

Nyugat-magyarországi Egyetem
Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola
Biokörnyezettudomány program

Herke Zoltán

BIOKATALITIKUS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA
A KÖRNYEZETI KÁRMENTESÍTÉSBEN

DOKTORI (PhD) ÉRTEKEZÉS

Témavezetők:

Dr. Németh Zsolt István

Dr. Cserny Tibor

Sopron

2015

BIOKATALITIKUS FOLYAMATOK VIZSGÁLATA A KÖRNYEZETI KÁRMENTESÍTÉSben

Értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében

Írta:

Herke Zoltán

Készült a Nyugat-magyarországi Egyetem: Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola

Biokörnyezettudomány programja keretében

Témavezetők:

Dr. Németh Zsolt István

Dr. Cserny Tibor

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

.....

.....

(aláírás)

(aláírás)

A jelölt a doktori szigorlaton % -ot ért el,

Sopron,

.....
a Szigorlati Bizottság elnöke

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom (igen /nem)

Első bíráló (Dr.) igen /nem

.....
(aláírás)

Második bíráló (Dr.) igen /nem

.....
(aláírás)

(Esetleg harmadik bíráló (Dr.) igen /nem

.....
(aláírás)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján.....% - ot ért el.

Sopron,

.....
a Bírálóbizottság elnöke

A doktori (PhD) oklevél minősítése.....

.....
Az EDHT elnöke

NYILATKOZAT

Alulírott **Herke Zoltán** jelen nyilatkozat aláírásával kijelentem, hogy a „**Biokatalitikus folyamatok vizsgálata a környezeti kármentesítésben**” című PhD értekezésem önálló munkám, az értekezés készítése során betartottam a szerzői jogról szóló 1999. évi LXXVI. törvény szabályait, valamint a Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola által előírt, a doktori értekezés készítésére vonatkozó szabályokat, különösen a hivatkozások és idézések tekintetében.¹

Kijelentem továbbá, hogy az értekezés készítése során az önálló kutatómunka kitétel tekintetében témavezetőimet, illetve a programvezetőt nem tévesztettem meg.

Jelen nyilatkozat aláírásával tudomásul veszem, hogy amennyiben bizonyítható, hogy az értekezést nem magam készítettem, vagy az értekezéssel kapcsolatban szerzői jogsértés ténye merül fel, a Nyugat-magyarországi Egyetem megtagadja az értekezés befogadását.

Az értekezés befogadásának megtagadása nem érinti a szerzői jogsértés miatti egyéb (polgári jogi, szabálysértési jogi, büntetőjogi) jogkövetkezményeket.

Sopron, 2015. október 10.

.....
doktorjelölt

1999. évi LXXVI. tv. 34. § (1) A mű részletét – az átvevő mű jellege és célja által indokolt terjedelemben és az eredetihez híven – a forrás, valamint az ott megjelölt szerző megnevezésével bárki idézheti.

36. § (1) Nyilvánosan tartott előadások és más hasonló művek részletei, valamint politikai beszédek tájékoztatás céljára – a cél által indokolt terjedelemben – szabadon felhasználhatók. Ilyen felhasználás esetén a forrást – a szerző nevével együtt – fel kell tüntetni, hacsak ez lehetetlennek nem bizonyul.

TARTALOMJEGYZÉK

1.	KIVONAT	8
2.	ABSTRACT.....	9
3.	BEVEZETÉS	10
4.	SZAKIRODALMI RÉSZ.....	12
4.1.	A remediáció eljárásai és csoportosítási lehetőségei.....	12
4.2.	Talaj- és talajvíz szennyezők eltávolítása a szennyezett közegből	13
4.3.	Biotechnológiai alkalmazások a kármentesítésben	17
4.4.	Biodegradációs folyamatokat befolyásoló tényezők.....	19
4.5.	Biodegradációs eljárások típusai.....	21
4.5.1.	Természetes szennyező anyag csökkenés, „öntisztulás”	22
4.5.2.	Biostimuláció	22
4.5.3.	Ösztönös talaj-, illetve talajvízoltás	23
4.5.4.	Bioaugmentáció – Faj szinten identifikált mikroba közösségekkel	24
4.6.	Enzimkészítmények alkalmazása a bioremediációra	25
4.7.	Enzimkatalitikus kármentesítések enzimszereplői.....	27
4.8.	Enzimkatalitikus lebontási folyamatok elméleti háttere.....	29
4.9.	Michaelis–Menten kinetikai modell.....	30
4.10.	Steady-state állapot, a Michaelis-konstans származtatása	31
4.11.	Enzimmoduláció, inhibíciós és aktiválási hatás az enzimaktivitására	34
4.11.1	Kompetitív inhibíció	34
4.11.2	Nemkompetitív inhibíció.....	36
4.11.3	Unkompetitív inhibíció	37
4.11.4	Kevert típusú inhibíció.....	38
5.	ANYAG ÉS MÓDSZER.....	40
5.1	Biokatalitikus lebontási folyamatok modellezése	40
5.2	Enzimaktivitást módosító hatások indikálási lehetőségei	42
5.2.1	Inhibitor hatások érzékelése kinetikai paraméterek változásával.....	42
5.2.2	Enzimaktivitást befolyásoló hatások érzékelése kinetikai görbék korreláltatásával	44
5.2.3	Kinetikai lebontási görbék főkomponens-elemzése.....	44
5.3	Kísérletes kinetikai adatsorok előállítása. Kísérlettervezési szempontok	45
5.3.1	Biológiai extraktum előállítása szennyező anyagok lebontásához.....	47
5.3.2	Szennyező anyag bontó termék alkalmazása	48
6.	EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK	50
6.1	Modellezett biokatalitikus lebontások eredményei és értékelésük.....	50

6.1.1	Enzim kinetikai paraméterek becslési lehetőségei és korlátai.....	50
6.1.2	Regressziós modellek elméleti, illetve modellezett hibaanalízise.....	50
6.1.3	Inhibíció érzékelése kinetikai paraméterek megváltozásán keresztül	58
6.1.4	Inhibíció érzékelése a variációs koefficiens (CV %) vizsgálatával.....	63
6.1.5	Inhibíció és aktiválás érzékelése a kinetikai adatsorok korreláltatásával....	64
6.1.6	Enzimaktivitást módosító hatás mértékének származtatása	67
6.1.7	Inhibíció és aktiválás érzékelése a kinetikai adatsorok főkomponens- elemzésével	68
6.2	Biokatalitikus szennyező anyag lebontás laborkísérletei és eredményei	69
6.2.1	Kinetikai paraméterek meghatározása kísérleti adatokból.....	78
7.	ÖSSZEFOGLALÁS, TÉZISPONTOK.....	80
7.1.	Összefoglalás.....	80
7.2.	Tézispontok.....	80
8.	KITEKINTÉS	84
9.	KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS.....	85
10.	HIVATKOZOTT IRODALOM.....	86
10.1.	A dolgozatban található ábrák jegyzéke:	92
10.2.	A dolgozatban található táblázatok jegyzéke:	94
11.	MELLÉKLETEK.....	95
11.1	Biokatalitikus lebontási folyamat modellezésének SCILAB algoritmus.....	95
11.2	PCA felbontás kiindulási relativizált adatmátrixai.....	97
11.2.1	Benzaldehid-Toluol modell adatok	97
11.2.2	Benaldehid-Toluol keverék „kvázi kísérleti” adatok	98
11.2.3	Benzol-Toluol keverék „kvázi kísérleti” adatok	99
11.3	Paraméterbecslési regressziós modell egyenletek elméleti hibaanalízise	101
11.3.1	Az (1) regressziós modell Lineweaver–Burk-féle paraméterbecslés esetén tapasztalt véletlenszerű kiugró szórásértékek az alkalmazott zajhatás eredményeként 104	
11.4	Biológiai (giliszta) extraktum előállítás a modell szennyező anyagok biokatalitikus lebontásához.....	107
11.5	GC, illetve GC-MS analízisek egy-egy reprezentáns kromatogramja	107
11.6	Benzol-toluol biokatalitikus párhuzamos kísérletek lebontási relativizált kinetikai görbéi és koncentráció értékei	108
11.7	Regressziós egyenesek Statsdirect-tel végzett kovariancia analízise (ANCOVA) 108	
11.7.1	Modell adatsorok.....	108
11.7.2	Autokorrelációs és inhibíciós regressziós egyenesek kovariancia analízise 108	

11.7.3	Referencia és inhibíciós regressziós egyenesek kovariancia analízise.....	109
11.7.4	Referencia és aktiválási regressziós egyenesek.....	111
11.7.5	Kísérleti adatsorok	112
11.7.6	Földigiliszta extraktummal végzett biokatalitikus kísérletekből származtatott regresszió egyenesek kovariancia analízise.....	112
11.7.7	Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (benzaldehyd-toluol).....	113
11.7.8	Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (toluol-benzol).....	114
11.7.9	Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (toluol-benzol).....	115
11.7.10	Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (toluol-benzol).....	115

1. KIVONAT

Herke Zoltán

Biokatalitikus folyamatok vizsgálata a környezeti kármentesítésben

Doktori (PhD) értekezés

A doktori dolgozat célja az enzimatis lefontási sebességet befolyásoló szubsztrát specifikus, gátló és aktiváló hatások érzékelhetőségi vizsgálata volt. Biokatalitikus kármentesítési beavatkozások hatékony tervezhetősége, optimálása megköveteli komplex szennyeződés összetétel esetén, hogy pontos képet kapjunk a biokémiai lefontási folyamatok sajátosságairól.

Az érzékelhetőségi vizsgálathoz kidolgoztam és teszteltem egy többváltozós lineáris regressziós eljárásón alapuló, kinetikai paraméterbecslési módszert. Továbbá kinetikai adatok regressziós és főkomponens elemzéseit felhasználva, az enzimek szubsztrát megkötését és átalakítását befolyásoló mechanizmusok kimutatására egy értékelési eljárást származtattam.

A kinetikai paraméterbecslés pontosságát befolyásoló tényezők hatását (kiindulási szubsztrát koncentráció, zaj és inhibíció jelenléte) egy a Michaelis–Menten kinetikán alapuló biodegradációs modell segítségével vizsgáltam. Az eljárás nem igényel bonyolult adatelőkészítési lépéseket és egyszerű felhasználói környezetben, speciális enzimkinetikai kiértékelő szoftver nélkül is alkalmazható. Az enzimaktivitást módosító hatások érzékelésére kidolgozott módszereket mind modell, mind kísérleti adatsorok felhasználásával egyaránt teszteltem.

A kimunkált értékelések lehetőséget teremtenek enzimkinetikai adatsorokból történő információszerzéshez, melyek nem csak oktatási/kutatási területeken, hanem az alkalmazott biokatalitikus termékek jellemzésére is felhasználhatóvá válnak.

2. ABSTRACT

Zoltán Herke

Investigation of biocatalytic processes in the environmental strategy

Ph.D. thesis

The aim of the doctoral essay was to investigate the detection of substrate inhibition and activation effects that are capable of influencing the rate of enzymatic degradation. To carry the biocatalytic environmental strategy into efficient execution, it is necessary to pick up information about the characteristic of biochemical degradation processes.

Therefore, I have worked out and tested a method for estimating kinetic parameters based on multivariate linear regression. Furthermore, I have made perceptible the enzyme activity modifications by using regression and principal component analysis on the concentration of substrates or contaminants. Effect of the inhibition, noise level and the initial concentration of substrate on the parameters estimating were investigated using biodegradation model. The applicability of evaluation strategy was checked successfully using model as well as experimental results. The advantages of evaluation are the following: (*a*) it does not require difficult data pre-processing, (*b*) it is applicable quickly and simply without using specific enzyme kinetics evaluator software.

The presented methods are opening up new opportunities to investigate enzyme kinetic data series, which can be adaptable not only as a field of education/research, but also in the biocatalytic environmental strategies.

3. BEVEZETÉS

A környezetvédelemben fajsúlyos szerepet tölt be a bekövetkezett káresemények tervezhető mentesítése, amely iránt fokozódó gazdasági és társadalmi igény jelentkezik. Az elmúlt évtizedekben egyre inkább előtérbe kerültek azok a biotechnológiai folyamatok, melyek során a talaj-, illetve talajvízszennyezők lebontása különböző élőszervezetek, illetve enzimeiken keresztül valósulnak meg. A biokatalitikus vagy bioremediációs technológiák számos előnnyel rendelkeznek más fizikai-kémiai kármentesítésekkel szemben, mint pl., viszonylagosan költségghatékonyak *in situ* alkalmazásaik a terület eredeti funkcióját nem módosítják, illetve más kármentesítési folyamatokkal, elő- és utókezelésként jól kombinálhatóak. Hátrányuk az időigényesség, valamint a környezeti tényezőktől, (pl. hőmérséklet, pH) való függőség. A szennyezett közeg és a szennyező anyagok sajátosságai a hatékonyságaikat erőteljesen befolyásolják. A bioremediációs kármentesítési fejlesztések az alkalmazási nehézségek megoldásaira fókuszálnak. Számos hazai és nemzetközi környezetvédelmi vállalkozás erőfeszítéseket tesz a szélesebb szennyező anyag specifikus és nagyobb lebontási hatékonyságú *in vivo* és/vagy *in vitro* kármentesítő termékek előállítására.

Bár előállításuk eltérő mikrobiológiai (algák, baktériumok, moszatok) vagy magasabb rendű (gombák) élőlényekből történhet, a szennyező anyagok lebontása enzimfehérjéken keresztül valósul meg. Éppen ezért a tématerület vizsgálatához elengedhetetlenül szükséges a biokémiai és enzimkinetikai megközelítés. A biokatalitikus lebontások hatékonyságáról, a biokémiai reakciók sebességét befolyásoló tényezőkről az enzimkinetika paraméterek nyújtanak információt és kínálnak lehetőséget a termékek jellemzésére.

A doktori értekezés a biokatalitikus kármentesítési eljárások során alkalmazható termékek vizsgálati és értékelési lehetőségeire egy alternatív, újszerű megközelítést mutat be. A kidolgozott értékelési eljárások megértését, illetve követhetőségét elősegítő, az enzimkinetika alapismeretei a 4.7–4.10. fejezetekben tárgyalt.

A téma célkitűzése a következőképpen foglalható össze:

- Enzimkinetikai reakciók jellemzésére a maximális reakció sebesség és a Michaelis konstans (v_{max} és K_M) paraméterek nyújtanak lehetőséget. Pontos meghatározásokra gyakran csak korlátozott formában, esetleg költségesen beszerezhető kiértékelő szoftverek (Berkeley Madonna, DynaFit) elérhetők. Éppen ezért egyszerű felhasználói környezetben kezelhető kiértékelési módszer kidolgozása volt az egyik célom.

- Komplex összetételű, kármentesítendő rendszerekben – legyen az *ex situ* vagy *in situ* kármentesítés – az alkalmazott biokatalitikus termékek lebontó képességét számos tényező képes befolyásolni. A szennyező anyagok spektrum komplexitása gyakorta jelentkezik inhibíciós hatásként. Így a biodegradáció sebessége és a beavatkozás hatékonysága is lecsökkenhet. Az enzimaktivitást módosító hatásokat a kinetikai paraméterek megváltozásán túl a kinetikai görbék vizsgálatával is lehetséges érzékelni. A kinetikai görbék monotonitásmértékének változása felhasználható a lebontás aktiválásának vagy gátlásának kimutatására. Ezen az alapon értékelési eljárás fejleszthető.

A célkitűzés teljesítéséhez a következő vizsgálatokat, fejlesztéseket és értékeléseket hajtottam végre:

- Modelleztem a kármentesítési beavatkozások során tapasztalható környezetszennyező anyagok lebontási kinetikáját különböző enzimaktivitást módosító hatások (inhibíció és aktiválás) jelenlétében.

- Kidolgoztam egy többváltozós lineáris megközelítéssel történő paraméterbecslést, melynek becslési pontosságát összehasonlítottam a konvencionálisan alkalmazott Lineweaver–Burk-féle kettősreciprok eljárásával, modellezett kinetikai adatsorok, illetve zaj- és inhibíciós hatások alkalmazásával.

- Kinetikai adatsorok regressziós és főkomponens-elemzésével gyors és egyszerű eljárást alkalmaztam a biokatalitikus lebontást befolyásoló hatások érzékelésére.

- Az értékelési eljárások validálását különböző szennyező komponensek biokatalitikus laborkísérleti eredményekkel is elvégeztem.

4. SZAKIRODALMI RÉSZ

4.1. *A remediáció eljárásai és csoportosítási lehetőségei*

Minden egyes olyan eljárást, amelynek a célja az, hogy a szennyező anyagok és a környezete kölcsönhatásait felügyelt feltételek mellett módosítsa és elindítson egy ellenőrzött lebontási folyamatot, amelynek eredményeként a szennyező anyag mennyisége csökken vagy veszélytelen vegyületté alakul át, környezeti kármentesítési beavatkozásnak nevezzünk. A kármentesítési beavatkozások csoportosítása többféle nézőpontból megvalósítható, azonban a gyakorlati alkalmazások különböző technológiai műveletek kombinációja – leggyakrabban a szennyezett közegre a szennyezők nagyfokú heterogenitása a jellemző – így nem érdemes és nem is lehet őket egymástól szigorúan elhatárolni.

A következő felsorolás magában foglalja azokat a fő szempontokat, amelyek alapján áttekinthetővé válnak a különböző módszerek, beavatkozások:

a. A szennyezett közeg, azaz a talaj fázisainak kármentesítési módszerei szerint: a talaj szilárd fázisa, talajvíz, talajlevegő, elkülönült szennyező komponensek fázis, illetve ezek kombinációjának tekinthető két- és háromfázisú talaj rendszerek kezelése (gyorsabban mozgó illetve időben elnyúló szennyezés esetén a rétegvizek tisztítása is szükséges lehet).

b. A szennyezettség-csökkentési technológiák alapulhatnak a szennyező anyag mobilizációján vagy immobilizációján, mely tulajdonságokat alapvetően a szennyező anyagi minősége határozza meg.

c. A remediáció megvalósulhat a következő tisztítási elvek szerint: *fizikai-kémiai, termikus, ökomérnöki és biológiai eljárások* illetve ezek *kombinációjaként*.

d. A beavatkozások helyszíne szerint történhetnek *in situ* vagy/és *ex situ* módon.

e. A szennyezett talaj spontán folyamatokon keresztül történő kármentesítése.

f. További szempontok lehetnek: a remediációs folyamatok idő- és költségigénye, a szennyezett terület nagysága illetve a beavatkozás során megengedett majd azt követő területhasználat (GRUIZ, 2003).

A teljesség kedvéért részletesen ismertettem a beavatkozás helyszíne szerint történő csoportosítást is, bár a gyakorlatban igazán nem használatos, mivel a legtöbb technológiafajta egyaránt *ex situ* és *in situ* kivitelben megoldható, illetve a működési elvük is azonos. Ez azt jelenti, hogy az eredeti helyéről kiemelt talajt különböző reaktorokba vagy prizmákba elhelyezve, valamint az eredeti helyén maradó talajba helyezett beren-

dezésekkel egyaránt elvégezhető a remediációs eljárás. A szakirodalom általánosságban az iménti felsorolásból az *a.* *b.* és *c.* pontokban foglalt szempontokat veszi figyelembe a technológiák csoportosításakor. Éppen ezért, illetve a könnyebb áttekinthetőség érdekében az alkalmazható technológiák az *1-4.táblázatokban* kerülnek bemutatásra.

- *in situ* eljárások: Ebbe a körbe tartozik valamennyi olyan eljárás, amikor a szennyezett földtani közeget, beleértve az egyes talaj fázisokat is természetes kifejlődésük környezetéből nem távolítjuk el. Ide sorolható a remediáció azon esete is, amikor a kitermelt vizet, a kezelést követően vissza szikkasztjuk a munkaterületen belül.

- *ex situ* eljárások: A beavatkozások nem a szennyeződés eredeti helyén valósulnak meg, további két alcsoportba sorolhatjuk:

- *ex situ on site* eljárások: A kitermelt szennyezett közeget nem szállítják el a munkaterületről, azon belül történik a remediációs eljárás. A tisztítást követően a közeg visszahelyezésre kerül a munkagödörbe.

- *ex situ off site* eljárások: Alapvető különbség az előző besoroláshoz képest, hogy a szennyezett közeg a tisztítás céljából elszállításra kerül azaz, nem helyben történik a beavatkozás (NÉMETH, 2001; BARÓTFI, 2003).

4.2. Talaj- és talajvíz szennyezők eltávolítása a szennyezett közegből

A remediálási technológiák műveleti és ártalmatlanítási folyamata szerint tehát a következő négy nagy csoportot különböztethetjük meg:

- a) *fizikai-kémiai technológiák*: céljuk egyaránt irányulhat a szennyező komponensek immobilizálására, illetve közvetlenül azok mennyiségi csökkentésére. Az előbbi esetben talajszennyezést feltételezve, az immobilizáció nem szükségszerűen jár a szennyező anyag eltávolításával, de a környezeti kockázat jelentős mértékben csökkenhet ez által. Más technológiákkal való kombinációja meglehetősen korlátozott, mivel az eljárás nagy eséllyel teljes mértékben megszünteti vagy korlátozza a közeg eredeti funkcióját. A leggyakoribb fizikai-kémiai eljárásokat az *1. táblázat* tartalmazza.

1. táblázat. Leggyakoribb fizikai és kémia eljárások a környezeti kármentesítés területén

Remediációs technológia	Technológiai folyamat leírása
Szennyezett közeg: talaj, altalaj, iszap	
Szemcseméret szerinti allokáció	A módszer elvi alapja, hogy a szennyezők nagy része a finom frakcióban koncentrálódik, míg a nagyobb szemcseméretű frakciókban a szennyezők előfordulási aránya jelentősen kisebb.
Talajle mosatás szabályozott vízzel	A szennyező oldódásnak fokozására vizet szívárogtatnak be a talajba, így mesterségesen megemelve a szennyezett talajrétegben a vízszintet. Az így beoldódott, átszivárgott szennyező anyagok gyűjtése ezt követően történik meg. Az eljárás során használt mosóvizet mechanikailag és kémiailag kezelni és tisztítani szükséges.
Oldószeres kémiai extrakció	A szennyezett közeget és az oldószer keverős extraháló készülékben keverik össze, miközben a szerves anyagokat az oldószer feloldja. Az így keletkező oldatot szeparálják, az oldószer regenerálják a későbbi felhasználás érdekében.
Fémek extrakciója	Leggyakrabban szerves vagy szervetlen savas mosást alkalmaznak a fémek talajrészecskék felületéről való eltávolítására. Az így kapott savas oldatunk további kezelése meszezéssel történő kicsapatás, műgyantás, ioncserés eljárás és egyéb elektrokémiai módszerek segítségével valósulhat meg.
Stabilizáció	A szennyező anyagok stabilizálása egyrészt történhet a pontos lokalizálást követően fizikai lehatárolással illetve „bezárással”. Másrészt pedig a kémiai eljárás eredményeképpen a szennyező anyag mobilitása fog jelentős mértékben csökkenni köszönhetően a stabilizáló reagens és a szennyeződés között kialakult kémiai reakciónak köszönhetően.
Kémiai oxidáció vagy redukció	Redukció /oxidáció révén a veszélyes anyag kémiailag átalakul stabilabb, ill. kisebb mobilitású vagy inert nem veszélyes, vagy kevésbé toxikus komponensekké. Az alkalmazott komponensek: ózon, hidrogén peroxid, klór, hipokloridok.
Dehalogénezés	A talajban található halogénezett szennyeződések ártalmatlanítása érdekében két különböző vegyületet alkalmazunk a gyakorlatban. A káliumpolietilén-glikolátos kezelés esetén a szennyező komponens halogén atomja kicserélődik a polietilén-glikolra, így jelentősen csökken a toxicitás, míg nátrium-bikarbonát használatkor a halogén vegyületek illékony-sága megnövekszik, a keletkező gázok ártalmatlanításáról kell gondoskodni. Mindkét esetben megfelelő reaktorokban végzik a technológiai eljárást.
Talajlevegőztetés, talajszellőztetés	Vákuum segítségével a talaj pórusaiból elszívják az illékony szennyezőket tartalmazó talajlevegőt, amelyet a felszínen különböző technológiák segítségével tisztítanak meg. A talaj átszellőztetésével spontán megindul a talaj mikroorganizmusainak aktiválása.
Szennyezett közeg: felszín alatti víz	
Talajvíz UV kezelése	A vízben oldott szerves szennyezőket tartályban áramoltatva ultraibolya sugárzás alkalmazásával bontják. Növelhető a hatékonyság abban az esetben, ha az eljárást más oxidációs technológiákkal is kiegészítik úgy mint ózon vagy hidrogén peroxidos kezelés.
Sztrippelés	Az eljárás illékony szerves komponensek folyadékokból történő eltávolítására kiváló hatékonysággal alkalmazható, melynek során ún. sztrippelőtoronyokban, vákuumban vagy ellenirányban áramoltatott levegővel történik a szennyezett vízkezelése.
Aktívszenes adszorpció	Az aktívszén szűrőszorozaton keresztül vezetett felszín alatti víz, illetve egyéb eljárások mosófolyadékainak szennyezői adszorbeálódnak, megkötődnek. A telítődött aktív szénes szűrőbetétet cserélni vagy regenerálni szükséges.

b) *termikus vagy hőkezeléses technológiák*: Az előző csoporthoz hasonlóan, elsőként itt is szót kell ejteni a termikus beavatkozások azon lehetőségeiről, amikor a komponensek immobilizálását vagy éppen ellenkezőleg a mobilizálását kívánjuk serkenteni az eljárások alkalmazásával. A szennyezőket magas hőmérsékleten, vitrifikációs eljárás segítségével a talaj szilikátjaiból üvegszerű, amorf vagy kristályos szerkezetű szilárd anyag válik, miközben a szennyezők deszorbeálódnak (termikus deszorpció) vagy pirolízissel elbomlanak, toxikus fémek esetén pedig immobilizálódnak. Másrészt viszont egyes komponensek esetén a mozgékonyság növelhető a hőmérséklet emelésével (illékony szennyezők elpárologtatása), a gőzök és a füstgázok kezeléséről azonban gondoskodni kell. Termikus eljárások csoportjába a következő remediációs technológiák sorolhatók (NÉMETH, 2001; BARÓTFI, 2003):

2. táblázat. *Termikus kármentesítési eljárások és jellemzőik*

Remediációs technológia	Technológiai folyamat leírása
Szennyezett közeg: talaj, altalaj, iszap	
Alacsony és magas hőfokú deszorpció	Alacsony hőfokú deszorpció esetében a hőmérsékleti tartomány 100-550 °C, ekkor történik meg a vízgőz és a szerves komponensek gáz fázisba való átalakulása.
Égetés	A veszélyes hulladékok szerves komponenseinek elégetését oxigén jelenlétében magas, 850-1200 °C körüli hőfokon végzik.
Pirolízis	Oxigén hiányában, illetve magas hőfokon lezajló termikus reakció eredményeképpen a szerves anyagok különböző gázokra és szilárd anyagokra (kocsz) bomlanak le.
Vitrifikáció	Az eljárás következtében a szennyezett talajból és iszaptól kis áteresztőképességű üveg, illetve kristályos szerkezetű komponensek képződnek.

c) *ökomérnöki technológiák*: Az alkalmazható beavatkozások közül – a biológiai mellett – a legkíméletesebb beavatkozás a szennyezett közeg szempontjából. Az eljárás lényege, hogy technológiai céllal kialakított, a szennyeződés specifikumait szem előtt tartva ún. mezokozmoszt, vagyis több fajt tartalmazó vízi, sekélyvízi vagy szárazföldi ökoszisztémát alkalmaznak. Alapvető követelmény a kialakításakor, hogy a szennyvíz szempontjából jó tisztítóképesseggel rendelkezzen a közösség. Ez úgy biztosítható, hogy tápanyagigénye meghaladja az elérhető lehetőségeket, így ennek köszönhetően a szerves anyagokkal, tápanyagokkal terhelt felszíni vagy felszín alatti vizek tisztításakor nagy hatékonyság érhető el. Alkalmazásuk rendszerint valamilyen más technológiával kiegészítve (fizikai-kémiai, biológiai) történik (MOLNÁR, 2006).

3. táblázat. Ökomérnöki technológiák és jellemzőik a kármentesítésben

Remediációs technológia	Technológiai folyamat leírása
Szennyezett közeg: talaj, altalaj, iszap, felszíni víz	
Élógépes szennyvíztisztítás (living machine)	A szennyvízkezelésre alkalmazott élőgép egy aktív mezokozmosz, mely jól tűri a szennyezettségből adódó körülményeket, azok között működni képes élőközösséget is hordoz. Eltérően az eleven iszapos eljáráshoz képest, itt növényeket és állatokat is alkalmaz a szennyeződés csökkentésének érdekében.
Eleveniszapos szennyvíztisztítás	Rögzített vagy szuszpendált formában jelenlévő mikroorganizmusokkal aerációs (levegőztető), medencékben kezelik a szennyezett talajvizet vagy a mosófolyadékot. Az anaerob bomlás végeredményeként keletkezik kiülepedve az ún. „eleven iszap”.
Gyökér-zónás szennyvízkezelés	A természetes szennyvízkezelés egyik meghatározó alkalmazása, mely a szennyező anyagok lebontásán kívül nagymértékű immobilizációra is képes. A gyökérmezőben aerob és anaerob zónák vannak, ahol a szennyező anyag koncentráció csökkenését a gyökérmező mikroorganizmusai, a mineralizált tápanyagok elfogyasztását a növények végzik.
Épített láp és épített mocsár (constructed wetland)	A természetes lápra, ill. a mocsárra jellemző sekélyvízi ökoszisztéma tagjait tartalmazza, beleértve a növényeket és az állatokat.
Fitoremediáció	Olyan biotechnológiai beavatkozás, mely növények felhasználásával csökkenti a szennyező komponensek koncentrációját. Alkalmazására különböző lehetőségek kínálkoznak, annak megfelelően, hogy milyen módon történik a szennyezett terület környezeti kockázat csökkentése. Megkülönböztetünk fitostabilizációt, fitodegradációt, fitoextrakciót és rizofiltrációt.

d) *biológiai technológia*: Ide sorolhatók a szennyező komponensek mobilizációs és immobilizációs folyamatain kívül az összes olyan beavatkozás, melynek során a szennyeződés környezeti kockázat csökkentése mikroorganizmus(ok) vagy növények átalakító, biodegradáló vagy bioakkumuláló tevékenységén keresztül valósul meg. A tisztítandó közeggel szemben kíméletes, viszonylag olcsó, ugyanakkor meglehetősen időigényes és a környezeti körülményekre érzékeny eljárások, melyeket az alábbi, 4. táblázat foglal össze (GRUIZ, 2003; ICSS, (2006):

4. táblázat. Ökomérnöki technológiák és jellemzőik a kármentesítésben

Remediációs technológia	Technológiai folyamat leírása
Szennyezett közeg: talaj, altalaj, iszap, felszín alatti víz	
Bioágyas, prizmás kezelés	Az eljárás során különös gondot fordítanak a nedvességtartalom, a pH, a hőmérséklet, a tápanyagellátás és az oxigénellátás kontrollálására a bejuttatott mikroorganizmusok optimális működése érdekében. Az eljárás talaj és iszap esetében is kivitelezhető.
Természetes szennyező anyag csökkenés	Amennyiben a talajban lévő szennyező anyag lebomlása spontán módon megindul, a megfelelő monitoring rendszer alkalmazásával, költséges beavatkozások nélkül megtörténhet a kárelhárítás.
Természetes biodegradáció fokozása	A szennyezett közeg természetes mikroorganizmusok aktivitásának növelése érdekében vízben oldható tápanyagokat és oxigént juttatnak be a rendszerbe. Az adalékok lehetnek tápanyag-kiegészítők, amelyek a biodegradációt segítik elő vagy lehetnek tenzidek, kelátképzők, amelyek a szennyező anyag biológiai hozzáférhetőségét segítik elő. Amennyiben a természetes mikroflóra sérült, mikrobiális talajoltó anyag injektálása is kivitelezhető.
Talajkezelés agrotechnikai módszerekkel	A felszínen szétterített szennyezett talajt periodikus átforgatással, boronálással, szántással levegőztetik, nedvesítik, és további adalékanyagokkal látják el, hogy a bontást végző mikroorganizmusok számára optimális körülmények keletkezzenek.
Kometabolikus eljárások: -oxigén -metán -nitrát tartalom növelése	Oldott oxigén, metán és nitrát tartalmú víz besajtolása a felszín alatti szennyezett vízbe, aminek köszönhetően a fokozódik a természetes mikroorganizmusok biológiai aktivitása, illetve ezzel együtt gyorsul a szerves szennyezők bomlása.
Bioszűrők alkalmazása	A gáz fázisú szennyezőket mikroflóra megtelepedésére alkalmas tölteten (talajágy, gyapjú, faháncs) vezetik át, ahol első lépésként megkötődnek majd az ott lévő mikroorganizmusok lebontják azokat.

4.3. Biotechnológiai alkalmazások a kármentesítésben

A témaválasztás szempontjából a biológia kármentesítések, szűkebben fogalmazva a mikroorganizmusok segítségével katalizált szennyező komponensek lebontásának a vizsgálata kerül a fókuszpontba.

Biodegradáció alatt a mikroszervezetek biokémiai anyagcsere-folyamatainak keresztül megvalósuló, lebontási (katabolitikus), illetve átalakítási (transzformációs) folyamatokat értjük, melyek szerves és szervetlen szennyezők széles körére kiterjedhetnek. A biológiai alapon végezhető degradációs eljárások előnyei, hogy jelentős kiterjedésű területekre és a szennyezett terület minimális átalakításával alkalmazhatóak. A többi kármentesítési beavatkozáshoz képest kisebb a költségigény, míg a terület eredeti élővilágával, mikroba közösségével kíméletesebbek. (SZOBOSZLAY & KRISZT, 2010; ICSS, 2006).

A bioremediációs eljárásokban a mikroorganizmusok enzimek által katalizált reakciókon keresztül tudják lebontani a szerves anyagokat. Energetikai szempontból a biodegradáció olyan elektronátadási folyamat, melyben a szerves szennyező anyagok táp- és energiaforrásként hasznosulhatnak, az oxidációjukból nyert energia pedig a sejtek felépítéséhez és azok fennmaradásához járul hozzá, azaz a szennyeződés mineralizációja a reakció végeredménye (SZOBOSZLAY et al., 1995). Ha az oxidációs folyamat nem teljes, akkor szerves anyagcseretermékek vagy melléktermékek maradnak vissza. Ezek az anyagok további lehetséges primer szubsztrátok lehetnek más mikrobák számára, ezt a folyamatot nevezzük biotranszformációnak. Azok a vegyületek, melyek nagy ellenálló képességűek ezekkel a folyamatokkal szemben, erőteljes enzimes reakciók hatására beépülhetnek a talajmátrixba, humifikálódnak. Az említett három folyamatnak közös jellemzője, hogy a mikrobiológiai átalakulás eredményeképpen a talaj szerves anyag-, illetve humusztartalma gyarapodni fog.

A mikrobiológiai lebontásnak egy sajátos specifikuma a kometabolizmus folyamata, amely során abban az esetben is végbe mehet bizonyos szennyezők enzimes lebontása, ha ebből a folyamatból közvetlenül a mikroorganizmus táplálék- vagy energiaforráshoz nem jut hozzá. Ennek feltétele az, hogy a reakcióközeg tartalmazzon olyan a mikroba számára tápanyagot jelentő vegyületet, aminek térszerkezete nagymértékű „hasonlóságot” mutat a szennyező komponensével. Erre a katalitikus reakcióra az ad lehetőséget, hogy a lebontást végző enzim aktív centruma nem teljes mértékben vegyület specifikus, így a kötőhelyen a szennyező komponens is rögzülhet, illetve szerkezete átalakulhat és degradálódhat. További jellemzője a kometabolikus reakcióknak, hogy a szennyező komponens teljes ásványosítását (mineralizációját) nem, csak az átalakítását (transzformációját) képes végrehajtani. A produktív metabolikus reakciókhoz képest, ahol gyorsan csökken a specifikus lebomlási reakciókban a tápanyag mennyisége, ennél a reakció típusnál a céltápanyag (szennyező) mennyisége csak lassabb ütemben csökken, mivel a másik tápanyag versenyez a szennyező anyaggal a katabolikus enzimért, azaz kompetitív gátolhatja annak lebomlását (HUGHES et al., 2002).

A lebontó szervezeteknek szükségük van elegendő mennyiségű tápanyagokra is a teljes anyagcsere fenntartásához akkor, amikor a szennyező anyag elsődleges szubsztrátként hasznosul. Ezek az egyéb tápanyagok közé tartoznak pl.: (a) a terminális elektron akceptorok (oxigén, nitrát, vas, mangán, szulfát, széndioxid); (b) a makrotápanyagok (pl. nitrogén, foszfor); (c) a mikrotápanyagok (pl. nyomelemek, anionok, kationok). Szerves szennyező anyagok biodegradációjakor gyakran a szennyező

anyag szolgál elektron donorként. Ilyen szennyező anyagok degradációját aerob mikroorganizmusok végzik, és a lebontási folyamat végterméke CO_2 , H_2O és biomasz. Egyes anaerob mikroorganizmusok képesek O_2 -t felhasználni elektron-akceptorként, ha az jelen van, vagy képesek alternatív elektron-akceptort is használni, illetve fermentálni is. Anaerob körülmények között a biodegradáció sebessége jelentősen lassabb az aerobéhoz képest, a bomlástermékek szerves savak, CO_2 , H_2 , CH_4 , H_2 , N_2 és biomasz (NÉMETH, 2001; NÉMETH, 2003; ICSS, 2006).

