

Válaszok Dr. Gubicza László egyetemi tanár opponensi bírálatára

Megköszönöm bírálómnak, Dr. Gubicza László egyetemi tanárnak a dolgozatom alapos áttanulmányozását.

Kérdéseire az alábbi válaszokat fogalmaztam meg.

1. Tapasztalatai alapján milyen más, gyakorlati szempontból fontos enzim rögzítésére ajánlaná a kidolgozott módszert?

Válasz:

Az általam kidolgozott β -galaktozidáz szol-gél rögzítési módszere egy teljesen új protokoll. Ebbe a rendszerbe ezt az enzimet még nem rögzítették, irodalmi adat nem található. A szol-gél rögzítés nagyon széles körben alkalmazható rögzítési módszer. Ez a nagy számú prekurzornak és az adalékanyagok széles választékának tulajdonítható. Viszont a szol-géles rögzítést minden esetben az adott enzimhez és az enzim alkalmazhatóságához kell igazítani. A β -galaktozidáz csak konvencionális, azaz vizes közegben működő enzim, a szol-gél térhálósított szerkezet pedig egy hidrofób rendszer. Ezért a szilán prekurzorok és a katalizátor fajtáját, úgy választottam ki, hogy egy kevésbé hidrofób rendszer jöjjön létre, hogy a vizes közegű szubsztrát eljuthasson az enzim katalitikus centrumába. A kidolgozott szol-gél rögzítési módszer első sorban konvencionális közegben működő olyan ipari felhasználhatóságú enzimekre alkalmazható mint a celluláz, amely a cellulózt hidrolizálja, az amiláz, amely a keményítőt hasítja és különböző proteáz enzimek, amelyek a fehérjékben található peptidkötések hidrolízise révén bontják le a fehérjéket kisebb peptidekre, majd aminosavakra. Minden esetben meg kell azonban vizsgálni, hogy a rögzített enzim mutat-e aktivitást, és a szol-gél rendszert az enzim szerkezetéhez kell alakítani, úgy, hogy az rögzített enzim az adott körülmények között a legmagasabb aktivitást mutassa.

2. Az irodalmi adatok azt mutatják, hogy a rögzítés következtében az enzimek aktivitási értéke megváltozik, általában csökken. Érvényes-e ez a megállapítás az előállított heterogén biokatalizátorokra, és ha igen, van-e az anyagátadásnak szerepe ebben az aktivitási érték változásban, valamint a szol-gélbe rögzített és a kovalensen kötött enzimek aktivitása között észlelt különbségben?

Válasz:

Erre a kérdésre adott válaszom kapcsolódik másik bírálóm, Dr. Sevela Béla egyetemi tanár kérdésére adott válaszomhoz. Az aktivitási értékek összehasonlítása leginkább a specifikus aktivitások alapján lehetséges. A natív enzim specifikus aktivitásához képest ($65,8 \mu\text{mol ONP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ fehérje) a kovalensen kötött β -galaktozidáz legmagasabb specifikus aktivitási értéke $2,3 \mu\text{mol ONP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ kötött fehérje, a szol-gélbe zárt enzim specifikus aktivitása pedig $83,1 \mu\text{mol ONP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ kötött fehérje. Ezeket az aktivitásokat a katalizált reakció sebességének mérése alapján számoltam ki, mivel megállapítottam, hogy az aktivitás mérés ideje alatt a reakciótermék (*o*-nitrofenol ONP) keletkezése lineáris az idő függvényében. Mivel alapjában véve kinetikai mérésekről van szó, az anyagátadás nyilvánvalóan befolyásolja az előállított heterogén biokatalizátorok aktivitását. A kovalens kötés esetében az enzim rögzítése a kitozán

mikrorészecskék külső felületére történt, melyek szerkezete nem volt porózus, míg a szol-gélbe rögzítés az enzim bezárását eredményezte, a keletkezett porózus szerkezet belsejébe. Ebből az következik, hogy a kovalensen kötött β -galaktozidáznál valószínűleg a külső diffúzióknak van meghatározó szerepe az anyagátviteli ellenállásban, viszont a szol-gélbe zárt enzimnél a belső diffúzió a legfontosabb tényező, amely az anyagátviteli ellenállás növekedését eredményezi. Annak ellenére, hogy a kovalens kötással rögzített enzim kisebb anyagátviteli ellenállást kellene tanúsítson, specifikus aktivitási értéke jóval alacsonyabb, mint a szol-gélbe rögzített β -galaktozidáz specifikus aktivitása. Ez többek között annak tulajdonítható, hogy a natív enzim tetrameres szerkezete vizes közegben disszociál, ennek eredményeképpen elveszíti aktivitásának egy részét, és a kovalens rögzítés során valószínű, hogy nem többpontos kovalens kötés jön létre. Tehát a szol-gélbe rögzített, valamint a kovalensen kötött enzim aktivitása között észlelt különbség elsősorban nem anyagátadási okokra vezethető vissza.

Az anyagátadási ellenállás fontossága jobban látszik, ha a szol-géles és a kombinált (szol-gél és adszorpció) módszerrel elért eredményeket hasonlítom össze. A kombinált módszer esetében a szol-gélbe zárt enzim vékony rétegben oszlik el a szilárd adszorbens felületén, ezzel csökkentve az anyagátadási ellenállást. Ennek következtében a kombinált módszerrel rögzített β -galaktozidáz specifikus aktivitása $127,8 \mu\text{mol ONP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ kötött fehérje, nagyobb, mint a szol-géles módszerrel rögzített enzim $83,1 \mu\text{mol ONP} \times \text{min}^{-1} \times \text{mg}^{-1}$ kötött fehérje specifikus aktivitási értéke.

A szol-géles módszer hatékonyságát a katalitikus hatékonysági értékek összehasonlítása is igazolja. A katalitikus hatékonyságot a rögzítés után visszanyert összaktivitás (aktivitás [$\mu\text{mol ONP} \times \text{min}^{-1} \times \text{g}$ enzim preparátum] megszorozva a biokatalizátor tömegével [g]) és a kötésre vitt összaktivitás arányaként számoltam ki. Ha ezeket az értékeket hasonlítom össze, a kombinált módszerrel rögzített enzim katalitikus hatékonysága 6,6-szoros, a szol-géles módszerrel rögzített biokatalizátoré pedig 4-szeres növekedést mutatott, míg a kovalensen kötött β -galaktozidáznál csak a kötésre vitt összaktivitás 13%-át tudtam visszanyerni. Összefoglalva, az aktivitás változása a rögzítés után sokkal inkább más tényezőknek tulajdonítható, mint az anyagátadás, de hasonló (szol-géles és a kombinált) módszerrel előállított biokatalizátorok esetében az anyagátadási ellenállás fontos szerepet játszik, mivel a kombinált módszerrel előállított biokatalizátor specifikus aktivitása 50%-kal növekedett a szimpla szol-géles módszerrel előállított biokatalizátor specifikus aktivitásához képest, és ez a növekedés az alacsonyabb anyagátadási ellenállás következtében jött létre.

Ismételten megköszönöm bírálómnak lelkiismeretes munkáját, amivel hozzájárult dolgozatom hibáinak javításához.



Biró Emese

Doktorjelölt

Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskola

Pannon Egyetem, Veszprém

Veszprém, 2012. december 18.