

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI
Přírodovědecká fakulta
Katedra ekologie a životního prostředí



Pozitivní účinky bioaktivních látek z řas
Chlorella a Eustigmatos/Vischeria

Bc. Magdaléna Šafářová

Diplomová práce

předložená

na Katedře Ekologie a životního prostředí

Přírodovědecké fakulty Univerzity Palackého v Olomouci

jako součást požadavků

na získání titulu Mgr. v oboru

Hydrobiologie

Vedoucí práce: RNDr. Lenka Šejnohová, Ph.D.

Konzultanti: RNDr. Jana Lišková, Ph.D., Doc. RNDr. Martin Rulík, Ph.D.

Olomouc 2015

Šafářová M. (2015): Pozitivní účinky bioaktivních látek z řas *Chlorella* a *Eustigmatos/Vischeria*. Diplomová práce, Katedra ekologie a životního prostředí, Přírodovědecká fakulta, Univerzita Palackého v Olomouci, 111 s., v češtině.

Abstrakt

Jeden z nejrozšířenějších doplňků stravy z řas se vyrábí ze zelené řasy rodu *Chlorella* pro svůj vysoký obsah cenných bioaktivních látek, zejména chlorofylu, β -karotenu, aminokyselin, peptidů a konglomerátu látek, tzv. *Chlorella* růstového faktoru (CGF) s příznivým efektem na imunitní a trávicí systém, detoxikaci aj. Literární rešerše předložené práce však poukazuje na minimální vědeckou verifikaci těchto pozitivních účinků. Nový potenciál představuje i hnědá řasa *Eustigmatos* díky produkci omega 3 nenasycených mastných kyselin nezbytných pro lidské zdraví.

Byla provedena aplikace autotrofní a heterotrofní biomasy *Chlorella* a CGF na tkáňové kultury. Biomasa byla poskytnuta výrobní společnosti *Chlorella* Třeboň a dvou producentů doplňků stravy (*Chlorella* Centrum a Green Ways). Pozitivní účinek byl pozorován u všech testovaných řasových vzorků, zejména při doporučené denní dávce 5 g/den – Třeboňská autotrofní *Chlorella* stimulovala po dvou dnech tkáňové kultury k 15% vyššímu růstu oproti kontrole. K největšímu nárůstu buněk tkáně (o 24% oproti kontrole) došlo po 7 dnech kultivace s CGF při dvojnásobku doporučené dávky.

V pilotním experimentu se dvěma vytypovanými kmeny komplexu rodů *Eustigmatos/Vischeria* nebyla stimulace buněčného růstu tkáňových kultur prokázána.

Práce byla podpořena projektem OP VaVpI Centrum řasových biotechnologií Třeboň (Algatech) reg. č. : CZ.1.05/2.1.00/03.0110) MBÚ AV ČR Třeboň.

Klíčová slova: řasová biomasa; tkáňové kultury; CGF; růst buněk; doplňky stravy

Šafářová M. (2015): The positive effects of bioactive compounds from algae *Chlorella* and *Eustigmatos/Vischeria*. Master's thesis, Department of Ecology & Environmental Sciences, Faculty of Science, Palacky Univerzity in Olomouc, 111 pp., in Czech.

Abstract

One of the most widespread nutrition supplements containing algae is made from green algae *Chlorella* for its high content of bioactive substances. These are especially chlorophyll, β -carotene, amino acids, peptides and a conglomerate of substances called Chlorella Growth Factor (CGF), all of which have positive effect on the immune and digestive systems, detoxification of the human organism, etc. However, according to the literature research of this thesis, there is a lack of scientific verification of such positive effects. New potential is also presented by a brown algae, *Eustigmatos*, as it produces desirable omega 3 unsaturated fatty acids which are essential for human health.

The autotrophic and heterotrophic biomass *Chlorella* and CGF were applied to the tissue culture. The biomass was provided by Production Company *Chlorella* Třeboň and two distributors of nutrition supplements (*Chlorella* Centrum and Green Ways). Positive effect was observed on all tested algal samples, particularly at the recommended daily dose of 5 g – after two days the autotrophic *Chlorella* Třeboň stimulated tissue cultures to 15% higher growth compared to control. The highest cell growth of tissue culture (24% higher compared to control) was observed after a 7 day cultivation with CGF at a double of the recommended dose.

In the pilot experiment with two selected phyla of the complex of two genera *Eustigmatos/Vischeria*, the growth stimulation of tissue cultures wasn't proved.

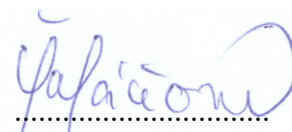
The thesis was supported by the project OP VaVpI Centre for Algal Biotechnologies Třeboň (Algatech) reg. number: CZ.1.05/2.1.00/03.0110) MBÚ AV ČR Třeboň.

Key words: algae biomass; tissue cultures; CGF; cell growth; nutrition supplements

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem svoji diplomovou práci vypracovala samostatně pod vedením RNDr. Lenky Šejnohové, Ph.D. a s využitím informačních zdrojů, které jsou v práci citovány.

V Olomouci dne: 12.10.2015


.....
Magdaléna Šafářová

OBSAH

Seznam tabulek	viii
Seznam obrázků	x
Seznam grafů	xi
Seznam použitých zkratk	xii
Poděkování	xiii
1. ÚVOD	1
1.1. Současné využití - biotechnologické obory	2
1.1.1. Léčivé a jiné pozitivní účinky řas a sinic – doplňky stravy a kosmetika.....	2
1.1.2. Biopaliva	7
1.1.3. Čištění odpadních vod a bioindikace	8
1.1.4. Zemědělství	9
1.2. <i>Chlorella</i>	11
1.2.1. Historie popisu rodu a taxonomické zařazení	11
1.2.2. Morfologie, ultrastruktura a životní cyklus	16
1.2.3. Druhy rodu <i>Chlorella</i>	18
1.2.4. <i>Chlorella</i> jako doplněk stravy - obsahové látky a jejich pozitivní účinky ..	20
1.2.5. Využití zelené řasy <i>Chlorella</i> jako doplňku stravy od historie až po současnost	29
1.3. <i>Eustigmatos/Vischeria</i>	32
1.3.1. Historie popisu rodu a taxonomické zařazení.....	32
1.3.2. Morfologie, ultrastruktura a životní cyklus	35
1.3.3. Druhy rodu <i>Eustigmatos/Vischeria</i>	38
1.3.4. Přehled a význam současně známých obsahových látek zástupců třídy Eustigmatophyceae	40
1.3.5. Potenciál rodů <i>Eustigmatos/Vischeria</i> jako nový doplněk stravy.....	46
2. CÍLE PRÁCE	47

3. MATERIÁL A METODIKA	48
3.1. Řasová biomasa	48
3.1.1. Kultivace řas	48
3.1.2. Zpracování řasové biomasy do práškové podoby	49
3.1.3. Extrakce <i>Chlorella</i> růstového faktoru (CGF)	49
3.2. Tkáňové kultury	50
3.2.1. Výběr typu tkáňových kultur	50
3.3. Popis vlastního experimentu	51
3.3.1. Nasazení buněk a aplikace řas	51
3.3.2. Inkubační doba	58
3.3.3. MTT test – princip a postup	59
3.3.4. Statistické zpracování dat	62
4. VÝSLEDKY	64
4.1. Kultivace řasové biomasy a extrakce bioaktivních látek	64
4.2. Ověření stimulačního účinku růstu na tkáňových kulturách	66
4.2.1. <i>Chlorella</i> Třeboň autotrofní	68
4.2.2. <i>Chlorella</i> Centrum	73
4.2.3. <i>Chlorella</i> Green Ways	77
4.2.4. <i>Chlorella</i> Třeboň heterotrofní	81
4.2.5. <i>Chlorella</i> růstový faktor (CGF) Třeboň	85
4.2.6. Srovnání stimulace růstu tkáně různými biomasami	88
4.2.7. <i>Eustigmatos/Vischeria</i>	88
5. DISKUZE	90
6. ZÁVĚR	96
7. SEZNAM POUŽITÉ LITERATURY	98

Seznam tabulek

- Tabulka 1:** Celosvětová produkce hlavních druhů mikroskopických sinic a řas
- Tabulka 2:** Přehled názvů druhů rodu *Chlorella* s jednoznačným nebo potencionálním využitím v oblasti zdravé výživy a biotechnologiích
- Tabulka 3:** Srovnání průměrných nutričních hodnot (% suché hmotnosti) vybraných základních a funkčních potravin včetně řasy *Chlorella*
- Tabulka 4:** Procentuální zastoupení esenciálních aminokyselin u řasy *Chlorella* a jeho srovnání se sinicí *Spirulina/Arthrospira*
- Tabulka 5:** Přehled mastných kyselin v řase *Chlorella* a srovnání se sinicí *Spirulina/Arthrospira*
- Tabulka 6:** Zastoupení vitamínů a minerálů u řasy *Chlorella*, sinice *Spirulina/Arthrospira* a ruduchy *Porphyra* (Nori) a mladého ječmene
- Tabulka 7:** Přehled a srovnání výrobků vybraných českých firem zabývajících se distribucí doplňků stravy z řasy *Chlorella*
- Tabulka 8:** Současné taxonomické postavení komplexu rodů *Eustigmatos/Vischeria*
- Tabulka 9:** Aktuální přehled druhů rodů *Eustigmatos* a *Vischeria*
- Tabulka 10:** Procentuální zastoupení mastných kyselin u tří druhů třídy Eustigmatophyceae
- Tabulka 11:** Procentuální zastoupení karotenoidů u šesti druhů třídy Eustigmatophyceae
- Tabulka 12:** Výpočet výchozí (100%) koncentrace
- Tabulka 13:** Postup vytvoření pasáže – tkáňové subkultury
- Tabulka 14:** Výpočet množství vody potřebné pro rozpuštění 1 g řasové biomasy
- Tabulka 15:** Ředící řada koncentrací řasové biomasy
- Tabulka 16:** Konkrétní množství buněk, kultivačního média a další specifika experimentů vzhledem k jejich inkubační době
- Tabulka 17:** Postup provedení MTT testu
- Tabulka 18:** Základní informace o provedených experimentech
- Tabulka 19a:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – před odečtením kontroly
- Tabulka 19b:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – po odečtu kontroly

- Tabulka 19c:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – před odečtením kontroly
- Tabulka 19d:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – po odečtu kontroly
- Tabulka 20a:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy řasy *Chlorella* Centrum – před odečtením kontroly
- Tabulka 20b:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy řasy *Chlorella* Centrum – po odečtu kontroly
- Tabulka 20c:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Centrum – před odečtením kontroly
- Tabulka 20d:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Centrum – po odečtu kontroly
- Tabulka 21a:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – před odečtením kontroly
- Tabulka 21b:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – po odečtu kontroly
- Tabulka 21c:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – před odečtením kontroly
- Tabulka 21d:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – po odečtu kontroly
- Tabulka 22a:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – před odečtením kontroly
- Tabulka 22b:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – po odečtu kontroly
- Tabulka 22c:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – před odečtením kontroly
- Tabulka 22d:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – po odečtu kontroly
- Tabulka 23a:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení CGF – před odečtením kontroly
- Tabulka 23b:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení CGF – po odečtu kontroly
- Tabulka 23c:** Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení CGF – před odečtením kontroly

Tabulka 23d: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení CGF – po odečtu kontroly

Seznam obrázků

- Obrázek 1:** Nejpravděpodobnější fylogenetický strom odvozený od sekvencí SSU a ITS rDNA u *Chlorella*-like řas
- Obrázek 2:** Buněčná struktura druhu *Chlorella vulgaris*
- Obrázek 3:** Areál Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., Třeboň – Opatovický mlýn
- Obrázek 4:** Buněčné formy v životním cyklu druhů *Eustigmatos magnus*, *Eustigmatos polyphem* a *Eustigmatos vischeri*
- Obrázek 5:** Buněčné formy v životním cyklu rodu *Vischeria*
- Obrázek 6:** Buněčná struktura typových druhů *Eustigmatos vischeri* a *Vischeria stelata*
- Obrázek 7:** Chemická struktura významných polynenasycených mastných kyselin
- Obrázek 8:** 96 jamková destička s tkáňovými kulturami ve fázi inkubace s řasovou biomasou
- Obrázek 9:** Schéma destičky – aplikace extraktů různých koncentrací řas na fibroblasty, resp. MSC v různých dávkách
- Obrázek 10:** Zařízení pro práci s tkáňovými kulturami
- Obrázek 11:** Přístroje pro měření životnosti buněk a centrifugaci
- Obrázek 12:** Štěpení žlutého MTT na fialové formazanové krystalky díky metabolické aktivitě, resp. aktivitě mitochondriálních dehydrogenáz v živých buňkách
- Obrázek 13:** Spektrofotometr VERSAmax Tunable Microplate Reader
- Obrázek 14:** Morfologické a fyziologické změny fibroblastů v průběhu experimentu
- Obrázek 15:** Příklad vstupních dat získaných provedením MTT testu
- Obrázek 16:** Venkovní kultivační plošina s kaskádovým uspořádáním pro pěstování řasy *Chlorella* na MBÚ Třeboň
- Obrázek 17:** MBÚ AV ČR Třeboň - hnědá řasa *Eustigmatos/Vischeria*
- Obrázek 18:** Práce s řasovou biomasou na FGÚ AV ČR v Praze

Seznam grafů

- Graf 1:** Zkušební testování dvou typů tkáňových kultur pro modelové experimenty aplikace řasové biomasy; a) fibroblasty, b) MSC
- Graf 2a:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň autotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment
- Graf 2b:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň autotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment
- Graf 3a:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Centrum na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment
- Graf 3b:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Centrum na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment
- Graf 4a:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Green Ways na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment
- Graf 4b:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Green Ways na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment
- Graf 5a:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň heterotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment
- Graf 5b:** R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň heterotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment
- Graf 6a:** R-D křivka – závislost koncentrace CGF na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment
- Graf 6b:** R-D křivka – závislost koncentrace CGF na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment
- Graf 7:** Pilotní experiment s biomasou řasy *Eustigmatos* – srovnání s kontrolou

Seznam použitých zkratk

ALA	kyselina α -linoleová
ARA	kyselina arachidonová
CGF	<i>Chlorella</i> růstový faktor (<i>Chlorella</i> Growth Factor)

CPE	<i>Chlorella pyrenoidosa</i> extrakt
EDTA	organická kyselina ethylendiamintetraoctová využívaná jako chelatační činidlo, tj. vytváří komplexní sloučeniny s ionty kovů
EPA	kyselina eikosapentaenová
FGÚ	Fyziologický ústav AV ČR
GLA	kyselina γ -linolenová
GW	Green Ways – distributor doplňků stravy <i>Chlorella</i> a Ječmene
HDL	lipoproteiny s nízkou hustotou, hlavní nositelé cholesterolu v krevní plazmě, které jím zásobují buňky různých tkání (High Density Lipoproteins)
LC-PUFA	polynenasycené mastné kyseliny s dlouhým řetězcem (Long-chain Polyunsaturated Fatty Acid)
MA	kyselina myristová
MBÚ	Mikrobiologický ústav AV ČR
MSC	mezenchymální kmenové buňky (Mesenchymal Stem/Stromal Cells)
MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenylnitrazolium bromid, sloučenina, která se používá k testování metabolické aktivity buněk
MUFA	mononenasycené mastné kyseliny
NMK	nenasycené mastné kyseliny
OA	kyselina olejová
OP	operační program
PA	kyselina palmitová
PBMC	periferní mononukleární buňky (Peripheral Blood Mononuclear Cell)
PUFA	polynenasycené mastné kyseliny (Polyunsaturated Fatty Acids)
<i>rbcL</i>	ribulóza-bisfosfát karboxyláza
rDNA	ribozomální DNA
SAF, SAFA	nasycené mastné kyseliny (Saturated Fatty Acids)
TAG	triacylglycerol
WFD	Rámcová směrnice o vodách (Water Framework Directive)
18S rDNA	malá ribozomální podjednotka DNA

Poděkování

Chtěla bych poděkovat své školitelce RNDr. Lence Šejnohové, Ph.D. za cenné rady a zkušenosti, které jsem od ní během této práce získala, RNDr. Janě Liškové, Ph.D. z FGÚ AV ČR za vstřícnou pomoc s metodikou a poskytnutí výborného laboratorního zázemí při samotných experimentech, RNDr. Dancu Haruštiakové, Ph.D. z Institutu biostatistických analýz MU za pomoc se statistickým zpracováním dat, a v neposlední řadě děkuji svým rodičům a příteli za nekonečnou a nenahraditelnou podporu a lásku.

1. ÚVOD

Řasy představují jedinečnou skupinu autotrofních organismů. Většina zástupců se vyskytuje ve vodních ekosystémech, ale můžeme je nalézt i v půdě a ve vzduchu. Často disponují životními strategiemi, které jim umožňují existenci v takových biotopech, kde by jiné organismy stěží přežily (Hoek et al. 1995). Významně se podílejí na primární produkci a biochemickém koloběhu látek ve svém prostředí (Kalina & Váňa 2005). Jsou základnou potravního řetězce a tvoří přibližně 70% světové biomasy. Díky jejich schopnosti rychlého rozmnožování a růstu, efektivního využití sluneční energie, fixace atmosférického CO₂, vysoké produktivity a syntéze velké škály bioaktivních látek se výrazně uplatňují v různých biotechnologických oborech.

Pro udržení kvalitní životní úrovně lidské populace navzdory jejímu rychlému růstu je mimo jiné důležité zásobovat světový trh obrovským množstvím potravin. To vyžaduje zintenzivňování především zemědělského a potravinářského průmyslu. Problémem takové intenzifikace je zejména energetická náročnost a tedy velká zátěž na životní prostředí, neboť energie je saturována převážně z fosilních zdrojů. V celosvětovém měřítku se na 95% zemědělské půdy pro dosažení co největšího výnosu používá velké množství pesticidů a jiných nebezpečných přípravků, které se kumulují v potravním řetězci a tím negativně ovlivňují naše zdraví. Jedním z možných řešení mnoha problémů z oblasti výživy, energetiky, pohonných hmot nebo čištění odpadních vod jsou právě řasové biotechnologie.

Stručná historie využití sinic a řas

Člověk řasy a sinice začal poprvé konzumovat i jinak využívat již před mnoha staletími. Mezi první tzv. jedlé rody patří sinice *Nostoc* v Asii, *Aphanizomenon* a *Spirulina* v Africe a v Mexiku. Avšak o jejich pozitivních vlivech věděli již staří Číňané před 2000 lety, kdy jim v období hladu pomáhaly přežít (Spolaore et al. 2006).

První zmínka o cílené kultivaci řas pochází z Japonska z roku 1640, kdy se jednalo o makroskopickou červenou řasu rodu *Porphyra* dnes známou jako “nori” v pokrmech sushi, která se však sbírá již od roku 530. V roce 1658 se v Japonsku začaly kultivovat červené řasy – ruduchy (oddělení Rhodophyta) rodu *Gelidium*,

Gracilaria a *Chondrus* pro získávání agaru a karagenu (viz také podkapitola 1.1.1.). V současnosti jsou využívány v mikrobiologii ale i v potravinářském, farmaceutickém či textilním průmyslu (Gross & Pulz 2004).

Hlavní vlna rozvoje aplikované algologie s cílem kultivovat řasy pro produkci bioaktivních látek (zejména proteinů) přišla po roce 1948 z Německa, odkud se rozšířila do USA, Izraele, Itálie a Japonska. Vznikaly také obory zabývající se fotosyntézou. Celosvětový boom řasových biotechnologií proběhl v 60. - 80. letech 20. století, kdy v Japonsku vznikly první společnosti zabývající se komerční produkcí řasy *Chlorella* pro kosmetiku a jako doplněk stravy (Burlew 1953).

1.1. Současné využití - biotechnologické obory

Biotechnologický průmysl se v současnosti rozšiřuje do celého světa, přičemž hlavní centra vývoje a výzkumu se nacházejí v USA (např. Kalifornie), v Evropě (např. Německo) a Asii (Japonsko, Thajsko, Malajsie, Indonésie, Filipíny). V globálním měřítku se ročně vyprodukuje a zpracuje okolo 10^7 tun řasové biomasy. Primární využití nachází v potravinářském, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu nebo v energetice. V České republice je hlavním zázemím toto odvětví Mikrobiologický ústav AV ČR v Třeboni, kde se již od 50. a 60. let minulého století mimo jiné věnují produkci biomasy řasy *Chlorella* včetně jejího zpracování až do práškové podoby (Kadlecová et al. 2012).

1.1.1. Léčivé a jiné pozitivní účinky řas a sinic – doplňky stravy a kosmetika

Aby byly řasy a sinice odolné vůči stresu, disponují nejrůznějšími fyziologickými, biochemickými a molekulárními strategiemi, které jsou spojené s produkcí bioaktivních látek, jako jsou organické kyseliny, sacharidy, proteiny, aminokyseliny, peptidy, enzymy, antibiotika atd. (Skulberg 2004). Tyto látky se vyznačují širokým spektrem pozitivních účinků na zdraví člověka i zvířat, ať už se jedná o detoxikaci, regeneraci, posilování imunitního systému, podporu krevetvorby apod. Mohou také obohacovat běžnou stravu o řadu minerálů, vitamínů a dalších látek. V souvislosti s růstem lidské populace a zájmem o zdravý životní styl, jsou řasy a sinice účelově a masově kultivovány (Cardozo et al. 2007).

Díky schopnosti těchto mikroorganismů působit preventivně či dokonce podporovat léčbu nejrůznějších nemocí (např. virové infekce, srdeční choroby, rakovinu),

si získávají pozornost od stále většího počtu vědců i lidí z široké veřejnosti. Ze skupiny sinic (Cyanobacteria) jsou komerčně nejpoužívanější rody *Spirulina/Arthrospira*¹ a dále např. rody *Anabaena*, *Aphanizomenon*, *Nostoc*, a *Synechococcus*² (Gouveia et al. 2008). Druhou velice využívanou skupinou jsou zelené řasy (Chlorophyta) konkrétně například rody *Botryococcus*, *Chlamydomonas*, *Chlorella*, *Dunaliella*, *Haematococcus*, *Parietochloris* a *Scenedesmus*.

Doplňky stravy, které se z nich vyrábějí, jsou nejčastěji ve formě tablet, prášku, kapslí či tekutin (Vyhláška č. 225/2008 Sb.). Nově se sinice a řasy používají přímo jako přísada do běžných potravin a nápojů (těstoviny, chleba, sladké tyčinky, sušenky, čaje, pivo, jogurty apod.) (Becker 2004).

Následující text se detailněji věnuje biotechnologicky významným řasám/sinicím uvedených v tabulce 1 (v pořadí dle průměrné roční produkce).

Tabulka 1: Celosvětová produkce hlavních druhů mikroskopických sinic a řas (Gross & Pulz 2004)

Název řasy/sinice	Roční produkce [t]	Země
<i>Spirulina/Arthrospira platensis</i>	3000	Čína, Indie, USA, Myanmar, Japonsko
<i>Chlorella</i>	2000	Taiwan, Německo, Japonsko
<i>Dunaliella salina</i>	1200	Austrálie, Izrael, USA, Čína
<i>Aphanizomenon flos-aquae</i>	500	USA
<i>Haematococcus pluvialis</i>	300	USA, Indie, Izrael

¹ Nesprávný název *Spirulina* pro rod *Arthrospira* Stizenberger 1852 přetrvával až do zrevidování (1925-1932), kdy byly v rámci rodu *Spirulina* Turpin 1829 sjednoceny oscillatorioidní spirálovitě stočené organismy s mnohobuněčnými vlákny bez ohledu na ne/přítomnost nebo větší či menší viditelnost příčných přepážek – sept pod světelným mikroskopem. O něco dříve Stizenberger (1854) a Gomont (1892-1893) odlišovali rod *Arthrospira* s pravidelně stočenými vlákny a viditelnými septy od rodu *Spirulina* s neviditelnými septy. Odlišnosti v posuzování hlavních kritérií pro determinaci těchto organismů vedly ke sjednocení obou rodů. Recentní studie však dokazují, že se jedná o dva samostatné rody. Do rodu *Arthrospira* se tedy řadí sinice, jež nachází využití jako doplňky stravy (typická je *A. platensis*), přestože se častěji setkáváme s označením *Spirulina*.

² Názvy jednotlivých taxonomických skupin jsou vždy seřazeny abecedně a jsou v souladu s kodexem „Mezinárodní kód nomenklatury řas, hub a rostlin (International Code of Nomenclature for algae, fungi, and plants)“

Spirulina/Arthrospira (oddělení Cyanobacteria)

Jedním z nejrozšířenějších a nejvíce komerčně kultivovaných zástupců v tomto odvětví je vláknitá sinice rodu *Spirulina/Arthrospira*, která se vyznačuje vysokým obsahem proteinů (60 - 70% buněčné hmotnosti). Mimo to je také bohatým zdrojem aminokyselin, esenciálních mastných kyselin (zejména γ -linolenová kyselina, GLA), chlorofylu, vitamínů skupiny B a minerálů. V jedné buňce se nachází až 17% fykobiliproteinů a až 10 krát větší množství β -karotenu než obsahuje mrkev na jednotku hmotnosti (Belay et al. 1993). Její příznivé účinky se projevují například při redukci hmotnosti, cukrovce, hypertenzi nebo snižování hladiny cholesterolu (Bishop & Zubeck 2012). Také podporuje růst střevní mikroflóry, správnou funkci ledvin a chrání před různými karcinogenními látkami (Spolaore et al. 2006). Studie chemopreventivních účinků proti 7, 12 - dimethyl benzantracenu, který u laboratorních krys indukoval vznik nádoru mléčných žláz, prokázaly, že konzumace *Spirulina/Arthrospira* redukuje výskyt nádoru u krys z 83% až na 13%. Během molekulárních analýz *in vitro* byl indikován inhibiční účinek proliferace nádorových buněk do 24 hodin doprovázený zvýšenou expresí transkripčního faktoru p53. Tento převratný objev podporuje tuto sinici při potencionálním využití jako chemoprevence rakoviny u člověka (Ouhtit et al. 2014). Další studie se zabývají využitím druhu *Arthrospira platensis* jako tzv. hypolipidemikum – léčivo snižující hladinu krevních tuků, čímž pomáhá redukovat výskyt kardiovaskulárních onemocnění (Mazokopakis et al. 2013).

Hlavním producentem této sinice je Asie (přibližně 350 t ročně pochází ze společnosti Hainan-DIC microalgae Co., Ltd. – Hainan, Čína) a USA. Světově největší producent s ročním výnosem okolo 450 t je společnost Earthrise Nutritionals, LLC. (Kalifornie) (Sastre 2012).

Chlorella (oddělení Chlorophyta, třída Trebouxiophyceae)

Tímto rodem se zabývá předložená práce, viz kapitola 1.2.

Dunaliella (oddělení Chlorophyta, třída Chlorophyceae)

Jednobuněčná zelená řasa *Dunaliella* (v biotechnologiích nejvíce využívaný druh *D. salina*) se vyznačuje vysokou produkcí β -karotenu, méně α -karotenu, luteinu a lykopenu (Chidambara et al. 2005). Pěstuje se ve velkých slaných jezerech v jižní Austrálii nebo v řízených kultivačních systémech. Její konzumace chrání organismus před působením volných radikálů, UV záření a byly prokázány i preventivní účinky proti ateroskleróze. Tato řasa je běžnou součástí doplňků stravy pro opalování s β -karotenem na přírodní bázi (Shaish et al. 2009).

Aphanizomenon (oddělení Cyanobacteria)

Pro potravinářský a farmaceutický průmysl jsou svým obsahem bioaktivních látek atraktivní i další zástupci sinic. Například druh *Aphanizomenon flos-aquae*, kterého se ve státech severní Ameriky ročně vyprodukuje až 500 t suché biomasy (Gross & Pulz 2004). Tato sinice má díky velkému obsahu chlorofylu (1-2%) a c-fykocyaninu antioxidační a protizánětlivé vlastnosti. Produkuje také značné množství polynenasycených mastných kyselin omega-3 a omega-6 (Bishop & Zubeck 2012).

Haematococcus (oddělení Chlorophyta, třída Chlorophyceae)

Další biotechnologicky významnou jednobuněčnou řasou je *Haematococcus* (převážně *H. pluvialis*) díky přítomnosti astaxantinu (příp. dalších červených barviv jako lutein, violaxantin), což je karotenoid s minimálně desetinásobně silnějším antioxidačním účinkem než má β -karoten. Astaxantin se používá hlavně jako potravinářské barvivo, nebo se přidává do krmiva pro drůbež a akvakultury (Lorenz & Cysewski 2000). Ze zdravotního hlediska chrání např. před UV zářením, posiluje imunitní systém a příznivě působí proti rakovině, Alzheimerově a Parkinsonově chorobě (Naguib 2000). Z této řasy se také vyrábí krmivo pro drobné korýše a ryby pro pigmentaci masa. *Haematococcus* je pěstován ve velkých systémech např. v Izraeli, na Havaii či v Indii. Tvorba astaxantinu je vyvolána pouze za určitých podmínek – důležitou roli hraje intenzita slunečního záření (Cifuentes et al. 2003).

V kosmetickém průmyslu se z řas a sinic využívají obsahové látky jako polysacharidy, lipidy, proteiny, vitamíny (např. A, B1), minerály a pigmenty (chlorofyl,

karotenoidy). Klasickými druhy v tomto odvětví jsou makroskopické červené řasy (oddělení Rhodophyta) *Chondrus crispus* a *Mastocarpus stellatus*, chaluhy (oddělení Heterocontophyta) *Alaria esculenta* a *Ascophyllum nodosum*. Z mikroskopických zástupců je to již zmíněná sinice *Spirulina/Arthrospira platensis* a zelené řasy *Dunaliella salina* a *Chlorella vulgaris* nebo také hnědá řasa (oddělení Heterocontophyta, třída Eustigmatophyceae) *Nannochloropsis oculata* (Hallmann 2007) příbuzná rodu *Eustigmatos* (viz kapitola 1.3).

Velice cenná je látka zvaná karagen, která značné uplatnění nachází v průmyslu farmaceutickém a potravinářském jako tzv. rostlinná želatina E 407 nebo v experimentální medicíně. V kosmetickém průmyslu se často využívá pro výrobu tělových a čistících krémů nebo deodorantů. Chemicky se jedná o sulfátový polygalaktan, v němž se střídají jednotky D-galaktózy a 3,6-anhydro-galaktózy. Zdrojem karagenu jsou mořské ruduchy jako *Eucheuma denticulatum* a *Kappaphycus alvarezii* (kultivované v tropických oblastech), nebo *Chondrus crispus*.

Chondrus (oddělení Rhodophyta, třída Rhodophyceae)

Červená řasa *Chondrus* (především druh *Ch. crispus*) je v Anglii známá jako Irish Moss, v Irsku zase jako Carraigin (Necas & Bartosikova 2013). Právě v Irsku se již v 5. století n. l. díky obsahu karagenu používala jako želatina a domácí lék proti kašli a nachlazení. Největším současným komerčním producentem *Chondrus crispus* je Kanada, přičemž hlavním centrem od 40. let 20. století byl severozápad Nového Skotska (nejvýchodnější z Pobřežních provincií Kanady). Vrchol produkce byl dosažen v 70. letech – okolo 10 000 t suché biomasy ročně. V 80. letech docházelo postupně k poklesu a v roce 2000 bylo množství získané biomasy menší než 2500 tun za rok.

V současné době se kvůli vzrůstající poptávce produkce šíří i do méně tradičních lokalit, jako je okolí hlavního města Halifax a Shelburne County (Sharp et al. 2008). Dále je *Chondrus crispus* pro karagen kultivována např. v USA, Čile, Dánsku, ve Francii, Portugalsku, Irsku nebo v Indonésii (Barsanti & Gualtieri 2006; Hallmann 2007).

Mezi další cenné přírodní složky využívané v kosmetice patří také polynenasycené mastné kyseliny (PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids), které jsou hlavní buněčnou komponentou řasy *Nannochloropsis*.

Nannochloropsis (oddělení Heterocontophyta, třída Eustigmatophyceae)

Zástupci rodu *Nannochloropsis* jsou heterokontní mikroskopické řasy (v kosmetice se využívá druh *N. oculata*) bohaté na PUFA, a proto spolu s příbuzným rodem *Eustigmatos* přitahují vědeckou pozornost z hlediska velkého biotechnologického potenciálu. Mezi hlavní PUFA rodu *Nannochloropsis* patří kyselina myristová (C[14:0]; MA), palmitová (C[16:0]; PA), palmitolejová (C[16:1 (n-7c)]), arachidonová (C[20:4 (n-6)]; ARA). Především je však tato skupina zajímavá vysokou produkcí n-3 (omega-3) dlouhého řetězce polynenasycené mastné kyseliny (LC-PUFA, long-chain polyunsaturated fatty acid) označované jako eikosapentaenová kyselina (C[20:5 (n-3)]; EPA – základní složka chloroplastových membrán). Díky tomu je několik druhů této řasy využíváno jako krmivo v akvakulturách, v kosmetice a také v lidské výživě, neboť omega-3 PUFA mají obecně příznivý vliv kardiovaskulární a imunitní systém. Mohou také pomáhat při léčbě některých psychiatrických onemocnění, jako je schizofrenie (Sukenik 1999; Pal et al. 2013). Účinkům EPA se více věnuje podkapitola 1.3.4.

1.1.2. Biopaliva

Nejen kvůli zvyšující se koncentraci CO₂ v ovzduší a poptávce po ropě, jejíž zásoby se neodvratně tenčí, vzrůstá v posledních letech zájem o řasy i jako základní surovina při výrobě tzv. biopaliv třetí generace, tj. paliv, které nekonkurují zemědělským plodinám, čímž nedochází k ohrožení produkce potravin, krmiv a dalších výrobků a tím (většinou) ani k jejich zdražování. Do první generace tedy patří paliva vyráběná ze zemědělských plodin (cukrová třtina, kukuřice), ze kterých se získávají cukry, škroby a oleje. Druhá generace je z nepotravinářských surovin bohatých na celulózu (dřevo, papír apod.) (Chu Wan- Loy 2012).

Mechanismus fotosyntézy sinic a řas se podobá vyšším rostlinám s tím rozdílem, že díky jednodušší buněčné struktuře využívají sluneční energii mnohem efektivněji a zároveň snadněji přijímají vodu, CO₂ a živiny (Sheehan et al. 1998). Z tohoto důvodu vykazují mnohem větší produktivitu (mohou svou hmotu zdvojnásobit i několikrát

za den) a jeví se tak jako hlavní obnovitelný zdroj energie, který může nahradit zdroje fosilní (Chisti 2007).

Řasová biomasa se dá konvertovat do několika druhů biopaliv (především bionafty a bioethanolu) v závislosti na tom, která z jejich zásobních látek a jiných produktů metabolismu se použije. Zásobní látkou řas z oddělení Chlorophyta je především škrob, jehož fermentace je hlavním procesem při vzniku bioetanolu (biolihu). Škrob je hojně obsažen např. u druhů rodu *Chlorella* (Demirbaş 2009). Hlavní složkou bionafty jsou oleje, resp. lipidy (triacylglyceroly – TAG). Velké množství olejů produkují hnědé řasy, zejména pak třída Bacillariophyceae (rozsivky) – testovány jsou některé druhy rodu *Amphora*, *Navicula*, *Nitzschia*, *Phaeodactylum*, *Thalassiosira* aj. Pro vysoký obsah olejů se využívají i někteří představitelé zelených řas (*Botryococcus braunii*, *Dunaliella salina*, *Chlamydomonas reinhardtii*, *Chlorella pyrenoidosa*, *Ch. vulgaris*, *Scenedesmus obliquus*). Další pokusy byly provedeny na rodu *Isochrysis* z oddělení Haptophyta (Hallmann 2007; Demirbaş 2009).

Ačkoliv se v současné době výzkum a vývoj biopaliv z řas těší velkému zájmu, potrvá ještě dlouho, než bude schopen dostatečně konkurovat palivům a dalším produktům z ropy. Rozvoj biopaliv závisí především na ekonomické výhodnosti jejich produkce. V současné době je ale stále rentabilnější využívání fosilních zdrojů, a proto se biotechnologie zatím těžko prosazují (Parka et al. 2011). Řasy však mají oproti jiným obnovitelným zdrojům řadu výhod. Jde především o celoroční neomezenou schopnost vysoké produkce olejů a škrobů za přísunu jen základních živin (převážně dusíku a fosforu např. z odpadních vod) a to bez nutnosti používání pesticidů nebo herbicidů. Proto je jen otázka času, kdy díky zdokonalení a optimalizaci procesu produkce klesne cena biopaliv z řas na přijatelnou hodnotu.

