

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích

Přírodovědecká fakulta



**Zástupci třídy Eustigmatophyceae jako zdroje lipidů a
polynenasycených mastných kyselin**

Bakalářská práce

Daniela Hofmannová

Školitel: Mgr. Martin Lukeš

České Budějovice

2019

Hofmannová, D. 2019: Zástupci třídy Eustigmatophyceae jako zdroje lipidů a polyenasycených mastných kyselin. [Representatives of Eustigmatophyceae class as a source of lipids and polyunsaturated fatty acids. Bc. Thesis in Czech]- 49 p., Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic

Anotation

Eustigmatophyceae algae have shown enormous potential due to the production of lipids and polyunsaturated fatty acids. *Nannochloropsis* belongs to the best known and most frequently used genus. However, researchers are exploring new strains that might have similar potential. Previous studies have shown that some soil strains of the Eustigmatophyceae class are suitable candidates for biotechnological applications as sources of lipids and unsaturated fatty acids. The attached bachelor thesis describes cultivation and analysis of *Eustigmatos* and *Monodopsis* strains with possible biotechnological potential. Observations and comparisons of EPA, other fatty acids, lipids were performed under various abiotic conditions algae were exposed to.

Anotace

U řas třídy Eustigmatophyceae, díky produkci lipidů a polynenasycených mastných kyselin, můžeme nalézt obrovský potenciál. Mezi nejznámější a nejpoužívanější rod se řadí *Nannochloropsis*. Výzkumníci se však zabývají objevováním nových kmenů, které by mohly mít podobný potenciál. V předchozí práci se prokázalo, že některé půdní kmeny třídy Eustigmatophyceae jsou vhodnými kandidáty pro biotechnologické využití jako zdroje lipidů a nenasycených mastných kyselin. V příložené bakalářské práci je popsána kultivace a rozbor kmenů *Eustigmatos* and *Monodopsis* s možným biotechnologickým potenciálem. Probíhalo pozorování a porovnávání obsahu EPA, dalších mastných kyselin, lipidů při různých abiotických podmínkách, kterým byly vystaveny.

Prohlášení

Prohlašuji, že svoji bakalářskou práci jsem vypracovala samostatně pouze s použitím pramenů a literatury uvedených v seznamu citované literatury.

Prohlašuji, že v souladu s §47b zákona č. 111/1998 Sb. v platném znění souhlasím se zveřejněním své bakalářské práce, a to v nezkrácené podobě elektronickou cestou ve veřejně přístupné části databáze STAG provozované Jihočeskou univerzitou v Českých Budějovicích na jejích internetových stránkách, a to se zachováním mého autorského práva k odevzdanému textu této kvalifikační práce. Souhlasím dále s tím, aby toutéž elektronickou cestou byly v souladu s uvedeným ustanovením zákona č. 111/1998 Sb. zveřejněny posudky školitele a oponentů práce i záznam o průběhu a výsledku obhajoby kvalifikační práce. Rovněž souhlasím s porovnáním textu mé kvalifikační práce s databází kvalifikačních prací Theses.cz provozovanou Národním registrem vysokoškolských kvalifikačních prací a systémem na odhalování plagiátů.

V Českých Budějovicích dne:

.....

11.12.2019

Podpis

Poděkování

Ráda bych touto cestou poděkovala svému školiteli Mgr. Martinu Lukešovi na trpělivé, vstřícné a milé jednání v průběhu celého výzkumu. Jsem mu velice vděčná za čas, který mi věnoval a za cenné rady a připomínky k mé práci. Také děkuji všem zaměstnancům MBÚ AVČR v Třeboni za poskytnutí zázemí, ve kterém jsem mohla pracovat na tomto výzkumu. V neposlední řadě děkuji i Ing. Aleně Lukešové, CSc. z Ústavu půdní biologie Biologického centra AV ČR v Českých Budějovicích, za poskytnutí půdních izolátů, bez kterých by tato práce nemohla vzniknout. Děkuji i garantovi celé práce RNDr. Jindřichu Chmelařovi, Ph.D.

Děkuji také mé skvělé kamarádce Báře Pešoutové, která mi velice pomohla jako nápověda na telefonu, co se týče práce s officem. Nadále bych ráda poděkovala mému partnerovi Vítovi Lexovi, za trpělivý a láskyplný přístup k mé neurotické osobnosti v době dokončování této bakalářské práce.

Obsah

1. Úvod.....	8
1.1. Řasy.....	8
1.2. Potenciál řas	9
1.2.1. Řasy v hospodářství, akvakultuře a zemědělství.....	9
1.2.2. Řasy a lékařství	10
1.2.3. Vitamíny a stopové prvky.....	12
1.3. Chemické složení řas	12
1.3.1. Proteiny	12
1.3.2. Sacharidy	13
1.3.3. Lipidy a mastné kyseliny	13
1.4. Podmínky růstu řas	14
1.4.1. Světlo.....	14
1.4.2. Teplota.....	15
1.4.3. Živiny	16
1.5. Třída Eustigmatophyceae a zástupci použítí v této práci	16
Kmeny využité pro tuto práci	19
2. Cíle práce	19
3. Metodika	20
3.1. Osnova pokusu	20
3.2. Kultivace a vzorkování.....	20
3.3. Stanovení počtu buněk	21
3.4. Stanovení fotosyntetické aktivity.....	21
3.5. Stanovení obsahu sušiny.....	22
3.6. Extrakce lipidů	22
3.7. Derivatizace vzorku a stanovení obsahu mastných kyselin pomocí plynové chromatografie	23
4. Výsledky	24
4.1. Výběr kmenů.....	24

4.2. Výsledky kmenů <i>Monodopsis</i> sp., <i>Eusigmatos</i> SVB213 a <i>Eustigmatos</i> SVB34.....	26
4.2.1. Růstová křivka.....	26
4.2.2. Množství lipidů v sušině.....	27
4.2.3. Procentuální zastoupení mastných kyselin.....	28
4.2.4. Relativní nenasycenost (DBI).....	31
4.3. Kmen <i>Eustigmatos</i> sp. SVB34	32
4.3.1. Vliv média při teplotě 20 °C a 25 °C na růst	32
4.3.2. Vliv média při teplotě 20 °C a 25 °C na fotosyntetickou aktivitu	33
4.3.3. Procentuální zastoupení MK u kmenu <i>Eustigmatos</i> sp. SVB34 v čase.....	34
4.3.4. DBI V různých médiích a teplotách.....	40
5. Diskuze	40
6. Závěry	42
7. Seznam použité literatury	44

1. Úvod

1.1. Řasy

Řasy jsou jedinečné organismy ovládající nejvyvinutější proces přeměny energie na Zemi, který se nazývá fotosyntéza. Při fotosyntéze je světlo nejprve přeměněno na chemicky vázanou energii a redukanty. Reduktanty jsou posléze využity pro fixaci anorganického CO₂ a následnou přeměnu na organickou formu uhlíku, která se dále ukládá v biomase. Tato fotosyntetická přeměna uhlíku anorganického na organický je obecně nazývána jako primární produkce. Řasy a další autotrofní organismy mají významnou roli ve tvorbě kyslíku a slouží jako základní kámen v potravním řetězci (Sayre, 2010, Tsai et. al., 2014). Další unikátní schopností těchto organismů je schopnost obývat extrémní biotopy. Můžeme je tak najít v suchých pouštích (Saber et al., 2014), horkých pramenech (Castenholz, 1968;1969), extrémně slaných mořských jezírkách (Ben-Amotz a Avron, 1990), ale i v mrazivém prostředí jako jsou permafrosty arktických oblastí (Holzinger et al., 2018) či ledových vodách, kde teplota může klesat až k -10 °C. I v těchto extrémních podmínkách jsou řasy stále schopné fotosyntézy. Aby byly organismy schopné přežít v takto nepřátelských (nehostinných) podmínkách, musely si vytvořit mechanismy vyrovnávající vnitřní rovnováhu (homeostázi) a tím zmírňovat vliv abiotického stresu na buňku. Mezi mechanismy, udržující stabilitu fotosyntetického systému, patří například úprava fotosyntetické antény, složení pigmentů nebo vznik komplexů inhibující fotosyntézu. Membránová homeostáze je ovlivněna syntézou nových mastných kyselin nebo jejich desaturací či elongací. Takto nově vzniklé či pozměněné mastné kyseliny se následně ukládají do strukturních a zásobních lipidů. Proteinová homeostáze zahrnuje degradaci proteinů poškozených stresem a syntézu nových proteinů zapojených do ochrany buněk před stresem. Homeostáze sacharidů spočívá v biosyntéze či degradaci sacharidů. Mají primárně funkci zásobní a u některých druhů i funkci strukturní zejména při formování buněčné stěny. Zásoby sacharidů jsou nezbytné pro energii ke správnému fungování metabolismu a umožňují buňkám dočasné přežití v temných podmínkách (Geider a La Roche, 2002; Raven a Beardall, 2004). Obecně jsou sacharidy během dne ukládány a během noci zpracovávány k udržení basálního metabolismu (Lancelot a Mathot, 1985; Granum et al., 2002). Fotosyntéza je také výrazně ovlivňována abiotickými faktory, zejména světlem a teplotou. Světlo není jen nezbytným zdrojem energie ale i významným stresovým faktorem (Vass et al., 2007). Pokud organismus absorbuje příliš mnoho světla může dojít k fotooxidativnímu poškození fotosyntetického aparátu, které vede ke snížení fotosyntetické aktivity. Buňky se musí aklimatizovat vzhledem k podmínkám v prostředí, ve kterém se

nachází, z důvodu zachování funkčního metabolismu. Za tímto účelem buňky využívají různé mechanismy pro zachycení, přeměnu a rozptyl energie, kterou následně využívá pro fotoprotekci a opravu foto-oxidativního poškození. Pokud je intenzita světla nízká dochází k omezení aktivity, která vede k poškození metabolismu a zastavení růstu (Niyogi a Truong, 2013). Změnou abiotických stresových faktorů, jako je teplota, světelná intenzita, či složení růstového média lze docílit produkce látek o které máme zájem (bez potřeby genového inženýrství). Tato bakalářská práce se zaměřuje výběr vhodných kandidátů pro biotechnologické využití. U nejúspěšnějšího kandidáta se zaměřuje na vliv dvou z těchto faktorů (2 teploty a tři růstová média s různým podílem dusíku) na růst a obsah polynenasycených mastných kyselin u vybraného kmene třídy Eustigmatophyceae.

1.2. Potenciál řas

Řasy se začaly využívat jako krmivo pro dobytek už ve starověké Číně, do Evropy se tento trend dostal o nějakých 1000 let později. Společně s migrací populace se postupně změnil i pohled na možnosti využití těchto energeticky nenáročných organismů. Díky tomu se začala vyvíjet jejich kultivace a následná komerční produkce. Rychlost růstu a nízké energetické nároky z nich činí ideální surovinu (Barsanti a Gualtieri, 2006; Koudelková, 2011). Prozatím největší ekonomickou hodnotu má samotná biomasa (Gross a Pulz, 2004 ; Koudelková, 2011). Kultivace probíhá v bioreaktorech nebo vodních nádržích s kultivačním médiem. Po patřičné separaci a vysušení se získává prášek, který se ve vysoké míře vyskytuje na trhu se zdravou výživou (Gross a Pulz, 2004; Koudelková, 2011).

1.2.1. Řasy v hospodářství, akvakultuře a zemědělství

Nejdůležitějším faktorem, mající významný vliv na zdraví, produkci a rozmnožovací schopnost hospodářských zvířat, je bezpochyby kvalitní strava. Po letech experimentů, kdy byla zvířata krmena různým množstvím řas s odlišným složením a obsahem proteinů, bylo dokázáno, že i malé množství řasy přidané do krmiva může pozitivně ovlivnit zdravotní stav zvířete. Toto zjištění vedlo k nárůstu vyráběných krmných směsí s přídavkem *Chlorelly*, zvláště pak u krmných směsí pro drůbež. Prášek nejčastěji z hnědých řas se nazývá „macroalgae meal“ (Gross a Pulz, 2004). Významnou roli zastupují řasy i v oblasti akvakultury. Mají pozitivní vliv na různá vývojová stádia veškerých organismů obývajících vodní prostředí. Slouží jako krmivo zooplanktonu, kterým se poté krmí larvy ryb ve velkochovech. Barviva, obsažená v některých řasách, se dají využít v případě šlechtění okrasných ryb, nebo mají pozitivní vliv na barvu svaloviny, která zvyšuje následnou cenu masa (Gross a Pulz, 2004).

Zlepšují kvalitu půdy a dodávají do ní potřebné minerály, zvyšují také vazebnou kapacitu vody (Gross a Pulz, 2004; Koudelková 2011). Dříve již zmiňované „Macroalgae meal“ se používá i jako směs v hnojivech, jelikož obsahuje ideální poměr dusíku a draslíku, méně fosforu než běžně používaná živočišná hnojiva (Barsanti a Gualtieri, 2006; Koudelková, 2011). Produkt obsahující vysoké množství vápníku, který se získává z červených řas se obecně označuje jako „mearl“. Využívá se v zahradnictví a zemědělství převážně za účelem zvýšení obsahu vápníku v půdě, slouží i k neutralizaci kyselé vody při výrobě vody pitné (Barsanti a Gualtieri, 2006; Koudelková, 2011). Současné výzkumy se zaměřují na prokázání biologické ochrany rostlin (Gross a Pulz, 2004; Koudelková, 2011).

1.2.2. Řasy a lékařství

Řasy mají široké využití, díky pestré paletě bioaktivních látek. Minerály, karotenoidy, peptidy i lipidy mají prokázané léčebné účinky proti degenerativním metabolickým onemocněním. Mohou být zdrojem antivirových látek. Široké spektrum výtažků je aktivní v obraně buňky před efekty způsobených virem HIV. Některé vykazují podpůrnou funkci proti nádorovým metastázím (Barsanti a Gualtieri, 2006; Koudelková, 2011; Mohamed et al., 2012). Volné radikály z řas se využívají při léčbě zánětlivých onemocnění (Gross a Pulz 2004; Koudelková 2011).

Terapeutické využití polynenasycených mastných kyselin (PUFA), především kyseliny dokosaheptaenové (DHA), eikosaheptaenové (EPA) a arachidonové (AA) bylo již demonstrováno na existujících klinických studiích. Rybí olej je hlavním komerčním zdrojem dlouhořetězcových ω 3 PUFA. Globální produkce pěstovaných ryb se v posledních dvaceti letech více než zdvojnásobila. Cena rybích výrobků v posledních třech dekadách postupně rostla a do budoucna se by se rostoucí trend cen měnit neměl. Tento fakt nabízí možnost výzkumu alternativních zdrojů (Hossain a Salleh et al., 2008).

PUFA

Bylo prokázáno, že ω 3 mastné kyseliny z rybího oleje, pochází ze zooplanktonu, který se živí řasami. Ty mohou mít vynikající stabilitu lipidů v porovnání s komerčními rybími zásobami, protože jsou přirozeně bohaté na antioxidanty, karotenoidy a vitaminy. ω 3 mastné kyseliny jsou důležité pro lidskou výživu a mají rozsáhlé farmaceutické využití. EPA a DHA jsou důležité pro prevenci aterosklerózy, rakoviny, revmatoidní artritidy, a nemocí vyššího věku, jako je například Alzheimerova choroba. AA a DHA mají speciální význam pro mozek a cévy a jsou považovány za nezbytné v pre- a post-natálním mozkovém vývoji (Hossain a Salleh et

al., 2008). Polynenasycené mastné kyseliny (PUFA) jsou dlouhořetězcové nenasycené kyseliny, které mají pozitivní vliv na lidské zdraví. Snižují hladinu cholesterolu a riziko srdečních onemocnění (Fišerová, 2012). Na základě stability v surovém stavu, běžnému výskytu a minimálnímu riziku chemické kontaminace, jsou řasy možným alternativním zdrojem PUFA. Polynenasycené mastné kyseliny jsou z řas extrahovány hned několika způsoby, které budou dále popsány v praktické části bakalářské práce (Fišerová, 2012).

