

# **Metody stanovení proteinů a nukleových kyselin v řasách**

Nina Úlehlová

---

Bakalářská práce  
2011



Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická

---

Univerzita Tomáše Bati ve Zlíně  
Fakulta technologická  
Ústav technologie a mikrobiologie potravin  
akademický rok: 2010/2011

## ZADÁNÍ BAKALÁŘSKÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Nina ÚLEHLOVÁ**  
Osobní číslo: **T08373**  
Studijní program: **B 2901 Chemie a technologie potravin**  
Studijní obor: **Chemie a technologie potravin**

Téma práce: **Metody stanovení proteinů a nukleových kyselin v řasách.**

Zásady pro vypracování:

### I. Teoretická část

1. Řasy jsou známé vysokým obsahem nukleových kyselin a proteinů.
2. Formou literární rešerše charakterizujte proteiny a nukleové kyseliny mořských a sladkovodních řas.
3. Popište metody pro stanovení proteinů a nukleových kyselin v řasách.

Rozsah bakalářské práce:

Rozsah příloh:

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

Seznam odborné literatury:

[1] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin 1*, OSSIS, Tábor 2009.

[2] KÁŠ, J. KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. VŠCHT Praha, 2006.

[3] BURTIN, P. Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*, 2003, 2, 498–503.

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

Vedoucí bakalářské práce:

**Ing. Ladislava Mišurcová, Ph.D.**

Ústav technologie a mikrobiologie potravin

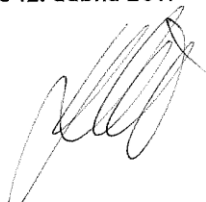
Datum zadání bakalářské práce:

**11. února 2011**

Termín odevzdání bakalářské práce:

**30. května 2011**

Ve Zlíně dne 12. dubna 2011



doc. Ing. Petr Hlaváček, CSc.  
*děkan*



doc. Ing. Jan Hrabě, Ph.D.  
*ředitel ústavu*

Příjmení a jméno: ŮLEHLOVÁ NINA

Obor: CHTĚ

## PROHLÁŠENÍ

Prohlašuji, že

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

Ve Zlíně 23. 5. 2011

Ůlehlová Nina

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

## **ABSTRAKT**

Řasy jsou významné svou nutriční hodnotou. Jsou vhodným zdrojem proteinů, vitaminů, minerálních látek a vlákniny. Tato bakalářská práce se zabývá obsahem proteinů a nukleových kyselin ve vybraných druzích mořských a sladkovodních řas. Dále popisuje metody, které se běžně používají ke stanovení obsahu proteinů, a metody ke stanovení nukleových kyselin v řasách.

Klíčová slova: sladkovodní řasy, mořské řasy, proteiny, nukleové kyseliny, metody stanovení

## **ABSTRACT**

The algae are known for their nutritional value. They are good source of proteins, vitamins, minerals and fiber. This bachelor thesis is focused on proteins and nucleic acids in selected species of seaweeds and freshwater algae. It also describes the methods that are commonly used to determine protein content, and methods of the determination of nucleic acids in algae.

Keywords: freshwater algae, seaweeds, proteins, nucleic acids, methods of determination

Tímto bych chtěla poděkovat vedoucí bakalářské práce, paní Ing. Ladislavě Mišurcové, Ph.D., za odbornou pomoc při zpracování bakalářské práce. Další poděkování patří mé rodině a příteli za podporu v průběhu celého studia.

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

# OBSAH

<b>ÚVOD</b> .....	<b>10</b>
<b>1 ŘASY</b> .....	<b>11</b>
1.1 SLOŽENÍ ŘAS .....	11
1.1.1 Sacharidy .....	11
1.1.2 Lipidy .....	12
1.1.3 Proteiny .....	12
1.1.4 Vitaminy a minerální látky.....	12
1.1.5 Ostatní složky.....	12
1.2 VYUŽITÍ ŘAS.....	13
1.3 DĚLENÍ ŘAS .....	13
1.3.1 Zelené řasy (Chlorophyta).....	13
1.3.2 Hnědé řasy (Phaeophyta).....	14
1.3.3 Červené řasy (Rodophyta).....	14
1.3.4 Modrozelené řasy (Cyanophyta) .....	15
<b>2 PROTEINY</b> .....	<b>16</b>
2.1 OBSAH PROTEINŮ V ŘASÁCH.....	17
2.1.1 <i>Porphyra tenera</i> .....	18
2.1.2 <i>Palmaria palmata</i> .....	19
2.1.3 <i>Laminaria</i> sp. ....	20
2.1.4 <i>Undaria pinnatifida</i> .....	21
2.1.5 <i>Ulva</i> sp. ....	22
2.1.6 <i>Chlorella</i> sp.....	23
2.1.7 <i>Spirulina</i> sp .....	24
2.1.8 Srovnání obsahu proteinů u vybraných zástupců řas .....	25
<b>3 NUKLEOVÉ KYSELINY</b> .....	<b>26</b>
3.1 DEOXYRIBONUKLEOVÁ KYSELINA.....	27
3.2 RIBONUKLEOVÁ KYSELINA .....	27
3.3 OBSAH NUKLEOVÝCH KYSELIN V ŘASÁCH.....	28
3.3.1 <i>Chlorella</i> sp., <i>Spirulina</i> sp. ....	28
<b>4 STANOVENÍ PROTEINŮ</b> .....	<b>29</b>
4.1 KJELDAHLOVA METODA .....	29
4.2 KOLORIMETRICKÉ METODY .....	32
4.2.1 Biuretová metoda .....	32
4.2.2 Lowryho metoda.....	33
4.2.3 Bicinchoninová metoda (BCA).....	34
4.2.4 Metoda dle Bradfordové.....	35
4.3 SDS-PAGE.....	36
<b>5 METODY STANOVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN</b> .....	<b>37</b>



5.1	SPEKTRÁLNÍ STANOVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN.....	37
5.2	STANOVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN – KOLORIMETRICKÉ METODY .....	37
5.2.1	Stanovení DNA .....	37
5.2.2	Stanovení RNA .....	37
5.3	POLYMERÁZOVÁ ŘETĚZOVÁ REAKCE (PCR) .....	38
	<b>ZÁVĚR .....</b>	<b>39</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY.....</b>	<b>41</b>
	<b>SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK .....</b>	<b>46</b>
	<b>SEZNAM OBRÁZKŮ .....</b>	<b>47</b>
	<b>SEZNAM TABULEK.....</b>	<b>48</b>

## ÚVOD

Řasy jsou rozsáhlou a nejednotnou skupinou organismů. Systém řas je možno rozdělit do kategorií podle výskytu na mořské a sladkovodní druhy, podle velikosti na mikrořasy a makrořasy, nebo podle obsahu fotosyntetických barviv na řasy hnědé, zelené a červené. Zvláštní kategorii tvoří sinice, které bývají označovány jako řasy modrozelené.

Řasy jsou hojně využívané organizmy. Slouží jako krmivo pro hospodářská zvířata a ryby, používají se jako hnojivo. Rozsáhlé je jejich využití v průmyslové činnosti, převážně v průmyslu potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém. V neposlední řadě je to využití řas ve výživě člověka.

Konzumace řas má bohatou historii ve východních přímořských zemích, hlavně v Japonsku. Přesto se konzumace rozšiřuje i do ostatních zemí. To souvisí s faktem, že se nejen odborná, ale i široká veřejnost v posledních letech zajímá o zdravý styl života a zkoumá nové kvalitní zdroje potravin.

Řasy jsou právě jedním z těchto zdrojů a zájmu veřejnosti vděčí svému nutričnímu složení. Řasy jsou významným zdrojem plnohodnotných proteinů, vitaminů a minerálních látek. Taktéž jsou bohaté na vlákninu. Naopak nízký je obsah lipidů a nízká je i energetická hodnota řas. To je v dnešní době velice důležité, neboť strava obyvatel rozvinutých zemí je charakteristická vysokým denním energetickým příjmem.

Přestože většina velkých obchodních řetězců nemá ve svém sortimentu produkty z řas, mohou si je obyvatelé České republiky zakoupit ve specializovaných prodejnách, případně formou internetového prodeje. Objevují se řasy sušené, v podobě vloček a plátků. Další možností jsou extrakty z řas ve formě tablet, které slouží jako doplněk stravy.

První kapitoly této bakalářské práce se zabývají obecnou charakteristikou řas. Podávají základní informace o vlastnostech, výskytu, využití, chemickém složení a o základním dělení řas. Následují kapitoly, které pojednávají o proteinech, nukleových kyselinách a o jejich zastoupení v řasách. V bakalářské práci jsou dále popsány metody stanovení proteinů a nukleových kyselin, které se používají při zkoumání nutričního složení řas.

## 1 ŘASY

Jsou to primárně autotrofní organizmy. Mezi řasami se objevují různě složité vývojové stupně, od jednobuněčných přes buněčné kolonie až k mnohobuněčným organizmům. Také jejich velikost je rozmanitá. Od  $\mu\text{m}$  u mikrořas až po desítky metrů u zástupců hnědých mořských řas. Tělo řas je tvořeno stélkou. Hlavními typy stélek jsou jednobuněčné, tri-chální, sifonální a pletivé. Stélka může být členěna na rhizoidy, fyloidy a kauloidy. Kořenovitý rhizoid přichycuje řasu k podkladu. Kauloid je stonkovitý útvar a nese listovité fyloidy. Fyloidy jsou místem fotosyntézy a mají zvětšenou plochu. [1-4]

Je známo přibližně 30 000 druhů řas. Vyskytují se skoro ve všech biotopech, ale přesto je většina druhů vázána na život ve vodě. Zde mohou obývat dno (bentos), nebo se vznášejí ve vodě v podobě planktonu. Řasy vylučováním kyslíku obnovují jeho množství ve vodě, a tím umožňují dýchání živočichů a život aerobních bakterií. Přijímáním a asimilací organických látek rozpuštěných ve vodě urychlují samočisticí proces vody. Některé řasy jsou v přírodě významné jako horninotvorné organizmy, kdy jejich stélky bývají inkrustovány solemi vápníku nebo křemíku. Obecně jsou řasy důležitým producentem organické hmoty. [2, 5]

Algologie a fykologie jsou termíny pro nauku o řasách. První termín je odvozen z latinského slova *algae* (bylinné a mořské řasy), druhý termín vznikl z řeckého slova *fykos* (keřovitě mořské řasy). [5]

### 1.1 Složení řas

#### 1.1.1 Sacharidy

Řasy obsahují velké množství polysacharidů. Zejména buněčná stěna je tvořena strukturálními polysacharidy, které jsou extrahovány a využívány při výrobě hydrokoloidů, které při rozpuštění ve vodě vytvářejí viskózní roztoky. Příkladem jsou algináty z hnědých řas, karragenany a agary z červených řas. Kromě strukturálních sacharidů obsahují také zásobní polysacharidy, příkladem je chryzolaminaran ( $\beta$ -1,3-glukan) v hnědých řasách, škrob v zelených a florideový škrob v červených řasách. [4, 6]

Tyto organizmy jsou bohatým zdrojem vlákniny. Celkový obsah vlákniny se pohybuje v rozmezí 33 až 50 % v sušině. Obsah vlákniny u některých druhů řas je vyšší než u většiny

druhů ovoce a zeleniny. V této souvislosti byly prokázány zdravotně prospěšné účinky konzumace řas. [6-7]

### 1.1.2 Lipidy

Lipidy představují pouze 1 – 5 % sušiny řas. Byl u nich zjištěn ideální poměr polynenasycených mastných kyselin (poměr  $\omega$ -3 a  $\omega$ -6 MK). Červené řasy mají vysoký obsah eikosapentaenové kyseliny, v zelených řasách převládá  $\alpha$ -linolenová kyselina. Hnědé řasy obsahují převážně kyselinu  $\alpha$ -linolenovou a olejovou. Modrozelené řasy obsahují značné množství kyseliny  $\gamma$ -linolenové. [6-7]

### 1.1.3 Proteiny

Mořské i sladkovodní řasy jsou známé vysokým obsahem proteinů. Podrobně o proteinech v řasách pojednává kapitola 2.1 v této bakalářské práci.

