

Univerzita Karlova v Praze
Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Biologie
Studijní obor: Biologie



Karolína Vávrová

Životní cyklus zelené řasy *Haematococcus pluvialis* produkující astaxantin, podmínky kultivace a
použitá kultivační média

Cell cycle of astaxanthin producing green alga *Haematococcus pluvialis*, culture media and
cultivation conditions

Bakalářská práce

Školitel: doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

Praha, 2015

Prohlášení:

Prohlašuji, že jsem závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

V Praze, 6. 5. 2015

Podpis

Poděkování

Chtěla bych poděkovat především své školitelce Yvonne Němcové za její trpělivost, pomoc, spoustu užitečných rad a připomínek a za drobné textové úpravy. Poděkovat bych chtěla i Radce Kočí z firmy Photon System Instruments za možnost vyzkoušet si práci s fotobioreaktorem a naučit se mnoho věcí spojených s kultivací řas pro biotechnologické účely.

Abstrakt

Haematococcus pluvialis je jednobuněčná zelená řasa (Chlorophyceae, Chlamydomonadales), kterou je možné nalézt v efemérních nádržkách na kamenech nebo v ptačích koupalištích. Tato řasa je nejlepším přírodním producentem červeného sekundárního karotenoidu astaxanthinu se silnými antioxidačními vlastnostmi, který se používá jako pigment v akvakulturách a v chovech drůbeže a který má pozitivní účinky na lidské zdraví. *Haematococcus pluvialis* má poměrně komplexní životní cyklus, v němž se objevují čtyři stádia, dvoubičíkaté zoospory, nepohyblivé kulaté palmely, tlustostěnné akinety (aplanospory, cysty) s vysokým obsahem astaxanthinu a malé dvoubičíkaté gamety. Akinety, které umožňují *H. pluvialis* přečkat období desikace v jeho přirozeném prostředí, jsou tvořeny při vystavení stresovým podmínkám, jako je vysoké ozáření a teplota a nedostatek živin. Během přeměny na cysty dochází v buňkách k výrazným ultrastrukturálním změnám. Sníží se objem chloroplastu, výsledkem syntézy velkého množství astaxanthinu a mastných kyselin je přítomnost tukových tělísek, jejichž tvorba postupuje od středu buňky směrem k periférii. Je vytvořena i tlustá buněčná stěna obsahující algaenan. Kultivace *H. pluvialis* většinou probíhá ve dvou fázích, první zelená fáze zaměřená na produkci biomasy je následovaná červenou fází, ve které dochází k akumulaci astaxanthinu za stresových podmínek. Tato řasa může být kultivována různými způsoby, které zahrnují batch, fed-batch, attached a perfuzní kultivaci. Kultury *H. pluvialis* mohou růst fototrofně, mixotrofně i heterotrofně v různých kultivačních médiích.

Klíčová slova: astaxanthin, buněčná ultrastruktura, fotobioreaktor, *Haematococcus pluvialis*, kultivační média, mikrořasové biotechnologie, stresová reakce, životní cyklus

Abstract

Haematococcus pluvialis is unicellular green alga (Chlorophyceae, Chlamydomonadales), which can be found in ephemeral rock pools and birdbaths. It is the best natural producer of strong antioxidant astaxanthin, red secondary carotenoid used as coloring agent in aquaculture and poultry breeding. Astaxanthin also has various positive effects on human health. *Haematococcus pluvialis* has quite complex life cycle consisting of four life stages, biflagellated zoospores, non-motile round palmella stage, thick-walled akinetes (aplanospores, cysts) with high content of astaxanthin and small biflagellated gametes. Akinetes, which enable *H. pluvialis* to survive desiccation in its natural habitat, are formed in response to stress conditions such as high irradiance and temperature and nutrient depletion. Cells undergo dramatic ultrastructural changes during aplanospore formation. Chloroplast volume is decreased, synthesis of high amount of astaxanthin and fatty acids results in presence of lipid droplets that spread from the center to the periphery of the cell and thick cell wall containing algaenans is formed. Cultivation of *H. pluvialis* is often performed in two subsequent stages, green stage focused on biomass production and red stage focused on astaxanthin accumulation under stress conditions. There are several different approaches to the cultivation of this alga including batch, fed-batch, perfusion and attached cultivation. Cultures of *H. pluvialis* can grow phototrophically, mixotrophically and heterotrophically in various culture media.

Keywords: astaxanthin, cell ultrastructure, culture media, *Haematococcus pluvialis*, life cycle, microalgae biotechnology, photobioreactor, stress response

Obsah

1	Úvod	1
1.1	Astaxanthin	2
2	Fylogenetické vztahy a výskyt.....	5
3	Životní cyklus	7
4	Ultrastrukturální a fyziologické změny v průběhu životního cyklu	10
4.1	Změny na úrovni chloroplastu	10
4.2	Změny spojené s akumulací astaxanthinu	11
4.3	Změny ve struktuře a složení buněčných obalů	13
4.4	Další změny v průběhu životního cyklu	14
5	Kultivace.....	16
5.1	Metody kultivace.....	16
5.1.1	Batch kultivace	17
5.1.2	Fed-batch kultivace.....	17
5.1.3	Perfuzní kultivace.....	18
5.1.4	Attached kultivace.....	19
5.2	Kultivační podmínky	22
5.2.1	Typ a míra ozáření	22
5.2.2	Množství živin.....	23
5.2.3	pH kultury	24
5.2.4	Kultivační teplota	25
5.2.5	Koncentrace solí	25
5.3	Média	27
5.4	Příklady kultivačních postupů s nejvyšší produktivitou.....	29
6	Závěr.....	30
7	Seznam literatury	31

1 Úvod

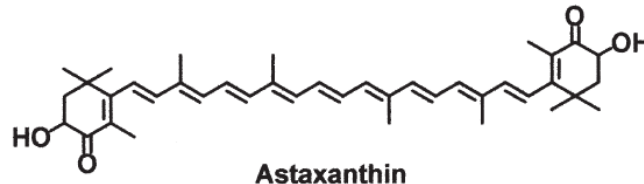
V současné době stoupá zájem o biotechnologie a využívání přírodních produktů. Z tohoto důvodu je poměrně intenzivně zkoumáno i množství druhů jednobuněčných řas, které mohou být potenciálně využity pro produkci biopaliv, obsahují hodně živin nebo syntetizují řadu zajímavých látek. Mezi mikrořasy s největším biotechnologickým využitím patří například *Chlorella*, *Arthrospira*, *Nannochloropsis* (produkce eikosapentenové kyseliny, EPA), *Dunaliella salina* (produkce β -karotenu) a *Haematococcus pluvialis* produkující sekundární karotenoid astaxanthin s vysokými antioxidačními účinky (Spolaore et al. 2006, Pulz & Gross 2004)

Mikrořasy a produkty z nich bývají využívány jako součást potravinových doplňků a krmiv pro zvířata, velký význam mají především v akvakulturách, další uplatnění nacházejí v kosmetice a farmaceutickém průmyslu. Kultivace řas je ale stále poměrně drahá, jejich produkty se tudíž v porovnání se syntetickými využívají v mnohem menším měřítku, především jako vysoce kvalitní látky v lékařství a kosmetice nebo v živočišné výrobě pro produkci biopotravin. Z tohoto důvodu jsou neustále zkoumány efektivnější a levnější metody kultivace, které by umožnily větší konkurenceschopnost řasových produktů v porovnání s průmyslovými (Lorenz & Cysewski 2000).

Cílem této bakalářské práce je shrnout současné poznatky o zelené řase *Haematococcus pluvialis*. Konkrétně je práce zaměřena na životní cyklus této řasy a s ním spojené ultrastrukturální a fyziologické změny v buňce s důrazem na tvorbu karotenů u *H. pluvialis*. Ve druhé části práce jsou popsány různé typy kultivace, kultivační podmínky a použitá média s cílem stanovit optimální parametry pro kultivaci *H. pluvialis*.

1.1 Astaxanthin

Astaxanthin (3,3'-dihydroxy- β -karoten-4,4'-dion) je sekundární ketokarotenoid. Ve své molekule obsahuje 2 centra chiralit, proto se může vyskytovat ve 3 formách: 3S,3'S; 3R,3'R a 3S,3'R (tato forma je zaměnitelná s 3R,3'S). *Haematococcus pluvialis* obsahuje astaxanthin s opticky čistou chiralitou 3S,3'S. Oproti tomu většina průmyslově syntetizovaného je směsí více forem, tudíž je pro farmaceutické použití vhodnější přírodní astaxanthin, protože syntetizovaný často nesplňuje nároky na čistotu látky (Jackson et al. 2008).



Obr. č. 1: Schematické znázornění struktury molekuly Astaxanthinu. (Jackson et al. 2008)

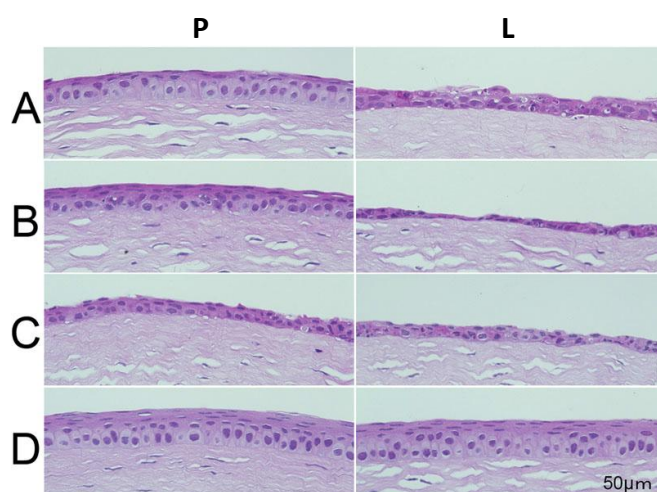
Astaxanthin působí jako silný antioxidant. Práce zabývající se vychytáváním volných radikálů a inhibičními účinky na radikály indukované oxidační reakce u různých skupin antioxidantů prokázala, že má astaxanthin v porovnání s lykopenem, α -karotenem, β -karotenem, luteinem a α -tokoferolem relativně nejvyšší antioxidační aktivitu (Naguib 2000).

Možná právě díky těmto antioxidačním vlastnostem je jeho syntéza v buňkách *H. pluvialis* spojená se stresovými podmínkami, které indukují tvorbu reaktivních forem kyslíku (ROS), jako je například zvýšená ozářenost, UV nebo přítomnost některých solí. Jeho tvorba je možná spuštěna přímo výskytem ROS, které mohou aktivovat cytoplazmatické enzymy zapojené do jeho biosyntetické dráhy (Kobayashi et al. 1993). Tento předpoklad je podpořen faktem, že s produkcí astaxanthinu není spojená syntéza nových proteinů (Boussiba 2000). Jeho akumulace je naopak spojená s tvorbou mastných kyselin, se kterými tvoří mono a diestery, které vytváří matrix pro jeho rozpuštění a zároveň ho mohou stabilizovat (Lemoine & Schoefs 2010). Navzdory svým silným antioxidačním vlastnostem ale nemusí být astaxanthin v buňce přímo látkou bránící fotooxidačnímu poškození, ale spíše konečným produktem jiných protekčních mechanismů (Lemoine & Schoefs 2010, Boussiba 2000, Han et al. 2012), jejichž povaha zatím není plně prozkoumána. Zároveň může stínit jádro a tím chránit DNA před poškozením vyplývajícím z působení UV, v prvních fázích akumulace je totiž vždy ukládán okolo jádra (Collins et al. 2011), nebo může fungovat jako zásobní látka (Lemoine & Schoefs 2010, Han et al. 2012).

Díky svým vlastnostem našel astaxanthin bohaté uplatnění v průmyslu. Nejvíce je používán jako zdroj pigmentu a antioxidant v živočišné výrobě. Hojně se používá v chovech lososů nebo pstruha duhového, u kterého působí komerčně atraktivní zbarvení svaloviny a navíc má pozitivní účinky na krevtvorbu a metabolismus lipidů (Řehulka 2000). Jako zdroj pigmentu je

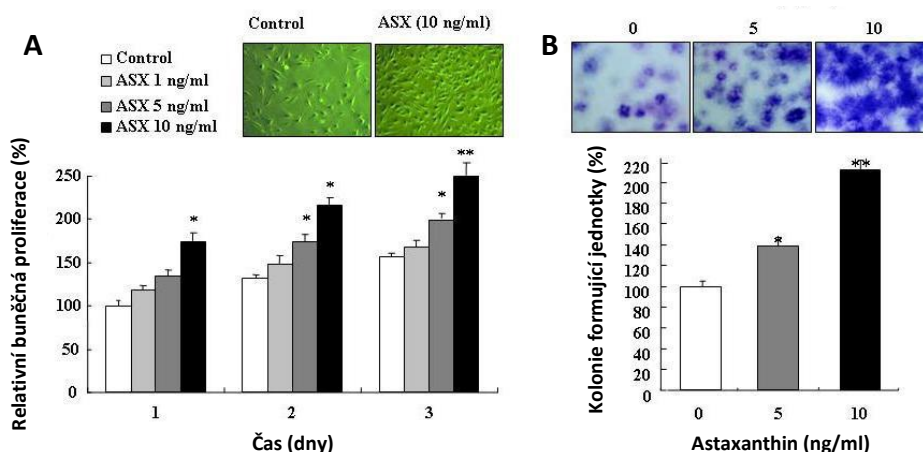
astaxanthin používán i v akvakulturách garnátů a krevet, brání zde onemocnění „blue colour syndrom“, zvyšuje růstovou rychlost a přibývání na váze (Zhang et al. 2013). Zároveň může snižovat mortalitu (Lorenz & Cysewski 2000). Další uplatnění nachází v chovu okrasných tropických ryb, jako jsou například klauni (Seyedi et al. 2013), kromě estetické hodnoty je správné zbarvení ryb důležité v mezidruhové i vnitrodruhové komunikaci a má vliv i na fyziologické funkce. Astaxanthin je používán i v chovech drůbeže pro vyšší pigmentaci žlutků, u brojlerů zvyšuje množství žlutého zbarvení v kůži na nohách a v zobáku, způsobuje rychlejší přibývání na váze a vyšší hmotnost prsních svalů a zefektivňuje krmění (Lorenz & Cysewski 2000).

Pro své silné antioxidační vlastnosti má astaxanthin značný potenciál i pro farmaceutické využití, ve studiích prováděných na zvířatech i na buněčných kulturách byla prokázána celá řada jeho pozitivních účinků. Během pokusu, který spočíval v dodávání astaxanthinu různě starým psům, bylo zjištěno, že v jejich buňkách snižuje oxidativní i zánětlivé poškození mitochondrií spojené se stárnutím. Zároveň zlepšil mitochondriální funkce prostřednictvím zvýšené tvorby ATP, která obvykle klesá s věkem, většího mitochondriálního objemu a množství cytochromu c oxidoreduktázy (komplexu III) zapojené do dýchacího řetězce, což vedlo ke snížení tvorby ROS (Park et al. 2013). Astaxanthin také stabilizuje buněčné membrány, protože brání peroxidaci polynenasycených mastných kyselin obsažených v membránových lipidech (Kurashige et al. 1990). Ve tkáních vystavených účinkům UVB záření snižuje tvorbu oxidu dusnatého a aktivitu kaspázy-3 zapojené do apoptické dráhy, čímž pozitivně působí na odolnost keratinocytů (Yoshihisa et al. 2014) a buněk očního rohovkového epitelu (Lennikov et al. 2012). U myší, jejichž oči byly po vystavení UVB záření ošetřeny astaxanthinovými kapkami, bylo v rohovce oproti kontrole zaznamenáno mnohem méně apoptických buněk a snížen byl i ROS signál.



