

OPONENTSKÝ POSUDEK

Doktorské disertační práce

Ing. Andrey Vlačihové

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

Oponent:

Prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.
Ústav pěstování, šlechtění rostlin a rostlinolékařství
Agronomická fakulta
Mendelova univerzita v Brně

V Brně dne : 3.4. 2017

Předložená disertační práce, kterou Ing. Andrea Vlačihová vypracovala na téma: **„Studium antimikrobiálních aktivit bílkovin a peptidů hlíz vybraných genotypů brambor (*Solanum spp.*)“**, je z hlediska vědeckého přínosu tématu a dalšího praktického uplatnění dosažených výsledků velmi zdařilou prací, která se zabývá způsoby metod identifikace hlízových bílkovin a to zejména inhibitorů proteas. Zabývá se rovněž detekcí jejich účinků na růst mycelia houbových fytopatogenů pomocí mikrobiologických testů in vitro, s využitím hodnocení pomocí počítačového software.

Autorka rozdělila svoji disertační práci, která má celkový rozsah 133 stran textu, celkem do 6 kapitol. V seznamu odborné literatury uvádí celkem 153 domácích i zahraničních prací, což prokazuje její zodpovědný přístup ke zvolenému tématu práce a rovněž i odborné vedení školitelů. Disertační práce přináší řadu cenných vědeckých výsledků prakticky využitelných při pěstování, šlechtění a zpracování zejména průmyslových odrůd brambor.

Hlavním cílem předložené disertační práce bylo studium optimalizace testování antimikrobiálních aktivit u zkoumaných skupin bílkovin, peptidů a jejich frakcí, na vybraných druzích mikrobiálních patogenů. Dále bylo provedeno hodnocení základních biochemických vlastností bílkovin a peptidů, včetně optimalizace metod izolace a purifikace skupin extracelulárních bílkovin z hlíz bramboru. Na základě uvedených údajů v závěrech práce na str. 118 je možno konstatovat, že všechny navržené cíle a stanovené hypotézy uvedené na str. 34 byly splněné. Prezentované výsledky práce mají široký potenciál dalšího využití uvedených metod a souborů dat v dalších vědeckých publikacích, zaměřených k podrobnějšímu studiu biochemických vlastností širšího spektra odrůd a houbových patogenů. Praktickým výstupem může být například příprava a využití termostabilního antifungálního koncentráту vyrobeného z hlízové vody, pro potřeby ochrany polních i okrasných rostlin před houbovými patogeny. Celkově je možno konstatovat, že byly dosaženy velmi cenné výsledky využitelné při pěstování, šlechtění nových průmyslových odrůd brambor a jejich zpracování ve škrobárnách, jakož i v potravinářském průmyslu nebo v různých oblastech veterinární a humánní medicíny.

V literární části práce autorka věcně popisuje jednotlivé faktory, které ovlivňují sekundární produkty vznikající při zpracování brambor při výrobě škrobu. K této části práce mám dotaz, jaké jsou výnosotvorné prvky u brambor? Dále mám ještě dotaz, které hlavní abiotické a biotické faktory ovlivňují produkční proces v porostech, dosahované výnosy a kvalitu brambor?

K vlastní metodické části práce nemám závažné připomínky. Disertační práce je ve výsledkové části na str. 35-67 souborem celkem 6 recenzovaných publikovaných vědeckých prací, na kterých se autorka podílela. Uvedené práce se zabývají studiem metod izolace a identifikace hlízových bílkovin zejména inhibitorů proteas, jakož i detekcí jejich účinků na růst mycelia houbových fytopatogenů. Dále je na str. 77-92 uvedena Certifikovaná metodika s názvem: „Metody izolace vybraných proteinů hlíz brambor“, jejímž cílem bylo shrnutí nejčastěji používaných optimalizovaných postupů a principů izolace purifikace vybraných skupin hlízových proteinů a jejich hlavních frakcí získaných z hlíz kulturních a planých druhů brambor. Na str. 94-99 je s komentářem uvedený Užitečný vzor s názvem: „Izolát proteinů z brambor s antimikrobiální účinností“, který se zabývá technickým řešením přípravy bílkovinného izolátu z hlízové vody z brambor, která vzniká jako sekundární produkt při průmyslovém zpracování směsi průmyslových odrůd brambor na škrob. V závěru výsledkové části je na str. 100-120 uvedený ještě rukopis publikace připravené do tisku, která se zabývá zhodnocením antifugálního potenciálu termorezistentních bílkovin získaných ze šesti odrůd bramboru hlíznatého s rozdílným užitkovým směrem a délkou vegetační doby.

