

Oponentský posudek

Doktorská disertační práce: „Studium metod izolace a vlastností inhibitorů proteas v hlízách bramboru

Autor disertační práce: Ing. František Lorenc

Oponent: Ing. Václav Dvořáček, Ph.D.

Předložená disertační práce Ing. Františka Lorence je především kombinací metodického přístupu izolace a separace vybrané skupiny hlízových bílkovin (inhibitorů proteas) bramboru s návazným mapováním jejich výskytu u modelového souboru vybraných 5 odrůd včetně doplnění o další základní charakteristiky hlíz jako např. jejich velikost, obsah NL, bílkovin, celkových polyfenolů či antioxidační aktivity. Dizertační práce tak naráží na významné a aktuální témata s možným širokým dopadem např. v oblasti fytopatologie a rezistentního šlechtění vzhledem k sledování antimikrobiální aktivity skupiny peptidů bramborové hlízy nebo problematiky efektivní separace bílkovin z odpadní hlízové vody ze škrobáren.

Předložená práce je po formální stránce zpracována přehledně s logickým členěním. Chválím především rešeršní část, která je aktuální, výstižně a současně i komplexně zpracována. Bohatý byl i seznam použité literatury a potěšil mne rovněž i uceleně zpracovaný seznam použitých zkratk.

Na druhé straně bych k celkové koncepci resp. konzistenci zpracované práce měl i několik kritičtějších připomínek. Především z názvu vyplývalo, že jádrem práce byly metodické přístupy izolace inhibitorů proteas. Očekával bych tak, že se v práci více dočtu o některých optimalizačních postupech vedoucí k finální purifikaci a separaci těchto bílkovin. Jistě vše neprobíhalo tzv. „na první dobrou“. Zde jsou však již přímo prezentovány kompletně optimalizované postupy. *Podílel se tak i pan kolega na vývoji a optimalizaci těchto metod nebo je převzal z pracoviště již jako zcela optimalizované?* Další koncepční poznámku bych měl i k zařazení pouze jednoletého hodnocení výše uvedených širších charakteristik hlíz vybraného modelového souboru. Za těchto podmínek a při pěti odrůdách se asi jen obtížně mohou dosažené výsledky, které jsou jinak velmi zajímavé, zobecnovat. Navíc regresní vztahy založené na 5 bodech nemusí být nejvěrohodnější. Například při aplikaci metody MS k identifikaci komplexu hlízových proteinů však již operujete u 2 odrůd s dvouletými výsledky. *Proč nebylo možné výsledkově zpracovat dvouletá hodnocení těchto širších charakteristik u sledovaných 5 odrůd?* S touto určitou nevyvážeností práce pak může souviset i z mého pohledu trochu skromnější vědecká hodnota zpracovaných publikací, kterou bych vzhledem k použité instrumentaci očekával o něco vyšší.

Výsledková i diskusní část je i přes uvedenou mírnou koncepční kritiku zpracována dle mého soudu kvalitně. Lze ocenit aplikaci velké škály rozličných analytických technik, které musel doktorand nejen teoreticky, ale především prakticky dosáhnout. Charakterizace získaných bílkovinných izolátů má dle mého soudu vysokou úroveň. Jen drobné připomínky mám v případě statistického zpracování při prezentaci metody Tukeyova HSD testu, kdy vyznačení signifikantně odlišných průměrů lze provést přímo do výsledkové tabulky (např. v podobě písmenných indexů) a ušetřit si tak jedno tabulkové vyjádření. V příloze 16 na str. 113 bych v názvu hlavičky grafu podobně jako v příloze 17 uvedl, že se jedná o lineární regresi.

