



VYSOKÉ UČENÍ TECHNICKÉ V BRNĚ

BRNO UNIVERSITY OF TECHNOLOGY

FAKULTA CHEMICKÁ

FACULTY OF CHEMISTRY

ÚSTAV FYZIKÁLNÍ A SPOTŘEBNÍ CHEMIE

INSTITUTE OF PHYSICAL AND APPLIED CHEMISTRY

**OPTIMALIZACE PODMÍNEK KULTIVACE ŘASOVÝCH
KULTUR VE FOTOBIOREAKTORECH**

OPTIMIZATION OF CULTIVATION OF MICROALGAE CULTURES IN PHOTOBIOREACTORS

DIPLOMOVÁ PRÁCE

MASTER'S THESIS

AUTOR PRÁCE

AUTHOR

Bc. Dana Byrtusová

VEDOUCÍ PRÁCE

SUPERVISOR

Ing. Radka Kočí, Ph.D.

BRNO 2016



Vysoké učení technické v Brně
Fakulta chemická
Purkyňova 464/118, 61200 Brno

Zadání diplomové práce

Číslo diplomové práce:	FCH-DIP0938/2015	Akademický rok: 2015/2016
Ústav:	Ústav fyzikální a spotřební chemie	
Student(ka):	Bc. Dana Byrtusová	
Studijní program:	Chemie pro medicínské aplikace (N2846)	
Studijní obor:	Chemie pro medicínské aplikace (2808T031)	
Vedoucí práce	Ing. Radka Kočí, Ph.D.	
Konzultanti:		

Název diplomové práce:

Optimalizace podmínek kultivace řasových kultur ve fotobioreaktorech

Zadání diplomové práce:

Ve spolupráci se společností Photosystem Instruments budou v rámci práce řešeny následující dílčí cíle:

- literární rešerše zaměřená na mikrořasy, specifika jejich metabolismu, možnosti kultivace a využití
- zavedení a optimalizace metod kultivace mikrořas v různých typech fotobioreaktorů
- sledování metabolické aktivity mikrořas
- vyhodnocení výsledků.

Termín odevzdání diplomové práce: 6.5.2016

Diplomová práce se odevzdává v děkanem stanoveném počtu exemplářů na sekretariát ústavu a v elektronické formě vedoucímu diplomové práce. Toto zadání je přílohou diplomové práce.

Bc. Dana Byrtusová
Student(ka)

Ing. Radka Kočí, Ph.D.
Vedoucí práce

prof. Ing. Miloslav Pekař, CSc.
Ředitel ústavu

V Brně, dne 31.1.2016

prof. Ing. Martin Weiter, Ph.D.
Děkan fakulty

ABSTRAKT

Předložená diplomová práce je zaměřena na optimalizaci kultivace kmenů *Haematococcus pluvialis* ve fotobioreaktorech a biotechnologickou produkci astaxanthinu. V teoretické části byly shrnuty poznatky o podmínkách pro optimální růst a produkci sekundárních metabolitů. Dále byly charakterizovány aktuální kultivační systémy a možnosti monitoringu metabolitů a živin.

V rámci experimentální části byla stanovena růstová charakteristika kmenu z Březové nad Svitavou HMP – CCALA 375 za optimálních podmínek na bílém a červeném světle. V průběhu růstu kultury byl studován také profil karotenoidů a jejich koncentrace. Vyšší výtěžek biomasy byl dosažen v kultivaci s bílým světlem (0,939 g/l). Z hlediska obsahu karotenoidů byly u obou kultivací dominujícími pigmenty lutein a β -karoten.

Další experimenty byly zaměřeny na stanovení optimálních růstových podmínek pro vybrané čtyři kmeny *H. pluvialis* z Německa, Ameriky, Afriky a Švýcarska. Jako nejvhodnější médium pro kultivaci bylo vyhodnoceno BBM, naopak nejhorší výsledky byly zaznamenány u BG11. Teplota kultivace 22°C byla v předchozích experimentech stanovena jako optimum pro srovnávací kmen HMP - CCALA 375. Vybrané čtyři kmeny byly podrobeny kultivaci nejen při 22°C, ale i při teplotě 25 °C. Kultivace při vyšší teplotě se ukázala být vhodná hlavně pro švýcarský, německý i africký kmen. Analýzou změny osvětlení bylo zjištěno, že je výhodnější kulturu předem adaptovat na nižší osvětlení (50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a poté zvýšit intenzitu na 100-150 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Nejlepších růstových výsledků dosahoval švýcarský kmen, který by mohl být využitelný pro komerční produkci astaxanthinu.

V poslední části práce byl zkoumán vliv stresových podmínek na produkci astaxanthinu kmenem z Březové nad Svitavou HMP – CCALA 375. Jako stresové faktory byly použity vysoké osvětlení (1 000 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), nízká koncentrace dusíku (32,96 mg/l), přídavek chloridu sodného (0,5%), vliv octanu sodného (2,2 mM) a kombinace chloridu a octanu sodného (0,5% NaCl, 2mM NaAc). Při vysokém osvětlení (1 000 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) bylo dosaženo největší akumulace astaxanthinu, která přesahovala 20 mg/g sušiny. Významný výtěžek byl pozorován i v kultivaci s přídavkem octanu sodného (9,2 mg/g) vzhledem k publikovaným hodnotám [103, 105]. Naopak minimální nárůst vykazovala kultura rostoucí v prostředí solného stresu (3,8 mg/g).

V navazujících experimentech bude zkoumán vliv vhodných kombinací stresových faktorů nejen na kmen HMP – CCALA 375, ale i na jiné perspektivní kmeny *H. pluvialis* s cílem dosáhnout nadprodukce astaxanthinu významné pro velkoobjemovou kultivaci.

KLÍČOVÁ SLOVA

Haematococcus pluvialis, karotenoidy, astaxanthin, cystace, fotobioreaktory

ABSTRACT

Presented diploma thesis is focused on the optimisation of *Haematococcus pluvialis* cultivations in different photobioreactors and on biotechnological production of astaxanthin. Theoretical part summarized the knowledge about optimal growth and production conditions of secondary metabolites. Followed research was focused on actual cultivation systems and on the possibilities of metabolite and nutrient monitoring.

In experimental part the growth characteristic of the strain from Březova nad Svitavou (HMP-CCALA 375) was analyzed under optimal cultivation conditions on white and red light. During culture growth the profile and the concentration of carotenoid pigments were determined. The best yield of biomass was achieved in the cultivation on white light (0,939 g/l), carotenoids lutein and β -carotene were observed as dominant pigments.

In the next experiments optimal growth medium, temperature and light intensity were determined for cultivations of four chosen HMP strains from Germany, America, Africa and Switzerland. The most suitable cultivation medium was found BBM, oppositely the worst results were obtained with BG11. In previous experiments cultivation temperature 22 °C was determined as optimal value for comparative strain HMP – CCALA 375. Selected four strains were cultivated at 22 °C, as well as at 25 °C. Higher temperature was more optimal mainly for Switzerland, German and Africa strains. By analyzing of light intensity influence, it was found that the best increase of biomass was induced by the adaptation of culture on lower illumination ($50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) followed by higher light intensity ($100 - 150 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). HMP from Switzerland showed the best growth results during all cultivation experiments, so this strain could be perhaps useful for industrial production of astaxanthin.

In the last part of work, the influence of stress conditions on astaxanthin production by strain from Březova nad Svitavou (HMP – CCALA 375) was studied. Followed stress factors were used: high intensity of light ($1\,000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$), low nitrogen concentration (32,96 mg/l), addition of sodium chloride (0,5%), influence of sodium acetate (2,2 mM) and combination of sodium chloride and sodium acetate (0,5% NaCl, 2mM NaAc). Due to strong illumination ($1\,000 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$) the best yield of astaxanthin was obtained (more than 20 mg/g). According to literature [103, 105] significant amount was also observed by addition of sodium acetate (9,2 mg/g). Oppositely minimal astaxanthin production was showed in presence of salt stress (3,8 mg/g).

In followed experiments should be studied the influence of stress combinations on HMP – CCALA 375 strain as well as on other suitable strains of *H. pluvialis* with the aim to achieve the maximal yield of astaxanthin significant for large scale cultivation.

KEYWORDS

Haematococcus pluvialis, carotenoids, astaxanthin, cystation, photobioreactors

BYRTUSOVÁ, D. *Optimalizace podmínek kultivace řasových kultur ve fotobioreaktorech*. Brno: Vysoké učení technické v Brně, Fakulta chemická, 2016. 105 s. Vedoucí diplomové práce Ing. Radka Kočí, Ph.D..

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem diplomovou práci vypracovala samostatně a že všechny použité literární zdroje jsem správně a úplně citovala. Diplomová práce je z hlediska obsahu majetkem Fakulty chemické VUT v Brně a může být využita ke komerčním účelům jen se souhlasem vedoucího diplomové práce a děkana FCH VUT.

.....
podpis studenta

Poděkování

Za cenné rady, všestrannou pomoc, bezmeznou ochotu a trpělivost bych tímto ráda poděkovala mé vedoucí diplomové práce, Ing. Radce Kočí, Ph.D. Dále bych chtěla poděkovat firmě Photon Systems Instruments za možnost zpracování experimentální části v jejich laboratořích a vytvoření příjemného pracovního prostředí.

V neposlední řadě bych chtěla poděkovat svým přátelům za příjemně strávené chvíle a mé rodině za důvěru a podporu během celého studia.

OBSAH

1	ÚVOD	9
2	TEORETICKÁ ČÁST	10
2.1	Fotoprotektivní pigmenty – karotenoidy	10
2.1.1	Astaxanthin.....	10
2.1.2	Metabolismus astaxanthinu	10
2.2	Zástupce karotenogenních mikrořas <i>Haematococcus pluvialis</i>	12
2.2.1	<i>Haematococcus pluvialis</i> – producent astaxanthinu	12
2.2.2	Životní cyklus a změny v buněčné morfologii.....	13
2.2.3	Biosyntéza astaxanthinu a změny aktivity buněk	13
2.2.4	Kultivační a produkční podmínky.....	14
2.2.5	Indukce tvorby astaxanthinu	15
2.2.6	Diverzita kmenů <i>Haematococcus pluvialis</i>	16
2.3	Metody kultivace řas	16
2.3.1	Otevřené kultivační systémy	16
2.3.2	Fotobioreaktory	17
2.3.3	Komerční produkce astaxanthinu.....	18
2.4	Monitoring řasových metabolitů a živin během kultivace	19
2.4.1	Stanovení pigmentů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)	19
2.4.1.1	Princip metody	19
2.4.1.2	Aplikace HPLC ke stanovení řasových pigmentů	20
2.4.2	Elementární analýza pomocí ICP/MS	20
2.4.2.1	Princip metody	20
2.4.2.2	Příprava biologických vzorků	21
2.4.2.3	Možnosti využití ICP/MS analýzy.....	21
2.4.3	Stanovení obsahu dusíku v kultivačním médiu s využitím TOC/TN.....	22
2.4.4	Fluorescenční parametry u fotosyntetizujících organismů.....	22
2.4.4.1	Fluorescence	22
2.4.4.2	Fluorescence chlorofylu a kvantový výtěžek PSII.....	23
3	CÍL PRÁCE	24
4	EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST	25
4.1	Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy	25
4.1.1	Chemikálie a přístroje - extrakce pigmentů a HPLC analýza	25
4.1.2	Chemikálie a přístroje - ICP/MS	25

4.1.3	Chemikálie a přístroje pro stanovení TN	25
4.1.4	Další použité přístroje	25
4.1.5	Kultivační a monitorovací přístroje firmy PSI	26
4.1.5.1	Multikultivátor MC 1000-OD, Photon Systems Instruments	26
4.1.5.2	Fotobioreaktor FMT 150, Photon Systems instruments	26
4.1.5.3	AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments	27
4.1.6	Použité mikroorganismy	27
4.2	Inokulum.....	28
4.2.1	Složení kultivačních médií	28
4.3	Stanovení sušiny	29
4.4	Stanovení počtu buněk.....	29
4.5	Stanovení růstové fáze.....	29
4.6	Stanovení růstové rychlosti (growth rate) a doby zdvojení (doubling time).....	29
4.7	Analýza spotřeby živin z média metodou ICP-MS	29
4.8	Monitoring spotřeby dusíku.....	30
4.9	Stanovení vybraných pigmentů produkovaných buňkami <i>H. pluvialis</i>	30
5	VÝSLEDKY A DISKUZE.....	32
5.1	Růstová křivka HMP – srovnání různého typu osvětlení	32
5.1.1	Monitoring nárůstu kultury a změny fluorescenčních parametrů	32
5.1.1.1	On-line měření optické hustoty v PBR	32
5.1.1.2	Stanovení sušiny a počtu buněk ve vzorcích v průběhu kultivace.....	33
5.1.1.3	Studium tvorby buněčných (růstových) fází během růstové křivky	34
5.1.1.4	Vztah mezi kvantovým výtěžkem fluorescence a obsahem chlorofylů.....	35
5.1.1.5	Růst biomasy a spotřeba dusíku.....	36
5.1.1.6	Růstová rychlost HMP a hodnoty doubling time.....	37
5.1.2	Biosyntéza karotenoidů během růstu kultury HMP	38
5.2	Optimalizace růstového média pro kmeny HMP z různých lokalit.....	40
5.2.1	Monitoring nárůstu kultury a buněčné fáze.....	40
5.2.1.1	Nárůst jednotlivých kmenů HMP v závislosti na použitém médiu.....	40
5.2.1.2	Vliv odlišného složení kultivačních médií na počet buněk	42
5.2.1.3	Změny buněčných fází v prostředí různých kultivačních médií	43
5.2.1.4	Hodnoty dob zdvojení u kmenů <i>H. pluvialis</i>	47
5.2.2	Monitoring kvantového výtěžku během kultivace jednotlivých kmenů HMP...	47
5.2.3	Spotřeba živin z média	49
5.2.3.1	Využití zdroje dusíku	49

5.2.3.2	Elementární analýza média v průběhu kultivace	51
5.3	Kultivace <i>H. pluvialis</i> za zvýšené teploty	55
5.3.1	Vliv zvýšené teploty na růst a studium buněčných fází	55
5.3.2	Monitoring kvantového výtěžku a rychlosti růstů kultury	59
5.4	Intenzita světla pro optimální růst <i>H. pluvialis</i>	61
5.4.1	Změna růstových parametrů v závislosti na použitém osvětlení.....	61
5.4.2	Tvorba růstových fází vlivem různé intenzity světla	63
5.4.3	Vliv změny osvětlení na fyziologii kultury	65
5.5	Stresové podmínky pro biotechnologickou produkci astaxanthinu.....	67
5.5.1	Změna optické hustoty a fyziologie buněk ve stresovém prostředí	67
5.5.2	Morfologický profil buněk během cystace.....	68
5.5.3	Vliv cystace na fluorescenční parametry	70
5.5.4	Analýza vybraných karotenoidů.....	72
6	ZÁVĚR.....	75
7	SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ	77
8	SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ.....	89
9	SEZNAM PŘÍLOH	90
10	PŘÍLOHY	91

1 ÚVOD

V posledních letech se využití mikrořas a sinic jako fototrofních organismů schopných konverze sluneční energie a oxidu uhličitého na hodnotné produkty stalo rychle rostoucí oblastí vědeckého zájmu. Jedná se o primární zdroj organické hmoty, který nachází uplatnění v biotechnologických aplikacích, jako jsou produkce biopaliv, pigmentů a dalších bioaktivních sloučenin, využitelných jako nutraceutika nebo léčiva [1].

Skupinou průmyslově využitelných pigmentů v mikrořasách jsou především karotenoidy. V těchto organismech slouží jako fotosyntetická barviva, odvozená od pětiuhlíkaté izoprenové jednotky, které jsou enzymaticky polymerovány ve sloučeniny o počtu čtyřiceti atomů uhlíků. Ze stovek druhů těchto molekul jsou komerčně dostupné hlavně β -karoten, který je získáván kultivací řasy *Dunaliella salina* v otevřených nádržích. V menší míře jsou produkovány také lykopen, lutein a zeaxanthin [1, 2].

Jiným, velmi žádaným karotenoidem, který zastává významnou pozici v biotechnologické kultivaci mikrořas, je astaxanthin. Tento keto-derivát má silnou antioxidační aktivitu, která je 100krát vyšší než u tokoferolu. Ve studiích jsou rovněž uváděny jeho ochranné účinky proti rakovině, zánětlivým onemocněním a neurodegenerativnímu onemocnění očí. Jeho biotechnologická produkce se stala skutečností díky vývoji nových kultivačních metod a nalezením vhodného zdroje – řasy *Haematococcus pluvialis* [1].

Jedná se o jednobuněčnou, sladkovodní řasu, která se vyskytuje v mnoha lokalitách po celém světě. Vlivem nepříznivých podmínek, jako je intenzivní osvětlení, nedostatek dusíku, nebo vysoká salinita, dochází v buňce k indukci akumulace astaxanthinu. Během růstu a cystace prochází *Haematococcus* řadou morfologických změn, jako jsou ztráta pohyblivosti a zvětšení objemu buňky [2].

I když je tato řasa masivně kultivována, některé skutečnosti, jako např. pohlavní rozmnožování, stále zůstávají ne zcela objasněny. Rovněž různé kmeny vyžadují odlišné podmínky pro jejich optimální růst, což může být způsobeno genetickou diverzitou řasy a jejími odlišnými biologickými vlastnostmi. Jejich zkoumáním vzniká možnost nalezení nového, vysoce produktivního kmenu, který by vyhověl podmínkám daného klimatického prostředí [3, 4, 5].

2 TEORETICKÁ ČÁST

2.1 Fotoprotektivní pigmenty – karotenoidy

Karotenoidy jsou skupinou všudypřítomných pigmentů rozpustných v tucích, zbarvených v odstínech od žluté do červené barvy. V přírodě bylo identifikováno přes 700 druhů. Strukturně se jedná o rodinu C_{40} isoprenoidních polyenových sloučenin [6].

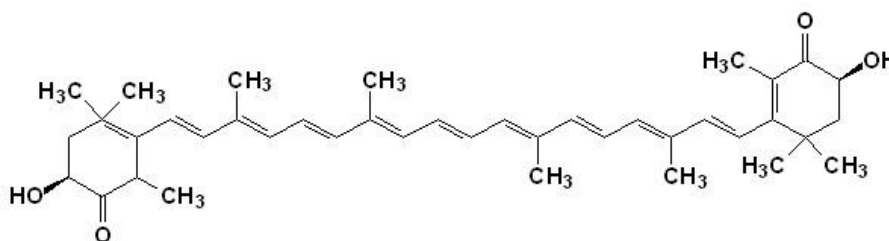
Nejvýraznějším strukturním rysem je vnitřní řetězec se střídavými dvojitými a jednoduchými vazbami. Tento konjugovaný systém dvojitých vazeb představuje světlo absorbující chromofor, který je zodpovědný nejen za zbarvení karotenoidu, ale rovněž za jejich oxidativní degradaci.

Karotenoidy mohou být acyklické (lykopen), mohou obsahovat jeden (γ -karoten, δ -karoten) nebo dva (β -karoten) šestičlenné kruhy. Molekuly jako kapsanthin nebo kapsorubin obsahují pětičlenné kruhy. Uhlovodíkové karotenoidy (β -karoten, lykopen) jsou označovány jako karoteny, zatímco kyslíkové deriváty jsou známy jako xantofyly [7].

2.1.1 Astaxanthin

Astaxanthin je červený ketokarotenoid ze skupiny xantofylů (karotenoidy obsahující kyslík) syntetizovaný několika druhy řas, rostlin, bakterií a hub. Má 13 konjugovaných dvojných vazeb a vykazuje silnou antioxidační kapacitu pro neutralizaci volných radikálů (silnější než β -karoten nebo vitamin E). V této souvislosti jsou zkoumány jeho možné pozitivní účinky proti rakovině, kardiovaskulárním onemocněním a degenerativnímu onemocnění očí [8].

Dominantou trhu je synteticky připravený astaxanthin s celkovou tržní hodnotou 240 milionů dolarů/rok. Odhadované náklady na jeho výrobu se pohybují kolem 1 000 dolarů/kg, jeho prodejní cena je 2 000 dolarů/kg. Syntetický astaxanthin obvykle tvoří směs tří izomerů (3S,3'R; 3R,3'S a 3R,3'R v poměru 1:2:1), zatímco u izolovaného z řas dominuje stereoizomer 3S,3'S. Z tohoto důvodu je poptávka po přírodním produktu mnohem větší [8].



Obr. č. 1: Struktura astaxanthinu [9]

2.1.2 Metabolismus astaxanthinu

Reaktivní formy kyslíku (ROS, reactive oxygen species), jako jsou například singletový kyslík, peroxid vodíku (H_2O_2) nebo hydroxylový radikál ($OH^\bullet$), jsou kontinuálně vytvářeny jako vedlejší produkty fotosyntézy [10, 11, 12]. Tyto ROS mohou potenciálně reagovat s makromolekulami, zvláště s DNA, lipidy a proteiny, což má za následek poškození buňky [13].

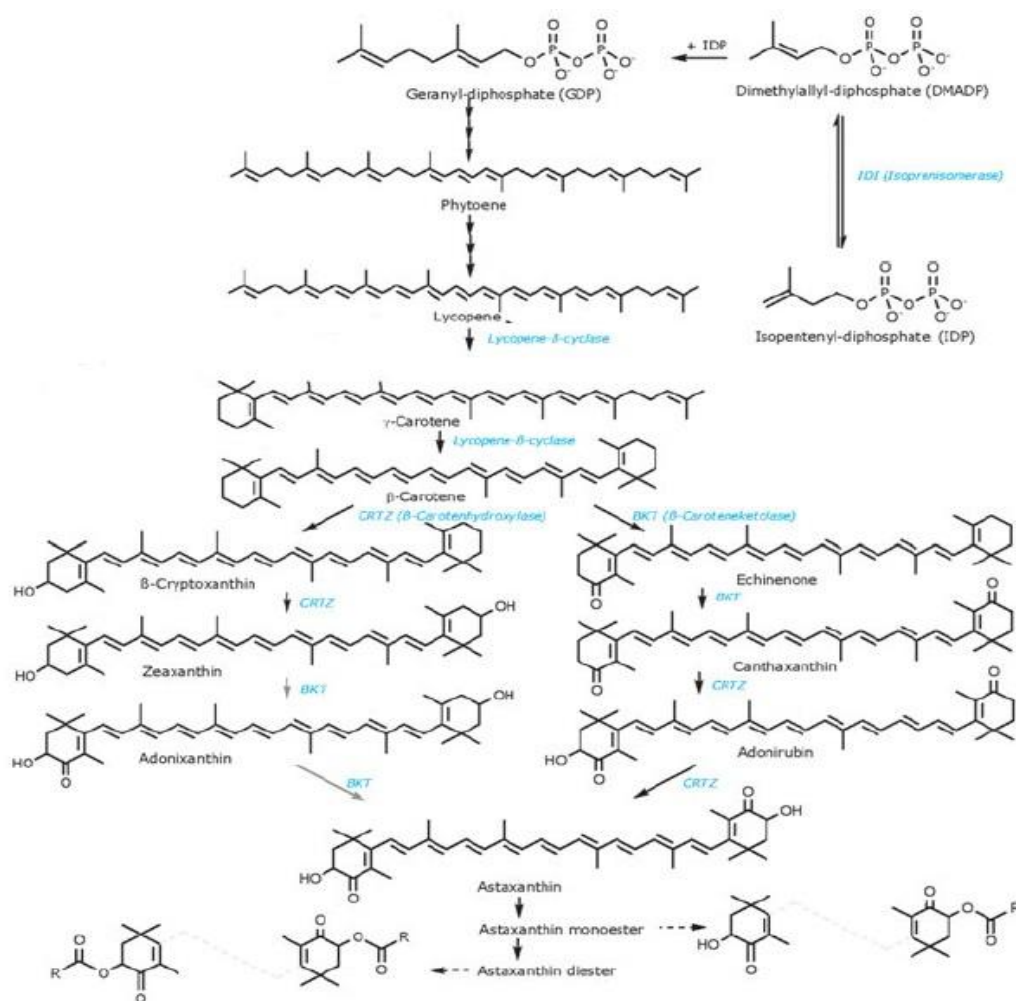
Velké množství ketokarotenoidů v buňce je strategií přežití buněk za fotooxidačního stresu a dalších nepříznivých podmínek, avšak specifická role astaxanthinu jako neenzymatického antioxidantu proti ROS není zcela známa. Hlavní hypotézou je, že velké nahromadění esterů tohoto pigmentu v cytoplazmatických lipidových tělískách funguje jako ochrana proti

nadměrnému množství slunečního záření dopadajícího na světlosběrné komplexy pigment-protein a na fotosyntetická reakční centra. Nicméně otázkou zůstává prostorová separace produkce ROS (hl. chloroplasty) a místo skladování astaxanthinu (lipidová tělíska), čímž je jeho schopnost jako antioxidantu diskutabilní [14]. Fan et al. navrhl, že astaxanthin není sám o sobě ochranným prvkem, tím jsou spíše meziproducty v procesu jeho biosyntézy [15].

Základními „stavebními bloky“ pro tvorbu astaxanthinu jsou molekuly aktivovaného izoprenu isopentenyl-difosfátu (IPP) a dimethylallyl-difosfátu (DMAPP), které jsou produkovány v plastidech. Po eliminaci difosfátového zbytku, IPP a DMAPP kondenzují („hlava k patě“) prostřednictvím nukleofilní substituce na geranyldifosfát (GPP). Další adicí dvou IPP dochází k tvorbě diterpenu geranylgeranyldifosfátu (GGPP), přímému prekursoru všech karotenoidů [2].

Následnou adicí dvou molekul GGPP („pata k patě“) je produkován prefytoen pyrofosfát (PPPP), z něhož se tvoří první bezbarvý karotenoid fytoen. Tento krok je považován za vstupní reakci v biosyntéze karotenoidů, která je katalyzována fytoensyntázou (PSY) [2].

Systém konjugovaných dvojných vazeb je prodlužován čtyřkrokovou dehydrogenací za tvorby intermediátu ξ -karotenu, proneurosporinu, prolykopenu a výsledného červeně zbarveného lykopenu. Tyto reakce katalyzují enzymy fytoendesaturáza (PDS) a ξ -karotendesaturáza (ZDS). Cyklizací koncové molekuly lykopenu dochází k tvorbě β -karotenu a α -karotenu [2].



Obr. 2: Metabolická dráha astaxanthinu [2]

2.2 Zástupce karotenogenních mikrořas *Haematococcus pluvialis*

Řasy (latinsky *Algae*) jsou převážně fotoautotrofní organismy a lze je najít ve čtyřech říších: Bakterie, Prvoci, Chromista a Rostliny. Vyskytují se v různých formách, jako jsou mikroskopické jednobuněčné a makroskopické mnohobuněčné organismy, kolonie nebo složitější listnaté formy, podobné cévnatým rostlinám. Počet druhů řas se odhaduje na jeden až deset miliónů, největším zástupcem jsou mikrořasy [16]. Jejich systematické zařazení je zobrazeno v tabulce 1.

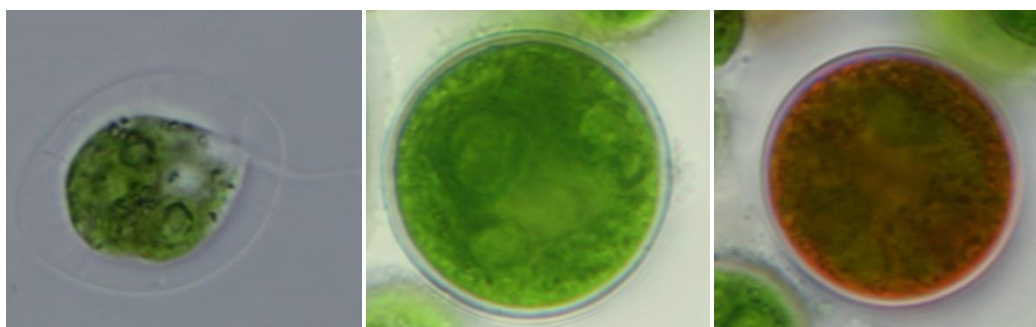
Tabulka 1: Přehled systematického zařazení řas [16]

Impérium	Říše	Oddělení
Prokaryota	Bakterie (Bacteria)	Sinice (Cyanobacteria)
Eukaryota	Prvoci (Protozoa)	Eugleny (Euglenophyta) Obrněnky (Dinophyta) Chlorarachniophyta
	Chromista	Skrytěnky (Cryptophyta) Heterokontophyta
	Rostliny (Plantae)	Glaucophyta Ruduchy (Rhodophyta) Zelené řasy (Chlorophyta) Parožnatky (Charophyta)

Řasy se nacházejí většinou ve sladkých i slaných vodách s tolerancí pro široké rozmezí pH, teploty, zákalu a koncentrace kyslíku a oxidu uhličitého. Značný počet řas se přizpůsobil rovněž životu na zemi. Vyskytují se především na kmenech stromů, zvířecí srsti nebo v pouštích na skalách. V některých případech tvoří vzájemně prospěšné partnerství s jinými organismy. Jako lišejníky jsou označovány symbionty hub a řas [1].

2.2.1 *Haematococcus pluvialis* – producent astaxanthinu

Haematococcus pluvialis (HMP) (Chlorophyceae, Volvocales) je jednobuněčná sladkovodní mikrořasa, nacházející se v různých prostředích. Za nepříznivých podmínek prochází sérií morfologických změn (Obr. 1) [2].



Obr. 1: *Haematococcus pluvialis* (zleva: flageloidní buňka, palmela, aplanospora)

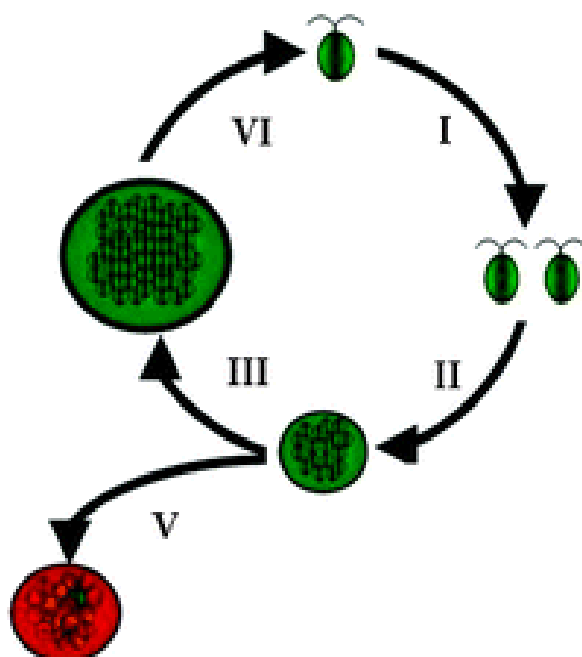
Existuje mnoho studií zabývajících se růstem HMP v různých médiích a v různých prostředích (kultivačních zařízeních). Avšak variabilita růstu HMP je pravděpodobně způsobená odlišnými populacemi nebo genetickou diverzitou této řasy z různých koutů světa.

Vyazuje proto odlišné biologické vlastnosti, jako je rychlost růstu, produkce biomasy, tloušťka buněčné stěny a biosyntéza astaxanthinu [3].

2.2.2 Životní cyklus a změny v buněčné morfologii

Haematococcus pluvialis má složitý životní cyklus (Obr. 2). Je rozdělen do čtyř stádií, a to na pohyblivé dvoubičíkaté zooidy (velikost 10 – 20 µm), zelené palmeloidy (20 – 40 µm), přechodné palmeloidy a zralé červené cysty (aplanospory, 30 – 60 µm). V zelené fázi jsou dominujícími pigmenty chlorofyl a, chlorofyl b, β-karoten, lutein, violaxanthin, neoxanthin a zeaxanthin, jak bylo rovněž zjištěno u Chlorophyta a v chloroplastech vyšších rostlin. Během cystace buňka prochází morfogenezí, především ztrátou bičíků, zaokrouhlením tvaru a přechodem ze zelených buněk na červené cysty, které jsou pokryté velmi silnou buněčnou stěnou [17, 18]. Ta se skládá ze tří vrstev. První sestává z třívrstvého obalu tvořeného algaenanem (silně acetolýze-rezistentní materiál, chemicky podobný sloučenině sporopoleninu), sekundární vrstvu tvoří celulóza a manóza v homogenním uspořádání a třetí vrstva obsahuje rovněž celulózu a manózu uspořádané heterogenně. Ve fázi cystace dochází k akumulaci astaxanthinu (z několika pikogramů do stovek pikogramů na buňku) v lipidových tělískách, které mohou buňku zcela vyplnit. Z celkového množství karotenoidů je astaxanthin zastoupen z 98 % a v přepočtu na sušinu dosahuje až 4 % [9, 19, 20].

Buňky se množí pomocí sporangií: bičíkovci jsou uvolňováni ze zoosporangií, nepohyblivé buňky pocházejí z aplanosporangií. Kromě vegetativního růstu byl u této řasy zaznamenán rovněž sexuální reprodukční cyklus, při kterém se tvoří gametocyty se 16 – 32 isogametami. Tento proces je ovšem velmi málo prozkoumán [2, 17].



Obr. 2: Životní cyklus řasy *Haematococcus pluvialis*: I – vegetativní růst, II – tvorba palmeloidních buněk, III – maturace, IV – germinace, V – tvorba sekundárních metabolitů [21]

2.2.3 Biosyntéza astaxanthinu a změny aktivity buněk

U *Haematococcus pluvialis* (HMP) vychází biosyntéza sekundárních karotenoidů z β-karotenu, tvorbou hydroxylové skupiny a/nebo keto skupiny ve dvou odlišných krocích: 1) zavedení keto skupiny na β-karoten a vytvoření kanthaxanthinu (cx), který je následně

hydroxylován, 2) oxidací zeaxanthinu. Tyto reakce jsou katalyzovány β -karotenketolázou (BKT) a β -karotenhydroxylázou (CRTZ) [2].

V HMP je BKT přítomna v chloroplastu a v cytoplasmatických lipidových tělískách. PDS je lokalizována pouze v chloroplastu, což znamená, že β -karoten musí být transportován do lipidových tělísek, kde dochází k tvorbě keto skupiny. Tato tělíska slouží jako zásobárna triacylglycerolů (TAG) a dochází v nich k esterifikaci astaxanthinu [22, 2].

V HMP se 95 % astaxanthinu vyskytuje ve formě mono nebo diesterů (70 % monoester s převahou 16:0, 18:1 a 18:2 mastných kyselin) a 5 % ve volné formě. V průběhu jeho akumulace jako reakce na daný stres dochází rovněž ke zvýšení biosyntézy mastných kyselin (MK). U vyšších rostlin a mikrořas biosyntéza MK začíná v chloroplastu konverzí acetyl CoA na malonyl CoA katalyzovanou enzymem acetyl-CoA-karboxylázou. Syntéza astaxanthinu a mastných kyselin je u řasy *Haematococcus pluvialis* propojena, avšak mechanismus propojení těchto dvou drah není zcela objasněn [22, 2].

Nejmarkantnější fyziologickou změnou u *Haematococcus pluvialis* v průběhu akumulace astaxanthinu je snížení fotosyntetické aktivity. Tento pokles je přičítán hlavně poškození komplexu fotosystému II (PSII), což se projevuje poklesem vývoje kyslíku nebo snížením variabilní fluorescence Fv/Fm (viz. kapitola 2.6.3). Množství buněčného astaxanthinu je nepřímo úměrné buněčné fotosyntetické aktivitě, i když množství chlorofylu a PSII reakčních center zůstávají stejná. Další příčinou poklesu je úbytek cytochromů f a tedy absence lineárního toku elektronů z PSII do PSI. Tyto změny způsobují zvýšení produkce reaktivních forem kyslíku (ROS), což má za následek peroxidaci membránových lipidů a pozdější buněčnou smrt. Proto se biochemické a molekulární studie zaměřují na identifikaci místa, kde se poškození ve fotosyntetickém aparátu přesně nachází [20].

2.2.4 Kultivační a produkční podmínky

Jedním z hlavních problémů pro masovou produkci astaxanthinu je optimalizace růstových podmínek vegetativních buněk. Existuje mnoho faktorů, které ovlivňují tempo růstu řasy. Z fyzikálních parametrů jsou to teplota a intenzita světla, které jsou nejdůležitější a je nutno je během kultivace neustále sledovat. Dalšími parametry jsou dostupnost živin, vhodné médium a pH [23].

Nejvyšší teplota, kterou eukaryotické řasy tolerují, je 60 °C, zatímco spodní mez se nachází kolem 0 °C [24]. Většina řas, včetně *Haematococca*, upřednostňují spíše mezofilní teplotu v rozmezí od 20 do 40 °C. Optimální teplota pro druh *Haematococcus pluvialis* se liší s každou publikací, což může být způsobeno rozdílností kmenů nebo odlišným nastavením ostatních kultivačních parametrů. Fan a kol. uvádí, že optimální teplotní rozmezí se pohybuje mezi 25 a 28 °C, překročení teploty pak inhibuje růst řasy [24]. To potvrzuje i článek týmu Borowitzka a kol., kde jako optimální uvádí méně než 28 °C, jinak dochází ke zvýšené tvorbě aplanospor [78].

Jako fotosyntetické organismy jsou řasy vysoce závislé na délce trvání a intenzitě viditelného světla. Optimální intenzita světla pro růst řasy *Haematococcus pluvialis* se udává 85 – 90 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, zatímco při osvětlení nad 130 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ docházelo k akumulaci astaxanthinu [23, 25]. Naopak buňky HMP mají vysokou míru přežití a normální produkci biomasy za nízkého osvětlení, tzn. kolem 37 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [26].

K největšímu růstu dochází za dostatečného množství živin, a to především při optimální koncentraci dusíku v médiu. V tomto případě se jako nejlepší volba jeví dusičnan sodný nebo dusičnan draselný. Dalším zdrojem může být například močovina [27].

Haematococcus pluvialis může růst stejně dobře za mixotrofních i autotrofních podmínek. Pro mixotrofní kultivaci je nejlepší volbou acetát sodný jako zdroj uhlíku. Je možné rovněž kultivovat tuto řasu za heterotrofních podmínek, avšak tempo růstu je příliš pomalé a pro biotechnologickou syntézu astaxanthinu bez osvětlení nepoužitelné. Nejlepší variantou pro růst se jeví mixotrofní podmínky s přidavkem acetátu v médiu [28]

2.2.5 Indukce tvorby astaxanthinu

Akumulace astaxanthinu je indukována za různých environmentálních podmínek, které nejsou příznivé pro růst a jsou označovány jako stresové faktory. Tyto faktory narušují rovnováhu v metabolismu, což vyžaduje adaptivní odpověď organismu [2].

Stresové podmínky spouštějící syntézu astaxanthinu u řasy *Haematococcus pluvialis* jsou různé, ale obecně mohou být rozděleny do následujících skupin: nedostatek živin (dusičnany, fosfáty a sulfáty), vysoká intenzita světla, sucho, vysoká salinita, vysoká teplota a množství acetátu (vysoký poměr C/N) nebo jejich kombinace [29].

Nejdůležitějším faktorem pro indukci karotenoidů je světlo. Za nízké osvětlení je považována hodnota menší než $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, která představuje optimum pro růst. Fotoindukce astaxanthinu byla zaznamenána při osvětlení $350 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [30], zatímco jiné publikace uvádějí větší akumulaci při $1\,550 - 1\,650 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [31]. Teorie, že světlo není nutné pro syntézu astaxanthinu, byla studována Droopem (1955), který poukázal, že xanthofyl může být akumulován i v nepřítomnosti světla po přidavku octanu sodného (6 mM). Tyto výsledky byly potvrzeny studií Kobayasiho v roce 1992 [20]. Pro fotosyntetické kultury lze rovněž dodávat světelnou energii formou krátkých záblesků světla. Jejich správné nastavení a použití na vysokou buněčnou koncentraci může zvýšit účinnost využití světla a tedy i produktivitu sekundárních metabolitů v organismu. Kim a kol. [32] ve své studii uvádí, že externí osvětlení v kombinaci se záblesky světla zvyšuje u řasy *Haematococcus pluvialis* výtěžnost astaxanthinu až o 60 %. Ještě lepší variantou je vnitřní osvětlení s intenzitou $16 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a záblesky o intenzitě $1700 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, kdy se produkce tohoto červeného pigmentu zvýší nejméně o 400 % v porovnání s kontinuálním osvětlením [32, 33].

Dalším důležitým faktorem pro stimulaci syntézy karotenoidů je nedostatek živin, zejména dusíku a/nebo fosforu, které indukují expresi genů pro syntézu astaxanthinu. U *H. pluvialis* dochází za těchto podmínek k transformaci z vegetativních buněk na cysty. Jako zajímavé se rovněž jeví použití herbicidů, které zhoršují asimilaci dusíku kvůli inhibici glutamin syntetázy. Aflalo a kol. studoval účinky herbicidu BASTA (glufosinát amonný), což vedlo k syntéze astaxanthinu, avšak rovněž k inhibici buněčného dělení [20].

Produkci pigmentu je možno navodit rovněž chemicky. Například přidavkem kyseliny jasmonové nebo kyseliny salicylové dochází ke zvýšené transkripci genů kódující enzymy specifické pro biosyntézu tohoto sekundárního karotenoidu. Obě kyseliny jsou rovněž využívány ke studiu metabolismu astaxanthinu, neboť každá aktivuje jinou dráhu pro jeho tvorbu [34].

Dalším induktorem akumulace astaxanthinu je solný stres. Bylo zjištěno, že salinita vyšší než 1 % (w/v) NaCl může být pro buňky *Haematococca* letální, pokud není zvýšená tvorba palmeloidních buněk. Další výsledky ukazují, že 0,8% NaCl způsobuje kompletní zastavení růstu a akumulaci astaxanthinu. Nejlepší koncentrací pro produkci karotenoidů se zdá být přidavek 0,2% NaCl do kultivace. Řasa pak tvoří až 3 % astaxanthinu v sušině. U starších kultur je možno použít koncentraci 0,5% NaCl. Přídavek KCl do řasové kultury, i v nízké

koncentraci (méně než 40 mM) způsobuje vysokou míru buněčné mortality, i když produkce astaxanthinu dosahuje 350 pg/buňku 13. den kultivace [35, 36].

Ke tvorbě astaxanthinu může docházet pomocí různých metabolických drah, avšak u jednotlivých stresových podmínek nebyly přesně popsány [36].

2.2.6 Diverzita kmenů *Haematococcus pluvialis*

Haematococcus pluvialis je kosmopolitní řasou, vyskytující se na všech kontinentech, včetně Antarktidy. Odlišnosti kmenů z různých lokalit mají za následek různorodé vlastnosti, jako jsou tempo růstu nebo množství akumulovaného astaxanthinu [4].

V roce 2013 tým Klochkova a kol. popsal arktický kmen ze Svalbardu, který je adaptovaný na růst a produkci astaxanthinu za nízké teploty (4 – 10 °C). Nachází se hlavně v podobě nepohyblivých palmeloidních buněk s tlustou buněčnou stěnou a velkým množstvím lipidových tělísek v červené i zelené fázi. Nevýhodou představoval nízký výtěžek biomasy [4].

Na pobřežních skalách Bílého moře (Rusko), kde vládnu obrovské rozdíly teplot, slunečního záření a salinity, byl objeven kmen BM1. Po vystavení kultury stresovým podmínkám (zvýšené osvětlení a snížené množství živin) dochází k masivní akumulaci astaxanthinu až do 5,5% množství sušiny. Vzhledem k toleranci na zvýšené množství chloridu sodného je tento kmen slibným organismem pro biotechnologickou produkci karotenoidů v brakických vodách [5].

Z teplejších oblastí byly studovány australské kmeny z Nového Jižního Walesu (NSW), Jižní Austrálie (SA) a Queenslandu (QLD), které byly vystaveny solnému stresu 0,17 M NaCl během deseti dnů. Po této době došlo ke zvýšení množství astaxanthinu na 16,2 mg/g (NSW), 5,6 mg/g (SA) a 17,7 mg/g (QLD) [37].

Tým Noorozi a kol. porovnával růst a akumulaci karotenoidů devíti kmenů ze tří zemí: Iránu, USA a Finska v různých médiích (Bold, NIES, OHM, Mixotroph a COMBO) [3] a dále dva kmeny z Chile, kde byla sledována celková produkce karotenoidů [38].

Sledování těchto rozmanitostí je důležité v kontextu biotechnologie, protože poskytuje příležitost pro výběr rychle rostoucích produktivních kmenů, které jsou přizpůsobeny určitým podmínkám daného území [4, 5].

2.3 Metody kultivace řas

Co se týče mechanismů používaných pro kultivaci řas, hlavní zájem leží ve vývoji různých technologií s cílem zlepšení produktivity a výtěžnosti biomasy. Obecně mohou být kultivační systémy rozděleny do dvou hlavních skupin: otevřené kultivační systémy a uzavřené fotobioreaktory. Mezi těmito dvěma skupinami existují významné rozdíly [39].

2.3.1 Otevřené kultivační systémy

I když většina literatury věnující se velkoobjemové kultivaci mikrořas je zaměřena spíše na uzavřené systémy, otevřené nádrže jsou nedílnou součástí průmyslové výroby řasových produktů. Důvod je čistě ekonomický – menší náklady na výstavbu a provoz a možnost využití přímého slunečního světla. Nicméně, ne všechny kultury takto lze kultivovat. U otevřených nádrží dochází k většímu odpařování vody, špatnému míchání a kontrole teploty a zvýšenému riziku kontaminace (zvláště bakteriemi nebo jinými druhy řas), což má za následek nižší produktivitu biomasy v porovnání s fotobioreaktory. Pro kultivaci mikrořas byly vyvinuty různé typy nádrží s různorodou velikostí, tvarem a použitým konstrukčním materiálem [2, 40, 41].