1.1.3. Čištění odpadních vod a bioindikace

Řasy a sinice jako fotoautotrofní organismy a primární producenti potřebují pro svůj růst a rozmnožování zejména CO₂, dusík, fosfor a draslík. Aby se při velkoobjemových kultivacích dosáhlo požadovaného množství biomasy, musí být zajištěn dostatečný přísun těchto živin, což může být z hlediska energetického a tedy i finančního poměrně náročné. Jako zdroj těchto látek však může být použita odpadní voda z průmyslových areálů nebo městské kanalizace, což se využívá (zatím jen v menší míře) v konečných fázích čištění odpadních vod (Hoffmann 1988). Tento princip lze uplatnit i při výrobě

biopaliv z řas (viz předchozí podkapitola). Jedná se v podstatě o cyklus, kdy řasy/sinice mají dvojí využití. Jednak slouží jako hlavní surovina pro biopaliva a zároveň jako přírodní „čistírna“ odpadní vody, která při tomto procesu vzniká (Bošnjaković 2013).

V porovnání s běžnými postupy, je využití řas a sinic při čištění odpadních vod šetrnější k životnímu prostředí, protože organické polutanty zabudovávají přímo do svých buněčných složek, jako jsou lipidy a sacharidy a není tedy potřeba dalších chemických zásahů (Wang et al. 2010). Pro vysokou schopnost redukce fosforu, dusíku, těžkých kovů a jiných ve vodě nežádoucích látek se k těmto účelům hodí např. *Spirulina/Arthrospira platensis*, *Chlorella vulgaris* nebo *Scenedesmus obliquus* (De-Bashan & Bashan 2010).

Existuje také spousta druhů řas a sinic, které jsou na rozdíl od předešlých citlivé na znečištění, a proto se mohou uplatnit při bioindikaci kvality vod a přítomnosti toxických látek. V souladu s WFD (Water Framework Directive) jsou jako vhodné organismy (kromě planktonu, vodních bezobratlých, makrofyt a ryb) využívány společenstva fyto bentosu, tj. souboru fototrofních mikrofyt (zelené řasy, rozsivky, ruduchy, sinice apod.) obývajících dno a jiný pevný substrát (Marvan & Heteša 2006). Hlavní výhody biomonitoringu spočívají ve schopnosti poskytnout odraz dlouhodobějšího stavu prostředí na sledované lokalitě a reálného působení více faktorů včetně jejich interakcí na vodní společenstva, jejichž prostřednictvím lze získávat objektivní informace o kvalitě vody nezávisle na čase (Conti 2008).

1.1.4. Zemědělství

Řasy a sinice jsou ubikvitní organismy, a proto je můžeme nalézt i v půdě, kde jako součást edafonu mají vliv na její kvalitu a úrodnost. Produkci polymerů, které se shlukují ve formě malých částic, pomáhají udržovat půdní vlhkost (Borowitzska 1995). Některé sinice (např. *Anabaena*, *Aulosira*, *Nostoc*, *Tolypothrix*) mají schopnost fixovat atmosférický dusík a tím zvyšovat jeho obsah v půdě (Song et al. 2005). V buňkách řas se nacházejí rostlinné hormony, aminokyseliny, mastné kyseliny a stopové prvky, které mohou ovlivňovat růst a vývoj vyšších rostlin i důležitých půdních mikroorganismů a dokonce zvyšovat jejich rezistenci vůči patogenům. V posledních letech proto roste zájem o získávání a využívání těchto látek jako biologická hnojiva nejen v tropických a subtropických oblastech na rýžových plantážích (kde jde především o ekonomické důvody), ale i v evropských zemích či USA ve snaze

o ekologický přístup v zemědělství (zejména snížení spotřeby dusíku z chemických hnojiv). Byly provedeny a stále se pracuje na mnoha studiích, které například potvrzují pozitivní efekt výše zmíněných látek z řas a sinic při pěstování zeleniny, ovoce a jiných zemědělských plodin (Chojnacka et al. 2005).

I když tendence současného zemědělství směřují k ekologičtějším metodám i při ochraně plodin před různými chorobami a škůdci, stále výrazně převládá potřeba chemických hnojiv, pesticidů aj., což se negativně odráží na stavu životního prostředí i lidském zdraví. Přírodní látky získané z řas (testují se zejména mořské řasy) se rovněž vyznačují protiplísňovými, antibakteriálními a dalšími účinky, které zvyšují odolnost rostlin. Nemají sice tak rychlý účinek jako přípravky na chemické bázi, pro životní prostředí však představují minimální riziko (Chojnacka et al. 2005).

1.2. *Chlorella*

1.2.1. Historie popisu rodu a taxonomické zařazení

Rod *Chlorella* patří mezi celosvětově nejprozkoumanější a nejznámější skupinu mikroskopických řas. Jedná se o jednobuněčnou, převážně sladkovodní ubikvitní řasu (některé druhy jsou i mořské, terestrické a symbiotické) patřící do oddělení Chlorophyta – zelené řasy, třídy Trebouxiophyceae. Na úvod je nutné zmínit, že jde o nesmírně rozsáhlou skupinu řas, která od svého objevu prošla celou řadou revizí a ani nejnovější závěry nejsou zdaleka konečné. Pomocí sekvenování se například zjistilo, že některé druhy patří do tř. Trebouxiophyceae (*Chlorella kesslerii*, *Ch. sacharophila*, *Ch. minutissima*, *Ch. ellipsoidea*, *Ch. vulgaris*, *Ch. sorokiniana*), ale např. *Ch. fusca* patří do tř. Chlorophyceae (Fiedl 1995).

Přes 50 let (od roku 1919) sloužili zástupci tohoto rodu jako modelové organismy v rostlinné fyziologii a biochemických výzkumech (Kessler & Soeder 1962). Avšak obrovská fylogenetická diverzita tohoto rodu v kombinaci s nedostatkem morfologických znaků v různých stádiích životního cyklu ztěžuje identifikaci jednotlivých druhů a díky tomu vzniklo mnoho odlišných názorů na celý systém tohoto taxonu. Od objevu prvního druhu po současně uznávaný systém (který je však průběžně obměňován) bylo k determinaci a taxonomickému vymezení použito mnoho metod a přístupů.

Přelom 19. a 20. století - první studie, morfologické metody

Jako první byl popsán druh *Chlorella vulgaris* (Beijerinck 1890). Postupně pak bylo identifikováno více než 100 dalších druhů, přičemž se vycházelo z klasické taxonomie založené na morfologických znacích. Na základě kritérií, jako je velikost a tvar buněk a chloroplastů, viditelnost pyrenoidu apod., které stanovil Pascher (1915), vznikla skupina zvaná *Euchlorella*, do které patřily nejběžnější druhy – *Chlorella vulgaris*, *Ch. pyrenoidosa* a *Ch. ellipsoidea*. Tato taxonomie se však pro determinaci ukázala jako nejednoznačná zejména kvůli nedostatku morfologických odlišností.

Beijerinck popsal druh *Chlorella vulgaris* v 19. století s maximální pečlivostí a za pomoci nejmodernějších metod, které mohla jeho doba nabídnout. Usiloval o to, aby na základě jeho popisu bylo možné tento druh i celý rod snadno identifikovat. To však

netušil, že determinace druhů této skupiny se stane jednou z nejobtížnějších v systému kokálních zelených řas 20. století.

60. – 90. léta - molekulární, biochemické a další přístupy

Postupem času byla provedena řada studií s cílem zrevidovat systém rodu na základě výživových požadavků, morfologických vlastností (Shrift & Sproul 1963, Fott & Nováková 1969), ultrastruktury a chemického složení buněčné stěny (Atkinson et al. 1972), ultrastruktury pyrenoidu (Němcová & Kalina 2000), fyziologických, biochemických a dalších charakteristik (Kessler 1976, Huss et al. 1999). Všechny tyto studie vedly k jednomu hlavnímu závěru, a tedy, že se jedná o velmi heterogenní skupinu řas a že více než na morfologii bude potřeba klást důraz na fyziologické a biochemické vlastnosti.

Na tři biochemické charakteristiky se při svém experimentu zaměřili Kessler a Soeder (1962). Konkrétně se jednalo o ne/přítomnost enzymu hydrogenázy, formování sekundárních karotenoidů při nedostatku dusíku a ne/přítomnost sacharidů uvnitř buňky a v buněčné stěně, které se zbarví dočervena při reakci s rutheniovou červení. Celkem se testovalo 25 kmenů *Chlorella* a výsledkem bylo jejich rozdělení do 4 skupin, z nichž 3 byly jasně definovány. Do první skupiny, která byla označena jako *Chlorella pyrenoidosa*, byly zařazeny druhy se silnou hydrogenázovou aktivitou, tmavě oranžovým zbarvením sekundárních karotenoidů při nedostatku dusíku a žádnou reakcí na rutheniovou červeně. Druhá skupina v čele s *Ch. vulgaris* nevykazovala žádnou hydrogenázovou aktivitu, při nedostatku dusíku ztrácela chloroplasty a karotenoidy a reagovala s rutheniovou červení jasně rudým zbarvením. Třetí skupina patřila pod *Ch. ellipsoidea* s charakteristickým eliptickým tvarem buněk, absencí hydrogenázy, při dusíkovém deficitu postupně ztrácela barvu a nereagovala s rutheniovou červení. Poslední skupinu podle testu už jednoznačně definovat nelze, protože má podobné charakteristiky se skupinou první a druhou. V roce 1969 byl popsán druh *Ch. kessleri* – třetí z hlediska významnosti pro potravní doplňky hned po druzích *Chlorella pyrenoidosa* a *Ch. vulgaris*.

O 13 let později pracoval Kessler (1976) již se 77 kmeny, které na základě stejných charakteristik rozdělil do 12 taxonů s tím, že zohledňoval i další kritéria jako například

ne/schopnost redukovat dusík, míru tolerance vůči acidifikaci a salinitě nebo základní složení DNA.

Friedl (1995) a Huss et al. (1999) pomocí fyziologických a biochemických vlastností, ultrastruktury a molekulárních dat (18S rRNA) došli k závěru, že taxony *Chlorella* se v rámci Chlorophyta dělí do dvou tříd – Trebouxiophyceae a Chlorophyceae. Současně navrhli, aby se do první třídy řadil tzv. pravý rod *Chlorella* zastoupený pouze druhy *Ch. vulgaris*, *Ch. pyrenoidosa*, *Ch. lobophora*, *Ch. sorokiniana* a *Ch. kessleri*. Za základní společné znaky je zde považována přítomnost glukosaminu jako hlavní složka buněčné stěny (v angličtině označení jako glukosamine-type) a dvojitý tylakoid rozdělující matrix pyrenoidu na dvě části. Do dalšího taxonu “*Chlorella*“ v rámci třídy Trebouxiophyceae zahrnuli druhy “*Ch.*“ *protothecoides*, “*Ch.*” *ellipsoidea*, “*Ch.*” *krabilis*, “*Ch.*” *saccharophila* a “*Ch.*” *luteo-viridis*. Do třídy Chlorophyceae pak podle tohoto systému patří “*Ch.*” *zofingiensis* a “*Ch.*” *homosphaera*.

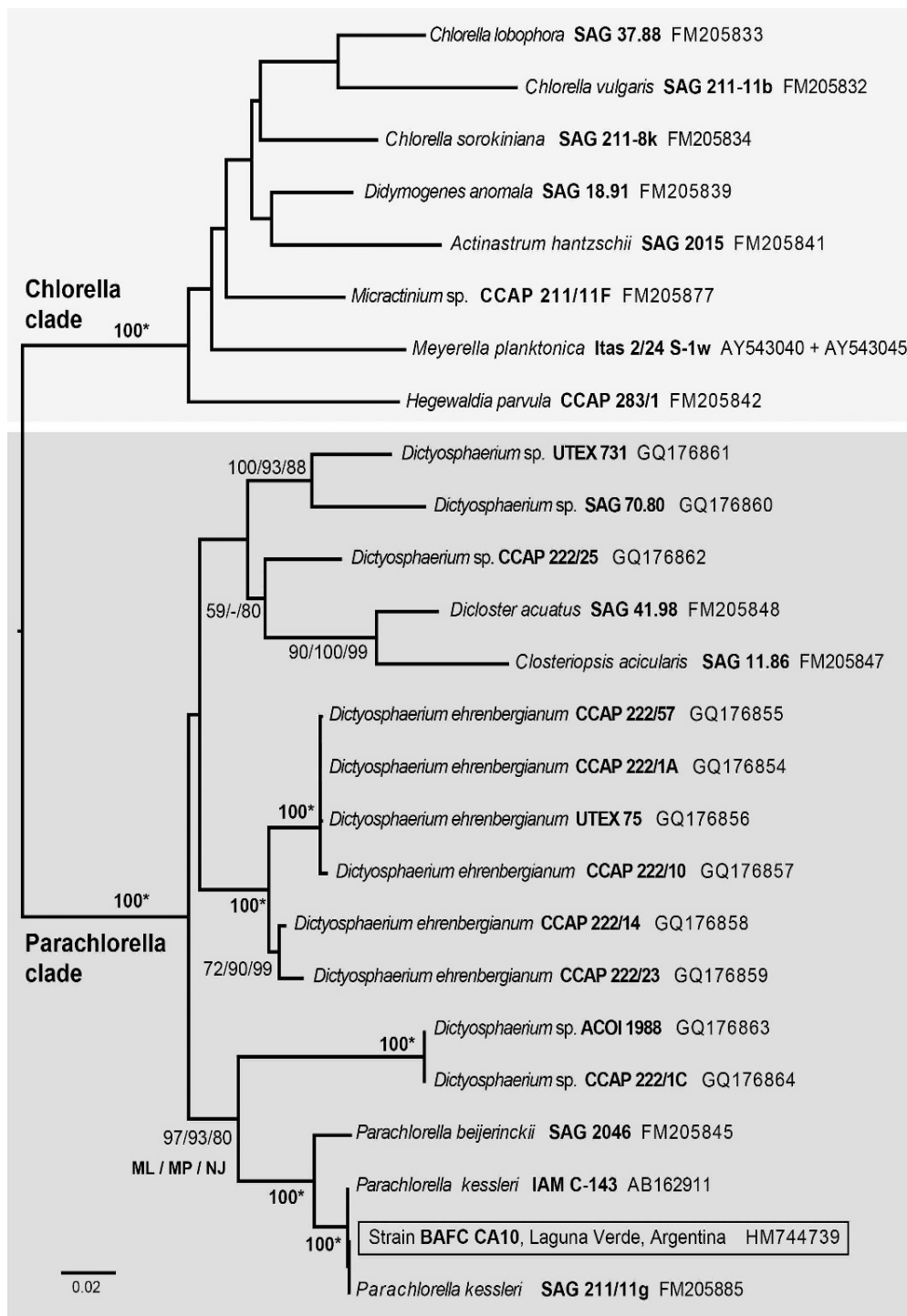
Současná taxonomie

Podle současných biochemických a molekulárních dat patří do tzv. pravého rodu *Chlorella* pět druhů: *Chlorella vulgaris*, *Ch. lobophora*, *Ch. sorokiniana*, *Ch. heliozoae* a *Ch. variabilis* (Huss et al. 1999; Pröschold et al. 2011). Recentní fylogenetické studie ukazují, že morfologické znaky charakteristické pro rod *Chlorella* jsou sdíleny i dalšími liniemi v rámci třídy Chlorophyceae a Trebouxiophyceae (Neustupa et al. 2009). V novější literatuře se proto často objevuje výraz „*Chlorella*-like“ (tedy něco jako *Chlorella*-podobný), který bývá v kontextu spojen s druhy, kmeny nebo právě morfologickými a jinými znaky. V rámci Trebouxiophyceae patří zástupci rodu *Chlorella* tradičně do čeledě Chlorellaceae, která se nově podle Krienitz et al. (2004) rozděluje na dvě sesterské skupiny:

- *Parachlorella* (*Parachlorella*-clade) v čele s *Parachlorella beijerinckii* gen. et sp. nov., *P. kessleri* comb. nov., *Dicloster acuatius* a *Closteriopsis acicularis*
- *Chlorella sensu stricto* (*Chlorella*-clade) má 8 různých linií a byla rozšířena na 14 druhů. Patří sem pravé, sférické druhy jako *Chlorella vulgaris*, *Ch. lobophora* a *Ch. sorokiniana*, ale také planktonní řasy s výrazně odlišnou morfologií – *Diacanthos belenophorum* (= *Micractinium belenophorum*),

některé druhy rodu *Micractinium*, *Didymogenes*, *Actinastrum* a *Dictyosphaerium* (Pröschold et al. 2010). Fawley et al. (2005) zde přiřadil rod *Meyerella* a Luo et al. (2010) zase rod *Hegewaldia*.

Rozdělení čeledi Chlorellaceae na dvě skupiny bylo podpořeno analýzami založenými na ultrastruktuře zejména syntézy buněčné stěny autospor u druhů obou skupin (Yamamoto et al. 2005) a je tedy v současné vědecké sféře akceptováno (obrázek 1).



Obrázek 1: Nejpravděpodobnější fylogenetický strom odvozený od sekvencí SSU a ITS rDNA u *Chlorella*-like řas. Za každým názvem druhu je název příslušného kmene a přístupové číslo do databáze GenBank. Čísla jednotlivých uzlů představují bootstrap hodnoty (stupeň podpory jednotlivých větví vzhledem k vstupním datům) pro metody maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP) a neighbor joining (NJ). 100* znamená 100% podpoření všemi třemi metodami (Juárez et al. 2011)

1.2.2. Morfologie, ultrastruktura a životní cyklus

Většina vědecké literatury popisuje druhy rodu *Chlorella* ve vegetativním stádiu jako kokální, kulovité, sférické až elipsoidní řasy o rozměrech 5-10 μm (obrázek 2). Velikost a tvar se mohou mírně lišit i v rámci druhu vlivem různých faktorů - stáří, živiny, environmentální nebo kultivační podmínky (Fott & Nováková 1969). Žijí převážně soliterně nebo tvoří kolonie v počtu do 64 buněk většinou bez slizového obalu. V žádné fázi buněčného cyklu nevytváří bičíky (Beijerinck 1890; Bock et al. 2011).

V každé buňce se nachází pouze **jeden chloroplast**, který bývá rozdělen na dva přibližně stejné laloky. Mezi základní fotosyntetická barviva nacházející se v chloroplastu patří chlorofyl *a* a *b* doplněné zejména luteinem, β -karotenem, neoxantinem a violaxantinem.

Buněčná stěna tvoří asi 13,6% suché buněčné hmotnosti. Elektronovým mikroskopem ji lze pozorovat jako dvě fáze (vrstvy) složené z mikrofibril uložených ve dvou směrech, které spolu s ostatními složkami stěny tvoří kontinuální matrix (Northcote et al. 1958). Tloušťka buněčné stěny se odvíjí od rychlosti růstu. Čím je růst kultur masivnější, tím více jsou stěny buněk tenčí (Němcová & Kalina 2000). Průměrné zastoupení jednotlivých chemických složek buněčné stěny je následující:

- proteiny (27%)
- lipidy (9,2%)
- α -celulóza (15,4%)
- hemicelulóza (31%)
- glukosamin (3,3)
- popel obsahující železo a vápník (5,2%)

Obsah proteinů je v porovnání s jinými rostlinnými buněčnými stěnami poměrně vysoký. Některé mohou být ve formě glykoproteinů asociovaných s hemicelulózou. α -celulóza je tvořena polysacharidy galaktózou, arabinózou, manózou, xylózou, v závislosti na obsahu glukózy také rhamnózou. Hemicelulóza zajišťující pevnost a tvar buněk je bohatá zejména na galaktózu, relativně dosti obsahuje také manózu, arabinózu, xylózu a rhamnózu. U některých druhů obsahuje vnější vrstva buněčné stěny složku blízkou podobnou sporopoleninu, což je vysoce rezistentní biopolymer známý na povrchu pylu (Atkinson et al. 1972; Gunning & Steer 1996).

Každá buňka obsahuje jedno velké, více méně **kulovité jádro** a jeden **pyrenoid**, který ovšem může chybět (Bock et al. 2011). Pyrenoid je uložen zpravidla centrálně a v jeho okolí se nachází homogenní matrix z granulárních škrobových zrn. Touto matrix prochází většinou dva páry vzájemně oddělených tylakoidních lamel (Nemcova & Kalina 2000). Někdy mohou být okolo pyrenoidu pozorovány bílkovinné „pásy“ uspořádané do mřížky, čímž pyrenoid získává krystalickou strukturu (Bertagnolli & Nadakavukar 1970).

V každé buňce je **jedna mitochondrie** a mikrotělísko (membránový váček obsahující enzymy a další důležité látky), které se nachází v bezprostřední blízkosti pyrenoidu. V místech, kterými mitochondrie prochází skrze chloroplast, vytváří trojrozměrnou retikulární síť, která, jak se ukázalo, je poměrně běžná pro jednobuněčné organismy z říše Plantae, ale u mnohobuněčných se za normálních okolností nevyskytuje (Atkinson et al. 1972; Atkinson et al. 1974).

Ačkoliv je *Chlorella* v důsledku **absence bičíku** nepohyblivá, v její cytoplazmě se nachází dva páry centriol (bazálních tělísek), které jsou pravděpodobně pozůstatkem bičíkatých předků (Gunning & Steer 1996).



Obrázek 2: Buněčná struktura druhu *Chlorella vulgaris*; zětšení 1000 x 750; zdroj: botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/110

Rozmnožování a životní cyklus

Druhy rodu *Chlorella* mají poměrně jednoduchý životní cyklus. I v nepříznivých či proměnlivých podmínkách vykazují rychlou reprodukční aktivitu – jsou výživově nenáročné. Vyžadují jen základní složky pro fotosyntézu a malé množství minerálů. Je známo pouze nepohlavní rozmnožování pomocí autospor – nepohyblivých buněk s buněčnou stěnou. Průměrný počet autospor vzniklých z jedné mateřské buňky se odvíjí od environmentálních nebo (v případě kultivací) laboratorních podmínek a je uváděn v rozmezí 2, 4 až 8, méně často až 16 (Yamamoto et al. 2004) nebo 32 (Hirata 1972). K dělení dochází každých 16 až 20 hodin (Myers 1953). Dceřiné buňky někdy zůstávají přisedlé na zbytcích mateřské buněčné stěny a vytváří tak kolonie obklopené slizovým obalem. V příznivých podmínkách je jejich růst velice intenzivní. Svůj objem mohou zdvojnásobit i během několika hodin (Bock et al. 2011). Obecně lze životní cyklus mikroskopických organismů pozorovat pouze pomocí laboratorních technik. V případě sinic a řas se k tomu využívají kultivace a již v 60. letech byla pro tyto účely zavedena metoda synchronních kultur, tj. všechny buňky jsou ve stejné fázi životního cyklu, jsou stejně staré (Tamiya 1957; Lorenzen & Rupal 1960). Touto metodou byl studován i **buněčný cyklus** řasy *Chlorella*. Lze v něm rozlišit dva základní procesy: (1) buněčný růst od uvolnění autospor až po dospělou buňku; (2) buněčné dělení, kdy postupně probíhá dělení chloroplastu na dvě poloviny, replikace jaderné DNA, první a následně druhé dělení protoplastu, dospívání a uvolnění autospor (Yamamoto et al. 2004).

1.2.3. Druhy rodu *Chlorella*

Po objevu typového druhu *Ch. vulgaris* v roce 1890 bylo izolováno velké množství kokálních zelených řas z různých habitatů (sladkovodních, mořských, terestrických, dokonce i z lišejníků, prvoků (*Paramecium*) nebo z žahavců (*Hydra*) ve formě symbiontů, jenž byly posléze na základě morfologie zařazeny do rodu *Chlorella* (Komárek & Fott 1983). Morfologických znaků, které by se daly pozorovat pod světelným mikroskopem, je však nedostatek a ani asexuální reprodukce formou autospor k determinaci nijak zvlášť nepřispívá. Dnes se systém kokálních řas opírá výhradně o molekulární studie založené např. na sekvencích rDNA, podle kterých se tyto organismy vyvíjely nezávisle na sobě. Rod *Chlorella* tedy představuje polyfyletickou a spíše uměle vytvořenou skupinu organismů, jenž sdílí podobnou

morfologii (Huss et al. 1999). Taxonomie proto zůstává velice komplikovaná, což celkem jasně vyplývá i z úvodu této kapitoly. Zejména za posledních padesát let v souvislosti se zdokonalováním vědecko-technologických metod docházelo k dramatickým změnám celého systému.

V celosvětové databázi AlgaeBase je aktuálně uvedeno 106 názvů druhů, z nichž taxonomicky je uznáno 40. Ostatní představují homotypická (nomenklatorická) nebo heterotypická (taxonomická) synonyma, názvy s nejasným taxonomickým postavením apod. (Guiry & Guiry 2014). Některé druhy se podle molekulárních studií a fylogeneze přearazují do jiných skupin. Příkladem je *Chlorella kessleri*, nově jako *Parachlorella kessleri* nebo *Chlorella luteoviridis*, která je nyní *Heterochlorella luteoviridis* (Champenois et al. 2014).

V oblasti zdravé výživy, kde není nutné klást na taxonomii hlubší význam, se používají “tradiční“ názvy, které přehledně uvádí Komárek & Fott (1983). Druhy jsou zde rozlišeny především podle tvaru chloroplastů, přítomnosti či absence pyrenoidu a způsobu uvolňování autospor. Pro praktické použití je však uvedená taxonomie příliš složitá. Champenois et al. (2014) se na základě rešerše nejnovější literatury a výzkumu světových sbírek řasových kultur snaží o revizi a sjednocení taxonomických a komerčních názvů druhů řasy *Chlorella*, které jsou v Evropě aktuálně využívány pro doplňky stravy a potravinářství. Díky tomu se ukazuje, že komerční jména nejsou vždy v souladu s aktuální taxonomií. Jde například o druhy *Ch. pyrenoidosa*, *C. vulgaris* a *Ch. luteoviridis* uvedené v evropském katalogu Novel Food Catalogue.

V následující tabulce 2 je přehled názvů druhů rodu *Chlorella*, které jsou podle databáze AlgaeBase v současné době taxonomicky akceptovány a jsou využívány ve zdravé výživě nebo biotechnologiích.

Tabulka 2: Přehled názvů druhů rodu *Chlorella* s jednoznačným nebo potencionálním využitím v oblasti zdravé výživy a biotechnologiích (Bock et al. 2011; Guiry & Guiry 2014)

Sladkovodní	Terestrické	Sladkovodní/terestrické
<i>Ch. pyrenoidosa</i>	<i>Ch. minutissima</i>	<i>Ch. ellipsoidea</i>
<i>Ch. saccharophila</i>		<i>Ch. sorokiniana</i>
<i>Ch. regularis</i>		<i>Ch. vulgaris</i>
<i>Ch. variabilis</i>		

1.2.4. *Chlorella* jako doplněk stravy - obsahové látky a jejich pozitivní účinky

Chlorella (včetně dalších již v této práci uvedených sinic a řas) bývá řazena mezi tzv. funkční (zelené) potraviny, jelikož mají podle níže citovaných i dalších studií pozitivní účinky na zdraví člověka. Také poměr základních nutričních hodnot bývá zpravidla optimálnější než u běžných potravin (tabulka 3). Podobně jako *Spirulina/Arthrospira* se i *Chlorella* přidává ve formě prášku do běžných potravin (např. sušenky, pečivo, těstoviny, jogurty aj.) k obohacení o důležité látky nebo je lze použít jako přírodní zelené až oranžové barvivo (Chu 2011; Batista et al. 2013).

Tabulka 3: Srovnání průměrných nutričních hodnot (% suché hmotnosti) vybraných základních a funkčních potravin včetně řasy *Chlorella* (Becker 2004)

		Proteiny	Sacharidy	Tuky
Základní potraviny	vejce	47	4	41
	sója	37	30	20
	mléko	26	38	28
	hovězí maso	20,6	1	4,5
	rýže	8	77	2
Funkční potraviny	<i>Spirulina/Arthrospira platensis</i>	52-60	15	3
	<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	57	26	2
	<i>Chlorella vulgaris</i>	51-58	12-17	14-22
	<i>Dunaliella salina</i>	39-61	14-32	14-20
	<i>Haematococcus pluvialis</i>	48	27	15
	mladý ječmen	28	41	4

Níže jsou popsány jednotlivé skupiny obsahových látek v buňkách řasy *Chlorella*, jejich množství včetně srovnání s podobnými organismy či potravinami a vlivu – pozitivnímu působení na zdraví člověka. Uvedené hodnoty v tabulkách jsou průměrné,

orientační. Jejich aktuální celkové množství se vždy odvíjí od kultivačních a jiných podmínek.

Základní živiny

Proteiny, resp. jejich vysoký podíl v biomase (až 58%), je jedním z hlavních důvodů, proč se začalo uvažovat o řase *Chlorella* jako o unikátním doplňku stravy. Udává se, že jich obsahuje téměř třikrát více, než se nachází v hovězím nebo kuřecím mase a dvacetkrát více než v rýži nebo bramborách. Nutriční hodnota těchto proteinů je značná, protože jsou v nich zahrnuty všechny pro člověka i zvířata esenciální aminokyseliny (tabulka 4). Již za první a druhé světové války studovali němečtí vědci tuto řasu jako alternativu pro zmírnění nedostatku potravy. Uvažovalo se o ní i jako potravina pro kosmonauty z NASA. Obecně jsou řasové proteiny v porovnání s živočišnými snadněji a rychleji vstřebávány trávicím traktem, a to díky jejich nízké molekulové hmotnosti, v případě řasy *Chlorella* však jen za předpokladu desintegrace buněčné stěny³. *Chlorella* je navíc dokáže produkovat s padesátkrát větší efektivitou než jiné na proteiny bohaté plodiny jako například sója (Lee & Rosenbaum 1987). Díky jejich velkému množství a vysoké kvalitě, zajišťuje pravidelná konzumace této řasy stabilní hladinu cukru v krvi, čímž organismus nemá sklon k hypoglykémii. Výhodou je také jejich optimální poměr (např. nižší obsah metioninu, který ve větším množství může podporovat rakovinové bujení a naopak vyšší obsah lysinu) (Pitchford 2003).

³ Desintegrace buněčné stěny je jednou z nejdůležitějších součástí technologického postupu při zpracování biomasy řasy *Chlorella* za účelem výroby doplňků stravy (viz kapitola 3).

Tabulka 4: Procentuální zastoupení esenciálních aminokyselin u řasy *Chlorella* a jeho srovnání se sinicí *Spirulina/Arthrospira* (dle Bedwicke et al. 1984)

Název aminokyseliny	Zkratka	% suché biomasy		Hlavní účinky
		<i>Chlorella</i> spp.	<i>Arthrospira</i> spp.	
fenylalanin	Phe	4,03	4,97	proti únavě, depresím, bolesti, produkce kolagenu
histidin	His	1,55	1,77	esenciální v dětství
isoleucin	Ile	4	6,03	proti ochabování svalstva
leucin	Leu	6	8,02	proti bolesti, podpora hojení
lysin	Lys	6,09	4,59	proti oparům, virům, produkce kolagenu a protilátek
methionin	Met	1,55	1,37	eliminace těžkých kovů
threonin	Thr	3,25	4,56	posílení imunity, produkce kolagenu
tryptofan	Trp	1,27	1,4	pro klidný spánek, mentální zdraví - produkce serotoninu
valin	Val	4,58	6,49	Neurotransmitter

Sacharidy jsou důležitou výživovou složkou živočichů a skládají se ze tří hlavních komponent – uhlíku, vodíku a kyslíku. Podle chemické struktury se rozdělují na monosacharidy (např. glukosa), disacharidy (např. maltosa) a polysacharidy (škrob) (Darush & Husainy 2011).

Celkový obsah sacharidů v řase *Chlorella* je v porovnání s proteiny poměrně nízký, přesto mají některé z nich velký nutriční význam. Například β -1,3-glukan je zásobní polysacharid s mnoha biologicky významnými vlastnostmi a patří do komplexu látek známých pod zkratkou CGF (Chlorella Growth Factor; viz níže). Poprvé ho izoloval Kojima et al. (1973) z kultury *Ch. pyrenoidosa* a nazval jej chlorellan. Na základě následné řady experimentů (na myších apod.) byly pozorovány silné stimulační účinky na imunitní systém. Tento glukan totiž dokáže podporovat produkci interferonu a makrofágů, nezbytné složky imunitního systému, čímž dochází k pohlcování volných radikálů a organismus je tak lépe chráněn před virovými a nádorovými nemocemi. Kromě doplňků stravy *Chlorella* bývá obsažen i v kosmetických přípravcích

(tzv. anti-aging a oční krémy, tělová mléka či pleťové masky) pro své hydratační a regenerační schopnosti (Posten & Walter 2012).

Za zmínku stojí také sacharidy nacházející se v buněčné stěně (viz podkapitola 1.2.2), které mají podobné účinky na trávicí soustavu (zejména střeva) jako vláknina.

Lipidy a mastné kyseliny jsou další důležitou složkou buněk sinic a řas. Tvoří hlavní komponenty buněčných membrán, mají zásobní funkci, mohou být produktem buněčného metabolismu či zdrojem energie.

Mastné kyseliny se na základě své chemické struktury dělí na dvě základní skupiny: (1) nasycené – SAF, SAFA (Saturated Fatty Acids) jsou obecně považovány za zdraví škodlivé, zejména kvůli zvyšování hladiny cholesterolu a negativního působení na kardiovaskulární systém; (2) nenasycené, u kterých dále rozlišujeme mononenasycené (MUFA - Monounsaturated Fatty Acids), polynenasycené (PUFA – Polyunsaturated Fatty Acids) a trans-nenasycené. MUFA mají na lidský organismus převážně neutrální vliv, naopak konzumace trans-nenasycených mastných kyselin působí výrazně negativně (Tvrzická et al. 2011).

Pro zdraví člověka, resp. zvířat jsou tedy důležité PUFA, které jsou známé tím, že obsahují relativně dlouhý uhlíkatý řetězec. Některé mikroskopické řasy stejně jako druhy rodu *Chlorella* jsou schopny za určitých environmentálních podmínek (světlo, teplota, pH aj.) shromažďovat ve svých buňkách značné množství těchto látek (až 60% suché hmotnosti). Nejcennější jsou tzv. esenciální omega (ω) 3- a 6- nenasycené mastné kyseliny. *Chlorella* obsahuje nejvíce kyselinu linolovou, α -linolenovou, γ -linolenovou a palmitovou (tabulka 5). Jsou to velice cenné látky, jelikož přispívají ke snižování cholesterolu v krvi, mají protisrážlivé a antiarytmické účinky a příznivě působí na kardiovaskulární systém (Sansawa et al. 2006; Bishop & Zubeck 2012).

Tabulka 5: Přehled mastných kyselin v řase *Chlorella* a srovnání se sinicí *Spirulina/Arthrospira* (^a Becker 1994, b Ötles & Pire 2001)

Skupina	Název mastné kyseliny	Zkratka	Lipidové číslo	% suché biomasy	
				<i>Chlorella pyrenoidosa</i>	<i>Spirulina/Arthrospira platensis</i>
LCFA	myristová	MA	14:0	2 ^a	0,2 ^a
	palmitová	PA	16:0	20,4 ^a	45,5 ^a
	stearová	SA	18:0	15,3^a	1,3 ^a
MFA-cis	olejová	OA	18:1n9-c	6,6^a	3,8 ^a
	palmitoolejová	-	16:1n-7c	5,8 ^a	9,6 ^a
PUFA n-3	α-linolenová*	ALA	18:3n-3	15,75 ^b	nedetekováno ^b
PUFA n-6	linoleová*	LA	18:2n-6	12,26 ^b	17,43 ^b
	γ-linolenová	GLA	18:3n-6	0,51 ^b	8,87 ^b

LCFA – nenasycené MK s dlouhým řetězcem, MFA-cis – mononenasycené MK s cis-konfigurací, PUFA – polynenasycené MK, * esenciální MK

Vitamíny a minerály tvoří asi 10% sušiny. Jedná se o více než 20 vitamínů, z nichž ty nejdůležitější znázorňuje tabulka 6. Pro srovnání jsou uvedeny další významné zdroje z funkčních potravin – *Spirulina/Arthrospira*, *Porphyra* (pokrm Sushi) a Mladý ječmen. Tabulka ukazuje, že *Chlorella* je výborným zdrojem vitamínů, fosforu, zinku a železa. Množství minerálních látek v biomase *Chlorella* lze navíc navýšit jejich přidáním do kultivačního média, ze kterého je řasa sorbuje s vysokou efektivitou (MBÚ AV ČR Třeboň).