Do vědecké diskuse mám následující dotazy:

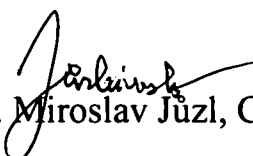
- 1.) Jaké jsou u nás hlavní užitkové směry pěstování brambor a jak rozdělujeme odrůdy brambor podle délky vegetační doby?
- 2.) Kolik je v současné době registrovaných v Katalogu odrůd v České republice a v Evropské unii průmyslových a konzumních odrůd brambor?
- 3.) Jaký je předpokládaný odhad finančního efektu ze separace bílkovin z hlízové vody a jaká je u nás finanční podpora pěstitelů průmyslových brambor?

Závěrem je možno konstatovat, že Ing. Andrea Vlačihová vypracovala doktorskou disertační práci samostatně a na vysoké vědecké i odborné úrovni. Po formální stránce je napsaná velmi srozumitelně, přehledně a věcně. Práce přináší řadu nových cenných teoretických poznatků, prakticky využitelných zejména při pěstování, šlechtění a zpracování průmyslových odrůd brambor v podmínkách České republiky. Literární část práce, jakož i vlastní dosažené výzkumné výsledky, jsou velmi cenným zdrojem nových informací, které budou jistě nacházet další uplatnění v zemědělské praxi.

Na základě uvedených skutečností proto doporučuji oponentní radě Zemědělské fakulty Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích, přijmout předloženou disertační práci k vlastní obhajobě a udělit jmenované akademický titul „Doktor“.

V Brně dne: 3.4. 2017

Vypracoval:


Prof. Ing. Miroslav Jůzl, CSc.

Ústav pěstování, šlechtění rostlin a
roślinolékařství
Agronomická fakulta
Mendelova univerzita v Brně

Oponentský posudek

Doktorská disertační práce: „Studium antimikrobiálních aktivit bílkovin a peptidů hlíz vybraných genotypů brambor (*Solanum spp.*)

Autor disertační práce: Ing. Andrea Vlačihová

Oponent: Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Předložená disertační práce Ing. Andrey Vlačihové se zabývá problematikou izolace a biochemické charakterizace hlízových bílkovin a peptidů rodu *Solanum* s posouzením jejich antimikrobiální aktivity. Dizertační práce tak naráží na významné a aktuální téma s budoucím širokým dopadem např. v oblasti rezistentního šlechtění odrůd brambor nebo problematiky využívání odpadní hlízové vody ze škrobáren. Významnou část práce pak tvořila především optimalizace široké škály separačních resp. preparativních metod zahrnující 1D a 2D elektroforetické techniky, rychlá proteinová chromatografie (FPLC) s řadou podpůrných separačních kroků (precipitace, filtrace, dialýza ad.).

Předložená práce je po formální stránce zpracována formou krátkého, nicméně výstižného literárního přehledu seznamující čtenáře se základní problematikou v oblasti produkce a spotřeby brambor, jejich škrobářským zpracováním a detailnější charakterizací bílkovin hlíz bramboru s možnými analytickými postupy jejich separace. Práce dále obsahuje základní cíle a hypotézy a dosažené výsledky jsou prezentovány ve formě 6 recenzovaných publikací, jedné certifikované metodiky a jednoho užitého vzoru, a také jednoho rukopisu připraveného do tisku, což se mi jeví jako více než standardní doklad úspěšné činnosti doktorandky na pracovišti.