Obr. č. 2: Morfologie myších rohovek po ozáření UVB v závislosti na množství dodaného astaxanthinu. A: 1 mg/ml ast.; B: 0,1 mg/ml ast.; C: 0,01 mg/ml ast.; D: neozářená kontrola. P: pravé oči ošetřené astaxanthinovými kapkami; L: levé oči sloužící jako kontrola. (Lennikov et al. 2012)

Díky stabilizaci membrán, inhibici apoptózy a udržování iontové homeostázy může astaxanthin bránit i vzniku Parkinsonovy choroby a dalších neurodegenerativních onemocnění (Chan et al. 2009). Dalším jeho pozitivním vlivem na nervovou tkáň je zlepšování funkce nervových kmenových buněk prostřednictvím zvýšené exprese transkripčních faktorů spojených s proliferací a genů hrajících roli při udržení vlastností kmenových buněk. Buňky po dodání astaxanthinu vykazovaly přibližně dvojnásobný nárůst tvorby kolonií (Kim et al. 2010).



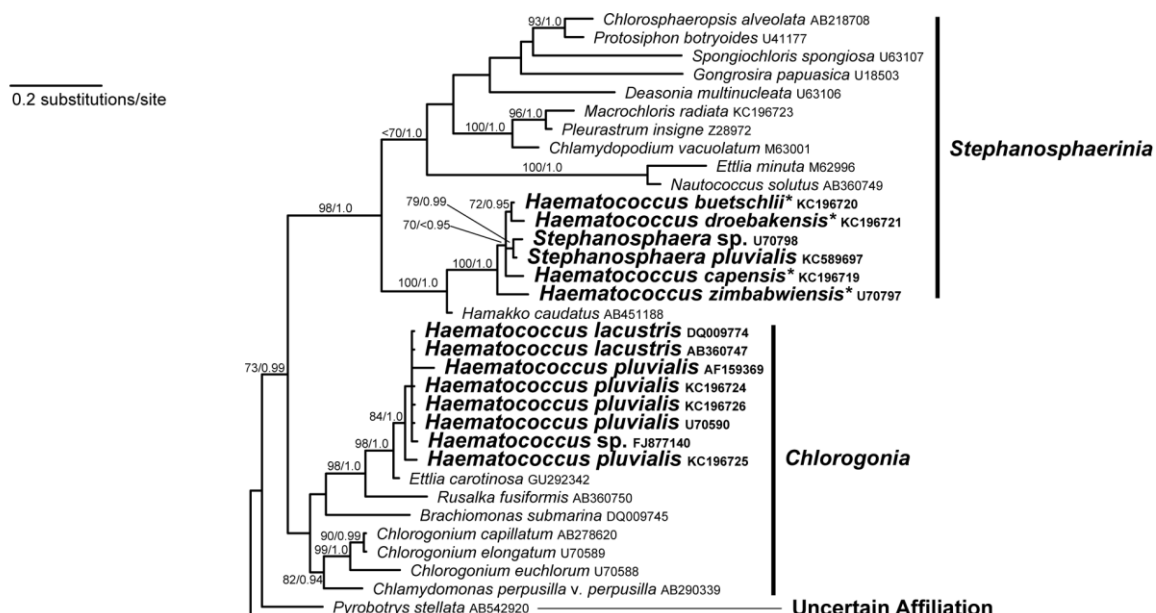
Obr. č. 3: Stimulace buněčné proliferace nervových kmenových buněk po dodání astaxanthinu. A: proliferace buněk ošetřených různými koncentracemi astaxanthinu (ASX) v průběhu 3 dnů; B: poměr kolonie formujících jednotek. (Kim et al. 2010)

Skrze inhibici produkce oxidu dusnatého a stimulaci tvorby HSP proteinů, konkrétně protizánětlivého enzymu Hsp32, může zmírňovat následky globální mozkové ischemie. Po jeho dodání byla týden po indukované desetiminutové ischemii naměřena vyšší denzita hippocampálních pyramidálních neuronů (Lee et al. 2010). Ale není jisté, jestli proces degenerace buněk nebyl pouze zpomalen, následky ischemie nebyly sledovány dostatečně dlouho. U astaxanthinu byla prokázána i imunomodulační aktivita spojená se stimulací proliferace a funkcí myších thymocytů a buněk sleziny (Okai & Higashi-Okai 1996). Největší efekt měl na produkci polyklonálních protilátek IgM a IgG slezinou. Skrze zvýšení aktivity protinádorové imunity u myši inhiboval nádorový růst transplantovatelného fibrosarkomu. U těchto myši byla zjištěna i zvýšená aktivita cytotoxických T-lymfocytů a produkce IFN- γ (Jyonouchi et al. 2000). Ale pravděpodobně je dodání astaxanthinu účinné jen v počátečních stádiích rakovinného vývoje. Dalším způsobem, jak může astaxanthin působit proti rozvoji rakoviny, je indukce xenobiotika-metabolizujících enzymů v játrech, plicích a ledvinách (Guerin et al. 2003). V neposlední řadě snižuje obsah cholesterolu a triacylglycerolů v krvi, pravděpodobně skrze modulaci exprese genů zapojených do metabolismu těchto látek. Spolu se svými antioxidačními vlastnostmi má tudíž astaxanthin potenciál v prevenci aterosklerózy (Yang et al. 2011).

2 Fylogenetické vztahy a výskyt

Haematococcus pluvialis (synonyma *H. lacustris*, *Sphaerella pluvialis*, *S. lacustris*, *Volvox lacustris*) je zelená řasa patřící do třídy Chlorophyceae, konkrétně do řádu Chlamydomonadales (Guiry & Guiry 2015). Rod *Haematococcus* byl společně s koloniálním bičíkovcem rodu *Stephanosphaera* řazen do čeledi Haematococcaceae na základě přítomnosti cytoplasmatických provazců propojujících protoplast s buněčnou stěnou (Buchheim et al. 2002). Z této čeledi se pouze u druhu *H. pluvialis* vyskytuje syntéza červeného sekundárního karotenoidu astaxanthinu, díky které je tento druh biotechnologicky významný.

Výsledky studie zkoumající vzájemnou příbuznost druhů *Haematococcus buetschlii*, *H. capensis*, *H. droebakensis*, *H. pluvialis*, *H. zimbabwiensis* a *Stephanosphaera pluvialis* (Buchheim et al. 2013) ale monofylii rodu *Haematococcus* zpochybňují. Ukázalo se, že druhy patří do dvou odlišných linií, přičemž v první je zastoupen pouze typový druh *H. pluvialis*, který byl zařazen do skupiny Chlorogonia do blízké přítomnosti druhu *Ettlia carotinos*, která také produkuje astaxanthin, oba druhy navíc vykazují značnou podobnost v genech pro malou ribozomální podjednotku. Všechny ostatní druhy původně řazené do rodu *Haematococcus* patří společně s rodem *Stephanosphaera* do druhé linie náležející do sesterské skupiny Stephanosphaerina. Proto byly tyto druhy přemístěny do nového rodu *Balticola*, od kterého se *H. pluvialis* odlišuje uniformně tenkými cytoplasmatickými provazci a přítomností 3 nebo více pyrenoidů.



Obr. č. 4: Fylogenetický strom sestavený na základě analýzy dat z genetických sekvencí 18S RNA. (podle Buchheim et al. 2013)

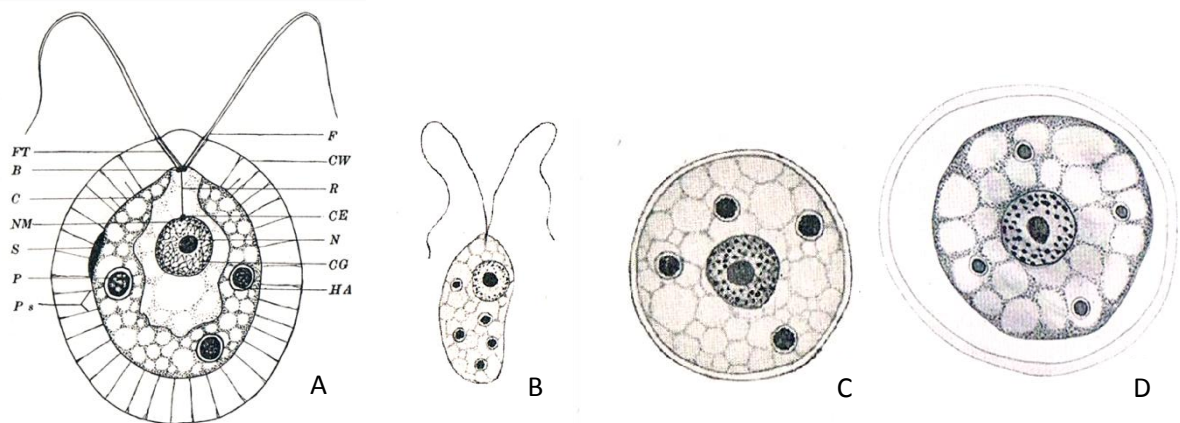
U *H. pluvialis* byla zjištěna poměrně velká vnitrodruhová diverzita (Mostafa et al. 2011), především u kmenů z různých geografických oblastí. Proto by bylo dobré obohatit omezené zdroje v kulturách o nové izoláty z dalších oblastí a stanovišť, které mohou mít jiné zajímavé

vlastnosti s potenciálním využitím pro kultivaci za biotechnologickými účely. Například byla popsána izolace kmenu, který vykazoval zvýšenou toleranci ke koncentraci solí, proto by k jeho kultivaci mohla být využita brakická voda, což může být výhodné v oblastech s nedostatkem sladké vody (Chekanov et al. 2014). Diverzita mezi kmeny může také poskytnout vysvětlení pro odlišné výsledky studií, které se zabývají kultivačními podmínkami.

H. pluvialis se vyskytuje celosvětově ve sladké vodě v mělkých nádržkách periodicky zaplavovaných vodou (Hazen 1899), které se mohou tvořit ve skalních prohlubních, v betonu, příkopech u silnice, na hřbitovech nebo v ptačích koupalištích (Proctor 1957). Může se vyskytovat i v brakické vodě na skalách na mořském pobřeží (Chekanov et al. 2014). Jeho nepřítomnost ve větších a vytrvalých vodních plochách pravděpodobně není způsobena samotnými vlastnostmi prostředí, ale velkou citlivostí ke kompetici, především k inhibičním látkám produkovaným jinými řasami, které mu brání v růstu. Přizpůsobení k přečkávání stresových podmínek jako je vyschnutí, vyšší ozáření nebo teplota ve formě aplanospor, mu naopak umožňují přežít i na místech, kde je kompetice velmi nízká (Proctor 1957).

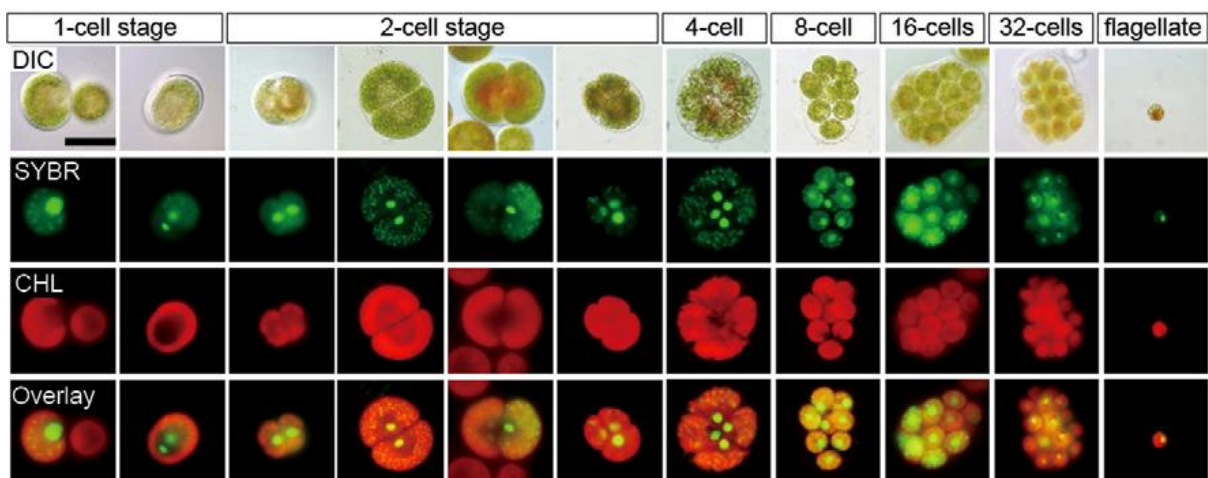
3 Životní cyklus

Haematococcus pluvialis má poměrně složitý životní cyklus. Hazen (1899) a Elliott (1934) shodně popisují výskyt čtyř odlišných morfologických stádií, konkrétně se jedná o pohyblivé megazooidy (= zoospory) velké až 50 µm s dvěma apikálními bičky vystupujícími z papily a s tenkými cytoplazmatickými provazci, které propojují protoplast s buněčnou stěnou, oválné dvoubičíkaté mikrozooidy (pravděpodobně se jedná o gamety) s velikostí nepřesahující 20 µm, kromě velikosti se od megazooidů odlišují i slabší buněčnou stěnou a jádrem posunutým do přední části buňky, nepohyblivé kulaté palmely a tlustostěnné aplanospory (= akinety, cysty).



Obr. č. 5: Schematické znázornění jednotlivých stádií životního cyklu *H. pluvialis*. A: megazooid; B: mikrozooid; C: palmela; D: aplanospora; B bazální tělíska; C chloroplast; CE centrozom; CG chromatinové granule; CW buněčná stěna; F flagellum; FT flagelární tubulus; HA hyalinní oblast; N nukleolus; NM jaderná membrána; P pyrenoid; Ps protoplazmatické provazce; R rhizoplast; S stigma. (Elliott 1934)

Po přenesení do čerstvého média se cysty začínají dělit, zvětšují svůj objem, takže dojde k prasknutí mateřské buněčné stěny. Vytvoří se v nich 2-32 dceřiných zoospor, které jsou následně uvolněny do okolí (Wayama et al. 2013). V přirozených podmínkách k tomu dochází většinou brzo ráno (Hazen 1899, Elliott 1934).

