

UNIVERZITA PALACKÉHO V OLOMOUCI

Přírodovědecká fakulta

Katedra biochemie



Extrakce a frakcionace proteinů ze sinic

BAKALÁŘSKÁ PRÁCE

Autor:	Josef Polehňa
Studijní program:	B1406 Biochemie
Studijní obor:	Biochemie
Forma studia:	Prezenční
Vedoucí práce:	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok:	2024

Prohlašuji, že jsem bakalářskou práci vypracoval samostatně s vyznačením všech použitých pramenů a spoluautorství. Souhlasím se zveřejněním bakalářské práce podle zákona č. 111/1998 Sb., o vysokých školách, ve znění pozdějších předpisů. Byl jsem seznámen s tím, že se na moji práci vztahují práva a povinnosti vyplývající ze zákona č. 121/2000 Sb., autorský zákon, ve znění pozdějších předpisů.

V Olomouci dne

.....Podpis studenta

Poděkování

Chtěl bych poděkovat především svému vedoucímu práce prof. Mgr. Markovi Šebelovi, Dr. za vedení práce, naučení metod, připomínky a trpělivost. Dále bych chtěl poděkovat doc. RNDr. Petrovi Hašlerovi, Ph.D., z Katedry botaniky Univerzity Palackého za poskytnutí vzorků sinic a za umožnění vyzkoušet v jeho laboratoři extrakci homogenizátorem FastPrep-24™.

Bibliografická identifikace

Jméno a příjmení autora	Josef Polehňa
Název práce	Extrakce a frakcionace proteinů ze sinic
Typ práce	Bakalářská
Pracoviště	Katedra biochemie
Vedoucí práce	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
Rok obhajoby práce	2024

Abstrakt

Sinice patří mezi nejrozšířenější organismy na Zemi. Rod *Synechococcus*, se kterým bylo pracováno, je jedním z dominantních druhů v oceánech i sladkovodních vodách a v podobě planktonu je významnou složkou potravního řetězce. Díky své odolnosti, která je hlavně zásluhou komplexní buněčné stěny, sinice přežívají i v náročných podmínkách. Některé druhy jsou pro svůj vysoký proteinový obsah populárními potravinovými doplňky. Tato práce se zaměřuje právě na získání proteinů ze sinic. Bylo otestováno několik extrakčních postupů a metod vedoucích k závěru, že použití ultrazvuku může být validní a snadno dostupná cesta k docílení buněčné lýzy. Koncentrace proteinů ve vzorcích byly stanoveny BCA metodou s nejvyšším dosaženým ziskem $4,22 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$, který náleží extrakci ultrazvukem za přítomnosti SDS a lysozymu.

Práce pouze nastiňuje možná úskalí extrakcí a jejich závislost na zvolených podmínkách a celkovou rozsáhlost tematiky. Pro hlubší proniknutí do problematiky je třeba dalšího výzkumu, který si sinice určitě zaslouží.

Klíčová slova	Sinice, <i>Synechococcus</i> , buněčná lýza, extrakce proteinů, ultrazvuk, BCA metoda, SDS-PAGE
Počet stran	62
Počet příloh	0
Jazyk	Český

Bibliographical identification

Autor's first name and surname	Josef Polehňa
Title	Extraction and fractionation of proteins from cyanobacteria
Type of thesis	Bachelor
Department	Department of biochemistry
Supervisor	prof. Mgr. Marek Šebela, Dr.
The year of presentation	2024

Abstract

Cyanobacteria are among the most abundant organisms on Earth. The genus *Synechococcus*, which has been worked with, is one of the most dominant species in the oceans and freshwater and is an important component of the food chain in the form of plankton. Thanks to their resilience, which is mainly due to their complex cell wall, cyanobacteria survive even in harsh conditions. Some species are popular food supplements due to their high protein content. This work focuses specifically on protein extraction from cyanobacteria. Several extraction procedures and methods have been tested leading to the conclusion that the use of ultrasound may be a valid and readily available route to achieve cell lysis. Protein concentrations in the samples were determined by the BCA method with the highest gain obtained being $4.22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, which belongs to ultrasound extraction in the presence of SDS and lysozyme.

This work only outlines the possible pitfalls of extractions and their dependence on the conditions chosen and the overall scope of the topic. Further research is needed to delve deeper into the subject, which cyanobacteria certainly deserve.

Keywords	Cyanobacteria, <i>Synechococcus</i> , cell lysis, protein extraction, ultrasonication, BCA method, SDS-PAGE
Number of pages	62
Number of appendices	0
Language	Czech

OBSAH

1	ÚVOD	1
2	SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY	2
2.1	Sinice – Cyanobacteria	2
2.1.1	Morfologie.....	2
2.1.2	Fotosyntéza sinic	6
2.1.3	Fixace dusíku	7
2.1.4	Cyanotoxiny	8
2.1.5	Ekologie sinic.....	9
2.1.6	Sinice v biotechnologiích.....	10
2.1.7	Systém sinic	10
2.1.8	Synechococcus	11
2.2	Buněčná lýza.....	12
2.2.1	Vysokotlaká homogenizace	12
2.2.2	French press	14
2.2.3	Vysokorychlostní homogenizace.....	14
2.2.4	Mletí kuličkami	14
2.2.5	Ultrazvuk.....	16
2.2.6	Pulzní elektrické pole	16
2.2.7	Mikrovlnné ozařování	17
2.2.8	Zmrazování a rozmrazování.....	17
2.2.9	Lyofilizace.....	17
2.2.10	Tepelné narušení.....	18
2.2.11	Chemická lýza.....	18
2.2.12	Enzymová lýza	19
2.2.13	Předchozí studie	20
2.3	Extrakce proteinů.....	21
2.3.1	Stabilizace proteinů	21
2.4	Extrakce lipidů.....	22
3	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	23
3.1	Materiál a vybavení	23
3.1.1	Biologický materiál.....	23
3.1.2	Chemikálie	23
3.1.3	Materiál a přístrojové vybavení	24
3.1.4	Použitý software.....	25
3.2	Metody.....	25
3.2.1	Zpracování sinic	25

3.2.2	Extrakce ultrazvukem s detergenty a lysozymem	25
3.2.3	Extrakce ultrazvukem za nativních podmínek	26
3.2.4	Extrakce v homogenizátoru FastPrep-24™	27
3.2.5	Extrakce v pufru s SDS bez ultrazvuku	27
3.2.6	Extrakce ultrazvukem v pufrech při různém pH	27
3.2.7	Extrakce ultrazvukem v různých koncentracích pufru.....	28
3.2.8	SDS-PAGE	28
3.2.9	BCA metoda	29
3.2.10	GelAnalyzer	30
4	VÝSLEDKY A DISKUSE	31
4.1	Koncentrace proteinů.....	31
4.2	Extrakce ultrazvukem s detergenty a lysozymem	32
4.3	Extrakce ultrazvukem za nativních podmínek.....	35
4.4	Extrakce v homogenizátoru FastPrep-24™	37
4.5	Extrakce v pufru s SDS bez ultrazvuku	39
4.6	Extrakce ultrazvukem v pufrech při různém pH	40
4.7	Extrakce ultrazvukem v různých koncentracích pufru	42
4.8	GelAnalyzer.....	43
4.9	Proteinové složení extraktů	48
4.10	Teoretický výtěžek.....	49
4.11	Nedostatky	50
5	ZÁVĚR.....	51
6	LITERATURA	52
7	SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK.....	62

CÍLE PRÁCE

Teoretická část:

- Vypracování literární rešerše na téma metodiky lyzování buněk sinic a postupů extrakce proteinů a jiných biomolekul

Praktická část:

- Použít několik vybraných postupů k extrakci proteinů ze sinice *Synechococcus* za účelem porovnání
- Stanovit koncentraci proteinů v extraktech a zhodnotit proteinové složení vzorků pomocí gelové elektroforézy

1 ÚVOD

Sinice jsou prakticky všudypřítomné autotrofní organismy, které se řadí mezi gram-negativní prokaryota. Jsou schopné fotosyntézy, díky které přispěly k vytvoření aerobní atmosféry na Zemi. Sinice nabízí velké množství potenciálně užitečného intracelulárního obsahu. Hlavní dominantou je jejich vysoký obsah proteinů. Morfologicky jsou jednotlivé druhy značně rozdílné. Jejich spojujícím prvkem je silná a odolná buněčná stěna (BS), skládající se z několika vrstev.

Právě odolná BS je hlavní překážkou při zisku požadovaného buněčného obsahu. Jako možná řešení se nabízí rozmanitá množství lyzačních a extrakčních metod, z nichž každá přináší své výhody i nevýhody. Mezi rozhodující faktory při výběru vhodné metody patří charakter požadované látky, její stabilita, množství dostupného buněčného materiálu, vybavení laboratoře a v neposlední řadě také časová a finanční náročnost.

2 SOUČASNÝ STAV ŘEŠENÉ PROBLEMATIKY

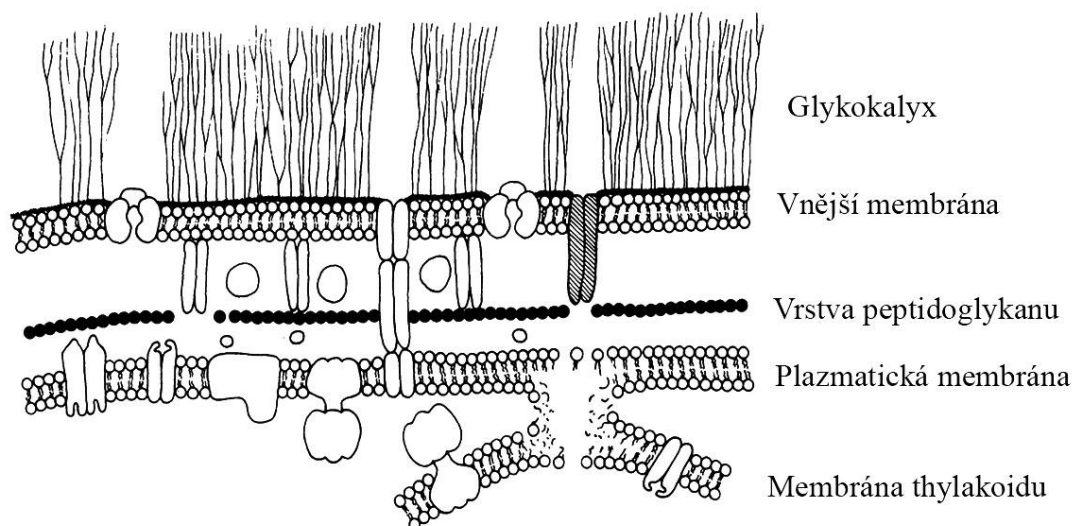
2.1 Sinice – Cyanobacteria

Sinice patří mezi gram-negativní prokaryotní organismy, jež jsou schopné produkovat kyslík fotosyntézou, která se řadí mezi rostlinný typ (Kalina & Váňa, 2005). Díky své přizpůsobivosti na okolní prostředí jsou prakticky všudypřítomné a jsou schopné obývat všechny biotopy (Gaysina et al., 2019), včetně pouští a polárních oblastí (Kalina & Váňa, 2005). Mezi hlavní přednosti sinic, díky kterým se tolik rozšířili, patří nadstandardní tolerance nízké hladiny kyslíku a volných sulfidů, schopnost anaerobní fotosyntézy a silná tolerance ultrafialového záření (Gaysina et al., 2019) i extrémních hodnot pH (Kalina & Váňa, 2005). Sinice taktéž sehrály zásadní roli v historii života naší planety. Díky nim došlo před zhruba 2 miliardami let k přeměně anaerobní atmosféry na aerobní a k obecnému rozvoji života na Zemi (Berman-Frank et al., 2003; Kalina & Váňa, 2005). Ač jsou současné sinice velmi podobné svým fosilním předchůdcům, mají odlišné genetické informace (Castenholz, 1992).

Udržitelnost a obnovitelné zdroje jsou populární témata a s nimi souvisí snaha využít mikroorganismy k udržitelné produkci chemických látek. Mezi vhodné organismy patří mimo jiné také sinice (Desai & Atsumi, 2013), které jsou schopné produkovat velké množství užitečných látek (Abed et al., 2009; Ducat et al., 2011). Velký zájem budí taktéž jejich vysoký obsah proteinů v sušině (10–47 %) (Field et al., 2017). Např. *Arthrospira maxima* obsahuje dokonce až 60–70 % proteinů (Belay et al., 1993; Teuling et al., 2017) a spolu s dalšími druhy patří mezi populární potravinové doplňky (Abed et al., 2009).

2.1.1 Morfologie

Sinice vykazují značnou morfologickou rozmanitost mezi jednotlivými druhy. Mohou být jednobuněčné nebo vláknité, žít osamoceně nebo v koloniích. U vláknitých sinic může být pravé i falešné větvení. Velikost jednobuněčných vegetativních buněk je v širokém rozmezí od 0,4 μm až do 40 μm , zatímco vláknité sinice *Oscillatoria* mohou mít i 100 μm v průměru (Whitton & Potts, 2002). Sinice mohou být monoploidní i polyploidní (Griese et al., 2011). Díky obrovské přizpůsobivosti jsou schopné proměňovat své znaky na základě okolního prostředí (Kalina & Váňa, 2005).

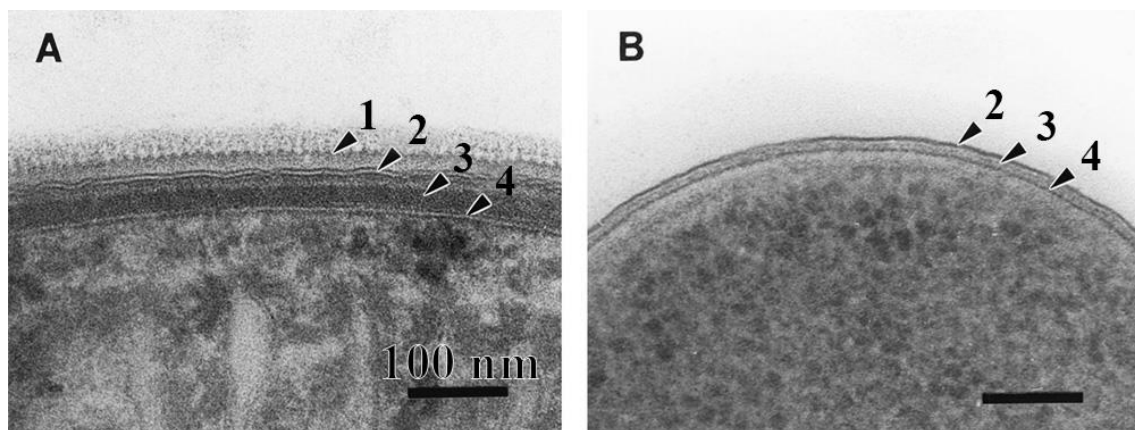


Obr. 1: Model buněčné stěny sinice. Převzato a upraveno podle (Gantt, 1994).

2.1.1.1 Buněčná stěna

Sinice mají komplexní BS skládající se z několika vrstev (Hoiczky & Hansel, 2000). Její schéma je zobrazeno na obrázku (Obr. 1). Na povrchu buňky je vnější plášť složený z exopolysacharidů a jednoho druhu často glykosylovaných proteinů, která se označuje jako S-vrstva (Hoiczky & Hansel, 2000). Lze se setkat s více názvy jako je glykokalyx, pochva nebo sliz (Adams & Duggan, 1999; Kalina & Váňa, 2005). Následuje vnější membrána obsahující různé transportní kanálky (Hoiczky & Hansel, 2000). Kanálky mají v průměru 5–13 nm a patří mezi ně například porinové kanály, které difúzí zajišťují výměnu iontů nebo malých molekul s okolním prostředím (Adams & Duggan, 1999; Kalina & Váňa, 2005). Mezi vnějším a vnitřním periplazmatickým prostorem se nachází vrstva peptidoglykanu (Hoiczky & Hansel, 2000). Poslední vrstvou je semipermeabilní cytoplazmatická membrána (CM) (Gantt, 1994).

Peptidoglykan (murein) je specifická esenciální struktura BS pro sinice a bakterie umístěná na vnější straně CM (Rogers et al., 1980; Vollmer et al., 2008a). Její úlohou je mechanická ochrana buňky a díky své tuhosti udává také její tvar (Gantt, 1994). Narušení syntézy peptidoglykanu nebo jeho degradace např. lysozymem (Enzymová lýza) vede ke ztrátě struktury a buněčné lýze (Vollmer et al., 2008a). Samotný peptidoglykan se skládá z vláken glykanu zesíťovaných krátkými peptidy (Rogers et al., 1980). Glykanová vlákna jsou složena z *N*-acetylglukosaminu a *N*-acetylmuramové kyseliny, navzájem spojené β -1,4 glykosidovou vazbou (Vollmer et al., 2008a).



Obr. 2: Srovnání buněčných obalů sinice *P. uncinatum* (A) a bakterie *E. coli* (B). 1 – vnější vrstva (S-vrstva a exopolysacharidy), 2 – vnější membrána, 3 – peptidoglykanová vrstva, 4 – plazmatická membrána. Převzato a upraveno podle (Hoiczky & Hansel, 2000).

Vrstva peptidoglykanu je u jednobuněčných sinic jako např. *Synechococcus* silná okolo 10-15 nm (Golecki, 1977; Samuel et al., 2001). Mezi sinicemi lze najít druhy, které mají vrstvu silnější. Vlákňité sinice mají 15-35 nm peptidoglykanu (Hoiczky & Baumeister, 1995), což by odpovídalo spíše gram-pozitivnímu zařazení (Jürgens et al., 1983). Mnoho gram-pozitivních bakterií má peptidoglykanovou vrstvu o síle 20–40 nm (Hoiczky & Hansel, 2000). Sinice *Oscillatoria princeps* se vyznačuje extra mohutnou vrstvou, která je 300-700 nm silná (Hoiczky & Baumeister, 1995). BS sinic se i přesto považuje za gram-negativní, zejména díky přítomnosti vnější membrány. Sinice mají vyvinutou unikátní organizaci BS, která neodpovídá typickému gram-pozitivnímu nebo gram-negativnímu uspořádání. I hustota zesíťování mezi jednotlivými vlákny peptidoglykanu je výrazně vyšší, než lze najít u většiny gram-negativních bakterií. (Jürgens et al., 1983). Srovnání stavby BS sinice *Phormidium uncinatum* a bakterie *Escherichia coli* je na obrázku (Obr. 2).

2.1.1.2 Stavba protoplastu

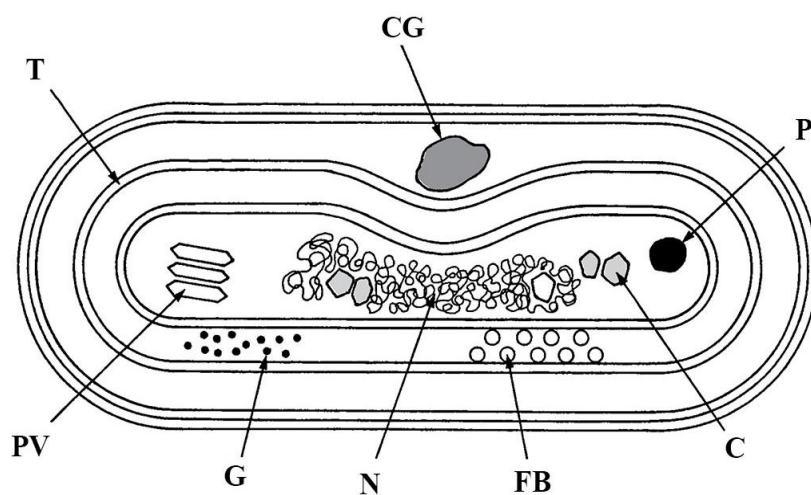
V buňce sinice lze rozlišit dva typy cytoplazmy: na povrchu výrazněji zbarvenou chromoplasmu s thylakoidy a ve středové oblasti buňky světlejší centroplastmu, kde se nachází kruhová molekula DNA, ribozomy, granule obsahující zásobní látky, plynové vezikuly a další plazmatické struktury (Kalina & Váňa, 2005). Molekula DNA je často obsažena ve více kopiích, přičemž počet molekul je velmi variabilní. Monoploidie je u sinic vzácná (Griese et al., 2011). Cytoplazma sinic obsahuje také plazmidy, krátké cyklické molekuly DNA, které buňce poskytují dodatečné vlastnosti díky své genetické informaci (Kalina & Váňa, 2005). Stavba buňky sinice je zobrazena na obrázku (Obr. 3).

Ve srovnání s eukaryotickou buňkou postrádají sinice většinu organel včetně buněčného jádra, plastidů, mitochondrií i Golgiho tělíska (Kalina & Váňa, 2005).

2.1.1.3 Buněčné inkluze

Sinice obsahují čtyři typy buněčných inkluzí, které jsou obecně přítomné: karboxysomy a trojici granulí (polyfosfátové, cyanofycinové a glykogenové) sloužící jako zásobní látky (Stanier & Cohen-Bazire, 1977; Kalina & Váňa, 2005). Karboxysomy (polyedrická tělíska) v sobě koncentrují CO_2 , neboť obsahují důležitý enzym ribulosa-1,5-bisfosfátkarboxylasu (Rubisco EC 4.1.1.39), který umožňuje fixaci C v rámci Calvinova cyklu (Kalina & Váňa, 2005; Andersson & Backlund, 2008).

Hlavními limitujícími prvky pro sinice jsou N a P (Yunes, 2019). N si ukládají v podobě cyanofycinu, který se skládá z dlouhých řetězců argininu a asparaginu (Stanier & Cohen-Bazire, 1988). P je v době nadbytku ukládán do polyfosfátových granulí tvořených ortofosforečnany (Kalina & Váňa, 2005). Obzvláště velké polyfosfátové granule má *Gloeobacter violaceus* (Stanier & Cohen-Bazire, 1988). Poslední zásobní látkou sinic je glykogen, který slouží jako hlavní organická zásobní látka (Stanier & Cohen-Bazire, 1977).



Obr. 3: Schéma tenkého řezu sinice. C – karboxysom, CG – cyanofycinová granula, T – thylakoid, P – polyfosfátová granula, N – nukleoplasmická oblast, G – glykogenová granula, FB – fycobilizom, PV – plynová vezikula. Převzato a upraveno podle (Adams & Duggan, 1999).

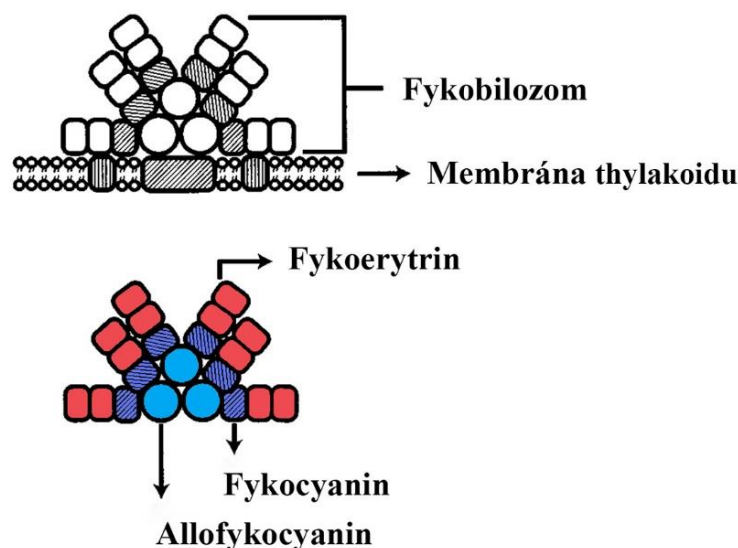
2.1.2 Fotosyntéza sinic

Velká část protoplastu sinic je vyhrazena pro fotosyntézu. Hlavní složkou fotosyntetického aparátu je řada zploštělých váčků neboli thylakoidů (Stanier & Cohen-Bazire, 1977), které se nacházejí u všech sinic s výjimkou *Gloeobacter violaceus*, která je postrádá. Uvnitř thylakoidů se nachází proteinové komplexy fotosystému I a II a také fotosyntetické pigmenty. U sinic lze najít zastoupení všech známých druhů chlorofylů. Chlorofyl *a* se vyskytuje v thylakoidech a bývá hlavním fotosyntetickým pigmentem u většiny sinic (Kalina & Váňa, 2005). Výjimkou je sinice *Acaryochloris marina*, která má jako hlavní pigment chlorofyl *d* (Miyashita et al., 1996). Chlorofyl *b* se vyskytuje u rodu *Prochloron*, *Prochlorococcus* a *Prochlorotrix* (Palenik & Haselkorn, 1992) a chlorofyl *c* se nachází u *Prochlorococcus marinus* (Helfrich et al., 1999). U sinice *Halomicronema hongdechloris* byla poprvé objevena přítomnost chlorofylu *f*, jehož absorpční maximum je 720 nm (Chen et al., 2010). Tato varianta byla posléze prokázána u více druhů jako *Leptolyngbya CCM 4* (Ohkubo & Miyashita, 2017; Gómez-Lojero et al., 2018).

Na stromální straně thylakoidů se nachází fykobilizomy, které zajišťují sběr světla pro fotosyntézu (Bryant, 1991). Fykobilizomy mají polokulovitý tvar a skládají se z jadra a periferních tyčinek. Komplex fykobilizomu tvoří převážně fykobiliproteiny. Jedná se o barevnou skupinu proteinů nesoucí struktury tetrapyrroly s otevřeným řetězcem (Sidler, 1994). Na obrázku (Obr. 4) je znázorněna struktura fykobilizomu včetně výskytu tří fotosyntetických pigmentů, červeného fykoerytrinu, a modrých fykocyaninu a allofykocyaninu. Díky rozdílným absorpčním maximům jednotlivých fotosyntetických pigmentů mohou sinice k fotosyntéze využívat světlo různé vlnové délky (Kalina & Váňa, 2005). Jednotlivá absorpční maxima fotosyntetických pigmentů sinic jsou uvedena v tabulce (Tab. 1).

Tab. 1: Absorpční maxima fykobiliproteinů. Vytvořeno podle (Sidler, 1994).

Fykobiliprotein	Absorpční maximum [nm]
Fykoerytrin	565–575
Fykocyanin	610–620
Allofykocyanin	650–655



Obr. 4: Struktura fykobilizomu a rozložení fotosyntetických pigmentů. Převzato a upraveno podle (MacColl, 1998).

Sinice mají užitečnou schopnost chromatické adaptace. Jedná se o reakci na změnu složení světelného spektra. Pro maximální zisk světelné energie se mění poměr fykoerytrinu a fykocyaninu na fykobilizomech. Allofykocyaninové jádro se nemění (Stanier & Cohen-Bazire, 1977; Kalina & Váňa, 2005). Jak však poznamenali Tandeau a Houmard (1993), ne všechny sinice touto schopností disponují.

