšetřovaných druhů mikrořas jsou ilustrovány na Obr. 6, přičemž byl sledován vliv kultivace a následné dezintegrace řasové biomasy na změnu jejich proteinových profilů.

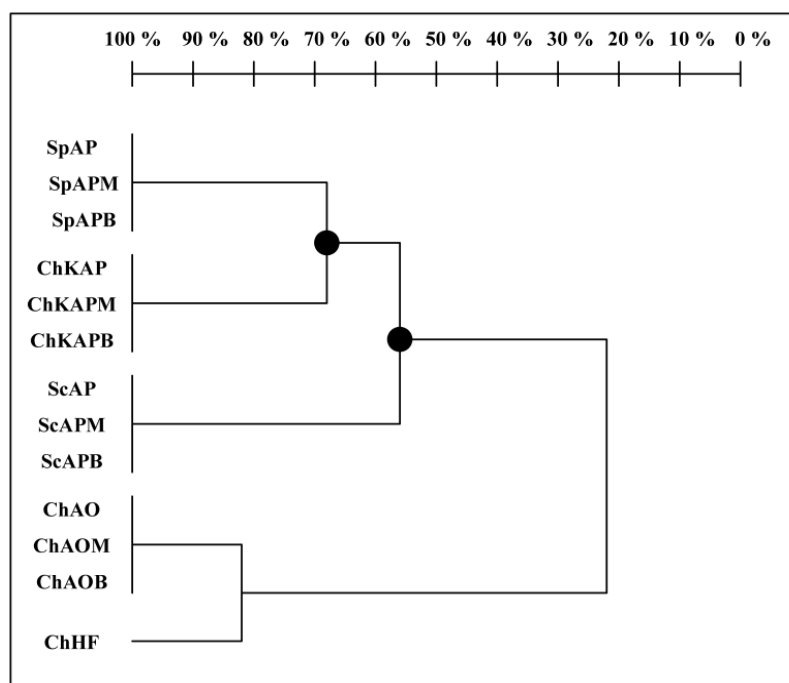


Obr. 6: Proteinové profily *Spirulina platensis*-Sp, *Chlorella kessleri*-ChK, *Scenedesmus quadricauda*-Sc a *Chlorella sp.*-Ch po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), autotrofní otevřené venkovní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO) a po ošetření oscilačním kulovým mlýnem (M), balotinou B7 (B) v kDa. Standard je označen jako S.

Společným znakem vyšetřovaných druhů mikrořas byl obsah proteinů o molekulových hmotnostech v rozmezí 14,3 až 27 kDa a 70 až 116 kDa. Heterogenita mezi proteinovými profily mikrořas byla pozorována v oblasti mezi 30 až 70 kDa. Proteiny o molekulových hmotnostech v rozmezí 30 až 70 kDa nebyly zjištěny u sinice *Sp. platensis*. V proteinovém profilu mikrořasy *Chlorella sp.* nebyly detekovány proteiny o molekulové hmotnosti v intervalu od 65 až 80 kDa, dále profil *Ch. kessleri* nevykazoval přítomnost proteinů v rozmezí od 30 do 65 kDa. V proteinovém profilu *Sc. quadricauda* nebyly zjištěny proteiny o molekulové hmotnosti 50 až 70 kDa. Značná

variabilita byla pozorována mezi proteinovými profily řas *Chlorella*. sp. a *Sc. quadricauda*.

Homologie neboli podobnost mezi proteinovými profily vyšetřovaných mikrořas jsou ilustrovány na dendrogramu (viz. Obr. 7).



Obr. 7: Dendrogram homologií proteinových profilů sinice (*Sp-Spirulina platensis*) a mikrořas (*ChK-Chlorella kessleri*; *Sc-Scenedesmus quadricauda*; *Ch-Chlorella* sp.) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), venkovní otevřené autotrofní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO), heterotrofní kultivaci ve fermentoru (HF) a po ošetření oscilačním kulovým mlýnem (M) a balotinou (B).

Nejvyšší míra podobnosti mezi proteinovými profily mikrořas byla zaznamenána mezi *Sp. platensis* a *Ch. kessleri*, jejíž hodnota byla na úrovni 69 %. Proteinový profil *Sc. quadricauda* vykazoval podobnost v 57 % s proteinovými profily mikrořas *Sp. platensis* a *Ch. kessleri*. Nejvíce odlišný proteinový profil vykazovala mikrořasa *Chlorella* sp., jehož podobnost byla na úrovni 21 % k proteinovým profilům ostatních mikrořas. Dále byl zhodnocen vliv kultivace u mikrořasy *Chlorella* sp., která byla kultivována heterotrofně ve fermentoru (ChHF) a autotrofně při venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (ChAO). Podobnost jejich profilů byla na úrovni 81 %.

4.5. Obsah lipidů a mastných kyselin

Hodnoty obsahu lipidů a procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v mikrořasách byly stanoveny v neošetřené řasové biomase a v biomase, která byla dezintegrována mechanickým způsobem pomocí oscilačního kulového mlýna, dále pro tato stanovení byly použity dvě rozpouštědlové soustavy (hexan; směs methanol/chloroform/voda v poměru 1 : 2 : 1) s cílem určit, která soustava je vhodnější pro extrakci lipidových složek z řasové biomasy.

Hodnoty obsahu lipidů ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas s využitím dvou rozpouštědlových soustav jsou uvedeny v Tab. 8. Volba použité rozpouštědlové soustavy významným způsobem ovlivnila zjištěný obsah lipidů ve vzorcích mikrořas. Rozpouštědlová soustava tvořená hexanem vykazovala ve všech vyšetřovaných vzorcích mikrořas nižší účinnost extrakce lipidových složek z jejich biomasy ve srovnání se soustavou tvořenou směsí methanol/chloroform/voda (1 : 2 : 1). Největšího rozdílu (téměř 9 %) mezi obsahy lipidů v závislosti na zvolené rozpouštědlové soustavě bylo zjištěno u *Ch. kessleri* (ChKAP), naopak nejmenší vliv použité rozpouštědlové soustavy byl zaznamenán u *Sp. platensis* (SpAP). Nejnižší obsah lipidů vůbec byl stanoven v heterotrofně kultivované *Chlorella* sp. (ChHF), naopak nejvyšších hodnot dosahovaly autotrofně kultivované mikrořasy ve fotobioreaktoru *Sc. quadricauda* a *Sp. platensis*. Důsledkem pokultivačního ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem oscilačním kulovým mlýnem bylo zvýšení účinnosti extrakce lipidických složek z řasové biomasy, přičemž nejvyšší vzrůst účinnosti extrakčního procesu byl pozorován v mikrořase *Sc. quadricauda* a to přibližně o 6 %. Vliv způsobu kultivace na celkový obsah lipidů v řasové biomase byl pozorován v *Chlorella* sp. při použití rozpouštědlové soustavy methanol/chloroform/voda, kdy heterotrofně kultivovaný vzorek (ChHF)

mikrořasy obsahoval o 3 % méně lipidů ve srovnání s autotrofně kultivovaným vzorkem v solárním fotobioreaktoru (ChAO).

Tab. 8: Obsah lipidů v mikrořasách (%; n = 3, průměr ± směrodatná odchylka)

vzorek	obsah lipidů	
	extrakce ^a	extrakce ^b
SpAP	13,41 ± 0,79	18,02 ± 1,15
SpAPM	15,07 ± 0,80	19,94 ± 1,37
ScAP	12,56 ± 1,14	18,06 ± 0,78
ScAPM	18,89 ± 0,63	23,90 ± 1,04
ChKAP	9,87 ± 0,89	18,01 ± 1,15
ChKAPM	11,89 ± 1,00	20,28 ± 0,63
ChAO	8,87 ± 0,84	16,91 ± 0,67
ChAOM	11,91 ± 0,84	17,17 ± 0,28
ChHF	7,97 ± 1,10	13,97 ± 0,57

extrakce ^a – rozpouštědlová soustava tvořená hexanem

extrakce ^b – rozpouštědlová soustava směs methanol/chloroform/voda 1 : 2 : 1

Zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vyšetřovaných mikrořasách za použití rozpouštědlové soustavy (směsi methanol/chloroform/voda) a hexanu jsou prezentovány v Tab. 9 a 10.

V řasových extraktech získaných různými extrakčními soustavami byla pozorována podobnost v zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Mezi nejvíce zastoupené mastné kyseliny při použití uvedených rozpouštědlových soustav ve vzorcích mikrořas byly nasycená mastná kyselina palmitová (C16:0); monoenoové mastné kyseliny – palmitolejová (C16:1) a olejová (C18:1; cis-9); dienoové mastné kyseliny – linolová (C18:2; cis-9,12) a polyenoové mastné kyseliny – γ -linolenová (C18:3; cis-6,9,12) a α -linolenová (C18:3; cis-9,12,15).

Avšak v případě obsahů jednotlivých mastných kyselin získaných s použitím rozpouštědla hexanu je nutno uvést, že tyto hodnoty jsou ovlivněny méně účinnou a tudíž nedokonalou extrakcí lipidických složek

z řasové biomasy, což již dokládají výsledky obsahů lipidů uvedených v Tab. 8. Při porovnání zastoupení jednotlivých mastných kyselin získaných za použití rozpouštědlové soustavy methanol/chloroform/voda (Tab. 9) a hexanu (Tab. 10) je zřejmé, že rozpouštědlo hexan je méně vhodné pro stanovení lipidového profilu mikrořas. Soustava tvořená hexanem nedostatečně extrahovala nasycené mastné kyseliny, například u kyseliny palmitové (C16:0) bylo pozorováno významně nižší zastoupení ve srovnání s rozpouštědlovou soustavou methanol/chloroform/voda, či některé nasycené mastné kyseliny nebyly vyextrahovány vůbec například kyselina lignocerová (C24:0). Dále lze obecně konstatovat, že zastoupení dienových a polyenových mastných kyselin stanovených při rozpouštědla hexanu bylo vyšší, než při použití soustavy methanol/chloroform/voda. Avšak je nutno podotknout, že v případě hexanu vykazovalo zastoupení jednotlivých dienových a polyenových mastných kyselin vyššího rozptylu hodnot a tato metoda extrakce nebyla vhodná pro mechanicky pokultivačně ošetřené vzorky mikrořas. Proto výsledky získané s použitím hexanu mají malou vypovídací hodnotu o skutečném zastoupení mastných kyselin ve vzorcích mikrořas a z tohoto důvodu jsou v práci dále komentovány a hodnoceny pouze výsledky získané za použití druhé rozpouštědlové soustavy methanol/chloroform/voda.

V Tab. 9 je znázorněno zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vzorcích mikrořas při použití rozpouštědlové soustavy methanol/chloroform/voda. Autotrofně kultivovaná *Sp. platensis* v solárním fotobioreaktoru (SpAP) byla nejhojnějším zdrojem kyseliny palmitové (C16:0), palmitolejové (C16:1) a γ -linolenové (C18:3; cis-6,9,12), avšak neobsahovala kyselinu α -linolenovou (C18:3; cis-9,12,15). V sinici nebyly detekovány trans mastné kyseliny. Největší zastoupení kyseliny olejové (C18:1; cis-9) a linolové (C18:2; cis-9,12) vykazovala heterotrofně kultivovaná *Chlorella* sp. (ChHF). Kyselina α -linolenová (C18:3; cis-9,12,15)

byla prokázána v nejvyšším množství ve vzorku autotrofně kultivované *Ch. kessleri* (ChAO). Ostatní detekované mastné kyseliny byly přítomny v řádově menších koncentracích. Vliv pokultivačního ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem pomocí oscilačního kulového mlýna na zvýšení účinnosti extrakce mastných kyselin z řasové biomasy byl pozorován zdatelně u γ -linolenové mastné kyseliny (C18:3; cis-6,9,12). V mikrořasách *Sp. platensis* a *Ch. kessleri* byl zaznamenán mírný vzrůst účinnosti extrakce této mastné kyseliny následkem mechanického pokultivačního ošetření, v případě *Sc. quadricauda* a *Chlorella* sp. se jednalo o významný nárůst účinnosti. Při zkoumání vlivu kultivace na zastoupení jednotlivých mastných kyselin v řasové biomase *Chlorella* sp. bylo pozorováno, že heterotrofně kultivovaná mikrořasa (ChHF) obsahovala dvojnásobné množství palmitové kyseliny (C16:0), o 75 % více kyseliny olejové (C18:1; cis-9), o 7 % více kyseliny linolové (C18:2; cis-9,12), ale o 27 % méně kyseliny α -linolenové (C18:3; cis-9,12,15) ve srovnání s autotrofně kultivovaným vzorkem mikrořasy (ChAO).

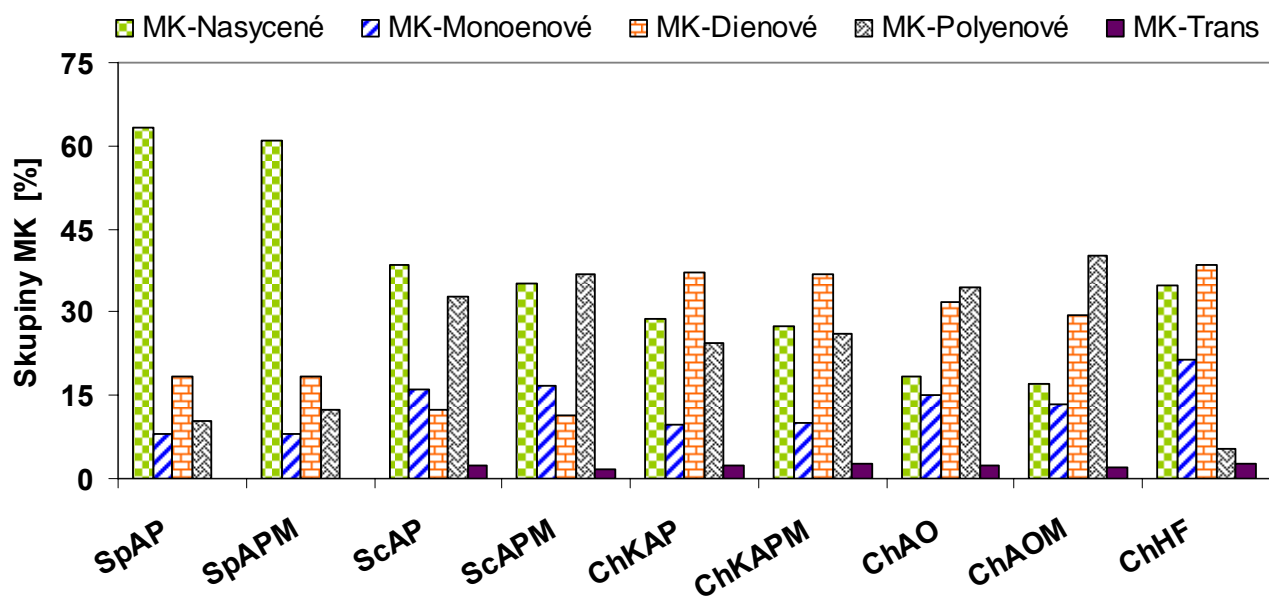
Tab. 9: Zastoupení mastných kyselin ve vyšetřovaných mikrořasách (% z celkových MK; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka) za použití rozpouštědlové soustavy methanol/chloroform/voda (1 : 2 : 1)

MK	SpAP	SpAPM	ScAP	ScAPM	ChKAP	ChKAPM	ChAO	ChAOM	ChHF
C12:0	---	---	0,06 ± 0,01	0,06 ± 0,00	0,11 ± 0,00	0,16 ± 0,01	---	0,11 ± 0,00	0,04 ± 0,00
C14:0	0,46 ± 0,03	0,56 ± 0,00	0,67 ± 0,00	0,66 ± 0,01	1,14 ± 0,00	1,15 ± 0,00	0,68 ± 0,00	0,56 ± 0,00	0,33 ± 0,01
C15:0	---	---	0,28 ± 0,01	0,25 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,70 ± 0,00	0,16 ± 0,00	0,21 ± 0,00	0,11 ± 0,00
C16:0	61,06 ± 0,06	58,75 ± 0,27	34,91 ± 0,02	31,21 ± 0,10	24,64 ± 0,09	23,38 ± 0,04	16,27 ± 0,02	14,76 ± 0,04	33,16 ± 0,03
C17:0	0,27 ± 0,00	0,45 ± 0,01	0,53 ± 0,02	0,47 ± 0,00	0,29 ± 0,01	0,32 ± 0,00	0,70 ± 0,01	0,62 ± 0,02	0,22 ± 0,02
C18:0	1,40 ± 0,02	1,34 ± 0,02	1,89 ± 0,02	1,99 ± 0,01	0,74 ± 0,01	0,89 ± 0,01	0,55 ± 0,02	0,42 ± 0,01	0,89 ± 0,03
C24:0	---	---	0,30 ± 0,02	0,42 ± 0,00	1,23 ± 0,07	0,73 ± 0,02	0,17 ± 0,00	0,32 ± 0,03	0,02 ± 0,00
C16:1(cis-9)	2,59 ± 0,03	2,53 ± 0,04	0,82 ± 0,01	0,63 ± 0,00	1,61 ± 0,01	1,58 ± 0,01	1,33 ± 0,03	1,06 ± 0,01	0,35 ± 0,01
C17:1(cis-10)	---	---	---	0,96 ± 0,01	---	---	---	0,19 ± 0,01	---
C18:1(cis-9)	5,29 ± 0,08	5,09 ± 0,14	12,89 ± 0,01	13,19 ± 0,04	5,50 ± 0,03	5,68 ± 0,02	11,42 ± 0,02	10,02 ± 0,02	18,57 ± 0,03
C18:1(trans-9)	---	---	2,31 ± 0,01	1,82 ± 0,03	2,50 ± 0,00	2,66 ± 0,02	2,18 ± 0,03	1,97 ± 0,01	2,40 ± 0,04
C24:1(cis-15)	0,07 ± 0,02	0,32 ± 0,03	---	---	---	---	0,06 ± 0,00	0,11 ± 0,01	0,01 ± 0,00
C18:2(cis-9,12)	18,42 ± 0,07	18,43 ± 0,04	12,52 ± 0,02	11,50 ± 0,04	36,38 ± 0,07	36,49 ± 0,03	31,89 ± 0,11	29,46 ± 0,11	38,22 ± 0,00
C18:2(trans-9,12)	---	---	---	---	---	---	---	---	0,26 ± 0,00
C20:2(cis-11,14)	---	---	---	---	0,64 ± 0,02	0,27 ± 0,39	---	---	---
C18:3(cis-6,9,12)	10,44 ± 0,03	12,55 ± 0,00	2,93 ± 0,04	10,45 ± 0,17	4,74 ± 0,11	5,98 ± 0,10	2,32 ± 0,06	10,58 ± 0,24	0,20 ± 0,01
C18:3(cis-9,12,15)	---	---	29,89 ± 0,01	26,40 ± 0,07	19,76 ± 0,01	20,03 ± 0,36	32,28 ± 0,25	29,61 ± 0,13	5,20 ± 0,00

