

## Posudek disertační práce Ing. Františka Škroba s názvem „Nová penicilin-G-acylasy z bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824“

---

Práce Ing. Františka Škroba na 93 stranách včetně příloh popisuje izolaci a charakterisaci nového mikrobiálního enzymu, penicilin-G-acylasy (PGA) z bakteriálního kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824. Práce má standardní členění, na úvod, materiál a metody, výsledky, diskusi a závěr.

Literárnímu úvodu je věnována asi čtvrtina práce; věnuje se popisu amidohydrolas  $\beta$ -laktamových antibiotik a jejich významu se zřetelem na dělení penicilinaminohydrolas. Dále je diskutována struktura aktivního místa PGA u *E. coli* a reakční mechanismus enzymu, v závěru pak je podán stručný přehled historie výroby semisyntetických antibiotik a úvod končí popisem dosud známých vlastností kmene *Achromobacter* sp. CCM 4824, který byl v rámci laboratorního screeningu nalezen v Mikrobiologickém ústavu AV ČR v Praze.

Práce zahrnovala kultivaci uvedeného kmene v bioreaktoru, zpracováním biomasy a purifikaci enzymu. Jak se zjistilo, enzym se skládal ze dvou nekovalentně spojených nestejně velkých podjednotek  $\alpha$  a  $\beta$ , jejichž molekulové hmotnosti byly stanoveny hmotnostní spektrometrií. Nativní elektroforézou byly zjištěny dvě isoformy o isoelektrických bodech pI 8,0 a 8,2. Zjistilo se, že substrátová specifita obou isoform byla stejná, a tak byly považovány nadále za jeden enzym.

Patrně nejdůležitější je zjištění autora, že se nový enzym od dosud známých PGA odlišuje svojí substrátovou specificitou – téměř dvojnásobnou rychlostí hydrolyzuje semisyntetická  $\beta$ -laktamová antibiotika, mající aminoskupinu na  $\alpha$ -uhlíku acylové skupiny (ampicilin, amoxicilin, cefalexin). Dále bylo zjištěno, že enzym má výhodné vlastnosti pro enzymové syntézy případných dalších  $\beta$ -laktamových antibiotik. Nepochybně i proto je později přípravná rekombinantní PGA v současné době testována pro průmyslové využití zahraniční firmou.

Pokud bych měl tedy shrnout věcný obsah a význam práce disertanta, práce popisuje kultivace mikroorganismu, srážecí a chromatografickou purifikaci enzymu, jeho další charakterisaci včetně určení molekulové hmotnosti metodami gelové filtrace a MALDI-TOF, substrátové specificity a dalších charakteristik enzymu, který pravděpodobně dojde průmyslového využití při přípravě nových semisyntetických antibiotik.

Význam práce je tedy zřetelný, obzvláště v době kdy se upřednostňuje ekologicky šetrný způsob výroby chemických látek či přípravků oproti klasickým technikám „těžké chemie“.

Doktorand výsledky své práce publikoval ve třech článcích v mezinárodních impaktovaných časopisech a na několika konferencích. Po věcné stránce se domnívám, že disertant splnil představy oborové rady Mikrobiologie o doktorandském studiu, jeho cíli a účelu. Po formální stránce splnil nároky na úspěšného disertanta této oborové rady kladené.

K práci mám několik drobných připomínek a dotazů.

V několika případech začíná v disertační práci či v autoreferátu věta termínem „ $\beta$ -laktamasa“ apod. V tom případě by termín za pomlčkou měl být uveden velkým písmenem. Podobně tak

např. na str. 27 odstavec začíná 6-nitro-3-fenylamidobenzoová kyselina; správně by mělo být 6-Nitro...

V některých případech jsou v disertační práci zmiňovány symboly s blíže vysvětlujícím horním indexem, který by podle mého názoru měl být spíše dolní. Například  $\Delta A^{405}$  (např. na str. 33) nebo  $V^{x1 \rightarrow x2}$  (např. na str. 30).

Redukce měďnatých iontů v přítomnosti peptidické vazby se nazývá biuretová reakce, nikoliv Biuretova (str. 32). Název reakce je odvozen od dvou zkondenzovaných molekul močoviny (urey), zvaných biuret, který vstupují do reakce, podobně jako peptidy či proteiny.

Ojediněle se v práci objevuje laboratorní slang, např. na str. 49, kde se v popisu gelové filtrace píše, že „frakce... byly slity“, lépe by asi bylo uvést „byly spojeny“.

Velmi ojediněle se v práci objevují typografické chyby, např. chybějící mezera mezi dvěma závorkami na str. 81, druhý řádek zdola.

Autor uvádí, že celkem bylo otestováno cca 2 000 sbírkových kmenů a přírodních isolátů. Na testování kolika z nich se autor disertace podílel?

Pokoušel se autor osobně o imobilisaci enzymu? V práci se uvádí, že imobilisovaný preparát je testován v komerční firmě. Je možné uvést, jakým způsobem a na jaký nosič byl enzym imobilisován?

Jak jsem uvedl výše, domnívám se, že autor splnil veškeré požadavky na doktoranda kladené a doporučuji práci přijmout a pokračovat v příslušném řízení, vedoucím k udělení titulu „PhD“ v oboru mikrobiologie.

RNDr. Jiří Gabriel, DrSc.  
Mikrobiologický ústav AVČR  
Praha 4-Krč

Praha, 10. srpna 2007