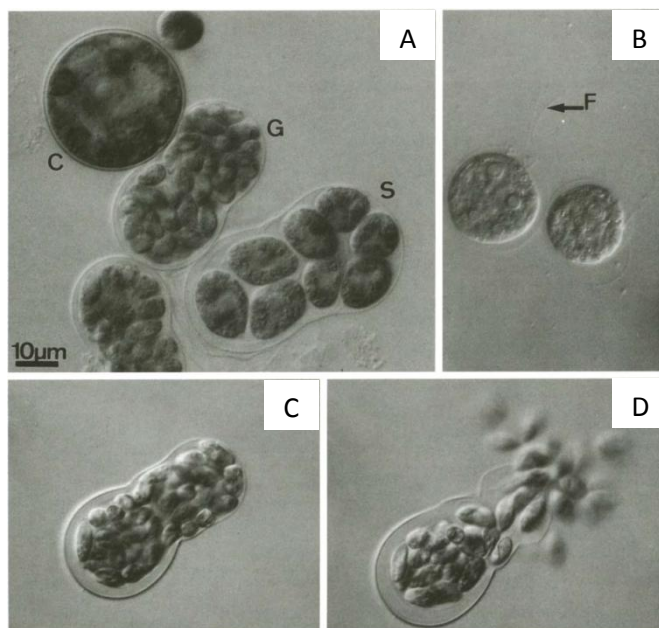


Obr. č. 6: Životní cyklus *H. pluvialis*: dělení cysty na 32 dceřiných zoospor. Fotografie z fluorescenčního mikroskopu. DIC: diferenční interferenční kontrast; SYBR: jádra barvená SYBR Green I; CHL: autofluorescence chlorofylu; Overlay: překrytí obrazů SYBR a CHL. (Wayama et al. 2013)

Zoospory se poté dál dělí, nejdříve ztratí bičík a zakulatí se, z těchto buněk jsou opět uvolňováni bičíkovci, kteří se po nějaké době přemění na kulaté bezbičíkaté palmely. Lee & Ding (1994) pozorovali, že k transformaci dojde po 5 buněčných děleních. V ostatních studiích tento jev pozorován nebyl, kultura naopak zůstávala v pohyblivé fázi déle (Hazen 1899, Elliott 1934), tudíž je možné, že omezený počet dělení nebyl determinován geneticky, ale došlo k němu v důsledku použitých kultivačních podmínek.

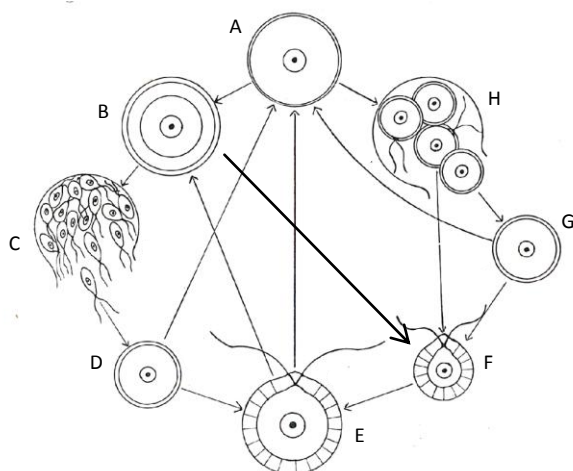
U palmel opět dochází k dělení, při kterém mohou být tvořeny další palmely nebo zoospory (Elliott 1934). Při přechodu do stresových podmínek se palmely transformují na tlustostěnné odpočívající akinety. Tato transformace může výjimečně proběhnout i u zoospor (Wayama et al. 2013, Elliott 1934), pokud dojde ke změně podmínek velmi rychle, při pomalejší změně ale nejdříve dochází k přeměně na palmely. Akinety dále zvětšují svůj objem (Hazen 1899) a získávají tmavě červenou barvu vlivem silné akumulace astaxanthinu. Ve formě těchto odolných cyst může *H. pluvialis* přečkávat nepříznivá období jako je vyschnutí nebo mráz. Jakmile se podmínky znovu zlepší, uvolní se z cyst zoospory a celý cyklus se opakuje.

Za určité situace se může z cyst uvolňovat místo velkých zoospor až 64 malých oválných dvoubičíkatých buněk (Triki et al. 1997, Elliott 1934), které se kromě velikosti odlišují i slabší buněčnou stěnou a jádrem posunutým do přední části buňky. Hazen (1899) pozoroval tvorbu těchto mikrozooidů, pokud byla kultura opakovaně vystavena mrznutí a tání nebo pokud došlo k postupnému vysušení akinet. Elliott (1934) oba tyto pokusy neúspěšně opakoval, místo toho navrhnul metodu umístění akinet ze starého agaru na noc do převařené vody. V jiné práci (Triki et al. 1997) byly tyto buňky získány po přidání čerstvého média do 1-4 měsíce starých kultur. Z toho je patrné, že indukovat gametogenezi v laboratorních podmínkách je poměrně obtížné a že je sexualita vždy indukována stresovými faktory. Všechny tyto studie uvádějí, že se gamety před uvolněním aktivně pohybují uvnitř mateřské buněčné stěny a poté velmi rychle plavou. V této formě ale nevydrží déle než den, postupně zpomalují, až nakonec dojde k jejich zakulacení a přeměně na palmeloidní bezbičíkaté buňky, které se mohou dále dělit a pokračovat v asexuální reprodukci, jaká byla popsána výše. Ani jednomu z těchto autorů se nepodařilo pozorovat splývání mikrozooidů, což ale nevylučuje, že plní funkci gamet. Je možné, že aby došlo k syngamii, musí být přítomné dva různé rozmnožovací typy, které se v daném izolovaném kmenu nemusí vyskytovat. Že se pravděpodobně jedná o gamety, podporuje studie Chekanova et al. (2014), ve které autoři pozorovali jejich konjugaci, která připomínala izogamii. Nicméně stále není jasné, co se děje po syngamii a kdy dochází k redukčnímu dělení.



Obr. č. 7: Gametogeneze u *H. pluvialis*. A: cysta (C), gametocysta (G) a sporocysta (S); B: vegetativní zoospory, F = bičík; C: gametocysta před uvolněním gamet; D: uvolňování gamet z gametocysty. (Triki et al. 1997)

Lee & Ding (1994) popisují splývání velkých bičíkovců, ke kterému docházelo před tvorbou palmel. Pozorování podkládají měření obsahu DNA v kultuře, jenž byl v dané době dvojnásobný oproti fázi životního cyklu, která byla tvořená pouze bičíkovci. Pokud by k této konjugaci megazooidů opravdu docházelo, jednalo by se v případě palmel pravděpodobně o zygoty. Žádný z ostatních autorů nic podobného nepopisuje a přítomnost menších bičíkovců v životním cyklu, kteří svým vzhledem i okolnostmi vzniku odpovídají gametám mnohem lépe, tuto možnost spíš vyvrací. Jediný, kdo se o splývání megazooidů také zmiňuje, je Hazen (1899), ten ale uvádí, že se pravděpodobně jedná o důsledek nedokonalého rozdělení dvou buněk, protože k sobě byli oba bičíkovci připojeni posteriorními konci. Jednou pozoroval celý proces, kdy se bičíkovec začal dělit a po neúplné cytokinezi došlo opět k fúzi a následné tvorbě buňky podobné cystě.



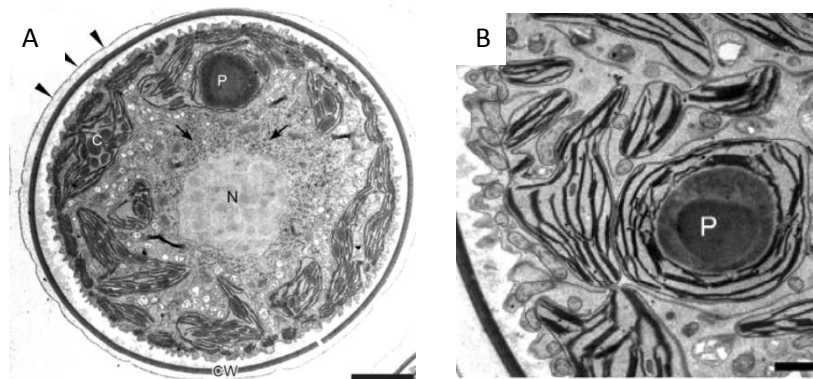
Obr. č. 8: Schematické znázornění životního cyklu *H. pluvialis* bez pohlavního rozmnožování. A: dospělá palmela; B: akineta; C: mikrozooidy; D+G: mladé palmely; H: dělení palmely na palmely nebo zoospory; F: mladá zoospora; E: dospělá zoospora. (podle Elliott 1934)

4 Ultrastrukturální a fyziologické změny v průběhu životního cyklu

V buňkách *H. pluvialis* dochází v průběhu jejich životního cyklu k velkému množství ultrastrukturálních i fyziologických změn, které jsou často spojené s odpovědí na stresové podmínky v prostředí, jež jsou přirozenou součástí životního cyklu této řasy. Případné strukturální změny spojené s pohlavním rozmnožováním nejsou vzhledem k nízkému počtu pozorování gamet detailněji prozkoumány, ale zdá se, že jsou gamety svou ultrastrukturou značně podobné zoosporám (Triki et al. 1997). V životním cyklu dochází ke změnám především na úrovni chloroplastu a buněčné stěny, významné jsou i změny spojené s akumulací astaxanthinu a lipidů.

4.1 Změny na úrovni chloroplastu

Po uvolnění mladých zoospor z cyst v čerstvém médiu u nich dochází ke zvýšené syntéze chlorofylu (Kobayashi et al. 1997). Parietální fragmentovaný chloroplast obsahuje kontinuální thylakoidy v lamelách po 2 až 6, přítomné jsou i typické výrazné pyrenoidy, v jejichž blízkosti je možné najít extrapyrenoidální škrobová zrna, přítomné je i intraplastidiální stigma, které je tvořeno jedinými většími lipidovými tělísky přítomnými v chloroplastovém stromatu (Santos & Mesquita 1984, Chekanov et al. 2014). Zoospory i gamety vykazují výraznou fototaxi (Hazen 1899). Pokud jsou zoospory vystaveny vyššímu ozáření, dochází u nich k úbytku chlorofylu a poškození fotosystému II, významně se zvýší produkce ROS, která posléze způsobí peroxidaci membránových lipidů, jež nakonec může vést až k buněčné smrti (Han et al. 2012).



Obr. č. 9: Ultrastruktura chloroplastu. A: rozložení chloroplastu v buňce; B: detail chloroplastu s pyrenoidem. C – chloroplast; N – jádro; P – pyrenoid. Měřítko v A odpovídá 5 μm , měřítko v B odpovídá 1 μm . (podle Wayama et al. 2013)

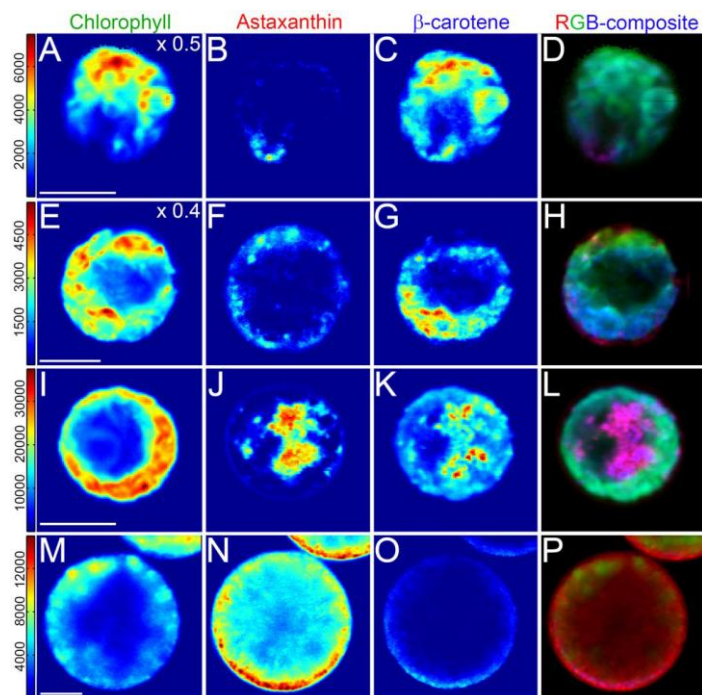
U zelených palmel jsou stále přítomné parietální chloroplasty s neporušenými thylakoidy, které mohou představovat až 41,7 % buněčného objemu (Wayama et al. 2013). V souvislosti s transformací na cysty bývá popisováno postupné rozkládání thylakoidních membrán pozorovatelné jako jejich rozvolňování směrem od okrajů (Wayama et al. 2013, Gu et al. 2013). Autoři jiných studií naopak žádné známky degradace thylakoidů v nepohyblivých stádiích životního cyklu nepozorují (Santos & Mesquita 1984, Han et al. 2012). Tyto odlišné výsledky

mohou být zapříčiněné různě vysokým množstvím stresu, kterému byly buňky během kultivace vystaveny. S postupnou akumulací astaxanthinu souvisí zmenšení chloroplastového objemu, ale fotosyntetická aktivita zůstává zachována, přinejmenším v podmínkách dlouhodobější aklimace, v některých parametrech je však odlišná od fotosyntézy zoospor (Gu et al. 2013). V thylakoidních membránách dochází ke značnému úbytku cytochromu f, který může dosahovat až 60 % původního obsahu, tím je omezen elektronový transport mezi oběma fotosystémy, což vede ke snížené produkci ROS (Han et al. 2012). Tato redistribuce energie mezi PSI a PSII vede k vyšší aktivitě PSI, která může být spojena i s vyšší potřebou produkce ATP pro syntézu astaxanthinu (Gu et al. 2013).

Ve stádiu cysty může být celková hmota chloroplastu snížena až na 9,7 % buněčného objemu, zmenšuje se i objem matrix pyrenoidu, konkrétně z 3,5 % na 0,2 %. Obě tyto struktury ale zůstávají v cystách zachovány, což hraje významnou roli v jejich rychlém obnovení po zlepšení podmínek (Wayama et al. 2013). Collins et al. (2011) popisuje, že je chloroplast v tomto stádiu lokalizován na buněčné periférii, ale později bylo s využitím jiných zobrazovacích metod zjištěno, že degradovaný chloroplast získává síťovitou morfologii a je distribuován po celé buňce (Wayama et al. 2013, Nogami et al. 2014).

4.2 Změny spojené s akumulací astaxanthinu

Akumulace astaxanthinu v buňkách je zároveň spojená se syntézou mastných kyselin, především olejové 18:1 a palmitové 16:0 (Wayama et al. 2013), se kterými tvoří estery, a s tvorbou triacylglycerolů, v nichž je astaxanthin rozpuštěn a které spolu s ním tvoří lipidová tělíska. Lipidy zároveň mohou zvyšovat buněčnou toleranci ke stresu (Gu et al. 2013). Přítomnost astaxanthinu v buňce může být především na snímcích z transmisní elektronové mikroskopie identifikována s umístěním lipidových tělísek, což je podpořeno skutečností, že je fluorescence astaxanthinu přesně kolokalizována s fluorescencí lipofilní barvy Nile Red (Wayama et al. 2013). Další látkou, u níž dochází vlivem akumulace astaxanthinu ke změnám, je β -karoten, který se nejprve nachází v chloroplastu, ale posléze dochází k jeho transportu přes chloroplastovou membránu (Wayama et al. 2013). Jeho poměrně vysoké koncentrace mimo chloroplast jsou kolokalizované s výskytem astaxanthinu, což podporuje hypotézu, že je β -karoten prekurzorem pro jeho syntézu (Collins et al. 2011). S tímto faktem může souviset i pozorování, že se množství β -karotenu ve starších kulturách výrazně snižuje (Nogami et al. 2014).