PUFA v potravě

Polynenasycené mastné kyseliny jsou látky, které nemohou být syntetizované člověkem jako takovým. Tudíž tyto látky musí být přijímány stravou. PUFA se běžně vyskytují v například v rybách, houbách a řasách. Stravovací návyky nynější doby jsou však založeny na nadměrné konzumaci fastfoodových výrobků, které obsahují PUFA jen minimálně. Z tohoto důvodu nutriční terapeuti považují za nezbytné informovat veřejnost o zdravotních benefitech konzumace ryb a zelené zeleniny. Právě tyto potraviny mohou snižovat riziko srdečních chorob díky svému obsahu PUFA (Fišerová, 2009). Problém s konzumací ryb a rybích výrobků spočívá hlavně v jejich ceně, chuti a zápachu, které mnozí lidé nesnesou a proto se těmto potravinám vyhýbají. Řešením by mohl být fakt, že ryby některé PUFA přirozeně nesyntetizují, ale získávají je z řas, které konzumují. Řasy jsou právě hlavním zdrojem PUFA (Fišerová, 2009).

EPA

Kyselina eikosapentaenová neboli EPA má prokazatelně pozitivní účinky na kardiovaskulární systém člověka, zahrnující snižování hladiny triglyceridů a cholesterolu. Jedná se o důležitou polynenasycenou mastnou kyselinu, která se ve velké míře vyskytuje v rybím oleji. Strava bohatá na tuto kyselinu snižuje riziko vzniku kardiovaskulárních onemocnění, předchází ucpávání cév a zabraňuje kyselině arachidové ve změně na prostaglandin-2 (Fišerová, 2012).

DHA

Kyselina dokosaheptaenová je nenahraditelnou složkou pro správný vývoj nervového systému v dětství a v dospělosti je nezbytná pro udržení normální funkce mozku. Začlenění této kyseliny do stravy napomáhá zlepšení paměti. Mozek tuto kyselinu přijímá primárně před všemi ostatními a zpracuje ji nepředstavitelnou rychlostí. Nedostatek této kyseliny je spojován s rozvojem hyperaktivity, cystickou fibrózou, fenylylketonurií, bipolární poruchou, depresí,

zvýšenou agresí. Má pozitivní vliv na hypertenzi, artritidu, aterosklerózu, depresi, infarkt, trombózy a některé typy rakoviny (Richmond, 2004).

AA

Kyselina arachnidonová se běžně vyskytuje v drůbežím mase, zvířecích orgánech a mase, rybách, mořských plodech a vejcích. Ovlivňuje iontové kanály a aktivitu enzymů. Zapojuje se do apoptózy, buněčné smrti (Richmond, 2004).

1.2.3. Vitamíny a stopové prvky

Řasy obsahují značné množství esenciálních vitamínů, které jsou velice kvalitní (Becker, 2004). Zelené řasy obsahují převážně vitamín C, β -karoten, niacin, biotin, cholin, vitamín K, Vitamín B12, vitamín B1 (thiamin), B2 (riboflavin), B6 (pyridoxin), kyselinu listovou, kyselinu panthotenovou, inositol a kyselinu lipoovou (Merchant a Andre, 2001). U Eustigmatophyceae je důležité zmínit i vitamín E (α -tokoferol). Tento vitamín je rozpustný v tucích a umí ho syntetizovat pouze fotosyntetizující organismy. Díky svým antioxidačním účinkům hraje důležitou roli při prevenci kožních onemocnění, způsobených slunečním zářením. Dále pomáhá při prevenci onemocnění očí, srdce a aterosklerózy (Durmaz, 2006).

Stopové prvky se v řasách vyskytují ve stejném množství jako vitamíny. Obsah jednotlivých stopových složek je však proměnlivý v rámci jednotlivých druhů i v něm samotném. Závisí na růstových podmínkách, výživě atp. Obsah těchto prvků lze ovlivnit složením kultivačního média pro daný druh (Merchant a Andre, 2001). Nejdůležitějším atributem u těchto složek je využitelnost, která je však u těchto řas vysoká a z toho důvodu jsou kultivovány za účelem komerčního využití (Becker, 2004).

1.3. Chemické složení řas

1.3.1 Proteiny

Proteiny jsou organické makromolekulární látky navzájem spojené peptidovou vazbou, která pojí dohromady amino skupinu jedné aminokyseliny a karboxylovou skupinu druhé aminokyseliny. Dělíme je na jednoduché a složené. Jednoduché proteiny jsou tvořeny pouze aminokyselinami a člení se na fibrilární proteiny, které jsou ve vodě nerozpustné a plní tak v buňce strukturní funkci (např. kolagen, keratin) a globulární proteiny, které svým charakteristickým kulovitým tvarem balí své hydrofobní vazby dovnitř buňky a umožňují tak její rozpustnost ve vodě (např. albumin). Složené proteiny obsahují navíc i neproteinovou strukturu. Řadí se sem například glykoproteiny (obsahující navíc glykosidicky vázaný sacharid), metaloproteiny (obsahující iont kovu, např. ferritin obsahuje Fe), chromoproteiny

(obsahují pigment, např. hemoglobin), nukleoproteiny obsahují navíc nukleové kyseliny nebo lipoproteiny, které navíc obsahují lipidovou složku (Becker, 1994). Kvalitu proteinu určíme z hlediska obsahu esenciálních aminokyselin (Becker, 1994). Termín esenciální znamená, že se jedná o látky, které si tělo nedokáže samo syntetizovat (Merchant a Andre 2001; Bishop and Zubeck 2012). Různé výzkumy zaměřené na výživové hodnoty řas prokázaly, že obsahují vysoké množství kvalitních proteinů (Becker, 1994). Právě tato skutečnost je důvodem, proč jsou tyto organismy hojně využívány jako doplňky stravy. V souvislosti s vysokým obsahem proteinů je často zmiňovaná *Chlorella*, jejíž obsah proteinů v sušině činí až 60 %.

1.3.2. Sacharidy

Jedná se o základní složku všech živých organismů a tvoří největší podíl organické hmoty na Zemi. Zatímco živočišné tkáně obsahují pouze 2 % sacharidů, rostliny mají podíl sacharidů až 90 % v sušině. Sacharidy jsou důležité zdroje energie a metabolické intermediáty, jsou součástí DNA a RNA. Hrají důležitou roli i v přenosu signálu v rámci jedné buňky i v mezibuněčné komunikaci (Becker, 1994). Z chemického hlediska se dále člení na monosacharidy, oligosacharidy a polysacharidy. Monosacharidy se řadí mezi nejjednodušší cukry obsahující minimálně 3 a maximálně 9 atomů uhlíku. Jedná se o přímý produkt fotosyntézy, slouží jako zásobárna sluneční energie. Oligosacharidy obsahují 2-10 monosacharidových podjednotek navzájem spojených glykosidovou vazbou. Tvoří důležitou součást složitých lipidů a proteinů (např. glykolipidy nebo glykoproteiny), plní tak důležitou stavební či regulační funkci (Becker, 1994). Polysacharid je označení pro velké množství vzájemně navázaných monosacharidových podjednotek. Hlavní roli hrají jako součást buněčných stěn rostlin a některých řas. Škrob a glykogen zase plní zásobní funkci u rostlin a živočichů (Becker, 1994).

1.3.3. Lipidy a mastné kyseliny

1.3.3.1. Lipidy

A v neposlední řadě jsou lipidy, které tvoří nejednotnou skupinu nízkomolekulárních látek a jsou význačné svou hydrofobicitou. Hlavní úlohu hrají jako součást buněčných membrán, ale také se zúčastňují různých biologických procesů. Jedná se o organické látky hydrofobního charakteru, tzn. že jsou nerozpustné ve vodě ale za to jsou dobře mísitelné s nepolárními rozpouštědly. Karboxylová skupina má sice hydrofilní charakter, ten je ovšem narušen esterovou vazbou a tak molekula zůstává i nadále hydrofobní (Tvrzicka et al., 2011). Lipidy mají dvě základní funkce: zásobní a strukturní. Zásobní lipidy (neutrální) se člení na acylglyceroly a vosky. Acylglyceroly jsou složeny výhradně ze zbytku alkoholu glycerolu a

kyseliny. Podle množství esterifikovaných hydroxylových skupin je dále členíme na mono-, di-, tri- glyceroly. Komplexní (strukturní) lipidy obsahují navíc polární skupiny, popřípadě další části molekuly, podle níž se utváří názvosloví. Např. fosfolipidy obsahují zbytek kyseliny fosforečné, glykolipidy zase obsahují zbytek cukru. Fosfolipidy jsou strukturované tak aby jejich hydrofilní konce směřovaly ven z molekuly a činily tak molekulu nerozpustnou (Tvrzicka et al., 2011). Mezi hlavní strukturní rostlinné lipidy patří MGDG, DGDG, SQDG a PG. MGDG (monogalaktosyldiacylglyceroly) a DGDG (digalaktosyldiacylglyceroly) jsou hlavní součástí tylakoidních membrán. Nacházíme je zejména u sinic, řas a vyšších rostlin (Tvrzicka et al., 2011)

1.3.3.1. Mastné kyseliny

Mastné kyseliny jsou jedním z nejvíce využívaných metabolitů řas. V tělech živočichů nemohou být některé mastné kyseliny z důvodu absence určitých enzymů (tzv. desaturáz) produkovány. Jsou označovány jako esenciální, je nutné je tedy přijímat v potravě (Tvrzicka et al., 2011). Lidský organismus nedokáže sám syntetizovat kyselinu linolovou (C18:2n6) a α -linolenovou (C18:3n3), tyto patří mezi esenciální mastné kyseliny. Z toho vyplývá, že i řasy jsou nedílnou součástí potravního řetězce (Tvrzicka et al., 2011). Jedná se o nasycené či nenasycené karboxylové kyseliny. Na jednom konci řetězce se nachází methylová skupina a na druhém je skupina karboxylová. Methylový uhlík na konci se označuje jako omega a směrem blíže ke skupině karboxylové se označují jako ω 1, ω 2, ω 3. Ideální poměr ω 3 a ω 6 mastných kyselin 3:1. ω 6 mastné kyseliny slouží jako prekurzor kyseliny arachnidonové. Vzhledem k tomu, že se mastné kyseliny vytvářejí ze dvou uhlíkových jednotek, je většinou počet atomů uhlíku sudý. Polovinu mastných kyselin u živočichů a rostlin tvoří nenasycené mastné kyseliny, obsahující 1 až 6 dvojných vazeb (Tvrzicka et al., 2011). Tvoří základ fosfolipidových membrán. V lidských a zvířecích tkáních jsou nejvíce zastoupeny mastné kyseliny s 16 až 18 uhlíky, mezi které patří např. kyselina palmitová, stearová, linolová atd. Polynenasycené, zejména ω 3 polynenasycené jsou označovány jako zdraví prospěšné (Tvrzicka et al., 2011).

1.4. Podmínky růstu řas

1.4.1 Světlo

Světlo je jedním z nejdůležitějších abiotických faktorů. Ovlivňuje fotosyntézu, kdy přeměňuje energii slunečního záření na energii chemických vazeb. Dále světlo, společně s dalšími abiotickými faktory, jako jsou teplota, živiny atd., ovlivňuje i homeostázi buněk

(Sayre, 2010; Tsai et al., 2014). Experimenty s intenzitou světla a její následný vliv na obsah a složení lipidů, demonstrovaly, že buňky rostoucí v saturujícím světle, vykazují vysoký obsah lipidů ve srovnání s buňkami rostoucí při osvětlení omezeném. Řasa *Nanochloropsis*, rostoucí v osvětlení sub-saturujícím, syntetizovala galaktolipidy s vysokým obsahem EPA. Za těchto podmínek tvořila EPA téměř polovinu obsahu MK. Vysoká intenzita světla podporuje růstovou aktivitu buněk, nemá však žádný vliv na produkci EPA (Sukeník, 1999). Experimenty s intenzitou světla nejsou relevantní v případech kultivace v nádržích či nádobách s velkou optickou hloubkou, jsou možné pouze u tenkých kultur, u kterých je ředěním udržovaná stabilní hustota (Sukeník, 1999). Pokud vytvoříme stabilně se opakující cyklus střídání světla a tmy, začne se u celé populace vyskytovat trend, kdy se řasy dělí v temné periodě a v té světlé probíhají metabolické procesy (syntéza MK, tvorba pigmentů, ukládání polynenasycených mastných kyselin). U *Nannochloropsis* byla během světelné periody prokázána syntéza triacylglycerolů a vzrůst obsahu EPA. Během temné periody triacylglyceroly u tohoto rodu metabolizují a obsah EPA klesá (Sukeník, 1999).

1.4.2. Teplota

Život na Zemi je spojený s kapalnou vodou. Voda je nezbytná jako medium pro vnější i vnitřní spojení buněk, metabolitů a enzymů. V tekuté formě existuje v teplotním rozpětí 0 až 100 °C. Vzhledem k okolnostem jsou některé mikroorganismy schopné přežít i v prostředí, která jsou pro jiné organismy neobyvatelná. Pokud vezmeme v potaz všechny mikroorganismy, může fotosyntéza obecně probíhat v rozpětí od 0 až po 74 °C. Klasická mikrobiologická klasifikace jednotlivé kmeny člení na termofily, které nejlépe rostou v teplotním rozhraní 55-75 °C, kam patří některé prokaryotní sinice, které mohou růst i při 73-74 °C, zatímco eukaryotní organismy se mezi termofily vůbec nevyskytují (Meeks a Castenholz, 1971). Dále mezofily prospívající při teplotách 25-45 °C a psychrofilní organismy rostoucí nižších teplotách pod 15-18 °C. Mezi psychrofilní patří např. *Chlamydomonas nivalis* (řád Volvocales). Jedná se o zelenou řasu, která je schopna hojného růstu i při teplotách blízkých se nule (Meeks a Castenholz, 1971). Funkce fotosyntézy je závislá na teplotě. Optimální funkce fotosyntézy pod teplotním stresem záleží na správné funkci thylakoidní membrány. To jak se membrána chová v závislosti na změně teploty záleží na její propustnosti. Vyšší teplota propustnost membrány zvyšuje, naopak snížení propustnosti vyvolávají reakce nově vzniklých mastných kyselin s membránovými lipidy nebo s membránu stabilizujícími proteiny (Los et al., 2013). Nízké teploty také vedou ke snížení propustnosti. Nízká propustnost je vyvážena desaturací membránových lipidů (Sakamoto a Murata, 2002).

Funkce fotosyntézy při nízkých teplotách může být pozitivně ovlivněna zvyšujícím se obsahem nenasycených mastných kyselin ve svých membránách (Wada et al., 1994). Stresové podmínky narušují slabé interakce, což má vliv na konformační stabilitu proteinů (Daniel et al. 1996). Indukují i denaturaci a agregaci proteinů, což má vliv na metabolismus a poškození membrány (Fu et al., 2008).

1.4.3. Živiny

Rostliny ke svému životu a správnému růstu potřebují makro a mikrobiogenní prvky, bez nichž dochází k poruchám růstu, zbarvení či úhynu organismu. Mezi základní mikrobiogenní prvky se řadí např. železo, chlor, zinek atp.. Makrobiogenní prvky zastupují dusík, uhlík, voda, draslík, vápník, hořčík, fosfor, síra a vodík (Sukenik, 1999). Uhlík je do těla buňky přijímán ve formě oxidu uhličitého a je základní složkou organické hmoty. Stejnou funkci zastupují i kyslík a vodík. Dusík je přijímán ve formě NO_3^- , NH_4^+ a je důležitou součástí nukleových kyselin, proteinů, hormonů a koenzymů. Vápník je přijímán jako Ca^{2+} a je důležitý pro utváření odolnosti buněčné stěny, zachování permeability a správné funkce membrán a slouží i jako významný regulátor buněčné odpovědi (Sukenik, 1999).

1.5. Třída Eustigmatophyceae a zástupci použití v této práci

V současnosti je třída Eustigmatophyceae tvořená 5 čeleděmi, 12 rody a více než 20 druhy v jediném řádu přičemž všichni známí zástupci jsou jednobuněčné kokální řasy se žlutozelenými plastidy (Eliáš a Neustupa, 2012; Procházková, 2012). Od ostatních zelených kokálních řas se liší přítomností oranžového těla chloroplastů. Naše znalosti eustigmatofytní biodiverzity jsou ovšem neúplné. Neznalost reálné biodiverzity, míry fenotypové plasticity nebo vhodných určujících rysů zdržuje vývoj znalostí o rozšíření a ekologii eustigmatofytních řas (Neustupa a Nemcova, 2001).