### 1.1.4 Vitaminy a minerální látky

Řasy jsou zdrojem vitaminů skupiny B, především vitamínu B<sub>12</sub>. Dále jsou hodnotným zdrojem vitamínu C, vyšší obsah byl stanoven u hnědých a zelených druhů řas. Značné je i množství vitamínu E. Hnědé řasy obsahují i  $\beta$ -tokoferol a  $\gamma$ -tokoferol, na rozdíl od řas červených a zelených, které obsahují pouze  $\alpha$ -tokoferol. [6]

Obsah minerálních látek je všeobecně vysoký (8 – 40 % sušiny). Jsou významným zdrojem jódu a vápníku. Dále obsahují značná množství železa, zinku, manganu a mědi. Některé zdroje uvádí, že vybraní zástupci řas, vzhledem k vysokému obsahu minerálních látek, by mohly být využívány jako doplněk stravy, který splňuje denní doporučené dávky některých makroelementů a stopových prvků. [6-7]

### 1.1.5 Ostatní složky

Mořské řasy jsou zvláště bohaté na karotenoidy, zejména hnědé řasy na fukoxantin, violaxantin a  $\beta$ -karoten, červené řasy na  $\beta$ -karoten,  $\alpha$ -karoten, zeaxantin a lutein, zelené pak na  $\beta$ -karoten, lutein, violaxantin, anteraxantin, zeaxantin a neoxantin. [6]

Chloroplasty řas obsahují fotosyntetické pigmenty. Všechny řasy obsahují chlorofyl *a* a většinou ještě jiný doplňkový chlorofyl (chlorofyl *b*, *c*, *d*). [5]

## 1.2 Využití řas

Řasy jsou využívány jako přísady v potravinářském a kosmetickém průmyslu, jako hnojivo i jako přísada do krmiv pro hospodářská zvířata. Řasy jsou také nedílnou součástí potravního řetězce ryb. Sklízí se buď volně rostoucí řasy, nebo řasy kultivované. Pěstování řas se v poslední době velmi rozšířilo, poněvadž přírodní zdroje nebyly schopny splnit požadavky trhu. Konzumace mořských řas je záležitostí převážně východních zemí, nedávno se ale tento trend rozšířil i do západních zemí, včetně Evropy. Řasy jsou k dostání ve formě tablet (doplňek stravy) nebo jako sušené stélky v podobě vloček, plátků. [9]

Roční světová produkce mořských řas činí asi  $8 \cdot 10^6$  tun (údaj z roku 2003). Největším producentem řas je Čína. Největším spotřebitelem je Japonsko, kde se udává spotřeba 1,6 kg na jednoho obyvatele za rok. [9-10]

## 1.3 Dělení řas

Systém řas je neustálený. Jedná se o nejednotnou a pestrou skupinu organizmů. Zástupci se liší kombinací fotosyntetických barviv, chemickým složením zásobních látek, morfologickou diferenciací stélek, atd. Nejzákladnějším dělením řas je dělení podle fotosyntetických barviv. [5]

### 1.3.1 Zelené řasy (Chlorophyta)

Zelené řasy představují druhově velmi početnou skupinu, existuje asi 8 000 druhů. Zahrnují jak jednobuněčné, tak i mnohobuněčné organizmy. Většina zelených řas žije ve sladkých vodách. V moři, převážně v blízkosti pobřeží, se vyskytují větší druhy zelených řas. Jsou známé i zástupci žijící na skalách, stromech nebo v půdě. Mohou žít také v symbióze s houbami a živočichy. [2, 5, 11]

Asimilačními barvivy jsou chlorofyly *a* a *b*, dále obsahují  $\beta$ -karoten a xantofyly. Zásobní látkou je především škrob, který se shromažďuje v chloroplastech nebo na pyrenoidu. Jako doplňkové zásobní látky se vyskytují mono- a disacharidy i jejich deriváty a polyfosfátová zrna (volutin). Buněčná stěna je zpravidla celulózní. [4, 12]

Typickým zástupcem je rod *Chlorella*. Z mořských druhů je využíván rod *Ulva*. [4, 9]

### 1.3.2 Hnědé řasy (Phaeophyta)

Je známo přibližně 1 800 druhů hnědých řas. Všichni zástupci této skupiny jsou mnohobuněční a většina z nich žije v mořích. Hnědé řasy jsou obzvláště časté v pobřežních oblastech s chladnou vodou. Některé hnědé řasy bývají vybaveny plovoucími útvary, které udržují fyloidy poblíž vodní hladiny. Velké druhy hnědých řas jsou známé pod pojmem chaluhy a jejich kauloidy mohou dosahovat až 60 m. [2, 13]

Fotosyntetická barviva tvoří chlorofyl *a* a *c*, dalšími barvivy jsou  $\beta$ -karoten, hnědý fukoxantin a jiné xantofyly. Zásobními látkami jsou chryzolaminaran, olej a manitol. Škrob se nevytváří. Buněčná stěna hnědých řas obsahuje algináty, látky gelového charakteru. [3, 13]

Potraviny z hnědých mořských řas pochází většinou z rodů *Laminaria* (*L. japonica*) a *Undaria* (*U. pinnatifida*). [9]

### 1.3.3 Červené řasy (Rodophyta)

Existuje přibližně 6 000 popsáných druhů červených řas. Žijí převážně v teplých mořích, jen málo druhů se nachází ve sladkých vodách. Mohou růst i ve větších hloubkách, protože jsou schopny využívat k fotosyntéze nepatrné množství světla, které již nestačí zeleným a hnědým řasám. [2-3, 5]

Obsahují kombinaci fotosyntetických barviv chlorofyl *a* a *d*. Dalšími barvivy v červených mořských řasách jsou  $\alpha$ - a  $\beta$ -karoten, fykobiliny – modrý fykokyanin a červený fykoerytrin. Výsledná barva chloroplastů závisí na poměru pigmentů. Může být modrozelená až po jasně červenou. Zástupci, kteří žijí ve velkých hloubkách, mohou být i černí. V menších hloubkách je typické jasně červené zbarvení a v mělké vodě převládá zelená barva, kdy je fykoerytrin maskován chlorofylem. [11, 13]

Zásobní látkou je florideový škrob. Buněčnou stěnu tvoří pektiny a jen z menší části celulóza. Povrch buňky je obalen silnou polysacharidovou stěnou, složenou z galaktanů – agaru a karagenanu. Tyto polysacharidy se průmyslově využívají na živná laboratorní média, v molekulární biologii a v potravinářství. [3, 14]

Potraviny z červených mořských řas pochází převážně z rodů *Porphyra* (*P. tenera*) a *Palmaria* (*P. palmata*). [9]

#### 1.3.4 Modrozelené řasy (Cyanophyta)

Sinice jsou prokaryotní, autotrofní organizmy. Je známo přibližně 2 000 druhů sinic. Na Zemi se sinice vyskytovaly již před 3 miliardami let a podílely se na nasycení praatmosféry kyslíkem. [3-4]

Sinice jsou téměř všudypřítomné organizmy, obývají většinu biotopů na Zemi. Vyskytují se nejčastěji ve sladkých vodách v planktonu, kde v důsledku zatížení povrchových vod nadměrným množstvím živin může dojít k jejich přemnožení, a vytváří tzv. vodní květ. Dále se vyskytují i v minerálních a termálních pramenech, v půdě, na kamenech, v pouštích i polárních oblastech. [3-4]

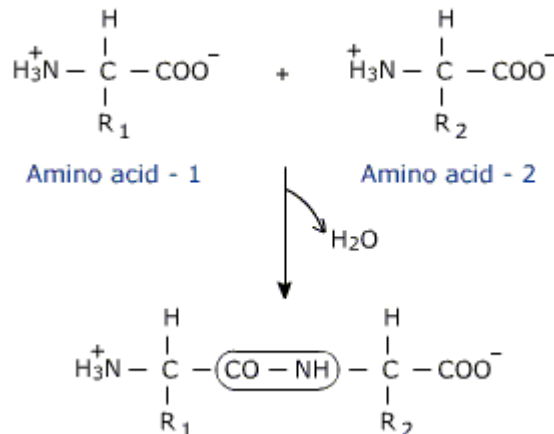
Obsahují pouze chlorofyl *a*, dále  $\beta$ -karoten, fykobiliny (fykokyanin a fykoerytrin). Jejich zbarvení je modrozelené. Hlavní zásobní látkou je sinicový škrob. [4]

Významným zástupcem sinic je rod *Spirulina* (*S. platensis*, *S. maxima*). [3]

## 2 PROTEINY

Název pochází z řeckého slova *proteois*, které znamená „první místo“. Podle biologické funkce v organismu lze proteiny rozdělit do několika skupin. Skupinami jsou strukturální proteiny, zásobní proteiny, transportní proteiny, regulační proteiny, receptorové proteiny, svalové proteiny, obranné a enzymatické proteiny. [13]

Základními stavebními jednotkami proteinů jsou aminokyseliny, které jsou navzájem vázány peptidovými vazbami. (Obr. 1) Ve své molekule proteiny obsahují více než 100 aminokyselin. Peptidová vazba vzniká mezi karboxylovou skupinou (-COOH) jedné aminokyseliny a aminovou skupinou (-NH<sub>2</sub>) druhé aminokyseliny. Kromě peptidových vazeb se na vytváření struktury proteinů podílejí ještě jiné vazby, zejména disulfidové, esterové a amidové. Na molekuly proteinů jsou dále vázány molekuly vody a různé anorganické ionty. Některé proteiny obsahují fyzikálně nebo chemicky vázané organické sloučeniny, například lipidy, sacharidy, nukleové kyseliny, aj. [1, 15-16]



