

Bírálat **Bíró Emese**
**IMMOBILIZATION OF β -D-GALACTOSIDASE ON
NANOSTRUCTURED CARRIERS AND
CHARACTERIZATION OF THE OBTAINED
BIOCATALYSTS**

című doktori értekezéséről

Bíráltomat avval a megjegyzéssel kell kezdenem, hogy nehéz a helyzete annak a bírálónak, aki már a házivédésen is akként szerepelt, hiszen érdemi megjegyzéseinek zöme bizonyára meghallgatásra lelt a végső dolgozat változat elkészítésekor. Bizony ez ebben az esetben is így van, akkori megjegyzéseim zömét Bíró Emese elfogadta, és azoknak megfelelően változtatott a dolgozatán. Így jelen bírálatom már szerencsésen főként a munka pozitívumainak kiemelésére koncentrálhat.

Bíró Emese egy mind tudományos mind gyakorlati szempontból rendkívül fontos és izgalmas területét választotta enzimmérnöki tevékenységének, azt kívánta ugyanis megvizsgálni, hogy hogyan lehet a természetből izolált, eddig többnyire homogén rendszerekben felhasznált enzimeket modern módszerekkel effektív heterogén fázisú katalizátorokká fejleszteni. Modell enzimként a tejcukorbontó β -galaktozidázt, egy élelmiszeriparilag is jelentős, tehát ipari felhasználású enzimet válsztott.

Kutatási célkitűzését a következőkben foglalhatjuk össze: alkalmas eljárást kívánt kidolgozni makro-, mikro- és nanoméretű kitozán hordozók előállítására és megoldást találni a célenzimnek ezen hordozókra történő effektív kovalens rögzítésére. Célul tűzte ki továbbá a sol-gél módszer felhasználásával nagy katalitikus hatékonyságú és megnövelt stabilitású enzimkészítményt előállítását. Végül természetesen ezen újonnan kialakított rögzített enzimrendszerek részletes vizsgálatát is megcélozta.

A tézisekkel együtt 156 oldal terjedelmű mű felépítése a következő: a célkitűzések ismertetését egy 57 oldalas irodalmi összefoglalás követi. Ezután a jelölt 14 oldalon keresztül ismerteti a felhasznált anyagokat és az alkalmazott módszereket, amelyet eredményeinek 72 oldalas ismertetése és diszkussziója követ. Végül a dolgozatot a három oldalas összefoglalás és a tézisek magyar és angol nyelvű ismertetése zárja. Ilyeténképpen, noha a mű kissé hosszabb az elvártnál, felépítése azonban a kívánt arányok szerinti.

Megadja a jelölt a dolgozat végén két impact faktoros idegennyelvű cikkének valamint 10 előadásának (7 külföldi, köztük 3 romániai konferencián elhangzott előadásának) adatait. Nagyon meggyőző ez a lista arra vonatkozóan, hogy eredményei felkeltették a nemzetközi tudományos közvélemény figyelmét, különösen, hogy a két folyóiratcikkre máris 18+7 független hivatkozást szerzett A házivédés óta kapott 3 újabb független hivatkozás egyik cikkére mutatja az értekezés témájának korszerűségét, beágyazottságát a nemzetközi tudományos áramlatokba..

Az irodami összefoglalás sorra veszi az enzim rögzítési módszereket erősen koncentrálva a hordozók fajtáira, a kitozán és a sol-gél mátrixok eddigi felhasználásaira, az alkalmazott módszerekre. Ezek az alfejezetek igen erősen review-szerűek, emiatt kissé leíróbbak a szükségesnél (értve ezalatt a ki mikor mivel mit csinált szerű feldolgozást), viszont élvezetes és hasznos áttekintést nyújtanak az olvasónak.

A dolgozat irodalomjegyzéke 182 irodalmi hivatkozást tartalmaz, amelyeknek legnagyobb része, 75 %-a 2000 utáni, ami mutatja az összefoglalás naprakész voltát.

Az irodalomjegyzékhez kapcsolódva kiemelem, hogy azt a házivédési megjegyzésemet, hogy ma már illik minden hivatkozott műnek a címét is megadni, megfogadta, és nyilván nem kis munkával, gondoskodott róla, hogy a végső dolgozatváltozat már minden cikk címét is tartalmazza. Evvel nagymértékben emelte dolgozatának mások által történő felhasználhatóságát.

Az anyagok és módszerek fejezet kiváló, a módszerek pontos leírása megteremti a megismételhetőségét a kísérleti munkának.

