

ODPOVĚDI NA OTÁZKY OPONENTŮM

Doc. RNDr. Yvonne Němcová, Ph.D.

1. Jaké formy N využívají řasy přednostně a proč?

Řasy mohou přijímat N z anorganických (NH_4^+ , NO_2^- , NO_3^-) i organických substrátů (močovina). Nejpreferovanějším zdrojem je amonium NH_4^+ , neboť N z této formy může být rovnou zabudovaný do aminokyselin. Formy NO_3^- a NO_2^- musí být nejprve zredukovány na NH_4^+ , což vyžaduje určitou energetickou náročnost (Podevin et al. 2015). Tato konverze vyžaduje přítomnost enzymu nitrát reduktázy, pro jejíž funkčnost je nezbytná přítomnost Fe a Mo jako kofaktoru.

Bohužel ne všechny mikrořasy přijímají jakoukoliv formu N. Například z našich experimentů plyne, že mikrořasa *Trachydiscus minutus* (Eustigmatophyceae) preferuje raději NO_3^- oproti močovině. V případě mikrořasy *Vischeria helvetica* (Eustigmatophyceae) je N v podobě NO_3^- přijímán stejně dobře jako v podobě močoviny.

Kim et al. (2016) Effects of nitrogen sources on cell growth and biochemical composition of marine chlorophyte *Tetraselmis* sp. for lipid production. *Algae* 31: 257-266.

2. *Chlorella vulgaris* R-117 (Annex 1) vykazuje velmi širokou teplotní valenci. Do jaké míry se jedná o evoluční paměť a do jaké míry se dokáže adaptovat?

Označení R v názvu nese pravděpodobně proto, že byla izolována Ing. Douchou z bývalé sopky v Rupite v Bulharsku. *Chlorelly* jsou především sladkovodní mikrořasy z různých klimatických oblastí. Jsou schopné aklimatizace na měnící se vnější faktory, např. teplota a světlo. Právě proto pravděpodobně získala (adaptovala) vlastnosti, které jí umožňují růst v tak širokém rozmezí teplot; námi zjištěná nejvhodnější teplota kultivace je v rozmezí 25 a 30°C (z hlediska rychlosti růstu i fotosyntetické aktivity). Výhodou – nejen kmene R-117 – ale všeobecně mikrořas rodu *Chlorella* je, že mají nízkou hodnotu saturačního ozáření, při které jiné druhy mikrořas neprosperují, a naopak tolerují i vysoké ozáření.

3. Historie kultivací řas v tenké vrstvě – 1963-70 – průměrný výtěžek kolem 10 g/m²/d; v letech 200-17 už cca 15 g/m²/d. Co vedlo k takto výraznému zvýšení? Kolik dní trvá průměrně kultivace?

K výraznému zvýšení výtěžků mezi léty 1963-1970 a 200-2017 vedlo především vylepšení technologie kultivačních jednotek. Původně ze skleněného povrchu osazeného přepážkami (pro lepší míchání suspenze), se vyvinul nový typ kultivační jednotky, kdy přepážky byly zcela odstraněny z důvodu usazování kultury v daných místech. Skla, která jsou obecně náchylná k prasknutí, byla vyměněna za nerezovou ocel, kvůli lepšímu přenosu tepla (rychlé ohřívání během slunných dnů) a z důvodu lepšího čištění. Povrch je pochozí, tedy se snadno vyčistí všechna potřebná místa na konci každého kultivačního dne.

4. Proč je *Arthrospira* dobře stravitelná? Mají všechny *Chlorelly* celulózní buněčnou stěnu?

Arthrospira (dříve *Spirulina*, nyní *Limnospira*) se taxonomicky řadí do třídy Cyanophyceae, tedy prokaryotních sinic, které mají od eukaryotních mikrořas zcela odlišnou stavbu buňky a tedy i buněčné stěny. Buněčná stěna sinice *Arthrospira* je tvořená lipopolysacharidy, které jsou dobře stravitelné, a není třeba tedy další úpravy po jejím usušení. *Chlorella* je eukaryotní mikrořasa řadící se do třídy Trebouxiophyceae, kde buňky mají celulózní stěnu, která je špatně stravitelná. Některé druhy (např. *C. fusca*, *C. saccharophila*, *C. vulgaris*) mají navíc vnější buněčnou stěnu obsahující sporopollenin (= směs biopolymerů se složitou strukturou složených z dlouhých řetězců aminokyselin, fenolů a karotenoidů). Je to látka vyskytující se u vyšších rostlin v pylových zrnech a sporech. Přítomnost této látky v buněčné stěně má za následek velkou odolnost vůči nareušení. Přítomnost sporopolleninu můžeme najít například i u mikrořasy *Scenedesmus quadricauda*. Buňky je nutné dezintegrovat (mechanicky, tlakem), aby došlo k zpřístupnění obsahu.

