

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta

Bakalářská práce

2012

Jitka Šítalová

Jihočeská univerzita v Českých Budějovicích
Přírodovědecká fakulta



Srovnání metod kvantifikace množství škrobu a
olejů v řasové kultuře *Chlamydomonas reinhardtii*

Bakalářská práce

Jitka Šítalová

Školitelka: RNDr. Kateřina Bišová, Ph.D.

České Budějovice 2012

Šítalová, J., 2012: Srovnání metod kvantifikace množství škrobu a olejů v řasové kultuře *Chlamydomonas reinhardtii*. [Comparison of methods for quantifying the amount of starch and oil in algal culture of *Chlamydomonas reinhardtii*. Bc. Thesis, in Czech], - p. 26, Faculty of Science, University of South Bohemia, České Budějovice, Czech Republic.

Anotace:

The aim this work is comparison of methods for quantifying the amount of starch and oil in algal culture of *Chlamydomonas reinhardtii*. This work includes description of gravimetric and fluorometric method for quantifying the amount of oil, spectrophotometric and colorimetric method for quantifying the amount of starch.

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

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

České Budějovice, 2012

.....

Poděkování

Děkuji vedoucí bakalářské práce RNDr. Kateřině Bišové, Ph.D., která mi byla po celou dobu nápomocna, za její ochotu, čas a trpělivost, za cenné rady a metodické vedení práce. Děkuji Heleně Vondrkové a Haně Brabcové za trpělivost, péči, klíčovou pomoc a vytváření vlídné atmosféry a zázemí. Děkuji RNDr. Vilému Zachlederovi, CSc. za podporu a rady.

Cíle práce

Cílem práce bylo porovnat klasické metody kvantifikování obsahu škrobu a olejů v řasových buňkách s metodami, které dosud nebyly označeny za přesné a adekvátní metodám klasickým, a které by mohly usnadnit stanovování škrobu a olejů v řasových kulturách pěstovaných za účelem výroby biopaliva.

OBSAH

1. ÚVOD.....	1
1.1. Biopaliva.....	1
1.2 Chlamydomonas reinhardtii jako modelový organismus	1
2. TEORETICKÝ ÚVOD.....	2
2.1 Chlamydomonas reinhardtii	2
2.1.1 Morfologie	2
2.1.2 Buněčný cyklus	3
2.2 Lipidy	4
2.2.1 Lipidy a Chlamydomonas reinhardtii	4
2.2.2 Zvyšování obsahu lipidů v biomase	5
2.2.3 Metody stanovování lipidů	6
2.3. Škrob.....	7
2.3.1. Škrob u rostlin	7
2.3.2 Zvyšování škrobu v kultuře	8
2.3.3 Stanovování škrobu	8
3. MATERIÁL A METODY.....	9
3.1 Chemikálie a zařízení	9
3.2. Kultivace.....	10
3.2.1 Kmen	10
3.2.2 Kultivační média	10
3.2.3. Kultivační podmínky a systém	15
3.3. Analýzy.....	16
3.3.1 Počet a velikost buněk	16
3.3.2 Analýzy obsahu olejů	17
3.3.3 Analýzy obsahu škrobu	17
4. VÝSLEDKY.....	18
4.1 Výsledky analýzy obsahu škrobu	19
4.2 Výsledky analýzy obsahu olejů	23
5. DISKUSE	28
5.1 Vliv kultivačních podmínek na obsah škrobu a olejů v řasových buňkách.....	28
5.2 Srovnání metod pro stanovení škrobu	29
5.3 Srovnání metod pro stanovení olejů	30
6. POUŽITÁ LITERATURA A CITACE.....	31

1. ÚVOD

1.1. Biopaliva

Klimatické změny, problém globálního oteplování, spalování fosilních zdrojů a stále rostoucí cena pohonných hmot, to jsou hlavní hnací síly vývoje obnovitelných zdrojů, tj. zdrojů, které mohou omezit produkci skleníkových plynů. Bionafta je netoxické kompletně biodegradovatelné palivo se sníženými emisemi síry. Toto palivo je definováno jako monoalkylové estery dlouhých řetězců mastných kyselin, nejběžněji používané jsou methyl estery mastných kyselin¹, které se dají získat z kapiček triacylglycerolů transesterifikací a glycerolýzou. Biopaliva jsou v současné době vyráběna z jedlých plodin jako je cukrová řepa, cukrová třtina nebo sójové boby². Užívání suchozemských plodin ale vyvolává spor, kvůli dopadu na potravinový trh, využívání orné půdy a pitné vody a odlesňování³. Není tedy překvapující, že vzrůstá zájem o produkci biopaliv z biomasy zelených řas, tedy mikroorganismů, které využívají sluneční záření k fixaci uhlíku a syntéze lipidů. Řasová biomasa je při standardních růstových podmínkách tvořena proteiny, sacharidy v buněčné stěně a membránovými lipidy². Při stresových podmínkách dochází ke tvorbě energetických zásob - k akumulaci škrobu a lipidů (olejů). Ovšem i získávání olejů a škrobu z řasových kultur je náročné. Za prvé, kvůli možnému napadení kultur bakteriemi a viry. Za druhé, náklady na řasové kultivace, sklizení biomasy a extrakci olejů výrazně přispívají k výsledné ceně. A za třetí, akumulace olejů vyžaduje fázi nedostatku živin, což ale snižuje výslednou produktivitu systému². Aby bylo možné komerčně získávat oleje a škrob je nutné, izolovat řasové kmeny, které budou produkovat velké množství žádaných olejů a škrobu a objasnit jejich životní cyklus.

1.2 *Chlamydomonas reinhardtii* jako modelový organismus

Jednobuněčná zelená řasa *Chlamydomonas reinhardtii* je široce prostudovaný modelový organismus pro studium mnoha biologických funkcí, včetně fotosyntézy^{4,5} a škrobového metabolismu^{5,6}. *Chlamydomonas reinhardtii* je pro

stanovování škrobů a olejů vhodným modelovým organismem, celý její genom je osekvenován, ve stresových podmínkách vytváří velké zásoby škrobu, kromě toho byla při nedostatku dusíku pozorována akumulace intracelulárních olejových kapek⁵. Syntéza škrobu je tu tohoto organismu velmi dobře prostudována díky izolaci několika mutantů s menším obsahem škrobu⁵.

2. TEORETICKÝ ÚVOD

2.1 *Chlamydomonas reinhardtii*

Rod *Chlamydomonas* (z řečtiny: *chlamys*, plášť; *monas*, osamělý) byl pojmenován C. G. Ehrenbergem v roce 1833 a pravděpodobně odpovídá flagelátům popsaným v roce 1786. Rodina Chlamydomonadaceae zahrnuje okolo 800 druhů ve 33 rodech, ve kterých *Chlamydomonas* představuje zdaleka největší zastoupení. Rod *Chlamydomonas* je celosvětově rozšířen a nachází se v rozmanitých lokalitách mírných, tropických i arktických oblastí. Druhy rodu *Chlamydomonas* byly izolovány ze sladkovodních rybníků a jezer, odpadních nádrží, mořských a brakických vod, ze sněhu, zahrad a zemědělských půd, lesů, pouští, rašelinišť, vlhkých zdí a dokonce i střešních tašek v Indii⁷. *Chlamydomonas* je haploidní zelená řasa, která existuje ve dvou párovacích typech, plus (mt^+) a mínus (mt^-). V přítomnosti světla a (případně nebo) živin buňky rostou a dělí se mechanismem násobného štěpení^{8,9}.

2.1.1 Morfologie

Všechny druhy rodu *Chlamydomonas* sdílejí základní tělesný plán, ale tvar buňky se mezi druhy značně liší, stejně jako tvar a pozice chloroplastu. Většina druhů je oválného nebo elipsoidního tvaru a polární struktury se dvěma bičíky vpředu a jedním bazálním chloroplastem, který může částečně obklopovat jádro. Všechny druhy mají zřetelnou buněčnou stěnu, obvykle úzce natlačenou na plazmatickou membránu. U některých druhů vzniká z vnějšku buněčné stěny slizový obal. Jádro s jadérkem je většinou umístěno

uprostřed buňky. Všechny druhy, kromě několika, mají zabarvenou světločivnou skvrnu, stigma, a jednu nebo častěji dvě stažitelné vakuoly⁷.

Přesto, že první zprávy o buněčné stěně u *Chlamydomonas* tvrdily, že je z celulózy¹⁰, novější studie ukazují, že v buněčné stěně nejsou žádné polysacharidové složky. Buněčná stěna je tvořena glykoproteiny bohatými na aminokyselinu hydroxprolin⁷.

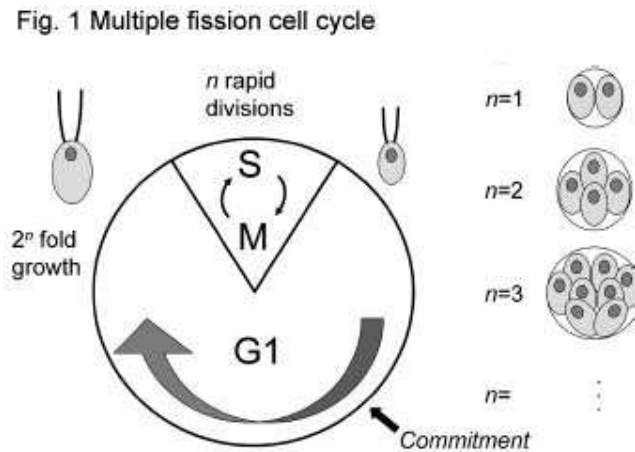
Velikost jádra je 2-4 μm v průměru, jeho dvojitá jaderná membrána je spojitá s endoplazmatickým retikulem a v blízkosti jádra je situován jeden až čtyři Golgiho aparáty⁷.