2.3.2 Fotobioreaktory

Termín „fotobioreaktor“ je používán pro označení uzavřených systémů, které neumožňují přímou výměnu plynů mezi kulturou a atmosférou. Tato zařízení poskytují chráněné prostředí před kontaminací jinými mikroorganismy a dovolují kontrolu parametrů, jako jsou pH, koncentrace oxidu uhličitého, osvětlení a teplota. Kromě toho zabraňují odpařování vody a ztrátě CO_2 v důsledku odplynění, což umožňuje produkci většího množství biomasy. Nicméně, tyto systémy jsou finančně náročnější na výstavbu a provoz, proto je jejich použití omezeno na výrobu vysoce-hodnotných sloučenin z řas, které nemohou být kultivovány v otevřených nádržích [1, 2].

Existují různé typy zařízení, jako jsou například tubulární nebo plošné fotobioreaktory; horizontální, vertikální, sloupcovité nebo spirálovité; jednofázové, naplněné suspenzí kulturou, kde výměna plynů probíhá v samostatném plynovém výměníku, nebo dvoufázové [1, 42].

Plošné reaktory jsou kvádrovitého tvaru s minimální světelnou dráhou. Jsou vyrobeny z průhledných materiálů, jako jsou sklo, plexisklo nebo polykarbonát. Vyznačují se vysokým poměrem plochy povrchu k objemu a agitace je zajištěna probubláváním vzduchem perforovanou trubicí pomocí pumpy. Pro scale-up uspořádání je instalováno několik desek na danou plochu [43].

Tubulární fotobioreaktory se vyskytují buďto v horizontálním nebo vertikálním (sloupcové nebo airlift fotobioreaktory) uspořádání. Jedná se o soubor transparentních trubek, které umožňují průnik světla. Míchání je zajištěno probubláváním plynu (nebo směsí plynů) [43].



Obr. č. 3: a) Plošný fotobioreaktor, b) vertikální tubulární fotobioreaktor, c) plastové pytle, d) horizontální tubulární reaktor [44, 45, 46]

Pro velkoobjemové kultivace jsou vhodné zejména bubble columns a tubulární reaktory. Ve studii provedené týmem López a kol. byly využity tyto dva systémy pro porovnání produktivity biomasy a astaxanthinu řasou *Haematococcus*. Z výsledných dat vyplynulo, že více efektivní je tubulární typ reaktoru a to zvláště díky lepší dostupnosti světla [14].

2.3.3 Komerční produkce astaxanthinu

Biotechnologická kultivace řasy *Haematococcus pluvialis* je založena na fotoautotrofní kultivaci v otevřených nádržích nebo uzavřených fotobioreaktorech. Používanými médii jsou BBM (Bold Basal Medium) a BG11 (Blue-Green Medium). Celý proces je rozdělen do dvou fází. V první jsou řase poskytnuty optimální podmínky pro růst (osvětlení, pH, výživa). V této fázi může být použita heterotrofní kultivace pro dosažení co nejvyššího množství biomasy. Když počet buněk dosáhne maxima, celá kultura je vystavena (nejčastěji fotooxidačnímu) stresu, při kterém dochází k transformaci zelených vegetativních buněk na červené aplanospory [38]. Pro kultivaci jsou využívány otevřené nádrže s kapacitou od 30 000 do 1 000 000 litrů kultury [3].

Jednou z největších výzev pro vývoj komerčně dostupných procesů pro produkci řasových metabolitů je sklizeň biomasy a její sušení. Sedimentace buněk vlivem gravitace je časově náročná a navíc nedokonalá. Nejrozšířenější technikou pro sběr karotenogenní biomasy je filtrace, centrifugace, bioflokulace, chemická flokulace nebo kombinace těchto metod. Cysty HMP bohaté na astaxanthin mají vyšší hustotu, než kultivační médium, proto mohou být podrobeny sedimentaci nebo centrifugaci s nízkou rychlostí [47].

Dalším stupněm je extrakce karotenoidů z buněk mikrořas. Hlavním problémem pro získání pigmentů je přítomnost tlusté buněčné stěny. Běžně jsou pro tyto účely používána různá nepolární rozpouštědla, zejména hexan. Selektivní extrakci astaxanthinu umožňuje také např. dodekan či methanol. Jako nejslibnější a mnohem rychlejší metoda se však jeví extrakce s použitím superkritického oxidu uhličitého, která nevyužívá toxická a drahá organická rozpouštědla [47].

Předními světovými společnostmi, které se věnují průmyslové kultivaci HMP jako zdroje astaxanthinu, jsou Cyanotech Inc. a Mera Pharmaceuticals na Havaji, Algatechnologies Ltd. v Izraeli a Biogenic Co. Ltd a Fuji Chemical Industry Co. Ltd v Japonsku [48].

V Cyanotechu se iniciační fáze produkce nachází v uzavřených systémech až o velikosti 40 000 litrů. Poté následuje přemístění kultury do otevřených nádrží o objemu cca 500 000 litrů, kde buňky v průběhu pěti až sedmi dnů akumulují astaxanthin. Po uplynutí této doby je výsledná biomasa sklizena, promyta a vysušena. Následuje extrakce astaxanthinu s použitím superkritického oxidu uhličitého [49].

Naproti tomu firma Algatech v Izraeli využívá přímého slunečního světla a systému uzavřených tubulárních skleněných fotobioreaktorů o délce 300 km na deseti akrech vyprahlé pouště. Extrakce astaxanthinu probíhá rovněž za použití superkritického oxidu uhličitého [50].



Obr. 4: a) Otevřené nádrže firmy Cyanotech na Hawai b) uzavřené reaktory firmy Algatech v Izraeli [51, 52]

2.4 Monitoring řasových metabolitů a živin během kultivace

Pro výzkum optimálních podmínek produkce biomasy a tvorbu kýžených metabolitů jsou velmi důležité monitorovací a instrumentální systémy, které zobrazují kontinuální růst řasových kultur a dokáží analyzovat i jejich metabolickou aktivitu [60].

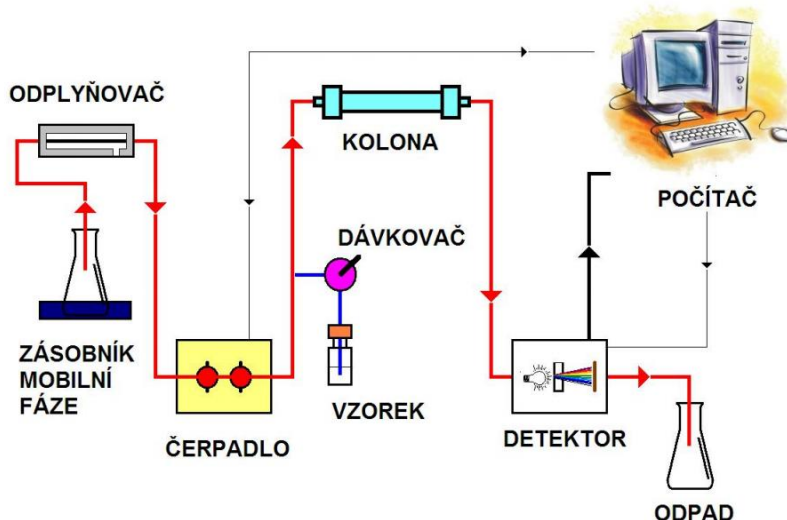
2.4.1 Stanovení pigmentů metodou vysokoúčinné kapalinové chromatografie (HPLC)

Vysokoúčinná kapalinová chromatografie je dnes rozšířenou separační metodou pro stanovení netěkavých sloučenin [53].

2.4.1.1 Princip metody

V průběhu analýzy pomocí HPLC dochází k rozdílné distribuci dělených látek mezi dvě nemísitelné fáze: pohyblivou (mobilní) a nepohyblivou (stacionární). Mobilní fáze protéká přes chromatografickou kolonu se sorbentem určitých vlastností a je dávkována pomocí čerpadla za vysokého tlaku [53].

Separace a eluce jednotlivých složek dělené směsi je ovlivněna jak povahou stacionární fáze, tak vlastnostmi mobilní fáze. Eluce může být provedena isokraticky za použití mobilní fáze o konstantním složení, nebo gradientově se zvyšující se eluční silou. Separované zóny analytů jsou zaznamenávány při průchodu detektorem, výsledný chromatografický záznam je charakteristický křivkami gaussovského tvaru (píky) [53].



Obr. 5: Schéma HPLC [54]

2.4.1.2 Aplikace HPLC ke stanovení řasových pigmentů

Většina současných metod využívá k separaci mikrořasových pigmentů reverzní fázi, kde jsou sloučeniny děleny především na základě jejich polarit. Jako stacionární fáze jsou používány kolony s C8 až do C30 zbytky vázanými na silikagel. Dalšími kroky pro optimalizaci separace je volba vhodné mobilní fáze, gradientového programu a teploty [60].

Počátky analýzy pigmentů jsou spjaty s prací Manthoura a Llewellyna, kteří vyvinuli techniku HPLC s reverzní fázi pro rychlou separaci a kvantifikaci 17 karotenoidů a 14 chlorofylů z acetonového extraktu řasové kultury [61]. Modifikace této metody byla popsána týmem Wrighta a Shearera, kde separovali fotosyntetické pigmenty lineárním elučním gradientem z 90% acetonitrilu do ethylacetátu. Další metodou pro optimální rozlišení polárních chlorofylů bylo přidání octanu amonného do methanolové mobilní fáze jako iontové párového činidla a vzorek byl dělen na koloně s C18 zbytky. Zapata a kolektiv vylepšili tuto metodu náhradou octanu pyridinem nebo tetrabutylammoniem (TBAA) [60, 80]. Teplota separace pigmentů se pohybuje v rozmezí od 20 °C do 60 °C podle teplotní stability dělených analytů. Jako detektory jsou nejčastěji voleny UV-VIS detektory s diodovým polem (většinou pro 410 a 676 nm) [62] a fluorimetrické detektory s excitační vlnovou délkou 430 nm a emisní 670 nm [63, 62].

Nejnovější možností je využití hmotnostní detekce, při které dochází k dělení vzorku podle poměru hmotnost/náboj. Sestává ze tří částí: iontový zdroj, hmotnostní analyzátor a detektor. Pro karotenoidy a chlorofyly jsou jako iontový zdroj využívány elektrosprej (ESI) a chemická ionizace za atmosférického tlaku (APCI). Z hmotnostních analyzátorů to jsou kvadrupólový analyzátor, průletový analyzátor nebo iontová past [62].

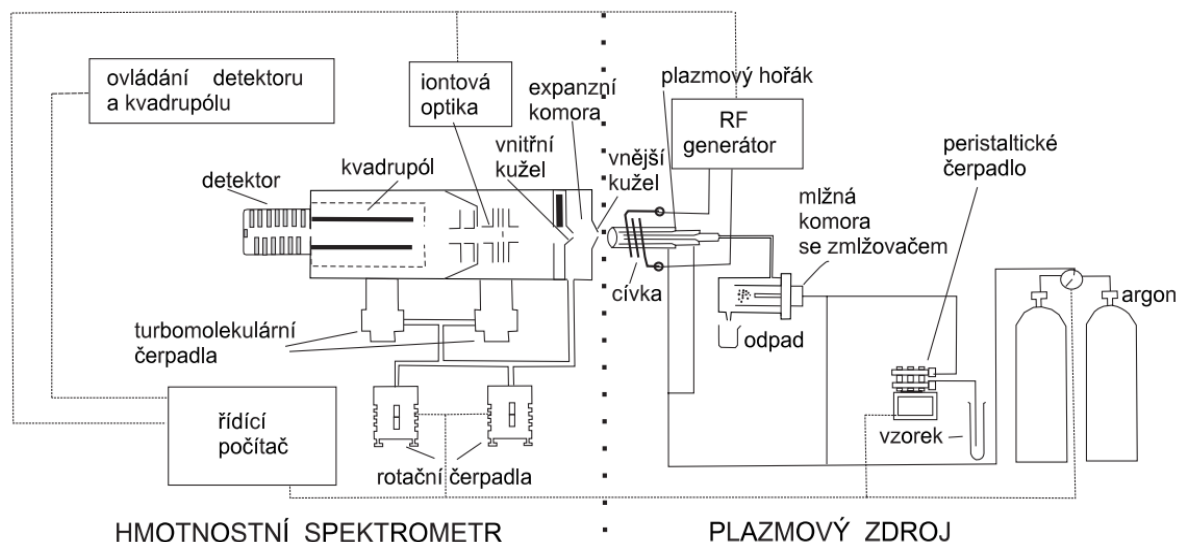
2.4.2 Elementární analýza pomocí ICP/MS

Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem (ICP-MS) je technika pro analýzu prvků, která nachází uplatnění v průmyslu, medicíně, geologii i na ekologických a akademických pracovištích.

2.4.2.1 Princip metody

Jedná se o kombinaci indukčně vázaného plazmatu (Inductively Coupled Plasma – ICP) jako zdroje kladně nabitých částic a hmotnostní spektrometrie (Mass Spectrometry – MS), která tyto částice detekuje [55].

Vzorek, většinou v kapalném stavu, je dávkován peristaltickou pumpou do zmlžovače, kde je konvertován do formy jemného aerosolu. Aerosol je dále za pomoci injektoru směřován do plazmového výboje generovaného intenzivním magnetickým polem. Zde je vzorek ionizován a výsledné ionty putují do interfacu, který zajišťuje přechod mezi atmosférickým tlakem plazmového zdroje a vakuem hmotnostního analyzátoru. V kvadrupólu dochází k vlastní separaci prvků ze vzorku podle poměru m/z [56].



Obr. 6: Schéma ICP-MS [55]

2.4.2.2 Příprava biologických vzorků

Biologické vzorky je nutné před prvkovou analýzou rozložit. Za tímto účelem se využívá metody rozkladu suchou cestou, kdy je zkoumaný materiál sušen, zuhelněn, zpopelněn a poté jeho popel loužen v minerálních kyselinách. Ve většině případů je přidáno pomocné činidlo, které zvyšuje účinnost procesu (nejčastěji se jedná o látky s oxidačními schopnostmi, nebo schopností převodu analytu do méně těkavých forem).

Dalším způsobem mineralizace vzorku je rozklad mokrou cestou, tedy přímý rozklad směsí koncentrovaných minerálních kyselin za zvýšené teploty a atmosférického tlaku. U tohoto procesu dochází nejprve k rozrušení biologické matrice kyselou hydrolýzou a její následné oxidaci. Rychlost reakce je závislá na reakční teplotě. Mezi nejčastěji používaná činidla patří kyselina dusičná a její směsi s peroxidem vodíku, s kyselinou sírovou nebo s kyselinou chloristou [67].

Dnes nejčastěji využívaným typem digesce je mikrovlnné záření, které za vysokého tlaku způsobuje destrukci matrice. Některé typy mikrovlnných přístrojů umožňují po ukončení procesu odpařit přebytečné množství reakční směsi a kvantitativně převést vzorek do odměrné baňky. Tímto se sníží možnost interference kyselin [67].

2.4.2.3 Možnosti využití ICP/MS analýzy

Metodu ICP/MS je možné využít v mnoha aplikacích, největší zastoupení má v environmentální analýze. Mezi nejčastější typy matric z této oblasti patří pitné vody, podzemní a odpadní vody, pevné odpady, půdy, kaly a sedimenty. V environmentálních vzorcích jsou většinou zjišťovány obsahy těžkých kovů (arsen, olovo, rtuť atd.) a fosfor [64, 65]. Pro tyto účely lze použít i rostlinné vzorky jako ukazatele kontaminace prostředí [66].

Druhým největším tržním segmentem je biomedicína. Zde metoda poskytuje rychlé a efektivní stanovení toxických prvků v krvi, analýzu moči, determinaci množství nutričních prvků v lidském séru, analýzu tkání, sledování hliníku u pacientů s dialýzou a stanovení stopových prvků v kostech a zubech. Dalšími oblastmi ve využití jsou farmacie, polovodiče, geochemie, agrikultura a petrochemie [56].

V řasových kultivacích lze ICP/MS použít k elementární analýze biomasy nebo zbytkového média. Je možné tak monitorovat chybějící živiny během růstových testů nebo akumulaci

prvků v buňkách. K nejsledovanějším analytům patří fosfor, železo, v případě zelených řas a rostlin i hořčík nebo některé mikroprvky jako zinek, měď či mangan účastníci se biochemických reakcí [85, 86].

2.4.3 Stanovení obsahu dusíku v kultivačním médiu s využitím TOC/TN

Monitorování obsahu dusíku je velmi důležité v mnoha průmyslových odvětvích, jako např. v procesu biologického čištění odpadních vod, kde jsou sledovány nitrifikační a denitrifikační pochody. Této detekce využívá rafinérie a petrochemický průmysl pro sledování vstupních a výstupních surovin, stejně tak je sledován celkový dusík v plastech, pryskyřicích, parafínech apod. [69]. V řasových kultivacích je nejčastěji monitorován úbytek celkového dusíku z živného média, jelikož změny v jeho koncentraci přímo souvisí s nárůstem kultury. Lze však stanovit i jeho akumulaci v řasovém peletu [87].

Ke stanovení celkového dusíku je používán TOC/TN analyzátor, ve kterém je vzorek unášen nosným plynem (přečištěný vzduch) do pyrolýzní kyvety a spálen při teplotě 720 °C. Během spalování vzorku dochází k přeměně vázaného dusíku na jeho oxidy. Ty jsou i s nosným plynem ochlazeny a transportovány do chemiluminiscenčního detektoru, kde reagují s ozonem za následné emise záření. Emitované světlo je pak detekováno a kvantifikováno jako množství celkového dusíku. Toto stanovení je možné provést u kapalných vzorků i v různých buněčných suspenzích [68].

2.4.4 Fluorescenční parametry u fotosyntetizujících organismů

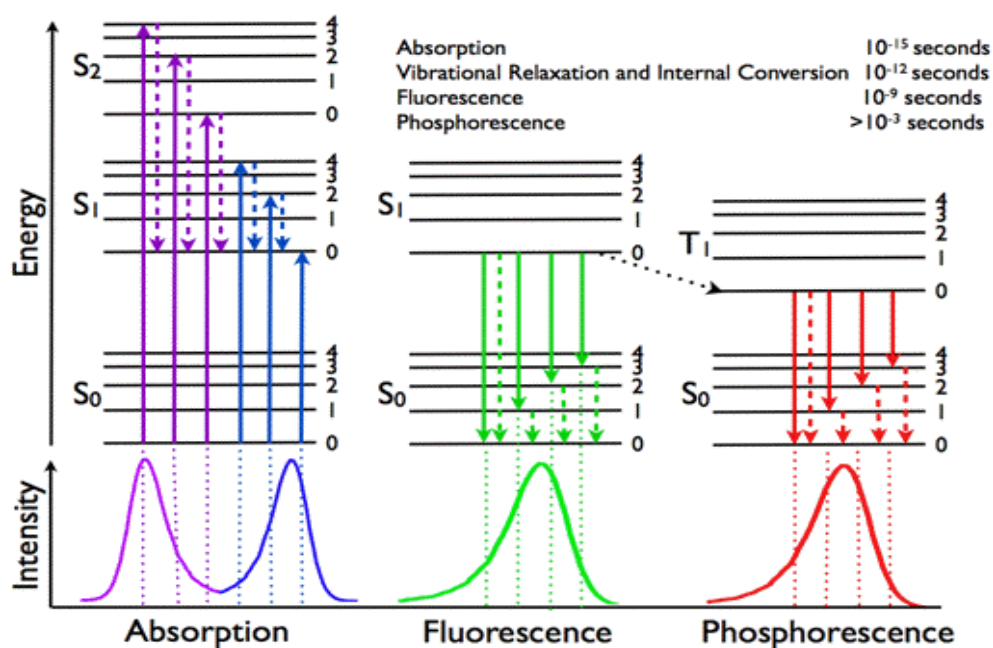
U řasových a sinicových kultur je možné, vzhledem k obsahu chlorofylových pigmentů v buňkách a jejich zapojení do metabolismu, monitorovat fotosyntetickou aktivitu a tím i celkový fyziologický stav pomocí fluorescenčního měření [73].

2.4.4.1 Fluorescence

Jako luminiscence je označována emise ultrafialového, viditelného nebo infračerveného světla z jakékoliv látky, která se nachází v elektronově excitovaném stavu. Pokud je zdrojem excitačního světla elektromagnetické záření, jedná se o fotoluminiscenci, která je rozdělena do dvou kategorií: fluorescence a fosforescence, v závislosti na povaze jejich excitovaného stavu [70, 71].

Elektronové stavy a procesy, které se vyskytují mezi absorpcí a emisí světla, popisuje Jablonského diagram (viz. obr. 7). Singletový stav, první a druhý elektronový stav jsou označeny jako S_0 , S_1 a S_2 . V každém z těchto energeticky odlišném stavu může existovat celá řada vibračních energetických hladin (označeno hladinami 0, 1, 2...). U fosforescence dochází k přechodu kvanta energie z tripletového stavu, u fluorescence jde o přechod ze stavu singletového. Elektrony jsou většinou excitovány do vyšších vibračních hladin S_1 nebo S_2 , poté rychle klesají na nejnižší hladinu. Tento jev je označován jako vnitřní konverze [70, 71].

Fluorofory (molekuly vykazující fluorescenci) se typicky vyskytují u aromatických sloučenin (systém konjugovaných vazeb), azosloučenin nebo organokovových sloučenin [70, 71].



Obr. 7: Jablonského diagram [72]

2.4.4.2 Fluorescence chlorofylu a kvantový výtěžek PSII

Analýza fluorescence chlorofylu je jednou z široce využívaných technik pro studium ekofyziologie a fyziologie rostlin a dalších fotosyntetizujících organismů. Molekula chlorofylu z anténního komplexu absorbuje foton a dojde k excitaci elektronu do S₁ (absorpce červeného fotonu) nebo do S₃ stavu (absorpce modrého fotonu) a poté k deexcitaci třemi možnými způsoby: 1) disipace tepla, 2) fluorescence, 3) energie fotonů, která je využita pro fotosyntézu. Fluorescence zde tvoří pouhé 3 až 5 % z absorbované energie, za pokojové teploty je převážně emitována z fotosystému II (PSII) [73, 74].

Efektivita procesů závisících na světle je označována jako kvantový výtěžek. Minimální fluorescenční výtěžek (F₀) nastane, pokud jsou otevřena všechna reakční centra PSII, dojde k oxidaci plastochinonů (Q_A) a absorbovaná energie je maximálně využitelná pro fotochemické procesy. Tohoto stavu je dosaženo adaptací ve tmě a následném slabém osvětlení, aby nedošlo k redukci Q_A a uzavření reakčních center. Když je na vzorek adaptovaný ve tmě aplikován světelný impuls o dostatečné intenzitě k uzavření všech reakčních center (redukce všech Q_A), bude zanedbatelné nefotochemické zhášení (NPQ) a fluorescence dosáhne svého skutečného maxima (F_M). Nicméně pokud vzorek není adaptován na tmu, bude docházet ke zhášení fluorescence a dosažený maximální výtěžek bude nižší (F_M'). Pokles z F_M na F_M' je využíván pro měření nefotochemického zhášení. Jako maximální výtěžek variabilní fluorescence chlorofylu ve stavu adaptovaném na tmu (F_V) je označován rozdíl mezi F_M a F₀ (v adaptovaném stavu na světlo: F_V'=F_M' - F₀'). Maximální kvantový výtěžek fotochemických procesů ve PSII (Φ_{PSII}) je pak vyjádřen rovnicí (1) [73, 74]:

$$\Phi_{\text{PSII}} = \frac{F_V}{F_M} = \frac{F_M - F_0}{F_M} \quad [74] \quad (1)$$

3 CÍL PRÁCE

Cílem diplomové práce byla optimalizace kultivačních podmínek pro vybrané karotenogenní řasové kultury v různých typech fotobioreaktorů a následné využití v biotechnologii, především pak k produkci průmyslově žádaných metabolitů.

V rámci práce byly řešeny následující dílčí úlohy:

1. Literární rešerše zaměřená na mikrořasy, specifika jejich metabolismu, možnosti kultivace a využití
2. Literární rešerše zabývající se stanovením potřebných chemických a potažmo i fyziologických parametrů využitelných k hodnocení nárůstu a produkce metabolitů u vybraných řas
3. Sledování růstu a metabolické aktivity mikrořas v optimálním prostředí v různých typech fotobioreaktorů
4. Monitoring úbytku živin v médiích během kultivace řasových kultur a hodnocení produkce sekundárních pigmentů indukovaných stresovým faktorem s využitím moderních instrumentálních metod
5. Zhodnocení výsledků uvedených ve výše stanovených bodech, diskuze o možnostech navýšení výtěžků žádaných produktů a využití pro biotechnologickou praxi.

4 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

4.1 Použité chemikálie, přístroje a mikroorganismy

4.1.1 Chemikálie a přístroje - extrakce pigmentů a HPLC analýza

Chemikálie:

Aceton for HPLC, LabScan, Thailand

Methanol for HPLC, Chromservis, ČR

Acetonitril for HPLC, J.T.Baker, USA

Petrolether, 99,5%, Roth, Německo

Ethylacetát for HPLC, Chromservis, ČR

2-amino-2-hydroxymethyl-propan-1,3-diol (Tris), Penta, ČR

Cholesterolesteráza z *Pseudomonas fluorescens*, Sigma Aldrich, ČR

Přístroje:

Centrifuga Sigma 1-16 K (chlazená)

HPLC 1260 Infinity, Agilent Technologies

Lyofilizátor FreeZone, Labconco

Vodní lázeň Grant TC120

Ultrazvuk Elma S30, Elmasonic

Přenosný spektrofotometr DR1900, HACH

4.1.2 Chemikálie a přístroje - ICP/MS

Chemikálie a filtry:

Deionizovaná voda pro ICP/MS

Kyselina dusičná 67% (Analaure, pro stopovou analýzu), Analytika spol. s.r.o.

Filtry, Sartorius stedim, Minisart 0,2 µm

Přístroj:

ICP-MS 7700x Series, Agilent technologies

4.1.3 Chemikálie a přístroje pro stanovení TN

Kyselina chlorovodíková 35%, Penta, ČR

Filtry Sartorius stedim, Minisart 0,2 µm

TOC-VCSH & TNM-1, Shimadzu Scientific Instruments, Inc., USA

Všechny ostatní chemikálie byly čistoty p.a. a byly získány od běžných distributorů.

4.1.4 Další použité přístroje

Sterilní box ESCO-PCR Cabinet

Mikroskop Olympus CX 41

Centrifuga Universal 320, Hettich Centrifugen

Analytické váhy XA105 Dual Range, Mettler Toledo

Filtry pro sušinu, Whatman Glass microfiber filters CF/CTM, Diameter 47 mm

UV-VIS spektrofotometr, Shimadzu UV-2450

Laboratorní exsikátor

4.1.5 Kultivační a monitorovací přístroje firmy PSI

4.1.5.1 Multikultivátor MC 1000-OD, Photon Systems Instruments

Multikultivátor MC 1000 - OD (Obr. 8) sestává z osmi zkumavek o objemu 85 cm³, které jsou samostatně osvětlené a aerované. Zkumavky jsou umístěny v temperované vodní lázni. Přístroj měří absorbanci každé zkumavky při vlnové délce 680 nm a 720 nm podle zvoleného protokolu a umožňuje tak provedení rychlého screeningu růstu mikroskopických řas a sinic [57]. V diplomové práci byl multikultivátor použit pro optimalizaci kultivačních médií a fyzikálních parametrů (teplota a osvětlení) u kmenů HMP izolovaných z různých lokalit.



Obr. 8: Multikultivátor MC 1000

4.1.5.2 Fotobioreaktor FMT 150, Photon Systems instruments

Laboratorní fotobioreaktor FMT 150 (obr. 9) slouží k precizní kultivaci především mikrořasových kultur. Přístroj je vybaven kyvetou o objemu 400, 1 000 nebo 3 000 ml a zajišťuje rovnoměrné osvětlení kultury. Růst je sledován on-line měřeními optické hustoty při 680 a 720 nm, okamžitý fyziologický stav kultury je charakterizován kvantovým výtěžkem PSII (kapitola 2.4.4.2). K zařízení je možné připojit peristaltické pumpy k případné regulaci nárůstu kultury (turbidostat) či pH (chemostat) i sondy pro měření pH, obsahu rozpuštěného O₂ a CO₂. Reaktor lze ovládat pomocí speciálního softwaru [58].

V diplomové práci byl použit fotobioreaktor o objemu 400 a 1 000 ml pro stanovení růstové křivky a následnému vystavení kultury HMP stresovým podmínkám. V průběhu kultivace byla měřena optická hustota, pH a dostupné fluorescenční parametry (kvantový výtěžek).



Obr. 9: Fotobioreaktor FMT 150 [58]

4.1.5.3 AquaPen-C AP-C 100, Photon Systems Instruments

AquaPen-C (obr. 10) je kapesní přístroj pro rychlé a snadno opakovatelné měření suspenzních vzorků. Je vybaven modrým a červeným LED emitorem s intenzitou světla až $3\,000\ \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Modré excitační světlo (455 nm) je určeno pro excitaci chlorofylu, tj. pro měření fluorescence chlorofylu v řasových kulturách s citlivostí $0,5\ \mu\text{g/l}$ [59].

V diplomové práci byl přístroj využíván k monitorování kvantového výtěžku PSII a optické hustoty při 680 a 720 nm v odebraných vzorcích během kultivací mikrořas (kap.5.2).



Obr 10: AquaPen-C AP-C 100 [59]

4.1.6 Použité mikroorganismy

V práci byly použity následující kmeny řasy *Haematococcus pluvialis*, které pochází ze sbírky autotrofních organismů (CCALA) v Třeboni a z Experimentální fykologie a kolekce řasových kultur (EPSAG) v Goettingenu:

HMP – CCALA 357, Česká Republika, Březová nad Svitavou

HMP – EPSAG 34-1d, Švýcarsko, Basel

HMP – EPSAG 44.96, Jižní Afrika, Cape Town

HMP – EPSAG 49.94 USA, Virginia

HMP – EPSAG 192.80 Německo, Bruchberg

4.2 Inokulum

Kmeny řasy HMP byly kultivovány fotoautotrofně v BG11 médiu v Erlenmeyerově baňce při teplotě 25°C za stálého osvětlení a probublávání vzduchem po dobu 14 dnů. Pro optimalizaci kultivace byly použity média BBM a obohacené médium BG11 s desetinásobnou koncentrací vybraných prvků (BG11+).

4.2.1 Složení kultivačních médií

Při změně kultivačního média byly řasové kultury centrifugovány 5 min při 5 000 rpm. Supernatant byl odtit a k sedimentu bylo přidáno čerstvé médium.

Médium BG11+ bylo optimalizováno pro kmen HMP – CCALA 357 v předešlých experimentech zaměřených na nadprodukcii biomasy v růstové fázi. Jeho složení se liší od média BG11 10tinásobným navýšením koncentrace vybraných prvků (Fe, Zn, P).

Pro indukci cystace a akumulaci astaxanthinu vlivem nutričního stresu bylo použito MCM médium se sníženým množstvím dusíku.

Složení jednotlivých médií je uvedeno v tabulce 2.

Tabulka 2: Složení kultivačních médií

Složka	Koncentrace [g/l]			
	BG11	BG11+	BBM	MCM
NaNO ₃	1,496	1,496	0,75	0,2
MgSO ₄ ·7H ₂ O	0,0748	0,0748	0,075	0,08
CaCl ₂ ·2H ₂ O	0,036	0,036	0,025	0,08
Kyselina citrónová	0,006	0,006	-	-
Na ₂ -EDTA·2H ₂ O	0,00123	0,00123	4,5·10 ⁻³	-
Ferric ammonium citrate	0,006	0,06	-	-
Na ₂ CO ₃	0,02	0,02	-	-
NaCl	-	-	0,01	-
K ₂ HPO ₄	0,0305	0,305	0,075	0,02
KH ₂ PO ₄	-	-	0,175	-
Komplexon III EDTA	-	-	-	-
EDTA	-	-	-	1,98·10 ⁻⁵
FeCl ₃ ·6H ₂ O	-	-	5,82·10 ⁻⁴	2,44·10 ⁻⁵
FeSO ₄ ·7H ₂ O	-	-	-	-
H ₃ BO ₃	0,00286	0,00286	-	6,1·10 ⁻⁵
ZnSO ₄ ·7H ₂ O	2,2·10 ⁻⁴	0,0022	-	-
MnCl ₂ ·4H ₂ O	1,81·10 ⁻³	1,81·10 ⁻³	2,46·10 ⁻⁴	6·10 ⁻⁶
Na ₂ MoO ₄ ·2H ₂ O	3,9·10 ⁻⁴	3,9·10 ⁻⁴	2,4·10 ⁻⁵	-
CuSO ₄ ·5H ₂ O	7,9·10 ⁻⁵	7,9·10 ⁻⁵	-	6·10 ⁻⁶
Co(NO ₃) ₂ ·6H ₂ O	4,9·10 ⁻⁵	4,9·10 ⁻⁵	-	-
ZnCl ₂	-	-	3·10 ⁻⁵	4,1·10 ⁻⁶
CoCl ₂ ·6H ₂ O	-	-	1,2·10 ⁻⁵	5,1·10 ⁻⁶
Vitamin B12	-	-	1,5·10 ⁻⁷	4·10 ⁻⁶

4.3 Stanovení sušiny

Na stanovení sušiny bylo odebráno 15 ml vzorku řasové suspenze, která byla filtrována přes předem zvážený 0,2 µm filtr (Whatman Glass microfiber filters CF/CTM, Diameter 47 mm). Řasový pelet na filtru byl vysoušen při 100 °C po dobu 24 hodin. Vzorek byl posléze ochlazen v exsikátoru a znovu zvážen. Z rozdílu hmotností bylo vypočítáno množství biomasy.

4.4 Stanovení počtu buněk

Počet buněk byl stanoven pomocí Bürkerovy komůrky pod světelným mikroskopem při zvětšení 100x. Vzorek byl fixován Lugolovým roztokem. Po stanovení počtu buněk v 75 čtvercích byl vypočítán celkový počet buněk v suspenzi dle následujícího vzorce (1) :

$$\text{Počet buněk} = \frac{\sum \text{buněk}}{75 \cdot 0,004} \cdot 1\,000 \quad (1)$$

4.5 Stanovení růstové fáze

Pod optickým mikroskopem se zvětšením 40x100 byly ve vzorku vždy u padesáti buněk stanoveny růstové fáze (flagela, tvořící se palmela, palmela, dělicí se buňka a dezintegrovaná buňka). V grafu bylo vyjádřeno procentuální zastoupení jednotlivých růstových fází.

4.6 Stanovení růstové rychlosti (growth rate) a doby zdvojení (doubling time)

Doubling time je čas, za který dojde ke zdvojnásobení počtu buněk. Lze jej vypočítat stanovením růstové rychlosti (μ) podle následující rovnice (2), kde OD₁ a OD₂ jsou optické hustoty v čase t_1 a t_2 . Doubling time (DT) byl pak určen pomocí rovnice (3).

Hodnoty doby zdvojení pro kulturu HMP byly počítány vždy po 24 hodinových periodách (interval (t_2-t_1) v rovnici (1)). Pro porovnání rychlosti nárůstu biomasy v jednotlivých experimentech jsou používány nejkratší DT po 24 h, případně 48 h kultivace.

$$\mu = \frac{\ln OD_2 - \ln OD_1}{t_2 - t_1} \quad (2)$$

$$DT = \frac{\ln 2}{\mu} [75] \quad (3)$$

4.7 Analýza spotřeby živin z média metodou ICP-MS

Využití živin kmeny HMP během nárůstu biomasy bylo stanovováno jako úbytek jednotlivých elementů v médiích během kultivace.

K prvkové analýze byly odebrány 2 ml řasové suspenze. Vzorek byl filtrován přes filtr (Sartorius stedim, Minisart 0,2 µm), supernatant bez buněk byl ředěn podle typu kultivačního média 3% HNO₃ a analyzován na přístroji ICP-MS.

Při práci s ICP/MS bylo nutné používat speciální plastové laboratorní nádoby a pomůcky určené pouze pro elementární analýzu, aby nedocházelo ke kontaminaci vzorků [76]. Použité nádoby bylo obvykle dekontaminováno minimálně 48 hodin 5% kyselinou dusičnou a umyto deionizovanou vodou pro ICP/MS.

Výpočet koncentrace studovaných prvků probíhal automaticky pomocí softwaru Masshunter na základě externích kalibračních křivek pro jednotlivé prvky, které byly stanovovány při každém novém měření.

4.8 Monitoring spotřeby dusíku

Dusík představuje významnou výživovou složku pro tvorbu biomasy nejen u řasových kultur. Jeho spotřeba z média během kultivace HMP byla sledována pomocí rychlé instrumentální metody TOC/TN.

Vzorek řasové suspenze (5 ml) odebraný v průběhu kultivace byl přefiltrován přes 0,2 μm filtr (Sartorius stedim, Minisart 0,2 μm). Supernatant bez buněk byl naředěn podle typu kultivačního média destilovanou vodou. U takto připraveného vzorku byla proměřena celková koncentrace dusíku TOC/TN analyzátozem.

Obsah dusíku byl stanoven automaticky na základě externí kalibrační křivky uložené v softwaru k TOC/TN analyzátoru. Regresní rovnice, ukázka chromatogramu a výpočtu celkového dusíku byly vloženy do přílohy 9.

4.9 Stanovení vybraných pigmentů produkovaných buňkami *H. pluvialis*

Během kultivace HMP za optimálních podmínek i v průběhu cystace vyvolané stresovými faktory byly z buněk extrahovány a analyzovány následující pigmenty: astaxanthin, neoxantin, violaxanthin, lutein, chlorofyl a, chlorofyl b a β -karoten. Extrakce i analýza karotenoidů byly provedeny při minimálním osvětlení, aby nedošlo k fotooxidaci vzorku.

Pro stanovení karotenoidů bylo odebráno 1,5 ml kultury, která byla podrobena lyofilizaci za teploty -96 °C a tlaku 1hPa po dobu 24 hodin.

K lyofilizátu byl přidán 1 ml acetonu a skleněné kuličky a směs byla vortexována po dobu 30 sekund. Vzorek byl centrifugován při 5 000 ot.min⁻¹ po dobu 5 minut při 4 °C. Tento postup byl opakován s 0,5 ml acetonu až do vybělení peletu. Jednotlivé frakce byly spojeny a byla změřena absorbance při 465 nm. Měřením byla kontrolována absorbance (vhodný rozsah 0,75 - 1,25), aby při následné aplikaci optimalizovaného množství enzymu k deesterifikaci astaxanthinu došlo ke kompletní konverzi na jeho volnou formu [77].

Ke 2 ml acetonového extraktu bylo přidáno 1,3 ml Tris-HCl o neutrálním pH a vzorek byl inkubován při 37 °C po dobu 3 min. Poté bylo přidáno 300 μl roztoku cholesterolesterázy (0,86 mg enzymu bylo rozpuštěno v 1 ml 0,05M Tris-HCl o pH=7), směs byla inkubována při 37 °C po dobu 45 minut. Extrakce uvolněných pigmentů pak probíhala do 2 ml petroletheru s přísávkem Na₂SO₄·7H₂O proti oxidaci. Směs byla vortexována a centrifugována při 3 000 ot/min po dobu 3 minut. Etherová fáze byla pipetována do mikrozkušavky o objemu 2 ml s přísávkem Na₂SO₄. Vzorek byl vysušen dusíkem a uschován ve tmě při -20 °C.

Odparek byl rozpuštěn v 0,5 ml methanolu za použití vortexu (30s), centrifugován při 15 000 ot.min⁻¹ po dobu 5 minut při 4 °C a supernatant byl pipetován do vialky. Analýza pigmentů pak probíhala metodou HPLC. Podmínky separace jsou uvedeny v tabulce 3, složení mobilních fází v tabulce 4.

Tabulka 3: Podmínky separace [77]

Kolona:	Kinetex, C18
Množství nástřiku vzorku:	15 - 60 μ l
Eluce:	gradientová
Průběh eluce: (složení mobilních fází viz. tab. 4)	0 – 13 min: ze 100% A do 100% B lineárně 13 – 19 min: 100% B 19 – 20 min: ze 100% B do 100% A lineárně 20 – 25 min: 100% A
Teplota:	25 °C
Analyzátor PDA:	astaxanthin: 476 nm ostatní pigmenty: 436 nm
Doba analýzy:	25 minut

Tabulka 4: Složení mobilních fází [77]

A		B	
Složka	Množství	Složka	Množství
Acetonitril	840 ml	Methanol	680 ml
Methanol	20 ml	Ethylacetát	320 ml
0,1M Tris-HCl (pH = 8)	140 ml	-	-

Ukázkový chromatogram z dělení HMP pigmentů metodou HPLC/DAD byl vložen do přílohy 8. Koncentrace jednotlivých pigmentů byly vypočteny na základě externích kalibračních křivek, regresní rovnice pro jednotlivé pigmenty jsou také uvedeny v příloze 8.

5 VÝSLEDKY A DISKUZE

5.1 Růstová křivka HMP – srovnání různého typu osvětlení

Optimální podmínky pro růst se obecně odvíjí od geografického původu kmenů HMP (kap. 2.2.6). Pro prvotní kultivační experimenty byl vybrán kmen z České republiky HMP-CCALA-357, jehož základní růstové parametry a charakteristické vlastnosti byly studovány v průběhu růstové křivky.

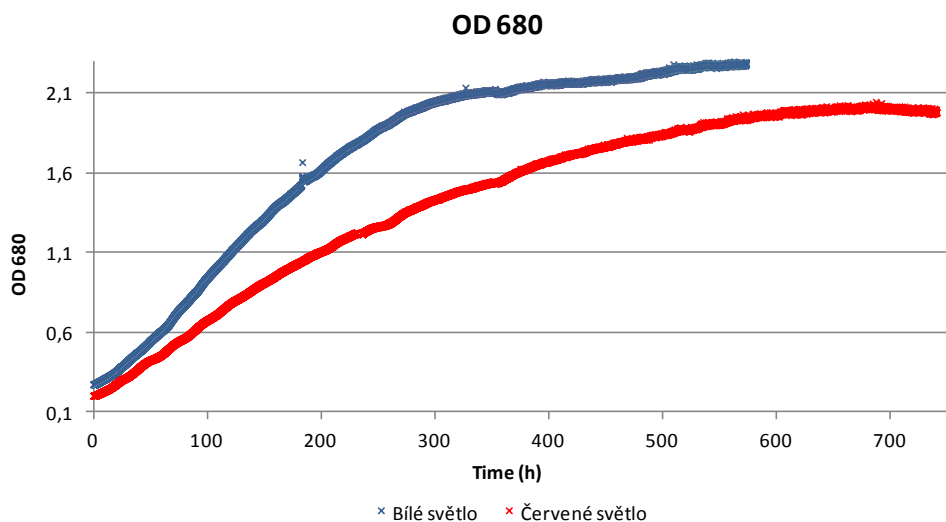
Kultivace HMP byla vedena ve fotobioreaktoru FMT 150 o objemu 1 litr, k osvětlení kultury bylo použito buď červené, nebo studené bílé světlo. Růst probíhal za podmínek, které byly v předešlých experimentech stanoveny jako optimální pro uvedený kmen HMP: teplota 22 °C, osvětlení $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, vzdušněno směsí 2% CO₂ a 98% vzduchu.

5.1.1 Monitoring nárůstu kultury a změny fluorescenčních parametrů

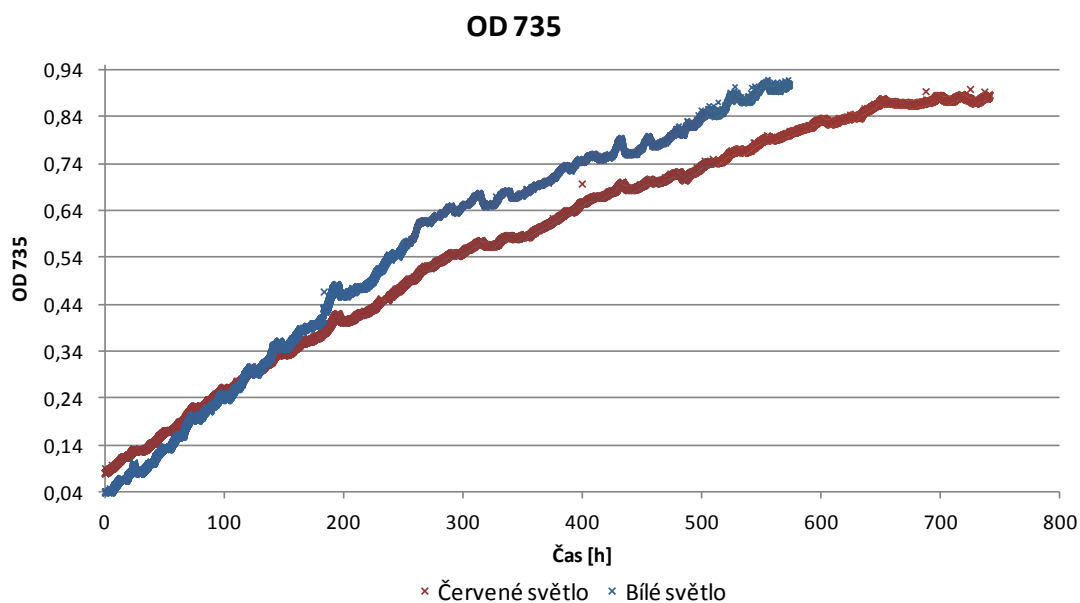
Během kultivace byly sledovány následující parametry: počet buněk, růstové fáze, kvantový výtěžek (QY), úbytek dusíku v médiu (kap. 4.8) a tvorba pigmentů (kap. 4.9). Průběh růstové křivky byl monitorován měřením optické hustoty (OD).