2.1.2.1 Anaerobní fotosyntéza

Některé sinice patří mezi fakultativně anaerobní organismy a mohou provádět fotosyntézu i za anaerobních podmínek. Patří mezi ně např. sinice *Oscillatoria limnetica* objevená u dna v solném jezeře Solar Lake na Sinajském poloostrově (Cohen et al., 1975). Během anaerobní fotosyntézy je jako donor elektronu používán sulfan (Stanier & Cohen-Bazire, 1977) a reakce má vzorec:

Když se sinice dostane do povrchové vody s dostupným kyslíkem, přejde na aerobní formu fotosyntézy a donorem elektronu se opět stává voda (Kalina & Váňa, 2005).

2.1.3 Fixace dusíku

Preferovaným zdrojem N je u sinic amoniak (Muro-Pastor et al., 2005), který je však v přírodním prostředí v nízkých koncentracích (Rees et al., 2006), a tak sinice nejčastěji využívají dusičnany a dusitany (Su et al., 2005).

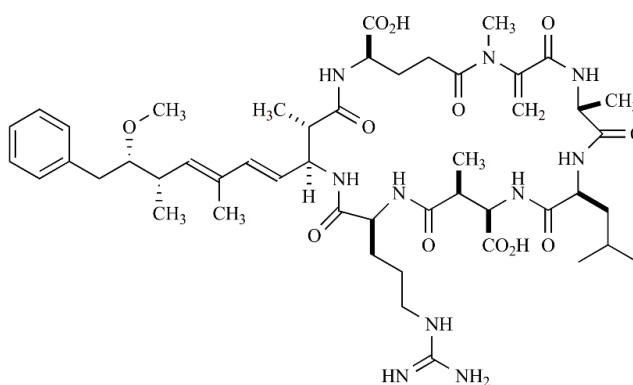
Sinice mohou získávat N i redukcí plynného N_2 . Dosahují toho za pomoci enzymu nitrogenasy (EC 1.18.6.1). Nitrogenasa vyžaduje anaerobní prostředí, neboť ji kyslík

nevratně inhibuje (Flores & Herrero, 1994). Sinice řádu Nostocales na to reagují přítomností speciálních buněk, heterocyst, které zajišťují pro fixaci N anaerobní prostředí. Vytvoří se v reakci na nízký obsah N v okolním prostředí. Celý proces trvá méně než 24 h (Kalina & Váňa, 2005).

Sinice, které heterocysty nemají, jsou schopny fixovat N₂ v anaerobních podmínkách (Flores & Herrero, 1994). Existují i druhy bez heterocyst schopné fixovat N₂ za přítomnosti kyslíku, např. sinice *Gloeothece* sp. PCC 6909, kterou objevili Wyatt a Silvey (1969).

2.1.4 Cyanotoxiny

Doposud bylo objeveno více jak 2000 sinicemi produkováných metabolických látek (Jones et al., 2021). Mezi tyto látky patří skupina cyanotoxinů, biologicky aktivních molekul, které se nepodílí na růstu nebo rozmnožování sinic a patří tak mezi sekundární metabolity (Carmichael, 1992). Pro člověka jsou chronicky toxické a vedou k různým onemocněním jako akutní gastroenteritida, kožní vyrážka, podráždění dýchacích cest, očí, uší nebo vředy v ústech (Zhang et al., 2022). Rozdělují se na dvě skupiny podle toxicity. První skupina působí smrtelné otravy a druhá má selektivní účinky na jiné konkurenční buňky, ale smrtelné účinky nemá (Kalina & Váňa, 2005). Mezi nejrozšířenější toxiny patří skupina mikrocystinů obsahující přes 80 variant. Nejvíce toxický z nich je mikrocystin-leucin-arginin (MC-LR) (Kim et al., 2009; Islam et al., 2019), jehož chemická struktura je na obrázku (Obr. 5).



Obr. 5: Mikrocystin-LR, Převzato z (Gademann & Portmann, 2008).

2.1.5 Ekologie sinic

2.1.5.1 Vodní květ

V případě přemnožení sinic na vodních plochách vzniká tzv. vodní květ (Kalina & Váňa, 2005). Květ s sebou přináší kontaminaci vody toxickými látkami a změny ve složení živin, které ohrožují vodní faunu a flóru (Zhang et al., 2022). Na vytváření květu se podílí např. sinice rodu *Microcystis*, *Anabaena*, *Aphanizomenon* nebo *Trichodesmium* (Kalina & Váňa, 2005; Sacilotto Detoni et al., 2016). K výskytu vodního květu dochází povětšinou v letním období, kdy je dostatek teplého slunečního záření. Dalšími podmínkami pro vznik jsou ideální hodnota pH a poměr živin ve vodě, zejména N a P (Yunes, 2019). Vodní květ se obtížně odstraňuje (Kalina & Váňa, 2005) a přítomnost cyanotoxinů může způsobovat vážné zdravotní komplikace nejen pro člověka, ale i pro zvířata (Yunes, 2019). Navíc z důvodu globálního oteplování počet květů každoročně stoupá (Zhang et al., 2022).

2.1.5.2 Výskyt sinic

Díky své veliké rozmanitosti a přizpůsobivosti jsou sinice schopné obývat téměř všechny myslitelné oblasti (Gaysina et al., 2019) od tvrdých podmínek Arktidy a Antarktidy (Mataloni & Komárek, 2004), až po rozpálené písčité pouště (Büdel et al., 2009). Mnoho sinic je schopno přežít v extrémních podmínkách. Sinice *Leptolyngya* zvládá růst v alkalických vodách při hodnotách pH dosahujících 13,5. Vlákniť sinice *Microcoleus chthonoplastes* snáší slanou vodu Mrtvého moře díky své toleranci salinity přes 200 ‰ (Kalina & Váňa, 2005).

Velmi rozšířené jsou ve vodách moří a oceánů, kde tvoří významnou složku potravního řetězce v podobě planktonu a jsou významnými producenty biologicky aktivních sloučenin (Andreeva et al., 2020). Mezi dominantní druhy v oceánech patří rody *Prochlorococcus* a *Synechococcus* (Flombaum et al., 2013).

2.1.5.3 Symbiotické sinice

Mnoho sinic žije v symbióze s řadou hostitelů, kteří jsou z řad rostlin, hub, protistů i živočichů (Rai et al., 2000). V symbiotických interakcích plní sinice roli chloroplastů a poskytují hostitelům zdroj uhlíku. Mohou také poskytovat dusík díky své schopnosti jeho fixace (Gaysina et al., 2019). U rostlin trvá symbióza po dobu jedné generace s výjimkou diatomů a vodní kapradiny *Azolla*, která má ve svých pletivech sinice řádu

Nostocales. Zde je symbiotický vztah předáván z generace na generaci (Plazinski et al., 1990; Gebhardt & Nierzwicki-Bauer, 1991; Rai et al., 2000). Dalším příkladem symbiotického soužití je lišejník, jehož složkami jsou houba a sinice, nebo houba, sinice a zelená řasa. Lišejníky většinou tvoří rody *Nostoc*, *Calothrix*, *Scytonema* a *Fischerella* (Kalina & Váňa, 2005).

2.1.6 Sinice v biotechnologiích

Sinice se uplatňují v široké škále průmyslových aplikací (Singh et al., 2016). Potravinové doplňky ze sinic jsou velmi populární pro svůj vysoký obsah vitaminů, minerálních látek, esenciálních aminokyselin a proteinů (Watanabe et al., 1999). Jejich častým zdrojem jsou sinice rodu *Spirulina*, *Anabaena* nebo *Nostoc* (Abed et al., 2009; Anantharajappa et al., 2020; Fais et al., 2022). V současné době se zkoumá také využití sekundárních metabolitů sinic s antibiotickými, protizánětlivými i protinádorovými účinky (Mayer et al., 2009; Qamar et al., 2021). Jednou z látek vykazujících vynikající protinádorový účinek je kryptofycin pocházející ze sinice *Nostoc* sp. var. ATCC 53789 a GSV 224 (Kang et al., 2018; Borbély et al., 2019).

Sinice *Synechococcus* a *Synechocystis* mohou produkovat laktát a sukcinát, jenž se užívá při výrobě bioplastů (Durall et al., 2021). Dále mohou sloužit pro produkci biopaliv jako 2-methyl-1-butanol, isobutanol či 2,3-butandiol (Nozzi et al., 2013).

2.1.7 Systém sinic

Systém sinic prošel za poslední roky výraznými změnami. Původně byl rozdělen na řády dle morfologické podobnosti, nynější systém je založen na genomové podobnosti analýzou 16S rRNA (Strunecký et al., 2023).

Strunecký et al. (2023) jsou autoři zatím poslední taxonomické klasifikace sinic. Jedinou třídu sinic Cyanophyceae rozdělili do 20 řádů: Gloeobacterales, Aegeococcales, Thermostichales, Pseudanabaenales, Gloeomargaritales, Acaryochloridales, Prochlorotrichales, Synechococcales, Nodosilineales, Leptolyngbyales, Oculatellales, Geitlerinematales, Desertifilales, Oscillatoriales, Coleofasciculales, Spirulinales, Chroococcales, Gomontiellales, Chroococciopsidales a Nostocales.

Jak sami autoři uvádí, ne všechny druhy mají dokončenou genomovou analýzu, takže je pravděpodobné, že se systém bude nadále vyvíjet.

2.1.8 *Synechococcus*

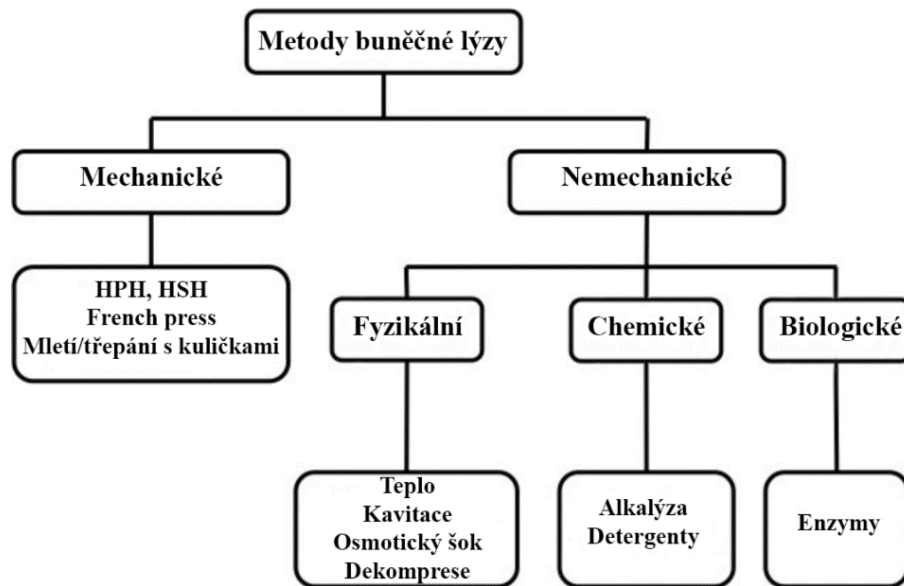
Rod *Synechococcus* patří mezi nejrozšířenější druhy sinic na Zemi (Whitton & Potts, 2002). Spolu s *Prochlorococcus* je dominantním rodem v oceánech (Ma & Jiao, 2004) a stejně tak je velmi rozšířen ve sladkovodních vodách (Gaysina et al., 2019).

Synechococcus má krátce oválné nebo tyčinkovité buňky o velikosti 0,4–6 μm (Komárek et al., 1999). Buňky *Synechococcus aeruginosus* jsou zobrazeny na obrázku (Obr. 6). Slizová vrstva není přítomna (Kalina & Váňa, 2005). Kvůli nízké morfologické variabilitě byl dlouho považován za souvislý rod (Komárek et al., 1999) a jeho druhové určení není snadné. Proto se často užívá pouze rodového označení (Kalina & Váňa, 2005). Podrobnější rozřazení umožnila až genomová analýza 16S rRNA (Dvořák et al., 2014; Strunecký et al., 2023).

Rod je oblíbený v laboratořích pro svou krátkou dobu zdvojení (Kalina & Váňa, 2005).



Obr. 6: Buňky *Synechococcus aeruginosus*. Převzato z (Gaysina et al., 2019).



Obr. 7: Rozdělení metod pro buněčnou lýzu. Vytvořeno podle (Middelberg, 1995; Shehadul Islam et al., 2017).

2.2 Buněčná lýza

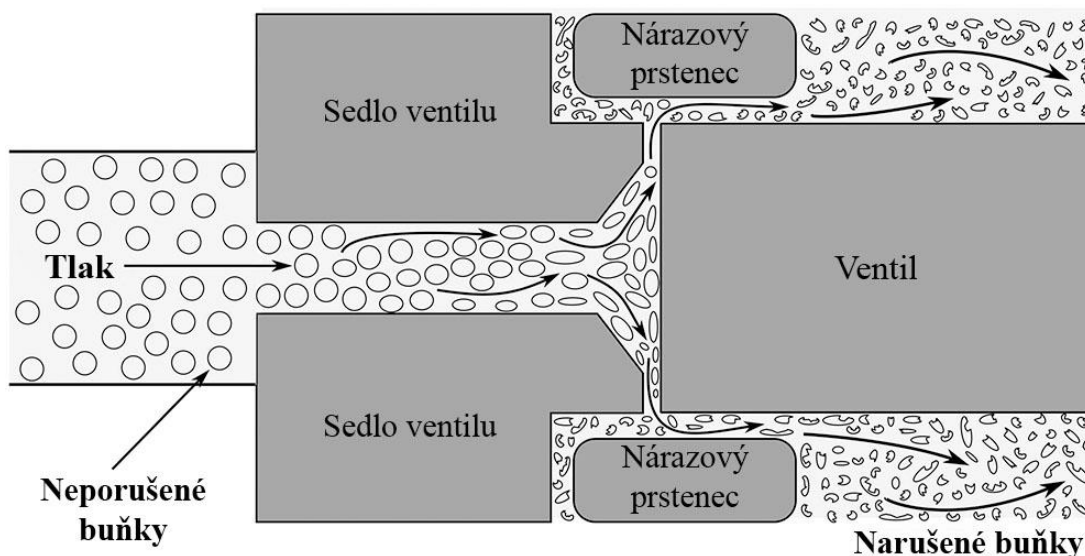
Buněčná lýza je prvním a klíčovým procesem pro získání buněčného obsahu (Timira et al., 2022). Účinnost konkrétní metody narušení buněk určuje dostupnost všech intracelulárních proteinů či jiných molekul, pro extrakci (Shen, 2019).

Na základě mechanismu lýzy lze metody rozdělit na mechanické a nemechanické (Shehadul Islam et al., 2017). Rozdělení metod lýzy je na obrázku (Obr. 7). V této práci budou zmíněny nejběžnější metody pro buněčnou lýzu a následně bude popsáno jejich uplatnění pro extrakci jednotlivých molekul, jako jsou proteiny, lipidy, pigmenty a další.

2.2.1 Vysokotlaká homogenizace

Vysokotlaká homogenizace (HPH) je jedna z nejvíce rozšířených metod pro lýzu buněk. Pro svou snadnou škálovatelnost je využívána hlavně v průmyslovém měřítku. Přístroj provádějící HPH se nazývá vysokotlaký homogenizátor (Levy et al., 2021). Na obrázku (Obr. 8) je zobrazeno schéma Mantonova-Gaulinova homogenizátoru vyrobeného firmou APV-Group (Daventry, UK). Skládá se z pístového čerpadla a sestavy homogenizačního ventilu (Gomes et al., 2020).

Lýza je dosaženo protlačováním suspenze buněk úzkým otvorem ventilu pod vysokým tlakem (Tanaka, 2015; Shehadul Islam et al., 2017). V závislosti na lyzovaných buňkách se běžně používá tlak v rozmezí 20–120 MPa (Gomes et al., 2020). Se specializovanými přístroji lze dosáhnou i tlaku 300–400 MPa. Jedná se pak



Obr. 8: Schematická reprezentace Mantonova-Gaulinova homogenizátoru. Upraveno podle (Gomes et al., 2020).

o ultra vysokotlakou homogenizaci (UHPH) (Dumay et al., 2013). Během průchodu ventilem jsou buňky narušovány nárazy do pevných povrchů (Bernaerts et al., 2019), kombinací intenzivních smykových sil a turbulentního proudu (Balduyck et al., 2018; Wang & Lan, 2018). Lýzu podporuje také prudký pokles tlaku na druhé straně ventilu a rozpad kavitačních bublin (Coccaro et al., 2018).

Homogenizace je ovlivněna použitým tlakem a počtem průchodů biomasy skrze něj (Soto-Sierra et al., 2018). Zvýšením tlaku lze požadovaný počet průchodů snížit (Bernaerts et al., 2019). Míru narušení buněk lze regulovat nejen tlakem, ale i velikostí mezery ventilu. Užší mezera má za následek silnější proudění a způsobuje intenzivnější narušení buněk (Tanaka, 2015). Uvolňování žádoucích molekul není závislé na koncentraci biomasy a může být současně narušována větší koncentrace buněk (Shehadul Islam et al., 2017).

Nevýhodou metody je generování tepla a zahřívání vzorku, které může způsobit degradaci termolabilních látek (Tanaka, 2015; Bernaerts et al., 2019). Na každých 10 MPa použitého tlaku, lze očekávat teplotní nárůst cca 2 °C (Becker et al., 1983). Z toho pramení nutnost použití externího chladičského systému (Bernaerts et al., 2019; Wang et al., 2020). Mezi další nevýhody patří neselektivita, omezení proti rozbití buněk s tvrdší stěnou a tvorba nežádoucích buněčných zbytků (Corrêa et al., 2021).

2.2.2 French press

French press patří mezi první vyvinuté metody pro buněčnou lýzu (D'Hondt et al., 2017). Funguje na stejném principu jako HPH (de Carvalho et al., 2017). Jedná se o malou aparaturu složenou z nerezového válce s úzkým otvorem uprostřed, pístem a ventilem. Objem bývá menší než 100 ml (Tanaka, 2015) a slouží spíše pro otestování podmínek pro větší aparaturu (de Carvalho et al., 2017).

2.2.3 Vysokorychlostní homogenizace

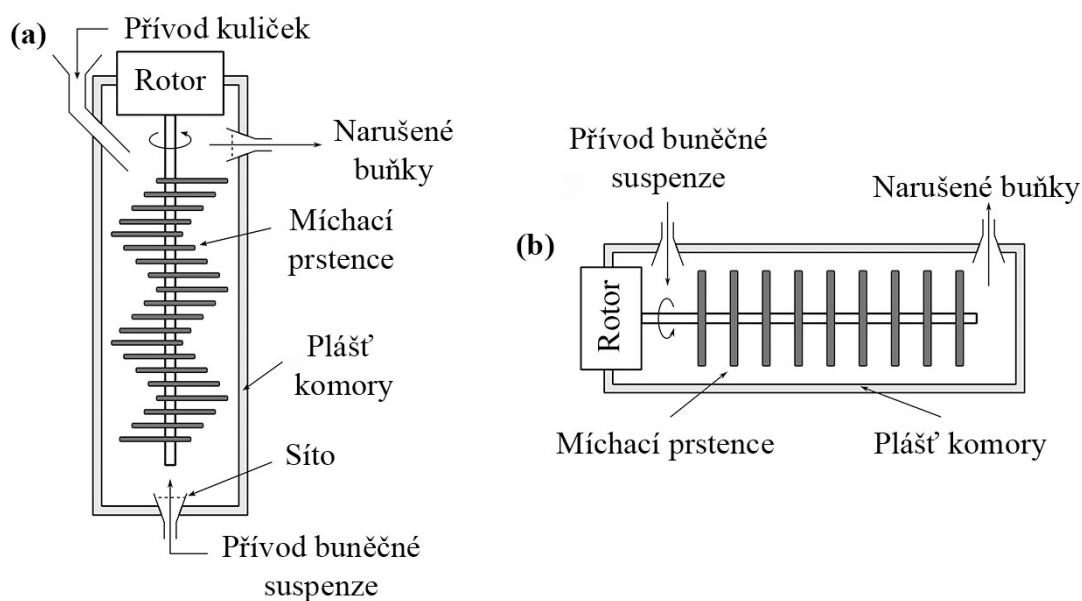
Vysokorychlostní homogenizace (HSH) je jednoduchá, ale agresivní a velmi účinná metoda pro buněčnou lýzu (Günerken et al., 2015). Vysokorychlostní homogenizátor se skládá z rotoru a statoru o různých provedeních. Vysoké otáčky (10000–20000 RPM (Corrêa et al., 2021)) způsobí lokální pokles tlaku a vzniká hydrodynamická kavitace, která způsobuje narušení buněk (Shirgaonkar & Lothe, 1998; Kumar & Bandit, 1999). Spolu s kavitací se na buněčné lýze podílí smykové síly (Günerken et al., 2015).

Výhodou metody je rychlé dosažení buněčné lýzy. I přes svou energetickou náročnost je vhodná pro průmyslové měřítko. HSH způsobuje denaturaci proteinů (Corrêa et al., 2021) a její využití je zejména pro extrakci lipidů (Wang & Wang, 2012; Balasubramanian et al., 2013) či antioxidantů (Guedes et al., 2013).

2.2.4 Mletí kuličkami

Mletí kuličkami je jedna z nejjednodušších metod pro lýzu buněk (Middelberg, 1995; Tanaka, 2015). Je oblíbená v laboratorním i průmyslovém měřítku díky vysoké účinnosti až 98 % (Soto-Sierra et al., 2018) a možnosti použití na široké spektrum buněk (Shehadul Islam et al., 2017). Kromě toho nezpůsobuje kontaminaci vzorku ve srovnání s chemickým ošetřením a zachovává většinu funkčních vlastností biomolekul (Corrêa et al., 2021).

Základem kuličkového mlýnu je plášťová mlecí komora s rotující hřídelí procházející jejím středem. Mlecí komora může být vertikální nebo horizontální a může být vybavena míchadly různé konstrukce (Middelberg, 1995). Srovnání obou provedení mlecí komory je na obrázku (Obr. 9). Z obou verzí je běžnější horizontální provedení (de Carvalho et al., 2017). Existují také verze, kde jsou buňky lyzovány třepáním suspenze s kuličkami (Goldberg, 2008). Nedosahují však efektivity mlýnů, ve kterých jsou kuličky míchány (D'Hondt et al., 2017).



Obr. 9: Schematická reprezentace dvou typů mlecí komory a) Vertikální mlecí komora b) Horizontální mlecí komora. Upraveno podle (Gomes et al., 2020).

Buňky jsou rozbíjeny silami způsobenými pohybem kuliček v mlecí komoře (Günerken et al., 2015) nebo drceny mezi kolidujícími kuličkami (Rahman et al., 2022). Spolu s buněčnou suspenzí jsou kuličky míchány vysokou rychlostí (Shehadul Islam et al., 2017), což dále podporuje narušení buněk (Corrêa et al., 2021). Správná velikost kuliček je kritická pro účinnost narušení buněk (Corrêa et al., 2021). Velké kuličky nejsou účinné, kvůli malému povrchu, kde dochází ke srážkám. Naopak příliš malé kuličky postrádají setrvačnost, a tak nemají dostatečnou sílu pro rozbití buněk (Tanaka, 2015). Optimální velikost je 0,1 mm pro bakterie a okolo 0,5 mm pro mikrořasy a různé živočišné buňky (Lee et al., 2012). Pro lýzu sinic jsou podobně účinné obě varianty i velikosti mezi nimi (Ivleva & Golden, 2007; Kim et al., 2009). Nejvyšší účinnosti lze dosáhnout, když se kuličkami naplní objem komory na 85 % (Doucha & Lívanský, 2008). Účinnost lýzy taktéž ovlivňuje i materiál použitých kuliček. Nejběžnější jsou kuličky ze zirkonu a kuličky ze skla (Lee et al., 2012). Dalšími používanými materiály pro kuličky jsou keramika a ocel (Shehadul Islam et al., 2017).

Nevýhodou metody je produkce tepla způsobeného třením (Wang et al., 2020). Vybavení mlecí komory chladicím systémem může předejít denaturaci proteinů a jiných molekul citlivých na teplo (Postma et al., 2015). Po ukončení mletí je nutné oddělit kuličky od buněčné suspenze sedimentací pro opětovné použití (Balasundaram et al., 2012; Wang et al., 2020). Kuličky s větší hustotou se od suspenze oddělují snadněji (Lee et al., 2012).

2.2.5 Ultrazvuk

Další z mechanických metod lýzy je ultrazvuk. Způsobuje rozpad všech buněčných membrán (Azencott et al., 2007). Metoda je velmi oblíbená na laboratorní úrovni (de Carvalho et al., 2017). Buňky jsou vystaveny smykovým silám v kapalině, které jsou způsobené ultrazvukovými vlnami o vysokých frekvencích (Wang et al., 2020).

Během ošetření ultrazvukem jsou buňky narušovány vícero způsoby. Jedním z nich je akustická kavitace (Günerken et al., 2015). Kavitace je proces, při kterém dochází k vícenásobné tvorbě mikrobublin na nukleačních místech v kapalině. Bubliny postupně narůstají až do dosažení kritické velikosti, kdy dojde k jejich implozi. Při kolapsu bublin se uvolní obrovské množství energie, která v podobě rázové vlny projde buněčnou suspenzí a způsobí narušení buněk (Saranya et al., 2014). Vytváří se také mikrooblasti s extrémně vysokou teplotou a tlakem až 100 MPa (Günerken et al., 2015). Během kavitace dochází taktéž k termolýze vody v okolí bublin a k tvorbě vysoce reaktivních volných radikálů (H^{\bullet} , HO^{\bullet} , HOO^{\bullet}) způsobujících narušení BS (Riesz et al., 1985).

Hlavními parametry ovlivňujícími účinnost sonikace jsou použitá frekvence, síla (W), koncentrace buněčné suspenze, teplota a délka expozice (Wu et al., 2015; Tanaka, 2015; Bhilare et al., 2019). Nevýhodou ultrazvuku je lokální zahřívání i celková produkce tepla ve vzorku (Günerken et al., 2015). Sheng et al. (2012) prováděli extrakci lipidů ze sinice *Synechocystis* PCC 6803 a zjistili, že kontrolování teploty během sonikace může zlepšit kvalitu extrahovaných produktů, ale znatelně sníží účinnost buněčné lýzy.

2.2.6 Pulzní elektrické pole

Pulzní elektrické pole (PEF) je metoda založená na vystavení biomasy krátkým impulzům (μs až ms) vysokého napětí ($10\text{--}50\text{ kV}\cdot\text{cm}^{-1}$) (Mahnič-Kalamiza et al., 2014). Na rozdíl od ostatních mechanických metod nezpůsobuje kompletní rozpad buňky, ale pouze permeabilizuje CM (Azencott et al., 2007). Je tak umožněno selektivní získání molekul, které mohou projít skrze CM (Postma et al., 2016).