Tabulka 6: Zastoupení vitamínů a minerálů u řasy *Chlorella*, sinice *Spirulina/Arthrospira*, ruduchy *Porphyra* (Nori) a mladého ječmene (^a Bedwicke et al. 1984; ^b Ali & Saleh 2012; ^c MacArtain et al. 2007; ^d <http://www.zelenyobchod.cz/products/jecmen-fresh-mlady-jecmen/>)

	Název triviální/ chemický	Množství na 100 g suché biomasy			
		<i>Chlorella</i> spp. ^a	<i>Spirulina/</i> <i>Arthrospira</i> spp. ^b	<i>Porphyra</i> <i>umbilicalis</i> ^c	mladý ječmen ^d
Vitamíny rozpuštěné v tucích	provitamin A/ β-karoten	180 mg	140 mg	23,83 mg	1,5 mg
	E/ tokoferol	10,5 mg	neuveďeno	1,4 mg	15 mg
	D/ kalciferol	0,173 mg	neuveďeno	neuveďeno	neuveďeno
	K1/ fylochinon	3,21 mg	2 mg	neuveďeno	0,776 mg
Vitamíny rozpuštěné ve vodě	B1/ thiamin	2,56 mg	3,5 mg	0,96 mg	0,43 mg
	B2/ riboflavin	4,8 mg	4 mg	3,4 mg	2,41 mg
	B3/ niacin	23,8 mg	14 mg	8,95 mg	3,63 mg
	B5/ kys. pantotenová	4,68 mg	0,1 mg	neuveďeno	5,1 mg
	B6/ pyridoxin	2,4 mg	0,8 mg	1,5 mg	17,8 mg
	B9/kys. listová	1,3 mg	0,01 mg	12,5 mg	0,946 mg
	B12/ kobalamin	0,42 mg	0,32 mg	0,029 mg	neuveďeno
	C/ kys. L- askorbová	34 mg	neuveďeno	161 mg	457 mg
	H/ biotin	0,39 mg	0,01 mg	neuveďeno	neuveďeno
IP3/ inositol	165 mg	neuveďeno	6,2 mg	neuveďeno	
Minerály	draslík/ K	952 mg	1 400 mg	1 602 mg	6 830 mg
	fosfor/ P	959 mg	800 mg	720 mg	394 mg
	hořčík/ Mg	315 mg	400 mg	233,9 mg	396 mg
	jód/ I	0,6 mg	neuveďeno	0,54 mg	neuveďeno
	mangan/ Mn	4,2 mg	6 mg	2,53 mg	14 mg
	měď/ Cu	0,08 mg	1,2 mg	0,57 mg	1,5 mg
	sodík/ Na	54 mg	900 mg	728,2 mg	474 mg
	vápník/ Ca	450 mg	700 mg	359 mg	548 mg
	zinek/ Zn	71 mg	3 mg	3,29 mg	2,71 mg
železo/ Fe	167 mg	100 mg	10,5 mg	13,3 mg	

Vláknina má značný podíl na detoxikaci a podpoře správné činnosti trávicího ústrojí. V suché biomase *Chlorella* tvoří asi 5% a nachází se v buněčné stěně (Bishop & Zubeck 2012).

Specifické bioaktivní látky

Chlorofyl je jednou z hlavních látek vyšších rostlin, sinic a řas. Nejde však jen o zelený pigment, ale také o složku s mnoha pro člověka příznivými vlastnostmi. Samotný název *Chlorella* může napovídat, že se tato řasa řadí mezi nejbohatší zdroje chlorofylu z celé říše Plantae (Becker 1994). Jeho koncentrace je až 3 krát větší než u jinak neméně cenného zdroje *Spirulina/Arthrospira* a pohybuje se v rozmezí 1-4 % (někdy se uvádí až 7%) z celkové buněčné hmotnosti (Bedwicke et al. 1984). U druhu *Ch. pyrenoidosa* se uvádí 3,27% (Merchant & Andre 2001).

Hlavní předností chlorofylu jsou čistící a celkově detoxikační účinky (Steenblock 1987; Nagano et al. 1978). Pomáhá tělu zbavovat se od těžkých kovů jako je arsen, kadmium, měď nebo olovo a dalších toxických látek, což je v současném stavu životního prostředí, kdy se tyto nebezpečné látky dostávají do potravního řetězce, více než prospěšné. Chlorofyl také zabraňuje vzniku zubního kazu a eliminuje zápach z úst. Působí i proti vředům a nejrůznějším zánětům – dásní, žaludku, střev, slinivky, kůže. Brání rozvoji bakterií, čímž urychluje hojení ran. Chlorofyl by měl být obsažen v jídelníčku všech, kdo trpí anémií, vysokým krevním tlakem, zácpou nebo onemocněním jater. V neposlední řadě aktivuje enzymy pro produkci vitamínů A, E a K (Pitchford 2003).

Karotenoidy jsou nejčastěji žluté nebo oranžové lipofilní pigmenty složené z izoprenových jednotek. Dělí se na dvě základní skupiny: (1) karoteny složené pouze z uhlovodíků; (2) xantofyly – kyslíkaté sloučeniny, deriváty karotenů. V buňkách řasy *Chlorella* se z první skupiny nachází zejména β -karoten. Je to zdroj vitamínu A a významný antioxidant, který potlačuje oxidativní stres v buňkách pohlčováním singletového kyslíku (reaktivní formy), čímž pomáhá předcházet vzniku různých chronických chorob včetně rakoviny, kardiovaskulárních onemocnění nebo osteoporózy. Velké množství β -karotenu se vyrábí synteticky a jeho účinnost není logicky tak vysoká jako z přírodních zdrojů. Navíc cena za jeden kilogram čistého β -karotenu se pohybuje relativně vysoko (okolo \$2500). Z těchto důvodů se jeho získávání z řasové biomasy stává čím dál více atraktivní (Baky & Gamal 2013).

Z druhé skupiny xantofylů je v této řase hlavní lutein, který tvoří až 50% všech obsažených karotenoidů (u β -karotenu je to 10%). Lutein má velký význam zejména

v prevenci okulární degenerace (poškození centrální části oční sítnice) a šedého zákalu (Bishop & Zubeck 2012).

Chlorella růstový faktor (CGF – Chlorella Growth Factor) je unikátní ve vodě rozpustný konglomerát látek tvořící přibližně 5% celkové buněčné hmotnosti. Je bohatý hlavně na nukleové kyseliny DNA a RNA a další složky jako proteiny (56,6% – včetně glykoproteinů), aminokyseliny (42,59% – kyselina glutamová, kyselina asparagová, alanin, serin, glycin a prolin), peptidy, vitamíny (1,7%), minerály, polysacharidy (4,8% – tvořené zejména glukózou, ale i manózou, rhamnózou, arabinózou, galaktózou, xylozou) a β -glukany (Han et al. 2004).

Poprvé byl CGF izolován v 50. letech v Tokyu doktorem Fujimaki pomocí elektroforézy (elektricky indukovaný pohyb suspendovaných částic) za využití horké vody – horký výluh („hot-water extract“). Následné výzkumy ukázaly, že právě tento komplex látek je zodpovědný za rychlý růst a reprodukci buněk řasy *Chlorella*. V raných fázích byly provedeny experimenty na mláďatech krysy, králíků, prasat a slepic, které ukázaly, že po přidání 5-10% řasy do běžného krmiva se dramaticky zvýšila hmotnost a velikost testovaných mláďat. Tento růst byl o 10-45% rychlejší než u kontrolní skupiny (Lee & Rosenbaum 1987). Yamagishi et al. (1961) dosáhl podobných výsledků, když řasu podával skupině desetiletých chlapců a děvčat z jedné základní školy v Tokyu a prokázal tak její pozitivní vliv na zdravý růst u dětí – odtud tedy název Chlorella růstový faktor.

Velký význam CGF dokazuje schopnost posilování imunity, hojení a regenerace lidského těla, která spočívá právě ve vysokém obsahu DNA a RNA, čímž dochází ke stimulaci dělení a růstu zdravých buněk, podpoře jejich normálních funkcí, zabraňování jejich předčasnému stárnutí a ochraně před toxickými látkami a viry (Merchant & Andre 2001). Podílí se také na opravě poškozených buněk (Lee & Rosenbaum 1987).

Nejen v Japonsku, kde se již roky zabývají definicí a využitím jednotlivých složek z řasy *Chlorella*, ale i v jiných zemích se vědci snaží o detailnější popis konglomerátu látek CGF a testování jejich účinků na laboratorních zvířatech či tkáňových kulturách. Přesný mechanismus, kterým CFG zvyšuje imunitní reakci, totiž dosud není zcela objasněn. Je zřejmé, že se nejedná o žádné přímé působení proti rakovinným buňkám, bakteriím nebo virům. Studie prováděné na modelových organismech a tkáňových

kulturách ukazují, že tajemství spočívá v aktivaci a zvyšování počtu všech důležitých látek v buňkách specifické i nespecifické imunity – cytokininů, makrofágů, T-lymfocytů a B-lymfocytů (Merchant & Andre 2001). Například Kralovec et al. (2004) zjistil zvýšenou stimulaci sekrece cytokininů ze skupiny interleukinů IL-6, IL-10, IL-12 a interferonu IFN- γ u myších peritoneálních makrofágů po aplikaci extraktu *Chlorella pyrenoidosa* (CPE). Ewart et al. (2007) testoval působení CPE na lidských periferních jednojaderných buňkách (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cell) izolovaných z krve devíti zdravých dobrovolníků (muži okolo 32 let). Na PBMC bylo *ex vivo* aplikováno CPE v koncentracích od 1,1 do 100 $\mu\text{g/ml}$. Po 24 hodinách byl zaznamenán značný nárůst sekrece interleukinu IL-10 (hlavní tlumivý, protizánětlivý cytokinin) a indukce imunitní reakce typu T_H1 (tvorba T_H1 lymfocytů stimulujících zejména buněčnou imunitu proti virům, bakteriím apod.).

Také v České republice v souvislosti se vznikem dodnes našeho hlavního zázemí řasových biotechnologií – MBÚ AV ČR v Třeboni (viz také podkapitola 1.2.5.) probíhal v 80. letech ve spolupráci s lékaři výzkum účinků práškové formy biomasy a tinktur dezintegrováných řas *Chlorella* a *Scenedesmus* na dobrovolnících. Vznikly tak preklinické studie a několik patentů zaměřených na léčbu rakoviny děložního čípku, bércových vředů či pásového oparu, např. řasová tinktura č. 183 616, vaginální globule a suppositoria č. 178 223, zásypy a masti k léčbě bércových vředů č. 152 528 (Prokeš et al. 1976; Tympl 1985; Zalabák et al. 1975).

Tyto imunostimulační účinky se v praxi mohou uplatnit nejen v prevenci nádorových onemocnění, ale také u nemocných lidí, kteří mají za sebou chemoterapii a/nebo radiační léčbu (Moss 1992; Yasukawa et al. 1996; Pitchford 2003). Léčba rakoviny a jiných chronických nemocí pomocí klasických léků nebo již zmíněné chemoterapie, dokáže jejich průběh zmírnit, v nejlepším případě se podaří nemocného úplně vyléčit. Bohužel většinou je taková léčba spojena s vedlejšími nežádoucími účinky, které mohou zdravotní i psychický stav pacienta silně poznamenat. Na základě studií z Číny a Japonska (např. Han et al. 2004; Wu et al. 2005; Sansawa et al. 2006; Hsu et al. 2010) mají doplňky stravy *Chlorella* velký potenciál jako nefarmakologická alternativa, která by mohla nahradit běžné léky nebo alespoň redukovat jejich spotřebu, a tak zmírňovat příznaky a zkvalitňovat život lidem s maligním nádorem na mozku, vysokým krevním tlakem, fibromiální (generalizovaná bolestivost svalů, poruchy spánku) a ulcerózní

kolitidou (zánětlivé onemocnění tlustého střeva a konečníku) (Merchant & Andre 2001).

1.2.5. Využití zelené řasy *Chlorella* jako doplňku stravy od historie až po současnost

Chlorella je jednou z nejvíce komerčně pěstovaných sladkovodních řas na světě, a to nejen díky svému rychlému růstu, snadné kultivaci, efektivní fotosyntetické aktivitě, ale především pro vysoký obsah mnoha cenných látek. Již krátce po svém objevu vzbudila velký vědecký zájem. Avšak první studie o jejích pozitivních účincích na lidské zdraví a využití ve zdravé výživě i kosmetice se objevily až v 50. letech 20. století v Japonsku, odkud se rychle rozšířily do mnoha zemí světa (Posten & Walter 2012). Poprvé byly masové kultivace navrženy a úspěšně testovány v Bostonu, USA v roce 1953. V témže roce následovaly země Izrael, Japonsko a Německo, v roce 1969 také Československo. Pro komerční účely začala tuto řasu masově pěstovat japonská společnost Nihon Chlorella Ryoho Kenkyukai Sendai Br. v roce 1961 (Iwamoto 2004).

Na pracovišti Mikrobiologického ústavu AV ČR, v. v. i. v Třeboni vzniklo v roce 1963 pod vedením Dr. Šetlíka v tehdejší Československu první centrum pro biotechnologický výzkum zelených řas, sinic a fotosyntetických bakterií zaměřené na jejich využití v potravinářství, kosmetickém a farmaceutickém průmyslu, pro výrobu krmiv apod.

MBÚ v Třeboni sídlí v Opatovickém mlýně – v historické stavbě, jejíž existence se podle dochovaných listin odhaduje na polovinu 13. století. V rámci projektu Algatech (Centrum řasových biotechnologií Třeboň reg.č. CZ.1.05/2.1.00/03.0110 a za podpory programu OP Výzkum a vývoj pro inovace CZ.1.05) prošel mlýn v letech 2011-2014 velkou rekonstrukcí včetně přístavby dalších prostor, a tak v současné době disponuje moderními a špičkově vybavenými biotechnologickými laboratořemi a areálem pro kultivační nádrže a plošiny s nakloněnou rovinou, kde se masově pěstuje řasa *Chlorella* (obrázek 3) (www.alga.cz/c-75-opatovicky-mlyn-.html). Výzkum je zde rozdělen do tří laboratoří. Laboratoř fotosyntézy studuje mechanismy fotosyntézy mikroorganismů, funkci pigmentů, genetiku sinic a ekofyziologii řas. Laboratoř buněčných cyklů se zabývá regulací buněčného cyklu zelených řas *Chlamydomonas*, *Scenedesmus* a *Chlorella*. Velkoobjemovou kultivaci řasy *Chlorella*, studium a výběr nových druhů řas s potenciálem jako doplňky stravy a výzkum v oblasti izolace nových

bioaktivních látek zajišťuje Laboratoř řasových biotechnologií (www.alga.cz/c-35-vyzkum.html).



Obrázek 3: Areál Mikrobiologického ústavu AV ČR, v.v.i., Třeboň – Opatovický mlýn;
© L. Šejnohová

U nás i jinde ve světě se v současné době se pro velkoobjemové kultivace nejčastěji používají druhy *Ch. vulgaris* a *Ch. pyrenoidosa*. Na jejich produkci, prodej a distribuci se specializuje více než 70 firem po celém světě. Za největšího producenta je považována společnost Taiwan Chlorella Manufacturing & Co. Ltd. (Tapei, Taiwan) s ročním výnosem okolo 330 t. V Evropě je hlavním centrem masových kultivací německá firma Roquette Klötze GmbH & Co. KG. s roční produkcí 100 t suché biomasy (Posten & Walter 2012). K celosvětové produkci 2000-2500 t/rok suché biomasy významně přispívá kromě výše uvedených zemí také Čína a Indonésie (Bishop & Zubeck 2012).

Na českém trhu existuje několik desítek firem zabývajících se distribucí doplňků stravy *Chlorella* (tabulka 7). Její biomasu získávají buď z MBÚ v Třeboni, častěji však ze zahraničí, především z Asie díky mnohem nižším cenám. Protože mají řasy a sinice schopnost kumulace různých látek včetně toxinů a těžkých kovů, je velice důležité, v jakých kultivačních a hygienických podmínkách jsou pěstovány a jaké technologické postupy jsou použity. Tyto faktory se mezi producenty mnohdy značně liší v závislosti na vyspělosti a ekonomické situaci dané firmy ale i celé země. Od toho se pochopitelně

odvíjí kvalita a složení konečného výrobku, který se pak dostává ke spotřebiteli. Každý distributor by měl mít o této problematice přehled a vybírat vždy kvalitní biomasu i za cenu vyšších nákladů.

Tabulka 7: Přehled a srovnání výrobků vybraných českých firem zabývajících se distribucí doplňků stravy z řasy *Chlorella*; zdroj: www.awashopbrno.cz/news/srovnani-produktu-chlorella-v-cr

Obsahové informace o produktu	Název výrobku								
	Chlorella Fresh	Chlorella Green Ways	Bio Chlorella A+ Bretbach	Chlorella Sanatur Bio	Chlorella Energy	Chlorella centrum	Chlorella Lifefood	Chlorella Pyrenoidosa BIO - Agapeia	Chlorella Vitaland
velikost balení [g]	250	300	125	100	100	150	120	500	30
Cena v Kč*	850	1 350	650	715	515	673,12	469	920	292
země původu/výrobce	Taiwan Chlorella	Taiwan Chlorella	nevedeno	Taiwan	nevedeno	nevedeno	Čína, ostrov Hainan	Čína	nevedeno
CGF	ano	ano	ano	nevedeno	nevedeno	ano	ano	nevedeno	nevedeno
bílkoviny [g]	64,4	57,5	58,8	60,4	nevedeno	69,2	56,6	57,2	nevedeno
sacharidy [g]	6,4	6,4	15	1,2	nevedeno	13,2	20	5,4	nevedeno
tuky [g]	11,7	11,6	7,5	4,7	nevedeno	6,3	7	12,8	nevedeno
chlorofyl [g]	3,27	3,27	2,63	nevedeno	nevedeno	nevedeno	3,76	nevedeno	nevedeno
β-karoten [mg]	85,5	85,6	182,5	nevedeno	150	54,1	54,1	nevedeno	nevedeno
vápník [mg]	450	450	nevedeno	nevedeno	400	250	275	nevedeno	nevedeno
hořčík [mg]	314	314	nevedeno	nevedeno	300	260	216	nevedeno	nevedeno
železo [mg]	162	162	100	220	80	120	108	nevedeno	nevedeno
B12 [μg]	420	420	100	12	90	170	170	nevedeno	nevedeno

* Uvedené ceny jsou platné k 1.2.2013

1.3. Eustigmatos/Vischeria

1.3.1. Historie popisu rodu a taxonomické zařazení

Rod *Eustigmatos/Vischeria* patří do říše Chromista, oddělení Heterokontophyta (uvádí se také Ochrophyta nebo Stramenopila) (Andersen et al. 1998; Andersen 2004; Yang et al. 2011) třídy Eustigmatophyceae. V podstatě se jedná o morfologicky definovaný komplex dvou rodů, u kterého řada studií dokazuje blízkou příbuznost (Andersen et al. 1998). Procházková (2012) však pomocí molekulárně fylogenetické analýzy (sekvencí ITS2 rDNA) objevila uvnitř tohoto komplexu velkou kryptickou diverzitu. Pro pochopení současného taxonomického postavení komplexu *Eustigmatos/Vischeria* je nezbytné vycházet od počátku vzniku a vývoje celé třídy Eustigmatophyceae, o kterém je ve stručnosti pojednáno v následujících odstavcích.

70. léta 20. století – založení tř. Eustigmatophyceae

Hibberd & Leedale (1971) na základě své detailní studie a dalších prací zaměřených na ultrastrukturu a cytologii kokálních jednobuněčných řas (Massalski & Leedale 1969) navrhli rozdělení skupiny Xantophyceae na dvě třídy – Xantophyceae *sensu stricto* a Eustigmatophyceae⁴. Důvodem bylo objevení unikátních znaků u některých zástupců, kterými se odlišovali nejen od xantofytních ale i ostatních skupin řas (Hibberd 1990). Rozdíly se týkaly ultrastruktury a morfologie zoospor i vegetativních buněk. U zoospor bylo objeveno charakteristické oranžovočervené extraplastidiální stigma, které se nachází podobně jako u třídy Euglenophyceae mimo chloroplast a podle něhož je odvozen název celé skupiny (Hibberd & Leedale 1971; Santos et al. 1996). Důležitým rozdílem u zoospor třídy Eustigmatophyceae oproti ostatním heterokontním řasám je redukce či absence druhého bičíku. Vegetativní buňky nemají ve svých chloroplastech věncové tylakoidní lamely. Obsahují však pyrenoid charakteristického polyedrického (mnohostěnného) tvaru s homogenní matrix, který je situován na vnější straně chloroplastu a je k němu přichycený krátkou stopkou⁵. V cytoplasmě se nachází lamelární váčky (jejichž vzhled se v průběhu životního cyklu mění) a zvláštní lipidická

⁴ Tyto dvě úzce příbuzné třídy pravděpodobně sdílejí společného předka s oddělením Chrysophyta (Hibberd 1990).

⁵ Nyní se ví, že tento unikátní typ pyrenoidu se nachází jen u rodů *Eustigmatos*, *Vischeria*, *Chlorobotrys* a u druhu *Pseudocharaciopsis minutus* (Gärtner et al. 2012; Fišerová 2012).

struktura zvaná „reddisch globule“. Obojí je charakteristické pouze pro třídu Eustigmatophyceae a jejich funkce zatím nebyla objasněna. Podle jedné z teorií se může jednat o zásobní produkty neznámého chemického složení (Hibberd & Leedale 1971; Hibberd 1990; Gärtner et al. 2012; Fišerová 2012). Dalším znakem podporujícím vyčlenění této skupiny je odlišné pigmentové složení v chloroplastech. Jde o unikátní kombinaci chlorofylu *a*, β -karotenu, violaxanthinu a vauseriaxanthinu. Na rozdíl od ostatních xanthofyt jim chybí chlorofyl *b* i *c*, fucoxanthin a diadinoxanthin (Whittle & Casselton 1975).

70.-80. léta 20. století – první velká revize tř. Eustigmatophyceae

Skupinu Eustigmatophyceae zrevidovali Loeblich & Loeblich v roce 1978 na základě biochemických a fyziologických aspektů a posléze Hibberd (1981), který vycházel z morfologie (Santos 1990). Systém se pak skládal z jednoho řádu Eustigmatales a čtyř čeledí⁶. Jednotlivé rody v rámci těchto čeledí byly rozděleny podle následujících znaků: tvar a velikost vegetativních buněk, počet chloroplastů, tvorba nebo absence zoospor (popřípadě autospor), počet bičíků (1 nebo 2), jejich struktura apod.:

- Chlorobotryaceae: rod *Chlorobotrys*, netvoří zoospory
- Monodopsidaceae: rod *Monodopsis* a *Nannochloropsis*, netvoří zoospory
- Pseudocharaciopsidaceae: rod *Pseudocharaciopsis*, tvorba zoospor se dvěma bičíky
- Eustigmataceae: rody *Eustigmatos*, *Vischeria* a *Pseudostaurastrum*, tvoří jednobíčíkaté zoospory

Popis rodu *Eustigmatos* je datován na rok 1981, kdy Hibberd uvádí typový druh *E.vischeri* v rámci tř. Eustigmatophyceae. Do tohoto nového rodu Hibberd navíc přeřazuje dva zástupce původně klasifikované v rámci rodu *Pleurochloris* ve tř. Xanthophyceae a stanovuje novou kombinaci *Eustigmatos magnus* a *E. polyphem*.

V roce 1938 Pascher popisuje nový rod *Vischeria* jako zástupce tř. Xanthophyceae. Typovým druhem byl zvolen *Vischeria stellata*, který byl původně popsán již v roce

⁶ V roce 2007 přibyla ještě pátá čeleď Loboceae (Hegewald et al. 2007).

1925 Poultonem v rámci rodu *Chlorobotrys*. Do nově vzniklé tř. Eustigmatophyceae byl rod *Vischeria* zahrnut v roce 1971.

V klasickém pojetí spadá celá třída pod oddělení Heterokontophyta. Někteří autoři se však přikláněli k vymezení samostatného oddělení Eustigmatophyta (Hibberd, 1981; Santos 1990).

Současný stav vědeckých poznatků o taxonomii rodů *Eustigmatos/Vischeria*

Nové poznatky do systému třídy Eustigmatophyceae přináší Fawley et al. (2014). Na základě molekulárních dat z 18S rDNA a rbcL se ukazuje, že diverzita celé skupiny je mnohem větší než se doposud předpokládalo a k již uznanému řádu Eustigmatales navrhuji zavést nový řád Goniochloridales, kam řadí původně xantophytní druhy jako *Pseudostaurastrum limneticum*, *P. enorme*, *Goniochloris sculpta* a *Trachydiscus minutus*.

V rámci snahy o prohloubení dosavadních znalostí eustigmatofytních řas bylo od 90. let minulého století provedeno několik studií (např. Santos 1990). Hlavním výsledkem bylo zjištění, že ne všechny ultrastrukturní znaky, na jejichž základě byla skupina Eustigmatophyceae Hibberdem a Leedalem vytvořena, lze považovat za univerzální. Některé z nich jsou typické jen pro jednotlivé čeledě a lze je takto vzájemně dobře rozlišit. Například polyedrický pyrenoid vyčnívající vně chloroplastu pomocí stopky je unikátní pouze pro čeleď Eustigmataceae (Fišerová 2012). Také se ukázalo, že morfologické znaky, které Hibberd (1981) považoval za klíčové pro rozlišení rodů *Eustigmatos* a *Vischeria*, nemusí souviset s fylogenetickými vztahy, ale spíše s vlivem prostředí nebo s fází životního cyklu. Jde především o rozdílnou povrchovou strukturu buněk, kdy pro rod *Eustigmatos* je charakteristická hladká buněčná stěna, zatímco rod *Vischeria* má výrůstky různého tvaru. Mnohá pozorování dokazují, že zástupci obou rodů mohou mít prakticky identickou morfologii. Zejména v případě kultivací se struktura buněčné stěny průběžně mění (Procházková 2012). Navíc u kultur rodu *Vischeria* se výrůstky vytváří jen vzácně (Neustupa & Němcová 2001). Zdá se, že i velikost buněk souvisí spíše s životními podmínkami než s fylogenezí (Procházková 2012).

Z výše uvedeného vyplývá, že rody *Eustigmatos* a *Vischeria* není možné od sebe rozlišit pomocí molekulárních metod a jejich druhy jsou z fylogenetického hlediska

navzájem propojeny. Někteří autoři (např. Andersen et al. 1998) jsou přesvědčeni, že jde o monofyletickou skupinu. Procházková (2012) však tuto teorii vyvrací a poukazuje na možnost, že rod *Vischeria* je vnitřní skupinou rodu *Eustigmatos*, nebo naopak. Což by znamenalo, že jeden rod je polyfyletický a druhý parafyletický nebo že jsou polyfyletické oba. Není ani vyloučeno, že budou oba rody sloučeny v jeden. Vzhledem k tomu, že rod *Vischeria* byl popsán dříve, má při pojmenování této skupiny přednost před názvem *Eustigmatos*.

Aktuální vymezení komplexu *Eustigmatos/Vischeria* v rámci třídy Eustigmatophyceae znázorňuje tabulka 8.

Tabulka 8: Současné taxonomické postavení komplexu rodů *Eustigmatos/Vischeria* (Guiry & Guiry 2014)

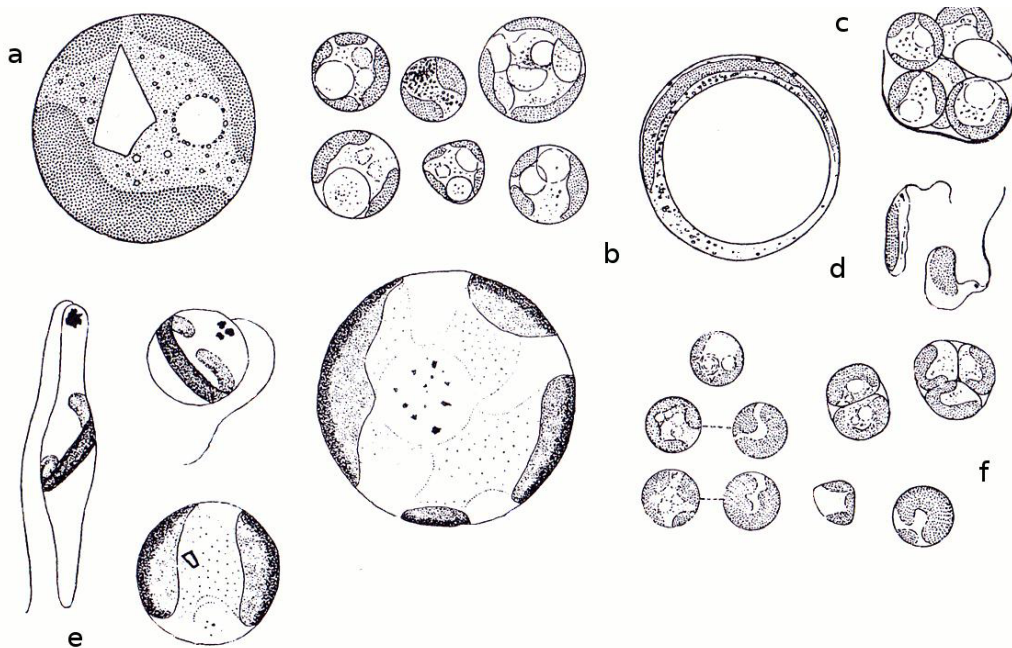
Pozice v systému	Název	Autor	Počet druhů
třída	Eustigmatophyceae	D.J.Hibberd & Leedale	36
řád	Eustigmatales	D.J.Hibberd	36
čeleď	Eustigmataceae	D.J.Hibberd	10
rod	<i>Eustigmatos</i>	D.J.Hibberd	3
	<i>Pseudostaurastrum</i>	R. Chodat	4
	<i>Vischeria</i>	Pascher	4

1.3.2. Morfologie, ultrastruktura a životní cyklus

Všechny známé formy třídy Eustigmatophyceae jsou výlučně jednobuněčné, kokální řasy obklopené polysacharidovou buněčnou stěnou, u které lze většinou (zejména v pozdějších stádiích buňky) pozorovat dvě vrstvy. Bývají zeleného nebo zelenožlutého zbarvení. Žijí buď soliterně, nebo v koloniích. Pro většinu druhů jsou typické aeroterestrické a sladkovodní biotopy. Pouze rod *Nannochloropsis* zahrnuje i mořské druhy (Hibberd 1990; van den Hoek et al. 1995; Gärtner et al. 2012). Některé kmeny *Eustigmatos* byly izolovány z bývalých těžebních oblastí a z půdy značně zatížené těžkými kovy jako je zinek a olovo (Trzcińska & Pawlik-Skowrońska 2013).

Eustigmatos

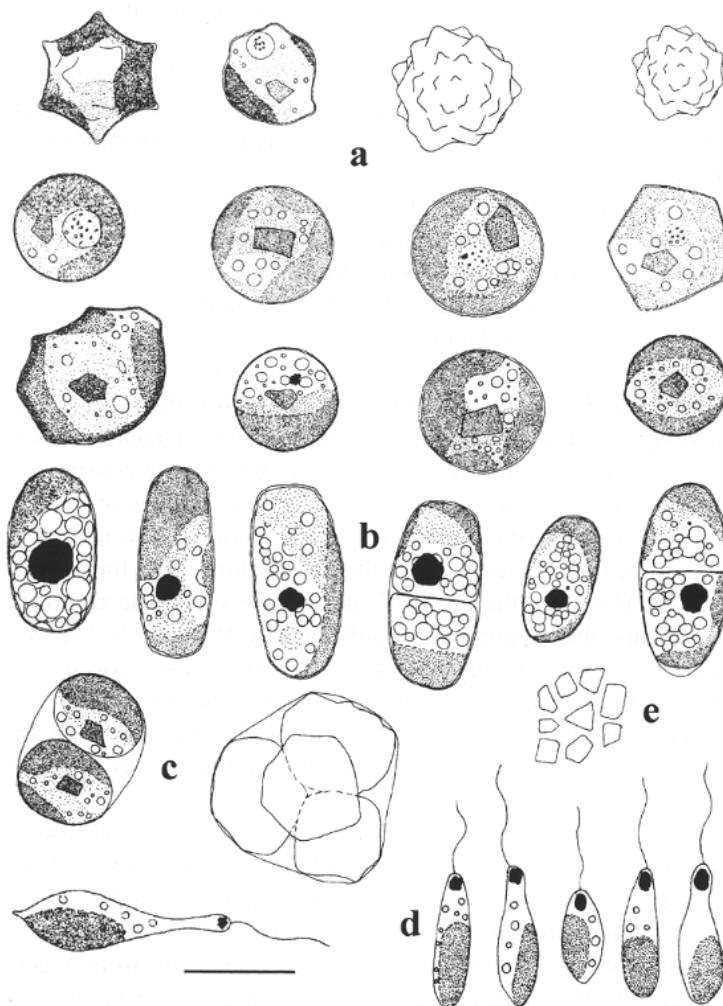
Rod *Eustigmatos* Hibberd (obrázek 4) zahrnuje druhy kulovitěho až oválněho tvaru s hladkou buněčnou stěnou (Hibberd 1981). Buňky mohou být někdy nápadně zvětšené a vyplněné velkou vakuolou (obrázek 4b) (Trzcińska et al. 2014). Tyto tzv. „obří buňky“ tvoří především druh *E. magnus*, jehož průměrná velikost se pohybuje v rozmezí 9-18 μm (Hibberd 1981), ale v případě zvětšených buněk je to 20-50 μm (Procházková 2012). Uvnitř v cytoplazmě se nachází jedno kulovité či oválné jádro o velikosti až 1,4 μm s dobře viditelným jadérkem (Fišerová 2012). Chloroplast je jeden, parietálně uložený bez věncové lamely. Stejně jako u rodu *Vischeria* je k němu z vnější strany pomocí krátké stopky přichycen pyrenoid charakteristického tvaru (obrázek 5e). Poblíž pyrenoidu se nachází lamelární váčky. Již také výše zmíněný oranžový až tmavě červený útvar „reddisch globule“ se skládá z malých kapének homogenní konzistence obalených membránou (Fišerová 2012). Vytváří se z vakuoly vyplněné granulemi a konečnou podobu získává až v dospělosti. Čím je buňka starší, tím je „reddisch globule“ větší a tmavší (Santos et al. 1996; Neustupa & Němcová 2001).



Obrázek 4: Buněčné formy v životním cyklu druhů *Eustigmatos magnus* (a-d), *Eustigmatos polyphem* (e) a *Eustigmatos vischeri* (f): a) kulovité vegetativní buňky; b) „obří buňka“ vyplněná velkou vakuolou; c) mladé buňky uvolňující se ze sporangia; d) zoospory; e) zoospory (dle Ettl & Gartner 1995)

Vischeria

Druhy rodu *Vischeria* Pascher (obrázek 5) mají kulovitý, nepravidelně polyedrický až podélně eliptický tvar. Mladé vegetativní buňky bývají převážně kulovité o rozměrech v průměru 7,3-10,4 μm . Občas se na jejich povrchu vytváří nepravidelně uspořádané výrůstky, výjimečně mohou být až hranaté a jsou menší než ty kulovité (obrázek 5a). Postupně, jak vegetativní buňky stárnou, se čím dál více protahují (obrázek 5b). Ultrastruktura i umístění chloroplastu, pyrenoidu a lamelárních váčků je velmi podobná rodu *Eustigmatos*. Rozměry pyrenoidu se pohybují okolo 2,5-6 μm nebo 3,4-5,1 μm . „Reddish globule“ se nachází ve většině dospělých buněk. Při rozmnožování je tato struktura předána jen jedné autospoře, a proto je v některých buňkách přítomna po celý životní cyklus (Neustupa & Němcová 2001).



Obrázek 5: Buněčné formy v životním cyklu rodu *Vischeria*: a) kulovitý, nepravidelný až hranatý tvar mladých vegetativních buněk; b) podélně eliptické buňky; c) autospory; d) zoospory; e) různé tvary pyrenoidu vegetativních buněk. Měřítko 5 μm (Neustupa & Němcová 2001).

