

# Posudek oponenta diplomové práce

Jméno a příjmení studenta: **Bc. Tereza Jerglová**

Osobní číslo: **C09837**

Studijní program: **N3912 Speciální chemicko-biologické obory**

Studijní obor: **Analýza biologických materiálů**

Název diplomové práce: **Purifikace askorbát oxidázy izolované z cukety (*Cucurbita pepo medulosa*)**

Zadávací katedra: **Univerzita Pardubice, Fakulta chemicko-technologická, Katedra biologických a biochemických věd**

Vedoucí diplomové práce: **Mgr. Marcela Slováková, Ph.D.**

Konzultant: **Ing. Jaroslav Kabát, Enzymo Plus, Brno**

Termín vypracování: **říjen 2010 – duben 2011**

Jméno oponenta: **RNDr. Miloslav Smrž, CSc., důchodce, Brno**

## Hodnocení práce podle jednotlivých kritérií

### 1. Náročnost tématu práce

Téma diplomové práce Bc. Terezy Jerglové bylo poměrně široké a tím i náročné, protože zahrnovalo zpracování literární a patentové rešerše o enzymu askorbát oxidase, stanovení aktivity enzymu z tykvovitých rostlin (cukety) v různě koncentrovaných preparátech a konečně otestování různých separačních a purifikačních technik z hlediska výtěžnosti a čistoty enzymu. Autorka práce se přitom musela seznámit s funkcí a použitím různých přístrojů a pomůcek, statistickým vyhodnocením dat pomocí speciálního software, jakož i s některými analytickými a preparativními postupy

### 2. Splnění cílů práce

Zadané cíle práce autorka splnila. Nesplněn zůstal dílčí cíl – optimalizace procesu lyofilizace roztoku enzymu. Lyofilizace enzymového preparátu sice byla úspěšně provedena, proces však již nebyl optimalizován. Zde je však třeba podotknout, že tento dílčí cíl se objevil v zadání práce podmíněně a určená podmínka – dosažení vysoké čistoty enzymu – splněna nebyla.

### 3. Rozsah diplomové práce

Práce má 84 stran a i při korekci jejich počtu (odpočet stran s překopírovanými obrázky přístrojů a tabulkami) překračuje požadavek na minimální rozsah diplomové práce. Teoretická část s komentovanými výsledky literární a patentové rešerše přitom zaujímá 15 stran. Poměrně obsáhlá metodická část s popisem metodik a statistických parametrů využívaných při validaci analytických postupů má stran 22, experimentální část je na 24 stranách, diskuse výsledků na 4 a zbytek tvoří seznam použitých zdrojů informací a 3 přílohy s chromatografickými záznamy. Rozsah jednotlivých částí práce je vcelku vyvážený, diskuse výsledků provedených experimentů by však mohla být obsírnější.

### 4. Prezentační úroveň práce

Prezentační úroveň zprávy je vcelku dobrá, určité rezervy má autorka snad v prezentaci dosažených výsledků. Převážná část práce má logickou strukturu, pouze popisy některých přístrojů a zařízení z experimentální části by patřily spíše do předchozí metodické části. Přehlednosti zprávy by prospěly u tabulek s výsledky odkazy na příslušné kapitoly metodické části nebo zopakování informací po použitém postupu. Zevrubnější komentář by si zasloužily

zejména tabulky z kapitoly věnované validaci analytického postupu. Na tyto tabulky navazují poslední odstavce kapitoly Závěr (str.76-77), které bez podrobnějšího komentáře k tabulkám nejsou vždy úplně jasné. Vhodnější a přehlednější by také bylo zahrnutí bilance purifikačního procesu zmiňované v kap. 3.5.1 v samostatných odstavcích do přehledné tabulky 3.6. V publikovaných bilancích postupů izolace enzymů se přitom spíše než ztráty uvádí hodnoty zbývající enzymové aktivity.