Nagyra értékelem azt a szisztematikus munkát, amit Emese az eredmények 3.1 fejezetében ad közre. Ez azoknak a módszereknek a végigvitelét jelenti, amelyekkel lehetséges volt makro-mikro- és nanorészecskéket előállítani kitozán alapon a lehető legkisebb átlagos részecskeátmérő és a legkarcsúbb méreteloszlás elérése céljából. Az itt leírtak eredményeit foglalja össze az 1. Tézispont is, amelynek megállapításaival egyetértek. Evvel kapcsolatban jegyzem meg, hogy a végső változathoz elkészített téziszjegyzék illetve téziszfüzet, így, alpontokba foglalva és kiemelve a saját eredményeket, valamint mindenhol magadva a hivatkozásokat is a saját munkára, már sokkal jobb és meggyőzőbb.

Ezeknek a kísérletsorozatoknak az eredménye az is, hogy megalapozta a következő nagyon értékes kísérleti munkarész – amelynek eredményeit a 3.2 fejezetben foglalta össze – alapjait, azaz azt, hogy meghatározta azokat a paramétereket, amelyek leginkább hatnak a részecske méret eloszlásra, ezek a következők: a keverősebesség, a kitozán koncentráció, a Tween80 koncentráció és a glutáraldehid koncentráció.

Ennek alapján egy végeredményben 43 kísérleti beállítást tartalmazó 4 faktoros, háromszintű Box-Behnken kísérlettervet realizált, majd a kísérletek eredményeit statisztikailag értékelte, illetve felállította a szignifikáns hatások alapján a rendszer lineáris és négyzetes tagokat valamint kétoldalú kölcsönhatásokat tartalmazó statisztikus matematikai modelljét, majd részletesen elemezte az egyes hatásokat az ANOVA rendszer alapján. Második lépésben a nem szignifikáns hatások elhagyásával egy módosított matematikai modellt kapott, amelyben csak négy lineáris hatás és 5 kölcsönhatás maradt és amely alkalmas az egyes technológiai paramétereknek az átlagos részecskeátmérő értékére gyakorolt hatása megjóslására. Ez a része a dolgozatnak lefedi a 2. Tézispont 5 alpontját. (Emese elfogadta azt a javaslatomat, hogy az eredetileg 2 és 3. tézispontot vonja egybe)

A dolgozat következő fejezete ugyan utal a makro- mikro és nanorészecskékre történő enzimrögzítés eredményeire, de szisztematikusan csak a mikro-val foglalkozik, ami nem baj, hiszen így tud az fentiekben bemutatott logikai vonal folytatódni. Itt a szerző a bétagalaktozidáz mikrohordozóra történő rögzítésének optimalizálásáról számol be, mégpedig az enzim terhelés és a glutáraldehid koncentráció, valamint a rögzítés idejének függvényében. Ezeket az eredményeket foglalja össze a 3. Tézispont is. Ez el is fogható, avval, hogy

nagymértékben technológiai jellegű, gyakorlati szempontból a legfontosabb megállapításokat tartalmazza,

Az utolsó rögzítéssel foglalkozó része a dolgozatnak a szol-gél bezárás módszerével foglalkozik és az itt tapasztaltakat foglalja össze az 4.Tézispont is. Itt nagyon leegyszerűsítve az lehet a tézis lényege, hogy egy új módszer lett kidolgozva, hiszen ezt a módszert először alkalmazták bétagalaktozidáz rögzítésére. Maga a munka vizsgálja az alkilcsoport hatását, a rögzítés megvalósításának illetve a TEOS-METEOS sziloxán arányának a hatását, továbbá additívok és az enzimterhelés kérdését és az egész módszer reprodukálhatóságának vizsgálatát, tehát végeredményben egy protokollt tesz le az asztalra, szerintem megfelel egy tézispontnak.