Rozmnožování a životní cyklus

Stejně jako u zelené řasy *Chlorella* nebylo ani u žádných eustigmatofytních řas pozorováno pohlavní rozmnožování. Komplex *Eustigmatos/Vischeria* se tedy rozmnožuje pravděpodobně pouze asexuálně tvorbou aktivně se pohybujících zoospor nebo nepohyblivých autospor. Morfologie těchto nepohlavních rozmnožovacích buněk je téměř identická, a tedy pro rozlišení obou rodů těžko použitelná (Procházková 2012). Zoospory jsou vždy jednobíčíkaté lahvicovitého nebo kapkovitého tvaru. Mají hruškovité jádro uložené naproti bazálnímu tělísku bičíku a jeden chloroplast, který stejně jako u vegetativních buněk neobsahuje věncovou lamelu, ale ani žádný pyrenoid. Typické je extraplastidiální stigma uložené v cytoplazmě v přední v části buňky (Hibberd 1981). Po krátkém období aktivního pohybu přecházejí zoospory do klidové fáze, kdy přisedají a postupně přebírají znaky vegetativních buněk. Právě v tomto období dochází k tvorbě pyrenoidu na vnitřní straně chloroplastu (Hibberd 1990). Autospory vznikají dělením mateřské buňky nejčastěji v počtu 2, 4 nebo 8 (Gärtner et al. 2012). Například *Eustigmatos magnus* tvoří buď dvě autospory ve tvaru písmene D nebo čtyři ve tvaru čtyřúhelníku.

1.3.3. Druhy rodu *Eustigmatos/Vischeria*

Současný přehled a znalosti o druhové diverzně zástupců rodů *Eustigmatos* a *Vischeria*, potažmo celé třídy Eustigmatophyceae, jsou poměrně nedostatečné. Podobně jako u zelené řasy rodu *Chlorella* je determinace eustigmatofytních řas pod světelným mikroskopem z důvodu nedostatku morfologických znaků prakticky nemožná (Andersen et al. 1998).

Rod *Eustigmatos* v současnosti zahrnuje pouze tři taxonomicky uznávané druhy a rod *Vischeria* čtyři⁷. Typovými jsou *Eustigmatos vischeri* a *Vischeria stellata* (tabulka 9, obrázek 6).

⁷ Uvádí se ještě 8 dalších druhů rodu *Vischeria*, jejichž existence dosud nebyla taxonomicky potvrzena (Guiry & Guiry 2014).

Tabulka 9: Aktuální přehled druhů rodů *Eustigmatos* a *Vischeria* (Guiry & Guiry 2014)

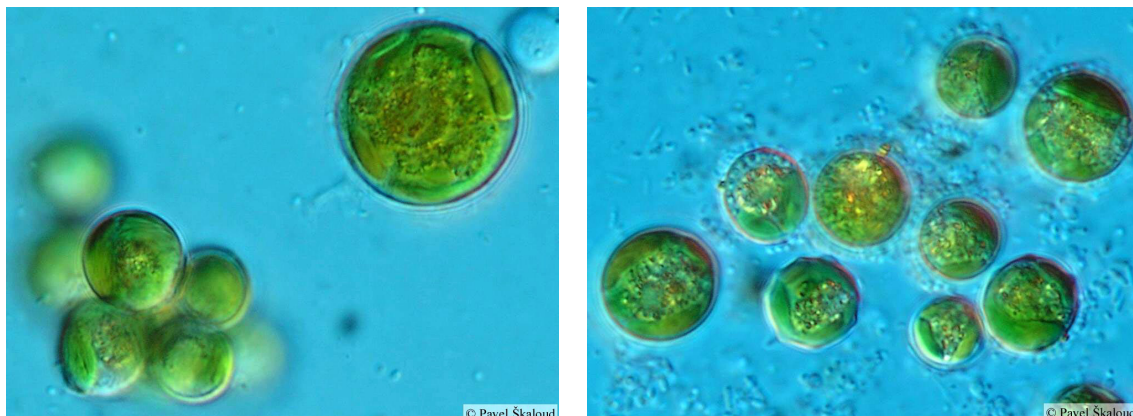
Rodový název	Druhový název	Synonymum/původní název	Autor
<i>Eustigmatos</i>	<i>magnus</i>	<i>Pleurochloris magna</i>	(J.B.Petersen) D.J.Hibberd
	<i>vischeri</i>	-	D.J.Hibberd
	<i>polyphem</i>	<i>Pleurochloris polyphem</i>	(Pitschmann) D.J.Hibberd
<i>Vischeria</i>	<i>stellata</i>	<i>Chlorobotrys stellata</i>	(Chodat ex Poulton) Pascher (Vischer & Pascher)
	<i>helvetica</i>	<i>Polyedriella helvetica</i>	D.J.Hibberd
	<i>punctata</i>	-	Vischer
	<i>torta</i>	-	Pascher

Jednotlivé druhy rodu *Eustigmatos* lze poměrně dobře odlišit podle velikosti. Nejmenších rozměrů (cca 7-9 μm) dosahuje *E. vischeri*, největší (i více než 20 μm) je bezesporu *E. magnus* (Procházková 2012). U druhu *E. polyphem* se udává 11-15 μm (Hibberd 1981).

Rozlišení na základě morfologických znaků u druhů rodu *Vischeria* už tak jednoduché není:

- *V. stellata*: více méně kulovité buňky s pravidelně rozloženými kuželovitými výrůstky na povrchu buněčné stěny
- *V. punctata* a *V. helvetica*: výrůstky jen vzácně
- *V. punctata*: buňky penta- nebo hexagonálního tvaru o velikosti v průměru 7-9 μm
- *V. helvetica*: zpravidla kosodélníkový nebo pentagonální tvar, větší než *V. punctata* (okolo 9-12 μm)

Pomocí těchto nepatrných morfologických rozdílů však poslední dva zmíněné druhy nelze navzájem rozlišit (Procházková 2012). Determinaci ještě více komplikuje fakt, že v kulturách druhu *V. stellata* se mohou vyskytovat také buňky kulovité s hladkým povrchem i polygonálního tvaru (Hibberd & Leedale 1972).



Obrázek 6: Buněčná struktura typových druhů *Eustigmatos vischeri* (vlevo) a *Vischeria stellata* (vpravo). Zvětšeno 1000 x 750; © P. Škaloud

V rámci všech eustigmatofytních řas byl popsán zatím jen zlomek a dalších 1000-10 000 teprve čeká na svůj objev. Proto je velice pravděpodobné, že v blízké budoucnosti přibudou i do tohoto komplexu nové druhy (Andersen 1998; Procházková 2012).

1.3.4. Přehled a význam současně známých obsahových látek zástupců třídy Eustigmatophyceae

Ačkoliv je třída Eustigmatophyceae relativně malou skupinou řas, paří sem hned několik zástupců, kterým je věnována značná pozornost vědců pro schopnost syntetizovat látky významné pro akvakultury, výrobu biopaliv a především pro zdravou výživu. Představují cenný potencionální zdroj těchto látek a nabízejí uplatnění jako doplňky stravy. V současnosti se pro syntézu bioaktivních látek v rámci třídy Eustigmatophyceae nejvíce využívají rody *Monodus* (Liu & Lin 2005) a *Nannochloropsis* (Sukeník et al. 1993; Sukeník 1999; Pal et al 2013). V ČR byl nově izolován a patentován pro syntézu EPA také rod *Trachydiscus* (Lukavský 2012). Zároveň je kladen důraz na objevování nových, produkčně atraktivních kmenů. Velký potenciál je nacházen právě u komplexu *Eustigmatos/Vischeria*, zejména pro vysoký obsah nenasycených mastných kyselin a dalších dosud nepopsaných látek (Lukavský 2012; Koudelková 2013).

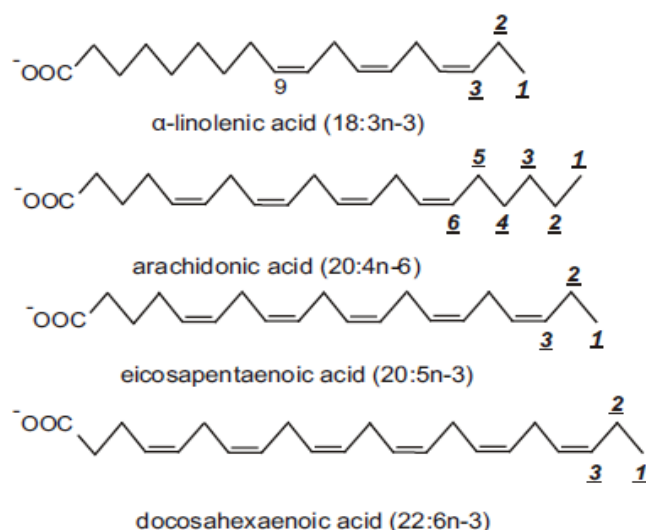
Následující odstavce se týkají dosavadních vědeckých poznatků a charakteristiky obsahových látek eustigmatofytních řas s důrazem na komplex *Eustigmatos/Vischeria*. Je však nutné brát v úvahu skutečnost, že autoři zabývající se distribucí obsahových látek (zejména mastných kyselin), používají většinou odlišné typy metodik, ať už při

kultivaci a/nebo extrakci. Obojí má pak zásadní vliv na výslednou kompozici detekovaných látek. Z tohoto důvodu nelze brát hodnoty obsahových látek uvedené v následujících odstavcích (tabulky 10 a 11) za zcela přesné.

Lipidy

V buňkách zástupců třídy Eustigmatophyceae najdeme několik typů lipidů, jako jsou mastné kyseliny, steroly, mono-, di- a triglyceridy, terpenoidy a fosfolipidy (Volkman et al. 1999a; Pal et al. 2013).

Mastné kyseliny jako hlavní složka lipidů a nejdůležitější zdroj energie pro organismus byly dlouhou řadu let opomíjenou skupinou nutrietů, na které se pohlíželo spíše negativně z důvodu rizika vzniku obezity, aterosklerózy (kornatění tepen) nebo zvyšování hladiny LDL cholesterolu v krvi. Dnes je ale i mezi laickou veřejností poměrně známý fakt, že příčinou výše uvedených zdravotních komplikací je, co se tuků týče, nadměrná konzumace potravin bohatých na nasycené (SFA) a trans nenasycené mastné kyseliny (TFA). Naopak dostatečný příjem mononenasycených (MUFA) a především polynenasycených mastných kyselin (PUFA) má pro organismus mnoho prospěšných účinků (Sansawa et al. 2006). I zde je však nutné dbát na správný poměr omega-3 PUFA: omega-6 PUFA, který by ideálně měl být 1:2 až 1:4. Avšak zatímco omega-6 PUFA přijímáme běžnou stravou v dostatečném množství, omega-3 PUFA jsou obsaženy jen v některých potravinách, jako jsou ryby, kvalitní oleje, semena, ořechy, listová zelenina a také řasy (Gouveia et al. 2008; Grofová 2010). Navíc díky současnému hektickému životnímu stylu a ne vždy vysoké kvalitě dostupných potravin se v USA i Evropě (včetně ČR) tento poměr pohybuje okolo 1:20 až 1:30. Důkazem je mimo jiné až 50% úmrtnost dnešní populace na kardiovaskulární choroby. Zvýšení příjmu omega-3 PUFA a omezení příjmu nasycených a trans nenasycených kyselin i nadměrné konzumace omega-6 PUFA je proto důležitým krokem pro zlepšení a udržení pevného zdraví (Grofová 2010; Tvrzicka et al. 2011). Chemickou strukturu vybraných PUFA znázorňuje obrázek 7.



Obrázek 7: Chemická struktura významných polynenasycených mastných kyselin (Tvrzicka et al. 2011)

Kyselina eikosapentaenová (C[20:5 (n-3)]; EPA) je z hlediska výživy jednou z nejvýznamnějších omega-3 mastných kyselin, která v lidském organismu plní mnoho životně důležitých funkcí. Je nedílnou součástí buněčných membrán a slouží jako prekurzor různých lipidových regulátorů v buněčném metabolismu. Jako součást fosfolipidů bývá metabolizována na eikosanoidy (látky podobné hormonům), které se účastní regulace krevního tlaku a koagulace, ovlivňují a kontrolují činnost ledvin a pohlavních orgánů. Zprostředkovávají zánětlivou odpověď kloubů (revmatická artritida), kůže (psoriáza) nebo očí. Mají vliv na stav horečky, bolesti aj. (Ruxton et al. 2004). Je dokázáno, že omega-3 PUFA v čele s EPA hrají stěžejní roli v prevenci kardiovaskulárních chorob. Dostatečný příjem EPA pomáhá snižovat LDL cholesterol a tím předcházet ateroskleróze (Bonaa et al. 1992). S velkou pravděpodobností má příznivý vliv na rytmicitu a elektrickou aktivitu srdce, čímž snižuje riziko infarktu a srdeční arytmie (Sansawa et al. 2006).

Hlavním běžně komerčně dostupným zdrojem EPA je v současnosti olej z mořských ryb, který má však oproti řasám řadu nevýhod. Pokud totiž hovoříme o využití čisté EPA jako doplňku stravy, je nutné jí separovat od ostatních složek rybího oleje. Pro tyto účely bylo vyvinuto mnoho metod, které většinou spojuje značná časová i finanční náročnost (Wen & Chen 2003). Poptávka po rybím oleji a dalších produktech se v globálním měřítku ročně zvyšuje asi o 9% (Naylor & Burke 2005), což způsobuje závažné environmentální problémy v souvislosti s nadměrným průmyslovým

rybolovem. Stejně jako člověk ani rybí organismus nedokáže EPA syntetizovat *de novo*. Mikroskopické řasy jako primární producenti omega-3 PUFA jsou základem potravního řetězce vodních ekosystémů a teprve jejich konzumací se v rybách tyto látky mohou kumulovat. Bohužel vlivem znečišťování životního prostředí dochází u ryb také k hromadění látek nežádoucích, jako jsou těžké kovy a toxiny (Wen & Chen 2003).

Prostor tak dostávají **nové alternativní zdroje omega-3 polynenasycených mastných kyselin**, mezi které řasy ze skupiny Eustigmatophyceae jednoznačně patří. První vlna zájmu o biochemické složení eustigmatofytních řas vypukla v 70. letech minulého století, kdy Mercer et al. (1974) popisují druh *Monodopsis subterranea* jako významný zdroj lipidů, převážně sterolů. O dvacet pět let později Volkman et al. (1999) zkoumají lipidické složení druhů *Vischeria punctata*, *Vischeria helvetica* a *Eustigmatos vischeri* (tabulka 10) a výsledky porovnávají s mořskými druhy rodu *Nannochloropsis* (*N. oculata*, *N. granulata* a *N. salina*). Následují například druhy *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Zhang et al. 2012) a *Trachydiscus minutus* (Řezanka et al., 2011; Lukavský 2012). Na rozdíl od rostlin nebo rybího oleje obsahují eustigmatofyta jen úzké spektrum PUFA, především PUFA omega-3, jako je kyselina arachidonová (C[20:4 (n-6)]; ARA) nebo α -linoleová (C[18:3 (n-3)]; ALA), u *Nannochloropsis oculata*, *N. limnetica*, *Vischeria punctata*, *V. helvetica* a *Eustigmatos vischeri* se uvádí i malé množství kyseliny dokosahexaenové (C[22:6 (n-3)]; DHA) (Volkman et al. 1999a; Řezanka et al., 2011). Zejména jsou však významnými producenty EPA. Rod *Nannochloropsis* je díky tomu od 80. let využíván v akvakulturách jako hlavní složka umělého potravního řetězce pro chov ryb například v Japonsku (Wen & Chen 2003). U sladkovodních druhů *Vischeria punctata*, *V. helvetica* a *Eustigmatos vischeri* je rovněž nejvíce zastoupena EPA, následuje kyselina palmitová (C[16:0]; PA) a palmitolejová (C[16:1n-7c]) (Volkman et al. 1999a).

Tabulka 10: Procentuální zastoupení mastných kyselin u tří druhů třídy Eustigmatophyceae (dle Volkman et al. 1999a)

Skupina	Název mastné kyseliny	Zkratka	Lipidové číslo	% suché biomasy		
				<i>Vischeria punctata</i>	<i>Vischeria helvetica</i>	<i>Eustigmatos vischeri</i>
LCFA	myristová	MA	14:0	1	1,5	3,9
	pentadekanová		15:0	0,9	1	1,3
	palmitová	PA	16:0	21,8	19,7	17,2
	margarová		17:0	0,6	0,6	0,5
	stearová	SA	18:0	0,5	0,4	0,4
VLVFA	arachová	AA	20:0	stopy	0,1	stopy
MFA-cis	olejová	OA	18:1n-9-c	4,2	3,3	1,5
	vaccenová	VA	18:1n-7-c	1,8	1,2	1
	palmitoolejová		16:1n-7c	20,1	22,8	20,6
PUFA n-6	linoleová	LA	18:2n-6	8,6	6,5	5,2
PUFA n-3	α -linoleová	ALA	18:3n-3	1,8	5,8	2,1
	eikosapentaenová	EPA	20:5n-3	37,2	35,3	43,2

LCFA – nenas. MK s dlouhým řetězcem, VLVFA - nenas. MK s velmi dlouhým řetězcem
MFA-cis – mononenas. MK s cis-konfigurací, PUFA – polynenas. MK

Komplex rodů *Eustigmatos/Vischeria* obsahuje také několik typů hydroxylových mastných kyselin. Jde o skupinu nasycených α -hydroxylových kyselin, jejichž uhlíkatý řetězec je v rozmezí C24 až C30 a menší skupinu mononenasycených α -hydroxylových kyselin spolu s nasycenými β -hydroxylovými kyselinami s počtem uhlíků od C26 až C30. Ačkoliv přesná funkce hydroxylových mastných kyselin není dosud objasněna, lze předpokládat jejich podíl na tvorbě lipidových prekursorů alifatických biopolymerů (Sakthivel et al. 2011).

Na obsah **neutrálních lipidů** tří sladkovodních druhů *Eustigmatos vischeri*, *Vischeria helvetica* a *Vischeria punctata* se zaměřil Volkman et al. (1990b). Jako hlavní byla detekována skupina jednoduchých sterolů s převažujícím 24-etylcholesterolem, dále pak několik typů nasycených a mononenasycených alkoholů s dlouhým řetězcem, z nichž dominoval fytol (nenasycený primární alkohol, který vzniká hydrolýzou chlorofylu *a*). Třetí hlavní skupinou byly alkyl-dioly s dlouhým řetězcem s převážným zastoupením 1,13- a 1,15-isomerů. Tyto výsledky byly porovnány s předchozími

studiemi mořských zástupců třídy Eustigmatophyceae. Zajímavé bylo zjištění, že lipidové složení je u obou skupin podobné.

Karotenoidy

Mikroskopické řasy ze skupiny Eustigmatophyceae jsou rovněž dobrým a hlavně přírodním zdrojem komerčně vysoce ceněných karotenoidů, jako je např. β -karoten. Dokládají to nedávné studie z Japonska, které spočívaly v měření karotenoidového profilu druhů *Eustigmatos magnus*, *E. polyphem*, *E. vischeri*, *Vischeria helvetica*, *V. punctata* a *V. stellata* ve dvou typech fotobioreaktorů – válcovitý a plochý fotobioreaktor (Li et al. 2012). Jedním z cílů výzkumu bylo zhodnotit potenciál této skupiny řas pro komerční produkci β -karotenu. V 18. den kultivace došlo u buněk k výraznému zvýšení obsahu karotenoidů a tím ke změně barvy z původní zelené na žlutooranžovou – koncentrace karotenoidů (i chlorofylu) se tedy se stářím kultury zvyšuje (záleží samozřejmě také na způsobu a podmínkách kultivace). Jako hlavní byly zjištěny β -karoten, violaxanthin, vaucheriaxanthin a zeaxanthin, v menší míře např. luteoxanthin (tabulka 11). Z celkového množství karotenoidů tvořil β -karoten u jednotlivých testovaných druhů přes 50%. Nejproduktivnější na obsah β -karotenu byl rod *Vischeria*, konkrétně pak *V. stellata*. Avšak v rámci všech mikroskopických řas vykazuje nejvyšší produkci β -karotenu (okolo 10% suché biomasy) známý rod *Dunaliella* (především *Dunaliella salina*) a je pro jeho získávání v současnosti nejvyužívanější (Chidambara et al. 2005). Nicméně intracelulární obsah β -karotenu u výše uvedených šesti eustigmatofyt se dá zvýšit optimalizací kultivačních podmínek. Navíc v porovnání s rodem *Dunaliella* vykazují tyto řasy vyšší růstovou rychlost a produkci biomasy, která v 18. den kultivace činila až 9 g/l, zatímco biomasa rodu *Dunaliella* se pohybuje okolo 2 g/l. Lze tedy konstatovat, že všechny tři druhy rodu *Eustigmatos* a tři výše jmenované druhy rodu *Vischeria* jsou stejně (za optimálních kultivačních podmínek i více) produktivní, co se týče β -karotenu jako druhy rodu *Dunaliella* a představují jeho potenciální zdroj pro komerční využití (Li et al. 2012).

Tabulka 11: Procentuální zastoupení karotenoidů u šesti druhů třídy Eustigmatophyceae (dle Li et al. 2012a)

Název karotenoidu	% suché biomasy					
	<i>Eustigmatos magnus</i>	<i>Eustigmatos polyphem</i>	<i>Eustigmatos vischeri</i>	<i>Vischeria helvetica</i>	<i>Vischeria punctata</i>	<i>Vischeria stellata</i>
violaxanthin	14,1	2,5	10,0	12,1	11,3	13,3
vaucherixanthin	12,0	12,7	14,1	10,5	11,8	7,6
zeaxanthin	2,6	3,2	1,9	1,2	1,7	1,6
luteoxanthin	2,1	4,9	3,5	4,2	4,7	3,6
antheraxanthin	1,9	2,2	2,6	2,3	2,4	1,8
β-karoten	52,8	50,5	53	58,4	56,7	61,5

Zájem o produkci a využití β-karotenu se postupně zvyšuje. Jako prekurzor vitamínu A a významný antioxidant působí například preventivně proti nádorovým nemocem a stimuluje imunitní systém (viz také podkapitola 1.2.4., odstavec Specifické bioaktivní látky). V současnosti nachází hlavní využití ve farmaceutickém a kosmetickém průmyslu, v akvakulturách, jako doplněk stravy nebo přírodní potravinářské barvivo (Williams et al. 2000).

1.3.5. Potenciál rodů *Eustigmatos/Vischeria* jako nový doplněk stravy

Buněčnému složení komplexu rodů *Eustigmatos/Vischeria* z malé skupiny řas třídy Eustigmatophyceae s cílem potvrdit či vyvrátit možnosti využití ve zdravé výživě se v poslední době věnuje pozornost také v ČR. K pozitivním výsledkům došla Koudelková (2013). Její práce byla zaměřena na kultivaci a screening pěti nových izolátů tohoto rodu z pěti různých geografických míst (také z ČR) spolu se sbírkovými kmeny *Vischeria stellata*, *Monodus subterraneus* včetně patentovaného kmene *Trachydiscus minutus* (Lukavský & Příbyl 2005/1; autoři patentu). Pro porovnání rozdílů nejen mezi kmeny, ale i v závislosti na kultivačních podmínkách Koudelková (2013) kultivovala každý kmen na dvou typech médií. Byla sledována jejich fyziologická aktivita, rychlost růstu a především produkce biomasy, lipidů a PUFA s hlavním zřetelem na EPA. Po celou dobu experimentu (7 denní kultivace) byly u většiny nových izolátů *Eustigmatos/Vischeria* zaznamenány vysoké hodnoty EPA. Zejména pak u jednoho izolátu byl potvrzen potenciál ve využití jako doplněk stravy díky výtěžku 100mg/l EPA v 7. den kultivace.

2. CÍLE PRÁCE

1. Rešerše

- a) Všeobecný přehled využití sinic a řas – biotechnologie
- b) Zelená řasa rodu *Chlorella* – pozitivní účinky bioaktivních látek a taxonomie druhů využívaných v potravinářství
- c) Hnědá řasa rodu *Eustigmatos/Vischeria* – taxonomické zařazení a současné vědecké poznatky o obsahových látkách včetně jejich využití jako doplňku stravy

2. Kultivace řasové biomasy a extrakce bioaktivních látek

- a) *Chlorella* – autotrofní kultivace, *Chlorella* růstový faktor (CGF)
- b) *Eustigmatos/Vischeria* – nenasycené mastné kyseliny (NMK)

3. Ověření stimulačního účinku růstu na tkáňových kulturách

- a) *Chlorella* – MBÚ Třeboň, dva výrobci na trhu
- b) *Eustigmatos* – první screening, zhodnocení potenciálu ve zdravé výživě

4. Srovnání výsledků s literaturou a zhodnocení konkurenceschopnosti doplňků stravy z řas

3. MATERIÁL A METODIKA

3.1. Řasová biomasa

V předložené diplomové práci byly použity následující typy biomasy:

- zelená řasa *Chlorella* kultivovaná autotrofně
MBÚ AV ČR Třeboň
- *Chlorella* Green Ways – doplněk stravy
- *Chlorella* Centrum – doplněk stravy
- zelená řasa *Chlorella* kultivovaná heterotrofně
MBÚ AV ČR Třeboň
- extrakt *Chlorella* růstový faktor (CGF)
MBÚ AV ČR Třeboň
- hnědá řasa *Eustigmatos/Vischeria*
- MBÚ AV ČR Třeboň

3.1.1. Kultivace řas

Kultivace zelené řasy *Chlorella* se na pracovišti MBÚ v Třeboni provádí v pitné vodě pod pečlivým dohledem pro zabezpečení absence cizorodých a toxických látek ve velkoobjemových kultivacích (200-10 000 litrů) a to dvěma způsoby:

- a) **Autotrofně** – venku během letních měsíců, kdy řasy normálně fotosyntetizují. Zdrojem uhlíku je tedy CO₂ a energii čerpají ze slunečního záření. Pro tento typ kultivace zde byl v 70. letech minulého století pod vedením RNDr. Šetlíka navržen a zkonstruován kaskádový kultivační systém šikmých plošin (650 m², sklizeň 1,2 tun/rok), kde je *Chlorella* pěstována v tenké vrstvě o tloušťce 6-8 mm, což zaručuje velmi rychlý růst stejně jako vysokou kvalitu biomasy. Tenká vrstva suspenze zaručuje dokonalé prosvětlení a tedy vysoký obsah zdraví prospěšných pigmentů – chlorofylů (2,5-3% v sušině) a karotenoidů (0,3-0,5% v sušině).

b) Heterotrofně – ačkoliv se jedná o fotoautotrofní organizmy, Dr. Šetlík se svým týmem na MBÚ AV ČR v Třeboni vybral v 70. letech 20. století některé kmeny řasy *Chlorella*, které lze kultivovat i ve tmě ve fermentačních kotlích, kdy zdrojem uhlíku je cukr – glukóza. Na rozdíl od autotrofního způsobu, je zde možné řasy kultivovat celoročně. Co se týče obsahových látek, množství pigmentů je pochopitelně nižší, výrazně však narůstá obsah cenného *Chlorella* růstového faktoru (CGF) a to až 2,5 krát oproti autotrofní kultivaci.

Hnědá řasa *Eustigmatos* je na MBÚ v Třeboni kultivována v laboratorních podmínkách v objemech do 1-100 litrů.

3.1.2. Zpracování řasové biomasy do práškové podoby

Výsledkem kultivace řasy *Chlorella* na venkovních plošinách je “zelená voda” s obsahem biomasy cca 40 g/l. Po její centrifugaci a zakoncentrování následuje nejvýznamnější krok zpracování a tím je desintegrace buněk. Jedná se o mechanické narušení buněčné stěny za účelem uvolnění a tím maximálního využití bioaktivního obsahu, který je jinak z důvodu pevné celulózní stěny pro lidský organismus nedostupný.

Podobně je potřeba desintegrovat buňky řasy *Eustigmatos*. Na MBÚ v Třeboni se tato desintegrace provádí pomocí přístroje BeadBeater, do kterého se vloží vialky obsahující biomasu a skleněné kuličky balotina vel. 9. Ty při pohybu v přístroji buňky mechanicky rozbíjejí, ale také zahřívají. Proto je nutné následné ochlazení v ledu.

Poslední fází zpracování obou typů biomasy je sušení ve sprejové sušárně. Výsledkem je 100% čistý, jemný prášek, který se uchovává při pokojové teplotě nejlépe v obalu se zamezením přístupu vlhkosti a světla. Prášek z řasy *Chlorella* je využíván např. v Bertiných lázních v Třeboni jako součást vodoléčebných procedur. V rámci využití jako doplňku stravy je nejčastěji slisován do formy tabletek.

3.1.3. Extrakce *Chlorella* růstového faktoru (CGF)

Chlorella růstový faktor se na MBÚ v Třeboni získává z heterotrofní biomasy řasy *Chlorella* tradičním a poměrně jednoduchým způsobem v podobě horkého výluhu. Získaný extrakt se poté podobně jako samotná biomasa vysuší do práškové formy.

3.2. Tkáňové kultury

V základním i aplikovaném výzkumu, v biomedicínských a farmaceutických oborech, ale i ve výrobě se v posledních několika desítkách let jako základní zdroj materiálu (buněk nebo jejich součástí) pro různé pokusy využívají tkáňové či buněčné kultury (oba výrazy jsou zaměnitelné). Principem je kultivace eukaryotických buněk *in vitro* v laboratorních podmínkách. Oproti jiným biologickým modelům, jako jsou pokusná zvířata, izolované orgány, tkáně apod., mají tkáňové kultury tvořené obvykle jediným buněčným typem tu výhodu, že u nich nedochází k ovlivnění výsledků v rámci interakce s jinými orgány, tkáněmi či buněčnými typy. Pominout nelze ani poměrně snadnou kultivaci i menší časovou, personální a finanční náročnost, než je tomu např. při pokusech na zvířatech, kde se také jedná i o etickou stránku experimentů (Cipro & Groh 2014).

3.2.1. Výběr typu tkáňových kultur

Ve fyziologické praxi bývají nejčastěji (jak z hlediska kultivace tak životnosti) používány buňky z nádorové tkáně se schopností kontinuálního dělení. Pro naše experimenty s předpokladem stimulace růstu živočišných buněk pomocí řasových extraktů s komplexem bioaktivních látek není tento typ tkáňových kultur tedy ideální (absence kontroly). Z tohoto důvodu byly pro sledování účinků biomasy řasy *Chlorella*, řasy *Eustigmatos/Vischeria* a *Chlorella* růstového faktoru (CGF) zvoleny dva typy ne-rakovinových buněk – lidské dermální fibroblasty a lidské mezenchymální kmenové/stromální buňky (MSC - Mesenchymal Stem/Stromal Cells).

Fibroblasty jsou základní buňky vazivových tkání, které produkují extracelulární matrix. Jejich výběr byl zvolen proto, že se jedná o primární, málo specializované buňky, které se však dobře dělí, jejich kultivace je snadná a i v laboratorních podmínkách vytvářejí relativně přirozený systém. Mezenchymální kmenové buňky (MSC) jsou multipotentní nekrvetvorné progenitorové buňky nacházející se např. v kostní dřeni, pupečnickové krvi nebo v dospělé tukové tkáni. Mají schopnost diferencovat se do několika buněčných linií, jako jsou např. chondrocyty, adipocyty, osteocyty a myocyty (Prockop 1997). Jejich využití ve vědecké praxi přináší výhody zejména v podobě snadné dostupnosti (možnost izolace z různých typů tkání ve velkém množství, avšak z etického hlediska je dána přednost tkáni tukové před embryonálními kmenovými buňkami) a dobré expanze při kultivaci *in vitro* (Astori et al. 2007).

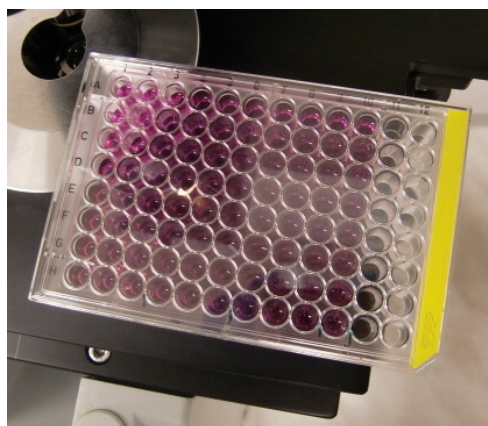
Oba zvolené typy buněčných kultur stejně jako výborně technicky vybavené zázemí pro realizaci experimentů poskytlo pracoviště Fyziologického ústavu AV ČR v. v. i. (FGÚ) v Praze, které má mnohaletou zkušenost s výzkumem a využitím biomateriálů pro tkáňové inženýrství.

3.3. Popis vlastního experimentu

3.3.1. Nasazení buněk a aplikace řas

Destičky pro tkáňové kultury

Pro práci s tkáňovými kulturami byly použity polystyrénové 96 jamkové destičky (TPP, Trasadingen, Švýcarsko) s kulatým dnem o ploše 0,32 cm² a s objemem 200 µl (obrázek 8).



Obrázek 8: 96 jamková destička s tkáňovými kulturami ve fázi inkubace s řasovou biomasou;
© M. Šafářová

Pro testování efektu řas na růst tkání byla tato destička rozdělena do 4 sektorů (obrázek 9), kdy se vytvořila možnost ověřit 3 typy biomasy ve třech opakováních a v osmi koncentracích + kontrola na jedné destičce. Pro exaktnost byla navíc každá destička zopakována v různý čas.

Dávky aplikované biomasy

Výchozí dávka aplikované biomasy (100%, tabulka 12) byla zvolena tak, aby co nejlépe odrážela reálné množství bioaktivních látek v řase *Chlorella*, resp. v CGF, které je doporučeno za den přijmout. Vycházelo se tedy standardní denní dávky doplňku stravy pro zdravého dospělého člověka, kterou u svých produktů uvádí největší distributor zelených potravin v ČR Green Ways (GW). Doporučená denní dávka produktu Chlorella od společnosti GW je cca 5g, tj. 20 tablet. Jelikož byl pokus prováděn s tkáňovými kulturami, tedy jen nepatrným zlomkem lidského těla, byla tato dávka přepočítána na množství g/kg průměrné hmotnosti dospělého muže, resp. ženy (údaj použitý ze zprávy Ústavu zdravotnických informací a statistiky České republiky, ÚZIS 2010).

Tabulka 12: Výpočet výchozí (100%) dávky biomasy

Doporučená denní dávka doplňku Chlorella podle GW	5 g
průměrná hmotnost žen	69,2 kg
průměrná hmotnost mužů	83,6 kg
množství g/kg průměrné hmotnosti žen*	0,07 = 100%
množství g/kg průměrné hmotnosti mužů*	0,06 = 90%*

* po zaokrouhlení

Vyšší hodnota, tj. 0,07 g/kg pro ženy, byla zvolena jako výchozí dávka, tudíž hodnota 0,06 g/kg pro muže činí 86 %, která byla zaokrouhlena na 90% pro možnost lepšího ředění v laboratoři. Jednotlivé typy biomasy v těchto dvou dávkách byly aplikovány doprostřed každé 8 jamkové řady na kultivační denstičce. Směrem doleva se dávky/ koncentrace postupně snižovaly a doprava zvyšovaly. Nejnižší koncentrace v experimentu (5%) je polovina minimální doporučené denní dávky při počátku užívání potravního doplňku Chlorella daná GW. Nejvyšší dávka byla zvolena jako 10x větší množství doporučené dávky. Zbylé koncentrace byly určeny jako střední hodnoty mezi minimem a maximem.

Pro testování *Eustigmatos/Vischeria* byly koncentrace odvozeny od stejné dávky jako u rodu *Chlorella*, jelikož je zde předpoklad podobného potenciálu v potravinářství.