5.1.1.1 On-line měření optické hustoty v PBR

Z grafů 1 a 2 je patrné, že na bílém světle dochází k většímu nárůstu OD. Stacionární fáze je dosaženo již po 300. hodině kultivace, kdežto u červeného světla se kultura dostává do stacionární fáze až v 600. hodině. Důvodem pro rychlejší růst na bílém světle je jeho světelné spektrum, ve kterém jsou zastoupeny i nižší vlnové délky o vyšší energii, na rozdíl od samotného červeného světla. Tyto výsledky potvrzuje i studie, kde byl lepší výtěžek zaznamenán na bílém, popřípadě modrém světle [88]. Červené světlo je využíváno spíše v kombinaci s modrým, a to ve fázi produkce astaxanthinu, kdy je buněčná kultura již dobře narostlá [89].



Graf 1: Závislost optické hustoty při 680 nm na čase

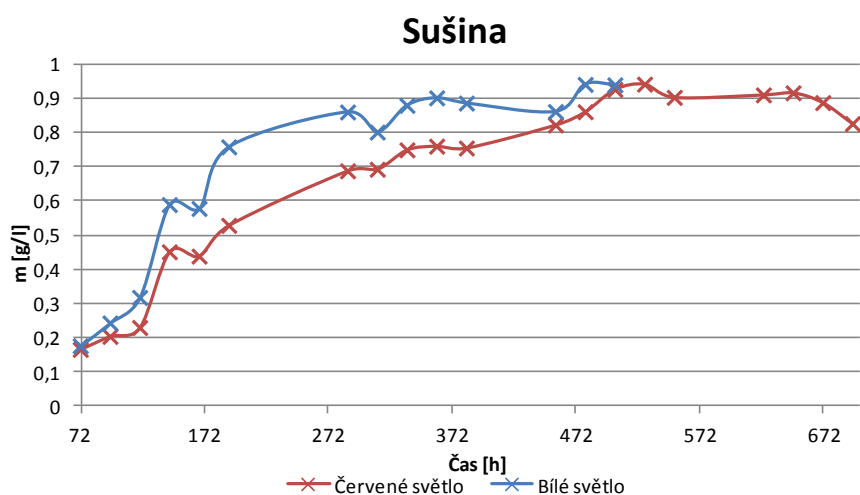


Graf 2: Závislost optické hustoty při 735 nm na čase

5.1.1.2 Stanovení sušiny a počtu buněk ve vzorcích v průběhu kultivace

Obdobně jako u měření optické hustoty (grafy 1 a 2) je pozorován v průběhu kultivace vyšší nárůst sušiny u experimentu s bílým světlem (graf 3). Jejího maxima je však u obou světél dosaženo kolem 500. hodiny kultivace a nepřekročí hodnotu 1 g/l.

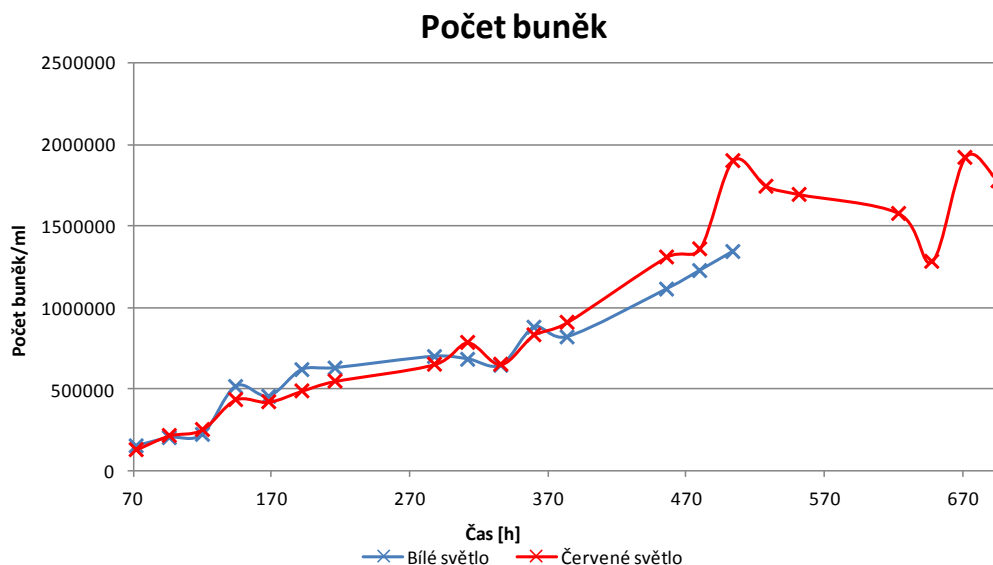
V literatuře se produkce biomasy *H. pluvialis* významně liší, pohybuje se od 0,4 do 2,5 g/l [81, 82, 83], v ojedinělých případech až 7 g/l [84] nebo 12,3 g/l [14]. Rozdílnosti jsou způsobeny odlišnými podmínkami kultivace (osvětlení, médium, teplota), použitým kmenem HMP nebo typem fotobioreaktoru.



Graf 3: Závislost sušiny na čase

V grafu 4 jsou uvedeny výsledky z měření počtu buněk v průběhu kultivace. U bílého světla množství buněk nepřekročilo hodnotu 1 400 000 buň./ml, zatímco u červeného osvětlení bylo dosaženo 1 800 000 buň./ml. Průběh růstové křivky byl on-line monitorován podle optické hustoty při 680 a 720 nm. Křivka OD 680 (graf 1) již kolem 300. hodiny kultivace naznačovala přechod kultury na bílém světle do stacionární fáze. Experiment

pokračoval ještě dalších 200 hodin bez významných změn (graf 1) a byl proto ukončen, i když počty buněk a OD 720 (graf 2) by mohly naznačit ještě další růst kultury.

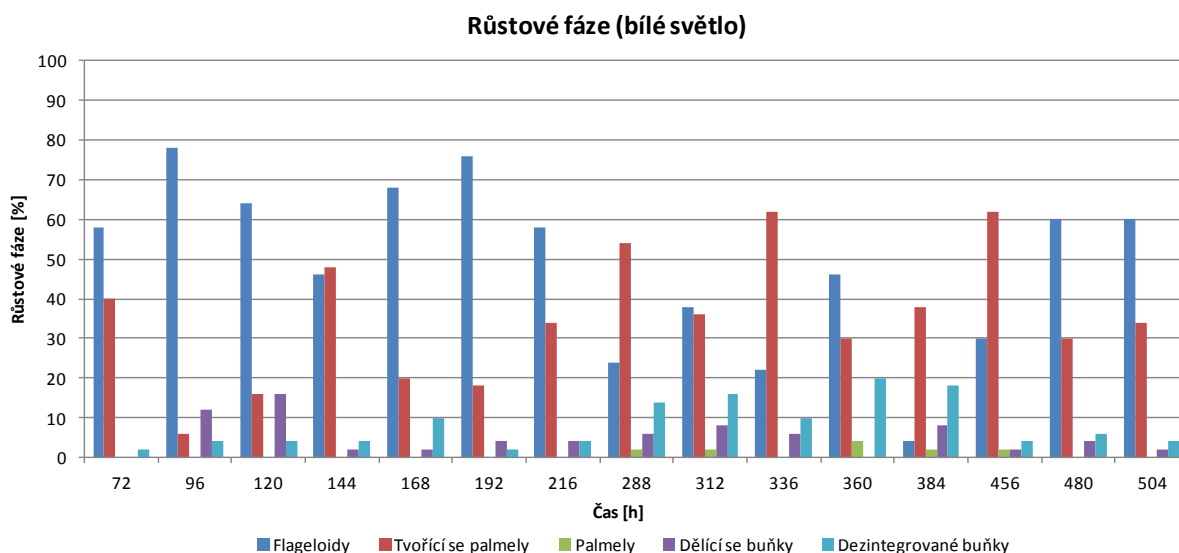


Graf 4: Závislost počtu buněk/ml na čase

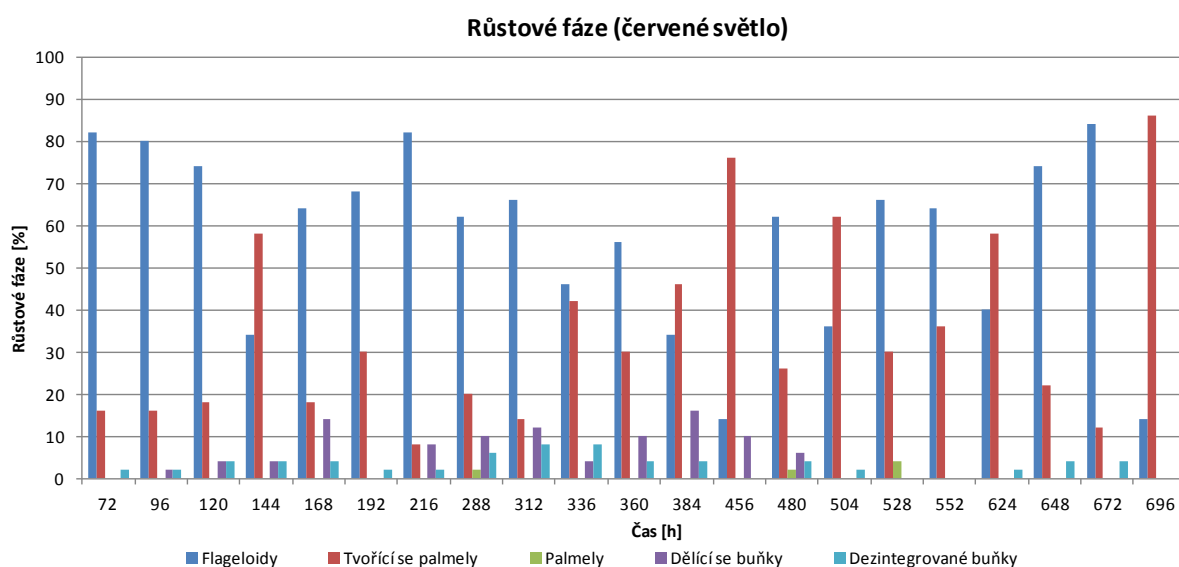
Všechny měřené parametry (optická hustota, sušina a počet buněk) charakterizují růst řasové kultury HMP v průběhu kultivace. U červeného světla bylo naměřeno větší množství buněk, i když vyšší hodnoty OD byly pozorovány u bílého světla (graf 1). Vysvětlením je variabilita růstových fází HMP (graf 5 a 6, kap. 5.1.1.3).

5.1.1.3 Studium tvorby buněčných (růstových) fází během růstové křivky

Na začátku kultivace převažují pohyblivé flageloidní buňky o velikosti 10 – 20 μm . S postupem času buňky ztrácejí svou pohyblivost, ztrácí bičíky a dochází k tvorbě palmeloidních buněk. U červeného světla je v celém průběhu kultivace přítomno velké množství menších flageloidních buněk a dělících se buněk, kdežto u bílého světla mají významný podíl velké přechodné buňky (40 μm) transformující se z flagel v palmely, palmely samotné (60 μm) [17] a rovněž vyšší míra dezintegrováných buněk. Proto také maximální výtěžek biomasy (sušiny) je na obou světlech (graf 3) prakticky stejný, kdežto počty buněk se v obou experimentech liší.



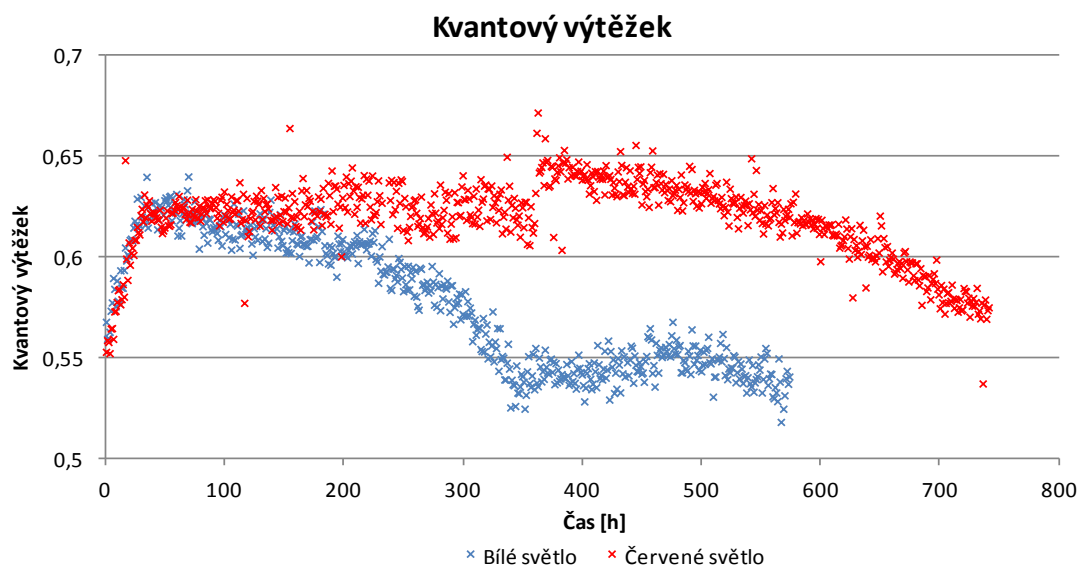
Graf 5: Průběh buněčných fází v průběhu kultivace za bílého osvětlení



Graf 6: Průběh buněčných fází v průběhu kultivace na červeném osvětlení

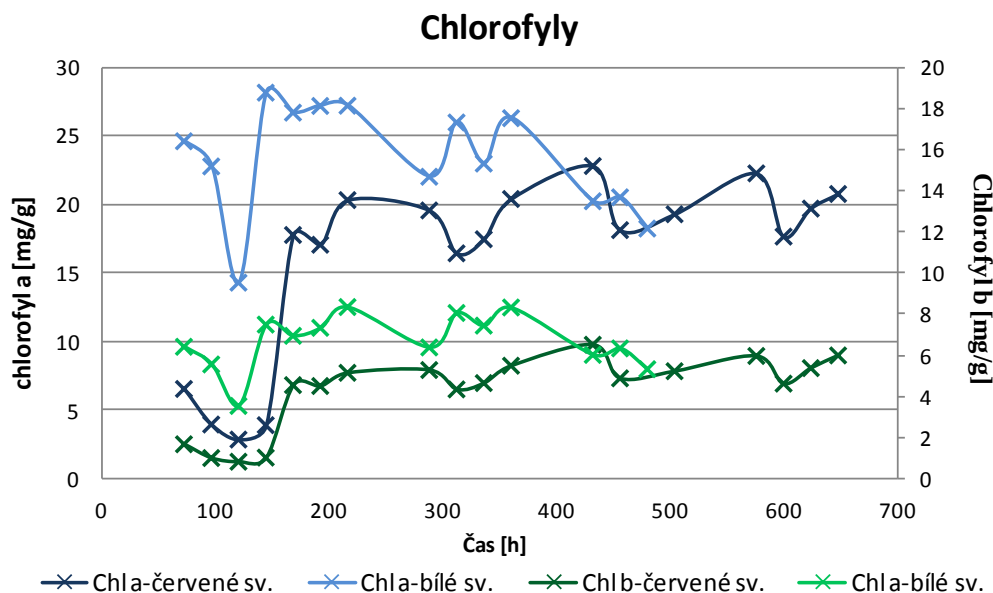
5.1.1.4 Vztah mezi kvantovým výtěžkem fluorescence a obsahem chlorofylů

V průběhu kultivace ve fotobioreaktoru byl rovněž zaznamenáván on-line kvantový výtěžek fluorescence (graf 7). Ten zůstává vyšší u červeného světla, zatímco bílé světlo způsobuje rychlejší pokles QY. Tento jev je spojen s rychlejším a vyšším nárůstem biomasy na bílém světle a větším množstvím dezintegrováných buněk (graf 5), a tedy i snížením fotosyntetické aktivity [33].



Graf 7: Závislost kvantového výtěžku v průběhu kultivace

S kvantovým výtěžkem pak přímo souvisí graf 8, který představuje změnu množství sledovaných chlorofylů v čase během růstu kultury. U bílého světla dochází ve stacionární fázi k mírnému poklesu obsahu chlorofylů, což je spojeno se snižujícím se kvantovým výtěžkem (graf 7) a zvyšujícím se množstvím dezintegrovaných buněk (graf 5). Naopak u červeného světla se koncentrace chlorofylů na začátku zvyšuje a po 200. hodině jen osciluje. V suspenzi je přítomno mnohem více flageloidních buněk, jelikož na ně působí červené světlo s menší energií a tím jsou vystaveny i méně stresovému prostředí. Buňky si pak zachovávají svou fotosyntetickou aktivitu a množství chlorofylu zůstává prakticky neměnné.

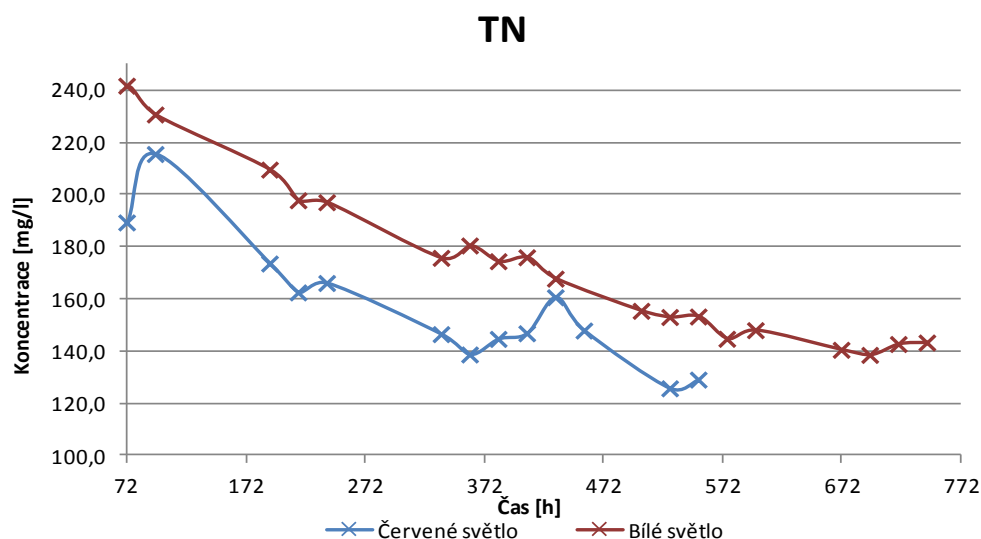


Graf 8: Závislost plochy chlorofylů na čase u bílého a červeného světla

5.1.1.5 Růst biomasy a spotřeba dusíku

S růstem řasové kultury je rovněž spojena spotřeba dusíku (graf 9). Při použití bílého světla je nárůst řasové biomasy rychlejší, a proto i spotřeba dusíku z média je vyšší. Naopak u

pomalejšího růstu na červeném osvětlení je jeho využití nižší. Limitní koncentrace dusíku pro růst HMP je v literatuře uváděna od 1,4 až po 14 mg/l [78, 96]. V žádné z obou kultur se kultura nepřiblížila uváděnému růstovému limitu dusíkatého zdroje.



Graf 9: Analýza spotřeby dusíku v průběhu kultivace

5.1.1.6 Růstová rychlost HMP a hodnoty doubling time

V tabulce 5 jsou shrnuty hodnoty růstových rychlostí a doubling time pro oba experimenty. Nejrychlejšího nárůstu dosahuje kultura na bílém světle, kdy dochází ke zdvojení buněk za 41,7 hodin při růstové rychlosti (GR) $0,385 \text{ d}^{-1}$. Nejnižší doba zdvojení na červeném světle byla stanovena na 43,1 hodin (odpovídá růstové rychlosti $0,321 \text{ d}^{-1}$). Uvedené hodnoty korespondují s výsledky naměřených optických hustot (graf 1 a 2), kde větší nárůst byl pozorován u bílého světla.

V literatuře se pro HMP kmeny uvádí rozmezí DT od 22 do 85 hodin [90], což znamená, že v našem experimentu dosahuje doba zdvojení průměrných hodnot.

V extrémních případech může být růst velmi rychlý (12 hodin) [91] a nebo naopak velmi pomalý (až 192 hodin) [92]. Příčinou je samozřejmě volba rozdílných podmínek, způsobů kultivace a také difference mezi kmeny HMP.

Tabulka 5: Srovnání doby zdvojení u bílého a červeného světla

t [h]	DT červené světlo [h]	DT bílé světlo [h]	GR červené světlo [d ⁻¹]	GR bílé světlo [d ⁻¹]
24	43,1	41,7	0,321	0,385
48	49,0	51,4	0,328	0,339
72	69,5	57,5	0,238	0,289
96	77,3	68,6	0,215	0,242
120	101,2	89,2	0,172	0,194
144	125,8	109,5	0,126	0,144
168	153,5	142,4	0,106	0,119
192	191,0	168,5	0,089	0,098
216	203,5	196,7	0,082	0,086
240	301,7	282,0	0,053	0,059
264	330,0	286,4	0,052	0,058
288	235,3	390,6	0,071	0,043
312	377,1	678,5	0,044	0,025
336	450,3	940,2	0,038	0,018
360	648,6	1473,5	0,025	0,002

5.1.2 Biosyntéza karotenoidů během růstu kultury HMP

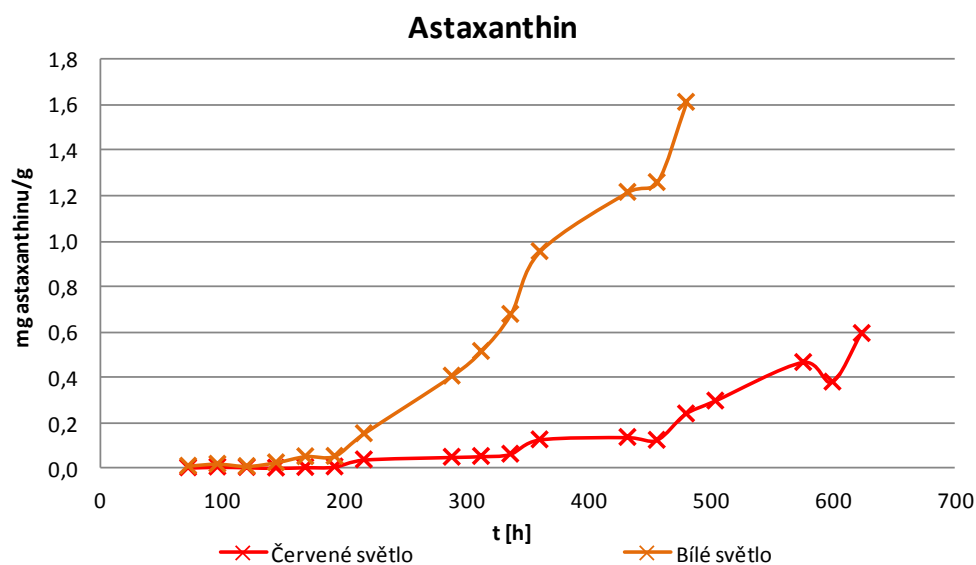
Stanovení karotenoidů bylo provedeno podle postupu uvedeného v kap. 4.9.

V grafu č. 10 je zobrazena produkce astaxanthinu během nárůstu kultury. Bílé světlo způsobuje zvýšení obsahu astaxanthinu po 200. hodině kultivace. Jeho maximum dosahuje až 1,6 mg/g sušiny. U červeného světla dochází ke zvýšení syntézy astaxanthinu u *H. pluvialis* rovněž po 200. hodině kultivace. Markantní nárůst je pozorován od 500. hodiny, kdy kultura přechází do stacionární fáze. Avšak maximální koncentrace astaxanthinu nepřevyšuje hodnotu 0,6 mg/g, jedná se tedy v porovnání s bílým světlem o více než 2,5x nižší výtěžek. Důvodem je vyšší energie bílého světla a fotoprotektivní úloha astaxanthinu v buňce [8].

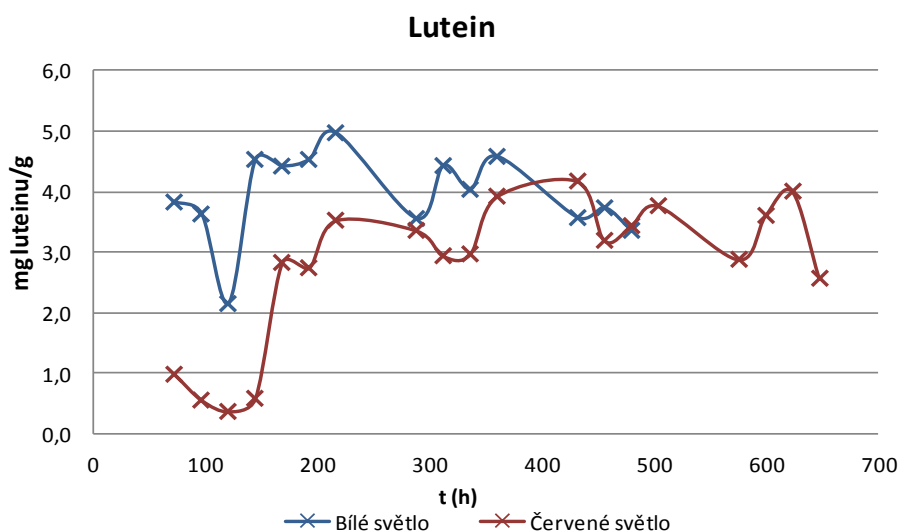
V literatuře je jako optimální osvětlení uvedena hodnota v rozmezí od 85 do 90 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ [23, 25], což při použitím světla 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ může do jisté míry způsobit indukci tvorby astaxanthinu.

U luteinu při kultivaci na bílém světle dochází spíše k oscilacím koncentrace po dobu růstu, ke konci kultivace (od začátku stacionární fáze) se jeho množství mírně snižuje (graf 11). Na červeném světle lze zaznamenat ze začátku mírný nárůst, po 200. hodině se jeho koncentrace pohybuje v rozmezí od 3 do 4 mg/g sušiny.

Graf 12 zobrazuje produkci β -karotenu, která po celou dobu růstu kultury na bílém světle osciluje a na začátku stacionární fáze je pak patrný mírný pokles. Obdobně je tomu i u červeného světla s tím, že pokles v produkci β -karotenu přichází až později v průběhu stacionární fáze. Produkce dalších sledovaných pigmentů (neoxanthin, violaxanthin – graf 79, 80 v příloze 1) na bílém světle je velmi podobná tvorbě β -karotenu. Naopak u červeného světla na konci kultivace se jejich koncentrace zvyšuje.

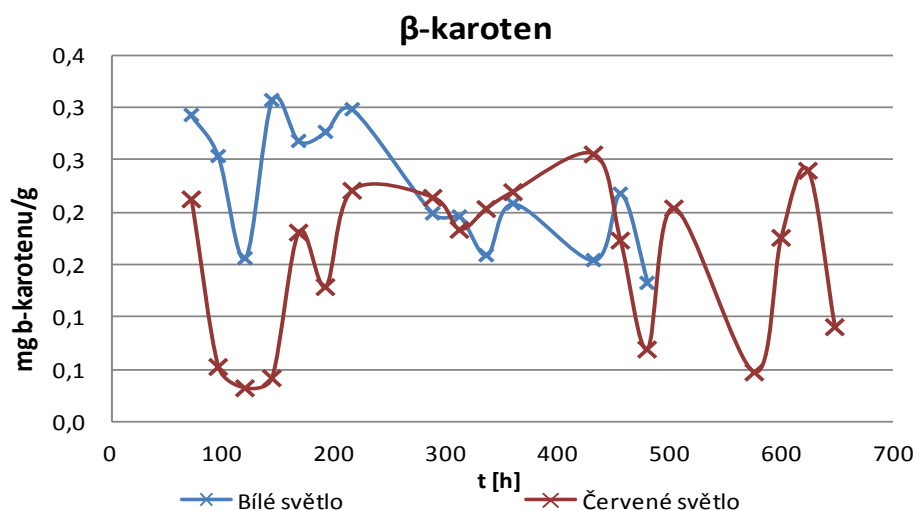


Graf 10: Závislost množství astaxanthinu



Graf 11: Závislost koncentrace luteinu

Profil karotenoidů zelených vegetativních buněk je tvořen z největší části luteinem (78 až 80 %) a β -karotenem (10 až 20 %) [93]. To koresponduje s naměřenými výsledky. Při zvyšování množství astaxanthinu dochází ke snižování množství jiných karotenoidů (hlavně β -karotenu, violaxanthinu a neoxanthinu), které slouží jako prekursor jeho biosyntézy [2]. Tento jev je pozorován spíše u bílého světla, kde i produkce astaxanthinu je mnohem vyšší, než je tomu u červeného světla.



Graf 12: Závislost množství β-karotenu

5.2 Optimalizace růstového média pro kmeny HMP z různých lokalit

Každý mikroorganismus vyžaduje pro svůj optimální růst vhodné médium, ve kterém jsou zastoupeny všechny potřebné živiny. V tomto experimentu jako testovací byla zvolena média BG11, obohacené BG11 a BBM (kapitola 4.2.1). Ke kultivacím byly využity čtyři kmeny HMP uvedené v tabulce 6.

Řasy byly kultivovány v multikultivátoru MC 1000-OD za podmínek doposud stanovených jako optimální pro kmen CCALE-357 (teplota 22 °C, osvětlení 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, vzdušně směsí 2% CO_2 a 98% vzduchu).

Tabulka 6: Označení jednotlivých kmenů HMP

Kmen	Označení
HMP-EPSAG 34-1d, Švýcarsko, Basel	S
HMP-EPSAG 44.94, Jižní Afrika, Cape Town	AF
HMP-EPSAG 49.94, USA, Virginia	AM
HMP-EPSAG 192.80, Německo, Bruchberg	G

5.2.1 Monitoring nárůstu kultury a buněčné fáze

Nárůst kultury byl monitorován obdobně jako v kapitole 5.1 studiem změn v on-line získaných hodnotách OD, počítáním buněk v odebraných vzorcích, analýzou buněčných fází a sledováním kvantového výtěžku v čase.

5.2.1.1 Nárůst jednotlivých kmenů HMP v závislosti na použitém médiu

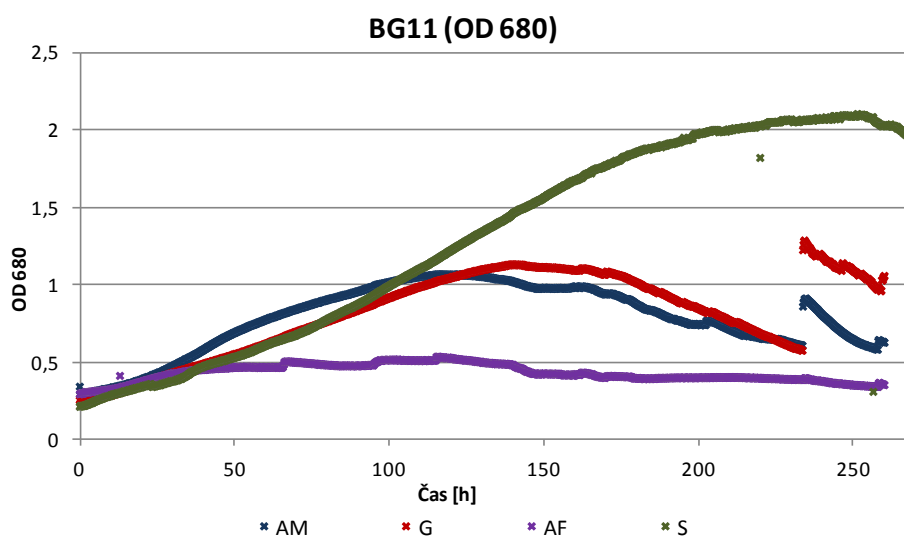
V grafech 13, 14 a 15 jsou uvedeny optické hustoty kmenů HMP stanovené při 680 nm v průběhu kultivace v různých médiích (BG11, BG11+ a BBM). Ve všech případech, nejlepších výsledků dosahuje švýcarský kmen, který vykazuje v kultivačních médiích BG11+ a BBM nejvyšší růst. V příloze 2 (grafy 81 – 86) jsou uvedeny optické hustoty odebraných vzorků, které byly pro kontrolu měřeny na kapesním přístroji AquaPen. Průběhy růstu jsou obdobné.

Pro americký kmen je nejlepším růstovým prostředím BBM médium, naopak nejhůře kultura rosla v BG11. V BG11+ médiu dochází k přechodu do stacionární fáze již po 150. hodině.

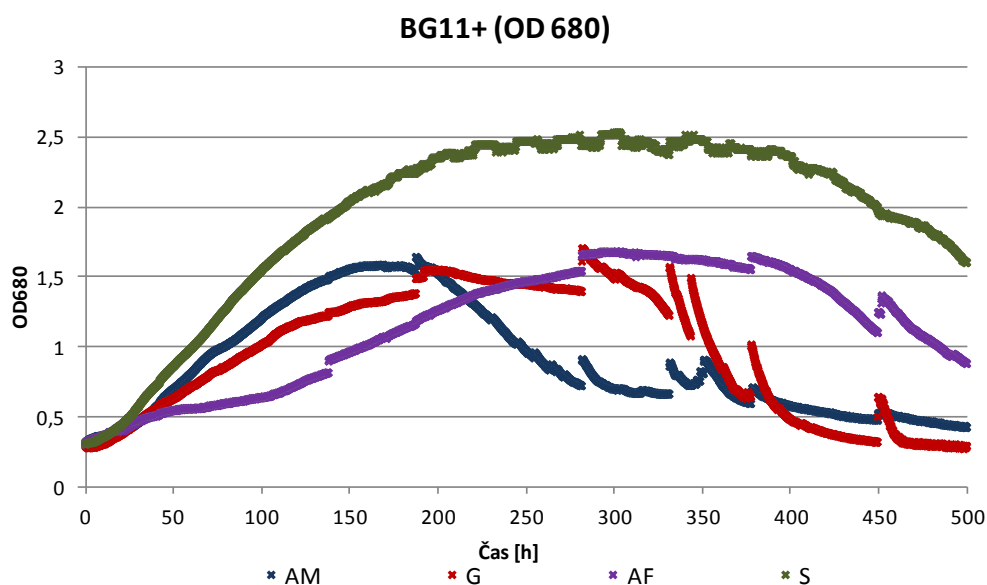
Stejně jako u amerického, tak i u německého kmenu je nejvhodnější volbou BBM médium, kde byla naměřena nejvyšší optická hustota. Nejmenší nárůst je pozorován opět u BG11.

Čtvrtý, africký kmen, vykazoval nejmenší nárůst ze všech použitých kmenů HMP, zvláště pak v BG11 médiu. Neoptimálnějším se jeví složení obohaceného BG11 média s 10ti-násobnou koncentrací vybraných prvků (P, Zn, Fe).

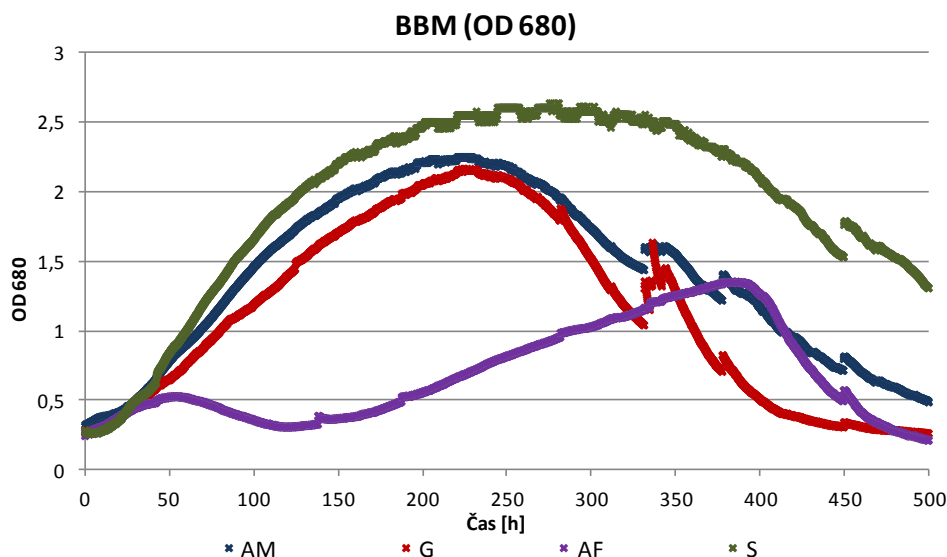
Obdobné výsledky byly pozorovány při měření OD 720, kde největšího nárůstu dosáhl opět švýcarský kmen a nejmenšího africký. Grafy 84, 85 a 86 jsou uvedeny v příloze 2.



Graf 13: Růst kmenů HMP v BG11 médiu při OD 680 nm



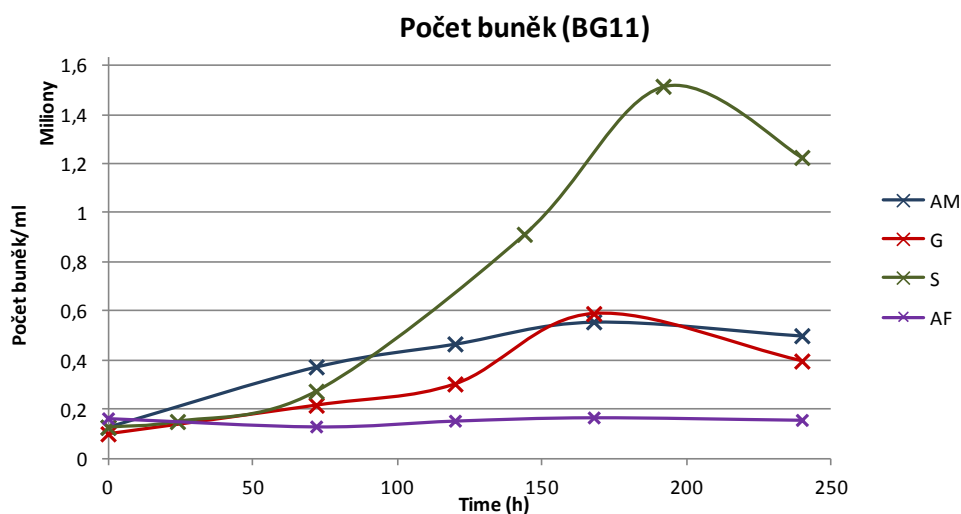
Graf 14: Růst kmenů HMP v BG11+ médiu při OD 680 nm



Graf 15: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 680 nm

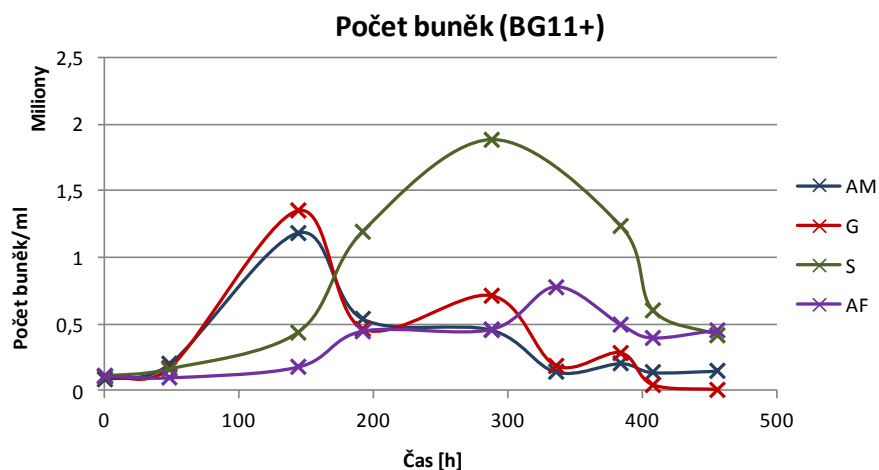
5.2.1.2 Vliv odlišného složení kultivačních médií na počet buněk

V grafu 16 je možné pozorovat nárůst počtu buněk HMP během kultivace v BG11 médiu. Kmen ze Švýcarska dosáhl nejvyšších hodnot, zatímco u kmenů z Ameriky a Německa je počet buněk v médiu až 3x menší. U afrického kmenu dochází k minimálním změnám (grafy 16, 17, 18).



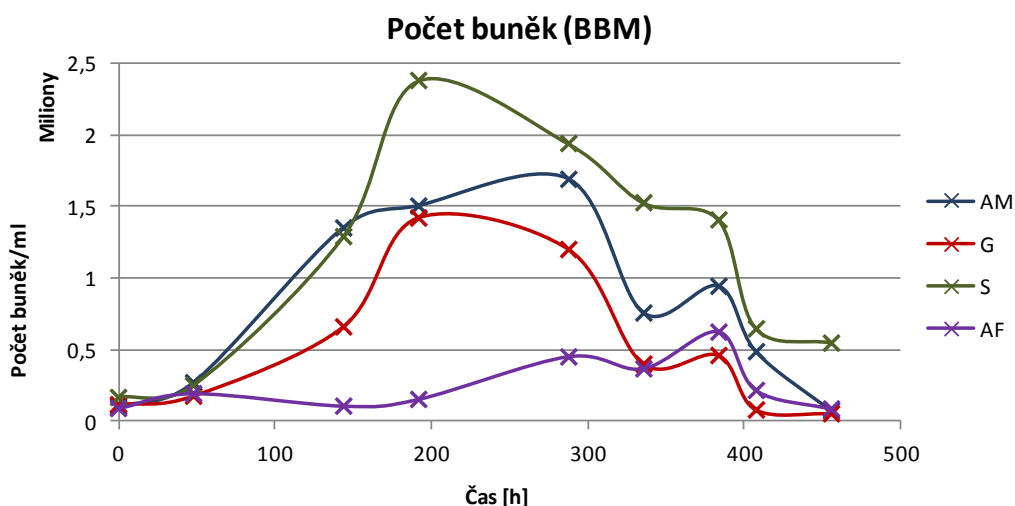
Graf 16: Růst kmenů HMP v BG11 médiu při OD 680 nm

Počet buněk pro všechny kmeny HMP kultivované v BG11+ médiu jsou zobrazeny v grafu 17. Nejvyšší nárůst vykazoval švýcarský kmen, s maximem 1 500 000 buněk/ml. Nejmenší množství buněk bylo naměřeno opět u afrického kmenu, který nepřekročil hodnotu 1 000 000 buněk/ml.



Graf 17: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 680 nm

V BBM médiu byl největší počet buněk stanoven u švýcarského kmenu (graf 18), 2 500 000 buněk/ml. Zatímco minimum vykazuje opět kmen z Afriky.



Graf 18: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 680 nm

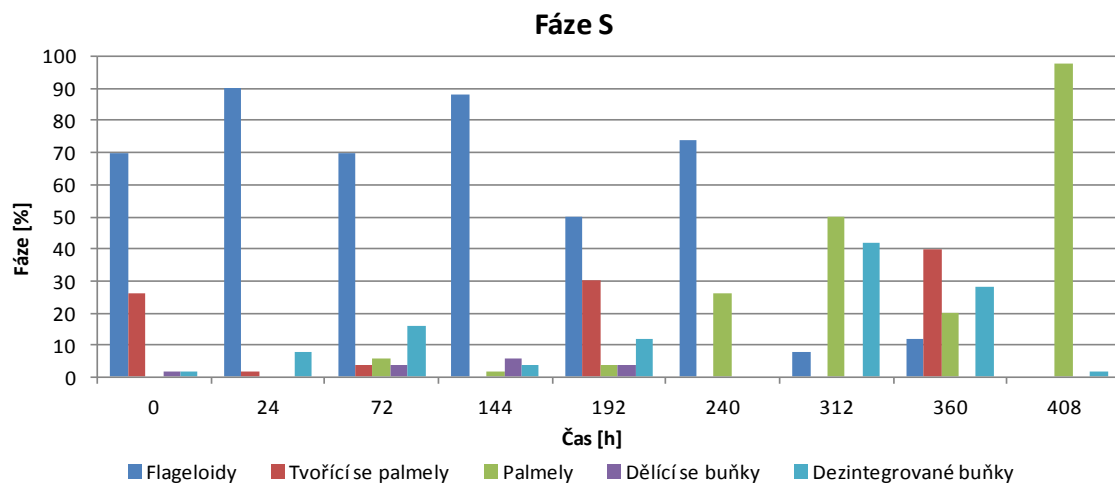
Obdobné výsledky potvrzuje studie Domínguez-Bocanegra, kde rovněž bylo dosaženo na základě měření počtu buněk/ml největšího růstu v BBM médiu a naopak nejnižší výtěžek byl pozorován u BG11 média [79].

Měření počtu buněk úzce souvisí s analýzou optické hustoty. V obou případech, největší počet buněk i nejvyšší hodnoty optické hustoty byly pozorovány u švýcarského kmenu. Naopak nejmenší odezvy na růst (OD, počet buněk) byly stanoveny u afrického kmenu.