Obr. č. 10: Změny v koncentraci a lokalizaci chlorofylu, astaxanthinu a β -karotenu v průběhu životního cyklu. A-D: zoospora; E-H: palmela při neinduktivních podmínkách; I-L: palmela po 24 hod vystavení induktivním podmínkám; M-P: aplanospora. Měřítka vždy představuje 10 μm . D, H, L a P představují RGB kompozit vytvořený z obrazů koncentrací jednotlivých pigmentů, barvy odpovídají barvě názvu sloučenin. Škály intenzity signálu se u jednotlivých stádií liší, ale v rámci jednoho stádia intenzita představuje relativní koncentrace pigmentů. (podle Collins et al. 2011)

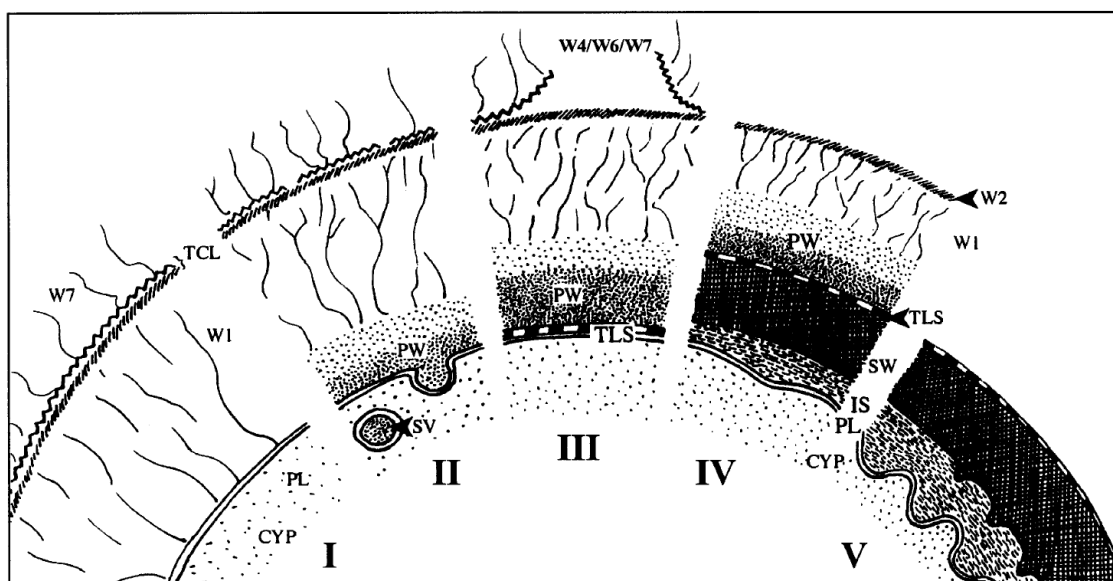
V oranžových palmelách bylo detekováno i zvýšené množství violaxanthinu, který také přispívá k syntéze astaxanthinu (Gu et al. 2013). Do procesu syntézy je nejspíš zapojené endoplazmatické retikulum, protože jsou s ním úzce asociována tělíska, v nichž se astaxanthin hromadí (Santos & Mesquita 1984).

Přestože je akumulace astaxanthinu a lipidů spojená především s nepohyblivými stádii životního cyklu, může k ní docházet i u zoospor, i když pouze ve snížené míře (Barlow et al. 2014). Lee & Ding (1994) ve své studii uvádí, že syntéza může u zoospor v některých podmínkách probíhat dokonce stejně rychle jako u nepohyblivých stádií, ale míra akumulace je pomalejší než dělení, proto v buňkách zoospor není pozorován žádný výrazný nárůst v obsahu sekundárních karotenoidů. V palmelách se lipidová tělíska typicky začínají tvořit okolo jádra, na němž nejprve tvoří čepičku, která se posléze rozšíří okolo celého jádra. Později množství tělísek stále narůstá a posouvá se směrem k periférii (Santos & Mesquita 1984, Collins et al. 2011). Postupně dochází k fúzi malých tukových kapének, výsledkem je menší počet velkých tělísek (Santos & Mesquita 1984, Wayama et al. 2013). V dospělých cystách mohou být tukové kapénky obsahující astaxanthin distribuovány po celé cystě a tvořit až 52,2 % objemu (Wayama et al. 2013, Chekanov et al. 2014). Přenesení cysty do čerstvého média je spojeno s rychlým rozložením sekundárních karotenoidů, dochází tak k obnovení původního zeleného zbarvení (Santos & Mesquita 1984).

4.3 Změny ve struktuře a složení buněčných obalů

V průběhu životního cyklu *H. pluvialis* prochází výraznými změnami i struktura a složení buněčných obalů. Zoospory jsou na začátku obklopené silnou vrstvou extracelulární matrix (Wayama et al. 2013) tvořenou převážně glykoproteiny (Hagen et al. 2002), kterou prostupují úzké cytoplasmatické provazce obsahující mitochondrie (Santos & Mesquita 1984). První vrstva (W1) této extracelulární matrix je naplněná rozvolněnou sítí vláken a granulóznicích struktur. Nad ní se nachází tripartitní krystalická vrstva (W2, W4, W6), jejíž vnější povrch je tvořen mozaikou krystalických plátků, které jsou spojené defektními zónami z amorfního materiálu. Poslední část zajišťující kontakt s médiem tvoří vrstva vláken (W7) se strukturou podobnou vrstvě W1 (Hagen et al. 2002).

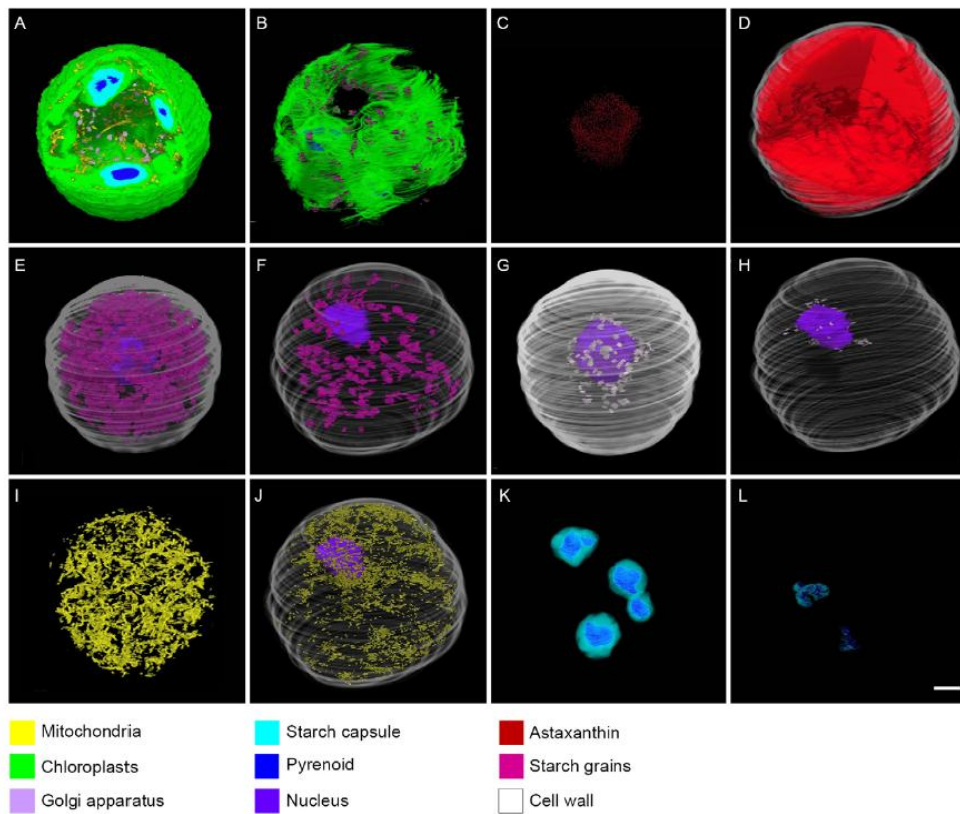
Jakmile po nějaké době od uvolnění zoospor dojde zakulacením jejich protoplastů a ztrátou bičíků k transformaci na palmely, začne se pod původní extracelulární matrix tvořit nová pevná buněčná stěna obsahující celulózu. Nejprve se na periferii jádra objevují váčky naplněné elektronodenním materiálem, které nakonec fúzí s cytoplasmatickou membránou. Z tohoto materiálu, sekretovaného do vnitřní části první vrstvy extracelulární matrix W1, se vytvoří nová dvojrstevná amorfní buněčná stěna silná 150-200 nm. V této době zároveň dochází k rozpadu vnějších vrstev W4, W6 a W7. Nejdříve se objevují praskliny v krystalické vrstvě W6 a následně se vnější vrstvy odloupnou po celém povrchu buňky, zachovány zůstávají pouze vrstvy W1 a W2. V podmínkách indukujících přeměnu na aplanospory vzniká pod primární buněčnou stěnou obal tvořený třemi vrstvami elektronodenního materiálu (TLS1-3) obsahující sloučeninu algaenan, která je chemicky podobná sporopoleninu. Tato vrstva může sloužit jako ochrana před vysušením a před účinky ultrafialového záření (Blokker 2000, Hagen et al. 2002). Současně v buňce dochází i k syntéze sekundárních karotenoidů, které jsou také spojené se zvýšenou odolností vůči vnějšímu stresu. Poté dojde k oddělení buněčné stěny od cytoplasmatické membrány a v meziprostoru se hromadí granulózní materiál. Pod trojvrstevným obalem (TLS) posléze vzniká objemná sekundární buněčná stěna typická pro aplanospory. Nejdříve je její vnitřní povrch hladký, ale po dosažení tloušťky 1,8-2,2 μm dochází k jejímu zprohýbání směrem dovnitř, které je poté kopírováno i zvlněním cytoplasmatické membrány. U starších buněk se rozpadají vnější vrstvy obalu tvořené primární buněčnou stěnou a zbytky extracelulární matrix. Po několika měsících kultivace může buněčná stěna aplanospor tvořit až 16% celkové hmotnosti sušiny (Hagen et al. 2002).



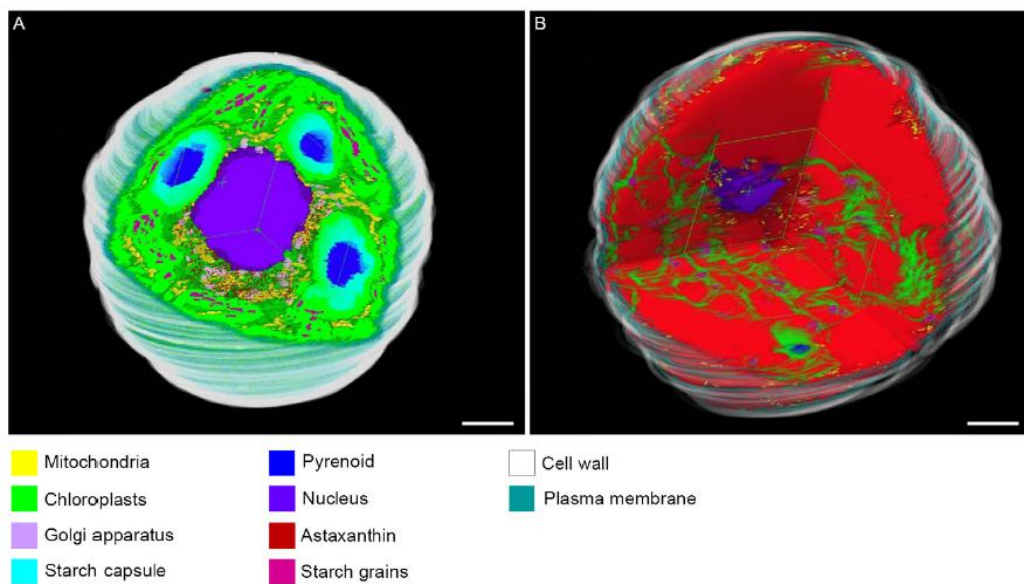
Obr. č. 11: Souhrnné schematické zobrazení 5 vývojových stavů buněčné stěny během morfogeneze směřující k tvorbě aplanospor *H. pluvialis*. CYP: cytoplasma; IS: meziprostor mezi buněčnou stěnou a plasmalemou; PL: plasmalema; PW: primární buněčná stěna; SV: sekreční váček; SW: sekundární buněčná stěna; TCL: tripartitní krystalická vrstva; TLS: trojvrstevný obal; W1-W7: vrstvy extracelulární matrix. (Hagen et al. 2002)

4.4 Další změny v průběhu životního cyklu

Kromě těchto změn byla v souvislosti s encystací pozorována řada dalších ultrastrukturálních a fyziologických proměn. Snižuje se relativní objem jádra, cisteren Golgiho aparátu i mitochondrií. Počet mitochondrií se ale během transformace nijak výrazně nezměnil (Wayama et al. 2013). Encystace je spojená i s degradací proteinů, germinace naopak s jejich syntézou (Kobayashi et al. 1997). Zároveň se mění i proteinové složení. V zelených buňkách je zvýšené množství proteinů, které jsou zapojeny do syntézy RNA, vazby bází a do metabolických procesů, tím je umožněna rychlá a aktivní buněčná proliferace a akumulace biomasy. S transformací do stádia cisty naopak souvisí větší zastoupení proteinů zapojených do redoxní regulace, transportu kyslíku nebo změn pH, celkově se jedná o proteiny úzce spojené s odpovědí na stres (Gu et al. 2013). Kromě lipidů narůstá v palmelách i množství škrobu, který je uložený uvnitř chloroplastu v zrnech umístěných především okolo pyrenoidů (Wayama et al. 2013). Jeho zvýšená tvorba může souviset s reakcí na stres způsobený nadměrným ozářením, v chloroplastu dochází ke zrychlené asimilaci uhlíku, ze kterého je následně syntetizován škrob, tím se využije velké množství elektronů generovaných v elektrontransportním řetězci a omezí se tak i tvorba ROS. Škrob poté slouží jako přechodná zásobárna energie a uhlíku pro syntézu lipidů a astaxanthinu (Han et al. 2012). S tím souvisí i značný úbytek množství škrobových zrn v cystách (Wayama et al. 2013).



Obr. č. 12: 3D TEM zobrazení subbuněčných komponent u palmel a cyst *H. pluvialis*. A, C, E, G, I a K představují zelenou palmelu; B, D, F, H, J a L představují cystu. A, B: rekonstrukce chloroplastu s pyrenoidy, mitochondriemi a škrobovými zrny; C, D: distribuce astaxanthinu; E, F: škrobová zrna a jádro; G, H: Golgiho aparát a jádro; I, J: mitochondrie (společně s jádrem v J); K, L: pyrenoidy a škrobové kapsule. Měřítko představuje 5 μm . (podle Wayama et al. 2013)



Obr. č. 13: 3D TEM zobrazení celých buněk. A: řez zelenou palmelou; B: řez cystou. Měřítko představuje 5 μm . (podle Wayama et al. 2013)

5 Kultivace

5.1 Metody kultivace

Kromě výběru média a optimálního nastavení kultivačních parametrů, jako je osvětlení, teplota nebo provzdušnění kultury, je pro efektivní kultivaci samozřejmě klíčový celkový kultivační postup ve zvoleném typu bioreaktoru. Pro kultivaci *H. pluvialis* je možné použít dva hlavní přístupy.

Prvním z nich je jednofázový způsob kultivace, v němž jsou po celou dobu kultivace zachovány stejné podmínky, při kterých dochází zároveň k akumulaci biomasy i k syntéze astaxanthinu. Pro tento přístup je vhodné použít metodu nepřetržité kultivace, která spočívá v udržování kultury po celou dobu ve fotoautotrofické fázi. Kultivace funguje na principu fotochemostatu v kontinuálním režimu, je nastavena konstantní míra ozáření a ředění a do bioreaktoru je konstantní rychlostí přidáváno čerstvé médium. Tím je dosaženo kultury s aktivně rostoucími a dělicími se buňkami, ve kterých je průběžně akumulován astaxanthin vlivem ubývajících množství dostupného nitrátu, jehož koncentrace musí být nastavena tak, aby nebyla limitující pro růst, ale zároveň aby vedla k syntéze astaxanthinu. Těmto požadavkům odpovídá koncentrace nitrátu přibližně 5,7 mM. S využitím metody kontinuální kultivace je možné dosáhnout produktivity astaxanthinu 5,6 mg/l za den, obsah astaxanthinu může odpovídat 0,8 % sušiny (Del Río 2005).