% řasy	VZ X			VZ XY			VZ XZ			K		
1000	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
500	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
200	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
100	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
90	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
50	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
10	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○
5	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○	○

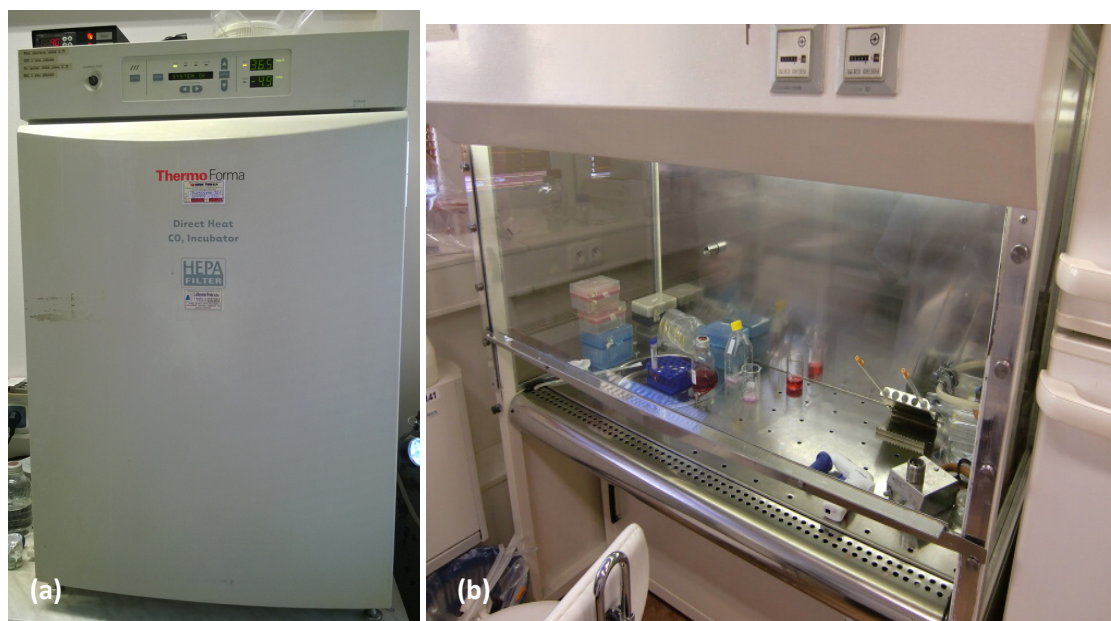
Obrázek 9: Schéma destičky – aplikace řas na fibroblasty, resp. MSC v různých dávkách; Vysvětlivky: VZ X, XY, XZ – testované typy biomasy, K – kontrola

Kultivační podmínky

Při práci s lidskými dermálními fibroblasty bylo jako kultivační médium použito komerčně dodávané Dulbecco's modified Eagle's Medium - DMEM, Sigma-Aldrich USA, Cat. #D5648 (dále v textu kultivační médium nebo jen médium), které se vyznačuje vysokým obsahem glukózy (4500 mg/L), přidaným L-glutaminem a absencí hydrohenuhličitanu sodného. K tomuto médiu se standardně přidává 10% fetálního bovinního séra (FBS, Sigma-Aldrich non-USA, Cat. #F7524) pro podporu proliferace a diferenciaci buněk díky obsahu řady biologicky významných sloučenin, stopových prvků, vitamínů a zejména několika typů růstových faktorů. Aby však bylo možné ověřit předpokládaný účinek na buňky, tj. stimulaci růstu díky růstovým faktorům a další bioaktivním složkám obsažených v řasových extraktech, bylo do média přidáno poloviční procento (5%) FBS, než je standard (konkrétní množství přidaného séra v jednotlivých experimentech viz podkapitola 3.3.3.). Mezenchymální kmenové buňky (MSC) byly kultivovány v Mesenchymal Stem Cell Medium (MSCM, ScienCell USA, Cat. #7501), které již obsahuje 5% růstového séra.

V rámci každého pokusu byly všechny použité typy tkáňových kultur kultivovány ve speciálním inkubátoru Forma Steri-Cycle CO₂ Incubator (Thermo Electron Corporation USA; obrázek 10a) s relativní vlhkostí vzduchu 100%, při teplotě 37°C (optimální pro

většinu buněk) a se zvýšeným parciálním tlakem CO₂ (5%). Veškeré manipulace s tkáňovými kulturami probíhaly za sterilních podmínek v laminárním boxu CYTOSAFE-N 2004, Faster s.r.l. (obrázek 10b).



Obrázek 10: Zařízení pro práci s tkáňovými kulturami: a) Forma Steri-Cycle CO₂ Incubator; b) CYTOSAFE-N 2004; © M. Šafářová

Nasazení buněk – princip a postup

- 1) vytvoření tzv. subkultury neboli pasáže (detailní postup viz tabulka 14)
 - uvolnění namnožených adherentních buněk (primokultury) od povrchu kultivační nádoby i od sebe navzájem tzv. tripsinizací (štěpení proteinů pomocí enzymu trypsinu)
 - opláchnutí od růstového séra, které bylo ve starém médiu pomocí roztoku PBS (Phosphate buffered saline, Sigma-Aldrich USA, Cat. #P4417 – 0,01 M Na₂HPO₄, 0,0027 M KCl, 0,137 M NaCl)
 - odstranění dvojmocných iontů (Ca²⁺ a Mg²⁺) pomocí chelatačního činidla kyseliny ethylendiamintetraoctové (Trypsin-EDTA Solution, Sigma-Aldrich USA, Cat. #T4174 – 5 g trypsin + 2 g EDTA.4Na v 0,9% NaCl)

- 2) odebrání malého množství suspenze pro měření % viability (životnosti), resp. počtu živých buněk na 1 ml vzorku pomocí přístroje Vi-CELL XR (Beckman Coulter, USA; obrázek 11a)
 - principem je pronikání tripanové modři do poškozených či mrtvých buněk
- 3) centrifugace zbylé větší části suspenze pomocí SIGMA 3-18K Centrifuge (SciQuip Ltd, UK; obrázek 11b)
 - pro odstranění média obsahujícího trypsin-EDTA a přidání média nového
- 4) naředění určitého množství suspenze (spočítaného jako podíl předem zvoleného počtu buněk na 1 jamku kultivační destičky a změřeného počtu živých buněk v 1 ml vzorku, viz podkapitola 3.3.3.) v adekvátním objemu kultivačního média (spočítaném jako součin počtu použitých jamek na kultivační destičce a objemu jedné jamky)
- 5) nasazení buněk do 96 jamkové kultivační destičky a uložení na 24 hodin do inkubátoru před vlastní aplikací řas

Tabulka 13: Postup vytvoření pasáže – tkáňové subkultury

Krok	Popis	Množství	Pomůcky, přístroj	Čas
Tripsinizace	odsátí starého média z kultivační nádoby		CYTOSAFE-N 2004, pipeta 10 ml, skleněná kádinka (odpad)	15 s
	opláchnutí buněk roztokem PBS a následné odsátí (pracovat rychle, aby buňky nevyschly)	5-10 ml	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 5 ml	1 min
	opláchnutí buněk roztokem trypsin-EDTA (pracovat rychle, aby buňky nevyschly)	2 ml	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 5 ml	1 min
	inkubace (37°C) a lehké třepání inkubační láhve – pro uvolnění buněk od stěny a jejich smrštění		Steri-Cycle CO ₂ Incubator	5+1 min
	přidání nového média a promíchání opakovaným nasáváním do pipety a následným vypouštěním	5 ml	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 5 ml	3 min
Měření životnosti buněk	přenesení malého množství resuspendovaných buněk do zkumavky	cca 1 ml	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 5 ml, zkumavka pro přístroj Vi-CELL XR	1 min
	spočítání živých buněk v % a v 1 ml vzorku		Vi-CELL XR	5 min
Centrifugace	přenesení zbylé (větší) části buněčné suspenze do zkumavky	6 ml	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 10 ml, plastová zkumavka s vrškem	1 min
	centrifugace při otáčkách 1315 rpm (300 G) a pokojové teplotě	6 ml	SIGMA 3-18K Centrifuge	5 min
	odsátí média, opatrné klepání zkumavkou o podložku (oddělení buněk)	6 ml	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 10 ml, skleněná kádinka na odpad	1 min
	přidání nového kultivačního média	6 ml	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 10 ml	2 min
Ředění	naředění zvoleného počtu buněk v adekvátním objemu kultivačního média		CYTOSAFE-N 2004, pipeta 10 ml, pipeta 5 ml, skleněná kádinka	15 min
Nasazení	Nasazení buněk do kultivační destičky	200 μl/jamka	mikropipeta 200 μl, 96 – jamková kultivační destička	15 min*

* platí pro práci s jednou kultivační destičkou



Obrázek 11: Přístroje pro měření životnosti buněk a centrifugaci: a) Vi-CELL XR; b) SIGMA 3-18K Centrifuge; © M. Šafářová

Příprava a aplikace řasové biomasy – postup

Řasovou biomasu bylo nejprve nutné důkladně rozpustit ve vodě. Výpočet objemu vody, ve kterém bylo potřeba rozpustit 1 g biomasy (tabulka 15), vycházel ze zvolené výchozí dávky aplikované biomasy (viz výše), resp. z jejího 1000 násobku pro pozdější ředění.

Tabulka 14: Výpočet množství vody potřebné pro rozpuštění 1 g řasové biomasy

dávka 100%	0,7 g/l*
dávka 100 000% (1000x více)	70 g/l*
70 g biomasy	1000 ml vody
1 g biomasy	14, 28 ml vody

* v případě čisté vody 1 kg = 1 l

Jelikož se rozpuštěná biomasa přidávala k buňkám na kultivační destičce s objemem jedné jamky mnohonásobně menším než výše spočítané množství vody, stačilo pracovat jen s polovičním množstvím, tzn., že bylo vždy rozpuštěno přibližně 0,5 g řasové biomasy v přibližně 7, 14 ml vody. Pokud např. bylo naváženo 504,9 mg, přidalo se 7,2 ml vody. Biomasa však nebyla zcela rozpustná, jelikož se jednalo o desintegrované buňky řas. Nevznikl tedy roztok, ale suspenze, kterou nebylo možné před aplikací na tkáňové kultury sterilizovat pomocí filtrace. Z tohoto důvodu se do kultivačního média, ve kterém byly extrakty posléze ředěny do příslušných koncentrací (viz koncentrace

na obrázku 9) přidalo 1% antibiotik/antimykotik ABAM, aby se zabránilo případné kontaminaci buněk. Vzhledem ke značné hustotě suspenze vzniklé smícháním řasové biomasy s vodou, bylo provedeno ještě jedno ředění stejným objemem vody (což by ve výše uvedeném příkladu znamenalo přidání dalších 7,2 ml). Suspenzi bylo poté třeba ředit 500x pro získání koncentrace 0,07 g/l (100%).

Následovalo ředění rozpuštěné biomasy řas do 800 µl kultivačního média podle příslušných koncentrací (tabulka 15).

Tabulka 15: Ředící řada koncentrací řasové biomasy

%	5	10	50	90	100	200	500	1000
g/kg	0,0035	0,007	0,035	0,063	0,07	0,14	0,35	0,7
Ředění ze zásobního roztoku	10 000x	5000x	1000x	555x	500x	250x	100x	50x
µl	0,08	0,16	0,8	1,44	1,6	3,2	8	16

Příliš malé objemy řasové suspenze (1,6 µl a menší) byly do příslušných jamek kultivační destičky pipetovány ze zředěných suspenzí. Z 10x zředěné suspenze byly pipetovány 10x větší objemy (pro objemy 0,8 µl, 1,44 µl, 1,6 µl). Ze 100x zředěné suspenze byly pipetovány 100x větší objemy (pro objemy 0,08 µl, 0,16 µl). Ředilo se kultivačním médiem.

3.3.2. Inkubační doba

Délka inkubace tkáňových kultur s řasovou biomasou byla zvolena na 2, resp. 7 dní. Následující tabulka 16 obsahuje přehled konkrétních hodnot (počáteční počet buněk nasazených do kultivační destičky a jejich stav po určité době, množství kultivačního média a dalších složek použitých v daných fázích pokusů) vzhledem k délce inkubační doby. Jedná se o hodnoty standardně používané při práci s tkáňovými kulturami (kromě množství přidaného FBS a ABAM, které bylo upraveno, viz Kultivační podmínky v podkapitole 3.3.1.). V případě sedmi denní kultivace byl nasazen poloviční počet buněk oproti 48 hodinám, jelikož by za tento více než dvojnásobný čas mohly buňky překročit nosnou kapacitu prostředí jednotlivých jamek na destičce, což by znemožnilo posouzení jejich růstu pod vlivem řas.

Tabulka 16: Konkrétní množství buněk, kultivačního média a další specifika experimentů vzhledem k jejich inkubační době

	Délka kultivace	2 dny	7 dní
Nasazení buněk – pasážování	Počet buněk na jamku	10 000	5 000
	Celkový počet nasazených buněk na jedné destičce	850 000	425 000
	Životnost buněk v %*	92,04%	
	Životnost buněk na 1 ml*	0,43*10 ⁶	
	Podíl buněk z daného objemu média**	1,7 - 2 ml	
	Celkový objem ředícího média	17 ml	17 ml
	Množství FBS v ředícím médiu	10%	10%
Aplikace řasové biomasy	Stav řasové biomasy	čerstvá/zmražená	
	Množství FBS v ředícím médiu	5%	5%
	Množství ABAM v ředícím médiu	1%	1%
MTT test	Celkový objem ředícího média	16,6 ml	16,6 ml
	Množství MTT z daného objemu média	1,6 ml	1,6 ml

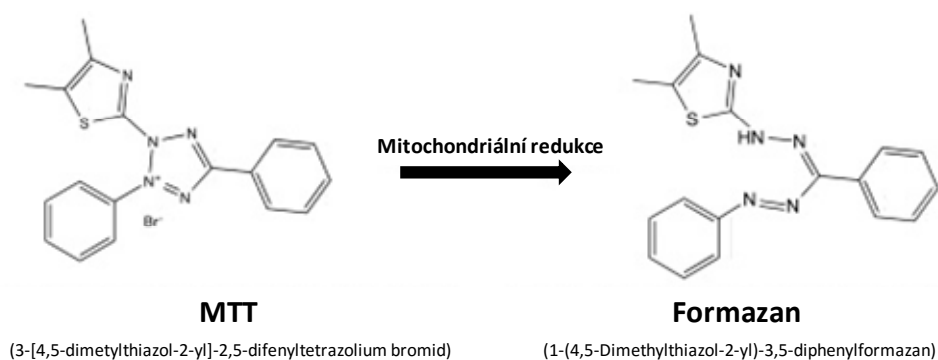
* průměrné hodnoty ze všech experimentů

** konkrétní hodnoty se odvíjely od životnosti buněk v daném experimentu

3.3.3. MTT test – princip a postup

Pro hodnocení působení řasové biomasy na tkáňové kultury byla zvolena metoda MTT testu (MTT assay, tabulka 17). Jedná se o test životnosti, resp. metabolické aktivity buněk. Principem je skutečnost, že v živých a zdravých buňkách probíhají normální metabolické pochody, jejichž součástí je i funkce mitochondriálních enzymů dýchacího řetězce – dehydrogenáz, zatímco v umírajících a mrtvých buňkách je tomu naopak. V testu byly tkáňové kultury inkubovány sloučeninou MTT

(3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-difenyltetrazolium bromid – Cell Proliferation Kit I MTT, Roche, Cat. #11465007001), neboli methyltetrazoliovou solí. Tato látka má v oxidovaném stavu žlutou barvu. V případě aktivity mitochondriálních dehydrogenáz (a tudíž životaschopnosti buněk) je MTT redukován na fialovo-modrý formazanový derivát (obrázek 12), který uvnitř buněk vytvoří nerozpustné krystalky. Ty se po přidání rozpouštědla (1% Triton X-100 – SERVA FEINBIOCHEMIA, Německo, Cat. #37238; isopropanol – Lach ner, ČR, Cat. #20037-AT0; 0,04N HCl) rozpustí a uvolní z buněk. Míra zbarvení vzniklého roztoku je pak stanovena spektrofotometricky. Získaný parametr absorbance (A) je přímo úměrný životnosti buněk.



Obrázek 12: Štěpení žlutého MTT na fialové formazanové krystalky díky metabolické aktivitě, resp. aktivitě mitochondriálních dehydrogenáz v živých buňkách. Míra konverze MTT na formazan je úměrná % živých buněk; zdroj: https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

Samotné měření bylo provedeno pomocí molekulárního přístroje VERSAmax Tunable Microplate Reader (Molecular Devices, USA). Výhodou tohoto spektrofotometru je možnost provádět měření přímo na destičce (obrázek 13) a lze použít pro všechny typy buněk.

Tabulka 17: Postup provedení MTT testu

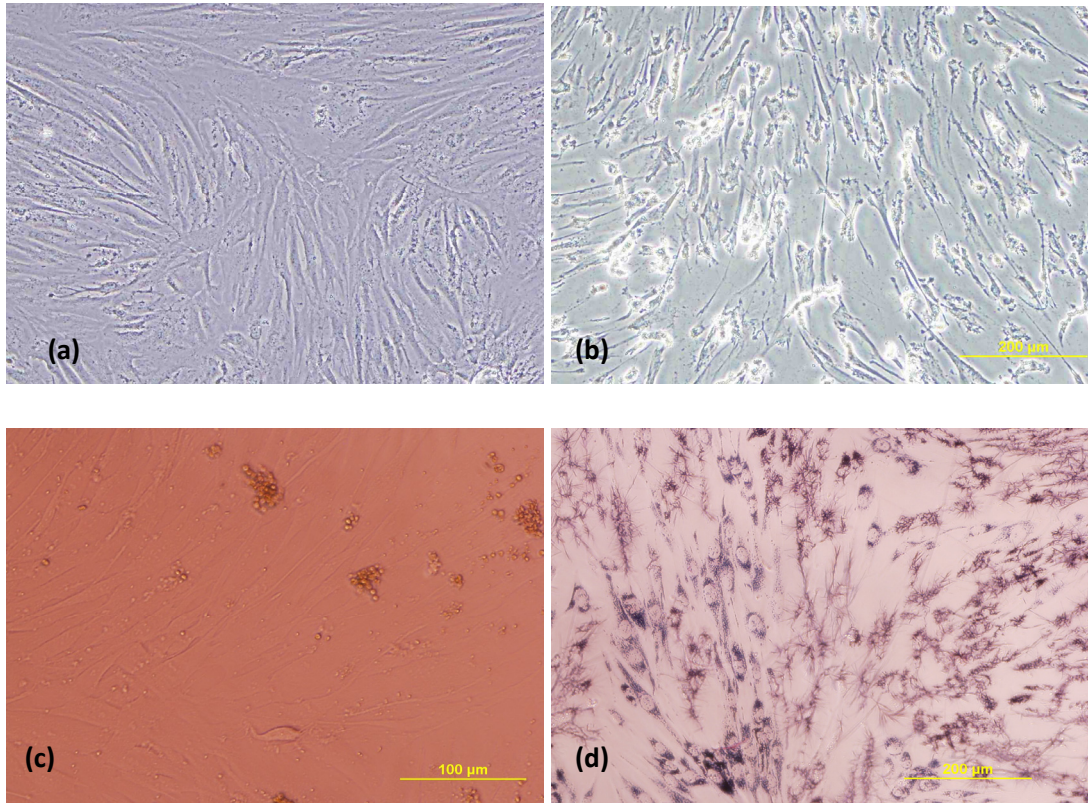
Krok	Popis	Množství	Pomůcky, přístroj	Čas
Ředění	naředění 1% MTT do nového kultivačního média (spočítáno jako součin počtu použitých jamek na kultivační destičce a objemu jedné jamky)	-	CYTOSAFE-N 2004, pipeta 10 ml, mokropipeta 1000 μ l	5 min
Aplikace MTT	odsátí starého média z jednotlivých jamek destičky a okamžité přidání nového média s MTT (vždy max. po 3 jamkách, aby buňky nevyschly)	200 μ l a 200 μ l	flow-box, mikropipeta 1000 μ l, mikropipeta 200 μ l, skleněná kádinka na odpad	10 min*
Inkubace	vložení destičky do inkubátoru	-	Steri-Cycle CO ₂ Incubator	4 hod.
Aplikace rozpouštědla	odsátí starého média s MTT z jednotlivých jamek destičky a okamžité přidání rozpouštědla	200 μ l a 200 μ l	mikropipeta 1000 μ l, mikropipeta 200 μ l, skleněná kádinka na odpad	15 min*
Inkubace	vložení destičky do inkubátoru	-	Steri-Cycle CO ₂ Incubator	30 min
Homogenizace	promíchání buněk v každé jamce	-	mikropipetra	10 min*
Spektrofotometrie	změření parametru absorbance A při vlnové délce 580 nm	-	VERSAmax Tunable Microplate Reader	1 min*

* platí pro práci s jednou kultivační destičkou



Obrázek 13: Spektrofotometr VERSAmax Tunable Microplate Reader; © M. Šafářová

Na následujícím obrázku 14 je vidět, jak se v jednotlivých fázích experimentu postupně mění morfologie buněk (v tomto případě fibroblastů).



Obrázek 14: Morfologické a fyziologické změny fibroblastů v průběhu experimentu: a) adherentní buňky před nasazením do kultivační destičky; b) smršťování buněk účinkem trypsinu; c) po inkubaci s buněčnou biomasou (růžové zbarvení je způsobeno pH indikátorem obsaženým v kultivačním médiu); d) buňky po MTT testu; © J. Lišková

3.3.4. Statistické zpracování dat

Jako vstupní data pro analýzu výsledků byly použity životnosti buněk, resp. parametry absorpance A zjištěné pomocí MTT testu. Příklad viability buněk na konci jednoho experimentu znázorňuje obrázek 15. Rozvržení obrázku odpovídá schématu aplikace různé řasové biomasy na jednu kultivační destičku, na které se testovaly vždy max. 3 typy biomasy ve třech opakováních (typ 1, 2 a 3). Poslední sloupec patřil kontrolním buňkám (viz také podkapitola 3.3.1., obrázek 9). Čísla ve sloupcích 1, 2 a 3 vyjadřují míru životnosti buněk (absorbanci) po inkubaci s danou řasovou biomasou ve srovnání s kontrolou K.

Typ řasové biomasy

% řasy	Typ 1			Typ 2			Typ 3			Kontrola
1000	0,171	0,189	0,16	0,216	0,230	0,263	0,363	0,355	0,428	0,372
500	0,297	0,338	0,396	0,295	0,288	0,341	0,366	0,363	0,352	0,412
200	0,47	0,533	0,402	0,372	0,446	0,485	0,479	0,40	0,375	0,418
100	0,388	0,354	0,332	0,349	0,352	0,386	0,290	0,482	0,424	0,393
90	0,392	0,455	0,516	0,481	0,432	0,412	0,399	0,411	0,352	0,499
50	0,324	0,307	0,346	0,293	0,275	0,284	0,322	0,260	0,232	0,401
10	0,340	0,296	0,295	0,296	0,289	0,282	0,237	0,249	0,222	0,395
5	0,391	0,433	0,305	0,289	0,277	0,294	0,213	0,217	0,223	0,309

Obrázek 15: Příklad vstupních dat získaných provedením MTT tesu

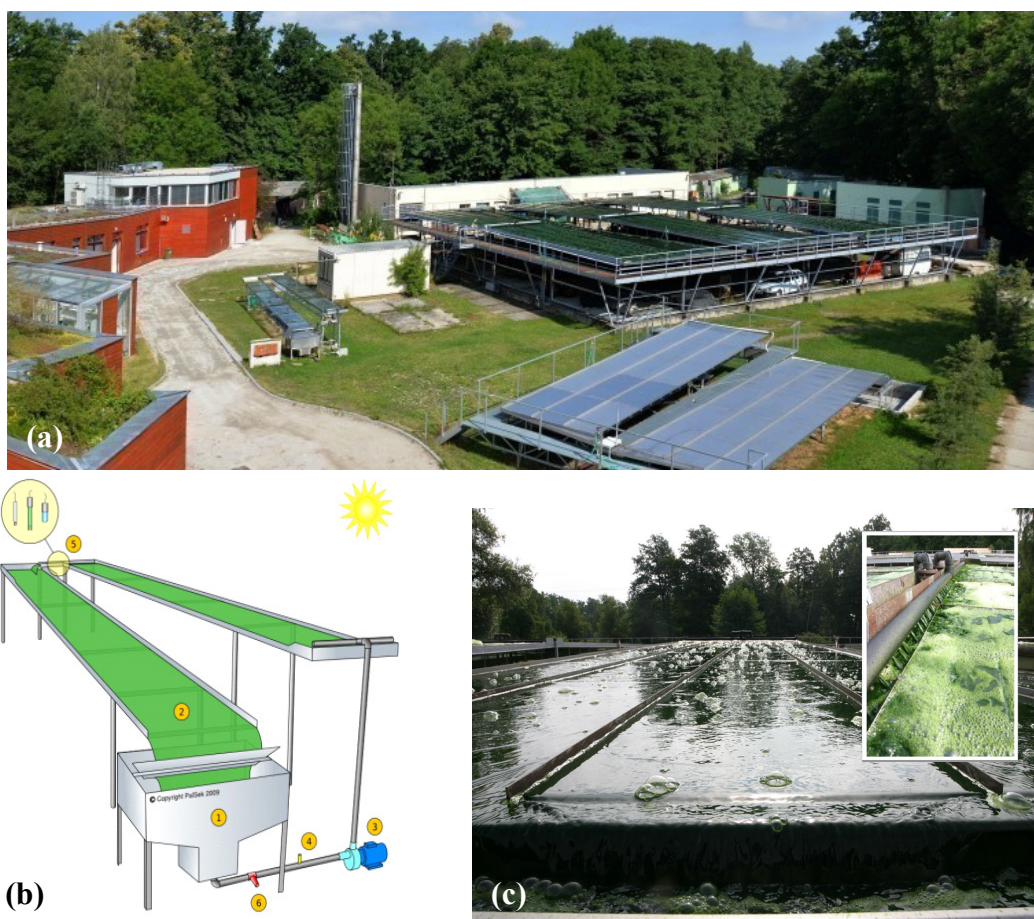
Vstupní data byla zpracována pomocí softwaru STATISTICA 12 CZ (StatSoft, Inc.), ve kterém byla použita nelineární regrese. Daty byla prokládána jednovrcholová křivka – parabola, tj. polynom druhého stupně, jehož rovnicí je $ax^2 + bx + c$. Odhadovány byly parametry a , b , c . Pokud byla hodnota parametru a záporná, byla parabola omezená shora, tj. hodnoty absorbance (které zde vyjadřují životnosti tkáňových kultur, resp. stimulaci jejich růstu pomocí řas) při narůstající koncentraci řasové biomasy stoupají až do maximální hodnoty. Po dosažení tohoto maxima se s dalším zvyšováním koncentrace řas růst tkáňové kultury postupně tlumí. Pokud je koeficient a kladný, je situace opačná, tzn., že hodnoty absorbance/ růst buněk tkáně s rostoucí koncentrací řas nejprve klesají a po dosažení maxima stoupají. V našem případě, kdy jsme zjišťovali vztah mezi koncentrací (dávkou) aplikované řasové biomasy a účinkem (stimulací růstu) na tkáňové kultury, se tato parabola nazývá „křivka dávka – odpověď“ (D-R křivka = dose response curve). Bod x , ve kterém se křivka "láme" z rostoucí na klesající, tj. kde má svoje maximum, byl vypočítán pomocí derivace tohoto polynómu a hledaného bodu x , při kterém je derivace polynómu rovna 0.

Pro vzájemné porovnávání účinku jednotlivých typů biomasy byly použity konfidenční intervaly koeficientů a , b , c spočítané pomocí softwaru SPSS Statistics Version 22. Srovnávány byly konfidenční intervaly statisticky významných koeficientů, tj. různých od 0. Účinnost dvou typů biomasy byla podobná, pokud se intervaly jejich koeficientů překrývaly.

4. VÝSLEDKY

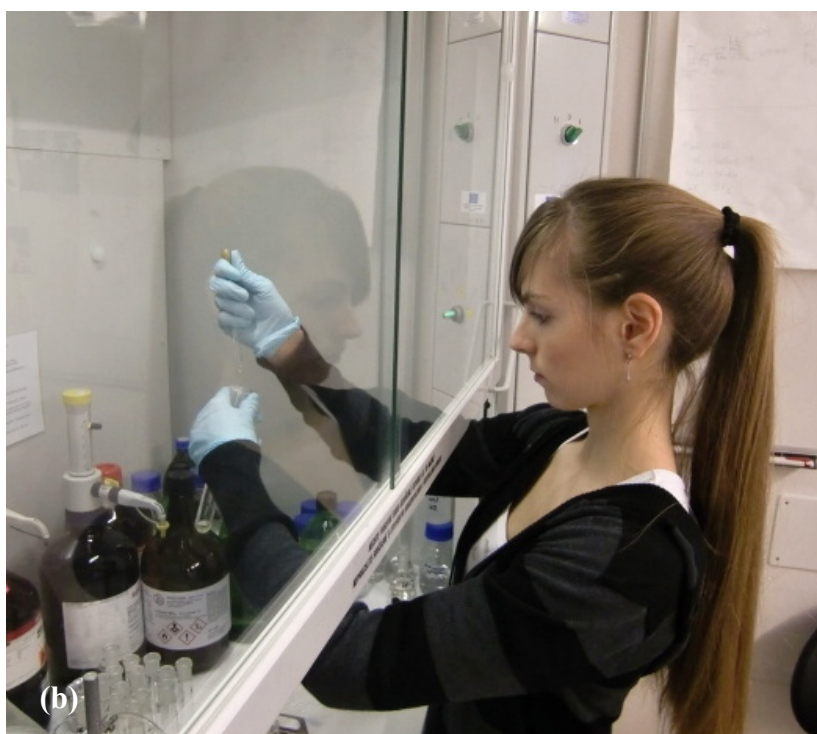
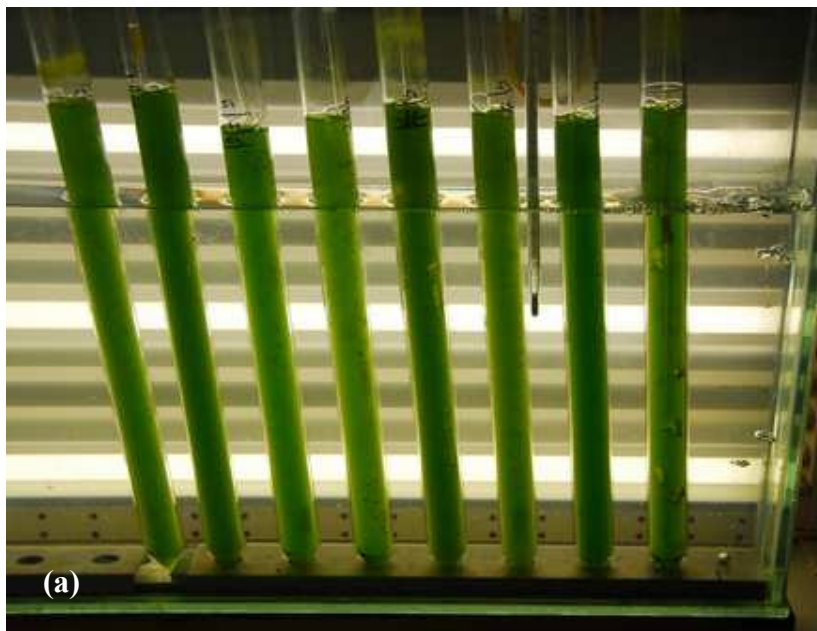
4.1. Kultivace řasové biomasy a extrakce bioaktivních látek

Během týdenní stáže na MBÚ AV ČR v Třeboni proběhlo seznámení s velkoobjemovou autotrofní kultivací zelené řasy *Chlorella* prováděnou venku v tenké vrstvě na speciálních nakloněných plošinách (obrázek 16) i s heterotrofním způsobem pěstování na glukóze. Následné zpracování řasové biomasy (velkoobjemová centrifugace, desintegrace buněk, sušení a extrakce CGF) je prováděno personálem vyškoleném speciálně pro tento provoz.



Obrázek 16: Venkovní kultivační plošiny s kaskádovým uspořádáním pro pěstování řas na MBÚ AV ČR Třeboň; a) různé velikosti plošin (200, 600, 3x2000 litrů); b) schéma; c) detail tenké vrstvy kultivované biomasy řasy *Chlorella* s bublinami kyslíku při velké rychlosti fotosyntézy; zdroj: www.alga.cz

Vlastní kultivace byla vyzkoušena na druhé studované hnědé řase *Eustigmatos/Vischeria* v laboratorních podmínkách ve válečcích o objemu 300 ml, vč. extrakce bioaktivních látek na příkladu nenasycených mastných kyselin (obrázek 17).



Obrázek 17: MBÚ AV ČR Třeboň - hnědá řasa *Eustigmatos/Vischeria* a) kultivace v 300ml válečcích sycených CO₂ ve vodní lázni udržující stabilní teplotu; b) extrakce mastných kyselin řasy z *Eustigmatos/Vischeria* ve fázi odebrání supernatantu s lipidy; © I. Koudelková.

4.2. Ověření stimulačního účinku růstu na tkáňových kulturách

Aplikace a testování pozitivního vlivu řasové biomasy na tkáňové kultury se uskutečnila na FGÚ AV ČR v Praze (obrázek 18). Všechny experimenty (tabulka 18) byly provedeny v 96 jamkových kultivačních destičkách, které umožňují jednotlivé typy biomasy testovat současně ve třech opakováních. Celkem se jednalo o 31* experimentů (10 dvoudenních a 21 sedmidenních).



Obrázek 18: Práce s řasovou biomasou na FGÚ AV ČR v Praze; a) vážení; b) aplikace na tkáňové kultury; © L. Šejnová

Tabulka 18: Základní informace o provedených experimentech

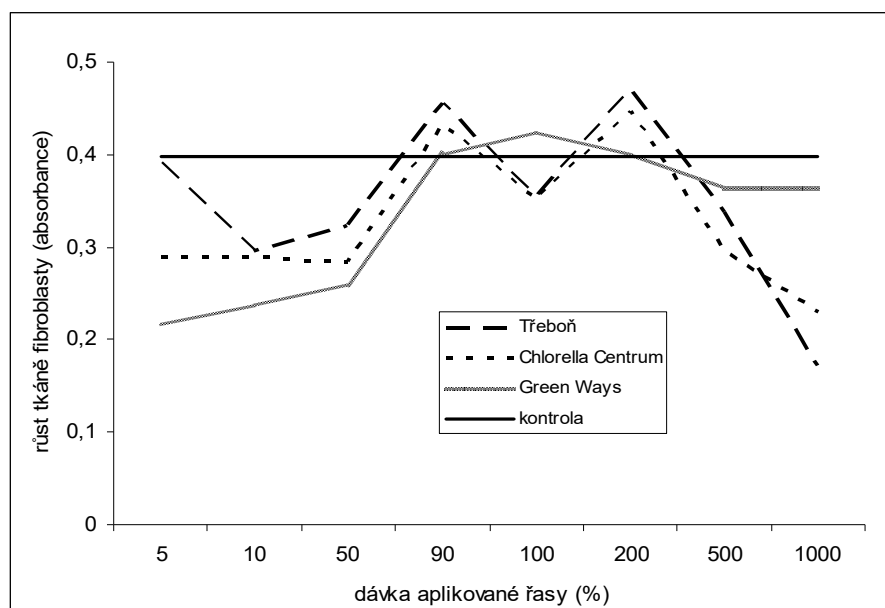
Typ biomasy	Termíny experimentů	Délka inkubace/ Poznámky
Ch. Tř. autotrofní Ch. Green Ways Ch. Centrum	29.9. -2. 10. 2014	2 dny/1.opakování
	10.11. -13. 11. 14	2 dny/2.opakování, zmražená biomasa
	15.12. -18. 12. 14	2 dny/ zkouška na MSC
	13.1. -15. 1. 2015	2 dny/ 3. opakování
	13.1. -20. 1. 2015	7 dní/1.opakování
	3.2. -5. 2. 2015	2 dny/ 4. opakování
Ch. Tř. heterotrofní CGF	3.2. -10. 2. 2015	7 dní/2.opakování
	13.4. -15. 4. 2015	2 dny/1.opakování
	14.4. -16. 4. 2015	7 dní/1.opakování
	13.4. -20. 4. 2015	2 dny/ 2. opakování
	14.4. -21. 4. 2015	7 dní/ 2. opakování
<i>Eustigmatos 1</i>	10.11. -13. 11. 14	2 dny/1.opakování
<i>Eustigmatos 2</i>		

* Jako jeden experiment se počítá jedna aplikace jednoho typu biomasy

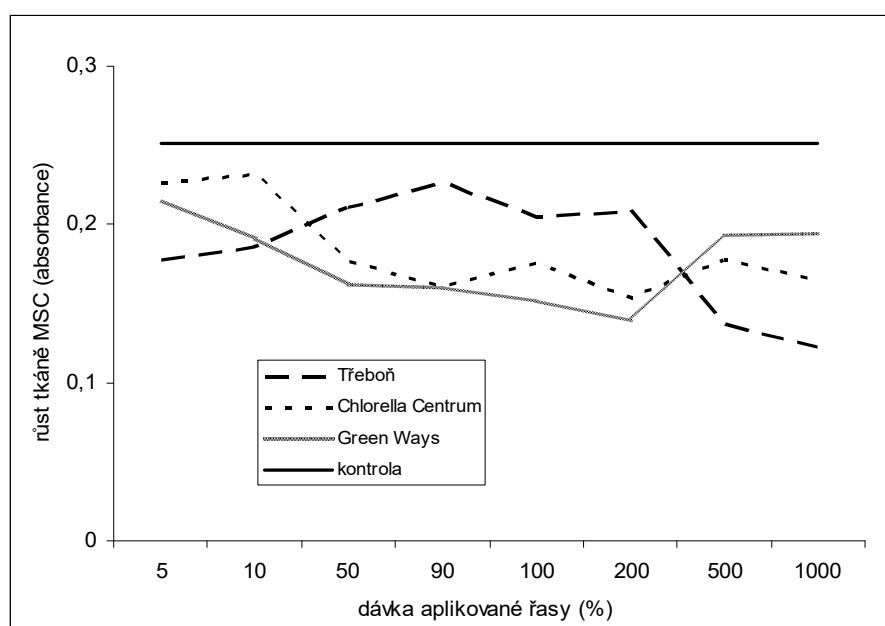
Stimulační účinek obsahových látek z řas byl primárně testován na dvou typech tkáňových kultur – na mezenchymálních kmenových buňkách (MSC) a fibroblastech (viz podkapitola 3.2.1.) s cílem vybrat vhodnější testovací model. Volba dopadla ve prospěch fibroblastů, jelikož tyto reagovaly na aplikaci řasového extraktu s lepší pozitivní odezvou růstu (graf 1a; tabulka 19a-b) oproti MSC (graf 1b).

