

Posudek na disertační práci Ing. Petry Briestenské

„Large scale screening of microalgae and cyanobacteria for a presence of bioactive compounds“

Detekce, izolace a detailní biochemická charakterizace nových typů nízko- a vysokomolekulárních biologicky aktivních látek nejrůznějšího původu prochází v současné době bouřlivým rozvojem. Mezi potenciální producenty řady významných biologicky aktivních látek patří i řasy a sinice. Z těchto důvodů je disertační práce Ing. Briestenské zaměřená na stanovení přítomnosti inhibitorů trypsinu a elastázy a rovněž allelopatických látek ve 182 kmenech řas a sinic velice aktuální a velice potřebná.

Disertační práce v úvodní části poskytuje užitečnou a přehlednou informaci jak o produkčních organismech, tak o známých skupinách biologicky aktivních látek které jsou jimi produkovány. Z tohoto přehledu je zřejmé, že řasy a sinice jsou velice významní producenti se značným potenciálem. Detailnější informace o inhibitech proteas a alelopatických látkách jsou vhodně zpracovány vzhledem k experimentální části práce. Rovněž stručně, ale výstižně jsou popsány metody pro screening, separaci, stanovení a charakterizaci cílových biologicky aktivních látek, stejně tak informace o možnostech kultivace produkčních kmenů jsou užitečné.

Ve výsledkové části bylo potvrzeno, že řasy a sinice jsou častými producenty významných biologicky aktivních látek. Tyto látky jsou zejména přítomny v intracelulárně, jak bylo ukázáno na příkladu inhibitorů trypsinu. Je rovněž zajímavé, že allelopatické látky byly produkovány pouze některými kmeny řas, ale žádným kmenem rodu *Nostoc*.

Pro detailnější charakterizaci je zapotřebí získat větší množství studovaných biologicky aktivních látek. Byly optimalizovány kultivační podmínky pro růst tří kmenů *Nostoc*, které produkovaly inhibitory trypsinu. Pomocí chromatografických technik byla studována produkce inhibitorů v průběhu kultivace. Následně byla aktivní složka produkovaná jedním producentem izolována a vyorek byl charakterizován hmotnostní spektrometrií, což umožnilo předběžně navrhnout možnou aminolyselinovou sekvenci trypsinového inhibitoru.

K předložené disertační práci nemám zásadní připomínky. Práce je psaná v angličtině (což charakterizuje jazykové schopnosti disertantky), je velmi dobře srozumitelná a množství překlepů a dalších nepřesností je v rozumných mezích. Ukazuje zároveň, že disertantka vykonala velké množství experimentální práce a testovala velké množství kmenů řas a sinic.

Práce vedla k vytipování potenciálních producentů inhibitorů významných proteolytických enzymů a allelopatických látek, které mohou být (a pravděpodobně budou) studovány v následujících letech.

K práci mám následující dotazy:

- Sledované látky byly přítomny zejména intracelulárně, zatímco v kultivačním mediu byly přítomny pouze vyjímečně. Dá se tato skutečnost zobecnit i pro jiné skupiny nízkomolekulárních biologicky aktivních látek?
- Pro sledování přítomnosti inhibitorů trypsinu byl jako substrát použit BAPNA. Vzhledem k přítomnosti doprovodných barevných látek v extraktech byla použita metoda extrakce na pevné fázi k oddělení p-nitroanilinu od pigmentů. Neexistují jiné substráty, které by umožnily stanovení proteolytické aktivity i v barevných vzorcích?

Na závěr mohu konstatovat že předložená disertační práce Ing. Briestenské je velice kvalitní a plně odpovídá všem kritériím na disertační práce. Vzhledem ke splnění všech formálních i odborných podmínek doporučuji přijmout práci k obhajobě.



Doc. Ing. Ivo Šafařík, DrSc.

Oddělení biomagnetických technik

Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, v.v.i.