Výhodou tohoto přístupu je jeho jednoduchost a nepřetržitá produkce biomasy i astaxanthinu. Vzhledem k průběžnému doplňování média a ředění kultury nedochází k vyčerpání živin a růstová rychlost během kultivace neklesá, stále má konstantní hodnotu, která ale není příliš vysoká, proto je tato metoda méně vhodná pro produkci v průmyslovém měřítku (Park et al. 2014). Další nevýhodou může být vyšší náchylnost ke kontaminaci během dlouhodobé kultivace. Vzhledem k požadavkům na nepřetržité ozáření se tento způsob příliš nehodí pro venkovní kultivace (Aflalo et al. 2007).

Druhou možností je využití dvojfázové kultivace, která spočívá ve vytvoření různých podmínek pro zelenou fázi, u níž je hlavním cílem produkce biomasy, a pro červenou fázi, ve které dochází k akumulaci astaxanthinu. Pro dosažení optimálních výsledků v každé fázi jsou totiž vhodné jiné podmínky, proto je dobré od sebe obě fáze oddělit. Tím je možné dosáhnout vyšší produktivity astaxanthinu, jež může být dokonce i po zprůměrování hodnot získaných v obou kultivačních fázích více než dvojnásobná oproti kontinuální kultivaci. Buňky *H. pluvialis* mohou v červené fázi akumulovat astaxanthin v množství až do 4 % sušiny, což je hodnota pětikrát vyšší než výtěžek z kontinuální kultivace, kde se množství astaxanthinu pohybuje okolo 0,8 % sušiny. Díky vyššímu obsahu astaxanthinu je pro dosažení stejného výsledného zbarvení svaloviny ryb a korýšů v akvakulturách potřeba mnohem méně biomasy. Další výhodou je, že zde astaxanthin

tvoří až 95 % všech karotenoidů, zatímco při kontinuální kultivaci je v buňkách mnohem vyšší podíl jiných karotenoidů, například luteinu nebo β -karotenu, které musí být pro získání čistého astaxanthinu ze směsi odděleny. Při dvojfázové kultivaci je také možné vyprodukovanou biomasu snadněji sklídit, protože těžké cysty klesají vlivem gravitace ke dnu. Odtud se dají poměrně snadno získat, zatímco v případě pohyblivých bičíkovců to je značně obtížnější. Z těchto důvodů je dvojfázový přístup vhodnější pro masovou produkci, navíc je lépe využitelný i pro venkovní kultivaci. Pro tu je vzhledem k náročnějším podmínkám vhodné, aby byly buňky odolnější vůči mechanickým i dalším vlivům, což tlustostěnné cysty z červené fáze splňují mnohem lépe než náchylnější bičíkovci (Aflalo et al. 2007).

Haematococcus pluvialis je možné v rámci dvojfázového přístupu kultivovat několika způsoby s využitím různých typů uzavřených fotobioreaktorů s umělým regulovaným osvětlením nebo metodou extenzivní velkoplošné venkovní kultivace, jejíž použití ale není v podmínkách mírného pásu severní polokoule vzhledem k vysokým nárokům na míru slunečního záření příliš vhodné, a proto nebude dále podrobněji popisována.

5.1.1 Batch kultivace

Asi nejjednodušším způsobem kultivace je metoda, při které je inokulum přeneseno do nádoby s počáteční koncentrací živin, médium není v průběhu kultivace doplňováno. Typicky je fotobioreaktor představován skleněným sloupcem, ve kterém je kultura probublávána vzduchem s 1,5% koncentrací CO_2 (Aflalo et al. 2007, Chekanov et al. 2014).

Nevýhodou této kultivace je, že v jejím průběhu postupně dochází k úbytku živin, které jsou tudíž pro buňky méně dostupné, zároveň se v médiu hromadí inhibiční metabolity produkované buňkami. Z těchto důvodů dochází ke snížení růstu, který se ve vyšších hustotách buněk relativně brzy dokonce zastaví (Park et al. 2014).

Ale na druhou stranu může být aplikace této metody levnější vzhledem k poměrně jednoduché konstrukci fotobioreaktoru. V průběhu kultivace navíc nedochází k vyšší spotřebě média, tudíž se šetří vodou i živinami. Pokud by na začátku byla správně nastavena koncentrace prvků v médiu, mohla by být tento způsob poměrně efektivní.

5.1.2 Fed-batch kultivace

O něco složitější je kultivace, v jejímž průběhu jsou do kultury postupně přidávány živiny v podobě malého množství koncentrovaného média. To může být přidáváno například na základě měření změn pH v kultuře (Hata et al. 2001). Během kultivace v tomto případě nedochází ke spotřebování živin, takže bývá dosahováno vyšší produkce biomasy než u batch kultivace, ale i zde dochází k akumulaci iontů a inhibičních metabolitů, které ve vyšší hustotě kultury zpomalují růstovou rychlost. Buňky nejsou schopné využít všechny dostupné živiny a

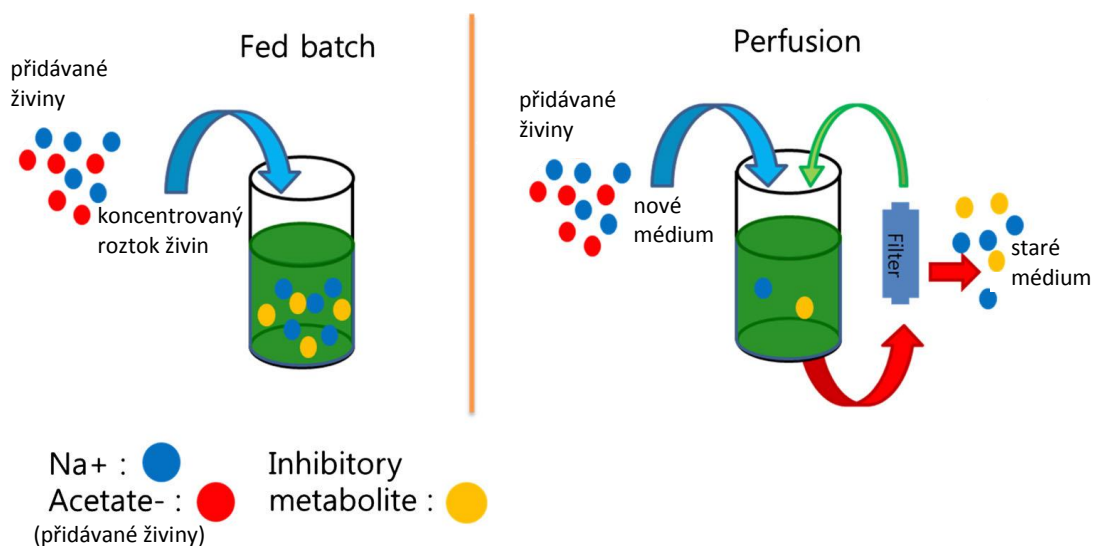
v konečné fázi kultivace stejně jako u předchozí metody biomasa téměř nepřibývá (Park et al. 2014).

5.1.3 Perfuzní kultivace

Další možností je perfuzní kultivace, která spočívá v opakovaném nahrazování starého média čerstvým. Buňky jsou kultivovány ve fotobioreaktoru a poté jsou zadrženy v usazovací komoře, z níž je odstraněn supernatant tvořený starým médiem. Zbytek husté buněčné kultury je recyklován a navrácen zpět do bioreaktoru, do kterého je průběžně doplňováno čerstvé médium. Aby v usazovači nedocházelo společně s odstraňováním supernatantu i k vyplachování buněk, je dobré, aby byla rychlost perfuze (neboli toku kultury z bioreaktoru do usazovače) dvakrát vyšší než rychlost doplňování čerstvého média. Tím je médium doplňováno stejnou rychlostí, jakou je kultura recyklována (tok z usazovače zpět do bioreaktoru).

Díky tomuto postupu nedochází ke spotřebování živin v médiu a navíc nedochází ani k inhibici růstu metabolity a ionty solí, které se zde nehromadí, ale jsou odstraněny spolu se starým médiem. Proto jsou buňky schopné efektivně využít dostupné živiny, nedochází zde k redukci růstové rychlosti, proto je možné v kultuře dosáhnout vysoké buněčné denzity. Koncentrace biomasy po 14 dnech dosahuje až 2,47 g/l, produktivita se může pohybovat okolo 0,18 g/l za den (Park et al. 2014).

Nevýhodou této kultivace je vyšší spotřeba vody vlivem kontinuální výměny média a náročnější konstrukce fotobioreaktoru.

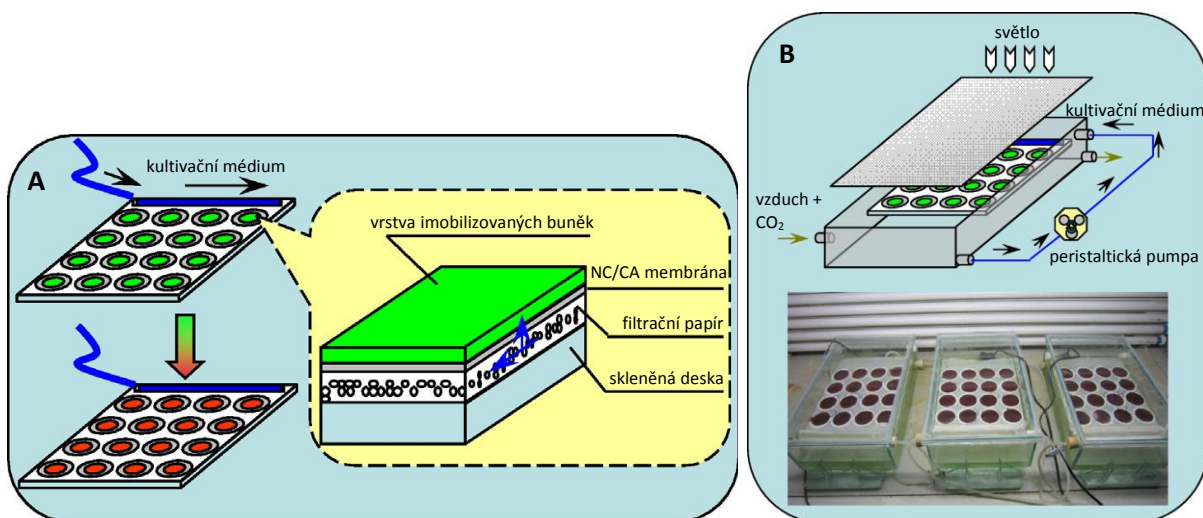


Obr. č. 14: Schematické porovnání fed-batch a perfuzní metody kultivace. (podle Park et al. 2014)

5.1.4 Attached kultivace

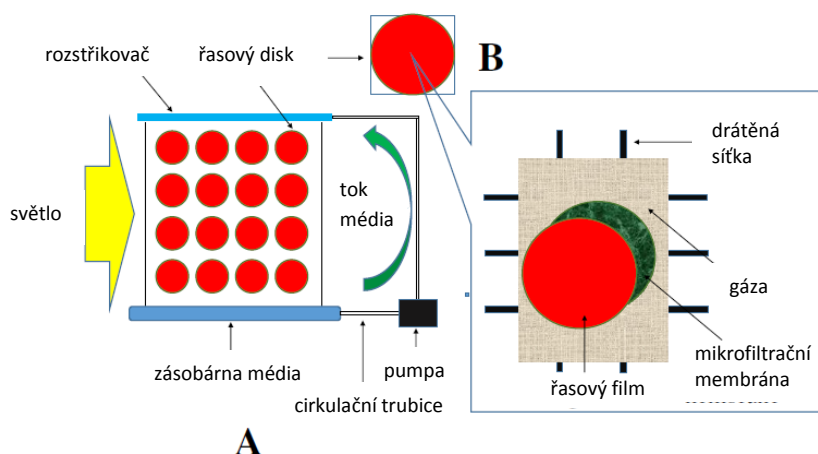
Hlavním principem této metody je umístění zelených buněk získaných klasickou kultivací ve vodním sloupci na membránu, na které zůstanou přichyceny po celou dobu druhé fáze kultivace zaměřené na produkci co největšího množství astaxanthinu. Tato metoda v podstatě napodobuje přirozené podmínky, protože i v přírodě dochází k nejvyšší akumulaci astaxanthinu v buňkách uchycených na stěnách nádržek (Wan et al. 2014, Hazen 1899). Samotná kultivace může být uspořádána různými způsoby.

Ve studii provedené týmem Zhang et al. (2014) je využit systém laminárního kultivačního modulu, který je umístěn s náklonem v úhlu 5° vůči horizontální rovině ve skleněné komoře, náklon byl zvolen proto, aby médium dodávané na vrchní stranu desky modulu mohlo vlivem gravitace rovnoměrně navlhčit celou kultivační plochu. Samotný modul je mnohvrstevná struktura tvořená skleněnou deskou, na které je umístěna vrstva filtračního papíru, nejvyšší vrstva je pak tvořena řasovými disky. Ty jsou vytvořené opatrným přefiltrováním buněk získaných centrifugací ze zelené kultury na nitrocelulóзовou/acetátovo-celulóзовou membránu. Buňky se tak nachází ve velké hustotě a dojde k jejich oddělení od tekutého média. Médium může být dodáváno dvěma způsoby. U necirkulujícího módu nedochází k žádné recyklaci, použité médium je odváděno ze dna komory a nahrazováno novým, díky čemuž jsou řasy zásobeny stále stejným množstvím živiny, ale dochází k vyšší spotřebě média. Cirkulační způsob je naopak založen na kompletní recyklaci média, jehož objem je stálý po celou dobu (výpar je kompenzován přidáváním deionizované vody). Živiny jsou tudíž postupně spotřebovávány, ale nároky na množství média jsou mnohem nižší, proto je tento způsob pro kultivaci vhodnější.



Obr. č. 15: A: Schematické znázornění použitého fotobioreaktoru; B: Uspořádání pro cirkulační způsob dodávání média. Pro necirkulační mód byla odstraněna peristaltická pumpa, čerstvé médium dodávané na vrchní stranu pouze stékalo dolů vlivem gravitace. (Zhang et al. 2014)

Trochu odlišný způsob kultivace zvolil tým Wan et al. (2014). Zde byly buňky ze zelené fáze přefiltrovány přes mikrofiltrační membránu s velikostí pórů $0,2 \mu\text{m}$, na níž následně vytvořily hustý biofilm. Tato membrána byla umístěna na vrstvu gázy podloženou drátěnou sítkou, která byla umístěná vertikálně do nádoby s médiem. Aby bylo možné membránu s biofilmem zafixovat, byly na její okraj připevněny malé magnety, které byly přitahovány ke kovové síťce. Médium bylo aplikováno rozstřikovačem na vrchní okraj gázy, pronikalo gázou a membránou a tímto způsobem zvlhčovalo řasové disky.