Mitochondrie zabírá pouze 1-3% objemu buňky, na rozdíl od chloroplastu, který zabírá přibližně 40% objemu¹¹⁻¹⁵. Typická mitochondrie je organela oválného tvaru, veliká 0,2 – 0,3 μm v průřezu, ohraničená dvojitou membránou, která má výrazně zřetelné vnitřní membrány vybíhající do tmavého matrixu¹⁰.

2.1.2 Buněčný cyklus

V průběhu vegetativního růstu se *Chlamydomonas*, jako mnoho jiných řas, dělí pomocí násobného dělení, tj. mechanismu odlišného od standardního buněčného cyklu¹⁶. Tento typ buněčného cyklu (vyobrazeno na obrázku číslo 1) je charakteristický prodlouženou fází G1, během které buňky vyrostou na mnohonásobek své původní velikosti (2^n krát). Na konci fáze G1 mateřské buňky podstoupí n -krát rychlé střídání fáze S a mitózy a vyprodukují 2^n dceřiných buněk¹⁷⁻¹⁹. Buněčný cyklus *Chlamydomonas* je řízen dvěma kontrolními body^{16,20,21}. Buňky, které projdou přes první kontrolní bod, „commitment point“, dokončí minimálně jedno kolo S fáze a mitózy, bez ohledu na to, jestli budou dále růst, např. ve tmě. Naopak buňky, které neprojdou přes kontrolní bod, se vrací do stavu jako ve fázi G0, kdy je zastaven růst nedostatkem světla nebo živin. Po překlenutí kontrolních bodů buňky zůstávají ve stavu podobném v G1 fázi na dalších 5-8 hodin, což předchází iniciaci první S/M fáze. Fáze S a M se střídají velmi rychle bez žádné viditelné mezifáze (3 kola DNA replikace a mitózy probíhají v jedné buňce od jedné do dvou hodin) a jsou hned následovány buněčným dělením.

Počet uskutečněných S/M fází je dán velikostí mateřské buňky a vede ke vzniku dceřiných buněk jednotné velikosti. Za fyziologických podmínek střídání světla (L) a tmy (D) (např. L:D - 12:12 hodin), je buněčný cyklus synchronizovaný tak, že k růstu dochází během periody světla a k buněčnému dělení během krátké periody tmy⁷.



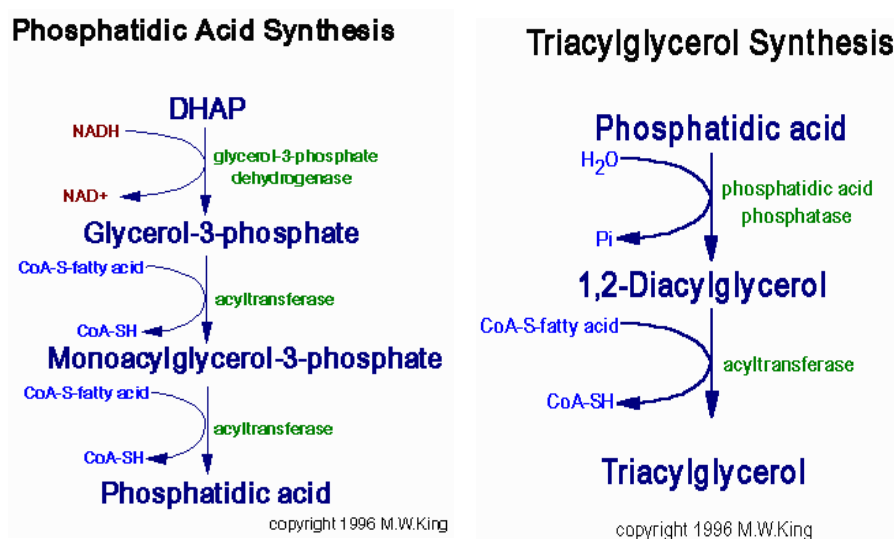
Obr. 1: Schématické znázornění specifického průběhu buněčného cyklu *Chlamydomonas reinhardtii*.(zdroj: ²²)

2.2 Lipidy

2. 2.1 Lipidy a *Chlamydomonas reinhardtii*

V eukaryotických a mnoha prokaryotických systémech slouží lipidy na bázi diacylglycerolu jako hlavní stavební kameny membrán. U rostlin a řas představují bezfosforečné galaktolipidy a sulfolipidy v plastidových membránách značnou část celkového obsahu lipidů^{23, 24}. Membrány a jejich vznik jsou nezbytné pro růst a dělení buněk. Buněčné membrány fungují jako strukturální součásti k vymezení hranic buňky a jednotlivých organel (kompartmentů). Membrány také slouží jako nosné struktury pro různé signální procesy a přímo se účastní základních metabolických procesů. Triacylglyceroly (TAG) představují skupinu glycerolipidů, které nejsou součástí buněčných membrán. TAG jsou neutrální lipidy sloužící hlavně jako zásobárna acylových skupin. U *Chlamydomonas reinhardtii* hrají

TAGy významnou roli, řasy je akumulují jako zásobníky živin, v případě nepříznivých podmínek jsou rezervy využity na podporu buněčného dělení a růst buněk, je jim přisuzována úloha energetické zásobárny pro dozrávání zygoty a pro plavání vegetativních buněk k vodní hladině². Řasy rodu *Chlamydomonas* TAGy kumulují v případě stresových podmínek jako nedostatek živin nebo při vysokém ozáření²⁵. *Chlamydomonas* může také syntetizovat TAGy z lipidů dodaných v médiu¹²⁻¹⁵. Syntéza triacylglycerolů, též lipogeneze, probíhá v cytosolu. Vychází z aktivovaných mastných kyselin v podobě acyl-CoA, které jsou acyltransferasami přenášeny na *sn*-glycerol-3-fosfát (aktivovaný glycerol vznikající buď redukcí dihydroxyacetonfosfátu nebo fosforylací glycerolu); tímto způsobem vzniká fosfatidová kyselina. Odštěpením fosfátu z fosfatidové kyseliny může být další transferázovou reakcí připojen třetí acylový zbytek a vznikne triacylglycerol (*Biochemické pojmy - výkladový slovník*, ISBN 80-7080-551-X) (vyobrazeno na obrázku číslo 2).



Obr.2: Schéma syntézy triacylglycerolů. (Zdroj: ⁴⁰).

2. 2. 2 Zvyšování obsahu lipidů v biomase

Pro podpoření syntézy lipidů je třeba vyvolat nedostatek živin, ten je navozen změnou složení kultivačního média, konkrétně nedostatkem dusíku a síry. Nedostatek dusíku způsobuje snížení funkce fotosyntetického aparátu

a rozpad plastidových membrán. Úroveň akumulace lipidů u *Chlamydomonas* je výrazně závislá na typu kmenu. Po porovnání obsahu olejů u různých mutantů a jejich přímých předků ve dvou různých genetických pozadích se ukázalo, že rozdělení uhlíku mezi dráhou škrobu a olejů u buněk se sníženou dávkou dusíku je velmi komplexní. Nahrazení nedostatku dusíku stresem po zvýšení salinity upozornilo na důležitost kultivačních podmínek a vnímání stresu v budování olejových zásob. Vysoký obsah soli, tedy 1 M roztok, zvýšil u mořské řasy *Dunaliella salina* akumulaci olejů o 65%²⁶. Další možnosti, jak navodit stres a spustit tak akumulaci olejů, je zvýšení pH, světla a extrémní teploty².

2.2.3 Metody stanovování lipidů

Nejběžnější postup je makro – gravimetrická metoda, při které jsou lipidy extrahovány ze vzorku, extrakční roztok se nechá odpařit a získaný materiál je měřen jako obsah lipidů²⁷. Pro stanovení olejů touto metodou je ale nutné velké množství vzorku, což ve spojení s vysokou spotřebou času, činí metodu náročnou. Fluorometrická analýza olejů s použitím barviva Nile Red, kterou vyvinul Greenspan²⁸, je oproti tomu časově a materiálně nenáročná. Ovšem aby tato metoda byla přesná pro stanovení lipidů je potřeba najít optimální spektrum a reakční podmínky pro každý typ vzorků před fluorescenčním měřením.

Spektrofluorometrická metoda

Pro kvalitativní a semi-kvantitativní stanovení olejů se používá barvivo Nile Red, které je intenzivně fluorescenční a při výběru vhodných podmínek může sloužit jako citlivé barvivo i pro detekci cytoplazmatických lipidů. Nile Red je červené benzofenoxazinové barvivo rozpustné v tucích, které má prokázat. Toto barvivo je relativně fotostabilní a vysoce fluorescenční v nepolárním hydrofobním prostředí, méně fluorescenční je ve vodném prostředí²⁹. Když je Nile Red rozpuštěný ve vodném roztoku prochází buněčnou stěnou, uvnitř buněk se barvivo naváže na cytoplazmatické

lipidové kapičky a stane se fluorescentním³⁰. Míra fluorescence pak udává množství přítomných neurálních lipidů.

Makro - gravimetrická metoda

Nejstarší dokumentovaná analytická metoda pro analýzu olejů byla popsána Hazenem, v této metodě se vzorky nechají odpařit, jsou zneutralizovány kyselinou chlorovodíkovou, vysušeny a extrahovány pomocí rozpouštědla. Vzorek je poté vysušen na předem zvážené nádobě a zvážen pro stanovení zbytku³¹. Tento navážený zbytek odpovídá obsahu olejů ve vzorku. Modifikace Hazenovy metody používá Caldwellově extraktoru pro extrahování přebytku po vysoušení vzorků. Zkoumal ethyl ether, petrolether a chloroform jako rozpouštědla a zjistil, že s chloroformem je dosaženo nejvyšší zbytkové hmotnosti³¹.