Tab. 10: Zastoupení mastných kyselin ve vyšetřovaných mikrořasách (% z celkových MK; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka) s použitím hexanu

MK	SpAP	SpAPM	ScAP	ScAPM	ChKAP	ChKAPM	ChAO	ChAOM	ChHF
C12:0	0,10 ± 0,01	0,81 ± 0,04	0,54 ± 0,09	0,12 ± 0,02	0,47 ± 0,02	0,18 ± 0,01	0,81 ± 0,09	0,08 ± 0,01	0,07 ± 0,00
C14:0	0,48 ± 0,01	0,58 ± 0,10	2,28 ± 0,08	0,84 ± 0,02	2,25 ± 0,10	0,69 ± 0,03	0,12 ± 0,00	0,28 ± 0,01	0,32 ± 0,00
C15:0	---	0,21 ± 0,01	0,81 ± 0,07	0,29 ± 0,02	1,08 ± 0,05	0,39 ± 0,03	0,06 ± 0,00	0,17 ± 0,02	0,11 ± 0,00
C16:0	50,43 ± 0,01	50,43 ± 0,23	30,61 ± 0,36	19,84 ± 0,25	20,33 ± 0,34	11,75 ± 0,04	12,70 ± 0,15	7,48 ± 0,05	23,29 ± 0,00
C17:0	0,51 ± 0,04	0,55 ± 0,02	1,75 ± 0,06	0,94 ± 0,01	1,37 ± 0,06	0,30 ± 0,08	0,15 ± 0,00	0,49 ± 0,03	0,33 ± 0,01
C18:0	1,30 ± 0,05	1,33 ± 0,09	4,11 ± 0,13	1,75 ± 0,05	3,79 ± 0,07	0,46 ± 0,01	0,16 ± 0,00	0,31 ± 0,01	0,91 ± 0,03
C20:0	---	---	---	---	---	---	6,34 ± 0,42	---	0,23 ± 0,01
C22:0	---	0,07 ± 0,01	---	---	---	---	---	---	---
C14:1(cis-9)	---	---	---	---	---	---	---	---	0,53 ± 0,04
C16:1(cis-9)	3,10 ± 0,14	3,06 ± 0,01	0,98 ± 0,08	0,72 ± 0,00	1,36 ± 0,04	0,84 ± 0,07	1,20 ± 0,50	0,49 ± 0,01	0,40 ± 0,01
C17:1(cis-10)	---	---	0,63 ± 0,07	1,79 ± 0,11	---	0,20 ± 0,00	---	0,32 ± 0,01	---
C18:1(cis-9)	5,13 ± 0,37	6,07 ± 0,04	23,10 ± 0,02	11,55 ± 0,09	7,86 ± 0,31	3,13 ± 0,06	11,31 ± 0,53	5,35 ± 0,04	18,39 ± 0,29
C18:1(trans-9)	---	---	---	---	1,91 ± 0,02	1,42 ± 0,07	0,60 ± 0,00	1,40 ± 0,01	2,16 ± 0,01
C20:1(cis-11)	---	0,34 ± 0,02	---	---	---	---	---	---	---
C24:1(cis-15)	---	---	---	---	16,88 ± 0,66	0,65 ± 0,00	---	---	---
C18:2(cis-9,12)	23,73 ± 0,57	21,23 ± 0,13	12,33 ± 0,52	8,91 ± 0,26	25,89 ± 0,05	18,15 ± 0,35	31,71 ± 0,65	20,51 ± 0,16	45,47 ± 0,50
C18:2(trans-9,12)	---	---	---	---	---	---	---	---	0,21 ± 0,01
C20:2(cis-11,14)	---	0,41 ± 0,00	---	---	---	1,35 ± 0,00	---	---	0,16 ± 0,00
C18:3(cis-6,9,12)	15,22 ± 0,18	14,92 ± 0,06	12,01 ± 0,00	33,52 ± 0,17	5,95 ± 0,01	49,90 ± 0,11	6,05 ± 0,03	42,91 ± 0,15	3,57 ± 0,08
C18:3(cis-9,12,15)	---	---	10,84 ± 0,40	19,75 ± 0,09	10,86 ± 0,11	10,59 ± 0,05	28,80 ± 1,45	20,22 ± 0,10	3,83 ± 0,03

Zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin z celkové sumy stanovených mastných kyselin ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas je znázorněno na Obr. 8. V modro-zelené mikrořase *Sp. platensis* byla majoritně zastoupena skupina nasycených mastných kyselin, dále byly ve větším množství zjištěny polyenové mastné kyseliny, naopak minoritní zastoupení vykazovala skupina monoenoových mastných kyselin. V zelených sladkovodních mikrořasách měla dominantní postavení skupina polyenových mastných kyselin, v hojnosti obsahu dále následovala skupina nasycených mastných kyselin, skupina monoenoových mastných kyselin byla zastoupena nejméně, stejně jako v sinici *Sp. platensis*. Obsah celkových trans mastných kyselin v zelených sladkovodních mikrořasách osciloval kolem hodnoty 2 % ze sumy stanovených mastných kyselin.



Obr. 8: Zastoupení jednotlivých skupin mastných kyselin z celkové sumy stanovených mastných kyselin ve vyšetřovaných vzorcích sinice (*Sp-Spirulina platensis*) a mikrořas (*Sc-Scenedesmus quadricauda*; *ChK-Chlorella kessleri*; *Ch-Chlorella sp.*) po autotrofni kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP), venkovní otevřené autotrofni kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO), heterotrofni kultivaci ve fermentoru (HF) a po ošetření oscilačním kulovým mlýnem (M).

4.6. Obsah chlorofylů a karotenoidů v mikrořasách

Obsahy pigmentů (chlorofylu *a*, *b* a celkových karotenoidů) ve vyšetřovaných mikrořasách jsou znázorněny v Tab. 11. Pigmenty byly stanoveny v pokultivačně neošetřených vzorcích mikrořas, při vlastní přípravě pigmentových extraktů byly vzorky rozmělněny pomocí skleněných mikrokuliček (postup přípravy extraktů je uveden v sekci 3.3.5).

Sinice jsou organismy, které jsou typické tím, že neobsahují ve svých buňkách chlorofyl *b*, což vyplývá i z naměřených dat v předložené práci. Nejvyšší hodnoty obsahů chlorofylu *a*, *b* a celkových karotenoidů byly stanoveny v autotrofně kultivované *Ch. kessleri* (ChKAP) v solárním fotobioreaktoru, dále hojně zastoupení pigmentů bylo stanoveno v autotrofně kultivované *Chlorella* sp. (ChAO) při venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě. Vliv kultivační metody na obsah pigmentů v řasové biomase byl zjištěn u řasy *Chlorella* sp. Mikrořasa kultivovaná heterotrofním způsobem ve fermentoru (ChHF) obsahovala výrazně nižší množství pigmentů než autotrofně kultivovaná řasová biomasa při venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (ChAO), řasová biomasa heterotrofně kultivované řasy obsahovala přibližně desetkrát méně chlorofylu *a*, *b* a pětkrát méně celkových karotenoidů než autotrofně kultivovaná biomasa.

Tab. 11: Obsahy chlorofylu *a*, chlorofylu *b* a celkových karotenoidů v mikrořasách ($\text{mg}\cdot\text{g}^{-1}$ řasy; $n = 9$, průměr \pm směrodatná odchylka)

vzorek	obsah pigmentů		
	chlorofyl <i>a</i>	chlorofyl <i>b</i>	celkové karotenoidy
SpAP	$7,80 \pm 0,03$	---	$0,62 \pm 0,00$
ScAP	$5,97 \pm 0,02$	$2,60 \pm 0,01$	$0,75 \pm 0,00$
ChKAP	$17,52 \pm 0,02$	$6,24 \pm 0,06$	$2,50 \pm 0,02$
ChAO	$12,18 \pm 0,02$	$3,35 \pm 0,01$	$1,16 \pm 0,01$
ChHF	$1,37 \pm 0,01$	$0,28 \pm 0,01$	$0,24 \pm 0,00$

4.6.1 Stabilita pigmentových extraktů

Stabilita pigmentových extraktů byla sledována po dobu skladování deseti dnů v temnu při teplotě 4 °C. Stabilita extraktu je vyjadřována jako poměr hodnot absorbancí při vlnových délkách 435 a 415 tzv. OD435/OD415. Tento poměr absorbancí se považuje za parametr vyjadřující degradaci chlorofylu, jehož hodnota představuje relativní poměr chlorofylu *a* ku feofytinu *a*. Měření hodnot absorbancí proběhlo v čerstvém pigmentovém extraktu a dále v prvním, druhém, čtvrtém, sedmém a desátém dni skladování extraktů za výše uvedených podmínek. Výsledky sledování stability extraktů jsou uvedeny v Tab. 12.

Ze získaných dat plyne skutečnost, že skladování pigmentových extraktů po dobu deseti dnů za zmíněných podmínek neovlivňuje jejich stabilitu. Avšak je nutno uvést, že chlorofyl *a* podléhá lehce transformaci na jeho bezhořečnatý derivát feofytin *a* již při přípravě samotného extraktu ze vzorků řas. Z uvedených hodnot vyplývá, že více než 70 % chlorofylu *a* bylo transformováno na feofytin *a* u mikrořas *Ch. kessleri* (73 %) a *Sp. platensis* (71 %), naopak nejnižší transformace chlorofylu *a* na feofytin *a* na úrovni 53 % byla pozorována u řasy *Chlorella* sp. pocházející z heterotrofní kultivace a na úrovni 54 % u téže řasy kultivované autotrofně.

Tab. 12: Stabilita pigmentových extraktů OD435/OD415 (%; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka)

doba skladování (dny)	OD435/OD415				
	SpAP	ScAP	ChKAP	ChAO	ChHF
čerstvý extrakt	0,70 ± 0,01	0,61 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,01
1	0,69 ± 0,01	0,60 ± 0,00	0,73 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,00
2	0,71 ± 0,00	0,60 ± 0,00	0,73 ± 0,00	0,54 ± 0,00	0,53 ± 0,00
4	0,71 ± 0,00	0,60 ± 0,01	0,73 ± 0,01	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,01
7	0,71 ± 0,01	0,60 ± 0,01	0,72 ± 0,00	0,54 ± 0,01	0,53 ± 0,00
10	0,71 ± 0,01	0,60 ± 0,00	0,72 ± 0,00	0,54 ± 0,00	0,53 ± 0,01

4.7. Obsah minerálních látek

V zelených sladkovodních mikrořasách a sinici byly stanoveny makrobiogenní prvky (K, P, Mg, Ca, Na), oligobiogenní prvky (Fe, Mn, Zn, Cu) mikrobiogenní prvky (B, Cr) a toxické prvky (Pb, Cd, Hg) postupem uvedeným s kapitole 3.3.6 a jejich obsahy jsou uvedeny v Tab. 13.

Makrobiogenní prvek draslík byl přítomen v řasách *Chlorella* sp., *Sc. quadricauda* a *Sp. platensis* v nejvyšším množství, v *Ch. kessleri* byl nejzastoupenějším prvkem fosfor. Makrobiogenní prvek sodík byl minoritně zastoupen ve všech vyšetřovaných zelených sladkovodních mikrořasách. Železo, jako zástupce oligobiogenních prvků, bylo ve všech vyšetřovaných mikrořasách přítomno v nejvyšší koncentraci. Bór vykazoval dominantní zastoupení v rámci stanovených mikrobiogenních prvků. Toxické prvky byly přítomny ve všech vyšetřovaných mikrořasách ve stopovém množství, nejméně byla zastoupena rtuť.

Nejvyšší koncentrace prvků fosforu, vápníku, železa a zinku byly stanoveny v autotrofně kultivované *Ch. kessleri* (ChKAP) v solárním fotobioreaktoru, mikrořasa *Sc. quadricauda* (ScAP) pocházející ze stejného způsobu kultivace vykazovala nejvyšší zastoupení draslíku, avšak obsahovala nejméně železa. Sinice *Sp. platensis* (SpAP) autotrofně kultivovaná v solárním fotobioreaktoru byla nejbohatším zdrojem sodíku, naproti tomu obsahovala nejnižší koncentrace zinku a mědi. Bylo pozorováno, že *Chlorella* sp. (ChAO) kultivovaná autotrofně při venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě obsahovala dvojnásobně více hořčíku, vápníku a manganu, avšak o polovinu méně mědi ve srovnání s *Chlorella* sp. (ChHF) pocházející z heterotrofní kultivace ve fermentoru. Dále v *Ch. kessleri* (ChKAP) bylo stanoveno dvakrát více fosforu než v řasách *Chlorella* sp. (ChAO a ChHF).

Tab. 13: Obsahy minerálních látek v mikrořasách (g.kg⁻¹ řasy, mg.kg⁻¹ řasy; n = 4, průměr ± směrodatná odchylka)

	ChHF	ChAO	ChKAP	ScAP	SpAP
makrobiogenní prvky (g.kg⁻¹ řasy)					
K	12,9 ± 0,02	13,4 ± 0,03	10,1 ± 0,11	14,2 ± 0,30	14,0 ± 0,30
P	11,7 ± 0,01	10,3 ± 0,01	19,4 ± 0,41	10,3 ± 0,01	8,0 ± 0,10
Mg	2,48 ± 0,00	4,01 ± 0,01	3,02 ± 0,01	2,00 ± 0,20	1,30 ± 0,01
Ca	1,37 ± 0,00	2,53 ± 0,00	4,70 ± 0,01	0,50 ± 0,00	1,01 ± 0,00
Na	1,12 ± 0,00	0,35 ± 0,00	1,02 ± 0,00	0,30 ± 0,00	9,40 ± 0,50
oligobiogenní prvky (mg.kg⁻¹ řasy)					
Fe	912,5 ± 28,66	1027,7 ± 15,35	1310,9 ± 33,19	248,1 ± 23,72	851,9 ± 12,39
Mn	73,9 ± 0,77	148,6 ± 1,96	65,8 ± 1,60	51,2 ± 2,91	64,8 ± 1,55
Zn	83,6 ± 0,17	114,7 ± 4,57	166,5 ± 1,18	144,1 ± 1,54	16,5 ± 0,49
Cu	98,4 ± 0,35	51,8 ± 1,00	84,4 ± 1,01	56,2 ± 0,35	2,81 ± 0,29
mikrobiogenní prvky (mg.kg⁻¹ řasy)					
B	41,0 ± 6,93	43,3 ± 2,31	41,0 ± 1,73	25,0 ± 2,08	35,5 ± 1,76
Cr	2,35 ± 0,02	0,63 ± 0,02	0,00 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,29 ± 0,01
toxické prvky (mg.kg⁻¹ řasy)					
Pb	0,21 ± 0,04	0,19 ± 0,01	0,27 ± 0,02	0,50 ± 0,03	0,22 ± 0,02
Cd	0,01 ± 0,00	0,03 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00
Hg	0,01 ± 0,00	0,01 ± 0,00	0,00 ± 0,00	0,02 ± 0,00	0,01 ± 0,00

4.8. Stravitelnost řas

Hodnoty stravitelnosti *in vitro* byly stanoveny postupem, který je uveden v kapitole 3.3.7. Stravitelnost byla zkoumána jak v neošetřené řasové biomase tak v řasové biomase, která byla pokultivačně ošetřena mechanickým a enzymatickým způsobem, kdy byl zkoumán vliv těchto ošetření na hodnoty stravitelnosti. Mechanicky byla ošetřena pomocí oscilačního kulového mlýna a enzymatická dezintegrace biomasy byla uskutečněna enzymem celulasou a komerčně dostupným celulasovým preparátem Celluclast 1,5L.

Hodnoty stravitelnosti DMD a OMD stanovené po hydrolýze pepsinem, pankreatinem a po kombinované hydrolýze v neošetřené řasové biomase a v biomase, která byla pokultivačně ošetřena mechanickým způsobem jsou uvedeny v příloze A. Pro přehlednost textu práce a lepší demonstraci vlivu

pokultivačních ošetření řasové biomasy na stravitelnost jsou hodnoty DMD a OMD znázorněny graficky.