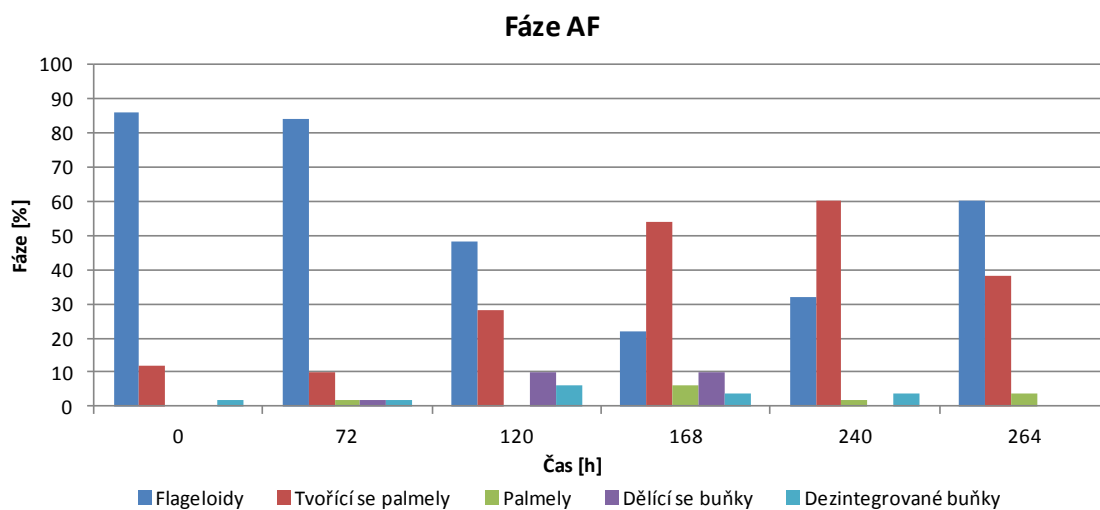
5.2.1.3 Změny buněčných fází v prostředí různých kultivačních médií

V BG11 médiu dochází u všech studovaných kmenů na začátku kultivace k nárůstu kultur s převahou flageloidních buněk (grafy 19, 20, 21 a 22). V průběhu růstu vznikají přechodné formy flagela/palmela a kolem 170. hodiny lze pozorovat zvýšenou tvorbu klidového stadia – palmel především u kmenů z Německa a Ameriky. Švýcarský kmen vykazuje významnou produkci palmel až po 200. hodině kultivace. U afrického kmenu jejich tvorba v BG11 prakticky není pozorována, jelikož kmen vykazuje velmi nízký nárůst biomasy. Vznik palmel

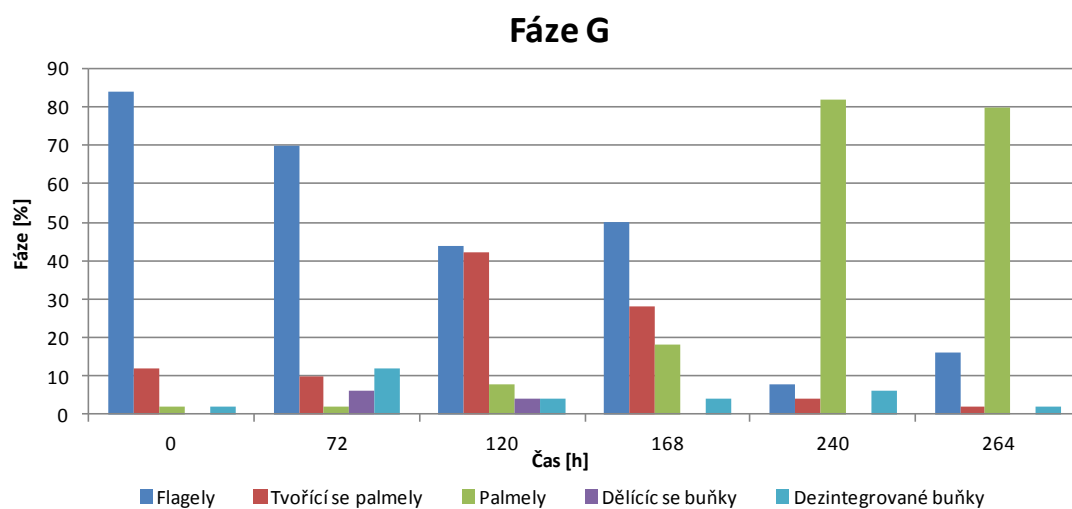
v druhé polovině kultivace souvisí většinou s úbytkem živin v médiu nebo s přítomností jiného stresového faktoru [106].



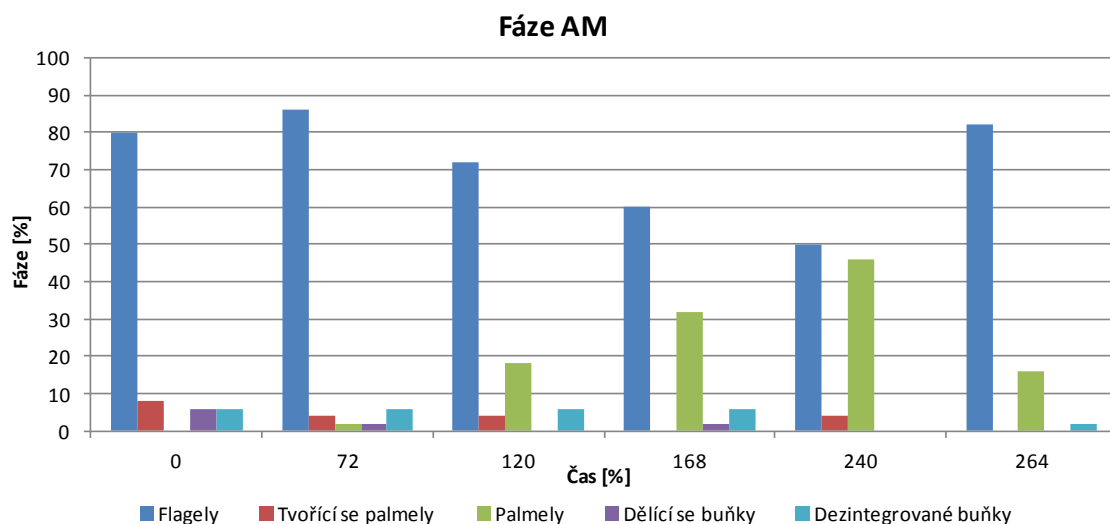
Graf 19: Fáze švýcarského kmenu během kultivace v BG11 médiu



Graf 20: Fáze afrického kmenu během kultivace v BG11 médiu

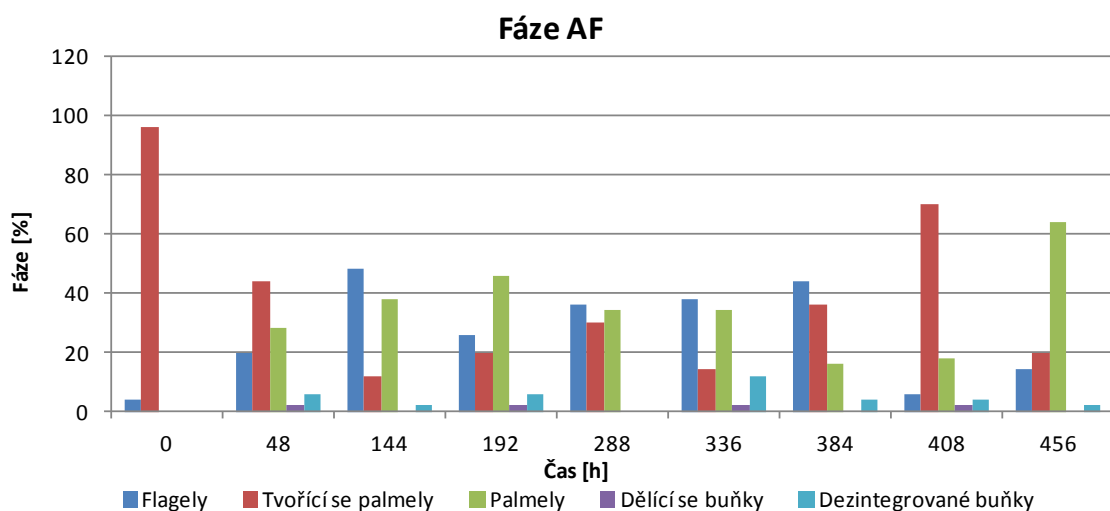


Graf 21: Fáze německého kmenu během kultivace v BG11 médiu

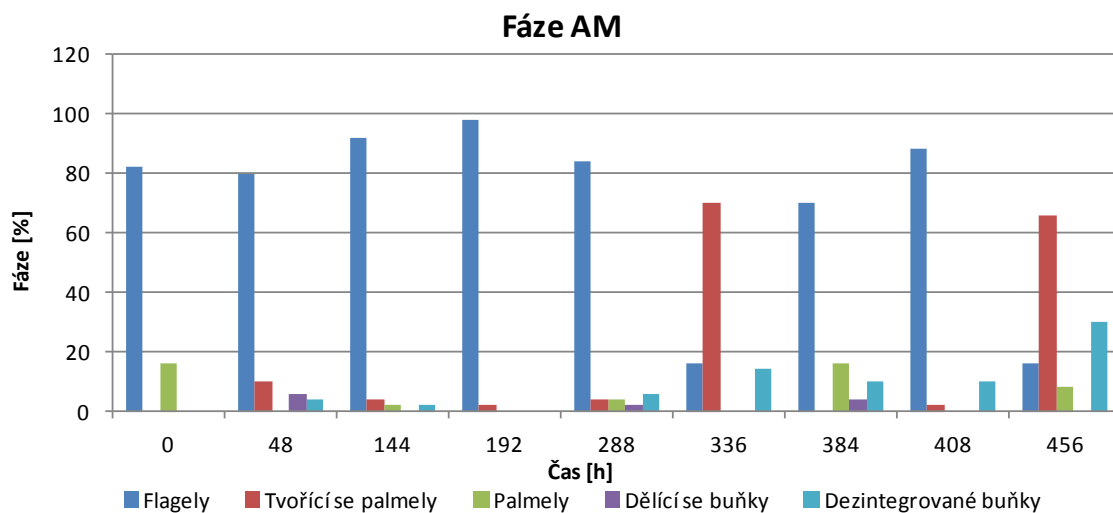


Graf 22: Fáze amerického kmenu během kultivace v BG11 médiu

V prostředí BG11+ se u afrického kmenu vyskytuje zvýšené množství palmeloidních buněk (graf 23). K opačnému jevu dochází u amerického kmenu, který je charakterizován převahou pohyblivých flagel (graf 24). Zbylé výsledky vykazují obvyklý průběh růstových fází (kapitola 5.1.1.3). Jsou proto uvedeny v příloze 3 (grafy 87 – 89).

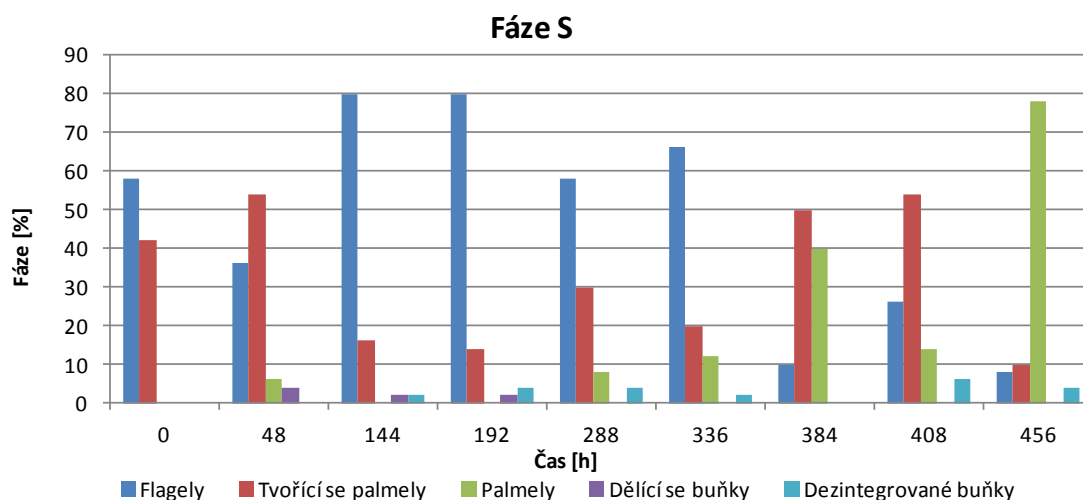


Graf 23: Fáze afrického kmenu během kultivace v BG11+ médiu

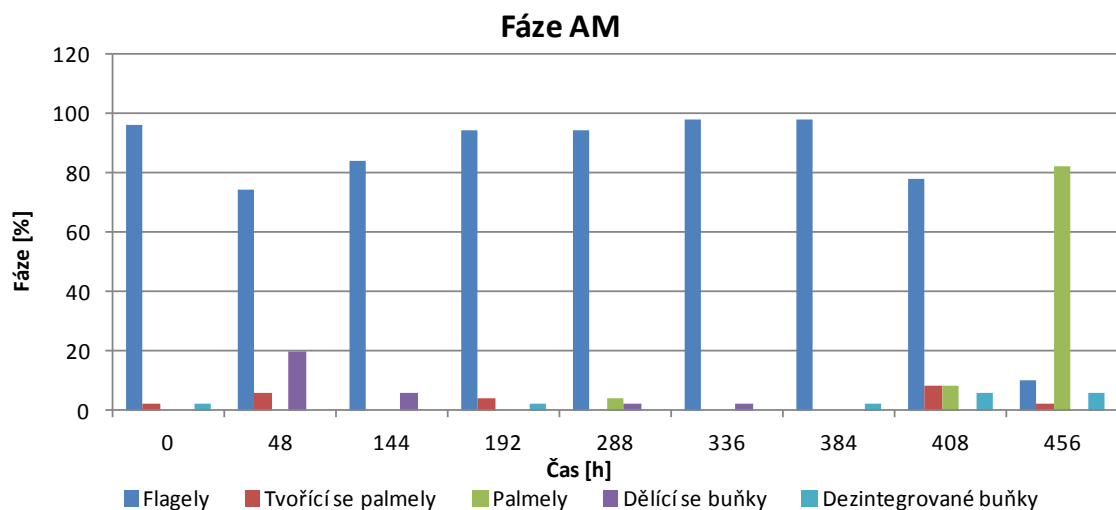


Graf 24: Fáze amerického kmenu během kultivace v BG11+ médiu

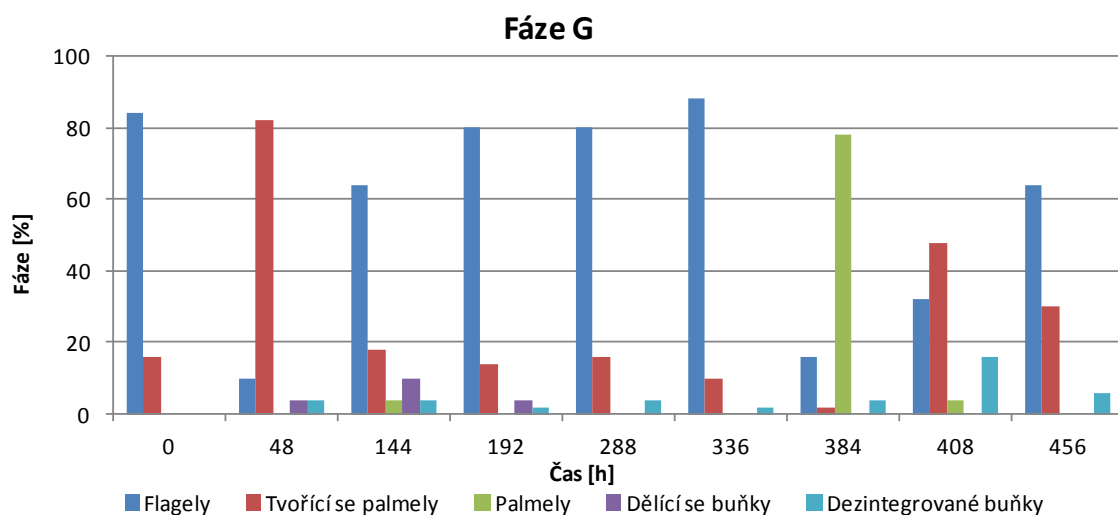
V BBM médiu bylo u kmenů z Německa a Ameriky pozorováno po celou dobu kultivace vysoké množství flageloidních buněk. V tomto médiu docházelo rovněž k jejich nejlepšímu růstu (graf 15). U švýcarského kmenu dochází k postupné tvorbě palmel po předchodu do stacionární fáze.



Graf 25: Fáze švýcarského kmenu během kultivace v BBM médiu



Graf 26: Fáze amerického kmenu během kultivace v BBM médiu



Graf 27: Fáze německého kmenu během kultivace v BBM médiu

5.2.1.4 Hodnoty dob zdvojení u kmenů *H. pluvialis*

V tabulce 7 jsou zobrazeny nejkratší doby zdvojení (DT) u jednotlivých kmenů HMP v různých médiích. Nejkratší DT z celého experimentu (25 h) byl zaznamenán u švýcarského kmenu v BBM médiu. Americký (31,2 h), německý (35,3 h) a africký (33,1 h) kmen vykazovaly nejlepší výsledky rovněž v BBM médiu, naopak jako nejhorší se jeví BG11 médium, kde časy zdvojení byly nejvyšší.

Tabulka 7: Doba zdvojení

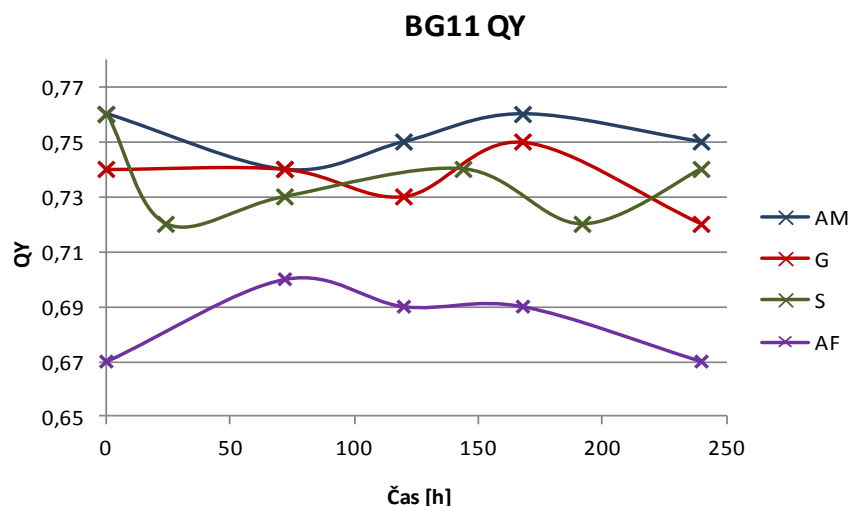
Doba zdvojení [h]	AF	AM	G	S
BG11	54,9	34,9	40,1	33,9
BG11+	46,9	34,3	41,0	30,5
BBM	33,1	31,2	35,3	24,8

5.2.2 Monitoring kvantového výtěžku během kultivace jednotlivých kmenů HMP

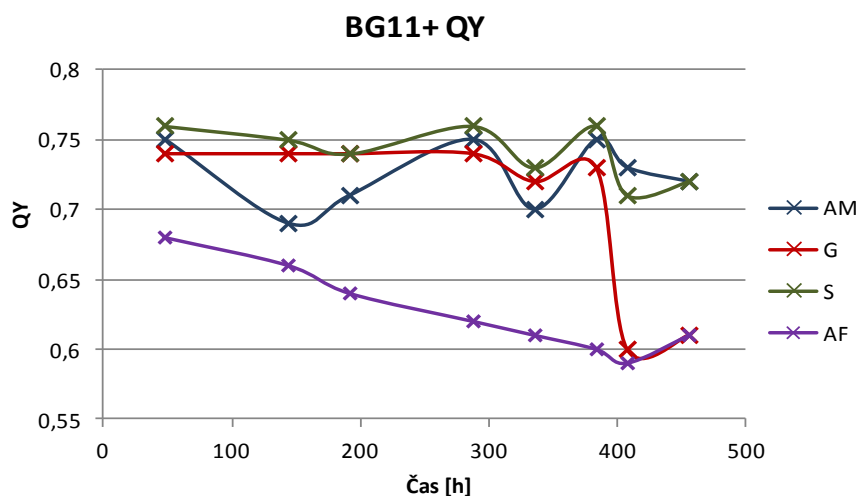
Ve všech médiích vykazovaly kmeny zprvu lepší fyziologický stav s kvantovým výtěžkem v rozmezí od 0,65 do 0,75 (graf 28, 29, 30), v průběhu kultivace však dochází k jeho poklesu.

Nejnižší QY je pozorován u kmenu z Afriky v BG11 a BG11+ médiu. Ke zlepšení došlo v BBM médiu, což nasvědčuje na lepší podmínky pro nárůst biomasy.

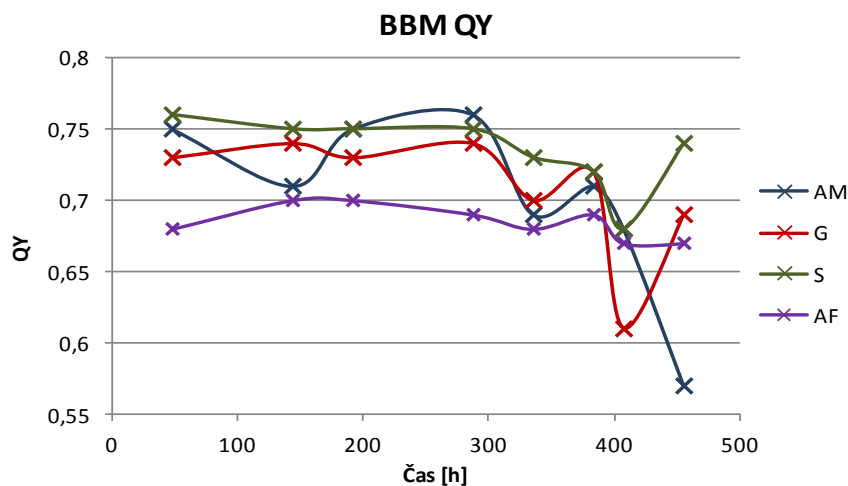
Kvantový výtěžek se u *H. pluvialis* za optimálních podmínek pohybuje v rozmezí 0,65 až 0,8. Snížení tohoto parametru může být přičítáno stárnutí kultury nebo jako reakce na nepříznivé podmínky prostředí [100, 101]. Nejnížší QY je pozorován u kmenu z Afriky, to znamená, že řasa nejen špatně rostla (grafy 13, 14, 15), ale i její fotosyntetická aktivita byla snížena oproti ostatním studovaným kmenům.



Graf 28: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 680 nm



Graf 29: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 680 nm



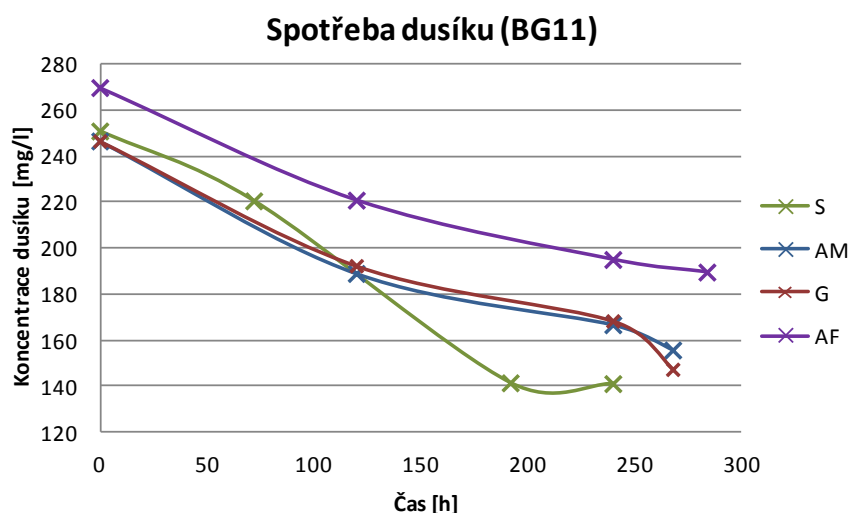
Graf 30: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 680 nm

5.2.3 Spotřeba živin z média

Obdobně jako u růstového testu s HMP – CCALA 375 byla i v tomto experimentu s různými kultivačními médii sledována spotřeba dusíku během růstu kultury. Kromě toho byly monitorovány koncentrace vybraných prvků za účelem vyhodnocení složení optimálního média pro růst jednotlivých kmenů HMP.

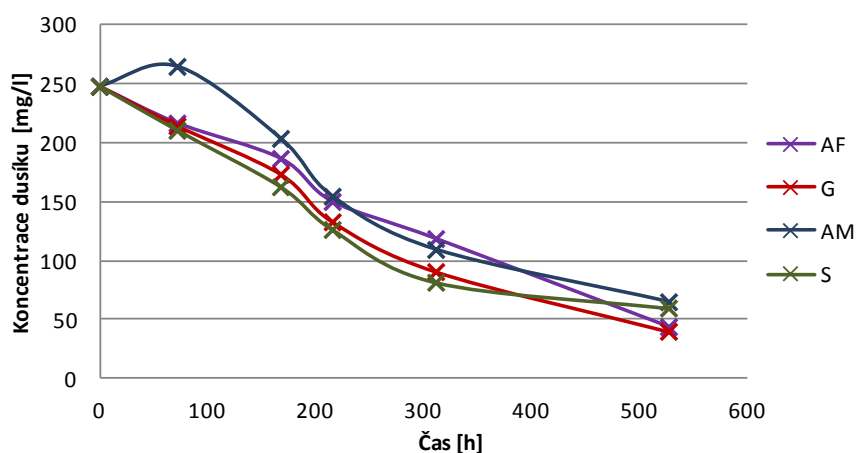
5.2.3.1 Využití zdroje dusíku

Nejmenší úbytek dusíku byl zaznamenán u BG11, kde jeho hodnota neklesla pod 140 mg/l a u BG11+ se zbytková koncentrace pohybovala kolem 50 mg/l. Tato dvě média se neliší obsahem dusíku, ale 10tinásobně vyšším množstvím vybraných prvků - železo, fosfor a zinek. Rozdíl ve složení médií má za následek lepší nárůst buněk HMP (viz grafy 13, 14 a grafy 16, 17) a tudíž zvýšenou spotřebu dusíku v prostředí s BG11+.



Graf 31: Spotřeba dusíku v BG11 médiu

Spotřeba dusíku (BG11+)

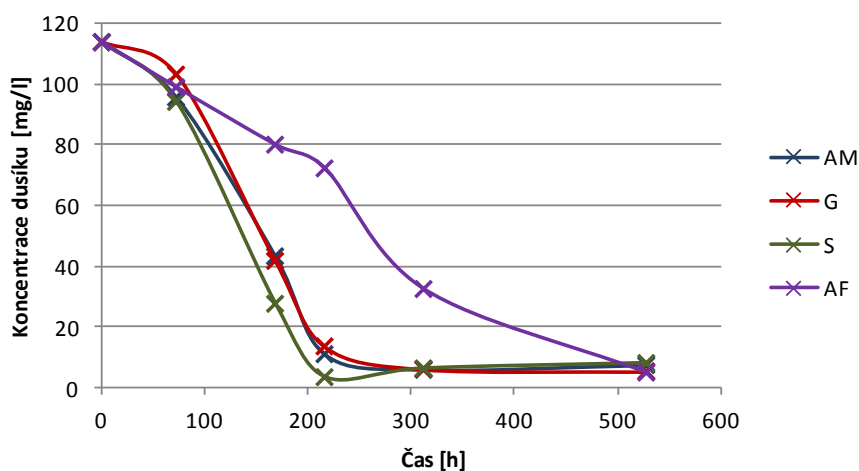


Graf 32: Spotřeba dusíku v BG11+ médiu

V experimentu s BBM médiem (graf 33) bylo množství celkového dusíku vyčerpáno již po 200. hodině kultivace HMP u švýcarského, německého a amerického kmenu. Využití dusíku u afrického kmenu bylo mnohem pomalejší vzhledem k nízkému nárůstu biomasy.

Limitní koncentrací dusíku pro růst kultury HMP je podle odborných zdrojů rozmezí 1,4 – 14,0 mg/ml [78, 96]. V BBM médiu se k této limitě přiblížily všechny kmeny kromě afrického již po 200. hodině kultivace (tabulka 8). V navazujících experimentech by bylo tedy vhodné zvýšit obsah dusíku již při přípravě samotného média pro možný větší výtěžek biomasy.

Spotřeba dusíku (BBM)



Graf 33: Spotřeba dusíku v BBM médiu

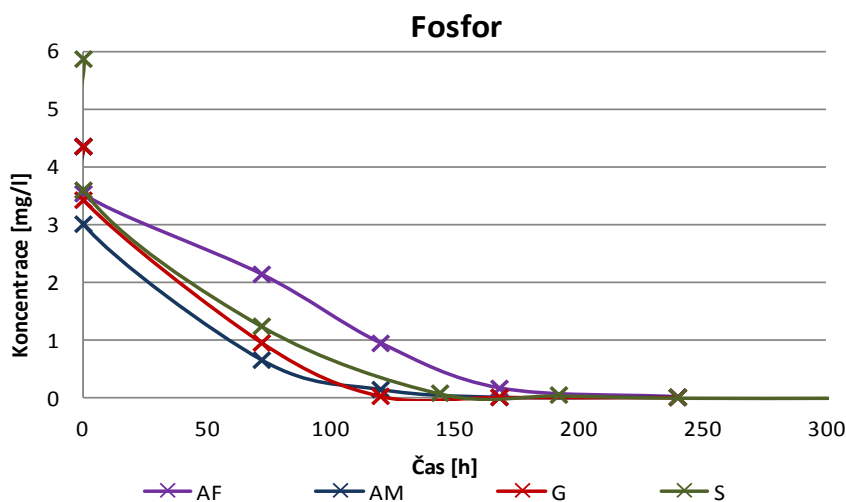
Tabulka 8: Limitní koncentrace kmenů HMP v BBM médiu

Kmen	Limitní koncentrace dusíku [mg/l]
AM	5,95
G	5,45
S	3,52

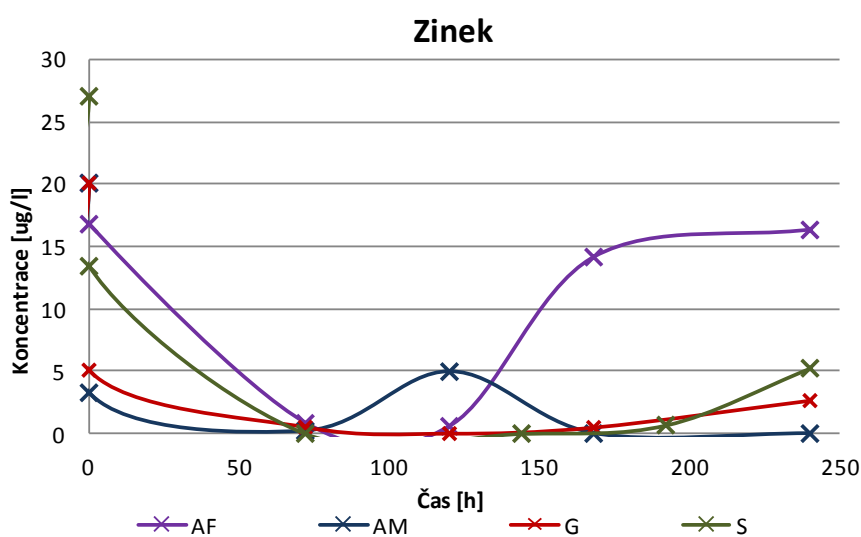
5.2.3.2 Elementární analýza média v průběhu kultivace

Analýza prvků v průběhu kultivace byla použita ke sledování úbytku množství živin z média.

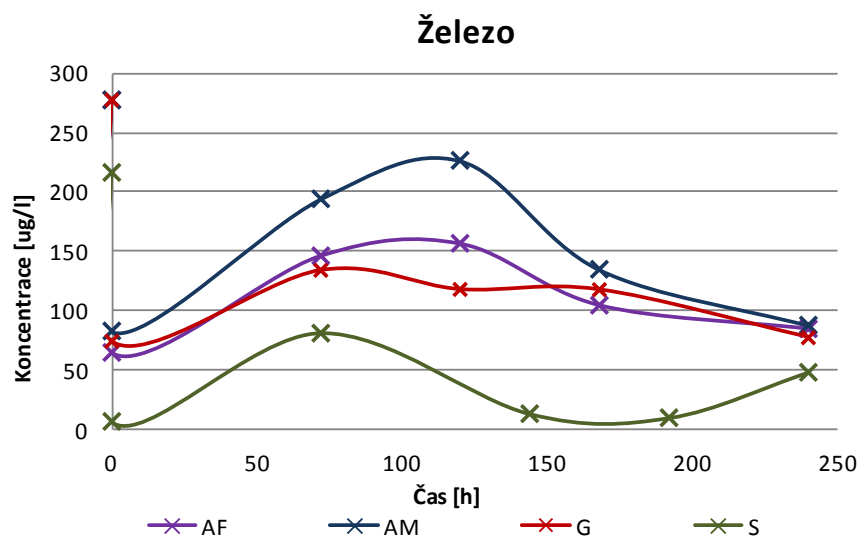
V BG11 médiu bylo zaznamenáno zvýšené využití fosforu, zinku a železa (graf 34, 35, 36). Vysoká spotřeba fosforu je pravděpodobně spojena s jeho participací v energetickém metabolismu a zároveň se známou schopností mikrořas si vytvořit jisté zásoby (pool) tohoto prvku [97, 98]. Kromě toho se fosfor z kultivačního prostředí zřejmě adsorbuje na povrchové struktury řasových buněk [97, 98]. Snížení koncentrace železa a zinku může znamenat zapojení prvků v oxido-redukčních aktivitách v buňce, hlavně u švýcarského kmenu.



Graf 34: Spotřeba fosforu v BG11 médiu



Graf 35: Spotřeba zinku v BG11 médiu



Graf 36: Spotřeba železa v BG11 médiu

Během kultivace v BG11+ dochází u všech kmenů k velkému úbytku železa, jenž se v médiu vyskytuje v desetinásobně vyšší koncentraci. Stejně je tomu i u zinku, což může souviset se zvýšením oxido-redukční aktivity spojené s nárůstem optické hustoty (graf 14) v porovnání s kultivací v neobohaceném médiu BG11. U obou prvků je největší pokles zaznamenán kolem 200. hodiny kultivace, tedy s přechodem buněčné kultury do stacionární fáze. V důsledku vyšší koncentrace v obohaceném médiu může mít na celkový obsah železa vliv i zapojení prvku ve Fentonově reakci při tvorbě hydroxylového radikálu. Tento jev je studován pro možné využití k indukci biosyntézy karotenoidů jako odpověď na oxidační stres [94]. Jak je vidět na obrázku 10, po 200. hodině kultivace dochází ke změně barvy kultury, což souvisí s vyšší akumulací astaxanthinu (reakce na tvorbu radikálů). Bezbarvý mléčný zákal afrického kmenu je důsledkem slabého růstu s usazeným peletem na dně zkumavky.

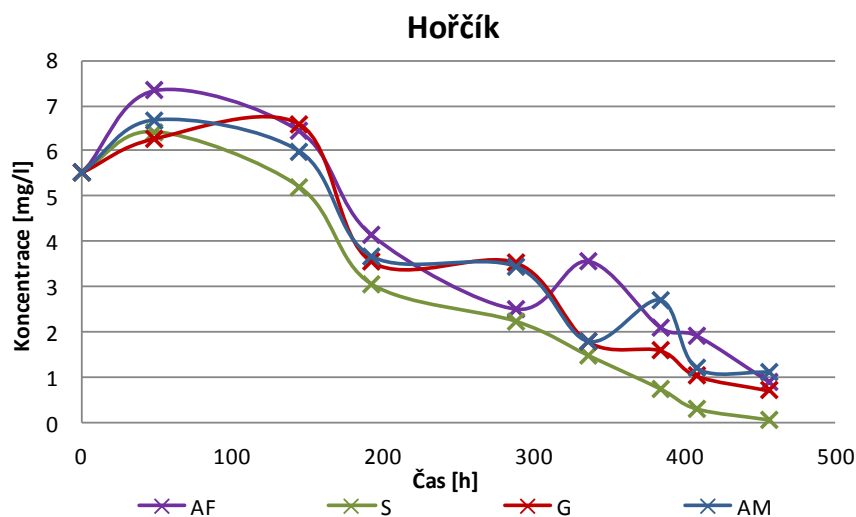


Obr. 10: a) Kultivace ve 150. hodině, b) Kultivace po 200. hodině

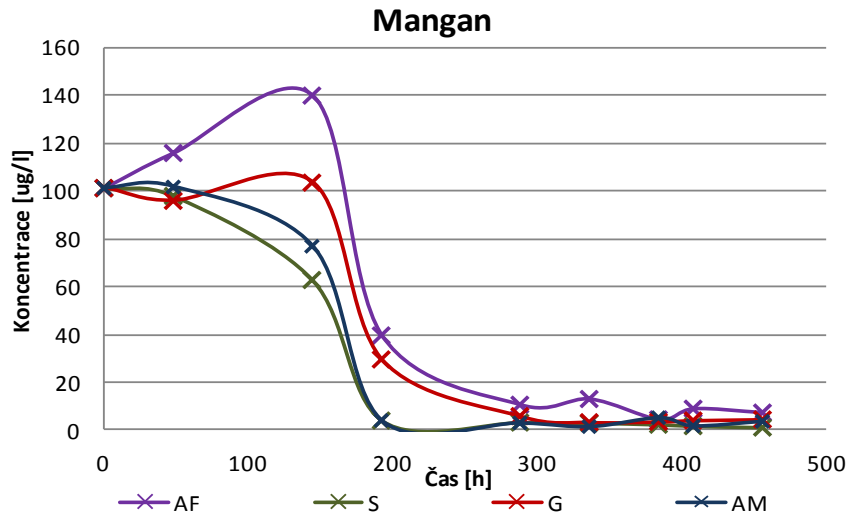
Draslík je v BG11+ médiu přítomen ve vyšší koncentraci (díky obohacení média fosforem ve formě fosfátu draselného) než v BG11. Obdobně je tomu u složení média BBM (tabulka 2). Tento prvek hraje významnou roli v transportu vody a živin. Je-li jeho množství sníženo, je snížen rovněž transport jiných prvků, jako jsou dusičnany, fosfáty, vápník, hořčík a jiné [99]. Proto jeho vyšší obsah v kultivacích s BG11+ i s BBM pravděpodobně provokuje

také zvýšenou spotřebu dusíku (graf 32, 33), hořčíku a manganu, která nebyla pozorována u předešlých kultivací s neobohaceným médiem BG11. Je rovněž možné, že se jedná např. o stresovou reakci na přítomnost osmoaktivní látky [99] (grafy 37 a 38). Nebyla však u kultivací v BG11+ ani v BBM pozorována limitace fosforem a prakticky ani zinkem (grafy 92 - 95, příloha 4), jako tomu bylo u předešlých experimentů s BG11 (grafy 34, 35)

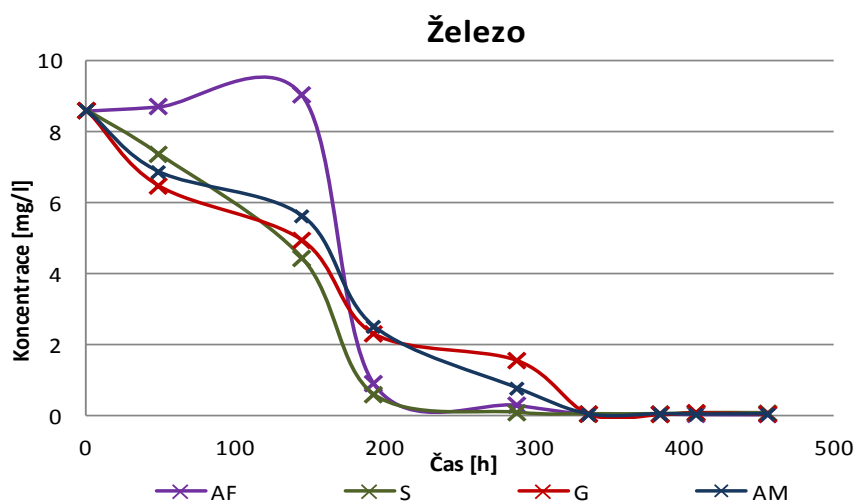
Z hlediska jednotlivých kmenů docházelo k pomalejší spotřebě prvků u afrického kmenu (zvláště manganu a železa). To je způsobeno jeho pomalým růstem.



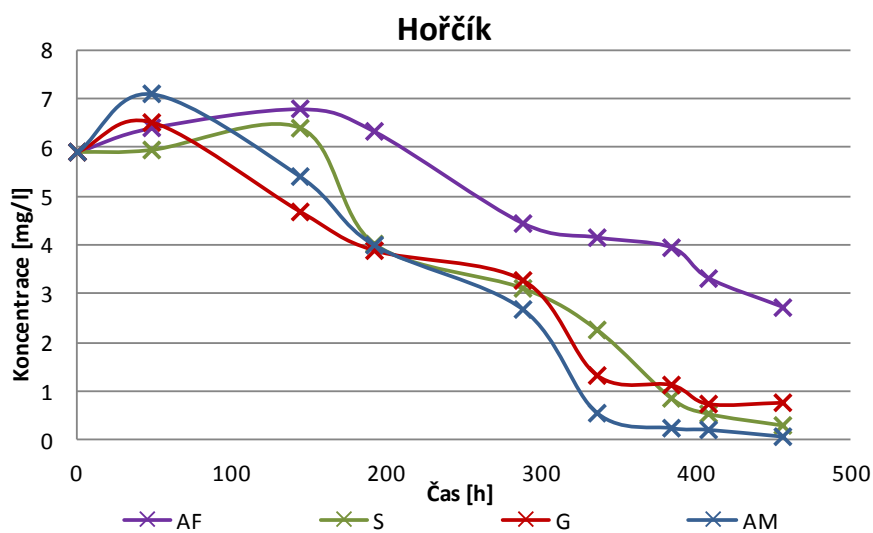
Graf 37: Spotřeba hořčíku v BG11+ médiu



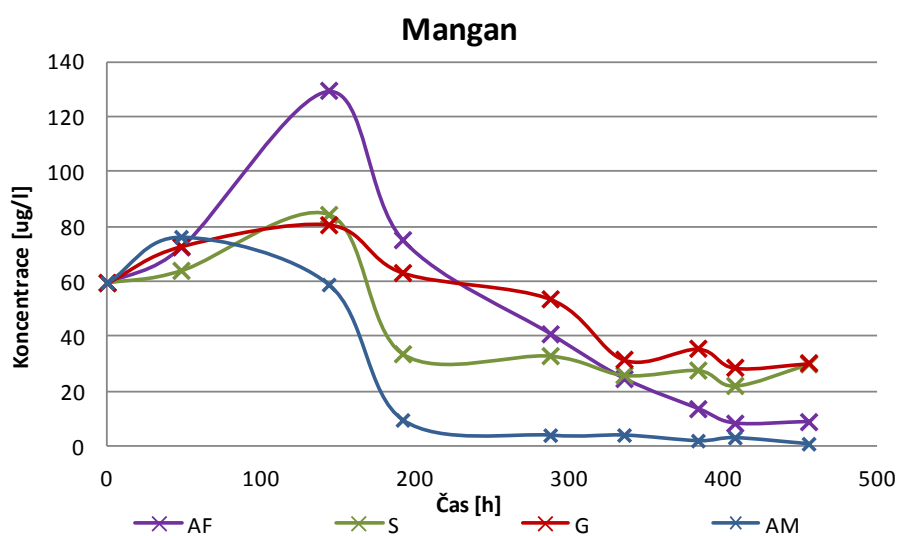
Graf 38: Spotřeba manganu v BG11+ médiu



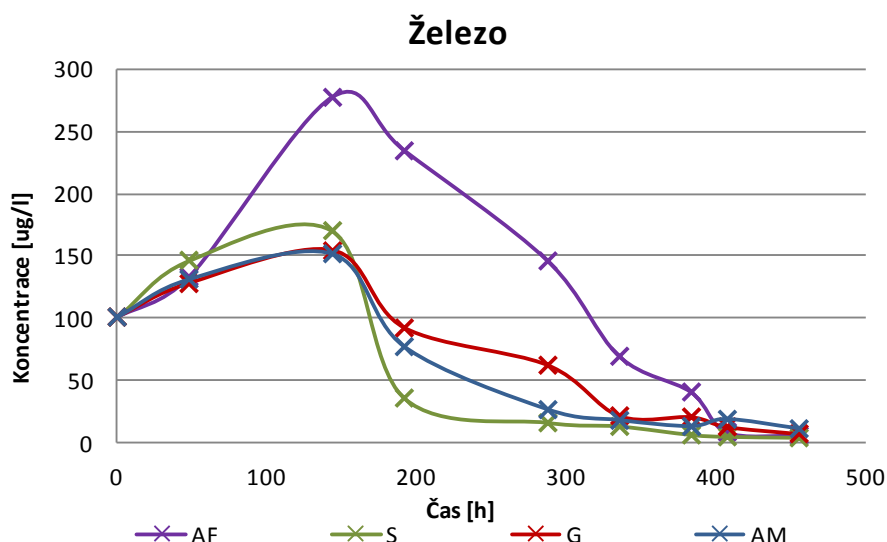
Graf 39: Spotřeba železa v BG11+ médiu



Graf 40: Spotřeba hořčíku v BBM médiu



Graf 41: Spotřeba manganu v BBM médiu



Graf 42: Spotřeba železa v BBM médiu

5.3 Kultivace *H. pluvialis* za zvýšené teploty

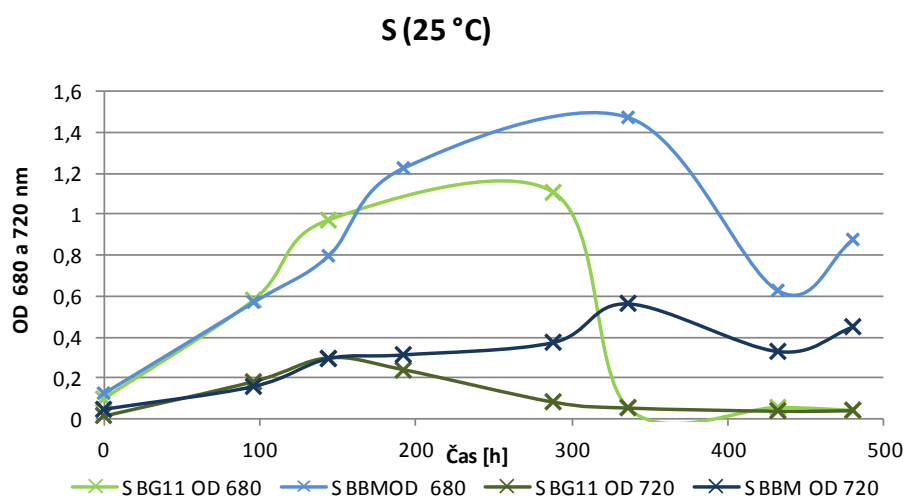
Při kultivaci HMP je teplota důležitým faktorem ovlivňující koncentraci biomasy. Studie se v tomto směru zabývají hodnotami od 20 do 28 °C a v mnohých případech se jako optimální jeví 25 °C. A právě tato teplota byla použita pro monitoring růstu studovaných kmenů (tabulka 6, kapitola 5.2). V experimentu jako testovací médium bylo zvoleno BG11 médium a BBM (kapitola 4.2.1).