Účinnost PEF je silně závislá na operačních podmínkách. Velký vliv má druh rozpouštědla, dávkování, teplota a konduktivita média (Lee et al., 2017). V závislosti na zvolených parametrech může být elektropermeabilizace vratná či nevratná (Buchmann et al., 2019) v případě aplikování příliš silného elektrického pole (Günerken et al., 2015). Vratná se používá na vsunutí molekul do buňky (Buchmann et al., 2019; Scherer et al., 2019). Metoda sama o sobě není vhodná pro úplnou extrakci proteinů (Soto-Sierra et al., 2018).

2.2.7 Mikrovlnné ozařování

Mikrovlnné záření odpovídá vlnové délce 300 MHz až 30 000 MHz (D'Hondt et al., 2017). Pro lýzu buněk se používá hlavně frekvence 2450 MHz, která je známá pro svou vhodnost ohřívat materiály obsahující vodu (Günerken et al., 2015). Teplo v buněčné suspenzi je způsobeno vibracemi a rotacemi dipolárních molekul a iontů v elektromagnetickém poli (Biller et al., 2013). K buněčné lýze dochází díky obrovskému tlaku způsobenému rychlým zahříváním a následné evaporaci vody uvnitř buněk (Ma et al., 2014). Metoda je využitelná pro extrakci lipidů (Balasubramanian et al., 2011; Zheng et al., 2011; Piasecka et al., 2014) a cyanotoxinů (Metcalf & Codd, 2000).

2.2.8 Zmrazování a rozmrazování

Jednoduchá metoda, jejímž principem je série zmrazovacích a rozmrazovacích cyklů (D'Hondt et al., 2017). Zmrazení probíhá pomalu při teplotách -15 až -80 °C (Dixon & Wilken, 2018). Když jsou buňky zmrazeny, voda v nich vytvoří krystalky, které mají větší objem než původní buněčný obsah. Díky snížené elasticitě zmrzlé buňky vytvoří tlak ledu v BS póry (Tanaka, 2015). Buňky jsou po několika hodinách v mrazu opět rozmrazeny. Postupným opakováním cyklů narůstá množství pórů v BS a intracelulární obsah může přejít do extrakčního pufu (Tavanandi et al., 2018). Z důvodu časové náročnosti a energetické nákladnosti je metoda aplikována spíše na laboratorní úrovni. Uplatnitelná je hlavně pro získání termolabilních molekul jako jsou např. enzymy (Dixon & Wilken, 2018).

2.2.9 Lyofilizace

Lyofilizace neboli sušení mrazem je metoda, během které jsou buňky nejprve pomalu zmrazeny a následně vystaveny nízkému tlaku cca 1 kPa při -40 °C. Pomalé zmrazení umožní tvorbu větších ledových krystalků, které vytvoří póry v buněčné stěně (D'Hondt et al., 2017). Následné vystavení nízkému tlaku zapříčiní sublimaci krystalků a buňky jsou pomalu dehydratovány (Lee et al., 2012). V lyofilizátoru se buňky ponechávají 24 h (Morist et al., 2001) nebo i několik dní (Unterlander et al., 2017). Metoda je užitečná pro práci s proteiny i enzymy, které nesnesou teplo (Lee et al., 2012). Nabízí se i možnost využít lyofilizaci jako předúpravu pro jiné metody jako ultrasonikace nebo třepání s kuličkami a získat lepší výtěžnost proteinů (Unterlander et al., 2017). Metoda je však energeticky i časově náročná (Lee et al., 2012).

2.2.10 Tepelné narušení

Mezi metody využívající teplo patří termolýza, autoklávování a exploze páry (Corrêa et al., 2021). U termolýzy a autoklávování je buněčná lýza způsobena denaturací membránových proteinů dodaným teplem (Shehadul Islam et al., 2017). Metody se netěší vysoké účinnosti, navíc jsou energeticky náročné a jejich použitelnost je omezena pro extrakci tepelně odolných molekul (Corrêa et al., 2021).

Během exploze páry jsou buňky vystaveny vysoké teplotě a tlaku po dobu 5–60 min. (Lorente et al., 2015; D'Hondt et al., 2017). Buňky jsou lyzovány prudkým poklesem tlaku při jeho uvolnění (Nurra et al., 2014). Exploze páry při 150 °C přinesla ve studii Lorente et al. (2015) nejlepší výsledky při extrakci lipidů ve srovnání s ultrazvukem, mikrovlnným ozařováním a autoklávováním.

2.2.11 Chemická lýza

Buňky lze lyzovat i celou řadou chemických metod. Patří mezi ně kyseliny, chelatační činidla, detergenty, chaotropní činidla, rozpouštědla, zásady nebo chlornany, které svou interakcí s buněčnou membránou způsobují její oslabení (Middelberg, 1995). Uvedené látky působí různými mechanismy (Günerken et al., 2015) a mohou být selektivnější než mechanické metody, díky specifickým interakcím se složkami BS (D'Hondt et al., 2017).

2.2.11.1 Kyseliny a zásady

Alkalýza je jednoduchá lyzační metoda spočívající v saponifikaci lipidů BS nejčastěji za pomoci NaOH nebo KOH. Bázi lze rozpustit ve vodě nebo alkoholu. Většinou jde o methanol, ethanol nebo isopropanol. Metoda je agresivní vůči proteinům, kvůli vysokému pH (de Carvalho et al., 2017). Běžně používaný pH rozsah je 10–12,5 (Harrison, 1991), ale při použití koncentrované báze může být i vyšší než 13 (de Carvalho et al., 2017). Většina proteinů není schopna za těchto podmínek zachovat své funkční vlastnosti (Harrison, 1991; Günerken et al., 2015). V laboratořích je alkalýza často využívána při extrakci plazmidové DNA (Middelberg, 1995; Chamsart & Karnjanasorn, 2007).

Kyseliny se většinou využívají jako předúprava pro další metody. Nejčastěji je využívána H₂SO₄. Proceduru lze provádět za ambientní teploty, ale většinou se směs zahřívá (D'Hondt et al., 2017). Vyšší reakční teploty vedou k vyššímu stupni narušení buněk (Halim et al., 2012; Günerken et al., 2015). Ošetření kyselinami může vést k degradaci extrahovaných molekul (Günerken et al., 2015).

2.2.11.2 Detergenty

K detergentní lýze lze využít celou řadu detergentů, které se svou povahou dělí na iontové, neiontové a zwiterionové (Brown & Audet, 2008). Detergenty způsobují solubilizaci fosfolipidové dvouvrstvy buněčné membrány (Helenius & Simons, 1975). Mezi nejpoužívanější detergenty patří dodecylsírán sodný (SDS), silný iontový detergent, schopný zajistit buněčnou lýzu v řádu sekund. Nevýhodou je jím způsobená denaturace proteinů (Brown & Audet, 2008). Pro práci s nimi mohou být vhodnější mírnější neiontové detergenty jako Triton X-100 nebo Tween-20, které sice lyzují buňky pomaleji, ale mají mnohem nižší tendence je denaturovat (Brown & Audet, 2008; Gomes et al., 2020).

Kvůli komplexnosti buněčné stěny sinic je lýza samotnými detergenty málo účinná (Kim et al., 2009). Vnější S-vrstva buněčné stěny je proti nim odolná (Nixdorff et al., 1978). Jejich využití je převážně asistence při buněčné lýze v kombinaci s dalšími metodami (Middelberg, 1995; Mehta et al., 2015).

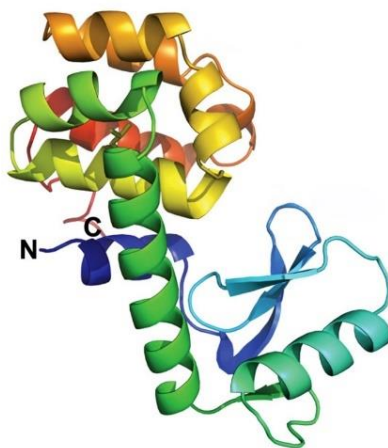
2.2.12 Enzymová lýza

Alternativou pro mechanické a chemické metody je použití enzymů, které spadají pod biologické metody lýzy. Jejich hlavní předností je vysoká specifita (Shehadul Islam et al., 2017). Enzymy mohou buňku lyzovat zcela nebo jen z části (Wang et al., 2020).

Mezi nejvíce užívanými enzymy pro buněčnou lýzu sinic je lysozym (EC 3.2.1.17) (Mehta et al., 2015) patřící do skupiny peptidoglykanových hydrolas. Úlohou lysozymu je štěpení β -1,4-glykosidové vazby v peptidoglykanu (Vollmer et al., 2008b), který je významnou složkou BS sinic, jak bylo uvedeno v kapitole (Buněčná stěna).

Nejpoužívanější variantou lysozymu je forma pocházející z vaječného bílku kuřat (hen egg white lysozyme, HEWL). Další významnou variantou, která je zobrazena na obrázku (Obr. 10), je lysozym T4 z bakteriofága. Optimální pH pro lysozym je 6–7 a optimální teplota 35 °C (Andrews & Asenjo, 1987).

Lysozomy jsou velmi účinné vůči gram-pozitivním bakteriím, méně však vůči gram-negativním, u kterých je, stejně jako u sinic, přístup k peptidoglykanové vrstvě blokován vnější membránou a S-vrstvou (Geciova et al., 2002; Salazar & Asenjo, 2007). Řešením je doplnění lyzační směsi o další látky jako chelatační činidla či detergenty (Salazar & Asenjo, 2007).



Obr. 10: Struktura lysozymu T4 se znázorněným N a C koncem. Převzato a upravenou podle (Baase et al., 2010).

2.2.13 Předchozí studie

Výše popsané chemické a enzymové metody kvůli komplexnosti BS sinic působí nejlépe v kombinaci, jak ukazuje komplexní chemická směs pro lýzu sinic podle Mehty et al. (2015). Jejich optimální chemická směs způsobila kompletní lýzu téměř všech buněk v suspenzi a vedla si lépe než lýza za použití skleněných kuliček. Její účinnost byla ověřena u 3 druhů sinic. Navržená směs pro lýzu se skládá z lysozymu T4 v koncentraci $10 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ pro degradaci peptidoglykanové vrstvy, detergentů C7Bz0 0,2% (w/v) a SB3-14 2% (w/v) pro permeabilizaci CM, sperminu v koncentraci $400 \mu\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ pro vnější membránu a $200 \text{mmol}\cdot\text{l}^{-1}$ DTT (dithiotreitol), který působí na vnější S-vrstvu.

Další studii vedli Kim et al. (2009), kteří extrahovali Mikrocytin-LR ze sinice *Microcystis aeruginosa* a srovnávali i účinnost jednotlivých použitých lyzačních metod. Účinnost lýzy byla stanovena pozorováním buněk pod hemocymetrem. Velmi dobrých výsledků $>90\%$ dosáhla lyofilizace v methanolu i v destilované vodě. Nejlepší účinnost, a to dokonce 99%, prokázala homogenizace skleněnými kuličkami o průměru 0,5 mm. Použití ultrazvuku zvládlo rozbít 73 % buněk. Posledními použitými metodami bylo opakované zmrazování a rozmrazování a 1% (v/v) Triton X-100. Ani jedna z těchto metod však nepřinesla uspokojivé výsledky.

2.3 Extrakce proteinů

Pro úspěšnou extrakci je zapotřebí zvolit vhodný organický zdroj proteinů a vhodné extrakční podmínky (Pingoud et al., 2002). Užitím vyššího pH lze uvolnit více proteinu, ale zachovává si méně funkčních vlastností. Naopak solubilizace při pH <7 může přinést menší výtěžek s vyšší funkčností (Ursu et al., 2014). Okyselení supernatantu přidáním HCl nebo kys. trichloroctové umožní vysrážení proteinů (Barbarino & Lourenço, 2005; Safi et al., 2014). Extrakce proteinů je obvykle následována centrifugací, kde se odstředivou silou odstraní pevné buněčné zbytky a zůstane fáze obsahující extrahované bílkoviny (supernatant) (Soto-Sierra et al., 2018). Zlepšení extrakce před centrifugací lze dosáhnout inkubací lyzovaných buněk při pH 12 pro maximální rozpustnost proteinů (Safi et al., 2014).

Po extrakci je třeba dalšího zpracování pro dosažení požadované čistoty a koncentrace (Soto-Sierra et al., 2018).

Ve srovnávací studii Fieldové et al. (2017) byla pro proteinovou extrakci ze sinic nejúčinnější jejich lehká modifikace metody IV od Barbarinové a Lourença (2005). Extrakční proces spočíval v inkubaci zmrzlých vzorků v dvakrát destilované vodě při 4 °C po dobu 24 h a následné homogenizaci ručním elektrickým homogenizérem. Vzorek byl centrifugován 20 min. při 15 000 g s následnou resuspendací 100 mmol·l⁻¹ NaOH s 0,5% β-merkptoethanolem (v/v) na rotační míchačce (Field et al., 2017).

2.3.1 Stabilizace proteinů

Během lýzy se naruší vnitřní prostředí buňky a může docházet k nekontrolované enzymové aktivitě. Hlavní problém mohou představovat uvolněné proteasy, enzymy štěpící proteinové řetězce (Deutscher, 1990). Nežádoucí degradaci proteinů během extrakce lze omezit udržováním vzorků při nízké teplotě nebo užití pufrů o pH vyšší než 9. Některé proteasy jsou odolné vůči denaturaci a zamezení jejich aktivity lze docílit přidavkem inhibitorů proteas (Shen, 2019). Buňky obsahují proteasy několika tříd, a proto je vhodné přidat inhibitory ve směsi, v níž každá složka cílí na jinou třídu (Pingoud et al., 2002). Používané inhibitory proteas spolu s jejich cílovým určením a běžně používanou koncentrací jsou uvedeny v tabulce (Tab. 2).

Metabolickou aktivitou může také dojít ke snížení pH v médiu (např. glykolýzou). Změně pH lze předejít použitím pufrů, které udržují stabilní koncentraci solí a pH. Často užívané pufrů jsou např. na bázi tris(hydroxymethyl)aminomethanu (Tris) (Pingoud et al., 2002; Anjos et al., 2022).

Tab. 2: Běžně používané inhibitory proteas (Deutscher, 1990; Pingoud et al., 2002)

Inhibitor proteasy	Cílové proteasy	Používané koncentrace
EDTA a EGTA	metaloproteasy	5 mmol·l ⁻¹
Benzamidin	Serinové	1 mmol·l ⁻¹
Aprotinin	Serinové	1 mg·ml ⁻¹
Fenylmethylsulfonyl fluorid (PMSF)	Serinové	1 mmol·l ⁻¹
Pepstatin	Aspartátové	0,1 mg·ml ⁻¹
Anipain	Cysteinové	1 mg·ml ⁻¹
Leupeptin	Cysteinové	1 mg·ml ⁻¹

2.4 Extrakce lipidů

Sinice mohou mimo vysoký proteinový obsah nabídnout také vysoký obsah lipidů (Passos et al., 2023). Velké popularitě se těší rod *Synechocystis* ve spojení s produkcí biopaliv, která lze vyrábět z mastných kyselin a intracelulárních lipidů těchto sinice (Sheng et al., 2011; Farrokh et al., 2019).

Pro extrakci lipidů jsou stále standardem extrakční postupy založené na metodách Bligha a Dyera (1959) a Folche et al. (1957). Obě jsou založeny na extrakci do chloroformu a methanolu. V současné době je snaha o jejich modifikaci nebo nalezení alternativních méně toxických rozpouštědel se stejnou účinností (Saini et al., 2021). Mezi úspěšné modifikace těchto dvou metod patří extrakce do *n*-hexanu a isopropanolu (3:2 v/v) (Hara & Radin, 1978), nebo isopropanol, cyklohexan a voda (8:10:11 v/v/v) (Smedes, 1999).

Pro dehydratované vzorky je stále velmi rozšířená Soxhletova extrakce (Saini et al., 2021). Další cestou mohou být více ekologická rozpouštědla jako jsou např. superkritický oxid uhličitý (Solana et al., 2014), D-limonen nebo p-cymen (Kumar et al., 2017). Ve srovnání s běžnými rozpouštědly však jejich použití nejsou cenově výhodná (Saini et al., 2021).

Studie Shenga et al. (2011) ukazuje, že pro lipidovou extrakci ze sinice *Synechocystis* PCC 6803 mohou být, mimo dvě výše zmíněné metody založené na chloroformu, účinné taktéž extrakce do methanolu, methanolu v kombinaci s methyl-*tert*-butyletherem a přímá trans-esterifikace bez předextrakce.

Mimo extrakci do organických rozpouštědel jsou uplatnitelné taktéž isotonická extrakce, ultrazvukem asistovaná extrakce, extrakce za pomoci mikrovln nebo PEF asistovaná extrakce (Ranjith Kumar et al., 2015; Rahman et al., 2022).

3 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

3.1 Materiál a vybavení

3.1.1 Biologický materiál

Sinice *Synechococcus Sp. UPOC S3* a *Synechococcus Sp. UPOC S4* ze Sbírký fytopatogenních mikroorganismů UPOC byly získány od doc. Petra Hašlera z Katedry botaniky Univerzity Palackého ve formě zmrazených buněk neznámého množství ve čtyřech 50 ml centrifugačních zkumavkách.

3.1.2 Chemikálie

2-merkptoethanol (Sigma-Aldrich, USA)

Akrylamid (AA, Bio-Rad, USA)

BCA činidlo A (Sigma-Aldrich, USA)

Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva, Německo)

Dihydrát citronanu sodného (Fluka, Švýcarsko)

Dihydrogenfosforečnan draselný (Sigma-Aldrich, USA)

DNasa I (Sigma-Aldrich, USA)

Dodecylsírán sodný (Serva, Německo)

Ethanol p.a. (Lach-Ner, Česká republika)

Fenylmethylsulfonyl fluorid (Sigma-Aldrich, USA)

Glycerol (Lach-Ner, Česká republika)

Glycin (Lach-Ner, Česká republika)

Hydrogenfosforečnan draselný (Lach-Ner, Česká republika)

Hovězí sérový albumin (BSA; Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid draselný (Sigma-Aldrich, USA)

Chlorid hořečnatý (Fluka, Švýcarsko)

Chlorid sodný (Lach-Ner, Česká republika)

Kyselina ethylendiamintetraoctová, dvojsodná sůl (EDTA; Sigma-Aldrich, USA)

Kyselina octová (Merck, Německo)

Kyselina orthofosforečná 85% (Lach-Ner, Česká republika)

Laemmliho vzorkový pufr (Sigma-Aldrich, USA)

Lysozym ze slepičího vaječného bílku (Sigma-Aldrich, USA)

Methanol (Lach-Ner, Česká republika)

Monohydrát kyseliny citronové (Lach-Ner, Česká republika)
N-butanol (Merck, Německo)
N,N'-methylenbisakrylamid (BIS; Bio-Rad, USA)
N,N,N',N'-tetramethylethyldiamin (TEMED; Bio-Rad, USA)
Octan sodný, bezvodý (Fluka, Švýcarsko)
Pentahydrát síranu měďnatého (Lach-Ner, Česká republika)
Persíran amonný (APS; Bio-Rad, USA)
Precision Plus Protein™ Standards (Bio-Rad, USA)
Sacharosa (Fluka, Švýcarsko)
Síran amonný (Lach-Ner, Česká republika)
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (Tris; Sigma-Aldrich, USA)
Triton X-100 (Bio-Rad, USA)

3.1.3 Materiál a přístrojové vybavení

Analytické váhy XA 110/2X (Radwag, Polsko)
Automatické pipety (Eppendorf, Německo)
Homogenizátor FastPrep-24™ (MP Biomedicals, USA)
Inkubátor Dry Bath (Major Science, USA)
Inkubátor Thermomixer comfort (Eppendorf, Německo)
Magnetická míchačka Big-Squid (IKA WERKE, Německo)
Magnetická míchačka M2-D PRO (Chromservis, Česká republika)
Minicentrifuga FC5306 (Ohaus, USA)
Minicentrifuga Mikrospin 12 (Biosan, Lotyšsko)
Mikrocentrifuga Microstar 17R (VWR, USA)
Přesné váhy Pioneer Analytical (Ohaus, USA)
Skener PowerLook 1120 USG (Umax, USA)
Spektrofotometr Lightwave II (Biochrom, Velká Británie)
Stolní pH metr pH50 (XS Instruments, Itálie)
Ultrazvuková lázeň K-5LM (Kraintek, Česká republika)
Vortex CHS (Chromservis, Česká republika)
Vývěva (KNF Laboport, Německo)
Zařízení pro elektroforézu Mini Protean (Bio-Rad, USA)
Zdroj pro elektroforézu PowerPac Universal (Bio-Rad, USA)

Běžné laboratorní vybavení: kádinky, odměrné válce, stříčka, Petriho misky, odsávací baňka, nůžky, mikrozkuhavky, špičky, spektrofotometrické kyvety (Brand, Německo)

3.1.4 Použitý software

Microsoft Office 365, LabScan 5.0, Adobe Lightroom Classic v13.2, GelAnalyzer 23.1.1

3.2 Metody

V rámci práce bylo použito několik extrakčních postupů. Pro analýzu koncentrace proteinů v extraktech bylo použito spektrofotometrické metody s kyselinou bicinchoninovou (BCA). Extrakty byly taktéž analyzovány pomocí elektroforézy v polyakrylamidovém gelu v prostředí dodecylsírany sodného (SDS-PAGE). Vyhodnocení výsledků bylo provedeno v programu GelAnalyzer a Microsoft Excel.

3.2.1 Zpracování sinic

Všechny vzorky sinic (*S3* i *S4* varianty) byly zpracovány následujícím způsobem: Zamražený vzorek sinice *Synechococcus* byl rozmrazen, suspendován v 5 ml deionizované vody a alikvotně rozdělen do mikrozkuhovek po 0,6 ml ($35,8 \pm 7,8$ mg buněk). Buněčná suspenze byla centrifugována 3 min. při 10000 g. Supernatant byl odebrán a získané pelety byly extrahovány v 0,5 ml níže uvedených pufrů pomocí několika extrakčních variant.

3.2.2 Extrakce ultrazvukem s detergenty a lysozymem

Pro extrakci byl nejprve připraven lyzační pufr na bázi Tris, upravený pomocí HCl na hodnotu pH 8,0. Použité chemikálie a jejich koncentrace a jsou uvedeny v tabulce (Tab. 3). Před použitím pufru byly přidány DNasa I (deoxyribonukleasa I – EC 3.1.21.1) v množství $2 \text{ UI} \cdot \text{ml}^{-1}$, PMSF (výsledná koncentrace $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$, připraven ředěním zásobního roztoku v ethanolu 100×) a detergenty SDS, nebo Triton X-100. Polovina vzorků byla doplněna o lysozym v koncentraci $1 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$.

Buňky sinice *S3* byly extrahovány ve variantách lyzačního pufru (Tab. 4) vložím na 5 min. do ultrazvuku. Po ošetření ultrazvukem byly vzorky vloženy do inkubátoru nastaveného na 37 °C, kde byly ponechány 2 h, nebo 18 h. Po ukončení inkubace byly vzorky pro odstranění buněčných zbytků centrifugovány 3 min. při 10000 g a bylo odebráno 100 µl extraktu pro analýzu SDS-PAGE.

Tab. 3: Chemikálie pro přípravu 1000 ml lyzačního pufru

Chemikálie	Koncentrace
Tris	50 mmol·l ⁻¹
NaCl	150 mmol·l ⁻¹
MgCl ₂	5 mmol·l ⁻¹
EDTA	1 mmol·l ⁻¹
β-merkptoethanol	2 mmol·l ⁻¹
Glycerol	1% (v/v)
Deionizovaná voda	Doplnění do 1000 ml celkového objemu

Tab. 4: Varianty proteinové extrakce s detergenty

Detergent (v/v)	Lysozym (1 mg·ml ⁻¹)	Délka inkubace
1% (w/v) SDS	Ano	2 h
1% (w/v) SDS	Ne	2 h
1% (w/v) SDS	Ano	18 h
1% (w/v) SDS	Ne	18 h
0,5% (v/v) Triton X-100	Ano	2 h
0,5% (v/v) Triton X-100	Ne	2 h
0,5% (v/v) Triton X-100	Ano	18 h
0,5% (v/v) Triton X-100	Ne	18 h

3.2.3 Extrakce ultrazvukem za nativních podmínek

Pro tuto extrakční variantu byly použity 2 druhy pufrů: Draselný fosfátový pufr (KPB) o koncentraci 0,1 mol·l⁻¹, pH 7,0, a 50 mmol·l⁻¹ pufr na bázi Tris s 30% (w/v) sacharosou a dalšími složkami (TS pufr). Složení TS pufru je uvedeno v tabulce (Tab. 5). TS pufr byl na požadovanou hodnotu pH 8,0 upraven pomocí HCl. Před použitím byl pufr doplněn o PMSF (výsledná koncentrace 1 mmol·l⁻¹). Zásobní roztok PMSF byl připraven v ethanolu a ředěn 100× stejně jako v případě první extrakční varianty. KPB byl připraven ze zásobního roztoku 0,2 mol·l⁻¹ naředěním deionizovanou vodou v objemovém poměru 1:1 s kontrolou výsledného pH (7,0). Zásobní roztok 0,2 mol·l⁻¹ KPB (pH 7,0) byl připraven ze směsi hydrogenfosforečanu draselného a dihydrogenfosforečanu draselného.

Celkem čtyři vzorky sinice *S3* byly extrahovány v příslušných pufrech. První dva vzorky byly umístěny do ultrazvuku na 5 min., po kterých následovalo 5 min. chlazení v ledu. Zbylé dva vzorky absolvovaly tento cyklus 3×. Všechny čtyři varianty jsou popsány v tabulce (Tab. 6). Po skončení cyklů bylo od všech vzorků odebráno 100 μl pro SDS-PAGE analýzu a vzorky byly umístěny na 2 h do inkubátoru nastaveného na 37 °C. Po ukončení inkubace byly vzorky centrifugovány 3 min. při 10000 g a opět bylo od všech vzorků odebráno 100 μl pro SDS-PAGE.

Tab. 5: Chemikálie pro přípravu 200 ml lyzačního TS pufru (pH 8,0)

Chemikálie	Množství
Sacharosa	30% (w/v)
Tris	50 mmol·l ⁻¹
KCl	100 mmol·l ⁻¹
EDTA	5 mmol·l ⁻¹
PMSF	1 mmol·l ⁻¹
Deionizovaná voda	Doplnění do 200 ml celkového objemu

Tab. 6: Varianty extrakce v ultrazvuku

Použitý pufr	Doba v ultrazvuku
0,1 mol·l ⁻¹ KPB	1× 5 min.
0,1 mol·l ⁻¹ KPB	3× 5 min.
50 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl pufr s 30% sacharosou	1× 5 min.
50 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl pufr s 30% sacharosou	3× 5 min.

