

Zemědělská
fakulta
Faculty
of Agriculture

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

PROTOKOL O OBHAJOBĚ DISERTAČNÍ PRÁCE DSP

Jméno studenta: Ing. Andrea Vlačihová (roz. Kamenová)
Narozen(a): 27. 10. 1985 v Praze
Studijní program: Fytotechnika
Studijní obor: Speciální produkce rostlinná
Forma studia: Prezenční
Školící pracoviště: KSPR ZF JU v Č. Budějovicích
Datum a místo konání zkoušky: 14. 2. 2016, ZF JU v Českých Budějovicích
Zkušební termín č.: 1.

Název disertační práce:

Studium antimikrobiálních aktivit bílkovin a peptidů hlíz
vybraných genotypů brambor (*Solanum* spp.)

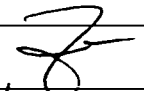
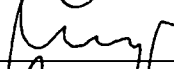
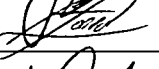
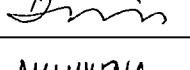
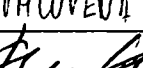
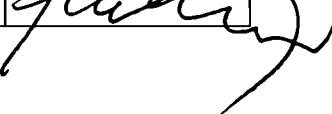
Výsledek obhajoby:

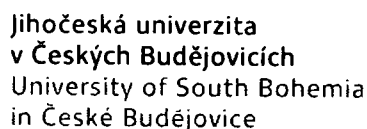
Prospěl (a)

Neprospěl (a)

Zkušební komise:

Podpis:

Předseda:	doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.; Masarykova univerzita (CEITEC)	
Členové:	prof. Ing. Jan Moudrý, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.; Mendelova univerzita v Brně, AF (oponent)	
	Ing. Martin Žabka, Ph.D.; VÚRV Praha (oponent)	
	Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.; VÚRV Praha (oponent)	
	prof. Ing. Vladislav Čurn, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jiří Diviš, CSc.; ZF JU v Českých Budějovicích	
	doc. Ing. Jana Pexová Kalinová, Ph.D.; ZF JU v Č. Budějovicích	
Školitel:	doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.; ZF JU v Českých Budějovicích	



+420 389 032 541
www.zf.jcu.cz
www.jcu.cz

Odpovědi na dotazy uvedené v oponentském posudku prof. Ing. Miroslava Jůzla, CSc.

- *Jaké jsou výnosotvorné prvky u brambor?*

Odpověď:

Výnosotvorné prvky u brambor jsou dány počtem trsů na jednotce plochy, počtem stonků na ploše resp. na jeden trs, počtem hlíz na stonek, hmotností hlíz, průměrnou hmotností jedné hlízy.

- *Které hlavní abiotické a biotické faktory ovlivňují produkční proces v porostech, dosahované výnosy a kvalitu brambor?*

Odpověď:

Mezi hlavní ovlivňující abiotické faktory patří půda (sklonitost pozemku, skeletovitost, půdní druh, obsah živin a její zpracování), zařazení brambor do osevního sledu, průběh ročníku (teplota, délka slunečního svitu a množství a rozložení srážek v průběhu vegetace).

Mezi biotické faktory patří počet rostlin na jednotce plochy, výskyt škůdců a chorob, zaplevelení pozemku.

- *1) Jaké jsou u nás hlavní užitkové směry pěstování brambor a jak rozdělujeme odrůdy brambor podle délky vegetační doby?*

Odpověď:

Hlavními užitkovými směry jsou pěstování konzumních odrůd brambor (raných pro přímý konzum, ostatních pro přímý konzum, na výrobu lupínků a hranolků), pěstování sadbových brambor a pěstování brambor pro výrobu škrobu.