Řasy byly kultivovány v multikultivátoru MC 1000-OD za následujících podmínek: osvětlení $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, vzdušněno směsí 2% CO₂ a 98% vzduchu. Hodnoty optických hustot a kvantových výtěžků v odebraných vzorcích byly měřeny kapesním přístrojem AquaPen-C AP-C 100. Výsledky (grafy 43, 45, 47 a 49) byly srovnány s OD hodnotami naměřenými v kontrolních vzorcích během kultivace HMP kmenů v různých médiích za teploty 22 °C (kap. 5.2.1.1 a grafy 44, 46, 48 a 50).

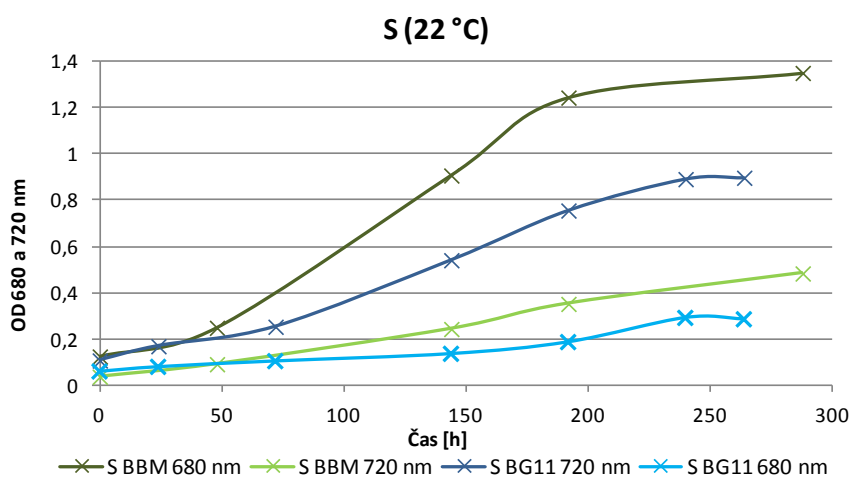
5.3.1 Vliv zvýšené teploty na růst a studium buněčných fází

V grafu 43 jsou zobrazeny výsledky kultivace švýcarského kmenu při 25 °C (680 nm). Zvýšená teplota v kombinaci s BBM médiem se jeví jako nejvhodnější volba, jelikož dochází k většímu nárůstu OD v porovnání se sníženou teplotou (graf 44). Ke zlepšení došlo i v případě kultivace v BG11 médiu.

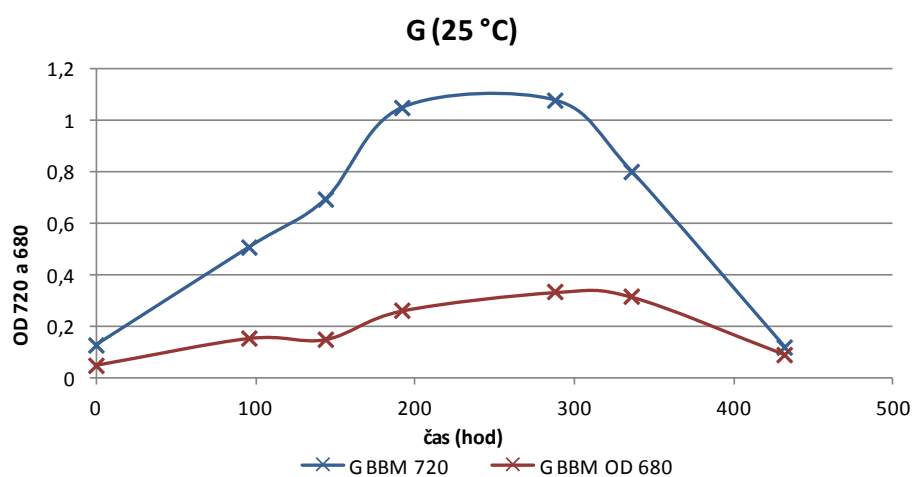
Pro německý kmen bylo vybráno pouze kultivační BBM médium, jelikož předchozí experiment (kap. 5.2.1.1, graf 13, 14) prokázal, že v médiu BG11 i v BG11+ byl pozorován mnohem nižší růst kultury. Vlivem zvýšené teploty dochází rovněž k nárůstu hodnoty optické hustoty oproti kultivaci při 22 °C (graf 45 a 46) jako u kmenu ze Švýcarska.



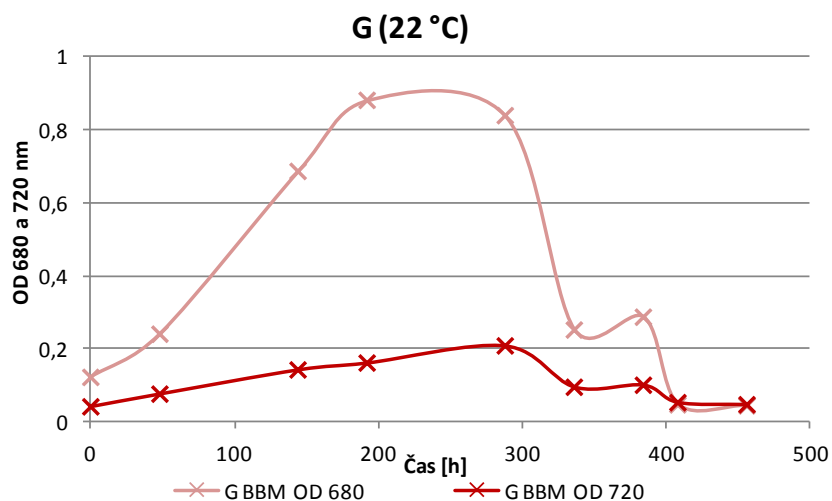
Graf 43: Růst kmenu S v BBM a BG11 médiu při OD 680 a 720 nm



Graf 44: Růst švýcarského kmenu při 22 °C – pro srovnání



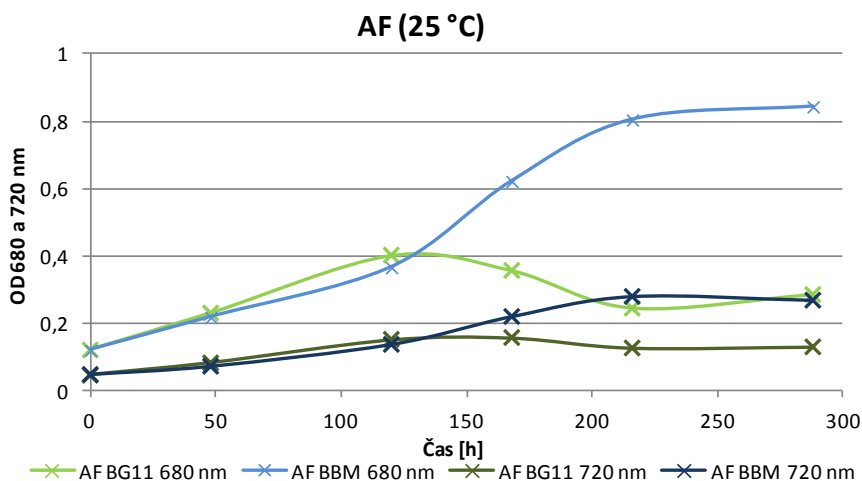
Graf 45: Růst německého kmenu za zvýšené teploty v BBM médiu



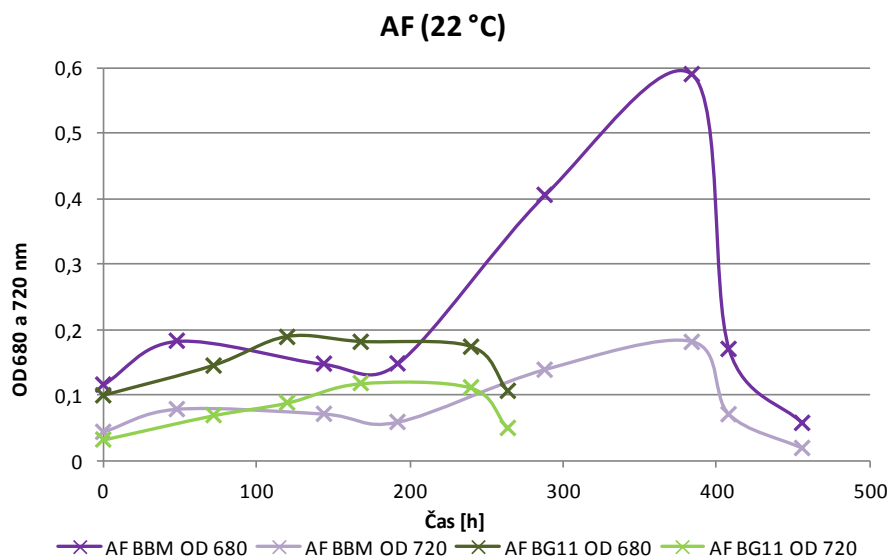
Graf 46: Růst německého kmenu při 22 °C v BBM - srovnání

V grafu 47 jsou zobrazeny růstové křivky afrického kmenu. Značně vyšších hodnot optické hustoty dosahuje v prostředí BBM média, nežli je tomu v BG11. V porovnání se sníženou teplotou (graf 48) došlo také k lepšímu nárůstu biomasy při 25 °C.

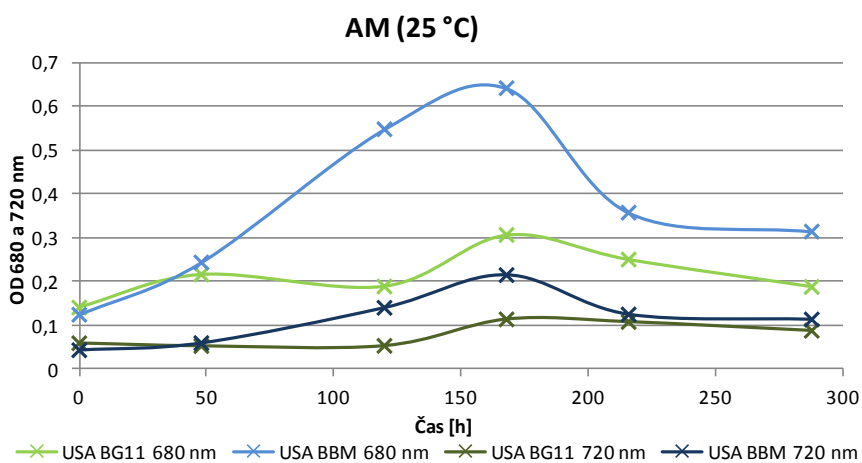
V případě amerického kmenu (graf 49) je růst při teplotě 25 °C nižší v porovnání s experimentem s růstovou teplotou 22 °C (graf 50). Nárůst biomasy je však i za zvýšené teploty signifikantně lepší v BBM médiu (dvojnásobné hodnoty OD) než v prostředí BG11, kde je pozorováno jen nepatrné zvýšení optické hustoty.



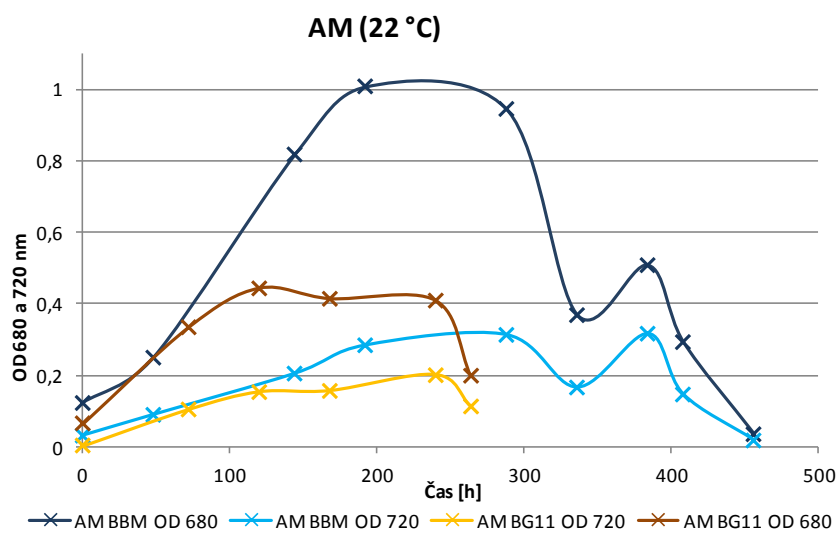
Graf 47: Růst afrického kmenu za zvýšené teploty



Graf 48: Růst afrického kmenu při 22 °C v BBM a BG11 – srovnání



Graf 49: Růst amerického kmenu za zvýšené teploty

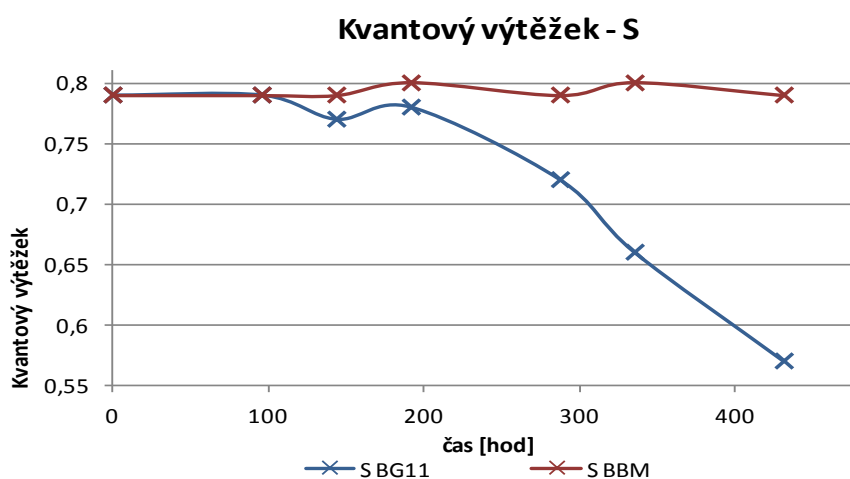


Graf 50: Růst amerického kmenu při 22 °C v BBM a BG11 – srovnání

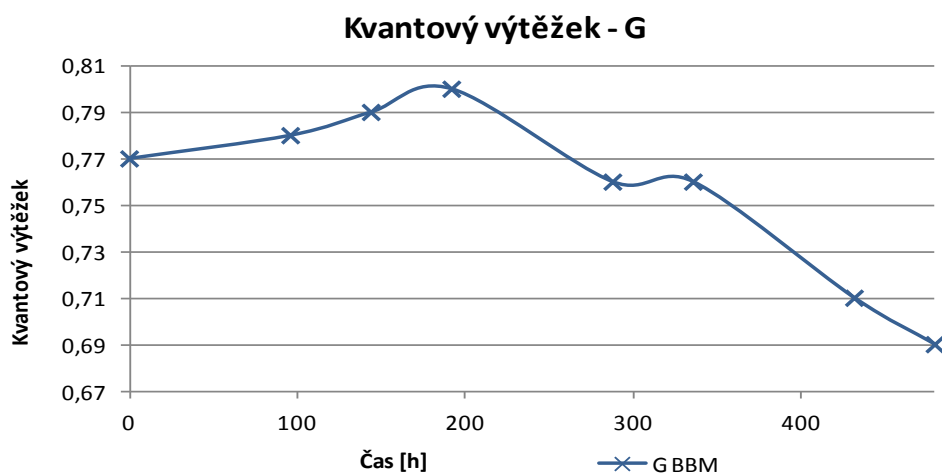
Profily růstových fází u všech kmenů v experimentech se zvýšenou teplotou vykazovaly obvyklý trend s flagelami v lag fázi a během exponenciální fáze růstu a jejich přechodem do palmel s počátkem stacionární fáze, případně výskytem dezintegrovaných buněk ke konci kultivace. Grafy 96-101 jsou uvedeny v příloze 6.

5.3.2 Monitoring kvantového výtěžku a rychlosti růstu kultury

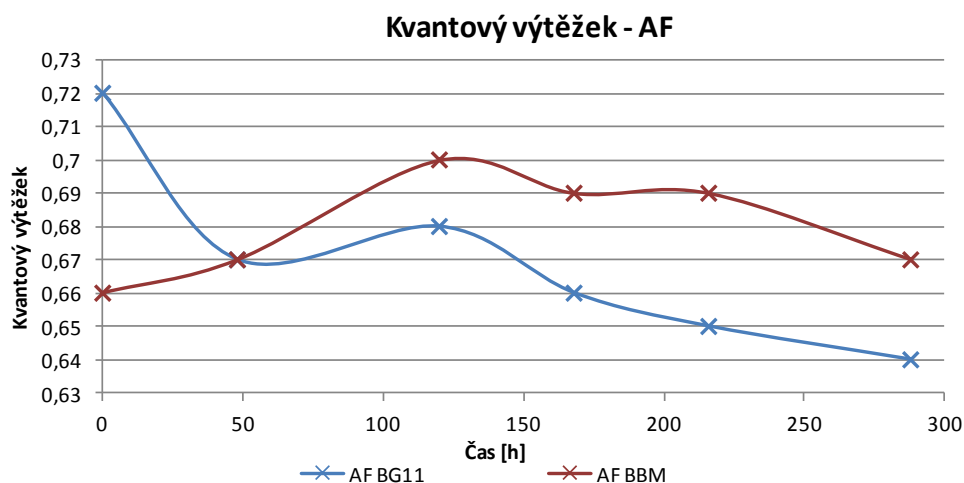
V grafech 51 až 54 jsou zobrazeny kvantové výtěžky jednotlivých kmenů, které se pohybují v rozmezí od 0,7 do 0,8. U švýcarského (zejména v BG11 médiu) a německého kmenu dochází s postupem času k poklesu, zatímco u amerického kmenu tyto hodnoty u BG11 mírně rostou.



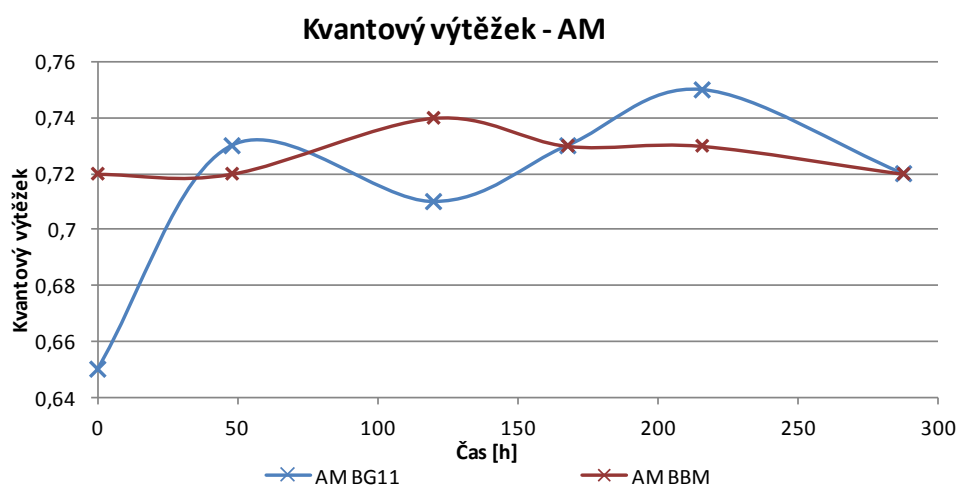
Graf 51: Kvantový výtěžek švýcarského kmenu za zvýšené teploty



Graf 52: Kvantový výtěžek německého kmenu za zvýšené teploty



Graf 53: Kvantový výtěžek afrického kmenu za zvýšené teploty



Graf 54: Kvantový výtěžek amerického kmenu za zvýšené teploty

V tabulce 9 jsou uvedeny doby zdvojení pro jednotlivé kmeny. Nejmenší hodnoty (nejrychlejší růst) byly vypočítány u švýcarského (29,0 h) a amerického kmenu (29,6 h) v BBM médiu. Obecně je v BG11 dosaženo pomalejšího růstu s ohledem na vyšší hodnoty DT.

Tabulka 9: Nejkratší doby zdvojení jednotlivých kmenů za zvýšené teploty

Doba zdvojení [h]		
S	BG11	31,9
	BBM	29,0
G	BBM	31,9
AF	BG11	32,6
	BBM	31,1
AM	BG11	31,8
	BBM	29,6

5.4 Intenzita světla pro optimální růst *H. pluvialis*

Volba intenzity osvětlení je nejdůležitějším parametrem s ohledem na fyziologii a metabolickou aktivitu mikrořas. Přeměna světelné energie v procesu fotosyntézy v buňce je v přímém vztahu s nárůstem biomasy. Při překročení optimálního množství dochází u HMP k indukci tvorby astaxanthinu a snížení buněčného dělení [95].

V experimentu bylo jako testovací médium zvoleno BBM (kapitola 4.2.1). Řasy byly kultivovány v multikultivátoru MC 1000-OD za podmínek: teplota 22 °C, vzdušně směsí 2% CO₂ a 98% vzduchu. Hodnoty optických hustot a kvantových výtěžků byly měřeny v odebraných vzorcích na kapesním přístroji AquaPen-C AP-C 100.

V prvním kroku byla intenzita světla nastavena na 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ z důvodu adaptace buněk. Po lag fázi (48 hodin) byla hodnota zvýšena. V tabulce 10 jsou uvedeny použité intenzity osvětlení. Jako kontrolní sloužily zkumavky, kde intenzita osvětlení byla po celou dobu kultivace nezměněna (50 a 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$).

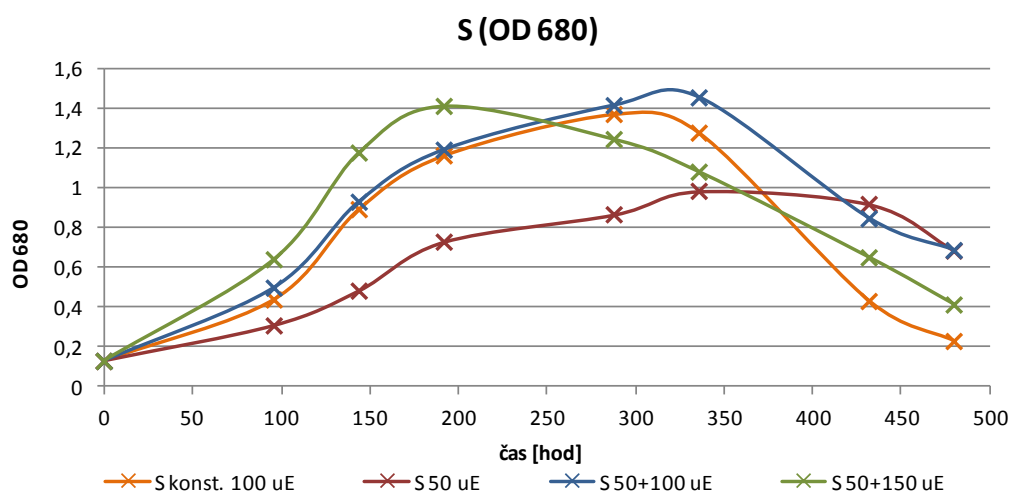
Tabulka 10: Studované intenzity osvětlení

	Preadaptace na nižší intenzitu světla	Změna intenzity po 48. hodině
1.	100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
2.	50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
3.	50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
4.	50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	150 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

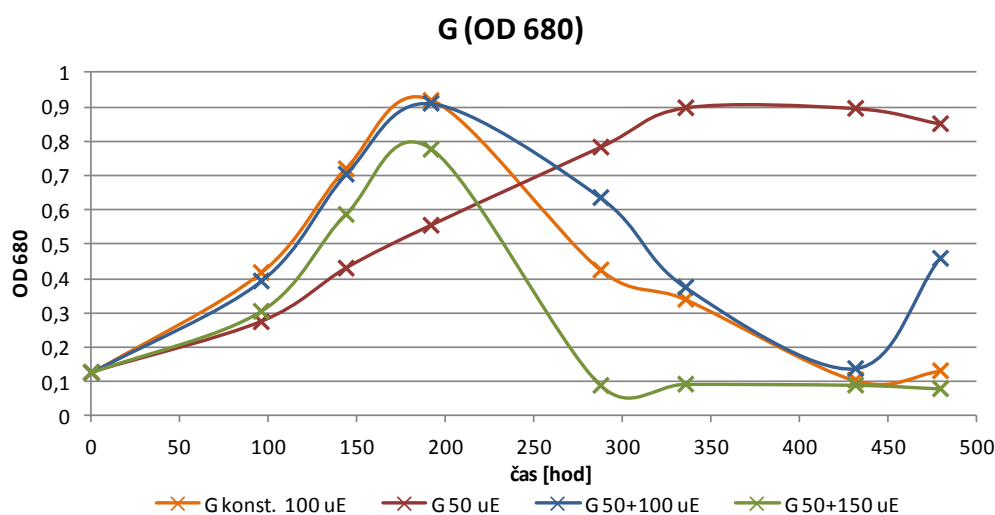
5.4.1 Změna růstových parametrů v závislosti na použitém osvětlení

V grafu 55 jsou zobrazeny výsledky optimalizace osvětlení během kultivace švýcarského kmenu. Nejvhodnější volbou pro růst je adaptovat kulturu při počátečním osvětlení s nižší intenzitou a poté ji zvýšit na 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Řasy pak dosahují nejvyšších hodnot OD. U vysokého osvětlení s preadaptací na nízkou intenzitu (50 + 150 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) se kultura dostává do stacionární fáze v nejkratším čase (před 200. hodinou) a zároveň výtěžek biomasy podle OD není zanedbatelný. Navíc byl vlivem vysokého osvětlení v průběhu kultivace vizuálně zaznamenán postupný přechod do červené fáze, což nasvědčuje indukci tvorby astaxanthinu (příloha 5). Naopak nejhorší nárůst byl zaznamenán u osvětlení 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Jako nevhodné osvětlení pro německý kmen (graf 56) se jeví 150 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, kde bylo dosaženo nejnižších hodnot OD. U 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ dochází k prodloužení přechodu kultury do stacionární fáze (350. hodina). Ve vzorcích s intenzitou světla 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ nedochází k žádné výrazné změně, a to ani v kontrolní zkumavce, ani při adaptaci kultury na nižší osvětlení.



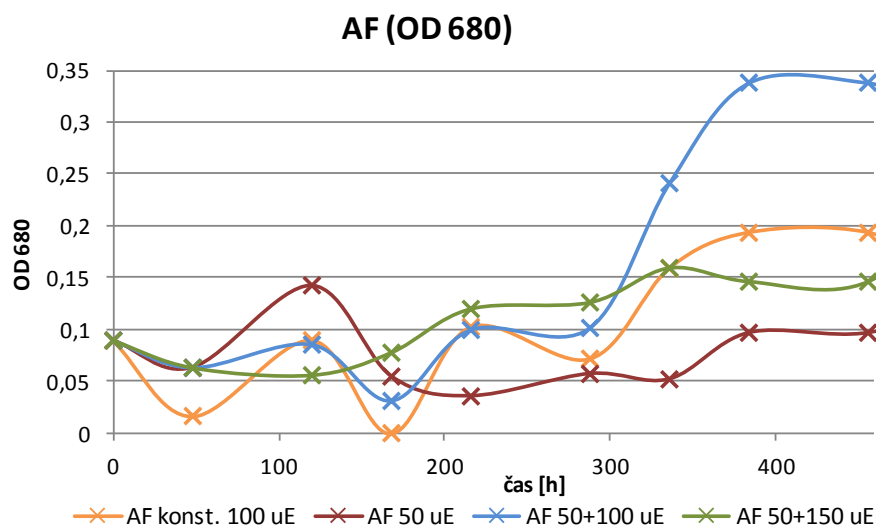
Graf 55: Růst švýcarského kmenu za různého osvětlení



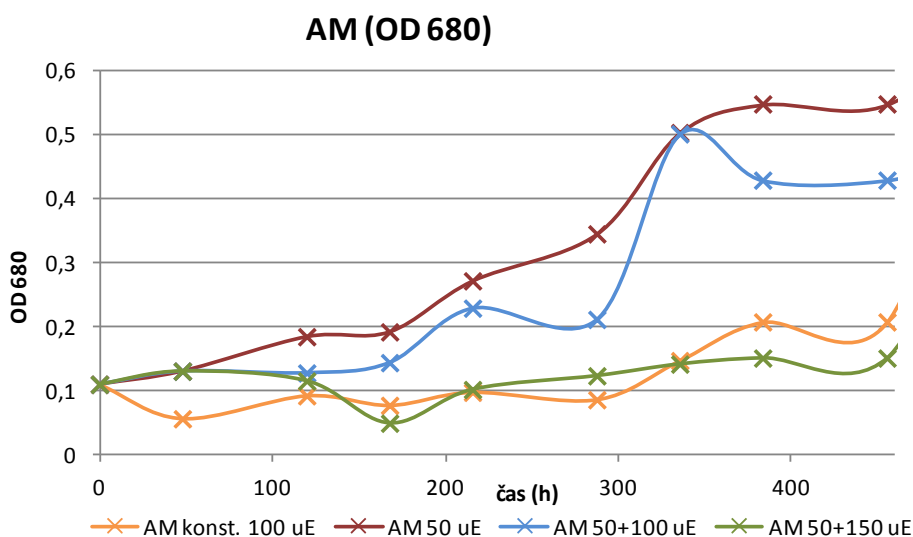
Graf 56: Růst německého kmenu za různého osvětlení

V grafech 57 a 58 jsou uvedeny výsledky optimalizace osvětlení afrického a amerického kmenu. Africký kmen vykazoval nejlepší nárůst při $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ s počátečním nižším osvětlením, u zbylých hodnot dochází spíše k oscilaci optických hustot, což mohlo být způsobeno velkým usazováním buněk na dně zkumavek.

Pro kultivaci amerického kmenu bude zřejmě lépe zvolit nižší osvětlení ($50 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), popřípadě $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ po adaptaci na menší intenzitu světla.



Graf 57: Růst afrického kmenu za různého osvětlení



Graf 58: Růst afrického kmenu za různého osvětlení

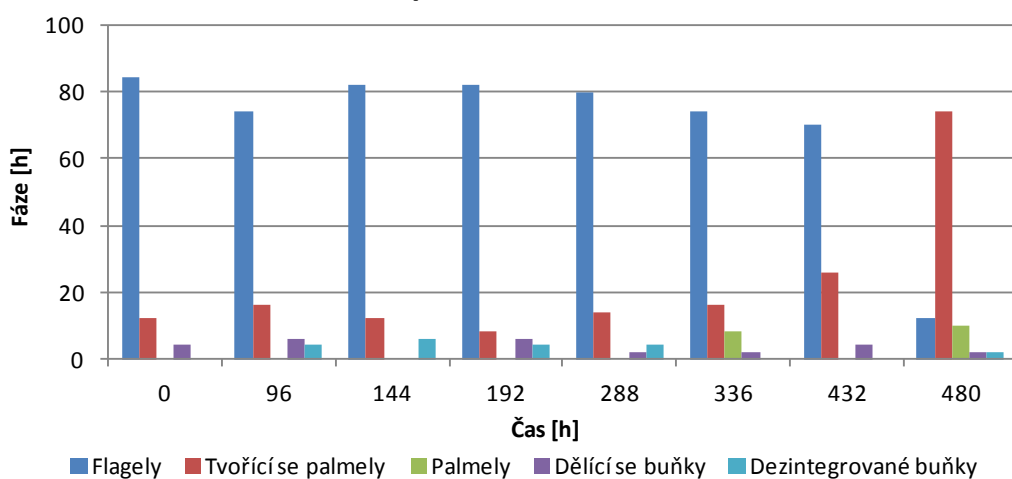
5.4.2 Tvorba růstových fází vlivem různé intenzity světla

Během kultivace německého a švýcarského kmenu dochází k postupnému zvyšování počtu palmeloidních buněk, zvláště u vyšších osvětlení. U $50 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ (graf 59 a 60) převažují flageloidní buňky, což souvisí s pomalejším nárůstem kultury. Obdobné výsledky byly uvedeny rovněž v literatuře, kde měly buňky HMP vysokou míru přežití v kultivaci s nízkou intenzitou světla [26].

U afrického kmenu během celé doby kultivace u všech osvětlení měly převahu palmeloidní buňky, naopak u amerického kmenu flageloidní buňky. Tato skutečnost může být způsobena rozdílnostmi kmenů s ohledem na genetickou výbavu a odlišné biologické vlastnosti [3].

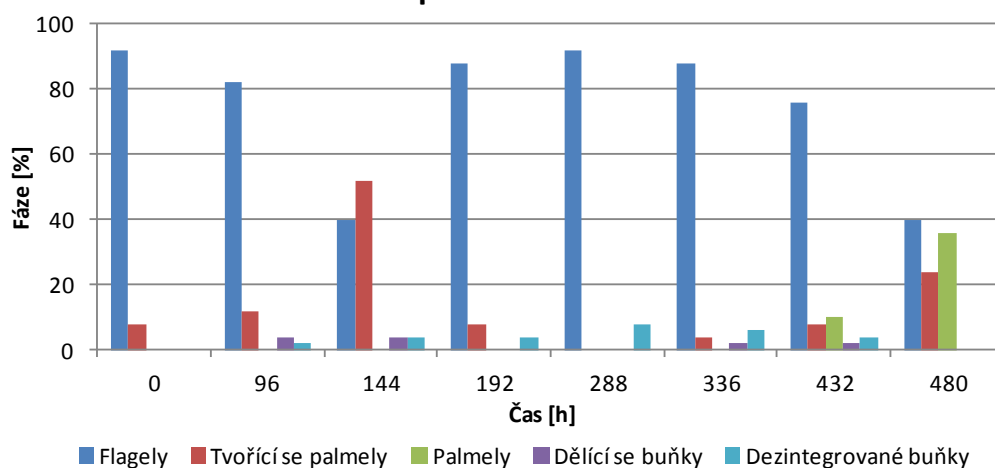
Grafy, které zobrazují obvyklý profil (kapitola 5.1.1.3 a 5.2.1.1) buněčných fází během kultivace, jsou uvedeny v příloze 7 (graf 102 – 113).

G - 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



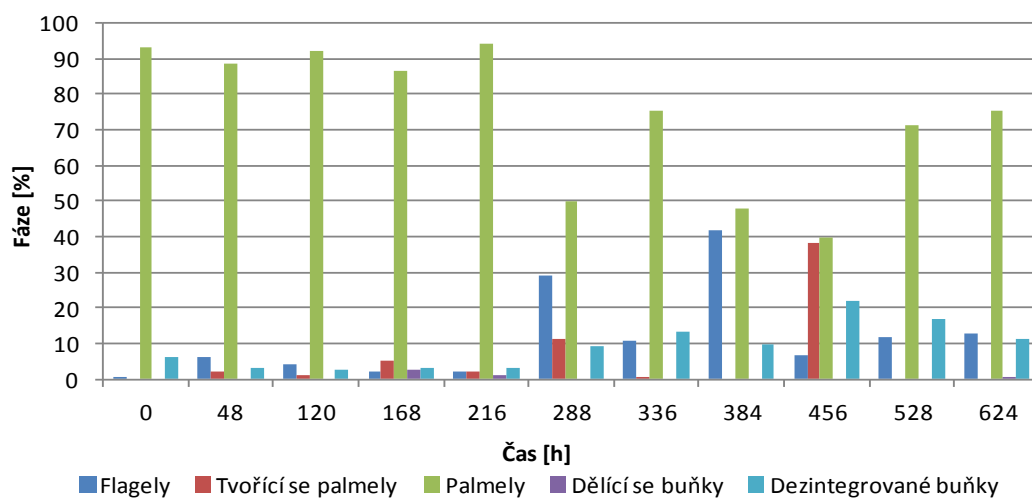
Graf 59: Buněčné fáze německého kmenu při osvětlení 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

S - 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

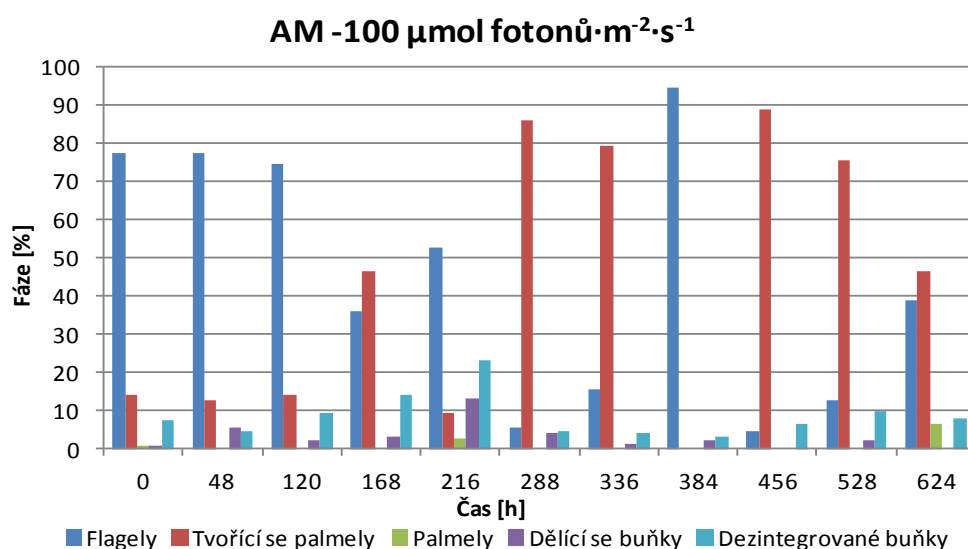


Graf 60: Buněčné fáze švýcarského kmenu při osvětlení 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

AF - 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



Graf 61: Buněčné fáze afrického kmenu při osvětlení 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

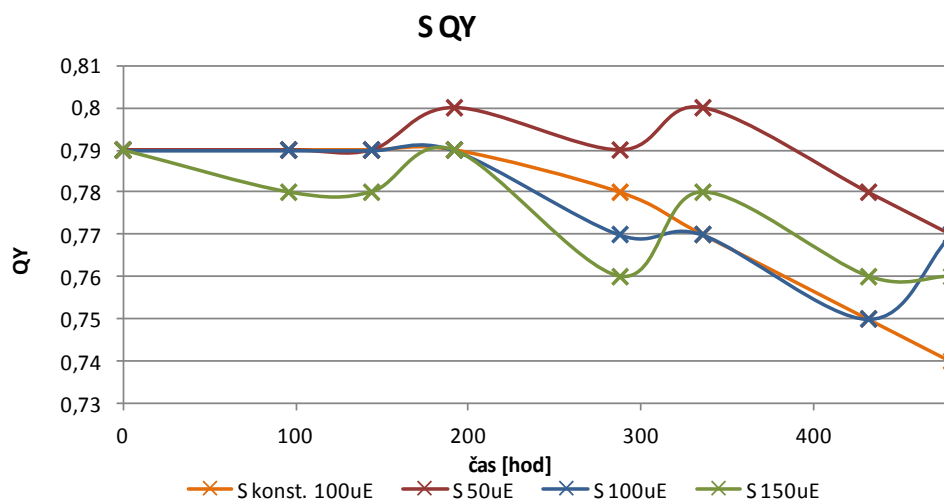


Graf 62: Buněčné fáze amerického kmenu při osvětlení $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

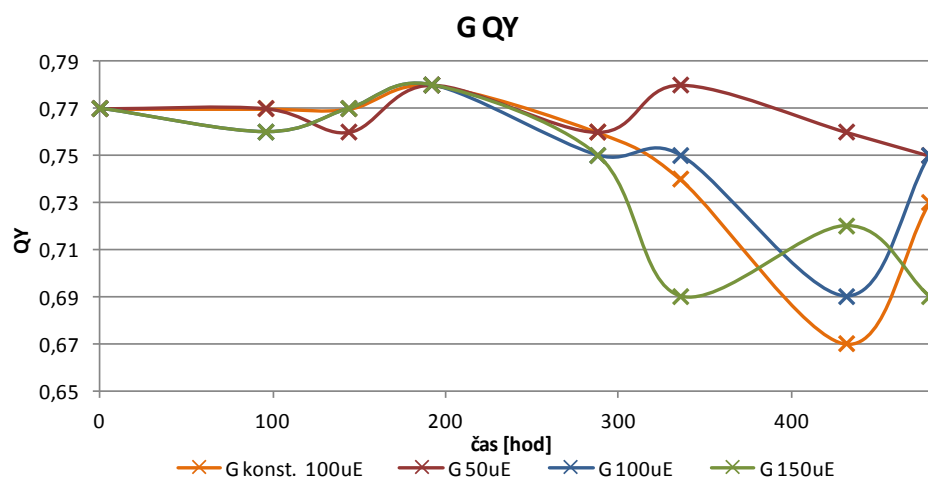
5.4.3 Vliv změny osvětlení na fyziologii kultury

V grafech 63 až 66 jsou zobrazeny kvantové výtěžky jednotlivých kmenů. U švýcarského a německého kmenu se hodnoty pohybují v rozmezí od 0,77 do 0,79 a v průběhu kultivace postupně klesají (nejmenší je tento pokles u nejnižšího osvětlení).

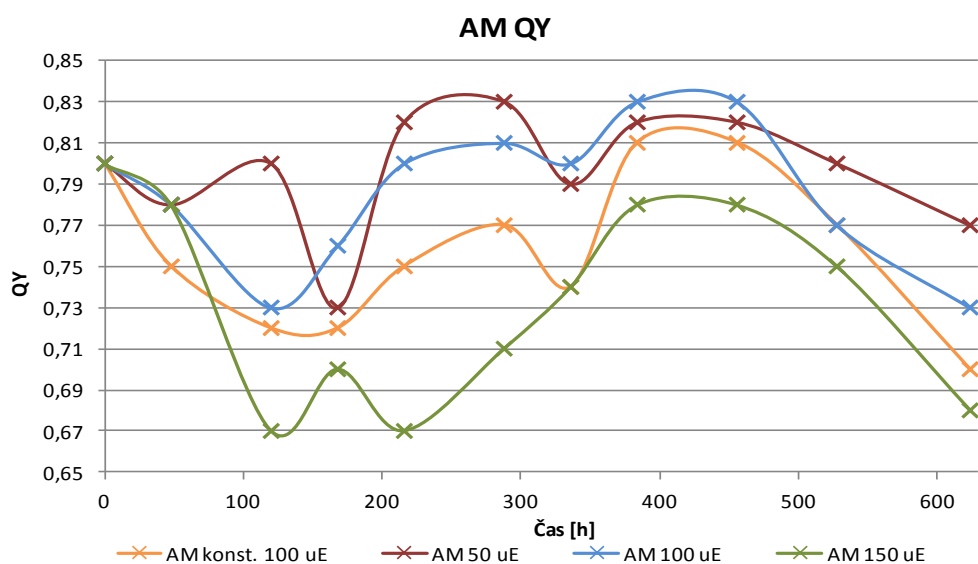
U amerického a afrického kmenu (graf 65, 66) dochází během kultivace k oscilacím kvantového výtěžku, což je zapříčiněno usazováním buněk na dno zkumavek. Tento jev byl způsoben externí sinicovou kontaminací kmenů v průběhu měření experimentální části. Po dekontaminaci bohužel kmény HMP nebyly zpět ve zcela suspenzním stavu.



