

Oponentní posudek diplomové práce Bc. Veroniky Černé

**“Vývoj a optimalizace podmínek vazby Sfingolipid ceramid N-deacylázy
na magnetické mikročástice“**

Předložená diplomová práce řeší vývoj a optimalizaci magnetického mikroreaktoru s imobilizovanou Sfingolipid ceramid N-deacyláзой a charakterizuje jeho parametry. Dále byly studovány hydrolytické a syntetické vlastnosti solubilního enzymu pomocí specifických substrátů.

Diplomantka k tématu prostudovala většinou novější publikace a pro řešení zadaného úkolu použila celkem 69 literárních zdrojů, z toho 12 elektronických a 61 cizojazyčných. Dokumentovala tím svoji schopnost aktivně pracovat s vědeckou odbornou literaturou.

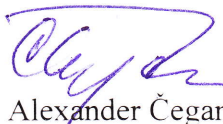
V textu teoretické a experimentální práce jsem našel některé chyby, nepřesnosti a nejasnosti, které celkově kladný dojem z této diplomní práce poněkud snižují. V textu jsou gramatické chyby na str. 13 (8. ř. sh.) správně: katalyzovaných (16. ř. sh.) připravovaly, str. 29 (1. a 2. ř. zd.) zachovaly, byly, nepřesnosti na str. 14 (6. ř. sh.) místo alkoholovou skupinu správně hydroxylovou skupinu a tvrzení (3. ř. zd.), že mastné kyseliny ceramidů obsahují hydroxylovou skupinu na α -, nebo ω - uhlíkovém atomu jsem v uváděné publikaci [12] nenalezl a je chybné. Na str. 15 v Obr. 1 je chybný vzorec sfingomyelinu a celkově k převzatým obrázkům konstatuji, že jsou málo čitelné a v angličtině. Na str. 32 (2. ř. sh) je termín „adsorpční vazba“, který již není dále vysvětlen, na str. 36 (6. ř. zd.) a na str. 41 (7. ř. sh.) je prováděna rehydratace směsi CHCl_3 a CH_3OH , myslím že se jedná pouze o rozpuštění.

Při konkrétní experimentální práci diplomantka prokázala značnou experimentální erudici a použitým postupům nelze nic vytknout. Bylo shromážděno množství experimentálních údajů které diplomantka odpovídajícím způsobem vyhodnotila a správně prezentovala a to jak tabelárně, tak i graficky. Pouze u Obr. 16 pochybuji, že vysvětlení uvedené na str. 50 je reálné, t.j. „tzv. zpětnou vazbou inhibice aktivity enzymu vznikající v důsledku rostoucí koncentrace produktu“ a to z důvodu, že koncentrace produktů u pokusů s konc. enzymu 5 a 10 mIU klesá. Na Obr. 17 je podobná situace i u reverzibilní reakce u stejných koncentrací enzymu a zde nesouhlasím s difúzní dostupností substrátu, tento fenomén se vyskytuje u velmi rychlých enzymů při nízké koncentraci substrátu. Velmi přijatelné vysvětlení jsem našel na str. 55 a to ustavování dynamické rovnováhy mezi hydrolytickou a syntetickou aktivitou enzymu, reálná je i malá rozpustnost enzymu při vyšší koncentraci, autoinaktivace atd. Stanovení Michaelisovy konstanty pomocí programu Gepasi bylo z důvodu malého množství dat neúspěšné, ptám se proč diplomantka nepoužila klasickou linearizovanou Lineweaver-Burkeho rovnici. Závěrečná část popisující stanovení skladovací a operační stability imobilizovaného enzymu již byla bezproblémová, prokázala převahu syntetické aktivity enzymu nad hydrolytickou a potvrdila význam imobilizace enzymů. Identifikace produktů obou reakcí pomocí hmotnostní spektrometrie potvrdilo experimentální erudici autorky i pracoviště a dokládá úspěšné nalezení vhodného magnetického nosiče s velmi dobrou skladovací i syntetickou operační stabilitou.

Diplomantka splnila zadání diplomního úkolu ve všech bodech, předložila závěrečnou zprávu s kvalitní experimentální částí na současné odborné úrovni, k písemné části práce mám převážně formální a interpretační připomínky. Doporučuji proto diplomovou práci Bc. Veroniky Černé k obhajobě a hodnotím ji známkou:

v ý b o r n ě – (m)

V Pardubicích 21.5.2010


doc. Ing. Alexander Čegan, CSc.
oponent