Řád třídy Eustigmatophyceae, tzv. *Eustigmatales*, rozlišil Hibberd nejdříve do 4 čeledí a to na základě ultrastrukturních znaků, především přítomnosti či absence zoospor a počtu bičíků. (Fišerová, 2009) Členové čeledi Eustigmataceae a Pseudocharaciopsidaceae byli charakterizováni produkcí zoospor, zatímco *Chlorobotryaceae* a *Monodopsidaceae* naopak absencí zoospor (Andersen and Brett et al., 1998) Dalšími znaky užívanými pro vymezení taxonu jsou například tvar vegetativní buňky, počet chloroplastů ve vegetativních buňkách atd. (Sheath a Wehr, 2003).

Morfologie vegetativních buněk Eustigmatophyceae je velmi jednoduchá - na povrchu mají buněčnou stěnu, tvarem jsou sférické, oválné, eliptické nebo kokální, nepravidelně

tvárovane, vyskytující se buď samostatně, v párech nebo v koloniích. Vegetativní buňky obsahují diktyosomy (golgiho aparát) a ačkoli se Van den Hoek et al. (1995) domnívali, že zoospory jej nemají, ukázalo se, že opak je pravdou. Golgiho aparát je pouze těžko pozorovatelný z důvodu velikosti (3-4 cisterny) (Hoek, Mann et al. 1995). Zástupci této třídy mají obvykle jeden nebo více parietálních plastidů obsahujících chlorofyl typu a, jak už bylo výše zmíněno, postrádajících věncovou lamelu. U zoospor se nikdy nevyskytuje pyrenoid a v přední části buňky mají velkou světločivnou skvrnu, která není spojená s plastidem a je strukturně podobná těm, které můžeme najít u oddělení krásnoočka-*Euglenophyta* (Euglenozoa), ačkoliv se zdá, že fotoreceptivní mechanismy se liší (Sheath a Wehr, 2003). Rozmnožování Eustigmatophyceae probíhá za pomoci autospor (nepohyblivé spory bez tvoření bičíku) nebo nahých (bez stěny) zoospor (bičíkaté, nepohlavní rozmnožovací buňky). Pohlavní rozmnožování nebylo u eustigmatofytních řas pozorováno. (Andersen et al., 1998; Gärtner et al., 2012)

1.5.2.1.1. Zástupci: *Eustigmatos* a *Vischeria*

Mezi nejhojnější zástupce eustigmatofytních řas patří rody *Vischeria* a *Eustigmatos* z čeledi Eustigmataceae. Oba tyto rody se běžně vyskytují v aeroterestrických podmínkách. Při jejich určování, stejně tak jako u ostatních eustigmatofyt, se řídíme následujícími znaky – organizace chloroplastu, přítomnost a typ pyrenoidu a přítomnost lamelárních váčků v cytoplazmě a v okolí pyrenoidu (Andersen et al., 1998; Gärtner et al., 2012). *Eustigmatos* má kulovité buňky s hladkou buněčnou stěnou, obvykle jedním parietálním chloroplastem a extraplastidálním polygonálním pyrenoidem. Rozmnožuje se zoosporami s jedním bičíkem a stigmatem. Rod *Vischeria* je charakteristický převážně svými zoosporami s jedním bičíkem a schopností tvořit polyedrické buňky (Fišerová, 2009).

1.5.2.1.2. Zástupci: *Monodus* a *Nannochloropsis*

Typový druh *Monodus subterraneus*, syn. *Monodopsis*, je dalším zástupcem eustigmatofytních řas. Je charakteristický kulatými, oválnými nebo cylindrickými buňkami s velikostí v průměru mezi 5 až 10 μm. Jedná se o žlutozelenou jednobuněčnou řasu, jejíž zástupci tvoří zoospory a mají jeden terminální pyrenoid uvnitř chloroplastu (Fišerová, 2012).

Monodus subterraneus je v současné době známým druhem díky významné produkci EPA, která může tvořit až 34 % celkového obsahu MK. Je proto právem označován za jednoho z nejslibnějších producentů této PUFA (Liu a Lin, 2005).

Jedná se o řasu, která má bezbičíkaté, sférické až lehce vejcovité buňky, které měří v průměru asi 2-4 μm . V každé buňce je jediný chloroplast, který nemá pyrenoid. Chloroplastové endoplazmatické retikulum je spojené s jaderným obalem. V chloroplastu jsou lamely, každá tvořená třemi tylakoidy, ale, stejně jako u ostatních eustigmatofyt, tu není věncová lamela. Nachází se zde pouze (stejně tak jako u všech eustigmatofyt) chlorofyl typu a a hlavním přídatným pigmentem je violaxanthin. Buňky neprodukují škrob, čili zásobní polysacharid zelených řas. *Nannochloropsis* se po dlouhou dobu pletla se zelenou kokální řasou *Chlorella*. Nejvíce se vyskytuje pravděpodobně ve světových oceánech (Van den Hoek et al., 1995).

Kmeny využité pro tuto práci

Číslo vzorku	Název vzorku	Sbírkové označení
1	<i>Monodopsis</i> sp.	SVA225
2	<i>Monodopsis</i> sp.	
3	<i>Monodopsis</i> sp.	SVA16
4	<i>Eustigmatos</i> sp.	SVB213
5	<i>Eustigmatos</i> sp.	SVB34
6	<i>Eustigmatos</i> sp.	SVB200

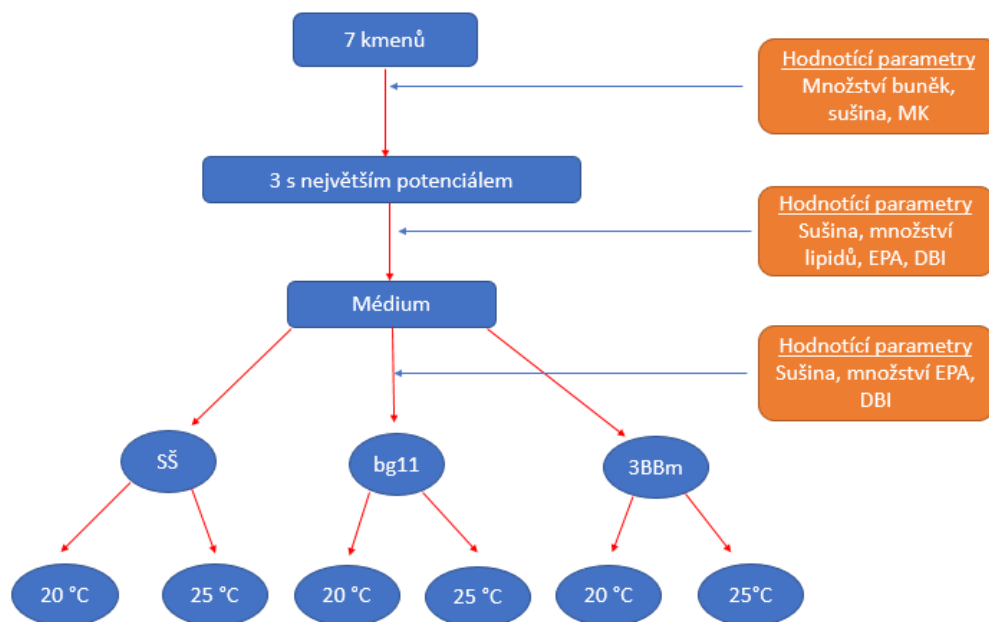
Tab.1. Přehled vzorků a jejich sbírkové označení

Pro tuto práci byly vybrány tři zástupci čeledi Monopsidaceae rodu *Monodopsis* a tři zástupci čeledi Eustigmataceae rodu *Eustigmatos*. Tyto kmeny byly obdrženy ze sbírky půdních řas a sinic doktorky Aleny Lukešové z Ústavu půdní biologie.

2. Cíle práce

1) Vybrat vhodné zástupce podle rychlosti růstu, množství lipidů v biomase a množství polynenasycených mastných kyselin.

2) U nejvhodnějšího kmene stanovit optimální růstové podmínky (kultivační médium, růstovou teplotu).



Obr. č.1: Schéma pokusů a jednotlivých hodnotících parametrů

3. Metodika

3.1. Osnova pokusu

Pro tuto práci bylo vybráno šest kmenů třídy Eustigmatophyceae. 3 zástupci rodu *Monodopsis* a 3 zástupci rodu *Eustigmatos*. V první fázi se rozhodovalo podle množství buněk, množství sušiny v biomase a množství kyseliny eikosapentaenové (obr.č.2) po 14-ti dnech od inokulace. V této fázi práce byly tyto kmeny pěstovány při kontinuálním osvětlení $80 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$, teplotě $20 \pm 1 \text{ }^\circ\text{C}$, homogenita vzorku byla zaručována rovnoměrným třepáním na orbitální třepače (Elmi, Unimed Praha). Jako živné médium bylo použito minerální Bold-Bazal medium (BBM) (Bischoff a Bold, 1963). Z těchto 6-ti kmenů poté byly vybrány tři s nejvyšší obsahem sušiny a množství EPA.).Z těchto 6-ti kmenů poté byly vybrány tři s nejvyšším počtem buněk, obsahem sušiny a množství EPA .Na třech nejlepších kmenech pokračovaly další pokusy (obr.č.1).

3.2. Kultivace a vzorkování

V druhé fázi pokusů (obr.č.1), podrobném studiu na třech vybraných kmenech se kultury pěstovaly stejným způsobem jako v první fázi. S rozdílem ve vzorkování. Vzorky byly odebírány v den inokulace (den 0), 3, 6, 10,14 a 21. Řasy byly kultivovány ve třech opakováních. U těchto vzorků byla stanovena sušina, množství lipidů v biomase a relativní zastoupení jednotlivých mastných kyselin (podrobně popsáno dále v kapitole 2.4-2.6).

Ve třetí fázi této práce se již pracovalo pouze s jediným kmenem (obr.č.1). Ke kultivaci byly použity 3 média. BBM (Bold's Basal Medium) je medium pro sladkovodní řasy, které se běžně používá k pěstování kultur bez potřeby půdních extraktů či vitamínů (Bishop a Zubeck ,2012). "Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements." Nutritional and Food.), v tomto případě byla použita modifikace s trojnásobným množstvím dusíku (3NBBM). Jako druhé médium bylo použito ½ SŠ. Jedná se o produkční médium vytvořené na ústavu MBU AV ČR v Třeboni v 60. letech minulého století. Bylo vyvinuto cíleně pro velkoobjemové kultivace pro biotechnologické účely (Bishop a Zubeck ,2012). Třetím médiem bylo Bg 11, které je vhodné pro pěstování sinic. Důvodem použití těchto tří médií bylo srovnání růstového potenciálu a obsahu lipidů a mastných kyselin v závislosti na množství dusíku v daném médiu. Obsah dusíku ve formě dusičnanu sodného těchto medií je pro 3NBBMV 0,75 g/l, pro SŠ je 1,5 g/l a u BG11 je množství dusičnanu 2,02 g/l. Vzorky byly kultivovány ve třech opakováních při teplotách 20 a 25 °C. U všech těchto pokusů byly vzorky odebrány ve dnech 0, 3, 6, 10,14 a 21. Tyto vzorky byly použity pro stanovení počtu buněk, stanovení sušiny, stanovení obsahu lipidů a mastných kyselin, zároveň byla na živých vzorcích stanovena fotosyntetická aktivita (maximální kvantový výtěžek fotochemie fotosystému II).

3.3. Stanovení počtu buněk

1 ml vzorku byl promíchán, aby se zabránilo vzniku shluků, které se u těchto kultur často vytvářejí. Poté bylo pomocí mikropipety odebráno 50 µl vzorku, ke kterému bylo přidáno 10 ml elektrolytu. Takto upravený vzorek byl umístěn do počítadla buněk (Coulter counter, Beckman). Tento přístroj umožňuje určit rychle a přesně počet buněk v roztoku. Aby se zabránilo zkreslení výsledků, vlivem kontaminace rozbitých buněk, počet buněk byl stanoven v rozmezí 1 – 12 µm.

3.4. Stanovení fotosyntetické aktivity

Fyziologická aktivita vzorků byla určena pomocí přístroje AquaPen AP100. Tento ruční přístroj je fluorometrem pro měření fotosyntetické aktivity v suspenzi. V tomto testu byl důležitým nástrojem pro zhodnocení efektivity fotosystému II, pomocí naměřených hodnot kvantového výtěžku. Fotosystém II je u vzorků adaptovaných na tmou roven hodnotě Fv/Fm (Bishop a Zubeck ,2012). Poměr byl odvozen od podílu (Fm-F0)/Fm). F0 označuje minimální fluorescenci, která je měřena slabými světelnými impulsy. Fmax označuje maximální fluorescenci, kterou vyvolá silný záblesk. Fluorescenční poměr variabilní ku maximální fluorescenci (FV/FM) je obecným indikátorem snížení funkce nebo poškození reakčních

center (RC) fotosystému II. Do kyvet byly odebrány 2ml vzorku, které byly následně umístěny do temna po dobu 15 minut, aby se adaptovaly na tmu. Poté byly změřeny.

3.5. Stanovení obsahu sušiny

Vzorky byly zakoncentrovány centrifugací při 5000 g po 10 min. Promyty destilovanou vodou a převedeny do předvážených vialek. Poté byly zamrazeny, vysušeny lyofilizací (sušení při sníženém tlaku) a po vysušení byly zváženy za účelem stanovení sušiny.

3.6. Extrakce lipidů

Z celkového množství sušiny bylo do mikrozkušavky odebráno 10 mg vzorku, ke kterému byly přidány kuličky o velikosti 100-200 μm a 1 ml destilované vody. Buňky byly rozbity pomocí homogenizátoru (Mini-Beater, Biospec products). Buňky byly rozbíjeny v 10 cyklech po 30 sekundách, v mezičase byly chlazeny ledem, aby nedošlo ke znehodnocení vzorků. Suspenze byla přenesena do zkumavek, do kterých bylo následně mikropipetou přidáno 2 ml metanolu a 1 ml dichlormetanu (finální poměr metanol:dichlormetan:voda 2:1:1 v/v). Zkušavky byly následně umístěny do ultrazvukové vany (Kraintek6, Kraintek) po dobu 15 minut. Opět bylo napipetováno 1ml destilované vody a 1 ml dichlormetanu (finální poměr metanol:dichlormetan:voda 1:1:1 v/v). Následovalo třepání vortexem a stočení centrifugou nastavenou na 600 g po dobu 10 minut. Po centrifugaci byly vzorky rozdělené na jednotlivé fáze podle hustoty. Suspenze byla přenesena do zkumavek, do kterých bylo následně mikropipetou přidáno 2 ml Met-OH a 1 ml dichlormetanu (finální poměr methanol:dichlormetan:voda 2:1:1 v/v). Zkušavky byly následně umístěny do ultrazvukové vany (Kraintek6, Kraintek) po dobu 15 minut. Opět bylo napipetováno 1ml destilované vody a 1 ml dichlormetanu (finální poměr methanol:dichlormetan:voda 1:1:1 v/v). Následovalo třepání vortexem a stočení centrifugou nastavenou na 600 g po dobu 10 minut. Po centrifugaci byly vzorky rozdělené na jednotlivé fáze podle hustoty. V tomto kroku přípravy vzorků byla odebírána spodní fáze obsahující lipidy. Po odebrání dichlormetanové fáze byl do zkumavek přidán dichlormetan 2 ml, vzorky byly znovu vortexovány a stočeny, poté byla znovu odebrána spodní vrstva a toto promytí se ještě jednou opakovalo. Dichlormetanové fáze byly pipetovány do nové zkumavky. Poté byly extrakty vysušeny proudem dusíku. Zkušavky se znovu zvážily, kvůli určení zastoupení lipidů. Lipidový extrakt byl vypláchnut směsí dichlormetanu a methanolu v poměru 2:1 (v/v), odpipetován do vialky a zamražen na $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ až do dalšího kroku.