Graf 1: Zkušební testování dvou typů tkáňových kultur pro modelové experimenty aplikace řasové biomasy; a) fibroblasty, b) MSC

a)



b)



Biomasa řas byla aplikována ve vzestupných dávkách/ koncentracích (5-1000%), kdy u 90% a 100% dávky (odpovídající doporučené denní dávce doplňku stravy pro muže, resp. ženu viz podkapitola 3.3.1) byl předpoklad stimulace buněčného růstu největší a směrem dolů i nahoru podél koncentrační řady by měl efekt postupně slábnout. Např. 1000% řasy znamená 10x větší dávka, než je v praxi doporučeno užívat za den.

Následující podkapitoly obsahují zhodnocení účinnosti jednotlivých typů řasové biomasy na růst fibroblastů po 2 a 7 dnech inkubace a to na základě:

- MTT testu, tj. výsledných životností buněk (viz také podkapitola 3.3.4.) měřených v hodnotách absorbance v rozpětí hodnot 0-1. K vlastnímu názornějšímu popisu výsledků je v těchto podkapitolách použito již procentuální vyjádření viability buněk, resp. nárůstu tkáňové kultury oproti kontrole za využití hodnot mediánu absorbance (dále jen med.)
- vyjádření závislosti odpovědi na dávce, tzv. křivka dávka – odpověď (D-R křivka, dose response curve), viz podkapitola 3.3.5.

4.2.1. *Chlorella* Třeboň autotrofní

Prášek biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní (v našem pokuse rozpuštěný v médiu) v koncentracích 90-200% stimuloval po dvou dnech fibroblasty k téměř modelovému a ukázkovému nárůstu o 2-16% oproti kontrole. Nejlepší účinek měla dávka běžně užívaná a doporučována v praxi (v našem experimentu 100% řasy), kdy se růst tkáně zvýšil o 16% (med. 0,041, tabulka 19a-b). Naopak nejnižší efekt byl zjištěn v hodnotách deseti předávkování (1000% řasy), kdy bylo působení na růst fibroblastů inhibiční – počet buněk tkáně byl zaznamenán téměř o polovinu menší oproti kontrole. Závislost mezi oběma sledovanými proměnnými je znázorněna D-R křivkou (parabolou, graf 2a), která popisuje nelineární regresi. V rovnici této paraboly $[y = (-0,21e-6)*x*x+(0,712e-4)*x+(0,284817)]$, vysvětlená variabilita 0,23758505] je koeficient *a* záporný, tzn., že D-R křivka je omezena shora. Je zde tedy patrný trend, kdy stimulační účinek prášku s rostoucí koncentrací sílí až do maximální hodnoty (bod $x = 172,3\%$) a s dalším zvyšováním koncentrace efekt postupně slábne.

Velice zajímavé jsou výsledky ze sedmidenních pokusů (tabulka 19c-d), které nekopírují pozitivní vliv řasy *Chlorella* Třeboň autotrofní na růst tkáně, jak bylo

pozorováno po dvou dnech. Je patrné, že všechny koncentrace této práškové biomasy po vícedenní aplikaci způsobují naopak útlum růstu fibroblastů, příp. dokonce jejich úmrtí. D-R křivka sedmidenního experimentu (graf 2b) zobrazuje omezení zdola (koeficient a rovnice $y = (0,236e-6)*x*x+(-0,39e-3)*x+(0,258873)$ je kladný, vysvětlená var. 0,56632255). Hodnoty růstu tkáňových kultur tedy s narůstající koncentrací řasy nejdříve klesají (až do koncentrace 826,2%) a pak stoupají. Největší záporné hodnoty (inhibice o -70 a -57%) byly zjištěny v koncentracích 500 a 1000% aplikované řasy.

Tabulka 19a: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – před odečtením kontroly

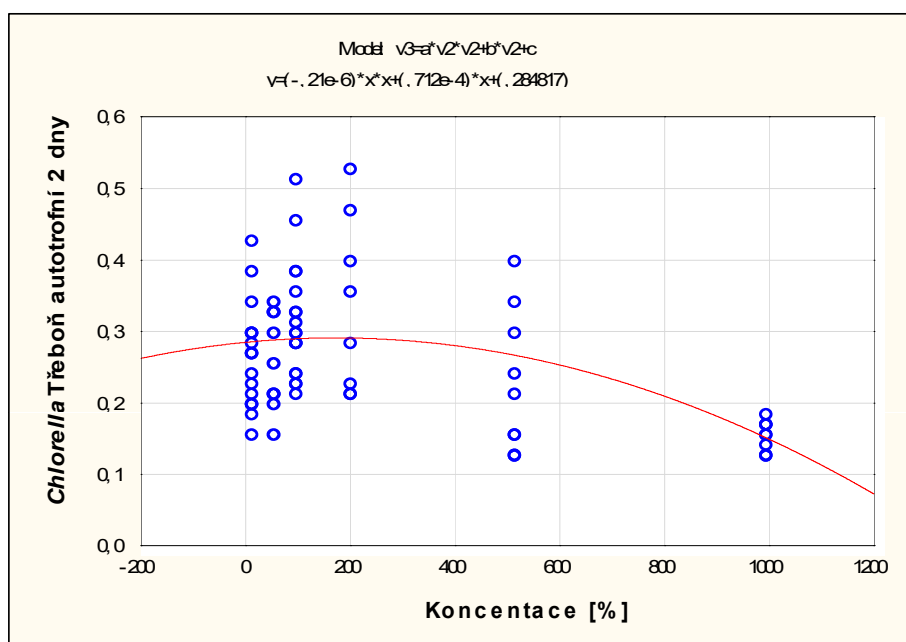
% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)									medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,171	0,189	0,16	0,168	0,141	0,165	0,125	0,125	0,17	0,165	0,157	0,021	0,125	0,189
500	0,297	0,338	0,396	0,137	0,245	0,214	0,159	0,126	0,156	0,214	0,230	0,091	0,126	0,396
200	0,47	0,533	0,402	0,212	0,293	0,352		0,226	0,215	0,323	0,338	0,115	0,212	0,533
100	0,388	0,354	0,332	0,235	0,297	0,336	0,291	0,283	0,286	0,297	0,311	0,043	0,235	0,388
90	0,392	0,455	0,516	0,215	0,31	0,244	0,248	0,232	0,294	0,294	0,323	0,101	0,215	0,516
50	0,324	0,307	0,346	0,161	0,22	0,327	0,199	0,254	0,216	0,254	0,262	0,063	0,161	0,346
10	0,34	0,296	0,295	0,272	0,274	0,288	0,194	0,209	0,197	0,274	0,263	0,048	0,194	0,34
5	0,391	0,433	0,305	0,187	0,237	0,267	0,162	0,244	0,197	0,244	0,269	0,087	0,162	0,433

pozn.: vynechaná místa jsou odlehle hodnoty

Tabulka 19b: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)									medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	-0,227	-0,209	-0,238	-0,089	-0,116	-0,092	-0,113	-0,113	-0,068	-0,113	-0,140	0,062	-0,238	-0,068
500	-0,101	-0,060	-0,002	-0,120	-0,012	-0,043	-0,079	-0,112	-0,082	-0,079	-0,068	0,040	-0,120	-0,002
200	0,072	0,135	0,004	-0,045	0,037	0,096	-0,238	-0,012	-0,023	0,004	0,003	0,102	-0,238	0,135
100	-0,010	-0,044	-0,066	-0,022	0,041	0,080	0,053	0,045	0,048	0,041	0,014	0,047	-0,066	0,080
90	-0,006	0,057	0,118	-0,042	0,054	-0,013	0,010	-0,006	0,056	0,010	0,025	0,046	-0,042	0,118
50	-0,074	-0,091	-0,052	-0,096	-0,037	0,071	-0,039	0,016	-0,022	-0,039	-0,036	0,050	-0,096	0,071
10	-0,058	-0,102	-0,103	0,016	0,018	0,032	-0,044	-0,029	-0,041	-0,041	-0,035	0,047	-0,103	0,032
5	-0,007	0,035	-0,093	-0,070	-0,020	0,011	-0,076	0,006	-0,041	-0,020	-0,028	0,042	-0,093	0,035

Graf 2a: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň autotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

Tabulka 19c: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – před odečtením kontroly

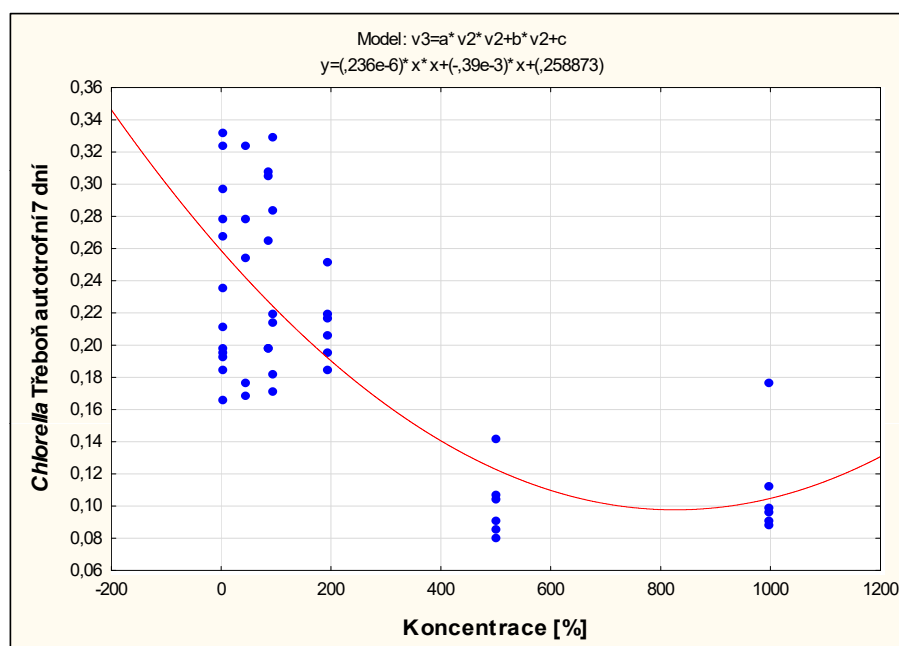
% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,097	0,087	0,096	0,091	0,110	0,176	0,097	0,110	0,031	0,087	0,176
500	0,078	0,102	0,140	0,090	0,084	0,105	0,096	0,100	0,020	0,078	0,140
200	0,183	0,217	0,216	0,251	0,193	0,205	0,211	0,211	0,022	0,183	0,251
100	0,181	0,170	0,212	0,328	0,217	0,283	0,215	0,232	0,056	0,170	0,328
90	0,198	0,196		0,303	0,307	0,263	0,263	0,253	0,049	0,196	0,307
50	0,176	0,167		0,323	0,252	0,276	0,252	0,239	0,060	0,167	0,323
10	0,184	0,164	0,195	0,323	0,296	0,276	0,236	0,240	0,061	0,164	0,323
5	0,210	0,198	0,192	0,266	0,330	0,234	0,222	0,238	0,048	0,192	0,330

pozn.: vynechaná místa jsou odlehle hodnoty

Tabulka 19d: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	-0,165	-0,175	-0,166	-0,247	-0,228	-0,162	-0,171	-0,191	0,034	-0,247	-0,162
500	-0,184	-0,160	-0,122	-0,248	-0,254	-0,233	-0,209	-0,200	0,049	-0,254	-0,122
200	-0,079	-0,045	-0,046	-0,087	-0,145	-0,133	-0,083	-0,089	0,039	-0,145	-0,045
100	-0,081	-0,092	-0,050	-0,010	-0,121	-0,055	-0,068	-0,068	0,035	-0,121	-0,010
90	-0,064	-0,066	-0,262	-0,035	-0,031	-0,075	-0,065	-0,089	0,079	-0,262	-0,031
50	-0,086	-0,095	-0,262	-0,015	-0,086	-0,062	-0,086	-0,101	0,077	-0,262	-0,015
10	-0,078	-0,098	-0,067	-0,015	-0,042	-0,062	-0,065	-0,060	0,026	-0,098	-0,015
5	-0,052	-0,064	-0,070	-0,072	-0,008	-0,104	-0,067	-0,062	0,029	-0,104	-0,008

Graf 2b: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň autotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

4.2.2. *Chlorella* Centrum

V pořadí první testovaný doplněk stravy v tabletách – *Chlorella* Centrum (v testech rozpuštěný v médiu) stimuloval fibroblasty po dvoudenní inkubaci k většímu růstu o 13% (med. 0,004) a to pouze v 90% dávce řasy (tabulka 20a-b). Ostatní koncentrace působily na fibroblasty inhibičně. Od koncentrací 100-1000% se růst ve vztahu ke kontrole postupně snižoval od -5% až na -36% (med. -0,092). Vztah dávka – odpověď je popsána opět v tzv. D-R křivce (graf 3a).

Rovnice $y = (-0,12e-6)*x*x+(0,321e-4)*x+(0,284034)$ s vysvětlenou variabilitou 0,16389691 ukazuje, že koeficient a je záporný, a tudíž je D-R křivka omezená shora. Tzn., že s rostoucí dávkou řas roste i stimulační efekt na fibroblasty až do maximální koncentrace 132,6% (v bodě x), po němž dochází k postupné inhibici růstu. Tento výsledek prakticky kopíruje druhého testovaného výrobce tablet *Chlorella* Green Ways, který je zhodnocen v následující podkapitole.

Zvýšený růst buněk byl pozorován také po týdnu testování (tabulka 20c-d), avšak teprve v rámci vyšších koncentrací (100-500%), než tomu bylo po dvou dnech při 90%. To lze vyčíst z grafu 3b, kdy se D-R křivka [rovnice $y = (-0,34e-6)*x*x+(0,279e-3)*x+(0,268568)$ s vysvětlenou var. 0,29924652] láme až v hodnotě koncentrace 406%. První pozitivní vliv řasy od výrobce *Chlorella* Centrum po 7mi dnech byl tedy zaznamenán až při doporučené denní dávce, resp. při 100% koncentraci řasy a to o 9% nárůst tkáně (med. 0,027) oproti kontrole – v případě dvoudenních pokusů se naopak jednalo při stejné koncentraci řasy již o inhibici růstu fibroblastů -5% (med. -0,012). Při dávce 5 krát vyšší (500% řasy) byl po 7 dnech nárůst pouze o 4% (med. 0,012), což je opět diametrální rozdíl oproti inhibici -21% (med. -0,055) zjištěného za stejných podmínek v kratším časovém intervalu, tj. po dvou dnech.

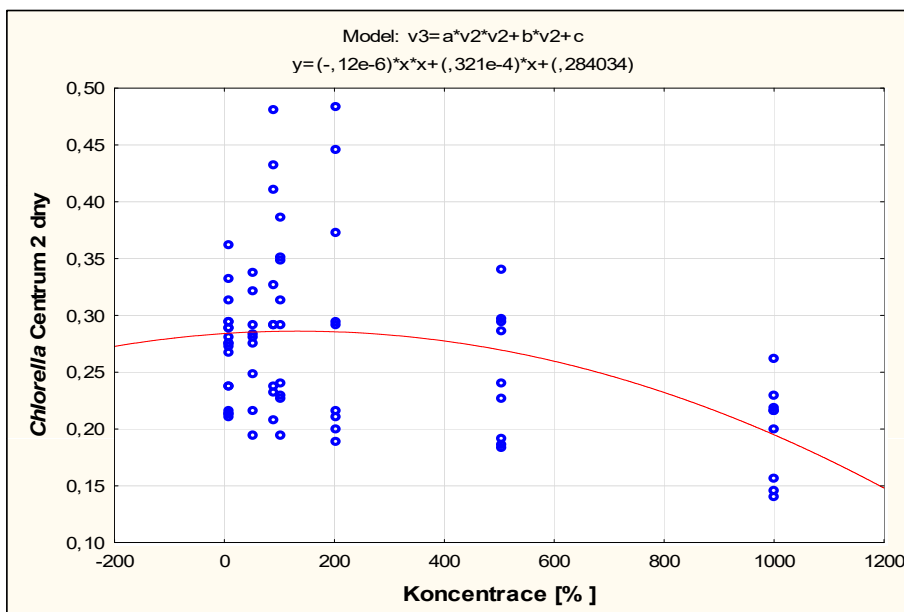
Tabulka 20a: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy řasy *Chlorella* Centrum – před odečtením kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)									medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,216	0,23	0,263	0,22	0,217	0,199	0,146	0,142	0,158	0,216	0,199	0,039	0,142	0,263
500	0,295	0,288	0,341	0,297	0,188	0,241	0,183	0,226	0,191	0,241	0,250	0,054	0,183	0,341
200	0,372	0,446	0,485	0,292	0,217	0,201	0,21	0,295	0,19	0,292	0,301	0,104	0,190	0,485
100	0,349	0,352	0,386	0,313	0,293	0,241	0,231	0,195	0,226	0,293	0,287	0,063	0,195	0,386
90	0,481	0,432	0,412	0,327	0,292	0,293	0,238	0,232	0,208	0,293	0,32389	0,092	0,208	0,481
50	0,293	0,275	0,284	0,281	0,321	0,338	0,217	0,194	0,25	0,281	0,273	0,043	0,194	0,338
10	0,296	0,289	0,282	0,315	0,333	0,363	0,237	0,211	0,267	0,289	0,288	0,044	0,211	0,363
5	0,289	0,277	0,294	0,237	0,273	0,276	0,214	0,214	0,216	0,273	0,254	0,032	0,214	0,294

Tabulka 20b: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Centrum – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)									medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	-0,182	-0,168	-0,135	-0,037	-0,040	-0,058	-0,092	-0,096	-0,080	-0,092	-0,099	0,050	-0,182	-0,037
500	-0,103	-0,110	-0,057	0,041	-0,069	-0,016	-0,055	-0,012	-0,047	-0,055	-0,048	0,044	-0,110	0,041
200	-0,026	0,048	0,087	0,036	-0,040	-0,056	-0,028	0,057	-0,048	-0,026	0,003	0,050	-0,056	0,087
100	-0,049	-0,046	-0,012	0,057	0,037	-0,016	-0,007	-0,043	-0,012	-0,012	-0,010	0,034	-0,049	0,057
90	0,083	0,034	0,014	0,071	0,036	0,037	0,000	-0,006	-0,030	0,034	0,026	0,034	-0,030	0,083
50	-0,105	-0,123	-0,114	0,025	0,065	0,082	-0,021	-0,044	0,012	-0,021	-0,025	0,073	-0,123	0,082
10	-0,102	-0,109	-0,116	0,059	0,077	0,107	-0,001	-0,027	0,029	-0,001	-0,009	0,080	-0,116	0,107
5	-0,109	-0,121	-0,104	-0,020	0,017	0,020	-0,024	-0,024	-0,022	-0,024	-0,043	0,051	-0,121	0,020

Graf 3a: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Centrum na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

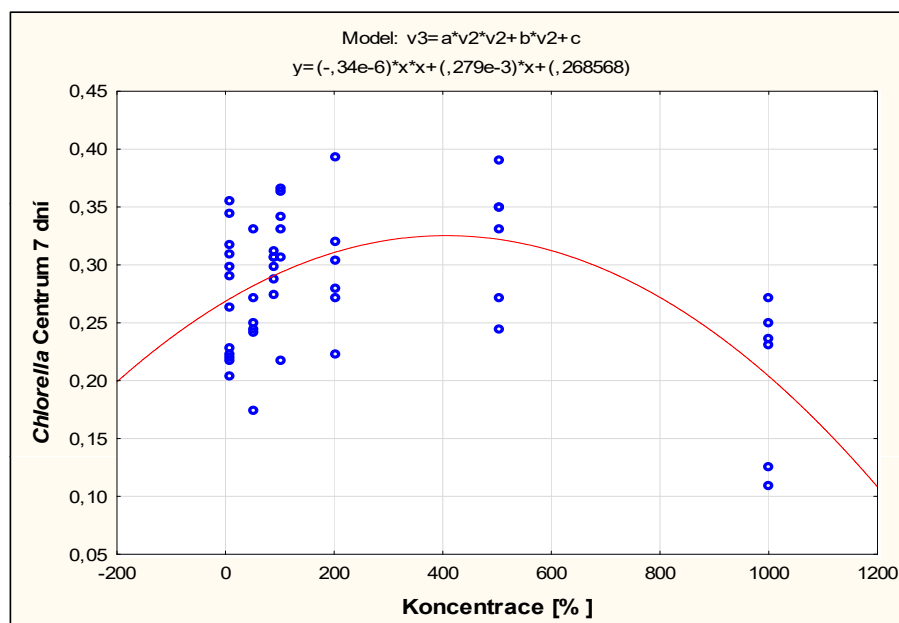
Tabulka 20c: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Centrum – před odečtením kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,238	0,109	0,127	0,230	0,271	0,249	0,234	0,204	0,062	0,109	0,271
500	0,272	0,331	0,244	0,349	0,390	0,350	0,340	0,323	0,050	0,244	0,390
200	0,272	0,281	0,222	0,321	0,394	0,303	0,292	0,299	0,052	0,222	0,394
100	0,341	0,219	0,307	0,331	0,366	0,364	0,336	0,321	0,050	0,219	0,366
90	0,275	0,288	0,308	0,313	0,299	0,307	0,303	0,298	0,013	0,275	0,313
50	0,175	0,246	0,242	0,271	0,249	0,330	0,248	0,252	0,046	0,175	0,330
10	0,204	0,228	0,300	0,319	0,345	0,263	0,282	0,277	0,050	0,204	0,345
5	0,220	0,219	0,222	0,292	0,311	0,356	0,257	0,270	0,053	0,219	0,356

Tabulka 20d: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení *Chlorella* Centrum – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	-0,024	-0,153	-0,135	-0,108	-0,067	-0,089	-0,099	-0,096	0,043	-0,153	-0,024
500	0,010	0,069	-0,018	0,011	0,052	0,012	0,012	0,023	0,029	-0,018	0,069
200	0,010	0,019	-0,040	-0,017	0,056	-0,035	-0,004	-0,001	0,033	-0,040	0,056
100	0,079	-0,043	0,045	-0,007	0,028	0,026	0,027	0,021	0,038	-0,043	0,079
90	0,013	0,026	0,046	-0,025	-0,039	-0,031	-0,006	-0,002	0,032	-0,039	0,046
50	-0,087	-0,016	-0,020	-0,067	-0,089	-0,008	-0,044	-0,048	0,034	-0,089	-0,008
10	-0,058	-0,034	0,038	-0,019	0,007	-0,075	-0,027	-0,024	0,038	-0,075	0,038
5	-0,042	-0,043	-0,040	-0,046	-0,027	0,018	-0,041	-0,030	0,022	-0,046	0,018

Graf 3b: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Centrum na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

4.2.3. *Chlorella* Green Ways

U třetího typu autotrofní biomasy řasy *Chlorella* a to v podobě tablet (rozpuštěné v médiu) od společnosti Green ways (dále jen GW) se v rámci dvoudenních experimentů projevila největší stimulace růstu v doporučené denní dávce (v našich pokusech 100% řasy). Konkrétně se jednalo o 10% nárůst tkáně (med. 0,025) ve srovnání s kontrolou (tabulka 21a-b). Je velice zajímavé, že v ostatních koncentracích biomasy *Chlorella* GW nebyla stimulace vůbec pozorována a to ani v přílehlých hodnotách (u 90 a 200% dávky řasy byla inhibice -6 a -15%). Tato odpověď není tedy logicky kontinuální. Inhibice růstu fibroblastů se pohybuje dokonce v hodnotách -6 až -30%. Koeficient a rovnice D-R křivky [$y = (-0,15e-6)*x*x+(0,175e-3)*x+(0,244292)$, vysvětlená var. 0,03629557] je ale i přes sledovaný útlum růstu fibroblastů záporný – resp. D-R křivka má typický tvar (je omezená shora), avšak vzhledem ke kontrole se od koncentrace 100% do 576,4% (bod x , kde má křivka své maximum, viz graf 4a) nejedná o pozitivní stimulaci růstu tkáňových kultur.

Logičtější výsledky se podařilo získat po 7 dnech podobně jako u tablet *Chlorella* Centrum. Stimulaci fibroblastů přineslo testování v rozmezí 90-500% koncentrace řasy (tabulka 21c-d). K pozitivnímu efektu došlo zejména při větším množství aplikované biomasy (200 a 500% řasy), kdy byl zaznamenán nárůst tkáně o 12% (med. 0,036) a 19%, (med. 0,057). O něco nižší, avšak stále kladné hodnoty (1 a 3%), měly buňky při doporučené denní dávce řasy 90 a 100%. Oproti tomu nejsilnější inhibiční efekt (-61%; med. -0,183) měl její desetinásobek (1000% řasy). Z grafu 4b lze vyčíst, že D-R křivka [rovnice $y = (-0,64e-6)*x*x+(0,540e-3)*x+(0,254699)$, vysvětlená variabilita 0,66213694] se z rostoucí na klesající "láme" v bodě x , který odpovídá koncentraci 419,2% řasy. Do této hodnoty byl tedy účinek biomasy ještě pozitivní.

Tabulka 21a: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – před odečtením kontroly

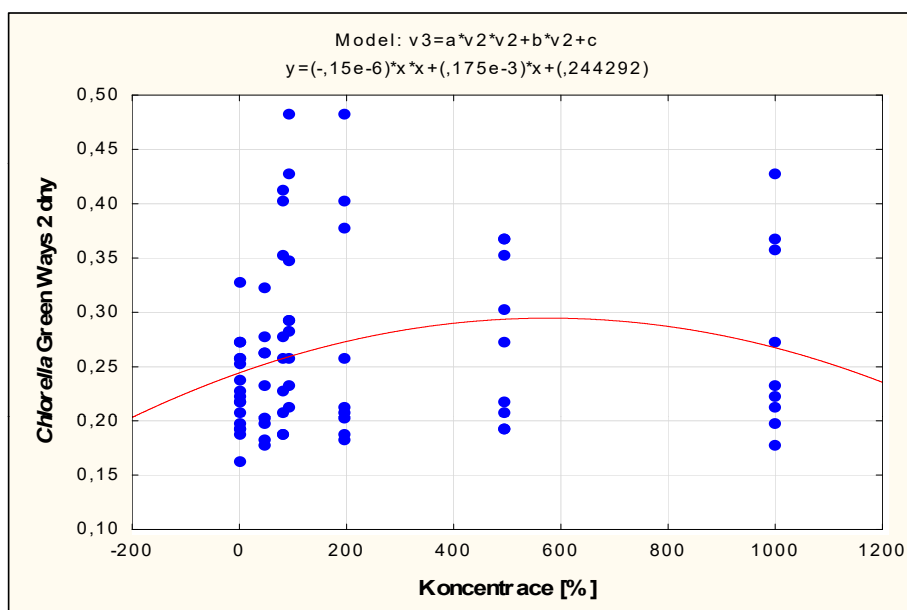
% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)									medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,363	0,355	0,428	0,270	0,220	0,232	0,211	0,173	0,197	0,232	0,272	0,084	0,173	0,428
500	0,366	0,363	0,352	0,216	0,298	0,272	0,204	0,189	0,192	0,272	0,272	0,071	0,189	0,366
200	0,479	0,400	0,375	0,254	0,204	0,212	0,183	0,178	0,200	0,212	0,276	0,106	0,178	0,479
100	0,290	0,482	0,424	0,253	0,281	0,345	0,209	0,289	0,229	0,289	0,311	0,085	0,209	0,482
90	0,399	0,411	0,352	0,277	0,257	0,183	0,223	0,203	0,187	0,257	0,277	0,084	0,183	0,411
50	0,322	0,260	0,232	0,259	0,201	0,276	0,178	0,174	0,193	0,232	0,233	0,047	0,174	0,322
10	0,237	0,249	0,222	0,254	0,256	0,269		0,160	0,184	0,243	0,229	0,036	0,160	0,269
5	0,213	0,217	0,223	0,190	0,270	0,324	0,204	0,196	0,188	0,213	0,225	0,042	0,188	0,324

pozn.: vynechaná místa jsou odlehle hodnoty

Tabulka 21b: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)									medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	-0,035	-0,043	0,030	0,014	-0,037	-0,025	-0,027	-0,065	-0,041	-0,035	-0,025	0,028	-0,065	0,030
500	-0,032	-0,035	-0,046	-0,041	0,042	0,016	-0,034	-0,049	-0,046	-0,035	-0,025	0,030	-0,049	0,042
200	0,081	0,002	-0,023	-0,003	-0,053	-0,045	-0,055	-0,060	-0,038	-0,038	-0,021	0,042	-0,060	0,081
100	-0,108	0,084	0,026	-0,004	0,025	0,089	-0,029	0,051	-0,009	0,025	0,014	0,057	-0,108	0,089
90	0,001	0,013	-0,046	0,021	0,001	-0,074	-0,015	-0,035	-0,051	-0,015	-0,021	0,030	-0,074	0,021
50	-0,076	-0,138	-0,166	0,003	-0,056	0,020	-0,060	-0,064	-0,045	-0,060	-0,065	0,056	-0,166	0,020
10	-0,161	-0,149	-0,176	-0,003	-0,001	0,013	-0,238	-0,078	-0,054	-0,078	-0,094	0,085	-0,238	0,013
5	-0,185	-0,181	-0,175	-0,067	0,014	0,068	-0,034	-0,042	-0,050	-0,050	-0,073	0,085	-0,185	0,068

Graf 4a: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Green Ways na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

Tabulka 21c: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – před odečtením kontroly

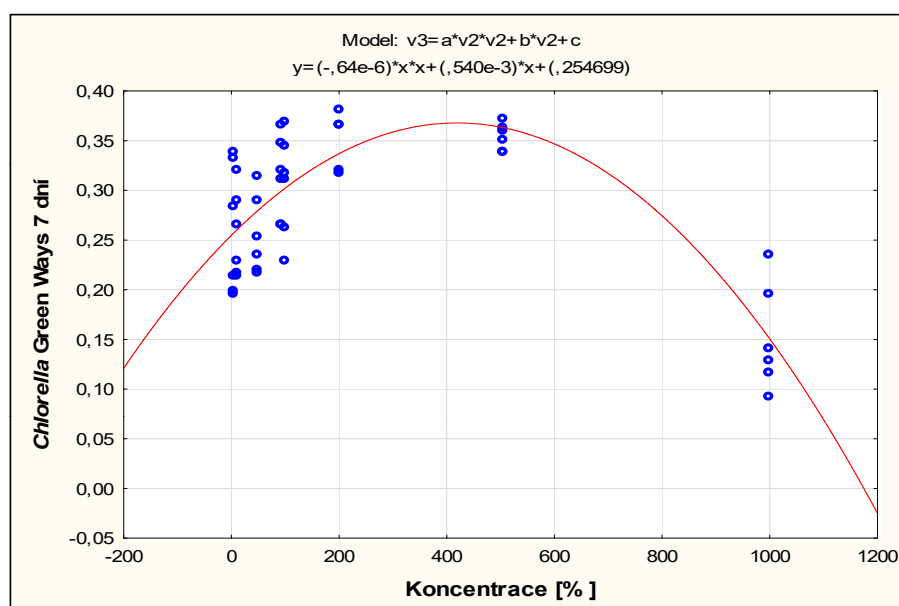
% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,092	0,195	0,235	0,131	0,142	0,119	0,137	0,152	0,048	0,092	0,235
500	0,363	0,360	0,340	0,374	0,339	0,351	0,356	0,355	0,013	0,339	0,374
200		0,367	0,318	0,366	0,381	0,321	0,366	0,351	0,026	0,318	0,381
100	0,318	0,231	0,264	0,345	0,370	0,312	0,315	0,307	0,047	0,231	0,370
90	0,265	0,268	0,311	0,367	0,348	0,322	0,317	0,314	0,038	0,265	0,367
50	0,217	0,235	0,220	0,315	0,253	0,290	0,244	0,255	0,036	0,217	0,315
10	0,218	0,215	0,231	0,266	0,291	0,321	0,249	0,257	0,039	0,215	0,321
5	0,197	0,200	0,214	0,286	0,341	0,332	0,250	0,262	0,061	0,197	0,341

pozn.: vynechaná místa jsou odlehle hodnoty

Tabulka 21d: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Green Ways – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	-0,170	-0,067	-0,027	-0,207	-0,196	-0,219	-0,183	-0,148	0,074	-0,219	-0,027
500	0,101	0,098	0,078	0,036	0,001	0,013	0,057	0,055	0,040	0,001	0,101
200	-0,262	0,105	0,056	0,028	0,043	-0,017	0,036	-0,008	0,119	-0,262	0,105
100	0,056	-0,031	0,002	0,007	0,032	-0,026	0,004	0,007	0,031	-0,031	0,056
90	0,003	0,006	0,049	0,029	0,010	-0,016	0,008	0,014	0,021	-0,016	0,049
50	-0,045	-0,027	-0,042	-0,023	-0,085	-0,048	-0,044	-0,045	0,020	-0,085	-0,023
10	-0,044	-0,047	-0,031	-0,072	-0,047	-0,017	-0,046	-0,043	0,017	-0,072	-0,017
5	-0,065	-0,062	-0,048	-0,052	0,003	-0,006	-0,050	-0,038	0,027	-0,065	0,003

Graf 4b: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Green Ways na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

4.2.4. *Chlorella* Třeboň heterotrofní

Výsledky dvoudenních experimentů s práškovou desintegrovanou biomasou *Chlorella* Třeboň heterotrofní (rozpuštěnou v médiu) poukazují na zvýšený růst fibroblastů téměř ve všech koncentracích aplikované řasy (tabulka 22a-b). S množstvím přidávané biomasy byl zaznamenán silící odezva stimulace růstu tkáně do maxima 583,7% řasy (graf 5a). Znatelný nárůst buněk o 6-7% (med. 0,014-0,017) byl zjištěn již při nízkých dávkách řasy (10 a 50%, resp. u desetiny až poloviny doporučené dávky). Nárůst o 10% (med. 0,022) vykazovaly buňky tkáně při koncentraci odpovídající doporučené denní dávce řasy. Největší aktivaci fibroblastů (o 15%; med. 0,034) vyvolala heterotrofní biomasa *Chlorella* při 5x větší doporučené denní dávce. Za pozornost stojí i skutečnost, že na rozdíl od *Chlorella* Třeboň autotrofní byly fibroblasty stimulovány k růstu i při desetinásobném předávkování (1000% řasy) a to o 5% (med. 0,011). Naopak nulový efekt se projevil v případě nejnižšího zvoleného množství aplikované řasové biomasy (5% řasy), kdy byly hodnoty oproti kontrole horší o 7% (med. - 0,017). Jestliže do D-R křivky zahrneme tedy i 1000% dávky řasy, dostáváme nakonec slabou nelineární regresi – koeficient a (z rovnice $y = (-0,93e-7)*x*x + (0,109e-3)*x + (0,226479)$ s vysvětlenou var. 0,08938171 je v porovnání s koeficienty rovnic u ostatních typů řasové biomasy nejmenší.

