

Oponentský posudek
disertační práce Ing. Veroniky Podzemné
Využití čipového mikrokolorimetru při studiu chemických reakcí

Předložená disertační práce se zabývá testováním nekomerčního čipového kalorimetru zkonstruovaného na TU Freiberg a jeho využitím pro měření reakčních entalpií a kinetiky tří enzymatických reakcí. Některé z výsledků této práce již byly publikovány: V. Podzemná et al.: *Utilization of the IC-calorimeter for study of enzymatic reaction*, J. Thermal Anal. Calorim. 101 (2010) 715-719, V. Podzemná et al.: *Microcalorimeter – essential aspects of measurement*, Sci. Pap. Univ. Pardubice, Ser. A 15 (2009) 137-149 a dále ve formě několika přednášek a posterů na odborných mezinárodních i národních konferencích.

Disertační práce má celkový rozsah 119 stran. V teoretické části (42 stran) jsou podány základní informace o kalorimetrii, mikrokolorimetrii (až příliš podrobně) a mechanismu a kinetice enzymatických reakcí. V experimentální části (15 stran) je popsán používaný kalorimetr, postup měření a vyhodnocení výsledků. V kapitole Výsledky a diskuze (39 stran) jsou shrnuty hlavní výsledky práce: (i) kalibrace kalorimetru a optimální postup měření, (ii) měření reakčních entalpií tří enzymatických reakcí a (iii) studium rychlosti těchto reakcí v závislosti na podmínkách (teplota, koncentrace enzymu a substrátu, pH, použitý pufr). Závěry práce jsou shrnuty do stručného textu, ve kterém jsou uvedeny i další náměty pro využití IC-kolorimetrie. Práce čerpá z 80 literárních odkazů (včetně webových stránek) z let 1956-2011.

Posuzovaná práce přináší jednak cenné metodické poznatky o postupech měření v čipovém mikrokolorimetru vlastní konstrukce (TU Freiberg), jednak nové údaje o reakčních entalpiích a kinetických parametrech tří enzymatických reakcí. Po stránce stylistické a z hlediska grafického provedení má práce dobrou úroveň. Z věcného hlediska mi v práci chybí především jasně deklarované cíle, které lze čtenář spíše vytušit z některých vět v abstraktu a závěru. Některé formulace nejsou zcela přesné, např. str.11: „Měřená energie se převede na teplo, které se změní na základě zvýšení teploty ...“. To jistě není principem všech kalorimetrických metod (viz dále uváděný izotermní kalorimetr Bunsenova typu resp. power compensating DSC). Rovněž neplatí tvrzení na str. 87: „Pokles hodnoty ... jen logicky potvrzuje fakt, že u exotermních reakcí s rostoucí teplotou intenzita tepelného zabarvení klesá.“ Jako příklad uvádím např. exotermickou reakci $C(s) + 2 H_2(g) = CH_4(g)$, jejíž standardní reakční entalpie s rostoucí teplotou klesá (v absolutní hodnotě tepelný efekt roste). Obdobně se chová i reakce $C(s) + O_2(g) = CO_2(g)$, avšak tam je změna reakční entalpie s teplotou méně významná. Vliv teploty na hodnotu reakční entalpie není totiž dán znaménkem reakční entalpie, ale znaménkem změny tepelné kapacity, která tuto reakci doprovází. Analogický efekt můžeme pozorovat např. u tání prvků, tedy procesu endotermního, který může být doprovázen jak zvýšením tepelné kapacity – $\Delta_{fus}C_p > 0$ a růstem hodnoty $\Delta_{fus}H$ s teplotou (např. Ag, Cu, Ga, Ni, Zn, ...), tak snížením tepelné kapacity – $\Delta_{fus}C_p < 0$ a poklesem hodnoty $\Delta_{fus}H$ s teplotou (např. Al, Mo, Ta, ...).

Dále uvádím některé formální připomínky:

1. Styl literárních odkazů není zdaleka jednotný. V některých případech chybí ročník, někdy je uváděna první a poslední stránka textu, jindy jen první, u odkazu 40 chybí název práce, u odkazu 63 chybí zdroj atd.

2. V textu nejsou respektována některá základní typografická pravidla, a to jak obecná, např. psaní jednopísmenných předložek a spojek na konci řádky, tak odborná, např. psaní symbolů fyzikálních veličin kurzivou nebo psaní mezer před a za znaménkem = v textu.

3. Termíny „volná energie“ (v seznamu symbolů) či „volná entalpie“ v textu (str. 50) nejsou správné. Tato veličina se symbolem G se nazývá Gibbsova energie (z anglického Gibbs energy dle nomenklatury IUPAC).