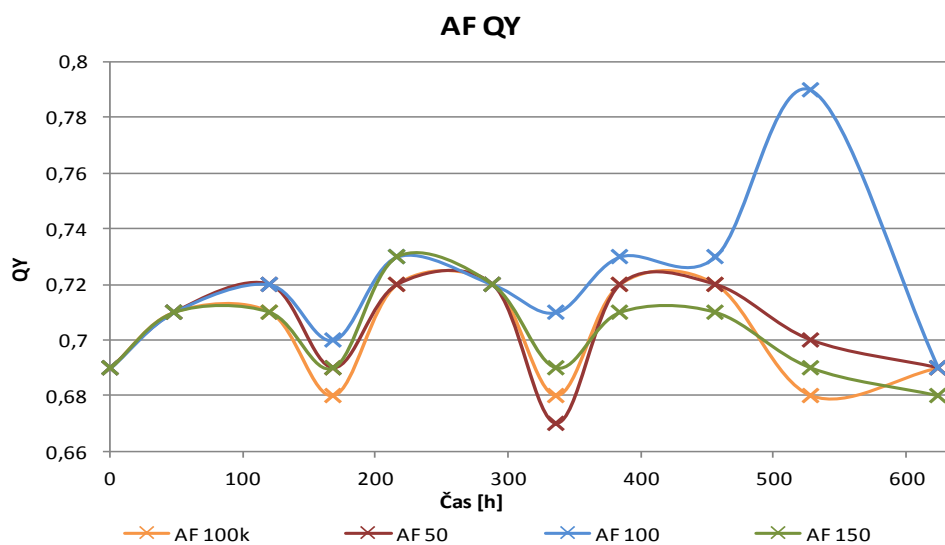
Graf 63: Kvantový výtěžek švýcarského kmenu za různého osvětlení



Graf 64: Kvantový výtěžek německého kmenu za různého osvětlení



Graf 65: Kvantový výtěžek amerického kmenu za různého osvětlení



Graf 66: Kvantový výtěžek afrického kmenu za různého osvětlení

V tabulce 11 jsou uvedeny doby zdvojení jednotlivých kmenů pro různá osvětlení. Nejmenší hodnoty (nejrychlejší růst) se vyskytují u švýcarského kmenu (33,4 h) a německého kmenu (29,7 h) s konstantní hodnotou $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

Vypočtené doby zdvojení pro africký a americký kmen se mohou od skutečných hodnot lišit právě z důvodu předešlé externí kontaminace a usazování buněk v průběhu kultivace na dno zkumavky.

Tabulka 11: Doba zdvojení pro různá osvětlení

Doba zdvojení [h]				
	Kon. $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$50 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$50+100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$	$50+150 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
S	33,4	44,2	36,3	35,2
G	29,7	37,2	34,4	40,5
AF	42,0	25,8	61,8	98,7
AM	56,0	32,8	82,4	45,7

5.5 Stresové podmínky pro biotechnologickou produkci astaxanthinu

Náhlá změna environmentálních podmínek vyvolává u mikrořas dva druhy odpovědi. Jsou to změny v jejich metabolismu, biochemické kompozici a změny morfologické struktury. V důsledku těchto změn dochází k produkci a akumulaci různých molekul, jako jsou mastné kyseliny, steroly a pigmenty. Studium této stresové fyziologie a adaptace hraje důležitou roli pro aplikace a další rozvoj biotechnologií pro masovou kultivaci řas a jejich produktů [2].

Kmen HMP - CCALA 357 byl kultivován ve fotobioreaktoru FMT 150 o objemu 400 ml za optimálních podmínek (kap. 5.1) v médiu BG11. Jakmile kultura dorostla do stacionární fáze (v rozmezí 200. – 250. hodiny kultivace), byl aplikován externí stresový faktor k indukci tvorby karotenoidů. Následná cystace byla vedena bez vzdušnění, za stálého míchání suspenze a teploty 25°C .

Použité stresové podmínky jsou zobrazeny v tabulce 12.

Tabulka 12: Stresové podmínky pro indukci biosyntézy astaxanthinu

Stres	Hodnota, výsledná koncentrace
Intenzivní osvětlení	$1\,000 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$
Nedostatek dusíku	32,96 mg/l
Chlorid sodný	0,5%
Octan sodný	2,2 mM
Kombinace octanu sodného a chloridu sodného	0,5% NaCl; 2,2 mM octan sodný

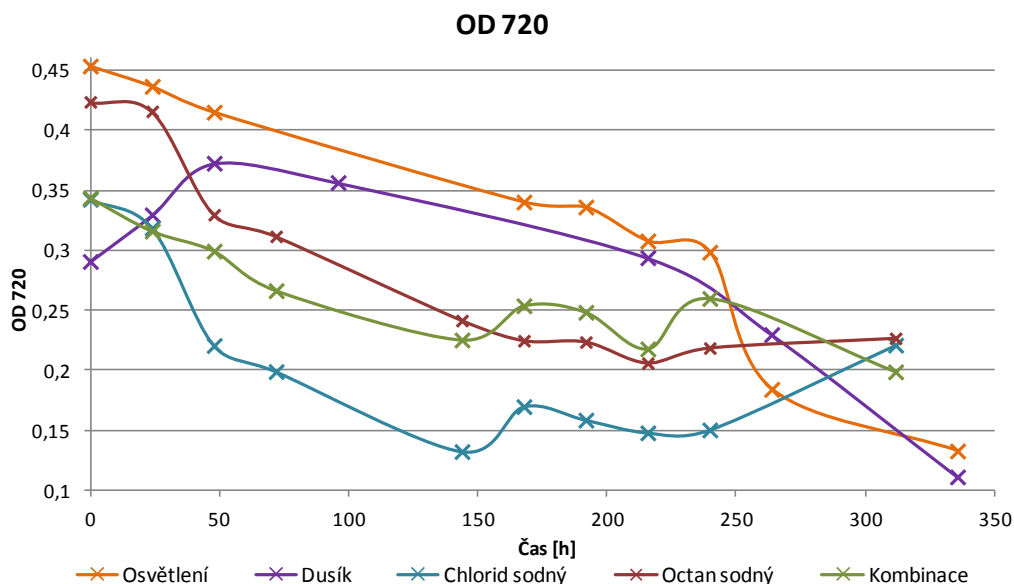
5.5.1 Změna optické hustoty a fyziologie buněk ve stresovém prostředí

V grafu 67 je uvedena závislost optické hustoty při 720 nm na čase v přítomnosti jednotlivých stresových faktorů. Z grafu je patrné, že v průběhu cystací se všemi stresovými faktory dochází k postupnému snižování biomasy.

Významný pokles optické hustoty byl zaznamenán u stresu s vysokou intenzitou světla, který poškozuje fotosystémy a buňky rychle odumírají, i když dochází k indukci biosyntézy karotenoidů jako fotoprotektantů (grafy 76, 77, 78 a příloha 8).

Přídavek chloridu sodného a kombinace octanu a chloridu sodného pravděpodobně u kmenu HMP – CCALA 375 způsobují zásadní odumírání buněk, což způsobuje jak pokles v hodnotách OD (graf 67), tak výskyt značného množství desintegrovaných buněk během cystace (graf 68, 69).

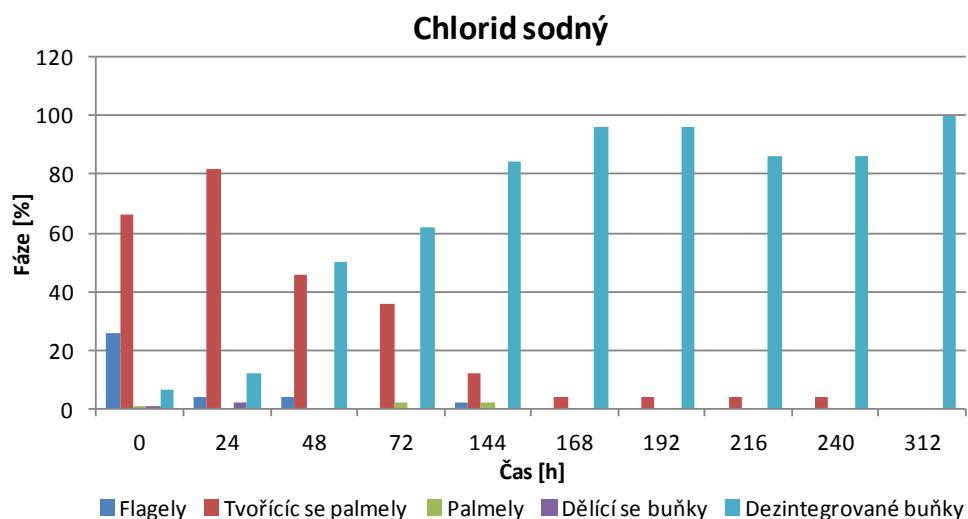
U sníženého množství dusíku byl až do cca 100. hodiny cystace dokonce zaznamenán nárůst optické hustoty (graf 67), jelikož koncentrace dusíku v médiu MCM byla stále dostatečná pro výživu buněk. Důsledkem jeho nedostatku pak byl pokles OD 720 během následujících hodin cystace.



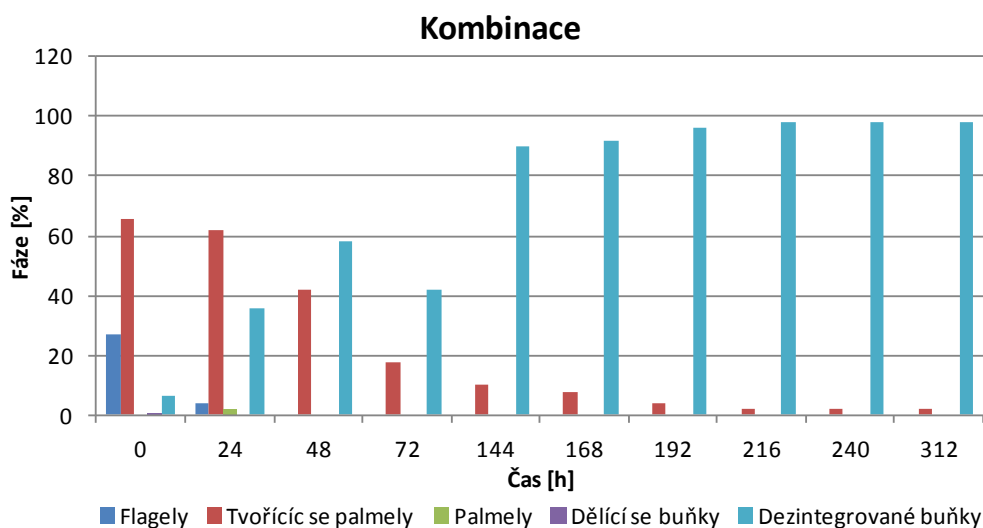
Graf 67: Změna optické hustoty pro různé stresové podmínky

5.5.2 Morfologický profil buněk během cystace

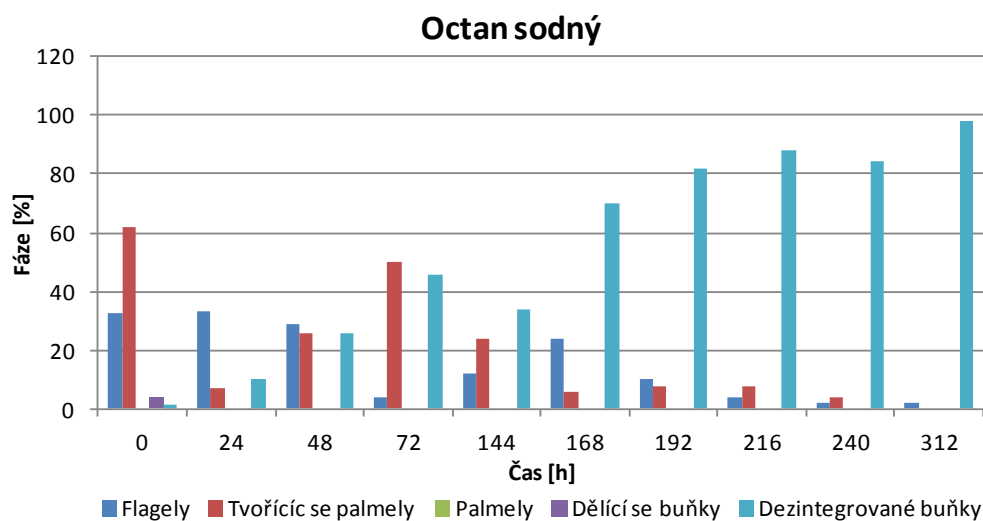
Paralelně s fotometrickým měřením zákalu (graf 67) byly pozorovány i morfologické změny buněk a jejich přechod do jednotlivých fází (grafy 68 - 72). U přídavku chloridu sodného, octanu sodného i kombinace chloridu a octanu více méně převládl počet dezintegrovaných buněk již po 48. hodině. Souvislost s vysokou mortalitou má nejspíš vysoká koncentrace sodných iontů v médiu. Naopak intenzivní osvětlení vyvolává ve větší míře tvorbu červených přechodných buněk flagela/palmela, i když k poškození buněk rovněž dochází, ale až mnohem později - kolem 168. hodiny. Odolnost vůči světlu je dána především nadprodukcí astaxanthinu (graf 76) a tudíž ochranou před fotooxidací a negativním účinkem volných radikálů. Zcela jiný profil růstových fází lze pozorovat při nutričním stresu, za sníženého množství dusíku, kde se především postupně zvyšuje množství červených plamel.



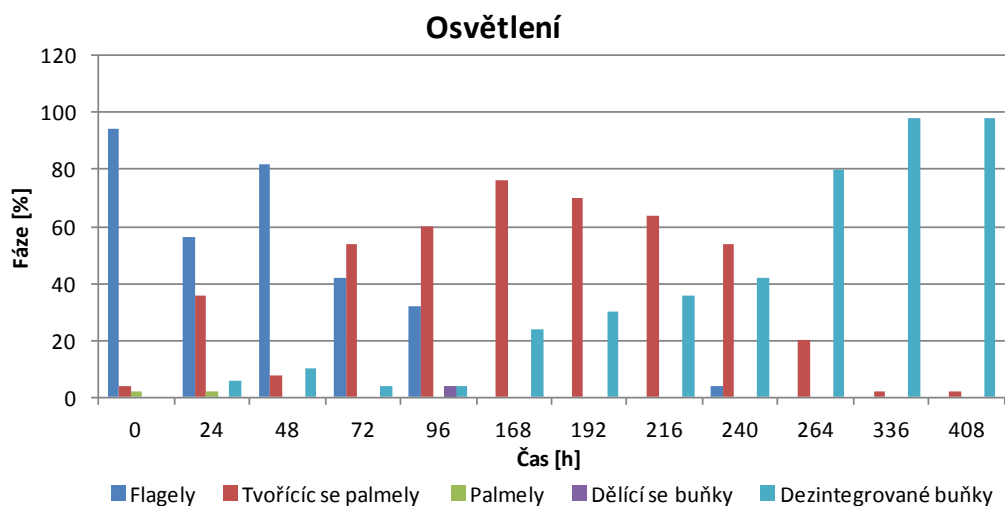
Graf 68: Buněčné fáze v prostředí chloridu sodného



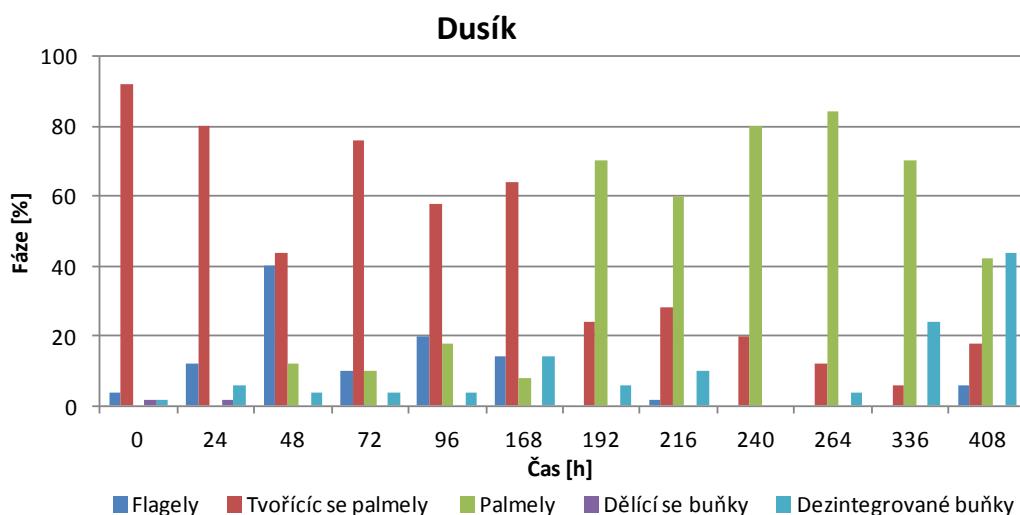
Graf 69: Buněčné fáze v prostředí chloridu sodného a octanu sodného



Graf 70: Buněčné fáze v prostředí octanu sodného



Graf 71: Buněčné fáze v průběhu kultivace za intenzivního osvětlení



Graf 72: Buněčné fáze v průběhu kultivace za sníženého množství dusíku

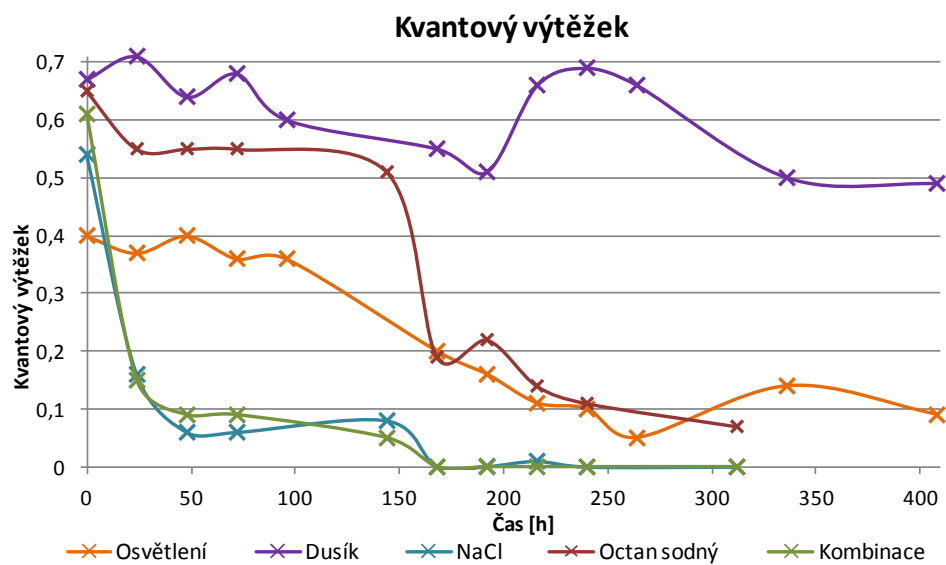
5.5.3 Vliv cystace na fluorescenční parametry

Vlivem stresových podmínek dochází ke snižování množství živých buněk a rovněž obsahu chlorofylu (grafy 74, 75). To se projevuje poklesem kvantového výtěžku (graf 73).

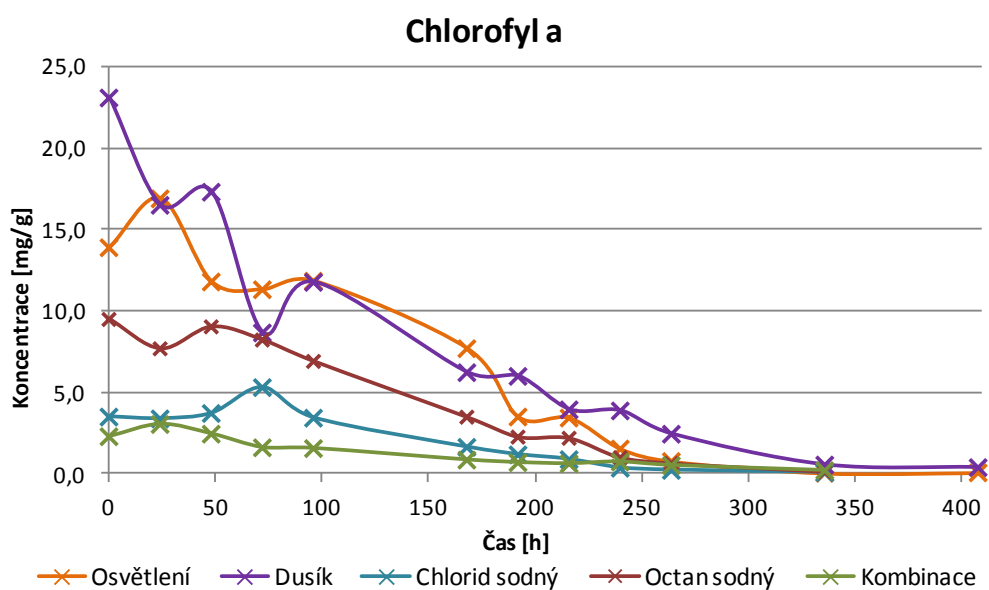
Buňky kmenu HMP – CICALA 375 v přítomnosti chloridu sodného a kombinace chloridu a octanu sodného nejsou prakticky schopny fotosyntézy z důvodu vysokého množství sodných iontů v médiu. V grafu 73 tak lze pozorovat rapidní pokles QY spjatý s velmi nízkou koncentrací chlorofylů v buňkách (graf 74, 75).

Vlivem silného světla dochází k poškození fotosystému, snížení fotosyntetické aktivity a tím k postupnému poklesu kvantového výtěžku (graf 73) i obsahu chlorofylů (graf 74, 75).

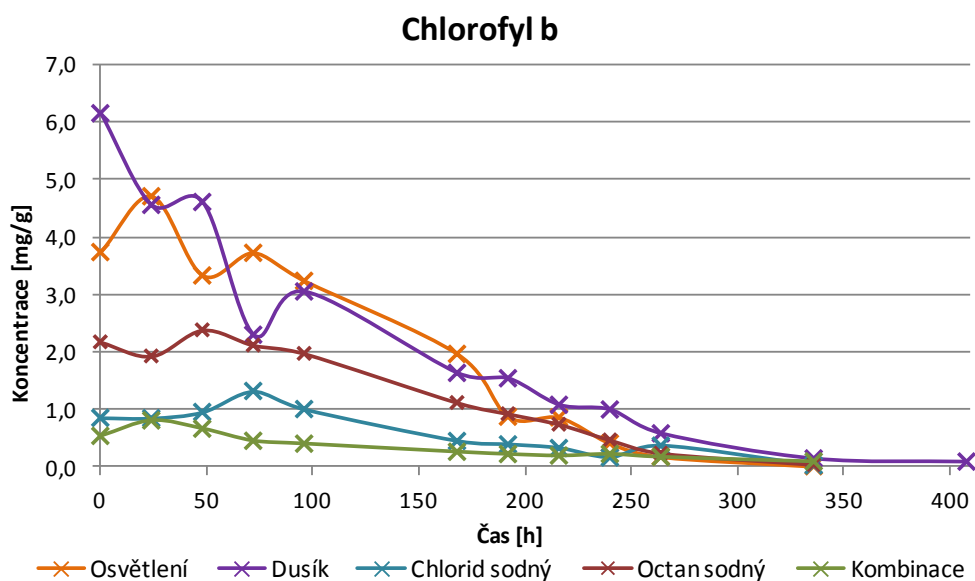
V případě dusíku a octanu sodného (nízké koncentrace NaAc lze využít jako zdroj organického uhlíku pro heterotrofní růst [2]) je po dlouhý čas kvantový výtěžek vysoký (u octanu pokles po 150. hodině) z důvodu dostatečného množství živin v médiu.



Graf 73: Kvantový výtěžek v přítomnosti stresových faktorů



Graf 74: Změna chlorofylu a po aplikaci stresových podmínek



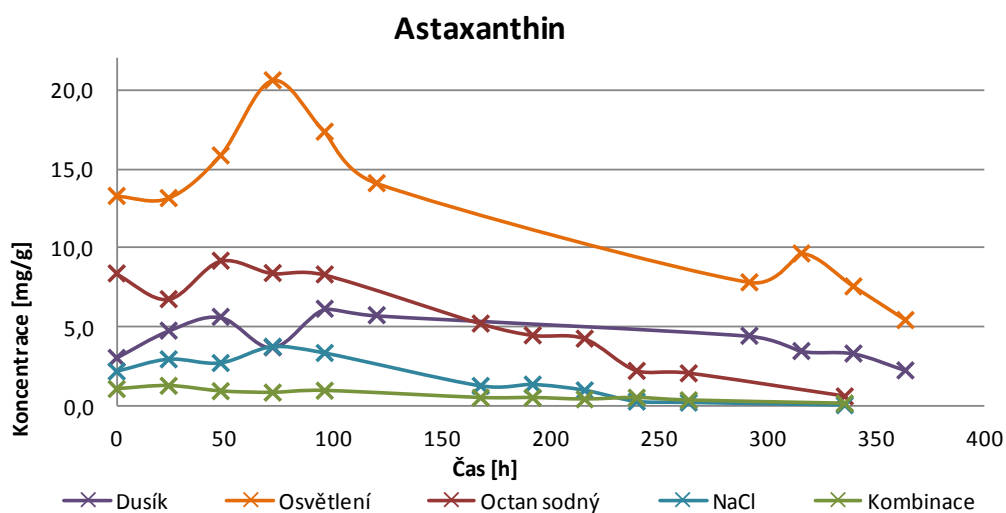
Graf 75: Změna chlorofylu b po aplikaci stresových podmínek

5.5.4 Analýza vybraných karotenoidů

V průběhu experimentu byly v odebraných vzorcích analyzovány obsahy karotenoidních pigmentů (kapitola 4.9). Ve stresovém prostředí dominuje tvorba astaxanthinu, který je u *H. pluvialis* nejvýznamnějším metabolitem pro biotechnologickou praxi.

Z grafu 76 je patrné, že největší produkce astaxanthinu bylo dosaženo za zvýšeného osvětlení ($1\,000\ \mu\text{mol fotonů}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). Druhý největší výtěžek byl zaznamenán u přidavku octanu sodného, dále u deficiencie dusíku, přidavku chloridu sodného a nejmenší množství bylo pozorováno u kombinace chloridu a octanu sodného.

Maxima jednotlivých křivek se nacházely v rozmezí od 50. do 75. hodiny od aplikace stresu. Tento fakt může být užitečný pro určení ukončení kultivace s maximálním výtěžkem astaxanthinu.



Graf 76: Produkce astaxanthinu vlivem stresových podmínek

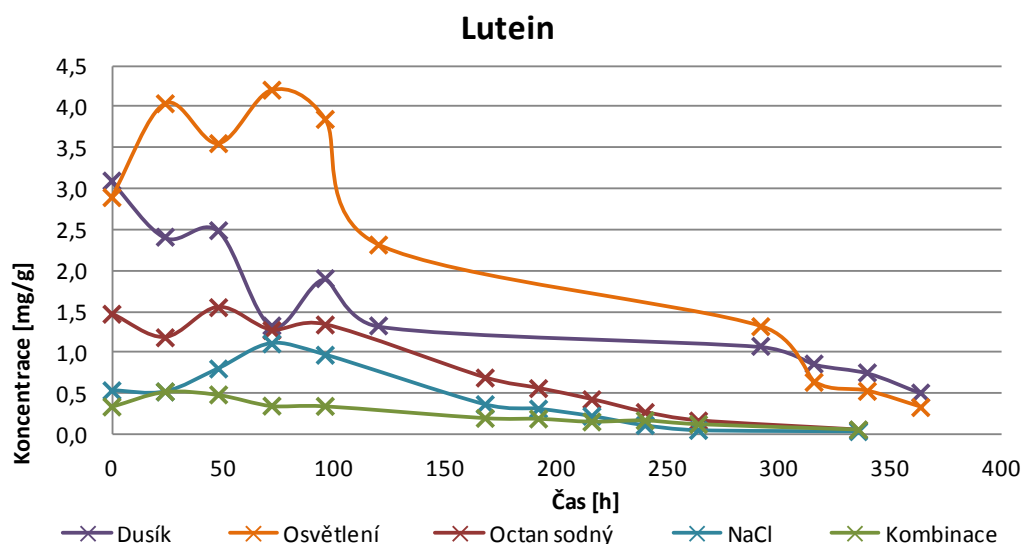
V tabulce 13 jsou porovnány výsledky maximální koncentrace astaxanthinu dosažené v průběhu experimentů s publikovanými hodnotami, které byly naměřeny v obdobných stresových podmínkách. Většina výsledků diplomové práce spadá do rozmezí množství

astaxanthinu uváděném v literatuře (tab.13). Srovnání výsledků se závěry jiných autorů je ale velmi obtížné, jelikož kultivaci a nadprodukcí metabolitů ovlivňuje řada faktorů včetně genové výbavy dostupných kmenů HMP. Z tabulky je však patrné, že přídavek chloridu sodného není pro používaný kmen HMP – CCALA 357 vhodný, protože produkované množství astaxanthinu nedosahuje ani spodní hranice publikovaných koncentrací. Kromě osvětlení, bylo dosaženo relativně vysokého výtěžku xanthofylu v kultivaci s přídavkem octanu sodného - v podstatě téměř nejvyšší koncentrace uvedené v literatuře. Další strategií v experimentech s cystacemi tedy jistě bude zkombinovat vhodné stresové faktory pro dosažení co největší akumulace astaxanthinu.

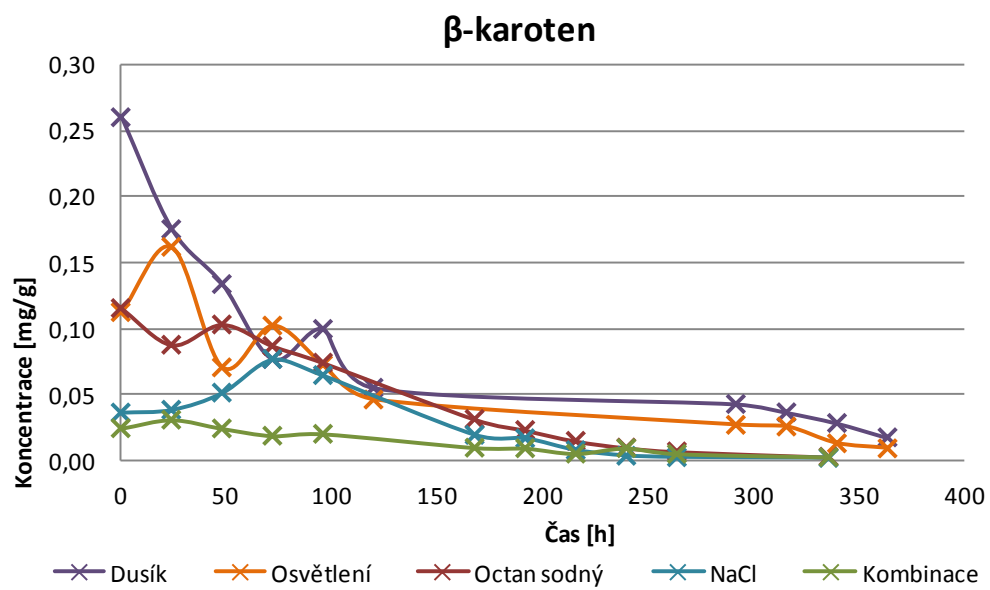
Tabulka 13: Naměřené množství astaxanthinu a údaje v literatuře

Stres	Naměřená koncentrace	Údaje z literatury
Osvětlení	20,6 mg/g	1,98 – 98 mg/g [102, 103, 89, 79]
Snížené množství dusíku	6,2 mg/g	0,12 – 77 mg/g [103, 26]
Chlorid sodný	3,8 mg/g	4,7 – 13,5 mg/g [104, 36]
Octan sodný	9,2 mg/g	3,48 – 9,78 mg/g [103, 105]
Kombinace chloridu a octanu sodného	1,29 mg/g	1,3 mg/g [103]

V grafech 77 a 78 jsou uvedena množství luteinu a β -karotenu v závislosti na době cystace. Stejně jako u astaxanthinu, je nejvyšší koncentrace luteinu zaznamenána u intenzivního osvětlení, kde rovněž dosahuje maxima kolem 75. hodiny. Zatímco u β -karotenu (graf 78) je pozorován spíše pokles od začátku aplikace všech typů stresu. Obdobný trend vykazují křivky produkce neoxanthinu a violaxanthinu (příloha 8, grafy 114, 115).



Graf 77: Produkce luteinu vlivem stresových podmínek



Graf 78: Změna množství β-karotenu vlivem různých stresových podmínek

6 ZÁVĚR

Cílem předložené diplomové práce byla optimalizace kultivace kmenů řasy *Haematococcus pluvialis* a sledování jejich metabolické aktivity. Pro tyto účely byly použity čtyři kmeny z různých světových lokalit, a to ze Švýcarska, Německa, Jižní Afriky a Severní Ameriky, u kterých byl analyzován růst ve vybraných kultivačních médiích, za zvýšené teploty a vlivem rozdílného osvětlení. Jako srovnávací byl vybrán kmen z lokality Březová nad Svitavou (HMP – CCALA 375), u něhož byla monitorována produkce karotenoidů (hlavně astaxanthinu) vlivem různých stresových podmínek. V průběhu experimentální části byly zjištěny následující výsledky:

- Rychlejší nárůst vykazoval srovnávací kmen (HMP – CCALA 375) na bílém světle v porovnání s červeným osvětlením, kde dosáhl vyšších hodnot optické hustoty a množství biomasy. Souvislost s uvedenými výsledky má spotřeba dusíku, která je vyšší rovněž na bílém světle. Bylo potvrzeno, že i během růstu jsou buňky HMP v malé míře schopny produkovat astaxanthin, jehož koncentrace na červeném světle dosáhla 0,6 mg/g, zatímco na bílém bylo toto množství více než 2,5x vyšší (1,6 mg/g). To potvrdilo fotoprotektivní úlohu pigmentu. V případě ostatních karotenoidů (lutein, β -karoten, violaxanthin a neoxanthin) nedocházelo k výrazným změnám, stejně jako u dalších studovaných pigmentů - chlorofylů.
- Optimálním médiem pro kultivaci vybraných kmenů HMP je BBM médium, ve kterém bylo dosaženo nejintenzivnějšího růstu. Vysoký výtěžek biomasy podtrhla nejvyšší spotřeba dusíku v tomto prostředí, dokonce bylo dosaženo až podlimitních koncentrací TN. Elementární analýzou pomocí ICP/MS bylo zjištěno, že za zvýšeného množství draslíku v médiu (BBM a BG11+) dochází k výraznému úbytku hořčíku, manganu, zinku a železa. Zvýšením koncentrace těchto prvků by teoreticky bylo možné dosáhnout vyšších výtěžků biomasy. Z hlediska jednotlivých kmenů bylo nejlepšího růstu dosaženo u švýcarského kmenu, naopak nejméně rostl kmen africký.
- Dalším zkoumaným parametrem byl vliv teploty. Bylo zvoleno 25 °C, hodnota uváděná v literatuře [24] jako optimální pro řadu kmenů *H. pluvialis*. Růst kultur byl porovnáván s kultivacemi při 22 °C. Tato teplota byla v předchozích experimentech stanovena jako optimální pro český kmen HMP – CCALA 375. 25 °C v kombinaci s BBM médiem se jevila jako vhodnější volba pro švýcarský, německý a africký kmen. Naopak u kmenu z Ameriky byl pozorován menší růst, než-li za teploty 22 °C.
- Analýzou vlivu změny osvětlení bylo u švýcarského kmenu zjištěno, že je výhodnější kulturu předem adaptovat na nižší osvětlení ($50 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$) a poté intenzitu světla zvýšit na $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Časově nejvýhodnější přechod do produkční fáze doprovázený poměrně vysokým výtěžkem biomasy byl pozorován u kultury adaptované na nízkou intenzitu světla a poté rostoucí při $150 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Navíc při vyšším osvětlení byl u švýcarského kmenu zaznamenán rychlý přechod do červené fáze, což nasvědčuje výrazné akumulaci astaxanthinu. Pro německý kmen bylo optimální osvětlení stanoveno na $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$, bez rozdílů s nebo bez adaptace na nižší světlo. Vzhledem k problémům s kontaminací, přečištěné kmeny HMP AM a AF očkované z pevného média nebyly v době experimentů v

dostatečně suspenzním stavu. Nicméně bylo nutné světelné experimenty realizovat, a proto je možné u výsledků pozorovat značná kolísání v měření optické hustoty. I přes komplikace lze uzavřít, že pro kultivaci amerického kmenu bude zřejmě lépe zvolit nižší osvětlení ($50 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$), popřípadě po adaptaci zvýšit osvětlení na $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Nejlepší nárůst biomasy kmenu AF byl pozorován po adaptaci a následném zvýšení světelné intenzity na $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$.

- Za účelem biotechnologické produkce astaxanthinu byl *Haematococcus* z Březové nad Svitavou vystaven stresovým podmínkám, kde největšího výtěžku bylo dosaženo vlivem zvýšeného osvětlení ($1\,000 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$). Maximální koncentrace astaxanthinu vzrostla na více než 20 mg/g, což jsou průměrné výsledky v porovnání s literaturou (tabulka 10). Přídavek octanu sodného vyvolal produkci astaxanthinu kolem 9 mg/g sušiny. Toto absolutní množství pigmentu indukované vlivem NaAc je naopak poměrně vysoké v porovnání s literárními zdroji [103, 105]. Nejmenší produkci astaxanthinu vykazoval přídavek chloridu sodného. Co se týká kombinace octanu a chloridu sodného bylo stanoveno množství astaxanthinu 1,29 mg/g sušiny, které odpovídá údajům v literatuře (tabulka 10), Naopak za sníženého množství dusíku byla naměřena podprůměrná koncentrace 6,2 mg/g. Použité médium MCM pro nutriční stres bylo zřejmě ještě dostatečně výživné, a proto podporovalo do jisté míry růst kultury a nikoliv produkci pigmentů.

Dle výše uvedených zjištění a charakteristik je patrné, že každý kmen řasy *Haematococcus pluvialis* vyžaduje pro svůj optimální růst rozdílné podmínky, pokud jde o výběr vhodného média, teploty nebo osvětlení. Sledování těchto růstových požadavků má obrovský význam v biotechnologiích, protože může sloužit pro rozšíření kultivace do dalších koutů světa a výběr produktivních kmenů, které jsou přizpůsobeny podmínkám daného území.

Možným vhodným produkčním kmenem pro biotechnologické aplikace se jeví švýcarský kmen. V průběhu experimentu dosahoval nejvyššího nárůstu biomasy. Optimální podmínky pro kultivaci jsou: BBM médium, 25 °C, adaptace kultury na $50 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$ a poté iluminovat na $100\text{--}150 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$. Nárůst s vysokým výtěžkem biomasy a rychlý přechod do stádia cyst je předpokladem pro maximální výtěžek astaxanthinu za krátkou dobu.

Druhým krokem je volba stresoru nebo kombinace stresových faktorů s ohledem na výtěžek astaxanthinu a celkovou cenu jeho produkce. Vysoká intenzita světla splňuje požadavek na množství tohoto karotenoidu, avšak může být využita spíše ve slunných a teplých oblastech s minimálními výkyvy počasí, neboť konstrukce světelných zdrojů pro velkovýrobu a jejich následný provoz jsou finančně velmi náročné.

Teoretickou možností, jak zvýšit akumulaci astaxanthinu, je vhodná kombinace vybraných stresových podmínek, jako třeba zvýšené osvětlení a nízká koncentrace dusíku nebo octanu sodného. Tyto experimenty budou námětem další práce.