Obr. č. 16: A: Schéma uspořádání použitého bioreaktoru; B: Detail řasového disku. (Wan et al. 2014)

Pro akumulaci astaxanthinu stačí intenzita světla okolo $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, protože v podmínkách limitace dusíkem se množství astaxanthinu při vyšší ozáření významně nemění. Tudíž je vhodnější použít nižší intenzitu, při které je dosaženo vyšší efektivity fotosyntézy. Pokud je médium využito v rámci cirkulující strategie, je potřeba stanovit vhodnou počáteční koncentraci dusíku. Jako kritická hodnota byla stanovena koncentrace $1,8 \text{ mM}$, což odpovídá $1/10$ množství dusičnanu sodného použitého pro přípravu standardního média BG-11. Pokud by byla koncentrace nižší, vedlo by to k úbytku biomasy, při vyšší by naopak byla snížena produkce astaxanthinu. Tato koncentrace tak vede k poměrně vysoké produkci biomasy i astaxanthinu (až 160 mg na m^2 za den) a k dosažení vysoké účinnosti fotosyntézy (Zhang et al. 2014). Pokud jde o spotřebu vody, je oproti kultivaci ve vodním sloupci snížena o více než 70 % (Wan et al. 2014), za určitých podmínek dokonce až o 90 %, na 1 m^2 kultivační plochy je potřeba pouze 30 l média (Zhang et al. 2014).

Díky nižším nárokům na množství vody je snížena finanční náročnost. Další výhodou je, že kultura nemusí být promíchávána a je odolnější vůči kontaminaci. Sběr buněk je velmi snadný, stačí je sebrat z povrchu a není potřeba se dále zbavovat vody. Imobilizované buňky jsou odolnější vůči vyšším teplotám i ozáření, takže může kultivace probíhat v širším rozmezí indukčních podmínek, které nemusí být tak přesně regulovány, což je výhodné především pro potenciální využití ve venkovní kultivaci. Zároveň lze touto metodou dosáhnout vyšší

produktivity biomasy i astaxanthinu než při kultivaci ve vodním sloupci za užití stejných podmínek (Wan et al. 2014).

Nevýhodou tohoto postupu je, že buňky ve svrchní části biofilmu stíní těm pod sebou, takže mají rozdílný přístup ke světelnému záření i k živinám. Výsledkem je, že se na povrchu vytvoří vrstva červených buněk s vysokým obsahem astaxanthinu, ale pod ní se nachází vrstva buněk zelených. Pokud se nepodaří zavést způsob na oddělení obou vrstev, díky kterému by se spodní část mohla použít pro další kultivaci, bude celkový obsah astaxanthinu v biomase tvořen průměrem obsahu v obou vrstvách. To je rozdíl oproti vodním kultivacím, ve kterých probíhá akumulace astaxanthinu synchronně (Zhang et al. 2014). Druhou nevýhodou mohou být vyšší prostorové nároky při horizontálním umístění biofilmu.

5.2 Kultivační podmínky

Pro dosažení vysoké produkce biomasy a astaxanthinu je třeba optimalizovat různé kultivační parametry jako je složení média, osvětlení kultury, pH nebo teplota, přičemž většina těchto parametrů má rozdílnou optimální hodnotu vzhledem k růstu kultury nebo naopak k produkci astaxanthinu za stresových podmínek.

Pro indukci karotenogeneze obvykle platí, že čím silnějšímu stresu jsou buňky vystaveny, tím více astaxanthinu se v nich akumuluje, ať už tento silný stres vyplývá z vysokých hodnot jednoho parametru nebo z kombinace více stresových faktorů. Zároveň ale buňky vystavené silnému stresu často úplně zastaví svůj růst a po poměrně krátké době začínají odumírat (Su et al. 2014). Proto je třeba zvolit, jestli je z dlouhodobějšího hlediska výhodnější aplikace slabšího stresu, při kterém buňky mohou pokračovat v růstu a akumulovat astaxanthin menší rychlostí, ale vytrvale (Park et al. 2014), nebo jestli by bylo větší produkce dosaženo vystavením buněk silnému stresu, v němž se astaxanthin tvoří rychleji a ve větší míře, ale jen po omezenou dobu.

5.2.1 Typ a míra ozáření

Pokud probíhá vegetativní fáze kultivace čistě heterotroficky v médiu se zdrojem organického uhlíku v podobě acetátu sodného, není potřeba, aby bylo buňkám zároveň dodáváno světlo, vysoké růstové rychlosti může být tudíž dosaženo i ve tmě (Hata et al. 2001). V případě, že probíhá vegetativní fáze kultivace fotoautotroficky nebo fotoheterotroficky, je dobré použít takové množství světla, při kterém je dosaženo vysoké aktivity fotosyntézy, ale ještě nedochází ke stresu z nadměrného ozáření. Tato hodnota se pohybuje okolo bodu, v němž dochází k plné světelné saturaci fotosystémů v chloroplastech (LSP, light saturation point). Poměrně často bývají užívány hodnoty ozáření mezi 40 a 50 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Chekanov et al. 2014, Hata et al. 2001, Park et al. 2014), ačkoli optimální hodnoty ozáření pro dosažení vysoké růstové rychlosti popisované jinými autory bývají vyšší, konkrétně 70 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Tjahjono et al. 1994, Zhang et al. 2014), 80 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Saha et al. 2013), 90 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Fan et al. 1994) nebo dokonce až 177 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Domínguez-Bocanegra et al. 2004). Tyto poměrně rozdílné optimální hodnoty mohou být zapříčiněné dalšími kultivačními parametry jako je složení média, teplota nebo použitý kmen *H. pluvialis*, i když se tyto podmínky v některých zmiňovaných pracích shodují. Z toho vyplývá, že je velmi obtížné mezi sebou porovnávat výsledky různých studií, pokud se v nich liší kultivační postup.

I když bývá pro kultivaci *H. pluvialis* používán ve vegetativní fázi pravidelný cyklus střídání světla a tmy 12:12 h, případně 16:8 h (Park et al. 2014, Saha et al. 2013), vyšší hustoty kultury bývá dosaženo při kontinuálním osvětlení (Domínguez-Bocanegra et al. 2004). Jako nejvhodnější se jeví použití bílého nebo modrého LED osvětlení (Saha et al. 2013).

Karotenogeneze je v buňkách indukována při ozáření vyšším, než odpovídá LSP. I zde se však konkrétní optimální hodnoty mezi jednotlivými studii značně liší, nejnižší udávané intenzity záření se pohybují okolo 100-150 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Tjahjono et al. 1994, Zhang et al. 2014), dále pak 240 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Saha et al. 2013), 345 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Domínguez-Bocanegra et al. 2004) a 480 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ (Chekanov et al. 2014). Nižší z těchto hodnot optimálního ozáření byly zjištěny při současné aplikaci dalších stresových podmínek, jako je nedostatek živin (Saha et al. 2013, Zhang et al. 2014) nebo zvýšená teplota (Tjahjono et al. 1994). Takto nízké osvětlení (100 – 150 a 240 $\mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$) by samo o sobě pro přechod do červené fáze patrně dostatečné nebylo (Boussiba et al. 1999). Z toho vyplývá, že pro efektivní indukci karotenogeneze nemusí být nadměrné ozáření nezbytné. Díky těmto sníženým světelným požadavkům mohou být při kultivaci ve fotobioreaktorech redukovány kultivační výdaje, což je podstatné především pro produkci astaxanthinu v průmyslovém měřítku.

Pokud jde o typ osvětlení, nejvyšší obsah karotenoidů byl získán při použití kontinuálního PAR osvětlení, žádný jiný z barevných typů LED záření nebyl tak efektivní (Saha et al. 2013).

Zajímavou alternativou k jednorázové okamžité změně intenzity ozáření při přechodu z vegetativní fáze na produkční je postupné zvyšování míry osvětlení. Tento postup je výhodný z několika důvodů. V kultuře s vyšší hustotou buněk je potřeba pro dosažení maximálního růstu vyšší ozářenosti, protože si buňky začínají vzájemně stínit. Pro indukci karotenogeneze je také lepší ozáření zvyšovat postupně, protože mladší buňky jsou na vysokou intenzitu světla citlivé a může docházet k jejich odumírání. Tímto způsobem je dosaženo postupné transformace na cystal, díky pozvolné aklimaci může být navíc akumulováno více astaxanthinu, protože se buňky musí vyrovnávat se stále vyšší mírou stresu (Park et al. 2014).

5.2.2 Množství živin

Nejvyšší růstové rychlosti je dosaženo, pokud nedochází k limitaci živinami (Park et al. 2014). Dostatek dostupného dusíku je patrně důležitější než množství fosforu, specifická růstová rychlost buněk se projevila jako funkce obsahu dusíku v médiu (Lee & Ding 1994). Jako nejvhodnější anorganický zdroj dusíku se jevil dusičnan sodný (Sarada et al. 2002), alternativou by teoreticky mohl být organický zdroj v podobě močoviny, která zároveň může sloužit jako synchronizační agens pro růst kultury (Lee & Ding 1994).

Pokud je kultura vystavena nedostatku živin, vede to u buněk k indukci akumulace astaxanthinu (Saha et al. 2013). I v tomto případě je podstatnějším faktorem limitace dusíkem, která vede přibližně ke dvojnásobné rychlosti produkce astaxanthinu než limitace fosforem. Může to být zapříčiněno vyšším buněčným poškozením vyplývajícím z nedostatku dusíku, které se projevuje především značnou degradací chlorofylu, oproti tomu fosfátové hladovění nemusí nutně znamenat poškození struktury chloroplastu (Boussiba et al. 1999).

Vystavení buněk tomuto typu stresu může být zajištěno dvěma způsoby. První z nich spočívá v použití takové počáteční koncentrace dusíku v médiu, aby na začátku kultivace umožnila dosažení vysoké růstové rychlosti. Při postupném spotřebovávání buňkami ve vyšších hustotách je později koncentrace dusíku natolik snížena, že dojde k indukci karotenogeze. Koncentrace dusičnanu sodného vhodná pro tento způsob kultivace se pohybuje okolo 1,8 mM (Zhang et al. 2014). Nevýhodou této metody je postupné snižování růstové rychlosti ve vegetativní fázi kultivace, ale na druhou stranu nedochází k tak vysokému úbytku buněk při přechodu do červené fáze, protože jsou buňky stresovým podmínkám vystavovány postupně. Navíc jsou dodané živiny téměř úplně spotřebovány, což může snížit kultivační náklady. Alternativním způsobem kultivace je přenesení buněk do média, které je ochuzené o dusík nebo fosfor (Boussiba et al. 1999) nebo dokonce do destilované vody (Chekanov et al. 2014). V tomto případě může být po celou dobu zelené fáze zachována vysoká růstová rychlost, ale výměna média komplikuje celý kultivační proces.

Pokud došlo k vytvoření stresových podmínek jiným způsobem než nedostatkem živin, jako nejlepší zdroj dusíku z hlediska akumulace astaxanthinu se projevil dusičnan vápenatý, u něhož byla pozorována několikanásobně vyšší produktivita řas než v případě užití dusičnanu sodného, draselného nebo amonného (Sarada et al. 2002).

5.2.3 pH kultury

Ve studii zkoumající vliv pH v rozsahu 5-9 na kulturu *H. pluvialis* bylo zjištěno, že pH významně ovlivňuje růst buněk i produkci chlorofylu a karotenoidů. Při pH 5 nedochází k žádnému růstu, nejnižší růst byl pozorován v pH 9, ve kterém buňky získávají žlutočervenou barvu. Nejvyššího počtu buněk bylo dosaženo v pH 7, vysoký obsah chlorofylu i karotenoidů bylo možné pozorovat v rozsahu pH 7-8, v pH 6 byly obě hodnoty významně nižší. Po vystavení kultur starých 9 dní stresovým podmínkám v podobě přidání 0,25% w/v NaCl společně s 4,4 mM acetátem sodným došlo ve všech pH k úbytku chlorofylu. V rozsahu pH 6-8 došlo ke dvojnásobnému nárůstu obsahu astaxanthinu, zatímco v pH 9 nebyl pozorován žádný signifikantní rozdíl. Z těchto údajů vyplývá, že z hlediska produkce biomasy i astaxanthinu je nejvhodnější pH 7 (Sarada et al. 2002). Podobný výsledek je prezentován i v další studii (Hata et al. 2001), v níž byl nejlepší růst kultury pozorován při počátečním pH 7,85.

5.2.4 Kultivační teplota

Pro růst *H. pluvialis* se jako optimální ukázala teplota okolo 25 °C, při které kultura dosahovala nejvyšší růstové rychlosti a při níž ještě nedocházelo k redukci tvorby chlorofylu a k formaci cyst (Hata et al. 2001). V jiné práci (Fan et al. 1994) dospěli k širšímu optimálnímu rozpětí teplot 25-28 °C, přičemž nejvyšší růstová rychlost (0,054/h, což odpovídá zdvojnásobení počtu buněk za 12-13 h) a fotosyntetická aktivita (podle množství vytvořeného O₂) byla pozorována při 28 °C. Toto zvýšené teplotní optimum může být zapříčiněné kromě rozdílné genetické preadaptace použitých kmenů i vyšší teplotou v předchozí fázi kultivace (28 °C oproti 20 °C).

Teplota nad 30 °C indukuje přechod do červené produkční fáze, zelené buňky mohou být transformovány na velké červené cysty během dvou dní. Dochází k výraznému zpomalení růstu, zatímco astaxanthin je akumulován ve 2-3x vyšší míře než při kultivaci ve 20 °C. Z hlediska buněčného obsahu může být produkce karotenoidů vzhledem k nižšímu počtu buněk zvýšená dokonce 15-20x. Zvýšená teplota pravděpodobně ovlivňuje syntézu astaxanthinu skrze stimulaci tvorby a reaktivity kyslíkových radikálů (Tjahjono et al. 1994). Aby během teplotní změny došlo k co nejmenšímu úbytku buněk, je výhodné, aby změna probíhala postupně, což umožní lepší aklimaci na nové podmínky, a zároveň aby vyšším teplotám byla vystavena starší kultura obsahující nepohyblivé buňky odolnější ke stresu (Hata et al. 2001).

Při teplotě 33 °C je inhibováno dělení a snížena tvorba chlorofylu, ale syntéza proteinů naopak zůstává vysoká (Fan et al. 1994). Vyšší teplota je pro *H. pluvialis* letální, při 35 °C buňky brzy lyzují (Tjahjono et al. 1994).

5.2.5 Koncentrace solí

Tvorba astaxanthinu v buňkách *H. pluvialis* může být indukována i přidáním NaCl do média. Pokud je ale sůl přidána do mladých kultur, dochází k vybělení buněk. Pokud je ale do starších kultur přidáno 0,25% w/v nebo 0,5% w/v NaCl, dojde k vyšší akumulaci astaxanthinu. U devítidenních kultur byl pozorován až dvojnásobný nárůst, množství vytvořeného astaxanthinu se ještě zvýšilo, pokud byl společně s NaCl přidán i 2,2 mM acetát sodný. Pokud bylo přidáno 1% w/v, došlo k mírnému úbytku, při 2% byly pozorovány vybělené buňky, z čehož vyplývá, že přidání většího množství NaCl než je 1% w/v je pro buňky letální (Sarada et al. 2002).