4.8.1 Vliv enzymu a pokultivačního ošetření řasové biomasy na

její stravitelnost

Na Obr. 9 jsou znázorněny hodnoty DMD a OMD po hydrolýze provedené pepsinem, pankreatinem a jejich kombinací v řasové biomase, která byla pokultivačně ošetřena mechanickým a enzymatickým způsobem.

Při srovnání použitých enzymatických hydrolýz, je z Obr. 9 patrné, že nejnižší hodnoty stravitelnosti DMD a OMD byly stanoveny při hydrolýze pepsinem, vyšší hodnoty byly určeny po hydrolýze pankreatinem a nakonec nejvyšší hydrolyzační účinek byl pozorován při kombinované hydrolýze pepsinem a pankreatinem. Ve všech vyšetřovaných vzorcích mikrořas bylo pozorováno, že hodnoty stravitelnosti organické hmoty (OMD) byly vyšší ve srovnání s hodnotami stravitelnosti sušiny (DMD). Tato skutečnost je podpořena faktem, že sušina obsahuje nestravitelné složky.

U zelených sladkovodních mikrořas byl pozorován trend vzrůstu hodnot OMD a DMD po mechanické či enzymatické dezintegraci jejich celulotické buněčné stěny. Získané údaje stravitelnosti u sinice *Sp. platensis* potvrdily hypotézu, že pokultivační ošetření její řasové biomasy mechanickým a enzymatickým způsobem stimuluje pouze nepatrný či žádný nárůst hodnot DMD a OMD. Výsledky dále ukazují, že sinice je velmi dobře stravitelná ve srovnání s vyšetřovanými vzorky zelených sladkovodních mikrořas.

Hydrolýza pepsinem

Výsledky stravitelnosti znázorněné na obrázku 9 (A, D) indikují, že nejnižší hodnoty DMD a OMD ve všech zkoumaných mikrořasách byly stanoveny při hydrolýze pepsinem (PE), bez jakékoliv pokultivační úpravy vzorků, přičemž nejnižší hodnoty stravitelnosti DMD (25,9 %) i OMD (33,2 %) byly stanoveny v mikrořase *Sc. quadricauda*, naopak nejvyšší hodnoty DMD

(53,2 %) a OMD (59,9 %) vykazovala *Ch. kessleri*. Navíc, hodnoty stravitelností stanovené u sinice převyšovaly stravitelnost *Ch. kessleri* o 16 %.

Z Obr. 9 je patrné, že narušení buněčných stěn pokultivačním ošetřením řasové biomasy celulasou (PE + CE) zvýšilo hodnotu DMD u *Chlorella* sp. o 40 %, u *Ch. kessleri* o 17,7 %, u *Sc. quadricauda* bylo pozorováno zvýšení pouze o 1,2 %. Nicméně narušení buněčných stěn mechanickým pokultivačním ošetřením (PE + M) způsobilo u *Sc. quadricauda* zvýšení hodnot stravitelností přibližně o 15 %, naopak u vzorků mikrořas rodu *Chlorella* tento způsob nevykazoval takovou účinnost ve srovnání s enzymatickým způsobem (PE + CE) pokultivačního ošetření. Nejvyššího nárůstu hodnot stravitelností bylo dosaženo při kombinaci mechanického a enzymatického způsobu pokultivačního ošetření (PE + CE + M) řasové biomasy. Kombinace obou metod pokultivačního ošetření měla nejvyšší účinek na zvýšení hodnot DMD a OMD zejména v mikrořase *Chlorella* sp.

Hydrolyza pankreatinem

Hydrolyza s použitím pankreatinu (PA) vedla k významnému zvýšení hodnot stravitelností u všech vyšetřovaných vzorků mikrořas. Hydrolyzy s použitím PE i PA ukazují, že *Sc. quadricauda* je nejméně stravitelná mikrořasa, na druhé straně *Ch. kessleri* byla ohodnocena jako nejvíce stravitelná zelená mikrořasa mezi vyšetřovanými vzorky. *Sp. platensis* převyšovala nejvyšší dosažené hodnoty stravitelností v zelených mikrořasách přibližně o 23 % u DMD a o 21 % u OMD.

Tak jako u předešlého typu hydrolyzy, tak i hydrolyza PA indikovala, že hodnoty stravitelností u *Chlorella* sp. a *Ch. kessleri* byly významně pozitivně ovlivněny enzymatickým pokultivačním ošetřením (PA + CE) řasové biomasy celulasou, nikoliv však v případě *Sc. quadricauda*. Významný nárůst DMD přibližně o 40 % a OMD o 35 % v řase *Sc. quadricauda* byl pozorován

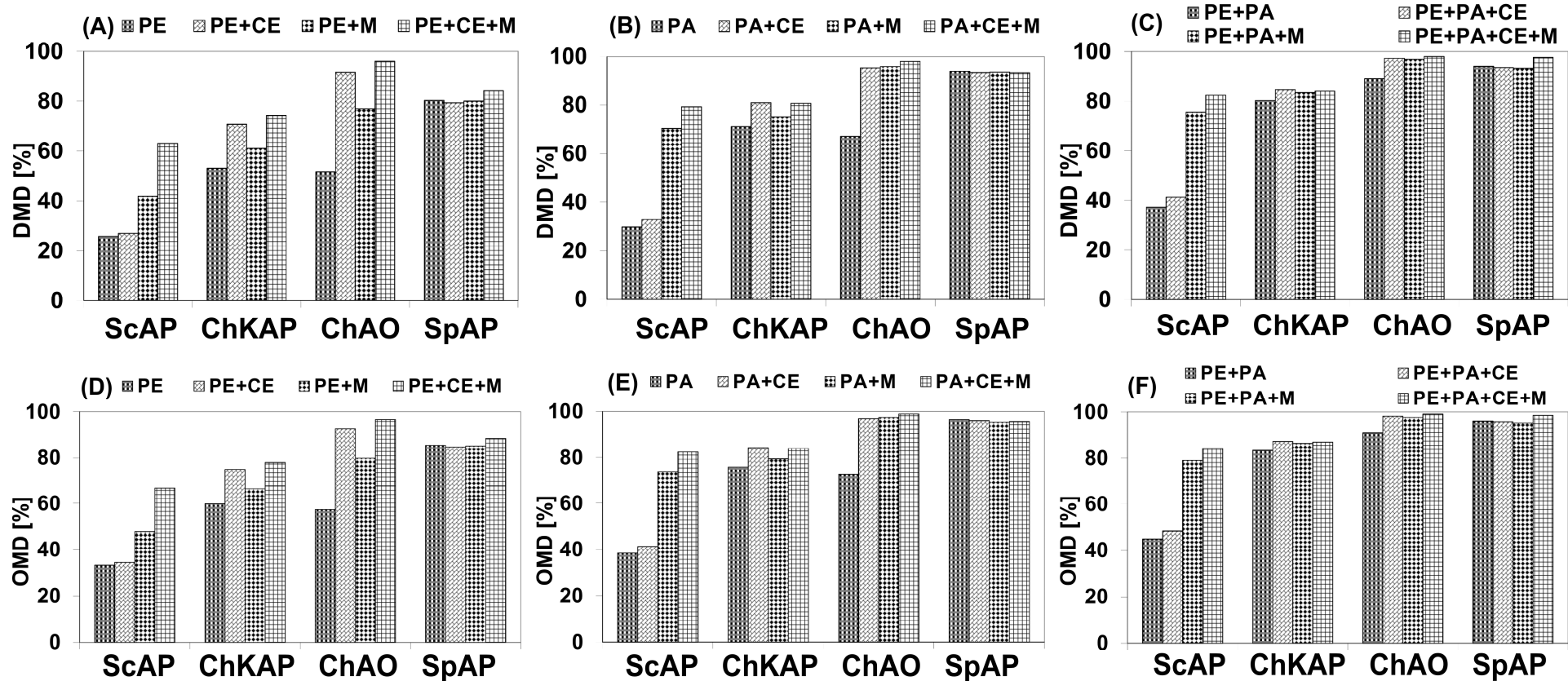
po mechanickém pokultivačním ošetření (PA + M) řasové biomasy (viz. Obr. 9 B, E).

I při tomto typu hydrolýzy bylo pozorováno, že nejvyššího nárůstu hodnot stravitelností bylo dosaženo při kombinaci mechanického a enzymatického způsobu (PA + CE + M) pokultivačního ošetření řasové biomasy, ačkoliv v případě *Chlorella* sp. měly oba typy pokultivačního ošetření srovnatelný účinek na stravitelnost. Dále byl zdokumentován výrazný růst DMD (49,3 %) a OMD (44,1 %) v mikrořase *Sc. quadricauda* při kombinaci mechanického a enzymatického způsobu pokultivačního ošetření.

Kombinovaná hydrolýza pepsinem a pankreatinem

Hodnoty DMD a OMD stanovené při hydrolýze (PE + PA) byly výrazně vyšší (u *Chlorella* sp.), mírně vyšší (u *Ch. kessleri* a *Sc. quadricauda*) nebo na stejné úrovni (u *Sp. platensis*) ve srovnání s hydrolýzou provedenou s použitím PA (viz. Obr. 9). Bylo pozorováno, že samostatný účinek mechanického (PE + PA + M) a enzymatického (PE + PA + CE) pokultivačního ošetření řasové biomasy u *Ch. kessleri* a *Chlorella* sp. způsobil pozitivní růst hodnot stravitelností, který byl na stejné úrovni, navíc současná aplikace těchto metod indikovala stejný vliv na zvýšení DMD a OMD.

Stejně jako u předchozích dvou typů hydrolýz, také při hydrolýze (PE + PA), mechanické pokultivační ošetření řasové biomasy *Sc. quadricauda* přispělo k výraznému nárůstu DMD (o 38,4 %) a OMD (o 34,2 %). Z obrázku 9 (C, F) je zřejmé, že kombinace použitých způsobů pokultivačního ošetření řasové biomasy u *Sc. quadricauda* vedlo k intenzivnímu nárůstu DMD (o 45,2 %) a OMD (o 39,5 %).



Obr. 9: Hodnoty stravitelnosti sušiny DMD (%) a organické hmoty OMD (%) po hydrolyze pepsinem PE, pankreatiem PA a kombinované hydrolyze PE+PA v zelených sladkovodních mikrořasách (Sc-Scenedesmus quadricauda; ChK-Chlorella kessleri; Ch-Chlorella sp.) a v sinici (Sp-Spirulina platensis) po autotrofni kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP) a venkovní otevřené autotrofni kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO). Hydrolyzy uskutečněné s řasovou biomasou ošetřenou enzymaticky celulasou jsou označeny CE, hydrolyzy provedené s pokultivačně ošetřenou řasovou biomasou oscilačním kulovým mlýnem jsou označeny M a hydrolyzy s řasovou biomasou pokultivačně ošetřenou enzymaticky celulasou a mechanicky oscilačním kulovým mlýnem jsou označeny CE+M.

4.8.2 Vliv kultivace na stravitelnost

Vliv zvolené kultivační metody na stravitelnost sušiny DMD a organické hmoty OMD byl pozorován u mikrořasy *Chlorella* sp. Hodnoty DMD a OMD stanovené ve vzorcích kultivovaných heterotrofním (ChHF) a autotrofním (ChAO) způsobem jsou uvedeny v Tab. 14, z jejichž údajů plyne skutečnost, že při hydrolýze pepsinem (PE) a kombinované hydrolýze (PE + PA) nejsou zaznamenány významné rozdíly v DMD a OMD ve vzorcích pocházejících z různých metod kultivací. Významný rozdíl v hodnotách stravitelností byl pozorován při hydrolýze pankreatinem, kdy heterotrofně kultivovaný vzorek vykazoval přibližně o 20 % vyšší stravitelnost ve srovnání s autotrofně kultivovaným vzorkem mikrořasy.

Tab. 14: Hodnoty DMD a OMD v mikrořase *Chlorella* sp. kultivované heterotrofně a při autotrofní kultivaci; (%; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka)

	PE		PA		PE + PA	
	DMD	OMD	DMD	OMD	DMD	OMD
ChHF	51,84 ± 1,43	57,67 ± 1,55	86,25 ± 0,23	89,09 ± 0,20	87,39 ± 0,36	89,43 ± 0,38
ChAO	51,75 ± 1,24	57,37 ± 0,99	67,29 ± 0,48	72,69 ± 0,62	89,29 ± 0,59	91,08 ± 0,48

4.8.3 Vliv použití Celluclastu 1,5L na stravitelnost

Při stanovení stravitelnosti *in vitro* v řasové biomase pokultivačně ošetřené enzymatickým způsobem bylo realizováno stanovení s komerčně dostupným celulasovým produktem Celluclast 1,5L, který je vhodný pro potravinářské použití. Bylo nutné zjistit vhodnou koncentraci tohoto produktu jejíž účinek by byl srovnatelný s pokultivačním ošetřením enzymem celulasou. Důvody proč bylo toto stanovení realizováno jsou následující: enzym celulasa je poměrně nákladný na pořízení a jeho použití při hydrolýze omezuje případné další využití řasové biomasy ke specifickým účelům, kdežto produkt Celluclast 1,5L je cenově dostupnější a v případě jeho použití je možno řasovou biomasu

či hydrolyzáty z ní využít pro specifické účely např. pro potravinářský či krmivářský průmysl. Při hledání vhodné koncentrace produktu Celluclast 1,5L byly provedeny analýzy stravitelnosti s jeho různými koncentracemi. Nakonec byla nalezena optimální koncentrace produktu, která vykazovala stejnou účinnost jako enzymatické pokultivační ošetření enzymem celulasou. Optimální hodnota koncentrace produktu Celluclast 1,5L byla 1,4 ml preparátu na 6 g vzorku řasy, nižší koncentrace produktu vykazovaly nedostatečnou účinnost, naopak vyšší hodnoty koncentrací již nepřispívaly k vyššímu účinku produktu.

V Tab. 15 jsou uvedeny hodnoty stravitelností DMD a OMD u mikrořas, jejichž biomasa byla enzymaticky pokultivačně ošetřena enzymem celulasou a celulasovým produktem Celluclast 1,5L. Z uvedených hodnot je patrné, že optimální množství produktu $0,23 \text{ ml.g}^{-1}$ řasy mělo téměř u všech vzorků velmi podobnou účinnost při realizovaných hydrolýzách ve srovnání s metodou využívající enzymu celulasy. Pouze u mikrořasy *Sc. quadricauda*, jejíž biomasa byla nejdříve mechanicky pokultivačně ošetřena byla zaznamenána nižší účinnost celulasového produktu, dále nižší účinnost produktu byla zaznamenána také u autotrofně kultivované mikrořasy *Chlorella* sp. při hydrolýze pankreatinem.

Tab. 15: Hodnoty DMD a OMD v mikrořasách stanovené po předchozí dezintegraci řasové biomasy enzymatickým způsobem pomocí enzymu celulasy a komerčně dostupným celulasovým produktem Celluclast 1,5L (%; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka)

vzorek	celulasa + PE		Celluclast 1,5L + PE	
	DMD	OMD	DMD	OMD
ScAP	27,10 ± 0,12	34,51 ± 0,20	27,18 ± 0,53	35,49 ± 1,65
ScAPM	63,27 ± 0,93	66,84 ± 0,78	53,80 ± 0,58	59,31 ± 0,69
ChKAP	70,89 ± 0,95	74,86 ± 0,71	72,36 ± 0,80	76,47 ± 0,65
ChKAPM	74,32 ± 0,45	77,95 ± 0,36	73,33 ± 0,03	77,57 ± 0,13
ChAO	91,71 ± 0,24	92,74 ± 0,16	93,48 ± 0,66	94,36 ± 0,53
ChAOM	96,10 ± 0,35	96,62 ± 0,15	94,98 ± 0,33	96,29 ± 0,45
SpAP	79,34 ± 0,72	84,89 ± 0,50	81,89 ± 0,82	87,03 ± 0,80
SpAPM	84,44 ± 1,33	88,62 ± 1,01	81,00 ± 0,25	86,16 ± 0,20
	celulasa+PA		Celluclast 1,5L+PA	
	DMD	OMD	DMD	OMD
ScAP	33,00 ± 0,28	41,32 ± 0,51	31,66 ± 0,34	40,49 ± 0,68
ScAPM	79,31 ± 0,23	82,45 ± 0,08	75,68 ± 0,28	79,24 ± 0,42
ChKAP	81,00 ± 1,07	84,46 ± 0,68	81,26 ± 0,69	84,60 ± 0,76
ChKAPM	80,72 ± 0,58	84,15 ± 0,38	79,21 ± 0,20	82,50 ± 0,42
ChAO	95,39 ± 0,43	96,92 ± 0,43	90,52 ± 0,50	91,99 ± 0,37
ChAOM	98,07 ± 1,78	98,89 ± 1,59	96,39 ± 0,39	97,17 ± 0,32
SpAP	93,51 ± 0,28	96,03 ± 0,04	94,43 ± 0,25	96,33 ± 0,22
SpAPM	93,48 ± 1,10	95,63 ± 0,67	91,74 ± 0,17	94,37 ± 0,40
	celulasa+PE+PA		Celluclast 1,5L+PE+PA	
	DMD	OMD	DMD	OMD
ScAP	41,20 ± 0,94	48,39 ± 0,91	38,49 ± 0,20	45,84 ± 0,10
ScAPM	82,39 ± 0,68	84,44 ± 0,13	77,35 ± 0,57	81,24 ± 0,81
ChKAP	84,92 ± 0,77	87,39 ± 0,65	82,51 ± 0,17	85,61 ± 0,19
ChKAPM	84,36 ± 1,15	87,14 ± 0,65	82,42 ± 0,54	86,55 ± 0,45
ChAO	97,34 ± 0,13	98,27 ± 0,20	93,20 ± 0,18	94,98 ± 0,32
ChAOM	98,03 ± 0,19	99,09 ± 0,58	96,19 ± 0,41	97,29 ± 0,27
SpAP	93,65 ± 1,54	95,83 ± 0,99	93,59 ± 0,41	95,92 ± 0,22
SpAPM	97,72 ± 0,13	98,51 ± 0,20	95,51 ± 0,61	96,98 ± 0,39

5. DISKUSE

Disertační práce sledovala vybrané nutriční složky aminokyseliny, proteiny, lipidy, mastné kyseliny, minerální prvky, chlorofyly a karotenoidy v řasové biomase zelených sladkovodních mikrořas *Chlorella kessleri*, *Chlorella sp.*, *Scenedesmus quaricauda* a v modro-zelené mikrořase (sinici) *Spirulina platensis* v závislosti na metodě jejich kultivace. Práce se zabývala sledováním vlivu pokultivačního ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem užitím oscilačního kulového mlýna a skleněných mikrokuliček balotina B7 na výtěžnost obsažených nutričních složek. V disertační práci byla stanovena stravitelnost organické hmoty OMD (%) a stravitelnost sušiny DMD (%) zelených sladkovodních mikrořas a sinice pomocí enzymaticko-gravimetrické filtrační metody *in vitro* s využitím inkubátoru Daisy II. Dále byl pozorován vliv pokultivačního ošetření řasové biomasy mechanickou cestou užitím oscilačního kulového mlýna a enzymatickým způsobem s využitím enzymu celulasy a komerčně dostupného celulasového produktu Celluclast 1,5L na hodnoty stravitelnosti řasové biomasy.