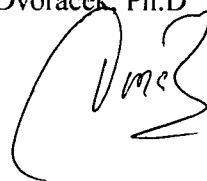
K výsledkové části bych měl dále řadu dotazů. *V tab. č. 10 na str. 55 uvádíte obsahy dusíku a dusíkatých látek (NLx6,25). V případě kalkulace mezi N a NL u odrůdy Adéla mi i při*

předpokládaném max. zaokrouhlování vychází hodnoty NL pro tuto odrůdu cca o 0,2% vyšší. Není tam početní chyba? V této výsledkové části rovněž uvádíte pro konzumenty jistě pozitivní informaci vyššího obsahu polyfenolů a antioxidační aktivity konzumních brambor. Lze tuto skutečnost podle Vás ovšem předpokládat i v případě standardní tepelné úpravy včetně oloupaní hlíz? Jaký je podíl antioxidační aktivity bílkovinného komplexu ve vztahu k dalším antioxidačním složkám hlízy, lze to nějak odhadnout? Čím je dána významně nižší hodnota antioxidační aktivity (reaktivity) při použití radikálů DPPH ve srovnání s ABTS u roztoků bílkovinných frakcí? Již v rešeršní části uvádíte poměrně široké obsahové rozsahy jednotlivých bílkovinných komplexů hlízy a rovněž v relativním zastoupení bílkovinných komplexů z Vašich 2 letých výsledků lze pozorovat výraznější odrůdové i ročníkové difference. Zajímá mě tak vztah (dynamika) mezi celkovými dusíkatými látkami, resp. čistými proteiny k jednotlivým bílkovinným komplexům. Myslíte si, že tento vztah bude univerzálnější přes všechny odrůdy, či bude mít výraznější odrůdová specifika. Lze pro praxi uvažovat možnost hrubé predikce výtěžnosti vybrané izolované frakce ze stanovené hodnoty obsahu N- látek či celkového proteinu?

Celkově nemám k práci dalších připomínek a doktorand jednoznačně prohloubil studovanou problematiku na pracovišti. Předložená disertační práce splňuje požadovanou odbornou úroveň a připravenost doktoranda pro samostatnou vědeckou práci. Po úspěšné obhajobě disertační práce tak doporučuji Oborové radě ZF Jihočeské univerzity v Českých Budějovicích disertační práci schválit a Ing. Františku Lorencovi udělit titul Ph.D.

V Praze 6. 6. 2018

Ing. Václav Dvořáček Ph.D.



Posudek disertační práce

Uchazeč: Ing. František Lorenc

Název disertační práce: Studium metod izolace a vlastností inhibitorů proteas v hlízách bramboru

Studijní obor Zemědělská biotechnologie

Školitel doc. Ing. Jan Bárta, Ph.D.

Oponent: Ing. Jaroslav Čepl, CSc.

Aktuálnost tématu disertační práce

komentář:

Téma disertační práce je velice aktuální. Jedná se zejména o izolaci inhibitorů proteas v nativním stavu, kdy zůstávají zachovány jejich funkční vlastnosti a biologická aktivita, na rozdíl od stávajících metod tepelné koagulace, kdy jsou bílkoviny získávány v denaturovaném stavu a ztrácí tak svoji biologickou aktivitu. Současně byly studovány i vlastnosti inhibitorů proteas a bylo poukázáno na jejich antimikrobiální a další významné vlastnosti a aktivity.

☒ vynikající ☐ nadprůměrný ☐ průměrný ☐ podprůměrný ☐ slabý

Splnění cílů disertační práce

komentář:

Disertační práce byla zaměřena na tři okruhy. Jednalo se o hodnocení vybraných vlastností výchozího materiálu (obsah N, NL, antioxidantů, bílkovin) u pěti odrůd. Druhou částí byla izolace a separace inhibitorů proteas pomocí chromatografických technik provedená u dvou odrůd. Třetím cílem bylo studium vlastností jednotlivých frakcí inhibitorů proteas získaných předchozí separací. Všechny cíle byly splněny, o čemž svědčí kapitoly popisující metodické postupy, výsledky, diskuze a závěry práce.

☒ vynikající ☐ nadprůměrný ☐ průměrný ☐ podprůměrný ☐ slabý

Metody a postupy řešení

komentář:

Metody a postupy jsou detailně rozvedeny v příslušné části práce. Týká se to logicky zejména postupů chromatografické purifikace a separace inhibitorů proteas, analýz proteinových spekter a postupů hmotnostní spektrometrie. Podrobně jsou popsány i postupy zjišťování působení frakcí inhibitorů proteas na růst patogenních hub a zjišťování antioxidační aktivity.