Obr. 1. Vznik peptidové vazby [17]

Proteiny jsou tvořeny zpravidla dvaceti základními aminokyselinami. Těmito aminokyselinami jsou glycin, alanin, valin, leucin, izoleucin, kyselina asparagová, kyselina glutamová, asparagin, glutamin, serin, treonin, cystein, metionin, lyzin, arginin, fenylalanin, tyrozin, tryptofan, histidin a prolin. Jejich různou kombinací při spojení vznikají makromolekuly charakteristické a stálé pro jednotlivce a daný druh. [15]



Počet a pořadí aminokyselin v řetězci udává tzv. primární strukturu proteinů. Pod pojmem primární struktura proteinů se rozumí i údaje o charakteru základních peptidových vazeb, a o počtu, charakteru a poloze vedlejších kovalentních vazeb. Sekundární struktura si všímá pouze prostorového uspořádání atomů hlavního peptidového řetězce. Nejčastějším uspořádáním řetězce jsou helikální struktury vzniklé stočením řetězce, nebo jeho části kolem atomu  $C_{\alpha}$  do šroubovice (helixu). V přírodních proteinech se převážně vyskytují jen pravotočivé helixy, př.  $\alpha$ -helix. Dalšími běžnými sekundárními strukturami jsou  $\beta$ -struktury (tzv. skládaný list). Výsledný tvar molekuly, tedy prostorové uspořádání postranních řetězců, určuje terciární struktura. Příkladem jsou globulární (kulovité) proteiny nebo fibrilární (vláknité). Kvartérní strukturu vykazují jen některé proteiny. [1, 15-16]

Proteiny (spolu s lipidy a sacharidy) náleží k nejdůležitějším složkám lidské výživy. V organismu jsou proteiny, po hydrolýze na aminokyseliny, využívány k obnově a výstavbě tkání a také částečně jako zdroj energie. Minimální denní potřeba plnohodnotného proteinu je u dospělého člověka 0,5 – 0,6 g na kg tělesné hmotnosti. Při nižším příjmu mohou nastat zdravotní poruchy. Proto se jako běžně doporučovaná dávka označuje množství 1,0 – 1,2 g na kg tělesné hmotnosti. Energetická výtěžnost proteinů je  $17 \text{ kJ} \cdot \text{g}^{-1}$ . Proteiny by měly tvořit 10 – 15 % celkového denního energetického příjmu. [16]

Pro lidskou výživu se proteiny získávají z různých zdrojů. Jedná se především o proteiny potravin živočišného původu (maso, mléko, vejce) a rostlinného původu (obiloviny, luštěniny). V poslední době jsou potenciálním zdrojem proteinů pro lidskou výživu také některé netradiční zdroje, například řasy. [16]

## 2.1 Obsah proteinů v řasách

Obsah proteinů v řasách se liší v závislosti na druhu. Platí, že proteinová složka hnědých řas je nízká (3 – 15 % v sušině) ve srovnání s řasami zelenými a červenými (10 – 47 %). Dalším limitem pro obsah proteinů v řasách je například roční období, oblast původu, zralost řasy, nebo podmínky prostředí, ve kterém se vyskytují. [6, 10, 18-19]

Proteiny u většiny řas jsou plnohodnotné, tedy obsahují všechny esenciální aminokyseliny. Celkové množství aminokyselin i zastoupení jednotlivých AMK se také mění v závislosti na výše jmenovaných faktorech. Mezi nejvíce obsažené esenciální aminokyseliny ve většině řas patří arginin, kyselina asparagová a glutamová (Arg, Asp a Glu). [7]

Tato kapitola dále pojednává o jednotlivých zástupcích mořských a sladkovodních řas. Byly vybrány ty druhy, které jsou ve své kategorii (zelené, hnědé, červené a modrozelené řasy) významné, co se týče obsahu proteinů. U každého zástupce je znázorněno taxonomické zařazení, stručná charakteristika, obsah proteinů a obrázek.

### 2.1.1 *Porphyra tenera*

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Rostliny (Plantae)

Oddělení: Ruduchy – Rhodophyta

Třída: Bangiophyceae

Řád: Bangiales

Rod: *Porphyra*

Druh: *P. tenera* [20]

*Porphyra tenera* (Obr. 2) je zástupcem červených mořských řas. Je známá pod pojmem „nori“. Je to řasa drobná (20 cm), nepravidelného tvaru a purpurově-červeného zbarvení. Nori se nachází ve většině mírných přílivových oblastech na celém světě. *Porphyra tenera* se suší a zpracovává na tenké purpurově-černé listy. Nejčastěji se používá v Japonsku pro výrobu sushi, dále jako přísada do polévek, vývarů a omáček. [9, 21]

Je známá svým obsahem proteinů, 25 až 35 % v sušině. Některé studie uvádí až 47 %. [10, 21]



Obr. 2. *Porphyra tenera* [21]

### 2.1.2 *Palmaria palmata*

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Rostliny (Plantae)

Oddělení: Ruduchy – Rhodophyta

Třída: Florideophyceae

Řád: Palmariales

Rod: *Palmaria*

Druh: *P. palmata* [20]

*Palmaria palmata* (Obr. 3) je dalším zástupcem červených mořských řas a nese označení „dulse“. Je méně používaná pro konzumaci než předchozí *Porphyra tenera*. Stélka je kožovitého vzhledu, zploštělá a zbarvená rudohnědě. Délka se pohybuje do 30 cm. [2, 9]

Z testování, které probíhalo po celý rok 1996, bylo zjištěno, že obsah proteinů této řasy je ovlivněn ročním obdobím. V průběhu roku se množství proteinů pohybovalo mezi hodnotami 9,7 a 25,5 % v sušině. Průměrná hodnota byla 18,3 %. Nejvyšší hodnoty pak byly zaznamenány v období zimy a brzkého jara. Naopak nejnižší hodnoty byly stanoveny u řas, které byly sesbírány v letních a podzimních měsících. Některé studie uvádí vyšší hodnoty proteinů v řase *P. palmata*, až 35 % v sušině. [10, 22]

Během studie byl také prokázán vztah mezi obsahem dusíkatých látek v mořské vodě a mezi obsahem proteinů v řase. Když byl zaznamenán vysoký obsah proteinů v řase, byly zjištěny také vyšší obsahy živin ve vodě, a naopak. [22]



Obr. 3. *Palmaria palmata* [2]

### 2.1.3 *Laminaria* sp.

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Chromista – Chromalveolata

Oddělení: Heterokontophyta

Třída: Hnědé řasy – Phaeophyceae

Řád: Laminariales

Rod: *Laminaria*,

Druh: *L. japonica*, *L. longissima*, *L. angustata* [20]

„Kombu“ je japonský název pro sušené mořské řasy, které jsou směsí různých druhů řas rodu *Laminaria*. Patří mezi ně například *L. japonica* (Obr. 4), *L. longissima*, *L. angustata*, *L. coriacea* a *L. ochotensis*. Tyto druhy hnědých mořských řas rostou na skalách a útesech v sublitorální zóně. Dávají přednost klidné vodě při teplotách mezi 3 ° až 20 °C. Zbarvení stélky je hnědé s tmavozeleným nádechem. Dosahují velikosti až 3 m. [9]

Kombu se používá do omáček, polévek i jako přísada při přípravě rýže a masa. Práškový produkt Kombu se používá k výrobě zeleného čaje. [9]

Rod *Laminaria* obsahuje přibližně 8 % proteinů. [7]



Obr. 4. *Laminaria japonica* [23]

#### 2.1.4 *Undaria pinnatifida*

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Chromista – Chromalveolata

Oddělení: Heterokontophyta

Třída: Hnědé řasy – Phaeophyceae

Řád: Laminariales

Rod: *Undaria*

Druh: *U. pinnatifida* [20]

*Undaria pinnatifida* (Obr. 5), známá pod názvem „wakame“, je dalším zástupcem hnědých mořských řas. Běžně dosahuje délky 1 až 2 m. Zbarvení stélky je nažloutlé až tmavě hnědé. Wakame se vyskytuje na skalnatém pobřeží a zátokách v mírných pásmech Japonska, Korejské republiky a Číny. Nejlépe se této řase daří při teplotách od 5 ° do 15 °C. [2, 9]

*Undaria pinnatifida* se používá hlavně jako přísada do instantních potravin. [9]

Hnědé řasy jsou známy nízkým obsahem proteinů. Výjimkou je právě *Undaria pinnatifida*, která obsahuje v sušině 11 – 24 % proteinů. [10]



Obr. 5. *Undaria pinnatifida* [2]

### 2.1.5 *Ulva* sp.

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Rostliny (Plantae)

Oddělení: Heterokontophyta

Třída: Ulvophyceae

Řád: Ulvales

Rod: *Ulva*

Druh: *U. pertusa*, *U. lactuca* [20]

V Japonsku jsou druhy, které patří do rodu *Ulva*, konzumovány pod názvem „ao-nori“. Součástí směsi ao-nori jsou i další zelené řasy (*Monostroma latissimum*, *Enteromorpha prolifera*) [24]

Rod *Ulva* se využívá jako přísada do polévek a salátů. Nejznámější a často potravinářsky využívaný je druh *Ulva lactuca* (Obr. 6). [24]

Vyšší obsah proteinů mezi zástupci zelených řas byl zaznamenán u druhu *Ulva pertusa*, 20 – 26 % proteinů v sušině. Rod *Ulva* má všeobecně 10 – 26 % proteinů. [10]



Obr. 6. *Ulva lactuca* [25]

### 2.1.6 *Chlorella* sp

Doména: Eukarya (Eucarya)

Říše: Rostliny (Plantae)

Oddělení: Heterokontophyta

Třída: Trebouxiophyceae

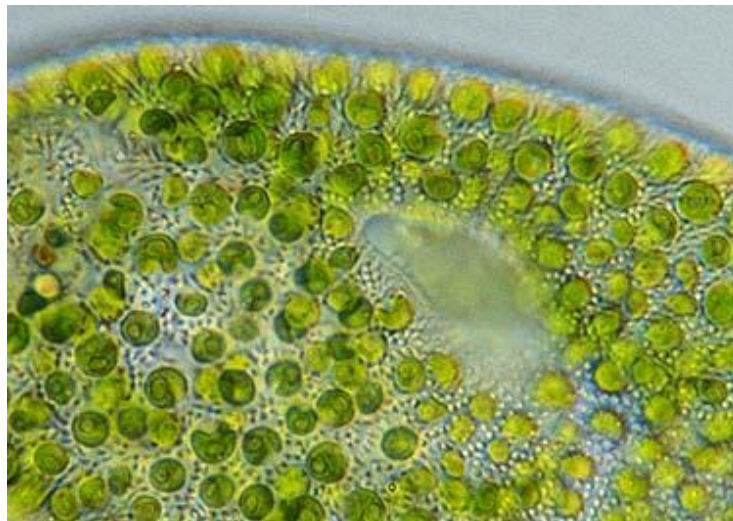
Řád: Chlorellales

Rod: *Chlorella*

Druh: *Ch. pyrenoidosa*, *Ch. vulgaris* [20]