3.7. Derivatizace vzorku a stanovení obsahu mastných kyselin pomocí plynové chromatografie

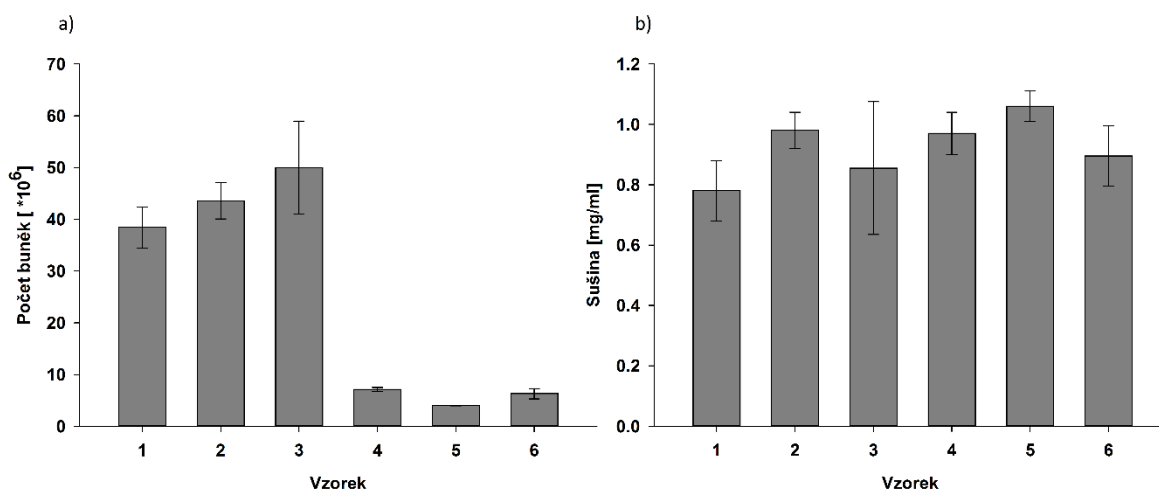
Ke 500 ug extraktu bylo přidáno 15 µg interního standardu (C17:0). Byl přidán 1 ml Boron trifluoridu v metanolu a 0,5 ml hexanu. Zkumavky byly vyfoukány dusíkem (odstranění kyslíku) a důkladně se uzavřely, aby se předešlo ztrátám. Poté se umístily na jednu hodinu do termobloku nastaveném na 85 °C. Poté se přenesly na led, kde se zchladily až poté byl přidán další 1ml hexanu. Takto připravená suspenze se protřepala na vortexu a zkumavky se následně umístily do centrifugy a stočily se na 600g po dobu 10 minut. Po stočení vzorků se pipetou odebírala horní hexanová fáze s rozpuštěnými methyl-estery mastných kyselin. Postup stáčení a odebírání horní fáze probíhal opět ve dvou následných opakováních. Vzorky se vysušily proudem dusíku a methylestery mastných kyselin byly převedeny do vialek. Vzorky se uchovávaly při -20 °C až do výsledné analýzy. V této práci byl použit plynový chromatograf s plamenově-ionizační detekcí (Trace 1300, Thermo), nosným plynem bylo Helium o rychlosti průtoku 2 mL/min. Teplotní gradient vypadal následovně: po nástřiku se kolona vyhřátá na 140 °C postupně zahřívá na 240 °C rychlostí 4 °C/min, po dosažení maximální teploty zůstane 5 min při této teplotě a poté dojde k ochlazení zpět na 140 °C před nástřikem dalšího vzorku. Množství mastných kyselin jsem stanovila pomocí známého množství interního standardu ve vzorku. Index dvojných vazeb DBI (relativní nenasycenost mastných kyselin) byl vypočítán podle vzorce $DBI = \sum (\% \text{ mastné kyseliny} * \text{počet dvojných vazeb})/100$ (Fišerová, 2009). Relativní nenasycenost určuje poměr mezi nasycenými a nenasycenými mastnými kyselinami. Pokud je zastoupení nasycených a nenasycených mastných kyselin stejný, pak je DBI rovno 1.

Všechny pokusy byly provedeny ve třech opakováních, výsledky jsou prezentovány jako průměr ± směrodatná odchylka.

4. Výsledky

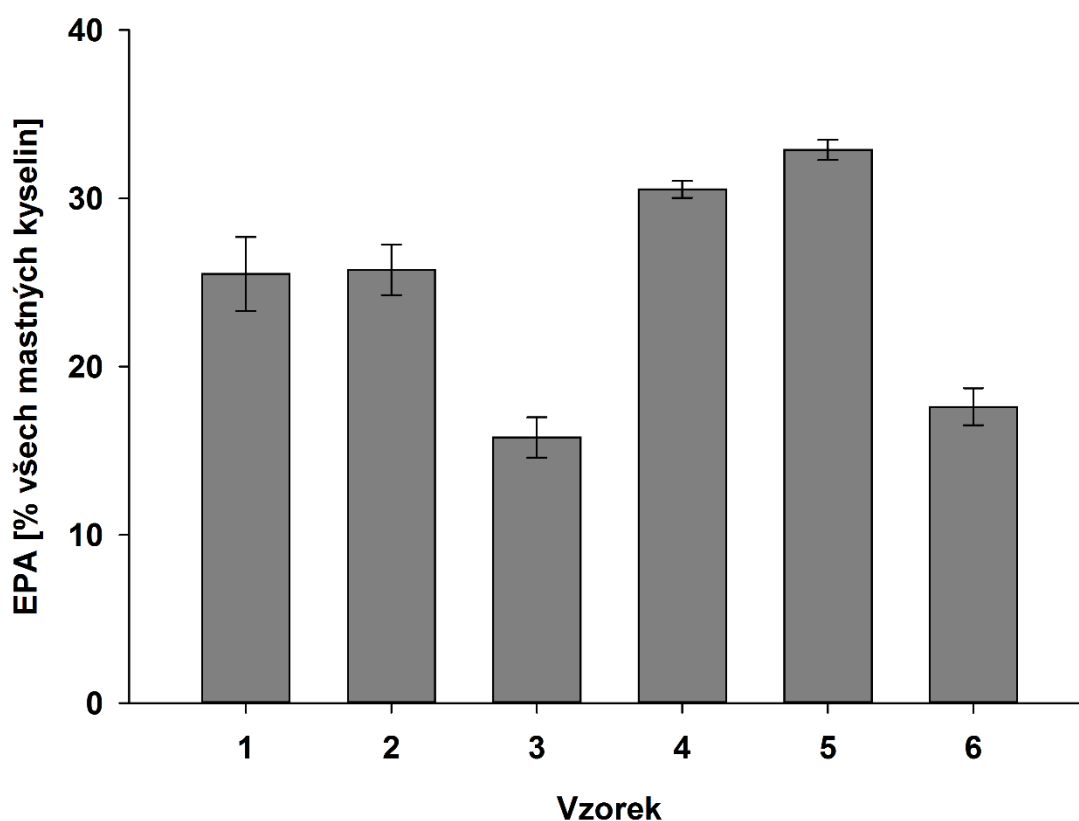
4.1. Výběr kmenů

Na počátku pokusu bylo k dispozici 6 kmenů (tab.č.1), z nichž byly nejprve podle nejvyššího počtu buněk (obr.č.2a), posléze podle nejvyššího množství sušiny (obr.č.2b) a podle nejvyššího množství kyseliny Eikosapentaenové (obr.č.3) vybrány 3 nejúspěšnější kmeny.



Obr.č.2: a) Počet buněk, b) množství sušiny testovaných 6 kmenů

Kmeny rodu *Monodopsis* vykazovaly vysoké počty buněk. Nejvyšší počet buněk byl u kmene č. 3 přibližně 50 milionů buněk na ml. (obr.č.2) Kmeny rodu *Eustigmatos* (4 -6) dosahovaly počtu buněk v rozmezí 4-7 milionů buněk na ml. (obr.č.2). Výsledky obsahu sušiny ukazovaly nejvyšší množství u kmenů rodu *Eustigmatos* 2, 4 a 5. Hodnoty sušiny byly okolo 1 mg/ml. Buňky rodu *Monodopsis* jsou mnohonásobně menší, než u *Eustigmatos*, tedy i s větším množstvím buněk dosahují menšího, či podobného výtěžku sušiny jako u rodu *Eustigmatos*, který nedosahoval tak vysokých počtů buněk.



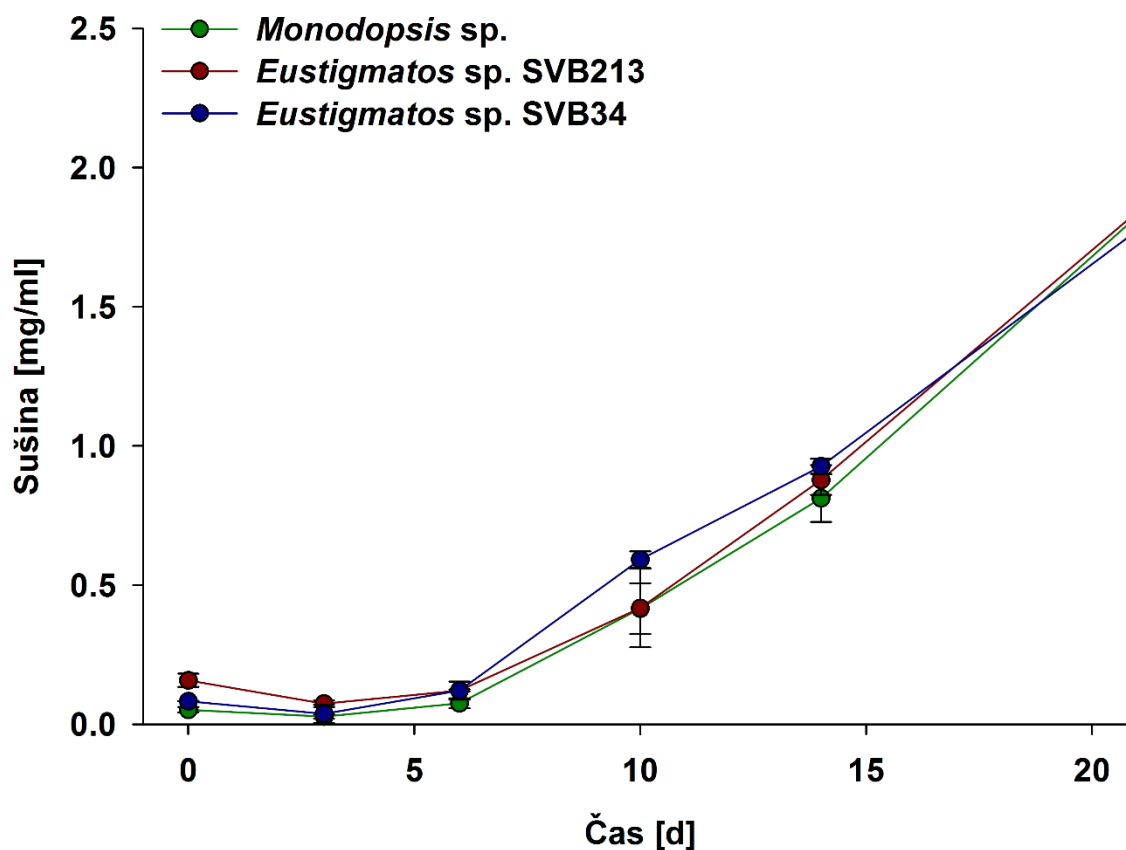
Obr. č. 3: Procentuální zastoupení EPA v testovaných kmenech

Analýza mastných kyselin ukázala, že nejvyšší množství EPA bylo ve vzorcích 4 a 5 s hodnotami 30 a 32 % (všech mastných kyselin) (obr.č.3). Dva kmény rodu *Monodopsis* 1 a 2 dosahovaly o něco nižších hodnot okolo 25 %. Zbylé dva kmény 3 a 6 dosahovaly jen 15-17 % EPA.

Na základě těchto výsledků, byly pro další zkoumání zvoleny kmény číslo 2, 4 a 5. Jednalo se o kmény *Monodopsis* sp., *Eusigmatos* SVB213 a *Eustigmatos* SVB34 (tab.č.1). Tyto kmény měly nejvyšší výtěžek sušiny a zároveň množství EPA.

4.2. Výsledky kmenů *Monodopsis* sp., *Eusigmatos* SVB213 a *Eusigmatos* SVB34

4.2.1. Růstová křivka



Obr.č.4: Růstové křivky studovaných kmenů

Na obr.č.4 jsou prezentovány růstové křivky 3 studovaných kmenů, které prošli prvotním výběrem. Všechny 3 měly podobný průběh růstu v čase. Obsah sušiny ve dne inokulace byl přibližně 0,1 mg/ml. Lag fáze probíhala ode dne 0 až do dne 6 v těchto dnech se obsah sušiny neměnil. Od 6. k 21. dni probíhal exponenciální růst a obsah sušiny tak vzrostl až na hodnotu $1,82 \pm 0,13$ mg/ml u *Monodopsis* sp., $1,84 \pm 0,06$ mg/ml u *Eusigmatos* sp. SVB213 a $1,77 \pm 0,05$ mg/ml u *Eusigmatos* sp. SVB34. Obsah sušiny se tedy zvýšil 35x u *Monodopsis* sp., 11,7x u *Eusigmatos* sp. SVB213 a 22x u *Eusigmatos* sp. SVB34.

4.2.2. Množství lipidů v sušině

Čas odběru [d]	Množství lipidů v sušině [%]		
	<i>Monodopsis</i> sp.	<i>Eustigmatos</i> sp. SVB213	<i>Eustigmatos</i> sp. SVB34
0	25,67 (12,51)	30,41 (9,94)	25,64 (2,56)
3	24,42 (16,93)	24,43 (5,74)	18,21 (2,06)
6	23,05 (5,21)	18,24 (4,49)	16,11 (2)
10	12,09 (2,12)	14,11 (1)	16,32 (4,48)
14	23,82 (9,32)	15,02 (3,61)	12,9 (2,82)
21	21,14 (11,48)	17,38 (5,89)	16,56 (1,07)

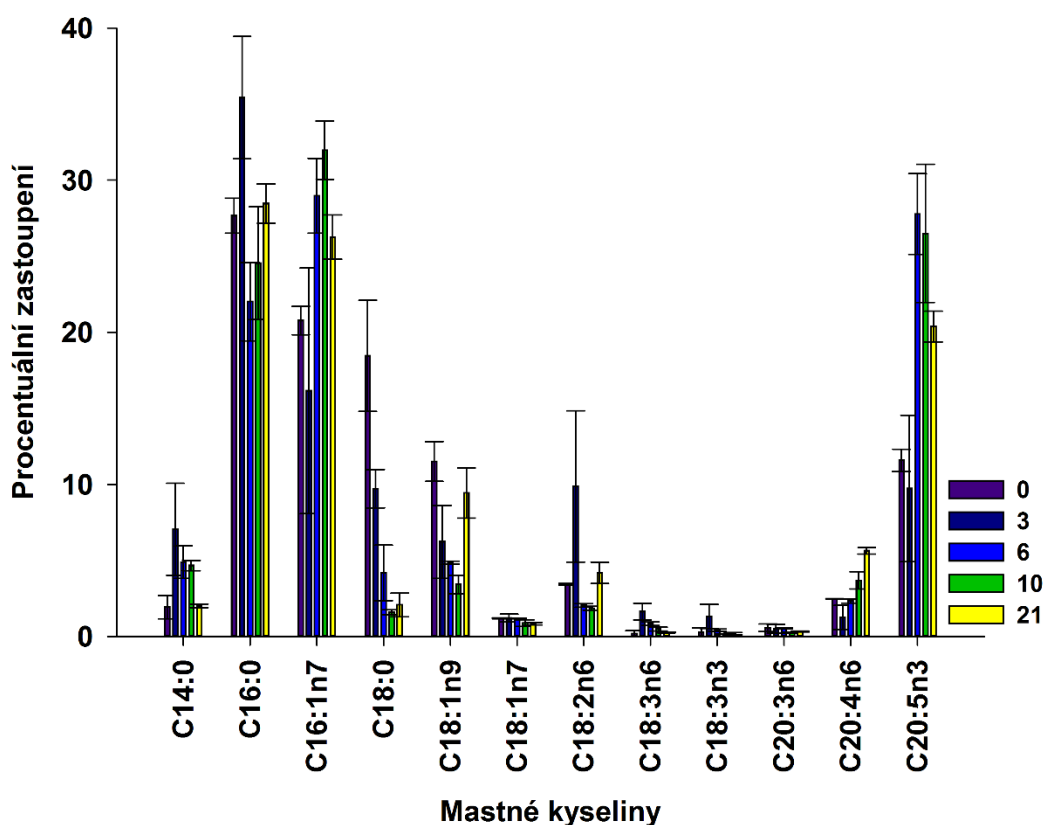
Tab.č. 2: Množství lipidů v sušině

Kmen *Monodopsis* sp. V průběhu prvních 6 dní svůj obsah lipidů výrazně neměnil a jejich hodnota se pohybovala kolem 23-25 % (tab.č. 2). Prudký propad nastal desátý den, kdy hodnota klesla až na 12 %, následoval opět nárůst na cca 24 % (den 14) a poté mírný pokles na 21 % (den 21). Množství lipidů u kmene *Eustigmatos* sp. SVB213 klesalo ode dne 0 ze 30 % až do dne 10 na 14 %. Následoval mírný nárůst hodnot až do dne 21, kdy množství lipidů činilo 17 %. Kmen *Eustigmatos* sp. SVB34 vykazoval klesající trend z 25 % (den 0) až na cca 13 % (den 14). Ke dni 21 došlo k nárůstu obsahu lipidů na cca 16,5 %.