Acetát sodný může při nižších koncentracích (např. 15 mM) sloužit jako organický zdroj uhlíku v heterotrofních nebo fotoheterotrofních médiích (Tjahjono et al. 1994). Avšak po jeho přidání do vegetativní růstové fáze v koncentracích vyšších než 40 mM dochází k inhibici buněčného růstu (Hata et al. 2001). Přidání 45 mM acetátu vedlo během 48 hodin k tvorbě cyst, která byla spojená s úbytkem proteinů i chlorofylu, zároveň byl pozorován mírný úbytek v počtu buněk (Kobayashi et al. 1993).

Dodání 0,45 mM Fe²⁺ ve formě síranu železnatého může významně zvýšit biosyntézu karotenoidů v cystách (Kobayashi et al. 1997), protože je využit pro tvorbu hydroxylového radikálu Fentonovou reakcí. Vzniklé radikály poté mohou posttranslačně aktivovat proteiny zapojené do syntézy karotenoidů (Kobayashi et al. 1993). Přidání samotného Fe²⁺ ale tvorbu astaxanthinu zvýší jen nepatrně, podstatnější změny je dosaženo, pokud je zároveň přidán i 45mM acetát sodný (Kobayashi et al. 1993, Tjahjono et al. 1994). Kombinace těchto dvou látek může zdvojnásobit produkci astaxanthinu dokonce i v případě, že už je karotenogeneze stimulována vysokou teplotou (Tjahjono et al. 1994).

5.3 Média

Pro kultivaci *H. pluvialis* jsou používány různé typy médií. V anorganických médiích může tato řasa růst čistě fototrofně. Pokud je v médiu přítomen organický zdroj uhlíku, může být *H. pluvialis* kultivován i mixotrofně. Kultivace je možná i ve tmě, kde růst probíhá čistě heterotrofně (Hata et al. 2001). Mezi nejčastěji užívaná média patří BG-11 (Boussiba et al. 1999, Zhang et al. 2014, Chekanov et al. 2014), BBM (Domínguez-Bocanegra et al. 2004, Triki et al. 1997, Tripathi et al. 1999) a bazální médium s organickým zdrojem uhlíku v podobě acetátu sodného KM1 (Kobayashi et al. 1993, Tjahjono et al. 1994, Sarada et al. 2002) nebo případně jejich modifikace.

Složení	Kultivační média								
	BBM [g/l]	FAB [g/l]	OHM [g/l]	BG-11 [g/l]	NIES-C [g/l]	A9 [g/l]	BAR [g/l]	KM1 [g/l]	Chu [g/l]
CaCl ₂ · 2H ₂ O	0,025	0,025	0,11	0,036	-	0,08	0,025	0,02	0,0367
Ca(NO ₃) ₂	-	-	-	-	0,15	-	-	-	-
FeCl ₃ · 6H ₂ O	0,005	-	-	-	5,88 · 10 ⁻⁴	0,096	0,0025	-	-
FeSO ₄ · 7H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	0,01	-
K ₂ HPO ₄	0,075	0,075	-	0,03	-	2,63	0,075	-	0,0087
KH ₂ PO ₄	0,175	0,175	-	-	-	-	0,175	-	-
KNO ₃	-	-	0,41	-	0,1	-	-	-	-
Kyselina citronová	-	-	-	0,006	-	-	-	-	-
MgCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	0,2	-
MgSO ₄ · 7H ₂ O	0,075	0,075	0,246	0,075	0,04	3,0	0,075	-	0,0369
MnSO ₄ · 4H ₂ O	-	-	-	-	-	0,016	-	-	-
Na ₂ B ₄ O ₇ · 10H ₂ O	-	-	-	-	-	0,035	-	-	-
Na ₂ -EDTA	-	-	-	0,001	0,003	0,2827	0,025	-	-
Na ₂ HPO ₄	-	-	0,03	-	-	-	-	-	-
Na ₂ SiO ₃ · 9H ₂ O	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0284
Na ₂ CO ₃	-	-	-	0,02	-	-	-	-	-
NaHCO ₃	-	-	-	-	-	-	-	-	0,0126
NaNO ₃	1,0	1,0	-	1,5	-	-	0,25	-	0,0085
NaCl	0,025	0,025	-	-	-	-	0,025	-	-
C ₃ H ₇ Na ₂ O ₆ P · 5H ₂ O	-	-	-	-	0,05	-	-	-	-
Tris	-	-	-	-	0,5	-	-	-	-
CoCl ₂ · 6H ₂ O	-	-	1,1 · 10 ⁻⁵	-	1,2 · 10 ⁻⁵	-	-	-	2,0 · 10 ⁻⁵
CoCl ₃	-	-	-	-	-	-	2,3 · 10 ⁻⁴	-	-
Cr ₂ O ₃	-	-	7,5 · 10 ⁻⁵	-	-	-	-	-	-
CuSO ₄ · 5H ₂ O	1,6 · 10 ⁻⁵	-	1,2 · 10 ⁻⁵	0,8 · 10 ⁻⁵	-	0,004	7,7 · 10 ⁻⁴	-	2,0 · 10 ⁻⁵
FeC ₆ H ₅ O ₇ · 5H ₂ O	-	-	2,62 · 10 ⁻³	-	-	-	-	-	0,0335
H ₃ BO ₄	5,7 · 10 ⁻³	-	-	2,8 · 10 ⁻³	-	-	-	-	6,2 · 10 ⁻⁴
MnCl ₂ · 4H ₂ O	3,6 · 10 ⁻³	-	9,8 · 10 ⁻⁴	1,8 · 10 ⁻³	1,08 · 10 ⁻⁴	-	7,3 · 10 ⁻⁴	-	1,26 · 10 ⁻⁵
Na ₂ MoO ₄ · 2H ₂ O	-	-	1,2 · 10 ⁻⁴	-	7,5 · 10 ⁻⁶	-	-	-	1,26 · 10 ⁻⁵
NaMoO ₄	4,2 · 10 ⁻⁵	-	-	2,1 · 10 ⁻⁵	-	-	3,5 · 10 ⁻⁴	-	-
NaVO ₃	-	-	-	-	-	5,0 · 10 ⁻³	-	-	-
NiSO ₄ · 7H ₂ O	-	-	-	-	-	8,0 · 10 ⁻⁴	-	-	-
SeO ₂	-	-	5,0 · 10 ⁻⁶	-	-	-	-	-	-
ZnSO ₄ · 7H ₂ O	4,4 · 10 ⁻⁴	-	-	2,2 · 10 ⁻⁴	6,6 · 10 ⁻⁵	0,018	4,4 · 10 ⁻³	-	4,4 · 10 ⁻⁵
Acetát sodný	-	-	-	-	-	-	1,0	1,986	-
Extrakt z kvasinek	-	-	-	-	-	-	-	2,0	-
L-asparagin	-	-	-	-	-	-	-	0,405	-
Močovina	-	-	-	-	-	1,7/0,85	-	-	-
B ₁₂	-	-	1,5 · 10 ⁻⁵	-	1,0 · 10 ⁻⁷	-	-	-	-
Biotin	-	-	2,5 · 10 ⁻⁵	-	1,0 · 10 ⁻⁷	-	-	-	-
Thiamin	-	-	1,75 · 10 ⁻⁵	-	1,0 · 10 ⁻⁵	-	-	-	-

Tab. č. 1: Složení vybraných médií. BBM, FAB, BG-11, BAR (Domínguez-Bocanegra et al. 2004), OHM, Chu médium (Fábregas et al. 2000), NIES-C (Kang et al. 2010), A9 (Lee & Pirt 1981), KM1 (Kobayashi et al. 1993).

Ideální složení média pro dosažení vysoké růstové rychlosti a pro vyšší objem biomasy se liší od ideálního složení pro vysokou akumulaci astaxanthinu. Proto je nutné zvolit vhodný kompromis. Také je třeba zvolit, jestli má být cílem kultivace rychlý zisk biomasy, které ale bude méně, nebo jestli je naopak z dlouhodobého hlediska výhodnější získat co nejvíc biomasy i přesto, že kultivace potrvá déle (Gong & Chen 1997).

Během autotrofního způsobu kultivace byl z klasicky užívaných médií nejvyšší růst kultury pozorován v médiu BBM (Tripathi et al. 1999, Domínguez-Bocanegra et al. 2004). O něco vyšší produktivita biomasy byla získána v médiu optimalizovaném přímo pro růst *H. pluvialis*, OHM (Fábregas et al. 2000). Při použití média BG-11 dochází k mírně sníženému růstu kultury, ale oproti BBM je v něm produkováno více astaxanthinu. Nejvyšší buněčné hustoty bylo dosaženo kontinuálním ozářením a provzdušňováním kultury vzduchem s 1,5% obsahem CO₂. Pro akumulaci astaxanthinu je naopak vhodné kulturu neprovzdušňovat (Domínguez-Bocanegra et al. 2004).

V heterotrofních (KM1) a mixotrofních (BBM s přidáním acetátem sodným a L-asparaginem) médiích je růst kultury rychlejší než v autotrofních (Tripathi et al. 1999). Čistě heterotrofní způsob kultivace je výhodný pro získání vysoké buněčné koncentrace, protože umožňuje udržet buňky poměrně dlouhou dobu ve vegetativní růstové fázi (Hata et al. 2001). K akumulaci astaxanthinu ale za těchto podmínek dochází pouze nepatrně (Kobayashi et al. 1997). Produkce astaxanthinu je naopak vysoká při vyšší ozáření za fototrofních podmínek, ve kterých je nárůst biomasy zprostředkován především zvyšováním objemu jednotlivých buněk. Z těchto důvodů by mohlo být vhodné oddělit růstovou a produkční fázi (Hata et al. 2001).

Více než dvojnásobný obsah astaxanthinu oproti kultivaci v tekutých médiích byl zjištěn v buňkách kultivovaných na agaru (Tripathi et al. 1999), což může souviset s tím, že i v přirozených podmínkách se nejvíc astaxanthinu syntetizuje v buňkách přichycených na stěny nádržek (Wan et al. 2014).

Zdá se, že je pro kultivaci *H. pluvialis* vhodnější, pokud jsou do média přidány vitaminy thiamin, biotin a B₁₂ (Tripathi et al. 1999, Fábregas et al. 2000), i když v jiné studii nebyly po přidání vitaminů pozorovány žádné významné změny (Gong & Chen 1997). Produkci biomasy i astaxanthinu zvyšuje i přidání mikronutrientů (Tripathi et al. 1999, Domínguez-Bocanegra et al. 2004). Selen a chrom, které se běžně do médií pro sladkovodní kultury nepřidávají, mají také pozitivní vliv na buněčný růst *H. pluvialis* (Fábregas et al. 2000).

5.4 Příklady kultivačních postupů s nejvyšší produktivitou

Stanovit optimální parametry pro kultivaci *H. pluvialis* je velmi obtížné, protože výsledný růst kultury nebo akumulace astaxanthinu vždy závisí na konkrétní kombinaci faktorů jako je typ fotobioreaktoru, použitý kmen *H. pluvialis*, složení kultivačního média a zvolené nastavení kultivačních podmínek. Z tohoto důvodu je možné, že jsou pro různé typy kultivace vhodnější různá média a podobně. Níže uvádím některé z kultivačních postupů, které se ukázaly jako efektivní.

Nejvyšší dosažené buněčné denzity jsou $4,2 \cdot 10^5$ buněk/ml (batch kultivace, KM1 médium bez extraktu z kvasinek, s přidanými stopovými prvky a vitaminy, kmen ze sbírek SAG, kontinuální ozáření $20 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, $25 \text{ }^\circ\text{C}$; Tripathi et al. 1999), $1,0 \cdot 10^6$ buněk/ml (nejdříve heterotrofní fed-batch kultivace v NIES-C médiu s 10 mM acetátem sodným při $25 \text{ }^\circ\text{C}$, ve druhé fázi fototrofní kultivace s kontinuálním ozářením $950 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ při $30 \text{ }^\circ\text{C}$, kmen NIES-144; Hata et al. 2001) a $1,6 \cdot 10^6$ buněk/ml (batch kultivace, nejprve médium BG-11, ozáření $40 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ve druhé fázi destilovaná voda a ozáření $480 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, nově izolovaný kmen BM1 z pobřeží Bílého moře, $27 \text{ }^\circ\text{C}$, 5-7 dní; Chekanov et al. 2014).

Pokud jde o produkci biomasy, nejvyšší hodnoty jsou 2,6 g/l (batch kultivace, BG-11, ozáření nejprve $100 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, ve druhé fázi médium bez obsahu dusíku nebo fosforu, ozáření $200 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$ kmen ze sbírek SAG; Boussiba et al. 1999), 7 g/l (Hata et al. 2001) a 12,3 g/l (perfuzní kultivace s postupným zvyšováním ozářenosti z 60 do $150 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, NIES-C médium, ve druhé fázi postupné zvyšování ozářenosti ze 150 na $450 \mu\text{mol fotonů m}^{-2}\text{s}^{-1}$, NIES-N médium bez obsahu dusíku, kmen NIES-144, $23 \text{ }^\circ\text{C}$, 38 dní; Park et al. 2014).

Obsah astaxanthinu v buňkách může dosahovat 4 % sušiny (Boussiba et al. 1999, Chekanov et al. 2014) nebo dokonce až 5-5,5 % sušiny při dlouhodobějším stresu (Chekanov et al. 2014).

Produkce astaxanthinu může dosahovat 114 mg/l s produktivitou 4,4 mg/l za den (Hata et al. 2001), při dlouhodobé kultivaci až 602 mg/l s produktivitou až 15,84 mg/l za den (Park et al. 2014).

6 Závěr

V této práci byly prezentovány dostupné informace o životním cyklu zelené řasy *H. pluvialis*. Navzdory tomu, že je tento organismus podrobně zkoumaný z hlediska optimalizace kultivace pro biotechnologickou produkci a jeho fyziologie s důrazem na mechanismus stresové reakce je tudíž známa poměrně dobře, zůstávají značné mezery v poznacích ohledně jeho životního cyklu a pohlavního rozmnožování, informací je k dispozici málo a jednotlivá pozorování se často liší.

Ve své navazující diplomové práci bych se proto chtěla zabývat touto problematikou, konkrétně mechanismy gametogeneze a její úlohou v životním cyklu. Dále bych chtěla ověřit, jestli je nějak geneticky omezen počet vegetativních dělení bičíkatých zoospor, jak naznačuje článek Lee & Ding (1994) nebo jestli byl tento výsledek zapříčiněn pouze danými kultivačními podmínkami. Zajímají mě i mechanismy, jakými by se případně dalo ovlivnit množství zoospor uvolněných z cyst za vhodných podmínek s ohledem na co nejvyšší nárůst počtu buněk během kultivace a tudíž i vyšší zisk výsledné biomasy.

Ve druhé části práce byly shrnuty dostupné informace o metodách kultivace, kultivačních podmínkách a použitých médiích. Obecně je ale poměrně obtížné mezi sebou porovnávat výsledky různých kultivačních studií, obzvláště pokud se jedná o stanovení optimálních podmínek, protože se v nich často podstatně liší použité kmeny *H. pluvialis*, kultivační média nebo celkový postup kultivace. Výsledný výtěžek je vždy důsledkem konkrétní kombinace všech zvolených parametrů a hodnoty optimální v jednom případě mohou být značně odlišné od hodnot optimálních při jiném kultivačním postupu. Proto je vhodné pro každou kultivační metodu nejprve otestovat produktivitu a finanční náročnost kultivace s využitím poznatků z předchozích pokusů a následně optimalizovat kultivační podmínky pro daný typ kultivace.