Základní chemické charakteristiky

Hodnoty obsahů sušiny ve vzorcích mikrořas byly vysoké a pohybovaly se v rozmezí od 83 % u *Sp. platensis* autotrofně kultivované při laboratorních podmínkách do 96 % u mikrořasy *Sc. quadricauda* autotrofně kultivované v solárním fotobioreaktoru. Obsah sušiny se vlivem kultivace statisticky významně lišil ($P < 0,05$) u *Sp. platensis* a *Sc. quadricauda*, kdy vzorky mikrořas pocházející z autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru vykazovaly statisticky významně vyšší hodnoty ve srovnání s mikrořasami, které byly kultivovány autotrofně v laboratorních podmínkách. Obsahy popela v zelených sladkovodních mikrořasách byly zjištěny v intervalu od 4,8 % (heterotrofně kultivovaná *Chlorella sp.*) do 6,7 % (autotrofně kultivovaná *Ch. kessleri* v solárním fotobioreaktoru), naproti tomu

Sp. platensis obsahovala přibližně třikrát vyšší obsah popela (17,8 %) než zelené sladkovodní mikrořasy. Zvolený typ kultivace statisticky významně ovlivnil ($P < 0,05$) hodnoty obsahu popela u *Sp. platensis*, *Sc. quadricauda* a *Ch. kessleri*. Při autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru byly zaznamenány jeho vyšší hodnoty ve srovnání s autotrofní kultivací při laboratorních podmínkách, nikoliv však u *Sc. quadricauda*.

Obecně lze konstatovat, že autotrofně kultivované mikrořasy v solárním fotobioreaktoru vykazují vyšší hodnoty obsahu dusíkatých látek ve srovnání s řasovou biomasou pocházející z autotrofní kultivace pod laboratorními podmínkami či z heterotrofní kultivace ve fermentoru. Rattanapoltee *a kol.* [13] uvádí, že řasová biomasa pocházející z autotrofní kultivace obsahuje vyšší množství dusíkatých látek než heterotrofně kultivovaná řasová biomasa, avšak toto tvrzení je v rozporu s Perez-Garzia *a kol.* [25], který uvádí, že heterotrofní kultivace může poskytovat řasovou biomasu s vyšším množstvím dusíkatých látek než v případě biomasy pocházející z autotrofní kultivace. Nejvýznamnější rozdíl v obsahu dusíkatých látek u analyzovaných vzorků byl pozorován v sinici *Sp. platensis*, kdy autotrofně kultivovaná biomasa v solárním fotobioreaktoru obsahovala přibližně dvojnásobné množství dusíkatých látek (55,5 %) než biomasa kultivovaná autotrofně pod laboratorním režimem (22,7 %). Tato situace mohla být pravděpodobně způsobena podmínkami při autotrofní laboratorní kultivaci (intenzita osvětlení, koncentrace živin v kultivačním médiu, teplota během kultivace, objem kultivační nádoby).

Při srovnání vlivu kultivační metody na hodnoty základních chemických charakteristik u mikrořasy *Chlorella* sp. bylo pozorováno, že statisticky významného rozdílu ($P < 0,05$) mezi zjištěnými hodnotami bylo dosaženo pouze v případě obsahu dusíkatých látek, kdy heterotrofně kultivovaná biomasa vykazovala přibližně o 20 % nižší hodnotu obsahu

ve srovnání s autotrofně kultivovanou mikrořasou při venkovní otevřené kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě.

Aminokyseliny

Autotrofně venkovně kultivovaná mikrořasa *Chlorella* sp. (ChAO) na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním obsahovala nejvíce celkových aminokyselin, esenciálních a neesenciálních aminokyselin mezi všemi zkoumanými vzorky mikrořas, avšak nejbohatším zdrojem sirných aminokyselin byla autotrofně kultivovaná *Ch. kessleri* (ChKAP) v solárním fotobioreaktoru. Lze tedy dedukovat, že řasová biomasa pocházející z autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru obsahuje vyšší množství celkových aminokyselin, celkových esenciálních a neesenciálních aminokyselin než biomasa kultivovaná pod autotrofní kultivací v laboratorních podmínkách. Dále, v případě *Chlorella* sp. bylo pozorováno, že mikrořasa kultivovaná heterotrofním způsobem obsahuje statisticky významně nižší množství ($P < 0,05$) aminokyselin, než mikrořasa pocházející z venkovní otevřené kultivace s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě.

Na základě získaných výsledků lze konstatovat, že aminokyselinové složení mikrořas je velmi variabilní mezi různými rody, ale i v rámci stejných druhů. V analyzované sinici *Sp. platensis* (SpAP), která byla autotrofně kultivovaná v solárním fotobioreaktoru byly obsahy aminokyselin Val – 3,1; Phe – 3,2; Met – 2,5 a His – 1,3 v g.16g⁻¹N srovnatelné s hodnotami těchto aminokyselin stanovených v sinici *Spirulina* sp. podle Ogbonda *a kol.* [18]. Na druhé straně obsahy dalších aminokyselin jako Thr – 2,3; Glu – 5,3; Gly – 3,3; Ala – 3,7 a Tyr – 2,2 v g.16g⁻¹N byly v analyzované sinici (SpAP) stanoveny v nižších koncentracích a zbývající aminokyseliny Ile – 2,5; Leu - 4,0; Lys - 3,6; Asp – 5,1; Ser - 4,2; Pro – 3,9; Cys – 2,6 a Arg – 4,4 v g.16g⁻¹N byly ve vyšetřované sinici stanoveny ve vyšších koncentracích než v případě publikovaných údajů u *Spirulina* sp. [18]. Ve vyšetřované sinici

(SpAP) byla stanovena sirtá aminokyselina Cys, jejíž nižší zastoupení bylo potvrzeno v *Sp. platensis* ve studii Morist *a kol.* [19], na rozdíl od sinice *Spirulina* sp., kde přítomnost této aminokyseliny nebyla potvrzena [18]. Dále bylo zjištěno, že obsahy Lys a Leu byly v analyzované sinici (SpAP) ve shodě s obsahy stanovenými v *Sp. platensis* podle Morist *a kol.* [19], nicméně významně nižší hodnoty těchto aminokyselin Lys – 0,9; Leu – 2,8 v g.16g⁻¹N byly stanoveny podle Ogbonda *a kol.* [18] ve *Spirulina* sp. Celkový obsah sirtých aminokyselin (5,1 g.16g⁻¹N) ve vyšetřované *Sp. platensis* (SpAP), která byla autotrofně kultivovaná v solárním fotobioreaktoru, byl přibližně dvakrát vyšší ve srovnání s hodnotami publikovanými pro *Sp. platensis* – 1,9 g.16g⁻¹N [19] a pro *Spirulina* sp. – 2,2 g.16g⁻¹N [18]. Na druhou stranu suma Phe a Tyr (5,4 g.16g⁻¹N) v analyzované sinici (SpAP) byla přibližně poloviční než publikovaná hodnota pro *Spirulina* sp. – 11,2 g.16g⁻¹N [18]. Je třeba zdůraznit, že laboratorně kultivovaná *Sp. platensis* (SpAL) při autotrofním režimu obsahovala nejnižší množství aminokyselin ze všech vyšetřovaných vzorků řas, což je souladu s nejnižším zjištěným množstvím dusíkatých látek mezi všemi vyšetřovanými vzorky mikrořas.

Obsahy jednotlivých aminokyselin v autotrofně kultivovaném *Sc. quadricauda* v solárním fotobioreaktoru (ScAP) a v laboratorních podmínkách (ScAL) byly převážně na nižších úrovních než hodnoty obsahů aminokyselin publikovaných podle Becker [4] v *Scenedesmus obliquus*, avšak v analyzovaném *Sc. quadricauda* (ScAL), který byl laboratorně kultivován, byly stanoveny vyšší obsahy Met – 3,9 a Cys – 2,6 v g.16g⁻¹N, dále vyšší koncentrace Lys – 6,1; Met – 4,7; Pro – 5,8; Tyr – 3,3 a Cys – 2,6 v g.16g⁻¹N byly stanoveny v biomase pocházející z autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru ve srovnání s koncentracemi aminokyselin stanovenými v *Sc. obliquus* [4]: Lys – 5,6; Met – 1,5; Pro – 3,9; Tyr – 3,2 a Cys – 0,6 v g.16g⁻¹N. Na rozdíl od publikovaných údajů byla zjištěna vysoká hodnota celkového obsahu sirtých aminokyselin v analyzovaném *Sc. quadricauda*

– 6,7 g.16g⁻¹N, který byl autotrofně kultivován ve fotobioreaktoru, jež přibližně třikrát převyšovala hodnotu tohoto parametru v *Sc. obliquus* – 2,1 g.16g⁻¹N podle Becker [4].

Stanovený obsah Arg – 8,3 g.16g⁻¹N, semiesenciální aminokyseliny pro děti, v autotrofně kultivované *Ch. kessleri* (ChKAP) v solárním fotobioreaktoru byl vyšší přibližně o 20 % ve srovnání s publikovanými obsahy v *Ch. vulgaris* – 6,4 a 6,0 v g.16g⁻¹N [4, 6]. Na druhé straně obsahy Val, Ile, Leu, Lys, Thr, Asp, Glu, Gly, Ala a His ve vyšetřované *Ch. kessleri* (ChKAP) byly nižší než v případě mikrořasy *Ch. vulgaris* [4, 6]. Zastoupení aminokyseliny Ser (3,4 g.16g⁻¹N) v analyzované *Ch. kessleri* pocházející z obou typů kultivací bylo srovnatelné s hodnotou stanovenou v mikrořase *Ch. vulgaris* – 3,3 g.16g⁻¹N [6]. Ve vyšetřované *Ch. kessleri* (ChKAP) byl zjištěn vyšší obsah sirných aminokyselin na úrovni 7,0 g.16g⁻¹N, čímž přibližně dvakrát až třikrát převyšil množství těchto aminokyselin, které byly publikovány pro *Ch. vulgaris* – 3,6 a 1,9 v g.16g⁻¹N [4, 6].

Mikrořasa *Chlorella* sp. (ChHF) pocházející z heterotrofní kultivace ve fermentoru obsahovala nižší množství aminokyselin, mimo Cys, ve srovnání se stanovenými obsahy v *Ch. vulgaris* [4]. Naproti tomu u řasy *Chlorella* sp. (ChAO), která byla kultivována na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním byly zjištěny vyšší obsahy aminokyseliny Arg (6,7 g.16g⁻¹N) a sumy sirných aminokyselin (4,8 g.16g⁻¹N) ve srovnání s publikovanými obsahy v *Ch. vulgaris*, kde byl obsah Arg – 6,4 a 6,0 v g.16g⁻¹N [4, 6] a suma sirných aminokyselin Σ Met+Cys byla 3,6 a 1,9 v g.16g⁻¹N [4, 6].

Obsahy některých aminokyselin Val, Ile, Leu, lys a Thr byly porovnány s hodnotami udávanými WHO [93] pro ideální bílkovinu. Doporučené obsahy Val, Ile, Leu, Lys a Thr podle WHO jsou příslušně 5,0; 4,0; 7,0; 5,5 a 4,0 g.16g⁻¹N. Hodnoty obsahů Leu a Thr byly nad doporučeními WHO v autotrofně kultivované *Chlorella* sp. Autotrofně kultivovaný

Sc. quadricauda a heterotrofně kultivovaná *Chlorella* sp. obsahovaly vyšší množství Lys než je doporučení WHO. Ve zbývajících mikrořasách byly hodnoty obsahů jednotlivých aminokyselin na stejné či nižší úrovni ve srovnání s doporučením WHO. V souvislosti s doporučeným příjmem aminokyselin v potravě zůstává otevřená otázka denní spotřeby řas a produktů z nich vyrobených.

Proteinové profily

Distribuce proteinů ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas byla stanovena na základě jejich molekulové hmotnosti metodou vertikální elektroforézy SDS-PAGE. Proteiny o molekulových hmotnostech určené pomocí této metody nepředstavují proteiny ve vyšetřovaných vzorcích mikrořas, ale pouze jejich subjednotky o určitých molekulových hmotnostech [16]. Disociace proteinů na subjednotky je způsobena přítomností redukčního agens, což je například dodecylsírán sodný (SDS).

Většina proteinů obsažených v mikrořasách jsou původem z fotosyntetického aparátu, kde jsou agregovány do supra-molekulárních struktur. V modro-zelených mikrořasách jsou fykobiliproteiny složkou makromolekulárního proteinového komplexu tzv. LHC (light-harvesting complex), fykobilisom je spojen s membránou tylakoidu v chloroplastu [16].

Proteinový profil *Ch. kessleri* (ChKAP) byl srovnán s proteinovým profilem mikrořasy *Ch. pyrenoidosa*, která byla fotoautotrofně kultivovaná v laboratorních podmínkách podle Leu a Hsu [88]. Byly pozorovány významné rozdíly v jejich proteinových profilech. Mikrořasa *Ch. kessleri* (ChKAP) neobsahovala proteiny o molekulových hmotnostech v oblasti od 30 do 60 kDa, naopak tato oblast byla hojně zastoupena u *Ch. pyrenoidosa*. Avšak je nutno uvést, že zmíněné mikrořasy společně obsahovaly vysoký počet proteinových bendů v oblastech od 10 do 30 kDa a od 80 do 120 kDa.

V proteinovém profilu *Sp. platensis*, která pocházela z otevřené kultivace v systému nádrží, byly podle Chronakis *a kol.* [16] přítomny proteiny o molekulových hmotnostech v intervalu 43 až 67 kDa na rozdíl od analyzované sinice *Sp. platensis* v jejímž proteinovém profilu nebyla přítomnost těchto proteinů potvrzena.

Při srovnání proteinových profilů vyšetřované mikrořasy *Sc. quadricauda* (ScAP) a autotrofně kultivované mikrořasy *Sc. obliquus* v laboratorních podmínkách v Kuhl médiu podle Osman *a kol.* [94] byla pozorována heterogenita převážně v oblasti od 43 do 69 kDa. Na rozdíl od *Sc. obliquus* [94] v analyzovaném *Sc. quadricauda* nebyla potvrzena přítomnost proteinů o těchto molekulových hmotnostech.

Jak již bylo zmíněno, proteinové profily vyšetřovaných mikrořas jsou převážně tvořeny polypeptidy, které pochází z fotosyntetického aparátu. Proteinové bendy z oblasti od 4 do 36 kDa jsou predominantně tvořeny polypeptidy pocházejícími z fotosystému I a II. V této oblasti jsou přítomny polypeptidy z membrány tylakoidu a z makromolekulárního proteinového komplexu tzv. LHC (LHC IIc, LHCPa, LHCPb) dále fytochelatin, polypeptidy z P700-chlorophyll *a*-protein 1 z fotosystému I mohou být vyjádřeny jako bendy o molekulových hmotnostech 8, 10, 15 a 18 kDa, molekulová hmotnost 9 kDa může představovat přítomnost proteinu CP111 – Chlorophyll *a* protein a oblast 22 kDa může indikovat protein CP22 [94-99]. Oblast 31 a 32 kDa může příslušet proteinům D1 a D2, přičemž protein D1 je klíčovou subjednotkou fotosystému II [100]. Apoprotein CP47 (ACP47) pocházející z fotosystému II může být vyjádřen jako bend v oblasti 50 kDa [100]. Proteinové bendy okolo 40 až 70 kDa mohou příslušet enzymu magnesium chelataza (podjednotka I a D), dále bendy oscilující okolo 75 kDa mohou indikovat přítomnost proteinu Toc75, který pochází z vnější membrány chloroplastu [101, 102]. Polypeptidy z fotosyntetického komplexu I (PSI-200) jsou vyjádřeny jako proteinové bendy v oblasti 58 a 62 kDa [103].