Podle délky vegetační doby se brambory rozdělují do 4 skupin:

1) velmi rané odrůdy, 2) rané odrůdy, 3) polorané odrůdy, 4) polopozdní až pozdní odrůdy

- *2) Kolik odrůd je v současné době registrovaných v Katalogu odrůd v České republice a v Evropské unii průmyslových a konzumních odrůd brambor?*

Odpověď:

V současné době je ve Státní odrůdové knize ČR zapsáno celkem 135 odrůd brambor (Čermák, 2016) z nichž tvoří 21 odrůd určených pro výrobu škrobu a 114 konzumních odrůd brambor (včetně 6 odrůd s kombinovaným využitím). Ve Společném katalogu odrůd druhů zemědělských plodin je to 1681 (Plant variety database – European Commission, 2017).

- *3) Jaký je předpokládaný odhad finančního efektu ze separace bílkovin z hlízové vody a jaká je u nás finanční podpora pěstitelů průmyslových brambor?*

Odpověď:

Dle údajů Českého škrobárenského svazu z roku 2016 bylo v roce 2015 v České republice zpracováno 106 326 t brambor, ze kterých bylo vyrobeno 22 074 t škrobu (Anonym 1, 2016). Z 1 t brambor vznikne asi 750 litrů hlízové vody, která obsahuje průměrně 13,4 g bílkovin/litr PFJ. Tzn., že v České republice by při zpracovávání veškeré hlízové vody, která vznikla v roce 2015, bylo možné získat téměř 1,067 milionu kg bílkovin. Tržní cena denaturovaného proteinového separátu z hlízové vody se pohybuje asi 1 – 1,5 EUR/kg denaturovaných hlízových proteinů (pro krmné účely) a předpokládaný odhad finančního efektu ze separace bílkovin by mohl být asi 1,068 mil. – 1,602 mil. EUR.

Vzhledem k tomu, že hlízová voda není v současné době dále využívána pro separaci bílkovin v žádném z podniků zabývajícím se výrobou bramborového škrobu v ČR, dá se říci, že se jedná o využití nežádoucího odpadu této výroby. Díky jejímu dalšímu zpracování by producentům škrobu odpadly náklady spojené s uskladněním a transportem tohoto sekundárního produktu, který může být problematický z pohledu skladovacích kapacit výrobců, z pohledu tvorby zápachu při dlouhodobějším skladování a hlavně kvůli transportu a aplikaci hlízové vody na pozemky, do bioplynových stanic či jeho likvidací jako odpadní vody.

Pěstitelé brambor určených pro výrobu škrobu mohou žádat o Přechodnou vnitrostátní podporu (PVP) jako doplňkovou platbu poskytovanou k Jednotné platbě na plochu (SAPS), která je plně hrazena z rozpočtu ČR a je poskytována jako kompenzace za znevýhodnění zemědělců v ČR oproti původním zemím EU. Sazba Přechodné vnitrostátní podpory v rámci Jednotné žádosti 2016 činí 1 621,74 Kč/t brambor určených na výrobu škrobu (Nováková, 2017). Žadatelem může být fyzická nebo právnická osoba, která pro hospodářský rok 2011/2012 uzavřela do 31. března 2011 se zpracovatelem brambor smlouvu o pěstování brambor pro výrobu škrobu.

Další možností je žádat o podporu na produkci brambor určených pro výrobu škrobu (které spadají do kategorie tzv. citlivých komodit) prostřednictvím Dobrovolné podpory vázané na produkci (VCS). Podpora se týká pěstitelů, kteří mají uzavřenou smlouvu s výrobcem bramborového škrobu pro příslušný hospodářský rok, pěstují brambory určené pro výrobu br. škrobu na ploše minimálně 1 hektar plochy, používají uznanou sadbu v množství nejméně 2 t sadby/ha a musí mít potvrzení od výrobce br. škrobu o skutečně nakoupeném množství škrobu ze sklizně pro příslušný hospodářský rok a prokáží se dodávkou brambor pro výrobu škrobu výrobcí br. škrobu v množství odpovídajícímu celkově v průměru nejméně 6 t škrobu/ha (Anonym 2, 2017). Zemědělci žádají prostřednictvím Jednotné žádosti, ve fondu je vyhrazeno 84,78 mil. Kč a státní dotace činí 16 268 Kč/ha pěstební plochy brambor na výrobu škrobu (Ježková, 2016).

