

Posudek oponenta

Diplomová práce Zdenky Markové („Purifikace a charakterizace penicilin-G-acylasy ...“)

Práce je velmi zajímavým a cenným příspěvkem ke studiu enzymu penicilin-G-acylasy, které je v literatuře již dlouho věnována velká pozornost pro její praktický význam (použití pro výrobu modifikovaných penicilinů).

Literární rešerše se zabývá penicilinacylasami a penicilin-G-acylasou z různých aspektů, zejména pak možnostmi exprese tohoto enzymu a je doplněna názornými ilustracemi. Přehledně shrnuje rozsáhlou literaturu a umožňuje tak čtenáři rychle se seznámit se studovaným problémem.

Experimentální část popisuje široké spektrum metod použitých k purifikaci enzymů ze dvou producentů (*E. coli* a *Pichia pastoris*) a jejich charakterizaci.

Purifikace enzymu, popsána ve výsledkové části, vycházela v obou případech z biomasy kultivované v poměrně velkém měřítku (50 a 6 l; v obou případech byly použity fermentory). V prvním případě byl materiál již k dispozici, ve druhém případě byla kultivace součástí předložené práce. Provedení pokusu v tomto měřítku je cenné z hlediska možného praktického využití enzymu, protože scale up do provozního měřítka bude snazší. Enzym produkovaný v *E. coli* byl purifikován v 5 krocích, při nichž bylo dosaženo dobrého výtěžku (ca. 23%), což svědčí o pečlivém provedení. U purifikace enzymu z *P. pastoris* jsou uvedeny výsledky tří experimentů, které se mírně lišily způsobem desintegrace a obsahem inhibitorů proteas. Ve dvou případech bylo dosaženo výborných výsledků, tj. zvýšení aktivity 26-33x při výtěžku kolem 50%. Uvedené elektroforeogramy ukazují na vysoký stupeň čistoty takto získaných enzymů.

V další části výsledků byly enzymy z obou producentů srovnávány z různých hledisek. Pomocí metody MALDI-TOF byl získáno zajímavé zjištění týkající se rozdílů v aminokyselinových sekvencích podjednotek α . Rozdíly pak byly zjištěny také ve stabilitách a optimech obou enzymů, zejména teplotním optimu, a také v relativních substrátových specifitách a kinetických parametrech. Srovnání s 6 penicilin-G-acylasami popsány v literatuře svědčí o nových vlastnostech enzymů studovaných v této práci.

Práce obsahuje samostatnou část Diskuse, která přehledně shrnuje srovnání obou enzymů mezi sebou i s enzymy popsány v jiných pracích.

Úroveň diplomové práce lze hodnotit jako nadstandardní z hlediska obsahu i rozsahu. Předpokládám, že výsledky budou publikovány.

Prosím diplomantku, aby krátce shrnula, který způsob exprese a purifikace považuje za nejúčinnější, a který by tedy doporučila ho při případné průmyslové aplikaci enzymu, a

dále jaké postupy by zvolila pro jeho imobilizaci, která by v případě průmyslové aplikace byla zřejmě nutná.

Doporučuji, aby tato diplomová práce byla přijata k obhajobě na Katedře biochemie PřF UK a klasifikována známkou „výborně“.

V Praze 7. 5. 2007



Ing. Ludmila Martínková, CSc.