Na druhé straně nejsem velkým příznivcem této formy zpracování dizertační práce, byť je možná toto zpracování pro autora jednodušší. V této souvislosti si tak neodpustím některé více či méně formální připomínky. U některých předložených prací mi na první pohled nebylo zřejmé, zda se jedná o celou originální verzi příspěvku, či jen finální rukopis (chybí stránkování příspěvku, název časopisu v záhlaví či zápatí viz kap. 4.1.3., 4.1.4. a 4.1.5.). V oblasti formulování hypotéz bych možná v jednom či dvou případech doporučil nebýt až tak obecný resp. neutrální při jejich formulacích. Tzn. např. Vaše hypotéza: „Jednotlivé skupiny bílkovin a jejich frakce vyžadují optimalizaci izolačních postupů v závislosti na biochemických vlastnostech jednotlivých skupin bílkovin peptidů“ by také mohla znít: „S využitím optimalizace vhodných kombinací extrakčních technik, separačních (např. FLPC) a precipitačních postupů lze získat skupiny hlízových proteinů se specifickými biochemickými a antimikrobiálními vlastnostmi“.

Z formálního pohledu tento způsob prezentace práce sice na jedné straně velmi racionalizuje výstupy, což je dáno redakčními pravidly pro jednotlivé typy výstupů na druhé straně se logicky v řadě takto navazujících příspěvků (jak v jejich rešeršní tak metodické části) opakují obdobné pasáže. V očích oponenta pak může také trochu zaniknout náročnost práce např. v oblasti optimalizace jednotlivých izolačních technik.

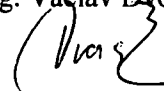
V rámci již recenzovaných výstupů práce by si dovolil vyzdvihnout právě metodické přístupy např. při izolaci inhibitorů proteas (IP). Metody pravděpodobně principiálně vycházely již z publikovaných postupů, na druhé straně jejich zavedení bylo klíčové pro dosažení řady unikátních a originálních výsledků antimikrobiálních aktivit IP vybraných odrůd resp. druhů rodu *Solanum*. Jako neméně významné lze ocenit i metodické příspěvky doktorandky v publikacích směřujících do zemědělské praxe (certifikovaná metodika a užitný

vzor). V rámci datování jednotlivých výsledků byla řada vědeckých publikací včetně užitého vzoru a certifikované metodiky prezentována již v období let 2011 – 2013. Očekával bych intenzivní publikační výsledky i v rámci dalšího období. Rovněž předložený rukopis nejnovějšího příspěvku vychází z pěstovaného materiálu z období let 2012 (pozn. nicméně neznám přesný termín studia doktorandky či případná její přerušení). Studovaná antimikrobiální aktivita IP je i zde prezentována v rámci jednoletého výstupu. *Lze skutečně předpokládat, že antimikrobiální aktivita IP bude vysoce odrůdově specifická a vliv ročníku nebude hrát žádnou roli?* Z rukopisu publikace nevyplývá, zda byla již práce někam zaslána či nikoli. *Současně mne v rámci dosažených výsledků v tomto rukopisu napadá otázka, jsou-li v současnosti na pracovišti nějaké další detailnější možnosti nedestruktivní separace (analýzy) izolovaných skupin proteinů IP pro posouzení jejich specifické antimikrobiální aktivity?*

Celkově nemám k práci žádných závažnějších připomínek a doktorandka jednoznačně prohloubila studovanou problematiku na pracovišti. Předložená disertační práce splňuje požadovanou odbornou úroveň a připravenost doktorandky pro samostatnou vědeckou práci. Po úspěšné obhajobě disertační práce tak doporučuji Vědecké radě ZF Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích disertační práci schválit a Ing. Andrey Vlačihové udělit titul Ph.D.

V Praze 5. 4. 2017

Ing. Václav Dyoráček, Ph.D



Oponentský posudek

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

Autor disertační práce: Ing. Andrea Vlačihová

Oponent: Ing. Martin Žabka, Ph.D.

Disertační práce, kterou předkládá Ing. Andrea Vlačihová je zaměřena na prakticky i teoreticky velmi zajímavé a slibné téma antimikrobiální aktivity bílkovin a peptidů obsažených v hlízách brambor (*Solanum tuberosum*). Pro oblast zemědělství a zpracování rostlinných produktů, brambor při zpracování škrobu, je toto téma velmi žádoucí, neboť směřuje k využívání odpadního produktu, hlízové šťávy. Toto aktuální téma s velkým potenciálem, zjevně přesahuje, a to významně, i do oblastí mimo zemědělství, jako je potravinářství kosmetika nebo medicína. Tento fakt považuji do budoucna za velice osvědčený a ekonomicky strategický. Kladně bych se rovněž chtěl vyjádřit k aktivitě autorky v oblasti grantového vykrytí.