Přítomnost bendů v oblastech 100 a 110 kDa mohou příslušet proteinu chlorofyl *a* protein CPIV a proteinu P700-chlorofyl *a* protein 1 z fotosystému I [95, 96].

Z dat uvedených ve studiích [16, 88, 94] a předložených výsledků analýz může být dedukováno, že proteinové profily mikrořas se liší jak v závislosti na druhu mikrořasy, tak mohou být rozdílné i v rámci stejného rodu mikrořas. Rozdílnosti v proteinových profilech mohou být dále způsobeny rozdílnou metodou jejich stanovení, dále také rozdílnou diverzí obsažených proteinů, která může být indukována odlišnou kultivační metodou ovlivňující syntézu fotosyntetických proteinů.

Lipidy a mastné kyseliny

Stanovení lipidů a zastoupení jednotlivých mastných kyselin bylo provedeno dle postupu uvedeného v kapitole 3.3.4, při kterém byly použity dvě rozpouštědlové soustavy: hexan a směs methanol/chloroform/voda (1 : 2 : 1).

Rozpouštědlová soustava tvořená hexanem vykazovala podstatně nižší účinnost při extrakci lipidových složek z řasové biomasy než směs methanol/chloroform/voda, tato situace byla potvrzena i studií [27]. Tudíž výsledky zjištěné při použití hexanu nemají dostatečnou vypovídající hodnotu, jak o obsahu lipidů, tak o zastoupení jednotlivých mastných kyselin v řasové biomase.

Také údaje o obsahu lipidů publikované v odborné literatuře se značně různí. Vyšetřovaná sinice *Sp. platensis* (SpAP) obsahovala ve své biomase přibližně třikrát více lipidů (18,0 %) ve srovnání s hodnotami, které jsou uvedeny u *Spirulina maxima* – 6,0 až 7,0 % [2] a u *Sp. platensis* – 4,0 až 9,0 % [4]. Analyzovaná mikrořasa *Sc. quadricauda* (ScAP) obsahovala o třetinu více lipidů (18,1 %) ve srovnání s mikrořasou *Sc. obliquus* – 12,0 až 14,0 % [2, 4]. Obsahy lipidů ve zkoumaných mikrořasách *Ch. kessleri* (ChKAP) – 18,0 % a *Chlorella* sp. (ChAO) – 16,9 % jsou srovnatelné

s hodnotami zjištěnými v *Ch. pyrenoidosa* [27] a *Ch. vulgaris* [2, 4], avšak mnohem vyšší obsahy lipidů byly zjištěny v *Ch. vulgaris* – 26,7 % podle Widjaja *a kol.* [104] a *Chlorella* sp. – 28,0 až 32,0 % podle Harun *a kol.*[24]. Na druhou stranu mnohem nižší obsahy lipidů byly publikovány v *Ch. vulgaris* – 7,0 % [6] a 13,3 % [54] ve srovnání s obsahy v námi analyzovaných *Ch. kessleri* a *Chlorella* sp.

Bylo pozorováno, že pokultivační ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem pomocí oscilačního kulového mlýna pozitivně ovlivnilo účinnost extrakce lipidických složek z řasové biomasy u vyšetřovaných vzorků mikrořas. Vliv způsobu kultivace na obsah lipidů byl pozorován u mikrořasy *Chlorella* sp., kdy řasa pocházející z heterotrofní kultivace obsahovala nižší množství lipidů (13,9 %) než biomasa kultivovaná autotrofním způsobem (16,9 %). Z uvedených dat lze dedukovat, že heterotrofní způsob kultivace poskytuje řasovou biomasu o nižším obsahu lipidů, toto tvrzení je podpořeno také studií dle Mitra *a kol.* [67], který uvedl, že heterotrofní kultivace poskytuje řasovou biomasu o nižším obsahu lipidů při srovnání s mixotrofní kultivací.

Poměrové zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve vyšetřované sinici *Sp. platensis* (SpAP) bylo ve shodě s daty publikovanými ve studiích [9, 19, 21, 54]. Nejvíce zastoupenou nasycenou mastnou kyselinou byla v analyzované sinici kyselina palmitová (C16:0 – 61,1 %), avšak její zastoupení bylo přibližně o 15 % vyšší než je publikovaný obsah pro *Sp. platensis* v rozmezí 44,3 až 45,6 % [9, 19, 21]. Kyselina olejová (C18:1; cis-9) v množství 5,3 % byla u této sinice nejhojněji zastoupenou monoenoovou mastnou kyselinou, na rozdíl od 1,8 % zjištěného v biomase *Sp. platensis* podle Xue *a kol.* [21]. Ve skupině dienových mastných kyselin měla ve vyšetřované sinici predominantní zastoupení v hodnotě 18,4 % kyselina linolová (C18:2; cis-9,12), jejíž zastoupení bylo ve shodě s hodnotami uvedenými pro *Sp. platensis* [19, 21], na rozdíl od výsledků

podle Colla *a kol.* [9] zjištěných v téže sinici, které byly o 7 % nižší. Zastoupení polyenové mastné kyseliny γ -linolenové (C18:3; cis-6,9,12) bylo ve vyšetřované sinici v poloviční koncentraci oproti publikovaným údajům v rozmezí od 20,3 do 23,5 % [9, 19, 21]. Ve shodě s publikovanými údaji však významné polyenové kyseliny kyselina α -linolenová (C18:3; cis-9,12,15), EPA a DHA nebyly detekovány [9, 19, 21].

V případě profilu mastných kyselin zelené mikrořasy *Sc. quadricauda* bylo zjištěno podobné poměrové zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve srovnání s profilem *Sc. obliquus* [105], i když v procentuálním zastoupení jednotlivých mastných kyselin byly zaznamenány i výrazné rozdíly. V obou profilech byla shodně nejvíce zastoupenou nasycenou mastnou kyselinou kyselina palmitová (C16:0), avšak obsah této mastné kyseliny v analyzovaném *Sc. quadricauda* – 34,9 % třikrát převyšoval její zastoupení v *Sc. obliquus* – 12,5 % [105]. V případě kyseliny olejové (C18:1; cis-9) byl zaznamenán rozdíl v menším rozsahu, kdy její zastoupení bylo u *Sc. obliquus* – 9,4 %, což je přibližně o 3 % méně ve srovnání s vyšetřovaným *Sc. quadricauda* – 12,9 %, dále v analyzované mikrořase bylo stanoveno přibližně šestkrát vyšší zastoupení kyseliny α -linolenové (C18:3; cis-9,12,15). Významné disproporce v procentuálním zastoupení byly pozorovány v analyzovaném *Sc. quadricauda* u kyseliny linolové (C18:2; cis-9,12) a γ -linolenové (C18:3; cis-6,9,12), jejichž obsahy byly 12,5 % a 2,93 % v uvedeném pořadí, kdežto v *Sc. obliquus* [105] byly detekovány v mnohonásobně nižších množstvích v příslušném pořadí 0,12 % a 0,07 %. Polynenasycené mastné kyseliny EPA a DHA nebyly ve vyšetřované biomase *Sc. quadricauda* stanoveny, i když EPA v *Sc. obliquus* byla přítomna ve stopové koncentraci 0,07 % [105]. Významné rozdíly v procentuálním zastoupení jednotlivých mastných kyselin ve srovnávaných profilech mikrořas rodu *Scenedesmus* mohou vyplývat z důvodu rozdílných kmenů.

Procentuální zastoupení mastných kyselin ve vyšetřovaných mikrořasách *Chlorella* sp. (ChAO) a *Ch. kessleri* (ChKAP) jsou převážně ve shodě s obsahy publikovanými pro *Ch. vulgaris* a *Ch. pyrenoidosa* podle Petkov *a kol.* [10], kde je srovnán profil mastných kyselin v biomase řas *Ch. vulgaris* pocházející z autotrofní laboratorní kultivace a z venkovní kultivace, dále v biomase řasy *Ch. pyrenoidosa* pocházející jak z heterotrofní tak z fotoautotrofní kultivace. V biomase *Ch. vulgaris* [10] pocházející z autotrofní laboratorní kultivace byly publikovány vyšší obsahy kyseliny palmitové (C16:0) a kyseliny linolové (C18:2; cis-9,12), avšak nižší obsah kyseliny α -linolenové (C18:3; cis-9,12,15) ve srovnání s venkovně kultivovanou mikrořasou. Obdobný trend v zastoupení těchto mastných kyselin byl pozorován i při srovnání vyšetřovaných mikrořas rodu *Chlorella* pocházejících z autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru (ChKAP) a z autotrofní venkovní kultivace na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním (ChAO). Heterotrofně kultivovaná *Chlorella* sp. (ChHF) ve fermentoru obsahovala ve srovnání s autotrofně kultivovaným vzorkem (ChAO) vyšší zastoupení kyseliny olejové (C18:1; cis-9) a kyseliny linolové (C18:2; cis-9,12), naopak nižší množství kyseliny α -linolenové (C18:3; cis-9,12,15). Vyšetřované mikrořasy rodu *Chlorella* neobsahovaly kyseliny EPA a DHA, tyto mastné kyseliny nebyly také stanoveny v *Ch. pyrenoidosa* a ani v *Ch. vulgaris* podle Petkov *a kol.* [10], avšak vysoké množství DHA (20,9 %) bylo publikováno v *Ch. vulgaris* podle Tokusoglu *a kol.* [54].

Polynenasycené mastné kyseliny (PUFAs) účinně redukuje riziko vzniku kardiovaskulárních chorob, rakoviny, osteoporózy a diabetu [28, 29]. Tato skupina mastných kyselin se dále dělí na ω -3 a ω -6 PUFAs, přičemž důležitý je jejich poměr v přijímané stravě. Optimální poměr mezi ω -3 a ω -6 PUFAs je 1:2 či 1:4, avšak v současnosti se pohybuje na úrovni 1:20-30 [28, 29]. Zvýšením příjmu potravin, které jsou zdroji ω -3 PUFAs a omezením příjmu nasycených mastných kyselin a ω -6 PUFAs se výrazně snižuje riziko

vzniku srdečních onemocnění [29]. Doporučený příjem ω -3 PUFAs je stále diskutován na vědecké úrovni, odhadovaný příjem této skupiny mastných kyselin v Evropě je 0,1 – 0,5 g/den [28]. Z profilu mastných kyselin ve vyšetřovaných zelených sladkovodních mikrořasách plyne skutečnost, že jsou významným zdrojem ω -3 polynenasycené mastné kyseliny α -linolenové (C18:3; cis-9,12,15). Z tohoto důvodu by konzumace biomasy zelených mikrořas a potravinových produktů z ní vyrobených mohla pozitivně přispívat k upravení poměru mezi příjmem ω -3 a ω -6 PUFAs a tudíž by se mohla podílet i na snižování rizika vzniku kardiovaskulárních chorob v lidské populaci.

Heterotrofně kultivovaná *Chlorella* sp. měla nejvyšší zastoupení nasycených a monoenoových mastných kyselin, avšak obsahovala nejméně polynenasycených mastných kyselin. Kyselina palmitová (C16:0) byla stanovena v heterotrofně kultivované mikrořase *Chlorella* sp. v dvojnásobně vyšším množství (33,2 %) než v autotrofně kultivovaném vzorku (14,8 %) při venkovní kultivaci na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním. Nejnižší hodnoty obsahů nasycených mastných kyselin vykazovala autotrofně venkovně kultivovaná *Chlorella* sp. na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním, na druhé straně tato mikrořasa byla hojným zdrojem polynenasycených mastných kyselin.

Zvýšení výtěžnosti mastných kyselin vlivem pokultivačního ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem pomocí oscilačního kulového mlýna bylo pozorováno pouze v případě kyseliny γ -linolenové (C18:3; cis-6,9,12). U *Sp. platensis* a *Ch. kessleri* bylo pozorováno zvýšení výtěžnosti této mastné kyseliny po pokultivačním ošetření v malé míře, kdežto u dalších mikrořas vyvolalo pokultivační ošetření biomasy přibližně pětinasobné zvýšení její výtěžnosti, a to u *Sc. quadricauda* z 2,9 % na 10,5 % a u *Chlorella* sp. z 2,3 % na 10,6 %.

Obsah chlorofylů a karotenoidů

Mikrořasy obsahují převážně fotosyntetické pigmenty chlorofyly, dále pak pomocné fotosyntetické pigmenty (fykobiliproteiny) zvyšující využitelnost energie ze světla a také karotenoidy sloužící jako ochrana před negativním vlivem slunečního záření [25]. Přirozeně jsou pigmenty produkovány pod autotrofními růstovými podmínkami, avšak překvapivě některé pigmenty jsou produkovány i při heterotrofním kultivačním režimu [25].

Obecně se uvádí, že řasy obsahují přibližně 0,5 – 1 % chlorofylů v sušině a 0,1 – 0,2 % karotenoidů v sušině, avšak toto rozmezí není uplatnitelné pro všechny typy mikrořas a je velmi proměnlivé [2]. Analyzovaná *Sp. platensis* obsahovala 7,8 mg.g⁻¹ řasy chlorofylu *a*, což bylo přibližně čtyřikrát více než hodnota stanovená v *Sp. platensis* [19]. Obsahy chlorofylu *a* (5,9 mg.g⁻¹ řasy) a chlorofylu *b* (2,6 mg.g⁻¹ řasy) ve vyšetřovaném *Sc. quadricauda* (ScAP) byly mírně vyšší ve srovnání s hodnotami publikovanými pro *Scenedesmus* sp., který byl kultivován v KEP I médiu [62] a to chlorofyl *a* (3,6 mg.g⁻¹ řasy) a chlorofyl *b* (2,3 mg.g⁻¹ řasy), avšak tato mikrořasa obsahovala přibližně čtyřikrát vyšší obsah celkových karotenoidů (3,3 mg.g⁻¹ řasy) než analyzovaný *Sc. quadricauda* (0,8 mg.g⁻¹ řasy). Vyšetřovaná *Ch. kessleri* obsahovala přibližně čtyřikrát více chlorofylů (23,8 mg.g⁻¹ řasy) ve srovnání s *Ch. vulgaris* – 5,3 mg.g⁻¹ řasy [6], avšak srovnatelné množství celkových karotenoidů (2,5 mg.g⁻¹ řasy). Vliv způsobu kultivace na obsah chlorofylů a karotenoidů byl pozorován v případě řasy *Chlorella* sp, kdy heterotrofně kultivovaná mikrořasa ve fermentoru obsahovala desetkrát méně chlorofylu *a* i *b* a pětkrát méně celkových karotenoidů ve srovnání s řasou pocházející z autotrofní venkovní kultivace na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním.

Pigmentové extrakty po dobu desetidenního skladování ve tmě při 4 °C nepodléhaly znatelné degradaci, což potvrzují data uvedená v tabulce 12, avšak tato situace je v ostrém kontrastu se studií Barnes *a kol.* [52], který

pozoroval výraznou degradaci pigmentových extraktů v 80% acetonu z lišejníků již po šestém dnu skladování při identických podmínkách skladování.

Obsah minerálních látek

Ze stanovených obsahů minerálních prvků ve vyšetřovaných mikrořasách a sinici lze konstatovat, že jejich biomasa je dobrým zdrojem makrobiogenních, oligobiogenních a mikrobiogenních prvků. Zastoupení jednotlivých prvků ve zkoumaných řasách se lišilo v závislosti na druhu mikrořasy a i na způsobu kultivace, ale i přesto byla obecně u vyšetřovaných mikrořas pozorována tendence obsahu jednotlivých prvků s klesající koncentrací v pořadí: K, P, Mg, Ca, Na, Fe, Mn, Zn, Cu, B a Cr. Toxické prvky byly v řasové biomase zastoupeny ve stopových koncentracích, jejich obsahy měly klesající trend v pořadí: Pb, Cd a Hg. Limity obsahů pro toxické prvky v řasových produktech nejsou samostatně řešeny v rámci legislativy České republiky, ale ani v rámci Nařízení komise (ES). Avšak je nutno podotknout, že námi vyšetřované mikrořasy nepřekročily francouzské limity stanovující limitní obsahy těchto toxických prvků v řasách a produktech z nich [106].

Ve všech zkoumaných mikrořasách byly stanoveny vysoké obsahy draslíku, železa a bóru. *Ch. kessleri* pocházející z autotrofní kultivace ve fotobioreaktoru byla ohodnocena jako relativně nejbohatší zdroj minerálních látek. Autotrofně kultivovaná sinice *Sp. platensis* ve fotobioreaktoru byla nejbohatším zdrojem sodíku ($9,4 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), obsahovala jej přibližně v desetkrát vyšší koncentraci ve srovnání s heterotrofně kultivovanou *Chlorella* sp. ($1,1 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy). Nejnižší zastoupení vápníku ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), sodíku ($0,3 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), železa ($248,1 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) a manganu ($51,2 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy) mezi zkoumanými vzorky mikrořas bylo stanoveno v *Sc. quadricauda* pocházející z autotrofní kultivace

ve fotobioreaktoru. Vliv způsobu kultivace na zastoupení jednotlivých minerálních prvků v řasové biomase byl pozorován u *Chlorella* sp., mikrořasa autotrofně venkovně kultivovaná na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním obsahovala přibližně dvakrát více hořčíku ($4,0 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), vápníku ($2,53 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy) a manganu ($148,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy), avšak o polovinu méně mědi ($51,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) ve srovnání s heterotrofně kultivovaným vzorkem mikrořasy. Dvojnásobně nižší obsah hořčíku ($2,48 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy) v případě heterotrofně kultivované *Chlorella* sp. ve srovnání s autotrofně kultivovanou mikrořasou může být způsoben nižším obsahem chlorofylů, který byl v heterotrofně kultivované mikrořase stanoven.