Domozych et al. (2015) The cell walls of green algae: a journey through evolution and diversity. *Front Plant Sci* 3: 82
Burczyk et al. (2014) Polyamines in the cell wall of Chlorococcalean microalga. *Zeitschrift für Naturforschung*
Atkinson et al. (1972) Sporopollenin in cell wall of *Chlorella* and other algae: Ultrastructure, chemistry and incorporation of ¹⁴C-acetate, studied in synchronous cultures. *Planta* 107: 1-32

5. Jaké druhy řas se mohou vyskytovat v produktech (prášek, tablety) komerčně nazývaných „chlorella“? Görs et al. 2010 *J Appl Phycol* (2010) 22:265-276

Dle legislativy EU se mohou jako potravinu vyskytovat pouze 3 druhy rodu *Chlorella* a to *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa* (nyní *C. sorokiniana*) i jak napovídají informace uváděné např. sbírkou mikrořas na Univerzitě v Göttingenu – SAG 211-8k) a *C. luteoviridis* (nyní nazývaná jako *Heterochlorella luteoviridis*). Co se týče taxonomie, celá situace je poněkud nejasná. Dříve se v biotechnologii používala mikrořasa označována pouze jako *Chlorella* na základě mikroskopického pozorování, druhový název se neurčoval. Pokud se přece jen určil, většinou byl uváděn *C. vulgaris* nebo *C. sorokiniana*. A tedy podle legislativy EU mikrořasy označené jako *Chlorella*, u kterých byla prokázána konzumace před rokem 1997, nemusejí podléhat regulaci (Novel Food Regulation EC No. 258/97) a mohou být volně konzumované. Jelikož pod názvem *Chlorella* bylo zahrnováno mnoho rodů i druhů, není tento problém stále vyjasněn a pokud bude moci být prokázána konzumace i jiných kmenů rodu *Chlorella* dříve nezmíněných, budou také spadat do kategorie tradiční potravin nespádající pod regulaci EU.

Champenois J, Marfaing H, Pierre R (2015) Review of the taxonomic revision of *Chlorella* and consequences for its food uses in Europe. *J Appl Phycol* 27: 1845-1851
Gouveia et al. (2008) Microalgae in novel food products. In: Papadopoulos KN (ed) *Food chemistry research developments*. Nova Science Publisher, Inc., New York, pp 75 – 111
Vigani et al. (2015) Food and feed products from micro-algae: Market opportunities and challenges for the EU. *Trend in Food Science and Technology* 42: 81-92.
https://ec.europa.eu/food/safety/novel_food/catalogue/search/public/?event=home&seqfce=103&ascii=C#

6. Jaká je optimální hodnota F_v/F_m pro řasové a sinicové kultury? Lze mluvit o jednom konkrétním čísle tak, jak to víceméně platí u cévnatých rostlin (0.83)?

U vyšších rostlin je hodnota F_v/F_m měřená na listech obvykle 0.83, protože vyšší rostliny mají poměrně jednotnou světlosběrnou Chl *a/b* anténu. Optimální hodnota F_v/F_m řas a sinic je odlišná. U mikrořas může dosahovat maximální fotochemický výtěžek hodnoty v rozmezí 0.65 až 0.75 (dle typu světlosběrné antény v závislosti na tom, jaký je přenos energie z antény do reakčního centra). U sinic je skladba světlosběrné antény zcela odlišná v porovnání s eukaryotickými řasami. K thylakoidní membráně přisedají fykobilizómy, které obsahují jednotlivé fykobiliproteiny (fykocyanin, allofykocyanin a fykoerythrin). Tento typ antén spolu s PSI také fluoreskuje a zvyšuje tak konstantní fluorescenci F_0 . Jelikož fotosyntetický a respirační řetězec sdílí PQ pool, není možné dosáhnout ve vzorcích adaptovaných na tmou plné oxidace akceptorů (otevření center), aby se mohla naměřit správná hodnota minimálního fluorescenčního výtěžku, musí se zablokovat přenos elektronů z PSII do PSI. To se docílí přidáním herbicidu DCMU [N'-(3,4-dichlorfenyl)-N,N-dimethylmočovina, který zablokuje přenos elektronů mezi Qa a Qb. Fykobiliny a PSI přispívají k fluorescenci, proto je hodnota F_0 vždy vyšší než by měla být a tedy z rovnice pro výpočet maximálního fotochemického výtěžku ($F_v/F_m = (F_m - F_0) / F_m$) dostaneme nižší hodnotu v porovnání s řasami, obvykle 0.55-0.65.