2.3. Škrob

2.3.1. Škrob u rostlin

Nejrozšířenějšími přírodními látkami jsou sacharidy, stále se vyskytující ve všech rostlinných a živočišných buňkách. V zelených rostlinách vznikají sacharidy účinkem slunečního záření v chloroplastech, kde probíhá fotosyntéza, tj. proces vzniku sacharidů ze vzdušného oxidu uhličitého (CO₂) a vody (H₂O). Fotosyntéza je katalyzována chlorofylem. Složitý průběh fotosyntézy lze vyjádřit jednoduchou stechiometrickou rovnicí: $6 \text{CO}_2 + 6 \text{H}_2\text{O} \rightarrow \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 + 6 \text{O}_2$. Vzniklé molekuly sacharidů se spojují za vzniku složitějších polysacharidů: $n \text{C}_6\text{H}_{12}\text{O}_6 \rightarrow (\text{C}_6\text{H}_{10}\text{O}_5)_n + n-1 \text{H}_2\text{O}$.

Nečastějšími formami polysacharidů v živých buňkách jsou glukany (glukózové jednotky) spojené α -1,4 vazbou. Tyto polymery přecházejí do velice odlišných forem, tedy glykogen a škrob. Škrob je tvořen amylopektinem a amylózou. Amylopektin tvoří několik tisíc glukózových jednotek, amylázu několik set glukózových jednotek, tyto řetězce jsou na hlavní řetězec navázány α -1,6 vazbou. Díky asymetrickému rozložení vazeb v amylopektinu není žádná horní hranice pro velikost jednotlivých molekul a

tak ani pro velikost škrobových zrn. Nerozpustná krystalická struktura škrobu má za následek, že pro mobilizaci glukózových zásob je potřeba enzymů a biochemických kroků. Amylóza je minoritní polysacharidová frakce škrobu a její přítomnost je postradatelná pro granulovou strukturu škrobu.

2.3.2 Zvyšování škrobu v kultuře

Ke zvyšování produkce škrobu je u řas často využíván nedostatek dusíku³²⁻³⁴. Nevýhodou limitace dusíku je, že zatímco buňky úspěšně zvýší obsah škrobu před barvením, jejich životaschopnost klesne během relativně krátkého časového intervalu kvůli vlivům na celkový buněčný metabolismus. Ve snaze pěstovat biomasu bohatou na škrob je nezbytné ji synchronizovat tak, aby byl interval mezi dosažením maximálního obsahu škrobu a buněčnou smrtí, která nastane z důvodu nedostatku makroelementů, co nejdelší^{35,36}.

2.3.3 Stanovování škrobu

Kolorimetrická - Cleggova metoda

Cleggova metoda využívá schopnosti sacharidů, v přítomnosti kyseliny a tepla, vytvořit derivát furfuralu (heterocyklický aldehyd, rozpouštědlo celulózy) a následně reagovat s anthronem za získání charakteristického modro-zeleného zbarvení³⁷

V modifikaci této klasické metody používané v této práci jsou rušivé látky odstraněny pomocí extrakce acetonem, následně jsou třikrát extrahovány pigmenty za použití 80% etanolu a pro úplnou hydrolýzu škrobu je k sedimentu přidávána 30% kyselina chloristá³⁶.

Spektrofotometrická - Lugolova metoda

Metoda je založená na měření intenzity modré barvy komplexu škrob-Lugolův roztok³⁵. Lugolův roztok je vodný roztok jodu (I, Ar 126,90) s

přísadou jodidu draselného (KI, Mr 166,00). Obsahuje 0,90 % až 1,10 % volného jodu a 2,4 % až 2,6 % jodidu draselného (Český lékopis, 1997).

Rychlost absorpce jódu po vyloučení škrobu závisí na charakteru škrobových granulí. Poškozené granule absorbují jód rychleji než nepoškozené³⁷.

3. MATERIÁL A METODY

3.1 Chemikálie a zařízení

Tab.1: Seznam chemikálií a látek používaných pro kultivaci *Chlamydomonas reinhardtii* a následné stanovování škrobu a olejů.

Činidlo	Firma
Aceton p.a.	Lachema
Anthron	Sigma-Aldrich
CaCl ₂ · 2 H ₂ O	Lachema
Chloroform p.a.	Lachema
CoSO ₄ · 7 H ₂ O	Lachema
CuSO ₄ · 5 H ₂ O	Lachema
EDTA Komplex	Lachema
Ethanol	Lachema
Glutaraldehyd	Lachema
H ₃ BO ₃	Lachema
HClO ₄	Penta
Jód	Lachema
Jodid draselný	Lachema
KH ₂ PO ₄	LachNer
(NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	Lachema
MnSO ₄ · 4 H ₂ O	Lachema
MgSO ₄ · 7 H ₂ O	Penta
NaCl	Penta
Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	Lachema
Nile Red	Sigma Aldrich
NH ₄ Cl	LachNer
Thiosíran sodný	Lachema
ZnSO ₄ · 7 H ₂ O	Lachema

Tab. 2: Seznam materiálů a zařízení používaných pro kultivaci *Chlamydomonas reinhardtii* a následnou detekci škrobu a olejů.

Předmět	Specifikace
počítač buněk	Beckmann-Coulter Cell Counter 3
Destičkový spektrofotometr a fluorometr	Tecan Infinite F200
Extrakční kyveta	RK250, 250 ml
Filtrační patrony	Firma Behr
Fluorescenční mikroskop	Olympus BX51
Kultivační válečky	100 ml, 200 ml, 300 ml
Odsávací pumpa	EZ100H
Osvětlení	OSRAM Dulux L, 55W/040
Osvětlení vodní lázně	Osram Dulux 55W/840
Spektrofotometr	Shimadzu UV1800
Sušárna	Memmert
Synchronizační hodiny	Avidsen 230V/50Hz 10/16 A
Vodní lázeň	Julabo SW22
Vortex	Vortex Genie 2
Zpětný chladič	RFK100

3.2. Kultivace

3.2.1 Kmen

Použit byl divoký kmen *Chlamydomonas reinhardtii* cc125. Je to divoký kmen "cc137c", který původně izoloval G.M. Smith, pravděpodobně ekvivalentní ke kmeni 11/32c z Centra kultur řas a protozoí (Cultural Centre of Algae and Protozoa). Kmeny cc124 a cc125 nesou mutace nit1 a nit2, nemohou růst jsou-li jediným zdrojem dusíku (N) dusičnany³⁸.

3.2.2 Kultivační média

V Tabulce 3 je uvedeno složení pro kultivační HS medium (převzato z³⁹, s několika modifikacemi) pro *Chlamydomonas reinhardtii*. Kontrolní kultura

byla pěstována v HS médiu. Pro kultury se zvýšeným obsahem lipidů a škrobů byly použity různé kombinace HS média, tyto kombinace jsou uvedeny v Tabulkách 4, 5, 6 a 7. Každé médium bylo doplněno destilovanou vodou a autoklávováno před přidáním roztoku číslo 5.

Tab.3: Složení a koncentrace látek v kultivačním HS médiu pro *C. reinhardtii*.

Číslo roztoku	Složení	Koncentrace v roztoku	Dávkování roztoku na 1 litr média
1	NH ₄ Cl CaCl ₂ · H ₂ O	50 g l ⁻¹ 2 g l ⁻¹	10 ml
2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O EDTA komplex	20 g l ⁻¹ 1.84 g l ⁻¹	10 ml
3	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.5 g l ⁻¹	0,5 ml
4	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ · 4 H ₂ O CoSO ₄ · 7 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O ZnSO ₄ · 7 H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	3.086 g l ⁻¹ 1.180 g l ⁻¹ 1.404 g l ⁻¹ 1.244 g l ⁻¹ 1.430 g l ⁻¹ 1.840 g l ⁻¹	1 ml
5	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	36 g 500 ml ⁻¹ 67 g 500 ml ⁻¹	10 ml

Tab. 4: Složení a koncentrace látek v médiu se sníženým obsahem všech živin, 1/5HS.

Číslo roztoku	Složení	Koncentrace v roztoku	Dávkování roztoku na 1 litr média
1	NH ₄ Cl CaCl ₂ · H ₂ O	50 g l ⁻¹ 2 g l ⁻¹	2 ml
2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O EDTA komplex	20 g l ⁻¹ 1.84 g l ⁻¹	2 ml
3	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.5 g l ⁻¹	0,1 ml
4	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ · 4 H ₂ O CoSO ₄ · 7 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O ZnSO ₄ · 7 H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	3.086 g l ⁻¹ 1.180 g l ⁻¹ 1.404 g l ⁻¹ 1.244 g l ⁻¹ 1.430 g l ⁻¹ 1.840 g l ⁻¹	0,2 ml
5	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	36 g 500 ml ⁻¹ 67 g 500 ml ⁻¹	2 ml

Tab. 5: Složení a koncentrace látek v médiu bez dusíku, HS-N.