Analyzovaná *Chlorella* sp. obsahovala vyšší obsahy draslíku ($13,4 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), zinku ($114,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) a mědi ($51,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) ve srovnání s hodnotami publikovanými pro *Chlorella* sp. – draslík ($8,4 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), zinek ($20,7 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) a měď ($2,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) [56]. Podobně jako v předešlém případě, obsahy draslíku ($10,1 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), zinku ($166,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) a mědi ($84,4 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) ve vyšetřované *Ch. kessleri* (ChKAP) byly stanoveny ve vyšších koncentracích ve srovnání s mikrořasou *Ch. vulgaris* – draslík ($0,5 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), zinek ($11,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) a měď ($0,6 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) podle Tokusoglu *a kol.* [54], která však obsahovala výrazně vyšší koncentrace sodíku ($13,5 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy) a železa (2591 mg.kg^{-1} řasy) ve srovnání s analyzovanými mikrořasami, kde sodík byl přítomen ve vzorcích *Chlorella* sp. a *Chlorella kessleri* v koncentracích $0,4$ a $1,0 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy a železo v množství $1027,7$ a $1310,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy v uvedeném pořadí. Obsahy fosforu, hořčíku, vápníku, manganu a chromu u vyšetřovaných mikrořas rodu *Chlorella* byly v souladu s hodnotami publikovanými pro *Ch. vulgaris* [54] a pro *Chlorella* sp. [56]. Zjištěné koncentrace prvků draslíku ($14,0 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), fosforu ($8,0 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), železa ($851,9 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy), zinku ($16,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) a mědi ($2,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) ve vyšetřované *Sp. platensis* (SpAP) byly ve shodě s hodnotami stanovenými v sinici *Sp. platensis* [54],

dále analyzovaná sinice obsahovala vyšší množství manganu ($64,8 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy), avšak nižší množství hořčíku ($1,3 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), vápníku ($1,0 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy) a chromu ($0,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) v porovnání s koncentracemi publikovanými pro *Sp. platensis* – mangan ($52,3 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy), hořčík ($3,9 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy), vápník ($7,0 \text{ g.kg}^{-1}$ řasy) a chrom ($1,5 \text{ mg.kg}^{-1}$ řasy) [54].

Stravitelnost

Míra stravitelnosti potravy je důležitou informací z hlediska využitelnosti nutričních složek v ní obsažených. Výživová hodnota proteinu je dána především obsahem a poměrovým zastoupením jednotlivých aminokyselin, avšak pro poskytnutí jeho hlubší charakteristiky je nutno se zabývat také oblastí jeho využitelnosti. Zelené sladkovodní mikrořasy a sinice obsahují ve své biomase vysoký obsah proteinů obsahujících esenciální i neesenciální aminokyseliny, a z tohoto důvodu jsou považovány za jejich vhodný alternativní zdroj. Avšak limitujícím faktorem jejich využití pro lidskou výživu je obsah celulosy v buněčné stěně zelených sladkovodních mikrořas, jelikož lidský zažívací trakt nedokáže tuto složku štěpit a může docházet ke snížení využitelnosti nutričních složek z jejich biomasy. Proto pokultivační metody pro ošetření řasové biomasy, které zajišťují účinné narušení celulotických buněčných stěn mikrořas, hrají důležitou roli pro zvýšení využitelnosti nutričních složek pro lidskou populaci a monogastriční živočichy.

V současné době je vědecký výzkum zaměřen především na identifikaci jednotlivých bioaktivních látek a jejich zdravotní účinek, avšak komplexní zhodnocení jejich využitelnosti pro lidský organismus je opomíjeno. Vzhledem ke zmíněnému složení buněčných stěn řasových organismů byla pozornost zaměřena i na stanovení stravitelnosti, a to jednoduchou enzymaticko-gravimetrickou *in vitro* metodou s využitím inkubátoru Daisy, která by mohla sloužit pro rychlé posouzení využitelnosti řasové biomasy. Dále byl sledován vliv pokultivačního ošetření buněčných stěn zelených

sladkovodních mikrořas na hodnoty jejich stravitelnosti, který doposud nebyl popsán.

Stravitelnost byla zkoumána po 24 hodinové hydrolýze pepsinem, pankreatinem a při kombinované hydrolýze s použitím obou enzymů. Byl sledován vliv mechanického a enzymatického pokultivačního ošetření řasové biomasy na hodnoty stravitelností vyšetřovaných mikrořas. Také bylo realizováno pokultivační ošetření řasové biomasy s komerčně dostupným celulasovým produktem Celluclast 1,5L s cílem nalézt jeho vhodnou koncentraci, která by měla srovnatelný účinek s pokultivačním ošetřením využívající enzym celulasu.

Modro-zelená mikrořasa *Sp. platensis* vykazovala nejvyšší hodnoty stravitelností při všech typech uskutečněných hydrolýz. Jelikož neobsahuje celulosu ve své buněčné stěně, neprokázal se vliv použitých pokultivačních ošetření na zvýšení hodnot stravitelností. Naopak nejméně stravitelnou mikrořasou při všech typech hydrolýz a realizovaných pokultivačních způsobů ošetření biomasy byl *Sc. quadricauda*. U této mikrořasy mělo mechanické pokultivační ošetření řasové biomasy výrazný pozitivní vliv na zvýšení hodnot stravitelností ve srovnání s enzymatickým ošetřením celulasou. Tato skutečnost může být podporována faktem, že buněčná stěna *Sc. quadricauda* je poměrně tlustá a odolná a navíc tato mikrořasa tvoří soubuní nejčastěji v počtu čtyř buněk, čímž dochází ke snížení plochy pro působení celulasu na jeho buněčnou stěnu.

Mikrořasy *Ch. kessleri* a *Chlorella* sp. vykazovaly podobné hodnoty stravitelností při uskutečněných typech hydrolýz. U těchto mikrořas byl pozorován vyšší účinek enzymatického pokultivačního ošetření biomasy na zvýšení hodnot stravitelností, než v případě mechanického způsobu, avšak výraznějšího efektu enzymatického ošetření bylo dosaženo u *Chlorella* sp. Je nutno uvést, že kombinované působení pokultivačního ošetření

mechanickou a enzymatickou cestou na řasovou biomasu vyvolalo nejvyšší efekt zvýšení stravitelnosti u všech vyšetřovaných vzorků mikrořas.

Vliv kultivační metody na hodnoty stravitelnosti byl sledován u mikrořasy *Chlorella* sp., avšak nepodařilo se průkazně určit zda má volba kultivačního způsobu významný vliv na stravitelnost řasové biomasy, z tohoto důvodu je nutno se touto problematikou dále podrobněji zabývat a zkoumat ji u více druhů mikrořas.

Byly srovnány hodnoty stravitelností biomasy zelené sladkovodní mikrořasy *Ch. kessleri* a sinice *Sp. platensis* se stravitelností komerčních řasových produktů Chlorella Tabs (vyrobena z *Ch. pyrenoidosa*) a Spirulina Bio (vyrobena ze *Sp. platensis*) uvedených v práci [55]. Při hydrolýze pepsinem vykazovala biomasa mikrořasy a sinice nižší hodnoty DMD a OMD v rozmezí od 6 do 10 % ve srovnání s příslušným komerčně dostupným produktem, tato situace byla obdobná i při hydrolýze pankreatinem kde biomasa mikrořas vykazovala nižší hodnoty stravitelností v rozmezí od 3 do 8 %. Avšak při kombinované hydrolýze byly stanoveny vyšší hodnoty DMD a OMD u biomasy *Ch. kessleri* přibližně o 4 % oproti produktu Chlorella Tabs [55], dále při tomto typu hydrolýzy byly hodnoty stravitelností mezi biomasou sinice *Sp. platensis* a produktem Spirulina Bio [55] srovnatelné.

Komerčně dostupný celulasový produkt Celluclast 1,5L vykazoval srovnatelný účinek s pokultivačním ošetřením řasové biomasy enzymem celulasou při koncentraci 1,4 ml produktu na 6 g řasové biomasy. Avšak bylo pozorováno, že v případě mechanicky ošetřené biomasy *Sc. quadricauda* neměl produkt v uvedené koncentraci takovou účinnost jako v případě použití enzymu celulasy, tato skutečnost byla dále pozorována u autotrofně venkovně kultivované *Chlorella* sp. na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním při hydrolýze pankreatinem a při kombinované hydrolýze. Stanovení stravitelnosti s využitím preparátu Celluclast 1,5L bylo provedeno s cílem

snížit náklady na stanovení stravitelnosti ve srovnání s využitím čistého enzymu celulasy a také pro případné další využití pokultivačně ošetřené řasové biomasy pro potravinářství či krmivářství.

6. PŘÍNOS PRÁCE PRO VĚDU A PRAXI

Ze získaných výsledků lze konstatovat, že vyšetřované zelené sladkovodní mikrořasy rodu *Chlorella*, *Scenedesmus* a modro-zelená mikrořasa (sinice) *Spirulina platensis* pocházející z kultivací uskutečněných v České republice, jsou dobrým zdrojem proteinů, aminokyselin, lipidů, mastných kyselin, pigmentů (chlorofylu *a* i *b*, karotenoidů) a minerálních prvků.

Disertační práce obohacuje oblast vědy v následujících aspektech:

- Stanovení nutričních profilů zelených sladkovodních mikrořas a sinice pocházejících z kultivací uskutečněných na území ČR, které poskytují ucelený přehled o složení řasové biomasy, dále obohacují stávající informace ve zkoumané oblasti.
- Srovnání obsahů nutričních složek obsažených ve vyšetřovaných mikrořasách v závislosti na způsobu jejich kultivace.
- Navržení a vyzkoušení dvou mechanických způsobů pokultivačního ošetření řasové biomasy s cílem zhodnotit jejich vliv na výtěžnost nutričních složek z biomasy.
- Stanovení *in vitro* stravitelnosti vyšetřovaných řas enzymaticko-gravimetrickou filtrační metodou s využitím inkubátoru Daisy.
- Navržení, vyzkoušení a popsání dvou enzymatických způsobů a jednoho mechanického způsobu pokultivačního ošetření mikrořas, které vedou ke zvýšení jejich stravitelnosti a tudíž i zvýšení využitelnosti obsažených nutričních složek v jejich biomase.
- Modifikování metodiky pro stanovení *in vitro* stravitelnosti, proteinového a lipidového profilu vzhledem k povaze a charakteru vyšetřovaných vzorků mikrořas.

Disertační práce obohacuje oblast praxe o následující skutečnosti:

- Práce poskytuje široký přehled o nutričním složení zelených sladkovodních mikrořas a sinici kultivovaných laboratorně i při komerčním typu kultivace v tuzemsku.
- Srovnání kultivačních metod dává možnost preferovat určitý způsob kultivace, který poskytuje řasovou biomasu o vysokém obsahu požadovaného nutrientu.
- Na základě výsledků z pokultivačních ošetření řasové biomasy se otevírá možnost jejich aplikace do komerčního způsobu produkce řasové biomasy s cílem zvýšit výtěžnost určité složky z biomasy či zvýšit stravitelnost (či využitelnost nutrientů) produktů vyrobených z pokultivačně ošetřené řasové biomasy.
- Navázání spolupráce s Ústavem mikrobiologie, Akademie věd České republiky, Sekce fotoautotrofních mikroorganismů v Třeboni, jehož výzkum je zaměřen na fotosyntetické mikroorganismy, řasy, sinice a fotosyntetické bakterie. Spolupráce bude zaměřena na hledání nových způsobů využití sladkovodních mikrořas pro výrobu potravinářských výrobků a doplňků stravy.

ZÁVĚR

Disertační práce poskytuje informace o nutričním složení zelených sladkovodních mikrořas *Chlorella kessleri*, *Chlorella* sp. a *Scenedesmus quadricauda*, sinice *Spirulina platensis* a o vlivu zvolené kultivační metody vyšetřovaných mikrořas na obsah nutričních složek v jejich biomase. Dále práce popisuje mechanické a enzymatické způsoby pokultivačního ošetření řasové biomasy s cílem zvýšit výtěžnost obsažených nutričních faktorů, či zvýšit stravitelnost řas. Mikrořasy byly kultivovány autotrofně v laboratorních podmínkách, v solárním fotobioreaktoru, při venkovní kultivaci v otevřeném kaskádovém kultivačním systému na tenké vrstvě a heterotrofním způsobem ve fermentoru. Pokultivační ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem bylo provedeno dvěma metodami a to oscilačním kulovým mlýnem a skleněnými mikrokuličkami balotina B7, enzymatické pokultivační ošetření bylo uskutečněno enzymem celulasou a komerčním celulasovým produktem Celluclast 1,5L.

Na základě výsledků z experimentální části lze konstatovat, že vyšetřované mikrořasy jsou dobrými zdroji esenciálních a neesenciálních aminokyselin, proteinů, mastných kyselin, pigmentů a minerálních látek. Obsah nutričních složek v řasové biomase se lišil v závislosti na zvoleném způsobu kultivace mikrořas. Autotrofní kultivace v solárním fotobioreaktoru poskytuje řasovou biomasu s vyšším množstvím celkových aminokyselin, celkových esenciálních a neesenciálních aminokyselin než autotrofní laboratorní kultivace. V případě *Chlorella* sp. bylo zjištěno, že kultivace heterotrofním způsobem poskytuje biomasu se statisticky významně nižším množstvím ($P < 0,05$) aminokyselin, než mikrořasa pocházející z venkovní otevřené kultivace s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě. *Chlorella* sp. autotrofně venkovně kultivovaná na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním

byla nejbohatším zdrojem celkových aminokyselin, esenciálních a neesenciálních aminokyselin, avšak nejvíce sirných aminokyselin bylo obsaženo v autotrofně kultivované *Ch. kessleri* v solárním fotobioreaktoru. Proteinové profily mikrořas společně obsahovaly proteiny o molekulových hmotnostech v rozmezí 14,3 až 27 kDa a 70 až 116 kDa, významná heterogenita mezi profily řas byla pozorována v oblasti mezi 30 až 70 kDa. Mechanické pokultivační ošetření řasové biomasy nemělo vliv na změnu žádného proteinového profilu. Nejvyšší obsah lipidů byl stanoven v *Sc. quadricauda* pocházející z kultivace v solárním fotobioreaktoru, naopak nejnižší množství lipidů obsahovala heterotrofně kultivovaná *Chlorella* sp. Heterotrofní kultivace poskytuje řasovou biomasu s nejvyšším zastoupením nasycených a monoenoových mastných kyselin, avšak s nejnižším obsahem polynenasycených mastných kyselin. Venkovní kultivace na tenké vrstvě s kaskádovým uspořádáním s autotrofním režimem produkuje řasovou biomasu s malým obsahem nasycených mastných kyselin, avšak s vysokým zastoupením polynenasycených mastných kyselin. Pokultivační ošetření řasové biomasy mechanickým způsobem pomocí oscilačního kulového mlýna zvýšilo výtěžnost lipidů z řasové biomasy a dále mělo významný vliv na zvýšení výtěžnosti kyseliny γ -linolenové z biomasy *Sc. quadricauda* a *Chlorella* sp. Vyšetřované mikrořasy byly hojným zdrojem chlorofylu *a* i *b*, celkových karotenoidů a minerálních látek především draslíku, fosforu a železa, přičemž bylo zjištěno, že heterotrofní kultivace poskytuje řasovou biomasu o výrazně nižším množství pigmentů ve srovnání s heterotrofním způsobem kultivace. Nejlépe stravitelnou mikrořasou při všech typech uskutečněných hydrolýz byla *Sp. platensis*, naopak nejhůře stravitelnou mikrořasou byl *Sc. quadricauda*. Mechanický a enzymatický způsob pokultivačního ošetření řasové biomasy zelených sladkovodních mikrořas významným způsobem zvyšuje jejich stravitelnost popřípadě využitelnost nutričních složek obsažených v jejich biomase. Nejvyššího zvýšení hodnot

stravitelnosti bylo dosaženo při kombinovaném působení mechanického a enzymatického způsobu pokultivačního ošetření biomasy zelených sladkovodních mikrořas.

Z uvedených výstupů plyne skutečnost, že nutriční složení mikrořas se mění v závislosti na způsobech jejich kultivace, dále byl pozorován vliv pokultivačních ošetření na zvýšení výtěžnosti nutričních složek z řasové biomasy a byly navrženy metody pokultivačního ošetření, které mohou vést ke zvýšení stravitelnosti mikrořas. Je nutno podotknout, že je nezbytné se danou problematikou nadále zabývat a prohlubovat znalosti jak v oblasti kultivace zelených sladkovodních mikrořas, tak v oblasti pokultivačních metod ošetření řasové biomasy a optimalizovat tyto metody tak, aby poskytovaly řasovou biomasu o vysoké nutriční hodnotě, která bude vysoce stravitelná respektive využitelná pro lidský organismus.

SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

[1] BARSANTI, L., GUALTIERI, P. *Algae: Anatomy, Biochemistry, and Biotechnology*. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group, 2006. 301 s. ISBN 0-8493-1467-4.