*Chlorella* (Obr. 7) je jednobuněčná sladkovodní řasa, zástupce zelených druhů řas. Jedná se nejčastěji o kulovité buňky o průměru 3 – 8  $\mu\text{m}$ . Růst řasy *Chlorella* je za vhodných podmínek velmi rychlý, proto je často využívána jako testovací organizmus v genetice, toxikologii nebo alergologii. [4, 26]

Je bohatým zdrojem proteinů, s vyváženým poměrem esenciálních aminokyselin. Obsah proteinů v řase *Chlorella* se pohybuje v rozmezí od 30 do 60 % v sušině. [27-28]



Obr. 7. *Chlorella* [28]

### 2.1.7 *Spirulina* sp

Doména: Bakterie (Bacteria)

Oddělení: Sinice – Cyanobacteria (syn. Cyanophyta)

Třída: Cyanophyceae

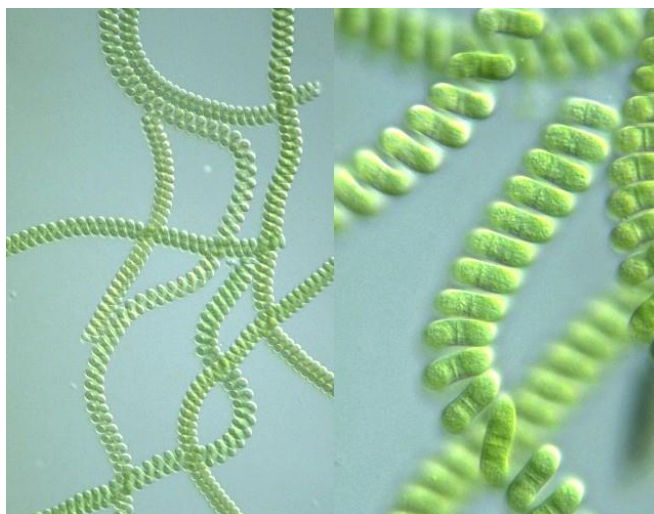
Řád: Oscillatoriales

Rod: *Arthrospira* (*Spirulina*)

Druh: *S. pacifica*, *S. platensis* [20]

*Spirulina* je zástupcem sinic. Je všudypřítomným organizmem, vyskytuje se v zemině, pís-ku, slané i sladké vodě. Nejlépe se jí daří ve vodách se zásaditým prostředím, jezerech v teplých, tropických oblastech. *Spirulina* dosahuje velikosti průměrně 1  $\mu\text{m}$ . Je tvořena vlákny svinutými do spirál. Buněčná stěna sinice *Spirulina* není tvořena celulózou, ale vrstvou mureinu, což zajišťuje dobrou stravitelnost. *Spirulina* je dostupná ve formě tablet jako doplněk stravy. [29]

*Spirulina* je známá pro mimořádný obsah proteinů, jejichž obsah se pohybuje v rozmezí od 50 do 70 % v sušině. Konkrétně 56 – 77 % u *S. platensis* (Obr. 8) a 60 – 71 % u *S. maxima*. U těchto druhů byla ověřena závislost obsahu proteinů na konkrétním čase sklizně. Rozdíl mezi obsahem proteinů činil až 15 %. Nejvyšší hodnoty byly zaznamenány u vzorků, které byly sklizeny při brzkém denním světle. *Spirulina* je opět plnohodnotným zdrojem protei-nů. [29-30]



Obr. 8. *Spirulina platensis* [31]



### 2.1.8 Srovnání obsahu proteinů u vybraných zástupců řas

Následující tabulka (Tab. 1) udává obsah proteinů u vybraných zástupců řas a přehledně znázorňuje odlišný obsah proteinů v závislosti na zařazení druhů řas do jednotlivých skupin. Z tabulky je patrné, že velké rozdíly hodnot v obsahu proteinů nejsou jenom mezi různými skupinami řas, ale také u řas stejných skupin.

Lze shrnout, že nejvyšší obsah proteinů je typický pro zástupce sladkovodních druhů řas (*Chlorella*, *Spirulina*). Mezi mořskými druhy byly zaznamenány vyšší hodnoty proteinů u zástupců červených řas (*Porphyra tenera*).

Tab. 1. Obsah proteinů u vybraných zástupců řas

skupina	rod, druh	obsah proteinů [%]
červené řasy	<i>Porphyra tenera</i> <sup>10, 21</sup>	25 – 35 (max. 47)
	<i>Palmaria palmata</i> <sup>10, 22</sup>	10 – 25 (max. 35)
hnědé řasy	<i>Undaria pinnatifida</i> <sup>10</sup>	11 – 24
	<i>Laminaria</i> sp. <sup>7</sup>	8
zelené řasy	<i>Ulva</i> sp. <sup>10</sup>	10 – 26
	<i>Chlorella</i> sp. <sup>27</sup>	30 – 60
modrozelené řasy	<i>Spirulina</i> sp. <sup>29-30</sup>	50 – 70

### 3 NUKLEOVÉ KYSELINY

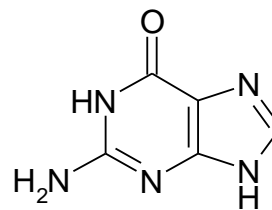
Základní stavební jednotkou každé nukleové kyseliny je nukleotid. Nukleotid je nízkomolekulární sloučenina sestávající ze tří základních složek: [11]

- dusíkaté cyklické báze

- purinové báze: adenin (Obr. 9) a guanin (Obr. 10)

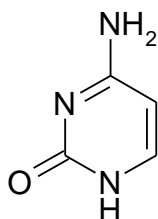


Obr. 9. Adenin

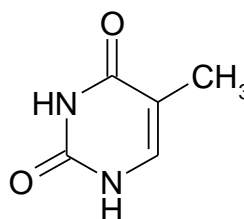


Obr. 10. Guanin

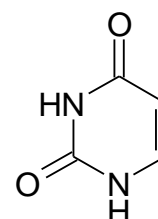
- pyrimidinové báze: cytozin (Obr. 11), tymin (Obr. 12), uracil (Obr. 13)



Obr. 11. Cytozin

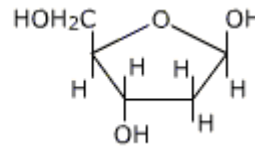
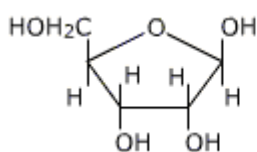


Obr. 12. Tymin



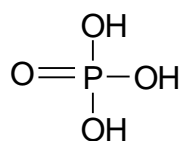
Obr. 13. Uracil

- pentózy:  $\beta$ -D-ribóza, 2-deoxy- $\beta$ -D-ribóza (Obr. 14)



Obr. 14.  $\beta$ -D-ribóza a 2-deoxy- $\beta$ -D-ribóza [32]

- kyseliny trihydrogenfosforečné (Obr. 15)



Obr. 15. Kyselina trihydrogenfosforečná

### 3.1 Deoxyribonukleová kyselina

Deoxyribonukleová kyselina (DNA) je složena z 2-deoxy- $\beta$ -D-ribózy, kyseliny fosforečné a dusíkatých bází, kterými jsou adenin, guanin, cytozin a thymin. Molekulu DNA vytváří dva polynukleotidové řetězce, které se otáčejí kolem společné osy v podobě dvoušroubovice, kdy jsou oba řetězce k sobě vázány vodíkovými vazbami mezi tzv. komplementárními bázemi. U virů je možné se setkat jak s dvouřetězcovou, tak i jednořetězcovou DNA. [1, 11, 15]

Komplementárními bázemi jsou adenin s thyminem, které jsou spojeny dvěma vodíkovými vazbami. Druhou dvojicí je guanin a cytozin, které jsou spojeny třemi vodíkovými vazbami. Díky velkému množství vodíkových vazeb je dvoušroubovice relativně stabilní útvar. [11]

DNA je nositelkou genetické informace o všech fyziologických a morfologických vlastnostech organismu. Genetická informace je obsažena ve sledu nukleotidů. Každá z 20 kódovaných aminokyselin, ze kterých se v buňkách syntetizují proteiny, je kódovaná třemi po sobě jdoucími bázemi, tzv. tripletem, který je označován názvem kodon. [3, 11]

DNA je přítomna v chromozomech a bývá označována jako chromozomová DNA. Kromě chromozomové DNA se v prokaryotických buňkách vyskytují malé kružnicové molekuly DNA, plazmidy. V eukaryotických buňkách pak mitochondriální a plastidová DNA. Tyto typy DNA ale nejsou nezbytné pro existenci buňky. [3, 11]

### 3.2 Ribonukleová kyselina

Ribonukleová kyselina (RNA) je složena z  $\beta$ -D-ribózy, kyseliny fosforečné a dusíkatých bází adeninu, guaninu, cytozinu a uracilu. RNA tvoří pouze jedna spirála polynukleotidového řetězce. Některé skupiny virů obsahují i dvouřetězcovou RNA. [1, 3]

Podle funkce a výskytu se rozeznávají tři druhy RNA: mediátorová, transferová a ribozomová. Mediátorová RNA (m-RNA) nese přepis genetické informace obsažené ve strukturálních genech a slouží jako matrice pro syntézu polypeptidového řetězce na ribozomu. Transferová RNA (t-RNA) se vyskytuje v cytoplazmě a přenáší stavební jednotky proteinů na ribozomy. Ribozomová RNA (r-RNA) spolu s proteiny tvoří ribozomy, na kterých probíhá proteosyntéza. [3, 11]

Příjem nukleových kyselin je důležitým bodem ve výživě člověka. Nukleové kyseliny jsou rozkládány enzymem nukleázou. Purinové báze (adenin a guanin) se v průběhu degradačních biochemických pochodů rozkládají na kyselinu močovou. Dlouhodobý výrazný vzestup hladiny kyseliny močové v plazmě může způsobit tvorbu ledvinových kamenů a onemocnění dnu. Jako optimální denní příjem nukleových kyselin potravou je pro dospělého člověka určena dávka 4 g. Poměr obou typů nukleových kyselin bývá nejčastěji 1 : 3, případně 1 : 4 ve prospěch RNA. Přitom RNA produkuje třikrát více kyseliny močové než DNA. [29]