Číslo roztoku	Složení	Koncentrace v roztoku	Dávkování roztoku na 1 litr média
2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O EDTA komplex	20 g l ⁻¹ 1.84 g l ⁻¹	10 ml
3	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.5 g l ⁻¹	0,5 ml
4	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ · 4 H ₂ O CoSO ₄ · 7 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O ZnSO ₄ · 7 H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	3.086 g l ⁻¹ 1.180 g l ⁻¹ 1.404 g l ⁻¹ 1.244 g l ⁻¹ 1.430 g l ⁻¹ 1.840 g l ⁻¹	1 ml
5	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	36 g 500 ml ⁻¹ 67 g 500 ml ⁻¹	10 ml
6	CaCl ₂	7,5 g CaCl ₂ 500 ml ⁻¹ H ₂ O	1,3 ml

Tab. 6: Složení a koncentrace látek v médiu se sníženým obsahem dusíku, HS 1/5N.

Číslo roztoku	Složení	Koncentrace v roztoku	Dávkování roztoku na 1 litr média
2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O EDTA komplex	20 g l ⁻¹ 1.84 g l ⁻¹	10 ml
3	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.5 g l ⁻¹	0,5 ml
4	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ · 4 H ₂ O CoSO ₄ · 7 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O ZnSO ₄ · 7 H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	3.086 g l ⁻¹ 1.180 g l ⁻¹ 1.404 g l ⁻¹ 1.244 g l ⁻¹ 1.430 g l ⁻¹ 1.840 g l ⁻¹	1 ml
5	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	36 g 500 ml ⁻¹ 67 g 500 ml ⁻¹	10 ml
6	CaCl ₂ · 2 H ₂ O	200mg CaCl ₂ · 2 H ₂ O 100 ml ⁻¹ H ₂ O	10 ml
7	NH ₄ Cl	5g NH ₄ Cl 100 ml ⁻¹ H ₂ O	2 ml

Tab. 7: Složení a koncentrace látek v médiu se zvýšeným obsahem soli, HS+NaCl.

Číslo roztoku	Složení	Koncentrace v roztoku	Dávkování roztoku na 1 litr média
1	NH ₄ Cl CaCl ₂ · H ₂ O	50 g l ⁻¹ 2 g l ⁻¹	10 ml
2	MgSO ₄ · 7 H ₂ O EDTA komplex	20 g l ⁻¹ 1.84 g l ⁻¹	10 ml
3	Na ₂ MoO ₄ · 2 H ₂ O	0.5 g l ⁻¹	0,5 ml
4	H ₃ BO ₃ MnSO ₄ · 4 H ₂ O CoSO ₄ · 7 H ₂ O CuSO ₄ · 5 H ₂ O ZnSO ₄ · 7 H ₂ O (NH ₄) ₆ Mo ₇ O ₂₄ · 4 H ₂ O	3.086 g l ⁻¹ 1.180 g l ⁻¹ 1.404 g l ⁻¹ 1.244 g l ⁻¹ 1.430 g l ⁻¹ 1.840 g l ⁻¹	1 ml
5	KH ₂ PO ₄ K ₂ HPO ₄	36 g 500 ml ⁻¹ 67 g 500 ml ⁻¹	10 ml
6	5M NaCl	0,584 g NaCl 100 ml ⁻¹ H ₂ O	20 ml

3.2.3. Kultivační podmínky a systém

Pro pěstování kultury byly pomocí sterilní mikrobiologické kličky odebrány jednotlivé kolonie kmene cc125 rostoucí na HS agaru a přeneseny do kultivačních válečků obsahujících kultivační médium HS. Pěstování kultur probíhalo 3-4 dny ve skleněných válečcích o objemu 300 ml ponořených ve vodní lázni o stálé teplotě 30°C a probublávaných směsí vzduchu a 2% CO₂ (vyobrazeno na obrázku číslo 3). Vodní lázeň byla osvětlována panelem

zářivka OSRAM Dulux L, 55 W/040, dopadající intenzita světla 566,9 $\mu\text{mol.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.



Obr. 3: Kultivační systém pro pěstování řasové kultury.

3.3. Analýzy

3.3.1 Počet a velikost buněk

Pro počítání buněk ve světelném mikroskopu byla použita Bürkerova komůrka s koeficientem $2,5 \cdot 10^4$. Buňky byly předem zafixovány glutaraldehydem.

Velikost buněk a počet buněk byla měřena pomocí přístroje Cell Counter 3, firma Beckmann Coulter. Buňky byly před měřením zafixovány glutaraldehydem.

3.3.2 Analýzy obsahu olejů

Makro – gravimetrická metoda pro stanovení olejů

Z jednotlivých kultur byly odebrány vzorky o objemu 10 ml, odstředěny 5 min při 3000 ot./min. (Hettich, Rotina 380R), supernatant byl odsát a pelet byl zamrazen na -20°C. Při analýze bylo k sedimentu přidáno 0,5 ml skleněných kuliček (0,14 – 0,39 mm) a 0,5 ml fosfátového pufru a následně byl drcen 4 minuty na vortexu na maximální počet otáček. Před samotnou analýzou byl rozdrcený vzorek sušen při 50°C 3 dny. Usušená hmota byla zvážena a v třecí misce rozdrcena na prášek, ten byl přenesen do filtračních patron na Soxhletově extraktoru a byla započata extrakce, která trvala 3-4 hodiny. Extrakt byl přenesen na předem zváženou Petriho misku a sušen při 50°C 30 minut a po ochlazení na pokojovou teplotu zvážen. Obsah olejů byl vypočítán z rozdílů hmotnosti sušiny před extrakcí a po extrakci.

Fluorometrická metoda

Mezibuněčné lipidové kapky byly stanoveny za použití specifického barviva Nile Red (9-dimethylamino-5H-benz{a}phenoxazine-5-on) a podle postupu popsaného již dříve²⁹ jen s drobnými úpravami. Po odběru bylo 100 µl kultury zafixováno glutaraldehydem a obarveno 4 µl barviva Nile Red (0,05 mg/ml). Intenzita fluorescence byla měřena v 96-ti místné mikrotitrační destičce v destičkovém fluorometru (Tecan F200) s excitací 485 nm a emisí 595 nm.

3.3.3 Analýzy obsahu škrobu

Kolorimetrická – Cleggova metoda

Vzorky kultury o objemu 10 ml byly odstředěny 5 min při 3000 ot/min (Hettich, Rotina 380R) a po odsátí supernatantu zmrazeny na -20°C. Při analýze byl vzorek drcen na Vortexu po dobu 5 minut spolu s 250 µl destilované vody a 500 µl skleněných kuliček. Pro odstranění pigmentu byly

vzorky třikrát extrahovány 4 ml 80% ethanolu, vždy 15 minut ve vodní lázni (68°C) a následně odstředěny (5 min, 3000 ot./min., Hettich, Rotina 380R). Pro stanovení škrobu bylo k sedimentu přidáno 3,3 ml 30% HClO₄, promícháno, ponecháno 15 minut v klidu při teplotě 25°C a opět odstředěno. Tato procedura se opakovala celkem třikrát. Sediment byl doplněn 30% HClO₄ na celkový objem 10 ml. Z těchto extraktů bylo odebráno 2,5 ml a ochlazeno v ledové lázni. Po přidání 2,5 ml anthronu (400 ml anthronu v 200 ml 70% H₂SO₄). Tato směs byla vařena ve vodní lázni (100°C) 8 minut, ochlazena na 20°C a následně byla změřena absorbance při 625 nm.

Spektrofotometrická – Lugolova metoda

Z kultury byl odebrán vzorek o objemu 100 µl a bez fixace dále zpracován. Byl přenesen do 96-ti místné mikrotitrační destičky, k němu bylo přidáno 20 µl roztoku Lugolova roztoku (100 µl Lugolu v 80 ml vody) naředěného 1:800. Vzorky byly v destičce inkubovány 20 minut při 37°C a následně byla změřena absorbance při 570 nm.

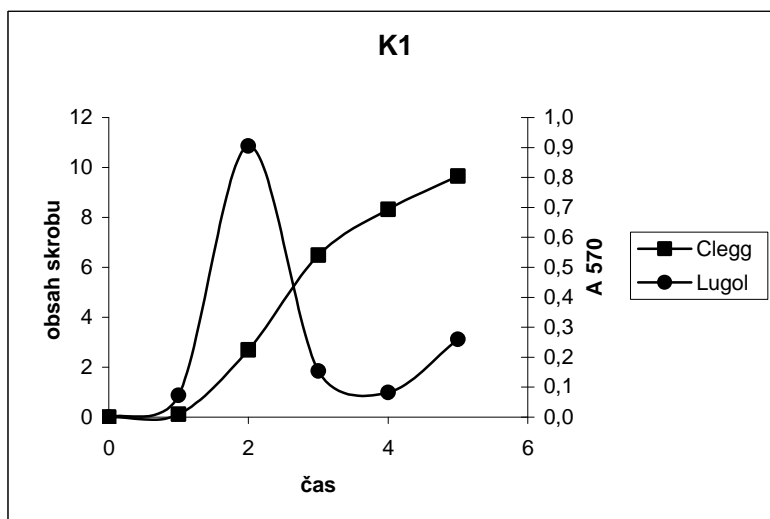
4. VÝSLEDKY

Aby bylo možné porovnávat metody pro stanovení obsahu škrobu a olejů v buňkách, musela jsem vytvořit několik variant buněčných kultur s odlišným obsahem škrobu a olejů. Tohoto různého obsahu jsem docílila různými modifikacemi kultivačního média HS. Použila jsem médium, které bylo naředěno na 1/5 (varianta média HS 1/5), médium neobsahující dusík (varianta média HS-N), médium s koncentrací dusíku sniženou na 1/5 původní koncentrace (varianta média HS 1/5N) a médium se zvýšeným obsahem soli (varianta média HS+NaCl). Pěstovala jsem také kontrolní kulturu s originálním složením HS média (varianta kontrola K). Každou variantu média jsem pěstovala ve dvou opakováních označovaných dále čísly 1 a 2.