4. V rovnici (16) na str. 51 nemá druhé a třetí znaménko \approx význam, neboť se jedná o rovnost a nikoli o přibližné vyjádření. První použití je v pořádku.

K prezentovaným výsledkům mám následující dotazy:

1. V textu na str. 86 jsou komentovány naměřené hodnoty reakční entalpie pro reakci ureázy s močovinou. Výrazné změny s teplotou (absolutní hodnota $\Delta_r H < 0$ se snižuje, tedy hodnota $\Delta_r H$ roste) jsou přisuzovány pouze vlivu teploty. Jelikož se však jedná o malou změnu teploty (zvýšení z 25 °C na 37 °C, tedy o 12 °C) je toto vysvětlení diskutabilní. Teplotní závislost reakční entalpie lze vyjádřit přibližným vztahem

$$\Delta_r H(T_2) = \Delta_r H(T_1) + \Delta_r C_p (T_2 - T_1)$$

Je-li rozdíl reakčních entalpií 33,1 kJ (fosfátový pufr) a rozdíl teplot 12 K, pak změna tepelné kapacity, která doprovází tuto reakci je $\Delta_r C_p = 33100/12 = 2758 \text{ J K}^{-1}$. (a tomu příliš nevěřím). Je možná takto výraznou závislost reakční entalpie na teplotě vysvětlit jinak?

2. Jak byly vypočteny meze intervalů spolehlivosti (hodnoty \pm) reakčních entalpií?

3. Na str. 89 je uvedeno, že obr. 58 potvrzuje předpoklad lineární závislosti rychlosti reakce na koncentraci enzymu. Lineární závislosti jsou proloženy i experimentální body v dalších obrázcích (59, 60, ...). Z čeho vychází předpoklad, že tato závislost je lineární a proč ve výše zmíněné publikaci (V. Podzemná et al.: *Utilization of the IC-calorimeter for study of enzymatic reaction*, J. Thermal Anal. Calorim. 101 (2010) 715-719) jsou v obr. 5 data pro trypsin + BApNA proložena nelineárně?

Závěrečné zhodnocení

Posuzovaná disertační práce Ing. Veroniky Podzemné přináší řadu cenných metodických poznatků a původních výsledků získaných při studiu tří enzymatických reakcí pomocí IC-kalorimetru. Přes výše uvedené připomínky k práci si myslím, že autorka prokázala tvůrčí schopnosti ve vědecko-výzkumné činnosti. Disertační práce vyhovuje obecně uznávaným požadavkům na doktorské disertační práce v příslušném oboru a doporučuji ji k obhajobě.



Praha 29.7.2011

prof. Ing. Jindřich Leitner, DrSc.
Ústav inženýrství pevných látek
Vysoká škola chemicko technologická
Technická 5
166 28 Praha 6 - Dejvice

7

Oponentní posudek disertační práce
**VYUŽITÍ ČIPOVÉHO MIKROKALORIMETRU PŘI STUDIU
CHEMICKÝCH REAKCÍ**

Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, katedra anorganické technologie,
2011

Vědní obor: Anorganická technologie

Doktorand: Ing. Veronika Podzemná

Školitel: Doc.Ing. Ladislav Svoboda, CSc.

Rozsah práce: 119 stran textu včetně 33 tabulek, 74 obrázků a 80 citací literatury

Posuzovaná doktorská práce se soustředí na problematiku miniaturizovaných, „čipových“ IC-kalorimetrů, které představují navýsost moderní vývojový trend současné kalorimetrie; z tohoto pohledu lze práci označit za průkopnickou. Cíl práce je orientován jednak na popis a poznání aspektů, které mohou ovlivnit správnost získaných experimentálních dat, jednak na ověření aplikačních možností IC-kalorimetrie pro studium (tří) enzymatických reakcí. V obou těchto rovinách dosáhla autorka evidentně původních poznatků, v čemž spatřuji hlavní přínos vlastní práce.

Práce je experimentálního charakteru a má odpovídající členění. Obrazová stránka je více než bohatá (celkem 74 obrázků) a zejména v úvodní části práce s fotografickou prezentací různých typů čipů se dala jistě efektivně zredukovat. V textu se vyskytují i poněkud „kostrbaté“ formulace, které přikládám menší „vypsánosti“ autorky; např. „*Termín izotermní zde není použit v pravém slova smyslu, ale značí především to, že teplota v kalorimetru je konstantní*“ (str. 54), „... *co nejvíce konstantní...*“ (str. 56) nebo „*Reakci je možné ukončit po 10 minutách od vyprázdnění mikrostríkačky*“ (str. 64, ukončit jistě můžeme měření, ale chemickou reakci sotva (s výjimkou jejího reversibilního provedení)).