A lebontási folyamatokban élőszervezetek is részt vehetnek, ezért ennek a mikrobiális lebontási típusnak a sajátossága, hogy hatékonysága több tényezőtől és egymástól egyáltalán nem független módon befolyásolható. A mikroorganizmusok minősége és mennyisége, illetve a környezeti paraméterek jelentősen befolyásolhatják a biodegradáció sebességét és határfokát, a következőkben ezek a tényezők szerepének tárgyalására kerül sor.

4.4. Biodegradációs folyamatokat befolyásoló tényezők

- A leghatékonyabb szerves szennyező bontóképességgel azon mikroorganizmusok rendelkeznek, melyek jelentős oxigenáz enzimaktivitással jellemezhetők, tehát a **környezet oxigén ellátottsága** jelentős limitáló tényező. A talaj típusa, vízzel való telítettsége, illetve egyéb szubsztrátok határozzák meg a mikroorganizmusok hozzáférhetőségét az oxigénhez. Telítetlen talajban a légzés forrása egyértelműen az oxigén, ennek hiányában vagy telített talajban értékelődik fel a nitrát- vagy szulfátlégzés jelenléte, de ezek hiányában a vas és mangán is betöltheti az elektronakceptor szerepét. Itt érdemes megemlíteni, hogy a **talajok víztartalma** szintén befolyásolhatja a lebontás hatékonyságát, a magas víztartalom okozta oxigén hiányról a fentiekben már esett szó, viszont az alacsony nedvességtartalmú talajok esetén is tapasztalható hatékonyság csökkenés. Ideálisnak mondható, amikor a maximálisan felvehető vízmennyiségnek a 40–60%-kal rendelkezik a talaj a telítetlen zónában (RÉVÉSZ, 2009).

- A **mikroorganizmusok hozzáférhetőségének a hiánya a szennyezőkhöz** több tényező eredménye is lehet pl.: alacsony vízdoldhatóság, erős szorpciós képesség a talaj szemcsékhez, illetve diffúzió a szilárd pórusokban, azaz erősen függ a talaj típusától (ALEXANDER, 1999). A biológiai hozzáférhetőséget a szennyező anyag fizikai-kémiai tulajdonságai és az őt felvenni szándékozó szervezet típusa együttesen határozza meg. A hozzáférhetőség növekedését elősegíthetik a mikrobák által termelt detergensok, az ún. biotenzidok, ezek hiányában a szennyeződés hosszútávon fennma-

radhat a környezetben. A mikrobiális felületaktív anyagok általában poliszacharidok, poliszacharid-fehérje komplexek, vagy glikolipidek (ROSENBERG, 1986). Ezen felül természetesen a mikroorganizmusok degradáló hatékonysága függ a vegyi anyag szerkezetétől, összetételétől (LIN, 1996).

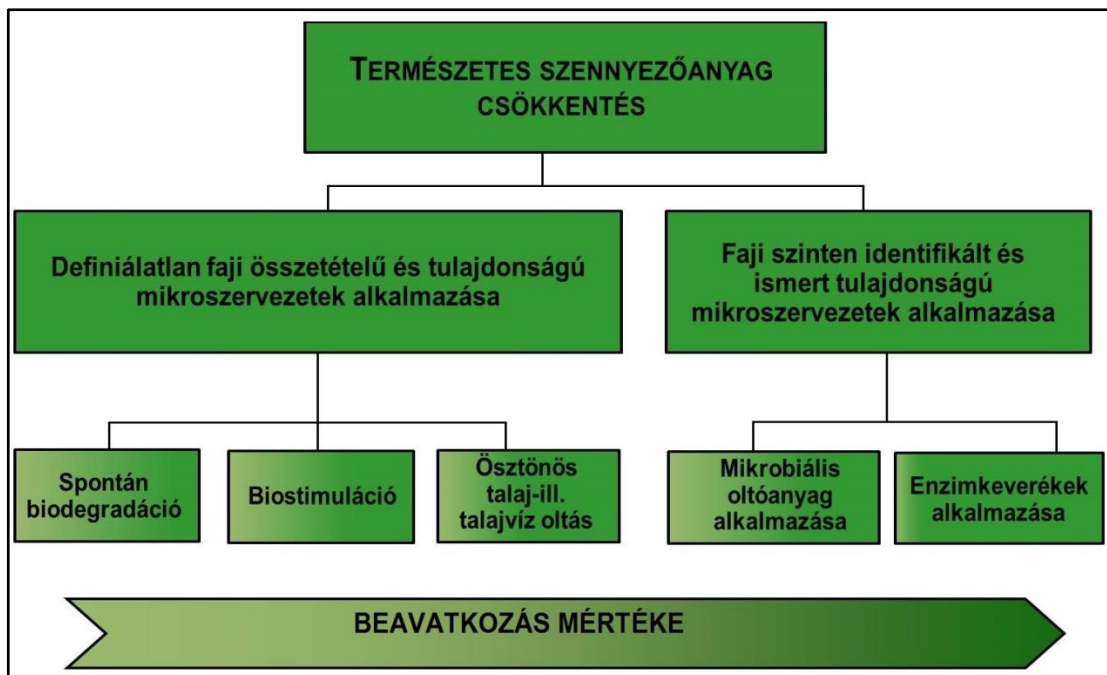
- **A hőmérséklet** a biodegradációs folyamatok mindkét „szereplőjére” hatással van, azaz alapvetően meghatározza a biokémiai reakciók sebességét és hatással van a szennyező komponensek fizikai-kémiai tulajdonságaira. Alacsony hőmérsékleti környezetben növekszik a szénhidrogén típusú szennyezők viszkozitása, vízben való oldékonyságuk, illetve illékonyságuk csökken. Általánosságban a mikrobiális lebontás optimális hőmérsékleti tartománya 30–35°C, azonban a szennyezett területeket ettől jelentősen eltérő értékek jellemzik. Számos tanulmány ismertet extrém hőmérsékleti tartományban megvalósuló szénhidrogén lebontást (BEJ et al., 2000; KLUG & MARKOVETZ, 1967). Atlas (1981) arra is rámutatott, hogy az évszakos hőmérsékletváltozás hatással van a környezetben élő mikrobiális közösség összetételére, ami pedig érzékenyen befolyásolja a lebontás sebességét. Ugyanebben a tanulmányában részletezi, hogy a hőmérséklet hogyan képes befolyásolni a szennyező anyagok fizikai-kémiai sajátosságain keresztül a biodegradálhatóságát. Magasabb hőmérsékleten az illékonyabb, de a mikroorganizmusok szempontjából toxikusabb olaj összetevőknek a kisebb koncentrációban való jelenléte gyorsítja a lebontást. Ugyanennek a mintának alacsony hőmérsékleten történő vizsgálatakor a magasabb koncentrációban jelenlévő toxikus komponensek inhibíciós hatását bizonyították.

- Az előző paraméterhez hasonlóan **a reakcióközeg kémhatásáról** is közismert, hogy jelentős mértékben képes befolyásolni a biokémiai reakciók sebességét, esetünkben ez a szennyező anyagok lebontásának a hatékonyságát jelenti. A talajok pH-ja széles sávban mozoghat, a biodegradációs eljárások számára az optimális tartomány a semleges közeli kémhatás.

- Talajok és talajvizek esetében is szót kell ejteni az elektromos vezetőképességről, vagyis az ionerősségről. Amennyiben magas **sótartalom** jellemzi a szennyezett területet, a biokémiai reakciók lassabban fognak végbe menni, potenciális inhibitorként tekinthetünk erre a környezeti paraméterre (LEDERBERG, 2000; NÉMETH, 2001; ICSS, 2006).

4.5. *Biodegradációs eljárások típusai*

A biodegradációs eljárások legelterjedtebb csoportosítása a gyakorlati kármentés esetében a beavatkozás mértéke alapján történik, azaz a szennyezett terület, mint reakció közeg illetve felhasználható mikroszervezetek intenzifikálása alapján. Ezen csoportosítást felhasználva a különböző mértékű beavatkozásokat összefoglalóan az 1. ábra mutatja be. Itt kell megjegyezni, hogy önmagában a legintenzívebb beavatkozást igénylő biodegradációs módszer sem érheti el a tökéletes hatékonyságot, vagyis szennyezőtől teljes mértékben megtisztított közeget nem eredményezhet, szemben bizonyos fizikai-kémiai eljárásokkal.



1. ábra. Beavatkozás mértékétől függően megkülönböztethető biodegradációs eljárások

4.5.1. Természetes szennyező anyag csökkenés, „öntisztulás”

A kárterületen a szennyeződés következtében megjelenő többlet szénforráshoz adaptálódva, illetve azt felhasználva megjelennek a mikroszervezetek és felszaporodnak. Az ilyen folyamatokon keresztül megvalósuló természetes szennyező anyag csökkenést (natural attenuation) spontán biodegradációnak is nevezhetjük. Ez a jelenség nem új keletű, már több évtizeddel ezelőtt megfigyelték a folyamatot más természetes szerves anyagok esetén is (KLUYVER & van NIEL, 1956; LEISINGER & BRUNNER, 1986; ALEXANDER, 1994; van der MEER, 1994). Azóta protokollokat, szabványokat, is kidolgoztak a technológiai alkalmazásuk érdekében (KORDA et al., 1997; SINKE, 2001; MARGESIN & SCHINNER, 2001; ALVAREZ & ILLMAN, 2005). Jellemző a folyamatra, hogy a szénhidrogén komponensek csak nagyon lassan és rossz hatásfokkal degradálódnak. Heterogén vegyületek esetén gyakran hosszú idő elteltével is visszamaradnak olyan komponensek, mellyel a talaj természetes, „benszülött” mikroba közösség enzimszere nem képes megküzdeni, degradálni azokat. Természetesen, ahogy arról már korábban is szó volt, befolyásoló tényező lehet még a reakciókhoz szükséges egyéb tápanyagok és elektron akceptorok jelenléte. Annak érdekében, hogy a szennyezet területről mindig naprakész és pontos adatokkal rendelkezzenek, – így felügyelve a természetes folyamatokat – a szakemberek gyakran monitor tevékenységet is végeznek a területen. Bár hosszas előkészítő munkát igényel az állapot és a szennyeződésterjedés felmérés, a monitorozott természetes szennyező anyag-csökkenés (monitored natural attenuation) alkalmazhatósága, költségkímélő megoldást kínál (MULLIGAN & YONG, 2003, US EPA, 1999a; US EPA, 1999b).

4.5.2. Biostimuláció

Összefoglalóan biostimulációnak hívjuk azokat az eljárásokat, amikor az előző pontban már említett, talajban lévő benszülött, szénhidrogénbontó mikroba közösség életfeltételei mikro tápanyaggal (P, N, K), elektron akceptorokkal (O_2 , NO_3^- , SO_4^{2-} , CO_2 , Fe^{3+}) vagy egyéb limitáló tényezők (pH, nedvesség, ionerősség) kedvező irányba történő megváltoztatásával befolyásolható, a mikrobiális lebontási sebesség növelhető. További adalékanyagok, detergensok, felületaktív anyagok adagolása is kedvezően befolyásolhatja az eljárás hatékonyságát, azáltal, hogy megnövekszik a szennyezők biológiai hozzáférhetősége. Ugyanakkor figyelembe kell venni, hogy bizonyos esetekben pl. a legtöbb *in situ* eljárás esetében alkalmazásuk nagy környezeti kockázattal járhat. Túlzott

mennyiségben való alkalmazásuk károsan befolyásolhatja a terület mikroba közösségét vagy az eredetnél toxikusabb, illetve nehezebben eltávolítható, biodegradálható komponensek jelennek meg. A biológiai hozzáférhetőség növelésére kínál kedvezőbb alternatívát a baktériumok által szintetizált felületaktív anyagok, azaz a biotenzidek alkalmazása (LIN, 1996). A mikroorganizmusok a fázishatár áttörésének érdekében szintetizálják ezeket az anyagokat, olyan módon, hogy hidrofíli felületük érintkezésbe kerül a víztaszító molekulával. A sejtmembránnal érintkezésbe lépő szennyeződésen ezt követően már megvalósulhat az oxigenáz enzimek által katalizált első degradációs lépés. A szintetikus felületaktív anyagokhoz képest a biotenzidek, könnyebben és biztonságosabban lebonthatók, illetve kevésbé toxikusak a környezetükre (MAIER, 2000; NÉMETH, 2001; ANTON et al., 2006; TYAGI et al., 2011).

4.5.3. Ösztönös talaj-, illetve talajvízoltás

A beavatkozás során a szennyezet közegben megtalálható, a feltételekhez már alkalmazkodott mikroszervezeteket kiemelik és lombikokban, majd táptalajokon fermentorokban felszaporítják. Fontos megjegyezni, hogy a tárgyalt eljárás során nem törekednek az organizmusok pontos, törzsek szerinti identifikálására, csak a leghatékonyabb degradációs tulajdonságokkal rendelkező állományokat szelektálják ki. A nagy mennyiségben előállított oltóanyagot öntözéssel vagy injektálással visszajuttatják, a szennyezet közegbe. Terepi kísérletekkel igazolták, hogy régóta fennálló, de nem extrém magas szennyező koncentrációval illetve jelentős heterogenitással rendelkező káresemények esetén, ahol már kialakult egy jól működő mikroba közösség a talajoltással nem lehet jelentős javulást elérni. Fontos az oltóanyag és talaj eredeti mikroflórájának komplex vizsgálata, mivel túlzott adagolás esetén az injektált „idegen” organizmusok háttérbe szoríthatják, elnyomhatják az őshonos mikroflóra tagokat illetve elhasználják az életműködésükhöz szükséges tápanyagokat. Az alkalmazásuknak humán egészségügyi szempontjai is vannak, hiszen komoly kockázatot jelenthet, amennyiben genetikailag módosított, speciális képességű mikroorganizmusok kijutnak a környezetbe (VAN DER MEER et al. 1998, MAIER, 2000).

4.5.4. Bioaugmentáció – Faj szinten identifikált mikroba közösségekkel

A fentiekben eddig ismertetésre kerülő bioremediációs eljárásokon kívül élesen elhatárolható a következő kettő beavatkozás. Bioaugmentáció során a talaj vagy talajvízoltáshoz használt mikroba közösségeket faji szinten identifikálják, felmérik az egyes szennyezők esetében elvárható degradációs sebességeket illetve környezeti hatásokkal szembeni érzékenységüket, tehát a gyakorlati alkalmazásuk teljes mértékben tudatosan, megtervezetten történik. Az ilyen fajta talajoltáshoz tehát teljes körű információszerezés szükséges, ami a mikroorganizmusok alapos vizsgálatán kívül ki kell, hogy terjedjen a szennyező közeg fizikai-kémiai sajátosságain túl, a szennyező anyagok mennyiségi és minőségi jellemzőinek a felderítésére is. Erre azért is van szükség, mert nem elegendő egy jó hatékonysággal működő szervezetet alkalmazni, arra is kellő figyelmet kell fordítani, hogy az alkalmazott mikrobaközösségek életképesek maradjanak, illetve egyedszámuk folyamatosan növekedjen. Annak érdekében, hogy minél szélesebb szennyező spektrumban valósuljon meg a biodegradáció többféle mikroorganizmusnak az alkalmazása ajánlott. Általánosan megfigyelt jelenség, hogy a gyakorlati, *in situ* alkalmazás során a laboratóriumi körülményekhez képest nagyságrendekkel lassabb ütemben csökken a szennyező anyagok lebontása. Ennek magyarázata egyrészt a már említett alacsonyabb szaporodási rátával, illetve a „bennszülött” mikrobaközösség és az oltóanyag között kialakuló kompetícióval magyarázható. A bioremediációval foglalkozó tanulmányok mélyrehatóan feltérképezték a kármentesítési beavatkozások során alkalmazható mikroorganizmusokat, melyek mostanára már a legkülönbözőbb környezeti kockázattal rendelkező szennyező anyagoknak a biokatalitikus lebontására megoldást jelenthetnek. A szénhidrogénbontó képességgel rendelkező baktériumok száma bőven meghaladja a 250-t, ezek közül a leggyakrabban alkalmazott fajokat az 5. táblázat ismerteti (TYAGI et al., 2011).

5. táblázat. Leggyakoribb baktérium törzsek, melyek szénhidrogén származékok bontására képesek

Szénhidrogén származékok és biokatalitikus degradálásukra használható baktérium törzsek, ill. fajok	
Alifás szénhidrogének	<i>Pseudomonas putida</i> ; <i>P. maltophilia</i> ; <i>Acinetobacter sp.</i> ; <i>Burkholderia cepacia</i> ; <i>Nocardiodes sp.</i> ; <i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Alcanivorax sp.</i> ;
Monoaromás szénhidrogének (BTEX- vegyületek)	<i>Pseudomonas sp.</i> ; <i>Thauera sp.</i> ; <i>Azoarcus sp.</i> ; <i>Geobacter metallireducens</i> ; <i>Desulfobacula toluolica</i> ; <i>Desulfobacterium cetonium</i> ; <i>Thearea aromatica</i> ;
Poliaromás szénhidrogének (PAH-vegyületek)	<i>Pseudomonas sp.</i> ; <i>Comamonas testosteroni</i> ; <i>Ralstonia sp.</i> ; <i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Burkholderia sp.</i> ; <i>Mycobacterium sp.</i> ; <i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Terrabacter sp.</i> ;
Oxigén tartalmú szénhidrogének	<i>Arthrobacter ilicis</i> <i>Methylobacterium mesophilium</i> ; <i>Pseudomonas aeruginosa</i> ; <i>Rhodococcus sp.</i> ; <i>Mycobacterium vaccae</i> ; <i>Mycobacterium austroafricanum</i> ; <i>Nocardia sp.</i>
Halogénezett szénhidrogének	<i>Xanthobacter autotrophicus</i> ; <i>Rhodococcus erythropolis</i> ; <i>Acetobacterium dehalogenans</i> ; <i>Sphingomonas paucimobilis</i> ; <i>Dehalococcoides sp.</i> ; <i>Dehalobacterium fromicoaceticum</i> ; <i>Desulfitobacterium sp.</i> ;

Biodegradációs kármentesítések esetén a szénhidrogén vegyületek eltávolítására az oltóanyagok szerepét baktériumok mellett gombafajok is betölthetik. A legszélesebb körben kutatott és alkalmazottak a következő nemzetségek: *Aspergillus*, *Rhizopus*, *Mucor*, *Graphium*. Rendszertanilag fejlettebb, ligninbontó enzimrendszerrel rendelkező, pl. fehérkorhasztó-gombák vagy bazídiumos gombák alkalmazhatók klórozott szénhidrogének, klór fenolok, DDT, TNT kometabolikus bontására (FRITSCHÉ, 1998). Az újabb bioremediációs fejlesztések éppen ezeket az enzim rendszerek által katalizált biokémiai alapú lebontási reakciókat kívánják a lehető legpontosabban feltérképezni és a környezetvédelem szolgálatába állítani (SUTHERLAND et al; 2004; RAO et al., 2010; SAJBEN-NAGY et al., 2013).

4.6. Enzimkészítmények alkalmazása a bioremediációra

Számos különböző mikroorganizmusból (baktérium, élesztőgombák, moszatok) izolált enzimet hasznosítanak az ipar legkülönbözőbb területein. Úgy mint az élelmiszeriparban (tejfelhérjék alkalmazása), a mosószergyártásban (zsír- és olajbontó enzimek), a gyógyszeriparban (enzimek segítségével történő antibiotikum előállítás), valamint a bioremediációban (AEHLE, 2003; AHUJA et al., 2004; SUTHERLAND et al.; 2004).

Az elmúlt években jelentős erőfeszítések történtek a szennyezett területek megtisztítására különböző módon előállított enzim vagy enzimkészítmények felhasználásával. A beavatkozás alapját a megfelelő enzimkészlettel és átalakító képességgel rendelkező organizmusok, illetve közösségeik kiválasztása adja, amelyeket a későbbiekben *in*

situ és *ex situ* kármentesítések alkalmával egyaránt alkalmaznak. Az enzimkatalizált biokémiai reakciók működésének ismeretében belátható, hogy számos tényező befolyásolhatja a bioremediációs kutatások sikerességét. A talajban természetes állapotukban alapvetően kétféle módon lehetnek jelen az enzimek. Egyrészt az élőlények szervezetében vagy a talajkolloidokhoz kötődve úgynevezett extra celluláris (sejten kívül funkcionáló) formában, illetve elpusztult sejtekből kiszabadulva. A mikrobiális közösségek alkalmazási elvéhez hasonlóan, az enzimkészítmények esetében is alapvető tényező az alkalmazott enzim aktivitásának hatásideő-tartama, vagyis az, hogy mennyi ideig képes a szennyező anyagok lebontására. Közismert az enzimműködés hatékonyságának pH és hőmérséklet függése, mindkét esetben beszélhetünk egy optimum tartományról, ahol az aktivitás a leghatékonyabb. Az enzimek hatásideő-tartama, függ az enzim, a talaj és/vagy talajvíz tulajdonságaitól. Néhány enzim akár több éven keresztül is működőképes maradhat.

Számos publikáció foglalkozik az enzimek és mikrobák felhasználásával történő bioremediációs eljárások összehasonlításával, *pro* és *kontra* érvek megfogalmazásával (GIANFREDA & BOLLAG, 2002; GIANFREDA & RAO, 2004; AHUJA et al., 2004.; PIEPER et al., 2004; ALCALDE et al., 2006;). Azokban az esetekben, ahol a mikrobiális lebontások hatásosnak bizonyultak, jó eséllyel számíthatunk az enzimatis leontás hatékonyságára is, hiszen az élő szervezetekben is az enzimek katalízise által megy végbe az adott lebontási reakció. Az enzimkivonatok mikrobákat helyettesítő alkalmazásának hangsúlyos előnye, hogy az enzimek jóval ellenállóbbak, vagyis szélsőséges feltételek mellett is működőképesek maradhatnak. Szintén kevésbé érzékenyek a mikrobiális ragadozók és lebontási folyamatok inhibitorai, illetve a szennyező anyagok drasztikus koncentráció változásaival szemben.

Természetesen mind a mikrobiális és mind az enzimatis eljárások esetében hangsúlyozni szükséges, hogy az egyes készítmények, termékek használhatósága korlátozott. Alkalmazhatóságuknak a szennyező anyagok heterogenitása valós korlátot jelent, azaz minél bonyolultabb, sokrétűbb a környezetszennyezés, annál kisebb hatékonysággal fog működni biodegradáció a teljes szennyező anyag spektrumra. Ugyanakkor bizonyos speciális komponensek pl.: xenobiotikumok esetében elképzelhető, hogy az enzimek használata jelentős előnyökkel járhat, az enzimkatalitikus biokémiai reakció végeredményeként egyáltalán nem vagy csak kevésbé toxikus komponensek keletkeznek. Ezt a megállapítást a többi, nem mikrobiális, hanem fizikai-kémiai kármentesítési eljárás esetében is számos tanulmány megerősíti, mint jelentős szempontot (GIANFREDA &

RAO, 2004; AHUJA et al., 2004; ALCALDE et al., 2006). Indokolt lehet továbbá, olyan szituációkban is az enzimek készítmények használata, amikor a mérgező vegyületet rosszul oldódó vagy nagy molekulatömegű termékekké szükséges oxidálni, amelyek aztán egyéb beavatkozás segítségével eltávolíthatók a talajból vagy talajvízből.

Az enzimes technológiák alkalmazhatóságának további hátrányát jelentheti, hogy a megfelelő kezelés nélkül meglehetősen korlátozott ideig használhatók fel a kivonatok, illetve a készítmények. Az eltarthatóság problémájára jelenthet megoldást többek között a liofilizálás is, azonban minden ilyen folyamatnak jelentős a költségvonzata, amely akár az egyes kármentesítési technológiák előtérbe kerülését is korlátozhatja. Mindenesetre az enzimekkel történő *in situ* kármentesítési eljárások a beavatkozási költség tekintetében jó eséllyel felveszik a versenyt az *ex situ* beavatkozásokkal szemben (TROMBLY, 1995).

4.7. **Enzimkatalitikus kármentesítések enzimszoportjai**

A Nemzetközi Biokémiai Egyesület Enzim Bizottsága által bevezetett, a katalizált reakciókat alapul vevő csoportosítás szerint a következő csoportok egyes enzimeit tölthetnek be jelentős szerepet a katalitikus biodegradációs folyamatokban: *hidrolázok*, *oxireduktázok*, *transzferázok*. Ezeknek az enzimszoportoknak, illetve izoenzimeinek izolálása és előállítása egyaránt történhet baktériumok, gombák, legtöbbször fehérkorhasztó gombák és növények felhasználásával. Számos enzim esetében sikerült laboratóriumi vagy kísérleti körülmények között a xenobiotikum lebontó képességüket igazolni, illetve reagensiket és aktivitásmérési protokolljaikat kimunkálni és alkalmazni. (WHITELEY & LEE, 2006).

A *hidroláz* enzimszoportba tartoznak többek között a proteázok, amilázok, cellulázok, észterázok és amidázok. Az általuk katalizált reakciótípusokra jellemző, hogy szubsztrátjaik kovalens kötéseit víz segítségével reverzibilis reakciókban bontják főként, tehát a lebontási folyamatokban vesznek részt. Bakteriális hidrolázok alkalmazásával számos szennyező komponens, úgymint: karbofurán, karbaril, diazinon, paration és egyéb növényvédőszer átalakítását leírták (MULBRY & EATON 1991; SUTHERLAND et al., 2004). Különleges és érdekes alcsoportját alkotja a hidrolázoknak a nitrilcsoport átalakító képességgel rendelkező nitriláz (*EC 3.5.5.1.*). A különböző szerves nitril csoportot tartalmazó vegyületek, más néven a cianid származékok minden élőlény számára nagymértékben toxikusak, ezért nagy jelentősége van a gombákból és baktériumokból származó nitrilázal történő biodegradációs vizsgálata-

toknak (SINGH et al., 2006; MARTINKOVÁ et al., 2009; RAO et al., 2010; SHARMA & PHILIP 2014).

A *transzferáz* enzimeknek az alapvető funkciója a különböző molekula-, illetve funkciós csoportok vagy atomok eltávolításának/átvitelének az elősegítése a donor szubsztrátról egy másik akceptor molekulára. A biokatalitikus folyamatok során legtöbbször valamilyen közttermék további átalakítását végzi. Ez azt jelenti, hogy megfelelő hatékonysággal csak más, egyéb enzimes lebontás eredményeként képes működni. Például a benzol *orto* útvonalon keresztüli bomlásakor a KoA-transzferáz csak az utolsó lépésben vesz részt, nélküle nem képződne a környezetre ártalmatlan végtermék – szukcinát és acetát (MECKENSTOCK et al., 2004; ABU LABAN et al. 2010). A cianid származékok átalakításában is szerepet játszhatnak a transzferáz enzimek. Cipollone és munkatársai (2006) *E. coli* baktériumból kivont *Pseudomonas aeruginosa rhodanese* (r-RhdA) enzim felhasználásával sikeresen alakítottak át cianid vegyületet kevésbé toxikus tiocianáttá.

A biodegradációs kármentesítési beavatkozásokban nagyon fontos enzim csoportot képeznek az *oxireduktázok*, amelyek hidrogén- vagy elektronátvitelt és oxigén-bevitelt katalizáló enzimek. Elsősorban energia felszabadító folyamatokban vesznek részt. A katalitikus eljárásokban leggyakrabban alkalmazott alcsoportjaik a következők: mono- vagy dioxigenázok, reduktázok, dehalogenázok, fenoloxidázok (pl.: lakkáz, tirozináz), peroxidázok (RAO et al., 2010). A környezeti kármentesítésekhez az oxireduktáz enzimek forrását a fehérkorhasztó gombák jelentik, mivel magas degradációs hatékonysággal és ellenálló képességgel rendelkeznek a szennyező anyagokkal szemben, mint a baktériumok (ASGHER et al., 2008; RUBILAR et al., 2008). Az extracelluláris enzimekkel megvalósuló degradációnak két fő lépése a hidrolízis és azt követően, az oxigénatomoknak a szubsztrátba építése. A hidrolízis szakaszban a makromolekuláris szubsztrátok „feldarabolódnak” az oxidatív reakciólépésekben a szubsztrát szénatomjai oxidálódnak (RAO et al., 2010). Számos kutató érdeklődését felkeltette a lakkáz (*EC 1.10.3.2*) enzim. Különösképpen a gombaeredetű, extracelluláris változata vált érdekessé, amely a réztartalmú polifenol-oxidázok, az ún. „multicopper” oxidázok (négy darab réz iont tartalmaz) közé tartozik. A lakkáz enzimet prokariótákból, gombákból (elsősorban bazídiomos gombákból) és magasabb rendű növényekből írták le. A felsorolt fajokban elsősorban extra-celluláris enzimekként vannak jelen. Felhasználják olyan vegyületek bioremediációjára, mint a fenol, polifenol, triklórfenol származékok, alkének, herbicidek vagy peszticidek valamint

xenobiotikumok degradációjára (RAO et al., 2014; SAJBEN-NAGY et al., 2013; STRONG & CLAUS 2011; SANCHEZ, 2009)

4.8. *Enzimatis lebonási folyamatok elméleti háttere*

Ebben a fejezetben a biokatalitikus kármentesítés alapjait képező elengedhetetlen enzimkinetikai alapismereteket foglalom össze, szem előtt tartva a dolgozat egyik alapvető célkitűzését, hogy az a későbbiekben oktatási, gyakorlati céllal is felhasználható legyen. Ennek érdekében a témakör részletes és összefoglaló forrásaira hagyatkozom úgy mint KELETI 1978; ELŐDI 1980; SEVELLA 2012; HEGYI et al., 2013.

A 20. század kezdetére nyilvánvalóvá vált, hogy bár a biológiai rendszerek kinetikai törvényszerűségei a kémiai reakciókinetikára támaszkodnak, de attól nagyon sok esetben eltérnek. Élőszervezetekben a reakciókat enzimek katalizálják. Az anyagcsere a biokatalízisre azért van szükség, mivel a legtöbb reakció az élőszervezet által biztosított körülmények között nem, vagy csak extrém lassan menne végbe. A mikroorganizmusok vagy azok enzimjei által katalizált folyamat akár tízszer-százszor-ezerszer is gyorsabb lehet, mint a nem enzimkatalizált folyamat ugyanazon körülmények között, továbbá jelentős tényező az is, hogy a legtöbb biokatalitikus reakció befejeztével az enzimek regenerálódnak, vagyis újabb reakciókban felhasználhatók (POPPE & NOVÁK, 1992). Az enzimreakciók kinetikájának ismerete elengedhetetlen a növényi és állati szerveket és szöveteket feldolgozó technológiák irányításához (gyógyszer, élelmiszer). A fermentációs műveleteknél és természetesen a környezeti kármentesítési beavatkozások esetén is szükséges ezen ismereteket szem előtt tartani. A következő pontok rögzítik az enzimkatalizált reakciók alapvető sajátosságait:

- Az enzimek csak termodinamikailag lehetséges, szabadentalpia csökkenéssel járó reakciókat katalizálnak és az átalakított molekulák számához képest elenyésző mennyiségben is hatékonyan működni képesek.
- Az enzimek a reakciók egyensúlyi állapotát nem változtatják meg, csak ennek az egyensúlyi állapotnak az elérését siettetik.
- Az enzim reakció specifikus katalizátor azaz, csak egyféle biokémiai reakciót képes katalizálni.

A legkülönbözőbb térszerkezeti struktúrát eredményezi az enzimeket felépítő bonyolult fehérjemolekuláknak aminosav sorrendjei, amelynek köszönhetően olyan molekula felület alakul ki, amely specifikus, meghatározott térszerkezettel és töltéseloszlással rendelkezik. A térszerkezet specifikusságának köszönhetően, csak bizonyos

szubsztrátok átalakításában vesznek részt az enzimek. Az enzimkatalizált reakciók szabályozása elsősorban aktivitásának szabályozásán vagy éppen gátlásán keresztül valósul meg.

4.9. Michaelis–Menten kinetikai modell

Az enzimek által katalizált reakciók kinetikájának első, teljes körű magyarázata Leonor Michaelis és Maud Menten nevéhez fűződik 1913-ból. Abból indultak ki, hogy az enzim (E) a szubsztráttal (S) egy intermedier komplexet képez. Ez az enzimszubsztrát komplex (ES) alakul át azután a reakció végtermékévé (P), miközben az enzim regenerálódik. Ez a folyamat a következő séma szerint alakul (MICHAELIS & MENTEN, 1913):



A kinetikai modell értelmezéséhez, több feltételt is rögzíteni szükséges. A második reakció irreverzibilis, vagyis ($k_{-2}=0$) illetve, az első reakció rendkívül gyorsan végbe megy, azaz kialakul az egyensúlyi állapot, innen származtatható a *rapid ekvilibrium* kinetika elnevezés is. Feltételezzük továbbá, hogy a rendszerben a teljes enzimkoncentráció állandó, azaz:

$$(E_t) = (E_0) + (ES), \quad (2)$$

ahol (E_t) = a teljes enzimkoncentráció,

(E_0) = a szabad állapotban levő enzimkoncentráció,

(ES) = az (ES) komplexben levő enzimkoncentráció.

Michaelis és Menten további egyszerűsítéseket és feltételezéseket tettek úgymint:

- Az enzim koncentrációja legyen lényegesen kisebb a szubsztráténál, vagyis $S \gg E_0$
- Az enzim-szubsztrát komplex kinetikai értelemben legyen stabil, $d(ES)/dt = 0$
- Az enzim egy-egy aktív centrumához csak egy szubsztrát kötődhet.

Az (1) egyenletben szereplő tagok a következő kinetika differenciálegyenletekkel is kifejezhetők.

$$V = \frac{d(P)}{dt} = k_2 \cdot (ES) \quad (3.1)$$

$$\frac{d(ES)}{dt} = k_{+1} \cdot (E) \cdot (S) - (k_{-1} + k_2) \cdot (ES) \quad (3.2)$$

$$\frac{d(E)}{dt} = -k_{+1} \cdot (E) \cdot (S) + k_{-1} \cdot (ES) + k_2 \cdot (ES) \quad (3.3)$$

$$\frac{d(S)}{dt} = -k_{+1} \cdot (E) \cdot (S) + k_{-1} \cdot (ES) \quad (3.4)$$

Visszatérve az (1)-es sztöchiometriai egyenlethez, illetve az első reakciólépés *rapid ekvilibriumra* felírható összefüggéshez:

$$k_1 \cdot [ES] = k_{-1} \cdot [E], \quad (4)$$

amiből, a következőképpen fejezhetjük ki az enzim-szubsztrát komplex disszociációs együtthatóját:

$$K_S = \frac{E \cdot S}{ES} = \frac{k_{-1}}{k_1} \quad (5)$$

A (3.1) egyenletet $[E_0]$ -lal a következőképpen elosztva:

$$\frac{V}{[E_0]} = \frac{k_2 \cdot [ES]}{[E] + [ES]} \quad (6)$$

A (4)-ből $[ES]$ -t kifejezve és az (5) egyenletbe helyettesítve az enzim-szubsztrát komplex koncentrációja kiküszöbölhető:

$$\frac{V}{[E_0]} = \frac{k_2 \frac{[S]}{K_S} [E]}{[E] + \frac{[S]}{K_S} [E]} \quad (7)$$

E-vel egyszerűsítve, majd átrendezve következő kifejezést kapjuk:

$$\frac{V}{k_2 E_0} = \frac{\frac{[S]}{K_S}}{1 + \frac{[S]}{K_S}} = \frac{[S]}{K_S + [S]} \quad (8)$$

A (3.1)-es egyenletet figyelembe véve, akkor kapunk **maximális reakciósebességet**, ha minden enzim komplexben kötött alakban van jelen:

$$v_{max} = k_2 \cdot E_0 \quad (9)$$

Ezt a (8)-be behelyettesítve kapjuk a **Michaelis-Menten kinetika egyenletét**:

$$V = \frac{k_2 \cdot [E_t] \cdot [S]}{K_S + [S]} \quad (10)$$

4.10. Steady-state állapot, a Michaelis-konstans származtatása

Briggs és Haldane (1925) modelljükben azt feltételezték, hogy az enzim és a szubsztrát oldat keveredésekor nem egy dinamikus egyensúly, hanem egy stacionárius állapot (*steady state*) jön létre igen gyorsan. Eszerint egy gyors, bár rövid ideig tartó felfutási szakaszt követően, viszonylag hosszú időn keresztül az enzimszubsztrát komplex koncentrációja nem, vagy csak minimálisan változik, csökken. Ennek az ún. stacionárius állapot létrejöttének feltételei ugyanazok, mint a Michaelis–Menten kinetikai esetében, ugyanakkor a komplex képződési sebessége lényegesen nagyobb kell, hogy legyen a bomlásénál:

$$k_1 \cdot [ES] > k_{-1} \cdot [E], \quad \text{és} \quad k_1 \cdot [ES] > k_2 \cdot [ES] \quad (11.1)$$

Vagyis a következőt írhatjuk fel:

$$k_1 \cdot [ES] = (k_{-1} + k_2) \cdot [ES], \quad (11.2)$$

ebből ES komplexet kifejezve:

$$[ES] = \frac{k_1 \cdot [E][S]}{(k_{-1} + k_2)} \quad (11.3)$$

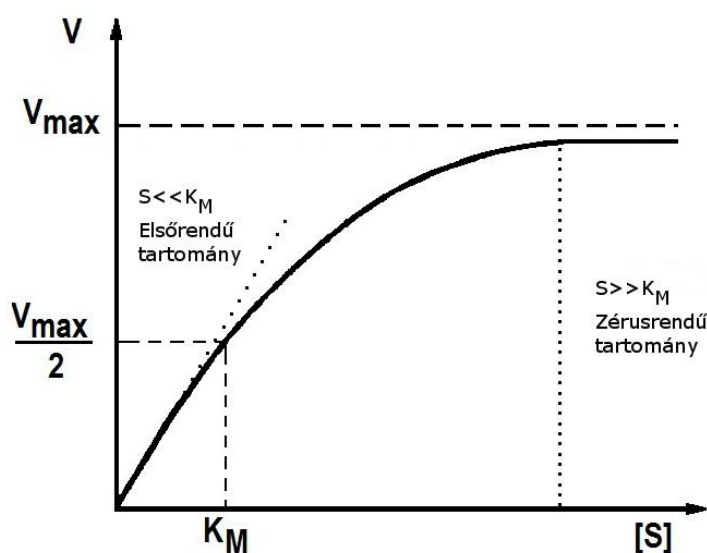
A reakciósebességi állandókat egy csoportba gyűjtve bevezethető a Michaelis konstans, melynek általánosan elfogadott jelölése K_M .

$$K_M = \frac{(k_{-1} + k_2)}{k_1} \quad (12)$$

A Michaelis állandó segítségével az enzim-szubsztrát komplex bomlékonyságáról kapunk információt, mivel egyaránt megjeleníti a kétirányú bomlásának és egyirányú keletkezésének ütemét. A K_M értéke formálisan annak a szubsztrát koncentrációnak felel meg, amelynél a maximális reakciósebesség felét mérhetjük. Természetesen a Briggs-Haldane-féle megközelítés alkalmazásakor is megkapjuk a Michaelis–Menten összefüggést, csak azzal a különbséggel, hogy itt a bevezetett Michaelis-konstans szerepel a nevezőben, vagyis a kétféle megközelítés formailag azonos.

$$V = v_{max} \cdot \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (13)$$

A szubsztrát koncentráció értéke a Michaelis konstanshoz viszonyítva jelentős hatással van az enzimkinetikai folyamatok sebességére, ezt a hatást a 2. ábra mutatja be.