7 SEZNAM POUŽITÝCH ZDROJŮ

- [1] GUALTIERI, Paolo a Laura BARSANTI. *Algae: anatomy, biochemistry, and biotechnology* [online]. Boca Raton: Taylor, 2006, 301 p. [cit. 2016-01-07]. ISBN 08-493-1467-4.
- [2] POSTEN, Clemens a Christian WALTER. *Microalgal biotechnology: integration and economy* [online]. Boston: Walter de Gruyter, 2012, 319 p. [cit. 2016-01-07]. ISBN 978-3-11-029832-1.
- [3] NOROOZI, Mostafa, Hishamuddin OMAR, Suhaimi NAPIS, Mohammad Amin HEJAZI a Soon Guan TAN. Comparative biodiversity and effect of different media on growth and astaxanthin content of nine geographical strains of *Haematococcus pluvialis*. *African Journal of Biotechnology* [online]. 2012, **11**(84), 15049-15059 [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.5897/AJB12.773. Dostupné z: http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/1272716315?rfr_id=info%3Axri%2Fsid%3Aprimo
- [4] KLOCHKOVA, Tatyana A., Min Seok KWAK, Jong Won HAN, Taizo MOTOMURA, Chikako NAGASATO a Gwang Hoon KIM. *Cold-tolerant strain of Haematococcus pluvialis (Haematococcaceae, Chlorophyta) from Blomstrandhalvøya (Svalbard)* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.185. ISBN 10.4490/algae.2013.28.2.185. Dostupné z: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=JORHBK>
- [5] CHEKANOV, Konstantin, Elena LOBAKOVA, Irina SELYAKH, Larisa SEMENOVA, Roman SIDOROV a Alexei SOLOVCHENKO. *Accumulation of Astaxanthin by a New Haematococcus pluvialis Strain BM1 from the White Sea Coastal Rocks (Russia)* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.3390/md12084504. ISBN 10.3390/md12084504. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/12/8/4504/>
- [6] TANUMIHARDJO, Sherry A. *Carotenoids and human health* [online]. New York: Humana Press, 2013, xxiii, 331 pages [cit. 2016-01-08]. Nutrition and health (Totowa, N.J.). ISBN 16-270-3202-9.
- [7] RODRIGUEZ-AMAYA, Delia. *Food carotenoids: chemistry, biology and technology*. Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Inc., 2016. IFT Press series. ISBN 9781118733301.
- [8] RICHMOND, Amos a Qiang HU. *Handbook of microalgal culture: applied phycology and biotechnology* [online]. 2nd ed. Chichester, West Sussex, U.K.: Wiley Blackwell, 2004, xvi, 719 p. [cit. 2016-01-08]. ISBN 978-0-470-67389-8.
- [9] HARKER, Mark, Alex J. TSAVALOS a Andrew J. YOUNG. *Autotrophic growth and carotenoid production of Haematococcus pluvialis in a 30 liter air-lift photobioreactor* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/0922-338X(96)85031-8. ISBN 10.1016/0922-338X(96)85031-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0922338X96850318>

- [10] ASADA, Kozi. Production and Scavenging of Reactive Oxygen Species in Chloroplasts and Their Functions. *Plant Physiology* [online]. 2006, **141**(2) [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/141/2/391.full.pdf+html>
- [11] KLOTZ, Lars-Oliver, Klaus-Dietrich KRÖNCKE a Helmut SIES. *Singlet oxygen-induced signaling effects in mammalian cells* [online]. [cit. 2016-03-29]. DOI: 10.1039/B210750C. ISBN 10.1039/B210750C. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B210750C>
- [12] MITTLER, Ron, Klaus-Dietrich KRÖNCKE a Helmut SIES. *Oxidative stress, antioxidants and stress tolerance* [online]. [cit. 2016-03-29]. DOI: 10.1016/S1360-1385(02)02312-9. ISBN 10.1016/S1360-1385(02)02312-9. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1360138502023129>
- [13] APOSTOL, Izydor, Peter F. HEINSTEIN a Philip S. LOW. Rapid Stimulation of an Oxidative Burst during Elicitation of Cultured Plant Cells. *Plant Physiology* [online]. 1989, 90(1), 109-116 [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.plantphysiol.org/content/90/1/109>
- [14] LÓPEZ, M.C. García-Malea, E. Del Río SÁNCHEZ, J.L. Casas LÓPEZ, F.G. Acien FERNÁNDEZ, J.M. Fernández SEVILLA, J. RIVAS, M.G. GUERRERO a E. Molina GRIMA. *Comparative analysis of the outdoor culture of Haematococcus pluvialis in tubular and bubble column photobioreactors* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2005.11.010. ISBN 10.1016/j.jbiotec.2005.11.010. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0168165605007467>
- [15] FAN, Lu, Avigad VONSHAK, Aliza ZARKA a Sammy BOUSSIBA. Does Astaxanthin Protect Haematococcus against Light Damage? *Zeitschrift für Naturforschung* [online]. 2014, 55(1-2), 93-100 [cit. 2016-03-29]. Dostupné z: <http://www.degruyter.com/view/j/znc.1998.53.issue-1-2/znc-1998-1-217/znc-1998-1-217.xml>
- [16] KALINA, Tomáš a Jiří VÁŇA. *Sinice, řasy, houby, mechorosty a jiné podobné organismy v současné biologii*. Vyd. 2. Praha: Karolinum, 2010, 606 s., 32 s. ISBN 80-246-1036-8.
- [17] KIM, Dong-Yeon, Durairaj VIJAYAN, Ramasamy PRAVEENKUMAR, Jong-In HAN, Kyubock LEE, Ji-Yeon PARK, Won-Seok CHANG, Jin-Suk LEE a You-Kwan OH. Cell-wall disruption and lipid/astaxanthin extraction from microalgae: Chlorella and Haematococcus. *Bioresource Technology* [online]. 2016, **199**, 300-310 [cit. 2016-01-07]. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.08.107. ISSN 09608524. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415012134>
- [18] DAMIANI, María Cecilia, Patricia I. LEONARDI, Olga I. PIERONI a Eduardo J. CÁCERES. *Ultrastructure of the cyst wall of Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae): wall development and behaviour during cyst germination* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI:

10.2216/05-27.1. ISBN 10.2216/05-27.1. Dostupné z:
<http://www.phycologia.org/doi/abs/10.2216/05-27.1>

- [19] JAIME, Laura, Irene RODRÍGUEZ-MEIZOSO, Alejandro CIFUENTES, Susana SANTOYO, Sonia SUAREZ, Elena IBÁÑEZ a Francisco Javier SEÑORANS. *Pressurized liquids as an alternative process to antioxidant carotenoids' extraction from Haematococcus pluvialis microalgae* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.lwt.2009.06.023. ISBN 10.1016/j.lwt.2009.06.023. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0023643809001959>
- [20] BOUSSIBA, S., Irene RODRÍGUEZ-MEIZOSO, Alejandro CIFUENTES, Susana SANTOYO, Sonia SUAREZ, Elena IBÁÑEZ a Francisco Javier SEÑORANS. *Carotenogenesis in the green alga Haematococcus pluvialis: Cellular physiology and stress response* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x. ISBN 10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1034/j.1399-3054.2000.108002111.x>
- [21] FIEDLER, Dirk, Uwe HAGER, Horst FRANKE, Ulrich SOLTSMANN a Horst BÖTTCHER. *Algae biocers: astaxanthin formation in sol-gel immobilised living microalgae* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1039/B613455F. ISBN 10.1039/B613455F. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=B613455F>
- [22] CHEN, Guanqun, Baobei WANG, Danxiang HAN, Milton SOMMERFELD, Yinghua LU, Feng CHEN a Qiang HU. *Molecular mechanisms of the coordination between astaxanthin and fatty acid biosynthesis in Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae)* [online]. [cit. 2016-03-29]. DOI: 10.1111/tpj.12713. ISBN 10.1111/tpj.12713. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/tpj.12713>
- [23] EVENS, Terence J., Randall P. NIEDZ a Gary J. KIRKPATRICK. *Temperature and irradiance impacts on the growth, pigmentation and photosystem II quantum yields of Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae)* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1007/s10811-007-9277-1. ISBN 10.1007/s10811-007-9277-1. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-007-9277-1>
- [24] BROCK, Thomas D. *Thermophilic Microorganisms and Life at High Temperatures* [online]. 1. New York: Springer series in microbiology, 1978 [cit. 2016-03-28]. ISBN 978-1-4612-6284-8.
- [25] BOUSSIBA, Sammy, Lu FAN a Avigad VONSHAK. [36] *Enhancement and determination of astaxanthin accumulation in green alga Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/0076-6879(92)13140-S. ISBN 10.1016/0076-6879(92)13140-S. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/007668799213140S>
- [26] HARKER, Mark, Alex J. TSAVALOS a Andrew J. YOUNG. *Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-03-

- 28]. DOI: 10.1016/0960-8524(95)00002-X. ISBN 10.1016/0960-8524(95)00002-X. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/096085249500002X>
- [27] GOKSAN, Tolga, Ilknur AK a Cenker KILIC. *Factors responsible for astaxanthin formation in the Chlorophyte Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.4194/1303-2712-v11_3_06. ISBN 10.4194/1303-2712-v11_3_06. Dostupné z: http://www.trjfas.org/pdf/issue_11_03/0306.pdf
- [28] JEON, You-Chul, Chul-Woong CHO a Yeoung-Sang YUN. *Combined effects of light intensity and acetate concentration on the growth of unicellular microalga Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.12.021. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2005.12.021. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022906001098>
- [29] KOBAYASHI, Makio, Yoshiro KURIMURA a Yasunobu TSUJI. Light-independent, astaxanthin production by the green microalga *Haematococcus pluvialis* under salt stress. *Biotechnology Letters* [online]. 1997, **19**(6), 507 -509 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://link.springer.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/article/10.1023/A%3A1018372900649>
- [30] WANG, Bing, Aliza ZARKA, Achim TREBST a Sammy BOUSSIBA. ASTAXANTHIN ACCUMULATION IN HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS (CHLOROPHYCEAE) AS AN ACTIVE PHOTOPROTECTIVE PROCESS UNDER HIGH IRRADIANCE1. *Journal of Phycology* [online]. 2003, **39**(6), 1116-1124 [cit. 2016-01-07]. DOI: 10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x. ISSN 0022-3646. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.0022-3646.2003.03-043.x>
- [31] HARKER, Mark, Alex J. TSAVALOS a Andrew J. YOUNG. Use of response surface methodology to optimise carotenogenesis in the microalga, *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology* [online]. 1995, **7**(4), 399-406 [cit. 2016-01-08]. DOI: 10.1007/BF00003797. ISSN 0921-8971. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00003797>
- [32] KIM, Z-Hun, Sun-Hyung KIM, Ho-Sang LEE a Choul-Gyun LEE. *Enhanced production of astaxanthin by flashing light using Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2005.11.041. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2005.11.041. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022906001189>
- [33] ABU-GHOSH, Said, Dror FIXLER, Zvy DUBINSKY a David ILUZ. *Flashing light in microalgae biotechnology* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.12.057. ISBN 10.1016/j.biortech.2015.12.057. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415016879>
- [34] RAMAN, Vidhyavathi a Sarada RAVI. *Effect of salicylic acid and methyl jasmonate on antioxidant systems of Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1007/s11738-010-0623-6. ISBN 10.1007/s11738-010-0623-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s11738-010-0623-6>

- [35] CORDERO, Beatriz, Ana OTERO, Manuel PATIO, Bertha O. ARREDONDO a Jaime FABREGAS. *Astaxanthin production from the green alga Haematococcus pluvialis with different stress conditions* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1007/BF00128682. ISBN 10.1007/BF00128682. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00128682>
- [36] GAO, Zhengquan, Chunxiao MENG, Yi Chung CHEN, Faruq AHMED, Arnold MANGOTT, Peer M SCHENK a Yan LI. *Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three Haematococcus pluvialis strains upon salinity stress* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1007/s10811-014-0491-3. ISBN 10.1007/s10811-014-0491-3. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s10811-014-0491-3>
- [37] GAO, Zhengquan, Chunxiao MENG, Yi Chung CHEN, Faruq AHMED, Arnold MANGOTT, Peer M SCHENK a Yan LI. *Comparison of astaxanthin accumulation and biosynthesis gene expression of three Haematococcus pluvialis strains upon salinity stress* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1007/s10811-014-0491-3. ISBN 10.1007/s10811-014-0491-3.
- [38] GONZÁLEZ, Mariela A., Ana Silvia CIFUENTES a Patricia I. GÓMEZ. GROWTH AND TOTAL CAROTENOID CONTENT IN FOUR CHILEAN STRAINS OF HAEMATOCOCCUS PLUVIALIS FLOTOW, UNDER LABORATORY CONDITIONS. *Gayana. Botanica* [online]. 2009, **66**(1), 58-70 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/222050512/fulltextPDF/6F5059B51A554C53PQ/1?accountid=17115>
- [39] PÉREZ-LÓPEZ, Paula, Sara GONZÁLEZ-GARCÍA, Clayton JEFFRYES, et al. *Life cycle assessment of the production of the red antioxidant carotenoid astaxanthin by microalgae: from lab to pilot scale* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.jclepro.2013.07.011. ISBN 10.1016/j.jclepro.2013.07.011. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0959652613004721>
- [40] RICHARDSON, James W., Myriah D. JOHNSON a Joe L. OUTLAW. *Economic comparison of open pond raceways to photo bio-reactors for profitable production of algae for transportation fuels in the Southwest* [online]. [cit. 2016-03-29]. DOI: 10.1016/j.algal.2012.04.001. ISBN 10.1016/j.algal.2012.04.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211926412000100>
- [41] RESURRECCION, Eleazer P., Lisa M. COLOSI, Mark A. WHITE a Andres F. CLARENS. *Comparison of algae cultivation methods for bioenergy production using a combined life cycle assessment and life cycle costing approach* [online]. [cit. 2016-03-27]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.09.038. ISBN 10.1016/j.biortech.2012.09.038. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412013831>

- [42] YADALA, Soumya a Selen CREMASCHI. *Design and optimization of artificial cultivation units for algae production* [online]. [cit. 2016-03-27]. DOI: 10.1016/j.energy.2014.06.001. ISBN 10.1016/j.energy.2014.06.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0360544214006963>
- [43] SINGH, R.N. a Shaishav SHARMA. *Development of suitable photobioreactor for algae production – A review* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1016/j.rser.2012.01.026. ISBN 10.1016/j.rser.2012.01.026. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1364032112000275>
- [44] Photobioreactor. *Wikipedia* [online]. [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <https://en.wikipedia.org/wiki/Photobioreactor>
- [45] Photo-Bioreactor for Micro Algae Production. *GENESIS TECHNOLOGIES* [online]. [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: http://neogenesisindia.com/pht_rctr.html
- [46] Algae. *OIL SEEDS CROPS* [online]. 2016 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://www.oilseedcrops.org/algae>
- [47] PAEK, Kee-Yoeup, Jian-Jiang ZHONG a Hosakatte Niranjana. *Production of biomass and bioactive compounds using bioreactor technology*. New York: Springer Netherlands, 2014. ISBN 9789401792226.
- [48] GOMEZ, P. I., I. INOSTROZA, M. PIZARRO a J. PEREZ. *From genetic improvement to commercial-scale mass culture of a Chilean strain of the green microalga Haematococcus pluvialis with enhanced productivity of the red ketocarotenoid astaxanthin* [online]. [cit. 2016-03-28]. DOI: 10.1093/aobpla/plt026. ISBN 10.1093/aobpla/plt026. Dostupné z: <http://aobplants.oxfordjournals.org/cgi/doi/10.1093/aobpla/plt026>
- [49] BioAstin Production and Purity. *Cyanotech* [online]. Hawai: Cyanotech Corporation, 2015 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://www.cyanotech.com/bioastin/quality.html>
- [50] TECHNOLOGY. *Algatech* [online]. Israel: Algatechnologies Ltd., 2015 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://www.algatech.com/technology.asp>
- [51] The Aquamen. *Kent Nishimura* [online]. Hawai: Kent Nishimura and Hana Hou!, 2016 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://www.kentnishimura.com/the-aquamen>
- [52] Algatechnologies: Successful Completion of Stability Studies of Natural Astaxanthin. *AlgaeObserver* [online]. AlgaeObserver, 2014 [cit. 2016-03-28]. Dostupné z: <http://www.algaeobserver.com/algatechnologies-stability-studies-algae-astaxathin>
- [53] NOVÁKOVÁ, Lucie a Michal DOUŠA. *Moderní HPLC separace v teorii a praxi*. 1. vyd. Praha [i.e. Hradec Králové]: Lucie Nováková, 2013. ISBN 978-80-260-4243-3.

- [54] Vysokoúčinná kapalinová chromatografie. *Http://www.muj-web.cz* [online]. 2015 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: http://www.muj-web.cz/vyuka/HPLC_soubory/1-HPLC%20uvod.pdf
- [55] MIHALJEVIČ, MARTIN, LADISLAV STRNAD a ONDŘEJ ŠEBEK. VYUŽITÍ HMOTNOSTNÍ SPEKTROMETRIE S INDUKČNĚ VÁZANÝM PLAZMATEM V GEOCHEMII. *Chemické listy* [online]. 2004, **98**, 123 – 130 [cit. 2016-04-03]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/2004_03_02.pdf
- [56] THOMAS, Robert. *Practical Guide to ICP-MS*. 1. Seattle: CRC Press, 2013. ISBN 978-1-4665-5544-0.
- [57] Multi-Cultivator MC 1000. *Photon Systems Instruments* [online]. Drásov, 2016 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.psi.cz/products/photobioreactors/multi-cultivator-mc-1000>
- [58] Photobioreactor FMT 150. *Photon Systems Instruments* [online]. Drásov, 2016 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.psi.cz/products/photobioreactors/photobioreactor-fmt-150>
- [59] AquaPen-C AP-C 100. *Photon Systems Instruments* [online]. Drásov, 2016 [cit. 2016-04-05]. Dostupné z: <http://www.psi.cz/products/pocket-sized-instruments/aquapen-c-ap-c-100>
- [60] KUCZYNSKA, Paulina, Malgorzata JEMIOŁA-RZEMINSKA a Kazimierz STRZALKA. *Photosynthetic Pigments in Diatoms* [online]. [cit. 2016-04-9]. DOI: 10.3390/md13095847. ISBN 10.3390/md13095847. Dostupné z: <http://www.mdpi.com/1660-3397/13/9/5847/>
- [61] MANTOURA, R.F.C. a C.A. LLEWELLYN. *The rapid determination of algal chlorophyll and carotenoid pigments and their breakdown products in natural waters by reverse-phase high-performance liquid chromatography* [online]. [cit. 2016-04-9]. DOI: 10.1016/S0003-2670(00)80092-6. ISBN 10.1016/S0003-2670(00)80092-6. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0003267000800926>
- [62] ROY, Suzanne. *Phytoplankton pigments: characterization, chemotaxonomy, and applications in oceanography*. New York: Cambridge University Press, 2011. ISBN 9781107000667.
- [63] BROTAS, Vanda a Marie-Reine PLANTE-CUNY. *The use of HPLC pigment analysis to study microphytobenthos communities* [online]. [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1016/S1146-609X(03)00013-4. ISBN 10.1016/S1146-609X(03)00013-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1146609X03000134>
- [64] SAUNDERS, Richard J., Nicholas A. PAUL, Yi HU, Rocky DE NYS a Joshua L. HEAZLEWOOD. *Sustainable Sources of Biomass for Bioremediation of Heavy Metals in Waste Water Derived from Coal-Fired Power Generation* [online]. [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1371/journal.pone.0036470. ISBN 10.1371/journal.pone.0036470. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0036470>

- [65] KROPAT, Janette, Anne HONG-HERMESDORF, David CASERO, Petr ENT, Madeli CASTRUITA, Matteo PELLEGRINI, Sabeeha S. MERCHANT a Davin MALASARN. *A revised mineral nutrient supplement increases biomass and growth rate in Chlamydomonas reinhardtii* [online]. [cit. 2016-04-10]. DOI: 10.1111/j.1365-313X.2011.04537.x. ISBN 10.1111/j.1365-313X.2011.04537.x. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1111/j.1365-313X.2011.04537.x>
- [66] PRASAD, M. *Heavy metal stress in plants: from biomolecules to ecosystems*. 2nd ed. New York: Springer, c2004. ISBN 3540401318
- [67] MADER, PAVEL a EVA ČURDOVÁ. METODY ROZKLADU BIOLOGICKÝCH MATERIÁLŮ PRO STANOVENÍ STOPOVÝCH PRVKŮ. *Chemické Listy* [online]. 1997, **91**, 227-236 [cit. 2016-03-11]. Dostupné z: http://www.chemicke-listy.cz/docs/full/1997_04_227-236.pdf
- [68] TOC-V Series. *SHIMADZU* [online]. Japan [cit. 2016-04-10]. Dostupné z: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/toc/toc-v-series.pdf>
- [69] Total Nitrogen Analysis: A New Perspective on TOC. *SHIMADZU* [online]. Japan [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/toc/totalnit.pdf>
- [70] JOSEPH R. LAKOWICZ. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. New York: Springer, 2006. ISBN 9780387463124.
- [71] DAVID M. JAMESON. *Introduction to fluorescence*. London: Taylor & Francis, 2012. ISBN 9781439806050.
- [72] BASIC PHOTOPHYSICS. *Photobiology* [online]. 2014 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://photobiology.info/Visser-Rolinski.html>
- [73] BLANKENSHIP, Robert E. *Molecular mechanisms of photosynthesis*. 2nd ed. Chichester: Wiley Blackwell, 2014. ISBN 9781405189767.
- [74] SUGGETT, David J, Ondřej PRÁŠIL a Michael A BOROWITZKA. *Chlorophyll a fluorescence in aquatic sciences: methods and applications*. New York: Springer, c2011. ISBN 9048192684.
- [75] Calculate the doubling time of your cells. *Doubling Time* [online]. 2006 [cit. 2016-04-11]. Dostupné z: <http://www.doubling-time.com/compute.php>
- [76] PITTER, Pavel. Chemie křemíku ve vodách. *Chemické listy*. 2002, **96**, s. 188-193.
- [77] GARCÍA-PLAZAOLA, José I. a M. BECERRIL. A rapid high-performance liquid chromatography method to measure lipophilic antioxidants in stressed plants: simultaneous determination of carotenoids and tocopherols. *Phytochemical Analysis* [online].

1999, **10**(6), 307–313 [cit. 2016-04-11]. DOI: 10.1002/(SICI)1099-1565(199911/12)10:6<307::AID-PCA477>3.0.CO;2-L. Dostupné z: [http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1099-1565\(199911/12\)10:6%3C307::AID-PCA477%3E3.0.CO;2-L/abstract](http://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1099-1565(199911/12)10:6%3C307::AID-PCA477%3E3.0.CO;2-L/abstract)

- [78] BOROWITZKA, Michael A., John M. HUISMAN a Ann OSBORN. *Culture of the astaxanthin-producing green alga Haematococcus pluvialis 1. Effects of nutrients on growth and cell type* [online]. [cit. 2016-04-11]. DOI: 10.1007/BF00026091. ISBN 10.1007/BF00026091. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/BF00026091>
- [79] DOMÍNGUEZ-BOCANEGRA, A.R, I GUERRERO LEGARRETA, F MARTINEZ JERONIMO a A TOMASINI CAMPOCOSIO. *Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-04-12]. DOI: 10.1016/j.biortech.2003.04.001. ISBN 10.1016/j.biortech.2003.04.001. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852403002335>
- [80] ZAPATA, M, F RODRÍGUEZ a JL GARRIDO. *Separation of chlorophylls and carotenoids from marine phytoplankton: a new HPLC method using a reversed phase C8 column and pyridine-containing mobile phases* [online]. [cit. 2016-04-15]. DOI: 10.3354/meps195029. ISBN 10.3354/meps195029. Dostupné z: <http://www.int-res.com/abstracts/meps/v195/p29-45/>
- [81] SUN, Han, Qing KONG, Zhaoyan GENG, Liangfei DUAN, Min YANG a Bin GUAN. *Enhancement of cell biomass and cell activity of astaxanthin-rich Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1016/j.biortech.2015.02.101. ISBN 10.1016/j.biortech.2015.02.101. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852415002874>
- [82] SUN, Han, Bin GUAN, Qing KONG, Zhaoyan GENG a Ni WANG. *Repeated cultivation: non-cell disruption extraction of astaxanthin for Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1038/srep20578. ISBN 10.1038/srep20578.
- [83] KANG, Chang Duk, Se Jong HAN, Seung Phill CHOI a Sang Jun SIM. *Fed-batch culture of astaxanthin-rich Haematococcus pluvialis by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation* [online]. [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1007/s00449-009-0362-5. ISBN 10.1007/s00449-009-0362-5. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00449-009-0362-5>
- [84] PARK, Joon Chul, Seung Phill CHOI, Min-Eui HONG a Sang Jun SIM. *Enhanced astaxanthin production from microalga, Haematococcus pluvialis by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation* [online]. [cit. 2016-04-17]. DOI: 10.1007/s00449-014-1180-y. ISBN 10.1007/s00449-014-1180-y. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00449-014-1180-y>
- [85] ROBERTS, David A., Rocky DE NYS, Nicholas A. PAUL a Brett NEILAN. *The Effect of CO2 on Algal Growth in Industrial Waste Water for Bioenergy and Bioremediation*

Applications [online]. [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1371/journal.pone.0081631. ISBN 10.1371/journal.pone.0081631. Dostupné z: <http://dx.plos.org/10.1371/journal.pone.0081631>

- [86] HO, Koon-Sing, Wing-Tat CHAN, Nicholas A. PAUL a Brett NEILAN. *Time-resolved ICP-MS measurement for single-cell analysis and on-line cytometry* [online]. [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1039/C002272A. ISBN 10.1039/c002272a. Dostupné z: <http://xlink.rsc.org/?DOI=c002272a>
- [87] Total Nitrogen Analysis: A New Perspective on TOC. *Shimadzu* [online]. [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://www.ssi.shimadzu.com/products/literature/toc/totalnit.pdf>
- [88] SAHA, Sushanta Kumar, Edward MCHUGH, Jeremiah HAYES, Siobhan MOANE, Daniel WALSH a Patrick MURRAY. *Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1016/j.biortech.2012.10.049. ISBN 10.1016/j.biortech.2012.10.049. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960852412015519>
- [89] KATSUDA, Tomohisa, Abdolmajid LABABPOUR, Kazumichi SHIMAHARA, Shigeo KATOH, Daniel WALSH a Patrick MURRAY. *Astaxanthin production by Haematococcus pluvialis under illumination with LEDs* [online]. [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1016/j.enzmictec.2004.03.016. ISBN 10.1016/j.enzmictec.2004.03.016. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141022904000912>
- [90] Special Haematococcus pluvialis Live Cultures. *Soley Institute* [online]. Turecko, 2016 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://www.soleybio.com/culture-collection/special-hpluvialis.html>
- [91] HAN, Danxiang, Yantao LI a Qiang HU. *Astaxanthin in microalgae: pathways, functions and biotechnological implications* [online]. [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.4490/algae.2013.28.2.131. ISBN 10.4490/algae.2013.28.2.131. Dostupné z: <http://koreascience.or.kr/journal/view.jsp?kj=JORHBK>
- [92] IMAMOGLU, Esra a Fazilet VARDAR SUKAN. Effect of Different Culture Media and Light Intensities on Growth of Haematococcus pluvialis. *International Journal of Natural and Engineering Sciences* [online]. 2007, 1(3), 5-9 [cit. 2016-04-18]. Dostupné z: <http://nobel.gen.tr/Makaleler/IJNES-Issue%201-24-2011.pdf>
- [93] RENSTRØM, Britta, Gunner BORCH, Olav M. SKULBERG a Synnøve LIAAEN-JENSEN. *Optical purity of (3S,3'S)-astaxanthin from Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-04-18]. DOI: 10.1016/0031-9422(81)83094-4. ISBN 10.1016/0031-9422(81)83094-4. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/0031942281830944>
- [94] KOBAYASHI, M., T. KAKIZONO a S. NAGAI. Enhanced Carotenoid Biosynthesis by Oxidative Stress in Acetate-Induced Cyst Cells of a Green Unicellular Alga,

Haematococcus pluvialis. *Applied and Environmental Microbiology* [online]. 1993, **59**(3), 867-73 [cit. 2016-04-21]. Dostupné z: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16348895>

- [95] WANG, Hui-Chih, Man-Gi CHO, Galina RIZNICHENKO, Andrey B. RUBIN a Ji-Hyun LEE. *Investigation of the maximum quantum yield of PS II in Haematococcus pluvialis cell cultures during growth: Effects of chemical or high-intensity light treatment* [online]. [cit. 2016-04-22]. DOI: 10.1016/j.jphotobiol.2011.04.006. ISBN 10.1016/j.jphotobiol.2011.04.006. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1011134411001084>
- [96] GARCÍA-MALEA, M.C., C. BRINDLEY, E. Del RÍO, F.G. ACIÉN, J.M. FERNÁNDEZ a E. MOLINA. *Modelling of growth and accumulation of carotenoids in Haematococcus pluvialis as a function of irradiance and nutrients supply* [online]. [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.1016/j.bej.2005.04.007. ISBN 10.1016/j.bej.2005.04.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1369703X05001051>
- [97] PERSSON, Gunnar a Mats JANSSON. *Phosphorus in Freshwater Ecosystems* [online]. Netherlands: Springer Netherlands, 1988 [cit. 2016-04-24]. ISBN 978-94-010-7898-6. Dostupné z: <http://link.springer.com/book/10.1007/978-94-009-3109-1>
- [98] KRAEPELIN, G. W. D. P. STEWART (Editor), *Algal Physiology and Biochemistry* (Reihe: Botanical Monographs, Vol. 10). 989 s. Oxford-London-Edinburgh-Melbourne 1974. Black-well Scientific Publ. *Zeitschrift für allgemeine Mikrobiologie* [online]. 1977, **17**(1), 88-88 [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.1002/jobm.19770170120. ISSN 00442208. Dostupné z: <http://doi.wiley.com/10.1002/jobm.19770170120>
- [99] IYER, Ganesh, Yash GUPTE, Palak VAVAL a Vinod NAGLE. Uptake of potassium by algae and potential use as biofertilizer. *Indian Journal of Plant Physiology* [online]. 2015, **20**(3), 285-288 [cit. 2016-04-24]. DOI: 10.1007/s40502-015-0165-4. ISBN 10.1007/s40502-015-0165-4. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s40502-015-0165-4>
- [100] CHEN, Zhangfan, Guangce WANG a Jianfeng NIU. *Variation in Rubisco and other photosynthetic parameters in the life cycle of Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1007/s00343-012-1060-8. ISBN 10.1007/s00343-012-1060-8. Dostupné z: <http://link.springer.com/10.1007/s00343-012-1060-8>
- [101] LIANG, C., Y. ZHAI, D. XU, N. YE a J. YU. Correlation between lipid and carotenoid synthesis and photosynthetic capacity in *Haematococcus pluvialis* grown under high light and nitrogen deprivation stress. *Grasas y Aceites* [online]. 2015, **66**(2) [cit. 2016-04-28]. DOI: <http://dx.doi.org/10.3989/gya.0708142>. Dostupné z: <http://grasasyaceites.revistas.csic.es/index.php/grasasyaceites/article/viewArticle/1542/1721>
- [102] YUAN, Jian-Ping, Xian-Di GONG a Feng CHEN. *Separation and Analysis of Carotenoids and Chlorophylls in Haematococcus lacustris by High-Performance Liquid*

Chromatography Photodiode Array Detection [online]. [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1021/jf970002b. ISBN 10.1021/jf970002b. Dostupné z: <http://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/jf970002b>

- [103] HA, LAU OI. *The growth and astaxanthin formation of haematococcus lacustris*. Hong Kong, 1998. Diplomová práce. The Chinese University of Hong Kong. Vedoucí práce Dr. Steven Feng Chen.
- [104] STEINBRENNER, Jens. Regulation of two carotenoid biosynthesis genes coding for phytoene synthase and carotenoid hydroxylase during stress-induced astaxanthin formation in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Plant Physiology* [online]. 2001, **125**(2) [cit. 2016-04-28]. Dostupné z: <http://search.proquest.com.ezproxy.lib.vutbr.cz/docview/218638155/abstract/D880B8475F5E4B11PQ/1?accountid=17115>
- [105] LI, Yantao, Milton SOMMERFELD, Feng CHEN a Qiang HU. *Consumption of oxygen by astaxanthin biosynthesis: A protective mechanism against oxidative stress in Haematococcus pluvialis (Chlorophyceae)* [online]. [cit. 2016-04-28]. DOI: 10.1016/j.jplph.2007.12.007. ISBN 10.1016/j.jplph.2007.12.007. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161708000023>
- [106] KOBAYASHI, Makio, Yoshiro KURIMURA, Toshihide KAKIZONO, Naomichi NISHIO a Yasunobu TSUJI. *Morphological changes in the life cycle of the green alga Haematococcus pluvialis* [online]. [cit. 2016-05-01]. DOI: 10.1016/S0922-338X(97)82794-8. ISBN 10.1016/S0922-338X(97)82794-8. Dostupné z: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0922338X97827948>

8 SEZNAM ZKRATEK A SYMBOLŮ

Zkratka	Význam
HMP	<i>Haematococcus pluvialis</i>
NaAc	Octan sodný
IPP	Izopentenyl difosfát
DT	Doba zdvojení
GR	Růstová rychlost
OD	Optická hustota
QY	Kvantový výtěžek
ICP/MS	Hmotnostní spektrometrie s indukčně vázaným plazmatem
HPLC	Vysokoúčinná kapalinová chromatografie
DAD	Detektor s fotodiodovým polem
TOC	Celkové množství organického uhlíku
TN	Celkový dusík
AM	Americký kmen
AF	Africký kmen
S	Švýcarský kmen
G	Německý kmen
BG11	Blue Green Medium
BBM	Bold Basal Medium
ROS	Reaktivní formy kyslíku
PBR	Fotobioreaktor
MK	Mastné kyseliny
CoA	Koenzym A

9 SEZNAM PŘÍLOH

Příloha 1: Koncentrace violaxanthinu a neoxanthinu v průběhu růstové křivky

Příloha 2: Optická hustota při 680 a 720 nm HMP v různých médiích

Příloha 3: Růstové fáze kmenů HMP v různých médiích

Příloha 4: Prvková analýza při kultivaci v různých médiích

Příloha 5: Ukázka kultivace v multikultivátoru – optimalizace osvětlení švýcarského a německého kmenu

Příloha 6: Buněčné fáze kmenů HMP za zvýšené teploty

Příloha 7: Buněčné fáze kmenů HMP za optimalizace osvětlení

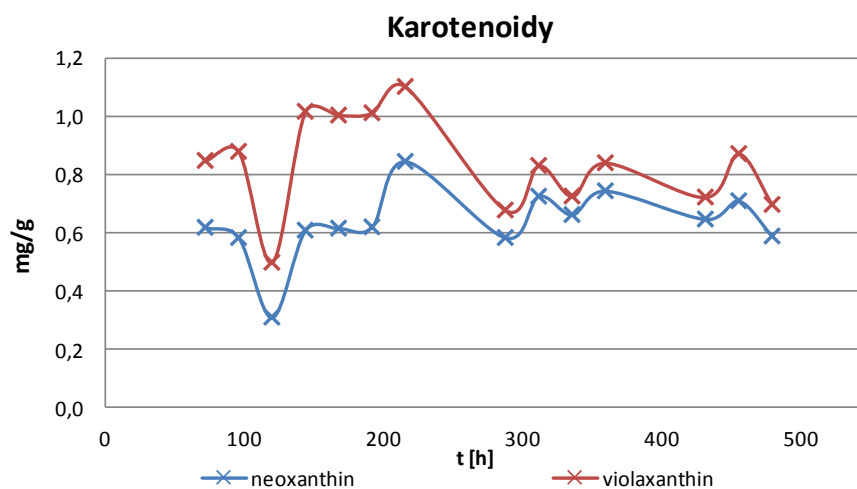
Příloha 8: Koncentrace violaxanthinu a neoxanthinu ve stresových podmínkách

Příloha 9: Ukázkový chromatogram a kalibrační rovnice analýzy karotenoidů a chlorofylů metodou HPLC

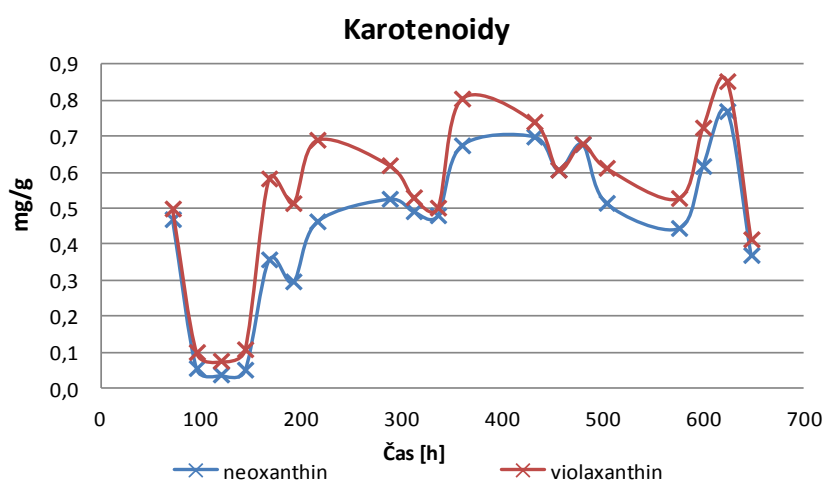
Příloha 10: Výsledky analýzy celkového dusíku

10 PŘÍLOHY

Příloha 1 – Koncentrace violaxanthinu a neoxanthinu v průběhu růstové křivky

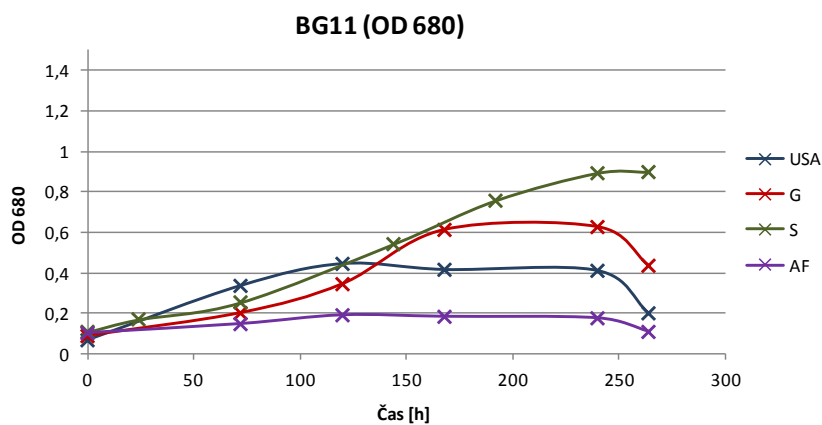


Graf 79: Koncentrace neoxanthinu a violaxanthinu – bílé světlo

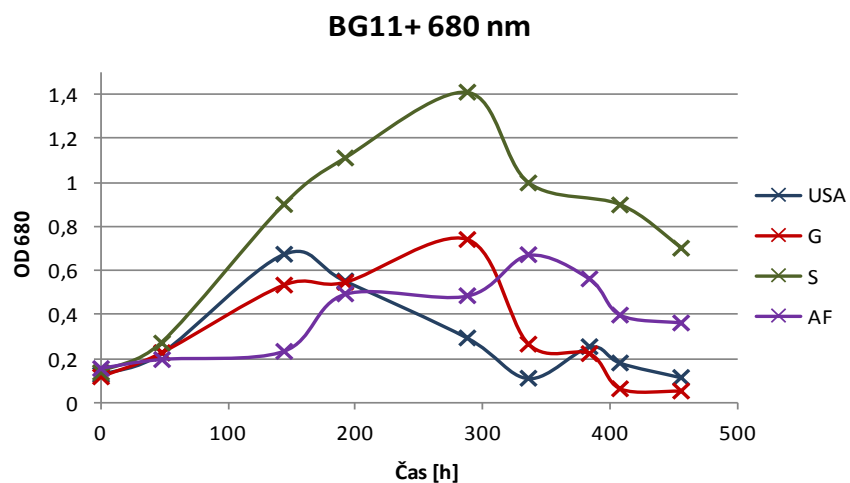


Graf 80: Koncentrace neoxanthinu a violaxanthinu – červené světlo

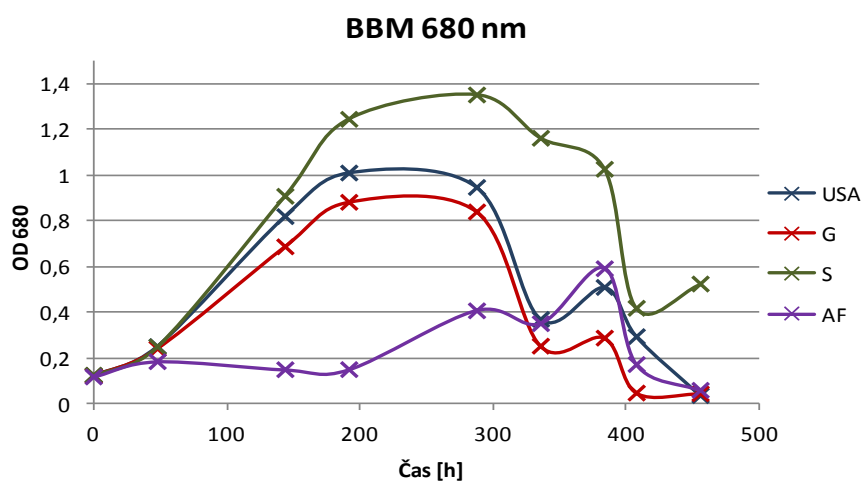
Příloha 2 – Optická hustota při 680 a 720 nm HMP v různých médiích



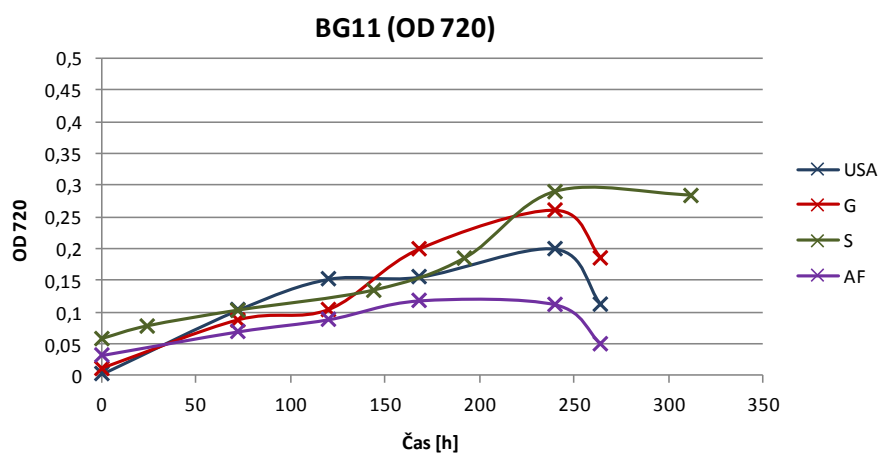
Graf 81: Růst kmenů HMP v BG11 médiu při OD 680 nm



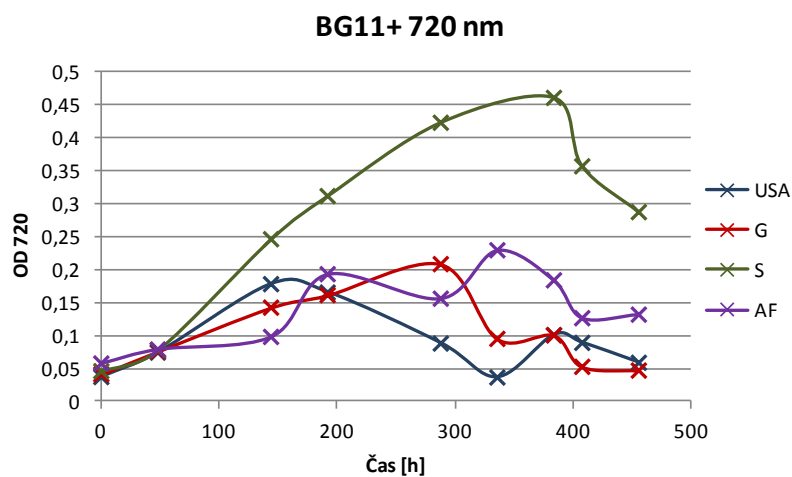
Graf 82: Růst kmenů HMP v BG11+ médiu při OD 680 nm



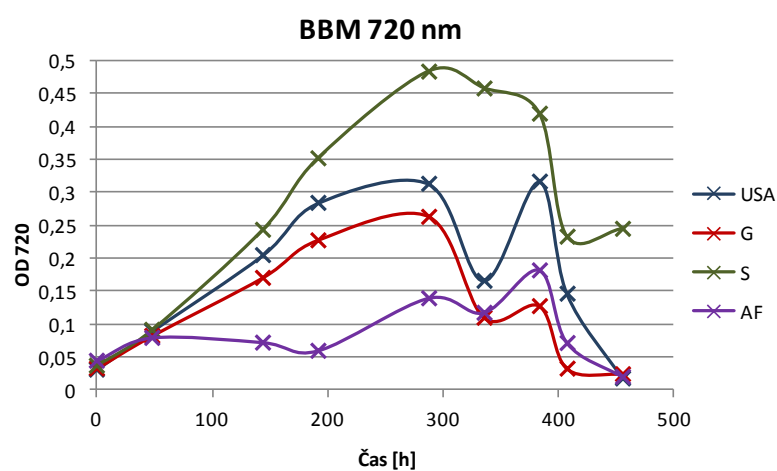
Graf 83: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 680 nm



Graf 84: Růst kmenů HMP v BG11 médiu při OD 720 nm

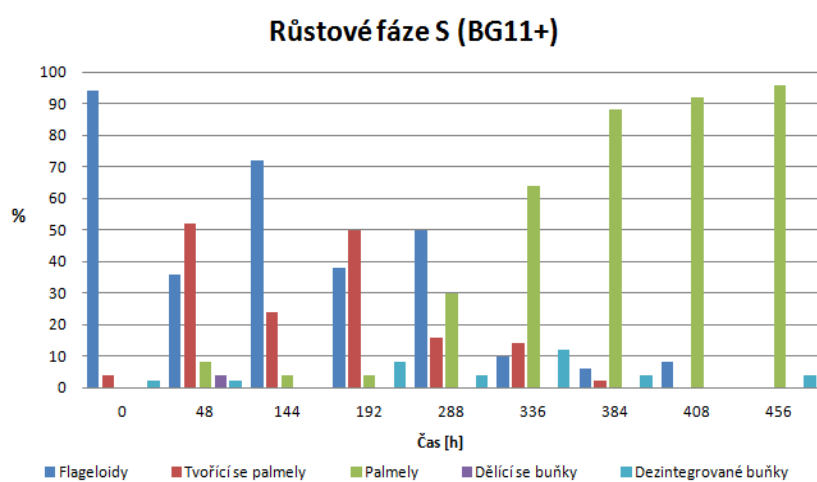


Graf 85: Růst kmenů HMP v BG11+ médiu při OD 720 nm

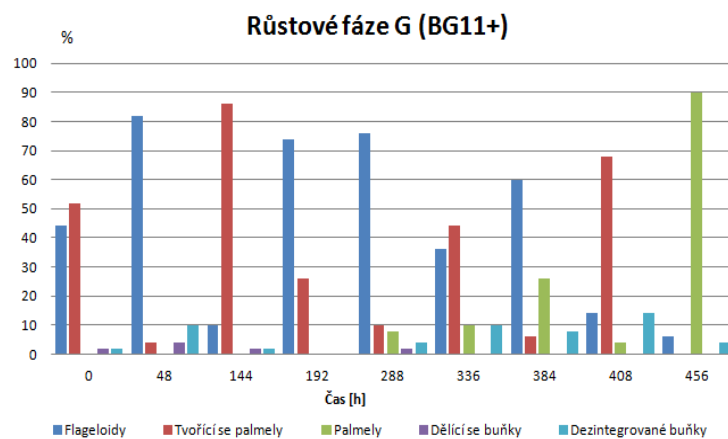


Graf 86: Růst kmenů HMP v BBM médiu při OD 720 nm

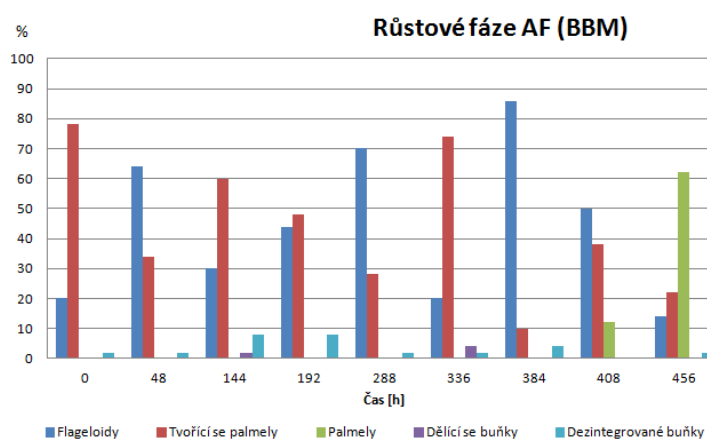
Příloha 3 – Růstové fáze kmenů HMP v různých médiích



Graf 87: Růstové fáze švýcarského kmenu v BG11+ médiu

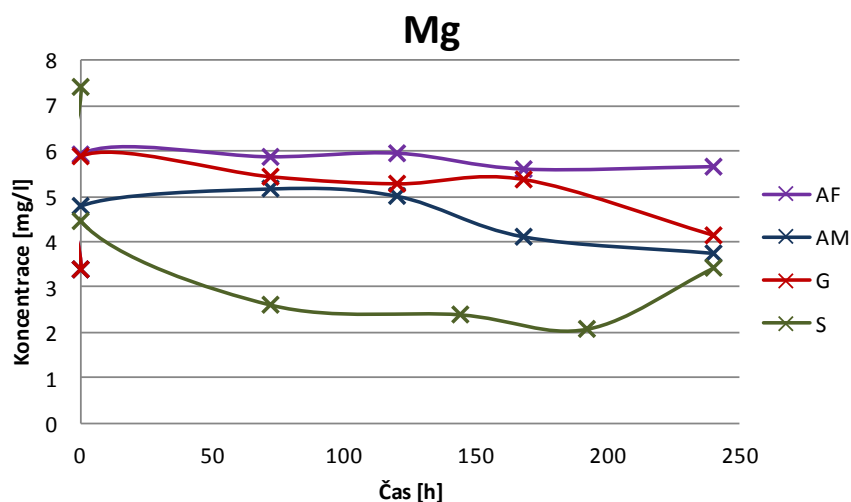


Graf 88: Růstové fáze německého kmenu v BG11+ médiu

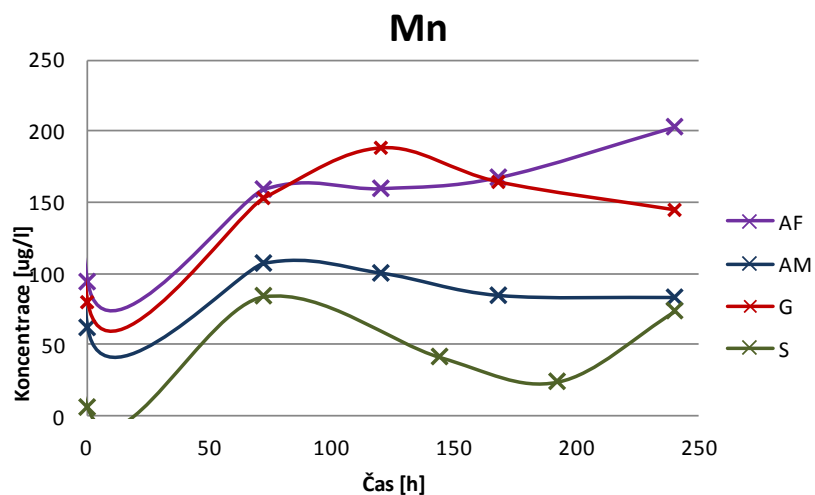


Graf 89: Růstové fáze afrického kmenu v BBM médiu

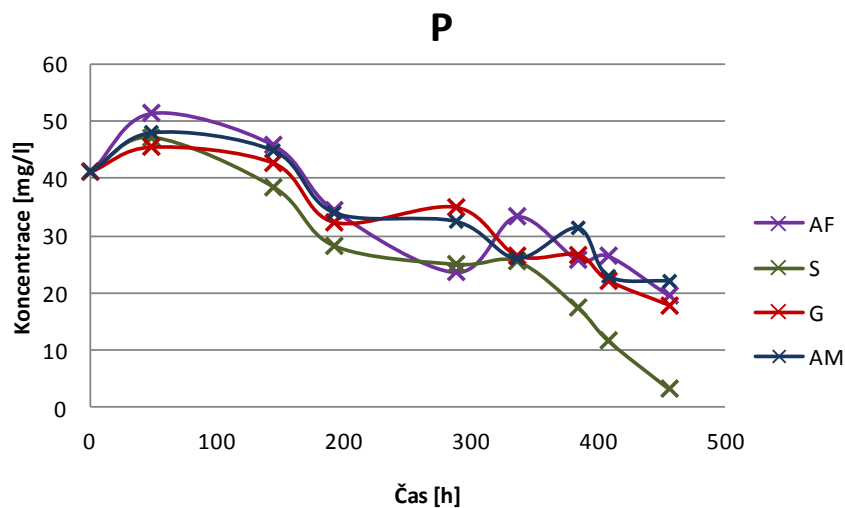
Příloha 4 – Prvková analýza při kultivaci v různých médiích