4.2.3. Procentuální zastoupení mastných kyselin

U tří kmenů, vybraných na základě předchozích pokusů, bylo sledováno procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin. Pro tento výzkum byly nejdůležitější hlavně kyselina palmitová (C16:0), kyselina palmitolejová (C16:1), kyselina arachnidová (C20:4n6, ARA) a kyselina eikosapentaenová (C20:5n3, EPA).

4.2.3.1. *Monodopsis* sp.

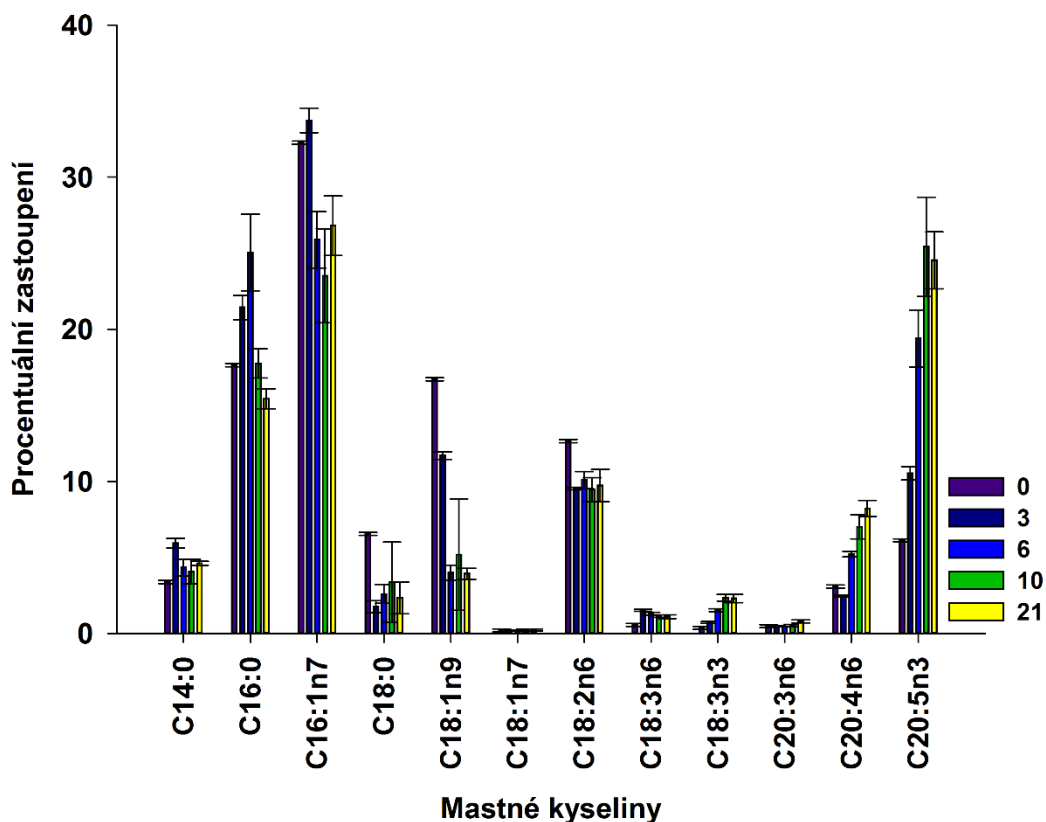


Obr.č. 5: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase u kmene *Monodopsis* sp.

Největší množství mastných kyselin u kmene *Monodopsis* sp. má kyselina palmitová, palmitolejová a EPA (obr.č. 5). C16:0 měla své zastoupení v den inokulace přibližně 27 %, během 3 dnů došlo k nárůstu až na 35 %. Tehdy dosáhla maximální hodnoty. 6. den došlo k poklesu na 21 %, následoval postupný nárůst na 28 %, kterého dosáhla 21. den. C16:1 vykazovala průběžný nárůst ode dne 0, kdy množství MK činilo 21 %, až ke dni 10. Tento den dosáhla maxima na 31 %. Ke 21. dni došlo k poklesu na 26 %. ARA měla ze všech

sledovaných mastných kyselin nejmenší procentuální zastoupení. Ode dne 0 až ke dni 21 u ní přetrvával rostoucí trend ze 3 na 5 %. Procentuální zastoupení EPA rostlo ze 12 % (den 0) na 27 % (den 6), následoval postupný pokles na 20 % (den 21).

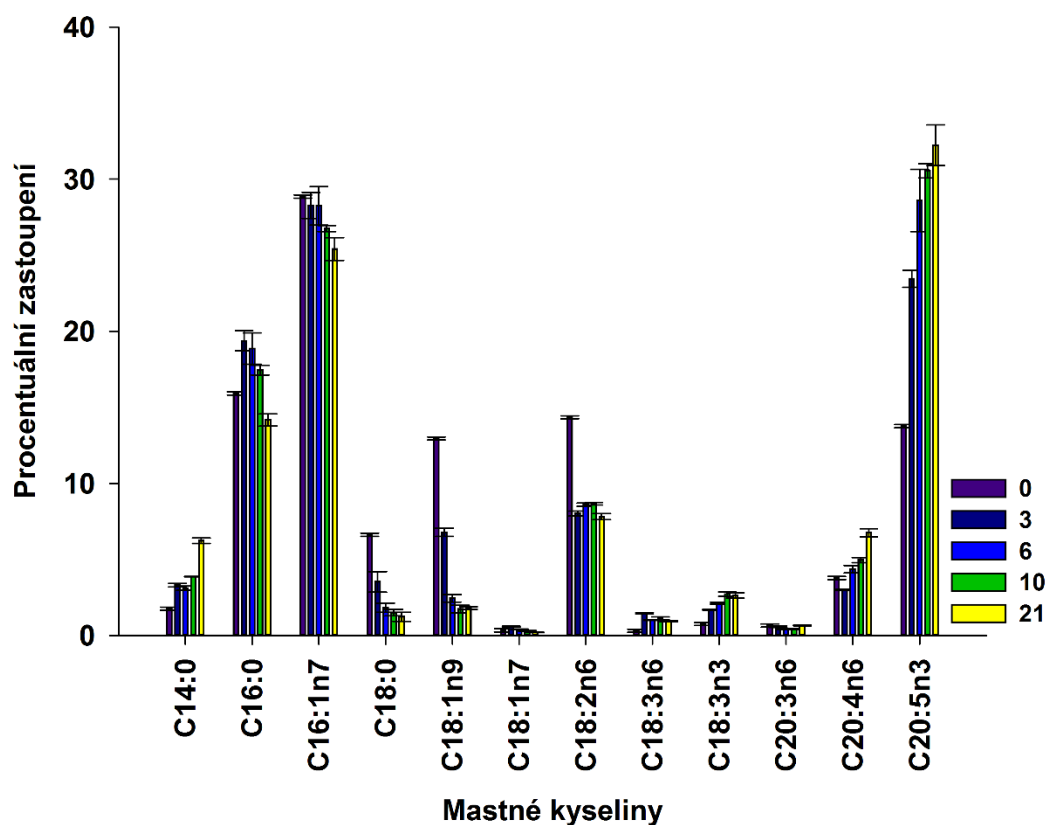
4.2.3.2. *Eustigmatos* sp. SVB213



Obr.č.6: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase u kmene *Eustigmatos* sp. SVB213

Stejně jako u kmene *Monodopsis* sp. mají největší zastoupení kyselina palmitová, palmitolejová a EPA (obr.č. 6). Množství C16:0 na počátku bylo kolem 19 % (den 0) a rostlo až do dne 6, kdy dosáhlo maxima na hodnotě cca 36 %. Následoval prudký pokles až ke dni 21, tou dobou byl obsah C16:0 cca 16 %. Obsah C16:1 ve dne 0 činil cca 31 %. Ke 3. dni došlo k mírnému nárůstu množství této kyseliny, ale pouze o 2 %. Klesající trend probíhal až do 10. dne, kdy dosáhla svého minima na 24 %. Ve dne 21 bylo množství této kyseliny okolo 26 %. ARA celou dobu měření vykazovala rostoucí trend. Obsah vzrostl ze 4 % na 9 %. Množství EPA vzrostlo z 6 % (den 0) na 26 % (den 10). Ke dni 21 se obsah snížil na 20 %.

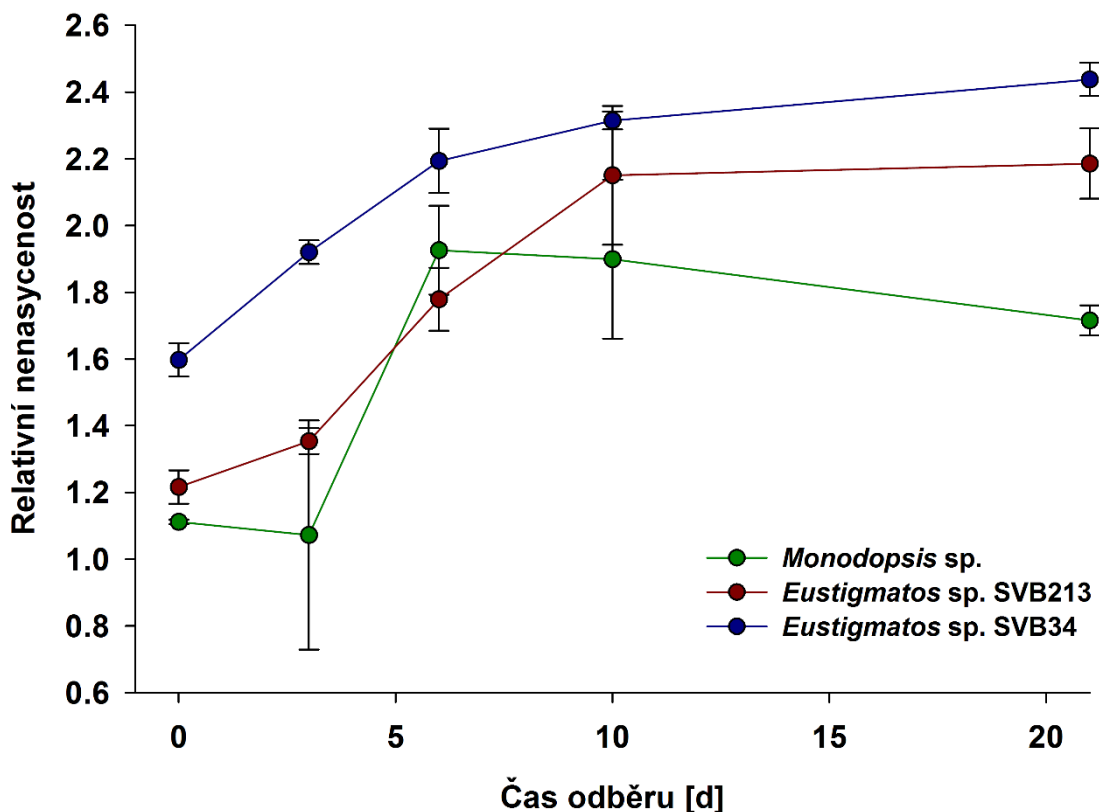
4.2.3.3 *Eustigmatos* sp. SVB34



Obr.č.7: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase u kmene *Eustigmatos* sp. SVB34

Množství C16:0 ve dne 0 bylo 26 % (obr.č. 7). Maximálního obsahu dosáhla 3. den na hodnotě cca 20 %. V průběhu dalších 18 dní docházelo k poklesu až na 15 %. Obsah C16:1 dosahoval svého maxima 29 % už v den 0. Celou dobu vykazovala klesající trend. Minimum nastalo 21. den, kdy se hodnota mastných kyselin pohybovala okolo 25 %. Obsah ARA rostl ze 4 % (den 0) až na 7 % (den 21) po celou dobu měla rostoucí trend. Stejnou tendenci jako ARA měla i EPA. U této kyseliny došlo ke zvýšení obsahu z 12 % (den 0) na 32 % (den 21).

4.2.4. Relativní nenasyčenost (DBI)



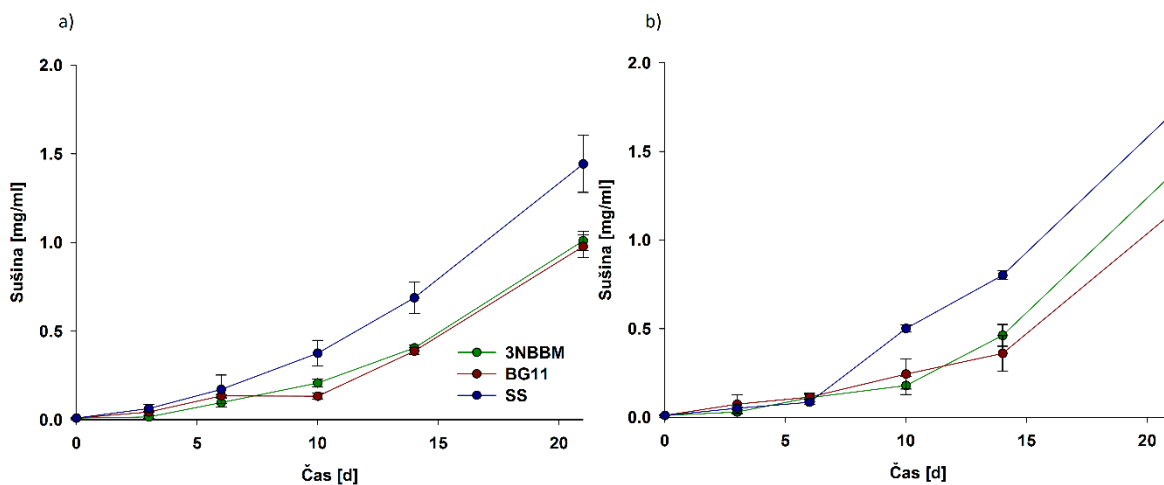
Obr.č.8: Relativní nenasyčenost mastných kyselin (DBI) studovaných kmenů

Relativní nenasyčenost kmene *Monodopsis sp.* se v prvních 3 dnech pochybovala kolem 1,1 (obr.č. 8). Prudký nárůst až na 1,9 nastal 10. dne a DBI u tohoto kmene dosáhla svého maxima. Následoval postupný pokles až do dne 21, na hodnotu cca 1,65. DBI u kmene *Eustigmatos SVB213* se postupně zvyšovalo z hodnoty 1,2 (den 0) na hodnotu 2,1 (den 10) (obr.č. 8). Ode dne 10 do dne 21 se DBI neměnilo. Nejvyššího DBI dosahoval kmen *Eustigmatos SVB34*. Po celou dobu analýzy vykazoval rostoucí trend. DBI se tak zvýšil z 1,6 na 2,3 (obr.č. 8).

Kmen *Eustigmatos SVB34* se sice vyznačoval stejnou růstovou rychlostí, jako zbylé dva kmene (obr.č. 4). Avšak obsahoval největší množství kyseliny eikosapentaenové (obr.č. 7) a celkově nejvyššího podílu polynenasycených mastných kyselin v sušině (obr.č. 7, 8). Na základě těchto výsledků byl zvolen jako nejideálnější kmen pro další analýzy.