2. ábra. Enzim kinetikai reakciók rendősége, a reakciósebesség függése a szubsztrát kezdeti mennyiségétől

Abban az esetben, ha $(S) \gg K_M$, a nevezőben K_M elhanyagolható, így:

$$V = k_2 \cdot [E] = v_{max} \quad (14)$$

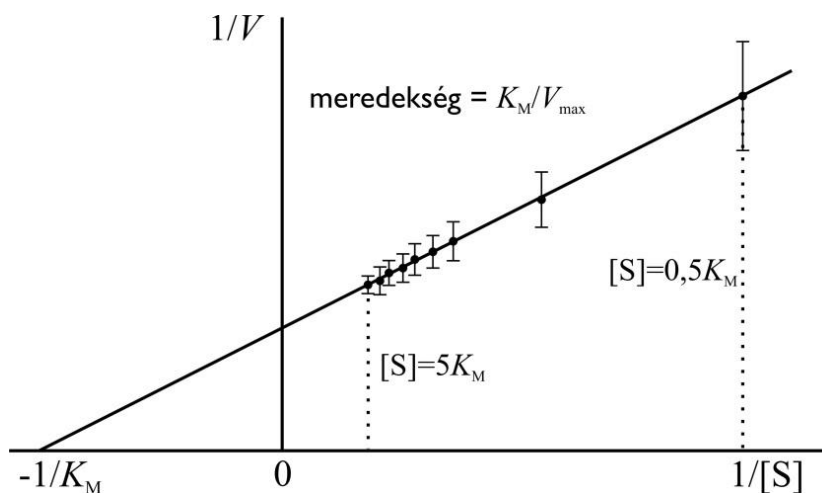
Nagy szubsztrát koncentráció esetén az enzim teljes mennyisége az (ES)-komplexben található, így a reakciósebesség maximális. Ekkor az enzim kinetikai reakciónk a zérusrendű tartományban zajlik. Ha $(S) = K_M$ akkor $V = \frac{V_{max}}{2}$ azaz K_M azzal a szubsztrátkoncentrációval egyenlő, amelynél $\frac{V_{max}}{2}$ reakciósebességet mérhetünk. A szubsztrát koncentráció nagyon kis értékénél, amikor $S \ll K_M$, a nevezőben (S) elhanyagolható, és ekkor:

$$V = \frac{V_{max}}{K_M} \cdot [S] = k'[S]. \quad (15)$$

Ez azt jelenti, hogy kis szubsztrát koncentrációnál, a reakciósebesség egyenesen arányos a szubsztrát koncentrációval és ekkor a reakció az elsőrendű kinetikai törvényszerűség szerint zajlik. Az enzim működéséről információt szolgáltató adatok, úgymint K_M és v_{max} paraméterek pontos becslése a kísérleti adatok görbéhez való illesztésével (lásd 2. ábra) nehézkes és pontatlan eredményt ad, ezért több féle eljárást is kidolgoztak a probléma megoldására. A legelterjedtebb ábrázolási módszer a Lineweaver-Burk, amikor a kinetikai változók reciprokját képezzük (LINEWEAVER & BURK, 1934):

$$\frac{1}{V} = \frac{K_M}{V_{max}} \cdot \frac{1}{[S]} + \frac{1}{v_{max}} \quad (16)$$

A Lineweaver–Burk-féle kettős reciprok a 3. ábrán bemutatott:



3. ábra. A Michaelis–Menten-egyenlet Lineweaver–Burk-féle linearizálása (Hegyi et al., 2013)

4.11. Enzimmoduláció, inhibíció és aktiválási hatás az enzimaktivására

Azokat a kémiai anyagokat, amelyek az enzimekhez kötődve megváltoztatják az enzim aktivitását, enzimmodulátoroknak nevezzük. Ez egyaránt jelentheti az aktivitás növekedését és csökkenését. Az előbbi esetben a modulátort (effektort) aktivátoroknak, míg az utóbbiban inhibitoroknak nevezzük. Az aktivátor, illetve inhibitor hatékonyságát a változásnak az eredeti állapot sebességére vonatkoztatva fejezhetjük ki:

$$\text{Aktiválási hatás mértéke: } \varepsilon_A = \frac{V_A - V_0}{V_0}$$

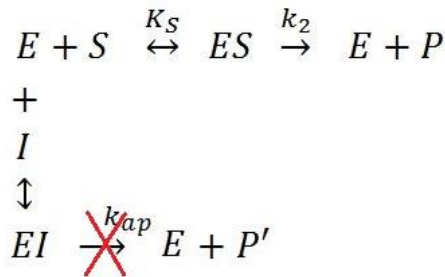
$$\text{Az inhibíciós hatás mértéke: } \varepsilon_I = \frac{V_0 - V_I}{V_0}$$

Amikor az enzim inhibitor molekulákkal kapcsolódik össze, enzim-inhibitor komplex (*EI*) alakul ki, Az *EI*-komplex keletkezése reverzibilis vagy irreverzibilis lehet. Irreverzibilis inhibíció esetén ténylegesen csökkenhet az aktív enzim mennyisége. Irreverzibilis inhibitorok lehetnek a különböző enzimmérgek úgymint, nehézfémek és cianid ionok. A reverzibilis inhibitorok dinamikus komplexeket képeznek az enzimmel, és e komplexek katalitikus aktivitása eltér a szabad enzimekétől. A reverzibilis inhibíció fajtáit megkülönböztethetjük aszerint, hogy milyen látszólagos hatást fejtenek ki a v_{max} és a K_M kinetikai paraméterekre. Ha az inhibitor növeli a K_M értéket, de nem befolyásolja a v_{max} -ot, akkor kompetitív inhibícióról beszélünk, ha csökkenti v_{max} -ot, de nem befolyásolja K_M értékét, akkor tiszta nemkompetitív inhibícióról beszélünk. Ha v_{max} és K_M egy állandó arányban csökken, akkor az úgynevezett unkompetitív inhibíció, míg ha ezen hatások bizonyos kombinációja jelentkezik, akkor kevert típusú inhibícióról beszélünk.

4.11.1 Kompetitív inhibíció

Kompetitív inhibíció ismérve az, hogy az inhibitor az enzim szubsztrátkötő aktív centrumhoz vagy annak közelében kapcsolódik és ezáltal ott konformáció változást idéz elő. A szubsztrát és az inhibitor kölcsönösen akadályozzák az enzimhez való kötődést. Amennyiben már létrejött az *ES* komplex, az inhibitor nem tudja befolyásolni az enzimaktivitást, de ez a kapcsolat fordítva is igaz, az inhibitor kapcsolódását követően az enzim már nem lesz képes az aktív centrumában további szubsztrát megkötésére és átalakítására. Tehát a szubsztrát és az inhibitor között valódi versengés alakul ki, ez magyarázza a kompetitív inhibíció elnevezést. Általánosságban elmondható, hogy a kompetitív inhibitorok az enzim valódi szubsztrátjához kémiai felépítésben hasonló

szubsztrátanalógok, alternatív szubsztrátok, illetve termékek lehetnek. Ez utóbbi eset igen jelentős a biokémiai folyamatokban, ugyanis a végtermékgátláson keresztül valósulhat meg az élettanilag fontos, enzimek által összekapcsolt folyamatok gátlása, szabályozása. A kompetitív inhibíció sematikus folyamata ábrája a 4. ábrán látható, amiből a Michaelis–Menten kinetika esetén már ismertetett módon, *rapid equilibrium* feltételezésével, – de akár *steady state* állapot esetén is – felírható a következő kinetikai összefüggés a két komplexre.

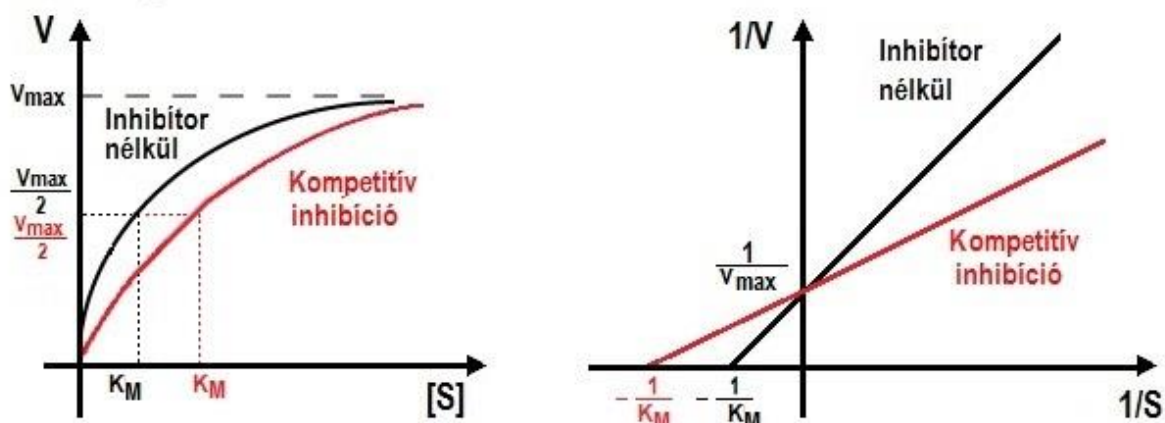


4. ábra. Kompetitív inhibíció sematikus kinetikai ábrája

Ha $k_{ap} = 0$ akkor az I az enzim valódi (dead end) inhibitora. Amennyiben $k_{AP} \neq 0$, azaz I is átalakul, akkor ez a molekula az enzim alternatív szubsztrátja, amely a katalízis során egy másik, P' alternatív terméket eredményez, így annak jelenléte is lassítja a reakciót. Az 5. ábrán a kompetitív inhibícióra jellemző S – V_{max} , illetve a kinetikai paraméterek grafikus meghatározásához alkalmazható Lineweaver–Burk grafikon látható, míg a maximális reakciósebesség analitikus megoldása a következő módon fejezhető ki:

$$V_{\max_ki} = \frac{V_{\max} [S]}{K_M \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \quad (17.1)$$

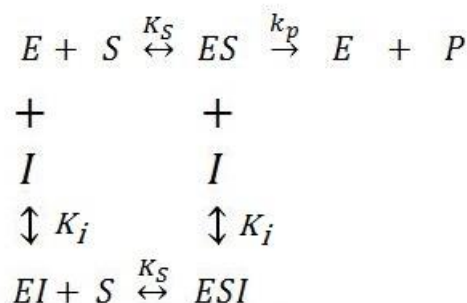
Az analitikus és a grafikus megoldásból egyaránt megállapítható, hogy kompetitív inhibíció esetén az (I) növelésével a v_{max} változatlan marad, a gátlási hatás csak a K_M értékét változtatja, növeli meg.



5. ábra. Kompetitív inhibíció Michaelis–Menten és Lineweaver–Burk ábrázolása

4.11.2 Nemkompetitív inhibíció

Nemkompetitív inhibíció esetén a szubsztrát és az inhibitor véletlenszerűen, reverzibilisen és egymástól függetlenül az enzim különböző kötőhelyeire kapcsolódnak, tehát az inhibitor nem változtatja meg az enzimnek a szubsztráthoz való affinitását. A keletkező EI és ESI komplex egyaránt inaktív, vagyis nem keletkezik belőlük termék. A 4. ábrához hasonlóan a komplex képződési folyamatok sematikus ábrázolása itt is bemutatott:



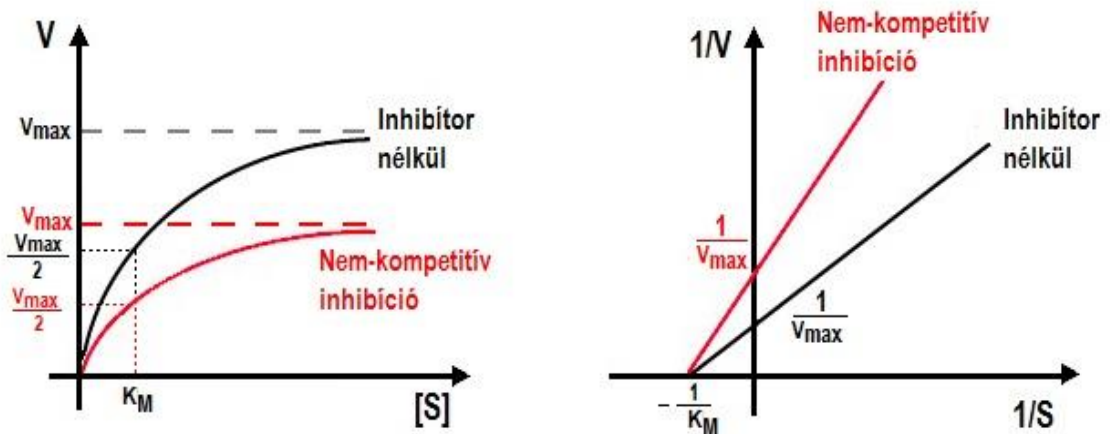
6. ábra. Nemkompetitív inhibíció sematikus kinetikai ábrája

Nemkompetitív inhibíció esetén az enzimatiszikus maximális reakciósebesség a következőképpen fejezhető ki:

$$V_{\max_nki} = \frac{v_{\max} \cdot [S] \cdot \left(\frac{K_i}{K_i + [I]} \right)}{K_M + [S]} \quad (17.2)$$

A nemkompetitív inhibíció esetén az inhibitor komponens csak a látszólagos v_{\max} értéket változtatja meg, míg a K_M értékét nem befolyásolja. Ez azt jelenti, hogy az inhibitor az enzimnek egy másik aktív helyéhez kötődik, mint a szubsztrát, és ez nem változtatja meg az enzimnek a szubsztráthoz való affinitását. Fontos megjegyezni, hogy a klasszikus nemkompetitív inhibíció csak a *rapid ekvilibrium* körülményei között léte-

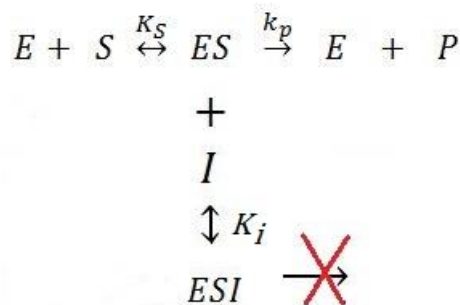
zik, vagyis amikor igaz lesz, hogy $K_S=K_M$. A 7. ábrán a nemkompetitív inhibíció Michaelis–Menten és Lineweaver–Burk ábrázolása látható.



7. ábra. Nemkompetitív inhibíció Michaelis – Menten és Lineweaver – Burk-ábrázolása

4.11.3 Unkompetitív inhibíció

Ebben az esetben az inhibitor komponens már csak a kialakult enzim-szubsztrát komplexhez képes kötődni, ennek eredményeképpen jön létre egy inaktív *ESI* komplex. A folyamatra az adhat magyarázatot, hogy a kiindulási enzim nem rendelkezik, olyan kötőhellyel ahol az inhibitor megkötődhetne, erre csak a szubsztrát kapcsolódást követő konformációváltozás adhat lehetőséget. A mechanizmus sematikus ábrája az alábbi:

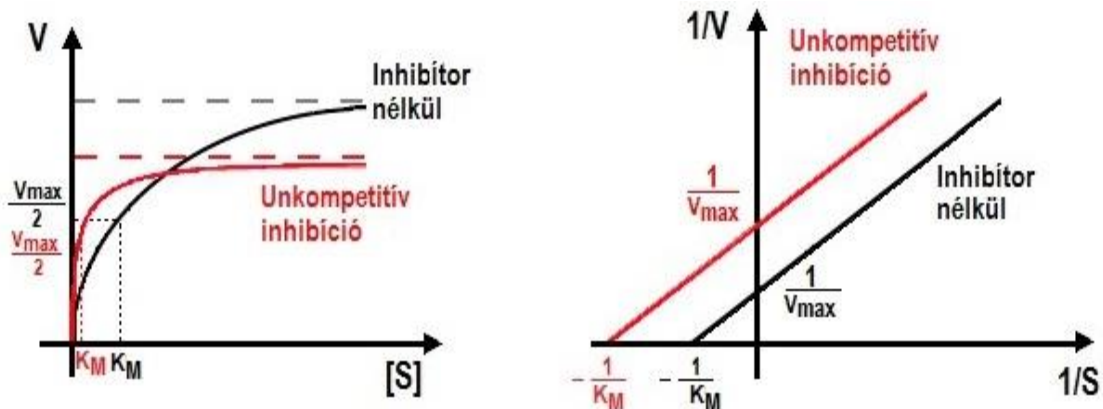


8. ábra. Unkompetitív inhibíció sematikus kinetikai ábrája

a kinetikai egyenletét pedig a következőképpen fejezhetjük ki:

$$V_{\max_uk} = \frac{v_{\max} \cdot [S]}{K_M + [S] \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right)} \quad (17.3)$$

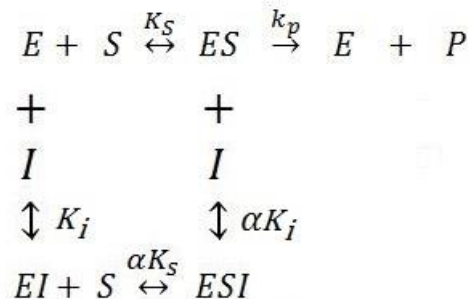
Az unkompetitív inhibitor mind K_M -et, mind pedig v_{\max} -ot ugyanolyan mértékben csökkenti, ahogy ez az ábrázolásból is látható (9. ábra), ugyanakkor az is elmondható, hogy ellentétben a kompetitív inhibícióval az inhibitorok hatását nem befolyásolja a szubsztrát koncentráció emelése, ennek köszönhető nagyfokú hatékonyságuk.



9. ábra. Unkompetitív inhibíció Michaelis–Menten és Lineweaver–Burk-ábrázolása

4.11.4 Kevert típusú inhibíció

A gyakorlatban nem minden esetben különítik el ezt a fajta inhibíció típusát, mivel valójában a nemkompetitív inhibíció egy speciális esetéről van itt szó. Az inhibitor módosító szerepe a szubsztrát enzimmről történő disszociációjakor jelentkezik, így az EI komplexnek a szubsztráttal való kapcsolódásakor a K_S disszociációs faktor helyett αK_S jelölés használt az alábbi sematikus ábrázolásakor. Ugyanez érvényes az ESI disszociációs állandójára is, vagyis az αK_i lesz, a kevert típusú inhibíció sémája a 10. ábrán megjelölt.

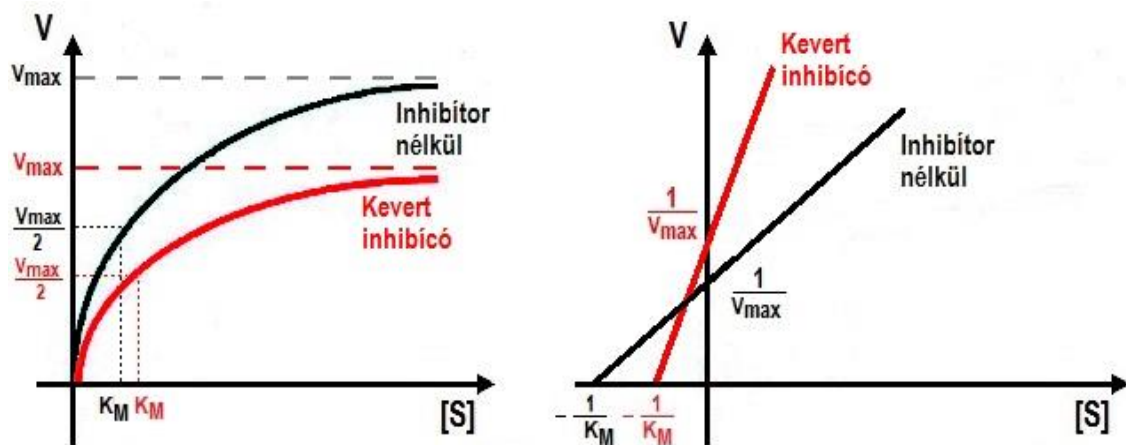


10. ábra. Kevert típusú inhibíció kinetikájának sematikus ábrázolása

A fenti sémából az előzőekben már alkalmazott módon levezethetővé válik a kevert típusú inhibíció sebességi egyenlete:

$$v_{max_{ke}} = v_{max} \cdot \frac{S}{K_S \cdot \left(1 + \frac{I}{K_i}\right) + S \cdot \left(1 + \frac{I}{\alpha K_i}\right)} \quad (17.4)$$

A Michaelis–Menten, illetve a Lineweaver–Burk ábrázolásból (11. ábra) tisztán látszik, hogy mind a K_M mind a v_{max} értékek módosulnak az inhibitor koncentrációk függvényében.



11. ábra. Lineáris kevert típusú inhibíció

5. ANYAG ÉS MÓDSZER

5.1 Biokatalitikus lebontási folyamatok modellezése

Az alkalmazott lebontási modell elméleti alapjait az előző fejezetben ismertetett Michaelis–Menten enzimkinetika szolgáltatja. A kinetikai paraméterek értékeinek (Michaelis konstans, maximális reakciósebesség, kompetitív inhibíciós faktor) és a szennyezett területek koncentrációtartományainak behatárolásaihoz a szakirodalomban fellelhető adatokra támaszkodtam. A lebontási folyamat modellezése megkötésként az alábbi kritériumi feltételekkel kiegészített:

- A lebontás mechanizmusa Michaelis–Menten típusúnak feltételezhető. A kiindulási szubsztrát koncentrációjának (S) csökkenése egyenesen arányos a belőle keletkező termék koncentráció (P) változásával, amelyet a (18) differenciálegyenlet egyértelműen kifejezésre jutat.

$$\frac{d[S]}{dt} = \left(-\frac{d[P]}{dt} \right) = -k \cdot E_0 \frac{[S]}{K_M + [S]} \quad (18)$$

,ahol S – szennyező komponens, mint kiindulási szubsztrát koncentrációja,

k – enzimatis degradáció sebességi együtthatója,

E_0 – lebontásban résztvevő enzim koncentrációja,

K_M – lebontási folyamatot végző enzim Michaelis konstansa.

- A szennyezést tartalmazó reakcióközeg összetevői, kémiai sajátosságai (termék illetve szubsztrát inhibíció, pH, ionerősség), inhibitor szerepet tölthetnek be. Gátolhatják, lassíthatják a szubsztrátok lebontási sebességét. A szakirodalom az alkalmazott szennyező anyagok (benzaldehyd, toluol, benzol) esetében többségében a hasonló térszerkezeten alapuló gátlási hatások lehetséges jelenlétét vizsgálják (REARDON *et al.*, 2000; HAMED *et al.*, 2003; LIN *et al.*, 2007). Ez az inhibíciós hatás a következőképpen definiált a lebontási modellben (HERKE & NÉMETH, 2011):

$$\frac{d[S]}{dt} = -\frac{k \cdot [E_0] \cdot [S]}{K_M \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_I} \right) + [S]} \quad (19)$$

,ahol I – inhibitor komponens koncentrációja,

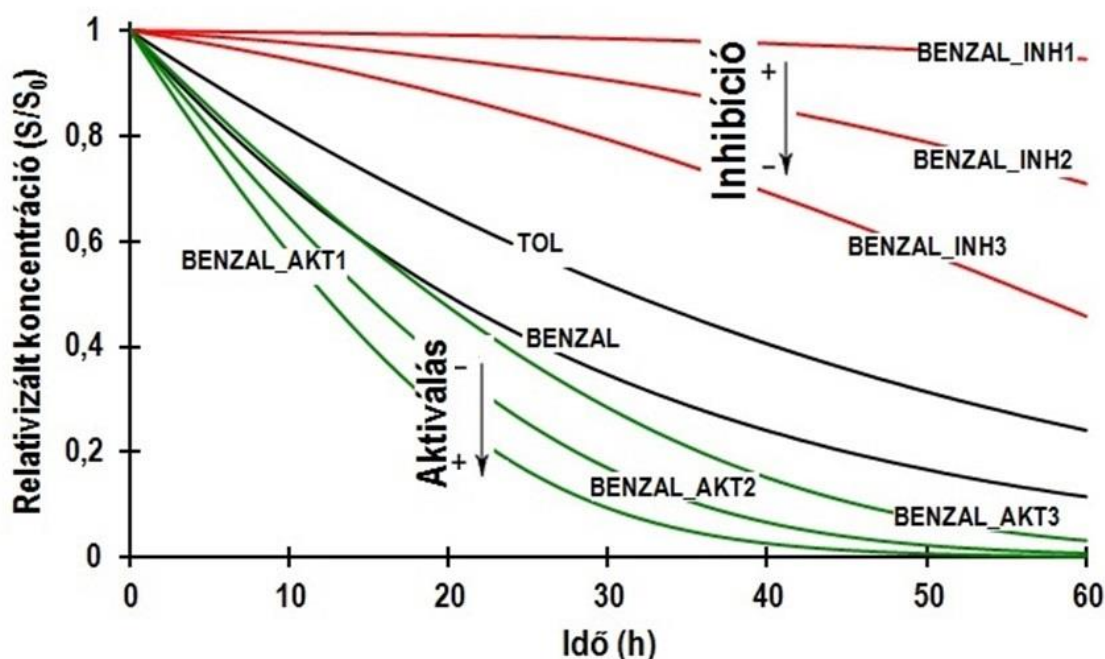
K_I – kompetitív inhibíciós faktor.

- Enzim kofaktorok, mediátorok jelenléte (fém ionok, szerves molekulák) a lebontás sebességét jelentősen növelhetik, tehát aktivátor szerepet tölthetnek be a biodegradációs reakciók során.

A *SCILAB*[®] műszaki programozás *ODE*, differenciálegyenlet megoldó algoritmusával generáltam a szubsztrátok $S = S(t)$ adatsorait, amelyekhez utólag – az analitikai mérések véletlenhibáit modellezendően – az átlagos modellszennyezők koncentráció értékeihez viszonyítva eltérő amplitúdójú (0, 0,5, 1, 2, 3, 6, 9, és 12% közötti) zajt szuperponáltam. A kezdeti szubsztrát koncentrációkat – összesen tizenegy tartományban – úgy választottam meg, hogy azok a laboratóriumi kísérletekkel összhangban legyenek, illetve mind az elsőrendű és mind a zérusrendű enzimkinetikai tartományt lefedjem. A primér adatokat – a lebontási kinetikai adatsorokat – mátrixokba (az oszlopok a modellezett szubsztrátokat, míg a sorok az adott időpontokhoz tartozó koncentrációértékeiket tartalmazza) rendeztem. A modell adatbázis (input mátrix) méretét a lebontási időtartam, az időköz és a komponensek száma határozza meg. Értékeiket a kiértékelési módszerek szerint optimalám. A primér adatmátrixon komponensek (oszlopok) szerinti relativizálást (oszlopmaximumra súlyozást), mint adatelőkészítést alkalmaztam.

A modell, illetve kísérleti eredmények hatékony összehasonlíthatóságához, a biokatalitikus tesztekben tapasztalati úton szerzett információkat, eredményeket a modell beállításokhoz visszacsatoltam. Abban az esetben, amikor a modell és a kísérlet összehangolására nem nyílt lehetőség, (pl. konkrét enzim mennyiség meghatározás) a modellfuttatásoknál a szakirodalmi adatokat (K_M és v_{max} értékek) használtam fel referenciánként. Benzaldehyd lebontása esetén, egyrészt egy a toluol által kifejtett lehetséges inhibíciós hatást, másrészt pedig a K^+ -ion aktiválási hatását modellezendően az eredeti modell egyenleteket módosítottam. A komplex lebontási modellben a toluol szubsztrátként és inhibitorként is szerepel, így keresztkorrelációs hatás miatt a toluolnak, mint inhibitornak koncentrációja időben változó, csökkenő.

A modellfuttatásokhoz alkalmazott inhibíciónak, aktiválásnak, illetve ezektől a hatásoktól mentes programja az *11.1 mellékletben* közölt. A lebontási modell generált adatsorainak egyik reprezentánsát szemlélteti a *12. ábra*, amelyen az inhibíciós hatás által, illetve attól mentes szubsztrátok kinetikai görbéi szerepelnek, (az aktuális kezdeti paramétereket lásd a *6. táblázatban*).



12. ábra. A kinetikai adatsorok alapját képző modell adatok egyik reprezentánsa, ahol a benzaldehid és toluol között inhibíciós hatás feltételezett. BENZAL= Benzaldehid inhibíciómentes adatsora, TOL= toluol lebontási adatsora. BENZAL_INH1-2-3=Benzaldehid lebontásra a toluol által kifejtett növekvő erősségű inhibíciós hatás. BENZAL_AKT1-2-3=Benzaldehid lebontásra a K^+ ion által kifejtett növekvő erősségű aktiválási hatás

6. táblázat. A benzaldehid-toluol modellezett lebontásokhoz tartozó kiindulási kinetikai paraméterek, aktiválási hatás modellezése esetén a v_{max} értékei 0,055; 0,065 és 0,075

Modell szubsztrátok	v_{max} ($\mu M \cdot h^{-1}$)	S_0 (μM)	K_M (μM)	K_i (μM)
BENZALDEHID	45,0	3627,0	1817,0	–
TOLUOL	20,0	2300,0	1150,0	–
BENZAL_INH1	45,0	3627,0	1817,0	9,5
BENZAL_INH2	45,0	3627,0	1817,0	47,1
BENZAL_INH3	45,0	3627,0	1817,0	90,0

5.2 Enzimaktivitást módosító hatások indikálási lehetőségei

5.2.1 Inhibitor hatások érzékelése kinetikai paraméterek változásával

Visszatérve a (18) összefüggéshez, ami formailag egy elsőrendű differenciálegyenlet és $t = 0, S = S_0$ kezdeti értékfeltételhez tartozó analitikus megoldását (20) implicit egyenlet szemlélteti:

$$K_M \cdot \ln\left(\frac{[S]}{[S_0]}\right) + [S] - [S_0] = -v_{max} \cdot t \quad (20)$$

A (18) illetve a fenti (20) egyenlet alapján, az S szubsztrát kinetikai, mérési-modellezési eredményeiből lehetséges a lebontási paraméterek, K_M és v_{max} értékeit megbecsülni. Eh-

hez a (18) egyenlet Lineweaver–Burk-féle linearizálása szükséges, mivel a $dt/dS=1/V$ és az I/S mennyiségek lineárisan korrelálhatnak egymással. A reciprokok mennyiségek regressziós egyenesének meredekségéből és tengelymetszeteiből származtathatók K_M és v_{max} paraméterek.

Ennek érdekében az $S = S(t)$ kinetikai görbe diszkrét adatsorát numerikusan differenciálni szükséges. A továbbiakban ezt a megközelítést **Lineweaver–Burk-féle becslésként** fogom jelölni. A lineáris regressziós egyenes illesztés eredményeit *Excel* környezetben is megkaphatjuk viszonylag gyorsan, a szoftverbe beépített „*LIN.ILL*” függvény szintaxis használatával, amely a legkisebb négyzetek módszerével kiszámolja az I/S és I/V adatokra legjobban illeszkedő egyenes egyenletét. Eredményként az egyenest és annak paramétereit leíró tömböt adja vissza a következőképpen:

$-(K_M/v_{max})$ értéke	$-1/v_{max}$ értéke
$-(K_M/v_{max})$ szórása	$-1/v_{max}$ szórása

ahol, az illesztet $y=m*x+b$ alakú egyenes meredekségét a $-(K_M/v_{max})$, illetve az Y -tengely metszéspontját, pedig a $-1/v_{max}$ érték adja meg. Ezen értékekből származtathatók az adatsorok kinetikai paraméterei, mely becslésekhez tartoznak a következő sorban lévő szórásértékek, standard hibák.

A (20) összefüggés becslésének felhasználásához az egyenlet S implicit tagjai szerint kvázi többváltozós lineáris összefüggéssé alakíthatók. Az $Y = \ln \frac{[S]}{[S_0]}$ és $X = S$ változók bevezetésével kapjuk:

$$K_M \cdot Y + X - [S_0] = -v_{max} \cdot t \quad (20.1)$$

,amely egy háromdimenziós ($Y=Y(X,t)$) síkot határoz meg. Az (20.1) egyenlet **többváltozós regressziójának** együtthatói a keresett biokémiai átalakulás paramétereinek közvetett, alternatív becslései és hasonlóan a Lineweaver–Burk becslés esetén itt is alkalmazható „*LIN.ILL*” függvény, azonban a változók számának növekedése miatt az eredmény tömb módosulni fog a következőképpen:

$-(K_M/v_{max})$ értéke	$-1/v_{max}$ értéke	S_0/v_{max} értéke
$-(K_M/v_{max})$ szórása	$-1/v_{max}$ szórása	S_0/v_{max} szórása

A harmadik oszlopban a becslés eredményeként egy S_0/v_{max} értéket és a hozzá tartozó szórást kapjuk meg kiegészítésként, mely további megerősítésként szolgálhat a predikció helyességét illetően. A teljesség igénye végett meg kell említenem, hogy természetesen az alkalmazott szintaxis eredmény tömbje további, az illesztéssel kapcsos-

latos információt (determinációs együttható, becslés standard hibája, F-próba eredménye, szabadsági fok, regressziós és maradék négyzetösszegek) tartalmaz, de vizsgálatuk nem tartozik szorosan a dolgozat tárgykörébe.

5.2.2 Enzimaktivitást befolyásoló hatások érzékelése kinetikai görbék korreláltatásával

A 12. ábrán is szembeűnő, hogy a modellben generált eltérő erősségű aktiválási és inhibíciós hatás jelentős módon megváltoztatja az adott szubsztrát kinetikai görbájének az alakját. A kinetikai görbe meredeksége, monotonitásának mértéke a referenciának tekinthető enzimaktivitás módosító hatástól mentes kinetikai görbéhez viszonyítva jelentősen megváltozik. Hasonló mechanizmussal lebomló szubsztrátok koncentrációinak időbeli adatsorai lineárisan korrelálnak, korrelálhatnak egymással. A komponensek korrelációi és lineáris kapcsolatukat megjelenítő regressziós paraméterei (meredekség és tengelymetszet) potenciális enzimaktivitás változást visszatükroző információforrások lehetnek. Az adatsorok egymással való lineáris korreláltatásával a pontokra illesztett egyenes meredekségének és tengelymetszetének a változásából is tudunk következtetni enzimaktivitás módosító hatás jelenlétére.