3.2.4 Extrakce v homogenizátoru FastPrep-24™

Extrakce byla provedena u dvou vzorků *S3* pomocí kuličkového homogenizátoru FastPrep-24™. První vzorek byl extrahován v 0,1 mol·l⁻¹ KPB (pH 7,0) a druhý v TS pufru (pH 8,0). Oba pufrы pocházejí z předchozí extrakční varianty. Vzorky byly vloženy do homogenizátoru a třepány 1 min. se zirkonovou kuličkou o průměru 2 mm. Po ukončení extrakce byly vzorky centrifugovány 3 min. při 10000 g. Ze získaných extraktů bylo následně odebráno 100 μl pro SDS-PAGE analýzu.

3.2.5 Extrakce v pufru s SDS bez ultrazvuku

Vzorek sinice *S3* byl v 0,1 mol·l⁻¹ KPB (pH 7,0) doplněném o 1% (w/v) SDS umístěn na 2 h do inkubátoru nastaveného na 37 °C. Spolu s ním byl ke dvouhodinové inkubaci umístěn taktéž vzorek *S3* v čistém 0,1 mol·l⁻¹ KPB (pH 7,0). Tento vzorek sloužil jako negativní kontrola lýzy buněk. Po ukončení inkubace byly oba vzorky centrifugovány 3 min. při 10000 g. Z extraktů pak bylo odebráno 100 μl pro SDS-PAGE analýzu.

3.2.6 Extrakce ultrazvukem v pufrech při různém pH

Pro otestování vlivu pH na proteinovou extrakci byly vzorky sinice *Synechococcus S4*, podrobeny extrakci ultrazvukem v pufrech o pH 3–9. Použit byl pufr citrátový (pH 3,0), acetátový (pH 4,0 a 5,0), KPB (pH 6,0 a 7,0) a Tris-HCl (pH 8,0 a 9,0). Všechny byly připraveny o objemu 50 ml a koncentraci 100 mmol·l⁻¹. Použité látky pro přípravu jednotlivých pufrů jsou uvedeny v tabulce (Tab. 7). KPB byl připraven stejným způsobem, jako v předchozích extrakčních variantách, naředěním zásobního roztoku deionizovanou

Tab. 7: Chemikálie pro přípravu pufrů o různém pH

Pufr	Množství
100 mmol·l ⁻¹ citrátový pufr (pH 3,0)	90,6 mmol·l ⁻¹ monohydrát kyseliny citronové 9,4 mmol·l ⁻¹ citrát sodný
100 mmol·l ⁻¹ acetátový pufr (pH 4,0)	77,3 mmol·l ⁻¹ kyselina octová 22,7 mmol·l ⁻¹ octan sodný
100 mmol·l ⁻¹ acetátový pufr (pH 5,0)	67,3 mmol·l ⁻¹ kyselina octová 32,7 mmol·l ⁻¹ octan sodný
100 mmol·l ⁻¹ Tris-HCl (pH 8,0; 9,0)	100 mmol·l ⁻¹ Tris

vodou. Všechny pufrы byly následně upraveny na požadované pH pomocí HCl nebo NaOH. Extrakce byla provedena se vzorky v jednotlivých pufrách vložením do ultrazvuku na dobu 5 min., po které následovalo ohlazení v ledu a centrifugace při 10000 g. Ze získaných extraktů bylo odebráno 100 μl pro SDS-PAGE analýzu.

3.2.7 Extrakce ultrazvukem v různých koncentracích pufru

Pro tuto extrakci byly použity buňky sinice *S4*. Nejprve byl připraven Tris-HCl pufr o pH 8,0 v koncentracích 50, 100, 150 a 200 mmol·l⁻¹. Pufrы byly upraveny na pH 8,0 pomocí HCl. Vzorky byly vloženy na 5 min. do ultrazvukové lázně, následně ochlazeny v ledu a centrifugovány při 10000 g po dobu 3 min. a z extraktů bylo odebráno 100 μl pro SDS-PAGE analýzu.

3.2.8 SDS-PAGE

SDS-PAGE byla provedena na 1 mm deskových gelech v diskontinuálním uspořádání podle Laemmliho (Laemmli, 1970). Všechny gely byly provedeny dvakrát. V tabulce (Tab. 8) jsou uvedena použitá množství jednotlivých složek pro zaostřovací a separační gel. Nejprve byl připraven separační gel. Před přidáním SDS, TEMED a APS byly složky v odsávací baňce odvětrány pomocí vývěvy. Po přidání zbylých složek a zahájení polymerace byla směs nalita mezi skla, převrstvena vodou nasyceným butanolem a ponechána k polymeraci. Po ukončení polymerace separačního gelu byl stejný proces opakován se zaostřovacím gelem s tím rozdílem, že místo převrstvení butanolem byly do gelu zasunuty hřebínky pro 10 jamek. Po zatuhnutí gelu byly hřebínky vytaženy a skla přemístěna do elektroforetické nádoby s elektrolytem (0,025 mol·l⁻¹ Tris; 0,192 mol·l⁻¹ glycin; 0,1% SDS).

Vzorky pro SDS-PAGE byly připraveny následujícím způsobem: 100 μl získaných extraktů bylo smícháno 1:1 s Laemmliho vzorkovým pufrém pro SDS-PAGE. Vzorky byly povařeny 7 min. při 100 °C, ochlazeny v ledové lázni a zcentrifugovány.

Tab. 8: Materiál pro přípravu zaostřovacího a separačního gelu (rozpis na 2 gely)

Chemikálie	Zaostřovací gel (4%)	Separační gel (12%)
AA/BIS (30,8% T/2,7 % C)	0,65 ml	4,0 ml
1,5 mol·l ⁻¹ Tris-HCl pH 8,8	-	2,5 ml
0,5 mol·l ⁻¹ Tris-HCl pH 6,8	1,25 ml	-
Deionizovaná voda	2,95 ml	3,2 ml
SDS (10%, w/v)	0,1 ml	0,1 ml
APS (10%, w/v)	0,06 ml	0,05 ml
TEMED	0,01 ml	0,01 ml

Tab. 9: Chemikálie pro přípravu 1000 ml barvicího roztoku (Candiano et al., 2004)

Chemikálie	Koncentrace
Kyselina fosforečná	10% (v/v)
Síran amonný	10% (w/v)
Coomassie blue G-250	1,2% (w/v)
Methanol	20% (v/v)
Deionizovaná voda	Doplnění do 1000 ml

Na gel bylo nanášeno 30 μ l vzorku. Použité standardy byly Precision Plus Protein™ Standards a byly nanášeny v množství 7 μ l. Elektroforéza probíhala při stabilním napětí 120 V po dobu cca 1,5 h. Ukončena byla ve chvíli, kdy zóna bromfenolové modři doputovala ke spodnímu okraji gelu.

Po ukončení elektroforézy byl gel umístěn v Petriho misce na třepačku do barvicího roztoku, kde byl přes noc ponechán k barvení. Barvicí roztok byl připraven podle postupu Candiana et al. (2004) a jeho složení je uvedeno v tabulce (Tab. 9). Následující den byl gel odbarvován několik hodin v deionizované vodě a později naskenován ve skeneru PowerLook 1120 a vyhodnocen pomocí programu GelAnalyzer 23.1.1.

3.2.9 BCA metoda

Pro analýzu proteinové koncentrace v extraktech bylo použito BCA metody (Smith et al., 1985), kvůli přítomnosti detergentů v první extrakční variantě. Standard z BSA byl připraven rozpuštěním 9,94 mg BSA v 994 μ l deionizované vody a následným naředěním 10 \times na výslednou koncentraci 1 mg·ml⁻¹. Z takto naředěného roztoku byla připravena kalibrační řada standardů v množství 5–50 μ g BSA. Objemy ředěného roztoku BSA uvedené v tabulce (Tab. 10) byly pipetovány do 2 ml mikrozkušavek spolu s 2 ml BCA činidla. Objemové rozdíly mezi jednotlivými standardy byly nízké, a proto byly zanedbány.

Tab. 10: Příprava kalibračních standardů roztoku BSA

Objem zásobního roztoku BSA [μl]	Množství BSA [μg]	Objem BCA činidla [μl]
5	5	2000
10	10	2000
15	15	2000
20	20	2000
30	30	2000
40	40	2000
50	50	2000

Ze získaných extraktů byly odebrány dávky v množství 7,5–15 μl a pipetovány vždy do 2 ml pracovního roztoku BCA připraveného čerstvě smísením činidla A a B (4% roztok síranu měďnatého, w/v) v objemovém poměru 1:50. Vzorky byly ponechány 30 min. inkubovat při laboratorní teplotě. Po uplynutí inkubační doby byla u vzorků změřena absorbance při vlnové délce 562 nm. Jako blanku bylo použito čistého roztoku 2 ml BCA činidla. Měření probíhalo na spektrofotometru Lightwave II. Všechna měření, včetně standardů, byla provedena v triplicátech.

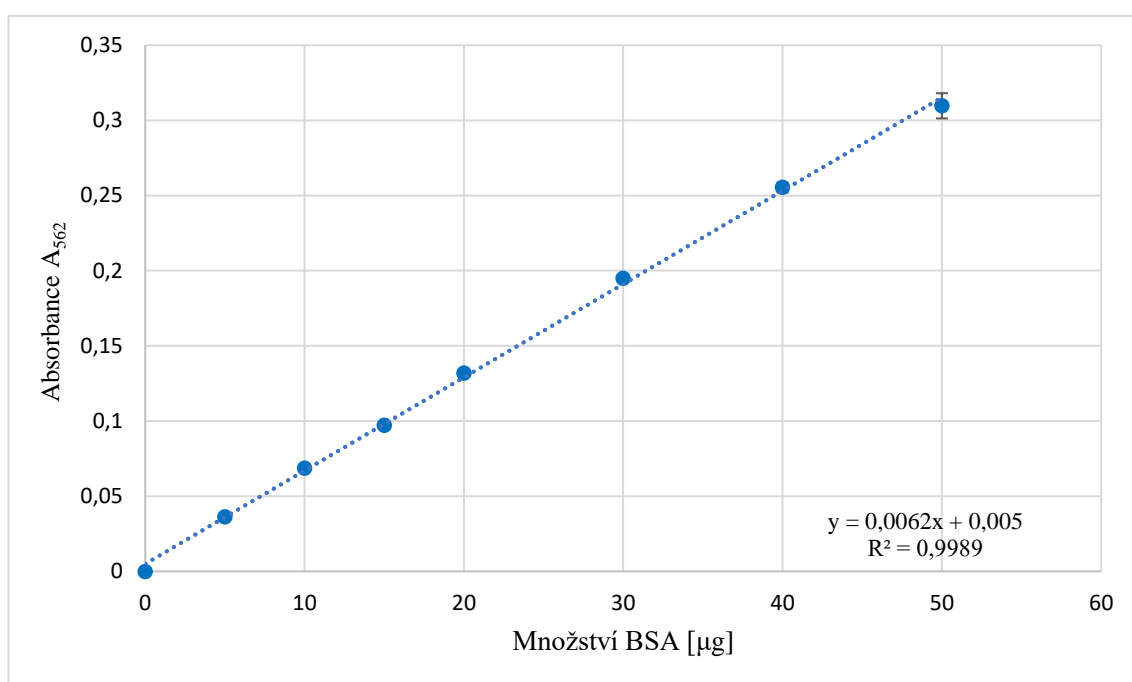
3.2.10 GelAnalyzer

Získané obrázky ze skeneru ve formátu .TIFF byly upraveny v programu Adobe Lightroom Classic, kde byly zvýšeny hodnoty kontrastu pro snadnější analýzu a soubory byly exportovány ve formátu .JPG, ve kterém byly analyzovány v programu GelAnalyzer. V samotné programu byly nejprve manuálně vyznačeny dráhy tak, aby byla co nejlépe vystihnuta jejich šířka a zakřivení. Následně byly u drah standardů vyznačeny jednotlivé proteinové pásy. A stejně tak byly vyznačeny proteinové pásy u drah se vzorky. Pozadí gelů odečítáno nebylo. Získané hodnoty intenzit byly vyhodnoceny v programu Microsoft Excel.

4 VÝSLEDKY A DISKUSE

4.1 Koncentrace proteinů

Z triplikátů BSA standardů měřených při vlnové délce 562 nm byla zprůměrováním naměřených absorbancí sestavena kalibrační přímka (Obr. 11). Z hodnot absorbancí jednotlivých extraktů, které byly získány z průměrných hodnot triplikátů, bylo získáno množství proteinů v extraktech vypočítané z rovnice kalibrační přímky $y = 0,0062x + 0,005$. Ze znalosti množství proteinů v extraktech byla určena jejich koncentrace. U vzorků, kde byl přidán lysozym, bylo z hodnot koncentrací jeho množství odečteno.



Obr. 11: Kalibrační přímka pro určení koncentrace proteinů ve vzorcích

4.2 Extrakce ultrazvukem s detergenty a lysozymem

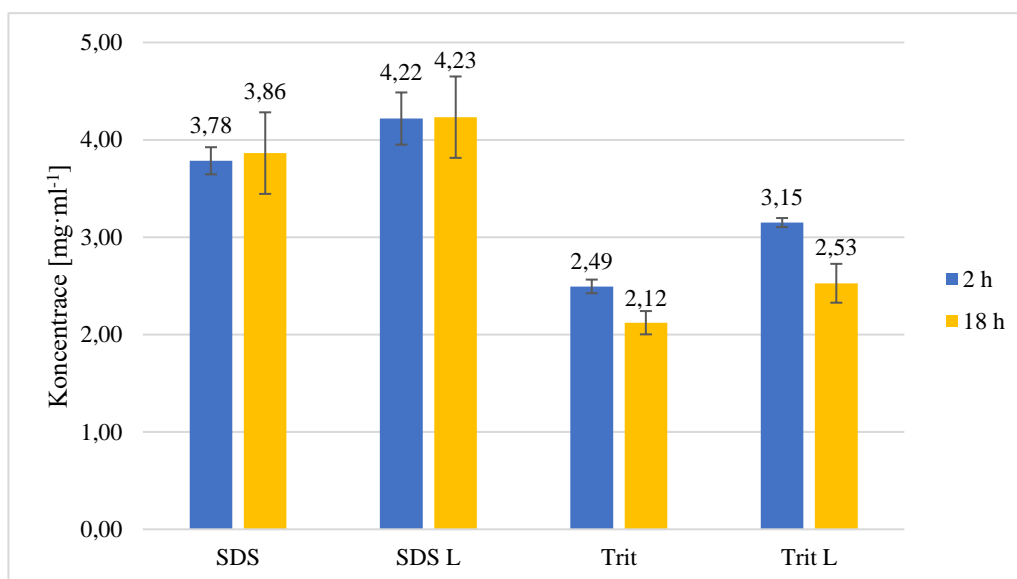
Extrakce v ultrazvuku byly provedeny za asistence detergentů a u poloviny vzorků i s přítomností lysozymu.

Vzorky jednoznačně ukazují, že účinek SDS je výrazně silnější než účinek Tritonu X-100 (Obr. 12). Nárůst proteinové koncentrace je v přítomnosti SDS značný. Nevýhodou jeho použití je denaturace proteinů a z toho vyplývající nemožnost použití v případě, kdy je třeba získat protein ve svém funkčním stavu.

Triton X-100 v tomto srovnání nepřinesl očekávané výsledky. Navíc při pohledu na následující sadu extrakcí (4.3) lze vidět téměř stejný zisk proteinů, jako ultrazvukem samotným. Je možné, že lepší výsledek by přinesla silnější koncentrace detergentu. V rámci této práce byla použita koncentrace 0,5 % (v/v). Ve dříve citované studii Kima et al. (2009) vykazoval Triton X-100 pouze 37,3% účinnost buněčné lýzy a jeho použitá koncentrace byla přitom dvojnásobná.

Extrakce po dobu 18 h přinesla zvýšení koncentrace proteinů pouze u vzorku s SDS bez lysozymu. Je to ale téměř zanedbatelný 2% nárůst, navíc pro velkou chybovou odchylku lze považovat výsledky za prakticky identické, stejně jako u vzorků s lysozymem. Pro velký rozptyl hodnot tak bude za nejlepší dosažený výsledek považována varianta extrahovaná 2 h v přítomnosti SDS a lysozymu. U obou vzorků s Tritonem X-100 došlo po delší extrakci naopak ke snížení koncentrace proteinů. Ztráta koncentrace byla 14,9 % a v případě vzorku s lysozymem dokonce 19,7 %. Tuto ztrátu nejspíše zapříčinila proteasová aktivita. Přestože byl pufr doplněn o inhibitory proteas PMSF a EDTA, existují i proteasy dalších tříd, které zřejmě inhibovány nebyly. Proteasy u vzorků s přítomností SDS, byly nejspíše díky jeho silné aktivitě denaturovány, a tak ke ztrátě proteinů nedošlo. Cennou informací by proto mohlo být změření proteolytické aktivity v extraktech. Delší doba extrakce ve výsledku postrádá smysl, neboť přinese především degradaci produktu, která je velmi dobře viditelná i na gelové separaci těchto vzorků (Obr. 13B).

Úlohou lysozymu je narušení peptidoglykanové vrstvy (Vollmer et al., 2008b). Jeho přítomnost v lyzačním pufru měla pozitivní vliv na získané koncentrace, více znatelné u vzorků se slabším Tritonem-X 100, ale i tak se nejednalo o nijak výrazný nárůst. U sinic



Obr. 12: Koncentrace proteinů ve vzorcích extrahovaných v ultrazvuku s detergenty a lysozomem. (SDS) vzorek s SDS, (SDS L) vzorek s SDS a lysozymem, (Trit) vzorek s Tritonem X-100, (Trit L) vzorek s Tritonem X-100 a lysozymem.

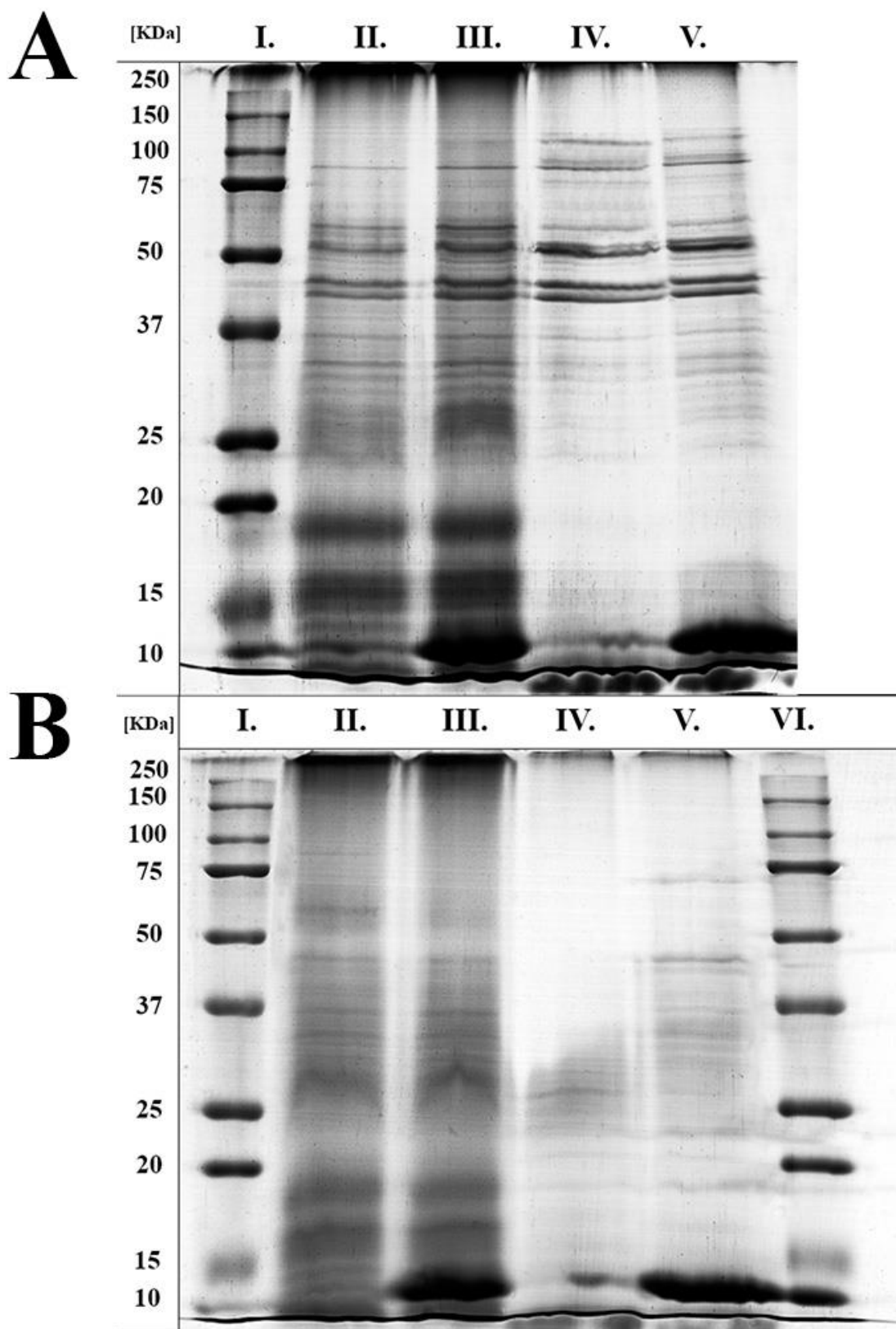
rodu *Synechococcus* se pohybuje síla peptidoglykanové vrstvy okolo 15 nm (Samuel et al., 2001). U mnoha dalších druhů sinic bývá tato vrstva znatelně mohutnější (Hoiczky & Baumeister, 1995). Dá se tedy očekávat, že při použití sinice se silnější vrstvou by byl přínos lysozymu významnější.

Pro úplnost výsledků by bylo vhodné použít lysozym ve více koncentracích a také otestovat enzym pouze s ultrazvukem bez použití detergentů.

Separace vzorků elektroforézou (Obr. 13A) odhalila větší počet extrahovaných proteinů s menší molekulovou hmotností u variant s SDS. Dominantní jsou proteinové pásy odpovídající molekulovým hmotnostem ~18 kDa a 16 kDa. Naopak u vzorků s Tritonem X-100 tyto skupiny proteinů zcela chybí. To je poněkud překvapivé, neboť právě tyto pásy se vyskytují u všech ostatních vzorků. Nabízí se vysvětlení opravdu silného naštěpení peptidových řetězců, které pak skončily na samém konci gelu (IV., V.) ještě pod zónou barviva. Další výraznou skupinou jsou proteiny v rozsahu 40–60 kDa, přítomné ve všech 4 variantách.

Varianta po 24 h (Obr. 13B) ukazuje značnou degradaci napříč všemi vzorky i proteinovými molekulovými hmotnostmi. Zůstalo jen opravdu malé množství analyzovatelných pásů. To opět potvrzuje přechodí negativní závěr ohledně přínosu takto dlouhé extrakce.

Ve sloupcích III. a V. je možné na gelu A i B vidět okolo 10 kDa výrazné tmavé oblasti, které náleží lysozymu, jehož M_w je ~14–15 kDa (Proctor et al., 1988).

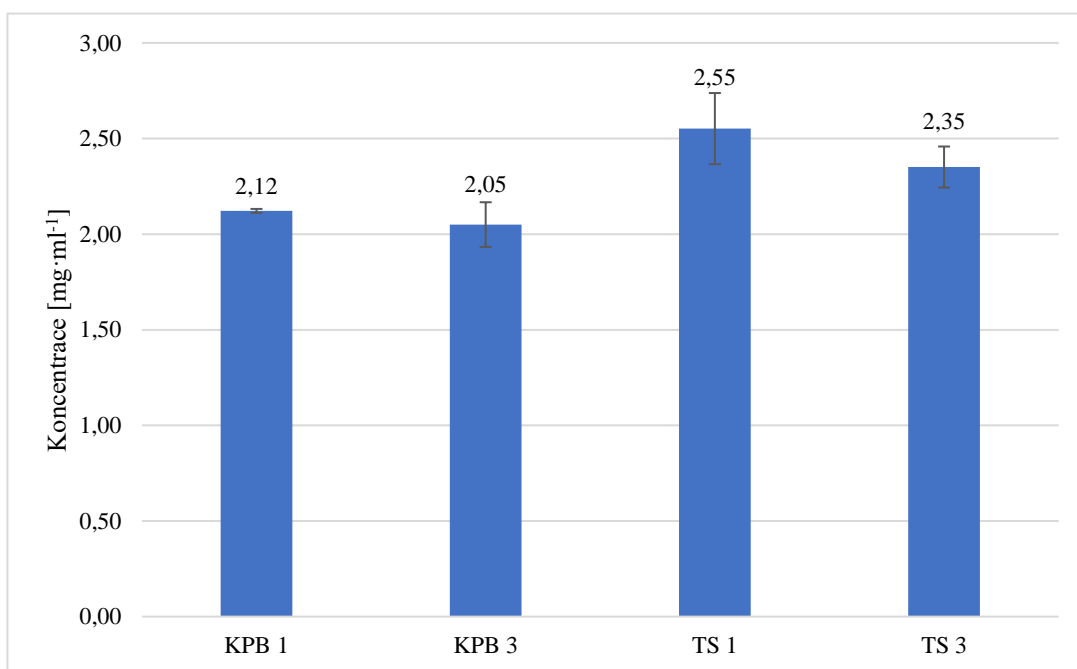


Obr. 13: SDS-PAGE vzorků lyzovaných ultrazvukem v přítomnosti detergentů a lysozymu A – varianta po dvouhodinové inkubaci; B – varianta po 18 h; Zleva: (I.) standardy M_w , (II.) SDS, (III.) SDS s lysozymem, (IV.) Triton X-100, (V.) Triton X-100 s lysozymem (VI.) standardy M_w

4.3 Extrakce ultrazvukem za nativních podmínek

V této sadě extrakcí bylo cílem ověřit, zda opakované vložení do ultrazvuku přinese díky vyššímu podílu lyzovaných buněk vyšší proteinové zisky. Bohužel jsem zapomněl odebrat vzorky pro změření proteinové koncentrace před umístěním do inkubátoru. Tyto vzorky jsou zaznamenány pouze na gelu (II.–V.) (Obr. 15). Při srovnání vzorky bez inkubace vykazují lehce vyšší intenzity proteinových pásů se znatelným nárůstem proteinů o M_w 20 a 15 kDa. Během dvouhodinové inkubace nejspíše došlo aktivitou proteas k částečné degradaci proteinů.