4.3. Kmen *Eustigmatos* sp. SVB34

4.3.1. Vliv média při teplotě 20 °C a 25 °C na růst

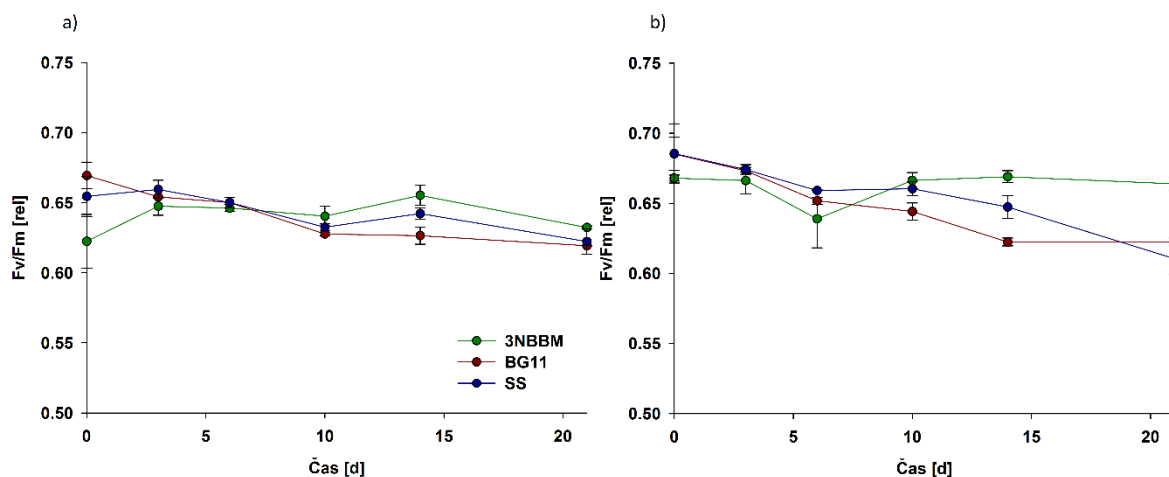


Obr.č.9: Vliv média na růst *Eustigmatos* sp. SVB34 při a) 20 °C, b) 25 °C

Lag fáze probíhala při 20 °C (obr.č. 9a) po dobu prvních 3 dní, bez ohledu na druh média. U buněk rostoucích v 3NBBM a BG11 (obr.č. 9a) došlo k 21. dni ke zvýšení obsahu sušiny studovaného kmene až na 1 mg/ml. V médiu SŠ měl růst buněk rapidnější průběh než u předchozích dvou médií. Výtěžek sušiny byl v tomto případě k 21. dni až 1,4 mg/ml.

Při 25 °C (Obr.č. 9b) bez ohledu na růstové médium trvala lag fáze také první 3 dny. Obsah sušiny u média 3NBBM k 21. dni činil 1,4 mg/ml, v médiu BG11 byl výtěžek o něco nižší a to 1,1 mg/ml. V médiu SŠ dosáhly buňky množství sušiny až 1,7 mg/ml. Při teplotě 25 °C měly buňky ve všech médiích vyšší výtěžnost sušiny než při 20 °C. Nejvyššího množství sušiny se u obou teplot dosáhlo v médiu SŠ.

4.3.2. Vliv média při teplotě 20 °C a 25 °C na fotosyntetickou aktivitu

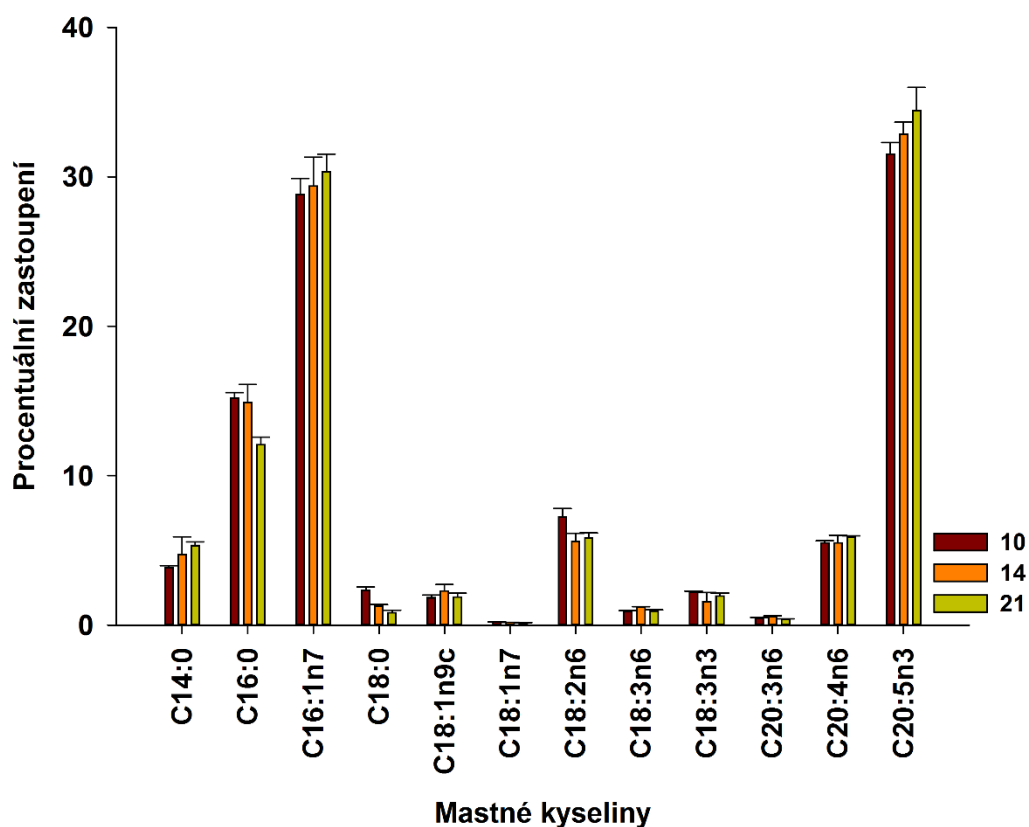


Obr.č.10: Vliv média na fotosyntetickou aktivitu *Eustigmatos* sp. SVB34 při a) 20 °C, b) 25 °C

Kultury rostoucí v 3NBBM při 20 °C ve dne inokulace (den 0) měly aktivitu fotosyntému II přibližně 0,62 (obr.č. 10a). Ke třetímu dni došlo k nárůstu Fv/Fm na 0,65. Po zbytek analýzy se parametr Fv/Fm nijak výrazně neměnil. U buněk rostoucích v médiu BG11 docházelo po celou dobu analýzy k poklesu hodnot Fv/Fm a to ode dne inokulace, kdy hodnota byla cca 0,66 až do dne 21 (0,64) (obr.č. 10a). Buňky rostoucí v médiu SŠ měly na počátku analýzy hodnotu Fv/Fm cca 0,62 a po celou dobu docházelo k postupnému nárůstu aktivity až do dne 21, kdy vykazovala hodnotu cca 0,64 (obr.č. 10a). Při 25 °C u buněk rostoucích v médiu 3NBBM dosahovaly buňky v den inokulace hodnoty Fv/Fm přibližně 0,66 a a ta se neměnila až do dne 6, kdy došlo k rapidnímu propadu až na 0,63 (obr.č. 10b). Den 14 se vyznačoval opětovným nárůstem aktivity zpět na hodnotu 0,66, která se pak neměnila až do dne 21. U buněk rostoucích v médiu BG11 při 25 °C začínalo Fv/Fm na hodnotě 0,68 (obr.č. 10b) a vyznačovalo po celou dobu analýzy klesající trend až na hodnotu 0,63 (den 21). Buňky rostoucí v médiu SŠ mělo podobný průběh jako BG11 (obr.č. 10b). Také na počátku vykazovalo hodnotu aktivity 0,68 a také mělo po celou dobu klesající trend. Hodnota aktivity 21. den byla jen 0,62.

4.3.3. Procentuální zastoupení MK u kmenu *Eustigmatos* sp. SVB34 v čase

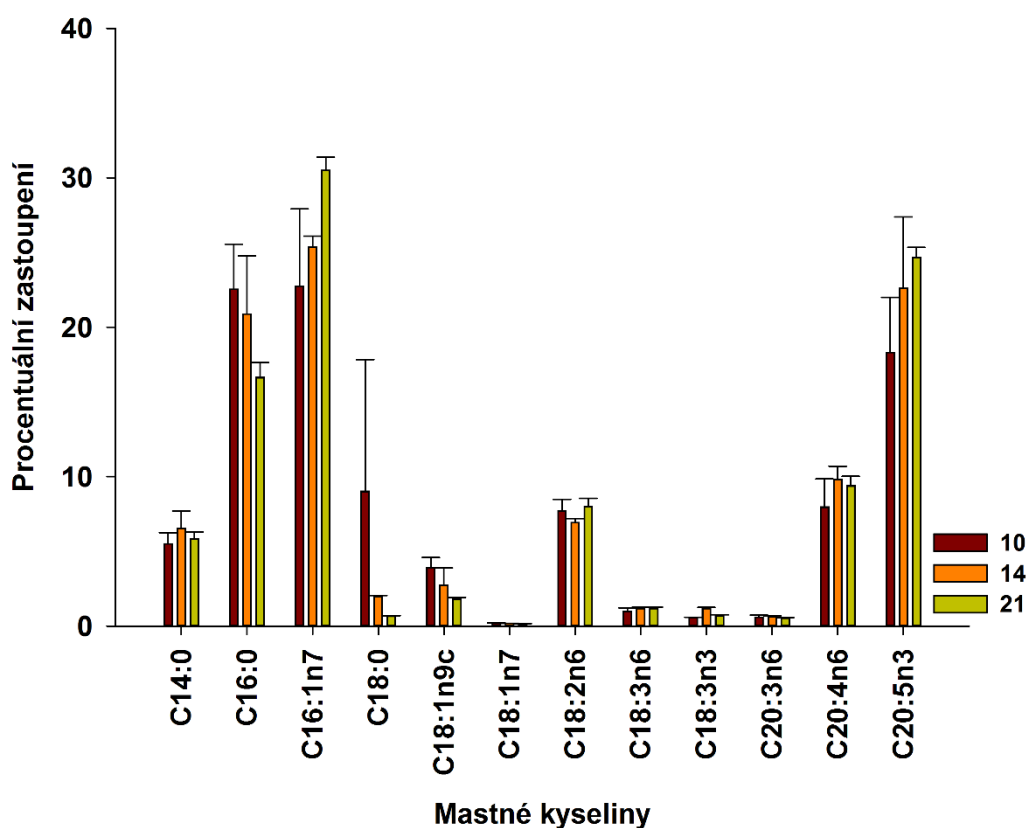
4.3.3.1. 3NBBM médium při teplotě 20 °C



Obr.č.11: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase v 3NBBM médiu při kultivační teplotě 20 °C

Kyselina palmitová vykazovala po celou dobu analýzy klesající trend (obr.č. 11) a to ode dne 10, kdy nabývala hodnoty cca 15 % až do dne 21 (12 %). C16:1 naopak po celou dobu zvětšovala své množství z 29 % (den 10) na 31 % (den 21). Kyselina arachnidová v době analýzy nijak neměnila své procentuální zastoupení a nabývala hodnoty 5 %. Kyselina eikosapentaenová zvyšovala své množství ode dne 10, kdy nabývala hodnoty 32 % až do dne 21, kdy její procentuální zastoupení činilo cca 36 %.

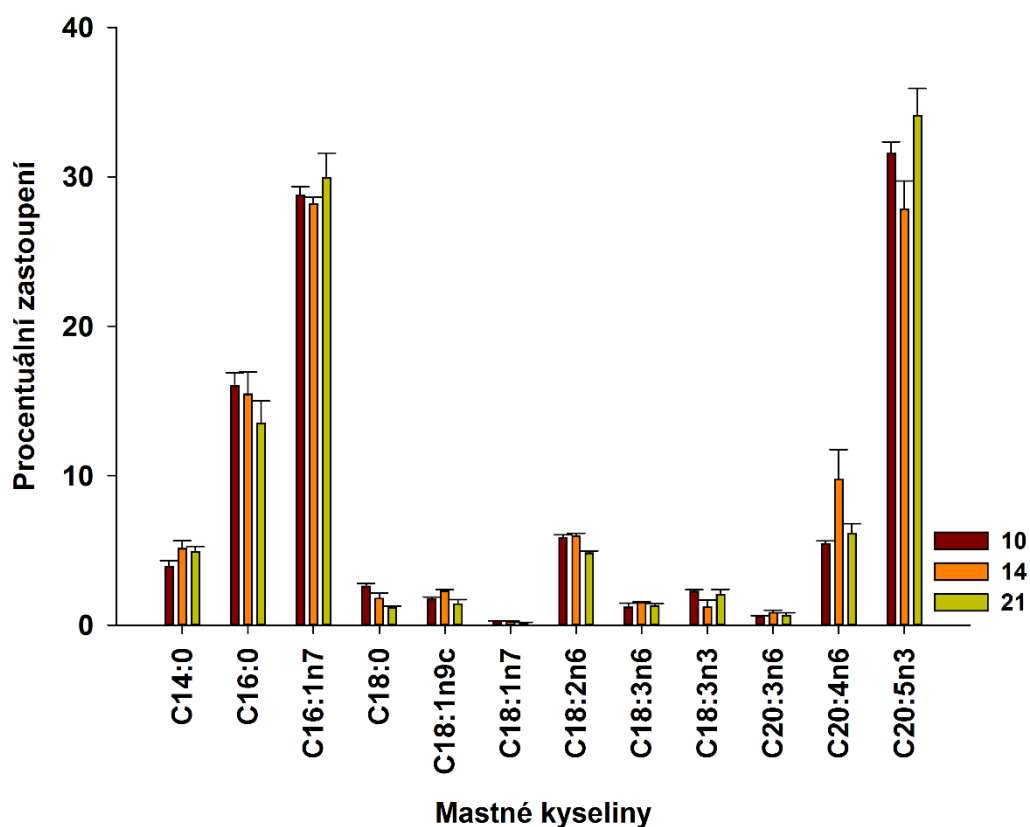
4.3.3.2. 3NBBM médium při teplotě 25 °C



Obr.č.12: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase v 3NBBM médiu při kultivační teplotě 25 °C

Množství C16:0 rostlo ode dne 10, kdy nabývalo hodnoty 22 % až do dne 21, tehdy vykazovala hodnoty kolem 16 % (obr.č. 12). C16:1 zvětšovala svůj obsah z 22 % (den 10) až na cca 31 % (den 21). Množství kyseliny arachnidové vzrostlo ze 7 % (den 10) na 9 % (den 14), poté se až do dne 21 její obsah prakticky neměnil. Rostoucí trend byl pozortován i u EPA, která své množství zvyšovala z 18 % (den 10) na 23 % (den 21).