### 3.3 Obsah nukleových kyselin v řasách

Vysoký obsah nukleových kyselin v řasách je typický pro zástupce sladkovodních druhů řas. Zastoupení nukleových kyselin v mořských řasách je v porovnání s nimi zanedbatelné. Obsah nukleových kyselin u vybraných zástupců mořských řas (mezi nimi zástupci rodů *Ulva*, *Porphyra*, *Laminaria*) se pohyboval v rozmezí od 0,06 po 1,62 % v sušině. [33]

#### 3.3.1 *Chlorella* sp., *Spirulina* sp.

Nejvyšší obsah nukleových kyselin v řasách byl zaznamenán především u zástupců řas rodu *Chlorella* a *Spirulina*. Procentuální zastoupení nukleových kyselin v sušině sladkovodních řas udává následující tabulka (Tab. 2). Pro srovnání je uveden obsah nukleových kyselin v droždí (*Saccharomyces cerevisiae*). [34]

Tab. 2. Obsah nukleových kyselin v řasách [34]

druh	obsah NK v sušině [%]
<i>Chlorella vulgaris</i>	4 – 5
<i>Spirulina platensis</i>	2 – 5
<i>Spirulina maxima</i>	3 – 4,5
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	9 – 22

U druhů *Spirulina* (*S. maxima* a *S. platensis*) byl zkoumán poměr zastoupení obou typů nukleových kyselin a prokázán nižší obsah DNA. Obsah ribonukleové kyseliny byl stanoven na 2,2 až 3,5 % v sušině. Kyselina deoxyribonukleová byla zastoupena v rozmezí od 0,6 po 1 % v sušině. [29]

## 4 STANOVENÍ PROTEINŮ

Nejčastěji používanou metodou pro stanovení proteinů v řasách je metoda dle Kjeldahla. Nevýhodou Kjeldahlovy metody je potřeba velkého množství vzorků řas i to, že stanovení celkového dusíku v mnoha případech zahrnuje neproteinové dusíkaté složky. Tato skutečnost může přinést příliš vysoký odhad proteinů. [27, 35]

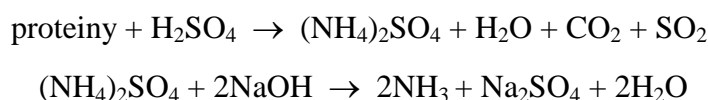
Dalšími běžně používanými metodami pro stanovení obsahu proteinů jsou biuretová metoda, metoda BCA, Lowryho metoda a metoda dle Bradfordové. Pro posouzení čistoty proteinů a k rozlišení proteinů na základě jejich molekulové hmotnosti se používá metoda SDS-PAGE. [35-36, 44]

### 4.1 Kjeldahlova metoda

Tato analytická metoda byla vypracována v roce 1883 dánským chemikem Johanem Kjeldahlem. Od té doby prošla mnoha změnami, ale podstata metody zůstala. Je použitelná pro celou řadu organických látek, včetně surovin, přísad i hotových výrobků. [36-37]

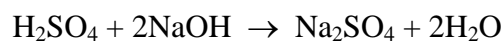
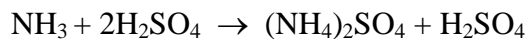
Podstatou metody je mineralizace dusíkatých sloučenin v analyzovaném vzorku varem s koncentrovanou kyselinou sírovou. Množství kyseliny je ovlivněno velikostí vzorku a také množstvím uhlíku, vodíku i dusíku ve vzorku. Mineralizace probíhá v teplotním rozmezí 370 až 410 °C a urychluje se přidávkem oxidačních látek jako je H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, KMnO<sub>4</sub>, katalyzátorů jako Hg, CuO, Se, případně směsí K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>, HgO, V<sub>2</sub>O<sub>5</sub>. K urychlení mineralizace se používají také látky, které zvyšují teplotu varu kyseliny sírové (K<sub>2</sub>SO<sub>4</sub>). [37-38]

Dusíkaté látky jsou převedeny na amonné ionty a jsou vázány ve formě síranu amonného. Po mineralizaci je přidán hydroxid sodný. V alkalickém prostředí se z mineralizovaného vzorku uvolní amoniak, který se kvantitativně předestiluje s vodní parou do předlohy, kde je nadbytečné množství kyseliny sírové o předem známém množství. [37]

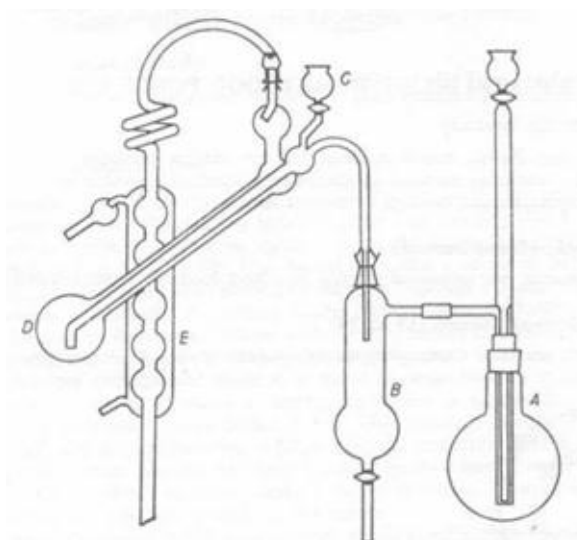


Po ukončení destilace se přebytek kyseliny sírové titruje odměrným roztokem hydroxidu sodného na indikátor metylčerveň nebo Tashirův indikátor (metylčerveň + metylenová

modř). Z množství spotřebované kyseliny sírové je vypočten obsah dusíku v analyzovaném vzorku. [37, 39]



Kritickými body této metody jsou teplota, doba mineralizace a také množství koncentrované kyseliny sírové. Dále je vhodné vyvarovat se vzorkům velkých rozměrů. Průměrná doba stanovení celkového dusíku dle Kjeldahla jsou 2 až 3 hodiny (70 až 90 minut pro mineralizaci, 30 až 40 minut pro chlazení a 5 až 10 minut pro destilaci a titraci). [36]



A – vyvíječ vodní páry, B – kondenzační baňka, C – nálevka,  
D – destilační baňka, E – chladič

*Obr. 16. Destilační aparatura dle Parnas Wagnera [38]*

V důsledku technických inovací jsou v současné době dostupné a používané poloautomatizované nebo plně automatizované systémy pro analýzu proteinů. Tyto systémy jsou založeny na principu Kjeldahlovy metody. Příkladem je destilační přístroj Pro-Nitro (Obr. 17). [37]



Obr. 17. Přístroj Pro-Nitro [40]

Pomocí Kjeldahlovy metody je stanoven celkový dusík v analyzovaném vzorku, tedy suma proteinového i neproteinového dusíku. Z tohoto důvodu Kjeldahlova metoda obvykle udává vyšší hodnoty proteinů, než které jsou ve vzorku skutečně přítomny. Přibližný obsah proteinů je možno určit pomocí přepočítacího koeficientu. Pokud se ale jedná o vzorek s vysokým podílem neproteinového dusíku, stanovené hodnoty jsou velice nepřesné. Tomu lze předejít stanovením hodnoty neproteinového dusíku a tu odečíst od celkového obsahu dusíku. Neproteinový dusík je možno stanovit ve filtrátu po odstranění proteinů pomocí např. kyseliny trichloroctové. [36, 39]

Průměrné procento dusíku u živočišných proteinů je 16 %, u rostlinných méně jak 16 %. Obecný přepočítací koeficient pro převod stanoveného dusíku na proteiny činí šestnáctinu jednoho sta, tedy 6,25. Použití tohoto faktoru je ale možné pouze za předpokladu, že analyzované vzorky obsahují nevýznamné množství neproteinového dusíku. Týká se to tedy především živočišných proteinů. [41]

Řasy mohou obsahovat vysoké koncentrace neproteinového dusíku, například v pigmentech (chlorofyl, fykoerytrin), nukleových kyselinách, volných aminokyselinách nebo ve formě anorganického dusíku (dusičnany, dusitany, amoniak). Použití faktoru 6,25 u těchto organismů je nevhodné, neboť výsledné obsahy proteinů jsou nadhodnocené. [7, 42]

Přepočítací koeficienty pro různé druhy řas byly stanoveny v rozmezí od 3,75 do 5,72. Větší podíl neproteinového dusíku byl zjištěn u červených řas. Průměrný přepočítávací faktor pro červené řasy je 4,59. Pro zelené řasy platí průměrná hodnota 5,13 a hnědé řasy 5,38. Pro sinice je doporučený přepočítací koeficient 5,95. [42-43]

## 4.2 Kolorimetrické metody

Dalšími metodami využívanými pro stanovení proteinů v řasách jsou kolorimetrické metody, jejichž postupy jsou rychlejší, jednodušší a méně pracné, než metody založené na odhadu obsahu celkového dusíku. [36]

Cílem je vybrat metodu, která vyžaduje nejméně manipulace a nevyžaduje důkladné předčištění vzorků z důvodu přítomnosti látek, které mohou stanovení rušit. Právě dezintegrace vzorku představuje riziko určení přesného obsahu proteinů ve vzorcích. Je známo, že mletí buněčné suspenze v přítomnosti skleněných kuliček nebo jiných jemných keramických částic, je jednou z neúčinnějších metod uvolňování intracelulárních proteinů. Další účinnou metodou je narušení buněk ultrazvukem. [36, 43]

Kolorimetrické metody využívají chemická činidla, která reagují s proteiny za vzniku barevných produktů, které jsou spektrofotometricky měřeny. Zbarvení vzorků je srovnáváno se standardními křivkami. Ty byly vytvořeny se známými proteiny za účelem stanovení koncentrace proteinů v neznámém vzorku. Při stanovení proteinů v řasách je nejčastěji jako standardní vzorek používán hovězí sérumalbumin (BSA). [35-36]

### 4.2.1 Biuretová metoda

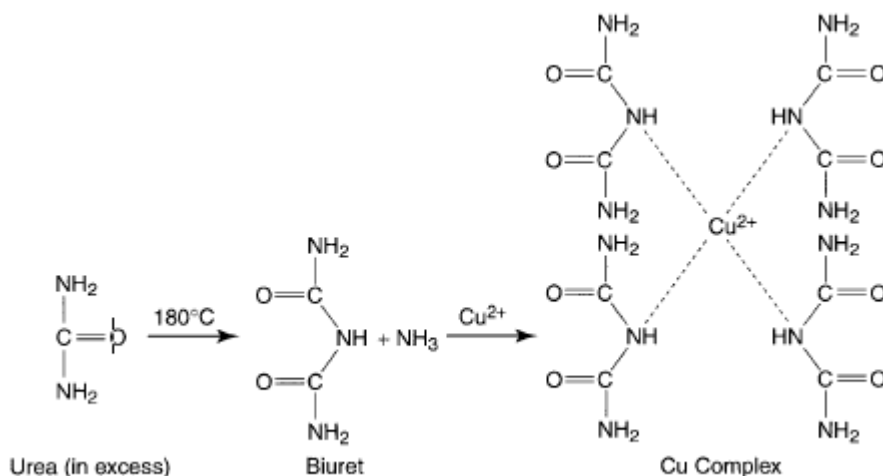
V roce 1914 E. Riegler představil biuretovou reakci jako metodu pro stanovení koncentrace albuminu v moči. Metoda je pojmenovaná podle sloučeniny biuretu, která vzniká tavením močoviny při odštěpení amoniaku a představuje peptidovou vazbu. [36]