☐ vynikající ☒ nadprůměrný ☐ průměrný ☐ podprůměrný ☐ slabý

Výsledky disertace - konkrétní přínosy disertanta

komentář:

Výsledky dizertace (včetně diskuse a závěrů) jednoznačně přesvědčují o významu práce. Autor uvádí cenné poznatky z oblasti studia inhibitorů proteas. Hlavním přínosem dizertanta je úspěšné ověření možnosti detailní izolace inhibitorů proteas v nativním stavu pomocí chromatografických technik.

☐ vynikající ☒ nadprůměrný ☐ průměrný ☐ podprůměrný ☐ slabý

význam pro praxi a pro rozvoj vědního oboru

komentář:

Význam disertační práce pro praxi je velmi vysoký. Práce přináší cenné poznatky o nových možnostech izolace inhibitorů proteas v nativním stavu, kdy jsou, na rozdíl od současného stavu, zachovány funkční vlastnosti. Otevírají se tak další možnosti jejich využití v oblastech antibakteriálního a antifungálního působení, využitelných v humánní medicíně i rostlinolékařské praxi. Neméně významné výsledky byly získány i v rámci rozvoje studia bramborových proteinů.

☒ vynikající ☐ nadprůměrný ☐ průměrný ☐ podprůměrný ☐ slabý

Formální úprava disertační práce a její jazyková úroveň

komentář:

K formální úpravě práce nemám připomínky. Práce je logicky členěna, rozsah je úměrný dané problematice, jsou jasně formulovány výsledky a závěry práce. Jazyková úroveň je velmi vysoká.

☒ vynikající ☐ nadprůměrný ☐ průměrný ☐ podprůměrný ☐ slabý

Připomínky

Hodnocení odrůd brambor je provedeno pouze z jednoho roku pěstování, je známý vliv ročníku na sledované ukazatele, včetně obsahu a kvality proteinů, resp. inhibitorů proteas?

Obsah polyfenolů a antioxidační aktivita byla nejvyšší u odrůd na přímý konzum oproti odrůdám na zpracování, lze to vysvětlit?

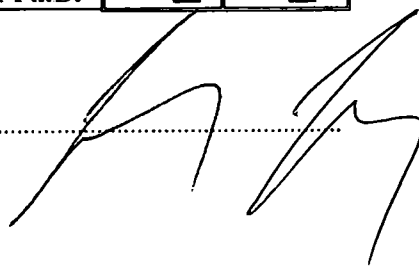
Závěrečné zhodnocení disertace

Předložená disertační práce je zpracována na velmi vysoké úrovni. Poznatky a závěry v ní uvedené mají význam pro další rozvoj vědeckého poznání v oblasti studia proteinů a zejména inhibitorů proteas. Byly získány poznatky využitelné v praxi - ověřeny a dokázány možnosti separace v nativním stavu, což otevírá další možnosti jejich využití v potravinářství, humánní medicíně a rostlinolékařství. Současně byly zhodnoceny vybrané odrůdy brambor z hlediska obsahu dusíkatých látek, polyfenolů a antioxidační aktivity.

Doporučuji po úspěšné obhajobě disertační práce udělení titulu Ph.D. **ano** ☒ **ne** ☐

Datum: 5.6.2018

Podpis oponenta:



Doc. RNDr. Zbyněk Zdráhal, Dr.
Středoevropský technologický institut
Národní centrum pro výzkum biomolekul, PřF
Masarykova univerzita
UKB, pavilon A26
Kamenice 5
625 00 Brno

Oponentský posudek doktorské disertační práce Ing. Františka Lorence:

Studium metod izolace a vlastností inhibitorů proteas v hlízách bramboru

Disertační práce Ing. Františka Lorence je příspěvkem k dnes aktuálnímu tématu – širší aplikaci přírodních látek v lékařství, farmacii, zemědělství, potravinářství a dalších oblastech, v tomto případě využití inhibitorů proteas z hlíz bramboru. Cílem práce byl popis vlastností bramborové hlízové vody, resp. bramborové mouky u pěti vybraných odrůd, experimentální ověření možností izolace a detailní separace inhibitorů proteas pomocí chromatografických technik a charakterizace vlastností získaných frakcí těchto látek. Kladně hodnotím, že Ing. Lorenc během své disertační práce zvládnul široké spektrum technik, jak pro separaci bramborových proteinů, tak i pro jejich charakterizaci.