Ez a megközelítés abban az esetben is használható, ha különböző szubsztrátok adatsorait korreláltatjuk egymással. Modell adataim esetében ez a komponens a toluol volt, mivel annak koncentrációján keresztül valósul meg a benzaldehid kompetitív inhibíciós gátlása. Itt ki kell, hogy hangsúlyozzam: a korrelációból származtatott görbére és az arra illesztett egyenesek alkalmazásával nem a legjobban illeszkedő regressziós függvénykapcsolat megkeresése volt a célom. Annál is inkább, hogy a lehető legegyszerűbben és leggyorsabban tudjam érzékeltetni a kinetikai görbék meredekségben bekövetkező változást, amely lehetséges inhibíciós és aktiválási hatások jelenlétére utalhatnak. A korreláltatott adatok regressziós egyeneseinek egymástól való megkülönböztetésére kovariancia analízist (ANCOVA) használtam, melyet a Statsdirect statisztikai szoftvercsomaggal végeztem el.

5.2.3 Kinetikai lebontási görbék főkomponens-elemzése

A főkomponens-elemzés (PCA) alkalmazása további lehetőséget kínál enzimkinetikai adatsorok jellemzésére. A PCA elemzésnél a modell komponensek, illetve a lebontandó szennyezők az objektumok, az objektum tulajdonságok pedig a komponensek lebontásainak az időfüggő koncentráció értékei. A PCA felbontás input mátri-

xának a sorai a lebontandó szubsztrátokat (szennyezések) jelképezik, az oszlopai az adott lebontási időkhöz tartozó koncentráció értékeket tartalmazzák. Ha a PCA értékelést a komponensek adatsorai közötti korrelációs kapcsolatok feltárására kívánjuk felhasználni, akkor a primér adatmátrixot transzponálni szükséges. A transzponálás eredménye a kinetikai paraméterbecslés primer adatmátrixával megegyező mátrixot (**D**) eredményez, amelyen adatelőkészítésként az oszlopok szerinti relativizálás a különböző kiindulási szubsztrát koncentrációk felbontásra gyakorolt hatását kiküszöböli. (*Kiindulási objektum mátrix PCA felbontáshoz lásd 11.2 melléklet*). A kiindulási adatmátrix (21) egyenlet szerinti felbontását „score” (**T**) és „loading” mátrixokra (**P**) a „Chemometrics-Add-In” Microsoft Excel bővítmény alkalmazásával végeztem el.

$$\mathbf{D} = \mathbf{T} \cdot \mathbf{P}^T \quad (21)$$

Az input mátrix kialakításából következik, hogy az inhibíciós aktiválási információtartalom csak a **P** „loading”, másnéven a *projekciós transzformációs mátrixra* korlátozódik, amelynek oszlopait korreláltatva kapjuk meg az úgynevezett főkomponens-együttható ábrákat. Ezeket vagy másnéven a „loading plotokon” a szubsztrátok kinetikai adatsorát megjelenítő pontok az első és második (*PC1* és *PC2*) komponensek által kifeszített térben helyezkednek el. A főkomponens-együttható ábrákon a szubsztrátok kinetikai sorát megjelenítő pontok elhelyezkedését az enzimatis lebontásukra kifejtett inhibíciós és aktiválási hatások befolyásolják.

5.3 Kísérletes kinetikai adatsorok előállítása. Kísérlettervezési szempontok

A lehetséges inhibíciós és aktiválási hatások érzékelésére kidolgozott értékelési módszert a modellezett kinetikai adatokon túl, valós, kísérleti adatsorokra is alkalmaztam. A GC-MS elválasztások kivitelezhetőségéhez az alkalmazott „modell” szennyeződések kiválasztásakor, a következő tervezési szempontok alapján választottam ki a lebontandó szubsztrátokat:

A GC-MS elválasztások esetében alkalmazott „modell” szennyeződések kiválasztásakor a következő szempontok kerültek előtérbe:

- A szénhidrogén bázisú komponensek, mint potenciális szennyező anyagok széleskörű (aromás és klórozott szénhidrogén, észter-, illetve ketonszármazékok) kiválasztása.
- A komponensek fizikai-kémiai tulajdonságainak (oldhatóság, illékonyság) kompatibilitása a GC-MS elválasztáshoz.

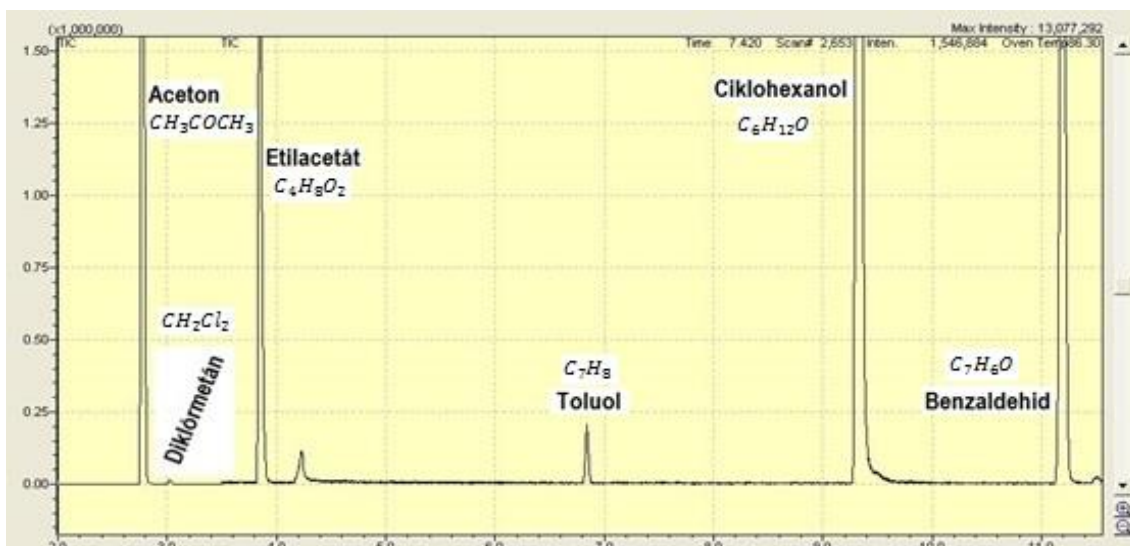
- A kezdeti koncentrációk értékek megválasztásával a lebontás egzakt nyomon követhetősége, illetve a kiindulási anyagok és a bomlási származékok anyagminőségei közötti szignifikáns eltérés biztosítása.

A biokatalitikus szennyező anyag lebontás kísérleteihez a fentiek alapján a 7. táblázatban szereplő vegyületeket és kiindulási koncentrációikat használtam fel.

7. táblázat. *Tesztzennyezők és néhány tulajdonságaik, illetve kezdeti koncentráció értékei a kinetikai vizsgálatokhoz*

Modell komponens	Aceton	Benzaldehid	Ciklohexanol	Diklórmétán	Etil-acetát	Toluol
CAS szám	67-64-1	100-52-7	108-93-0	75-09-2	141-78-6	108-88-3
Oldhatóság vízben (g/100 ml)	elegyedik	0,695	3,6	1,3	8,3	0,053
Gőznyomás (kPa)	24,46	0,13	0,131	47	13,3	2,93
Forráspont (°C)	56,3	178,1	160,84	39,6	77,1	110,6
Kiindulási koncentráció [μ M]	35212 \pm 1692	7989,31 \pm 203	15126 \pm 382	1023 \pm 391	24852 \pm 1115	1120 \pm 143

A referencia adatsorokat a modellszennyezők külön-külön, csak nyers enzim extraktummal (földigiliszta extraktum) való reagáltatásai szolgáltatták. A feltételezett inhibíciós, illetve aktivációs hatások vizsgálatához a komponensek keverékével, illetve egyéb adalék anyag hozzáadásával (KCl) hajtottam végre a lebontási kísérleteket. A reakcióközegbe mért koncentráció értékek, illetve a biokatalízisekhez felhasznált extraktum mennyisége mindegyik kísérletben azonos értékűre beállított volt. Gázkromatográfias kromatogramokból, adott mintavételi időpontokban történt a komponensek koncentráció értékeinek meghatározása (lásd 13. ábra).



13. ábra. Választott szennyező anyagok földigiliszta extraktum általi biokatalitikus lebontás vizsgálatának egyik reprezentáns GC-MS kromatogramja komponensek közötti lehetséges inhibíciós hatások érzékelése érdekében.

A gázkromatográfiás-spektrofotometriás elválasztás paraméterei a következők voltak. A szennyező komponensek koncentrációértékeinek meghatározása egy GC-QP2010-MS és AOC-5000 automata mintaadagoló (Shimadzu Co., Japan) alkalmazásával történt. A szennyezők, illetve a bomlástermékek elválasztása Supelco SLB-5ms kapillaris oszloppal, (minta injektálási mennyisége 1 μ l, split arány 1:80, injektálási hőmérséklet 250°C, a hőmérsékleti program kezdeti értéke 35°C, majd ezt követően 20°C-kal emelkedett három percenként a hőmérséklet a 250°C-os fűtési végpontig) kiviteleztem. A detektálás a program első 5 percében SIM (szelektált ion monitorozó), majd azt követően TIC (totál ionkromatogram) üzemmódban üzemelt. A komponensek mennyiségi meghatározása 7 pontos kalibráción alapult.

5.3.1 Biológiai extraktum előállítása szennyező anyagok lebontásához

A szennyező komponensek lebontásához a földigiliszta-félék családjába tartozó gilisztákból (*Lumbricina*) előállított biológiai kivonatot használtam fel. A kivonat alapanyagát a soproni egyetem botanikus kertjének területéről, saját kezűleg gyűjtöttem be. A giliszta kivonat készítésekor enzim, illetve baktérium összetételének szeparálása nem tartozott a célkitűzések közé, mivel a vizsgálatok célja a szennyező anyag lebontásakor jelentkező enzimaktiválási mechanizmusok érzékelésére irányult. A biológiai kivonat elkészítésének pontos menetét a 11.4 melléklet tartalmazza.

5.3.2 Szennyező anyag bontó termék alkalmazása

A németországi, Helmholtz Intézetben (UFZ, Lipcse) végzett kutatási munkám során lehetőségem volt egy kifejezetten környezetvédelmi célokra fejlesztett szénhidrogénbontó termék alkalmazására (továbbiakban biokatalitikus termék), amely jó lehetőséget kínált a giliszta kivonatokkal szerzett tapasztalatok és eredmények megerősítésére, visszaigazolására, illetve a kidolgozott módszer további tesztelésére. A termék pontos összetételét nem állt módomban kideríteni, illetve megismerni, azonban a vizsgálatok – a biológiai kivonattal végzett mérésekhez hasonlóan – célja itt is az inhibíciós vagy aktiválási hatás érzékelésére, kimutatására irányultak.

A korábbiakban már felhasznált modell komponenseket bonyolultabb, jellegzetes kőolaj eredetű aromás szénhidrogénekre, a BTEX vegyületek közé tartozó benzol és toluol komponensekre cseréltem. A választott vegyületek alkalmazásának további oka pedig az volt, hogy a két komponens közötti inhibíciós kapcsolatot már számos irodalmi forrás bizonyította (BIELEFELDT *et al.*, 1999; REARDON *et al.*, 2000; DEEB *et al.*, 2001). Feltételezve, hogy a biokatalitikus termék képes a szennyező anyagokat bontani, egyaránt mértem koncentrációváltozásukat külön-külön önálló, illetve egymás jelenlétében, azaz kevert szubsztrátként. A termék baktérium törzseinek összetételéből következik, hogy eltérő benzol, illetve toluol bontóképességgel jellemezhetők, vagyis az inhibíciós hatás eredményeként a komponensek egyidejű jelenléte a reakcióközegben a lebontóképesség módosulását eredményezheti, ami az általam kidolgozott értékelési eljárással érzékelhetővé válik.

A biokatalitikus termékről (*Ativa Biosciensis, Bioclean Septic TM*[®]) a forgalmazó gyártói titoktartási szerződésre hivatkozva meglehetősen kevés információt szolgáltatott. A szilárd halmazállapotú minta különböző talaj-mikroorganizmusok és enzimek keverékét, illetve a gyors szaporodásukhoz szükséges tápanyagokat tartalmazza. A szennyező komponensekkel való homogenizálásuk előtt 48 órán keresztül 37°C-on folyamatos keverés mellett inkubáltam desztillált vizes oldatukat. A benzol, illetve toluol hozzáadását követően különböző időközönként történt a mintavételezés. A vizsgált szennyezők jelentős illékonysággal rendelkeznek, ezért az egyes mintavételi időpontokhoz külön-külön reakciótér, reakcióközeg (kiindulási oldat osztott sorozata) tartozott minimalizálendő a mintavételből származó hibalehetőségét.

A benzol és a toluol kiindulási koncentrációi $368,48 \pm 13,89$ illetve $379,16 \pm 8,89$ mg/l voltak. A szennyezők koncentráció meghatározása, egy Agilent GC 6890

gázkromatográf és egy G1888 gőztér mintaadagolóval, továbbá egy OPTIMA delta 3 (60 m×0,32 mm×0,1 µm) kapilláris oszloppal történt. Az analízis főbb hőmérsékleti paraméter beállításai a következők voltak: a fűtési program 50°C-ról indult és 15°C/perc sebességgel emelkedett 200°C-ig. Az elválasztási program ideje 12 perc volt. A mintatárolók gőztéréből 20 perces 135°C-os rázatást követően, 95°C-os fecskendővel történt a mintavétel. A mintavivőgáz nitrogén, a split arány 1:10 volt az analízis során. A mennyiségi meghatározás érdekében a mintákban lévő komponensekkel hét pontos kalibrációs sor készült.

6. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELÉSÜK

6.1 Modellezett biokatalitikus lebontások eredményei és értékelésük

6.1.1 Enzim kinetikai paraméterek becslési lehetőségei és korlátai

A generált adatsorokból a *biokatalitikus lebontási folyamatok modellezése* fejezetben ismertetett értékelési stratégia alkalmazásával érzékelhetővé válnak a biokatalitikus reakciók lebontásának körülményei, a potenciális enzimaktivitást befolyásoló hatások. Jelen fejezetben bemutatom a kinetikai paraméterek becslésén keresztül az inhibíciós és aktiválási hatások érzékelési lehetőségeit, illetve az azokat befolyásoló tényezőket. A paraméterbecslésekhez használt regressziós modellek kiindulási egyenletein hibaanalízist hajtottam végre. Az eredmények közvetve felfedik a zaj amplitúdónak és a kiindulási szubsztrát koncentrációnak a K_M és v_{max} becslési jóságára gyakorolt hatását. Az elméleti úton származtatott tendenciákat a zajjal, illetve inhibíciós hatásokkal terhelt adatsorok regressziós modellszámításai is alátámasztják.

6.1.2 Regressziós modellek elméleti, illetve modellezett hibaanalízise

Az alábbiakban az (18) és (20) modellegyenletekre alkalmazott hibaanalízis eredményeit foglalom össze. A levezetés részletes ismertetése (HERKE & NÉMETH. 2011) az 11.3 mellékletben található.

Az (18) egyenlet zérusrendű tartományában (I.a.: $S \gg K_M$) a maximális reakciósebesség becslési hibája (Δv_{max}) egyenesen arányos a szubsztrát koncentráció hibájával (Δh_S), és fordítottan arányos a numerikus differenciálás lépésközével (Δt). Ugyanakkor az elsőrendű (I.b.: $K_M \gg S$) szubsztrát koncentrációtartományában a maximális reakciósebesség és a Michaelis konstans hányadosának abszolút hibája (Δm) egyenesen arányos a szubsztrát koncentráció relatív hibájával (δ_S), ahogy ez az alábbi összefüggés is visszatükrözi:

$$\pm \delta_S \cdot \left(\frac{2}{\Delta t} - \frac{v_{max}}{K_M} \right) \approx \pm \Delta m. \quad (22)$$

A numerikus differenciálás lépésköze (Δt) fordítottan arányosan befolyásolja a v_{max} / K_M becslés jóságát.

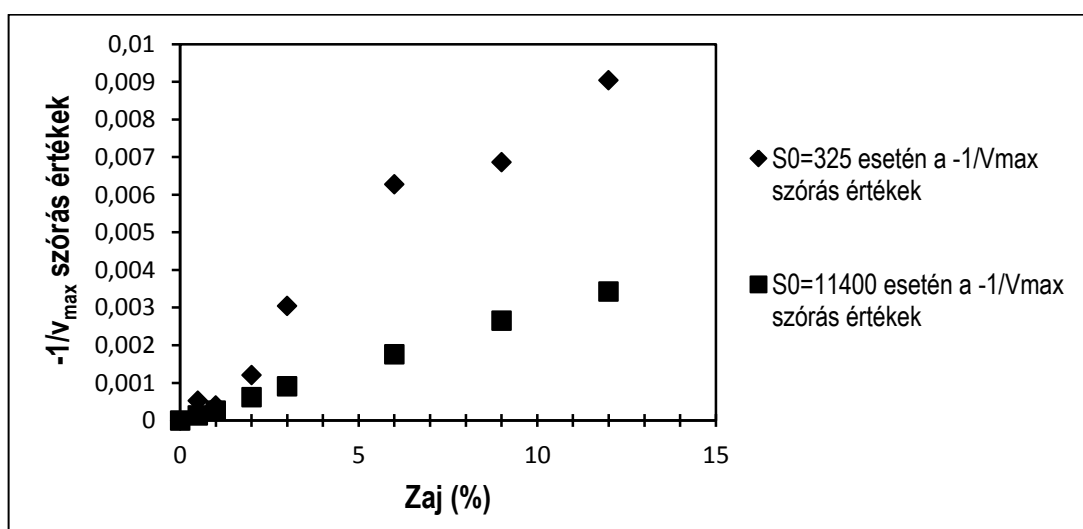
A (20) implicit összefüggés hibaelemzése már Δt figyelembe vételét kikerüli. A maximális reakciósebesség reciprokának hibája a következőképpen fejezhető ki:

$$\Delta r_v = \Delta h_t \cdot \frac{K_M}{S_0} + \left(\frac{K_M}{S \cdot S_0} + \frac{K_M}{S_0^2} + \frac{S}{S_0} \right) \cdot \Delta h_s + \frac{K_M}{S_0} \cdot \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) \cdot \frac{\Delta K_v}{K_v} \quad (23)$$

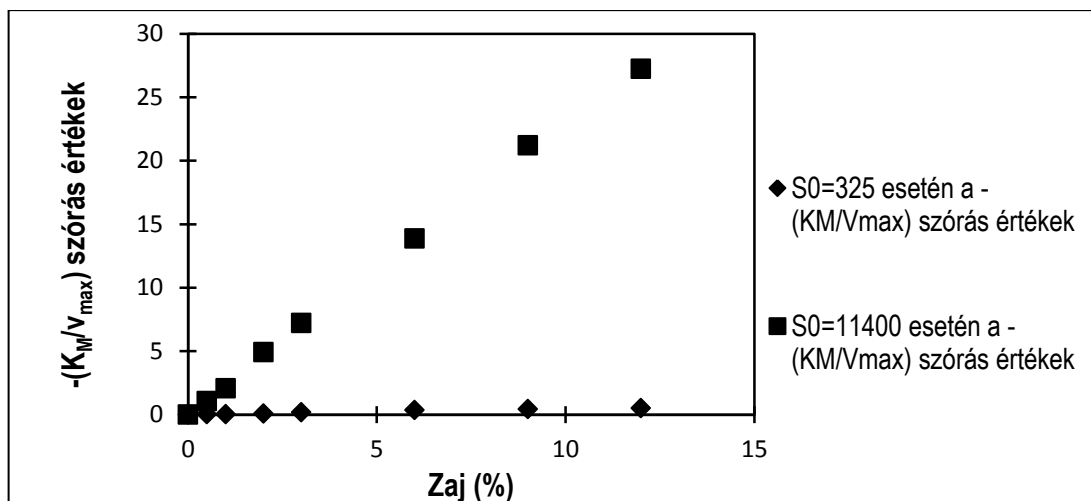
, ahol Δh_t az időbecslés abszolút hibája és Δh_s a szubsztrát koncentráció abszolút hibája.

A (23) egyenlet a hibaterjedés I.a és I.b elemzések eredményeinek megerősítése mellett kihangsúlyozza a maximális reakciósebesség becslésének kiindulási szubsztrát koncentrációtól való függését is.

Az elméleti hibaanalízissel párhuzamosan modelleztem a hiba nagyságának és a szubsztrát koncentrációknak az (18) és (20) modell egyenletek regressziójára, illetve paraméter $(-1/v_{max}, -(K_M/v_{max}))$ becsléseire gyakorolt hatását. A modell a szennyezők lebontásánál a kiindulási koncentrációnak és a „mérési/modellezési” hibának (zajnak) $-1/v_{max}$, illetve $-(K_M/v_{max})$ értékek szórásaira gyakorolt hatásait a 14.a. és 14.b. ábrák szemléltetik. A modellszámítással származtatott szórásérték változási tendenciák a (22) és (23) hiba összefüggések arányossági kapcsolataival harmonizálnak. A Lineweaver–Burk becslés esetén ezt a lineáris kapcsolatot a zajhatás nagysága, illetve a szórásértékek között felfedezhető, bár a becslés esetén véletlenszerűen adódó kiugró értékek erőteljesen torzítják, befolyásolják (ennek további ismertetéséről a későbbiekben lesz szó). A 14.a. és 14.b. ábrák megfelelő ábrázolása a Lineweaver–Burk becslés esetén a mellékletben (M11.3.1.a. és M11.3.1.b. ábra) megjelenített.

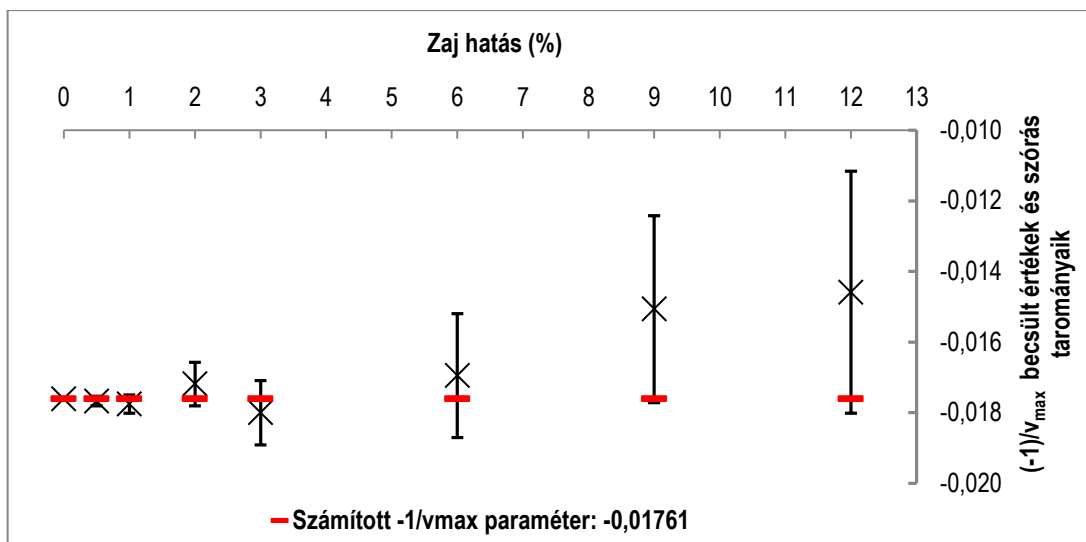


14.a. ábra. Zajhatása a benzaldehid $-1/v_{max}$ szórásértékeire első-, illetve zérusrendű tartományban (többváltozós lineáris becslés)

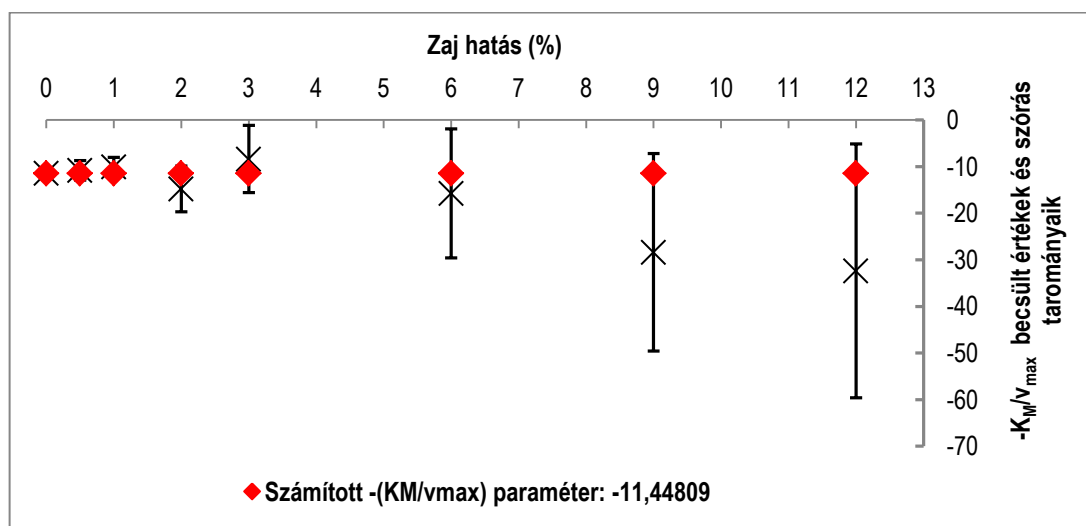


14.b. ábra. Zajhatása a benzaldehid $-(K_M/v_{max})$ szórásértékeire első-, illetve zérusrendű tartományban (többváltozós lineáris becslés)

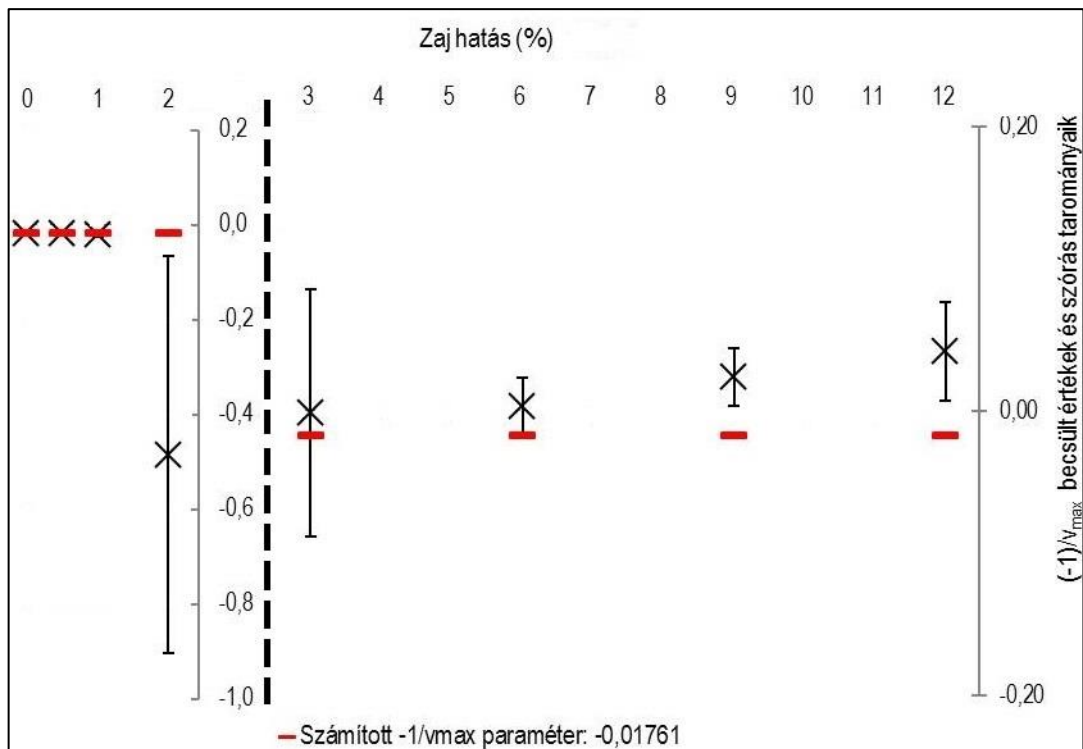
A kiindulási koncentráció-tartománytól függetlenül mindkét paraméter becslési pontossága természetesen egyenesen arányosan változik az alkalmazott zajhatás mértékével. Jelentős eltérés a két paraméter szórásértékei között jelentkezik, ugyanis az $-(K_M/v_{max})$ esetén több nagyságrenddel nagyobb. Ennél a paraméternél az is megállapítható, hogy a modellezett koncentráció tartomány határainál számottevő különbség jelentkezik. Az 11400 μM szubsztrát koncentráció értékénél a szórásértékek megközelítőleg két nagyságrenddel nagyobbak, mint 325 μM esetén. A $-1/v_{max}$ többváltozós lineáris becslése esetén kiindulási koncentrációtól függetlenül a szórásértékek hasonlóak. A két becslési eljárás által becsült $-1/v_{max}$ és $-(K_M/v_{max})$ szórás- és átlag értékeit különböző koncentrációk esetén a mellékletben található *M11.3.2.a* és *M11.3.2.b táblázatok* mutatják be. A numerikus differenciálást követő I/S vs. I/V regressziós analízissel megvalósított paraméterbecslésnél tapasztalható, hogy ez az eljárás igen érzékeny a differenciálási lépésközre, –hiszen már a zajmentes adatsor esetén is pontatlanabb becslést kapunk, főleg alacsony koncentráció esetén– és az eltérő amplitudójú zajhatására. Ehhez képest a többváltozós lineáris megközelítés magasabb zajhatás esetén is viszonylag pontosabb becslést szolgáltat. Eredményként a becsléseket és a hozzájuk tartozó jelentősen magas szórásértékeket valamint a számított paramétereket az alábbi *15.a-b.*, illetve *16.a-b. ábrák* mutatják be a legmagasabb modellezett benzaldehid koncentrációban.



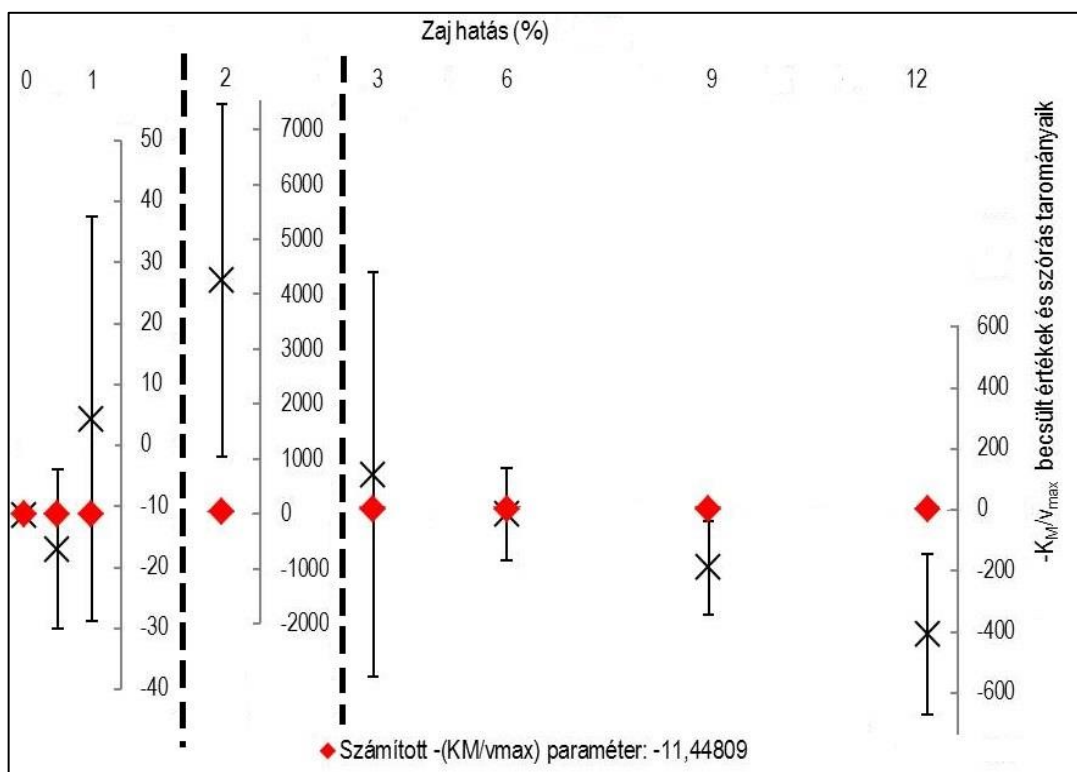
15.a. ábra. A többváltozós becslés $-1/v_{max}$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és 11400 μM kiindulási koncentráció esetén



15.b. ábra. A többváltozós becslés $(-K_M/v_{max})$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és 11400 μM kiindulási koncentráció esetén



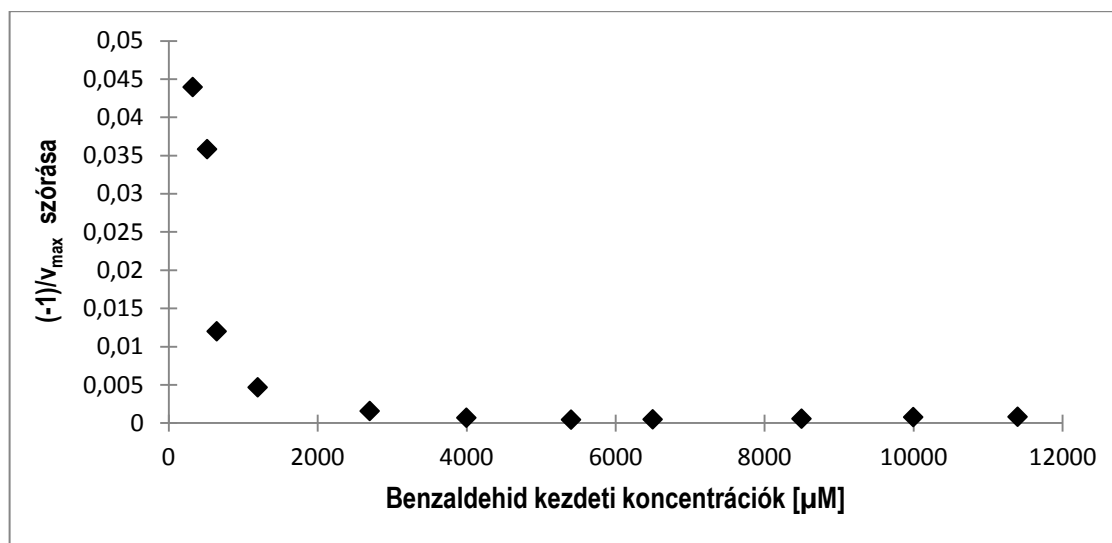
16.a. ábra. A Lineweaver–Burk-féle becslés $-1/v_{max}$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és $11400 \mu M$ kiindulási koncentráció esetén



16.b. ábra. A Lineweaver–Burk-féle becslés $-(K_M/v_{max})$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és $11400 \mu M$ kiindulási koncentráció esetén

Az elméleti hibaanalízis következtetései a $-1/v_{max}$ illetve a $-(K_M/v_{max})$ paraméterek szórásértékei vs. benzaldehid kiindulási koncentrációk ábrákból is megerősíthetők, illetve visszaigazolhatók (17.a. és 17.b. ábrák) Ennek érdekében azonban az eredeti

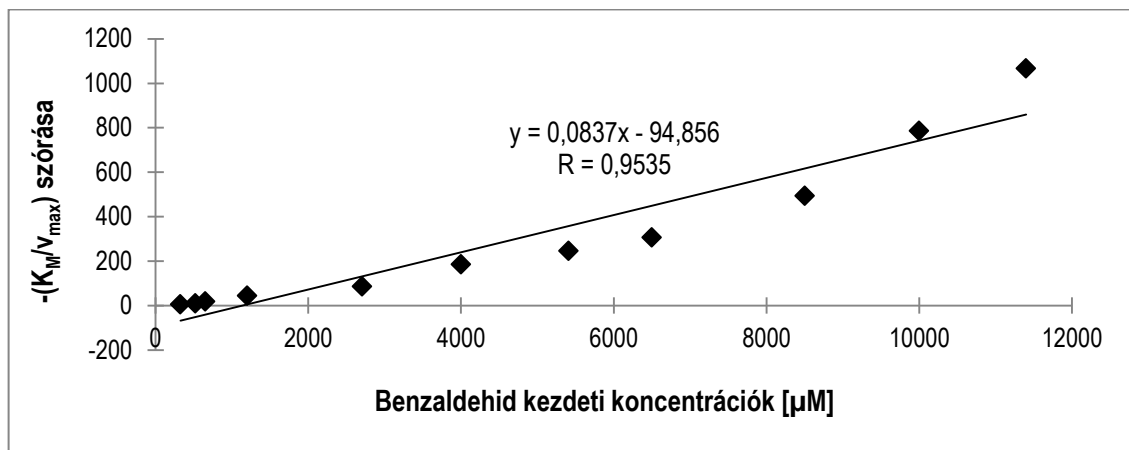
modellezési beállításokat, illetve zaj definíciót módosítani szükséges. Az azonos mértékű zajhatás biztosításához a zajhatást a kiindulási koncentrációk átlagának 5%-ként állítottam be, illetve szuperponáltam a lebontási adatsoraimra. A standardizált zajjal módosított adatsorok paraméterbecslését követően a 17.a. ábrán látható hiperbolikus összefüggést kaptam a $-1/v_{max}$ szórásértékek esetében, kisebb koncentráció értékeknél a maximális reakció sebesség – vagyis helyesebb itt kezdeti sebesség értékről (v_0) beszélni – pontatlanabb becslés, magasabb szórásértékek jellemzik. Ennek oka, hogy alacsony szubsztrát koncentráció esetében és az eredeti kiindulási beállításokat (v_{max} , K_M , lebontási időtartam) nem változtatva a szubsztrát koncentráció csökkenése a v_0 csökkenését vonja maga után, ami a modellezett zajszintre szuperponálódva jóval magasabb tényleges zajhatást, ezáltal magasabb szórásértékeket fog eredményezni. Ez a szubsztrát koncentráció emelkedésével csökken. Esetemben – példaként véve egy reális környezeti kármentesítést – a gyakori magas szennyező és egyben lehetséges szubsztrát koncentráció a jellemző.