Biuretová metoda je vhodnou metodou pro stanovení celkové koncentrace proteinů ve vzorcích s vysokým obsahem proteinů a nezávisí na aminokyselinovém složení. [36]

Biuretová metoda je založena na chelataci měďnatého iontu imidovými strukturami proteinu izolovanými v silně alkalickém prostředí za vzniku barevného komplexu. Jednotlivé aminokyseliny nebo dipeptidy nereagují, ale tripeptidy a větší polypeptidy nebo proteiny reagují za vzniku světlé modrého až fialového komplexu. Změna zbarvení je způsobena



redukcí měďnatého ( $\text{Cu}^{\text{II}}$ ) iontu na měďný ( $\text{Cu}^{\text{I}}$ ). Vzniklý komplex absorbuje světlo při 540 (550) nm. Intenzita zbarvení je přímo úměrná počtu peptidových vazeb, které se reakce účastnily. [36-37, 39]



Obr. 18. Schéma biuretové metody [36]

#### 4.2.2 Lowryho metoda

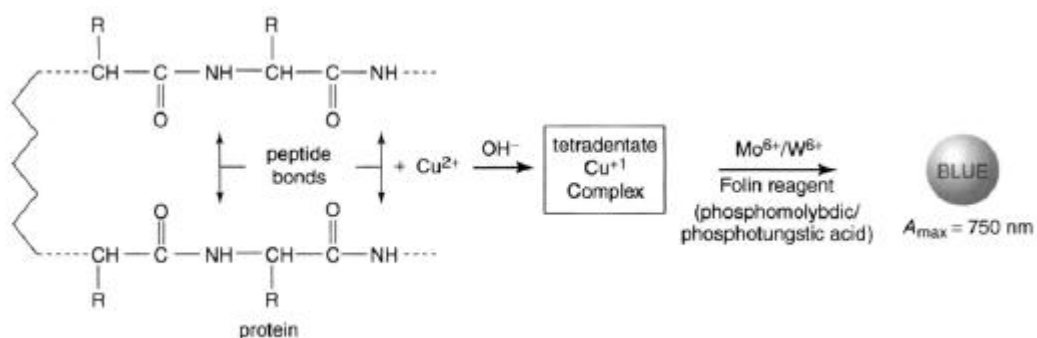
V roce 1951, Oliver H. Lowry představil kolorimetrickou metodu stanovující celkový obsah proteinů. Ve své podstatě je rozšířením metody stanovení proteinů biuretovou reakcí. Lowryho metoda je snadná k provedení, jelikož se provádí při pokojové teplotě a stanovení je dostatečně citlivé i pro malé koncentrace vzorků. [36]

Lowryho metoda je založena na interakci proteinů s měďnatými ionty (biuretová metoda) za vzniku světle modrého komplexu. Po inkubaci je přidáno fenolové činidlo (Folin-Ciocalteu), které obsahuje kyselinu fosfomolybdenovou a fosfowolframovou. Tyto se redukují zbytky proteinů (Tyr, Trp, Cys) a poskytují sytě modré zbarvení. [36, 39, 44]

Zbarvení je měřeno na spektrofotometru při 750 nm. [45]

Nevýhodou této metody je citlivost na změny pH. Pro reakci je nutné dodržet zásadité prostředí (pH 10,0 – 10,5). Tato metoda může být negativně ovlivněna přítomností některých látek (např. vysokou koncentrací sacharózy), které se v biologických materiálech vyskytují a způsobují nepřesnosti výsledných hodnot. Zbarvení není přímo úměrné koncentraci pro-

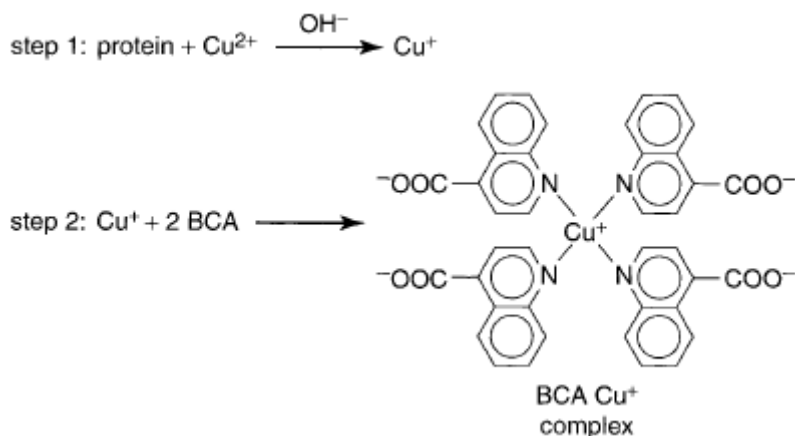
teinů. Intenzita zbarvení je ovlivněna nejen koncentrací proteinů, ale i zastoupením jednotlivých AMK. Přes všechny tyto negativa je Lowryho metoda široce používána. [37, 45]



Obr. 19. Schéma reakcí Lowryho metody [36]

#### 4.2.3 Bicinchoninová metoda (BCA)

Tato metoda byla prezentována v roce 1985 P. K. Smithem. Metoda BCA využívá kyseliny bicinchoninové ke spektrofotometrickému stanovení celkových proteinů. Je založena na redukci měďnatého iontu na mědný proteinem v alkalickém prostředí. Následuje chelatace měďného iontu kyselinou bicinchoninovou za vzniku fialového barevného komplexu. Komplex mědi a bicinchoninové kyseliny vykazuje absorpční při 562 nm. Je to velmi citlivá metoda. [36, 39]

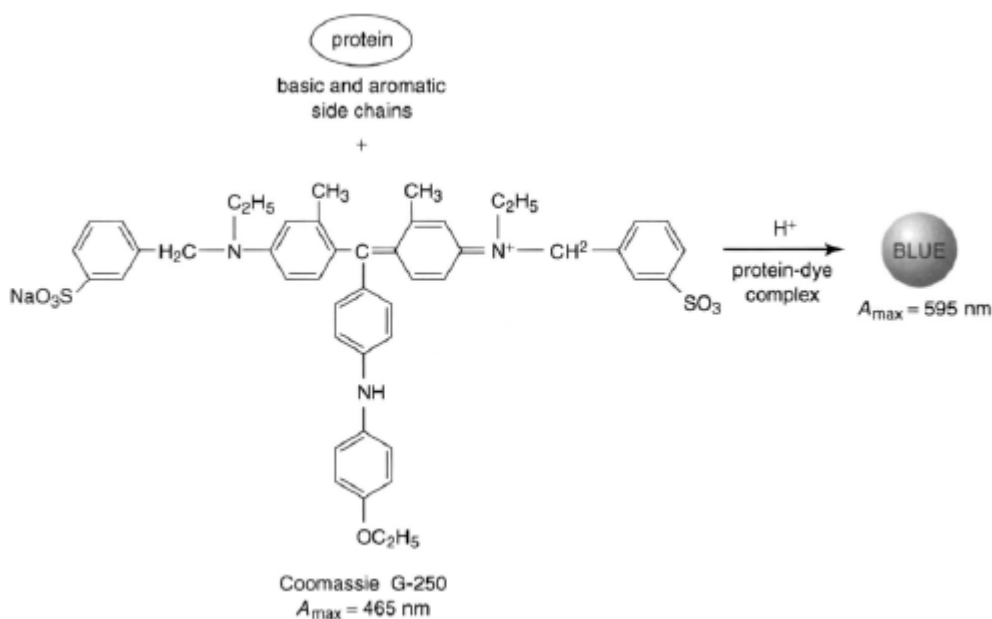


Obr. 20. Schéma metody BCA [36]

#### 4.2.4 Metoda dle Bradfordové

Marion Bradford představila tuto metodu v roce 1976. Barvivo Coomassie Brilliant blue G250 se váže na proteinové molekuly v kyselém prostředí dvěma způsoby. Trifenylmetanová skupina se váže na nepolární části proteinu, a anionsulfoskupina na bazické skupiny ve vedlejších řetězcích aminokyselin. Po vazbě barviva na proteiny dochází k barevné změně, která je úměrná množství proteinu. [36]

Metoda je založena na poznatku, že Coomassie Brilliant blue G-250 existuje ve dvou barevných formách – červené a modré. Červená je převedena na modrou formu při vázání barviva na proteiny. Intenzita zbarvení je ovlivněna přítomností proteinových zbytků (Arg, Lys, His). Vazba barviva na proteiny je velmi rychlý proces (asi 2 min). Měří se spektrofotometricky v oblasti 595 nm. [36, 39, 46]

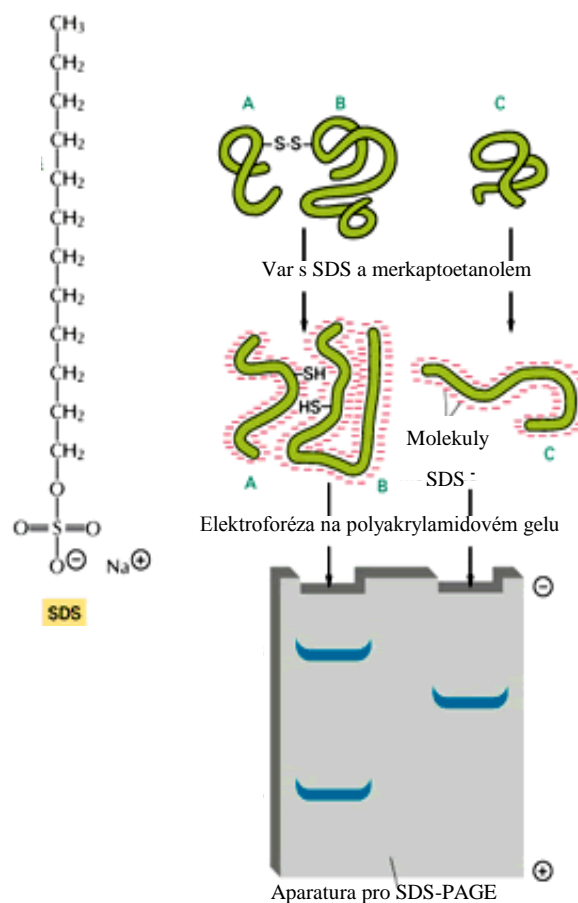


Obr. 21. Schéma metody dle Bradfordové [36]