České Budějovice

České Budějovice, 13. 7. 2007

**Oponentský posudek disertační práce Ing. Petry Briestenské, posluchačky ZF JČU
v Českých Budějovicích s názvem „Velkoplošné mapování kmenů mikrořas a sinic na
přítomnost bioaktivních látek“**

Tématem této disertační práce bylo mapování bezmála 200 kmenů mikrořas na přítomnost inhibitorů trypsinu a elastázy a allelopatických látek. Autorka se v práci podrobně zaměřila na optimalizaci růstových podmínek třech kmenů rodu *Nostoc* produkujících inhibitory trypsinové aktivity, pro které vyvinula izolační metody a pokusila se objasnit jejich chemickou strukturu pomocí HPLC/MS. Tato disertační práce tématicky zapadá do pracovní náplně skupiny Dr. J. Kopeckého z Mikrobiologického ústavu AVČR v Třeboni, která se zabývá především výzkumem bioaktivních látek mikrořas.

Disertace má dobrou grafickou úpravu, je ucelená a přehledná s obvyklou strukturou disertačních prací: obsah, přehled současných poznatků, cíle, materiál a metody, výsledky, diskuse a přehled literatury. Součástí práce je rukopis publikace pro *Algological Studies* (v tisku) v dodatku.

Práce obsahuje 69 stran textu, včetně 28 obrázků, 6 tabulek a přílohy (20 stran). Má dobrý literární úvod a přehled literatury, obsahuje dostatečné množství výsledků, které jsou celkem logicky uspořádané. Metodika je zpracovaná velmi podrobně a pečlivě. Většina obrázků jsou vlastní výsledky autorky. Cíle práce jsou uvedeny a závěry jim odpovídají.

Styl angličtiny je na relativně dobré úrovni, i když v některých částech je poněkud neuspořádaný a těžkopádný (část Results) a dal by se výrazně zhustit (Introduction). Gramatických chyb a překlepů není mnoho a nejsou závažné. Případné uveřejnění výsledků v odborném časopise by vyžadovalo zhuštění a úpravu textu.

Obecná doporučení:

- a. Název - podle mého názoru by mohl být poněkud údernější, např. Large scale screening of bioactive compounds in microalgae: trypsin and elastase inhibitors, and alleopathic compounds.
- b. V aplikované fykologii se obvykle používá termín „microalgae“ pro prokaryotní sinice a eukaryotní řasy, včetně rozsivek.
- c. Pro čtenáře je vhodné uvést na začátku práce Seznam zkratk (Abbreviations) a krátké Shrnutí (1 strana).
- d. Text Úvodu je velmi rozsáhlý podrobný, dal by se v některých částech zestručnit či zhustit (např. část o toxinech).
- e. Cíle práce by měly být formulovány v bodech, a poněkud jasněji.
- f. Na konci Diskuse bych doporučoval shrnout v několika bodech dosažené cíle a závěry práce (Conclusions).
- g. Kapitola č. 7 References by měla být před přílohou (kapitola 6) a doporučoval bych v jednotlivých referencích uvést název článků jako v rukopisu publikace v příloze.
- h. Jako příklad úpravy uvádím text na str. 37, který je poněkud těžkopádný, vynechal bych první odstavec, který je již uveden dříve a další text v odst. 4.1.1 by měl jít částečně do Metod.
- i. Ve všech disertacích bych doporučoval uvádět krátký životopis na konci práce.

Technické poznámky k rukopisu:

- a. V práci jsou obrázky a tabulky číslovány společně, což je velmi neobvyklé; doporučoval bych označovat obrázky a tabulky odděleně jako ve většině časopisů.
- b. Disertace by měla být napsána buď v 1. osobě jednotného času nebo v pasivu (v angličtině).

- c. Odborný termín v angličtině je growth rate, rate of enzymatic reaction, nikoli ~~growth speed, reaction speed~~
- d. Tabulka na obr. 4 je těžko pochopitelná, uváděl bych molaritu látek v mediu.
- e. Obrázky č. 7, 12, aj. – při uvádění číselných hodnot je v angličtině oddělovníkem desetinných míst tečka, nikoli čárka jako v jiných evropských jazycích.
- a. Některé obrázky např. č. 17-19 nebo 24-26 by mohly být sloučeny do jednoho jako části – panely A, B, C, aby byly lépe porovnatelné a došlo k úspoře místa.
- b. Pro přehlednost je nutno v grafech zaokrouhlovat hodnoty, např. obr. 27, Area [r.u], hodnota např. $3 \cdot 10^{-9}$.
- c. Rovnice na str. 40 by měla být očíslována a popsána v textu, ne jako samostatný obrázek.
- d. U jednotek je nutné používat v textu i v grafech jednotný systém, spíše s násobky v exponentu, např. $1000 \mu\text{mol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ či $1 \text{ mmol photon m}^{-2} \text{s}^{-1}$ než $1000 \mu\text{mol photon/m}^2 \text{s}^{-1}$.