Pozn.:

„Rozhodně bych uvítala přesnější charakteristiku/rozdělení mikrořas. Je třeba si uvědomit, že eukaryotické mikrořasy netvoří žádnou evoluční jednotku a patří do různých říší eukaryot (supergroups) většinou i s mnohobuněčnými příbuznými ..“

Podle aplikované fykologie se v řasové biotechnologii obvykle používá účelově zjednodušený systém rozdělení řas: makrořasy a mikrořasy. Mikrořasy (prokaryotní i eukaryotní mikroorganismy, které provozují oxgyenní fotosyntézu) se pak uvádějí podle skupin a účelu využití na sinice, a hlavní skupiny eukaryot – Chlorophyta, Rhodophyta, Ochrophyta - Eusrtigmatophyceae a další.

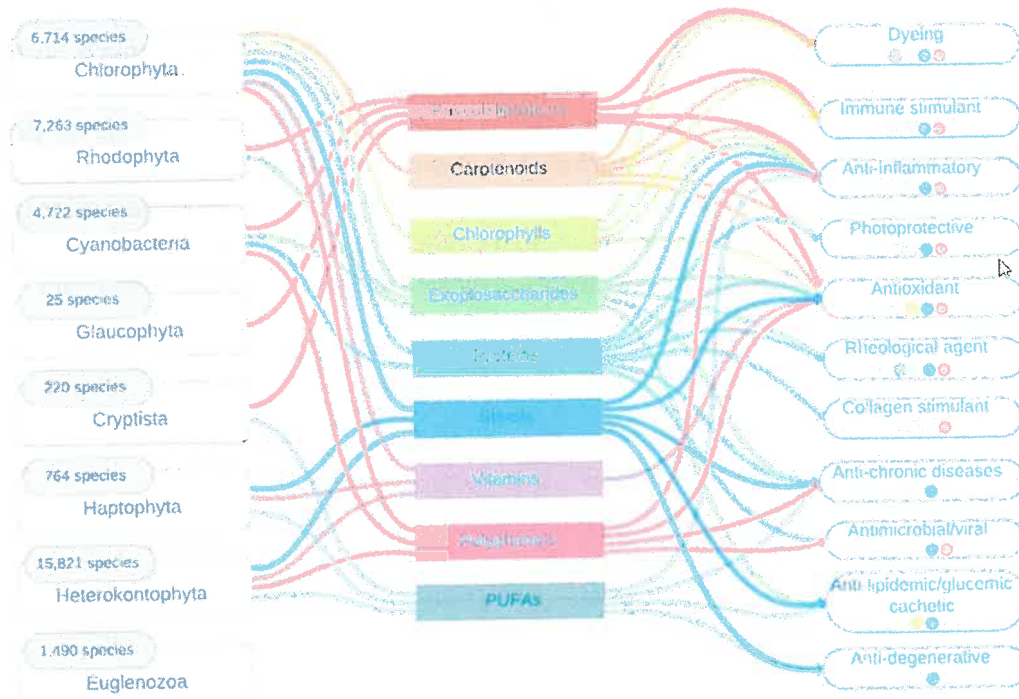


Fig. 4. Main bioactive compounds expressed in microalgae in relation to their classification and possible applications as high value added products. Numbers of species obtained from [Gairy \(2012\)](#); [Gairy and Gairy \(2020\)](#). Blue circle: pharmaceuticals; pink circle: cosmetics; yellow circle: nutraceuticals and green circle: food. (For interpretation of the references to color in this figure legend, the reader is referred to the web version of this article.)

Levasseur et al. (2020A) review of high-value molecules production by microalgae in light of the classificatio. *Biotechnol Adv* 41.

1. I am aware that taxonomic changes are not quickly reflected in biotechnologies, e.g. Because of „rigidity“ of certification processes. How many genera contain now species produced under commercial name *Chlorella*?