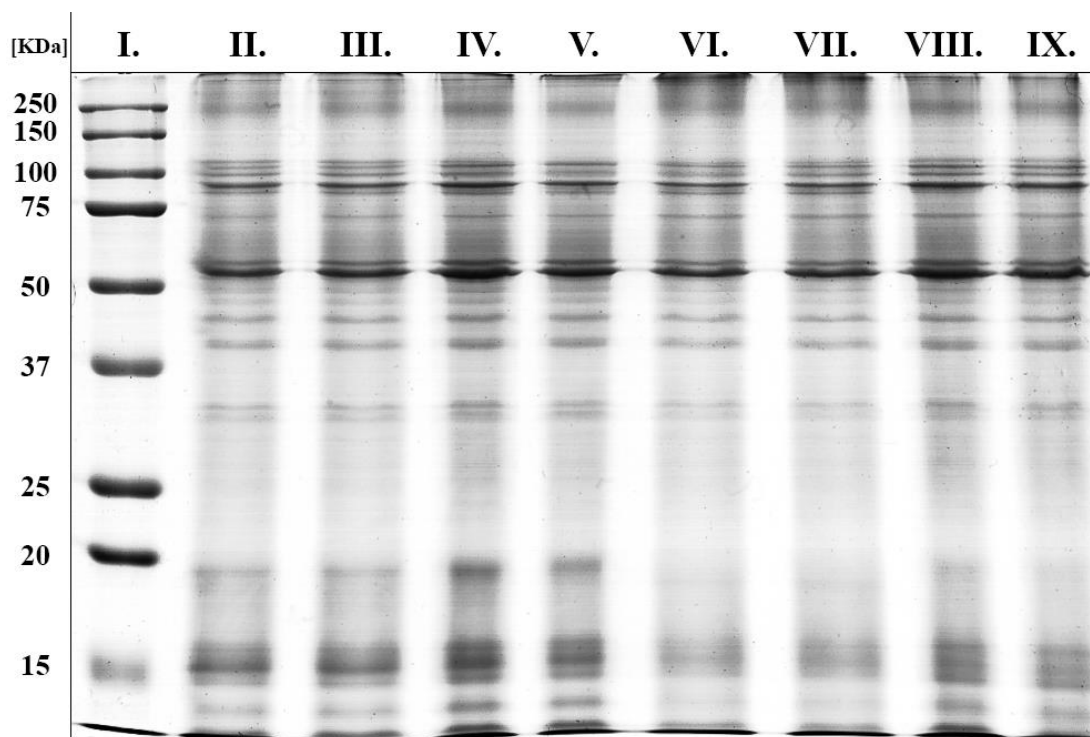
BCA metodou byly změřeny až koncentrace po dvouhodinové inkubaci při 37 °C. Jejich hodnoty vyšly v obou případech 3× opakovaného cyklu ultrazvuk led nižší, než pouze po 5 min. (Obr. 14). Obě varianty TS pufru přinesly v průměru o 17,7% vyšší výtěžky než při použití KPB. Hlavním důvodem je nejspíše vysoká koncentrace sacharosy a její osmotická aktivita, která by měla podporovat lýzu buněk. Mezi další důvody zcela jistě patří vyšší pH TS pufru, jak se ukázalo u extrakcí v různém pH (4.6).



Obr. 14: Koncentrace proteinů ve vzorcích extrahovaných v ultrazvuku po 2 h v inkubátoru při 37 °C. (KPB 1) Extrakce v KPB, cyklus ultrazvuk led 1×. (KPB 3) Extrakce v KPB, cyklus ultrazvuk led 3×. (TS 1) Extrakce v TS pufru cyklus ultrazvuk led 1×. (TS 3) Extrakce v TS pufru cyklus ultrazvuk led 3×.

Výsledky by mohly naznačovat, že delší čas v ultrazvuku nepřinesl lýzu dalších buněk a s tím i vyšší koncentrace proteinů v extraktech. Pokud by však byly lyzovány všechny buňky již během prvních 5 min., odporovalo by to předchozí extrakční variantě, při které se podařilo získat výrazně vyšší výtěžky. Ve dříve zmíněné studii Kima et al. (2009) vykazovalo použití ultrazvuku pouze 73,3% účinnost v rozbití buněk. Jejich vzorek byl navíc vystaven ultrazvuku 30 min. Greensteinová et al. (2021) pro lýzu použili místo ultrazvukové lázně ultrazvukový homogenizátor. V jejich případě byla většina buněk lyzována již po 2 min. Delší doba v ultrazvuku přinesla jen minimální navýšení a i po 10 min. zůstávaly v suspenzi neporušené buňky.

Je tedy možné, že ani 5 ani 15 min. není při použití ultrazvukové lázně pro maximální rozbití buněk dostačující. Avšak jak ukazují i obě zmíněné studie, ani delší čas v ultrazvuku nepřinese lýzu všech buněk.

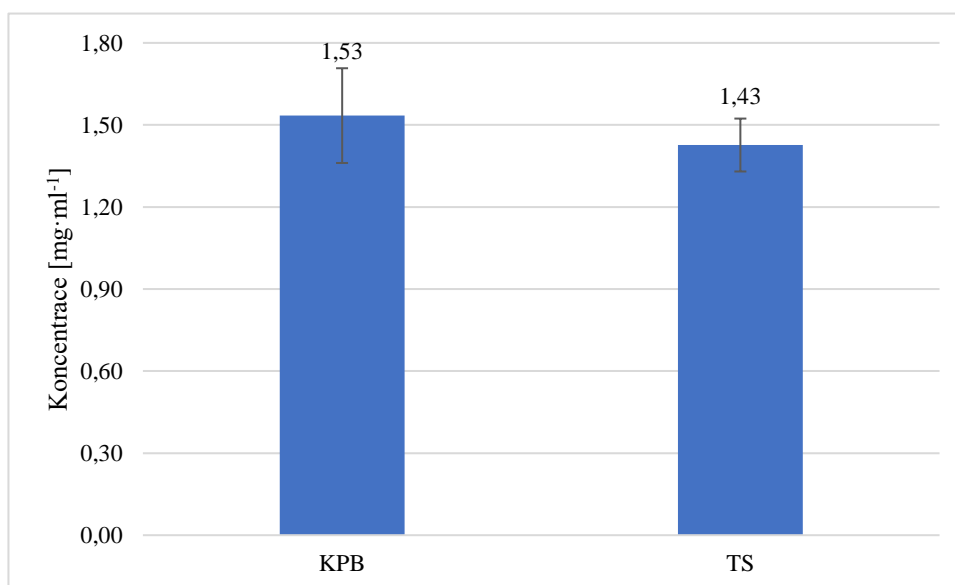


Obr. 15: SDS-PAGE vzorků lyzovaných ultrazvukem Zleva: (I.) standardy M_w , (II.) KPБ 1, (III.) KPБ 3, (IV.) TS 1, (V.) TS 3, (VI.) KPБ 1 – 2 h, (VII.) KPБ 3 – 2 h, (VIII.) TS 1 – 2 h, (IX.) TS 3 – 2 h.

4.4 Extrakce v homogenizátoru FastPrep-24™

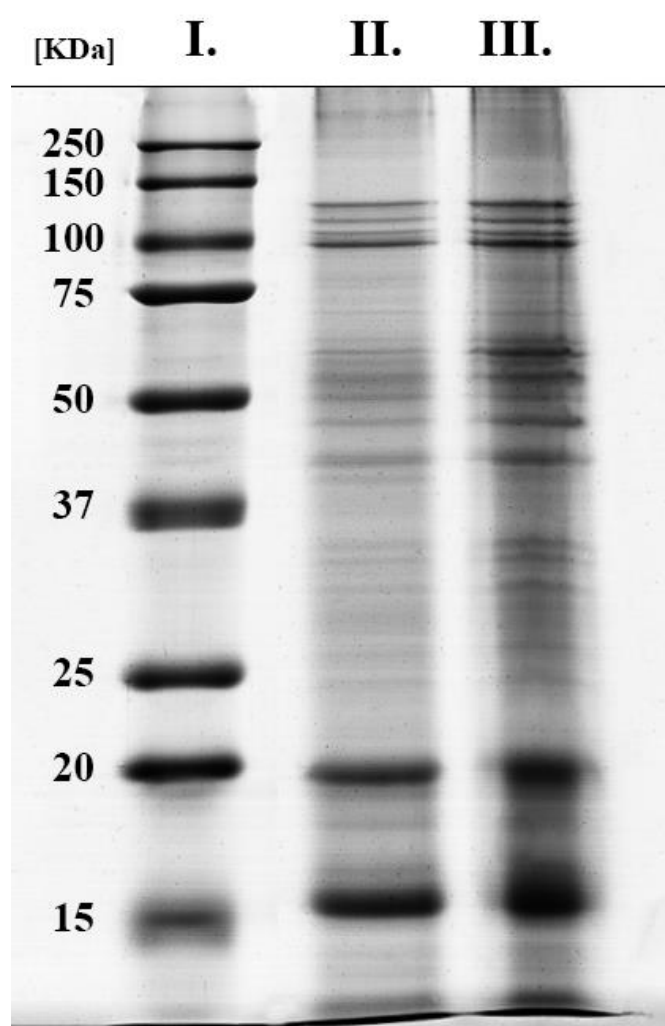
Extrakce kuličkovým homogenizátorem FastPrep-24™ přinesla u obou použitých pufrů srovnatelný výsledek. V extraktu KPB bylo $1,53 \pm 0,17 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů (Obr. 16), což je podle naměřených koncentrací lehce více jak v TS pufru, kde vyšel proteinový obsah $1,43 \pm 0,1 \text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Teoreticky by měl větší proteinové koncentrace přinést TS pufr, neboť má díky vysoké koncentraci sacharosu značnou osmotickou aktivitu, která by měla podpořit lýzu buněk. To potvrzuje i pohled na gel (Obr. 17), kde je vidět, že TS pufr přinesl vyšší proteinové zisky. Výraznější pásy jsou hlavně v oblasti okolo 50 a 30 kDa. Nižší koncentrace naměřená BCA metodou může být způsobena přítomností EDTA v pufru, která chelatací měďnatých iontů interferuje s výsledky. Pro nízkou koncentraci by ale vliv měl být minimální. Vzhledem k výsledkům gelové elektroforézy a velké chybové odchylce u extraktu KPB lze považovat vyšší naměřenou koncentraci spíše za chybu.

Celkově je však výtěžek z homogenizátoru spíše zklamáním. Ač je použití kuliček pro lýzu sinic standard (Mehta et al., 2015), přinesla tato metoda horší výsledky než ultrazvuk, který je dostupný ve většině laboratoří. Díky kavitaci, způsobené vysokou frekvencí ultrazvukových vln, vzniká velké množství mikrobublinek, jež při rozpadu uvolní velké množství energie, která zřejmě způsobí větší narušení buněk než nárazy kuliček. Lze očekávat, že použití většího množství menších kuliček by přineslo lepší výsledky. Navíc kuličkové třepačky jsou obecně méně účinné než kuličkové mlýny (D'Hondt et al., 2017).



Obr. 16: Koncentrace proteinů ve vzorcích z kuličkového homogenizátoru. (KPB) Vzorek extrahovaný v KPB. (TS) Vzorek extrahovaný v TS pufru.

Tyto výsledky jsou v rozporu s (Kim et al., 2009), kde naopak použití kuliček přineslo nejlepší výsledky. V jejich případě však byly použity kuličky skleněné a vzorky byly v homogenizátoru trojnásobnou dobu. Mehta et al. (2015) použili taktéž skleněné kuličky k lýze tří druhů sinic, z nichž u každého byly výsledky rozdílné v rozsahu účinností 25–55 %. Odpovědí nejspíš bude velká závislost u účinnosti metody na použitém typu homogenizátoru, podmínkách a druhu lyzované sinice.



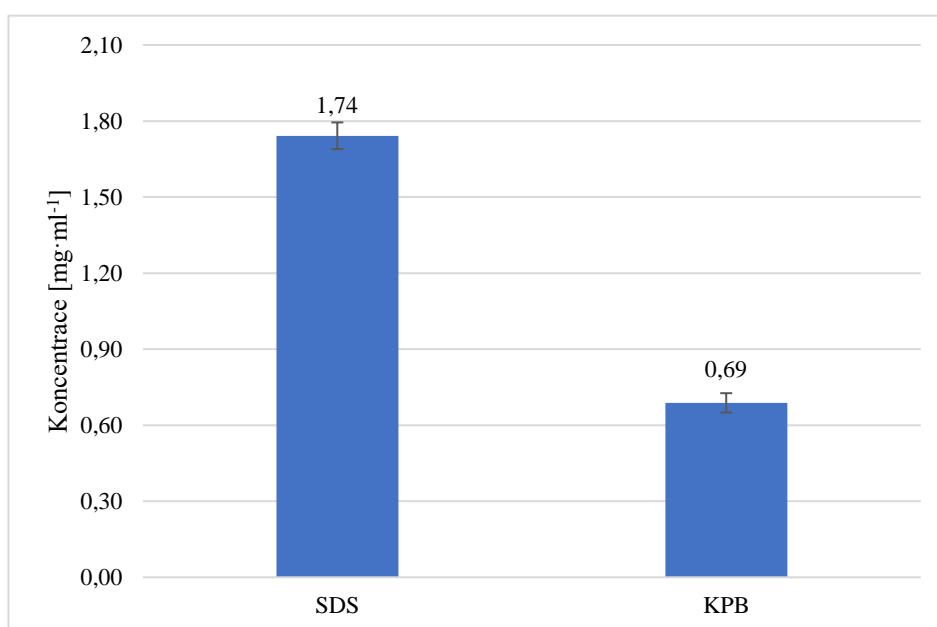
Obr. 17: SDS-PAGE vzorků lyzovaných kuličkovým homogenizátorem. Zleva: (I.) Standardy Mw; (II.) Vzorek v KPB; (III.) Vzorek v TS pufru.

4.5 Extrakce v pufru s SDS bez ultrazvuku

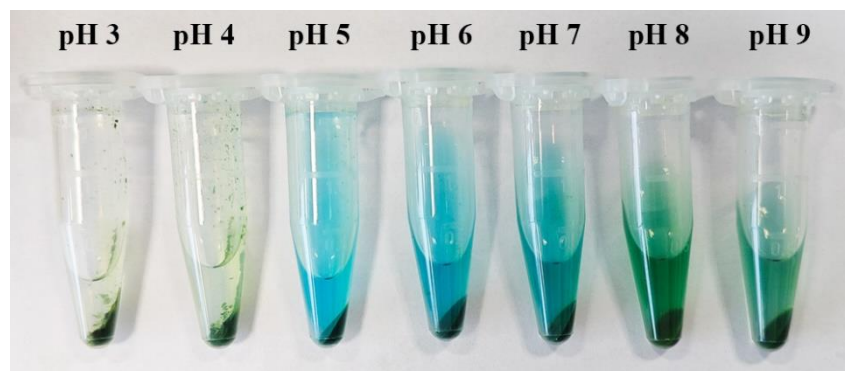
Tyto dvě extrakční varianty měly původně sloužit pro ověření přínosu SDS samotného a jako negativní kontrola lýzy buněk, které byly uchovány v mrazáku při $-28\text{ }^{\circ}\text{C}$ více jak rok. Byly však provedeny na zbylých alikvotech extrakční sady (4.3) a extrahovány byly až o týden později, přičemž mezitím byly opět zamrazeny. Buňky tak byly nechtěně vystaveny druhému cyklu zmrazení a rozmrazení. Opakování těchto cyklů lze využít k buněčné lýze. Metoda nedosahuje vysoké účinnosti (Kim et al., 2009) a pro lýzu většího počtu buněk je zapotřebí vyšší počet opakování (Tanaka, 2015).

Při pohledu na výsledky (Obr. 18) přinesl SDS $1,74 \pm 0,05\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$ proteinů. Bylo to však s podporou mrazu, jak ukazuje vzorek ponechaný pouze v KPB. Samotný SDS, tedy přinesl $\sim 1\text{ mg}\cdot\text{ml}^{-1}$. Není to špatný výsledek, ale rozhodně nelze říct, že by SDS byl dostačující sám o sobě. Vnější S-vrstva sinic detergentům odolává (Nixdorff et al., 1978). Působení mrazu zřejmě umožnilo její narušení a lepší výsledky dosažené s SDS. Využití detergentů může mít větší přínos v kombinaci s jinou lyzační metodou (de Carvalho et al., 2017), jak ostatně potvrzuje i extrakce s detergenty za použití ultrazvuku (4.2).

Elektroforetická separace těchto dvou vzorků byla provedena na gelu společně se vzorky extrahovanými v pufrch o různém pH (Obr. 21, IX.; X.).



Obr. 18: Koncentrace proteinů ve vzorcích extrahovaných bez použití ultrazvuku. (SDS) Extrakce s SDS bez použití ultrazvuku (KPB) Extrakce v KPB bez použití ultrazvuku.

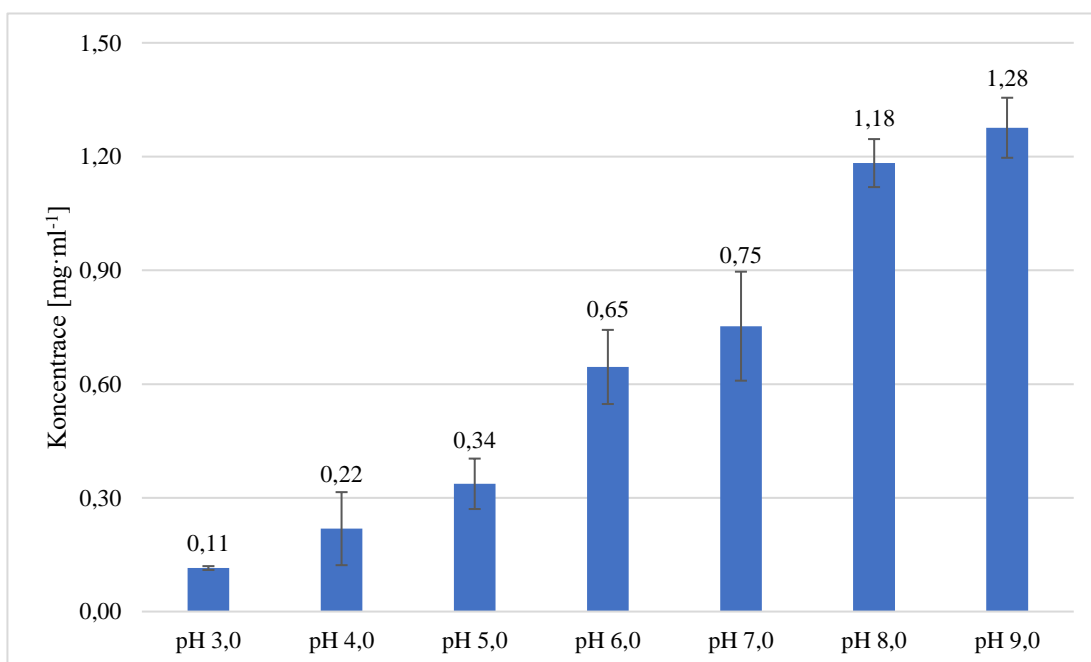


Obr. 19: Vzorčky po přidání pufrů o různém pH

4.6 Extrakce ultrazvukem v pufrch při různém pH

V rámci této extrakční varianty byl otestován vliv pH pufru na proteinovou extrakci. Rozdíl byl patrný hned po přidání pufrů k buňkám, ještě před samotnou lýzou v ultrazvuku (Obr. 19). V kyselých pufrch o pH 3 a 4 došlo okamžitě ke shluku buněk a bylo obtížné se vzorkem nadále pracovat. U pufrů o pH 5–7 byla vidět přítomnost uvolněného modrého barviva, nejspíše směs fykocyaninu a allofykocyaninu. U bazických pufrů začala převažovat zelená barva, způsobená zřejmě uvolněným chlorofylem.

Obsah proteinů ve vzorcích postupně narůstá s rostoucím pH (Obr. 20). První 3 vzorky extrahované v kyselém pH přinesly nejnižší naměřené koncentrace v rámci celé práce. Při využívání kyselých extrakcí se vzorky zahřívají na vysoké teploty (Slocombe et al., 2013). Možná právě absence přidaného tepla neumožnila lepší výsledky.

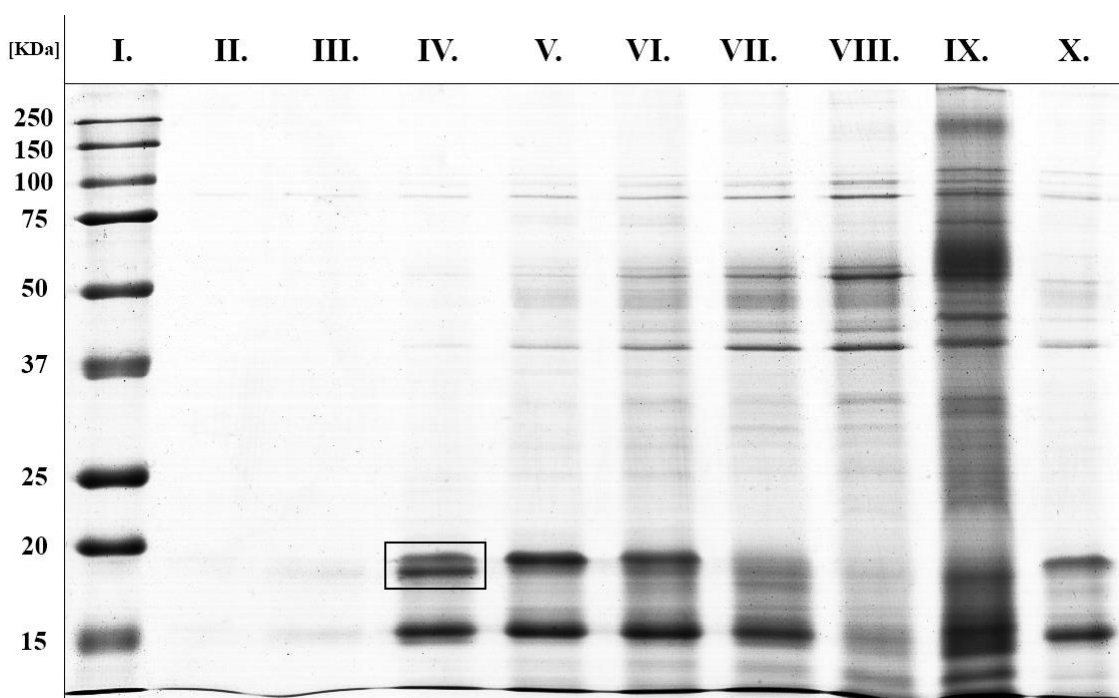


Obr. 20: Koncentrace proteinů ve vzorcích extrahovaných v pufrch při různém pH.

Znatelné skoky v koncentraci jsou z pH 5,0 na 6,0 a z pH 7,0 na 8,0. Je tak snadno vidět, že bazické pH je vhodnější pro proteinovou extrakci zaměřenou na maximální výtěžek. Bohužel nebylo otestováno pH >9,0, ale lze usoudit, že koncentrace by do určitého bodu dál narůstala, a to výměnou za vyšší denaturaci vzorku. V případě, že je snaha zachovat vzorek maximálně funkční, může být rozumnější volbou neutrální pH 7,0.

Při srovnání výsledků s ostatními extrakcemi vyšly u těchto vzorků nižší koncentrace, než by se dalo očekávat, a to hlavně pro pH 7,0; 8,0 a 9,0. Vzorek extrahovaný při pH 8,0 odpovídá 100 mmol·l⁻¹ variantě z následující extrakce, a přesto vyšla koncentrace proteinů poloviční. Nedostatečnou inkubaci vzorku s roztokem BCA činidla lze vyloučit, protože 30 min. inkubace bylo pečlivě hlídáno. Mohlo však dojít k lidské chybě na jiném místě. I přes poloviční koncentrace získané u této extrakce zůstává nejdůležitější jednoznačný trend rostoucí proteinové koncentrace společně s rostoucí hodnotou pH.

Pohled na elektroforetickou separaci proteinů (Obr. 21) odhaluje, že vyšší pH je vhodnější pro získání proteinů o vyšší M_w, ale naopak způsobuje ztrátu proteinů menších. Patrné je to hlavně u pH 9 v oblasti pod 20 kDa. Volba vhodného pufru by proto měla být ovlivněna i posouzením charakteru požadovaného proteinu.



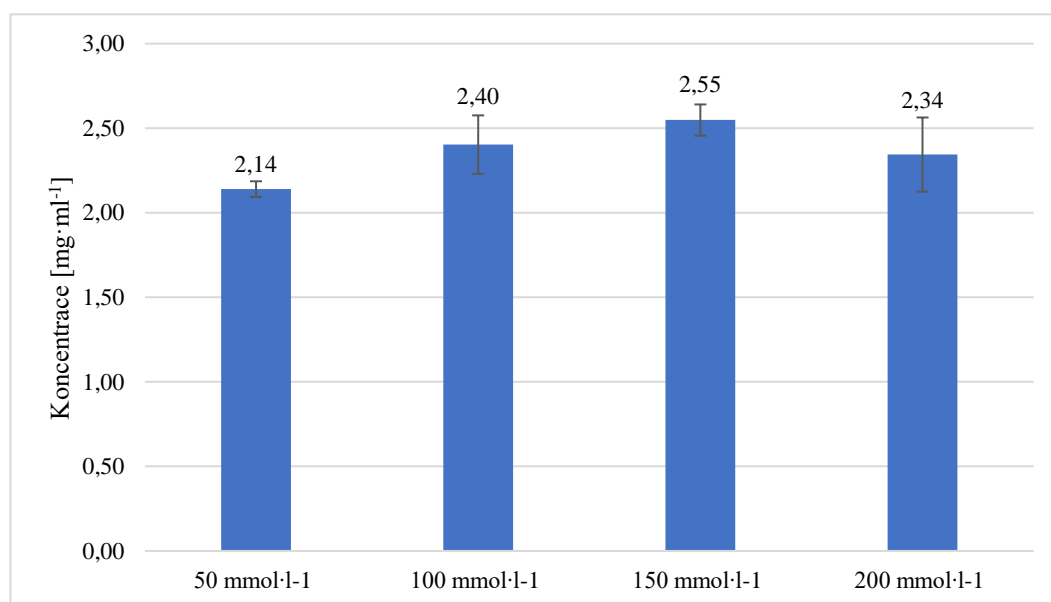
Obr. 21: SDS-PAGE vzorků extrahovaných při různém pH. Zleva: (I.) standardy M_w (II.) pH 3,0; (III.) pH 4,0; (IV.) pH 5,0; (V.) pH 6,0; (VI.) pH 7,0; (VII.) pH 8,0 (VIII.) pH 9,0; (IX.) Extrakce s SDS bez použití ultrazvuku; (X.) Extrakce v KPB bez použití ultrazvuku.