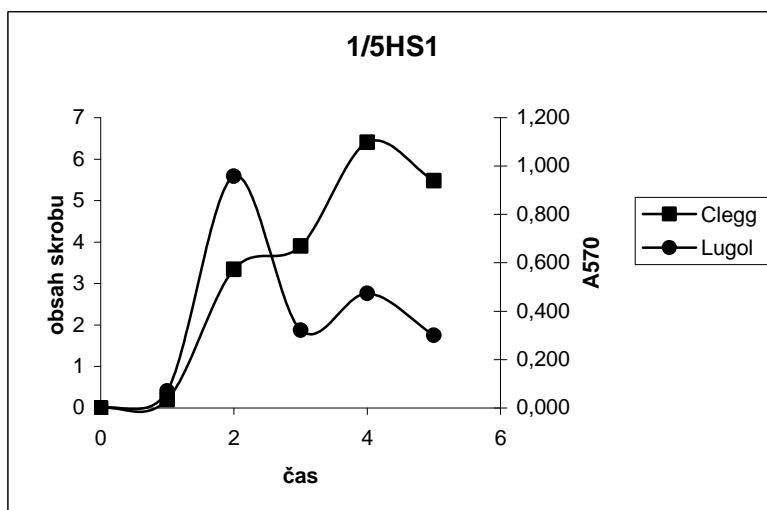
4.1 Výsledky analýzy obsahu škrobu

Pomocí Cleggovy i Lugolovy metody jsem ve všech variantách medií naměřila vzrůstající obsah škrobu s rostoucí dobou kultivace. Nejvyšších hodnot bylo naměřeno Cleggovou metody. Nejvyšší akumulace škrobu v buňkách bylo dosaženo pomocí média se zvýšeným obsahem soli. Naopak k nejmenší akumulaci škrobu došlo v buňkách kultivovaných v bezdusíkatém médiu. Obsah škrobu u kontroly (K) a HS+NaCl varianty narůstal postupně a po dosažení maxima pouze klesal. U variant HS 1/5, HS-N a HS 1/5N obsah škrobu narůstal střídavým růstem a poklesem. Největší nárůst škrobu byl zaznamenán mezi třetím a pátým dnem kultivace, výjimkou jsou pouze varianty HS-N a HS 1/5N, kdy byl nárůst nejvyšší od prvního do třetího dne nebo akumulace škrobu neprobíhala vůbec.

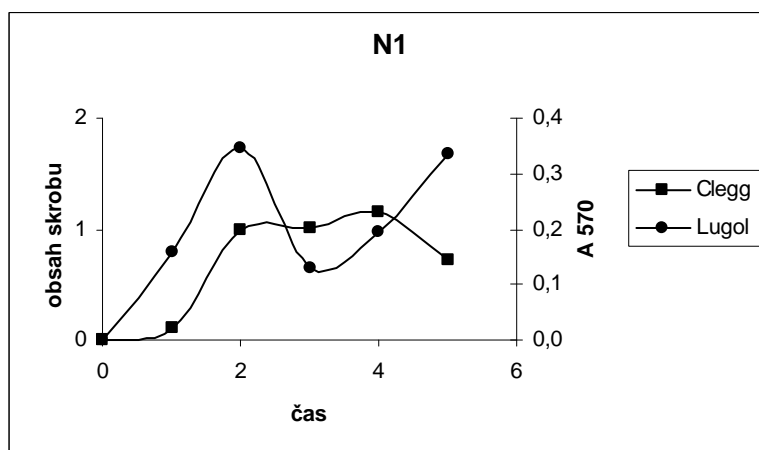
Na obrázcích číslo 4-8 (linie 1) a 9-13 (linie 2) jsou graficky znázorněny výsledky spektrofotometrické metody (Lugol) v porovnání s kolorimetrickou metodou (Clegg) pro obě opakování.



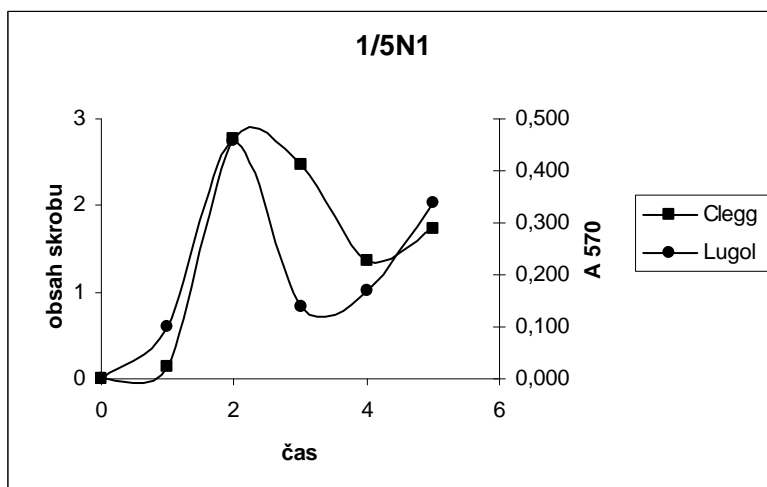
Obr. 4: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v médiu HS (kontrola).



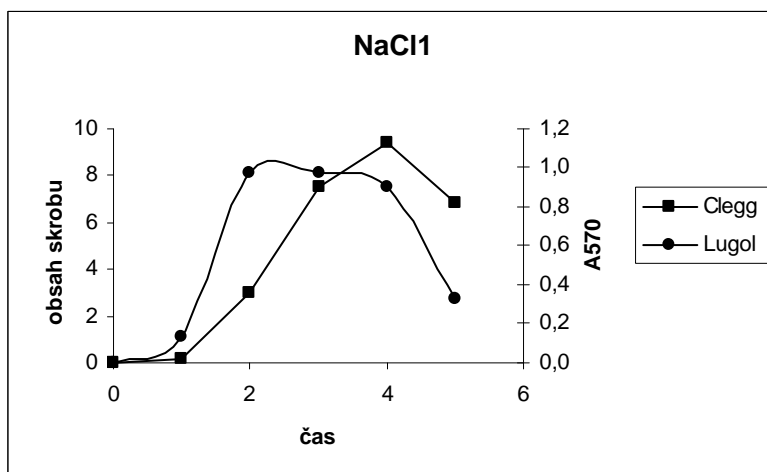
Obr. 5: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v ředěném médiu HS (1/5HS).



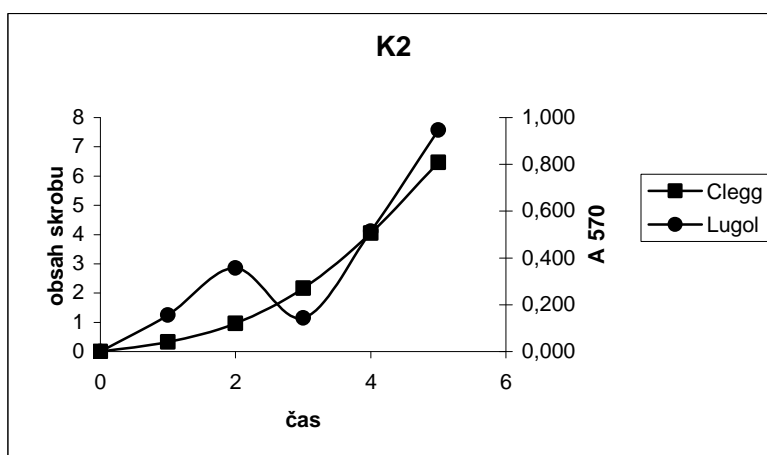
Obr. 6: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v bezdusíkatém médiu (HS-N).



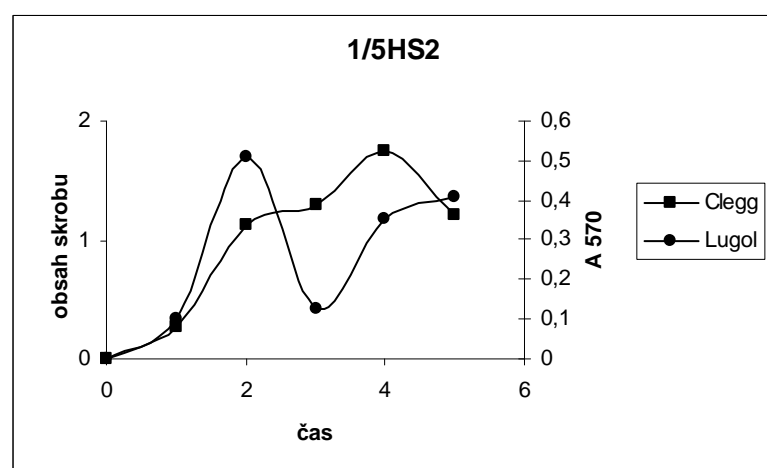
Obr. 7: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v médiu s 1/5 původního obsahu dusíku (HS 1/5N).



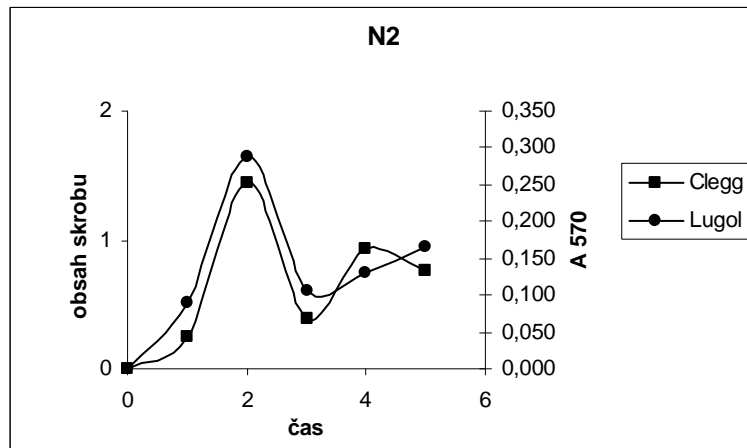
Obr. 8: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v médiu se zvýšeným obsahem soli (HS+NaCl).