Překvapivé výsledky ukázaly opět experimenty po 7 dnech (tabulka 22c-d). I přes očekávání podobného pozitivního efektu dosaženého po dvoudenní inkubaci fibroblastů, došlo ke zvýšenému růstu tkáně pouze při 50% koncentraci řasy, kdy byl nárůst fibroblastů o 6% (med. 0,016) a tedy srovnatelný jako po dvou dnech. O 1% (med. 0,004) narostly buňky také při desetinásobném předávkování. Výsledná odezva zobrazená D-R křivkou (graf 5b) poukazuje podobně jako v případě prášku *Chlorella* Třeboň autotrofní na omezení křivky zdola (koef. a z rovnice $y = (0,977e-7)*x*x + (-0,10e-3)*x + (0,25408)$ je kladný). Růst fibroblastů jde tedy se zvyšující se koncentrací nejprve do záporných hodnot (až do koncentrace 525,1% řasy). Poté se křivka mírně zvedá, avšak pozitivního účinku nedosáhne. Zajímavé je, že stimulaci neprokázala doporučená dávka (100% řasy). Ostatní koncentrace vyvolaly dokonce inhibici růstu tkáně a to o -2 až -14%. Jedná se opět o srovnatelný jev s práškem *Chlorella* Třeboň autotrofní, kde byl útlum buněk po 7 dnech ještě o něco výraznější (srovnání grafů 2b a 5b).

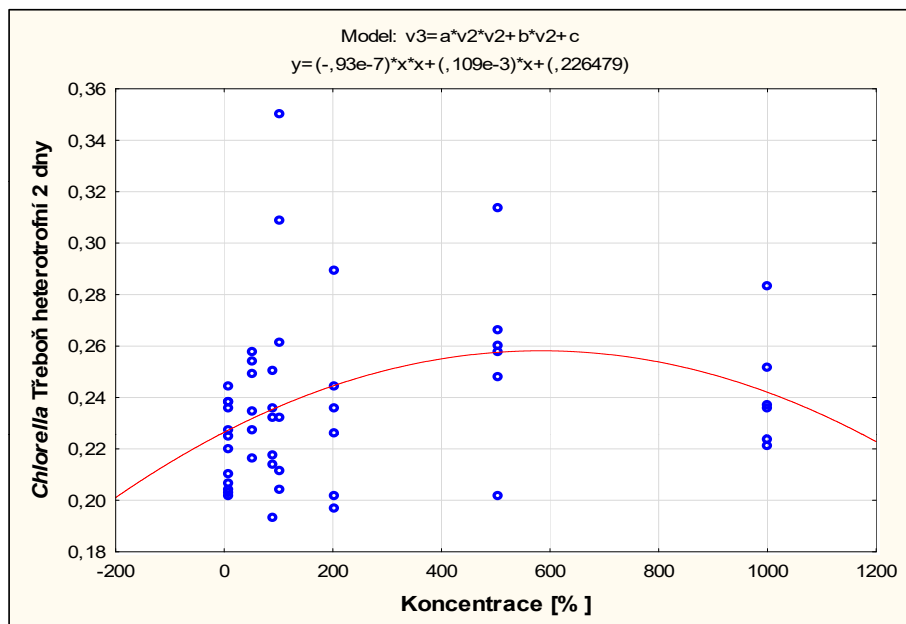
Tabulka 22a: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – před odečtením kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián průměr		sm.od.	min	max
1000	0,221	0,237	0,224	0,236	0,252	0,283	0,237	0,242	0,021	0,221	0,283
500	0,202	0,267	0,258	0,248	0,260	0,314	0,259	0,258	0,033	0,202	0,314
200	0,197	0,226	0,290	0,202	0,245	0,236	0,231	0,233	0,031	0,197	0,290
100	0,351	0,232	0,309	0,212	0,205	0,262	0,247	0,262	0,053	0,205	0,351
90	0,218	0,214	0,232	0,194	0,251	0,236	0,225	0,224	0,018	0,194	0,251
50	0,258	0,249	0,228	0,217	0,235	0,254	0,242	0,240	0,015	0,217	0,258
10	0,203	0,245	0,225	0,238	0,239	0,236	0,237	0,231	0,014	0,203	0,245
5	0,205	0,210	0,228	0,202	0,207	0,220	0,209	0,212	0,009	0,202	0,228

Tabulka 22b: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián průměr		sm.od.	min	max
1000	-0,006	0,010	-0,003	0,013	0,029	0,060	0,011	0,017	0,022	-0,006	0,060
500	-0,025	0,040	0,031	0,025	0,037	0,091	0,034	0,033	0,034	-0,025	0,091
200	-0,030	-0,001	0,063	-0,022	0,022	0,013	0,006	0,007	0,031	-0,030	0,063
100	0,124	0,005	0,082	-0,012	-0,019	0,039	0,022	0,037	0,052	-0,019	0,124
90	-0,009	-0,013	0,005	-0,030	0,028	0,013	-0,002	-0,001	0,018	-0,030	0,028
50	0,031	0,022	0,001	-0,007	0,012	0,031	0,017	0,015	0,014	-0,007	0,031
10	-0,024	0,018	-0,002	0,015	0,016	0,013	0,014	0,006	0,015	-0,024	0,018
5	-0,022	-0,017	0,001	-0,022	-0,017	-0,004	-0,017	-0,013	0,009	-0,022	0,001

Graf 5a: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň heterotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

Tabulka 22c: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – před odečtením kontroly

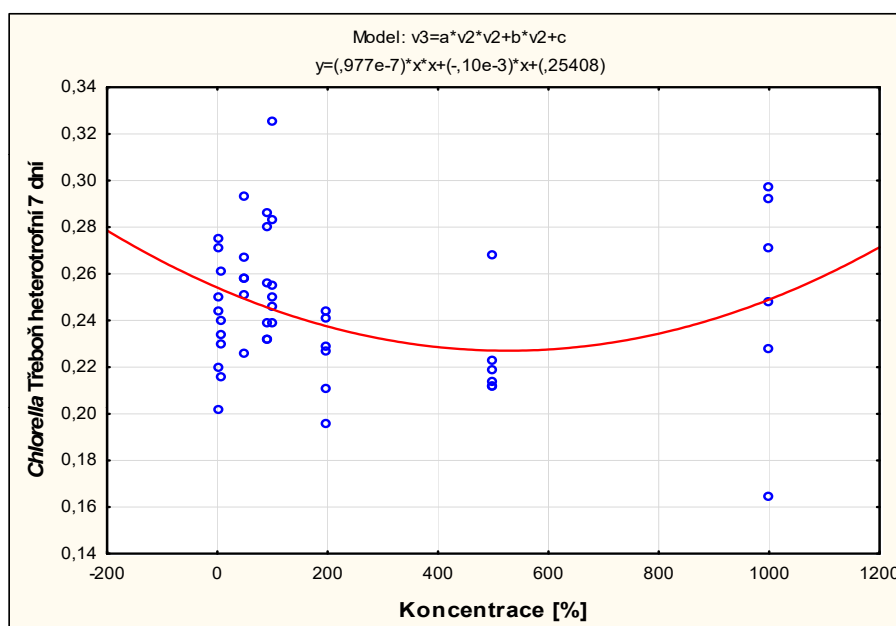
% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,228	0,248	0,164	0,297	0,271	0,292	0,260	0,250	0,045	0,164	0,297
500	0,213	0,211	0,218	0,222	0,268	0,211	0,216	0,224	0,020	0,211	0,268
200	0,195	0,241	0,210	0,244	0,229	0,227	0,228	0,224	0,017	0,195	0,244
100	0,325	0,283	0,250	0,246	0,239	0,255	0,253	0,266	0,030	0,239	0,325
90	0,256	0,286	0,280	0,239	0,232	0,232	0,248	0,254	0,022	0,232	0,286
50	0,258	0,258	0,251	0,293	0,267	0,226	0,258	0,259	0,020	0,226	0,293
10	0,230	0,215	0,240		0,261	0,234	0,234	0,236	0,015	0,215	0,261
5	0,244	0,201	0,219	0,271	0,275	0,250	0,247	0,243	0,026	0,201	0,275

pozn.: vynechaná místa jsou odlehle hodnoty

Tabulka 22d: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení biomasy *Chlorella* Třeboň heterotrofní – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,002	0,022	-0,062	0,010	-0,016	0,005	0,004	-0,006	0,027	-0,062	0,022
500	-0,013	-0,015	-0,008	-0,065	-0,019	-0,076	-0,017	-0,033	0,027	-0,076	-0,008
200	-0,031	0,015	-0,016	-0,043	-0,058	-0,060	-0,037	-0,032	0,026	-0,060	0,015
100	0,099	0,057	0,024	-0,041	-0,048	-0,032	-0,004	0,010	0,055	-0,048	0,099
90	0,030	0,060	0,054	-0,048	-0,055	-0,055	-0,009	-0,002	0,051	-0,055	0,060
50	0,032	0,032	0,025	0,006	-0,020	-0,061	0,016	0,002	0,034	-0,061	0,032
10	0,004	-0,011	0,014	-0,287	-0,026	-0,053	-0,019	-0,060	0,104	-0,287	0,014
5	0,018	-0,025	-0,007	-0,016	-0,012	-0,037	-0,014	-0,013	0,017	-0,037	0,018

Graf 5b: R-D křivka – závislost koncentrace *Chlorella* Třeboň heterotrofní na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

4.2.5. *Chlorella* růstový faktor (CGF) Třeboň

Velmi zajímavé výsledky pro interpretaci jsou údaje o růstu tkáně po aplikaci konglomerátů bioaktivních látek získaných horkým výluhem z řasy *Chlorella* kultivované heterotrofním způsobem. Tzv. CGF ve formě prášku (rozpuštěný v médiu) vykazuje naprosto rozdílné efekty na růst fibroblastů po 2 a 7 denních experimentech. Po 2 dnech tlumí tkáň v růstu ve všech dávkách až na -17%, což je v hodnotách inhibice (tabulka 23a-b). Z grafu 6a je sice vidět, že funkcí kvadratické rovnice $[y = (-0,73e-7)*x*x+(0,103e-3)*x+(0,193155)]$ s vysvětlenou var. 0,0884189] je parabola (D-R křivka) omezená shora, a tedy vliv CGF při jeho zvyšujících se dávkách sílí (do maxima 707,8%), avšak vzhledem je kontrole se nejedná o pozitivní efekt na růst fibroblastů.

Naopak po 7 dnech vykazuje aplikace CGF (koncentrace 200-500%) úplně nejvyšší stimulaci růstu tkáně ze všech pokusů – až o 24% vzhledem ke kontrole (tabulka 23c-d). D-R křivka [rovnice $y = (-0,21e-6)*x*x+(0,213e-3)*x+(0,241202)$, vysvětlená var. 0,08576543] dosahuje svého maxima při koncentraci 508,6% a zde se tedy nárůst fibroblastů zastavuje (graf 6b). Ve srovnání s ostatními prověřovanými biomasami *Chlorella* byl u CGF patrný vzestupný trend v míře stimulace (čím vyšší dávka, tím vyšší stimul).

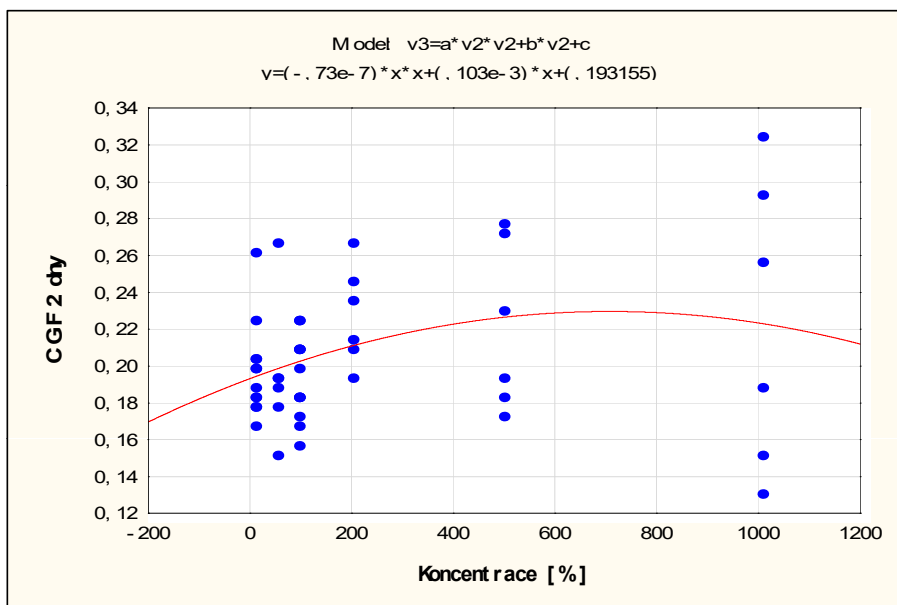
Tabulka 23a: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení CGF – před odečtením kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián průměr		sm.od.	min	max
1000	0,129	0,189	0,151	0,257	0,324	0,295	0,223	0,224	0,073	0,129	0,324
500	0,181	0,171	0,192	0,231	0,275	0,280	0,212	0,222	0,044	0,171	0,280
200	0,216	0,193	0,210	0,248	0,268	0,234	0,225	0,228	0,025	0,193	0,268
100	0,165	0,211	0,182	0,184	0,185	0,212	0,185	0,190	0,017	0,165	0,212
90	0,157	0,171	0,224	0,226	0,201	0,210	0,206	0,198	0,026	0,157	0,226
50	0,193	0,177	0,153	0,187	0,266	0,192	0,190	0,195	0,035	0,153	0,266
10	0,204	0,202	0,262	0,176	0,198	0,185	0,200	0,205	0,028	0,176	0,262
5	0,198	0,184	0,224	0,176	0,190	0,170	0,187	0,190	0,018	0,170	0,224

Tabulka 23b: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 2 denním působení CGF – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián průměr		sm.od.	min	max
1000	-0,098	-0,038	-0,076	0,034	0,101	0,072	-0,002	-0,001	0,074	-0,098	0,101
500	-0,046	-0,056	-0,035	0,008	0,052	0,057	-0,014	-0,004	0,045	-0,056	0,057
200	-0,011	-0,034	-0,017	0,025	0,045	0,011	0,000	0,003	0,026	-0,034	0,045
100	-0,062	-0,016	-0,045	-0,040	-0,039	-0,012	-0,039	-0,035	0,017	-0,062	-0,012
90	-0,070	-0,056	-0,003	0,003	-0,023	-0,014	-0,018	-0,027	0,027	-0,070	0,003
50	-0,034	-0,050	-0,074	-0,037	0,043	-0,032	-0,035	-0,031	0,036	-0,074	0,043
10	-0,023	-0,025	0,035	-0,048	-0,026	-0,039	-0,025	-0,021	0,026	-0,048	0,035
5	-0,029	-0,043	-0,003	-0,048	-0,034	-0,054	-0,038	-0,035	0,016	-0,054	-0,003

Graf 6a: R-D křivka – závislost koncentrace CGF na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 2 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

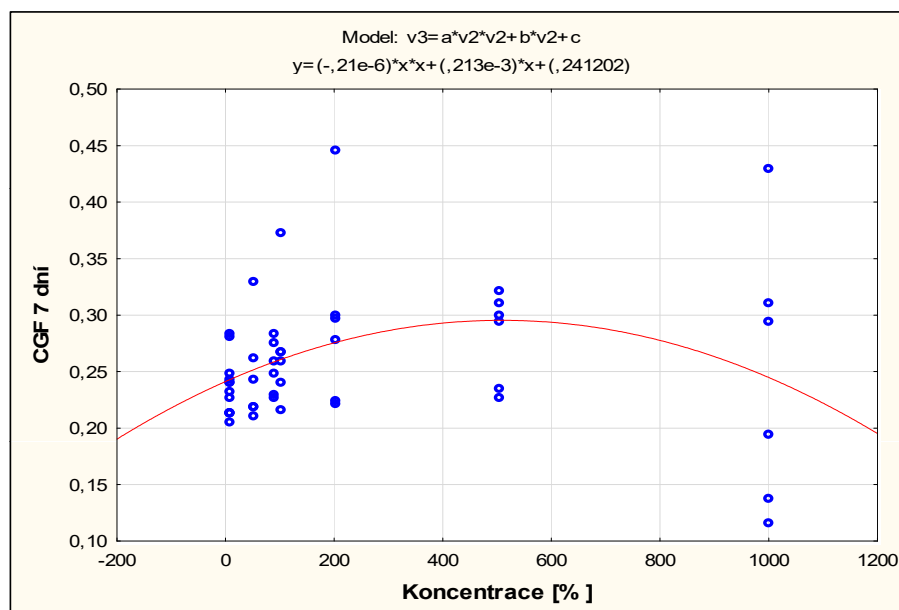
Tabulka 23c: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení CGF – před odečtením kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	0,194	0,138	0,116	0,295	0,430	0,311	0,245	0,247	0,109	0,116	0,430
500	0,227	0,300	0,236	0,323	0,295	0,311	0,298	0,282	0,037	0,227	0,323
200	0,279	0,301	0,297	0,224	0,221	0,446	0,288	0,295	0,075	0,221	0,446
100	0,372	0,269	0,267	0,241	0,216	0,261	0,264	0,271	0,049	0,216	0,372
90	0,259	0,277	0,283	0,231	0,228	0,248	0,254	0,254	0,021	0,228	0,283
50	0,220	0,263	0,331	0,218	0,212	0,243	0,232	0,248	0,041	0,212	0,331
10	0,214	0,241	0,227	0,214	0,205	0,234	0,221	0,223	0,013	0,205	0,241
5	0,240	0,284	0,282	0,214	0,244	0,248	0,246	0,252	0,024	0,214	0,284

Tabulka 23d: Růst tkáňové kultury (fibroblastů) po 7 denním působení CGF – po odečtu kontroly

% řasy	Nárůst buněk tkáňové kultury (fibroblastů)						medián	průměr	sm.od.	min	max
1000	-0,032	-0,088	-0,110	0,008	0,143	0,024	-0,012	-0,009	0,083	-0,110	0,143
500	0,001	0,074	0,010	0,036	0,008	0,024	0,017	0,026	0,025	0,001	0,074
200	0,053	0,075	0,071	-0,063	-0,066	0,159	0,062	0,038	0,080	-0,066	0,159
100	0,146	0,043	0,041	-0,046	-0,071	-0,026	0,008	0,015	0,072	-0,071	0,146
90	0,033	0,051	0,057	-0,056	-0,059	-0,039	-0,003	-0,002	0,050	-0,059	0,057
50	-0,006	0,037	0,105	-0,069	-0,075	-0,044	-0,025	-0,009	0,064	-0,075	0,105
10	-0,012	0,015	0,001	-0,073	-0,082	-0,053	-0,033	-0,034	0,037	-0,082	0,015
5	0,014	0,058	0,056	-0,073	-0,043	-0,039	-0,013	-0,005	0,050	-0,073	0,058

Graf 6b: R-D křivka – závislost koncentrace CGF na účinku (stimulaci) tkáňových kultur (fibroblastů), 7 denní experiment



Vysvětlivky: poloha křivky znázorňuje účinnost řasové biomasy v příslušných koncentracích (modré body) ve stimulaci růstu tkáně

4.2.6. Srovnání stimulace růstu tkáně různými biomasami

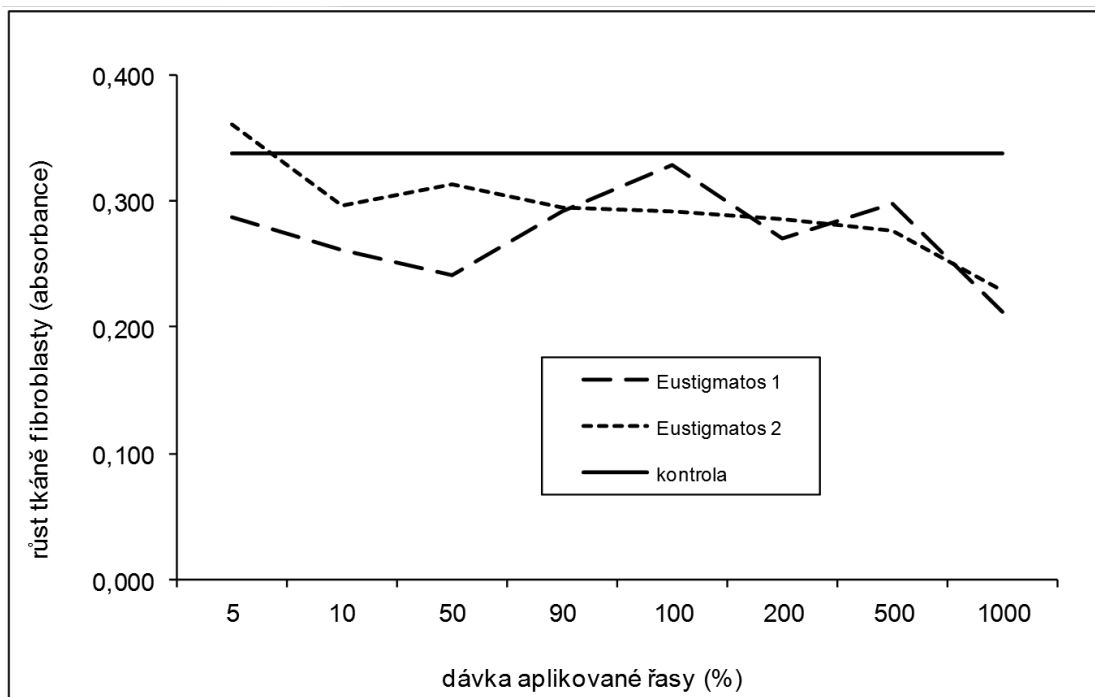
Statistické srovnávání dat modelově poukazuje na skutečnost, že prokazatelné efekty a rozdíly mezi různými typy biomasy jsou znatelné až při dlouhodobější inkubaci tkání s biomasou. Při 2 denních experimentech jsou vzájemné rozdíly podle očekávání neprůkazné mezi všemi sledovanými biomasami (konfidenční intervaly koeficientů a , b , c spočítané pro všechny testované typy biomasy byly statisticky nevýznamné, tj. byla v nich zahrnuta 0). Naopak 7 denní pokusy potvrzují, že účinnost řasových přírodních preparátů a jejich výsledné efekty ve formě pozitivního růstu tkáňových kultur je možné objektivně porovnávat až při dlouhodobějším užívání (konfidenční intervaly koeficientů a , b , c byly ve všech případech statisticky významné, tj. různé od 0).

Doplňky stravy *Chlorella* Centrum a Green Ways vykazují po 7 dnech stejnou účinnost, CGF má srovnatelný efekt s *Chlorella* Centrum (konfidenční intervaly koeficientů a , b , c se překrývají). Prášek dezintegrovaných buněk *Chlorella* Třeboň autotrofní i heterotrofní nelze tímto způsobem s ostatními typy biomasy porovnávat, jelikož D-R křivky znázorňující jejich působení na fibroblasty jsou obrácené, viz podkapitoly 4.2.2., resp. graf 2b a 4.2.5., resp. graf 5b.

4.2.7. Eustigmatos/Vischeria

Aplikace dvou kmenů rodu *Eustigmatos* na tkáň proběhla v rámci jednoho dvoudenního pokusu jako pilotní experiment a případné vodítko pro budoucí detailnější výzkum (graf 7). Jelikož se jedná o nový zatím pouze potenciálně uvažovaný doplněk stravy, bylo zde zvoleno stejné dávkování jako u řasy *Chlorella* a CGF (tj. 5-1000% řasy). Avšak v žádných z těchto koncentrací k nárůstu fibroblastů nedošlo. Možné důvody jsou probírány v následující diskuzi (kapitola 5).

Graf 7: Pilotní experiment s biomasou řasy *Eustigmatos* – srovnání s kontrolou



5. DISKUZE

Hlavním cílem diplomové práce bylo ověření zdravotně pozitivního účinku bioaktivních látek vybraných typů biomasy řasy *Chlorella* a *Eustigmatos/Vischeria* a extraktu *Chlorella* růstový faktor (CGF). Aplikace vybrané autotrofní i heterotrofní biomasy řasy *Chlorella*, vč. extraktu CGF vyvolala stimulaci růstu fibroblastů nejčastěji v hodnotách stanovené denní dávky (v této práci 100% koncentrace řasy).

Tkáňové kultury byly pro testování účinku řasy *Chlorella* zvoleny také např. v práci Ewart et al. (2007). Jednalo se o lidské krevní buňky (PBMC - Peripheral Blood Mononuclear Cell), na které po dobu 24 hodin působil extrakt druhu *Ch. pyrenoidosa* ve třech koncentracích (1, 10 a 100 µg/ml). Výsledky ukázaly, že tento extrakt výrazně stimuluje produkci cytokininů (IL-10), T-lymfocytů (Th-1), interferonů-γ a TNF-α (Tumor Necrosis Factor) v PBMC. Byly zde tedy prokázány imunostimulační a protizánětlivé účinky extraktu *Ch. pyrenoidosa*, avšak na rozdíl od naší práce nedošlo ke stimulaci růstu tkáňových kultur. Autoři to zdůvodnili tím, že zvýšená sekrece cytokininů pravděpodobně nezpůsobuje sekundární nárůst tkáně. Hsu et al. (2010) uvádí, že látkami z řasy *Chlorella* zodpovědnými za stimulaci imunity v lidském organismu jsou polysacharidy, které získali horkým výluhem (podobně jako CGF), a že klíčovou roli v tomto mechanismu hraje speciální protein tzv. Toll-like receptor 4 (TLR 4). V našem případě se však nejednalo o extrakci a testování jednotlivých látek, ale byla sledována a potvrzena stimulace růstu tkáně prostřednictvím všech složek řasové biomasy, resp. konglomerátu látek CGF. Je tedy zřejmé, že různé bioaktivní látky řasy *Chlorella* mají různý mechanismus působení (ovlivňují a aktivují rozdílné receptory) a tedy i zdravotní efekt, avšak společně mohou vykazovat významný synergistický a komplexní účinek, který lze na venek zaznamenat právě zvýšeným růstem, popř. regenerací buněk v organismu. Tuto skutečnost dokazují např. studie Yamagishi et al. (1961) nebo Lee & Rosenbaum (1987), podle kterých se pozitivní vliv *Chlorella* růstového faktoru v kombinaci s dalšími cennými látkami, které řasa *Chlorella* obsahuje (zejména vysoké množství chlorofylu), projeví na celkovém zvýšeném růstu lidských, resp. zvířecích buněk. Jensen (1992) hovoří také o schopnosti CGF obnovovat poškozené tkáně.

Zdroj biomasy *Chlorella* pro pokusy – prášek vs. tablety

Dvoudenní experimenty s různou biomasou řasy *Chlorella* prokázaly největší účinek u *Chlorella* Třeboň autotrofní (nárůst oproti kontrole o 2-16% v koncentracích 90-200% řasy) a u *Chlorella* Třeboň heterotrofní (nárůst oproti kontrole o 3-15% v koncentracích 10-50 a 100-1000% řasy). Tento výsledek se dá zdůvodnit dvěma způsoby. Prvním je logicky vyšší obsah, resp. lepší poměr bioaktivních látek v těchto biomasách v porovnání s ostatními typy (*Chlorella* Centrum a GW). Druhým možným vysvětlením je rozdíl v rozpouštění (rozptýlení) řasového desintegrátu v podobě prášku a tablet ve vodě a následně v kultivačním médiu před jejich samotnou aplikací na buňky tkáně. I přes maximální snahu tablety (*Chlorella* Centrum a GW) důkladně rozpustit, čemuž navíc předcházelo jejich rozdrčení ve hmoždíři, výsledky poukazují na to, že se z nich celá dávka dostatečně nerozpustí. K uvolňování bioaktivních látek pravděpodobně docházelo pomaleji a postupně z mikročásteček tablet oproti prášku (*Chlorella* Třeboň autotrofní i heterotrofní). Tímto mohl být pozitivní efekt na tkáň znatelný až po vícedenní kultivaci. Jak si ale vysvětlit, že práškové biomasy *Chlorella* Třeboň autotrofní i heterotrofní zapůsobily na buňky po 7 denní inkubaci inhibičně? Jelikož buňky tkáně reagovaly na stimulační efekt obou prášků velice výrazně již po dvou dnech, je pravděpodobné, že v průběhu dalších dnů inkubace si obsahové látky z aplikovaných řas postupně vyčerpaly, což se projevilo v podobě růstové stagnace až inhibice na konci 7 denních experimentů. V praxi se však tento rozdíl v rychlosti uvolňování a využití živin v lidském organismu pravděpodobně neprojeví. Je zde totiž předpoklad, že absorpce bioaktivních látek z tablet i prášku by mohla být efektivní ve stejné kvantitě, jelikož obojí prochází přes trávicí trakt s kyselinami a enzymy, kterým jsou tyto chemické sloučeniny přírodního původu dobře známé a vstřebávané do těla. Lee & Rosenbaum (1987) dokládají stimulační účinek doplňků stravy *Chlorella* na růst prospěšných bakterií střevní mikroflóry, absorpci toxických látek a podporu peristaltiky střev. Při pravidelné konzumaci řasy *Chlorella* se tedy celkově zefektivňuje práce trávicího ústrojí, čímž se navíc zvýší využitelnost živin i z běžné potravy.

Porovnatelnost výsledků v závislosti na životaschopnosti tkáňových kultur

Na první pohled by se dalo usuzovat, že na výsledný stimulační účinek řasové biomasy mají vliv i samotné tkáňové kultury, resp. nasazené kmeny. Tento úsudek se

nabízel v případě 2 i 7 denních pokusů s CGF uskutečněné v jednom týdnu. CGF byl aplikován na fibroblasty, které se nasazovaly po jednom dni – pocházely ze stejného zdroje. Výsledky těchto experimentů jsou velice podobné na rozdíl od výsledků pokusů s biomasou *Chlorella* Třeboň autotrofní (rozdíly v růstu měly velký rozptyl v minimech i maximech), u kterých byl časový rozdíl nasazení buněk dva měsíce. Nabízí se tedy otázka, zda se na výsledném stimulačním účinku jednotlivých dávek biomasy neprojeví počáteční životaschopnost buněk tkáň, na které pak řasy působí, a zda je potom možné výsledky prováděné na tkáňových kulturách o různé metabolické aktivitě vůbec srovnávat? Meerloo et al. (2011) z tohoto důvodu přikládá velký význam kontrole, bez níž by tento typ testování, tj. MTT test nebylo možné vyhodnotit. Kontrolní tkáň nám vždy dala určitou hodnotu metabolismu, resp. míru absorbance (viz podkapitola 3.3.3. a 3.3.4.), ke které se pak vztahovaly hodnoty životnosti buněk ovlivněných řasami. Míra účinku jednotlivých typů biomasy lze proto ve všech provedených pokusech porovnávat bez ohledu na rozdíly ve vitalitě použitých buněk tkáňových kultur.

Význam použití kontroly

S rozdíly metabolické aktivity fibroblastů použitých v jednotlivých pokusech souvisí i fluktuace, které se vyskytly i v rámci jedné kultivační destičky, kde byla každá biomasa aplikována ve třech opakováních. Jako příklad lze uvést prášek *Chlorella* Třeboň heterotrofní, u kterého se stimulace růstu po dvou dnech při koncentracích 90 a 100% (které jsou prakticky stejné) lišila o 11%. Dalším příkladem jsou tablety *Chlorella* Centrum – po sedmi dnech měla nejlepší efekt 100% dávka, poté logicky o něco menší účinek se projevil při 500%. Prostřední koncentrace (200%) však podle výsledných hodnot MTT testu zapůsobila na buňky inhibičně. Tyto fluktuace pocházejí z toho, že pokaždé jsou tkáňové kultury sázeny a sklizeny v trochu jiný čas a i v rámci jednoho opakování na destičce mají pokaždé trochu jinou úroveň metabolismu – jsou zkrátka živé. V úvahu je potřeba brát i lidský faktor, resp. MTT do jednotlivých jamek destičky nemohlo být nikdy přidáno ve stejnou chvíli. Vždy na některé buňky působilo déle než na druhé, což se projevilo v různých hodnotách naměřené absorbance (čím déle působilo, tím byla absorbance vyšší). Morgan (1998) uvádí několik faktorů, které ovlivňují míru produkce formazanu, na který je MTT redukován, a u kterého je absorbance měřena. Důležitý je např. typ rozpouštědla, díky kterému se krystalky

formazanu z buněk uvolní a jako jeden z vyhovujících uvádí Triton X-100 (použitý v našich experimentech). Podle Morgana (1998) roste produkce formazanu lineárně s dobou působení rozpouštědla od 30 minut (jako v našem případě) až do 2 hodin a závisí i na počtu buněk – jako ideální rozmezí udává 200- 50 000 buněk/jamka. Což opět potvrzuje správnost postupu v našich experimentech, ve kterých bylo nasazováno 5000 a 10 000 buněk/jamka.

CGF jako zajímavý přírodní produkt pro další výzkum a zdravou výživu

Velkým otazníkem jsou negativní výsledky působení CGF na růst tkáně po dvou dnech (takřka ve všech dávkách) při současně největším zaznamenaném pozitivním účinku ze všech typů řasové biomasy po 7 denní inkubaci a to při 200% koncentraci tohoto extraktu. Jako jeden z přijatelných důvodů se nabízí malý počet opakování (pouze 2 destičky pro každý typ experimentu), která navíc proběhla v jednom týdnu ve dnech za sebou, např. v jeden den byly nasazeny fibroblasty pro 2 i 7 denní pokus, druhý den v rámci opakování to samé. Použité fibroblasty pocházející z jedné pasáže mohly být v horší kondici, což by podhodnotilo výsledný pozitivní efekt CGF. Tuto možnost jsme ale vyvrátili, viz 4. odstavec výše.

Ve srovnání s výsledky s různou biomasou řasy *Chlorella* je u CGF patrné, že se požadovaného stimulačního efektu dosáhne až při vyšších dávkách, tzn., že by doporučené dávkování tohoto extraktu mohlo být vyšší než u samotného doplňku stravy řasy *Chlorella*. Vyvozování nějakých závěrů je však na tomto místě předčasné. Je zde velká nutnost ověření všech získaných poznatků na dalších pokusech, případně by bylo vhodné vyzkoušet i jiné způsoby testování – např. dlouhodobější experimenty, opakované přidávání extraktu k buňkám, aplikace vyšších dávek apod. Šejnohová (2012) poukazuje na skutečnost, že doposud neexistují detailní údaje o jednotlivých účinných látkách tohoto konglomerátu. Budoucí studie by se měly zaměřit také přímo na mechanismus, díky kterému je CGF schopen tak výrazné stimulace růstu, jakého jsme byli v našich experimentech svědky. Není v něm např. obsažen chlorofyl, který má podle Lee & Rosenbaum (1987) u řasy *Chlorella* jednu z hlavních rolí stimulace buněčného růstu. Je tedy zřejmé, že pro budoucí praktické využití v oboru zdravé výživy tzv. zelených potravin je CGF pravděpodobně jeden z nejzajímavějších.

Eustigmatos

Součástí předložené práce byl také první screening pozitivních účinků hnědé řasy *Eustigmatos/Vischeria* v podobě dvoudenního experimentu s biomasou ze dvou vytipovaných kmenů. Naše prvotní výsledky naznačují, že ani jeden z těchto kmenů nemá přímý efekt na zrychlené dělení buněk tkáně oproti kontrole, jenž byl zde prokázán v případě aplikace řasy *Chlorella*. Důvodem může být např. nedostatečná desintegrace buněčné stěny řas nebo jiný princip, který by mohl snižovat efekt bioaktivních látek. Otázkou také je, zda polynenasycené mastné kyseliny (PUFA), jenž má *Eustigmatos/Vischeria* obsahovat ve velkém množství, jsou schopny přímo ovlivňovat růst tkáně, jelikož Rose & Connolly (1990) a Schley et al.(2007) potvrzují, že EPA a DHA inhibují růst nádorových buněk prsu. Jako vhodnější indikátor, na kterém by šlo hodnotit pozitivní efekt konglomerátů látek rodu *Eustigmatos* se proto nabízí buňky nádorové tkáně, ačkoliv právě tento typ tkáňových kultur nebyl pro naše experimenty zvolen z důvodu předpokládané stimulace buněčného růstu jak řasy *Chlorella* tak *Eustigmatos/Vischeria*. Zvážit je potřeba také výběr kmenů, jelikož Koudelková (2013) při sledování pěti izolátů zjistila, že řasy produkovaly PUFA v různé míře v závislosti na typu média a kultivačních podmínkách. Jednoduchou příčinou negativního výsledku by také mohly být příliš nízké koncentrace, ve kterých se *Eustigmatos/Vischeria* na tkáňové kultury aplikovaly. Byly odvozeny z doporučené denní dávky doplňku stravy *Chlorella* a je možné, že pro prokázání pozitivního vlivu je toto množství nedostatečné. Podobně jako v případě CGF je pro verifikaci potenciálu využití komplexu rodů *Eustigmatos/Vischeria* ve zdravé výživě nutné ve zkoumání pokračovat.