[2] SPOLAORE, P., JOANNIS-CASSAN, C., DURAN, E., ISAMBERT, A. Commercial application of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 2006, 101, 87-96. ISSN 1389-1723.

[3] HOLDT, S. L., KRAAN, S. Bioactive compounds in seaweed: functional food applications and legislation. *Journal of Applied Phycology*, 2011, 23, 543-597. ISSN 0921-8971.

[4] BECKER, E. W. Micro-algae as a source of protein. *Biotechnology Advances*, 2007, 25, 207-210. ISSN 0734-9750.

[5] McARDLE, R. N., LASEKAN, J., ENGEL, R., BEHRENS, P. Protein and Amino Acid Content of Selected Microalgae Species. *Lebensmittel-Wissenschaft und Technologie*, 1994, 27, 249-252. ISSN 0023-6438.

[6] MORRIS, H. J., ALMARALES, A., CARRILLO, O., BERMÚDEZ, R. C. Utilisation of *Chlorella vulgaris* cell biomass for the production of enzymatic protein hydrolysates. *Biosource Technology*, 2008, 99, 7723-7729. ISSN 0960-8524.

[7] GOUVEIA, L., BATISTA, A. P., MIRANDA, A., EMPIS, J., RAYMUNDO, A. *Chlorella vulgaris* biomass used as a colouring source in traditional butter cookies. *Innovative Food Science and Emerging Technologies*, 2007, 8, 433-436. ISSN 1466-8564.

[8] ONOFREJOVÁ, L., VAŠÍČKOVÁ, J., KLEJDUS, B., STRATIL, P., MIŠURCOVÁ, L., KRÁČMAR, S., KOPECKÝ, J., VACEK, J. Bioactive phenols in algae: The application of pressurized-liquid and solid-phase extraction techniques. *Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis*, 2010, 51, 464-470. ISSN 0731-7085.

[9] COLLA, L. M., BERTOLIN, T. E., COSTA, J. A. V. Fatty acids profile of *Spirulina platensis* grown under different temperatures and nitrogen concentrations. *Zeitschrift fur Naturforschung C: Journal of Biosciences*, 2004, 59, 55-59. ISSN 0939-5075.

- [10] PETKOV, G., GARCIA, G. Which are fatty acids of the green alga *Chlorella*? *Biochemical Systematics and Ecology*, 2007, 35, 281-285. ISSN 0305-1978.
- [11] VONSHAK, A. *Spirulina platensis (Arthrospira): Physiology, cell-biology and biotechnology*. 1st ed. New York: Taylor & Francis Group, 1997. 233 s. ISBN 0-7484-0674-3.
- [12] DAWCZYNSKI, C., SCHUBERT, R., JAHREIS, G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*, 2007, 103, 3, 891-899. ISSN 0308-8146.
- [13] RATTANAPOLTEE, P., CHULALAKSANANUKUL, W., JAMES, A. E., KAEWKANNETRA, P. Comparison of autotrophic and heterotrophic cultivations of microalgae as a raw material for biodiesel production. *Journal of Biotechnology*, 2008, 136, 412. ISSN 0168-1656.
- [14] MASOJÍDEK, J., PRÁŠIL, O. The development of microalgal biotechnology in the Czech Republic. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, 2010, 37, 1307-1317. ISSN 1476-5535.
- [15] AL-HAMDANI, S., BURNETT, C., DURRANT, G. Effect of low-dose ultrasonic treatment on *Spirulina maxima*. *Aquatic Engineering*, 1998, 19, 17-28. ISSN 1015-1621.
- [16] CHRONAKIS, I. S., GALATANU, A. N., NYLANDER, T., LINDMAN, B. The behavior 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. ISSN 0927-7757.
- [17] ESTRADA, J. E. P., BESCÓS, P. B., VILLAR DEL FRESNO, A. M. Antioxidant activity of different fraction of *Spirulina platensis* protean extract. *II Farmaco*. 2001, 56, 497-500. ISSN 0014-827X.
- [18] OGBONDA, K. H., AMINIGO, R. E., ABU, G. O. Influence of temperature and pH on biomass production and protein biosynthesis in a putative *Spirulina* sp. *Bioresource Technology*, 2007, 98, 2207-2211. ISSN 0960-8524.

- [19] MORIST, A., MONTESINIS, J. L., CUSIDÓ, J. A., GÓDIA, F. Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, 2001, 37, 535-547. ISSN 1359-5113.
- [20] CONVERTI, A., LODI, A., DEL BORGHI, A., SOLISIO, C. Cultivation of *Spirulina platensis* in a combined airlift-tubular reactor system. *Biochemical Engineering Journal*, 2006, 32, 13-18. ISSN 1369-703X.
- [21] XUE, C., HU, Y., SAITO, H., ZHANG, Z., LI, Z., VAI, Y., OU, C., LIN, H., IMBS, A. B. Molecular species composition of glycolipids from *Spirulina platensis*. *Food Chemistry*, 2002, 77, 9-13. ISSN 0308-8146.
- [22] ZHOU, Z. P., LIU, L. N., CHEN, X. L., WANG, J. X., CHEN, M., ZHANG, Y. Z., ZHOU, B. C. Factors that effect antioxidant activity of c-phycoyanins from *Spirulina platensis*. *Journal of Food Biochemistry*, 2005, 29, 313-322. ISSN 0145-8884.
- [23] LOURENCO, S. O., BARBARINO, E., DE-PAULA, J. C., PEREIRA, L. O. D. 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. ISSN 1322-0829.
- [24] HARUN, R., SINGH, M., FORDE, G. M., DANQUAH, M. K. Bioprocess engineering of microalgae to produce a variety of consumer products. *Renewable and Sustainable Energy Reviews*, 2010, 14, 1037-1047. ISSN 1364-0321.
- [25] PEREZ-GARCIA, O., ESCALANTE, F. M. E., DE-BASHAN, L. E., BASHAN, Y. Heterotrophic cultures of microalgae: Metabolism and potential products. *Water Research*, 2011, 1, 11-36. ISSN 0043-1354.
- [26] GUSCHINA, I. A., HARWOOD, J. L. Lipids and lipid metabolism in eukaryotic algae. *Progress in Lipid Research*, 2006, 45, 160-186. ISSN 0163-7827.
- [27] D'OCA, M. G. G., VIEGAS, C. V., LEMOES, J. S., MIYASAKI, E. K., MORÓN-VILLARREYES, J. A., PRIMEL, E. G., ABREU, P. C. Production of FAMES from several microalgal lipidic extracts and direct transesterification of the *Chlorella pyrenoidosa*. *Biomass and Bioenergy*, 2011, 35, 1533-1538. ISSN 0961-9534.

[28] MIŠURCOVÁ, L., AMBROŽOVÁ, J., SAMEK, D. Seaweed lipids as nutraceuticals. *Advances in Food and Nutrition Research*, 2011, 64, 339-355. ISSN 1043-4526.

[29] GROFOVÁ, Z. Mastné kyseliny. *Medicina pro praxi*, 2010, 7, 388-390. ISSN 1214-8687.

[30] CARDOZO, K. H. M., GUARANTINI, T., BARROS, M. P., FALCAO, V. R., TONON, A. P., LOPEZ, N. P., CAMPOS, S., TORRES, M. A., SOUZA, A. O., COLEPICCOLO, P., PINTO, E. Metabolites from algae with economical impact. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology Toxicology and Endocrinology*, 2007, 146, 60-78. ISSN 1367-8280.

[31] ELLEUCH, M., BEDIGIAN, D., ROISEUX, O., BESBES, S., BLECKER, C., ATTIA, H. Dietary fibre and fibre-rich by-products of food processing: Characterisation, technological functionality and commercial applications: A review. *Food Chemistry*, 2011, 124, 411-421. ISSN 0308-8146.

[32] SINHA, A. K., KUMAR, V., MAKKAR, H. P. S., BOECK, G. D., BECKER, K. Non-starch polysaccharides and their role in fish nutrition – A review. *Food Chemistry*, 2011, 127, 1409-1426. ISSN 0308-8146.

[33] TAKEDA, H. Cell wall sugars of some *Scenedesmus* species. *Phytochemistry*, 1996, 42, 673-675. ISSN 0031-9422.

[34] YANG, L., ZHANG, L. M. Chemical structural and chain conformational characterization of some bioactive polysaccharides isolated from natural sources. *Carbohydrate Polymers*, 2009, 76, 349-361. ISSN 0144-8617.

[35] NORTHCOTE, D. H., GOULDING, K. J., HORNE, R. W. The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemistry Journal*, 1958, 70, 391-397. ISSN 1742-4658.

[36] BURCZYK, J., ŚMIETANA, B., TERMIŃSKA-PABIS, K., ZYCH, M., KOWALOWSKI, P. Comparison of nitrogen content amino acid composition and glucosamine content of cell walls of various chlorococcalean algae. *Phytochemistry*, 1999, 51, 491-497. ISSN 0031-9422.

[37] SHI, Y., SHENG, J., YANG, F., HU, Q. Purification and identification of polysaccharide derived from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry*, 2007, 103, 101-105. ISSN 0308-8146.

[38] SUÁREZ, E. R., BUGDEN, S. M., KAI, F. B., KRALOVEC, J. A., NOSEDA, M. D., BARROW, C. J., GRINDLEY, T. B. First isolation and structural determination of cyclic β -(1 \rightarrow 2)-glucans from an alga, *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydrate Research*, 2008, 343, 2623-2633. ISSN 0008-6215.

[39] SUÁREZ, E. R., KRALOWEC, J., GRINDLEY, T. B. Isolation of phosphorylated polysaccharides from algae: the immunostimulatory principle of *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydrate Research*, 2010, 345, 1190-1204. ISSN 0008-6215.

[40] SHENG, J., YU, F., XIN, Z., ZHAO, L., ZHU, X., HU, Q. Preparation, identification and their antitumor activities *in viro* of polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa*. *Food Chemistry*, 2007, 105, 533-539. ISSN 0308-8146.

[41] SUÁREZ, E. R., KRALOWEC, J. A., NOSEDA, M. D., EWART, H. S., BARROW, C. J., LUMSDEN, M. D., GRINDLEY, T. B. Isolation, characterization and structural determination of a unique type of arabinogalactan from an immunostimulatory extract of *Chlorella pyrenoidosa*. *Carbohydrate Research*, 2005, 340, 1489-1498. ISSN 0008-6215.

[42] GAROZZO, D., IMPALLOMENI, G., SPINA, E., STURIALE, L. The structure of the exocellular polysaccharide from the cyanobacterium *Cyanospira capsulata*. *Carbohydrate Research*, 1998, 307, 113-124. ISSN 0008-6215.

[43] PHILIPPIS, R., VINCENZINI, M. Exocellular polysaccharides from cyanobacteria and their possible applications. *FEMS Microbiology Review*, 1998, 22, 151-175. ISSN 1574-6976.

[44] BURCZYK, J., ŚMIETANA, B., TERMIŃSKA-PABIS, K., ZYCH, M., KOWALOWSKI, P. Comparison of nitrogen content amino acid composition and glucosamine content of cell walls of various chlorococcalean algae. *Phytochemistry*, 1999, 51, 491-497. ISSN 0031-9422.

[45] CIFERI, O. *Spirulina*, the edible microorganism. *Microbiology Reviews*, 1983, 47, 551-578. ISSN 1574-6976.

[46] LICHTENTHALER, H. Chlorophylls and Carotenoids: Pigments of Photosynthetic Biomembranes. *Methods in Enzymology*, 1987, 148, 350-382. ISSN 0076-6879.

- [47] NEGISHI, T., RAI, H., HAYATSU, H. Antigenotoxic activity of natural chlorophylls. *Mutation Research*. 1997, 376, 97-100. ISSN 1383-5718.
- [48] CHERNOMORSKY, S., SEGELMAN, A., PORETZ, R.D. Effect of dietary chlorophyll derivatives on mutagenesis and tumor cell growth. *Teratogenesis, Carcinogenesis, and Mutagenesis*. 1999, 19, 313-322. ISSN 1520-6866.
- [49] DERE, S., GUNES, T., SIVACI, R. Spectrophotometric determination of chlorophyll - a, b and total carotenoid contents of some algae species using different solvents. *Turkish Journal of Botany*, 1998, 22, 13-17. ISSN 1300-008X.
- [50] PORRA, R. J., THOMPSON, W. A., KRIEDEMANN, P. E. Determination of accurate extinction coefficients and simultaneous equations for assaying chlorophylls *a* and *b* extracted with four different solvents: verification of the concentration of chlorophyll standards by atomic absorption spectroscopy. *Biochimica et Biophysica Acta BBA bioenergetics*. 1989, 975, 384-394. ISSN 0005-2728.
- [51] WELLBURN, A. R. The spectral determination of chlorophylls *a* and *b*, as well as total carotenoids, using various solvents with spectrophotometers of different resolution. *Journal of Plant Physiology*, 1994, 144, 307-313. ISSN 0176-1617.
- [52] BARNES, J. D., BALAGUER, L., MANRIQUE, E., ELVIRA, S., DAVISON, W. A reappraisal of the use of DMSO for the extraction and determination of chlorophylls *a* and *b* in lichens and higher plant. *Journal Environmental and Experimental Botany*, 1992, 32, 85-100. ISSN 0098-8472.
- [53] RONEN, R., GALUN, M. Pigment extraction from lichens with dimethyl sulfoxide (DMSO) and estimation of chlorophyll degradation. *Journal Environmental and Experimental Botany*, 1984, 24, 239-245. ISSN 0098-8472.
- [54] TOKUSOGLU, O., UNAL, M. K. Biomass nutrient profiles of three microalgae: *Spirulina platensis*, *Chlorella vulgaris*, and *Isochrysis galbana*. *Journal of Food Science*. 2003, 68, 1144-1148. ISSN 0022-1147.

- [55] MIŠURCOVÁ, L. Nové nutriční aspekty a využití mořských a sladkovodních řas ve výživě člověka. *Disertační práce*. Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně, Zlín, 2008. 120 s.
- [56] SOARES, B. M., VIEIRA, A. A., LEMOES, J. S., SANTOS, C. M. M., MESKO, M. F., PRIMEL, E. G., D'OCA, M. G. M., DUARTE, F. A. Investigation of major and trace element distribution in the extraction-transesterification process of fatty acid methyl esters from microalgae *Chlorella* sp. *Bioresource Technology*, 2012, 110, 730-734. ISSN 0960-8524.
- [57] SKŘIVAN, M., SKŘIVANOVÁ, V., DLOUHÁ, G., BRÁNYIKOVÁ, I., ZACHLEDER, V., VÍTOVÁ, M. The use of selenium-enriched alga *Scenedesmus quadricauda* in a chicken diet. *Czech Journal of Animal Science*, 2010, 55, 565-571. ISSN 121-1819.
- [58] TORZILLO, G., PUSHPARAJ, B., MASOJÍDEK, J., VONSHAK, A. Biological constraints in algal biotechnology. *Biotechnology and Bioprocess Engineering*, 2003, 8, 338-348. ISSN 1226-8372.
- [59] ZENG, X., DANQUAH, M. K., ZHANG, S., ZHANG, X., WU, M., CHEN, X. D., NG, I., JING, K., LU, Y. Autotrophic cultivation of *Spirulina platensis* for CO₂ fixation and phycocyanin production. *Biochemical Engineering Journal*, 2012, doi:10.1016/j.cej.2011.12.062.
- [60] MASOJÍDEK, J., TORZILLO, G. "Mass cultivation of freshwater microalgae" in *Encyclopedia of Ecology*. 3rd ed. Academic Press, Oxford, UK, 2008. 2226-2235.
- [61] LV, J. M., CHENG, L. H., XU, X. H., ZHANG, L., CHEN, H. L. Enhanced lipid production of *Chlorella vulgaris* by adjustment of cultivation conditions. *Bioresource Technology*, 2010, 101, 6797-6804. ISSN 0960-8524.
- [62] KIM, M. K., PARK, J. W., PAKR, C. S., KIM, S. J., JEUNE, K. H., CHANG, M. U., ACREMAN, J. Enhanced production of *Scenedesmus* spp. (green microalgae) using a new medium containing fermented swine wastewater. *Bioresource Technology*, 2007, 98, 2220-2228. ISSN 0960-8524.
- [63] OGBONNA, J. C., TANAKA, H. Cyclic autotrophic/heterotrophic cultivation of photosynthetic cells: A method of achieving continuous cell growth under light/dark cycles. *Bioresource Technology*, 1998, 65, 65-72. ISSN 0960-8524.