Z drobnějších připomínek, které k práci mám, uvádím následující:

- Str.11: Uvedená bilanční rovnice /1/ platí (pouze) pro adiabatické podmínky, v obecném tvaru kalorimetrickou soustavu popisuje vztah obsahující kromě akumulčního členu nutně také člen vodivosti, tzv. Tian-Calvetova rovnice.
- Str. 15, 2. odst.: „*Tvar závislosti $\Delta T - t$ je závislý na hodnotě rovnovážné konstanty probíhající reakce*“. Správněji patří „... *na rychlosti probíhající reakce*“.
- Str. 18, 2. odst.: Na obrázku 5, na který je zde odkazováno, není IC-kalorimetr, ale „pouze“ jeho čip.
- Str. 31, 2. řádek: Skutečně se při vzniku chemické vazby může teplo pohlcovat ?
- Str. 47. 2. odst.: U hodnot molekulových hmotností chybí rozměr.
- Str. 47, předposlední odst.: Co se rozumí označením „*Počáteční rychlost rovnovážné reakce*“?
- Str. 50: Označení svislé osy na obr. 36 nemá být ΔG , ale G.
- Str. 50, 51 a. 61: Rovnice /15/, /19/ a /23/ jsou zcela totožné (podobně vztahy /21/ a /22/).
- Str. 53, Tab. 4: „*35% p.a.*“ není vyjádření čistoty látky, ale koncentrace a čistoty (podobně 25% p.a.).
- Str. 65, 1. odst.: „*Fyziologické hodnoty v lidském těle se pohybují v rozmezí 138 -400 $\mu\text{g/l}$.* Jedná se o (fyziologické) hodnoty **koncentrací**.
- Str. 66, 1. odst.: Je na místě označovat směs $\text{CH}_3\text{COONH}_4$ s NH_4OH jako **anorganický pufr**?

- Str. 73, tab. 8: Údaje o integračních plochách A pro koncentrace 0 a 50 mM jsou vzájemně přehozeny.
- Str. 83, posl. odst.: Srovnávání hodnoty dávkovacího efektu (120 μ J) s „měřeným tepelným efektem v řádech desítek kJ“ není korektní. Tepelné efekty v řádech desítek kJ totiž nejsou měřeny, ale jsou z naměřených hodnot (až následně) vypočteny.
- Str. 87, posl. odst.: Jak je myšleno, že „u exotermních reakcí s rostoucí teplotou intenzita tepelného zabarvení klesá“ ?

Mé následně uváděné dotazy necht' jsou prosím chápány jako náměty do diskuze při vlastní obhajobě.

Zaujalo mne studium vlivu charakteru látky vnášené na čip na výchozí hodnoty základní linie (kap. 5.1.4.2), kdy byl opakovaně zjištěn zcela odlišný (totiž klesající) průběh pro N,N-dimethylformamid v porovnání s chováním vody a hydrogenuhličitanu amonného s průběhy rostoucími (obr. 54, str. 80). Jakou roli při zjištěných průbězích hraje skutečně charakter sledovaných látek a jak se zde projevuje (možný) vliv počáteční teploty látek ?

Jako stěžejní kvantitativní údaj získaný analýzou kalorimetrických křivek byla u sledovaných enzymatických reakcí vyhodnocována konstanta K vyjadřující poměr mezi maximální reakční rychlostí (V_{max}) a Michaelisovou konstantou (K_m). Na stránce 62 je přitom uvedeno, že hodnotu konstanty K lze (také) získat z hodnoty časové konstanty kalorimetru τ . Údaj o časové konstantě τ použitého IC-kalorimetru jsem v práci nezaregistroval. Uvítám bližší vyjádření se k tomuto parametru (τ), ke vzájemnému vztahu „obou konstant“ (τ , K) respektive také k návaznosti na (související) otázku dekonvoluce kalorimetrických křivek.

Z vlastní (ne IC-)kalorimetrické zkušenosti vím, jak je pro získání věrohodné, správné hodnoty měřeného tepla důležitá znalost (nejpravděpodobnějšího) průběhu základní linie během kalorimetrického experimentu – tj. propojení mezi „začátkem a koncem“ měření. Z textu doktorské práce jsem vyrozuměl, že pro vyhodnocení průběhu základní linie ze záznamu z IC-kalorimetru je rozhodující „doběhová“ část kalorimetrické křivky (viz obr. 57, str. 84). V rámci vlastní obhajoby uvítám bližší pozastavení se u této otázky včetně „instruktáže“, jak by se pro zjištění reakčního tepla vyhodnocovaly kalorimetrické křivky znázorněné (např.) na obr. 72, str.103.