Zajímavé může být, že u vzorku extrahovaného v pH 5,0 se vyskytly dva pásy proteinů o M_w přibližně 18 kDa. Tyto pásy jsou na obrázku (Obr. 21) označeny černým obdélníkem. Jejich přítomnost na obou kopiích gelu vylučuje náhodu či chybu. Ze všech provedených elektroforetických separací je toto jediný vzorek, kde se proteiny nejeví jako jeden souvislý pás. Nabízí se tedy možnost v budoucnu tyto proteiny separovat a blíže prozkoumat.

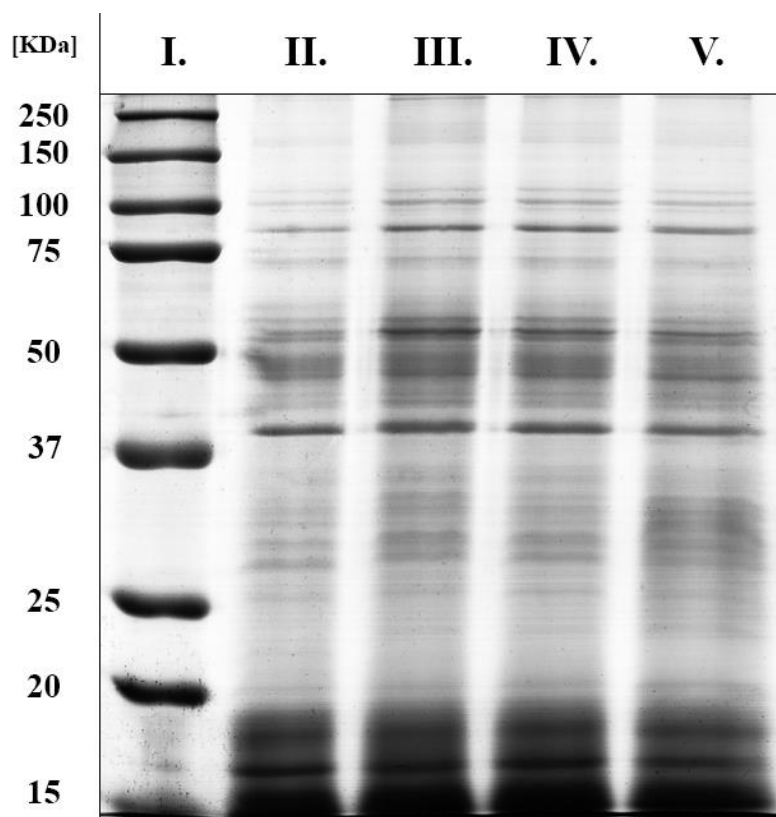
4.7 Extrakce ultrazvukem v různých koncentracích pufru

Podle výsledků předchozí extrakce bylo pH 8,0 zvoleno jako nejlepší kompromis mezi získanými proteiny a zachováním funkčnosti vzorku. Ze čtyř použitých koncentrací Tris-HCl pufru přinesla nejnižší extrahované koncentrace nejslabší varianta (Obr. 22). Zbylé tři varianty jsou svými výtěžky srovnatelné i vzhledem k výsledkům SDS-PAGE (Obr. 23), kde vyšla nejlépe koncentrace $100 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$. I zde vyšel vzorek extrahovaný v pufru o koncentraci $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ nejhůře.

Vliv koncentrace pufru nemá příliš velké dopady, pokud je jeho puфраční kapacita a iontová síla dostatečná. Naopak pokud dostatečná není, bývá často příčinou nízkých výtěžků, degradace nebo denaturace produktů (Pingoud et al., 2002). Podle výsledků spadá koncentrace $50 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ už mezi nedostatečné a lepší volbou je užití koncentrovanějšího pufru.



Obr. 22: Koncentrace proteinů ve vzorcích extrahovaných při různé koncentraci Tris-HCl pufru.



Obr. 23: SDS-PAGE vzorků extrahovaných při různé koncentraci Tris-HCl pufru. Zleva: (I.) standardy M_w , (II.) $50 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (III.) $100 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (IV.) $150 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$, (V.) $200 \text{ mmol}\cdot\text{l}^{-1}$

4.8 GelAnalyzer

Pro rozdíly v barvení, skenování i úpravách kontrastu jednotlivých gelů, nelze jejich výsledky jednoduše srovnávat, tak jako naměřené koncentrace proteinů. Místo toho byla pro každou dráhu gelu, reprezentující separaci proteinů z jedné extrakční varianty, vytvořena hodnota „redukované intenzity“. Hodnota redukované intenzity byla získána vydělením intenzity proteinových pásů na dráze hodnotou, která náleží součtu intenzit standardů z daného gelu. Jelikož bylo na všechny gely nanášeno stejné množství standardů, měla by získaná hodnota umožnit přesnější srovnání jednotlivých výsledků elektroforetických separací. Získané hodnoty redukovaných intenzit byly vyneseny do grafů (Obr. 24, Obr. 25, Obr. 26, Obr. 27, Obr. 28, Obr. 29).

Redukované intenzity vykazují v rámci jednoho gelu silnou korelaci s koncentracemi naměřenými BCA metodou (Obr. 12, Obr. 14, Obr. 20, Obr. 22) s rozdílem extrakce v kuličkovém homogenizátoru, kde vychází redukovaná intenzita o polovinu větší v případě TS pufru, ač naměřené koncentrace vyšly ve prospěch KPB (Obr. 16). Výsledek z gelu tak podporuje dřívější předpoklad, že TS pufr by měl pro vysokou koncentraci

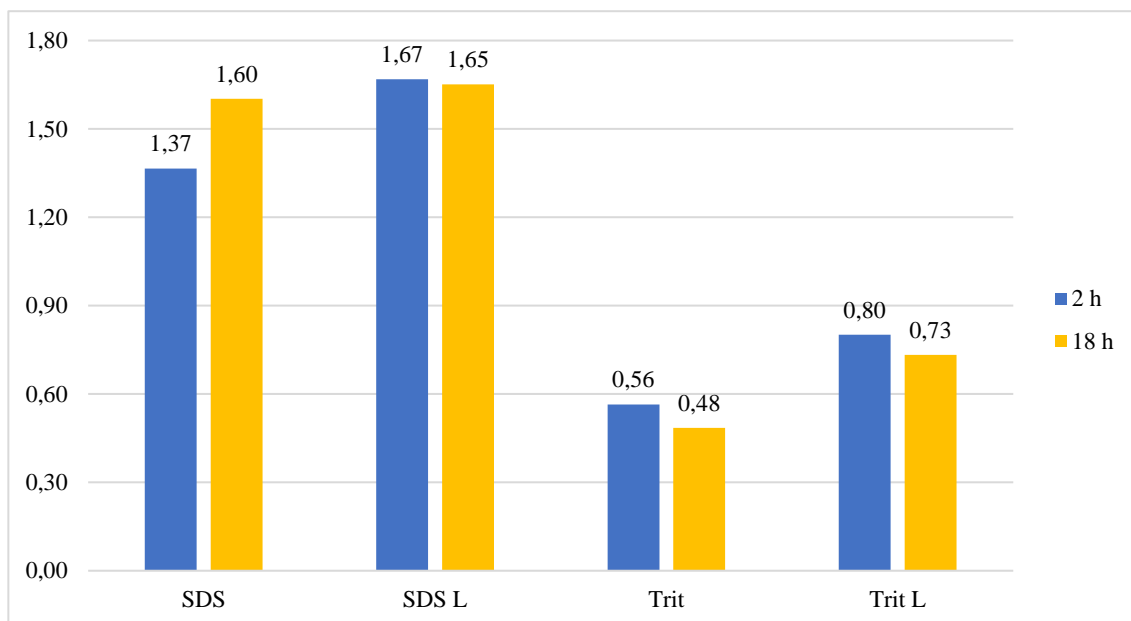
sacharosy a taktéž pro vyšší hodnotu pH přinést lepší výsledky než KPB. Další hodnoty, které si zcela neodpovídají, pocházejí z extrakce v přítomnosti detergentů. Přidané množství lysozymu v tomto případě nebylo možné odečíst, a tak mají tyto redukované intenzity vyšší hodnotu, než by měla být. Výsledky s Tritonem X-100 jsou také výrazně nižší než naměřené koncentrace, ale vysvětlením bude nejspíše přítomnost černého pásu pod zónou bromfenolové modři, která byla diskutována už v kapitole 4.2. (Obr. 13A, B; dráhy IV.; V.).

Graf se vzorky extrahovanými v ultrazvuku (Obr. 25) potvrzuje negativní přínos delších extrakcí. Všechny 4 varianty bez inkubace přinesly dle intenzity proteinových pásů lepší výsledky, než jejich protějšky inkubované 2 h.

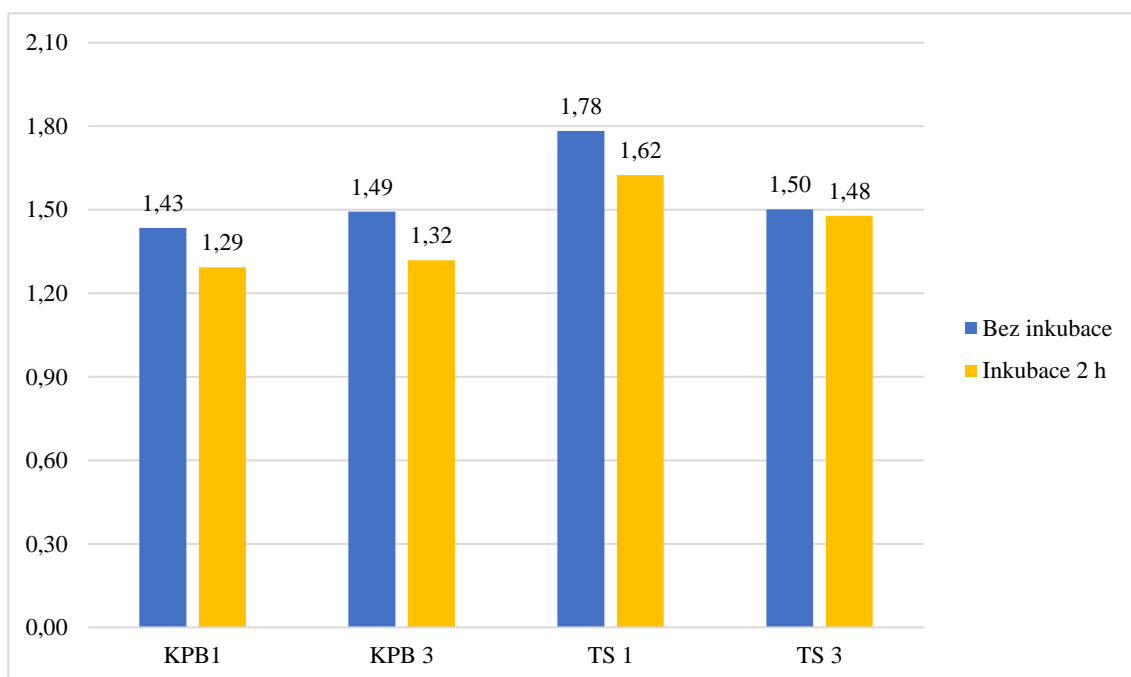
Na obrázku (Obr. 28) je redukovaná intenzita drah, které náleží vzorkům extrahovaným bez použití ultrazvuku. SDS varianta vyšla 2,51 a je nejvyšší získanou hodnotou redukované intenzity. Znamenalo by to, že podle elektroforetické separace dosáhlo SDS samotné na výrazně lepší výsledky než ostatní metody, což samozřejmě není pravda. Narážíme zde na limitace srovnání redukovaných intenzit. Vzorky extrahované v SDS a KPB bez použití ultrazvuku byly separovány na gelu společně se vzorky extrahovanými v pufrách o různém pH (Obr. 21). U nich byla naměřena nejnižší koncentrace, i intenzita proteinových pásů na gelu byla nejnižší. Proto bylo tomuto naskenovanému gelu přidáno nejvíce kontrastu, což zřejmě způsobilo ztrátu informace v intenzitách standardů.

Redukované intenzity gelu, na kterém byly separovány vzorky extrahované v pufrách při různém pH (Obr. 28), ukazují mnohem bližší hodnoty k ostatním extrakcím než naměřené koncentrace, které vyšly poloviční. Stejně tak extrakce kuličkovým homogenizátorem (Obr. 26) podle tohoto srovnání přinesla srovnatelné výsledky s ultrazvukem. Při znalosti příliš vysoké hodnoty vzorku s SDS bez ultrazvuku však těmto výsledkům nelze moc věřit a jejich charakter je spíše orientační. Je možné, že rostoucí intenzita proteinových pásů neroste lineárně společně se stoupající koncentrací proteinů.

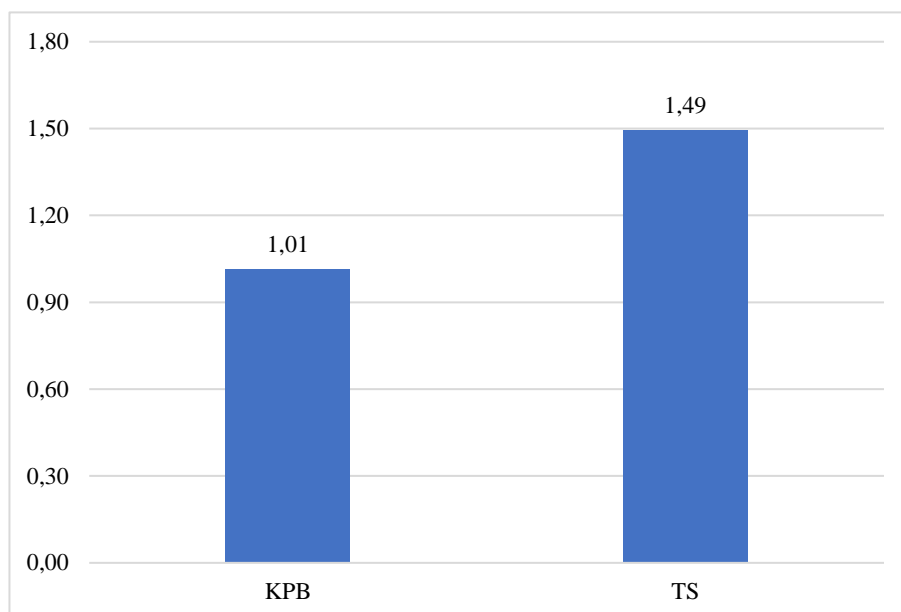
Srovnání intenzit napříč gely odpovídá výsledkům BCA metody pouze u extrakční varianty s detergenty. Ač byly vzorky extrahované po dobu 2 h a 18 h separovány na samostatných gelech, oba byly připraveny, barveny i naskenovány společně, a proto si jejich hodnoty odpovídají.



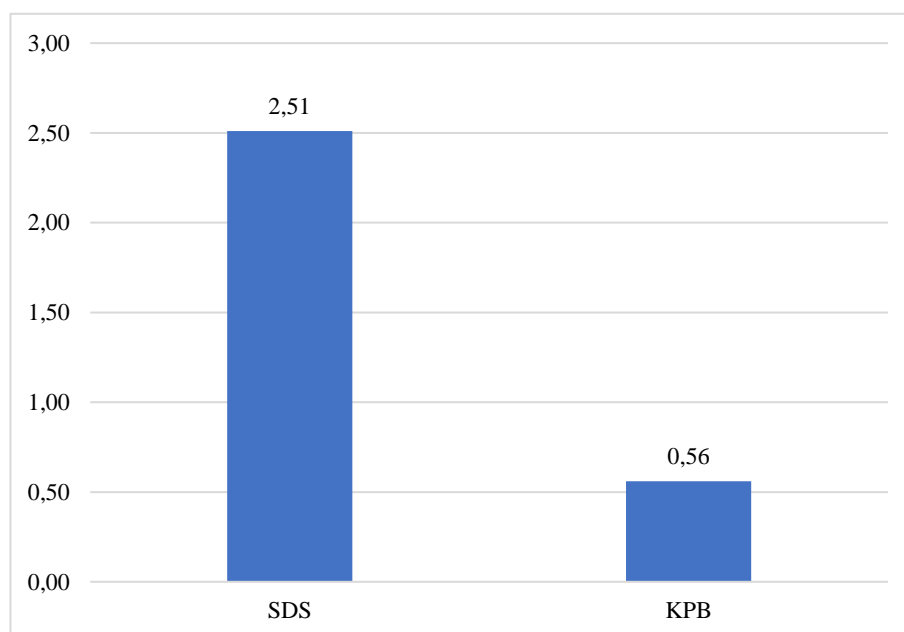
Obr. 24: Redukované intenzity u vzoriek extrahovaných v ultrazvuku s detergenty a lysozomem. (SDS) vzorek s SDS, (SDS L) vzorek s SDS a lysozomem, (Trit) vzorek s Tritonom X-100, (Trit L) vzorek s Tritonom X-100 a lysozomem.



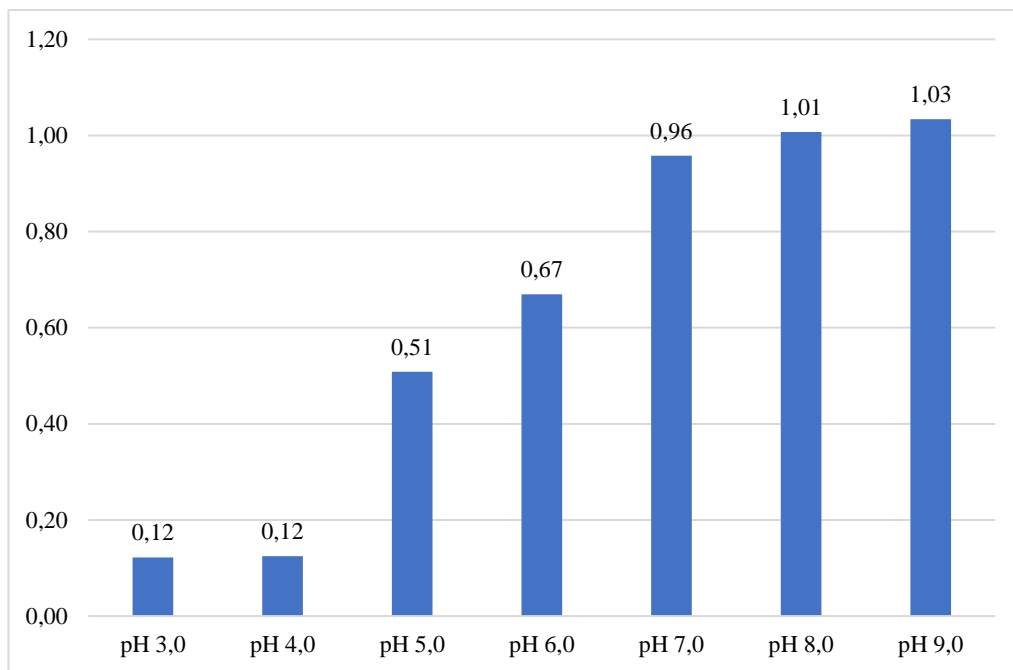
Obr. 25: Redukované intenzity u vzoriek extrahovaných v ultrazvuku. (KPBI) Extrakce v KPBI, cyklus ultrazvuk led 1×. (KPBI 3) Extrakce v KPBI, cyklus ultrazvuk led 3×. (TS 1) Extrakce v TS pufri, cyklus ultrazvuk led 1×. (TS 3) Extrakce v TS pufri, cyklus ultrazvuk led 3×.



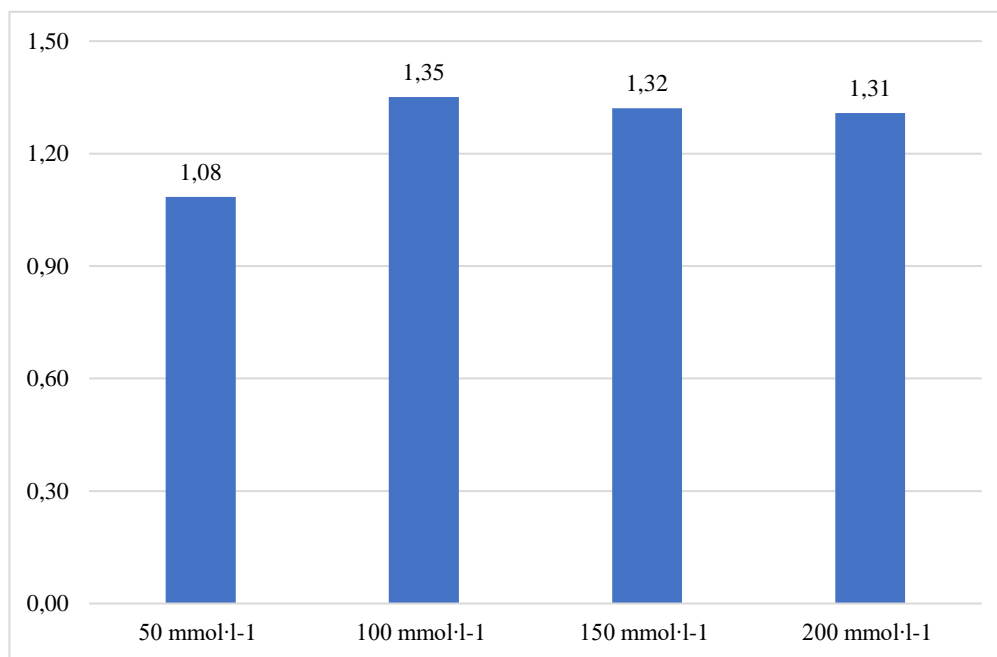
Obr. 26: Redukované intenzity u vzorků z kuličkového homogenizátoru. (KPB) Vzorek extrahovaný v KPB. (TS) Vzorek extrahovaný v TS pufru.



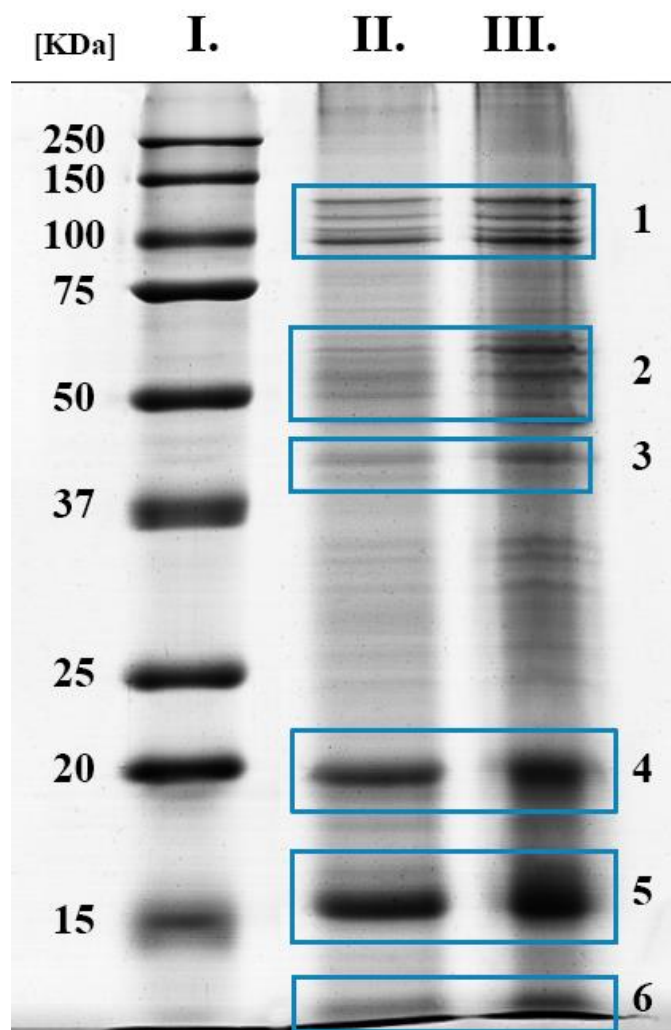
Obr. 27: Redukované intenzity u vzorků extrahovaných bez použití ultrazvuku. (SDS) Extrakce s SDS bez použití ultrazvuku. (KPB) Extrakce v KPB bez použití ultrazvuku.



Obr. 28: Redukované intenzity u vzorků extrahovaných v pufrách při různém pH.



Obr. 29: Redukované intenzity u vzorků extrahovaných při různé koncentraci Tris-HCl pufru.



Obr. 30: Separace proteinů pro analýzu proteinového složení. Zleva: (I.) standardy M_w , (II.) vzorek v KPB, (III.) vzorek v TS pufru. Zvýraznění: (1) skupina 4 proteinových pásů o M_w 100–120 kDa, (2) skupina 5 proteinových pásů o M_w 50–55 kDa, (3) 2 proteinové pásy 40–45 kDa, (4) Pás ~20 kDa, (5) 15–17 kDa (6) ~10 kDa

4.9 Proteinové složení extraktů

Separace gelovou elektroforézou umožnila posoudit proteinové složení jednotlivých extraktů. Získané gely (Obr. 13A/B, Obr. 15, Obr. 17, Obr. 21, Obr. 23) už byly dříve zmiňovány v souvislostech s koncentrací proteinů měřenou BCA metodou. Pro reprezentativní analýzu proteinového složení byl zvolen gel, kde byly separovány vzorky z kuličkového homogenizátoru (Obr. 30), protože na něm bylo nejvíce detekovatelných proteinových pásů. Napříč vzorky byla nalezena vysoká přítomnost proteinů o odhadovaných M_w ~100, 50–55, 18–20, ~15 a 10 kDa.

Mezi pásy ~50 kDa by mělo patřit 8 velkých podjednotek enzymu Rubisco jejichž M_w se pohybuje v rozsahu 50–55 kDa (Andersson & Backlund, 2008). Teulingová et

al. (2017) ve své studii potvrdili imunoblotováním přítomnost proteinu. Autoři dále usuzují, že mezi pásy ~15 kDa budou patřit malé podjednotky Rubisca. Těch je také 8 a pohybují se v rozsahu 12–18 kDa (Andersson & Backlund, 2008). Extrahované vzorky vykazují vysoký podíl nízkomolekulární proteinové frakce. Stejný výsledek ukazuje proteinové složení v případě Teulingové et al. (2017) i analýza proteinového složení hmotnostní spektrometrií Šebely et al. (2018), při níž bylo u sinice *S4* nalezeno 167 proteinů o M_w pod 20 kDa.