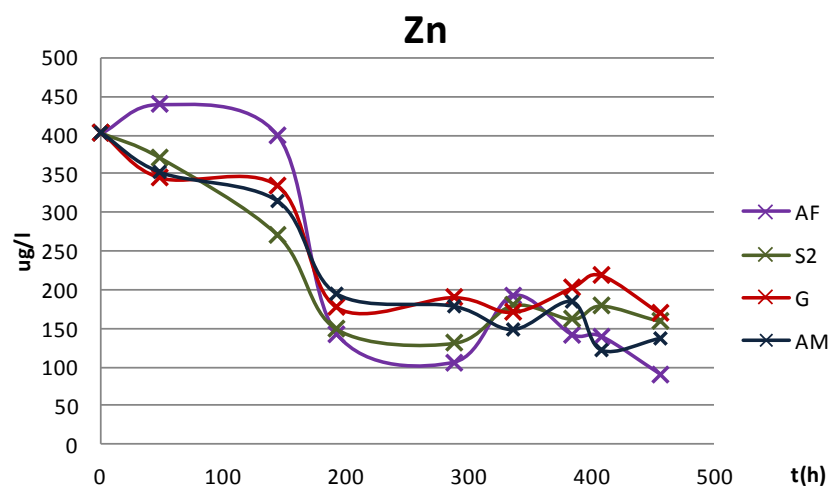
Graf 90: Změna hořčíku v průběhu kultivace v BG11 médiu



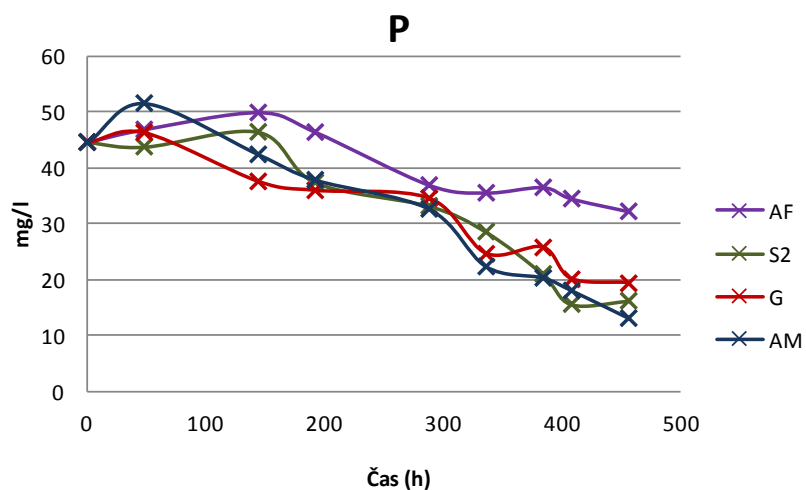
Graf 91: Změna manganu v průběhu kultivace v BG11 médiu



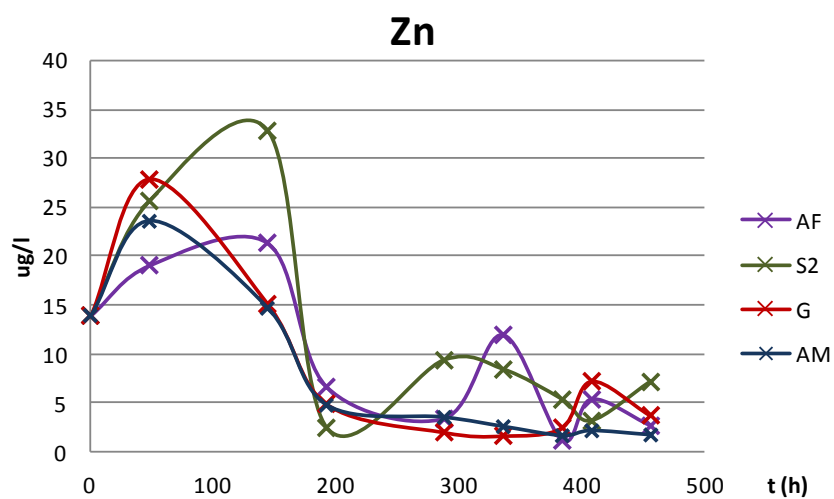
Graf 92: Změna fosforu v průběhu kultivace v BG11+ médiu



Graf 93: Změna zinku v průběhu kultivace v BG11+ médiu

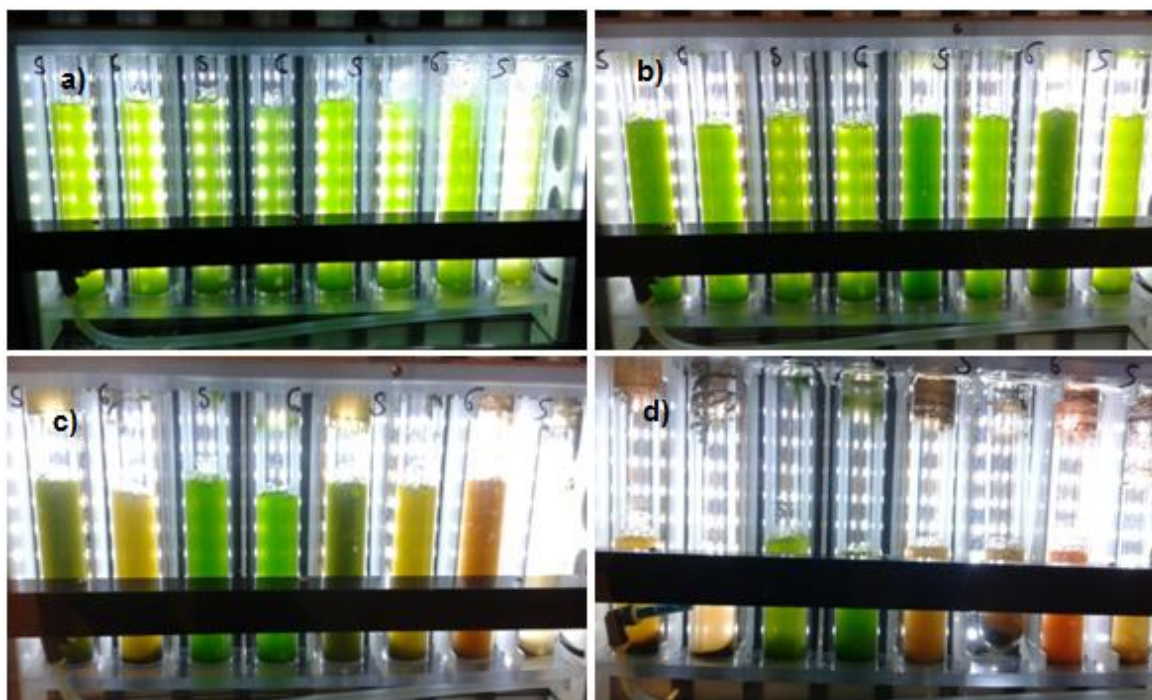


Graf 94: Změna fosforu v průběhu kultivace v BBM médiu



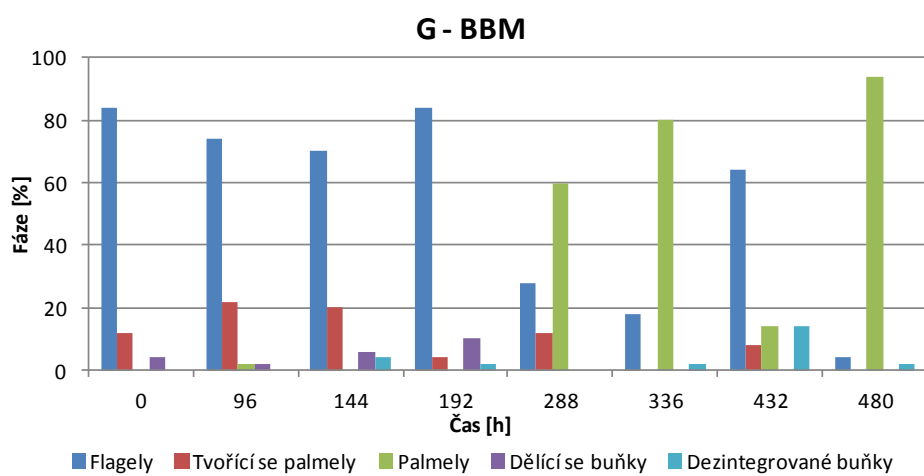
Graf 95: Změna zinku v průběhu kultivace v BBM médiu

Příloha 5 – Ukázka kultivace v multikultivátoru – optimalizace osvětlení švýcarského a německého kmenu

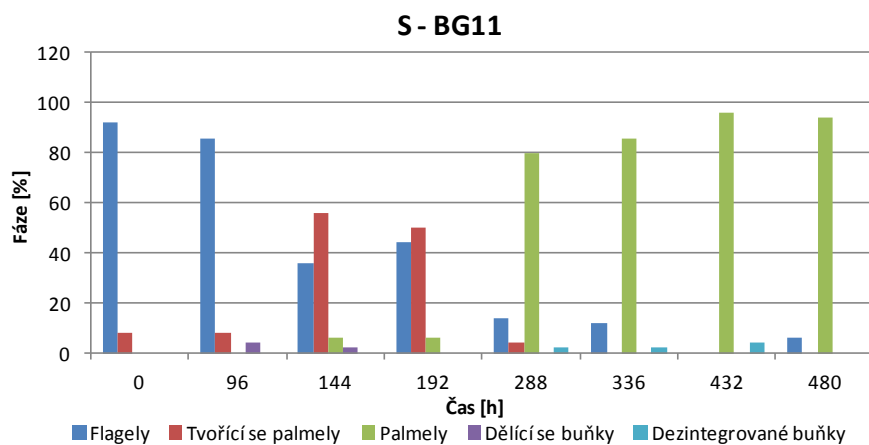


Obr. 11: Optimalizace osvětlení švýcarského kmenu

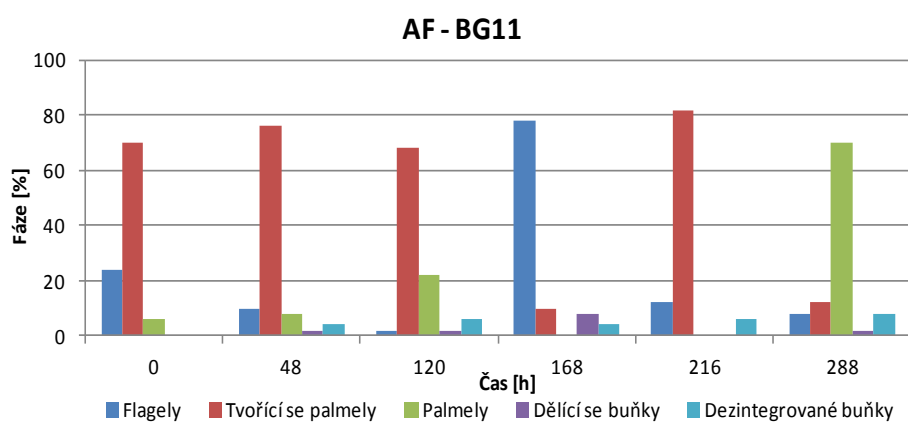
Příloha 6 – Buněčné fáze kmenů HMP za zvýšené teploty



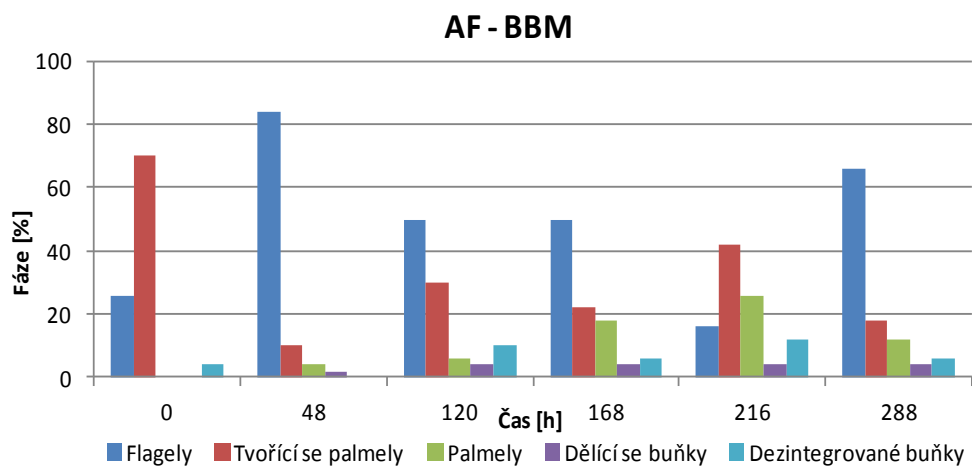
Graf 96: Růstové fáze německého kmenu v BBM médiu



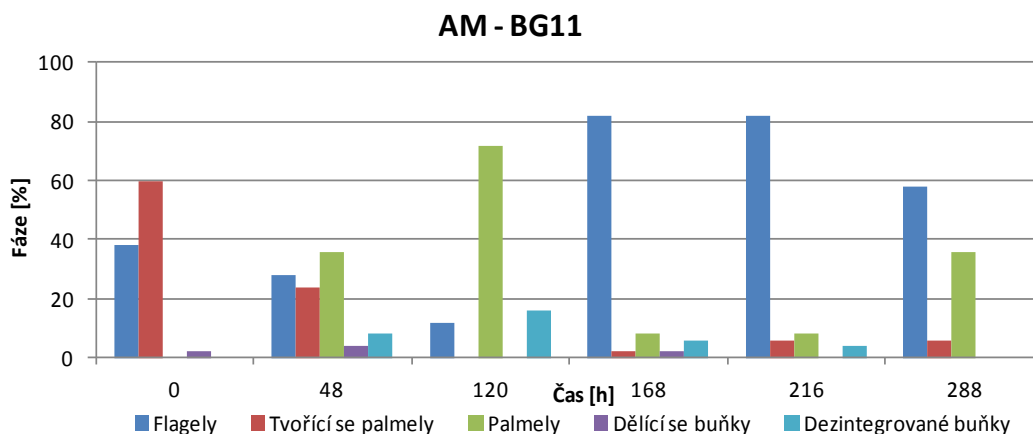
Graf 97: Růstové fáze švýcarského kmenu v BG11 médiu



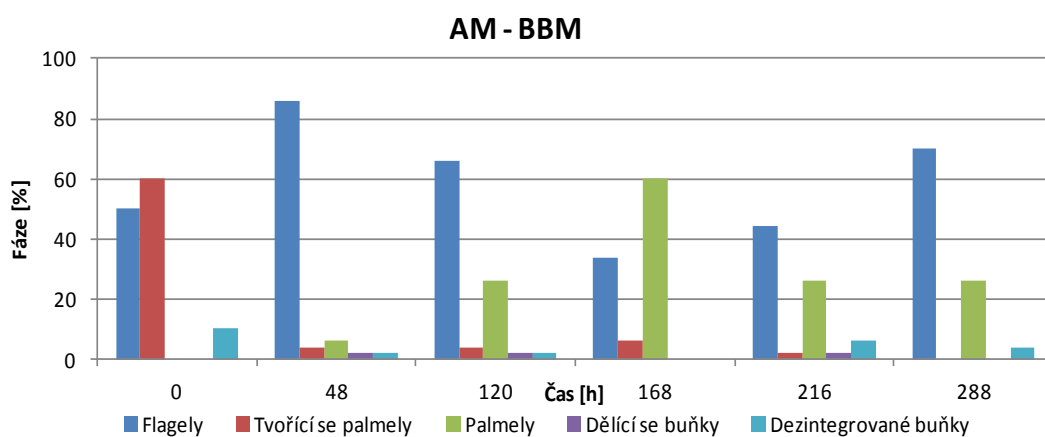
Graf 98: Růstové fáze afrického kmenu v BG11 médiu



Graf 99: Růstové fáze afrického kmenu v BBM médiu

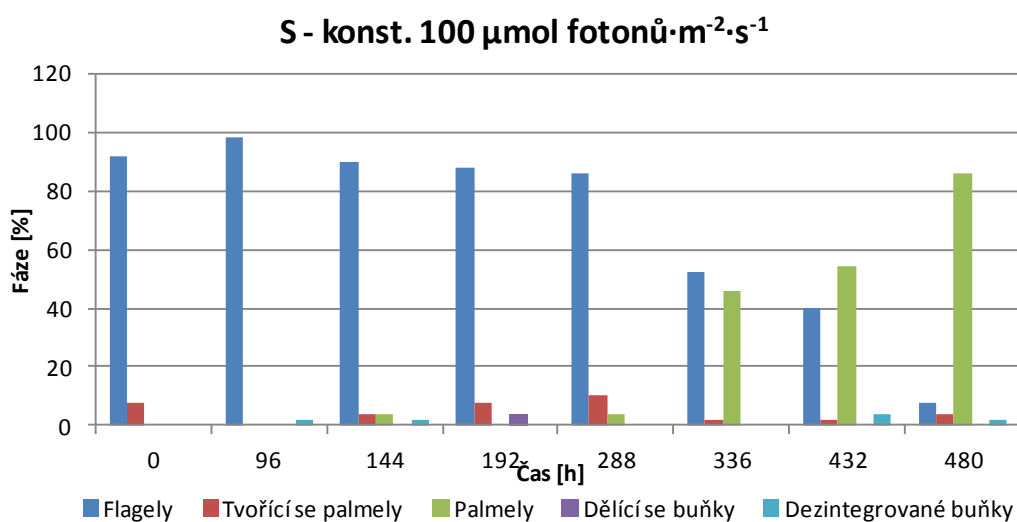


Graf 100: Růstové fáze amerického kmenu v BG11 médiu

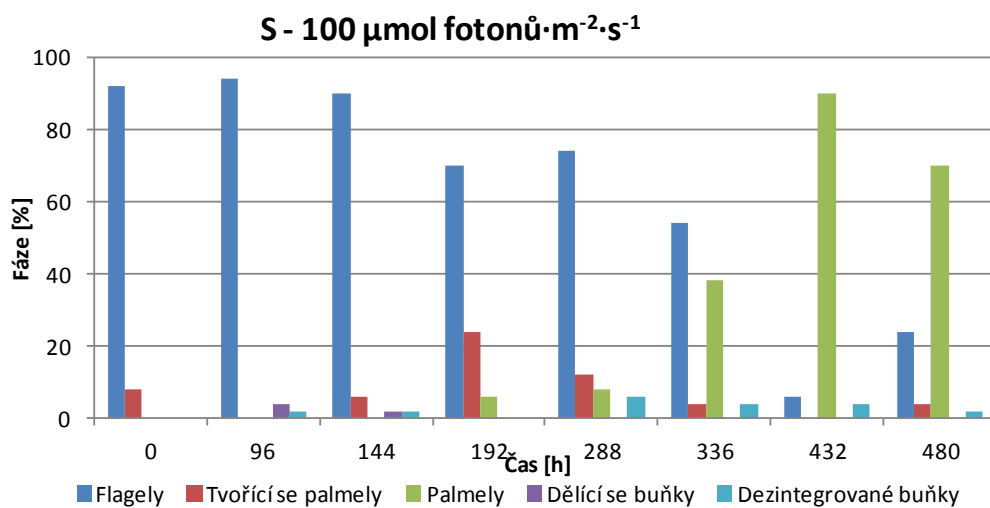


Graf 101: Růstové fáze amerického kmenu v BBM médiu

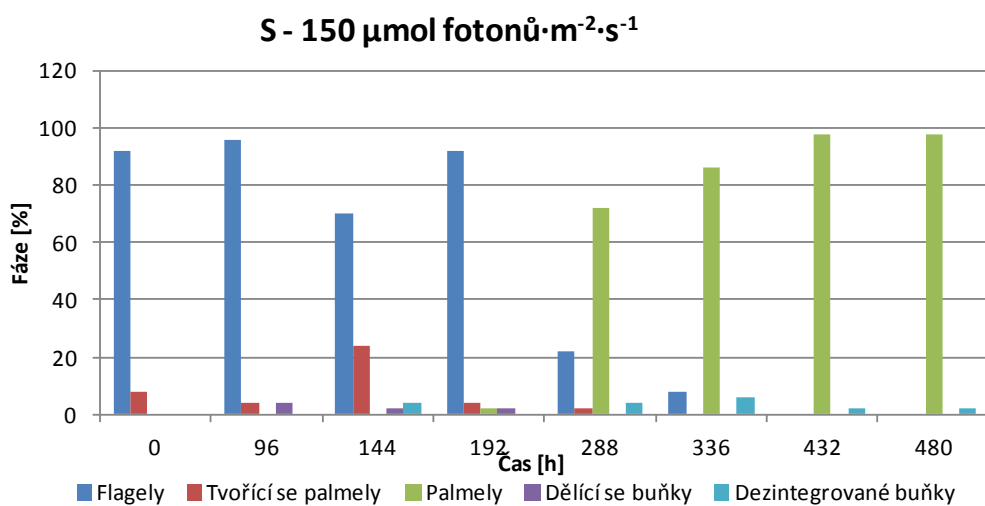
Příloha 7 – Buněčné fáze kmenů HMP za optimalizace osvětlení



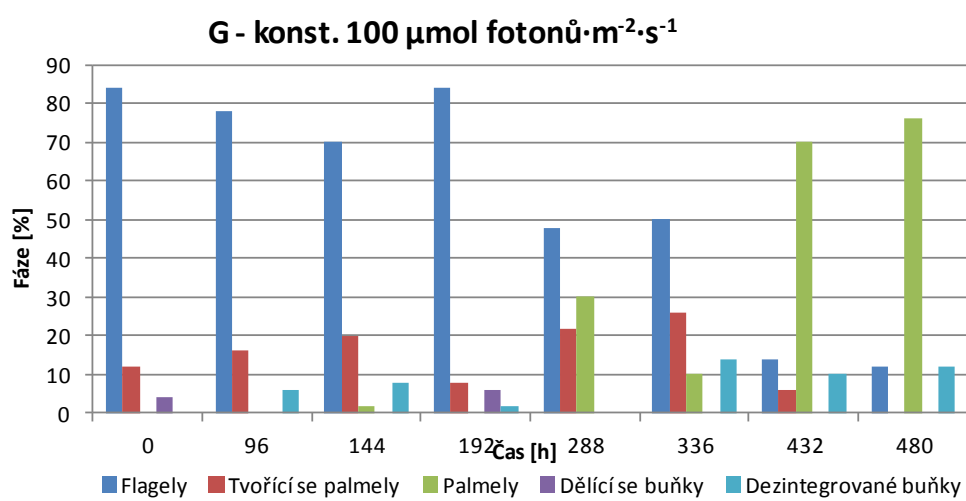
Graf 102: Růstové fáze švýcarského kmenu při konst. $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



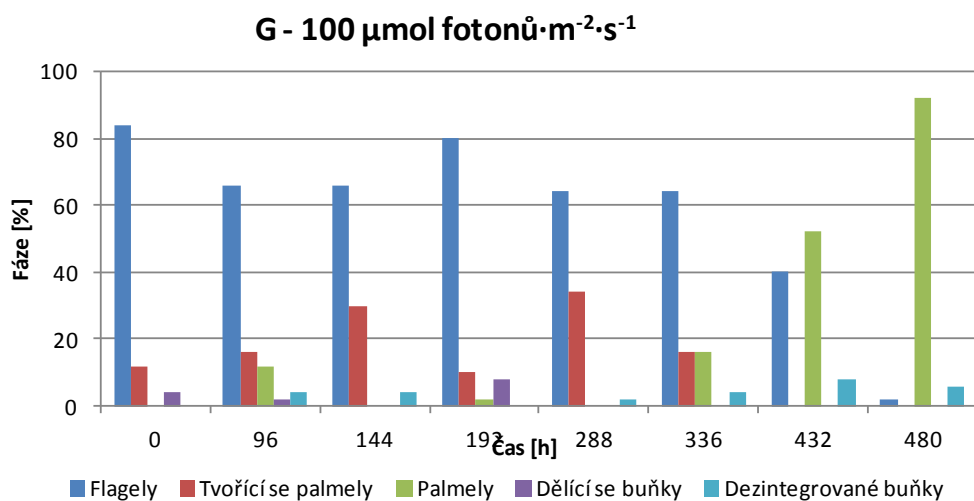
Graf 103: Růstové fáze švýcarského kmenu při 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



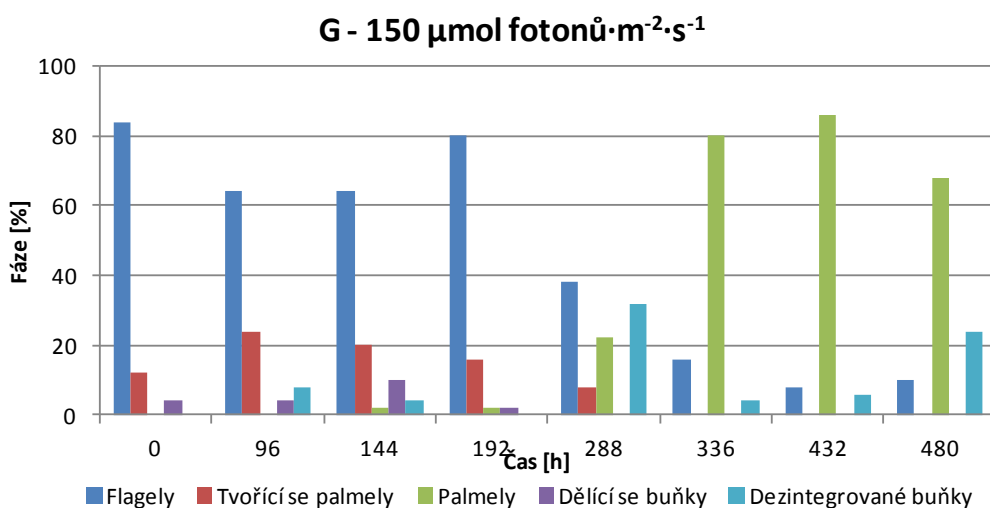
Graf 104: Růstové fáze švýcarského kmenu při 150 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



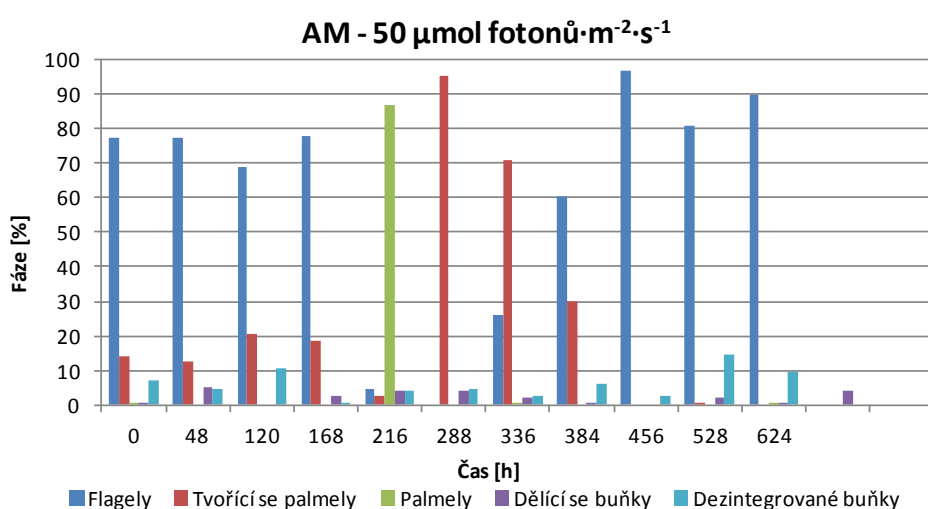
Graf 105: Růstové fáze německého kmenu při konst. 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



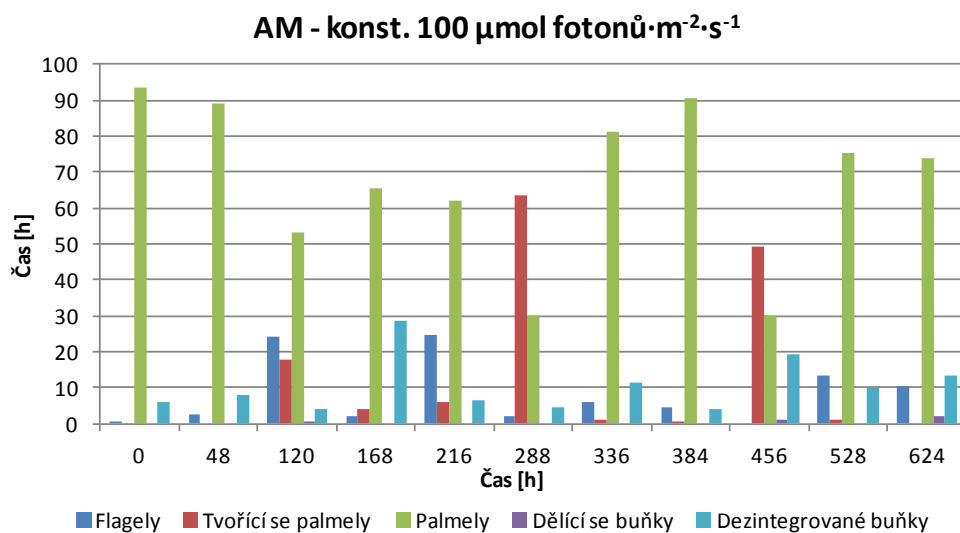
Graf 106: Růstové fáze německého kmenu při 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



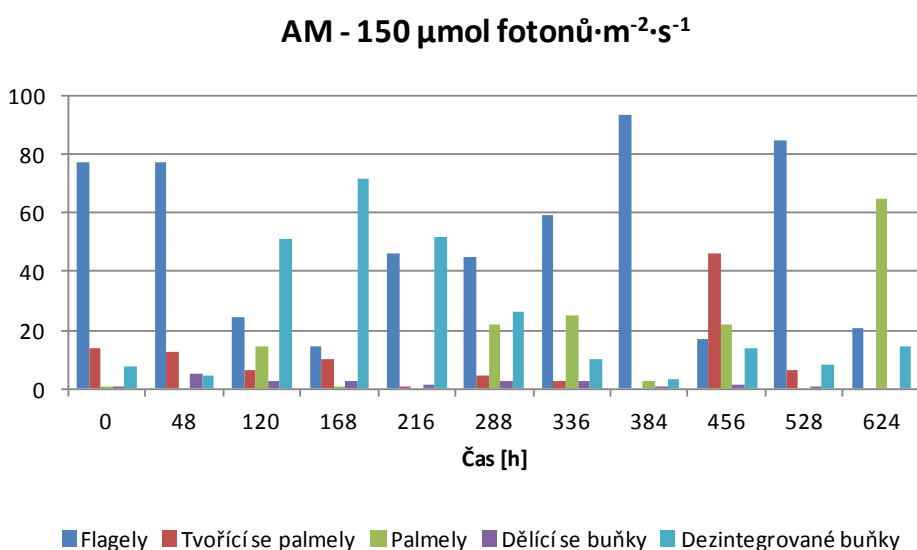
Graf 107: Růstové fáze německého kmenu při 150 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



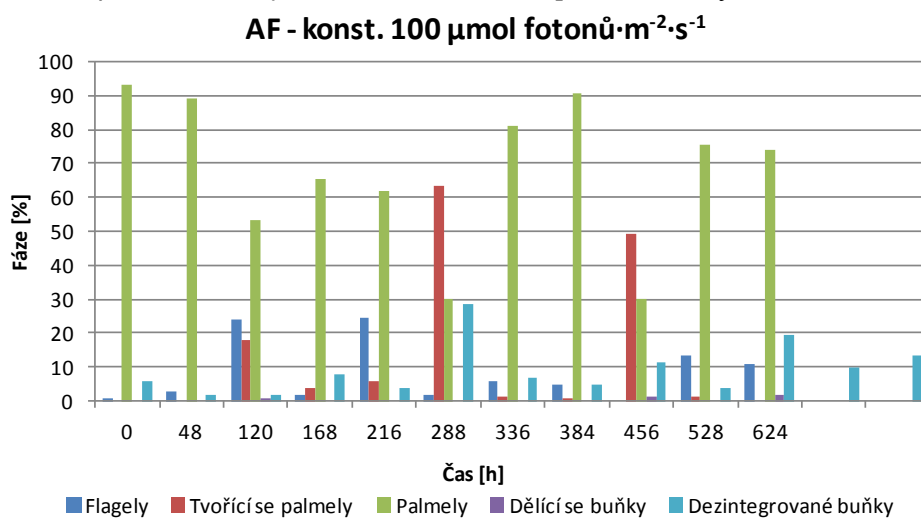
Graf 108: Růstové fáze amerického kmenu při 50 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



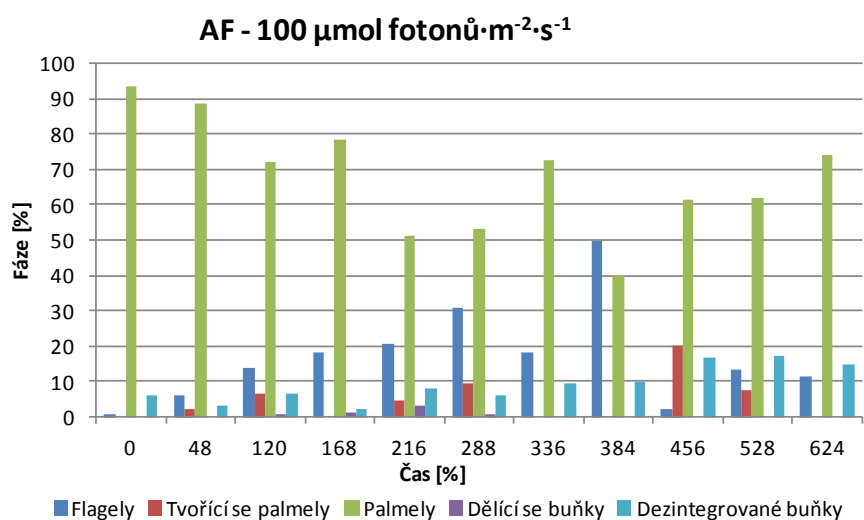
Graf 109: Růstové fáze amerického kmenu při konst. $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



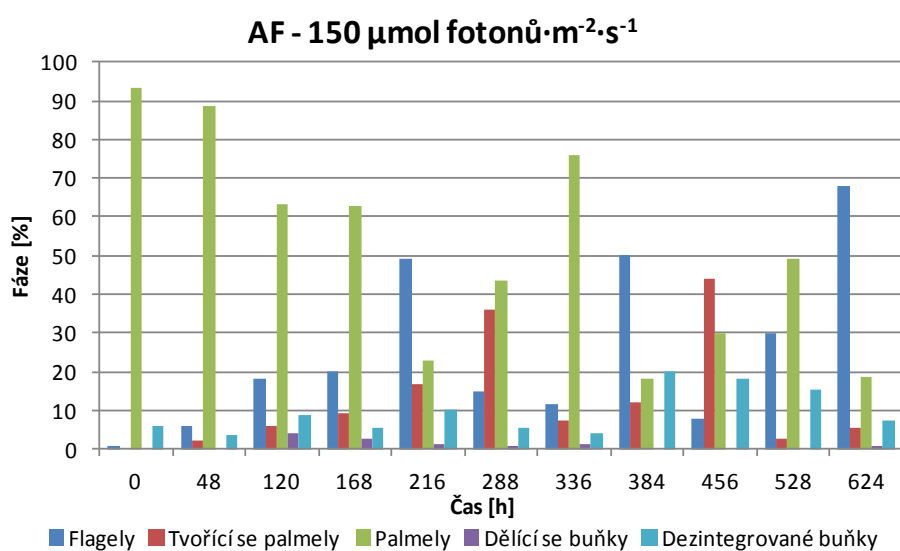
Graf 110: Růstové fáze amerického kmenu při $150 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$



Graf 111: Růstové fáze afrického kmenu při konst. $100 \mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

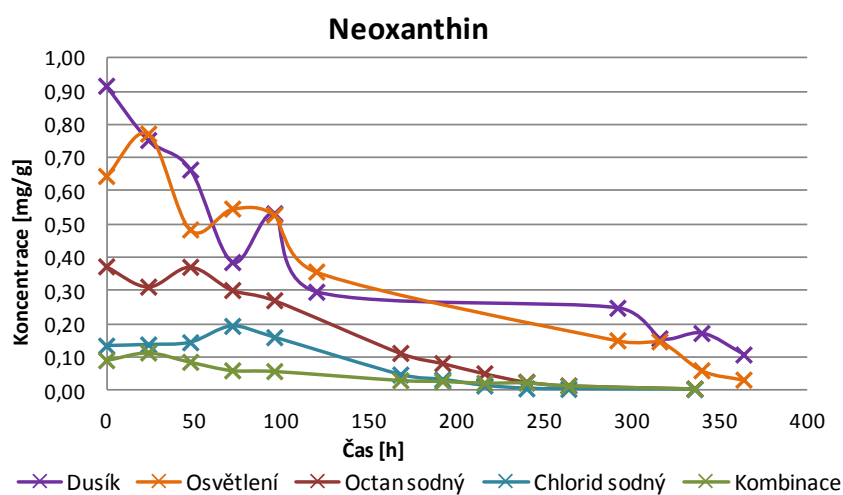


Graf 112: Růstové fáze afrického kmenu při 100 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

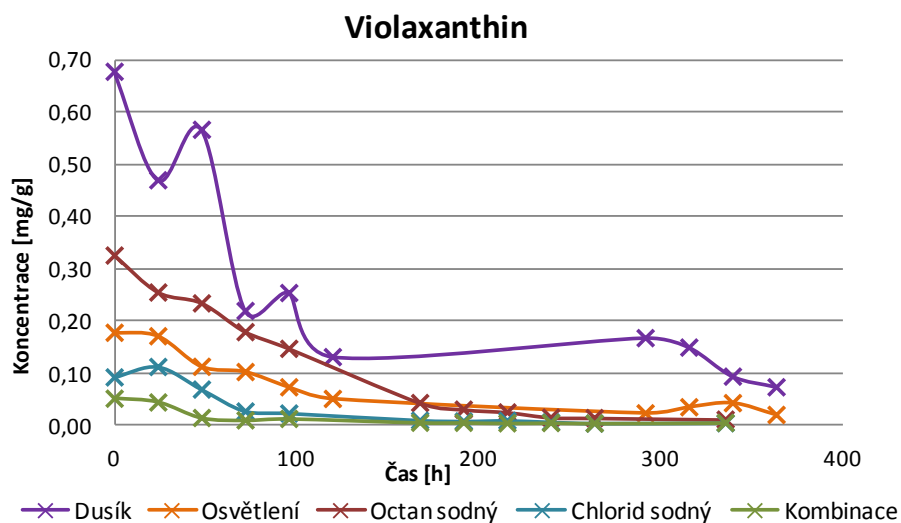


Graf 113: Růstové fáze afrického kmenu při 150 $\mu\text{mol fotonů} \cdot \text{m}^{-2} \cdot \text{s}^{-1}$

Příloha 8 – Koncentrace violaxanthinu a neoxanthinu ve stresových podmínkách



Graf 114: Změna množství neoxanthinu vlivem různých stresových podmínek

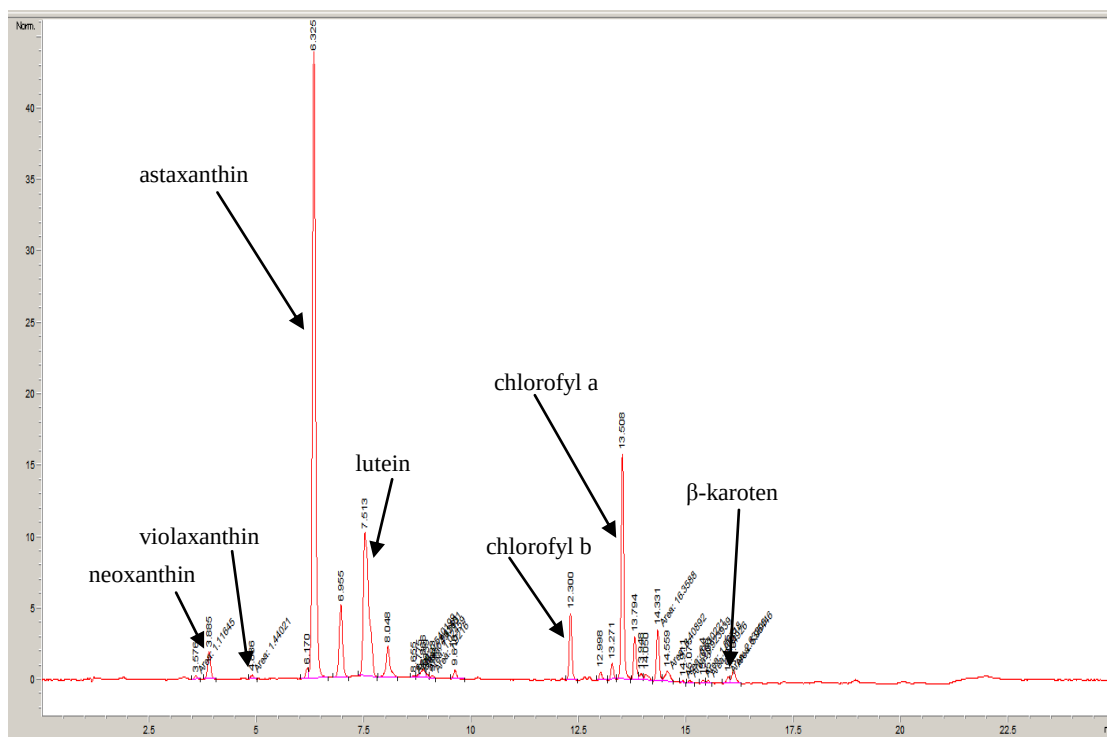


Graf 115: Změna množství violaxanthinu vlivem různých stresových podmínek

Příloha 9 – Ukázkový chromatogram a kalibrační rovnice analýzy karotenoidů a chlorofylů metodou HPLC

Tabulka 14: Rovnice kalibračních křivek karotenoidů a chlorofylů a regresní koeficienty

	Regresní rovnice
Neoxanthin	$y = 0,0754x - 0,7904$; $R = 0,9995$
Violaxanthin	$y = 0,0866x - 0,2608$; $R = 0,9976$
Lutein	$y = 0,0728x - 0,2553$; $R = 0,9976$
Astaxanthin	$y = 0,0751x - 0,5021$; $R = 0,9986$
Chlorofyl a	$y = 0,0283x + 0,4092$; $R = 0,9978$
Chlorofyl b	$y = 0,0283x + 0,4092$; $R = 0,9978$
β -karoten	$y = 0,4193x + 7,7024$; $R = 0,9986$

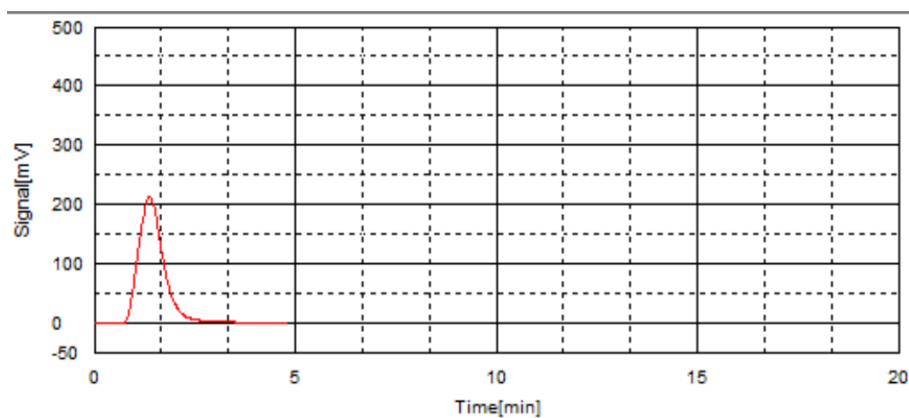


Obr. 12: Ukázkový chromatogram analýzy karotenoidů pomocí HPLC

Příloha 10 – Výsledky analýzy celkového dusíku

Tabulka 15: Regresní přímka pro stanovení celkového dusíku

Dusík	$y = 12,044x + 2,1269; R = 0,9999$
-------	------------------------------------



Obr. 13: Ukázka výsledků analýzy celkového dusíku