Celkové hodnocení:

Práce se věnuje modernímu trendu současné kalorimetrie, totiž miniaturizaci kalorimetrických zařízení s využitím „čipových“ IC-kalorimetrů. Velmi oceňuji autorčino úsilí v této průkopnické problematice a naměřená experimentální data pokládám za originální. S ohledem právě na „neprobádanost“ možností IC-kalorimetrů, včetně otázky jejich spolehlivosti pro exaktní sledování tepelných efektů, se ale domnívám, že byl zvolen příliš široký záběr experimentálního zájmu, kdy namísto tří sledovaných enzymatických reakcí mohla být pozornost detailněji věnována jediné z nich.

Práci doporučuji přijmout k obhajobě.

Ostrava 11. srpna 2011



Boleslav Taraba (Prof.,Ing.,CSc.)
katedra chemie PŘF
Ostravská univerzita
30.dubna 22, 701 03 Ostrava I

(Oponentem ustanoven Prof.Ing. M. Trojanem, DrSc.,
předsedou komise pro obhajoby dis. prací ve studijním programu
P283 na základě dopisu ze dne 7/7/011, zn. CH-0429-C/35-11)

Oponentský posudek

na disertační práci Ing. Veroniky Podzemné

„Využití čipového mikrokolorimetru při studiu chemických reakcí“

Disertační práce Ing. Podzemné se zabývá testováním vsádkového typu čipového mikrokolorimetru (IC-kolorimetru). Získané poznatky byly využity ke studiu tří enzymatických reakcí: ureázy s močovinou, invertázy se sacharózou a trypsinu s *N*- α -benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem.

Předložená práce má 120 stránek. Název práce by měl být konkrétnější, byl studován jen jeden typ chemických reakcí. Pro přehlednost by bylo lepší zařadit nejdříve úvod práce s jasně definovaným cílem práce (cíl práce je pouze krátce zmíněn v abstraktu a částečně také v závěru). Kapitoly 1-3 by měly být shrnuty do jedné teoretické části. Zařazení kapitoly 2.3., týkající se plynové mikrokolorimetrie, je zbytečné, protože v práci tato technika není použita. Správný zápis vzorce enzymu, který autorka používá ve tvaru *N*- α -benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem, by měl být *N*- α -benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem (*N* je psáno kurzívou).

Na 49 stranách autorka popisuje funkci mikrokolorimetru a jeho hlavní měřicí jednotku čip NCM-9924. Z abstraktu vyplývá, že jedním z důležitých parametrů ovlivňujících citlivost čipu je objem reakční směsi. Objem je obvyklé značit písmenem *V*, viz str. 75. V práci je však V_{\max} označována i maximální rychlost *v* v rovnici Michaelise a Mentenové, což je zavádějící (rovnice 15 a další). Pokud je rychlost enzymatické reakce v rovnici 15 na str. 50 definována jako *v*, je pak i její všechny hodnoty, včetně maximální, nutno značit stále stejně, tedy v případě maximální rychlosti, v_{\max} . Entropie, koncentrace substrátu a substrát jsou označeny *S*. Co se týká konstanty *K*, je v práci používána pod názvem konstanta, rychlostní konstanta a rychlostní parametr. Vzhledem k použití dalších čtyř konstant označených *K* (str. 117), je to zavádějící.

Dále potom:

- na str. 46, kapitola 3.3.1.3, je na obrázku 34 schéma Michaelise a Mentenové (MM), které vyjadřuje rychlost enzymatických reakcí *v* v závislosti na koncentraci substrátu c_{sub} . Rychlost nejprve roste lineárně (pro $c_{\text{sub}} \ll K_m$) až do bodu daného Michaelisovou konstantou (ta je rovna takové koncentraci substrátu, při které reakce katalyzovaná enzymem probíhá rychlostí,

kteřá je rovna polovině rychlosti maximální). Nakonec dochází k nasycení, MM křivka je tedy saturační. Není zde však uvedeno, že se jedná o MM rovnici. To je uvedeno až v kapitole 3.3.2., která by měla být logicky součástí kapitoly 3.3.1.3.

- na str. 46 je v textu koncentrace substrátu označena c_{sub} , na obrázku je označena S.