Forma disertační práce je zvolena spíše jako kompoziční, kde podstatnou část vytváří publikační výstupy vědeckého i praktického charakteru, jimiž se autorka může finálně prezentovat. Tato forma je v souladu s možnostmi současného přístupu k publikaci disertační práce a chápu výhody a důvody, které autorku k volbě této formy vedly. Nicméně, dle mého názoru, uvítal bych v tomto případě spíše formu klasickou, kde se může více projevit tvůrčí a literární talent výzkumníka. Na druhou stranu, hlavní, publikačně kompoziční část, je dostatečně uvedena kratším a výstižným úvodem s cíleně směřovaným literárním přehledem s dostatečným informativním charakterem. Následuje kapitola uvádějící seznam cílů práce a navržených hypotéz, jejichž splnění a potvrzení je vhodně uzavřeno výstižným závěrem, což autorka komentuje na základě jednotlivých publikačních výstupů.

Jednotlivé publikační výstupy, jsou tvořeny nejen klasickými vědeckými pracemi, přičemž je jedna s impakt faktorem, ale i certifikovanou metodikou a užitným vzorem. To reprezentuje dobrou vědeckou aktivitu autorky, což je podtrženo i vložením dalšího připraveného rukopisu. Při řešení doktorské práce se autorka zabývala testováním a optimalizací celé řady purifikačních a preparativních postupů a metod jako jsou jednorozměrné a dvourozměrné elektroforetické techniky nebo fast protein liquid chromatography (FPLC). Druhou podstatnou částí bylo testování antifungální účinnosti proti dobře významným a vhodně zvoleným fungálním patogenům. Přesto, že téma, postupy práce i zvolenou formu disertační práce schvaluji, v některých bodech si dovoluji přednést několik kritických poznámek a vyplývajících dotazů.

V práci jsem zaznamenal několik formálních a běžných přehmatů, jako je matoucí výskyt tabulky 4 na str. 15 a jiné tabulky 4. na str 16. Nebo chybně citace Hraška et al. 2006, která

je použita v literárním přehledu, a přesto není součástí hlavního seznamu literatury. Je uvedena jen v některé z publikací. Subjektivně jsem shledal jako méně přehledné i velikost písma v hierarchii kapitol a subkapitol, kdy subkapitoly 4. řádu jsou výraznější než kapitoly 3. nadřazeného řádu. U některých implementovaných publikačních výstupů bych uvítal v záhlaví alespoň zmínku, o jaký časopis nebo příspěvek se citačně jedná, aby oponent nemusel listovat a dohledávat. V poslední řadě bych možná uvítal kapitolu souhrnné diskuse mezi pracemi samotnými.

Již v kapitole souhrn/summary jsem nabyl pocitu nevyváženého pohledu autorky na implementované publikace, které by měly tvořit v podstatě rovnocenné celky s doplňujícími se informacemi o pokroku v práci samotné. Nicméně autorka se v souhrnu nejvíce zaměřuje na podrobnější popis pouze první publikované práce, ale překvapivě ostatní publikace tak podrobně nezmiňuje, nebo o nich nehovoří vůbec. Podrobněji se vyjadřuje až k užitému vzoru.

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.

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

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

Předložená práce Ing. Andrey Vlačihové splňuje všechny formální předpoklady. Se zpracováním a formulováním výsledků si poradila v souladu se zavedenými zvyklostmi. Pozitivně musím hodnotit přínos pro zvolenou oblast výzkumu i implementaci výsledků cílených pro praktické využití. Celkově mohu práci hodnotit pozitivně, stejně tak odbornou úroveň, kterou doktorandka během svého studia získala. Souhlasím tímto, aby byla práce přijata k obhajobě a aby byl autorce po úspěšné obhajobě udělen titul „Doktor“ Ph.D.

V Praze 6.4.2017

Ing. Martin Žabka, Ph.D.