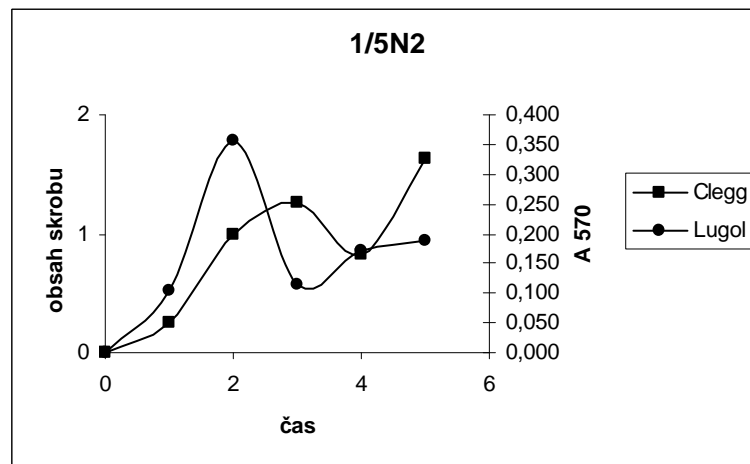
Obr. 9: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v médiu HS (kontrola).



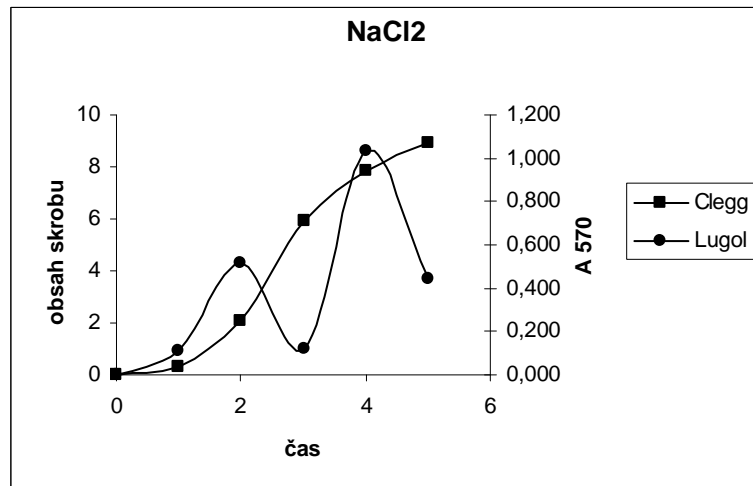
Obr. 10: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v ředěném médiu HS (1/5HS).



Obr. 11: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v bezdusíkatém médiu (HS-N).



Obr. 12: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v médiu s 1/5 původního obsahu dusíku (HS 1/5N).

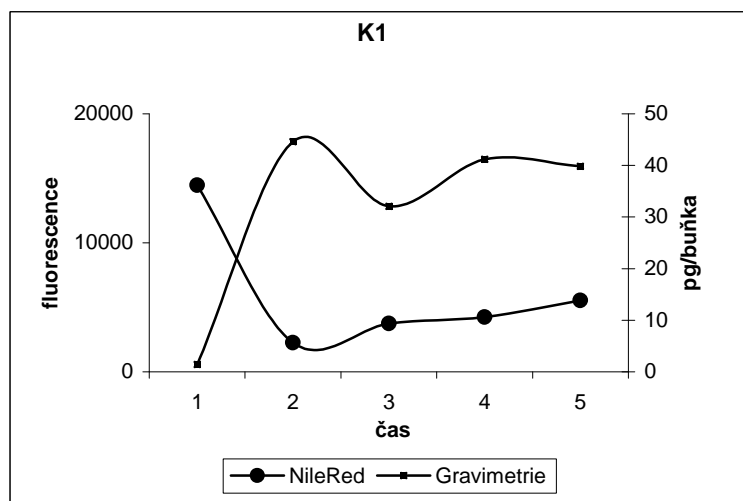


Obr. 13: Srovnání množství škrobu měřeného Cleggovou a Lugolovou metodou u řasové kultury kultivované v médiu se zvýšeným obsahem soli (HS+NaCl).

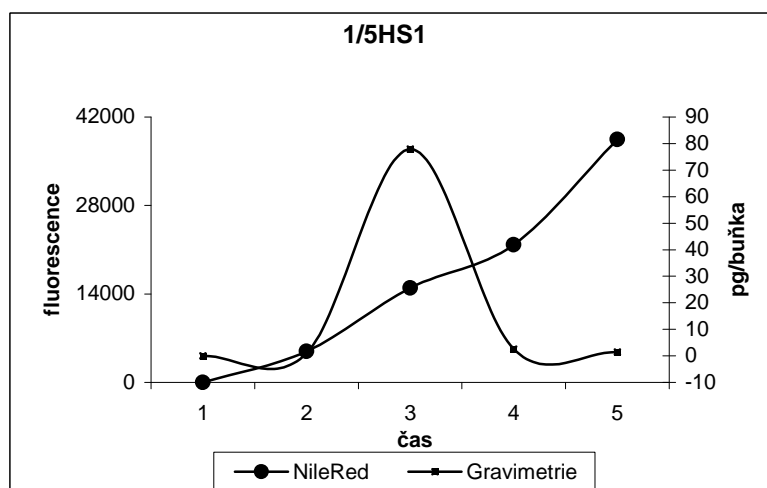
4.2 Výsledky analýzy obsahu olejů

Pomocí gravimetrické i fluorometrické metody jsem naměřila rostoucí obsah olejů od prvního do třetího dne kultivace, po třetím dnu se výsledky obou metod lišily poklesem nebo vzrůstem hodnot obsahu oleje. Nejvyšších hodnot bylo naměřeno v kontrolní variantě K v obou opakováních. Vysoké hodnoty byly naměřeny v obou opakováních varianty 1/5 HS ve druhém dni kultivace, ale vystřídány byly skokovým poklesem. Postupná a trvalá akumulace byla zaznamenána u varianty HS-N v obou opakováních. Ve variantě se sníženým obsahem dusíku HS1/5N obsah oleje dosahoval nízkých hodnot a metody se v těchto výsledcích shodovaly.

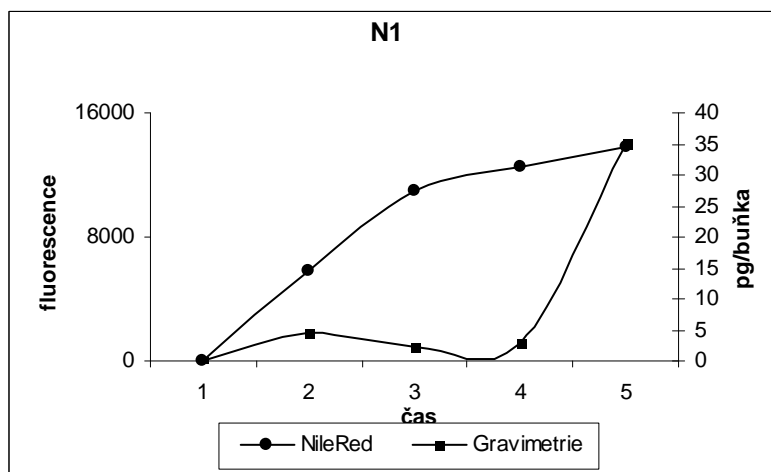
Na obrázcích číslo 14-18 (linie 1) a 19-23 (linie 2) jsou graficky znázorněny výsledky makro-gravimetrické metody v porovnání s fluorometrickou metodou (NileRed) pro obě opakování pokusu.



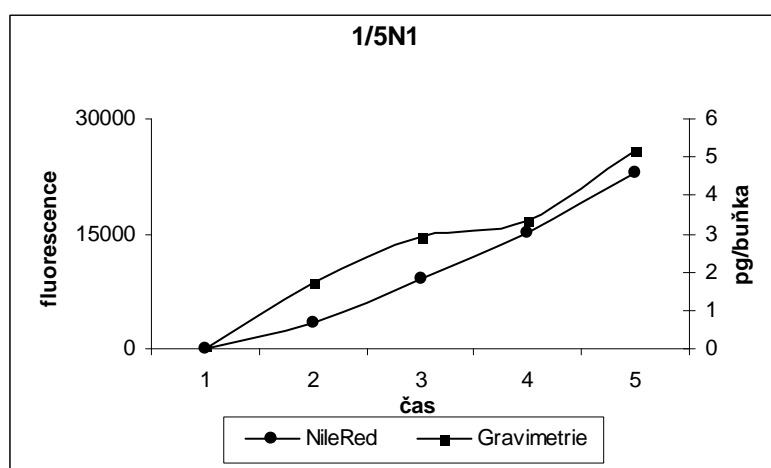
Obr. 14: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v médiu HS (kontrola).