17.a. ábra. A benzaldehid kiindulási koncentrációinak hatása a $-1/v_{max}$ becsült paraméter szórásértékeire 5%-os zaj esetén (többváltozós lineáris modellbecslés)

A $-(K_M/v_{max})$ paraméter hasonló ábrázolása esetén-vagyis az elméleti hibaanalízis (23) egyenletének modelladatokkal való alátámasztásához, figyelembe kellett venni a becsléshez felhasznált kinetikai görbe értelmezési tartományát is. Ugyanis az elsőrendű tartomány közelében az alkalmazott lebontási időintervallum és az 5 %-os zajdefiníció hatására a kinetikai adatsorom mérete módosulni fog, így a becslésbe bevonni kívánt tartományt értelemszerűen a legkisebb koncentrációt figyelembe véve standardizálni szükséges. A regressziós egyenes Pearson R értéke, illetve figyelembe véve a Bevington kritérium értékét 0,602 (11, 95%) a görbe szignifikánsan egyenesnek tekinthető (17.b.

ábra). Megjegyezendő, hogy ebben az esetben a pontok egyenesen való elhelyezkedésének statisztikai valószínűségére voltam kíváncsi, hanem arra, hogy statisztikailag feltehető-e – figyelembe véve az aktuális elemszámot illetve a lineáris regresszió Pearson R értékét –, hogy a pontok elhelyezkedése egyenes trendet követ. Ezt a Bevington kritérium Pearson féle korrelációs koefficiens értékével lehetséges visszaigazolni (BEVINGTON, 1969).



17.b. ábra. A benzaldehyd kiindulási koncentrációinak hatása a $-(K_M/v_{max})$ becsült paraméter szórásértékeire 5%-os zaj esetén (többváltozós lineáris modellbecslés)

Ezzel szemben az Lineweaver–Burk regressziós modell esetében ezt a lineáris összefüggést erőteljesen torzítja az alkalmazott zajdefiníció, illetve a differenciálási lépésköz, amelyek eredményeként az $1/V$ adatsorunkban minden alkalommal, véletlenszerűen előfordulhatnak kiugró értékek, melyek az $1/V$ vs. $1/S$ lineáris regresszió paraméterbecslés pontosságát jelentősen befolyásolják, az értékek szórását megnövelik. (lásd melléklet M11.3.3.a és M11.3.3.b ábrái). A két becslési eljárás pontosságát egymással összehasonlítva mindkét paraméter esetében határozottan jelentős az eltérés (8.a-b. táblázatok). A Lineweaver–Burk becslés esetében szignifikánsan nagyobbak a szórásértékek.

8.a. táblázat. $-1/v_{max}$ és $-(K_M/v_{max})$ szórásértékek változása a két különböző becslési eljárás esetén 5 %-os zajjal terhelve

Koncentráció (μmol)	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk- féle regressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk- féle regressziós becslés
	$(-1)/v_{max}$ szórás		$-(K_M/v_{max})$ szórás	
11400	0,00078	0,10795	1066,46	3337,31
10000	0,00074	0,04230	785,24	4698,50
8500	0,00056	0,11489	492,61	1900,39
6500	0,00046	0,03087	305,87	10391,88
5407	0,00042	0,02716	244,83	3538,43
4000	0,00068	0,05677	185,13	209,50
2703	0,00154	0,04316	85,27	176,76
1200	0,00463	0,03925	44,27	306,54
650	0,01198	0,07955	17,27	50,97
520	0,03579	0,04440	8,90	18,11
325	0,04393	0,04715	7,51	6,42

8.b. táblázat. $-1/v_{max}$ és $-(K_M/v_{max})$ becsült értékek változása a két különböző becslési eljárás esetén 5 %-os zajjal terhelve, kinetikai paraméterek számított értéke: $-0,01761$ és $-11,44809$

Koncentráció (μmol)	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk- féle re- gressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk- féle regressziós becslés
	$(-1)/v_{max}$ értékek		$-(K_M/v_{max})$ értékek	
11400	-0,01707	-0,00938	-16,53630	-236,59154
10000	-0,01727	0,02169	-13,53218	-305,65053
8500	-0,01745	-0,13211	-11,70622	308,51377
6500	-0,01791	-0,04789	-10,49662	41,72901
5407	-0,01781	-0,02943	-10,75329	-16,73756
4000	-0,01862	-0,01399	-9,88384	-17,26228
2703	-0,01959	-0,04789	-9,37539	-1,33881
1200	-0,04161	-0,04111	-2,51127	2,54837
650	-0,05356	-0,03582	-1,96632	0,17315
520	-0,07257	-0,03482	-0,61173	5,17969
325	-0,01074	-0,05655	-7,21863	4,99532

Összegezve a modellezett adatsorokon végrehajtott hibaelemzést, megállapítható, hogy az enzimkinetikai adatsorokból történő kinetikai paraméterek becslése az általunk elvégzett mindkét eljárás esetében egyszerű szoftveres környezetben (pl. Microsoft Office Excel) megvalósíthatók. Ugyanakkor a becslés jóságát jelentősen és eltérő módon befolyásolja a „mérési-modellezési” adatsorokra szuperponált zajhatás, relatív szórással. A Lineweaver–Burk-féle I/V vs. I/S becslés esetén a deriválás felerősíti a zaj hatását, aminek következtében a paraméterek szórásértékei jelentősen megnövekednek. Továbbá, a modellszámítás esetén alkalmazott $\Delta t = 2\text{h}$ differenciálási lépés rendkívül le-

rontotta a becslés jóságát, ezért a Δt érték megválasztása különös körültekintést igényel. Különösen nehézkesé, vagy értékelhetetlenné válik az adatsor az alkalmazott zaj „véletlenszerű” definíciója végett, ami a differenciálhányados képzésekor az adatsorban extrém kiugró értékek formájában jelenik meg. A kiindulási paraméterek (E_0 , S_0) helyes optimalizálása azért is fontos, mivel az eljárás alkalmazhatóságát, pontosságát befolyásolja a rendelkezésünkre álló adatmennyiség.

Ezzel szemben a többváltozós lineáris becslési eljárás jóval pontosabb predikciót szolgáltatott, amelynek magyarázata, hogy az kompenzálja a zaj hatását, illetve az adat-előkészítés során mellőzi a differenciálhányados értékeinek származtatását. Bár itt is igaz, és a módszer hátrányaként említhető, hogy az adatsor mérete befolyásolja a becslés jóságát. Azonban összehasonlítva az előbbi módszerrel az adatok szórásértékei határozottan kisebbek, valamint a deriválásból illetve zajdefinícióból fakadó kiugró értékek sem rontják a becslés pontosságát.

A Lineweaver–Burk-féle becslés esetén tapasztalt hátrányok természetesen a modern számítógépes elemző szoftverek használatával már kiküszöbölhetők (SEVELLA 2012; HEGYI et al., 2013) és ennek érdekében a legtöbb program nemlineáris regressziót alkalmazva becsli a paramétereket (MOTULSKY & CHRISTOPOULOS, 2004; BEVC et al., 2011), amely természetesen már jóval megbízhatóbb eredményeket szolgáltat. Ugyanakkor a legtöbb ilyen számítási módszer sajátossága, hogy igényli egy kezdeti K_M és v_{max} paraméter megadását a becslés első lépéseként. Abban az esetben, amikor ez irányú empirikus ismereteink korlátozottak, a módszer által kapott lehetséges lokális eredmények közül problematikus lehet helyes paraméterek kiválasztása. Az általam kidolgozott eljárással tehát ez a hibaforrás kiküszöbölhetővé válik.

6.1.3 Inhibíció érzékelése kinetikai paraméterek megváltozásán keresztül

Az 5.2.1 fejezetben ismertetett becslési eljárásokkal, illetve a kinetikai paraméterek megváltozásából, az enzimek működését befolyásoló gátlási hatások létezésére valamint hiányára lehet következtetni. A referenciának tekintett, aktiválási hatástól mentes adatsorokból számított paraméterekhez viszonyíthatjuk a feltételezett, módosító hatás alatti kinetikai paramétereink értékét. A kísérleti eredményekből feltételezett, toluol által indukált inhibíciós hatást építettem be a benzaldehid lebontási algoritmus modelljébe, amely annak időbeli koncentrációcsökkentését gátolja, lassítja. A módosított modellegyenlet az alábbiakban látható:

$$\frac{d[S^B]}{dt} = -v_{max}^B \cdot \frac{[S^B]}{K_M^B \cdot \left(1 + \frac{[S^T]}{K_I}\right) + [S^B]}, \quad (24)$$

ahol, B és T indexek a benzaldehid, illetve a toluol modellszubsztrátok kiindulási paramétereit jelöli, míg K_i a kompetitív inhibíciós faktorként definiált. Szükséges hangsúlyozni, hogy a (24) összefüggés esetén kapott kinetikai paraméterek megváltozása nem a klasszikus kompetitív inhibíció szerint fog történni, mivel a komponensek között az időben változó koncentráció miatt, keresztinhibíciós hatás definiált. Ennek az a következménye, hogy a $-1/v_{max}$ paraméter a gátlóhatás miatt megváltozik, csökkenni fog. Így becslésének pontosságát is befolyásolja az inhibícióval terhelt adatsorok esetén.

Amennyiben kompetitív inhibíciós hatást kívánunk modellezni – amikor a $-1/v_{max}$ értéke állandó marad, illetve a $-(K_M/v_{max})$ értéke növekedni fog – az inhibitor értékét konstansként kell rögzíteni. Ha az inhibíciós hatás szimulációs céljának azt tekintjük, hogy a biokatalitikus kármentesítések esetén lejátszódó enzim-szubsztrát kölcsönhatások (gátlási, aktiválási hatások) működéséről a legrealisztikusabb képet kapjuk, akkor a komponensek időbeni változását is figyelembe kell venni. Ugyanakkor a gyakorlatban tapasztalt extrém magas, vagy gyakorta állandónak tekinthető szennyeződéskoncentrációk, illetve egyes fizikai-kémiai paraméterek (pH, ionerősség) esetén indokolt lehet a modellben állandó inhibitor koncentráció (S^T) szerepeltetése. A paraméterek megváltozásán alapuló inhibíció érzékelés esetén felértékelődik a becslés pontossága, illetve az adatok szórásértékeinek lehetséges minimalizálása. A 9.a. és 9.b. alábbi táblázatok az inhibíciómentes, illetve azzal terhelt adatsorokból történő $-1/v_{max}$ és $-(K_M/v_{max})$ paraméterbecslés szórásértékeit mutatja be.

9.a. táblázat. $-1/v_{max}$ paraméterek szórásértékei a kétféle becslési eljárás különböző kiindulási koncentráció és zajmentes inhibíciómentes és inhibícióval terhelt adatsorai esetén

0 % zaj	Többváltozós lineáris becslés		Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	
	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor
Koncentráció (μM)	$(-1)/v_{max}$ szórásértékek		$(-1)/v_{max}$ szórásértékek	
11400	4,399E-09	5,630E-10	2,425E-07	2,979E-07
10000	2,362E-09	5,560E-11	4,269E-07	4,916E-07
8500	3,115E-09	8,338E-10	9,018E-07	9,336E-07
6500	1,977E-09	1,163E-09	3,672E-06	2,781E-06
5407	2,044E-09	1,092E-09	1,020E-05	5,696E-06
4000	1,511E-09	1,794E-09	3,226E-05	1,387E-05
2703	1,721E-09	5,080E-10	4,951E-05	2,247E-05
1200	2,865E-09	3,006E-09	1,180E-04	2,165E-05
650	4,891E-09	1,455E-08	1,750E-03	9,318E-05
520	1,180E-08	1,767E-08	4,342E-03	6,284E-05
325	1,645E-08	7,618E-08	1,997E-02	1,810E-04

9.b. táblázat. $-K_M/v_{max}$ paraméterek szórásértékei a kétféle becslési eljárás különböző kiindulási koncentráció és zajmentes inhibíciómentes és inhibícióval terhelt adatsorai esetén

0 % zaj	Többváltozós lineáris becslés		Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	
	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor
Koncentráció (μM)	$-K_M/v_{max}$ szórásértékek		$-K_M/v_{max}$ szórásértékek	
11400	3,49320E-05	4,54790E-06	1,85613E-03	2,32709E-03
10000	1,54362E-05	3,72548E-07	2,64067E-03	3,13621E-03
8500	1,56742E-05	4,36666E-06	4,13248E-03	4,51559E-03
6500	6,02831E-06	3,88916E-06	8,73200E-03	7,75052E-03
5407	4,14644E-06	2,60179E-06	1,22669E-02	9,81630E-03
4000	1,49441E-06	2,38847E-06	7,29033E-03	8,80303E-03
2703	7,59875E-07	3,33067E-07	1,18301E-03	3,79113E-03
1200	7,94791E-07	5,97240E-07	1,25855E-04	3,47243E-04
650	5,88609E-07	1,35367E-06	4,34080E-04	1,85959E-05
520	1,03757E-06	1,26854E-06	7,05574E-04	1,78630E-05
325	9,67519E-07	3,23199E-06	1,50295E-03	1,00163E-04

Az eredményekből megállapítható, hogy az inhibíció hatása sem a többváltozós lineáris és sem a Lineweaver–Burk-féle becslési eljárás esetén nem befolyásolja annak pontosságát, annak ellenére, hogy a kinetikai görbék meredekségét erőteljesen módosítja. Azonban a két eljárás szórásértékei tekintetében jelentkező különbségek az előző fejezetben leírtakhoz hasonlóan itt is világosan kirajzolódnak, vagyis aktivitás módosító hatástól függetlenül a deriválást is magába foglaló becslés pontossága legalább két nagyságrenddel kisebb lesz a többváltozós becsléséhez viszonyítva (9.a és 9.b táblázat). Ennek a megállapításnak az inhibíció érzékelés szempontjából akkor lesz – a gyakorlat-

ban is – jelentős szerepe, amikor zajjal terhelt adatsorokból történik a kinetikai paraméterek becslése. A becslés jósága már viszonylag alacsony zajhatás esetén lecsökkenhet, ami a szórásértékek jelentős növekedéséhez vezethet (10.a. és 10.b. táblázat).

10.a. táblázat. $-1/v_{max}$ paraméterek szórásértékei a kétféle becslési eljárás különböző kiindulási koncentráció és 3%-os zajhatás inhibíciómentes és inhibícióval terhelt adatsorai esetén

3 % Zaj	Többváltozós lineáris becslés		Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	
	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor
Koncentráció (μM)	$(-1)/v_{max}$ szórásértékek		$(-1)/v_{max}$ szórásértékek	
11400	9,10351E-04	1,03020E-03	8,68176E-02	2,58805E-01
10000	6,44267E-04	1,10573E-04	4,12786E-02	4,20543E-02
8500	3,99471E-04	5,01489E-04	3,01702E-02	1,11338E-01
6500	2,06095E-04	2,88906E-04	1,31756E-02	1,28212E-02
5407	1,46591E-04	1,87853E-04	6,19593E-03	6,36178E-03
4000	2,32122E-04	2,14366E-04	3,02158E+00	1,66728E-01
2703	3,54595E-04	3,66838E-04	3,98218E-02	3,88838E-02
1200	1,89719E-03	1,69923E-03	1,64743E+00	1,29805E-01
650	1,12509E-03	5,48152E-03	1,94697E-01	1,32318E+00
520	2,57480E-03	8,28533E-03	6,42471E+00	7,45102E-01
325	3,03978E-03	1,01379E-02	8,27251E-01	5,87281E+00

10.b. táblázat. $-K_M/v_{max}$ paraméterek szórásértékei a kétféle becslési eljárás különböző kiindulási koncentráció és zajmentes inhibíciómentes és inhibícióval terhelt adatsorai esetén

3 % Zaj	Többváltozós lineáris becslés		Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	
	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor	Inhibíciómentes adatsor	Inhibíciós adatsor
Koncentráció (μM)	$-K_M/v_{max}$ szórásértékek		$-K_M/v_{max}$ szórásértékek	
11400	7,22220E+00	8,30229E+00	6,64069E+02	2,01608E+03
10000	4,20731E+00	7,40613E-01	2,54768E+02	2,65592E+02
8500	2,01682E+00	2,61761E+00	1,38519E+02	5,36618E+02
6500	6,27344E-01	9,69966E-01	3,49443E+01	3,58613E+01
5407	2,99346E-01	4,46779E-01	7,55938E+00	1,09089E+01
4000	2,30178E-01	2,85322E-01	7,05301E+02	1,06683E+02
2703	2,10006E-01	2,37260E-01	1,86392E-01	6,37795E+00
1200	3,01810E-01	3,43432E-01	3,44411E+00	2,16936E+00
650	1,34551E-01	4,90900E-01	2,32285E+00	2,98773E+00
520	2,09339E-01	5,50676E-01	1,66250E+01	4,21054E-01
325	1,77635E-01	4,13948E-01	4,60423E+00	5,85178E+00

A két eljárás becslési pontosságára, a 11.a. és 11.b. táblázatban szereplő adatokra vonatkozóan, a zajmentes becslés esetén tapasztalt megállapítások szintén érvényesek. Azonban fontos kihangsúlyozni, hogy már 3%-os zajterhelésnél a Lineweaver–Burk becslés pontatlansága olyan mértékű lesz, hogy ezzel az eljárással a paraméterek

megváltozásából nem tudunk megbízhatóan az inhibíció jelenlétére következtetni. Ezzel szemben a többváltozós lineáris becslésnél, annak ellenére, hogy a zajhatására torzul a paraméterbecslés, mégis a kinetikai paraméterek pontosabb becslését teszi lehetővé. Ezt szemlélteti az alábbi adatsor, amely az inhibícióval terhelt adatsorokból a két különböző modellel becsült $-1/v_{max}$ és $-K_M/v_{max}$ paramétereket tartalmazza. Az adatokból a kompetitív inhibíciónak törvényszerűségei is felismerhetők, miszerint a maximális reakciósebesség értéke állandó marad, amíg az inhibíció mértékével arányosan a Michaelis konstans értéke növekedik.

11.a. táblázat. Kinetikai paraméterek becsült értékei különböző kiindulási koncentráció esetén, zajmentes inhibícióval terhelt adatsorok esetén. A számított paraméter értékek a kiindulási értékekből: $-1/v_{max} = -0,01761245$; $-K_M/v_{max} = -11,448$

0 % zaj	Többváltozós lineáris becslés		Lineveawer-Burk féle regressziós becslés	
Koncentráció (μM)	$-1/v_{max}$ értékek	$-K_M/v_{max}$ értékek	$-1/v_{max}$ értékek	$-K_M/v_{max}$ értékek
11400	-0,017612454	-17,41639459	-0,017599458	-17,63549051
10000	-0,017612456	-17,41636943	-0,017593917	-17,67697782
8500	-0,017612448	-17,41643869	-0,017582959	-17,74311042
6500	-0,017612473	-17,41632022	-0,017545283	-17,90110793
5407	-0,017612473	-17,41632192	-0,017492861	-18,04703867
4000	-0,017612454	-17,41636514	-0,017347895	-18,27493221
2703	-0,017612451	-17,41637123	-0,017144917	-18,39746949
1200	-0,017612455	-17,41636971	-0,016853633	-18,43365374
650	-0,01761244	-17,41637245	-0,016752783	-18,43510104
520	-0,017612454	-17,41637011	-0,016717085	-18,43538322
325	-0,017612437	-17,41637159	-0,016696046	-18,43536685

11.b. táblázat. Kinetikai paraméterek becsült értékei különböző kiindulási koncentráció esetén, 3 %-os zajhatással inhibícióval terhelt adatsorok esetén. A számított paraméter értékek a kiindulási értékekből: $-1/v_{max} = -0,01761245$; $-K_M/v_{max} = -11,448$

3 % zaj	Többváltozós lineáris becslés		Lineveawer-Burk féle regressziós becslés	
Koncentráció (μM)	$(-1)/v_{max}$ értékek	$-K_M/v_{max}$ értékek	$(-1)/v_{max}$ értékek	$-K_M/v_{max}$ értékek
11400	-0,01733739	-19,30679706	0,06697776	-325,01182324
10000	-0,01779564	-16,17943902	0,06475610	-308,38815526
8500	-0,01838175	-12,62589773	-0,05018729	194,99624709
6500	-0,01714658	-19,10367440	0,03669941	-15,39878055
5407	-0,01776703	-16,90250727	0,02086316	27,35136330
4000	-0,01759386	-17,37589723	-0,08448987	80,89884421
2703	-0,01847747	-16,64002348	0,06698316	-3,91215312
1200	-0,01680526	-17,81758802	0,18451537	-6,95817586
650	-0,02927882	-15,77006154	0,37662634	-2,25956548
520	-0,04559813	-14,40030815	0,25724709	0,95702675
325	-0,04301993	-15,83137468	5,98507303	-1,70502696

6.1.4 Inhibíció érzékelése a variációs koefficiens (CV %) vizsgálatával

A biokatalitikus modellezés adatsorainak információtartalma alternatív értékelésekkel is felszínre hozható. Az enzimaktivitást módosító hatások indikálására egy ilyen egyszerű eljárás lehet – amikor a nyers adatsorunk ($S(t)$) átlag- és szórásértékein keresztül származtatott – variációs koefficiens (CV) használjuk fel. A CV, mint dimenzió nélküli statisztikai mutató, az átlagértékkel súlyozza a szórásértékeket, így a különböző mérési skálán végrehajtott mérések szórásértékei összehasonlíthatók lesznek. Számításának képlete:

$$CV (\%) = \frac{SD}{\bar{X}} \times 100. \quad (25)$$

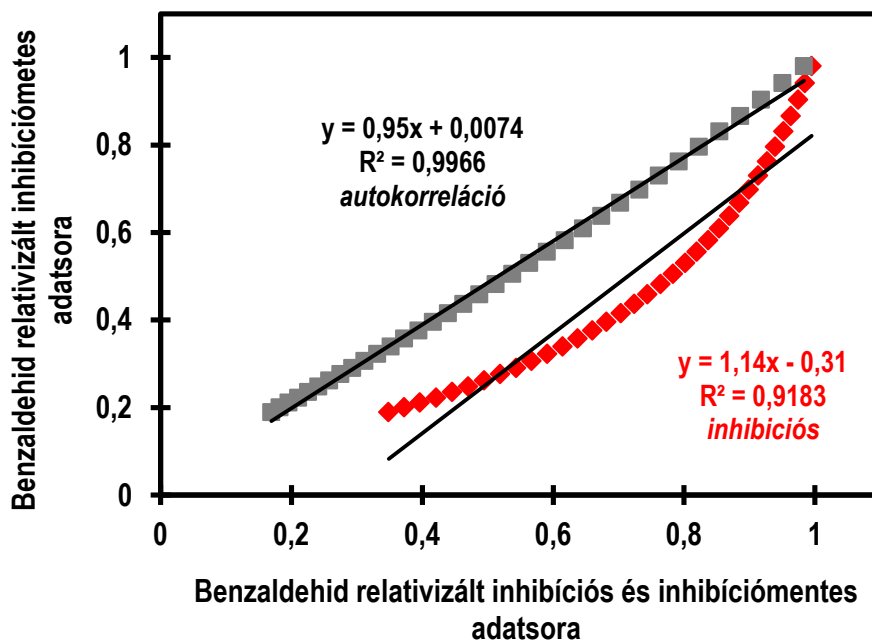
Az adatsorokból képzett variációs koefficiens alkalmazására az ad lehetőséget, hogy a lebontási görbe meredekségét a gátlóhatás, a referenciának (inhibíciós hatástól mentes) tekintett görbéhez viszonyítva módosítja, megváltoztatja. Ez a módosulás az adatsor átlag- és szórásértékeinek megváltozásában is tapasztalható. A gátlóhatás eredményeként az átlag növekszik, míg a hozzá tartozó szórás csökken, aminek eredményeként a variációs koefficiens értéke szintén csökkenni fog a vizsgált adatsoron. Ezeket a megállapításokat erősíti meg az 12. táblázat adatai is.

12. táblázat. *A variációs koefficiens értékének változása inhibíciós hatással, illetve attól mentes adatsorok esetén különböző kiindulási koncentráció tartományokban. INHM & ZAJM = inhibíció- és zajmentes adatsorok; INH & ZAJM = inhibíciós és zajmentes adatsorok*

Kiindulási szubsztrát koncentráció tartományok (µM)											
CV (%)	11400	10000	8500	6500	5407	4000	2703	1200	650	520	325
INHM & ZAJM	22,67	26,74	32,96	46,76	58,78	80,08	105,75	148,65	171,67	178,10	188,69
INH & ZAJM	19,01	22,82	25,43	32,57	49,72	47,12	94,80	73,94	128,94	139,87	159,69

6.1.5 Inhibíció és aktiválás érzékelése a kinetikai adatsorok korreláltatásával

A biokatalitikus reakciókban résztvevő szubsztrát komponensek kinetikai adatsorainak korreláltatásával inhibíciós vagy aktiválási hatások jelenlétére következtethetünk. Ha egy szubsztrát vagy a kísérletek esetében is alkalmazott szennyező anyag azonos körülmények, pl. inhibíciómentes lebontás melletti adatsorait korreláltatjuk (*autokorreláció*), akkor szükségeszerű, hogy a regresszió határozottsági foka (R^2) igen magas értékkel rendelkezzen.



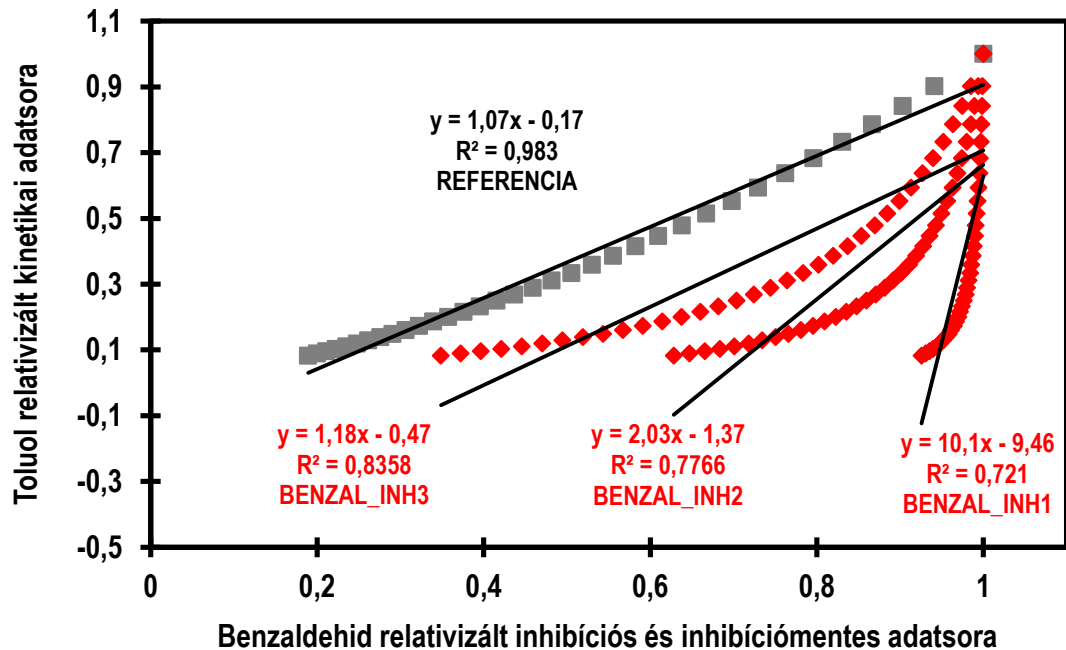
18. ábra. Modell szubsztrát (benzaldehyd) relativizált adatsorainak korreláltatása

A 18. ábrán, az autokorrelációs regresszió egyenes meredeksége és tengelymetszete eltér az autokorreláció 1-es és zérus elméleti értékeitől. Az eltérésnek az az oka, hogy a modell adatsorokra szuperponáltotott véletlen zajhatás mindig újra előállított. A modell „autokorrelációs” adatsor „erős” korrelációs kapcsolatát szemlélteti a 18. ábra. Az alkalmazott inhibíció hatására a modell komponens lebontási sebessége csökken, a kinetikai görbéje módosul. Az inhibíciós kinetikai adatsor meredeksége az inhibíciómentes adatsorétól eltérő lesz. A monotonitásmértékének változását, az adatsorok korreláltatásával érzékeltetni lehetséges. Korreláltatva a benzaldehyd inhibíciómentes és inhibíciót magában foglaló kinetikai adatsorát egymással, azt tapasztaljuk az autokorrelációs (referencia) regressziós egyeneshez képest, hogy a kapott paraméterek megváltoznak, a meredekség növekszik, míg a tengelymetszet és a regresszió határozottsági foka csökkeni fog (lásd 18. ábra inhibíciós adatsor).

Különböző szubsztrátok adatsorainak regresszióiban is leképződik az enzimaktivitás módosulása. Az előző gondolatmenetet két különböző szubsztrát adatsor korrelációjára kiterjesztve az értékelés alapját itt is az képezi, hogy referenciának az inhibíciós és aktiválási hatásoktól mentes adatsorok regresszióját tekintjük és ehhez viszonyítjuk az inhibíciónak vagy az aktiválásnak a regressziós paramétereket módosító hatásait.

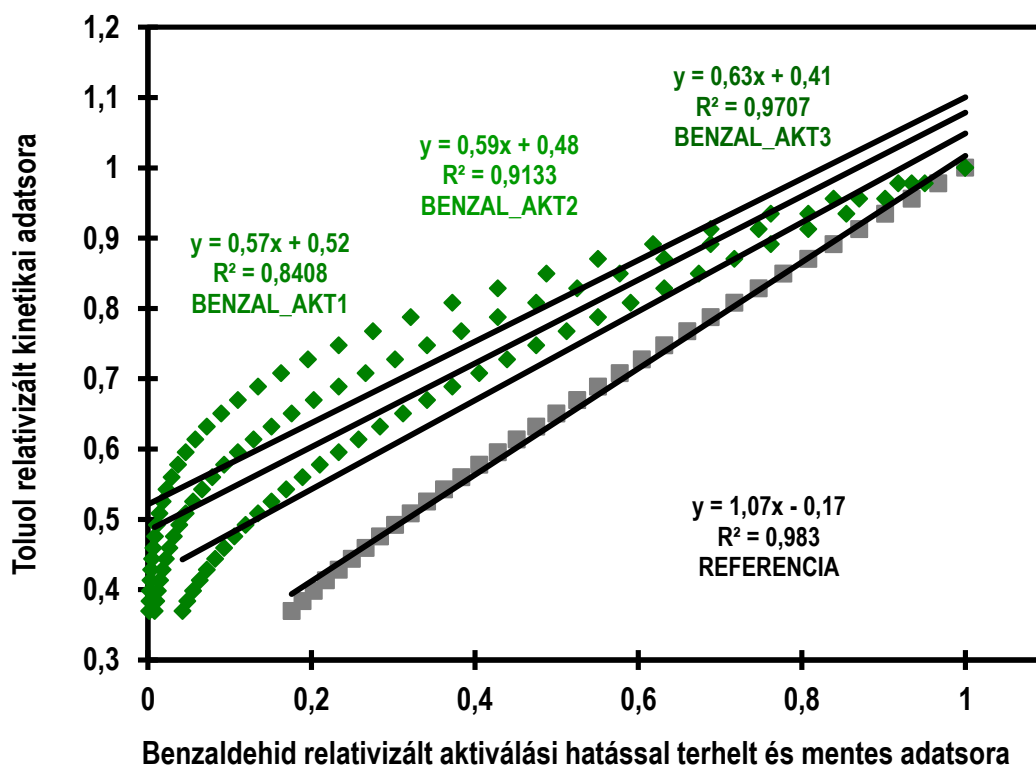
A modellben megjelenő kompetitív inhibíciónak az érzékeléséhez tehát, referenciaként képezni kell a benzaldehyd és toluol aktivitás módosító hatástól mentes, illetve azzal terhelt adatsorainak lineáris regresszióját. A 19. ábrán látható, hogy az alkalma-

zott inhibíció szerepe szembevetendő a regressziós paraméterek változtatásában. A gátlóhatásnak a növekvő mértéke összhangban van a regressziós egyenesek meredekségének a növekedésével, illetve a tengelymetszet csökkenésével. A különböző inhibíciómértékkel terhelt regressziós egyenesek kovariancia analízissel szignifikánsan megkülönböztethetők egymástól (lásd 11.7 melléklet).



19. ábra. Különböző erősségű inhibíciós hatás indikálása a szubsztrátok relativizált adatsoraik korrelálásával

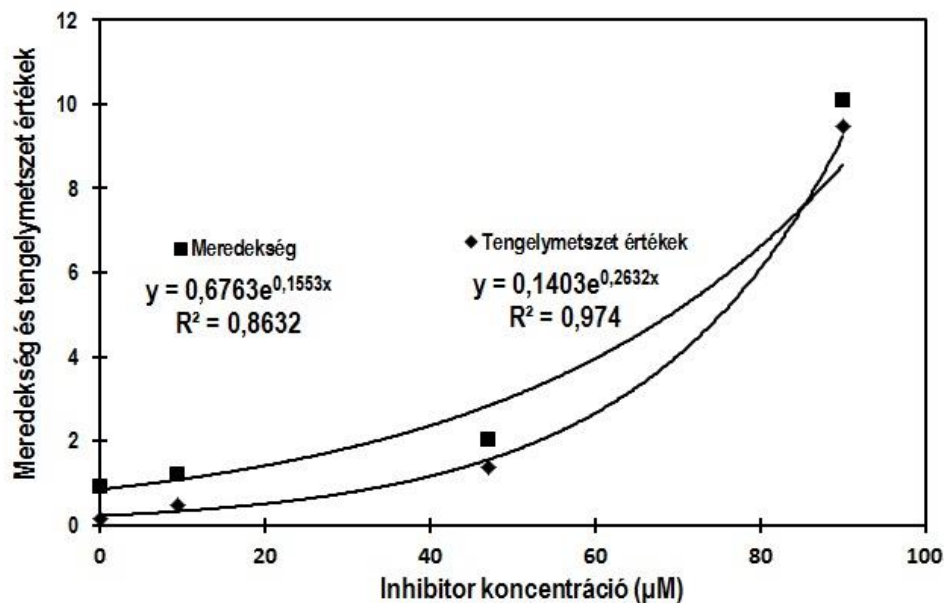
Az alkalmazás kiterjeszhető az aktiválási hatások érzékelésére is. Ha egy aktivátor komponens következtében a lebontási reakció nagyobb sebességgel megy végbe, akkor a fentiekhez hasonló módon, de ellentétes irányban módosul a kinetikai görbe alakja. Az algoritmusban ezt a hatást a v_{max} paraméter növelésével modelleztem. A regressziós egyenes paraméterei az inhibíciós esethez képest ellenkező irányba módosulnak. Aktiválás esetén a meredekség csökken, a tengelymetszet pedig növekedik (20. ábra).



20. ábra. Különböző erősségű aktiválási hatás indikálása a szubsztrátok relativizált adatsorainak korreláltatásával

6.1.6 Enzimaktivitást módosító hatás mértékének származtatása

Az inhibíciós és aktiválási adatsorok korreláltatásakor kapott lineáris regressziós paraméterek további értékelési lehetőségeket kínálnak. Amennyiben az enzimaktivitás változásáért a szennyezett közeg egy konkrét komponense (szennző anyag) a felelős és ennek a komponensnek a koncentráció változását kellő pontossággal és megbízhatósággal mérni tudjuk, ebben az esetben a módosító hatás mértékének, erősségének becslése is lehetséges. A tengelymetszet, illetve meredekség paraméterek, illetve a befolyásoló komponensek koncentrációi abszolút értékeit egymással korreláltatva és a pontokra exponenciális görbét illesztve vizualizálhatóvá tehetjük az inhibíciós hatást. A görbe egyenletét felhasználva empirikus megállapításokat tehetünk a cél szennyezőanyag lebontásának gátlásáról/aktiválásáról. A megállapításnak a kármentesítési beavatkozások gyakorlati alkalmazása során lehet fontos jelentősége, mivel ezen ismeretek birtokában az egyes folyamatok időigénye megbecsülhetővé, hatékonyságuk tervezhetővé válnak. A biodegradációs modell esetén alkalmazott különböző toluol, – mint inhibitor – koncentrációk felhasználásával mutatja be a 21. ábra a korelálatott adatpontokra illesztett exponenciális görbéket.