Sinice jsou fotosyntetizující organismy, a tak bude velké množství proteinů patřit k součástí fotosystému I a II, fykobyliproteinům a dalším esenciálním buněčným makromolekulám jako jsou ribozomy, transportní proteiny, enzymy a mnoho dalších (Šebela et al., 2018).

4.10 Teoretický výtěžek

Obdržené vzorky byly bohužel v neznámém množství. Přibližné množství bylo získáno zvážení centrifugačních zkumavek se zamrazenými vzorky a od jejich průměrné hmotnosti bylo odečtena průměrná hmotnost 7 prázdných zkumavek. Získané teoretické množství je $0,286 \pm 0,062$ g v každé ze 4 zkumavek. Po alikvotním rozdělení obsahu pro 8 vzorků hmotnost vychází $35,8 \pm 7,8$ mg. Tato množství sinic by se tedy měla nacházet v každém jednotlivém vzorku. Nejvyšší získaná koncentrace proteinů v extraktu byla $4,22 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$, což odpovídá $2,11 \pm 0,13$ mg extrahovaných proteinů.

Obsah proteinů se u jednotlivých druhů sinic velmi liší. Ve srovnávací studii Passose et al. (2023) se pohyboval proteinový obsah u všech druhů sinic v rozmezí 2,5–66,7 % s průměrnou hodnotou 36,9 %. V sinici rodu *Synechococcus* naměřili Nagle et al. (2010) proteinový obsah 45,9 %. Při hrubém odhadu usuzujícím 35–50% podíl proteinů na hmotnosti sinic *Synechococcus S3* a *S4*, odpovídá množství extrahovaných proteinů výtěžnosti 9,1–22,9 %. Ač se jedná opravdu o teoretické odhady, výsledek by mohl odpovídat. Fieldová et al. (2017) zaznamenali při srovnávání extrakčních metod nejvyšší dosažený výtěžek 17,51 %. Nezbyvá než poznamenat, že hlavním cílem této práce bylo především srovnání jednotlivých extrakčních postupů a metod, ne dosažení nejvyššího proteinového výtěžku.

4.11 Nedostatky

Ač byla snaha o dodržení stejných postupů a podmínek u všech extrakčních variant, je třeba zmínit několik nedostatků práce. Výsledky v rámci jedné extrakční sady jsou srovnatelné, ale srovnávání extraktů mezi různými sadami přináší jistá úskalí. Prvním z nich jsou samotné použité vzorky sinic, které byly bohužel obdrženy ve zmrazeném stavu, navíc v neznámém množství. Nelze tedy s jistotou říci, zda všechny čtyři obdržené zkumavky obsahovaly stejné množství, ač se dá předpokládat, že ano, protože byly zmrazeny alikvoty. Zváženy totiž byly jen 2 zkumavky obsahující *S4* variantu a byl mezi nimi znatelný váhový rozdíl, který však byl způsoben spíše velkou variabilitou v hmotnosti jednotlivých zkumavek. První 2 extrakce byly prováděny s variantou *S3* a extrakce v různém pH a koncentracích byly vyzkoušeny s *S4*. S velkou pravděpodobností budou tyto sinice morfologicky a proteinovým složením velmi podobné. Se vzorky sinic souvisí také skutečnost, že většina prošla jedním cyklem zmrazení a rozmrazení a část buněk tak byla lyzována ještě před zahájením extrakcí. Pro srovnávací účely této práce by zcela jistě bylo vhodnější pracovat s čerstvými buňkami. Naštěstí jediný cyklus je málo účinný a naruší jen malé množství buněk (Tanaka, 2015). Dopad na výsledky by tedy neměl být velký. Nežádoucí tvorbě ledových krystalků v buňkách lze při delším skladování v mrazu předejít přidáním dimethylsulfoxidu nebo exopolysacharidů (Ali et al., 2021).

Další potenciální překážkou je různé složení použitých pufrů, přesněji jejich doplnění o soli, chelatační činidla, inhibitory proteas a další složky, které mohou mít dopady na proteinový zisk a nebyly přítomny u všech variant. Konkrétní pufrы použité bez přídavných látek byly KPB, Tris-HCl v různých koncentracích a pufrы použité pro srovnání vlivu pH. Naopak některé pufrы obsahovaly β -merkaptoethanol a EDTA, které interferují s BCA metodou (He, 2011). Koncentrace těchto látek byla díky velkému naředění BCA roztokem nízká a vliv na přesnost měření by tedy měl být minimální. DNasa I byla přidána pouze u extrakce s detergenty a měla by rozštěpením odstranit nežádoucí DNA. Její přítomnost ani absence u dalších extrakčních pufrů však nejspíš neměla velký vliv, protože ultrazvuk samotný DNA degraduje (Elsner & Lindblad, 1989).

5 ZÁVĚR

Tato práce pojednává o metodách lýzy buněk sinic a extrakce jejich intracelulárního obsahu se zaměřením především na proteiny.

V rámci teoretické části byly představeny sinice jako rozmanité organismy nabízející mnoho potenciálně využitelných produktů, jejichž zisk je omezen odolnou BS sinic. Dále byly rozebrány běžně používané metody pro lýzu buněk společně se svými klady a zápory. Poslední část je věnována metodice extrakcí proteinů a dalších molekul.

V praktické části bylo provedeno několik sad extrakcí proteinů ze sinice *Synechococcus Sp. UPOC S3* a *S4* s cílem jejich srovnání. Bylo zjištěno, že ultrazvuk může být účinnou a snadno dostupnou metodou pro lyzování buněk sinic, ač má prostor pro zlepšení, kterého lze docílit doplněním lyzačních pufrů detergenty či lysozymem. Dále byla vyzkoušena extrakce kuličkovým homogenizátorem, který přinesl horší výsledky než ultrazvuk. Nakonec byla omylem vyzkoušena do jisté míry i metoda zmrazování a rozmrazování, kterou však pro nízký počet cyklů nelze více zhodnotit.

Přínos déle trvajících extrakcí se ukázal spíše záporný a je doporučeno se jim vyhnout, nebo doplnit extrakční pufr o směs inhibující všechny třídy proteas, případně proteasovou aktivitu změřit a ujistit se, že je minimální.

BCA metodou byly analyzovány proteinové koncentrace v extraktech, přičemž nejvyšší hodnoty $4,22 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ dosáhl vzorek extrahovaný ultrazvukem v přítomnosti SDS a lysozymu. Dále bylo zjištěno, že extrakce v kyselém pH není pro proteiny vhodná a jako nejlepší kompromis mezi proteinovým ziskem a zachováním funkčnosti produktu bylo zvoleno pH 8,0. Ač vliv různých koncentrací pufru nepřinesl přílišné rozdíly, použití vyšších koncentrací se ukázalo jako spolehlivější volba.

Nakonec bylo za pomoci SDS-PAGE zhodnoceno proteinové složení jednotlivých extraktů a byla srovnána redukovaná intenzita proteinových pásů, která ve většina případů podpořila výsledky BCA metody. Extrakty obsahovaly velké zastoupení proteinů do 20 kDa a napříč vzorky byla nalezena i vysoká přítomnost proteinů o odhadovaných M_w 100–120 a 50–55 kDa. Předpokládá se, že identita velké části z nich bude patřit částem fotosyntetického aparátu sinic.

V rámci dalšího výzkumu je široký prostor pro bližší otestování přínosu jednotlivých složek jako např. lysozymu. Dále se nabízí otestování většího množství lyzačních metod, neboť v rámci této práce bylo pracováno převážně s ultrazvukem a taktéž ověření dosažených výsledků u více druhů sinic.

6 LITERATURA

- Abed, R. M. M., Dobretsov, S., & Sudesh, K. (2009). Applications of cyanobacteria in biotechnology. *Journal of Applied Microbiology*, *106*(1), 1-12. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.2008.03918.x>
- Adams, D. G., & Duggan, P. S. (1999). Tansley Review No. 107. Heterocyst and akinete differentiation in cyanobacteria. *New Phytologist*, *144*(1), 1-33. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.1999.00505.x>
- Ali, P., Fucich, D., Shah, A. A., Hasan, F., & Chen, F. (2021). Cryopreservation of Cyanobacteria and Eukaryotic Microalgae Using Exopolysaccharide Extracted from a Glacier Bacterium. *Microorganisms*, *9*(2), 1-14. <https://doi.org/10.3390/microorganisms9020395>
- Anantharajappa, K., Dharmesh, S. M., & Ravi, S. (2020). Gastro-protective potentials of Spirulina: role of vitamin B12. *Journal of Food Science and Technology*, *57*(2), 745-753. <https://doi.org/10.1007/s13197-019-04107-8>
- Andersson, I., & Backlund, A. (2008). Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry*, *46*(3), 275-291. <https://doi.org/10.1016/j.plaphy.2008.01.001>
- Andreeva, N. A., Melnikov, V. V., & Snarskaya, D. D. (2020). The Role of Cyanobacteria in Marine Ecosystems. *Russian Journal of Marine Biology*, *46*(3), 154-165. <https://doi.org/10.1134/S1063074020030025>
- Andrews, B. A., & Asenjo, J. A. (1987). Enzymatic lysis and disruption of microbial cells. *Trends in Biotechnology*, *5*(10), 273-277. [https://doi.org/10.1016/0167-7799\(87\)90058-8](https://doi.org/10.1016/0167-7799(87)90058-8)
- Anjos, L., Estêvão, J., Infante, C., Mantecón, L., & Power, D. M. (2022). Extracting protein from microalgae (*Tetraselmis chuii*) for proteome analysis. *MethodsX*, *9*, 1-19. <https://doi.org/10.1016/j.mex.2022.101637>
- Azencott, H. R., Peter, G. F., & Prausnitz, M. R. (2007). Influence of the Cell Wall on Intracellular Delivery to Algal Cells by Electroporation and Sonication. *Ultrasound in Medicine & Biology*, *33*(11), 1805-1817. <https://doi.org/10.1016/j.ultrasmedbio.2007.05.008>
- Baase, W. A., Liu, L., Tronrud, D. E., & Matthews, B. W. (2010). Lessons from the lysozyme of phage T4. *Protein Science*, *19*(4), 631-641. <https://doi.org/10.1002/pro.344>
- Balasubramanian, R. K., Yen Doan, T. T., & Obbard, J. P. (2013). Factors affecting cellular lipid extraction from marine microalgae. *Chemical Engineering Journal*, *215-216*, 929-936. <https://doi.org/10.1016/j.cej.2012.11.063>
- Balasubramanian, S., Allen, J. D., Kanitkar, A., & Boldor, D. (2011). Oil extraction from *Scenedesmus obliquus* using a continuous microwave system – design, optimization, and quality characterization. *Bioresource Technology*, *102*(3), 3396-3403. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.09.119>
- Balasundaram, B., Skill, S. C., & Llewellyn, C. A. (2012). A low energy process for the recovery of bioproducts from cyanobacteria using a ball mill. *Biochemical Engineering Journal*, *69*, 48-56. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2012.08.010>
- Balduyck, L., Bruneel, C., Goiris, K., Dejonghe, C., & Foubert, I. (2018). Influence of High Pressure Homogenization on Free Fatty Acid Formation in *Nannochloropsis* sp. *European Journal of Lipid Science and Technology*, *120*(4), 1-19. <https://doi.org/10.1002/ejlt.201700436>
- Barbarino, E., & Lourenço, S. O. (2005). An evaluation of methods for extraction and quantification of protein from marine macro- and microalgae. *Journal of Applied Phycology*, *17*(5), 447-460. <https://doi.org/10.1007/s10811-005-1641-4>
- Becker, T., Ogez, J. R., & Builder, S. E. (1983). Downstream processing of proteins. *Biotechnology Advances*, *1*(2), 247-261. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(83\)90591-8](https://doi.org/10.1016/0734-9750(83)90591-8)
- Belay, A., Ota, Y., Miyakawa, K., & Shimamatsu, H. (1993). Current knowledge on potential health benefits of Spirulina. *Journal of Applied Phycology*, *5*(2), 235-241. <https://doi.org/10.1007/BF00004024>
- Berman-Frank, I., Lundgren, P., & Falkowski, P. (2003). Nitrogen fixation and photosynthetic oxygen evolution in cyanobacteria. *Research in Microbiology*, *154*(3), 157-164. [https://doi.org/10.1016/S0923-2508\(03\)00029-9](https://doi.org/10.1016/S0923-2508(03)00029-9)

- Bernaerts, T. M. M., Gheysen, L., Foubert, I., Hendrickx, M. E., & Van Loey, A. M. (2019). Evaluating microalgal cell disruption upon ultra high pressure homogenization. *Algal Research*, 42. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101616>
- Bhilare, K. D., Patil, M. D., Tangadpalliwar, S., Shinde, A., Garg, P., & Banerjee, U. C. (2019). Machine learning modelling for the ultrasonication-mediated disruption of recombinant *E. coli* for the efficient release of nitrilase. *Ultrasonics*, 98, 72-81. <https://doi.org/10.1016/j.ultras.2019.06.006>
- Billar, P., Friedman, C., & Ross, A. B. (2013). Hydrothermal microwave processing of microalgae as a pre-treatment and extraction technique for bio-fuels and bio-products. *Bioresource Technology*, 136, 188-195. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2013.02.088>
- Bligh, E. G., & Dyer, W. J. (1959). A RAPID METHOD OF TOTAL LIPID EXTRACTION AND PURIFICATION. *Canadian Journal of Biochemistry and Physiology*, 37(8), 911-917. <https://doi.org/10.1139/o59-099>
- Borbély, A., Figueras, E., Martins, A., Esposito, S., Auciello, G., Monteagudo, E., Di Marco, A., Summa, V., Cordella, P., Perego, R., Kemker, I., Frese, M., Gallinari, P., Steinkühler, C., & Sewald, N. (2019). Synthesis and Biological Evaluation of RGD–Cryptophycin Conjugates for Targeted Drug Delivery. *Pharmaceutics*, 11(4), 1-15. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics11040151>
- Brown, R. B., & Audet, J. (2008). Current techniques for single-cell lysis. *Journal of The Royal Society Interface*, 5(2), 131-138. <https://doi.org/10.1098/rsif.2008.0009.focus>
- Bryant, D. A. (1991). Cyanobacterial Phycobilisomes: Progress toward Complete Structural and Functional Analysis via Molecular Genetics. In *The Photosynthetic Apparatus: Molecular Biology and Operation* (pp. 257-300). Academic Press. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-715010-9.50014-1>
- Büdel, B., Darienko, T., Deutschewitz, K., Dojani, S., Friedl, T., Mohr, K. I., Salisch, M., Reisser, W., & Weber, B. (2009). Southern African Biological Soil Crusts are Ubiquitous and Highly Diverse in Drylands, Being Restricted by Rainfall Frequency. *Microbial Ecology*, 57(2), 229-247. <https://doi.org/10.1007/s00248-008-9449-9>
- Buchmann, L., Brändle, I., Haberkorn, I., Hiestand, M., & Mathys, A. (2019). Pulsed electric field based cyclic protein extraction of microalgae towards closed-loop biorefinery concepts. *Bioresource Technology*, 291, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2019.121870>
- Candiano, G., Bruschi, M., Musante, L., Santucci, L., Ghiggeri, G. M., Carnemolla, B., Orecchia, P., Zardi, L., & Righetti, P. G. (2004). Blue silver: A very sensitive colloidal Coomassie G-250 staining for proteome analysis. *ELECTROPHORESIS*, 25(9), 1327-1333. <https://doi.org/10.1002/elps.200305844>
- Carmichael, W. W. (1992). Cyanobacteria secondary metabolites—the cyanotoxins. *Journal of Applied Bacteriology*, 72(6), 445-459. <https://doi.org/10.1111/j.1365-2672.1992.tb01858.x>
- Castenholz, R. W. (1992). SPECIES USAGE, CONCEPT, AND EVOLUTION IN THE CYANOBACTERIA (BLUE-GREEN ALGAE). *Journal of Phycology*, 28(6), 737-745. <https://doi.org/10.1111/j.0022-3646.1992.00737.x>
- Coccaro, N., Ferrari, G., & Donsì, F. (2018). Understanding the break-up phenomena in an orifice-valve high pressure homogenizer using spherical bacterial cells (*Lactococcus lactis*) as a model disruption indicator. *Journal of Food Engineering*, 236, 60-71. <https://doi.org/10.1016/j.jfoodeng.2018.05.011>
- Cohen, Y., Jørgensen, B. B., Padan, E., & Shilo, M. (1975). Sulphide-dependent anoxygenic photosynthesis in the cyanobacterium *Oscillatoria limnetica*. *Nature*, 257(5526), 489-492. <https://doi.org/10.1038/257489a0>
- Corrêa, P. S., Morais Júnior, W. G., Martins, A. A., Caetano, N. S., & Mata, T. M. (2021). Microalgae Biomolecules: Extraction, Separation and Purification Methods. *Processes*, 9(1), 1-34. <https://doi.org/10.3390/pr9010010>
- D'Hondt, E., Martín-Juárez, J., Bolado, S., Kasperoviciene, J., Koreiviene, J., Sulcius, S., Elst, K., & Bastiaens, L. (2017). Cell disruption technologies. In *Microalgae-Based Biofuels and Bioproducts* (1st ed., pp. 133-154). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-08-101023-5.00006-6>

- de Carvalho, J. C., Medeiros, A. B. P., Letti, L. A. J., Kirnev, P. C. S., & Soccol, C. R. (2017). Cell Disruption and Isolation of Intracellular Products. *Current Developments in Biotechnology and Bioengineering*, 807-822. <https://doi.org/10.1016/B978-0-444-63662-1.00035-X>
- Desai, S. H., & Atsumi, S. (2013). Photosynthetic approaches to chemical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, 24(6), 1031-1036. <https://doi.org/10.1016/j.copbio.2013.03.015>
- Deutscher, M. P. (1990). [8] Maintaining protein stability. *Guide to Protein Purification*, 83-89. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(90\)82010-Y](https://doi.org/10.1016/0076-6879(90)82010-Y)
- Dixon, C., & Wilken, L. R. (2018). Green microalgae biomolecule separations and recovery. *Bioresources and Bioprocessing*, 5(1), 1-24. <https://doi.org/10.1186/s40643-018-0199-3>
- Doucha, J., & Lívanský, K. (2008). Influence of processing parameters on disintegration of Chlorella cells in various types of homogenizers. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 81(3), 431-440. <https://doi.org/10.1007/s00253-008-1660-6>
- Ducat, D. C., Way, J. C., & Silver, P. A. (2011). Engineering cyanobacteria to generate high-value products. *Trends in Biotechnology*, 29(2), 95-103. <https://doi.org/10.1016/j.tibtech.2010.12.003>
- Dumay, E., Chevalier-Lucia, D., Picart-Palmade, L., Benzaria, A., Gràcia-Julià, A., & Blayo, C. (2013). Technological aspects and potential applications of (ultra) high-pressure homogenisation. *Trends in Food Science & Technology*, 31(1), 13-26. <https://doi.org/10.1016/j.tifs.2012.03.005>
- Durall, C., Kukil, K., Hawkes, J. A., Albergati, A., Lindblad, P., & Lindberg, P. (2021). Production of succinate by engineered strains of Synechocystis PCC 6803 overexpressing phosphoenolpyruvate carboxylase and a glyoxylate shunt. *Microbial Cell Factories*, 20(1), 1-14. <https://doi.org/10.1186/s12934-021-01529-y>
- Dvořák, P., Casamatta, D. A., Pouličková, A., Hašler, P., Ondřej, V., & Sanges, R. (2014). Synechococcus: 3 billion years of global dominance. *Molecular Ecology*, 23(22), 5538-5551. <https://doi.org/10.1111/mec.12948>
- Elsner, H. I., & Lindblad, E. B. (1989). Ultrasonic Degradation of DNA. *DNA*, 8(10), 697-701. <https://doi.org/10.1089/dna.1989.8.697>
- Fais, G., Manca, A., Bolognesi, F., Borselli, M., Concas, A., Busutti, M., Broggi, G., Sanna, P., Castillo-Aleman, Y. M., Rivero-Jiménez, R. A., Bencomo-Hernandez, A. A., Ventura-Carmenate, Y., Altea, M., Pantaleo, A., Gabrielli, G., Biglioli, F., Cao, G., & Giannaccare, G. (2022). Wide Range Applications of Spirulina: From Earth to Space Missions. *Marine Drugs*, 20(5), 1-27. <https://doi.org/10.3390/md20050299>
- Farrokh, P., Sheikhpour, M., Kasaeian, A., Asadi, H., & Bavandi, R. (2019). Cyanobacteria as an eco-friendly resource for biofuel production: A critical review. *Biotechnology Progress*, 35(5), 1-16. <https://doi.org/10.1002/btpr.2835>
- Field, L. M., Fagerberg, W. R., Gatto, K. K., & Anne Böttger, S. (2017). A comparison of protein extraction methods optimizing high protein yields from marine algae and cyanobacteria. *Journal of Applied Phycology*, 29(3), 1271-1278. <https://doi.org/10.1007/s10811-016-1027-9>
- Flombaum, P., Gallegos, J. L., Gordillo, R. A., Rincón, J., Zabala, L. L., Jiao, N., Karl, D. M., Li, W. K. W., Lomas, M. W., Veneziano, D., Vera, C. S., Vrugt, J. A., & Martiny, A. C. (2013). Present and future global distributions of the marine Cyanobacteria Prochlorococcus and Synechococcus. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 110(24), 9824-9829. <https://doi.org/10.1073/pnas.1307701110>
- Flores, E., & Herrero, A. (1994). Assimilatory Nitrogen Metabolism and Its Regulation. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (1st ed., pp. 487-517). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8_16
- Folch, J., Lees, M., & Stanley, G. H. S. (1957). A SIMPLE METHOD FOR THE ISOLATION AND PURIFICATION OF TOTAL LIPIDES FROM ANIMAL TISSUES. *Journal of Biological Chemistry*, 226(1), 497-509. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)64849-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)64849-5)
- Gademann, K., & Portmann, C. (2008). Secondary Metabolites from Cyanobacteria: Complex Structures and Powerful Bioactivities. *Current Organic Chemistry*, 12(4), 326-341. <https://doi.org/10.2174/138527208783743750>

- Gantt, E. (1994). Supramolecular Membrane Organization. In D. A. Bryant, *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (1st ed., pp. 119-138). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8_6
- Gaysina, L. A., Saraf, A., & Singh, P. (2019). Cyanobacteria in Diverse Habitats. In A. K. Mishra, A. N. Rai, & D. N. Tiwari (Eds.), *Cyanobacteria* (pp. 1-28). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00001-5>
- Gebhardt, J. S., & Nierzwicki-Bauer, S. A. (1991). Identification of a common cyanobacterial symbiont associated with *Azolla* spp. through molecular and morphological characterization of free-living and symbiotic cyanobacteria. *Applied and Environmental Microbiology*, *57*(8), 2141-2146. <https://doi.org/10.1128/aem.57.8.2141-2146.1991>
- Geciova, J., Bury, D., & Jelen, P. (2002). Methods for disruption of microbial cells for potential use in the dairy industry—a review. *International Dairy Journal*, *12*(6), 541-553. [https://doi.org/10.1016/S0958-6946\(02\)00038-9](https://doi.org/10.1016/S0958-6946(02)00038-9)
- Goldberg, S. (2008). Mechanical/Physical Methods of Cell Disruption and Tissue Homogenization. In *2D PAGE: Sample Preparation and Fractionation* (1st ed., pp. 3-22). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-60327-064-9_1
- Golecki, J. R. (1977). Studies on ultrastructure and composition of cell walls of the cyanobacterium *Anacystis nidulans*. *Archives of Microbiology*, *114*(1), 35-41. <https://doi.org/10.1007/BF00429627>
- Gomes, T. A., Zanette, C. M., & Spier, M. R. (2020). An overview of cell disruption methods for intracellular biomolecules recovery. *Preparative Biochemistry & Biotechnology*, *50*(7), 635-654. <https://doi.org/10.1080/10826068.2020.1728696>
- Gómez-Lojero, C., Leyva-Castillo, L. E., Herrera-Salgado, P., Barrera-Rojas, J., Ríos-Castro, E., & Gutiérrez-Cirlos, E. B. (2018). Leptolyngbya CCM 4, a cyanobacterium with far-red photoacclimation from Cuatro Ciénegas Basin, México. *Photosynthetica*, *56*(SPECIAL ISSUE), 342-353. <https://doi.org/10.1007/s11099-018-0774-z>
- Greenstein, K. E., Zamyadi, A., & Wert, E. C. (2021). Comparative Assessment of Physical and Chemical Cyanobacteria Cell Lysis Methods for Total Microcystin-LR Analysis. *Toxins*, *13*(9), 1-12. <https://doi.org/10.3390/toxins13090596>
- Griese, M., Lange, C., & Soppa, J. (2011). Ploidy in cyanobacteria. *FEMS Microbiology Letters*, *323*(2), 124-131. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2011.02368.x>
- Guedes, A. C., Amaro, H. M., Gião, M. S., & Malcata, F. X. (2013). Optimization of ABTS radical cation assay specifically for determination of antioxidant capacity of intracellular extracts of microalgae and cyanobacteria. *Food Chemistry*, *138*(1), 638-643. <https://doi.org/10.1016/j.foodchem.2012.09.106>
- Günerken, E., D'Hondt, E., Eppink, M. H. M., Garcia-Gonzalez, L., Elst, K., & Wijffels, R. H. (2015). Cell disruption for microalgae biorefineries. *Biotechnology Advances*, *33*(2), 243-260. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2015.01.008>
- Halim, R., Harun, R., Danquah, M. K., & Webley, P. A. (2012). Microalgal cell disruption for biofuel development. *Applied Energy*, *91*(1), 116-121. <https://doi.org/10.1016/j.apenergy.2011.08.048>
- Hara, A., & Radin, N. S. (1978). Lipid extraction of tissues with a low-toxicity solvent. *Analytical Biochemistry*, *90*(1), 420-426. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(78\)90046-5](https://doi.org/10.1016/0003-2697(78)90046-5)
- Harrison, S. T. L. (1991). Bacterial cell disruption: A key unit operation in the recovery of intracellular products. *Biotechnology Advances*, *9*(2), 217-240. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(91\)90005-G](https://doi.org/10.1016/0734-9750(91)90005-G)
- He, F. (2011). BCA (Bicinchoninic Acid) Protein Assay. *Bio-101*, *1*(5), e44. <https://doi.org/10.21769/BioProtoc.44>
- Helenius, A., & Simons, K. (1975). Solubilization of membranes by detergents. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Biomembranes*, *415*(1), 29-79. [https://doi.org/10.1016/0304-4157\(75\)90016-7](https://doi.org/10.1016/0304-4157(75)90016-7)
- Helfrich, M., Ross, A., King, G. C., Turner, A. G., & Larkum, A. W. D. (1999). Identification of [8-vinyl]-protochlorophyllide a in phototrophic prokaryotes and algae: chemical and spectroscopic properties. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, *1410*(3), 262-272. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(99\)00004-3](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(99)00004-3)