- na str.62 je uvedena jedna z nejpodstatnějších informací pro celou práci, a to, že rychlostní konstanta K je získávána jako převrácená hodnota τ ze vztahu $U = U_0 e^{-U/\tau}$ a dále používána. Tento vztah je však uveden jen jako malý inset v obr. 41.

- str. 50 a dále je stejná rovnice uvedena pod číslem 15 a 23 a je rovněž uvedena jako jedna ze dvou rovnic ve vztazích 16, 17 a 18.

- na str. 65, je uvedeno, že fyziologické hodnoty enzymů se v lidském těle pohybují v rozmezí 138 - 400 $\mu\text{g/l}$. Autorka však v předložené práci užívá koncentrace od 5 - 25 mg/ml , což je o několik řádů více. Není uveden důvod proč autorka zvolila právě tyto enzymy a jejich koncentrace.

- na str. 85, 86 a 87, jsou v tabulkách 15, 16, 17 a 18 uvedeny i literární údaje které nelze porovnat s výsledky, které jsou získány v předložené práci (jiná teplota, jiné pH nebo jiný pufr).

- na str. 89 - s odkazem na stranu 48, obr. 35 - by regresní přímka (rovnice 30) tedy měla procházet počátkem. Pokud v uvedeném případě regresní přímka počátkem neprochází, potom při nulové koncentraci enzymu je rychlost reakce (i bez enzymu) nenulová. To je potřeba objasnit.

- na str. 90, obr. 60, je závislost parametru K na koncentraci enzymu klesající. Použitý *N*- α -benzoyl-L-arginin-p-nitroanilid hydrochloridem se používá pro inhibici reakcí. Je pro tento případ možno použít schéma z rovnice 6 s rovnovážnou konstantou k_{-1} nebo se jedná o kompetitivní inhibici?

- str. 91 „autolýza“ je spíše než „sebetrávení“ samovolný rozklad.

- str. 104 „hodnotu V_{max} nelze z uvedené závislosti určit, jelikož na ose pořadnic není vynášena rychlost, ale pouze parametr K přímo úměrný rychlosti“. Tenhle předpoklad, měl být uveden a zdůrazněn pro lepší srozumitelnost práce na začátku experimentální části.

- str. 104 proč nebyla pro dosažení saturace zvýšena koncentrace substrátu?

- str. 104 jakou matematickou funkcí byla křivka na obr. 73 fitována a jaký je její fyzikální význam?

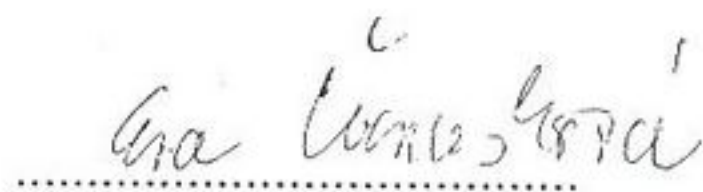
Po stránce formální i jazykové je práce psaná bez podstatných překlepů a v dobré kvalitě. Na stranách 11, 30 a 43 autorka uvádí citace nestandardním způsobem, např. „při sepisování této části disertační práce bylo čerpáno z práce [54-56]“. Citace je zvykem uvádět přímo za každým faktem a ne až za odstavcem. Autorka místy používá anglikanismy typu „co nejvíce komplexní“ (str. 30), „více komplexní“ (str. 35), „více kompaktní kalorimetr,“. Místy autorka používá laboratorní slang, např. „ligandový roztok,“ (str. 32) nebo „polykřemíková vrstva“(str. 117).

Získané poznatky o použitém IC-kalorimetru autorka použila při studiu kinetiky enzymatických reakcí. Byly měřeny aktivované i inhibované reakce a jejich závislost na koncentraci tří enzymů, na koncentraci substrátu, na pH a na teplotě. Bylo zjištěno, že rychlost enzymatických reakcí je možno, s jistým omezením, nahradit konstantou K, kterou lze určit z experimentálních dat získaných s použitím IC-kalorimetru.

I přes uvedené připomínky však mohu konstatovat, že doktorandka prokázala orientaci ve složité problematice kinetiky enzymatických reakcí, schopnost samostatné vědecké práce a v neposlední řadě také značnou laboratorní zručnost při měření na novém typu kalorimetru. Předloženou disertační práci proto

doporučuji k obhajobě.

Pardubice 28. 7. 2011



doc. Ing. Eva Černošková, CSc.

SLCHPL ÚMCH AVČR a Univerzity Pardubice