### 4.3 SDS-PAGE

SDS-PAGE je označení pro gelovou elektroforézu s využitím polyakrylamidového gelu. SDS je zkratka pro dodecylsulfát sodný, který se používá pro denaturaci proteinů. Metoda SDS-PAGE se široce používá k posouzení čistoty izolovaných proteinů a hlavně jako metoda k oddělení proteinů podle molekulové hmotnosti. [44]

Princip metody (Obr. 22) je založen na separaci proteinů na základě odlišné molekulové hmotnosti. K rozlišení dochází při průchodu proteinů skrz polyakrylamidový gel, který je umístěn v elektrickém poli. [44]



Obr. 22. Princip metody SDS-PAGE [47]

## 5 METODY STANOVENÍ NUKLEOVÝCH KYSELIN

### 5.1 Spektrální stanovení nukleových kyselin

Nukleové kyseliny absorbují záření v ultrafialové oblasti, maximum absorpce je při 260 – 265 nm. Spektrální stanovení v UV oblasti je rychlou, snadno proveditelnou a velmi často používanou metodou pro stanovení obsahu nukleových kyselin v řasách. [37, 39]

Toto stanovení může být rušeno přítomností proteinů a aromatických látek. Proteiny absorbují záření při 280 nm. U preparátů obsahujících značné množství proteinů se využívá pro stanovení nukleových kyselin porovnání absorbancí  $A_{280}/A_{260}$ . [39]

### 5.2 Stanovení nukleových kyselin – kolorimetrické metody

#### 5.2.1 Stanovení DNA

Množství deoxyribonukleové kyseliny lze stanovit na základě reakce deoxyribózy s cysteinem. Deoxyribóza reaguje s cysteinem v prostředí kyseliny sírové za vzniku růžového zbarvení, jehož intenzita je spektrofotometricky měřena při 490 nm. Koncentrace DNA se zjistí z kalibrační křivky, která byla sestrojena se standardními roztoky deoxyribonukleové kyseliny. [39]

Další možnou metodou je stanovení koncentrace DNA na základě reakce deoxyribózy s difenylaminem. V přítomnosti kyseliny chlorovodíkové vzniká při reakci deoxyribózy s difenylaminem modře zbarvený produkt. Absorbance vzniklého produktu, měřená při 595 nm, je úměrná množství vázané deoxyribózy, tedy i koncentraci DNA. [39]

#### 5.2.2 Stanovení RNA

Na stejném principu, tedy reakce sacharidu, je založeno i stanovení ribonukleové kyseliny. Ribóza reaguje s orcinem (5-metylrezorcin) v přítomnosti chloridu železitého a kyseliny chlorovodíkové. Touto reakcí vzniká zeleně zbarvený produkt, který je měřen při 670 nm. Výsledek lze přepočítat na množství RNA. [39]

### 5.3 Polymerázová řetězová reakce (PCR)

Metoda polymerázové řetězové reakce byla zavedena v roce 1985 Kary B. Mullisem. Metoda PCR umožňuje získat požadovanou a specifickou sekvenci genomové DNA. Princip metody PCR je založen na replikaci nukleových kyselin. Podstatou je cyklicky se opakující enzymová syntéza nových řetězců vybraných úseků dvouřetězcové DNA prostřednictvím DNA-polymerázy. [48]

PCR metoda probíhá ve 3 fázích. První fáze zahrnuje denaturaci dvouřetězcových molekul DNA při teplotě 94 °C. Následuje komplementární připojení primerů na cílové sekvence vyšetřované DNA v teplotním rozmezí 30 – 60 °C. Posledním krokem je syntéza nových řetězců DNA při 65 – 75 °C. Vzhledem k měnícím se teplotním podmínkám probíhá reakce v zařízení termocykler, které umožňuje rychlou změnu teploty podle nastavených časových intervalů. [48-49]

Po skončení PCR se fragmenty DNA izolují z reakční směsi pomocí elektroforézy, fyzikálně-chemické metody, která je založena na rozdílné pohyblivosti molekul v elektrickém poli. Umožňuje oddělení fragmentů DNA o nesejné hmotnosti [49]

Přestože tato metoda neslouží ke stanovení celkového obsahu deoxyribonukleové kyseliny, stojí za zmínku ve výčtu metod stanovení DNA. Hlavní využití metody PCR je v oblasti molekulárně-biologického výzkumu. V praxi se využívá v lékařské diagnostice, v soudní genetice či archeologii. Metody PCR se dále využívá pro identifikaci organismů, stanovení patogenních organismů a geneticky modifikovaných organismů. Metodou PCR může být také určena přítomnost sinic, které produkují toxiny. [49-50]

## ZÁVĚR

Řasy jsou bohatým zdrojem proteinů. To dokládají mnohé studie, které se touto problematikou zabývají. Bylo zjištěno, že obsah proteinů je velice proměnlivý v závislosti na některých faktorech (druh, stáří, lokalita výskytu, roční období, atd.). Lze konstatovat, že obsah proteinů v červených mořských řasách dosahuje nejvyšších hodnot v porovnání se zelenými a hnědými mořskými řasami, které mají naopak nejnižší zastoupení proteinů. Pokud je srovnán obsah proteinů ve sladkovodních a mořských řasách, tak obsah proteinů je mnohem vyšší u zástupců sladkovodních řas a u modrozelených řas (sinic).

Metodou, která se nejčastěji používá pro stanovení celkového obsahu proteinů v řasách, je Kjeldahlova metoda. Tato mineralizační metoda byla vynalezena v 19. století, přesto je dnes velmi rozšířená. Od svého uvedení prošla řadou obměn, a vzhledem k technickému rozvoji je dnes tato metoda poloautomatizovaná nebo plně automatizovaná. Metoda je založena na stanovení celkového dusíku v analyzovaném vzorku. Tato hodnota je poté pomocí přepočítávacího faktoru (6,25) převedena na hodnotu představující celkový obsah proteinů.

Negativem Kjeldahlovy metody pro stanovení proteinů v řasách je právě tento přepočítací faktor. Je známo, že řasy, stejně jako ostatní rostliny, kromě proteinového dusíku obsahují i velké procento neproteinového dusíku. V souvislosti s tímto poznatkem je zřejmé, že obsah proteinů stanovených touto metodou bývá nadhodnocen, pokud je použit právě faktor 6,25.

Kromě Kjeldahlovy metody se pro stanovení proteinů v řasách běžně používají i spektrofotometrické metody (biuretová, Lowryho, bicinchoninová a dle Bradfordové).

Pro stanovení a rozlišení proteinů o rozdílných molekulových hmotnostech jsou používány elektroforetické metody (SDS-PAGE).

Obsah nukleových kyselin v řasách je všeobecně nízký. To dokládá i skutečnost, že studie, které se zabývají stanovením jednotlivých složek v řasách, stanovení nukleových kyselin většinou opomíjí. Co se týče obsahu nukleových kyselin v řasách, lze shrnout, že vyšší obsah je typický pro zástupce sladkovodních druhů řas a sinic, než je tomu u zástupců mořských řas.

Nejčastěji používanou metodou pro stanovení celkového obsahu nukleových kyselin v řasách je spektrofotometrická metoda, která využívá poznatku, že nukleové kyseliny absorbují záření v oblasti UV (max. 260 nm).

Pro stanovení jednotlivých sekvencí nukleových kyselin, např. pro taxonomické rozlišení jednotlivých druhů řas, jsou využívány metody založené na polymerázové řetězové reakci.

Studie zabývající se stanovením proteinů u vybraných zástupců řas potvrzují významné množství proteinů. Vzhledem k zastoupení všech esenciálních aminokyselin jsou řasy kvalitním zdrojem plnohodnotných proteinů a měly by být běžnou součástí stravy.

Obyvatelstvo České republiky je poměrně velmi málo informováno o vhodných nutričních vlastnostech řas a sinic. Podle mého názoru by mediální propagace a zařazení řas a řasových produktů do běžných obchodních sítí jistě zvýšilo zájem spotřebitelů o tento druh potravin.



## SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY

- [1] ODSTRČIL, J., HRŮZA, A. *Biologie pro zdravotnické školy*. 5. vyd. Brno: Národní centrum ošetrovatelství a nelékařských zdravotnických oborů, 2008. 216 s. ISBN 978-80-7013-471-9.
- [2] *The Seaweed Site: information on marine algae* [online]. [cit. 2011-04-23]. Dostupné na WWW: <http://www.seaweed.ie/algae/>.
- [3] JELÍNEK, J., ZICHÁČEK, V. *Biologie pro gymnázia*. 7. vyd. Olomouc: Nakladatelství Olomouc, 2004. 574 s. ISBN 80-7182-177-2.
- [4] POULÍČKOVÁ, A., JURČÁK, J. *Malý obrazový atlas našich sinic a řas*. 1. vyd. Olomouc: Univerzita Palackého v Olomouci, 2001. 81 s. ISBN 80-244-0242-4.
- [5] ŠPAČEK, J. *Hlenky, houby, řasy*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, Přírodovědecká fakulta, 1999. 134 s. ISBN 80-210-2157-8.
- [6] BURTIN, P. Nutritional value of seaweeds. *Electronic Journal of Environmental, Agricultural and Food Chemistry*. 2003, 2, 498-503.
- [7] DAWCZYNSKI, CH., SCHUBERT, R., JAHREIS, G. Amino acids, fatty acids, and dietary fibre in edible seaweed products. *Food Chemistry*. 2007, 891-899.
- [8] RUPÉREZ, P. Mineral content of edible marine seaweeds. *Food Chemistry*. 2002, 79, 23-26.
- [9] McHUGH, D.J. *A guide to the seaweed industry*. FAO Fisheries Technical Paper 441. Food and Agriculture Organization of the United Nations. Rome, 2003. 105 s. ISBN 92-5-104958-0.
- [10] FLEURENCE, J. Seaweed proteins: Biochemical, nutritional aspects and potential uses. *Trends in Food Science & Technology*. 1999, 10, 25-28.
- [11] ROSYPAL, S. *Nový přehled biologie*. 1. vyd. Praha: SCIENTIA, 2003. 797 s. ISBN 978-80-86960-23-4.
- [12] *Oddělení Chlorophyta*. [online]. [cit. 2010-12-27]. Dostupné na WWW: <http://www.sinicearasy.cz/134/Chlorophyta>.
- [13] CAMPBELL, N. A., REECE, J. B. *Biologie*. 1. vyd. Brno: Computer Press, 2006. 1332 s. ISBN 80-251-1178-4.