Proces uvedení určité mikrořasy na trh je velmi zdlouhavý. Podle legislativy EU mikrořasy označené jako *Chlorella*, u kterých byla prokázána konzumace před rokem 1997, nemusejí podléhat regulaci (Novel Food Regulation (EC) No. 258/97) a mohou být volně konzumované. Dle legislativy EU se mohou jako potravina vyskytovat pouze 3 druhy rodu *Chlorella* a to *C. vulgaris*, *C. pyrenoidosa* (nyní *C. sorokiniana* i jak napovídají informace uváděné např. sbírkou mikrořas na Univerzitě v Göttingenu – SAG 211-8k) a *C. luteoviridis* (nyní nazývaná jako *Heterochlorella luteoviridis*). Jelikož pod názvem *Chlorella* se mohlo před rokem 1997 nacházet spousta druhů, je tento problém stále nevyjasněn a pokud bude moci být prokázána konzumace i jiných kmenů rodu *Chlorella* dříve nezmíněných, budou také spadat do kategorie tradiční potravina nespádající pod regulaci EU.

Ve světě je ovšem situace jiná, tam není konzumace mikrořas jako potraviny (zeleniny) kontrolovaná legislativou a tedy uvádění kmene není nezbytností. Většinou se uvádí na produktech označení *Chlorella vulgaris* či *Chlorella* sp. (Yaeyama, Japonsko; Tchaj-wan).

2. Could you estimate what is the real share of PBR's, TLC's and RWP's, on biomass production?

Pro komerční produkci mikrořas se převážně používají především jednotky typu RWP, neboť náklady na vybudování jsou nižší než u tenkovrstevných kaskád. RWP jsou snadno vyčistitelné. Převážně se používají pro pěstování mikrořas *Chlorella* (Japonsko, Tchaj-wan), *Arthrospira* (Cyanotech, Hawaii; Earthrise, Kalifornie), *Dunaliella* (Shaivaa, Indie), *Haematococcus* (Cyanotech, Hawaii).

Tenkovrstvé kaskády se pro velkoobjemové kultivace využívají méně, neboť náklady na vybudování jsou vyšší, ale jejich využití se začíná prosazovat vzhledem k vyšší produktivitě a hustotě biomasy (A4F, Pataias, Portugalsko, cascade raceways, *Nannochloropsis*; University of Almería, různé kmeny). Při veškeré optimalizaci by teoreticky bylo možné tenkovrstvé kaskády používat, jelikož na nich je možné docílit vysokých hustot.

V otevřených systémech se většinou kultivují vybrané druhy řas, které vyžadují specifické podmínky (salinita, pH, teplota) a je nízké riziko kontaminace jinými mikroorganismy.

Kultivace v uzavřených PBR probíhají většinou tam, kde je cílená snaha udržet monokulturu, kontrolovat a dodržovat kultivační podmínky (např. teplota, intenzita záření, určité spektrum záření). Tato vyšší pořizovací cena a složitost chodu zařízení se pak odráží ve výsledné ceně cíleném produktu (např. Algamo, Česká republika).

3. Annex V deals with mass cultivation of *Arthrospira platensis* M2. What is the origin of the strain? Which of the tested technologies is more feasible for production of this organism in terms of capital and operational costs?

Arthrospira platensis M2 byla původně izolovaná Luisou Tomaselli (CNR Florencie) z jezera Mombolo v Čadu, která byla poté uložena ve sbírce a dále zkoumána skupinou řasových biotechnologů (Centro dei Microorganismi Autotrofi) ve Florencii. Z již zmíněných kultivačních zařízení pro velkoobjemovou kultivaci sinice *Arthrospira* je nejvhodnější jednotkou právě RWP. Náklady na vybudování jsou nízké, suspenze je poháněna jednoduchým kolesem nebo ramenem, tedy náklady na provoz jsou také minimální. Pěstuje se v přítomnosti bikarbonátu (NaHCO_3) jako zdroje uhlíku za vysokého pH 9.4, které je výlučné prostředí pro růst a omezuje kontaminaci jinými kmeny. Sklizení je jednoduché, jednotlivá vlákna se zachytí na sítích a biomasa je následně usušena. Jelikož buněčná stěna neobsahuje celulózu, je tedy dobře stravitelná, další biotechnologický krok není nutný.