21. ábra. Inhibitor koncentrációk és a regressziós paraméterek közötti kapcsolat exponenciális függvényel közelítve

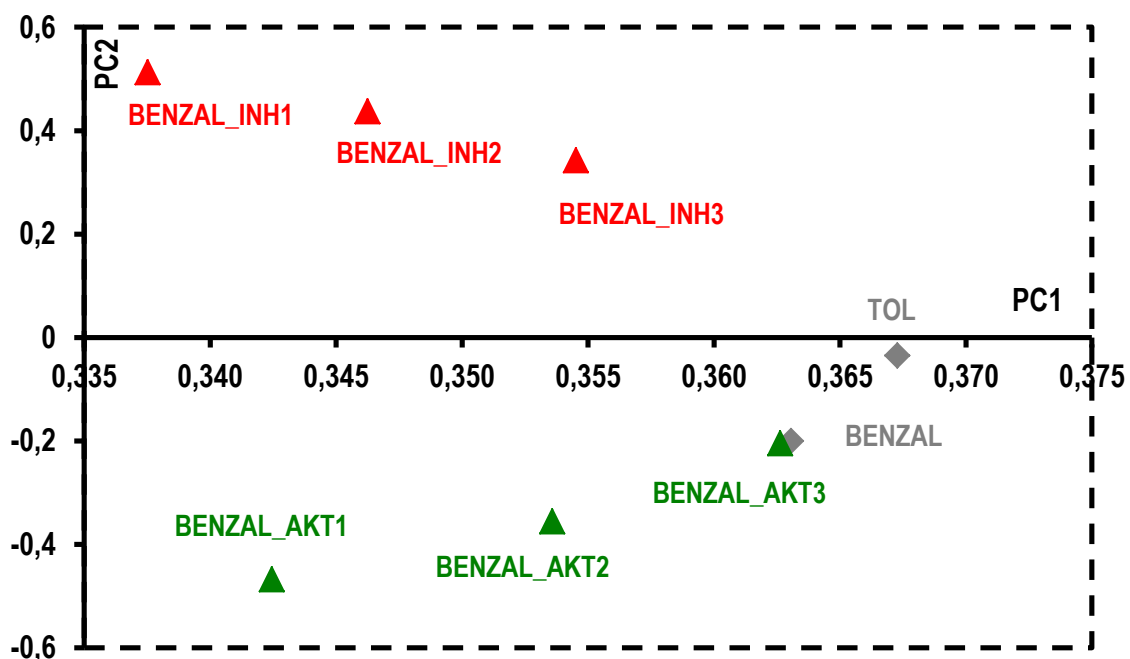
6.1.7 Inhibíció és aktiválás érzékelése a kinetikai adatsorok főkomponens-elemzésével

A főkomponens-elemzés modell adatainak egyik objektummátrixa (**D**) a 13. táblázatban látható. A PCA alkalmazása lehetőséget teremt arra, hogy a kinetikai görbékhez tartozó szubsztrát pontokat a „loading plot” ábrák vizualizálják.

13. táblázat. Modell komponensek referencia és inhibíciós adatsorainak elrendezése PCA objektummátrixban

	TOLUOL	BENZALDEHID	BENZAL_INH3	BENZAL_INH2	BENZAL_INH1
1	1	1	1	1	1
2	0,94117	0,90234	0,98494	0,99381	0,99911
3	0,90333	0,84183	0,97465	0,98919	0,99844
...
33	0,21109	0,09586	0,39661	0,66577	0,93566
34	0,19993	0,08892	0,37234	0,64707	0,93091
35	0,18926	0,08221	0,34869	0,62829	0,92586

A PCA felbontás eredményeként kapott „loading” mátrixokból, az első két főkomponens terében ábrázolt modell komponensek pontjaink elhelyezkedése leképezi a kinetikai görbék alakjait, monotonitásbeli változásának sajátosságait. Közös „loading plot”-on ábrázolva az inhibíciós és aktiválási modell komponensek pontjait, azok elhelyezkedéséből néhány törvényszerűség körvonalazódik.



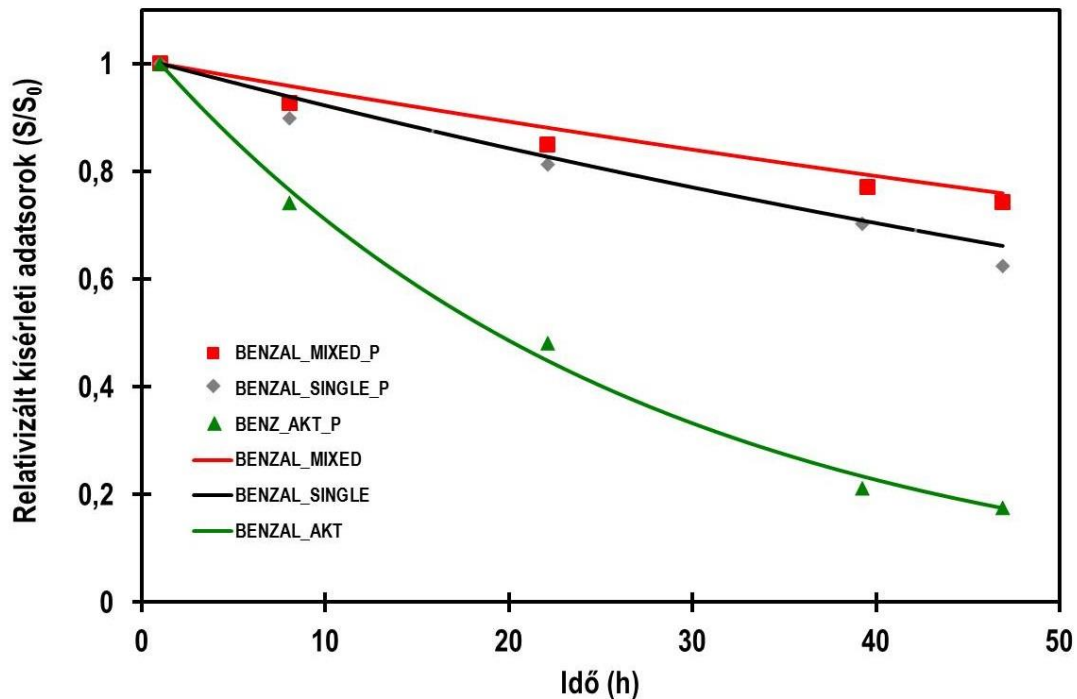
22. ábra. Modell szubsztrátok elhelyezkedése inhibíció és aktiválási hatás eredményeképpen az első kettő főkomponens-együttható síkjában ábrázolva

A modellben alkalmazott különböző erősségű inhibíciós- és aktiválási hatások alatti szubsztrátok pontjai jól elkülöníthető a referenciának tekinthető, módosító hatástól mentes „BENZAL” ponttól. Az inhibíciós hatással terhelt szubsztrát pontok (BENZAL_INH1-3) az első, míg az aktiválási hatással módosított pontok (BENZAL_AKT1-3) a negyedik térszékben helyezkednek el. A referencia ponthoz viszonyított távolságuk az ellentétes irányban, az aktivitásmódosító hatás erősségével arányosan nő. A pontok elkülönülése sokkal inkább a második főkomponens együttható esetében jelentkezik, míg a pontok elhelyezkedéséhez való hozzájárulása az első főkomponens-együtthatónak jóval diszkrétebb (lásd 22. ábra).

6.2 Biokatalitikus szennyező anyag lebontás laborkísérletei és eredményei

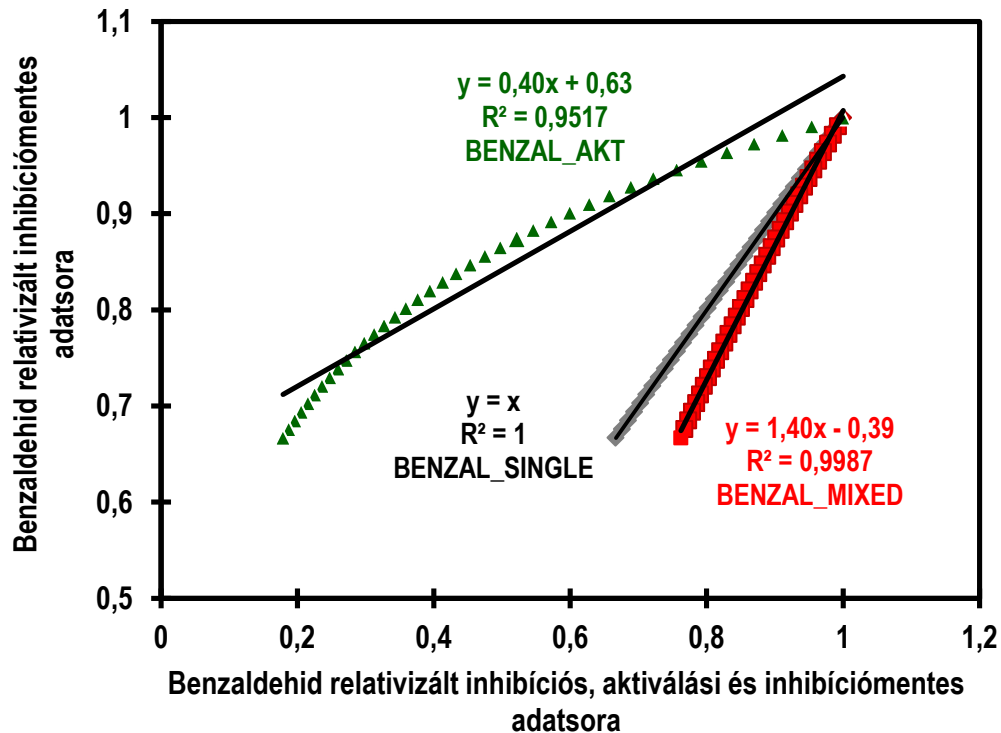
Földigiliszta extraktummal végzett biokatalitikus lebontási kísérleteink során szignifikáns koncentrációcsökkenést nem minden egyes szennyező komponens esetében tapasztaltam. Az extraktum csekély diklórometán, toluol és acetone bontóképességgel rendelkezett, azonban jelentős volt a koncentrációcsökkenés benzaldehid, ciklohexanol, és etilacetát esetében. A lehetséges inhibíciós vagy aktiválási hatások észlelése, kizárólag az utóbbi szennyezők esetén vált lehetségessé. A GC-MS elválasztások jelentős időigénye miatt, viszonylag korlátozott számú primér kinetikai adat (mintavételi pont) volt tervezhető, illetve elérhető. Ezért az értékelési eljárásokhoz szükséges adatmennyiséget, az egyes szennyezők primér kinetikai mérési pontjaira exponenciális görbét illesztve és

az illesztett függvényt felhasználva „kvázi mérési” adatok szolgáltatják az értékelések kinetikai adatsorait. A további regressziós és főkomponens elemzéshez, a benzaldehid különböző lebontási feltételek mellett végrehajtott kísérleteit választottam ki az értékelés gondolatmenetének szemléltetéséhez. A giliszta extraktummal végzett benzaldehid kísérletek eredményei a 23. ábrán látható.



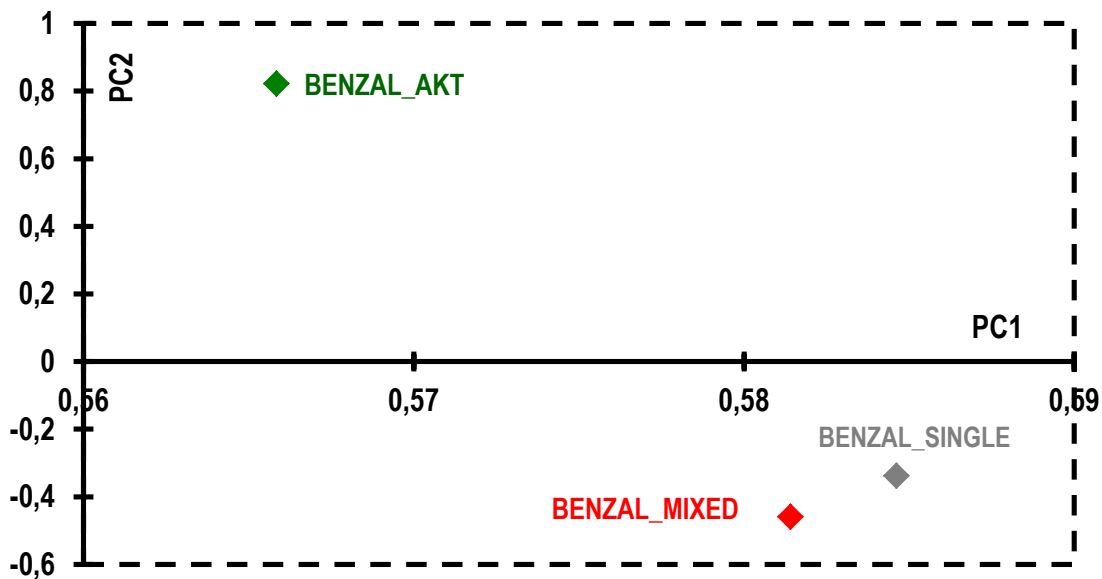
23. ábra. Giliszta extraktummal végzett benzaldehid biokatalitikus lebontása. Az egyes pontok az ábrán a relativizált kísérleti koncentráció adatokat jelöli, míg a vonalak pontokra illesztett exponenciális függvényvel nyert „kvázi” mérési kinetikai adatsorokat jelöli.

A kísérletekben modellezendő inhibíciós és aktiválási hatásokhoz képeztem a szennyezők és egyéb komponensek keverékét, illetve vizsgáltam a benzaldehid lebomlását önálló szubsztrátként is. A feltételezett inhibíciós adatsort a továbbiakban „BENZAL_MIXED”, az aktiválását „BENZAL_AKT”, míg a mintában csak önmagában jelenlévő szennyezőnek az adatsorát „BENZAL_SINGLE” feliratok jelölik.



24. ábra. *Eltérő összetételű benzaldehyd minták gilisza extraktummal végzett kísérleti adatsorainak korreláltatása. A „BENZAL_MIXED” a vizsgált szennyezők keverékét, a „BENZ_AKT” benzaldehyd és KCl keverékét jelöli, míg a „BENZAL_SINGLE” esetében csak benzaldehyd szerepelt a mintában.*

A 24. ábrán mindhárom lebontási kinetikai adatsor ábrázolt. Az aktivitás módosító hatás nélküli adatsorának (*BENZAL_SINGLE*) autokorrelációját tekinthetjük referencia adatsornak, amelynek egységnyi meredekségéhez és zérus tengelymetszetéhez viszonyíthatjuk a regressziós paraméterek változását a többi görbe esetén. A reakcióközegbe kálium-kloridot juttatva, a benzaldehyd-koncentráció csökkenése egységnyi idő alatt gyorsabb volt (lásd 23. ábra), azaz az extraktum specifikus szennyező anyag lebontó képessége növekedett. Az így kapott adatsort a referenciával korreláltatva, a modellektől is tapasztalt regressziós paraméter változási trendet kapjuk. Ebből arra következtethetünk, hogy a K^+ ion aktiválja a benzaldehyd lebontását. Ezt a megállapítást alátámasztja Livingstone és Fewson (1972) munkája is, akik benzaldehyd dehidrogenáz (EC.: 1.2.1.28) aktivitásnövekedést tapasztaltak egyszeresen pozitív kationok – többek között K^+ ion – jelenléte mellett. Az is szembevetendő az ábrából, hogy ha a benzaldehyd mellett más komponensek is jelen voltak a mintában, az aldehid lebontási sebessége csökkent. Ennek megfelelően a regressziós egyenes meredeksége növekedett, tengelymetszete pedig csökkent, ami a modellezett adatok regressziós paraméterváltozási törvényszerűségeivel összhangban vannak.



25. ábra. Eltérő összetételű benzaldehid minták giliszta extraktummal végzett PCA elemzés „loading” plotja az első kettő főkomponens-együttható síkjában. A jelölések jelentéstartalma azonos a 17. ábrával

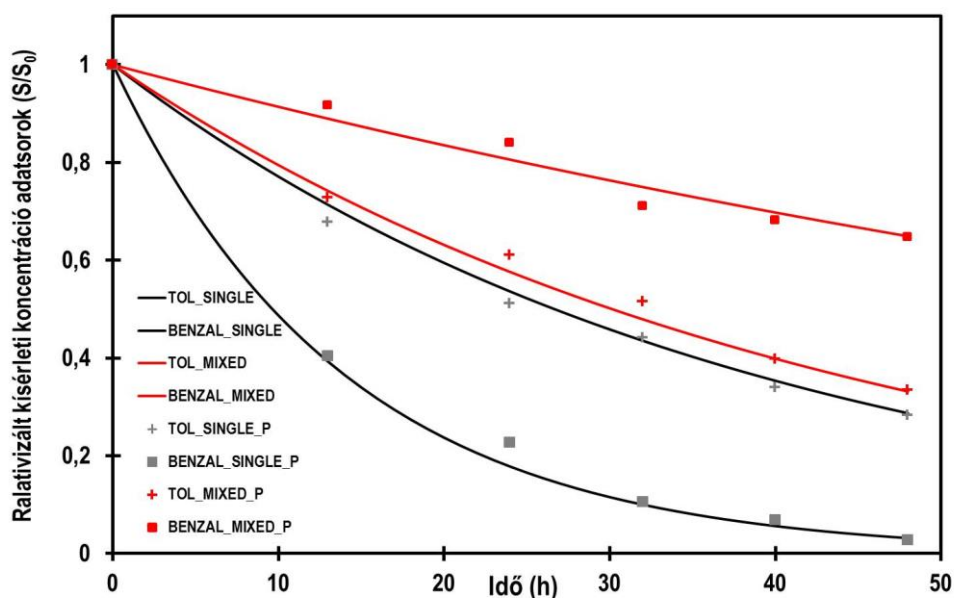
A modell adatokhoz hasonlóan a különböző „irányú” aktivitásmódosító hatás által befolyásolt szubsztrát pontok elhelyezkedése eltérő ténnyedbe, illetve egymáshoz és a referenciához viszonyított elhelyezkedésük elkülöníthető egymástól. A modell adatok PCA értékeléséhez hasonlóan a pontok PC2 tengelymentén való elmozdulása erőteljesebb, főleg az aktiválási hatás esetében, ami összhangba hozható a referencia kinetikai görbéhez viszonyított monotonitásmérték változással (25. ábra)

A giliszta-extraktummal végzett kísérletek eredményeiből közvetlenül nem volt lehetséges egyértelműen meghatározni, hogy a benzaldehid biológiai lebontásának gátlóhatása melyik reakció összetevő (szennyező komponens, adalékanyag) jelenlétének tudható be. Ezért németországi méréseim során az 5.3.2 fejezetben már ismertetett szénhidrogén származékok kármentesítésére kifejlesztett termékkel végezhettem további kísérleteket. Ezek a vizsgálatok lehetőséget teremtettek arra, hogy az eddig alkalmazott módszert további mérésekkel tesztelhessem. A gilisztakivonattal végzett vizsgálatok tapasztalatait felhasználva történtek a gázkromatográfiás elválasztások, melyek közül itt csak a módszer alkalmazási szempontjából releváns eredményeket mutatom be.

Számos szakirodalmi forrás beszámol a toluol biotoxicitásáról, illetve a mikroorganizmusok gyarapodására kifejtett gátló hatásról. (INOUE & HORIKOSHI 1989; DONALD et al., 1991; NAHAR et al., 2000). Wackett és munkatársai eredményei is visszaigazolják (WACKETT et al., 1988), hogy a toluol egyik lehetséges aerob lebontási köztes terméke a benzaldehid, ami a benzil-alkohol oxidációjából keletkezik és a már

említett dehidrogenáz enzim segítségével tovább oxidálódik benzosavvá. Ugyanakkor Altenschmidt és Fuchs (1992) denitrifikáló *Pseudomonas* törzsek segítségével, anaerob körülmények között is képes volt a toluolt előbb benzil-alkohol majd azt benzaldehydre bontani. Ferreira és munkatársai (2009) kimutatták, hogy a benzaldehyd oxidációs lépését alkohol oxidáz enzimek (pl. aryl-alkohol oxidáz EC.: 1.1.3.7) szintén képesek tovább katalizálni, hidrogén-peroxid keletkezése és a FAD koenzim regenerálódása mellett. Korábbi munkájukban (FERREIRA et al., 2005) ugyanezen enzim kompetitív inhibitoraként jellemzik a toluolt ($K_i = 0,75 \pm 0,05 \text{ mM}$).

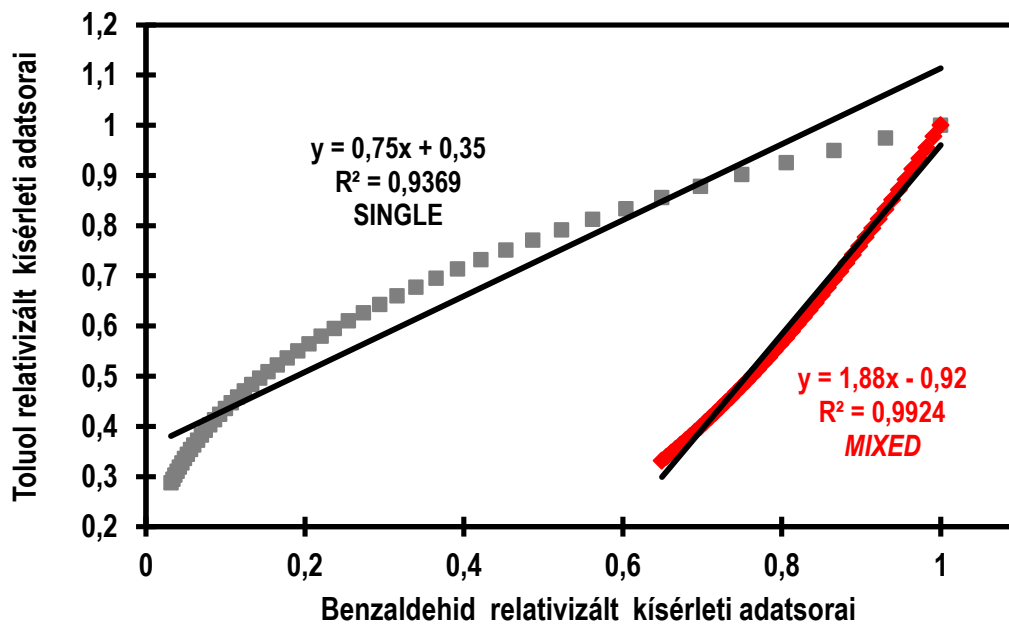
A biokatalitikus termékkel végzett szennyező anyag lebontási kísérletekből származó benzaldehyd és toluol kinetikai görbék – a már ismertetett exponenciális görbeillesztéssel – a 26. ábrán látható.



26. ábra. Biokatalitikus termékkel végzett benzaldehyd és toluol lebontási kísérletek. Az egyes pontok az ábrán a relativizált kísérleti koncentráció adatokat jelöli, míg a vonalak pontokra illesztett exponenciális függvénynek nyert „kvázi” mérési kinetikai adatsorokat jelöli. „SINGLE”: az adott komponens önmagában, „MIXED” a két komponens keverékékként történt a vizsgálat.

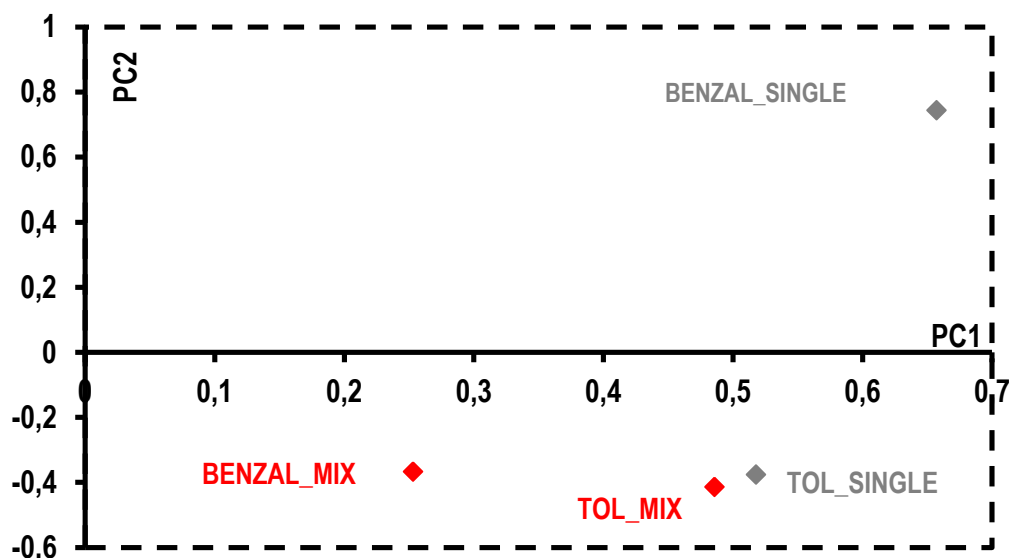
A benzaldehyd és toluol biokatalitikus lebontási sebessége ugyanazon körülmények között jelentősen eltérnek egymástól. A termékben lévő baktériumok aldehid lebontó képessége nagyobb volt, mint a toluol esetében. Mind a benzaldehyd dehidrogenáz és mind a toluol lebontásáért felelős enzimek (toluol mono- és dioxygenázok) az oxireduktázok csoportjába tartozik. A komponensek keverékének vizsgálatakor (MIXED) a benzaldehyd lebontási sebessége jelentősen csökken, ebből feltételezhető a két komponens biokatalitikus lebontása során az antagonisztikus kap-

csolat (HERKE et al., 2015) . Ezek a megállapítások megerősítik, hogy benzaldehid – toluol keverékek biokatalitikus vizsgálataiban során inhibíciós hatások jelentkezhetnek.



27. ábra. Benzaldehid és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti adatsorok egymással történő korreláltatása. „MIXED” a vizsgált szennyezők keverékének (toluol és benzaldehid), míg a „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzaldehid szerepelt a mintában.

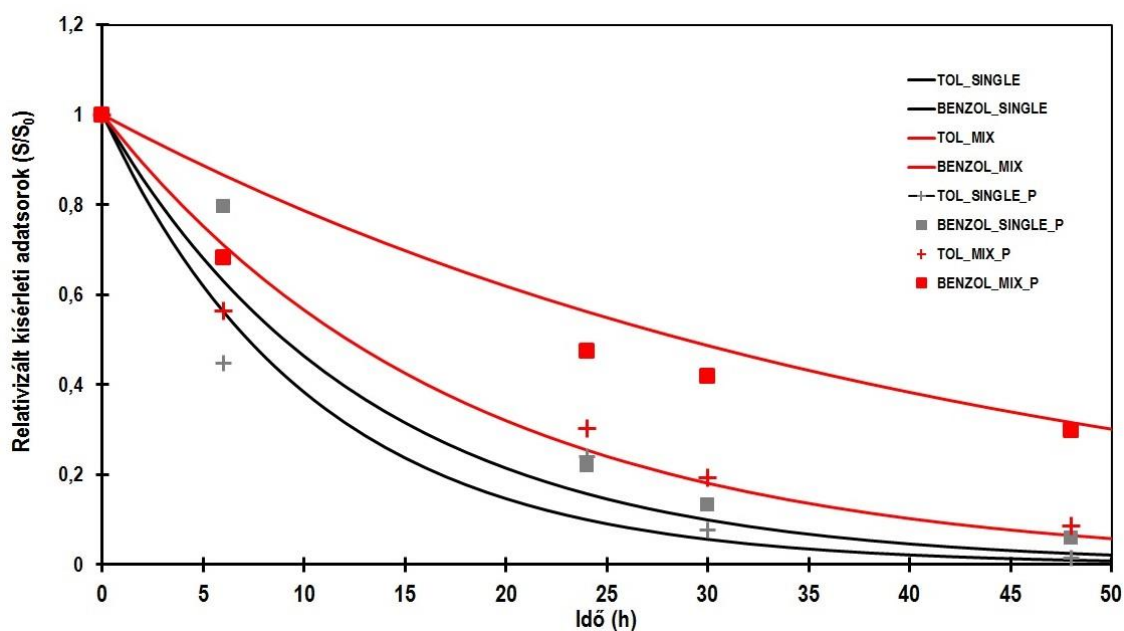
A 27. ábra a toluol és benzaldehid komponensek külön-külön, illetve keverékből származó adatsorok korreláltatását, illetve az egyenesekhez tartozó regressziós paramétereket mutatja be. Az eredmények a szakirodalmi megállapításokon túl a modell adatsorok esetén tapasztaltakkal is összhangban van. A toluol benzaldehid enzimatis lebontására kifejtett gátlóhatása érzékelhető a keverék adatsorok regressziós egyenesének meredekség növekedéséből, illetve a tengelymetszet csökkenéséből.



28. ábra. Benzaldehid és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti kinetikai görbének PCA elemzése „MIXED” a vizsgált szennyezők keverékének (toluol és benzaldehid), míg a „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzaldehid szerepelt a mintában.

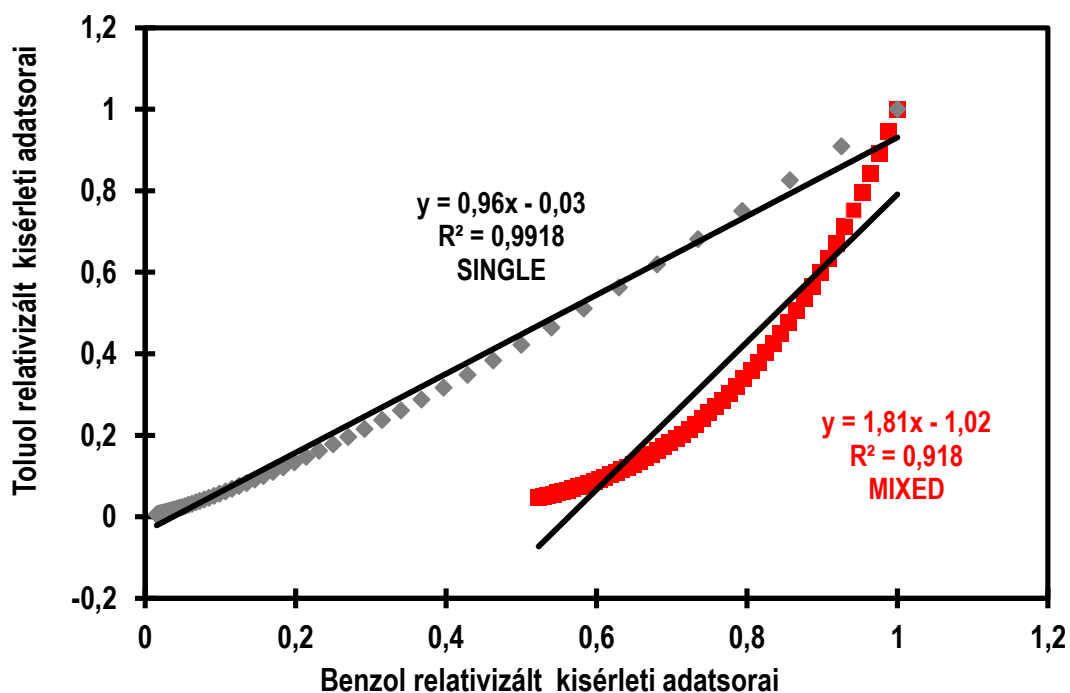
A PCA felbontás eredményeként kapott „loading plot” ábráján a benzaldehid önmagában (*BENZAL_SINGLE*) és toluollal képzett keverékének (*BENZAL_MIX*) biokatalitikus lebontási görbéit megjelenítő pontok egymáshoz viszonyított térbeli elkülönülése szembetűnő (28. ábra). Az inhibíció hatására a csökkenő monotonitásmértékű görbét megjelenítő pont a negyedik térnegyedben az origó irányába mozdul el. Ebben az esetben mind az első és mind a második főkomponens-együttható hozzájárulása a pont térbeli elhelyezkedéséhez számottevően csökken. A toluol esetében mind referencia és mind keverék elegyben tapasztalt közel azonos lebontási dinamikát jellemző pontok egymáshoz közel esnek, de egymáshoz viszonyított elhelyezkedésük megegyező a benzaldehidével.

Az értékelést további, a kármentesítések gyakori szennyezőivel is teszteltem. A BTEX szennyezők biodegradációját, illetve a komponensek közötti kölcsönhatásokat részletesen tanulmányozták. Számos publikáció született már ezen a téren. Egyes források a benzol lebontásának kompetitív inhibíciós gátlását írták le toluol jelenlétében (CHANG et al., 1993; REARDON et al., 2000; HAMED et al., 2003) míg, Oh és társai (1994) nem tisztán kompetitív gátlást tapasztaltak. A relativizált kísérleti kinetikai görbék a 29. ábrán láthatók. Mindkét komponens lebontási sebessége módosul, azonban a benzol degradáció csökkenése – a benzaldehidhez hasonlóan – jóval erőteljesebb mind a saját, mind az önmagában történő vizsgálatokor, a toluol lebontási sebességéhez képest.



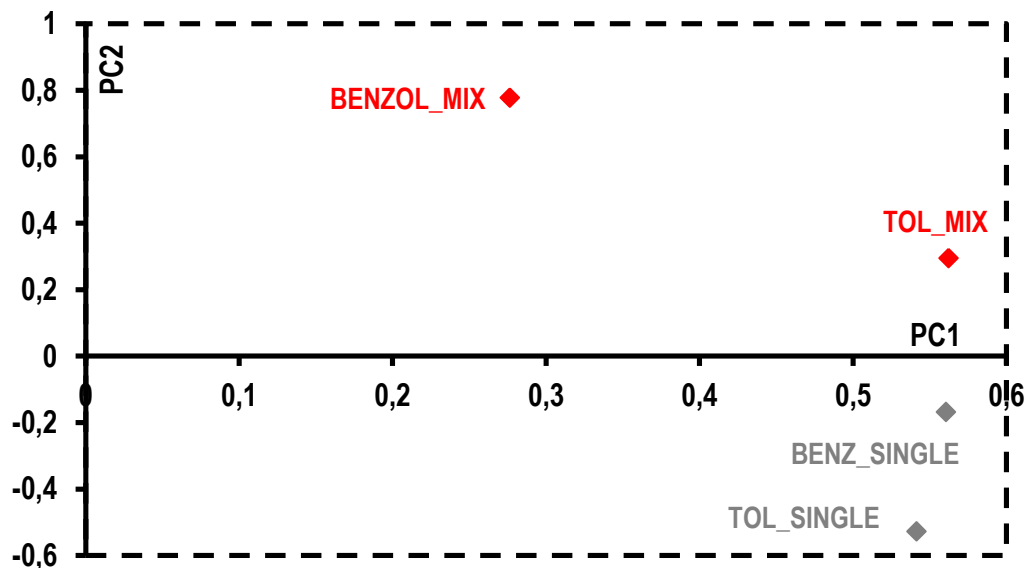
29. ábra. Biokatalitikus termékkel végzett benzol és toluol lebontási kísérletek. Az egyes pontok az ábrán a relativizált kísérleti koncentráció adatokat jelöli, míg a vonalak pontokra illesztett exponenciális függvényekkel nyert „kvázi” mérési kinetikai adatsorokat jelöli. „SINGLE”: az adott komponens önmagában, „MIXED” a két komponens keverékeként történt a vizsgálat.

A kinetikai görbék korreláltatásakor a modell adatokhoz és a benzaldehid kísérletek kapcsán bemutatott ábrákhoz hasonlóan változnak meg a regressziós paraméterek (30. ábra). Az inhibíció hatása jelentős mértékben befolyásolja mind a kinetikai görbék, alakját mind a regressziós egyenesek paramétereit. A komponensek keverékeiből származtatott adatsorok (*MIXED*) regressziójának paramétereit ez eddig bemutatottakkal összhangban vannak, visszaigazolva a szakirodalomban is szereplő benzol-toluol komponensek közötti negatív gátlóhatást.



30. ábra. Benzol és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti adatsorok egymással történő korreláltatása. „MIXED” a vizsgált szennyezők keverék (toluol és benzol) mintájának a jelölése, míg „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzol szerepelt a mintában.

A benzol és toluol keverékekből származtatott kinetikai görbéket jelölő pontok a főkomponens-együttható ábrán szintén eltérő negyedben helyezkednek el, mint a referencia pontok. A benzol keverék pontjának (*BENZOL_MIX*) térbeli elhelyezkedéséhez, a referenciaponthoz képest mindkét főkomponens-együttható hozzájárulása megváltozik, míg a toluol hasonló pontjának esetében (*TOL_MIX*) ez csak a PC2 tengely értékeiben tetten érhető (31. ábra). A pontok térbeli elhelyezkedése az első két főkomponens együttható terében relatív, azok újabb, a PCA elemzésbe bevont adatsorok hatására megváltoznak (lásd pl. 25. és 28. ábrák). Az aktivitásmódosító hatások érzékeléséhez szükséges egy előre definiált referencia pont kijelölése, esetünkben ez a vizsgált komponensek önmagukban történő biokatalitikus lebontása volt.



31. ábra. Benzol és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti kinetikai görbéinek PCA elemzése „MIXED” a vizsgált szennyezők keverékének (toluol és benzaldehid), míg a „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzaldehid szerepelt a mintában.

6.2.1 Kinetikai paraméterek meghatározása kísérleti adatokból

Az 5.2.1 fejezetben bemutatott regressziós eljárásokkal a kísérleti adatsorokból meghatározhatók a K_M és v_{max} kinetikai paraméterek. A referencia paraméterekhez viszonyított megváltozásukból nem csak az inhibíciós hatás jelenlétére illetve mértékére, hanem annak típusára (kompetitív, nemkompetitív, kevert) is következtethetünk. A benzol-toluol biokatalitikus termékkel végzett lebontási kísérletek eredményeit felhasználva, a többváltozós lineáris, illetve a Lineweaver–Burk eljárással számított benzol kinetikai paraméter eredményei a 14. táblázatban bemutatott.