Citované zdroje:

Anonym 1 (2016): Základní statistické údaje o komoditě „Brambory, brambory na škrob“, eEAGRI – resortní portál Ministerstva zemědělství.

http://eagri.cz/public/web/file/465790/Zakladni_statisticke_udaje_komodity_Brambory_a_skrob_za_2015.pdf [Dostupné online: 9. 4. 2017]

Anonym 2 (2017): Příručka pro žadatele, SZIF.
https://www.szif.cz/cs/CmDocument?rid=%2Fapa_anon%2Fcs%2Fdokumenty_ke_stazeni%2Fplatby_na_zaklade_jz%2Fjz%2Fjz%2F1491555324222.pdf [Dostupné online: 9. 4. 2017]

Čermák V. (2016): Seznam doporučených odrůd bramboru 2016, Ústřední kontrolní a zkušební ústav zemědělský Brno, 97 s.:
http://eagri.cz/public/web/file/473979/Brambor_2016.pdf [Dostupné online: 8. 4. 2017]

Ježková M. (2016): Tisková zpráva Ministerstva zemědělství: Ministr Jurečka schválil letošní sazby na ciltivé komodity. Ministerstvo zemědělství na ně poskytne téměř 3,5 miliardy korun, SZIF.
https://www.szif.cz/cs/CmDocument?rid=%2Fapa_anon%2Fcs%2Fzpravy%2Fzpravy_o_fondu%2Ftiskove_zpravy%2F1478759988396.pdf [Dostupné online: 9. 4. 2017]

Nováková V. (2017): Tisková zpráva SZIF začíná vydávat rozhodnutí na Přejchodné vnitrostátní podpory s předstihem, SZIF.
http://www.szif.cz/cs/CmDocument?rid=%2Fapa_anon%2Fcs%2Fzpravy%2Fzpravy_o_fondu%2Ftiskove_zpravy%2F1485437433545.pdf [Dostupné online: 9. 4. 2017]

Plant variety database – European Commission (2017): Agricultural plant species – Varieties (databáze online).
http://ec.europa.eu/food/plant/plant_propagation_material/plant_variety_catalogues_data_bases/search//public/index.cfm?event=SearchVariety&ctl_type=A&species_id=262&variety_name=&listed_in=0&show_current=on&show_deleted=&numeric_max_index=0
[Dostupné online: 8. 4. 2017]

Odpovědi na otázky vypracovala

Ing. Andrea Vlačihová



Odpovědi na dotazy uvedené v oponentském posudku Ing. Václava Dvořáčka, Ph.D.

- 1) *Lze skutečně předpokládat, že antimikrobiální aktivita IP bude vysoce odrůdově specifická a vliv ročníku nebude hrát žádnou roli?*

Odpověď:

Vzhledem k dostupným informacím si myslím, že vliv ročníku bude hrát určitou roli na antimikrobiální aktivitu inhibitorů proteas v souvislosti s odpovědí organismu (hlízy bramboru) na průběh ročníku, tzn. např. kumulace či určitý poměr IP v hlízách, jako přímá odpověď na průběh počasí v daném roce. Osobně si však nemyslím, že by vliv ročníku hrál důležitější roli, než je právě zmíněná odrůdová specifita, což by bylo samozřejmě vhodné potvrdit ročníkovým opakováním testů s novým materiálem a na širším spektru odrůd, případně genotypů.