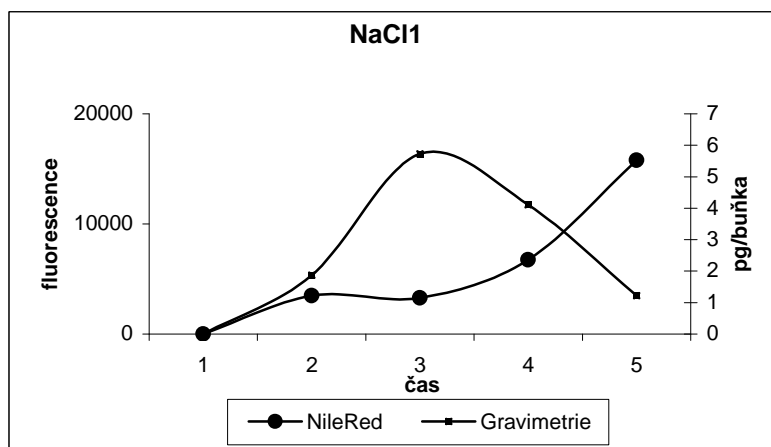
Obr. 15: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v ředěném médiu HS (1/5HS).



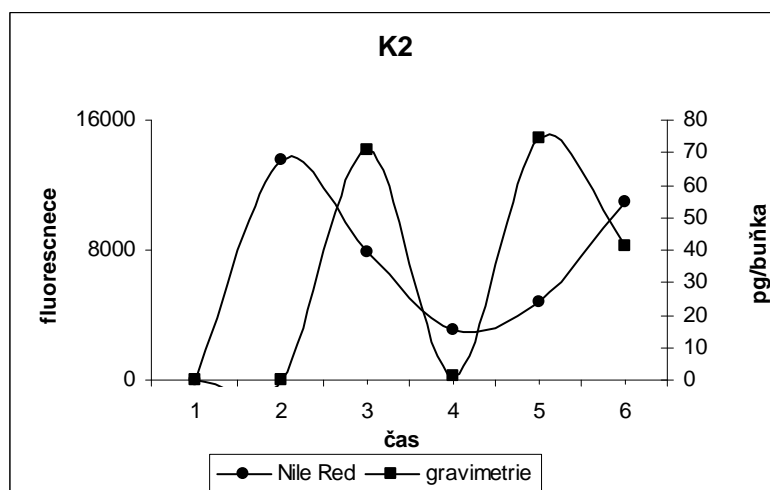
Obr. 16: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v bezdusíkatém médiu (HS-N).



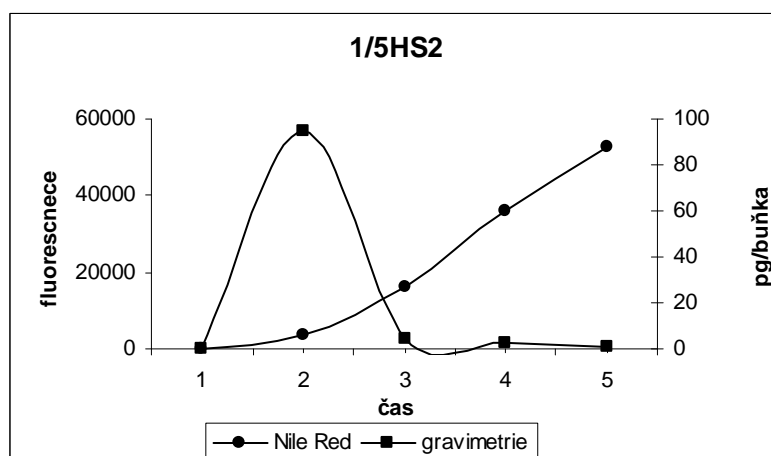
Obr. 17: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v médiu s 1/5 původního obsahu dusíku (HS 1/5N).



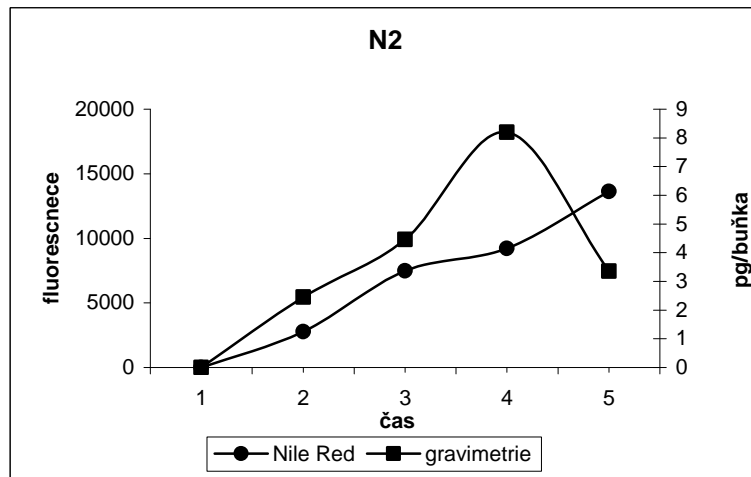
Obr. 18: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v médiu se zvýšeným obsahem soli (HS+NaCl).



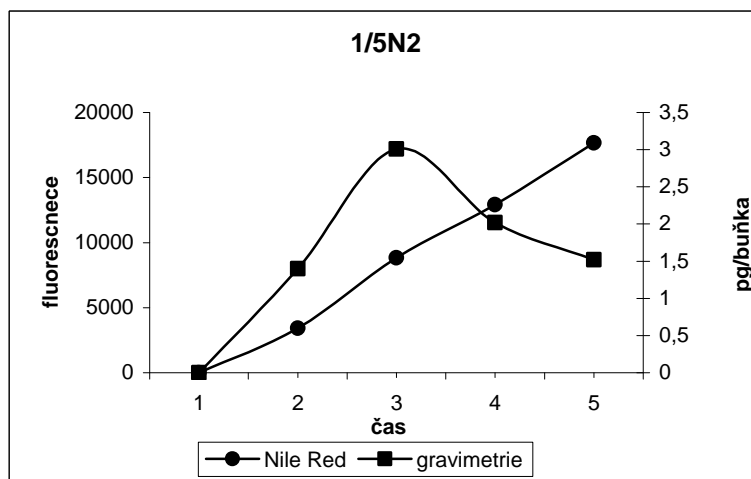
Obr. 19: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v médiu HS (kontrola).



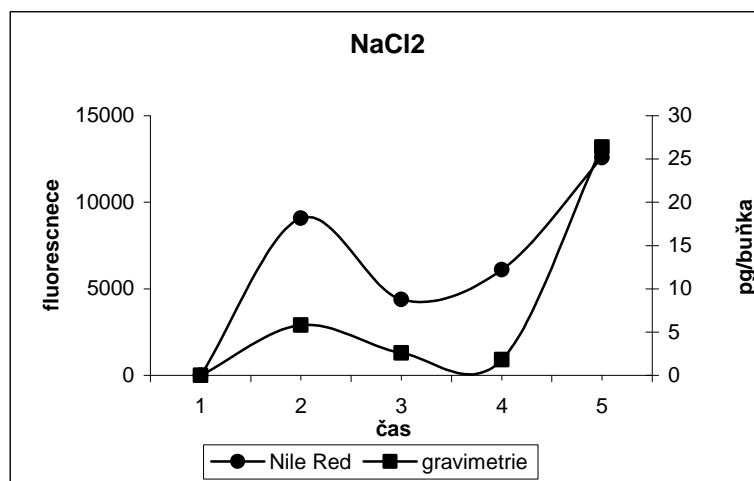
Obr. 20: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v ředěném médiu HS (1/5HS).



Obr. 21: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v bezdusíkatém médiu (HS-N).



Obr. 22: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v médiu s 1/5 původního obsahu dusíku (HS 1/5N).



Obr. 23: Srovnání množství oleje měřeného gravimetrickou a fluorometrickou metodou u řasové kultury kultivované v médiu se zvýšeným obsahem soli (HS+NaCl).

5. DISKUSE

5.1 Vliv kultivačních podmínek na obsah škrobu a olejů v řasových buňkách

Aby bylo možné efektivně převádět oleje a škrob z řasových kultur na biopaliva, je nezbytné, aby buňky obsahovaly vysoký obsah škrobu a oleje. Klíčová je tedy akumulace těchto buněčných zásobních látek. Spuštění a zachování akumulace je možné ovlivnit složením kultivačního média², v práci byly použity čtyři upravené varianty klasického média HS. Z naměřených hodnot obsahu škrobu vyplývá, že nejúčinnější variantou pro akumulaci škrobu v řasové kultuře je pěstování kultury v kultivačním médiu se zvýšeným obsahem soli. V obou variantách (opakováních) obsah škrobu rychle narůstal, nejvyšších hodnot dosahoval mezi 4. a 5. dnem kultivace a dále nijak výrazně neklesal. Z výsledků počtu buněk vyplývá, že se buňky od 3. dne již nedělí a to je důvodem poměrně konstantního vysokého obsahu škrobu. Podobně byla prokázána zvýšená akumulace škrobu v kulturách zelené řasy *Chlorella* v přítomnosti inhibitoru proteosyntézy, cykloheximidu, a při limitaci sírou, které vedou k zastavení buněčného cyklu³⁶. Varianta se zvýšeným obsahem soli není účinná pro

zvyšování obsahu olejů, obsah oleje narůstal velice pomalu a dosahoval nízkých hodnot, což bylo způsobeno zastavením buněčného dělení v okamžiku, kdy buňky obsahovaly malé množství oleje. U varianty média HS1/5 obsah škrobu sice narůstal, ale ve druhém opakování dosahoval nízkých hodnot a buňky se v této variantě přestaly dělit. Stejně tak ovlivnilo naředěné médium 1/5HS obsah oleje. Obsah oleje se zvýšil na maximum kolem 2. dne kultivace, hodnota v porovnání s kontrolní kulturou byla vysoká, ale v zápětí obsah oleje klesl na velmi nízké hodnoty a buňky se přestaly dělit. Snížená nebo nulová koncentrace dusíku v médiu neovlivňovala buněčný cyklus tak, aby buňky akumulovaly škrob, ve variantě média HS-N a HS1/5N byly naměřeny nejnižší hodnoty obsahu škrobu. V bezdusíkatém médiu, pouze v prvním opakování, jsem zaznamenala, v porovnání s kontrolou, trvale vysoké hodnoty oleje, nedostatek dusíku zastavil dělení buněk. V médiu se sníženou koncentrací dusíku obsah oleje narůstal, ale dosahoval nízkých hodnot. Moje výsledky tedy potvrzují předchozí studie, které popsaly výrazný vliv složení kultivačního média na produkci škrobu a olejů³.