Odborné dotazy pro autorku do diskuse:

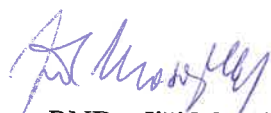
- Jaké jsou ekologické přínosy a zápory výskytu mikrořas – např. výskyt vodních květů, potravní řetězce, aj.
- Proč produkují sinice alelopathické látky?
- Jaké jsou zvláštnosti metabolismu dusíku u sinic (např. sinice *Nostoc*)?
- Ve které fázi růstu dochází k maximální produkci bioaktivních látek a jaké je vysvětlení?

Závěr

Nejvýznamnějším přínosem této disertační práce bylo objevení tří kmenů sinic z rodu *Nostoc* vykazujících inhibiční aktivitu proti trypsinu, které byly následně izolovány, charakterizovány a identifikovány. Předložená disertační práce jasně prokazuje, že autorka dobře zvládla doktorské studium z hlediska teoretického i praktického.

Působení Ing. Petry Briestenské v třeboňské laboratoři, které jsem měl možnost sledovat po celou dobu studia, její výsledky a znalosti mne, jako oponenta, opravňují k tomu, abych vypracovanou doktorskou disertaci doporučil k obhajobě a v souhrnu jí hodnotím známkou velmi dobře.

Nové Hradky 29.7.2007


 Doc. RNDr. Jiří Masojídek, CSc.
 Mikrobiologický ústav AVČR v.v.i. v Třeboni
 Ústav fyzikální biologie JČU v Nových Hradech

Posudek doktorské disertace Ing. Petry Briestenské "Large scale screening of microalgae and cyanobacteria for a presence of bioactive compounds"

Vyhledávání bioaktivních látek a jejich identifikace u různých skupin organismů představuje problematiku s velkým teoretickým i praktickým významem. Doktorandka P. Briestenská se zaměřila na vyhledávání a identifikaci těchto látek u sinic a řas. Využila přitom svého biochemického vzdělání a zkušeností. Z bioaktivních látek se zaměřila na biologicky velmi významné inhibitory proteáz trypsinu a elastázy a kromě toho též na případnou přítomnost allelopaticky působících látek ve sledovaných řasových a sinicových kmenech, jichž bylo celkem 182. Pro získání biologicky působících látek bylo třeba vyvinout izolační a separační metody, především využívající kapalinovou chromatografii (high power liquid chromatography – HPLC), ve spojení s hmotnostní detekcí (mass spectrometry - MS).

V rozsáhlé úvodní části disertace, pojaté především metodologicky, doktorandka uvádí přehled různých typů bioaktivních látek vytvářených sinicemi a řasami, a teprve na str. 14-17 se zabývá proteázami a jejich inhibitory. Potom se krátce věnuje allelopatii a posléze problematice screeningu mikroorganismů na přítomnost bioaktivních látek a metodami kultivace mikroorganismů. Nakonec popisuje analytické techniky různého druhu použitelné při uvedeném screeningu. Jakkoli je tento metodologický přehled užitečný, zdá se mi být až příliš rozsáhlý: měl by se věnovat převážně jen přehledem znalostí o problematice a metodách týkajících se vlastní náplně disertace, s uvedením citací prací o principech a využití těchto metod, včetně metodických příruček. Dostatečný počet odkazů na literaturu postrádám u dosti velkého podílu dílčích kapitol tvořících úvodní část disertace.

Oproti úvodní části disertace je až telegraficky stručná její druhá část (3 věty na str. 28), vymezující cíle, jichž má disertace dosáhnout, resp. otázky, jež má vyřešit. Zde by bylo neškodilo, kdyby byla vždy poněkud odůvodněna (mj. v návaznosti na úvodní část) potřeba řešit danou problematiku.

Třetí část disertace, věnovaná popisu použitých metod (str. 29-36), je plně informativní a instruktivní, ale není z ní většinou patrné, které metody autorka disertace převzala, které modifikovala a které případně sama vyvinula. Postrádám i odůvodnění výběru každé z použitých metod jako nejvhodnější pro daný účel, a opět i dostatek odkazů na využitou literaturu.