- 2) *Jsou v současnosti na pracovišti nějaké další detailnější možnosti nedestruktivní separace (analýzy) izolovaných skupin proteinů IP pro posouzení jejich specifické antimikrobiální aktivity?*

Odpověď:

V současné době jsou na pracovišti používány i další chromatografické separační metody, které se řadí k nedestruktivním metodám. Konkrétně iontovýměnná chromatografie na anexu (používáno je celulosové medium s ligandem DEAE). Inhibitory proteas se nachází ve frakci, která není tímto mediem zachycena (převaha basických IP). Další separace nenavázaných proteinů v této frakci je dále prováděna na katexovém iontovýměnném médiu s využitím keramické katexové kolony UNO S6 (sulfonylový ligand) a gradientové eluce (pomocí systému FPLC) a je získáno v závislosti na genotypu 10 - 14 dílčích frakcí, které se vzájemně liší ve složení (dle provedené MS identifikace). Detailnější dělení těchto dílčích frakcí je pak prováděno pomocí hydroxyapatitové chromatografie nebo chromatografie na principu hydrofobních interakcí.

Odpovědi na otázky vypracovala

Ing. Andrea Vlačihová



Odpovědi na dotazy uvedené v oponentském posudku Ing. Martina Žabky, Ph.D.

- 1) *Považuje autorka některé publikační výstupy (nehledě na impakt faktor, nebo přínos v RIV) jako méně nebo více významné pro celek samotné disertační práce? Které? V největší stručnosti prosím o subjektivní či objektivní dojem.*

Odpověď:

Za více významné považuji práce, ve kterých je daná problematika týkající se disertační práce (studium inhibitorů proteas, antimikrobiální účinky, metody, atd.) pojata v širším a hlubším kontextu skutečností, tzn., že je v nich použito maximum informací, které byly o materiálu samotném dosaženy/získány (biochemické složení zkoušených vzorků, velikost souboru testovaných odrůd a mikroorganismů atp.).

Obecně jsou jako více významné publikační výstupy z mé strany vnímány ty publikace, na kterých se podílelo větší množství autorů a pracovišť a praktické výstupy prezentovaných výsledků.

- 2) *V rámci provedených antifungálních testů byly pozorovány mnohé rozdíly mezi jednotlivými frakcemi proteinů. Byla nalezena nějaká korelace mezi Mw frakce a účinností? Některé mohou interagovat s buněčnou stěnou. Byl pozorován alespoň náznakem takový trend?*

Odpověď:

Interakce proteinů o určité MW frakci v hlízách bramboru je známá, např. kumulace proteinů o molekulové hmotnosti 21-23 kDa po infekci hlíz brambor patogenem *Phytophthora infestans* (Valueva *et al.*, 1998). Na základě dosažených výsledků v antifungálních testech a LC-MS/MS analýzy byla v jedné z prací, která je součástí předložené disertační práce, vyslovena domněnka, že u odrůdy Siby může být její největší antifungální účinek ze všech testovaných odrůd dán jednak specifickým zastoupením (poměrem) antifungálních forem inhibitorů PI-1 (Protease Inhibitor 1) a PI-2 (Protease Inhibitor 2) obsažených v testovaném vzorku a jednak může být dán zjištěnou největší intenzitou spotů identifikovaných jako PI-1, které se od PI-2 liší mimo jiné právě i molekulovou hmotností (PI-1 MW 7,7-7,9 kDa a PI-2 20,7 kDa).

- 3) Jaká byla teoretická výtěžnost termostabilní antifungální proteinové frakce z hlízové vody po provedení tepelné koagulace a finální purifikace přes filtr?

Odpověď:

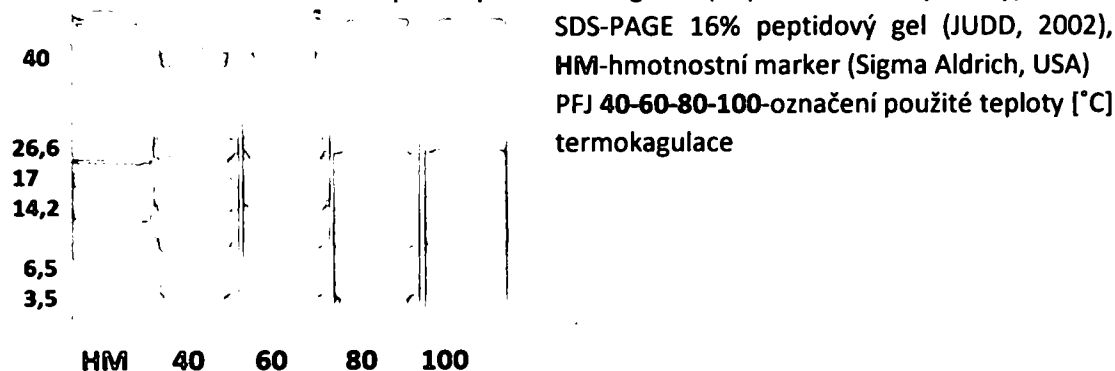
Teoretická výtěžnost proteinové frakce z hlízové vody se pohybuje v závislosti na obsahu sušiny v hlízách brambor zpracovávaných na škrob kolem 0,12 – 0,63 %. Skutečná finální výtěžnost proteinového izolátu při použití různých teplot zpracování hlízové vody (40-60-80-100°C) je uvedena v tabulce 1:

Tabulka 1: Průměrná výtěžnost proteinového izolátu z hlízové vody zpracované při daných teplotách a obsah bílkovin v jednotlivých variantách (nepublikované výsledky).

Teplotní varianta PFJ	Průměrná výtěžnost po filtraci a dialýze	Obsah proteinů BCA
Varianta 40°C	1,18 %	33 %
Varianta 60°C	0,62 %	39,2 %
Varianta 80°C	0,40 %	79,2 %
Varianta 100°C	0,40 %	72,8 %

Hodnoty skutečné finální výtěžnosti u proteinového izolátu variant 60°C - 100°C se pohybují při vyšší hranici teoretické výtěžnosti, kdy nejvyšší výtěžnosti bylo dosaženo u proteinového izolátu zpracovaného při 60°C. U varianty 40°C byla výtěžnost nadprůměrná, neboť vzhledem k nízké teplotě zpracování vzorku byly ve vzorku obsaženy nejen inhibitory proteas, ale i další skupiny ve vodě rozpustných proteinů (oblast 40 kDa, 26 kDa, 17 kDa), u kterých ještě nebylo teplotou 40°C dosaženo kritického bodu denaturace (viz obr. 1) a další nebílkovinné látky (viz. sloupec tabulky obsah bílkovin; Pierce™ BCA Protein Assay Kit, Thermo Scientific™). Denurací ztratily tyto skupiny proteinů vlastnost rozpustnosti ve vodě a byly odstraněny při centrifugaci a filtraci spolu s ostatními balastními a ve vodě nerozpustnými složkami.

Obrázek 1: Změna bílkovinného spektra po termokoagulaci (nepublikované výsledky).



Při testování antifungální aktivity takto získaných variant proteinového izolátu při 40°C a 60°C byl zároveň zjištěn minimální nebo nulový antifungální vliv na růst mycelia testovaných hub v porovnání s variantami 80°C a 100°C. U teplotních variant 80°C a 100°C byl zjištěn nejvyšší obsah proteinů (více než 72 %), a proto bylo vzhledem k získaným výsledkům dále pracováno pouze s teplotní variantou 80°C, která při nižší energetické náročnosti získání této frakce, totožné výtěžnosti a s o 6 % vyšším obsahem proteinů ve vzorku (oproti variantě 100°C) dosahovala lepších výsledků v prováděných antifungálních testech.

Před samotnou aplikací proteinového izolátu v antifungálních testech byly ještě vzorky sterilizovány pomocí antibakteriálních filtrů (Millex-GP Syringe Filter Unit, 0,22 µm), které jsou výrobcem doporučeny pro sterilizaci proteinových izolátů a které díky svému materiálovému složení a konstrukčním vlastnostem minimalizují ztráty proteinů.

Citované zdroje:

Judd R. C. (2002) SDS-Polyacrylamide gel electrophoresis of peptides. From. WALKER J. M. (ed.) The Protein Protocols Handbook, 2nd Edition. Humana Press Inc., Totowa New Jersey, 1146p.