5.2 Srovnání metod pro stanovení škrobu

V práci jsem pro měření obsahu škrobu v řasové kultuře použila dvě metody. Klasickou kolorimetrickou Cleggovu metodu s níž jsem porovnávala spektrofotometrickou Lugolovu metodu, u které je nutné ověřit, zda je vhodná pro přesné stanovení škrobu v řasových buňkách. Metody jsem srovnávala na základě grafického znázornění výsledků měření. U kontrolní varianty v HS médiu byly výsledky měření obsahu škrobu během kultivace oběma metodami přibližně stejné, Lugolovu metodu by bylo možné pro stanovení škrobu použít. U varianty média HS-N v druhém opakování byl průběh hodnot téměř stejný, u varianty se sníženým obsahem dusíku HS1/5N velice podobný, z toho lze odvodit, že za snížené koncentrace dusíku je Lugolova vhodná jako rychlá a jednoduchá metoda stanovení obsahu škrobu v buňkách. V případě varianty média se zvýšeným obsahem soli se průběh hodnot přibližně podobal. Vzhledem k tomu, že se hodnoty v grafech nijak zásadně nelišily u žádné varianty, je možné Lugolovu metodu označit za vhodnou pro měření obsahu

škrobu v řasových buňkách. Moje výsledky naznačují, že Lugolova metoda může být použita pro rychlé a snadné předběžné stanovení obsahu škrobu v buňkách zelených řas. Tato metoda může být využita například při analýze velkého množství vzorků při skrínování produkce škrobu různými druhy řas či za různých růstových podmínek³.

5.3 Srovnání metod pro stanovení olejů

V práci jsem pro měření obsahu olejů v řasové kultuře použila dvě metody. Metodu gravimetrickou, která se pro stanovení používá standardně, s níž jsem porovnávala metodu fluorometrickou, u které je nutné ověřit, zda je vhodná pro přesné či orientační stanovení oleje v řasových buňkách. Metody jsem, podobně jako v případě stanovení obsahu škrobu, srovnávala na základě grafického znázornění výsledků měření. Na základě srovnání obou metod lze říci, že fluorometrické měření pomocí barviva Nile Red je lineární i v případě, kdy gravimetrická metoda vykazuje skokové změny. Zcela jiný průběh hodnot u obou metod měla varianta kontrolní varianta HS a varianta HS 1/5, naproti tomu ve variantách HS-N a HS1/5N byl průběh hodnot u obou metod podobný postupným vzrůstem. Srovnání obou metod, hlavně opakovatelnosti měření v obou variantách, naznačuje, že fluorometrická metoda je citlivější a lépe reprodukovatelná než metoda gravimetrická. Nepřesnost gravimetrické metody je zřejmá zvláště v kulturách s nízkým množstvím oleje na buňku, v kontrolním měření se výsledky dvou opakování neshodují. Moje výsledky naznačují, že pro rutinní měření zvláště u velkého množství vzorků je fluorometrická metoda vhodnější než metoda gravimetrická. Použitelnost a výhody fluorometrické metody barvení lipidů u živočišných buněk byly popsány už dříve²⁹.

6. POUŽITÁ LITERATURA A CITACE

1. S. Elumalai, R. Sakthivel, B. Infant Santhose and P. Arul Murugan, *J Exp Sci*, 2011, **2**, 26-29.
2. M. Siaux, S. Cuine, C. Cagnon, B. Fessler, M. Nguyen, P. Carrier, A. Beyly, F. Beisson, C. Triantaphylides, Y. Li-Beisson and G. Peltier, *BMC Biotechnol*, 2011, **11**, 7.
3. P. Přibyl, V. Cepák and V. Zachleder, *Appl Microbiol Biotechnol.*, 2012, **94**, 549–561.
4. J. D. Rochaix, *FEBS Lett*, 2002, **529**, 34-38.
5. S. G. Ball, L. Dirick, A. Decq, J. C. Martiat and R. F. Matagne, *Science*, 1990, **66**, 1-9.
6. G. R. Hicks, C. M. Hironaka, D. Dauvillee, R. P. Funke, C. D'Hulst, S. Waffenschmidt and S. G. Ball, *Plant Physiol*, 2001, **127**, 1334-1338.
7. E. H. Harris, *The Chlamydomonas sourcebook, A comprehensive guide to biology and laboratory use*, 1988.
8. V. Zachleder and H. van den Ende, *J Cell Sci*, 1992, **102**, 469-474.
9. U. W. Goodenough, E. V. Armbrust, A. M. Campbell and P. J. Ferris, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1995, **46**, 21-44.
10. R. Sager and G. E. Palade, *J Biophys Biochem Cytol*, 1957, **3**, 463-488.
11. J. E. Boynton, N. W. Gillham and J. F. Chabot, *J. Cell Sci.*, 1972, **10**, 267-305.
12. C. Goodson, R. Roth, Z. T. Wang and U. Goodenough, *Eukaryot Cell*, 2011, **10**, 1592-1606.
13. V. H. Work, R. Radakovits, R. E. Jinkerson, J. E. Meuser, L. G. Elliott, D. J. Vinyard, L. M. L. Laurens, G. C. Dismukes and M. C. Posewitz, *Eukaryot Cell*, 2010, **9**, 1251-1261.
14. Y. Li, D. Han, G. Hu, M. Sommerfeld and Q. Hu, *Biotechnol Bioeng*, 2010, **107**, 258-268.
15. W. Eichenberger, *Phytochem*, 1976, **15**, 459-464.
16. P. L. C. John, in *Algal Development. Molecular and cellular aspects*, eds. W. Wiesnar, D. G. Robinson and R. C. Starr, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokyo, 1987, pp. 9-16.
17. A. W. Coleman and P. Heywood, *J Cell Sci*, 1981, **49**, 401-409.
18. L. Donnan and P. C. L. John, *Nature*, 1983, **304**, 630-633.
19. T. Cavalier-Smith, *Annu Rev Biophys Bioeng*, 1982, **11**, 273.
20. J. Umen and U. Goodenough, *Genes Dev*, 2001, **15**, 1652-1661.
21. J. L. Spudich and R. Sager, *J Cell Biol*, 1980, **85**, 136-146.
22. K. Bisova, D. M. Krylov and J. G. Umen, *Plant Physiol*, 2005, **137**, 1-17.
23. C. Benning, *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 1998, **49**, 53-75.
24. P. Dormann and C. Benning, *Plant J*, 1998, **13**, 641-652.
25. S. S. Merchant, J. Kropat, B. Liu, J. Shaw and J. Warakanont, *Curr Opin Biotechnol*, 2011.
26. M. Takagi, Karseno and T. Yoshida, *J Biosci Bioeng*, 2006, **101**, 223-226.
27. E. G. Bligh and W. J. Dyer, *Can J Biochem Physiol*, 1959, **37**, 911-917.
28. P. Greenspan, E. P. Mayer and S. D. Fowler, *J Cell Biol*, 1985, **100**, 965-973.
29. P. Greenspan, E. P. Mayer and S. D. Fowler, *J Cell Biol*, 1985, **100**, 965-973.

30. W. Chen, C. Zhang, L. Song, M. Sommerfeld and Q. Hu, *J Microbiol Meth*, 2009, **77**, 41-47.
31. M. K. Stenstrom, S. Fam and G. S. Silverman, *Sci Technol Lett, Environ Technol Lett*, 1986, **7**, 625-636.
32. L. Rodolfi, G. C. Zittelli, N. Bassi, G. Padovani, N. Biondi, G. Bonini and M. R. Tredici, *Biotechnol Bioeng*, 2009, **102**, 100-112.
33. N. T. Eriksen, F. K. Riisgard, W. S. Gunther and J. J. Lonsmann Iversen, *J Appl Phycol*, 2007, **19**, 161-174.
34. I. Maeda, Y. Seto, S. Ueda, Y. Cheng, J. Hari, M. Kawase, H. Miyasaka and K. Yagi, *Biotechnol Bioeng*, 2006, **94**, 722-729.
35. N. R. Pimstone, *Clin Chem*, 1964, **10**, 891-906.
36. I. Brányiková, B. Maršálková, J. Doucha, T. Brányik, K. Bišová, V. Zachleder and V. Vítová, *Biotechnol Bioeng*, 2011, **108**, 766-776.
37. L. Sattler and F. W. Zerban, *Science*, 1948, **108**, 207.
38. T. Proschold, E. H. Harris and A. W. Coleman, *Genetics*, 2005, **170**, 1601-1610.
39. N. Sueoka, *Proc Natl Acad Sci USA*, 1960, **46**, 83-91.
40. Kantharaj, G. R., *Schéma syntézy triacylglycerolů*, V: „Plant Cell Biology“ [online]. Bangalore, India [cit 2012-02-15]. Dostupné z: plantcellbiology.masters.grkraj.org.