Konkurenceschopnost doplňků stravy z řas

Poptávka po bioaktivních látkách z řasové biomasy roste úměrně se sílící potřebou nalézt nová alternativní řešení problémů, kterým dnešní společnost čelí – z hlediska výživy a zdravého životního stylu jde především o nedostatek důležitých nutrietů v běžné stravě včetně ovoce a zeleniny, prevence nebo podpora léčby řady nemocí aj. Využití ať už poměrně dobře prozkoumaných skupin řas tak i těch nových (např. CGF a *Eustigmatos/Vischeria*) pro tyto účely přináší oproti doposud hlavním zdrojům nutričně cenných látek řadu výhod ale i úskalí, na která je třeba se v blízké budoucnosti zaměřit. V první řadě jde o získání dostatku exaktních výsledků, jež verifikují pozitivní

účinky bioaktivních látek z řas. Na druhé straně je nutné zdokonalit technologie kultivace pro dosažení maximální produkce a následné extrakce daných látek. S tím úzce souvisí energetická a materiální optimalizace celého provozu, aby byla zajištěna konkurenceschopnost výsledného produktu, tj. doplňku stravy z řas.

Z pohledu stávajícího či potencionálního uživatele řasy *Chlorella* a dalších přírodních doplňků stravy hraje velkou roli také poměr cena vs. dávka vs. výsledný zdravotní efekt, resp., která z dostupných variant tohoto produktu je nejúčinnější a zároveň nejlevnější. Je důležité si také uvědomit, že účinky řasy *Chlorella* na lidský organizmus jsou komplexní a míra pozitivního efektu je velice individuální. Roli hraje mnoho faktorů jako např. množství, délka a pravidelnost užívání, věk, životní styl a užívání léků – je např. známo blokování účinku řasy *Chlorella* při současném užívání vitamínu C (doporučuje se užívat odděleně s minimálně hodinovým odstupem).

6. ZÁVĚR

Práce obsahuje rozsáhlou literární rešerši o řasových biotechnologiích a dosavadních vědeckých znalostech týkajících se taxonomie, obsahových látek a využití rodů *Chlorella* a komplexu rodů *Eustigmatos/Vischeria* ve zdravé výživě. Výsledek rešerše poukazuje na nedostatečnou vědeckou verifikaci pozitivních účinků *Chlorella* na zdraví člověka na úrovni experimentů s tkáňovými kulturami a možnost využití zcela nové řasy *Eustigmatos* ve zdravé výživě pro vysoký obsah nenasycených mastných kyselin, především EPA.

Provedla jsem celkem 31 experimentů ve třech opakováních během 39 dní s aplikací desintegrované řasy *Chlorella* a *Eustigmatos/Vischeria* na tkáňové kultury fibroblastů po dobu dvou a sedmi dnů. Jednalo se o autotrofně a heterotrofně kultivovanou biomasu *Chlorella* od 5 výrobců a konglomerát bioaktivních látek *Chlorella* růstového faktoru (CGF).

Stimulační účinky desintegrované biomasy řasy *Chlorella* na buněčný růst tkání byly pozorovány po dvou i sedmi dnech působení u výrobních společností *Chlorella* Třeboň, *Chlorella* Centrum i Green Ways. Práce potvrzuje, že doporučená denní dávka 5 g/den v doplňcích stravy z řasy *Chlorella* je velice dobře zvolena s maximálním efektem stimulace růstu tkáně. Nejlepší stimulační efekt při této dávce (o 15% vyšší růst než kontrola) vykazovala na fibroblasty po 2 denním experimentu biomasa Třeboňské řasy *Chlorella* získaná autotrofní kultivací na nakloněných plošinách. Velice povzbudivé je hodnocení pokusů s extraktem bioaktivních látek tzv. CGF po 7 dnech, kdy byl pozorován vůbec největší nárůst buněk (o 24%) v dávce 200% tohoto konglomerátu. Před vlastním uvedením produktu CGF (v podobě prášku, tablet aj.) na trh by bylo ale vhodné ověřit tyto nadmíru pozitivní výsledky prostřednictvím dalších pokusů i s využitím jiných metod testování. Velmi dobrý a vzájemně srovnatelný efekt (10-13% nárůst oproti kontrole) měly také doplňky stravy *Chlorella* Centrum a GW v podobě tablet. Výsledky 7 denních experimentů naznačují, že pozitivní účinky řasových preparátů na růst tkáňových kultur jsou prokazatelné a lze je srovnávat až při dlouhodobějším užívání.

Aplikace biomasy hnědé řasy rodu *Eustigmatos/Vischeria* vyžaduje další testování. Pilotní experiment přímou stimulaci buněčného růstu tkáňových kultur neprokázal.

Pozitivní efekt nenasycených mastných kyselin je nutné pravděpodobně testovat na jiném markeru, než je pouhý buněčný růst.

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.
- Andersen R. A. 2004: Biology and systematics of heterokont and haptophyte algae. *American Journal of Botany* 91: 1508-1522.
- Astori G., Vignati F., Bardelli S., Tubio M. & Gola M. 2007: "In vitro" and multicolor phenotypic characterization of cell subpopulations identified in fresh human adipose tissue stromal vascular fraction and the derived mesenchymal stem cells. *Journal of Translational Medicine* 5(55): 1479-5876.
- Atkinson A. W., John P. C. L. & Gunning B. E. S. 1972: Sporopollenin in the cell-wall of *Chlorella* and other Algae: ultrastructure, chemistry, and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* 107: 1-32.
- Atkinson A. W. Jr., John P. C. L. & Gunning B. E. S. 1974: The growth and division of the single mitochondrion and other organelles during the cell cycle of *Chlorella*, studied by quantitative stereology and three dimensional reconstruction. *Protoplasma* 81(1): 77-109.
- Baky H. H., Abd E. & Gamal S. E. B. 2013: Healthy Benefit of Microalgal Bioactive Substances. *Journal of Aquatic Science* 1: 11-22.
- de-Bashan L. E. & Bashan Y. 2010: Immobilized microalgae for removing pollutants: review of practical aspects. *Bioresource Technology* 101: 1611-1627.
- Barsanti L. & Gualtieri P. 2006: *Algae: anatomy, biochemistry and biotechnology*. CRC Press, Italy, pp. 361.
- Batista A. P., Gouveia L., Bandarra N. M., Franco J. M. & Remundo A. 2013: Comparison of microalgal biomass profiles as novel functional ingredient for food products. *Algal Research* 2: 164-173.
- Bedwicke D. & Potter B. A. et al. 1984: *Chlorella: The Emerald Food*. Ronin Publishing, Berkeley, pp. 120.
- Becker E. W. 1994: *Microalgae: Biotechnology and Mikrobiology*. Cambridge University Press, pp. 293.

- Becker E. W. 2004: Microalgae in human and animal nutrition. In: Richmond A. (ed.): *Handbook of Microalgal Culture*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 312-351.
- Belay A., Ota Y., Miyakawa K. & Shimamatsu H. 1993: Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of Applied Phycology* 5: 235-241.
- Bertagnolli B. L. & Nadakavukar J. 1970: An ultrastructural study of pyrenoyds from *Chlorella pyrenoidosa*. *Journal of cell science* 7: 623-630.
- Beyerinck M. W. 1890: Culturversuche mit Zoochlorellen, Lichenengonidien und anderen niederen Algen. *Botanische Zeitung* 47: 725-739, 741-754, 757-768, 781-785.
- Bishop W. M. & Zubeck H. M. 2012: Evaluation of Microalgae for use as Nutraceuticals and Nutritional Supplements. *Journal of Nutrition and Food Science* 2: 147.
- Bock Ch., Krienitz L. & Pröschold T. 2011: Taxonomic reassessment of the genus *Chlorella* (Trebouxiophyceae) using molecular signatures (barcodes), including description of seven new species. *Fottea* 11(2): 293-312.
- Bonaa K. H, Bjerve K. S & Nordoy A. 1992: Habitual fish consumption, plasma phospholipid fatty acids, and serum lipid: the Tromso study. *The American Journal of Clinical Nutrition* 55: 1126-234.
- Borowitzka M. A. 1995: Microalgae as source of pharmaceuticals and other biologically active compounds. *Journal of Applied Algology* 7: 3-15.
- Bošnjaković M. 2013: Biodiesel from Algae. *Journal of Mechanics Engineering and Automation* 3: 179-188.
- Burlew J. S. 1953: *Algal Culture: From Laboratory to Pilot Plant*. Carnegie Institution of Washington, Washington DC, pp. 357.
- Cardozo K. H. M., Guaratini T., Barros M. O., Falcao V. R., Tomon A. P., Lopes N. P., Campos S., Tores M. A., Souza A. O., Colepicolo P. & Pinto E. 2007: Metabolites from algae with economically impact. *Comparative Biochemistry and Fysiology, Part C* 146: 60-78.
- Champenois J., Marfaing H. & Pierre R. 2014: Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *Journal of Applied Phycology* 1-7.

- Chidambara M. K. N., Vanitha A., Rajesha J., Mahadeva S. M., Sowmya P. R. & Ravishankar G. A. 2005: In vivo antioxidant activity of carotenoids from *Dunaliella salina* - a green microalga. *Life Sciences* 76: 1381-1390.
- Chisti Y 2007: Biodiesel from microalgae. *Biotechnology Advances* 25: 294-306.
- Chojnacka K., Chojnacki A. & Górecka H. 2005: Biosorption of Cr^{3+} , Cd^{2+} and Cu^{2+} ions by blue-green algae *Spirulina* sp.: kinetics, equilibrium and the mechanism of the proces. *Chemosphere* 59: 75-84.
- Chu W. L. 2011: Potential applications of antioxidant compounds derived from algae. *Current Topics in Nutraceutical Research* 9 (3): 83-98.
- Chu W. L. 2012: Biotechnological applications of microalgae. *International e-Journal of Science, Medicine & Education* 6: 24-37.
- Cifuentes A. S., Gonzalez M. A., Vargas S., Hoeneisen, M. & Gonzalez N. 2003: Optimization of biomass, total carotenoids and astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* Flotow strain Steptoe (Nevada, USA) under laboratory conditions. *Biological Research* 36(3-4): 343-357.
- Cipro Š. & Groh T. 2014: Tkáňové kultury. *Česko-slovenská patologie* 50(1): 30-32.
- Conti M. E. (ed.) 2008: *Biological Monitoring: Theory & Applications, Bioindicators and Biomarkers Environmental Quality and Human Exposure Assessment*. WIT Press, Southampton, UK, pp. 2-6.
- Darush M. N. & Husainy A. 2011: *Nutritional Supplement Through Gel Suspension Technology: The role of nutritional supplements, and the latest technology of delivery system*. Ra Globalcrest Sdn. Bhd., Malaysia, pp. 9.
- Demirbaş A. 2009: Production of Biodiesel from Algae Oils. *Energy Sources* 31:163-168.
- Ettl H. & Gärtner G. 1995: Sylabus der Boden-, Luft- und Flechtenalgen. In: Procházková K. 2012: *Diverzita a druhový koncept u komplexu Vischeria/Eustigmatos (Eustigmatophyceae)*. Diplomová práce, Karlova univerzita, Praha.
- Ewart H. S., Bloch O., Girouard G. S., Kralovec J., Barrow C. J., Ben-Yehudah G., Suárez E. R. & Rapoport M. J. 2007: Stimulation of cytokine production in human peripheral blood mononuclear cells by an aqueous *Chlorella* extract. *Planta Medica* 73: 762-8.

- Fawley M. W., Fawley K. P. & Owen H. A. 2005: Diversity and ecology of small coccoid green algae from Lake Itasca, Minnesota, USA, including *Meyerella planktonica*, gen. et sp. nov. *Phycologia* 44: 35-48.
- Fawley K. P., Eliáš M., Fawley M. 2014: The diversity and phylogeny of the commercially important algal class Eustigmatophyceae, including the new clade *Goniochloridales*. *Journal of Applied Phycology* 26(4): 1773-1782.
- Fišerová M. 2012: *Ultrastruktura eustigmatofytních řas*. Diplomová práce, Karlova univerzita, Praha.
- Fott B. & Nováková M. 1969: A monograph of the genus *Chlorella*. The freshwater species. In: Fott B. (ed.): *Studies in Phycology*. Schweizerbart'sche, Stuttgart, pp. 10-74.
- Friedl T. 1995: Inferring taxonomic position and testing genus level assignments in coccoid green algae: a phylogenetic analysis of 18S ribosomal RNA sequences from *Dictyochloropsis reticulata* and from members of the genus *Mynnecia* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae cl. nov.). *Journal of Phycology* 31: 632-639.
- Gärtner G., Stoyneva M. P., Uzunov B. A., Mancheva A. D. & Ingolić E. 2012: Ultrastructure of vegetative cells and autospores of an aerophytic strain of *Vischeria stellata* (Chodat ex Poulton) Pascher (Eustigmatophyceae) from Bulgaria. *Fottea* 12: 273-280.
- Gouveia L., Batista A. P., Sousa I., Raymundo A. & Bandarra N. M. 2008: Microalgae in Novel Food Products. In: Papadopoulos K. N. (ed.): *Food Chemistry Research Developments*. Nova Science Publishers, pp. 2-26.
- Grofová Z. 2010: Mastné kyseliny. *Medicína pro praxi* 7(10): 388-390.
- Gross W. & Pulz O. 2004: Valuable products from biotechnology of microalgae. *Journal of Applied Microbiology and Biotechnology* 65: 635-648.
- Guiry M. D. & Guiry G. M. 2014: AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. Dostupné z <http://www.algaebase>. Verze ze 7. 6. 2014.
- Gunning B. E. S. & Steer M. W. 1996: *Plant Cell Biology: Structure and Fiction*. Jones & Bartlett Learning, pp. 120.
- Hallmann A. 2007: Algal Transgenics and Biotechnology. *Transgenic Plant Journal* 1(1): 81-98.

- Han S., Zhang Z. H. & Liu H. Q. 2004: Effects of chlorella growth factor on physiological fiction. *Chinese Journal of Biochemical Pharmaceutics*.
- Hegewald E., Padisák J. & Friedl T. 2007: *Pseudotetraëdriella kamillae*: taxonomy and ecology of a new member of the algal class Eustigmatophyceae (Stramenopiles). *Hydrobiologia* 586: 107-116.
- Hibberd D. J. & Leedale G. F. 1971: A new algal class- the Eustigmatophyceae. *Taxon* 20(4): 523-525.
- Hibberd D. J. 1981: Notes on the taxonomy and nomenclature of the algal classes Eustigmatophyceae and Tribophyceae (synonym Xanthophyceae). *Botanical Journal of the Linnean Society* 82(2): 93-119.
- Hibberd D. J. 1990: Phylum Eustigmatophyta. In: Marguli J., Corliss O., Melkonian M., Chapman D. J. & A McKhann H. I. (eds.): *Handbook of Protoctista*. Jones and Bartlett, London, pp. 326-333.
- Hirata H. 1972: The Growth of *Chlorella* Cells in Culture. *Memoirs of Faculty of Fisheries Kagoshima University* 21(1): 15-21.
- Hoek C. van den, Mann D. G. & Jahns H. M. 1995: *Algae. An Introduction to Phycology*. Cambridge University Press, Cambridge, pp. 623.
- Hoffmann J. P. 1988: Wastewater treatment with suspended and nonsuspended algae. *Journal of Phycology* 34: 757-763.
- Hsu H. Y, Jeyashoke N., Yeh CH. H., Song Y. J., Hua K. F. & Kuoping CH. L. 2010: Immunostimulatory Bioactivity of Algal Polysaccharides from *Chlorella pyrenoidosa* Activates Macrophages via Toll-Like Receptor 4. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 58: 927-936.
- Huss V. A. R., Frank C., Hartmann E. C., Hirmer M., Kloboucek A., Seidel B. M., Wenzeler P. & Kessler E. 1999: Biochemical taxonomy and molecular phylogeny of the genus *Chlorella* sensu lato (Chlorophyta). *Journal of Phycology* 35: 587-598.
- Iwamoto H. 2004: Industrial production of microalgal cell-mass and secondary products – major industrial species *Chlorella*. In: Richmond A (ed.): *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Science, UK, pp. 255-263.
- Janča J. 1991: *Co nám chybí: Kovy, jiné prvky a vitamíny v lidském těle*. Eminent, Praha, pp. 121.

- Jensen B. 1992: *Chlorella*, Jewell of the Far East; A Food Algae for a Nutritionally-Hungry World (The ultimate in nutritional excellence; extending a helping hand for greaer self-help health care and the pursuit of happiness). Bernard Jensen Intl, pp. 93.
- Juárez Á. B., Vélez C. G., Iñiguez A. R., Martínez D. E., Rodríguez M. C., Vigna M. S. & Ríoz de Molina M. C. 2011: A *Parachlorella kessleri* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta) strain from an extremely acidic geothermal pond in Argentina. *Phycologia* 50: 413-421.
- Kadlecová V., Březina V., Drbal K., Grubhoffer L., Mikeš J., Petr J., Polach M. & Prell A. 2012: *Biotechnologická ročenka*. Dostupné z [http// www.gate2biotech.cz/btr-2012/data/report_25.pdf](http://www.gate2biotech.cz/btr-2012/data/report_25.pdf). Verze z 5.11.2013.
- Kalina T & Váňa J. 2005: *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Univerzita Karlova, Nakladatelství Karolinum, Praha, pp. 60-201.
- Kessler E. & Soeder C. J. 1962: Biochemical Contributions to the Taxonomy of the Genus *Chlorella*. *Nature* 194: 1096-1097.
- Kessler E. 1976: Comparative physiology, biochemistry, and taxonomy of *Chlorella* (Chlorophyceae). *Plant Systematics and Evolution* 125: 129-138.
- Kessler E. & Huss V. A. R. 1992: Comparative physiology and biochemistry and taxonomic assignment of the *Chlorella* (Chlorophyceae) strains of the culture collection of the University of Texas at Austin. *Journal of Phycology* 28: 550-553.
- Kojima M., Kasajima T., Imag I., Kobayashi S. Dobashi M. & Lemura T. 1973: A new *Chlorella* polysaccharide and its accelerating effect on the phagocytic activity of the reticuloendothelial system. *Recent Advanced R. E. S. Researche* 13: 11.
- Komárek J. & Fott B. 1983: Chlorophyceae (Grünalgen) Ordnung: Chlorococcales. In: Huber-Pestalozzi, G. (ed.): *Das Fytoplankton des Süßwassers*. 7. Teil, 1. Hälfte. E.Schweizerbart'sche Verlagsbuchahndlung (Nägele u. Obermiller), Stuttgart, Germany, pp. 1-1044.
- Koudelková I. 2013: *Potenciál nových kmenů řas třídy Eustigmatophyceae v průmyslovém využití se zaměřením na zdravou výživu*. Bakalářská práce, Masarykova univerzita, Brno.
- Kralovec J. A., Metera K. L., Kumar J. R., Watson L. V., Girouard G. S., Guan Y., Carr R. I., Barrow C. J. & Ewart H. S. 2007: Immunostimulatory principles from

- Chlorella pyrenoidosa* - Part 1: Isolation and biological assessment in vitro. *Phytomedicine* 14(1): 57-64.
- Krienitz L., Hegewald E. H., Hepp D., Huss V. A. R., Rohr T. & Wolf M. 2004: Phylogenetic relationship of *Chlorella* and *Parachlorella* gen. nov. (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Phycologia* 43: 529-542.
- Lee W. H. & Rosenbaum M. 1987: *Chlorella: the Sun-Powered Super Nutrient and its Beneficial Properties*. Keats Publishing Inc, Connecticut, USA.
- Li Z., Sun M., Li Q., Li A., Zhang Ch. 2012: Profiling of carotenoids in six microalgae (Eustigmatophyceae) and assessment of their β -carotene productions in bubble column photobioreactor. *Biotechnology letters* 34(11): 2049-2053.
- Li-chen W., Ja-an A. H., Ming-Chen S. & In-Wei L. 2005: Antioxidant and Antiproliferative Activities of *Spirulina* and *Chlorella* Water Extracts. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 53: 4207-4212.
- Liu C. P. & Lin L. P. 2005: Morphology and eicosapentaenoic acid production by *Monodus subterraneus* UTEX 151. *Elsevier* 36(6): 545-50.
- Loeblich A. R. & Loeblich L. A. 1978: Division Eustigmatophyta. In: Santos L. M. A. 1990: *Cytology and ultrastructure of Eustigmatophyceae*. Ph. D. Thesis, University of Leeds.
- Lorenz R. T., Cysewski G. R. 2000: Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology* 18: 160-167.
- Lorenzen H. & Ruppel H. G. 1960: Versuche zur Gliederung des Entwicklungsverlaufs der *Chlorella* Zelle. *Planta* 54: 394-403.
- Lukavský J. 2012: *Trachydiscus Minutus*: A New Algal EPA Producer. In: Berger D. & Meyer H. (eds.): *Algae*. Nova Science Publishers, Inc. pp. 77-104.
- Luo W., Pröschold T., Bock C., Krienitz L. 2010: Generic concept in *Chlorella*-related coccoid green algae (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Plant biology* 12(3): 545-53.
- MacArtain P., Gill Ch. I. R., Brooks M., Campbell R., Rowland I. R. P. 2007: Nutritional Value of Edible Seaweeds. *Nutrition Reviews* 65(12): 535-543.
- Marvan P. & Heteša J. 2006: *Metodika odběru a zpracování vzorků fyto-bentosu tekoucích vod*. Výzkumný ústav vodohospodářský T. G. M., Praha, pp. 2-9.

- Massalski A. & Leedale G. F. 1969: Cytology and ultrastructure of the Xantho-phyceae. I. Comparative morphology of the zoospores of *Bumilleria sicula* Borzi and *Tribonema nvulgare* Pascher. *British Phycological Journal* 4: 159-180.
- Mazokopakis E. E., Starakis I. K., Papadomanolaki M. G., Mavroeidi N. G. & Ganotakis E. S. 2014: The hypolipidaemic effects of *Spirulina* (*Arthrospira platensis*) supplementation in a Cretan population: a prospective study. *Journal of the Science of Food and Agrikulture* 94: 432-437.
- Merchant R. E. & 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 in Health and Medicine* 7(3): 79-91.
- Meerloo J., Kaspers G. J. L. & Cloos J. 2011: Cell Sensitivity Assays: The MTT Assay. *Methods in Molecular Biology* 731: 237-245.
- Morgan D. L. M. 1998: Tetrazolium (MTT) Assay for Cellular Viability and Activity. *Methods in Molecular Biology* 79: 179-184.
- Myers J. 1953: Growth characteristics of algae in relation to the problems of mass culture. In: J. S. Burlew (ed.): *Algal culture from laboratory to pilot plant*. Carnegie Institution of Washington, pp. 357.
- Nagano T., Watanabe Y., Honmat T., Suketa Y. & Yamamoto T. 1978: Absorption and Excretion of Cadmium by the Rat Administered Cadmium Containing *Chlorella*. *Eisei Kagaku* 24(4): 182-186.
- Naguib Y. M. 2000: Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry* 48: 1150-1154.
- Naylor R. L. & M. Burke 2005: Aquaculture and ocean resources: Raising tigers of the sea. *Antal Review of Environment and Resources* 30:185-218.
- Necas J. & Bartosikova L. 2013: Carrageenan: a review. *Veterinarni Medicina* 58: 187-205.
- Nemcova Y. & Kalina T. 2000: Cell wall development, microfibril and pyrenoid structure in type strains of *Chlorella vulgaris*, *C. kessleri*, *C. sorokiniana* compared with *C. luteoviridis* (Trebouxiophyceae, Chlorophyta). *Algological Studies* 100: 95-105.

- Neustupa J. & Nemcova Y. 2001: Morphological and Taxonomic Study of Free Terrestrial Eustigmatophycean Species. *Beiheft* 123: 373-386.
- Neustupa J., Němcová Y., Eliaš M. & Škaloud P. 2009: *Kalinella bambusicola* gen. et sp. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel coccoid *Chlorella* – like subaerial alga from Southeast Asia. *Phycological Research* 57: 159-169.
- Neustupa J., Němcová Y., Veselá J., Steinová J. & Škaloud P. 2013: *Parachloroidium* gen. nov. (Trebouxiophyceae, Chlorophyta), a novel genus of coccoid green algae from subaerial corticolous biofilms. *Phycologia* 52: 411-421.
- Northcote D. H., Goulding K. J. & Horne R. W. 1958: The chemical composition and structure of the cell wall of *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochemical Journal* 70(3): 391-397.
- Ouhtit A., Ismail M. F., Othman A., Fernando A., Abdraboh M. E., El-Kott A. F., Azab Y. A., Abdeen S. H., Gaur R. L., Gupta I., Shanmuganathan S., Al-Farsi Y. M., Al-Riyami H. & Raj M. H. 2014: Chemoprevention of Rat Mammary Carcinogenesis by *Spirulina*. *The American Journal of Patology* 184: 296-303.
- Ötleş S. & Pire R. 2001: Fatty acid composition of *Chlorella* and *Spirulina* Microalgae Species. *Journal of AOAC International* 84: 1708-1714.
- Pal D., Khozin-Goldberg I., Didi-Cohen S., Solovchenko A., Batushansky A., Kaye Y., Sikron N., Samani T., Fait A. & Boussiba S. 2013: Growth, lipid production and metabolic adjustments in the euryhaline eustigmatophyte *Nannochloropsis oceanica* CCALA 804 in response to osmotic downshift. *Applied Mikrobiology and Biotechnology* 97: 8291-8306.
- Parka J. B. K., Craggs R. J. & Shilton A. N. 2011: Wastewater treatment high rate algal ponds for biofuel production. *Bioresource Technology* 102: 35-42.
- Pascher A. 1915: Die Süßwasser-Flora Deutschlands, Österreichs und der Schweiz. Heft 5. Chlorophyceae II. Jena: Gustav Fischer.
- Pitchford P. 2003: *Healing with Whole Foods: Asian Traditions and Modern Nutrition*. North Atlantic Books, pp. 753.
- Posten C. & Walter C. (eds.) 2012: *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*. Walter de Gruyter, pp. 319.
- Prockop D. J. 1997: Marrow Stromal Cells as Stem Cells for Nonhematopoietic Tissues. *Science* 276(5309): 71-74.

- Procházková K. 2012: Diverzita a druhový koncept u komplexu *Vischeria/Eustigmatos* (*Eustigmatophyceae*). Diplomová práce, Karlova univerzita. Praha.
- Prokeš B., Nečas J., Rydlo O., Balák K., Drnek F. et al. 1976: Příprava a použití řasových preparátů ve farmacii, lékařské a veterinární praxi. Mikrobiologický ústav ČSAV, Biotechnologická laboratoř Třeboň, zpráva za rok 1975.
- Pröschold T., Bock C., Luo W. & Krienitz L. 2010: Polyphyletic distribution of bristle formation in *Chlorellaceae*: *Micractinium*, *Diacanthos*, *Didymogenes* and *Hegewaldia* gen. nov. (*Trebouxiophyceae*, *Chlorophyta*). *Phycological Research* 58: 1–8.
- Ralph W. M. 1992: Cancer Therapy: The Independent Consumer's Guide to Non-toxic Treatment & Preventiv. *Equinox Press* 523: 203-204.
- Rose D. P. & Connolly J. M. 1990: Effects of Fatty Acids and Inhibitors of Eicosanoid Synthesis on the Growth of a Human Breast Cancer Cell Line in Culture. *Cancer Research* 50: 7139-7144.
- Ruxton C. H. S., Reed S. C., Simpson M. J. A. & Millington K. J. 2004: The health benefits of omega-3 polyunsaturated fatty acids: a review of the evidence. *Journal of Human Nutrition and Dietetics* 17: 449–459.
- Řezanka T., Lukavský J., Nedbalová L. & Sigler K. 2011: Effect of nitrogen and phosphorus starvation on the polyunsaturated triacylglycerol composition, including positional isomer distribution, in the alga *Trachydiscus minutus*. *Phytochemistry* 72: 2342-2351.
- Sakthivel R., Elumalai S. & Arif M. 2011: Microalgae lipid research, past, present: A critical review for biodiesel production, in the future. *Journal of Experimental Sciences* 2(10): 29-49.
- Sansawa H., Takahashi M., Tsuchikura S. & Endo H. 2006: Effect of *Chlorella* and its fractions on blood pressure, cerebral stroke lesions, and life-span in stroke-prone spontaneously hypertensive rats. *Journal of Nutritional Science and Vitaminology* 52: 457-66.
- Santos L. M. A. 1996: The Eustigmatophyceae: Actual knowledge and research perspectives. In: Prasad A. K. S. K., Nienow J. & Rao V. N. R. (eds.): Contributions in Phycology. *Nova Hedwigia* 112: 391- 405.

- Sastre R. R. 2012: Product from microalgae: An overview In: Posten C. & Walter Ch.: *Microalgal Biotechnology: Integration and Economy*. Walter de Gruyter, pp. 13-21.
- Schley P. D., Brindley D. N. & Field C. J. 2007: (n-3) PUFA alter raft lipid composition and decrease epidermal growth factor receptor levels in lipid rafts of human breast cancer cells. *Journal of Nutrition* 137(3) 548–553.
- Shabana K. A. & Arabi M. S. 2012: *Spirulina* - an overview. *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences* 4 (3): 9-15.
- Shaish A., Harari A., Kamari Y., Cohen H., Schonfeld G. & Harats D. 2009: Application of *Dunaliella* in atherosclerosis. In: Ben-Amotz A., Polle J. E. W. & Rao D. V. S. (eds.): *The alga Dunaliella: biodiversity, physiology, genomics and biotechnology*. Jersey Science Publishers, USA, pp. 475-494.
- Sharp G., Semple R., Wilson M., Vandermuelen H. & Rowland B. 2008: *A survey of the distribution and abundance of Irish Moss (Chondrus erispus) on the south shore of Nova Scotia*. Port Medway, Shelburne Co. to Pennant Point, Halifax Co. Cano Manuser.
- Sheehan J., Dunahay T., Benemann & J. Roessler P. 1998. *A Look Back at the U. S. Department of Energy's Aquatic Species Program - Biodiesel from Algae*. National Renewable Energy Laboratory, USA, pp. 328.
- Shihira I. & Krauss R. W. 1965: *Chlorella. Physiology and taxonomy of forty-one isolates*. University of Maryland, College Park, pp. 1-97.
- Shrift A. & Sproul M. 1963: Sulfur Nutrition and the Taxonomy of *Chlorella*. *Phycologia* 3: 85-100.
- Skulberg O. M. 2004: Bioactive chemicals in microalgae. In: Richmond A. (ed.): *Handbook of microalgal culture: biotechnology and applied phycology*. Blackwell Publishing Ltd., Oxford, pp. 485-512.
- Song T., Mårtensson L., Eriksson T., Zheng W. & Rasmussen U. 2005: Biodiversity and seasonal variation of the cyanobacterial assemblage in a rice paddy field in Fujian, China. *The Federation of European Materials Societies Microbiology Ecology* 54: 131-140.
- Spolaore P., Joannis-Cassan C., Duran E. & Isambert A. 2006: Commercial applications of Microalgae- review. *Journal of Bioscience and Bioengineering* 101: 87-96.

- Steenblock D. 1987: *Chlorella: Natural Medicinal Algae*. Aging Research Institute, CA USA.
- Sukenik A. 1999: Production of eicosapentaenoic acid by the marine eustigmatophyte *Nannochloropsis*. In: Z. Cohen: *Chemicals from microalgae*. CRC Press, Izrael, pp. 41-52.
- Šejnohová L. 2012: *Bioaktivní látky růstového faktoru řasy Chlorella (CGF) – ověřená technologie nízkonákladové výroby garantující imunostimulační a růstové účinky pro humánní a veterinární aplikace*. Veřejná soutěž ve výzkumu, vývoji a inovacích vyhlášená v roce 2012, program ALFA - 3. výzva.
- Tamiya H. 1957: Mass culture of algae. *Annual Review of Plant Biology* 8: 309-334.
- Trzcińska M. & Panik-Skowrońska B. 2013: Differences in Zn- and Pb-resistance of two ecotypes of microalga *Eustigmatos* sp. inhabiting metal loaded calamine mine spoils. *Journal of Applied Phycology* 25: 277-284.
- Trzcińska M., Panik-Skowrońska B., Krokowski D. & Watanabe S. 2014: Genetic and morphological characteristics of two ecotypes of *Eustigmatos calaminaris* sp. nov. (Eustigmatophyceae) inhabiting Zn- and Pb- loaded calamine mine spoils. *Fottea* 14(1): 1-13.
- Tvrzicka E., Kremmyda L., 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* 155(2): 117-30.
- Tympl R. 1985: Možnosti využití zelených řas typu *Chlorella* při léčení některých revmatických onemocnění, Československé státní lázně Třeboň; III. interní klinika fakultní nemocnice Olomouc; ČSAV - Mikrobiologický ústav, oddělení autotrofních mikroorganismů Třeboň, závěrečná zpráva za rok 1984.
- Veselá J., Škaloud P., Urbánková P., Škaloudová M. & Kalina T. 2011: The CAUP image database. *Fottea* 11: 313-316.
- Volkman J. K., Barrett S. M. & Blackburn S. I. 1999a: Fatty acids and hydroxy fatty acids in three species of freshwater eustigmatophytes. *Journal of Phycology* 35: 1005-1012.

- Volkman J. K., Barrett S. M. & Blackburn S. I. 1999b: Eustigmatophyte microalgae are potential sources of C29 sterols, C22-C28 n-alcohols and C28-C32 n-alkyl diols in freshwater environments. *Organic Geochemistry* 30: 307-318.
- Wang L., Min M., Li Y., Chen P., Chen Y., Liu Y., Wang Y. & Ruan R. 2010: Cultivation of Green Algae *Chlorella* sp. in Different Wastewaters from Municipal Wastewater Treatment Plant. *Applied biochemistry and Biotechnology* 162: 1174-1186.
- Wen Z. Y. & Chen F. 2003: Heterotrophic production of eicosapentaenoic acid by microalgae. *Biotechnology advances* 21: 273-294.
- Whittle S. J. & Casselton P. J. 1975: The chloroplast pigments of the algal classes Eustigmatophyceae and Xanthophyceae. I. Eustigmatophyceae. *British Phycological Journal* 10: 179-191.
- Williams A., Pryor B. S., Wilhelm S., Cheryl L. & Rock R. D. 2000: β -Carotene from biochemistry to clinical trials. *Nutrition Reviews* 1: 39-53.
- Yamagishi Y. et al. 1961: School children's growth and the value of chlorophyll. In: Komiyama K., Hirokawa Y. & Macota T. 1986: *Chlorella* in cancer therapy. *Chemotherapy* 34 (1986): 302-307.
- Yamamoto M., Kurihara I. & Kawano S. 2005: Late type of daughter cell wall synthesis in one of the Chlorellaceae, *Parachlorella kessleri* (Chlorophyta, Trebouxiophyceae). *Planta* 221: 766-775.
- Yasukawa K., Akihisa T., Kanno H., Kaminaga T., Izumida M., Sakoh T., Tamura T. & Takido M. 1996: Inhibitory effects of sterols isolated from *Chlorella vulgaris* on 12-0-tetradecanoylphorbol-13-acetate-induced inflammation and tumor promotion in mouse skin. *Biological and Pharmaceutical Bulletin* 19(4): 573-6.
- Zalabák V., Prokeš B., Podojil M., Nečas J., Zahradník J. et al. 1975: Příprava a použití řasových preparátů ve farmacii, lékařské a veterinární praxi, Mikrobiologický ústav ČSAV, Biotechnologická laboratoř Třeboň, zpráva za rok 1974.
- Zhang J., Wan L., Xia S., Li A. & Zhang C. 2012: Morphological and spectrometric analyses of lipids accumulation in a novel oleaginous microalga, *Eustigmatos* cf. *polyphem* (Eustigmatophyceae). *Bioprocess and biosystems engineering* 36(8):1125-1130.

Internetové zdroje:

<http://ftp.alga.cz/cs/kultivace-chlorella.html>

<http://www.alga.cz/c-75-opatovicky-mlyn-.html>

<http://www.alga.cz/c-35-vyzkum.html>

<http://www.awashopbrno.cz/news/srovnani-produktu-chlorella-v-cr>
botany.natur.cuni.cz/algo/database/node/110 (UK Praha)

https://en.wikipedia.org/wiki/MTT_assay

<http://www.zelenyobchod.cz/products/jecmen-fresh-mlady-jecmen/>