- Hoiczuk, E., & Baumeister, W. (1995). Envelope structure of four gliding filamentous cyanobacteria. *Journal of Bacteriology*, 177(9), 2387-2395. <https://doi.org/10.1128/jb.177.9.2387-2395.1995>
- Hoiczuk, E., & Hansel, A. (2000). Cyanobacterial Cell Walls: News from an Unusual Prokaryotic Envelope. *Journal of Bacteriology*, 182(5), 1191-1199. <https://doi.org/10.1128/JB.182.5.1191-1199.2000>
- Chamsart, S., & Karnjanasorn, T. (2007). Alkaline-cell lysis through in-line static mixer reactor for the production of plasmid DNA for gene therapy. *Biotechnology and Bioengineering*, 96(3), 471-482. <https://doi.org/10.1002/bit.21142>
- Chen, M., Schliep, M., Willows, R. D., Cai, Z. -L., Neilan, B. A., & Scheer, H. (2010). A Red-Shifted Chlorophyll. *Science*, 329(5997), 1318-1319. <https://doi.org/10.1126/science.1191127>
- Islam, M. S., Sazawa, K., Sugawara, K., & Kuramitz, H. (2019). Micro-droplet Hydrodynamic Voltammetry for the Determination of Microcystin-LR Based on Protein Phosphatase. *Journal of Water and Environment Technology*, 17(1), 18-26. <https://doi.org/10.2965/jwet.18-040>
- Ivleva, N. B., & Golden, S. S. (2007). Protein Extraction, Fractionation, and Purification From Cyanobacteria. In *Circadian Rhythms* (pp. 365-373). Humana Press. https://doi.org/10.1007/978-1-59745-257-1_26
- Jones, M. R., Pinto, E., Torres, M. A., Dörr, F., Mazur-Marzec, H., Szubert, K., Tartaglione, L., Dell'Aversano, C., Miles, C. O., Beach, D. G., McCarron, P., Sivonen, K., Fewer, D. P., Jokela, J., & Janssen, E. M. -L. (2021). CyanoMetDB, a comprehensive public database of secondary metabolites from cyanobacteria. *Water Research*, 196. <https://doi.org/10.1016/j.watres.2021.117017>
- Jürgens, U. J., Drews, G., & Weckesser, J. (1983). Primary structure of the peptidoglycan from the unicellular cyanobacterium *Synechocystis* sp. strain PCC 6714. *Journal of Bacteriology*, 154(1), 471-478. <https://doi.org/10.1128/jb.154.1.471-478.1983>
- Kalina, T., & Váňa, J. (2005). *Sinice, řasy, houby, mechorosty a podobné organismy v současné biologii*. Karolinum.
- Kang, H., Choi, M. -C., Seo, C., & Park, Y. (2018). Therapeutic Properties and Biological Benefits of Marine-Derived Anticancer Peptides. *International Journal of Molecular Sciences*, 19(3), 1-40. <https://doi.org/10.3390/ijms19030919>
- Kim, I. S., Nguyen, G. -H., Kim, S. -Y., Lee, J. -W., & Yu, H. -W. (2009). Evaluation of Methods for Cyanobacterial Cell Lysis and Toxin (Microcystin-LR) Extraction Using Chromatographic and Mass Spectrometric Analyses. *Environmental Engineering Research*, 14(4), 250-254. <https://doi.org/10.4491/eer.2009.14.4.250>
- Komárek, J., Kopecký, J., & Cepák, V. (1999). Generic characters of the simplest cyanoprokaryotes and. *Cryptogamie Algologie*, 20(3), 209-222. [https://doi.org/10.1016/S0181-1568\(99\)80015-4](https://doi.org/10.1016/S0181-1568(99)80015-4)
- Kumar, P. S., & Bandit, A. B. (1999). Modeling Hydrodynamic Cavitation. *Chemical Engineering & Technology*, 22(12), 1017 - 1027. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1521-4125\(199912\)22:12<1017::AID-CEAT1017>3.0.CO;2-L](https://doi.org/10.1002/(SICI)1521-4125(199912)22:12<1017::AID-CEAT1017>3.0.CO;2-L)
- Kumar, S. P. J., Prasad, S. R., Banerjee, R., Agarwal, D. K., Kulkarni, K. S., & Ramesh, K. V. (2017). Green solvents and technologies for oil extraction from oilseeds. *Chemistry Central Journal*, 11(1), 1-7. <https://doi.org/10.1186/s13065-017-0238-8>
- Laemmli, U. K. (1970). Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. *Nature*, 227(5259), 680-685. <https://doi.org/10.1038/227680a0>
- Lee, A. K., Lewis, D. M., & Ashman, P. J. (2012). Disruption of microalgal cells for the extraction of lipids for biofuels: Processes and specific energy requirements. *Biomass and Bioenergy*, 46, 89-101. <https://doi.org/10.1016/j.biombioe.2012.06.034>
- Lee, S. Y., Cho, J. M., Chang, Y. K., & Oh, Y. -K. (2017). Cell disruption and lipid extraction for microalgal biorefineries: A review. *Bioresour. Technology*, 244(part 2), 1317-1328. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2017.06.038>
- Levy, R., Okun, Z., & Shpigelman, A. (2021). High-Pressure Homogenization: Principles and Applications Beyond Microbial Inactivation. *Food Engineering Reviews*, 13(3), 490-508. <https://doi.org/10.1007/s12393-020-09239-8>

- Lorente, E., Farriol, X., & Salvadó, J. (2015). Steam explosion as a fractionation step in biofuel production from microalgae. *Fuel Processing Technology*, *131*, 93-98. <https://doi.org/10.1016/j.fuproc.2014.11.009>
- Ma, Y. -A., Cheng, Y. -M., Huang, J. -W., Jen, J. -F., Huang, Y. -S., & Yu, C. -C. (2014). Effects of ultrasonic and microwave pretreatments on lipid extraction of microalgae. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, *37*(8), 1543-1549. <https://doi.org/10.1007/s00449-014-1126-4>
- Ma, Y., & Jiao, N. (2004). Molecular ecology studies of marine *Synechococcus* *. *Progress in Natural Science*, *14*(8), 649-655. <https://doi.org/10.1080/10020070412331344101>
- MacColl, R. (1998). Cyanobacterial Phycobilisomes. *Journal of Structural Biology*, *124*(2-3), 311-334. <https://doi.org/10.1006/jsbi.1998.4062>
- Mahnič-Kalamiza, S., Vorobiev, E., & Miklavčič, D. (2014). Electroporation in Food Processing and Biorefinery. *The Journal of Membrane Biology*, *247*(12), 1279-1304. <https://doi.org/10.1007/s00232-014-9737-x>
- Mataloni, G., & Komárek, J. (2004). *Gloeocapsopsis aurea*, a new subaerophytic cyanobacterium from maritime Antarctica. *Polar Biology*, *27*(10), 623-628. <https://doi.org/10.1007/s00300-004-0620-6>
- Mayer, A. M. S., Rodríguez, A. D., Berlinck, R. G. S., & Hamann, M. T. (2009). Marine pharmacology in 2005-6: Marine compounds with anthelmintic, antibacterial, anticoagulant, antifungal, anti-inflammatory, antimalarial, antiprotozoal, antituberculosis, and antiviral activities; affecting the cardiovascular, immune and nervous systems, and other miscellaneous mechanisms of action. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1790*(5), 283-308. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2009.03.011>
- Mehta, K. K., Evitt, N. H., & Swartz, J. R. (2015). Chemical lysis of cyanobacteria. *Journal of Biological Engineering*, *9*(1). <https://doi.org/10.1186/s13036-015-0007-y>
- Metcalf, J. S., & Codd, G. A. (2000). Microwave oven and boiling waterbath extraction of hepatotoxins from cyanobacterial cells. *FEMS Microbiology Letters*, *184*(2), 241-246. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.2000.tb09021.x>
- Middelberg, A. P. J. (1995). Process-scale disruption of microorganisms. *Biotechnology Advances*, *13*(3), 491-551. [https://doi.org/10.1016/0734-9750\(95\)02007-P](https://doi.org/10.1016/0734-9750(95)02007-P)
- Miyashita, H., Ikemoto, H., Kurano, N., Adachi, K., Chihara, M., & Miyachi, S. (1996). Chlorophyll d as a major pigment. *Nature*, *383*(6599), 402-402. <https://doi.org/10.1038/383402a0>
- Morist, A., Montesinos, J. L., Cusidó, J. A., & Gòdia, F. (2001). Recovery and treatment of *Spirulina platensis* cells cultured in a continuous photobioreactor to be used as food. *Process Biochemistry*, *37*(5), 535-547. [https://doi.org/10.1016/S0032-9592\(01\)00230-8](https://doi.org/10.1016/S0032-9592(01)00230-8)
- Muro-Pastor, M. I., Reyes, J. C., & Florencio, F. J. (2005). Ammonium assimilation in cyanobacteria. *Photosynthesis Research*, *83*(2), 135-150. <https://doi.org/10.1007/s11120-004-2082-7>
- Nagle, V., Mhalsekar, N. M., & Jagtap, T. G. (2010). Isolation, optimization and characterization of selected Cyanophycean members. *Indian Journal of Marine Sciences*, *39*, 212-218.
- Nixdorff, K., Gmeiner, J., & Martin, H. H. (1978). Interaction of lipopolysaccharide with detergents and its possible role in the detergent resistance of the outer membrane of gram-negative bacteria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, *510*(1), 87-98. [https://doi.org/10.1016/0005-2736\(78\)90132-3](https://doi.org/10.1016/0005-2736(78)90132-3)
- Nozzi, N. E., Oliver, J. W. K., & Atsumi, S. (2013). Cyanobacteria as a Platform for Biofuel Production. *Frontiers in Bioengineering and Biotechnology*, *1*(7), 1-6. <https://doi.org/10.3389/fbioe.2013.00007>
- Nurra, C., Torras, C., Clavero, E., Ríos, S., Rey, M., Lorente, E., Farriol, X., & Salvadó, J. (2014). Biorefinery concept in a microalgae pilot plant. Culturing, dynamic filtration and steam explosion fractionation. *Bioresource Technology*, *163*, 136-142. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.04.009>
- Ohkubo, S., & Miyashita, H. (2017). A niche for cyanobacteria producing chlorophyll f within a microbial mat. *The ISME Journal*, *11*(10), 2368-2378. <https://doi.org/10.1038/ismej.2017.98>

- Palenik, B., & Haselkorn, R. (1992). Multiple evolutionary origins of prochlorophytes, the chlorophyllb-containing prokaryotes. *Nature*, 355(6357), 265-267. <https://doi.org/10.1038/355265a0>
- Passos, L. S., de Freitas, P. N. N., Menezes, R. B., de Souza, A. O., Silva, M. F. da, Converti, A., & Pinto, E. (2023). Content of Lipids, Fatty Acids, Carbohydrates, and Proteins in Continental Cyanobacteria: A Systematic Analysis and Database Application. *Applied Sciences*, 13(5), 1-28. <https://doi.org/10.3390/app13053162>
- Piasecka, A., Krzemińska, I., & Tys, J. (2014). Physical Methods of Microalgal Biomass Pretreatment. *International Agrophysics*, 28(3), 341-348. <https://doi.org/10.2478/intag-2014-0024>
- Pingoud, A., Urbanke, C., Hoggert, J., & Jeltsch, A. (2002). *Biochemical methods: a concise guide for students and researchers*. Wiley-VCH.
- Plazinski, J., Zheng, Q., Taylor, R., Croft, L., Rolfe, B. G., & Gunning, B. E. S. (1990). DNA Probes Show Genetic Variation in Cyanobacterial Symbionts of the Azolla Fern and a Closer Relationship to Free-Living Nostoc Strains than to Free-Living Anabaena Strains. *Applied and Environmental Microbiology*, 56(5), 1263-1270. <https://doi.org/10.1128/aem.56.5.1263-1270.1990>
- Postma, P. R., Miron, T. L., Olivieri, G., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., & Eppink, M. H. M. (2015). Mild disintegration of the green microalgae *Chlorella vulgaris* using bead milling. *Bioresource Technology*, 184, 297-304. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.09.033>
- Postma, P. R., Pataro, G., Capitoli, M., Barbosa, M. J., Wijffels, R. H., Eppink, M. H. M., Olivieri, G., & Ferrari, G. (2016). Selective extraction of intracellular components from the microalga *Chlorella vulgaris* by combined pulsed electric field-temperature treatment. *Bioresource Technology*, 203, 80-88. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2015.12.012>
- Proctor, V. A., Cunningham, F. E., & Fung, D. Y. C. (1988). The chemistry of lysozyme and its use as a food preservative and a pharmaceutical. *CRC Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 26(4), 359-395. <https://doi.org/10.1080/10408398809527473>
- Qamar, H., Hussain, K., Soni, A., Khan, A., Hussain, T., & Chénais, B. (2021). Cyanobacteria as Natural Therapeutics and Pharmaceutical Potential: Role in Antitumor Activity and as Nanovectors. *Molecules*, 26(1), 1-30. <https://doi.org/10.3390/molecules26010247>
- Rahman, M. M., Hosano, N., & Hosano, H. (2022). Recovering Microalgal Bioresources: A Review of Cell Disruption Methods and Extraction Technologies. *Molecules*, 27(9), 1-31. <https://doi.org/10.3390/molecules27092786>
- Rai, A. N., Söderbäck, E., & Bergman, B. (2000). Tansley Review No. 116. *New Phytologist*, 147(3), 449-481. <https://doi.org/10.1046/j.1469-8137.2000.00720.x>
- Ranjith Kumar, R., Hanumantha Rao, P., & Arumugam, M. (2015). Lipid Extraction Methods from Microalgae: A Comprehensive Review. *Frontiers in Energy Research*, 2, 1-9. <https://doi.org/10.3389/fenrg.2014.00061>
- Rees, A. P., Woodward, E. M. S., & Joint, I. (2006). Concentrations and uptake of nitrate and ammonium in the Atlantic Ocean between and. *Deep Sea Research Part II: Topical Studies in Oceanography*, 53(14-16), 1649-1665. <https://doi.org/10.1016/j.dsr2.2006.05.008>
- Riesz, P., Berdahl, D., & Christman, C. L. (1985). Free radical generation by ultrasound in aqueous and nonaqueous solutions. *Environmental Health Perspectives*, 64, 233-252. <https://doi.org/10.1289/ehp.8564233>
- Rogers, H. J., Perkins, H. R., & Ward, J. B. (1980). *Microbial Cell Walls and Membrane*. Chapman & Hall.
- Sacilotto Detoni, A. M., Fonseca Costa, L. D., Pacheco, L. A., & Yunes, J. S. (2016). Toxic *Trichodesmium* bloom occurrence in the southwestern South Atlantic Ocean. *Toxicon*, 110, 51-55. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2015.12.003>
- Safi, C., Ursu, A. V., Laroche, C., Zebib, B., Merah, O., Pontalier, P. -Y., & Vaca-Garcia, C. (2014). Aqueous extraction of proteins from microalgae: Effect of different cell disruption methods. *Algal Research*, 3, 61-65. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2013.12.004>
- Saini, R. K., Prasad, P., Shang, X., & Keum, Y. -S. (2021). Advances in Lipid Extraction Methods—A Review. *International Journal of Molecular Sciences*, 22(24), 1-22. <https://doi.org/10.3390/ijms222413643>

- Salazar, O., & Asenjo, J. A. (2007). Enzymatic lysis of microbial cells. *Biotechnology Letters*, 29(7), 985-994. <https://doi.org/10.1007/s10529-007-9345-2>
- Samuel, A. D. T., Petersen, J. D., & Reese, T. S. (2001). Envelope structure of *Synechococcus* sp. WH8113, a nonflagellated swimming cyanobacterium. *BMC Microbiology*, 1(1), 1-8. <https://doi.org/10.1186/1471-2180-1-4>
- Saranya, N., Devi, P., Nithiyantham, S., & Jeyalaxmi, R. (2014). Cells Disruption by Ultrasonication. *BioNanoScience*, 4(4), 335-337. <https://doi.org/10.1007/s12668-014-0149-2>
- Shehadul Islam, M., Aryasomayajula, A., & Selvaganapathy, P. (2017). A Review on Macroscale and Microscale Cell Lysis Methods. *Micromachines*, 8(3), 1-22. <https://doi.org/10.3390/mi8030083>
- Shen, C. -H. (2019). Extraction and Purification of Nucleic Acids and Proteins. In *Diagnostic Molecular Biology* (pp. 143-166). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-802823-0.00006-7>
- Sheng, J., Vannela, R., & Rittmann, B. E. (2011). Evaluation of methods to extract and quantify lipids from *Synechocystis* PCC 6803. *Bioresource Technology*, 102(2), 1697-1703. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2010.08.007>
- Sheng, J., Vannela, R., & Rittmann, B. E. (2012). Disruption of *Synechocystis* PCC 6803 for lipid extraction. *Water Science and Technology*, 65(3), 567-573. <https://doi.org/10.2166/wst.2012.879>
- Shirgaonkar, I. Z., & Lothe, R. R. (1998). Comments on the Mechanism of Microbial Cell Disruption in High-Pressure and High-Speed Devices. *Biotechnology Progress*, 14(4), 657-660. <https://doi.org/10.1021/bp980052g>
- Scherer, D., Krust, D., Frey, W., Mueller, G., Nick, P., & Gusbeth, C. (2019). Pulsed electric field (PEF)-assisted protein recovery from *Chlorella vulgaris* is mediated by an enzymatic process after cell death. *Algal Research*, 41, 1-8. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2019.101536>
- Sidler, W. A. (1994). Phycobilisome and Phycobiliprotein Structures. In *The Molecular Biology of Cyanobacteria* (pp. 139-216). Springer Netherlands. https://doi.org/10.1007/978-94-011-0227-8_7
- Singh, J. S., Kumar, A., Rai, A. N., & Singh, D. P. (2016). Cyanobacteria: A Precious Bio-resource in Agriculture, Ecosystem, and Environmental Sustainability. *Frontiers in Microbiology*, 7(529), 1-19. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2016.00529>
- Slocombe, S. P., Ross, M., Thomas, N., McNeill, S., & Stanley, M. S. (2013). A rapid and general method for measurement of protein in micro-algal biomass. *Bioresource Technology*, 129, 51-57. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2012.10.163>
- Smedes, F. (1999). Determination of total lipid using non-chlorinated solvents. *The Analyst*, 124(11), 1711-1718. <https://doi.org/10.1039/a905904k>
- Smith, P. K., Krohn, R. I., Hermanson, G. T., Mallia, A. K., Gartner, F. H., Provenzano, M. D., Fujimoto, E. K., Goeke, N. M., Olson, B. J., & Klenk, D. C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Analytical Biochemistry*, 150(1), 76-85. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(85\)90442-7](https://doi.org/10.1016/0003-2697(85)90442-7)
- Solana, M., Rizza, C. S., & Bertucco, A. (2014). Exploiting microalgae as a source of essential fatty acids by supercritical fluid extraction of lipids: Comparison between *Scenedesmus obliquus*, *Chlorella protothecoides* and *Nannochloropsis salina*. *The Journal of Supercritical Fluids*, 92, 311-318. <https://doi.org/10.1016/j.supflu.2014.06.013>
- Soto-Sierra, L., Stoykova, P., & Nikolov, Z. L. (2018). Extraction and fractionation of microalgae-based protein products. *Algal Research*, 36, 175-192. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.10.023>
- Stanier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (1977). PHOTOTROPHIC PROKARYOTES: THE CYANOBACTERIA. *Annual Review of Microbiology*, 31(1), 225-274. <https://doi.org/10.1146/annurev.mi.31.100177.001301>
- Stanier, R. Y., & Cohen-Bazire, G. (1988). [14] Fine structure of cyanobacteria. *Cyanobacteria*, 157-172. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(88\)67017-0](https://doi.org/10.1016/0076-6879(88)67017-0)
- Strunecký, O., Ivanova, A. P., & Mareš, J. (2023). An updated classification of cyanobacterial orders and families based on phylogenomic and polyphasic analysis. *Journal of Phycology*, 59(1), 12-51. <https://doi.org/10.1111/jpy.13304>

- Su, Z., Olman, V., Mao, F., & Xu, Y. (2005). Comparative genomics analysis of NtcA regulons in cyanobacteria: regulation of nitrogen assimilation and its coupling to photosynthesis. *Nucleic Acids Research*, 33(16), 5156-5171. <https://doi.org/10.1093/nar/gki817>
- Šebela, M., Jahodářová, E., Raus, M., Lenobel, R., Hašler, P., & Calderaro, A. (2018). Intact cell MALDI-TOF mass spectrometric analysis of Chroococcidiopsis cyanobacteria for classification purposes and identification of possible marker proteins. *PLOS ONE*, 13(11), 1-21. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0208275>
- Tanaka, T. (2015). Traditional enzyme separation and preparation. In *Improving and Tailoring Enzymes for Food Quality and Functionality* (1st ed., pp. 59-83). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-1-78242-285-3.00003-X>
- Tandeu de Marsac, N., & Houmard, J. (1993). Adaptation of cyanobacteria to environmental stimuli: new steps towards molecular mechanisms. *FEMS Microbiology Letters*, 104(1-2), 119-189. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1993.tb05866.x>
- Tavanandi, H. A., Mittal, R., Chandrasekhar, J., & Raghavarao, K. S. M. S. (2018). Simple and efficient method for extraction of C-Phycocyanin from dry biomass of *Arthrospira platensis*. *Algal Research*, 31, 239-251. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2018.02.008>
- Teuling, E., Wierenga, P. A., Schrama, J. W., & Gruppen, H. (2017). Comparison of Protein Extracts from Various Unicellular Green Sources. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 65(36), 7989-8002. <https://doi.org/10.1021/acs.jafc.7b01788>
- Timira, V., Meki, K., Li, Z., Lin, H., Xu, M., & Pramod, S. N. (2022). A comprehensive review on the application of novel disruption techniques for proteins release from microalgae. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*, 62(16), 4309-4325. <https://doi.org/10.1080/10408398.2021.1873734>
- Unterlander, N., Champagne, P., & Plaxton, W. C. (2017). Lyophilization pretreatment facilitates extraction of soluble proteins and active enzymes from the oil-accumulating microalga *Chlorella vulgaris*. *Algal Research*, 25, 439-444. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2017.06.010>
- Ursu, A. -V., Marcati, A., Sayd, T., Sante-Lhoutellier, V., Djelveh, G., & Michaud, P. (2014). Extraction, fractionation and functional properties of proteins from the microalgae *Chlorella vulgaris*. *Bioresource Technology*, 157, 134-139. <https://doi.org/10.1016/j.biortech.2014.01.071>
- Vollmer, W., Blanot, D., & De Pedro, M. A. (2008a). Peptidoglycan structure and architecture. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 149-167. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00094.x>
- Vollmer, W., Joris, B., Charlier, P., & Foster, S. (2008b). Bacterial peptidoglycan (murein) hydrolases. *FEMS Microbiology Reviews*, 32(2), 259-286. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6976.2007.00099.x>
- Wang, C., & Lan, C. Q. (2018). Effects of shear stress on microalgae – A review. *Biotechnology Advances*, 36(4), 986-1002. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2018.03.001>
- Wang, G., & Wang, T. (2012). Characterization of Lipid Components in Two Microalgae for Biofuel Application. *Journal of the American Oil Chemists' Society*, 89(1), 135-143. <https://doi.org/10.1007/s11746-011-1879-8>
- Wang, M., Chen, S., Zhou, W., Yuan, W., & Wang, D. (2020). Algal cell lysis by bacteria: A review and comparison to conventional methods. *Algal Research*, 46, 1-10. <https://doi.org/10.1016/j.algal.2020.101794>
- Watanabe, F., Katsura, H., Takenaka, S., Fujita, T., Abe, K., Tamura, Y., Nakatsuka, T., & Nakano, Y. (1999). Pseudovitamin B 12 Is the Predominant Cobamide of an Algal Health Food, *Spirulina* Tablets. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 47(11), 4736-4741. <https://doi.org/10.1021/jf990541b>
- Whitton, B. A., & Potts, M. (2002). *The Ecology of Cyanobacteria: Their Diversity in Time and Space*. Springer Dordrecht. <https://doi.org/10.1007/0-306-46855-7>
- Wu, T., Yu, X., Hu, A., Zhang, L., Jin, Y., & Abid, M. (2015). Ultrasonic disruption of yeast cells: Underlying mechanism and effects of processing parameters. *Innovative Food Science & Emerging Technologies*, 28, 59-65. <https://doi.org/10.1016/j.ifset.2015.01.005>
- Wyatt, J. T., & Silvey, J. K. G. (1969). Nitrogen Fixation by *Gloeocapsa*. *Science*, 165(3896), 908-909. <https://doi.org/10.1126/science.165.3896.908>

- Yunes, J. S. (2019). Cyanobacterial Toxins. In *Cyanobacteria* (pp. 443-458). Elsevier. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-814667-5.00022-2>
- Zhang, W., Liu, J., Xiao, Y., Zhang, Y., Yu, Y., Zheng, Z., Liu, Y., & Li, Q. (2022). The Impact of Cyanobacteria Blooms on the Aquatic Environment and Human Health. *Toxins*, *14*(10), 1-10. <https://doi.org/10.3390/toxins14100658>
- Zheng, H., Yin, J., Gao, Z., Huang, H., Ji, X., & Dou, C. (2011). Disruption of *Chlorella vulgaris* Cells for the Release of Biodiesel-Producing Lipids: A Comparison of Grinding, Ultrasonication, Bead Milling, Enzymatic Lysis, and Microwaves. *Applied Biochemistry and Biotechnology*, *164*(7), 1215-1224. <https://doi.org/10.1007/s12010-011-9207-1>

7 SEZNAM POUŽITÝCH SYMBOLŮ A ZKRATEK

AA – akrylamid

APS – persíran amonný

BCA – bicinchoninová metoda

BIS – *N,N'*-methylenbisakrylamid

BS – buněčná stěna

BSA – hovězí sérový albumin

CM – cytoplazmatická membrána

HEWL – lysozym ze slepičího vaječného bílku (hen egg white lysozyme)

HPH – vysokotlaká homogenizace

HSH – vysokorychlostní homogenizace

KPB – K-fosfátový pufr

MC-LR – mikrocystin-leucin-arginin

PEF – pulzní elektrické pole

PMSF – fenylmethylsulfonyl fluorid

TEMED – *N,N,N',N'*-tetramethylethyldiamin

Tris – Tris(hydroxymethyl)aminomethan

TS pufr – Tris-HCl pufr se 30% (w/v) sacharosou

UHPH – ultra vysokotlaká homogenizace