## **5. Formální a jazyková úroveň práce**

Formálních a jazykových prohrěšků se v práci Bc. Jerglové projevuje jen malý počet. Vytknout lze některé překlepy, vynechaná nebo opakovaná slova. Na str. 10 má věta zřejmě končit slovy ...který peroxid vodíku rozkládá, na str. 20 v posledním odstavci se píše o dikarboxylových polyaminokyselinách, správně by ale mělo jít o poly(dikarboxylové aminokyseliny), ve 3. řádce od konce by slova ...dialdehydu získaného oxidací... měla být vypuštěna a údaj o „vysoké“ teplotě, kterou snese imobilizovaný termín by měl být zmírněn (vyšší, relativně vysoká teplota) nebo konkretizován. Manometrický přístroj (str. 22) je Warburgův a askorbát oxidáza může zřejmě oxidovat aminofenol (str. 24). Informaci o styren-divinylbenzenové kopolymerní matrici ionexů (str. 28) používaných při iontovýmenné chromatografii bílkovin autorka převzala zřejmě z některé obecně zaměřené učebnice, matricí ionexů používaných pro dělení bílkovin jsou většinou polysacharidové materiály. Údaj na str. 36 o silném vakuu 1-3 kPa, při němž se provádí lyofilizace, je chybný. Kdyby si autorka přepočítala jednotky z kap. 3.3.10 v údaji o praktickém provedení „isokratické“ lyofilizace (0,025 mbar - patrně odečet vakuometru na použitém lyofilizačním zařízení) na jednotky SI, pak by věděla, že nejde o kPa, ale pouze Pa. V termínu isokratická lyofilizace se autorka zřejmě přepsala. Na str. 75 píše autorka o gelové permeační chromatografii na gelu DEAE-Sephadex A50. Tento materiál sice má gelovou matrici, je to však iontoměnič. Poslední odstavec kapitoly věnované diskusi výsledků by spíše patřil do závěrečné kapitoly. Zmíněné nedostatky ale nejsou závažné a srozumitelnost práce výrazně nesnižují

## **6. Práce s literaturou**

Problematika askorbát oxidázy je komplexní a překvapivě rozsáhlá. Protože jde o enzym, který má významné praktické využití, představuje značný podíl podkladů patentová literatura. Diplomantka ve své práci dokazuje, že se v této problematice dobře orientuje a že si umí z dostupných informací vybrat ty podstatné.

## **7. Přínos studenta**

Přínos Bc. Jerglové k přípravě a analytickému hodnocení enzymu askorbát oxidasy lze hodnotit pozitivně, i když se v převážné míře zabývala reprodukcí popsaných metodik. Studentce se podařilo zvládnout celou řadu postupů a prací s různorodým zařízením používaným v praktické enzymologii, a to jak v oblasti enzymové analytiky, tak i izolace enzymu z rostlinné suroviny. Patrně jako první nebo jedna z prvních se zabývala validací postupu stanovení askorbát oxidasy a i když se ukázalo, že použitá metoda není za použitých podmínek stanovení aktivity není zcela ještě zcela validní, dávají její výsledky návod, jak dosáhnout splnění validačních kritérií (omezení koncentrací).

## **8. Aplikovatelnost výsledků v praxi**

Diplomantka získala zkušenosti, které bude možné využít při další optimalizaci postupu izolace enzymu askorbát oxidázy ze slupek cuket. Na její práci může navázat další vývoj, který by mohl vyústit ve vypracování postupu výroby důležitého enzymu ze suroviny, která je v podstatě odpadem.

### **Souhrnné hodnocení**

Bc. Tereza Jerglová se ve své diplomové práci zabývala řešením problematiky důležité pro praxi. Obtížné zadání práce splnila. Dobře se orientovala v literárních pramenech a pro svoji praktickou práci si zvolila vhodné metody. Dobře zvládla i různé izolační techniky, jakož i postup stanovení enzymové aktivity, který statisticky vyhodnotila. Na výsledky její práce může navázat další vývoj a optimalizace postupu. Její diplomová práce je přes drobné formální nedostatky a určitou nezkušenost s prezentací výsledků kvalitní.

**Doporučuji proto, aby práce byla přijata k obhajobě**

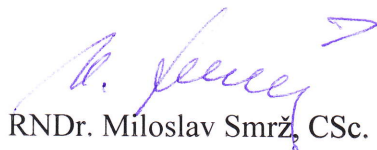
**Navrhované hodnocení: B**

### **Návrh otázek pro rozpravu k diplomové práci:**

Čím by mohly být způsobeny ztráty aktivity při odsolování preparátu askorbát oxidázy ultrafiltrací.

Jakým jiným způsobem by mohl být roztok enzymu odsolen?

V Brně dne 20. května 2011

  
RNDr. Miloslav Smrž, CSc.