Výsledky práce jsou podloženy jedním prvoautorským článkem v odborném časopise s impaktním faktorem, třemi prvoautorskými publikacemi v recenzovaném časopise a dvěma spoluautorskými. Práce je poměrně rozsáhlá (114 stran textu včetně příloh). Práce je jinak dobře členěna, s dobře obsahově zpracovaným úvodem do problematiky, doplněna množstvím citací. Bohužel dobrý dojem z práce je dle mého názoru snížen poměrně vysokým počtem formálních chyb a někdy i nepřesných formulací.

Na základě prostudování disertační práce mám tyto komentáře a poznámky:

Obecné komentáře

Plný název musí být vždy uveden u prvního použití zkratky, resp. musí být uveden v seznamu zkratek, v souhrnu tomu tak není, např. zkratka DPPH, názvy frakcí AS, ES, AQ...

Z práce by jasně mělo vyplynout, které experimenty uchazeč prováděl sám a u kterých zpracovával pouze výsledky.

Poznámky

- str. 22 – ...výskyt genů exprimujících PI-2 také ... - nemá být uvedeno PI-1?
- str. 22 – ...Každá podjednotka je tvořena osmi cysteinovými vazbami... - nepřesná formulace
- str. 33 – ...u měnič kationtů je ligand tvořen sulfonátovými kladně nabitými skupinami – správně má být záporně místo kladně
- str. 44 – postup vypracovaný autory Bárta et al. je na Obr. 2 a ne Obr. 1, odkaz na Obr. 2 mi přijde vhodnější, protože se pak dále v odstavci odkazujete na frakci B
- str. 44 – uvádíte, že ekvilibrace probíhala při 4 °C, v Příloze 5 při 6 °C
- str. 45 – věta o frakcích B a C v odstavci 4.4.2 zřejmě patří do odstavce 4.4.1

- str. 47 – uvádíte, že na koloně UNO Q6 byly separovány inhibitory z frakce B, dle schématu by to měla být frakce D, prosím o vysvětlení
- str. 50 – uvedena chybně průtoková rychlost „300 ml/min“, správně má být 300 nl/min
- str. 50/51 – nepřesný popis experimentální části týkající se hmotnostní spektrometrie, např. „tolerance počtu jednotlivých peptidů a MS/MS fragmentů...“, správně je např. „interval chyby měření hmotnosti peptidů a MS/MS fragmentů“
- str. 65, 66, 77 – co rozumíte pod pojmem neidentifikované proteiny, obvykle jsou to ty, které nevidíme
- str. 75 – „... lze pomocí separace na systému FPLC částečně oddělit frakce na základě proporcionality skupin PIs,...“, zřejmě nesprávná formulace, vysvětlete, jak je to myšleno
- str. 79 – citace Kamenová et al. chybí v seznamu citací, pokud jsem ji nepřehlédl

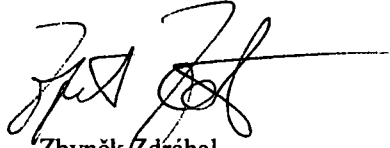
Dále pak mám tyto otázky, u kterých předpokládám jejich zodpovězení či komentář v rámci obhajoby:

- Na str. 13 uvádíte, že hlízy jsou využívány pro výrobu potravinářských a potravinových produktů. Jaký je mezi těmito produkty rozdíl?
- Na str. 45 uvádíte, že Konkanavalin A se vyznačuje svojí schopností vázat glykoproteiny. Váže tento lektin opravdu všechny glykoproteiny?
- Deklarujete, že antioxidační aktivita PIs byla potvrzena. Nemůže být antioxidační aktivita např. frakce B způsobena jiným typem látek, které jsou s PIs eluují společně?
- Jaký je Váš názor na praktické využití Vámi navrženého postupu izolace PIs vzhledem k zachování antimikrobiálních vlastností?

Na základě prostudování této práce mohu konstatovat, že Ing. František Lorenc prokázal tvůrčí schopnosti.

Závěrem mohu prohlásit, že i přes uvedené připomínky, práce splňuje kritéria doktorské disertační práce k získání vědecké hodnosti Ph.D. a doporučuji ji k obhajobě.

v Brně, dne 4.6. 2018



Zbyněk Zdráhal