Nejobsáhlejší část disertace (str. 37-63) je věnována prezentaci výsledků práce. Těmi jsou poznatky jednak metodologické, jednak faktické. Obojí poznatky, k nimž doktorandka dospěla, jsou doloženy četnými grafy (většinou výstupy z přístrojových měření, a také tabulkami – rovněž označenými jako figures (obrázky), z nichž nejobsáhlejší jsou 2 tabulky, jedna s výsledky screeningu různých druhů a kmenů řas na přítomnost inhibitorů trypsinu a elastázy a na allelopatické působení, druhá s výsledky obdobného screeningu velkého počtu kmenů sinic rodu *Nostoc*. Obě tyto tabulky v sobě shrnují výsledky doktorandčiny usilovné práce a zasluhují velmi kladné ocenění. Výběr kmenů rodu *Nostoc* pro screening mezi sinicemi považuji za šťastný, neboť soudím, že je užitečnější ukázat variabilitu tvorby bioaktivních látek uvnitř jednoho rodu než u více méně náhodného výběru z různých rodů sinic. Kladně hodnotím rovněž péči, již doktorandka věnovala vymezení optimálních kultivačních podmínek pro tvorbu inhibitorů trypsinu. Též izolace a vymezení látek působících inhibičně na trypsin pomocí preparativní HPLC/MS vyžadovaly jistě hodně doktorandčina umu a úsilí. Považuji za pozoruhodné, že je rozdílná účinnost jednotlivých rozpouštědel použitých k extrakci aktivních sloučenin vytvářených

různými kmeny sinic rodu *Nostoc* (viz obr. 27, 28 a 29 na str. 55 a 56). Může autorka disertace blíže vysvětlit tuto skutečnost, tak významnou pro celkový postup při separaci bioaktivních látek, jak je popisován na str. 57-63?

Část označená „Summary and Discussion“ je jakýmsi hybridem mezi diskusí výsledků disertace a jejich souhrnem, což nepovažuji za příliš šťastné. Takto diskuse vlastních autorčiných výsledků s příslušnou literaturou (byly všechny dostupné časopisecké a knižní práce vyčerpány?) vyšla poněkud zkrátka, zatímco samotný souhrn výsledků by byl mohl být již zcela stručný.

Po formální stránce je disertace uspořádána přehledně. Je napsaná v angličtině, což velmi oceňuji. V anglickém textu jsou však ještě některé nedostatky ve stylistice, místy v gramatice a vzácně i v odborné terminologii („growth speed“ místo běžně používaného „growth rate“ pro růstovou rychlost).

Celou disertaci doplňuje rukopis publikace, jež je přijata do tisku v renomovaném mezinárodním časopise „*Algological Studies*“. Doktorandka Petra Briestenská je její první autorkou, ještě pod svým dívčím příjmením Drápalová. Publikace obsahuje značnou část výsledků, jež tato autorka uvádí i ve své disertaci. A tak nelze pochybovat, že na vzniku a obsahu této publikace má ze všech čtyř jejích autorů největší podíl. Přijetí tohoto rukopisu práce do tisku, po jeho posouzení nezávislými recenzenty, považuji za významný důkaz dobré kvality výsledků, jež jsou obsaženy jak v této práci, tak v posuzované disertaci.

Právě pro kvalitu a hodnotu výsledků, jež obsahuje, hodnotím předloženou disertaci Ing. Petry Briestenské za velmi kvalitní, přes některé dílčí nedostatky, jež jí vytýkám. Považuji proto tuto disertaci také za důkaz, že Ing. Petra Briestenská je schopna samostatné vědecké práce a že jí právem má být udělen titul *Philosophiae Doctor = Ph.D.*. Doporučuji proto oponentní komisi, aby Ing. Petře Briestenské tento titul udělila.

V Třeboni dne 14. srpna 2007.

RNDr. Jan Květ, CSc., v.r.,
oponent

Jihočeská univerzita v Čes. Budějovicích, Přírodovědecká fakulta, a
Ústav systémové biologie a ekologie AV ČR, odd. ekologie mokřadů, Třeboň