- [64] BOROWITZKA, M. Commercial production of microalgae: ponds, tanks, tubes and fermenters. *Journal of Biotechnology*, 1999, 70, 313-321. ISSN 0168-1656.
- [65] SHI, X. M., ZHANG, X. W., CHEN, F. Heterotrophic production of biomass and lutein by *Chlorella protothecoides* on various nitrogen sources. *Enzyme and Microbial Technology*, 2000, 27, 312-318. ISSN 0141-0229.
- [66] YANG, C., HUA, Q., SHIMIZU, K. Energetics and carbon metabolism during growth of microalgal cells under photoautotrophic, mixotrophic and cyclic light-autotrophic/dark-heterotrophic conditions. *Biochemical Engineering Journal*, 2000, 6, 87-102. ISSN 1369-703X.
- [67] MITRA, D., LEEUWEN, J. H., LAMSAL, B. Heterotrophic/mixotrophic cultivation of oleaginous *Chlorella vulgaris* on industrial co-products. *Algal Research*, 2012, doi: 10.1016/j.algal.2012.03.002.
- [68] HARKER, M., TSAVALOS, A. J., YOUNG, A. J. Autotrophic growth and carotenoid production of *Haematococcus pluvialis* in a 30 liter air-lift photobioreactor. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 1996, 82, 113-118. ISSN 0922-338X.
- [69] UGWU, C. U., AOYAGI, H., UCHIYAMA, H. Photobioreactors for mass cultivation of algae. *Bioresource Technology*, 2008, 99, 4021-4028. ISSN 0960-8524.
- [70] SCRAGG, A. H., ILLMAN, A. M., CARDEN, A., SHALES, S. W. Growth of microalgae with increased calorific values in a tubular bioreactor. *Biomass Bioenergy*. 2002, 23, 67-73. ISSN 0961-9534.
- [71] MASOJÍDEK, J., SERGEJEVOVÁ, M., ROTTNEROVÁ, K., JIRKA, V., KOREČKO, J., ZAŤAKOVÁ, I., TORZILLO, G., ŠTYS, D. A two-stage solar photobioreactor for cultivation of microalgae based on solar concentrators. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21, 55-63. ISSN 0921-8971.
- [72] DOUCHA, J., LÍVANSKÝ, K. Outdoor open thin-layer microalgal photobioreactor: potential productivity. *Journal of Applied Phycology*, 2009, 21, 111-117. ISSN 0921-8971.
- [73] BOISEN, S., EGGUM, B. O. Critical evaluation of *in vitro* methods for estimating digestibility in simple-stomach animals. *Nutrition Research Reviews*, 1991, 4, 141-162. ISSN 0954-4224.

[74] WOODWARD, Ch. J. H., CARROLL, K. K. Digestibilities of casein and soya-bean protein in relation to their effects on serum cholesterol in rabbits. *British Journal of Nutrition*, 1985, 54, 355-366. ISSN 0007-1145.

[75] MIŠURCOVÁ, L. (2012). Handbook of Marine Macroalgae, In S. K. Kim (Ed.), *Seaweed Digestibility and Methods Used for Digestibility Determination* (s. 285-301). Biotechnology and Applied Phycology, Wiley-Blackwell.

[76] WONG, K. H., CHEUNG, P. C.K.: Nutritional evaluation of some subtropical red and green seaweeds. Part II. In vitro protein digestibility and amino acid profile of protein concentrates. *Food Chemistry*, 2001, 72, 11-17. ISSN 0308-8146.

[77] MIŠURCOVÁ, L., KRÁČMAR, S., KLEJDUS, B., VACEK, J. Nitrogen content, dietary fiber, and digestibility in algal food products. *Czech Journal of Food Sciences*, 2010, 28, 27-35. ISSN 1212-1800.

[78] HENG, L., JUN, N., JIE, H. W., GUIBAI, L. Algae removal by ultrasonic irradiation-coagulation. *Desalination*. 2009, 239, 191-197. ISSN 0011-9164.

[79] JANCZYK, P., FRANKE, H., SOUFFRANT, W. B. Nutritional value of *Chlorella vulgaris*: Effects of ultrasonication and electroporation on digestibility in rats. *Animal Feed Science and Technology*, 2007, 132, 163-169. ISSN 0377-8401.

[80] ZHANG, G., ZHANG, P., LIU, H., WANG, B. Ultrasonic damages on cyanobacterial photosynthesis. *Ultrasonic Sonochemistry*. 2006, 13, 501-505. ISSN 1350-4177.

[81] HAO, H., WU, M., CHEN, Y., TANG, J., WU, Q. Cavitation mechanism in cyanobacterial growth inhibition by ultrasonic irradiation. *Colloids and Surfaces B*, 2004, 33, 151-156. ISSN 1873-4367.

[82] MA, B., CHEN, Y., HAO, H., WU, M., WANG, B., LV, H., ZHANG, G. Influence of ultrasonic field on microcystins produced by bloom-forming algae. *Colloids and Surfaces B*, 2005, 41, 197-201. ISSN 1873-4367.

[83] ZARROUK, C. Contribution à l'étude d'une cyanophycée. Influence de divers facteurs physiques et chimiques sur la croissance et la photosynthèse de *Spirulina maxima*. 1966, Ph.D. Thesis, Université de Paris, Paris.

- [84] ŠETLÍK, I. *Algal Assays*, 1979, 23-40. ISSN 0049-6979.
- [85] STANIER, R. Y., KUNISAWA, R., MANDEL, M., COHEN-BAZIERE, G. Purification and properties of unicellular blue-green algae (order Chroococcales). *Bacteriological Reviews*, 1971, 35, 171-205. ISSN 1092-2172.
- [86] COMMISSION REGULATION (EC) No 152/2009 of January 27, 2009 laying down the methods of sampling and analysis for the official control feed.
- [87] BUŇKA, F., KRÍŽ, O., VELIČKOVÁ, A., BUŇKOVÁ, L., KRÁČMAR, S. Effect of acid hydrolysis time on amino acid determination in casein and processed cheeses with different fat content. *Journal of Food Composition and Analysis*, 2009, 22, 224-32. ISSN 0889-1575.
- [88] LEU, K. L., HSU, B. D. A programmed cell disintegration of *Chlorella* after heat stress. *Plant Science*, 2005, 168, 145-152. ISSN 0168-9452.
- [89] ČSN CEN ISO/TS 17764-1. *Krmiva-stanovení obsahu mastných kyselin: část 1: příprava methylesterů, část 2: metoda plynové chromatografie*. Praha: Český normalizační institut, 2007. 20 s. Třídící znak 467096.
- [90] ČSN CEN ISO/TS 17764-2. *Krmiva-stanovení obsahu mastných kyselin: část 2: metoda plynové chromatografie*. Praha: Český normalizační institut, 2007. 24 s. Třídící znak 467096.
- [91] JAVORSKÝ, P. *Chemické rozbory v zemědělských laboratořích*, I. Díl. 1987, MZV ČSR České Budějovice.
- [92] ZBÍRAL, J., *Analýza rostlinného materiálu, Jednotné pracovní postupy*. 1994, SKZÚZ Brno.
- [93] FAO/WHO. Energy and protein requirement. Report of a Point FAO/WHO *ad hoc* Expert Committee, 1973, 52, Ženeva: FAO.
- [94] OSMAN, M. E. H., EL-NAGGAR, A. H., EL-SHEEKH, M. M., EL-MAZALLY, E. E. Differential effects of Co^{2+} and Ni^{2+} on protein metabolism in *Scenedesmus obliquus* and *Nitzschia perminuta*. *Environmental Toxicology and Pharmacology*, 2004, 16, 169-178. ISSN 1382-6689.

- [95] BRANDT, P., KAISER-JARRZ, K., WIESSNER, W. Chlorophyll-protein complexes. Variability of CPI, and the existence of two distinct forms of LHCP and one low-molecular-weight chlorophylla protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1982, 679, 404-409. ISSN 0006-3002.
- [96] HOJ, P. B., MOLLER, B. L. The 110-kDa reaction center protein of photosystem I, P700-chlorophyll a-protein 1, is an iron-sulfur protein. *Journal of Biological Chemistry*, 1986, 261, 14292-14300. ISSN 0021-9258.
- [97] IKEUCHI, M., INOUE, Y. A New 4.8-kDa Polypeptide Intrinsic to the PS II Reaction Center, as Revealed by Modified SDS-PAGE with Improved Resolution of Low-Molecular-Weight Proteins. *Plant Cell Physiology*, 1988, 29, 1233-1239. ISSN 1471-9053.
- [98] FUNK, C., SCHRODER, W. P., GREEN, B. R., RENGGER, G., ANDERSSON, B. The intrinsic 22 kDa protein is a chlorophyll-binding subunit of photosystem II. *FEBS Letters*, 1994, 342, 261-266. ISSN 0014-5793.
- [99] MORISHIGE, D. T., THORNBER, J. P. Identification of a novel light-harvesting complex II protein (LHC IIc'). *Photosynthesis Research*, 1994, 39, 33-38. ISSN 0166-8595.
- [100] KOMENDA, J., MASOJIDEK, J. Functional and structural changes of the photosystem II complex induced by high irradiance in cyanobacterial cells. *European Journal of Biochemistry*, 1995, 233, 677-682. ISSN 0014-2956.
- [101] INOUE, K., POTTER, D. The chloroplastic protein translocation channel Toc75 and its paralog OEP80 represent two distinct protein families and are targeted to the chloroplastic outer envelope by different mechanisms. *The Plant Journal*, 2004, 39, 354-365. ISSN 1365-313X.
- [102] GAMINI KANNANGARA, C., WETTSTEIN, D.. The Chloroplast, Basic and Applications. In C. A. Rebeiz, C. Benning, H. J. Bohnert, H. Daniell, J. K. Hooper, H. K. Lichtenthaler, A. R. Portis, B. C. Tripathy (Eds.), *Magnesium Chelatase* (s. 79-88). 2010, Springer, The Netherlands.
- [103] MALKIN, R. I. Photosynthetic Unit; The antenna system, and the photosynthetic pigments. *Photosynthesis Research*, 1986, 10, 197-200. ISSN 0166-8595.

[104] WIDJAJA, A., CHIEN, C. C., JU, Y. Study of increasing lipid production from fresh water microalgae *Chlorella vulgaris*. *Journal of the Taiwan Institute of Chemical Engineers*, 2009, 40, 13-20. ISSN 1876-1070.

[105] MAKULLA, A. Fatty Acid Composition of *Scenedesmus obliquus*: Correlation to Dilution Rates. *Limnologova*, 2000, 30, 162-168. ISSN 1439-8621.

[106] MABEAU, S., FLEURENCE, J.: Seaweed in food products: biochemical and nutritional aspects. *Trends in Food Science and Technology*, 1993, 4, 103-107. ISSN 0924-2244.

PŘÍLOHY

Příloha A:

Hodnoty stravitelnosti sušiny DMD a organické hmoty OMD po hydrolýze pepsinem PE, pankreatim PA a kombinované hydrolýze PE + PA v mikrořasách (*Sc-Scenedesmus quadricauda*; *ChK-Chlorella kessleri*; *Ch-Chlorella* sp. a *Sp-Spirulina platensis*) po autotrofní kultivaci v solárním fotobioreaktoru (AP) a venkovní otevřené autotrofní kultivaci s kaskádovým uspořádáním na tenké vrstvě (AO), pokultivačně ošetřená řasová biomasa oscilačním kulovým mlýnem je označena M (%; n = 9, průměr ± směrodatná odchylka).

	PE		PA		PE + PA	
	DMD	OMD	DMD	OMD	DMD	OMD
ScAP	25,92 ± 0,86	33,23 ± 0,77	30,00 ± 0,77	38,39 ± 0,79	37,19 ± 0,10	44,92 ± 0,05
ScAPM	41,82 ± 0,73	47,90 ± 0,79	70,56 ± 0,69	73,74 ± 0,58	75,64 ± 0,34	79,07 ± 0,60
ChKAP	53,16 ± 0,83	59,85 ± 0,64	71,27 ± 0,27	75,72 ± 0,14	80,27 ± 0,77	83,40 ± 0,75
ChKAPM	61,13 ± 1,29	66,57 ± 0,94	75,25 ± 0,78	79,40 ± 0,68	83,79 ± 0,86	86,60 ± 0,74
ChAO	51,75 ± 1,23	57,37 ± 0,99	67,29 ± 0,48	72,69 ± 0,62	89,29 ± 0,59	91,08 ± 0,48
ChAOM	76,91 ± 0,80	79,77 ± 0,76	95,97 ± 1,02	97,41 ± 0,89	96,96 ± 0,79	97,65 ± 0,89
SpAP	80,30 ± 0,66	85,64 ± 0,46	94,03 ± 1,14	96,50 ± 0,67	94,10 ± 0,28	96,07 ± 0,24
SpAPM	79,99 ± 0,40	85,33 ± 0,29	93,72 ± 0,47	95,39 ± 0,36	93,37 ± 0,42	95,26 ± 0,29

SEZNAM PUBLIKACÍ AUTORA

Příspěvky akceptované k publikaci v impaktovaných časopisech

SAMEK, D., MIŠURCOVÁ, L., MACHŮ, L., BUŇKOVÁ, L., MINAŘÍK, A., FIŠERA, M. Whole-Cell Protein Profiles of Disintegrated Freshwater Green Algae and Cyanobacterium. Akceptován v mezinárodním žurnálu *Journal of Aquatic Food Product Technology*, ISSN-1049-8850.

MACHŮ, L., MIŠURCOVÁ, L., **SAMEK, D.**, HRABĚ, J., FIŠERA, M. *In vitro* digestibility of different commercial edible algae products. Akceptován v mezinárodním žurnálu *Journal of Aquatic Food Product Technology*, 2013, DOI: 10.1080/10498850.2012.721873, ISSN-1049-8850.

Příspěvky v recenzovaných zahraničních časopisech

MIŠURCOVÁ, L., AMBROŽOVÁ, L., **SAMEK, D.** Seaweed Lipids as Nutraceuticals, *Advances in Food and Nutrition Research*. 2011, vol. 64, p. 339-355. ISBN: 978-0-12-387669-0.

MIŠURCOVÁ, L., ŠKROVÁNKOVÁ, S., **SAMEK, D.**, AMBROŽOVÁ, J., MACHŮ, L. Health Benefits of Algal Polysaccharides in Human Nutrition, *Advances in Food and Nutrition Research*. 2012, vol. 66, p. 75-145. ISBN: 978-0-12-394597-6.

Příspěvky v recenzním řízení v zahraničních impaktovaných časopisech

SAMEK, D., MIŠURCOVÁ, L., MACHŮ, L., BUŇKA, F., FIŠERA, M. Influencing of Amino Acid Composition of Green Freshwater Algae and Cyanobacterium by Methods of Cultivation, *Turkish Journal of Biochemistry-Turk Biyokimya Dergisi*. Research Article: TJB-42104. ISSN-0250-4685.

MIŠURCOVÁ, L., BUŇKA, F., VÁVRA AMBROŽOVÁ, J., MACHŮ, L., **SAMEK, D.**, KRÁČMAR, S. Amino Acid composition of Algal Products and Its Contribution to RDI, *Food Chemistry*. FOODCHEM-D-13-01531. ISSN-0308-8146.

Příspěvky ve sbornících z konferencí v českém jazyce

SAMEK, D., MIŠURCOVÁ, L., BUŇKA, F., FIŠERA, M. 2011. Aminokyselinový profil vybraných zelených sladkovodních řas a sinice v závislosti na způsobu jejich kultivace a dezintegrace. In *Proteiny 2011*, Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně 3. - 4. 5. 2011, s. 108-112. ISBN: 978-80-7454-022-6.

Příspěvky ve sbornících z konferencí v cizím jazyce

SAMEK, D., MIŠURCOVÁ, L., MACHŮ, L., VÁVRA AMBROŽOVÁ, J., FIŠERA, M. Enzymatical and Mechanical Disruption Method of Algal Cellulotic Cell Walls As a Factor Influencing *in vitro* Digestibility.

In *Bezpečnost' a kontrola potravin*, SPU v Nitre, 21. - 22.3.2013, Potravinárstvo, 2013, 7, 214-217. ISSN 1337-0960.

MIŠURCOVÁ, L., MACHŮ, L., VÁVRA AMBROŽOVÁ, J., **SAMEK, D.**, FIŠERA, M. Algal Polysaccharides and Their Function as dietary fibre. In *Bezpečnost' a kontrola potravin*, SPU v Nitre, 21. - 22.3.2013, Potravinárstvo, 2013, 7, 195-199. ISSN 1337-0960.

STÁŽE

V roce 2009 proběhly odborné stáže na dvou pracovištích, které byly zaměřeny na kultivační techniky řasové biomasy. V průběhu těchto stáží byly nakultivovány vzorky řas a sinice, které byly podrobeny analýzám. První odborná stáž proběhla na Ústavu fyzikální biologie v Nových Hradech, Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích. Další stáž se konala v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Třeboni v Opatovickém mlýně.

CURRICULUM VITAE

OSOBNÍ ÚDAJE

Jméno a příjmení: Ing. Dušan Samek

E-mail: dsamek@ft.utb.cz

VZDĚLÁNÍ

- 2000 – 2004 **Gymnázium Ladislava Jaroše, Holešov**
- 2004 – 2007 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
bakalářské studium; obor Chemie a technologie potravin
- 2007 – 2009 **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
navazující magisterské studium; obor Technologie, hygiena
a ekonomika výroby potravin
- 2009 – doposud **UTB ve Zlíně, Fakulta technologická**
doktorské studium; obor Technologie potravin

PROJEKTY ŘEŠENÉ V RÁMCI INTERNÍ GRANTOVÉ AGENTURY UTB

- 2010 **IGA/14/FT/10/D**
Stravitelnost vybraných potravin rostlinného původu
- 2011 **IGA/22/FT/11/D**
Optimalizace metodiky na stanovení vybraných nutričních faktorů
mořských a sladkovodních řas
- 2012 **IGA/38/FT/12/D**
Optimalizace metodiky na stanovení vybraných biologicky aktivních
látek mořských a sladkovodních řas
- 2013 **IGA/FT/2013/017**
Stanovení vybraných biologicky aktivních látek mořských
a sladkovodních řas

JAZYKOVÉ ZNALOSTI

Anglický jazyk Pokročilá znalost - aktivně

Německý jazyk Středně pokročilá znalost

Latinský jazyk Základní znalost

OSTATNÍ DOVEDNOSTI

Práce s PC OS Windows, MS Office (Word, Excel, PowerPoint)

Řidičský průkaz Skupina B