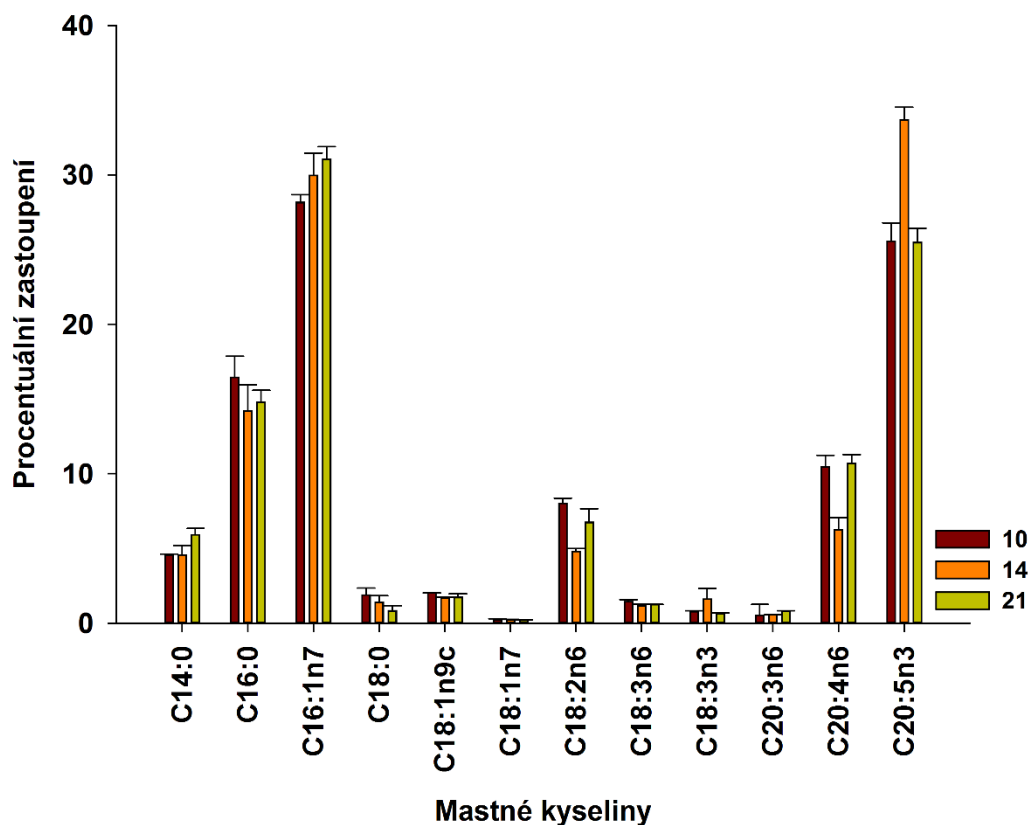
4.3.3.3. BG11 médium při teplotě 20 °C



Obr.č.13: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase v BG11 médiu při kultivační teplotě 20 °C

Množství C16:0 se snižovalo z 15 % (den 10) na 12 % (den 21) (obr.č. 13). Po celou dobu vykazovala klesající trend. C16:1 snížila svůj obsah z 28 % (den 10) na 27 % (den 14). Poté došlo opět ke zvýšení obsahu na 29 %. ARA zaznamenala prudký nárůst ze 4 % (den 10), na 9 % (den 14). Následoval prudký pokles množství kyseliny arachnidové na cca 5 %. EPA snížila své množství ze 31 % (den 10) na 29 % (den 14). Následoval prudký nárůst obsahu této kyseliny až na 32 %.

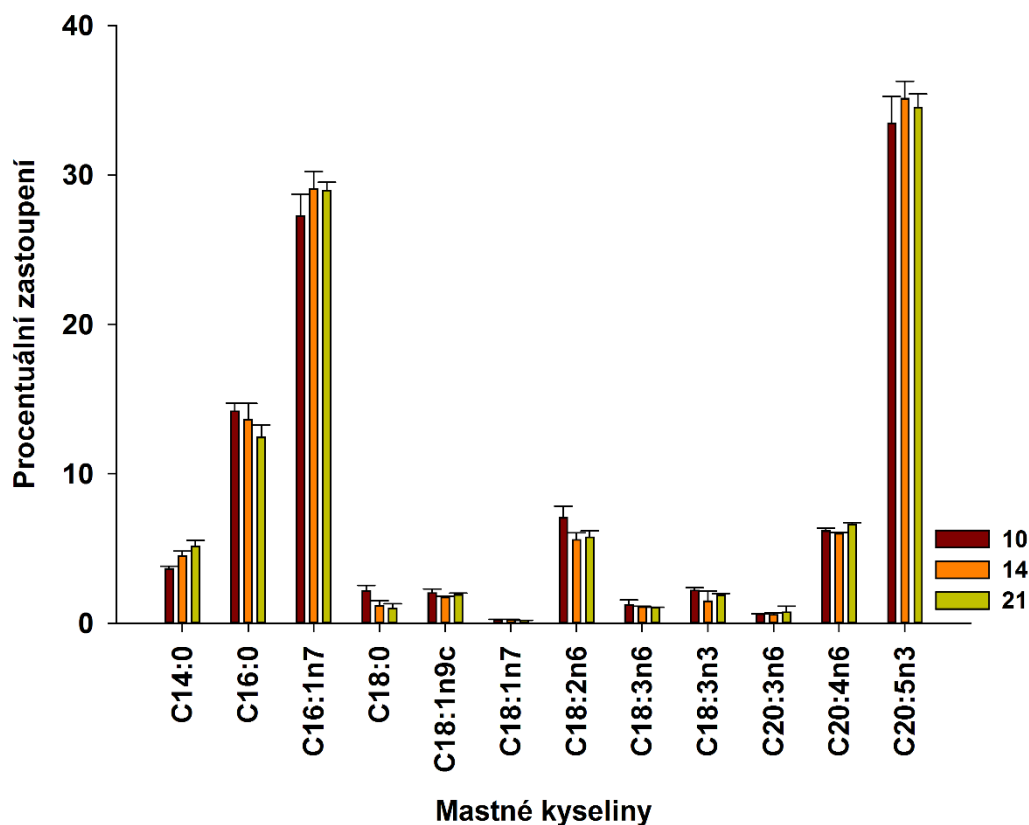
4.3.3.4. BG11 médium při teplotě 25 °C



Obr.č.14: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase v BG11 médiu při kultivační teplotě 25 °C

U C16:0 došlo ke snížení množství z 26 % (den10) na 24 % (den 14) (obr.č. 14). Tato hodnota se dále prakticky neměnila až do konce analýzy. Množství C16:1 vykazovalo po celou dobu narůstající trend. Množství se zvýšilo z cca 28 % (den 10) na cca 31 % (den 14). Obsah ARA klesl z 10 % (den 10) na 6 % (den 14). Poté k 21. dni následoval nárůst na původní hodnotu 10 %. Množství EPA bylo v den 10 cca 25 % a ke dni 14 došlo na zvýšení obsahu na cca 33 %, k poslednímu dni analýzy došlo k poklesu na 25 %.

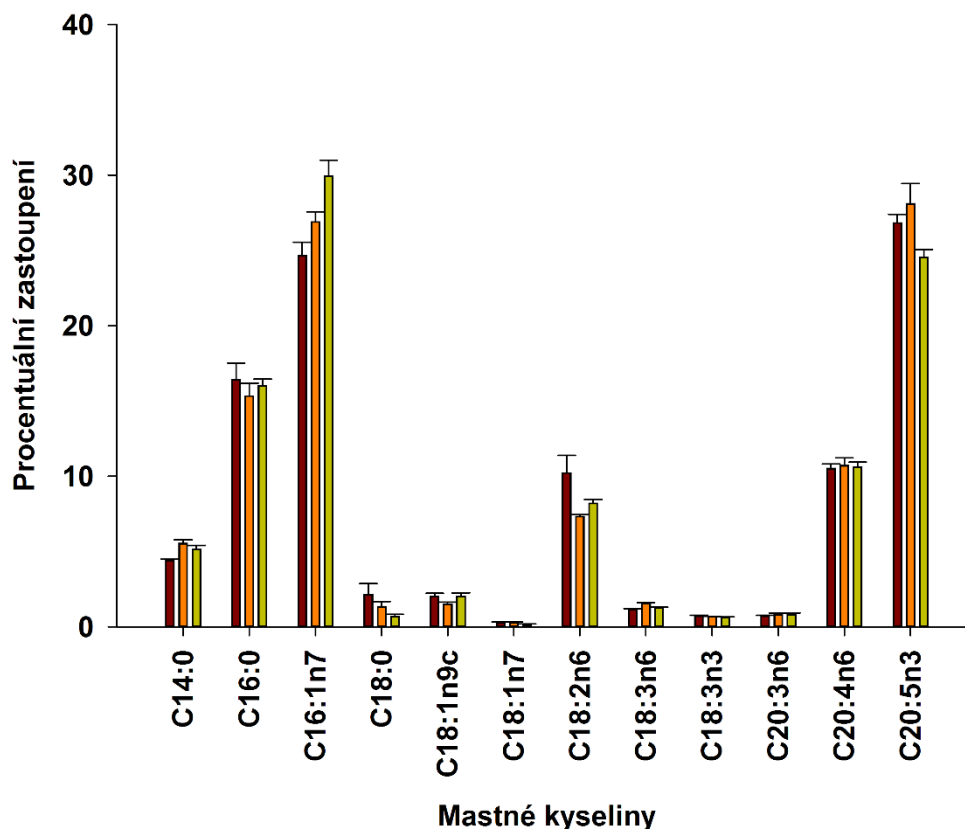
4.3.3.5. SŠ médium při teplotě 20 °C



Obr.č.15: Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase v SŠ médiu při kultivační teplotě 20 °C

C16:0 vykazovala po celou dobu analýzy klesající charakter (obr.č. 15). Její množství se snížilo z 12 % (den 10) na 11 % (den 21). Množství C16:1 narostlo z 27 % (den 10) na 29 % (den 14). Po zbytek analýzy se obsah této mastné kyseliny prakticky nezměnil. ARA měla po celou dobu analýzy stejné množství okolo 5,5 %. Obsah EPA se zvýšilo z 33 % (den 10) na 34 % (den 14). Následoval nepatrný pokles na zpět na 33 % (den 21).

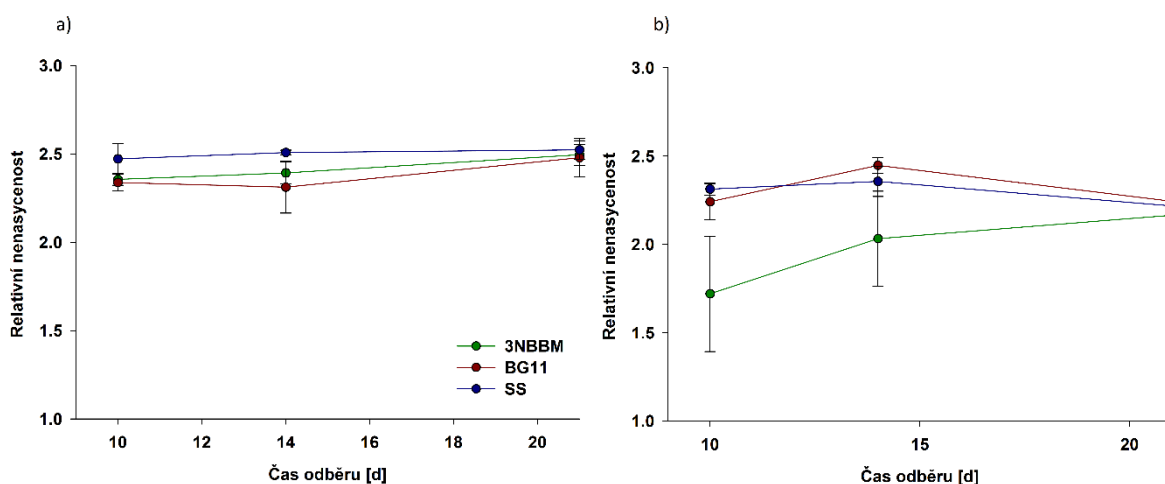
4.3.3.6. SŠ médium při teplotě 25 °C



Obr.č.16. Procentuální zastoupení jednotlivých mastných kyselin v čase v SŠ médiu při kultivační teplotě 25 °C

C16:0 snížila své množství z 26 % (den 10) na 24 % (den 14) (obr.č. 16). V následujících dnech došlo k mírnému nárůstu na 25 % (den 21). C16:1 se vyznačovala stoupajícím trendem a zvyšovala své množství z 23 % (den 10) až na cca 30 % (den 21). Množství ARA se po celou dobu analýzy nezměnilo a pohybovalo se na hodnotě 10 %. EPA zvýšila svůj obsah z 28 % (den 10) na 30 % (den 14). Do 21. dne následoval výrazný pokles na cca 25 %.

4.3.4. DBI V různých médiích a teplotách



Obr.17. Relativní nenasycenost mastných kyselin (DBI) při růstu v různých médiích a teplotách a) 20 °C, b) 25 °C

Vzorky rostoucí v médiu 3NBBM při 20 °C vykazovaly po celou dobu analýzy pozvolný nárůst DBI (obr.č. 17a). Hodnota se zvýšila 2,3 (den 10) na 2,5 (den 21). DBI u vzorků rostoucích v médiu BG11 při teplotě 20 °C se chovalo podobně jako u 3NBBM, nárůst byl pomalejší ale množství se zvýšilo z 2,3 (den 10) na 2,5 (den 21) (obr.č. 17a). Vzorky rostoucí při 20 °C v médiu SŠ po celou dobu analýzy nezměnily hodnoty DBI, to po celou dobu nabývalo hodnoty 2,5 (obr.č. 17a). Při 25 °C došlo ve vzorcích z média 3NBBM k nárůstu DBI z 1,7 (den 10) na 2,1 (den 21) (obr.č. 17b). V médiu BG11 při 25 °C hodnota DBI vzrostla z 2,3 (den 10) na 2,5 (den 14). Následoval pozvolný pokles až na hodnotu 2,1 (den 21) (obr.č. 17b). Vzorky rostoucí v SŠ médiu při 25 °C, po celou dobu analýzy vykazovaly klesající trend. Hodnota DBI tak postupně klesla z 2,3 (den 10) na 2,1 (den 21) (obr.č. 17b).

5.Diskuze

Tato bakalářská práce byla zaměřena na, zatím nedostatečně prozkoumanou, skupinu řas Eustigmatophyceae a především na výzkum potenciálu rodů *Eustigmatos* a *Monodopsis*. Cílem bylo získat informace o vlastnostech růstu, množství mastných kyselin, indexu nenasycenosti a fotosyntetické aktivitě za předpokladu změny kultivačního média nebo teploty. Důležitým aspektem práce bylo získání dat ohledně produkce látek, které by mohly mít potenciální využití v komerční výrobě potravinových doplňků nebo zdravých potravin.

Biotechnologický potenciál kmenů třídy Eustigmatophyceae by prokázán již v předchozích výzkumech (Wolkman, et al. 1999; Lang et al., 2011). Absolutní hodnoty různých kmenů však nebyly detailně vyhodnoceny. Byla provedena kultivace šesti kmenů třídy Eustigmatophyceae, z nichž byly vybrány 3 jako nejvhodnější kandidáti pro další analýzy. Výsledky analýzy růstu tří vybraných kmenů (fáze 2, obr.č.1) ukázaly, že všechny tři kmeny e.g. *Monodopsis* sp., *Eustigmatos* sp. SVB213 a *Eustigmatos* sp. SVB34 dosahovaly výtěžků sušiny v rozmezí 0,4 – 0,6 g/l v desátý den kultivace, což je srovnatelné až vyšší než u práce Lima et al. (2018), kde sledované kmeny v desátý den kultivace dosahovaly výtěžku maximálně 0,38 g/l. Při dlouhodobější kultivaci (30 dnů), kmeny eustigmatofyt dosahovaly maximální sušiny 0,2 – 0,78 g/l, kde kmen *Eustigmatos* ACCI 3441 dosahoval hodnoty 0,78 g/l (Lima et al., 2018), zatímco v této práci sledované kmeny dosahovaly k 21. dni výrazně vyšších výtěžků biomasy a to v rozmezí 1,7 – 1,85 g/l (obr.č. 4). Předchozí výzkum (Koudelková, 2015), studoval několik kmenů *Eustigmatos/Vischeria*, *Vischeria Stellata* SAG887-2 a *Monodopsis Subterraneus* CCALA 830 v mediích BBM a ½ SŠ. Výsledky této studie ukázaly dokonce ještě vyšších výtěžků biomasy 1,5 - 2,5 g/l během 7dmi dnů a to v obou růstových médiích (Koudelková, 2015). V tomto případě růst byl výrazně vyšší díky jinému způsobu kultivace. Kultivace v tomto případě byly prováděny ve válečcích a kultury byly probublávány vzduchem s přidaným 1 % CO₂ (Koudelková, 2015)., zatímco v mé práci byly kmeny kultivovány v Erlenmeyrových baňkách a pouze třepány. Množství lipidů v této práci (12 – 16 %) (tab.č.2) u studovaných kmenů mnohem nižší v porovnání s *Nannochloropsis* CCMP 1775 (32,53 %), *Characiopsis* ACOI 2424 (29,04 %) či *Nannochloropsis* SAG 38.85 (22,07 %) (Lima et al., 2018) a cca 41 % pro *Eustigmatos/Vischeria* MBU4 (Koudelková, 2015). Tyto výsledky jsou těžko porovnatelné díky různým kultivačním podmínkám (teplota a způsob kultivace) a různým kultivačním časům. Z předchozích měření na třech kmenech byl, jako nejvhodnější kandidát pro podrobné analýzy, vybrán kmen *Eustigmatos* sp. SVB34. Nejdůležitějším parametrem analýzy bylo množství eikosapentaenové kyseliny (EPA), v závislosti na kultivačním médiu a teplotě (obr.č.11 – 16). Kmen byl pěstován ve třech médiích s různou koncentrací dusíku a byl vystaven dvěma různým teplotám a to 20 a 25 °C. Efekt teploty na produkci EPA je velmi komplexní a zatím ještě nebyl úplně objasněn. V práci Seto et al. (1992) kmeny pěstované při teplotě 20 °C obsahovaly o 60 % více EPA než při optimální růstové teplotě (25 °C). Podobně v práci Sukenik et al. (1993) díky větší produkci galaktolipidů bylo relativně větší zastoupení EPA v kultuře *Nannochloropsis* sp. pěstované při 20 °C než při 30 °C. Na rozdíl od těchto autorů Teshima et al. (1983) pozoroval nejvyšší produkci EPA při 25 °C u mořského kmene