Valueva T. A., Revina T. A., Kladnitskaya G. V., Molosov V. V. (1998): Kunitz-type proteinase inhibitors from intact and Phytophthora infected potato tuber. FEBS Letters, 426: 131-134.

Odpovědi na otázky vypracovala

Ing. Andrea Vlačihová



Věc: Zápis z obhajoby disertační práce Ing. Andrei Vlačihové

V rámci obhajoby disertační práce Ing. Andrei Vlačihové byla představena komise pro obhajobu disertační práce a bylo konstatováno, že kandidátka splnila veškeré náležitosti nutné pro zahájení obhajoby disertační práce. Následovalo přednesení stanoviska školitele a školícího pracoviště studentky. Vzhledem k tomu, že obě tato stanoviska byla pozitivní, bylo přistoupeno k prezentaci výsledků disertační práce zpracované na téma „Studium antimikrobiálních aktivit bílkovin a peptidů hlíz vybraných genotypů brambor (*Solanum* spp.)“. Po proběhlé prezentaci byly čteny posudky oponentů (prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc., Ing. Václav Dvořáček, Ph.D., Ing. Martin Žabka, Ph.D.), ve kterých bylo shodně konstatováno, že prezentované výsledky jsou přínosem pro další vědecké i praktické zaměření práce v této oblasti a že práce byla zpracována kvalitním způsobem s odpovídajícími výstupy v podobě publikací. Po přečtení otázek jednotlivých oponentů, které Ing. Vlačihová v rámci své prezentace zodpověděla, bylo přistoupeno k všeobecné diskuzi. V rámci této diskuze prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc. vznesl dotaz týkající se možnosti praktického využití antimikrobiálních látek izolovaných a popsanych v rámci řešení práce a ekonomické náročnosti průmyslové náročnosti také izolace a finalizace získaných antimikrobiálních látek. Na tuto otázku bylo zodpovězeno, že možnosti využití těchto látek jsou velmi široké zahrnující specifické aplikace v rámci farmakologie, medicínské využití, potenciál využití ve veterinárním lékařství a velký význam v případě aplikace v rámci ochrany rostlin či ve specifických potravinářských aplikacích, jakými jsou např. výroba obalových materiálů s možností inkorporace termostabilních látek s antimikrobiální aktivitou. Pokud se týká ekonomické náročnosti, bude bezesporu záležet na zvolené technologii, ale lze předpokládat zvýšené náklady na izolaci této specifické frakce s ohledem na nízkou koncentraci proteinů v odpadní hlízové vodě po tepelné koagulaci hlavní proteinové složky. Ing. Dvořáček se zajímal o možnosti aplikace výsledků izolačních postupů přímo ve škrobárenském průmyslu při izolaci bílkovin – byly následně diskutovány různé možnosti izolace bílkovin s ohledem na jejich využití v průmyslu a získání bílkovin v nativním stavu. Jednalo se nejrozumnější systémy chromatografické separace bílkovin (zejména iontovýměnná a afinitní chromatografie) či membránové systémy izolace bílkovin při jejich nízké koncentraci v roztoku. Ing. Žabka se zajímal o možný vztah mezi molekulovou hmotností bílkovinné frakce a mírou zjištěné antifungální aktivity – na základě tohoto dotazu bylo konstatováno, že opravdu je znám vztah mezi molekulovou hmotností proteinu a jeho antimikrobiální aktivitou; obecně platí, že protein s nízkou molekulovou hmotností vykazuje vyšší a obdobný efekt byl zjištěn i v případě výsledků Ing. Vlačihové – nejvýznamnější míra antimikrobiální aktivity byla zjištěna u frakce proteinů s hmotností v rozsahu 5-10 kDa po odstranění termolabilní frakce proteinů s vyšší molekulovou hmotností. Na závěr bylo konstatováno, že Ing. Vlačihová splnila veškeré náležitosti pro udělení titulu Ph.D., a na základě hlasování bylo komisí doporučeno tento titul kandidátce udělit.