- [14] *Oddělení Rhodophyta*. [online]. [cit. 2010-12-27]. Dostupné na WWW: <http://www.sinicearasy.cz/134/Rhodophyta>.
- [15] HOJA, Š. *Biologie*. 1. vyd. Praha: Avicenum, 1974. 257 s.
- [16] VELÍŠEK, J. *Chemie potravin I*. 3. vyd. Tábor: OSSIS, 2009. 580 s. ISBN 978-80-86659-15-2.
- [17] *Chemical properties of Amino Acids*. [online]. [cit. 2011-05-04]. Dostupné na WWW: <http://www.tutorvista.com/content/chemistry/chemistry-iv/biomolecules/chemical-properties--amino-acids.php>.
- [18] PATARRA, R. F., PAIVA, L., NETO, A. I., LIMA, L., BAPTISTA, J. Nutritional value of selected macroalgae. *Journal of Applied Phycology*. 2010, 23, 205-208.
- [19] 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 profiles of protein concentrates. *Food Chemistry*. 2001, 72, 11-17.
- [20] MIŠURCOVÁ, L. *Nové nutriční aspekty a využití mořských a sladkovodních řas ve výživě člověka*. Zlín: Univerzita Tomáše Bati, Fakulta technologická, 2008, 120 s.
- [21] *Porphyra tenera*. [online]. [cit. 2011-05-04]. Dostupné na WWW: <http://www.fao.org/fishery/species/2790/en>.
- [22] GALLAND-IRMOULI, A. V., FLEURENCE, J., LAMGHARI, R., LUCON, M., ROUXEL, C., BARBAROUX, O., BRONOWICKI, J. P., VILLAUME, CH., GUÉANT, J. L. Nutritional value of proteins from edible seaweed *Palmaria palmata* (Dulse). *J. Nutr. Biochem*. 1999, 10, 353-359.
- [23] *Laminaria japonica extrakt 500 mg*. [online]. [cit. 2011-05-04]. Dostupné na WWW: <http://www.super-smart.eu/en--Immune-Support--Laminaria-japonica-Extract-500-mg--0584>.
- [24] FLEURENCE, J., CHENARD, E., LUCON, M. Determination of the nutritional value of proteins obtained from *Ulva armoricana*. *Journal of Applied Phycology*. 1999, 11, 231-239.

- [25] *BioLib: Ulva lactuca*. [online]. [cit. 2011-05-04]. Dostupné na WWW: <http://www.biolib.cz/cz/taxonimage/id7080/>.
- [26] *Chlorella*. [online]. [cit. 2011-04-21]. Dostupné na WWW: <http://www.chlorella.cz/>.
- [27] MEIJER, E. A., WIJFFELS, R. H. Development of a fast, reproducible and effective method for the extraction and quantification of proteins of micro-algae. *Biotechnology Techniques*. 1998, 12, 353-358.
- [28] *Chlorella*. [online]. [cit. 2011-04-10]. Dostupné na WWW: <http://chlorella.co.nz/>.
- [29] *The nutritional aspects of Spirulina*. [online]. [cit. 2011-04-22]. Dostupné na WWW: [http://www.antenna.ch/en/documents/AspectNut\\_UK.pdf](http://www.antenna.ch/en/documents/AspectNut_UK.pdf)
- [30] CIFERRI, O. Spirulina, the Edible Microorganism. *Microbial Reviews*. 1983, 47, 551-578.
- [31] *Spirulina vitamins*. [online]. [cit. 2011-04-10]. Dostupné na WWW: <http://spirulina-vitamins.inform2u.com/>.
- [32] *Structures of purines and pyrimidines*. [online]. [cit. 2011-05-04]. Dostupné na WWW: <http://www.tutorvista.com/content/chemistry/chemistry-iv/biomolekules/purines-pyrimidines-structures.php> obr. pentosy
- [33] YOUNG, E. G. The concentration of nucleic acids in some common marine algae. *Canadian Journal of Botany*. 1964, 42, 1471-1480.
- [34] BECKER, E. W. *Microalgae – biotechnology and microbiology*. 1. vyd. Cambridge: University press, 1994. 295 s. ISBN 0-521-35020-4.
- [35] CROSSMAN, D. J., CLEMENTS, K. D., COOPER, G. J. S. Determination of protein for studies of marine herbivory: a comparison of methods. *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*. 2000, 244, 45-65.
- [36] *Measurement of Protein Content*. [online]. [cit. 2011-05-19]. Dostupné na WWW: <http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/0471709085.ch3/pdf>.
- [37] POMERANZ, Y., MELOAN, C. E. *Food analysis: theory and practice*. 3. vyd. Gaithersburg: Aspen Publishers, 2000. 778 s. ISBN 0-8342-1826-7.

- [38] *Analýza potravin přírodní látky*. [online]. [cit. 2011-04-29]. Dostupné na WWW: [http://utbfiles.cepac.cz/moduly/M0028\\_chemie\\_a\\_analyza\\_potravin/distančni\\_text\\_II/M0028\\_chemie\\_a\\_analyza\\_potravin\\_distančni\\_text\\_ii.pdf](http://utbfiles.cepac.cz/moduly/M0028_chemie_a_analyza_potravin/distančni_text_II/M0028_chemie_a_analyza_potravin_distančni_text_ii.pdf).
- [39] KÁŠ, J., KODÍČEK, M., VALENTOVÁ, O. *Laboratorní techniky biochemie*. 1. vyd. Praha: Vysoká škola chemicko-technologická v Praze, 2006. 258 s. ISBN 80-7080-586-2.
- [40] *Distillation unit Pro-Nitro M, Kjeldahl*. [online]. [cit. 2011-05-11]. Dostupné na WWW: [http://www.analytika.gr/index.asp?mod=eshop\\_item&ID=77&p=418&lstLanguages=en](http://www.analytika.gr/index.asp?mod=eshop_item&ID=77&p=418&lstLanguages=en).
- [41] MARSHAM, S., SCOTT, G. W., TOBIN, M.L. Comparison of nutritive chemistry of a range of temperate seaweeds. *Food Chemistry*. 2007, 100, 1331-1336.
- [42] LOURENCO, S. O., BARBARINO, E., DE-PAULA, J. C., PEREIRA, L. O. de S., MARQUEZ, U. M. L. Amino acid composition, protein content and calculation of nitrogen-to-protein conversion factors for 19 tropical seaweeds. *Phycological Research*. 2002, 50, 233-241.
- [43] LÓPEZ, C. V. G., GARCÍA, M. C. del C., FERNÁNDEZ, F. G. A., BUSTOS, C. S., CHISTI, Y., SEVILLA, J. M. F. Protein measurements of microalgal and cyanobacterial biomass. *Bioresource Technology*. 2010, 101, 7587-7591.
- [44] COX, M. M., PHILLIPS, G. N. *Handbook of proteins: structure, function and methods*. Chichester: Wiley, 2007. 1319 s. ISBN 978-0-470-06098-8.
- [45] LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L., RANDALL, L. J. Protein measurement with the Folin phenol reagent. *Department of Pharmacology*. 1951, 28, 265-275.
- [46] BRADFORD, M. M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. *Analytical Biochemistry*. 1976, 72, 248-254.
- [47] *Bioinformatics: Protein purification*. [online]. [cit. 2011-05-20]. Dostupné na WWW: [http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics\\_WEB/proteins\\_purification.html](http://www.imb-jena.de/~rake/Bioinformatics_WEB/proteins_purification.html)

- [48] ŠMARDA, J., DOŠKAŘ, J., PANTŮČEK, R., RŮŽIČKOVÁ, V., KOPTÍKOVÁ, J. *Metody molekulární biologie*. 1. vyd. Brno: Masarykova univerzita, 2005. 188 s. ISBN 80-210-3841-1.
- [49] KOČÁREK, E. *Genetika: obecná genetika a cytogenetika, molekulární biologie, biotechnologie, genomika*. 1. vyd. Praha: Scientia, 2004. 211 s. ISBN 80-7183-326-6.
- [50] BAN, H. Q., ZHUANG, D. G., ZHU, J. Y., BA, Y. Investigation of algae pollution in Xiliu Lake and identification of toxic cyanobacteria by whole-cell PCR. *Wei Sheng Yan Jiu*. 2006, 35, 165-167.

**SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK**

MK	mastná kyselina
AMK	aminokyselina
Arg	arginin
Asp	kyselina asparagová
Glu	kyselina glutamová
His	histidin
Lys	lyzin
DNA	deoxyribonukleová kyselina
RNA	ribonukleová kyselina
m-RNA	mediátorová ribonukleová kyselina
t-RNA	transferová ribonukleová kyselina
r-RNA	ribozomová ribonukleová kyselina
SDS	dodecylsulfát sodný
PAGE	elektroforéza v polyakrylamidovém gelu
PCR	polymerázová řetězová reakce

**SEZNAM OBRÁZKŮ**

<i>Obr. 1. Vznik peptidové vazby [17]</i> .....	16
<i>Obr. 2. Porphyra tenera [21]</i> .....	18
<i>Obr. 3. Palmaria palmata [2]</i> .....	19
<i>Obr. 4. Laminaria japonica [23]</i> .....	20
<i>Obr. 5. Undaria pinnatifida [2]</i> .....	21
<i>Obr. 6. Ulva lactuca [25]</i> .....	22
<i>Obr. 7. Chlorella [28]</i> .....	23
<i>Obr. 8. Spirulina platensis [31]</i> .....	24
<i>Obr. 9. Adenin</i> .....	26
<i>Obr. 10. Guanin</i> .....	26
<i>Obr. 11. Cytosin</i> .....	26
<i>Obr. 12. Tymin</i> .....	26
<i>Obr. 13. Uracil</i> .....	26
<i>Obr. 14. <math>\beta</math>-D-ribóza a 2-deoxy-<math>\beta</math>-D-ribóza [32]</i> .....	26
<i>Obr. 15. Kyselina trihydrogenfosforečná</i> .....	26
<i>Obr. 16. Destilační aparatura dle Parnas Wagnera [38]</i> .....	30
<i>Obr. 17. Přístroj Pro-Nitro [40]</i> .....	31
<i>Obr. 18. Schéma biuretové metody [36]</i> .....	33
<i>Obr. 19. Schéma reakcí Lowryho metody [36]</i> .....	34
<i>Obr. 20. Schéma metody BCA [36]</i> .....	34
<i>Obr. 21. Schéma metody dle Bradfordové [36]</i> .....	35
<i>Obr. 22. Princip metody SDS-PAGE [47]</i> .....	36

**SEZNAM TABULEK**

<i>Tab. 1. Obsah proteinů u vybraných zástupců řas .....</i>	<i>25</i>
<i>Tab. 2. Obsah nukleových kyselin v řasách [34] .....</i>	<i>28</i>