14. táblázat. Benzol kinetikai paramétereit a két különböző becslési eljárás eredményeképpen. Az adatok a kísérlet háromszoros ismétléséből származnak.

	Benzol referencia kísérlete (SINGLE)		Benzol-Toluol keverék kísérlete (MIXED)	
	Többváltozós lineáris	Lineweaver–Burk becslés	Többváltozós lineáris	Lineweaver–Burk becslés
K_M (mg/l)	194,22 ± 52,38	57,82 ± 14,60	478,15 ± 150,60	534,20 ± 82,613
v_{max} (h ⁻¹)	20,49 ± 2,97	6,49 ± 0,46	6,95 ± 4,30	2,98 ± 1,47
S_0 (mg/l)	316,93 ± 8,23	-	366,17 ± 17,93	-

Mind a többváltozós lineáris és mind a Lineweaver–Burk becslés meglehetősen megbízható adatokat szolgáltat, amit a szórás adatok is visszatükröznek. A többváltozós megközelítés esetében, lehetőség van a kiindulási szubsztrát koncentráció meghatározására is. A mért kiindulási szubsztrát koncentrációk, 374, 63 ± 2,8 és 362,33 ± 11,09

mg/l voltak, amelyek az alkalmazott módszerrel meglehetősen pontosan számíthatók (lásd 14. táblázat). Ugyanakkor a két eljárás által becsült értékek szisztematikusan eltérnek egymástól. Ugyanazon paraméterek esetében a többváltozós becslés nagyobb értékeket ad eredményül. A különbség természetesen az analitikai mérések esetén mindig jelen lévő hibahatásnak is tulajdonítható. Mivel pontos ismeretekkel nem rendelkezem a benzol lebontását végző mikroorganizmussal, illetve enzimmel kapcsolatban, ezért a két eljárás pontosságát értékelni, összehasonlítani egymással vagy szakirodalmi adatokkal nehézkes. Mindazonáltal a 15. táblázatban összegeztem a benzol kinetikai paramétereit. Az idézett tanulmányokban kivétel nélkül *Pseudomonas putida* törzseket használtak a vizsgálatokban.

15. táblázat. Benzol szakirodalmi kinetikai (K_M és v_{max}) paramétereit

Kiindulási koncentráció (mg/l)	Önmagában (SINGLE)		Keverékben (MIXED)		Referencia
	v_{max} (h ⁻¹)	K_M (mg/l)	v_{max} (h ⁻¹)	K_M (mg/l)	
12	0,85 ± 0,23	0,08 ± 0,03	0,48 ± 0,21		Bielefeldt & Stensel 1999
60	0,48	3,1	0,337	28,5	Trigueros et al., 2010
	0,34	30	-	-	
43	0,73 ± 0,03	0,12 ± 0,02	-	-	Reardon et al., 2000
70	0,44	3,36	-	-	Oh et al., 1994

Ennél sokkal hangsúlyosabb megállapítás, hogy mindkét regressziós számítás esetében a kinetikai paraméterek változása ugyanazt a trendet követi. K_M értéke a referencia kísérletekhez viszonyítva ($194,22 \pm 52,38$ és $57,82 \pm 14,60$) mind a többváltozós ($478,15 \pm 150,60$) és mind a Lineweaver–Burk-féle értékelés ($534,20 \pm 82,613$) esetén növekedett. Ezzel egyidejűleg a v_{max} értéke rendre kisebb a benzol-toluol keveréknél. A kinetikai paraméterek ilyen irányú megváltozása a két szennyező komponens közötti kevert inhibíciós hatásra utalhat. Ez az eredmény összhangban van, azokkal a szakirodalmi megállapításokkal, amik az aromás szénhidrogének között fellépő és azok biodegradációs lebontását negatív vagy pozitív módon befolyásolni képes kölcsönhatásként írják le (ARVIN et al., 1989; SMITH et al., 1991; OH et al., 1994).

7. ÖSSZEFOGLALÁS, TÉZISPONTOK

7.1.Összefoglalás

Dolgozatomnak az egyik fő célkitűzése a biokatalitikus kármentesítési eljárások gyakorlati alkalmazásának azon problematikus témakörére fókuszált, amely a szennyező komponensek nagyfokú heterogenitásakor jelentkezhet. Az egyes komponensek közötti inhibíciós vagy aktiválási hatások érzékelése, felismerése a kármentesítési beavatkozások tervezhetőségének elengedhetetlen részét képezi.

A biodegradációs folyamatok vizsgálatához létrehoztam egy a Michaelis–Menten kinetikán alapuló modellt, melynek különböző, enzimaktivitást befolyásoló – aktiválási és gátlási – feltételekkel kiegészített megoldásait is származtattam.

Kidolgoztam egy többváltozós megközelítésen alapuló az enzim kinetikai paraméterek becslésére felhasználható gyors és egyszerű eljárást, melynek eredménye a konvencionálisnak tekinthető Lineweaver–Burk-féle kettős reciprok eljáráshoz képest jóval megbízhatóbb és pontosabb becslést tesz lehetővé. Modell adatok segítségével mindkét becslés jóságát ellenőriztem zaj-, illetve inhibíciós hatás alkalmazása esetén.

Kidolgoztam a kinetikai adatsorok regressziós analízisén alapuló eljárást, melynek segítségével egy komplex szennyeződés esetén lehetségessé válik a szennyező anyag lebontási sebességet befolyásoló hatások érzékelése. A kinetikai adatsorok PCA-val történő vizsgálatával vizuálisan is érzékelhetővé tehető az enzim aktivitás módosulása. Az eljárás tesztelését mind modell és mind kísérleti adatsorokon teszteltem. Kísérleti eredményekből érzékelt inhibíciós hatás típusa az ismertetett többváltozós lineáris regressziós módszerrel – a kinetikai K_M és v_{max} paraméterek számításán keresztül – meghatározható.

7.2.Tézispontok

Kutatómunkám eredményeiből a következő tézispontok fogalmazhatók meg:

1. tézis

Biokémiai folyamatok kinetikai paraméterbecslését a kidolgozott többváltozós lineáris regresszió használatával pontosabban lehetséges kivitelezni a Lineweaver–Burk-féle kettősreciprok becsléshez viszonyítva.

Michaelis–Menten típusú kinetika esetén a szubsztrát koncentráció időbeli változásának kifejezésére szolgáló differenciálegyenlet implicit formában kifejezve:

$$K_M \cdot \ln\left(\frac{[S]}{[S_0]}\right) + [S] - [S_0] = -v_{max} \cdot t ,$$

és az alábbi behelyettesítéseket

$$Y = \ln\left(\frac{[S]}{[S_0]}\right)$$

$$X = S$$

elvégezve kapjuk a következő összefüggést:

$$K_M \cdot Y + X - [S_0] = -v_{max} \cdot t.$$

A többváltozós lineáris regresszió együtthatói a biokémiai átalakulás paramétereinek alternatív becslései. A megközelítés kiküszöböli a Lineweaver–Burk-féle eljárás esetén szükséges differenciálási lépésközből eredő hibát, továbbá az adatsorra szuperponált zajhatást részlegesen tompítja, melynek eredményeképpen nagyságrendekkel pontosabb, kisebb szórásértékű becslést tesz lehetővé (lásd (15.a-b. és 16.a-b. ábrák)

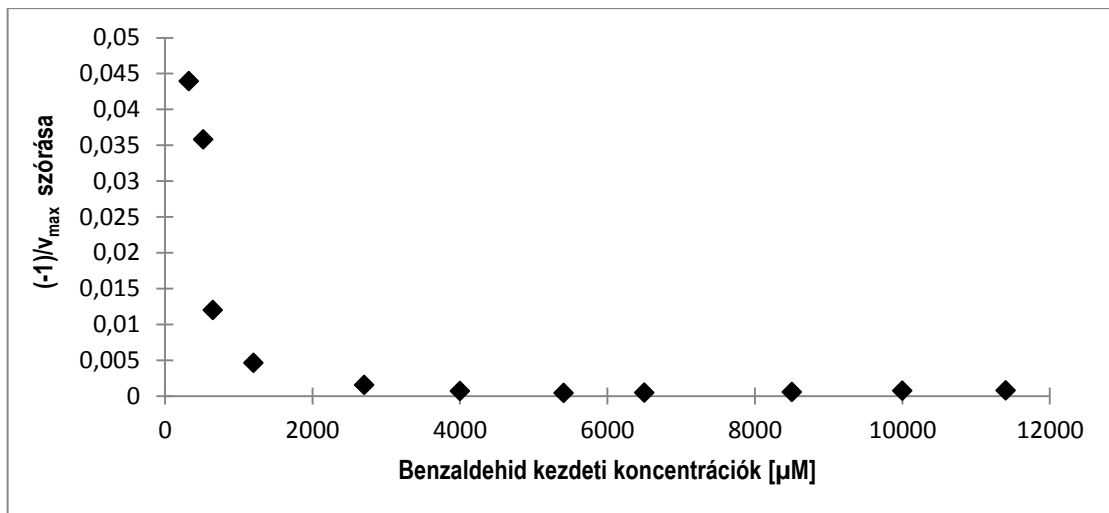
2. tézis

Az elméleti hibaanalízis Δr_v -re, vagyis a maximális reakciósebesség reciprokának hibájára vonatkozó elméleti megállapítását, nevezetesen a

$$\Delta r_v = \Delta h_t \cdot \frac{K_M}{S_0} + \left(\frac{K_M}{S \cdot S_0} + \frac{K_M}{S_0^2} + \frac{S}{S_0} \right) \cdot \Delta h_s + \frac{K_M}{S_0} \cdot \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) \cdot \frac{\Delta K_v}{K_v}$$

származtatott összefüggést megerősítettem modellezett adatok felhasználásával is, vagyis, hogy alacsonyabb szubsztrát koncentrációk esetén a becslés pontossága függ a szubsztrát koncentráció mérési/becslési hibájától (zajtól).

Az elméleti összefüggés kihangsúlyozza a maximális reakciósebesség becslésének kiindulási szubsztrát koncentrációtól való függését, melyet a következő 17.a. ábrára, a modellezett adatok felhasználásával érzékeltet.



17.a. ábra. A benzaldehyd kiindulási koncentrációinak hatása a $-1/v_{max}$ becsült paraméter szórásértékeire 5%-os zaj esetén (többváltozós lineáris modellbecslés)

Ez a megállapítás, egyben rávilágít a Lineweaver–Burk-féle becslés egyik gyengeségére is, ugyanis a legkisebb szubsztrát koncentrációhoz tartozó és ezáltal a legnagyobb mérési hibával meghatározott kezdeti sebesség adatok reciprokai lesznek a legnagyobb számértékűek. Ezáltal befolyásolva majd az illesztett egyenes paramétereit, így téve pontatlanná a v_{max} becslését.

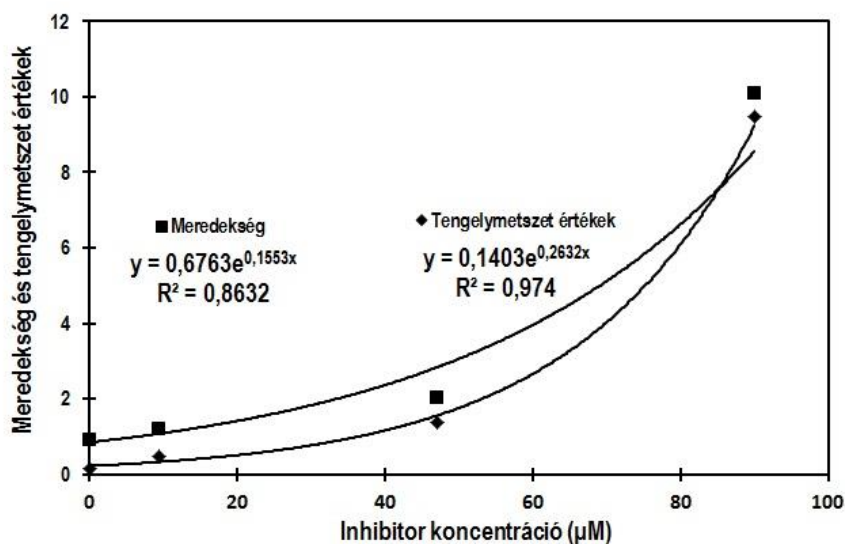
3. tézispont

Szennyező komponensek azonos feltételek (önmagukban, illetve keverék-ként) mellett történő enzimatis lebontrási adatsorai korrelálhatnak egymással. A korreláltatott adatokra illesztett regressziós egyenes paramétereit (meredekség és tengelymetszet) az enzimaktivitást befolyásoló hatás következményeként szignifikánsan megváltoznak.

A referencia adatsor regressziós egyenes paramétereit viszonyított változás irányából meghatározható, hogy inhibíció vagy aktiválás befolyásolja-e a lebontás sebességét. Inhibíció esetén az egyenes meredeksége növekedni, a tengelymetszet pedig csökkeni fog, míg aktiválási hatás esetén a paraméterek változása ellentétes irányú lesz. A paraméterek változásának mértéke arányos a módosító hatás erősségével. A tézis ponthoz tartozó grafikus interpretálást modell adatok esetén lásd a dolgozat 19. és 20. ábrájánál, míg a kísérletek során tapasztalt hatások érzékelése a 24., 27., és 30. ábrán bemutatott. Az első tézispontban ismertetett paraméterbecslési eljárással az érzékelt inhibíció túl, annak típusa is meghatározható.

4. tézispont

A korreláltatott adatsorok regressziós paramétereinek és az inhibíciót kifejtő komponens koncentrációjának kapcsolatából empirikus úton származtatni lehetséges az enzimaktivitást módosító hatás erősségét. Ezt a hatást a két mennyiség közötti exponenciális függvény kapcsolattal fejezhetjük ki.



21. ábra. Inhibitor koncentrációk és a regressziós paraméterek közötti kapcsolat exponenciális függvényekkel közelítve

Exponenciális függvényt illesztve az inhibitor koncentrációk és az abszolút értékben vett tengelymetszet, illetve merekség adatok korrelációjából kapott adatokra az inhibíciós hatás erőssége kifejezhetővé válik, így további információkat szolgáltathat az inhibícióérzékelés regressziós alapokon történő megközelítése, értékelése. Inhibitor helyett az aktivátor koncentráció értékeket alkalmazva az aktiválási hatás mértéke is számszerűsíthető ezzel a megközelítéssel.

5. tézispont

Főkomponens-elemzés használatával a kinetikai görbék alakjait sajátosságai leképezhetők a "loading plot" első két főkomponens-együttható terében, melyek elhelyezkedése visszatükrözi az enzimaktiválási hatások jelenlétét.

Az alkalmazás az aktivitásmódosulás gyors vizualizálására alkalmazható. Az elemzéshez minden esetben szükséges bevonni az inhibíció vagy aktiválás mentes „referencia” kinetikai adatsort, mivel a „loading plot”-on az azt megjelenítő szubsztrát ponthoz történik a többi pont elhelyezkedésének viszonyítása. Ezek alapján válik lehetségessé a módosító hatások érzékelése, s mértékük számszerűsítése.

8. KITEKINTÉS

A kutatási terület néhány továbbfejlesztési lehetőséget kínál. Az egyik ilyen a komplexebb lebontási/inhibíciós modellekre való alkalmazása, illetve új szennyeződések (klórozott szénhidrogének, peszticidek) kapcsán tapasztalt enzimaktivitás módosulási hatások modellezése. Az értékelés hátrányaként lehet megemlíteni a nagy adatigényt, erre a problémára megoldást adhat az egyes spektrofotométeres enzimaktivitás mérések, melyek alkalmazása további költség- és időhatékony megoldást is jelenthetnek.

Egy további lehetőség a sokváltozós adatelemzési módszerek lehetnek. Kujur és Kumar-Patel (2013) munkájukban különböző talajtípusok fizikai és kémiai sajátosságait korreláltatta a talajokban található enzimek K_M , v_{max} és v_{max}/K_M paramétereivel. Főkomponens-elemzés alkalmazásával jól elkülönülhetővé tették egymástól az egyes talajtípusokat, illetve paramétereik alapján jellemezni tudták azok eredeti, enzimjeik által történő szubsztrát bontó képességüket. Ugyanezen elven keresztül a különböző biokatalitikus termékeket is jellemezhetjük szennyeződésbontó képességük alapján, illetve kiválaszthatjuk a legmegfelelőbbet a szennyezett terület fizikai-kémiai sajátosságainak megfelelően. A vizsgálat során elengedhetetlen a kinetikai paraméterek gyors és pontos meghatározása.

A kidolgozott paraméter becslési módszer további fejlesztésére kínál lehetőséget a többváltozós lineáris megközelítés kombinálása, együttes használata a nemlineáris módszerekkel. Ebben az esetben, az utóbbi eljáráshoz szükséges, már említett kezdeti paraméterek kiválasztása precízebben kivitelezhetővé válna, elkerülhetővé válna a több lokális megoldásból adódó pontatlan becslés.

9. KÖSZÖNETNYÍLVÁNÍTÁS

Ezúton szeretném megköszönni témavezetőm Dr. Németh Zsolt István szüntelen támogatását, iránymutatását, továbbá hasznos elméleti és gyakorlati tanácsait, melyekkel munkámat segítette.

Köszönettel tartozom társ-témavezetőmnek, Dr. Cserny Tibornak is, aki figyelmemet a környezeti kármentesítés jelen területére irányított a témaválasztás során.

Továbbá köszönetemet fejezem ki a Kémiai Intézet minden dolgozójának, többek között Dr. Rétfalvi Tamás intézetigazgatónak, aki lehetővé tette számomra a GC-MS analitikai technika alkalmazását kísérletes munkám során.

Köszönettel tartozom Dr. Thomas Maskownak, a Helmholtz Kutató Intézet professzorának is, aki németországi ösztöndíjam során lehetőséget biztosított a biokatalitikus termékkel végzett kísérleteim kivitelezéséhez.

Végül, de nem utolsósorban köszönöm családomnak és páromnak a folyamatos bátorítást, erkölcsi-emberi támogatást, amire az olykor nehézkes és rögzös doktori munka során mindig számíthattam.

10. HIVATKOZOTT IRODALOM

- ABU LABAN, N., SELESI, D., RATTEI, T., TISCHLER, P., MECKENSTOCK, R.U. (2010): Identification of enzymes involved in anaerobic benzene degradation by a strictly anaerobic iron-reducing enrichment culture. *Environmental Microbiology*, **12**. 2783–2796.
- AEHLE, W. (ed) (2003): *Enzymes in industry: production and applications*. Second edition, Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim, Germany.
- AHUJA, S.K., FERREIRA G.M., MOREIRA A.R. (2004): Utilization of enzymes for environmental applications, *Critical Reviews in Biotechnology*, **24**(2-3). 125-154.
- ALCALDE, M., FERRER, M., PLOU, F.J., BALLESTEROS, A. (2006): Environmental biocatalysis: from remediation with enzymes to novel green processes”, *Trends in Biotechnology*, **24**(6). 281-287.
- ALEXANDER, M. (1999): *Biodegradation and bioremediation*. Academic Press, Sandiego, California
- ALTENSCHMIDT, U., FUCHS, G. (1992): Anaerobic toluene oxidation to benzyl alcohol and benzaldehyde in a denitrifying *Pseudomonas* strain. *Journal of Bacteriology*, **174**(14). 4860–4862.
- ALVAREZ, P.J.J., ILLMAN W.A. (2005): *Bioremediation and Natural Attenuation: Processes Fundamentals and Mathematical Models*. John Wiley & Sons Inc., Hoboken, New Jersey.
- ANTON, A., BORIÁN, Gy., FORGÁCS, J., HORVÁTH, ZS., LUKÁCS, L., LELIK, Zs. (2006): *Környezettechnika II. Vituki Kht*, Budapest.
- ARVIN, E., JENSEN B. K., GUNDERSEN A.T., (1989): Substrate interactions during aerobic biodegradation of benzene. *Applied Environmental Microbiology*, **55**. 3221–3225.
- ASGHER, M., NAWAZ-BHATTI, H., ASHRAF, M., LEGGE, R.L. (2008): Recent developments in biodegradation of industrial pollutants by white rot fungi and their enzyme system. *Biodegradation*, **19**. 771-783.
- ATLAS, R.M. (1981): Microbial degradation of petroleum hydrocarbons: an environmental perspective. *Microbial Reviews*, **45**(1). 180-209.
- BARÓTFI, I. (2003): *Környezettechnika*. Mezőgazda Kiadó, Budapest pp. 502-510.
- BEJ, A. SAUL K.D., AISLABIE. J. (2000): Cold-tolerant alkane-degrading *Rhodococcus* species from Antarctic. *Polar Biology*, **23**. 100-105.
- BIELEFELDT, A.R., STENSEL, D.H. (1999): Modeling competitive inhibition effects during biodegradation of BTEX mixtures. *Water Resources Management*, **33**. 707-714.
- BEVC, S., KONC, J., STOJAN, J., HODOŠČEK, M., PENCA, M., PRAPROTNİK, M., (2011): ENZO: A web tool for derivation and evaluation of kinetic models of nzyme catalyzed reactions. *PLoS ONE* **6**(7).
- BEVINGTON P.R. (1969): *Data reeduction and error analysis for the physical sciences*, McGraw-Hill Book Co., New York
- BRIGGS, E.G., HALDANE J.B.S., (1925): A note on the kinetics of enzyme action. *Biochemical Journal*, **19**(2). 338-339.

- CHANG, M.-K., VOICE, T.C., CRIDLE, C.S. (1993): Kinetics of competitive inhibition and co-metabolism in the biodegradation of benzene, toluene, and p-xylene by two *Pseudomonas* isolates. *Biotechnology and Bioengineering*, **41**. 1057-1065.
- CIPOLLONE, R., ASCENZI, P., FRANGIPANI, E., VISCA, P. (2006): Cyanide detoxification by recombinant bacterial rhodanese. *Chemosphere*, **63**. 942-949.
- DEEB, R.A., HU, H.-Y., HANSON, J.R., SCOW, K.M., ALVREZ-COHEN, L. (2001): Substrate interactions in BTEX and MTBE mixtures by an MTBE-degrading isolate, *Environmental Science Technology*, **35**. 312-317.
- DONALD, J.M., HOOPER, K., HOPENHAYN-RICH, C. (1991): Reproductive and developmental toxicity of toluene: a review. *Environmental Health Perspectives*, **94**. 237-244.
- ELŐDI, P. (1980): *Biokémia*. Akadémia kiadó, Budapest pp. 266-277.
- FERREIRA, P., MEDINA, M., GUILLEN, F., MARTINEZ, M.J., van BERKEL, W.J.H., MARTINEZ, A.T., (2005): Spectral and catalytic properties of aryl-alcohol oxidase, a fungal flavoenzyme acting on polyunsaturated alcohols. *Biochemical Journal*, **389**. 731-738.
- FERREIRA, P., HERNANDEZ-ORTEGA, A., HERGUEDAS, B., RENCORET, J., GUTIERREZ, A., MARTINEZ, M.J., IMENEZ-BARBERO, J., MEDINA, M., MARTINEZ, A.T., (2009): Kinetic and chemical characterization of aldehyde oxidation by fungal aryl-alcohol oxidase. *The Journal of Biological Chemistry*, **425**. 585-593.
- FRITSCHÉ, W. (1998): *Umweltmikrobiologie, Grundlagen und Anwendungen*. Gustav Fischer Verlag, Jena
- GIANFREDA, L., BOLLAG, J.-M. (2002): Isolated enzymes for the transformation and detoxification of organic pollutants. In: R. G. Burns, R. Dick (eds). *Enzymes in the Environment: Activity, Ecology and Applications*. Marcel Dekker, New York, 491-538.
- GIANFREDA, L., RAO, M.A. (2004): Potential of extra cellular enzymes in remediation of polluted soils: a review. *Enzyme and Microbial Technology*, **35**. 339-354.
- GRUIZ, K. (2003): A területhasználat, a környezeti kockázat és a természetes szennyező anyag-csökkenés összefüggései. *Környezetvédelmi füzetek*, BME OMIKK, 58-60.
- HAMED, T.A., BAYRAKTAR, E., MEHMETOGLU, T., MEHMETOGLU, U. (2003): Substrate interactions during the biodegradation of benzene, toluene and phenol mixtures. *Process Biochemistry*, **39**. 27-35.
- HEGYI, Gy., KARDOS, J., KOVÁCS, M., MÁLNÁSI-CSIZMMADIA, A., MICSONAI, A., NYITRAY, L., PÁL, G., RADNAI, L., REMÉNYI, A., VENEKEI, I. (2013): *Bevezetés a biokémiába gyakorlati jegyzet*. ELTE
- HERKE, Z., NÉMETH, ZS.I. (2011): Inhibíciós hatások kimutatása komplex enzim rendszerekben statisztikai módszerekkel. Lakatos F., Polgár A., Kerényi-Nagy V. (szerk.): *Tudományos Doktorandusz Konferencia, Konferencia-kötet*, Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar, NymE Kiadó

- HERKE, Z., MASKOW, T., NÉMETH ZS.I. (2015): New method for detection of cross inhibition effects in the environmental biocatalytic processes. *BioTechnologia* (A kézirat benyújtásra került: 2015. 07.12.)
- HUGHES, J., DUSTON, K., WARD, C.H. (2002): Engineered bioremediation, Technology. Evaluation Report TE-02-03. Ground-Water Remediation Technologies Analysis Center, Pittsburg, PA, USA.
- ICSS (2006): Manual for biological remediation techniques. International Centre for Soil and Contaminated Sites, Desseau, Germany
- INOUE, A., HORIKOSHI, K. (1989): A *Pseudomonas* thrives in high concentrations of toluene. *Nature*, **338**. 264 – 266.
- KELETI, T. (1978): Az enzim kinetika alapjai. Tankönyvkiadó, Budapest
- KLUG, M.J., MARKOVETZ, A.J.,(1967): Degradation of hydrocarbons by members of the genus *Candida* II. Oxidation of n-alkanes and 1-alkenes by *Candida lipolytica*. *Journal of Bacteriology*, **93**. 1847–1852.
- KLUYVER, A., van NIEL, C. (1956): The microbe's contribution to biology, Harvard University Press. Cambridge.
- KORDA, A., SANTAS, P., TENETE A., SANTAS R. (1997): Petroleum hydrocarbon bioremediation: sampling and analytical techniques, in situ treatments and commercial microorganisms currently used. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **48**. 677-686.
- KUJUR, M., KUMAR-PATEL, A., (2014): Kinetics of soil enzyme activities under different ecosystems: An index of soil quality. *Chilean Journal of Agricultural Research*, **74**(1). 96-104.
- LEDERBERG, J. (ed.) (2000): *Encyclopedia of microbiology*. Academic Press, San Diego.
- LEISINGER, T., BRUNER, W. (1986): Poorly degradable substances, In: Rehm H. J., Reed G., Schönborn W. (eds) *Biotechnology, Microbial degradations*, VCH, Weinheim, **8**. 475-513.
- LIN, C.W., CHENG, Y.-W., TSAI, S.-L. (2007): Multi-substrate biodegradation kinetics of MTBE and BTEX mixtures by *Pseudomonas aeruginosa*, *Process Biochemistry*, **42**. 1211-1217.
- LIN, S.C. (1996): Biosurfactants: Recent Advances. *Journal of Chemical Technology and Biotechnology*, **63**. 109-120.
- LINEWEAVER, H., BURK, D. (1934): The determination of enzyme dissociation constants. *Journal of the American Chemical Society*, **56**(3). 658-666.
- LIVINGSTONE A., FEWSON C.A. (1972): Two Benzaldehyde Dehydrogenases in Bacterium N.C.I.B. 8250. *Biochemical Journal*, **130**. 927-935.
- MAIER, R.M. (2000): Microorganisms and organic pollutants. IN: R.M. Maier, I.L. Peper and C.P. Gerba (eds.) *Environmental Microbiology*, Academic Press, San Diego 363-402.
- MARGESIN, R., SCHINNER, F. (2001): Bioremediation (natural attenuation and biostimulation) of diesel-oil-contaminated soil in an Alpine glacier skiing area. *Applied and Environmental Microbiology*, **67**. 3127-3133.

- MARTINKOVÁ L., VEJVODA V., KAPLAN O., KUBÁČ D., MALANDRA A., CANTARELLA M., BEZOUŠKA K., KŘEN V. (2009): Fungal nitrilases as biocatalysts: Recent developments. *Biotechnology Advances*, **27**. 661–670.
- MECKENSTOCK, R.U., SAFINOWSKI, M., GRIEBLER, C. (2004): Anaerobic degradation of polycyclic aromatic hydrocarbons. *FEMS Microbiology Ecology*, **49**. 27–36.
- MICHAELIS, L., MENTEN, M.L., (1913): Die Kinetik der Invertinwirkung. *Biochem Zeitschrift* **49**. Angolra fordította: Roger S. Goody és Kenneth A. Johnson. Újrafordította: 2011. *Biochemistry*, **50**(39). 8264–8269.
- MOLNÁR, M. (2006): Szennyezett talaj ciklodextrinnel intenzifikált bioremediációja – tervezéstől az alkalmazásig. Ph.D. értekezés, BME, Budapest.
- MOTULSKY, H., CHRISTOPOULOS A. (2004): Fitting models to biological data using linear and nonlinear regression: A practical guide to curve fitting. Oxford University Press, pp. 27-35
- MULBRY, W.W., EATON, R.W. (1991): Purification and characterization of the N-methylcarbamate hydrolase from *Pseudomonas* strain CRL-OK. *Applied and Environmental Microbiology*, **57**. 3679-3682.
- MULLIGAN, C. N., YONG, R. N. (2003): Surfactant-enhanced remediation of contaminated soil: a review. *Engineering Geology*, **60**. 371-380.
- NAHAR, N., ALAUDDIN M., QUIÉTY, B. (2000): Toxic effects of toluene on the growth of activated sludge bacteria. *World Journal of Microbiology and Biotechnology*, **16**(3). 307-311.
- NÉMETH T. (szerk.) (2001): Kármentesítési kézikönyv 4. - Kármentesítési technológiák. Környezetvédelmi Minisztérium, Budapest.
- NÉMETH, T. (szerk.) (2003): Kármentesítési útmutató 7, a mennyiségi kockázatelemzés alapjai. 5. melléklet. Környezetvédelmi és Vízügyi Minisztérium, Budapest.
- OH, Y.-S., SHAREEFDEEN, Z., BALZIS, B.C., BARTHA, R. (1994): Interactions between benzene, toluene, and p-xylene (BTX) during their biodegradation. *Biotechnology and Bioengineering*, **44**. 533–538
- PIEPER, D.H., dos SANTOS, V.M., GOLYSHIN, P.N. (2004): Genomic and mechanistic insight into the biodegradation of organic pollutants. *Current Opinion in Biotechnology*, **15**. 215-224.
- POPPE, L., NOVÁK, L. (1992): *Selective Biocatalysis: A Synthetic Approach*, VCH: Weinheim, New York
- RAO, M.A., SCELZA, R., ACEVEDO, F., DIEZ, M.C., GIANFREDA, L., (2014): Enzymes as useful tools for environmental purposes. *Chemosphere*, **107**. 145-162.
- RAO, M.A., SCELZA, R., SCOTTI, R., GIANFREDA, L. (2010): Role of enzymes in the remediation of polluted environments. *Journal of Plant Nutrition and Soil Science*, **10**(3). 333- 353
- REARDON, K.F., MOSTELLER, D.C., ROGERS, J.D.B. (2000): Biodegradation kinetics of benzene, toluene and phenol as single and mixed substrates for *Pseudomonas putida* F1, *Biotechnology and Bioengineering*, **69**. 385-400.

- RÉVÉSZ, S. (2009): Adalékanyagok hatása különböző szennyező anyagok lebontására. Doktori (Ph. D.) értekezés. Gödöllő, SZIE Környezettudományi Doktori Iskola. Adalékanyagok hatása különböző szennyezőanyagok lebontására
- ROSENBERG, E. (1986): Microbial surfactants. *Critical Review of Biotechnology*, **3**(2). 109–132.
- RUBILAR, O., DIEZ, M.C., GIANREDA, L. (2008): Transformation of chlorinated phenolic compounds by white rot fungi. *Critical reviews in Environmental Science and Rechnology*, **38**. 227-268.
- SAJBEN-NAGY, E., MANCZINGER, L., SKRBIĆ B., ZIVANČEV, J., ANTIĆ, I., KRISCH, J., VÁGVÖLGYI C. (2013): Application of laccases, produced by *Ganoderma* species, for the detoxification of some aniline and phenol derivatives. *Review on agriculture and rural development*, **2**(1). 422-426.
- SANCHEZ, C. (2009): Lignocellulosic residues: biodegradation and bioconversion by fungi. *Biotechnology advances*, **27**. 185-194.
- SEVELLA, B. (2012): Biomérnöki műveletek és folyamatok. BME Vegyészmérnöki és Biomérnöki Kar Alkalmazott Biotechnológia és Élelmiszertudományi Tanszék
- SHARMA, N.K., PHILIP L. (2014): Effect of cyanide on phenolics and aromatic hydrocarbons biodegradation under anaerobic and anoxic conditions. *Chemical Engineering Journal*, **256**. 255–267
- SINGH, R., SHARMA, R., TEWARI, N., GEETANJALI, RAWAT D.S. (2006): Nitrilase and its application as a ‘green’ catalyst. *Chemistry & Biodiversity*, **3**. 1279-1287.
- SINKE, A. (2001): Monitored natural attenuation; moving forward to consensus. *Land Contamination and Reclamation*, **9**. 111-118.
- SMITH, M.R., EWING, M., RATLEDGE, C. (1991): The interactions of various aromatic substrates degraded by *Pseudomonas* sp. NCIB 10643: synergistic inhibition of growth by two compounds that serve as growth substrates. *Applied Microbiology and Biotechnology*, **34**. 536–538.
- STRONG, P.J., CLAUS, H., (2011): Laccase: a review of its past and its future in bioremediation. *Critical Reviews in Environmental Science and Technology*, **41**(4). 373-434.
- SUTHERLAND, T., HORNE, I., WEIR, K., COPPIN, C., WILLIAMS, M., SELLECK, M., RUSSEL, R., OAKESHOTT, J. (2004): Enzymatic bioremediation: from enzyme discovery to applications. *Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology*, **31**. 817-821.
- SZOBOSZLAY, S., TÖRÖK G., KRISZT, B. RÚZS-MOLNÁR S. (1995): Nem patogén mikroorganizmusok alkalmazása szénhidrogénnel szennyezett területek környezetkímélő mentesítésére. *Biotechnológia és környezetvédelem-ma és holnap*, **9**. 34-37.
- SZOBOSZLAY, S., KRISZT B. (2010): Környezeti elemek védelme. Szent István Egyetemi Kiadó, Gödöllő.
- TROMBLY, J. (1995): Engineering enzymes for better bioremediation, *Environmental Science & Technology*, **29**. 560–564.

