

Posudek diplomové práce Tomáše Filipi („Fungální α -N-acetylgalaktosaminidasa – screening, produkce a charakterizace enzymu“)

Práce svědčí o tom, že se autor výborně vyrovnal s obtížným úkolem, jakým byl screening, produkce a charakterizace tohoto biotechnologicky významného enzymu. K řešení úkolu přistoupil po důkladné teoretické přípravě, navazující na ročníkovou práci. Výsledky této práce shrnuje pečlivě zpracovaná a rozsáhlá literární část, kde autor přehledně uspořádal dostupná data o známých enzymech tohoto typu.

Metodická část je přehledně zpracována a detailně popisuje použité postupy tak, aby je bylo možno snadno reprodukovat. Svědčí o tom, že řešení úkolu vyžadovalo zvládnutí širokého spektra mikrobiologických a biochemických metod od kultivačních technik a stanovení enzymové aktivity po různé metody purifikace enzymu a jeho charakterizace, např. elektroforézu v polyakrylamidovém gelu.

Výsledková část svědčí o velkém rozsahu provedených pokusů. Například výsledky shrnuté v tabulce 6 (screening kmenů hub na žádanou aktivitu) vyžadovaly rozsáhlé a časově náročné kultivace. Autorovi se podařilo nalézt perspektivní produkční kmeny a optimalizovat i produkci enzymu změnami kultivačních podmínek. Purifikace enzymu byla značně komplikována skutečností, že jeho zastoupení ve výchozím materiálu je nízké a enzym se vyskytuje v přítomnosti příbuzných kontaminujících aktivit. Přesto se autorovi podařilo v několika chromatografických krocích izolovat žádaný enzym, který je cenným nástrojem pro glykosylační reakce. Navržený originální postup je dobrým východiskem pro další práci, jejímž cílem, jak se zde uvádí, bude optimalizace výtěžku purifikace.

Práce obsahuje samostatnou diskusní část, kde jsou výsledky přehledně shrnuty a naznačeny další perspektivy studia daného problému. V této části bych ale očekávala také ve větší míře srovnání vlastností nového enzymu s již částečně charakterizovanými enzymech tohoto typu.

Práce je doplněna zdařilými makro- i mikroskopickými snímky producentů studovaného enzymu a detailním přehledem přístrojů a materiálů.

Po formální stránce hodnotím práci jako pečlivě napsanou a logicky tříděnou. Formulace jsou jasné a jazykové chyby se vyskytují jen ojediněle. Doporučila bych spíše průběžné číslování všech obrázků, zahrnující i tzv. grafy.

Prosím autora o odpovědi na tyto otázky:

1. Co by mohlo vysvětlovat pokles pH během kultivace produkčních kmenů (na rozdíl od kmenů, které sledovaný enzym neprodukují nebo jen v malé míře, Graf 1)?
2. V Grafu 4 se uvádí jak objemová, tak specifická aktivita. V předchozích částech práce jsou zmíněny problémy se stanovením specifické aktivity vzhledem k přítomnosti kontaminujících proteinů. Jak byl tento problém nakonec vyřešen?
3. U houby *Aspergillus niger* byl již částečně charakterizován enzym s α -N-acetylgalaktosaminidasovou aktivitou. Tato diplomová práce však svědčí o tom, že nový enzym má jiné vlastnosti. Prosím autora o shrnutí rozdílů.
4. Jak byla zjištěna pravděpodobná lokalizace subjednotky enzymu na elektroforetogramu (Obr. 15)?
5. Které faktory by bylo možno při izolaci enzymu optimalizovat tak, aby se zvýšil výtěžek izolace? Jaké další kroky lze doporučit pro úplnou purifikaci enzymu?

Autor prokázal, že je schopen řešit náročný vědecký úkol a výsledky své práce přehledně prezentovat písemnou formou. Proto doporučuji, aby jeho práce byla přijata k obhajobě na katedře botaniky PŘF UK a klasifikována „výborně“.

V Praze 10. 5. 2006



Ing. Ludmila Martínková, CSc.