Další komplikací při porovnávání maximální dosažené produktivity různých prací je skutečnost, že jsou výsledky vyjádřeny v odlišných vzájemně obtížně porovnatelných jednotkách, jako jsou g/kg sušiny, g/l nebo objemová procenta.

Také se dá obtížně zhodnotit, jaký typ kultivace je v konečném důsledku ekonomicky výhodnější, protože není jednoduché z popisu metod prezentovaných v jednotlivých studiích odvodit, jaká je finanční náročnost celého postupu. Proto může být například výhodnější zvolení jednoduššího typu fotobioreaktoru a nižších kultivačních nákladů, i když je tímto způsobem získána nižší biomasa než při nákladnějším kultivačním postupu. Podobně může být z dlouhodobějšího hlediska výhodnější kultivovat *H. pluvialis* kratší dobu s nižším výtěžkem, ale opakovaně, než dosáhnout vysokého výtěžku, ale po dlouhé kultivační době.

Domnívám se, že by bylo vhodné věnovat větší pozornost rozdílným vlastnostem dostupných kmenů, například s ohledem na využití v odlišných typech fotobioreaktorů. Zároveň by bylo dobré doplnit sbírky o další kmeny z jiných geografických oblastí a odlišných habitatů. Toto navýšení genetické diverzity může vést k získání dalších ekonomicky výhodných vlastností.

7 Seznam literatury

- Aflalo, C., Meshulam, Y., Zarka, A., Boussiba, S. (2007). On the relative efficiency of two- vs. one-stage production of astaxanthin by the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Biotechnology and Bioengineering*, 98(1), 300-305.
- Barlow, A. M., Slepko, A. D., Ridsdale, A., McGinn, P. J., Stolow, A. (2014). Label-free hyperspectral nonlinear optical microscopy of the biofuel micro-algae *Haematococcus pluvialis*. *Biomedical Optics Express*, 5(10), 3391-3402.
- Blokker, P. (2000). Structural analysis of resistant polymers in extant algae and ancient sediments. *Geologica Ultraiectina*, 193, 1-145.
- Boussiba, S. (2000). Carotenogenesis in the green alga *Haematococcus pluvialis*: Cellular physiology and stress response. *Physiologia Plantarum*, 108, 111-117.
- Boussiba, S., Bing, W., Yuan, J. P., Zarka, A., Chen, F. (1999). Changes in pigments profile in the green alga *Haematococcus pluvialis* exposed to environmental stresses. *Biotechnology Letters*, 21(7), 601-604.
- Buchheim, M. A., Buchheim, J. A., Carlson, T., Kugrens, P. (2002). Phylogeny of *Lobocharacium* (Chlorophyceae) and allies: A study of 18S and 26S rDNA data. *Journal of Phycology*, 38, 376-383.
- Buchheim, M. A., Sutherland, D. M., Buchheim, J. A., Wolf, M. (2013). The blood alga: phylogeny of *Haematococcus* (Chlorophyceae) inferred from ribosomal RNA gene sequence data. *European Journal of Phycology*, 48(3), 318-329.
- Collins, A. M., Jones, H. D. T., Han, D., Hu, Q., Beechem, T. E., Timlin, J. A. (2011). Carotenoid distribution in living cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *PLoS ONE*, 6(9), e24302.
- Del Río, E., Ación, F. G., García-Malea, M. C., Rivas, J., Molina-Grima, E., Guerrero, M. G. (2005). Efficient one-step production of astaxanthin by the microalga *Haematococcus pluvialis* in continuous culture. *Biotechnology and Bioengineering*, 91(7), 808-815.
- Domínguez-Bocanegra, A. R., Legarreta, I. G., Jeronimo, F. M., Campocoso, A. T. (2004). Influence of environmental and nutritional factors in the production of astaxanthin from *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 92(2), 209-214.
- Elliott, A. M. (1934). Morphology and life history of *Haematococcus pluvialis*. *Archiv für Protistenkunde*, 82, 250-272.
- Fábregas, J., Domínguez, A., Regueiro, M., Maseda, A., Otero, A. (2000). Optimization of culture medium for the continuous cultivation of the microalga *Haematococcus pluvialis*. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 53(5), 530-535.
- Fan, L., Vonshak, A., Boussiba, S. (1994). Effect of temperature and irradiance on growth of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 30(5), 829-833.
- Gong, X., Chen, F. (1997). Optimization of culture medium for growth of *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Applied Phycology*, 9, 437-444.
- Gu, W., Xie, X., Gao, S., Zhou, W., Pan, G., Wang, G. (2013). Comparison of different cells of *Haematococcus pluvialis* reveals an extensive acclimation mechanism during its aging process: from a perspective of photosynthesis. *PLoS ONE*, 8(6), e67028.

- Guerin, M., Huntley, M. E., Olaizola, M. (2003). *Haematococcus* astaxanthin: Applications for human health and nutrition. *Trends in Biotechnology*, 21(5), 210–216.
- Guiry, M. D., Guiry, G. M. (2015). AlgaeBase. World-wide electronic publication, National University of Ireland, Galway. <http://www.algaebase.org>; searched on 15 April 2015.
- Hagen, C., Siegmund, S., Braune, W. (2002). Ultrastructural and chemical changes in the cell wall of *Haematococcus pluvialis* (Volvocales, Chlorophyta) during aplanospore formation. *European Journal of Phycology*, 37(2), 217–226.
- Han, D., Wang, J., Sommerfeld, M., Hu, Q. (2012). Susceptibility and protective mechanisms of motile and non motile cells of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) to photooxidative stress. *Journal of Phycology*, 48(3), 693–705.
- Hata, N., Ogbonna, J. C., Hasegawa, Y., Taroda, H., Tanaka, H. (2001). Production of astaxanthin by *Haematococcus pluvialis* in a sequential heterotrophic-photoautotrophic culture. *Journal of Applied Phycology*, 13(5), 395–402.
- Hazen, T. E. (1899). The life history of *Sphaerella lacustris*. *Memoirs of the Torrey Botanical Club*, 6, 211-244.
- Chan, K. C., Mong, M. C., Yin, M. C. (2009). Antioxidative and anti-inflammatory neuroprotective effects of astaxanthin and canthaxanthin in nerve growth factor differentiated PC12 cells. *Journal of Food Science*, 74(7), 225–231.
- Chekanov, K., Lobakova, E., Selyakh, I., Semenova, L., Sidorov, R., Solovchenko, A. (2014). Accumulation of astaxanthin by a new *Haematococcus pluvialis* strain BM1 from the White Sea coastal rocks (Russia). *Marine Drugs*, 12(8), 4504–4520.
- Jackson, H., Braun, C. L., Ernst, H. (2008). The chemistry of novel xanthophyll carotenoids. *American Journal of Cardiology*, 101(10A), 50D–57D.
- Jyonouchi, H., Sun, S., Iijima, K., Gross, M. D. (2000). Antitumor activity of astaxanthin and its mode of action. *Nutrition and Cancer*, 36(1), 59–65.
- Kang, C. D., Han, S. J., Choi, S. P., Sim, S. J. (2010). Fed-batch culture of astaxanthin-rich *Haematococcus pluvialis* by exponential nutrient feeding and stepwise light supplementation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 33(1), 133–139.
- Kim, J. H., Nam, S. W., Kim, B. W., Choi, W., Lee, J. H., Kim, W. J., Choi, Y. H. (2010). Astaxanthin improves stem cell potency via an increase in the proliferation of neural progenitor cells. *International Journal of Molecular Sciences*, 11(12), 5109–5119.
- Kobayashi, M., Kakizono, T., Nagai, S. (1993). Enhanced carotenoid biosynthesis by oxidative stress in acetate-induced cyst cells of a green unicellular alga, *Haematococcus pluvialis*. *Applied and Environmental Microbiology*, 59(3), 867–873.
- Kobayashi, M., Kurimura, Y., Kakizono, T., Nishio, N., Tsuji, Y. (1997). Morphological changes in the life cycle of the green alga *Haematococcus pluvialis*. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, 84(1), 94–97.
- Kurashige, M., Okimasu, E., Inoue, M., Utsumi, K. (1990). Inhibition of oxidative injury of biological membranes by astaxanthin. *Physiological Chemistry and Physics and Medical NMR*, 22(1), 27–38.

- Lee, D.-H., Lee, Y. J., Kwon, K. H. (2010). Neuroprotective effects of astaxanthin in oxygen-glucose deprivation in SH-SY5Y cells and global cerebral ischemia in rat. *Journal of Clinical Biochemistry and Nutrition*, 47(2), 121–129.
- Lee, Y.-K., Ding, S.-Y. (1994). Cell cycle and accumulation of astaxanthin in *Haematococcus lacustris* (Chlorophyta). *Journal of Phycology*, 30, 445–449.
- Lee, Y.-K., Pirt, S. J., (1981). Energetics of photosynthetic algal growth: influence of intermittent illumination in short (40 s) cycles. *Journal of General Microbiology*, 124, 43-52.
- Lemoine, Y., Schoefs, B. (2010). Secondary ketocarotenoid astaxanthin biosynthesis in algae: a multifunctional response to stress. *Photosynthesis Research*, 106(1-2), 155–177.
- Lennikov, A., Kitaichi, N., Fukase, R., Murata, M., Noda, K., Ando, R., Ohguchi, T., Kawakita, T., Ohno, S., Ishida, S. (2012). Amelioration of ultraviolet-induced photokeratitis in mice treated with astaxanthin eye drops. *Molecular Vision*, 18, 455–464.
- Lorenz, R. T., Cysewski, G. R. (2000). Commercial potential for *Haematococcus* microalgae as a natural source of astaxanthin. *Trends in Biotechnology*, 18(4), 160–167.
- Mostafa, N., Omar, H., Tan, S. G., Napis, S. (2011). Studies on the genetic variation of the green unicellular alga *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae) obtained from different geographical locations using ISSR and RAPD molecular marker. *Molecules*, 16(3), 2599–2608.
- Naguib, Y. M. A. (2000). Antioxidant activities of astaxanthin and related carotenoids. *Journal of Agricultural and Food Chemistry*, 48(4), 1150–1154.
- Nogami, S., Ohnuki, S., Ohya, Y. (2014). Hyperspectral imaging techniques for the characterization of *Haematococcus pluvialis* (Chlorophyceae). *Journal of Phycology*, 50(5), 939–947.
- Okai, Y., Higashi-Okai, K. (1996). Possible immunomodulating activities of carotenoids in *in vitro* cell culture experiments. *International Journal of Immunopharmacology*, 18(12), 753–758.
- Park, J. C., Choi, S. P., Hong, M. E., Sim, S. J. (2014). Enhanced astaxanthin production from microalga, *Haematococcus pluvialis* by two-stage perfusion culture with stepwise light irradiation. *Bioprocess and Biosystems Engineering*, 37, 2039–2047.
- Park, J. S., Mathison, B. D., Hayek, M. G., Zhang, J., Reinhart, G. A., Chew, B. P. (2013). Astaxanthin modulates age-associated mitochondrial dysfunction in healthy dogs. *Journal of Animal Science*, 91(1), 268–275.
- Proctor, V. W. (1957). Some controlling factors in the distribution of *Haematococcus pluvialis*. *Ecology*, 38(3), 457–462.
- Pulz, O., Gross, W. (2004). Valuable products from biotechnology of microalgae. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 65(6), 635-648.
- Řehulka, J. (2000). Influence of astaxanthin on growth rate, condition, and some blood indices of rainbow trout, *Oncorhynchus mykiss*. *Aquaculture*, 190(1-2), 27–47.
- Saha, S. K., McHugh, E., Hayes, J., Moane, S., Walsh, D., Murray, P. (2013). Effect of various stress-regulatory factors on biomass and lipid production in microalga *Haematococcus pluvialis*. *Bioresource Technology*, 128, 118–124.

- Santos, M. F., Mesquita, J. F. (1984). Ultrastructural study of *Haematococcus lacustris* (Girod.) Rostafinski (Volvocales) I. Some aspects of carotenogenesis. *Cytologia*, 49, 215–228.
- Sarada, R., Tripathi, U., Ravishankar, G. (2002). Influence of stress on astaxanthin production in *Haematococcus pluvialis* grown under different culture conditions. *Process Biochemistry*, 37, 623–627.
- Seyedi, S. M., Sharifpour, I., Ramin, M., Jamili, S. (2013). Effect of dietary astaxanthin on survival, growth, pigmentation clownfish, *Amphiprion ocellaris*, Cuvier. *Indian Journal of Fundamental and Applied Life Sciences*, 3(3), 391–395.
- Spolaore, P., Joannis-Cassan, C., Duran, E., Isambert, A. (2006). Commercial applications of microalgae. *Journal of Bioscience and Bioengineering*, 101(2), 87-96.
- Su, Y., Wang, J., Shi, M., Niu, X., Yu, X., Gao, L., Zhang, X., Chen, L., Zhang, W. (2014). Metabolomic and network analysis of astaxanthin-producing *Haematococcus pluvialis* under various stress conditions. *Bioresource Technology*, 170, 522–529.
- Tjahjono, A. E., Hayama, Y., Kakizono, T., Terada, Y., Nishio, N., Nagai, S. (1994). Hyper-accumulation of astaxanthin in a green alga *Haematococcus pluvialis* at elevated temperatures. *Biotechnology Letters*, 16(2), 133–138.
- Triki, A., Maillard, P., Gudin, C. (1997). Gametogenesis in *Haematococcus pluvialis* Flotow (Volvocales, Chlorophyta). *Phycologia*, 36(3), 190–194.
- Tripathi, U., Sarada, R., Ramachandra Rao, S., Ravishankar, G. A. (1999). Production of astaxanthin in *Haematococcus pluvialis* cultured in various media. *Bioresource Technology*, 68(2), 197–199.
- Wan, M., Hou, D., Li, Y., Fan, J., Huang, J., Liang, S., Wang, W., Pan, R., Wang, J., Li, S. (2014). The effective photoinduction of *Haematococcus pluvialis* for accumulating astaxanthin with attached cultivation. *Bioresource Technology*, 163, 26–32.
- Wayama, M., Ota, S., Matsuura, H., Nango, N., Hirata, A., Kawano, S. (2013). Three-dimensional ultrastructural study of oil and astaxanthin accumulation during encystment in the green alga *Haematococcus pluvialis*. *PLoS ONE*, 8(1), 1–9.
- Yang, Y., Seo, J. M., Nguyen, A., Pham, T. X., Park, H. J., Park, Y., Kim, B., Bruno, R. S., Lee, J. (2011). Astaxanthin-rich extract from the green alga *Haematococcus pluvialis* lowers plasma lipid concentrations and enhances antioxidant defense in apolipoprotein E knockout mice. *Journal of Nutrition*, 141, 1611–17.
- Yoshihisa, Y., Rehman, M. U., Shimizu, T. (2014). Astaxanthin, a xanthophyll carotenoid, inhibits ultraviolet-induced apoptosis in keratinocytes. *Experimental Dermatology*, 23(3), 178–183.
- Zhang, J., Liu, Y.-J., Tian, L.-X., Yang, H.-J., Liang, G.-Y., Yue, Y.-R., Xu, D.-H. (2013). Effects of dietary astaxanthin on growth, antioxidant capacity and gene expression in Pacific white shrimp *Litopenaeus vannamei*. *Aquaculture Nutrition*, 19(6), 917–927.
- Zhang, W., Wang, J., Wang, J., Liu, T. (2014). Attached cultivation of *Haematococcus pluvialis* for astaxanthin production. *Bioresource Technology*, 158, 329–335.