Chlorella. Výsledky této práce ukazují, že množství EPA je více méně závislé na teplotě, neboť při nižší teplotě 20 °C bylo relativní množství EPA více než 30 %, zatímco při teplotě 25 °C bylo toto množství o cca 5 % nižší. V porovnání s prací Koudelková (2015), měl kmen *Eustigmatos* sp. SVB34 obsahovat až o 19 % více EPA, než jakýkoliv z jimi analyzovaných kmenů. Dalším zajímavým výsledkem potvrzujícím „strain specific“ produkce látek je relativně vysoký obsah EPA (okolo 30 %, obr.č. 3 a 5 v této práci) u kmene *Monodopsis* sp., kde *Monodus subterraneus* CCALA 830 ve studii Koudelková (2015), neprodukoval EPA. *Monodus subterraneus* je jinak intenzivně studován pro svůj vysoký obsah EPA (až 26,9 %) (Cohen, 1990). Běžným způsobem pro zvýšení obsahu lipidů v biomase řas je limitace dusíkem (Yeesang a Cheirsilp, 2011). V práci (Converti et al., 2009) je uváděno, že 75% snížení obsahu dusíku indukovalo až 100% nárůst totálních lipidů v buňkách *Nannochloropsis oculata*. EPA je však nejvíce obsažena v glykolipidech a fosfolipidech, tedy strukturních formách lipidů. Proto u buněk rostoucích v dusíku hojném médiu docházelo ke zvýšené produkci EPA u *Nannochloropsis oceanica* (Meng et al., 2015). To je v souladu s výsledky této práce, protože relativní obsah EPA rostl se vyrůstajícím množstvím dusíku v médiu (obr.č. 11 – 16).

6. Závěry

Na základě výsledků počtu buněk, množství sušiny a množství mastných kyselin, byly pro podrobnější analýzu vybrány kmeny *Monodopsis* sp., *Eustigmatos* sp. SVB213 a *Eustigmatos* sp. SVB34. U těchto tří studovaných kmenů proběhla analýza růstové křivky, množství lipidů v sušině, složení mastných kyselin a indexu nenasycenosti (DBI). Z těchto výsledků byl, nejúspěšnějším kandidátem pro další analýzy zvolen kmen *Eustigmatos* sp. SVB34. Jedním z důvodů byla nejvyšší podíl EPA a celkově nejvyšší podíl polynenasycených mastných kyselin v sušině a zároveň vykazoval nejvyšší reprodukovatelnost výsledků (nejnižší směrodatné odchylky) a to u růstu (množství lipidů v sušině, procentuálního zastoupení mastných kyselin a relativní nenasycenosti mastných kyselin).

Z analýz růstových křivek při dvou testovaných teplotách 20 a 25 °C se ukázalo, že růst při vyšší teplotě vedlo vyšší růstové rychlosti ve všech růstových médiích. *Eustigmatos* sp. SVB34 však rostl nejrychleji v médiu SŠ a to v obou testovaných teplotách. Fotosyntetická aktivita (parametr Fv/Fm) však ukázala, že v médiu 3NBBM nedocházelo ani v hustých kulturách k poklesu jako u obou dalších médií. Toto zjištění vede k závěru, že médium BBM s trojnásobným množstvím dusíku (3NBBM) je vhodnější pro velkokapacitní kultivace do

mnohem vyšších hustot, než byly použity v této práci. DBI parametr ukázal, že kmeny rostoucí bez ohledu na živné médium dosahují v teplotě 20 °C vyšších hodnot než při 25°C, tedy, že při nižší teplotě dochází k produkci většího množství polynenasycených mastných kyselin. Vyšší hodnoty nenasycenosti mastných kyselin u vzorků rostoucích při 20 °C však mohou být kompenzovány rychlejším růstem při 25 °C. Hodnoty DBI byly při daných teplotách bez ohledu na živné médium stejné. Po analýze těchto výsledků jsem došla k závěru, že ačkoliv se zdá, že buňky rostoucí v médiu SŠ předčí v růstu buňky rostoucí v ostatních médiích, při velkokapacitních kultivacích by však mohlo docházet ke zpomalení růstu v důsledku snížené fotosyntetické aktivity. Toto by mělo být potvrzeno dalším podrobnějším výzkumem. Nabízí se analýza kmenů pěstovaných v monochromatickém, kontinuálním světle či ve světle o různých vlnových délkách.

7. Seznam použité literatury

Andersen, R. A., Brett, R. W., Potter, D., Sexton, J.P. (1998). Phylogeny of the Eustigmatophyceae Based upon 18S rDNA, with Emphasis on Nannochloropsis. *Protist* 149: 61-74.

Barsanti, L. and Gualtieri, P. (2006). *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. Boca Raton, CRC Press.

Becker, E. W. (1994). *Microalgae: biotechnology and microbiology*. Cambridge, Press Syndicate of the University of Cambridge.

Becker, E. W. (2004). *Microalgae in human and animal nutrition. Handbook of microalgae culture*. A. Richmond. Oxford.

Ben-Amotz, A. and Avron, M. (1980). Osmoregulation in the halophilic algae *Dunaliella* and *Asteromonas*. In *Genetic Engineering of Osmoregulation*. Eds. D W Rains, R C Valentine and A Hollaender. pp 91-95. Plenum Press, New York.

Bischoff, W.M. and Zubeck, H.M. (2012). *Phycological Studies IV. Some Soil Algae Enchanted Rock and Related Algal Specie*. University of Texas, Austin, 6318: 1-95

Bishop, W. M. and Zubeck H. M. (2012). Evaluation of microalgae for use as nutraceuticals and nutritional supplements. *Nutritional and Food*.

Castenholz, R.W. (1968). The behavior of *Oscillatoria trebriformis* in hot springs. *J.Phycol* 4:132-9.

Castenholz, R.W. (1969). Thermophilic blue-green algae and the thermal environment. *Bact. Rev.*33:476-504.

Cohen, Z. (1999). *Monodus subterraneus*. *Chemicals from microalgae*. Taylor & Fancis Ltd.

Converti, A., Casazza, A.A., Ortiz, E.Y., Perego, P., Del Borghi, M. (2009) Effect of temperature and nitrogen concentration on the growth and lipid content of *Nannochloropsis oculata* and *Chlorella vulgaris* for biodiesel production. *Chem. Eng. Process.* 48, 1146–1151.

Durmaz, Y. (2006). Vitamin E (alfa-tocopherol) production by the marine microalgae *Nannochloropsis oculata* (Eustigmatophyceae) in nitrogen limitation. *Science Direct*.

Eliáš, M. and Neustupa, J. (2012). Phylum Eustigmatophyta. Handbook of Protoctista. L. Margulis, Jones and Bartlett Learning.

Fišerová, M. (2009). Ultrastruktura eustigmatofytních řas Katedra botaniky. Praha, Karlova univerzita. Bc.: 32.

Fišerová, M. (2012). Ultrastruktura eustigmatofytních řas. Praha, Karlova univerzita.

Fu, J., Momcilovic, I., Clemente, T.E., Neresian N., Trick, H.N., Ristic Z. (2008) Heterologous expression of plastid EF-Tu reduces protein thermal aggregation and enhances CO₂ fixation in wheat (*Triticum aestivum*) following heat stress. *Plant Mol Biol* 68(3): 277-288.

Gärtner, G., Stoyneva, M.P., Uzunov, B.A., Mancheva, A.D. and Ingolić, E. (2012). Ultrastructure of vegetative cells and autospores of an aerophytic strain *Vischeria Stellata* (*Chodax ex Poulton*) Pascher (Eustigmatophyceae) from Bulgaria. *Fottea*, 12(2), 273-280.

Geider, R.J., La Roche J. (2002). Redfield revisited: variability of C: N: P in marine microalgae and its biochemical basis. *Eur J Phycol* 37(1): 1–7.

Granum, E., Kirkvold, S. and Mykkestad, S.M. (2002). Cellular and extracellular production of the carbohydrates and amino acids by the marine diatom *Skeletonema costatum*: diel variations and effects of N depletion. *Marine Ecology Progress Series* 242: 83–94.

Gross, W. and Pulz, O. (2004). Valuable Products from Biotechnology of Microalgae. *Applied Microbiol. Biotechnology* 65: 635-648.

Hossain, S., Salleh, A., Boyce, A.N., Husri, M.N. (2008). Biodiesel Fuel production from Algae as Renewable Energy. *American Journal of Biochemistry and Biotechnology* 4: 250-254.

Holzinger, A., Albert, A., Aigner, S., Uhl, J., Schmitt-Kopplin, P., Trumhová, K., a Pichrtová, M. (2018). Arctic, Antarctic, and temperature green algae *Zygnema* spp. under UV-B stress: vegetative cells perform better than pre-akinetes. *Protplasma*, 255(4): 1239-1252.

Koudelková, I. (2011). Kultivace řas a jejich využití v zemědělství. Ústav botaniky a zoologie. Brno, Masarykova univerzita. Bc.

Koudelková, I. (2015). Potenciál nových kmenů řas třídy Eustigmatophyceae v průmyslovém využití se zaměřením na zdravou výživu. Ústav botaniky a zoologie. Brno, Masarykova univerzita, Mgr.

Lancelot C, and Mathot S (1985). Biochemical fractionation of primary production by phytoplankton in Belgian coastal waters during short-and-long term incubations with ^{14}C -bicarbonate. II *Phaeocystis pouchetti* colonial population. Marine Biology 86: 227–232.

Lima, T.S., Assunção, M.F.G., Santos, L.M.A. (2018) Survey of growth and lipid profiles in Eustigmatophytes, Frontiers in Marine Science. DOI: 10.3389/conf.FMARS.2018.06.00092

Los, D.A., Mironov, K.S., Allakhverdiev, S.I., (2013). Regulatory role of membrane fluidity in gene expression and physiological functions. Photosynth. Res. 116(2-3): 489-509.

Meeks, J.C. and Castenholz, R.W. (1971). Growth and photosynthesis in an extreme thermophile, *Synechococcus lividus* (Cyanophyta). Arch. Mikrobiol. 78(1): 25-41.

Meng, Y.Y., Jiang, J.P., Wang, H.T., Cao, X.P., Xue, S., Yang, Q., Wang, W.L. (2015.) The characteristics of TAG and EPA accumulation in *Nannochloropsis oceanica* IMET1 under different nitrogen supply regimes. Bioresour. Technol. 179, 483–489.

Merchand, R. E. and Andre, C. A. (2001). A review of recent clinical trials of the nutritional supplement *Chlorella Pyrenoidosa* in the treatment of fibromyalgia, hypertension, and ulcerative colitis. Alternative therapies.

Mohamed, S., Hashim, S. N., Rahman, A. (2012). Seaweeds: A sustainable functional food for complementary and alternative therapy. Trends in Food Science and Technology 23: 83 – 96.

Niyogi, K.K., Truong, T.B. (2013). Evolution of flexible non-photochemical quenching mechanisms that regulate light harvesting in oxygenic photosynthesis. Current Opinion in Plant Biology 16: 307-3014

Neustupa, J. and Nemcova, Y. (2001). Morphological and Taxonomic Study of Three Terrestrial Eustigmatophycean Species. Beiheft 123: 373-386.

Procházková, K. (2012). Diverzita a druhový koncept u komplexu *Vischeria/Eustigmatos* (Eustigmatophyceae). Praha, Karlova univerzita. Mgr.

Raven, J.A., Beardall, J. (2004) Carbohydrate metabolism and respiration in algae. In: Larkum AWD, Douglas SE, Raven JA (eds) *Photosynthesis in algae*, vol 14. *Advances in photosynthesis and respiration*. Springer, Netherlands, pp 205–224.

Richmond, A. (2004). *Handbook of microalgal culture*. Iowa, Blackwell publishing company.

Saber, A.A., Fučíková, K., McManus, H. A., Cuella, G., and Cantonati, M., (2018). Novel green algal isolates from the Egyptian hyper-arid desert oases: a polyphasic approach with a description of *Pharao desertorum* gen. et sp.nov. (Chlorophyceae, Chlorophyta). *Journal Of Phycology* 54(3): 342-357.

Sakamoto, T., Murata, N. (2002). Regulation of the desaturation of fatty acids and its role in tolerance to cold and salt stress. *Curr. Opin. Microbiol.* 5(2): 208-210.

Sayre, R. (2010). Microalgae: The Potential for Carbon Capture. *BioScience* 60(9): 722-727.

Seto, A., Kumasaka, K., Hosaka, M., Kojima, E., Kashiwakura, M., Kato, T., (1992.) Production of eicosapentaenoic acid by marine microalgae and its commercial utilization for aquaculture. In: Kyle, D.J., Ratledge, C. (Eds.), *Industrial Application of Single Cell Oils*. American Oil Chemists' Society, Champaign, IL, pp. 219–234.

Sheath, R. G. and J. D. Wehr (2003). *Freshwater algae of North America: ecology and classification*. London, Academic Press.

Sukenik, A. (1999). Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. *Chemicals from microalgae*. Z. Cohen. Negev, CRC Press.

Sukenik, A., Yamaguchi, Y., Livne, A., (1993b) Alterations in lipid molecular species of the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis* sp. *J. Phycol.* 29, 620–626.

Teshima, S., Yamasaki, S., Kanazawa, A., Hirata, H., (1983.) Effects of water temperature and salinity on eicosapentaenoic acid level of marine *Chlorella*. *Bull. Jpn. Soc. Sci. Fisheries* 49, 805.

Tsai, A-Y., Gong, G-C., Chiang, K-P., Tsai, P-J., Chao, C.F. (2014). Picoplankton Dynamics and Their Trophic roles in the Microbial Food-Web Processes in the Southern East China Sea Upwelling Region During Summer. *Terrestrial, Atmospheric and Oceanic Sciences*, 25(3): 435.

Tvrzicka, E., Kremmyda L. S., Stankova, B., Zak, A. (2011). Fatty acids as biocompounds: Their role in human metabolism, health and disease - A review. Part 1: Classification, dietary sources and biological functions. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc.

Van den Hoek, C., Mann, D. G., Jahns, H.M. (1995). Algae, An introduction to phycology. Cambridge, Cambridge University Press.

Vass, I., Cser, K., Cheregio, O. (2007). Molecular Mechanisms of Light Stress of photosynthesis. Annals of the New York Academy of Sciences 1113(1): 114-122.

Wada, H., Goimpos, Z., Murata, N.(1994). Contribution of membrane lipids to the ability of the photosynthetic machinery to tolerate temperature stress. Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91(10): 4273-4277.

Wolkman, J. K. and Barrett, S. M. (1999). "Fatty acids and hydroxyfatty acids in three species of freshwater Eustigmatophytes." Journal of Phycology 35: 1005-1012

Yeesang, C., Cheirsilp, B. (2011.) Effect of nitrogen, salt, and iron content in the growth medium and light intensity on lipid production by microalgae isolated from freshwater sources in Thailand. Bioresour. Technol. 102, 3034–3040.