

## Posudek diplomové práce diplomantky Bc. Hany Víškové

**Název diplomové práce:** Uplatnění mikrokalorimetrie při studiu enzymatických reakcí

Diplomantka Bc. Hana Víšková se ve své diplomové práci zabývá aplikací mikrokalorimetrických metod při sledování kinetiky enzymatických reakcí.

V úvodu *teoretické části* shrnuje základní vlastnosti enzymů a popisuje mechanismus enzymaticky katalyzované reakce. Trochu nelogicky je zde včleněna kapitola 1. 1. 5 *Absorpce viditelného a ultrafialového záření* (str. 17), která dle mého názoru nemá souvislost s předchozí ani následující kapitolou. V kapitole 1. 2 *Kinetika enzymatické reakce, rovnice Michaelis-Mentenové* (str. 18) diplomantka vysvětluje základní pojmy reakční kinetiky a odvozuje rovnici Michaelis-Mentenové (MM) na základě popisu reakčního schématu /5/ diferenciálními rovnicemi. Zde uvedené reakční schéma /5/ je speciálním případem obecné jednosubstrátové enzymatické reakce a lze jej použít pouze za určitých zjednodušujících předpokladů, které však v dalším textu postrádám. Rovněž by bylo vhodné podrobněji vysvětlit pojem počáteční reakční rychlost a zdůraznit podmínky (zejména stupeň konverze chybně uvedený na str.21), za kterých lze rovnici MM použít. Na str. 24 je uvedena definice jednotky „*katal* ....jako *množství enzymové aktivity*, které katalyzuje přeměnu 1 molu substrátu za sekundu“. Správně by mělo být uvedeno „*katal* - množství enzymu, které katalyzuje.....“, protože enzymatické reakce jsou katalyzovány enzymem nikoli enzymovou aktivitou.

V další části se diplomantka podrobně zabývá enzymem trypsinem, jeho popisem, klasifikací, sekrecí prekursoru trypsinu a katalytickým mechanismem trypsinu. Tato část je zpracována velmi přehledně, logicky členěna a obsahově i zpracováním je dobré odborné úrovni.

V kapitole 1. 4 je diskutována problematika mikrokalorimetrie, její využití při studiu enzymatických dějů, výhody a nevýhody z pohledu studia kinetiky. Na str.37 je uveden vztah /25/ pro entalpii reakce, kde je však souvislost reakční rychlosti s měřenou veličinou? Jak vlastně přepočítáváme plochu píku resp. měřený signál na časovou závislost koncentrace substrátu nebo produktu, což je pro získání reakční rychlosti a posouzení kinetiky děje zásadní?

V teoretické části bych ještě upozornila na drobné nesrovnalosti, např. aktivní oblast membrány – na str. 40 je uvedeno 4x4 mm a v experimentální části na str. 44 se uvádí 4x4 cm, rovněž termín *pravoúhlá hyperbola* na str. 20. by bylo vhodné opravit. Tyto drobné nedostatky formálního charakteru vznikly zřejmě v důsledku časové tísně a nepovažuji je za zásadní.

### Připomínky k experimentální části:

- **str. 49** - je uvedeno, že enzym trypsin je převážně izolován z ryb a obojživelníků. Proč je potom pro celou experimentální část používán trypsin hovězí?
- **str. 55** - rovnovážná konstanta  $K$  je vyjádřena rovnicí /30/, kde se chybně vyskytuje koncentrace enzymu  $[E]$  ve jmenovateli (správně má být  $[S]$ ), což je v rozporu s dalším textem „..... $K$  nezávisí na koncentraci enzymu“
- **str. 55 a 56** – domnívám se, že kap. 3. 2. 1 a 3. 2. 2 týkající se poznatků z literatury by bylo vhodnější zařadit do teoretické části a v dalším textu se na ně odkazovat

- **str.57 – obr. 31** nemá pro experimentální část velkou vypovídací schopnost vzhledem k tomu, že chybí měřítko os i rozměry uváděných veličin (pro diplomovou práci toto schematické vyjádření dané závislosti nepovažuji za příliš vhodné)
- **str. 57 – obr. 32** převzatý z literatury (*patří tedy do teoretické části*) není vhodně zvolen, protože nezobrazuje typický případ substrátové inhibice. U většiny známých enzymů závislost reakční rychlosti na koncentraci substrátu nevykazuje „ostré“ maximum, ale pro určité rozmezí koncentrací substrátu je rychlost reakce na koncentraci nezávislá.
- **str. 60 – obr. 35** chybný popis – nejedná se o zobrazení vlivu koncentrace enzymu na rychlost reakce -  $K(s^{-1})$  je rychlostní konstanta nikoliv reakční rychlost, navíc proložení experimentálních bodů pro  $c_s = 0,022 \text{ mol/l}$  (červeně) je značně diskutabilní
- **str. 63 – obr. 38** – rovněž chybný popis os i obrázku a chybné proložení experimentálních bodů (zvláště černá závislost)

V experimentální části diplomantka píše o kinetice enzymatické reakce a sledování reakční rychlosti, nenalezla jsem ale jediný vzorový výpočet reakční rychlosti ani rychlostní konstanty. V tabulkách i grafech je často zaměněn nebo chybně uveden pojem rychlostní konstanta a rychlost reakce (grafy a tabulky str. 58 – 67). V celé práci rovněž postrádám *přepočet měřené veličiny na reakční rychlost (nebo rychlostní konstantu) a tudíž souvislost veličin mikrokolorimetrických a kinetických.*

Závěrem konstatuji, že diplomantka zvládla náročné experimentální metody i zpracování dat dle zadání diplomové práce v plném rozsahu a prokázala samostatnost při zpracování zadaného tématu. Oceňuji také schopnost kriticky zhodnotit výsledky i celkovou grafickou úpravu textu.

Předloženou diplomovou práci doporučuji k obhajobě a hodnotím známkou

velmi dobře

Ing. Alena Komersová, Ph.D.