Zápis z průběhu obhajob doktorských disertačních prací – OR Zemědělské biotechnologie

Karolína Ranglová

10.12.2020

Zahájení – prof. Komenda, představení komise a disertantky, CV, publikace, granty

K. Ranglová – prezentace výsledků disertační práce

posudky oponentů:

1. doc. Němcová
2. doc. Koblížek
3. Dr. Lukavský
4. Dr. Hauer

odpovědi na posudky oponentů:

otázky oponentů byly zodpovězeny, vypracované odpovědi na otázky oponentů jsou přiloženy k materiálům z obhajoby, další dotazy oponentů zazněly ve vědecké rozpravě

vědecká rozprava:

- doc. Němcová – připomínky k taxonomickému zařazení mikrořas
– která z vývojových linií mikrořas má v buněčné stěně „citin“ resp. chitin-like struktury
– co to je sporopollenin
– proč je u zelených řas výtěžek fotosyntézy nižší než u cévnatých rostlin
– byly při hodnocení antibakteriální aktivity hodnoceny i účinky samotné WW?
- doc. Koblížek – je struktura světlosběrných antén u řas a cévnatých rostlin stejná?
- Dr. Hauer – poznámky k taxonomii řas
– proč je ve výsledcích zobecnění na rod *Chlorella* s.l.?
– jaké jsou parametry a podmínky kultivace v tenkovrstvé kaskádě a fotobioreaktorech
– nemohou sinice produkovat fotoprotektivní látky, které ovlivňují měření fluorescence?
- prof. Komenda – produkuje kultury sinic pigmenty do media?
- doc. Koblížek – byla provedena analýza WW z pohledu nutričního a z pohledu obsahu reziduí farmak a pesticidů?
– jaký poměr základních živin byl ve WW
– charakterizujte světelné poměry ve fotobioreaktoru
- Dr. Lukavský – druhy řas v komerčně prodávaných preparátech
- Dr. Žabka – za jakých podmínek se produkuje sekundární metabolity
– je možné v kulturách mikrořas produkovat chitosany?
- prof. Komenda – vliv světla a hustoty kultury na růst
– struktury PI a PII u mikrořas
- prof. Čítek – proč se biomasa mikrořas používá jako aditivum do krmiv

doc. Pexová – jak se stanovily dávky pro testy biostimulačních účinků a byl
hodnocen vliv kontroly? tedy WW

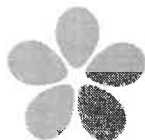
prof. Komenda – jak se stanovovaly selenAK?

doc. Němcová – jaký je stav ohledně genových manipulací u mikrořas

disertantka zodpověděla na všechny dotazy, členové komise i oponenti vyslovili
souhlas s úrovní odpovědí, do disertace bude vložen opravný list – doplněny
chybějící citace

prof. Komenda – zhodnocení průběhu obhajoby, ocenil bohatou vědeckou rozpravu
k disertaci i úroveň odpovědí disertantky, hlasování

Zapsal V. D.



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

OBHAJOBA DIZERTAČNÍ PRÁCE DSP PROTOKOL O HLASOVÁNÍ

Jméno studenta: Ing. Karolína RANGLOVÁ
Narozen(a): 3. 2. 1990 v Jindřichově Hradci

Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Kombinovaná

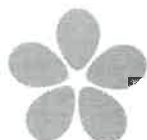
Výsledek hlasování:

Počet členů komise: 8
počet platných hlasů: 6
počet neplatných hlasů: 0
počet přítomných členů komise: 6
kladných: 6
záporných: 0

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. RNDr. Josef Komenda, CSc., DSc., Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň	
Členové:	prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	RNDr. Tomáš Hauer, Ph.D.; PŘF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	Ing. Martin Žabka, Ph.D.; VÚRV Praha	
	Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha	ONLINE HLASOVÁNÍ
	doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	/
	doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	



Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

Jihočeská univerzita
v Českých Budějovicích
University of South Bohemia
in České Budějovice

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DIZERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Karolína RANGLOVÁ
Narozen(a): 3. 2. 1990 v Jindřichově Hradci
Studijní program: Biotechnologie
Studijní obor: Zemědělské biotechnologie
Forma studia: Kombinovaná
Školící pracoviště: KSPR ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 10. 12. 2020, ZF JU v Českých Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název dizertační práce:

Cultivation, Monitoring and Application of Microalgae Cultures
(Kultivace, sledování a využití mikrořas)

Výsledek obhajoby:

Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	prof. RNDr. Josef Komenda, CSc., DSc., Mikrobiologický ústav AV ČR, Třeboň	
Členové:	prof. RNDr. Hana Čížková, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	04.11.2020
	RNDr. Tomáš Hauer, Ph.D.; PŘF JU v Č. Budějovicích (oponent)	
	Ing. Martin Žabka, Ph.D.; VÚRV Praha	
	Ing. Miroslav Klíma, Ph.D.; VÚRV Praha	ONLINE
	doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	04.11.2020
	doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, CSc.; ZF JU v Č. Budějovicích	
	prof. Ing. Jindřich Čítek, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
Školitel:	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	