Az utolsó fejezet és egyben a 5. Tézispont az alkalmazott rögzítési módszerekkel készített immobilizált bétagalaktozidáz preparátumok tulajdonságait vizsgálja és hasonlítja össze az oldott enzimével. A hőmérséklet hatást csak egy szempontból vizsgálja, azaz hogy a magasabb hőmérsékleten történő rövidebb-hosszabb inkubálás hatására hogyan veszít aktivitást az enzim. Ezt meg kell különböztetni attól, hogy hogyan hat a hőmérséklet az enzimaktivitásra. Utóbbi esetben magát az aktivitásmérést kell az adott hőmérsékleten végezni. E két módszerrel kapott eredmények jelentősen eltérhetnek egymástól. Ez szó szerint megegyezik a házivédésen mondottakkal, amire ugyan Emese meggyőzően azt válaszolta, hogy ő a termostabilitást tartja fontosnak és azt vizsgálta, amivel én is egyetértek, mindazonáltal továbbra is hiányolom annak megvilágítását, hogy itt nem csak erről kell szót ejteni, hanem, hogy egy rögzített enzimnek a hőmérséklet optimuma is eltérhet a natívétől ezt pedig Emese nem vizsgálta, de nem is említi, azaz nem tesz különbséget a kétféle hatás között. Nem beszélve arról, hogy a fejezet avval a szakmailag pontatlan megfogalmazással kezdődik, hogy „The activity of enzymes, except thermostable enzymes, is usually decreasing or is completely lost with increasing of operation temperatures, due to the irreversible conformational changes at tertiary structure level” Ez így nem igaz.

A kinetikai görbékkel kapcsolatban megjegyzem, hogy továbbra is hagynak kívánnivalót maguk után, bár jelentősen javultak a házivédés óta. Az a problémám, hogy az enzimbemérések el vannak dugva a szövegben, illetve molárisan nem követhetők, továbbá a Sigma-Plot-tal kapott illesztéseknél nem értem, hogy a V_{max} -ot miért nem adta meg. Az időfüggés görbék nyilvánvalóan megfelelnek a Michaelis-Menten hiprbolák egy- egy pontjának (a legnagyobb S bemérésnek illetve bemérésnél), de oda-vissza számoláskor bizony csak részben kaptam hasonló eredményeket. Lásd a számolt enzim beméréseket illetve k_{cat} ($=k_H$) értékeket:

	M-M-ből k_{cat}	időgörbéből k_H	számolt enzim bemérés
Natív:	948 min ⁻¹	2982 min ⁻¹	$3,84 \cdot 10^{-5}$ mM
Kovalens	196,4	220,1	$4,259 \cdot 10^{-4}$ mM
Sol/gél	62,9	46,05	$1,448 \cdot 10^{-3}$ mM

Vajon van- e magyarázat ezekre az eltérésekre, hiszen utóbbi két esetben lehet, hogy a mérési hibák jelentik az eltérést, de az elsónél nagyon nagy a különbség. Vajon tényleg ennyi volt-e

az enzim bemérés a három esetben, ahogy az eredményekből számolható? Ha ezeket az eredményeket publikálni akarja utólag, véleményem szerint további finomításra szorulnak.

Ha összefoglaljuk a kinetikai eredményeket, az alábbiakat nyerjük:

	K_m ONPG	K_m laktóz	k_{cat} ONPG	k_{cat} laktóz	K_{cat}/K_m ONPG	K_{cat}/K_m laktóz
natív	3,93	84,42	81,05 s ⁻¹	948 s ⁻¹	20,62	11,23
kovalens	13,95	140,7	12,72	196,4	0,91	1,40
Sol/gél	10,53	123,6	23,68	62,89	2,25	0,51

Affinitás csökken tehát ebben az irányban: natív > sol/gél > kovalens mindkét szubsztrátra, míg k_{cat} esetében a sorrend natív >> kovalens > sol/gél de csak a laktóz szubsztrátnál, az ONPG-nél marad a fenti sorrend.

Tudna-e ezekre magyarázattal szolgálni, illetve arra, hogy az ONPG-re miért specifikusabb az enzim mindhárom esetben?

A dolgozat szerkesztése kiváló, a táblázatok és az ábrák informatívak, utóbbiak esztétikusak is.

A dolgozat angolja – amennyire én meg tudom ítélni – korrekt, könnyen olvasható, kevés szembeötlő nyelvi hibát és elírást tartalmaz.

Összefoglalóan megállapíthatom, hogy Bíró Emese egy egészen kiváló PhD értekezést tett le az asztalra. Kutató munkája során modern módszereket alkalmazott, eredményei meggyőzőek. Valamennyi tézisét és azok altézispontjait elfogadom új tudományos eredménynek.

Véleményem szerint a dolgozat illetve annak új tudományos eredményei sikeres védelem esetén alkalmasak a doktori cím elnyerésére. Gratulálok mind a jelöltnek mind témavezetőjének az értékes tudományos eredményekhez.

Budapest, 2012-08-16.



Sevela Béla

egyetemi tanár