- TYAGI, M., DA FONSECA, M.M.R., DE CARVAHLO, C.C.R. (2011): Biougmentation and biostimulation strategies to improve th effectiveness of bioremediation processes. *Biodegradation*, **22**(2). 231-241.
- US EPA (1999a): Monitored natural attenuation of petroleum hydrocarbons. U.S. EPA Remedial technology fact sheet. EPA/600/F-98/021
- US EPA (1999b): Monitored natural attenuation of chlorinated solvents. U.S. EPA Remedial technology fact sheet. EPA/600/F-98/022
- van der MEER, J.R. (1994): Genetic adaptation of bacteria to chlorinated aromatic compounds. *FEMS Microbiology Reviews*, **15**(2). 239-249.
- van der MEER, J.R., WERLEN, C., NISHINO, S.F.; SPAIN, J.C. (1998): Evolution of a pathway for chlorobenzene metabolism leads to natural attenuation in contaminated groundwater. *Applied and Environmental Microbiology*, **64**(11). 4185-4193.
- WACKETT, L.P., KWART, L.D., GIBSON, D.T. (1988): Benzylic monooxygenation catalyzed by toluene dioxygenase from *Pseudomonas putida*. *Biochemistry*, **27**(4). 1360-1367.
- WHITELEY, C.G., LEE, D.-J. (2006): Enzyme technology and biological remediation. *Enzyme and Microbial Technology*, **38**. 291-316

10.1. A dolgozatban található ábrák jegyzéke:

1. **ábra.** Beavatkozás mértékétől függően megkülönböztethető biodegradációs eljárások
2. **ábra.** Enzim kinetikai reakciók rendűsége, a reakció sebesség függése a szubsztrát kezdeti mennyiségétől
3. **ábra.** A Michaelis–Menten-egyenlet Lineweaver–Burk-féle linearizálása (Hegyi et al., 2013)
4. **ábra.** Kompetitív inhibíció sematikus kinetikai ábrája
5. **ábra.** Kompetitív inhibíció Michaelis–Menten és Lineweaver–Burk ábrázolása
6. **ábra.** Nemkompetitív inhibíció sematikus kinetikai ábrája
7. **ábra.** Nemkompetitív inhibíció Michaelis–Menten és Lineweaver–Burk-ábrázolása
8. **ábra.** Unkompetitív inhibíció sematikus kinetikai ábrája
9. **ábra.** Unkompetitív inhibíció Michaelis–Menten és Lineweaver–Burk-ábrázolása
10. **ábra.** Kevert típusú inhibíció kinetikájának sematikus ábrázolása
11. **ábra.** Lineáris kevert típusú inhibíció
12. **ábra.** A kinetikai adatsorok alapját képző modell adatsorok egyik reprezentánsa, ahol a benzaldehid és toluol között inhibíciós hatás feltételezett. BENZAL= Benzaldehid inhibíciómentes adatsora, TOL= toluol lebontási adatsora. BENZAL_INH1-2-3=Benzaldehid lebontásra a toluol által kifejtett növekvő erősségű inhibíciós adatsora. BENZAL_AKT1-2-3=Benzaldehid lebontásra a K⁺-ion által kifejtett növekvő erősségű aktiválási hatás
13. **ábra.** Választott szennyező anyagok földgiliszta extraktum általi biokatalitikus lebontás vizsgálatának egyik reprezentáns GC-MS kromatogramja (további kromatogramok a 11.5 mellékletben)
- 14.a. **ábra.** Zajhatása a benzaldehid $-1/v_{\max}$ szórásértékeire első,- illetve zérusrendű tartományban (többváltozós lineáris becslés)
- 14.b. **ábra.** Zajhatása a benzaldehid $-(K_M/v_{\max})$ szórásértékeire első,- illetve zérusrendű tartományban (többváltozós lineáris becslés)
- 15.a. **ábra.** A többváltozós becslés $-1/v_{\max}$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és 11400 μM kiindulási koncentráció esetén
- 15.b. **ábra.** A többváltozós becslés $-(K_M/v_{\max})$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és 11400 μM kiindulási koncentráció esetén
- 16.a. **ábra.** A Lineweaver–Burk-féle becslés $-1/v_{\max}$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és 11400 μM kiindulási koncentráció esetén
- 16.b. **ábra.** A Lineweaver–Burk-féle becslés $-(K_M/v_{\max})$ értékei és a hozzájuk tartozó szórásértékek különböző zajhatás és 11400 μM kiindulási koncentráció esetén
- 17.a. **ábra.** A benzaldehid kiindulási koncentrációinak hatása a $-1/v_{\max}$ becsült paraméter szórásértékeire 5%-os zaj esetén (többváltozós lineáris modellbecslés)
- 17.b. **ábra.** A benzaldehid kiindulási koncentrációinak hatása a $-(K_M/v_{\max})$ becsült paraméter szórásértékeire 5%-os zaj esetén (többváltozós lineáris modellbecslés)
18. **ábra.** Modell szubsztrát (benzaldehid) relativizált adatsorainak korreláltatása
19. **ábra.** Különböző erősségű inhibíciós hatás indikálása a szubsztrátok relativizált adatsorainak korreláltatásával
20. **ábra.** Különböző erősségű aktiválási hatás indikálása a szubsztrátok relativizált adatsorainak korreláltatásával
21. **ábra.** Modell szubsztrátok elhelyezkedése inhibíció és aktiválási hatás eredményeképpen az első kettő főkomponens-együttható síkjában ábrázolva
22. **ábra.** Giliszta extraktummal végzett benzaldehid biokatalitikus lebontása. Az egyes pontok az ábrán a relativizált kísérleti koncentráció adatokat jelöli, míg a vonalak pontokra illesztett exponenciális függvényvel nyert „kvázi” mérési kinetikai adatsorokat jelöli.
23. **ábra.** Eltérő összetételű benzaldehid minták giliszta extraktummal végzett kísérleti adatsorainak korreláltatása. A „BENZAL_MIXED” a vizsgált szennyezők keverékét, a „BENZ_AKT” benzaldehid és KCl keverékét jelöli, míg a „BENZAL_SINGLE” esetében csak benzaldehid szerepelt a mintában.
24. **ábra.** Eltérő összetételű benzaldehid minták giliszta extraktummal végzett PCA elemzés, „loading”plotja az első kettő főkomponens-együttható síkjában. A jelölések jelentéstartalma azonos a 17. ábrával
25. **ábra.** Biokatalitikus termékkel végzett benzaldehid és toluol lebontási kísérletek. Az egyes pontok az ábrán a relativizált kísérleti koncentráció adatokat jelöli, míg a vonalak pontokra illesztett exponenciális függvényvel nyert „kvázi” mérési kinetikai adatsorokat jelöli. „SINGLE”: az adott komponens önmagában, „MIXED” a két komponens keverékéként történt a vizsgálat.

- 26. ábra.** Benzaldehyd és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti adatok egymással történő korreláltatása. „MIXED” a vizsgált szennyezők keverékének (toluol és benzaldehyd), míg a „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzaldehyd szerepelt a mintában.
- 27. ábra.** Benzaldehyd és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti kinetikai görbéinek PCA elemzése „MIXED” a vizsgált szennyezők keverékének (toluol és benzaldehyd), míg a „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzaldehyd szerepelt a mintában.
- 28. ábra.** Biokatalitikus termékkel végzett benzol és toluol lebontási kísérletek. Az egyes pontok az ábrán a relativizált kísérleti koncentráció adatokat jelöli, míg a vonalak pontokra illesztett exponenciális függvénnyel nyert „kvázi” mérési kinetikai adatsorokat jelöli. „SINGLE”: az adott komponens önmagában, „MIXED” a két komponens keverékékként történt a vizsgálat.
- 29. ábra.** Benzol és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti adatok egymással történő korreláltatása. „MIXED” a vizsgált szennyezők keverék (toluol és benzol) mintájának a jelölése, míg „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzol szerepelt a mintában.
- 30. ábra.** Benzol és toluol szennyezők önmagukban és keverékként biokatalitikus kísérleti kinetikai görbéinek PCA elemzése „MIXED” a vizsgált szennyezők keverékének (toluol és benzaldehyd), míg a „SINGLE” esetében csak toluol vagy benzaldehyd szerepelt a mintában.
- 31. ábra.** Inhibitor koncentrációk és a regressziós paraméterek közötti kapcsolat exponenciális függvényre közelítve

10.2. A dolgozatban található táblázatok jegyzéke:

1. táblázat. Leggyakoribb fizikai és kémia eljárások a környezeti kármentesítés területén
2. táblázat. Termikus kármentesítési eljárások és jellemzőik
3. táblázat. Ökomérnöki technológiák és jellemzőik a kármentesítésben
4. táblázat. Ökomérnöki technológiák és jellemzőik a kármentesítésben
5. táblázat. Leggyakoribb baktérium törzsek, melyek szénhidrogén származékok bontására képesek
6. táblázat. A benzaldehid-toluol modellezett lebontásokhoz tartozó kiindulási kinetikai paraméterek, aktiválási hatás modellezése esetén a v_{\max} értékei 0,055; 0,065 és 0,075
7. táblázat. Tesztzennyezők és néhány tulajdonságaik, illetve kezdeti koncentráció értékei a kinetikai vizsgálatokhoz
- 8.a. táblázat. $-1/v_{\max}$ és $-(K_M/v_{\max})$ szórásértékek változása a két különböző becslési eljárás esetén 5 %-os zajjal terhelve
- 8.b. táblázat. $-1/v_{\max}$ és $-(K_M/v_{\max})$ becslött értékek változása a két különböző becslési eljárás esetén 5 %-os zajjal terhelve, kinetikai paraméterek számított értéke: -0,01761 és -11,44809
- 9.a. táblázat. $-1/v_{\max}$ paraméterek szórásértékei a kétféle becslési eljárás különböző kiindulási koncentráció és zajmentes inhibíciómentes és inhibícióval terhelt adatsorai esetén
- 10.a. táblázat. $-1/v_{\max}$ paraméterek szórásértékei a kétféle becslési eljárás különböző kiindulási koncentráció és 3%-os zajhatás inhibíciómentes és inhibícióval terhelt adatsorai esetén
- 10.b. táblázat. $-K_M/v_{\max}$ paraméterek szórásértékei a kétféle becslési eljárás különböző kiindulási koncentráció és zajmentes inhibíciómentes és inhibícióval terhelt adatsorai esetén
- 11.a. táblázat. Kinetikai paraméterek becslött értékei különböző kiindulási koncentráció esetén, zajmentes inhibícióval terhelt adatsorok esetén. A számított paraméter értékek a kiindulási értékekből: $-1/v_{\max} = -0,01761245$; $-K_M/v_{\max} = -11,448$
- 11.b. táblázat. Kinetikai paraméterek becslött értékei különböző kiindulási koncentráció esetén, 3 %-os zaj hatással inhibícióval terhelt adatsorok esetén. A számított paraméter értékek a kiindulási értékekből: $-1/v_{\max} = -0,01761245$; $-K_M/v_{\max} = -11,448$
12. táblázat. A variációs koefficiens értékének változása inhibíciós hatással, illetve attól mentes adatsorok esetén különböző kiindulási koncentráció tartományokban. INHM & ZAJM = inhibíció- és zajmentes adatsorok; INH & ZAJM = inhibíciós és zajmentes adatsorok
13. táblázat. Modell komponensek referencia és inhibíciós adatsorainak elrendezése PCA objektummátrixban
14. táblázat. Benzol kinetikai paraméterei a két különböző becslési eljárás eredményeképpen. Az adatok a kísérlet háromszoros ismétléséből származnak.
15. táblázat. Benzol szakirodalmi kinetikai (K_M és v_{\max}) paraméterei

11. MELLÉKLETEK

11.1 *Biokatalitikus lebontási folyamat modellezésének SCILAB algoritmus*

```
clear();
clc
lines(0);
//
// Biodegradáció modellezése Michaelis–Menten kinetikával
//
function Sdot=y(t, S, kA, kB, kC, kD, kE, kF, kG, kH, E0A, E0B, E0C, E0D, E0E, E0F, E0G, E0H, KmA, KmB,
KmC, KmD, KmE, KmF, KmG, KmH, KIaA, KInkA, KIukA, KIkB, KInkB, KIukB, KIcC, KInkC, KIukC, KIcD,
KInkD, KIukD, Ika, Inka, Iuka, Ikb, Inkb, Iukb, Ikc, Inkc, Iukc, Ikd, Inkd, Iukd, KIke, KInke, KIuke, KIkf,
KInkf, KIukf, KIkg, KInkg, KIukg, KIkh, KInkh, KIukh, Ike, Inke, Iuke, Ife, Inkf, Iukf, Ikg, Inkg, Iukg,
Ikh, InkH, IukH),...
y1=-(kA*E0A*S(1)*KInkA/(KInkA + Inka))/(KmA*(1+Ika/KIaA)+S(1)*(1+IukA/KIukA));
y2=-(kB*E0B*S(2)*KInkB/(KInkB + Inkb))/(KmB*(1+Ikb/KIcC)+S(2)*(1+IukB/KIukB));
y3=-(kC*E0C*S(3)*KInkC/(KInkC + Inkc))/(KmC*(1+Ikc/KIcC)+S(3)*(1+IukC/KIukC));
y4=-(kD*E0D*S(4)*KInkD/(KInkD + Inkd))/(KmD*(1+Ikd/KIcD)+S(4)*(1+IukC/KIukD));
y5=-(kE*E0E*S(5)*KInkE/(KInkE + Inke))/(KmE*(1+Ike/KIke)+S(5)*(1+Iuke/KIuke));
y6=-(kF*E0F*S(2)*S(6)*KInkF/(KInkF + Inkf))/(KmF*(1+Ife/KIcF)+S(6)*(1+IukF/KIukF));
y7=-(kG*E0G*0.4*S(2)*S(7)*KInkG/(KInkG + Inkg))/(KmG*(1+Ikg/KIcG)+S(7)*(1+IukG/KIukG));
y8=-(kH*E0H*0.7*S(2)*S(8)*KInkH/(KInkH + InkH))/(KmH*(1+Ikh/KIkh)+S(8)*(1+IukH/KIukH));
Sdot=[y1; y2; y3; y4; y5; y6; y7; y8];
endfunction;
//
// nem kompetitív inhibíciós faktor: pl. KInkA/(KInkA + Inka), stb.
// kompetitív inhibíciós faktor : 1+Ika/KIaA, stb.
// unkompetitív inhibíciós faktor : 1+Iuka/KIukA, stb.
//
// y1 y2 y3 y4 y5 y6 y7 y8
k=[0.002 0.0015 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002 0.002]; // 1/h
E0=[800 800 800 800 800 800 800 800]; //microM
S0=[20 20 20 20 20 20 20 20]; //microM
Km=[100 100 100 100 100 100 100 100] ; //microM
//
kA=k(1,1); kB=k(1,2); kC=k(1,3); kD=k(1,4); kE=k(1,5); kF=k(1,6); kG=k(1,7); kH=k(1,8);
E0A=E0(1,1); E0B=E0(1,2); E0C=E0(1,3); E0D=E0(1,4); E0E=E0(1,5); E0F=E0(1,6); E0G=E0(1,7); E0H=E0(1,8);
S0A=S0(1,1); S0B=S0(1,2); S0C=S0(1,3); S0D=S0(1,4); S0E=S0(1,5); S0F=S0(1,6); S0G=S0(1,7); S0H=S0(1,8);
KmA=Km(1,1); KmB=Km(1,2); KmC=Km(1,3); KmD=Km(1,4); KmE=Km(1,5); KmF=Km(1,6); KmG=Km(1,7);
KmH=Km(1,8);
//
// Kompetitív inhibíciós faktor      Nem kompetitív inhibíciós faktor      Unkompetitív inhibíciós faktor
KI=[1 1 1
1 1 1
0.9 1 1
0.6 1 1
0.3 1 1
1 1 1
1 1 1
1 1 1]
//
KIaA =KI(1,1); KIcB =KI(2,1); KIcC =KI(3,1); KIcD =KI(4,1); KIcE =KI(5,1); KIcF =KI(6,1); KIcG =KI(7,1);
KIcH =KI(8,1);
KInkA=KI(1,2); KInkB=KI(2,2); KInkC=KI(3,2); KInkD=KI(4,2); KInkE=KI(5,2); KInkF=KI(6,2);
KInkG=KI(7,2); KInkH=KI(8,2);
KIukA=KI(1,3); KIukB=KI(2,3); KIukC=KI(3,3); KIukD=KI(4,3); KIukE=KI(5,3); KIukF=KI(6,3);
KIukG=KI(7,3); KIukH=KI(8,3);
// Kompetitív inhibitor koncentrációja      Nem kompetitív inhibitor koncentrációja      Unkompetitív inhibitor koncentrációja
I=[ 0 0 0
0 0 0
5 0 0
10 0 0
15 0 0
0 0 0]
```

```

0 0 0
0 0 0];
//
IkA=I(1,1); IkB=I(2,1); IkC=I(3,1); IkD=I(4,1); IkE=I(5,1); IkF=I(6,1); IkG=I(7,1); IkH=I(8,1);
InkA=I(1,2); InkB=I(2,2); InkC=I(3,2); InkD=I(4,2); Inke=I(5,2); InkF=I(6,2); InkG=I(7,2); InkH=I(8,2);
IukA=I(1,3); IukB=I(2,3); IukC=I(3,3); IukD=I(4,3); IukE=I(5,3); IukF=I(6,3); IukG=I(7,3); IukH=I(8,3);
//
t=0:2:300;
S=ode(S0, 0, t, y);
//
n=size(E0);
n1=n(1,2); // n1 - E0 vektor mérete
nS=size(S); // nS - S megoldásvektor mérete
n2=nS(1,2);
nt=size(t); // nt - t idővektor mérete
n3=nt(1,2);
// S vektor adatainak megoldása mátrixba (SS) rendezése
i1=1;
j1=0;
for i=1:n2;
    j1=j1+1;
    if j1 > n1 then i1=i1+1; j1=1; end
    SS(i1,j1)=S(i);
end
//
// Zajhatás generálása
//
SSmean=mean(SS);
disp(SSmean);
SSmean=mean(SS); SSmean=0.025*SSmean;
SSrand=rand(SS);SSrand=SSrand-0.5; SSrand=SSmean*SSrand;
SSzaj=SS+SSrand;
disp(SSzaj);
//
//Az "SSzaj" mátrix relativizálása (a mátrix oszlopainak elemeit végig osztjuk az adott oszlop legnagyobb elemével)
//
SSzaj1oszlop=SSzaj(:,1);
//disp(SSzaj1oszlop);
SSzaj2oszlop=SSzaj(:,2);
SSzaj3oszlop=SSzaj(:,3);
SSzaj4oszlop=SSzaj(:,4);
SSzaj5oszlop=SSzaj(:,5);
SSzaj6oszlop=SSzaj(:,6);
SSzaj7oszlop=SSzaj(:,7);
SSzaj8oszlop=SSzaj(:,8);
//
SSzaj1=SSzaj1oszlop(1,:);
disp(SSzaj1, "az első oszlop első eleme=");
SSzaj2=SSzaj2oszlop(1,:);
disp(SSzaj2, "a második oszlop első eleme=");
SSzaj3=SSzaj3oszlop(1,:);
disp(SSzaj3, "a harmadik oszlop első eleme=");
SSzaj4=SSzaj4oszlop(1,:);
disp(SSzaj4, "a negyedik oszlop első eleme=");
SSzaj5=SSzaj5oszlop(1,:);
disp(SSzaj5, "a ötödik oszlop első eleme=");
SSzaj6=SSzaj6oszlop(1,:);
disp(SSzaj6, "a hatodik oszlop első eleme=");
SSzaj7=SSzaj7oszlop(1,:);
disp(SSzaj7, "a hetedik oszlop első eleme=");
SSzaj8=SSzaj8oszlop(1,:);
disp(SSzaj8, "a nyolcadik oszlop első eleme=");
//
//az első elemmel való osztás, SSzaj1=az első eleme az 1. oszlopvektornak
//
RelSSzaj(:,1)=SSzaj(:,1)/SSzaj1;
disp(RelSSzaj(:,1), "első relativizált oszlop");

```



```

RelSSzaj(:,2)=SSzaj(:,2)/SSzaj2;
disp(RelSSzaj(:,2), "második relativizált oszlop")
RelSSzaj(:,3)=SSzaj(:,3)/SSzaj3;
disp(RelSSzaj(:,3), "harmadik relativizált oszlop")
RelSSzaj(:,4)=SSzaj(:,4)/SSzaj4;
disp(RelSSzaj(:,4), "negyedik relativizált oszlop")
RelSSzaj(:,5)=SSzaj(:,5)/SSzaj5;
disp(RelSSzaj(:,5), "ötödik relativizált oszlop")
RelSSzaj(:,6)=SSzaj(:,6)/SSzaj6;
disp(RelSSzaj(:,6), "hatodik relativizált oszlop")
RelSSzaj(:,7)=SSzaj(:,7)/SSzaj7;
disp(RelSSzaj(:,7), "hetedik relativizált oszlop")
RelSSzaj(:,8)=SSzaj(:,8)/SSzaj8;
disp(RelSSzaj(:,8), "nyolcadik relativizált oszlop")
//
//Relativizált oszlopvektorok mátrixba rendezése
//
RelSSzaj=[RelSSzaj(:,1),RelSSzaj(:,2),RelSSzaj(:,3),RelSSzaj(:,4),RelSSzaj(:,5),RelSSzaj(:,6),RelSSzaj(:,7),RelSSzaj(:,8)];
disp(RelSSzaj); // Relativizált mátrix
//
//Kiindulási adatbázis méretének csökkentése PCA feldolgozáshoz
//
nRelSSzaj=size(RelSSzaj);
disp(nRelSSzaj);
n1RelSSzaj=nRelSSzaj(1,1);

PCAD=RelSSzaj(1:4:n1RelSSzaj,1:8);
disp(PCAD);
disp(size(PCAD));
t2=1:38;
//
// Kinetikai görbék ábrázolása
//
plot2d(t2,PCAD,leg="S1@S2@S3@S4@S5@S6@S7@S8",style=[color("black"),color("black"),color("red"),color("red"),color("red"),color("green"),color("green") color("green")]);
//
//Kinetikai görbék mentése fájlba
//
[fd,err]=mopen('H:8komponens.txt','w');
fprintf(fd,"%n% .5f% .5f% .5f% .5f% .5f% .5f% .5f%",PCAD);
fclose(fd);

```

11.2 PCA felbontás kiindulási relativizált adatmátrixai

11.2.1 Benzaldehid-Toluol modell adatok

ID	Toluene	Benzaldehyde	BENZAL_INH3	BENZAL_INH2	BENZAL_INH1
1	1	1	1	1	1
2	0,98019	0,96605	0,99524	0,99815	0,99974
3	0,94117	0,90234	0,98494	0,99381	0,99911
4	0,90333	0,84183	0,97465	0,98919	0,99844
5	0,86629	0,78583	0,96362	0,98494	0,99772
6	0,83062	0,73255	0,95204	0,97996	0,99705
7	0,79606	0,68326	0,93975	0,97448	0,99603
8	0,7622	0,63686	0,92708	0,96903	0,99536
9	0,72964	0,59337	0,9134	0,96301	0,99428
10	0,69802	0,5528	0,89941	0,95679	0,99307

11	0,6674	0,51452	0,88471	0,94991	0,9922
12	0,6379	0,47907	0,86972	0,94307	0,99088
13	0,60943	0,4462	0,85379	0,93555	0,99008
14	0,58221	0,41531	0,83704	0,92781	0,9887
15	0,55553	0,38602	0,81981	0,91936	0,98741
16	0,53004	0,3592	0,80211	0,91081	0,98563
17	0,50534	0,33402	0,78358	0,90141	0,98422
18	0,48165	0,31071	0,76432	0,89178	0,9825
19	0,45879	0,28869	0,74454	0,8816	0,98066
20	0,43661	0,2684	0,72448	0,87088	0,97881
21	0,41548	0,24957	0,70365	0,85984	0,9767
22	0,3956	0,23225	0,6818	0,84793	0,97446
23	0,37597	0,2158	0,66015	0,83555	0,97213
24	0,35751	0,20029	0,63745	0,82297	0,97006
25	0,33948	0,18622	0,6146	0,80947	0,96735
26	0,32248	0,173	0,59107	0,79567	0,9646
27	0,30639	0,16065	0,56722	0,7809	0,96138
28	0,29061	0,14899	0,54357	0,76619	0,95853
29	0,27602	0,13854	0,51925	0,75077	0,95511
30	0,26154	0,12883	0,49458	0,73446	0,95153
31	0,24804	0,11947	0,47041	0,71819	0,94776
32	0,23519	0,11092	0,44582	0,70099	0,94419
33	0,22257	0,1029	0,42131	0,6836	0,93967
34	0,21109	0,09586	0,39661	0,66577	0,93566
34	0,19993	0,08892	0,37234	0,64707	0,93091
34	0,18926	0,08221	0,34869	0,62829	0,92586

11.2.2 Benaldehid-Toluol keverék „kvázi kísérleti” adatok

ID	Benzlnh	BenzM	BenzAkt
1	1	1	1
2	0,99633	0,98904	0,98181
3	0,99268	0,97821	0,96395
4	0,98904	0,96749	0,94641
5	0,98542	0,95689	0,92919
6	0,98181	0,94641	0,91229
7	0,97821	0,93604	0,89569
8	0,97462	0,92579	0,8794
9	0,97105	0,91564	0,8634
10	0,96749	0,90561	0,84769
11	0,96395	0,89569	0,83227
12	0,96041	0,88588	0,81713
13	0,95689	0,87617	0,80226
14	0,95339	0,86657	0,78767

15	0,94989	0,85708	0,77334
16	0,94641	0,84769	0,75927
17	0,94294	0,8384	0,74546
18	0,93948	0,82922	0,73189
19	0,93604	0,82013	0,71858
20	0,93261	0,81115	0,70551
21	0,92919	0,80226	0,69267
22	0,92579	0,79347	0,68007
23	0,92239	0,78478	0,6677
24	0,91901	0,77618	0,65555
25	0,91564	0,76768	0,64362
26	0,91229	0,75927	0,63192
27	0,90894	0,75095	0,62042
28	0,90561	0,74272	0,60913
29	0,90229	0,73459	0,59805
30	0,89899	0,72654	0,58717
31	0,89569	0,71858	0,57649
32	0,89241	0,71071	0,566
33	0,88914	0,70292	0,5557
34	0,88588	0,69522	0,54559
35	0,88263	0,6876	0,53567
36	0,8794	0,68007	0,52592
37	0,87617	0,67262	0,51636
38	0,87296	0,66525	0,50696

11.2.3 Benzol-Toluol keverék „kvázi kísérleti” adatok

	Toluol_SINGLE	Benzol_SINGLE	Toluol_MIXED	Benzol_MIXED
1	1	1	1	1
2	0,908464	0,925889854	0,944594069	0,988071713
3	0,8253069	0,857272021	0,892257956	0,97628571
4	0,7497616	0,793739466	0,842821573	0,964640293
5	0,6811314	0,734915318	0,79612426	0,953133787
6	0,6187834	0,680450636	0,752014254	0,941764534
7	0,5621424	0,63002234	0,710348205	0,930530896
8	0,5106862	0,583331292	0,670990701	0,919431256
9	0,46394	0,540100525	0,633813837	0,908464016
10	0,4214728	0,500073596	0,598696792	0,897627596
11	0,3828929	0,463013068	0,565525439	0,886920437
12	0,3478444	0,428699102	0,534191975	0,876340995
13	0,3160041	0,396928149	0,504594572	0,865887748
14	0,2870784	0,367511746	0,47663704	0,85555919
15	0,2608004	0,340275396	0,450228521	0,845353835
16	0,2369278	0,315057537	0,425283191	0,835270211
17	0,2152403	0,291708577	0,40171998	0,825306868
18	0,1955381	0,270090011	0,379462311	0,815462371

19	0,1776393	0,250073601	0,358437848	0,805735302
20	0,1613789	0,23154061	0,338578266	0,79612426
21	0,146607	0,214381101	0,319819022	0,786627861
22	0,1331871	0,198493287	0,302099151	0,777244738
23	0,1209957	0,18378292	0,285361067	0,76797354
24	0,1099203	0,170162741	0,269550371	0,758812931
25	0,0998586	0,157551955	0,254615682	0,749761592
26	0,090718	0,145875757	0,240508463	0,740818221
27	0,082414	0,135064883	0,227182868	0,731981528
28	0,0748701	0,125055205	0,21459559	0,723250242
29	0,0680168	0,115787345	0,202705721	0,714623106
30	0,0617908	0,107206328	0,191474622	0,706098876
31	0,0561348	0,099261252	0,180865793	0,697676326
32	0,0509964	0,091904986	0,170844755	0,689354243
33	0,0463284	0,085093894	0,161378942	0,681131427
34	0,0420877	0,078787573	0,152437592	0,673006696
35	0,0382352	0,072948614	0,143991645	0,664978879
36	0,0347353	0,067542382	0,136013654	0,65704682
37	0,0315557	0,062536806	0,128477691	0,649209377
38	0,0286672	0,057902194	0,121359265	0,641465421
39	0,0260432	0,053611054	0,114635242	0,633813837
40	0,0236593	0,049637931	0,10828377	0,626253524
41	0,0214936	0,045959257	0,102284207	0,618783392
42	0,0195262	0,042553209	0,096617055	0,611402366
43	0,0177388	0,039399585	0,091263897	0,604109383
44	0,0161151	0,036479676	0,086207336	0,596903393
45	0,01464	0,033776162	0,081430938	0,589783358
46	0,0132999	0,031273005	0,076919181	0,582748252
47	0,0120825	0,028955358	0,072657403	0,575797064
48	0,0109765	0,026809473	0,068631752	0,568928791
49	0,0099717	0,024822619	0,064829146	0,562142445
50	0,009059	0,022983011	0,061237226	0,555437049
51	0,0082297	0,021279736	0,057844321	0,548811636
52	0,0074764	0,019702692	0,054639402	0,542265253
53	0,0067921	0,018242523	0,051612056	0,535796958
54	0,0061703	0,016890567	0,048752442	0,529405818
55	0,0056055	0,015638804	0,046051267	0,523090913

11.3 Paraméterbecslési regressziós modell egyenletek elméleti hibaanalízise

A kiindulási szubsztrát koncentráció időbeli változásának kifejezése elsőrendű differenciálegyenlet segítségével:

$$\frac{dS}{dt} = \left(-\frac{dP}{dt} \right) = -v_{max} \cdot \frac{S}{K_M + S} \quad (\text{M1})$$

Az (M1) egyenlet zérus- (**I.a.** : $S \gg K_M$) és elsőrendű (**I.b.** : $K_M \gg S$) szubsztrát koncentráció tartományokban a hibaanalízis eredményeit a következő levezetésekből kapjuk meg:

$$\text{I.a)} \quad S \gg K_M, \quad \frac{dS}{dt} = -v_{max} \cdot \frac{S}{K_M + S} \approx -v_{max}$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{S_i \pm \Delta h_S - S_{i+1} \pm \Delta h_S}{\Delta t} \approx -v_{max} \pm \Delta v_{max}$$

$$\frac{S_i \pm \Delta h_S - S_{i+1} \pm \Delta h_S}{\Delta t} = \frac{\Delta S}{\Delta t} \pm 2 \cdot \frac{\Delta h_S}{\Delta t} \approx -v_{max} \pm \Delta v_{max},$$

zérusrendű reakciósebesség tartományban lehetséges a következő megközelítés

$$\begin{aligned} \frac{\Delta S}{\Delta t} &\approx -v_{max}, \text{ így} \\ &\pm 2 \cdot \frac{\Delta h_S}{\Delta t} \approx \pm \Delta v_{max} \end{aligned} \quad (\text{M2})$$

a maximális reakciósebesség becslési hibája (Δv_{max}) egyenesen arányos a szubsztrát koncentráció hibájával (Δh_S) és fordítottan arányos a numerikus differenciálás lépésközével (Δt).

$$\text{I.b)} \quad K_M \gg S, \quad \frac{dS}{dt} = -v_{max} \frac{S}{K_M + S} \approx -v_{max} \frac{S}{K_M} = -\frac{v_{max}}{K_M} \cdot S$$

$$\frac{dS}{dt} = \frac{S_i \pm \Delta h_S - S_{i+1} \pm \Delta h_S}{\Delta t} = \frac{\Delta S}{\Delta t} \pm 2 \cdot \frac{\Delta h_S}{\Delta t}$$

és

$$-\left(\frac{v_{max}}{K_M} \pm \Delta m \right) \cdot (S \pm \Delta h_S) = -\frac{v_{max}}{K_M} \cdot S \pm S \cdot \Delta m \pm \frac{v_{max}}{K_M} \cdot \Delta h_S \pm \Delta m \cdot \Delta h_S,$$

$$\text{így felírható: } \frac{\Delta S}{\Delta t} \pm 2 \cdot \frac{\Delta h_S}{\Delta t} = -\frac{v_{max}}{K_M} \cdot S \pm S \cdot \Delta m \pm \frac{v_{max}}{K_M} \cdot \Delta h_S \pm \Delta m \cdot \Delta h_S.$$

$$\text{Mivel } \frac{\Delta S}{\Delta t} \approx -\frac{v_{max}}{K_M} \cdot S,$$

így

$$\pm 2 \cdot \frac{\Delta h_s}{\Delta t} \approx \pm S \cdot \Delta m \pm \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot \Delta h_s \pm \Delta m \cdot \Delta h_s. \quad (\text{M3})$$

$S \gg \Delta h_s$ és $\frac{v_{\max}}{K_M} \gg \Delta m$ relációk fennállása esetén a (M3) összefüggésben a $\pm \Delta m \Delta h_s$ a többihez képest elhanyagolható ($\pm \Delta m \Delta h_s \approx 0$). Ekkor

$$\pm 2 \cdot \frac{\Delta h_s}{\Delta t} \approx \pm S \cdot \Delta m \pm \frac{v_{\max}}{K_M} \cdot \Delta h_s \quad (\text{M3.1})$$

$$\pm 2 \cdot \frac{\Delta h_s}{\Delta t} - \frac{v_{\max}}{K_M} \Delta h_s = \pm \left(\frac{2}{\Delta t} - \frac{v_{\max}}{K_M} \right) \cdot \Delta h_s \approx \pm S \cdot \Delta m. \quad (\text{M3.1.1})$$

(M3.1.1)-ből kifejezhető a szubsztrát koncentráció relatív hibája:

$$\pm \delta_s = \pm \frac{\Delta h_s}{S} \approx \pm \frac{\Delta m}{\left(\frac{2}{\Delta t} - \frac{v_{\max}}{K_M} \right)} \quad (\text{M3.2})$$

Rendezve a (M3.2) egyenletet, kapjuk:

$$\pm \delta_s \cdot \left(\frac{2}{\Delta t} - \frac{v_{\max}}{K_M} \right) \approx \pm \Delta m \quad (\text{M3.2.1.})$$

Az elsőrendű sebességi tartományában a maximális reakció sebesség és a Michaelis konstans hányadosának abszolút hibája (Δm) egyenesen arányos a szubsztrát koncentráció relatív hibájával (δ_s). A numerikus differenciálás lépésköze (Δt) fordítottan arányosan befolyásolja a v_{\max} / K_M becslés jószágát, tehát Δt értékének optimalását is figyelembe kell venni a paraméterbecslés folyamán.

Az (M1) egyenlet analitikus megoldása (M1.1) implicit összefüggést szolgáltatja, amelynek hibaelemzése már Δt figyelembe vételét kikerüli.

$$K_M \cdot \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) + S - S_0 = -v_{\max} \cdot t \quad (\text{M1.1})$$

Az (1.1) többváltozós, lineáris egyenlet hibaterjedési elemzését II. levezetés szolgáltatja.

$$\text{II.} \quad K_M \cdot \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) + S - S_0 = -v_{\max} \cdot t$$

$$-\frac{K_M}{v_{\max}} \cdot \ln \left(\frac{S}{S_0} \right) - \frac{1}{v_{\max}} \cdot S + \frac{S_0}{v_{\max}} = t, \quad (\text{M4})$$

Legyen $Kv = \frac{K_M}{v_{\max}}$ és $rv = \frac{1}{v_{\max}}$.

$$-Kv \cdot \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) - rv \cdot S + rv \cdot S_0 = t \quad (\text{M4.1})$$

$$-Kv \cdot \ln S + Kv \cdot \ln S_0 - rv \cdot S + rv \cdot S_0 = t \quad (\text{M4.1.1})$$

(M4.1.1) szorzattagjaira alkalmazva a hibaterjedési relációkat:

$$\begin{aligned} & -Kv \cdot \ln S \cdot \frac{\Delta \ln S}{\ln S} - Kv \cdot \ln S \cdot \frac{\Delta Kv}{Kv} + Kv \cdot \ln S_0 \cdot \frac{\Delta \ln S_0}{\ln S_0} + \\ & K_M \cdot \ln S_0 \cdot \frac{\Delta Kv}{Kv} - rv \cdot S \cdot \Delta h_S + rv \cdot S_0 \cdot \Delta rv = \Delta h_t, \end{aligned} \quad (\text{M4.1.2})$$

ahol Δh_S – a szubsztrát koncentráció abszolút hibája és Δh_t – az idő becslés abszolút hibája.

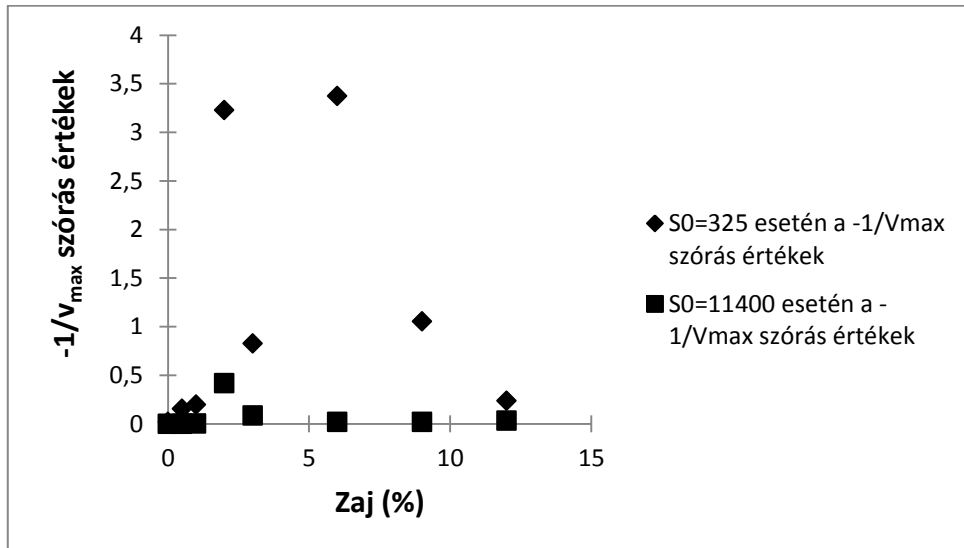
Egyszerűsítés és a logaritmus függvény Gauss-féle hibaterjedési sajátága alapján:

$$-Kv \cdot \frac{\Delta h_S}{S} - \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) \cdot \Delta Kv + Kv \cdot \frac{\Delta h_S}{S_0} - rv \cdot S \cdot \Delta h_S + rv \cdot S_0 \cdot \Delta rv = \Delta h_t \quad (\text{M4.1.3})$$

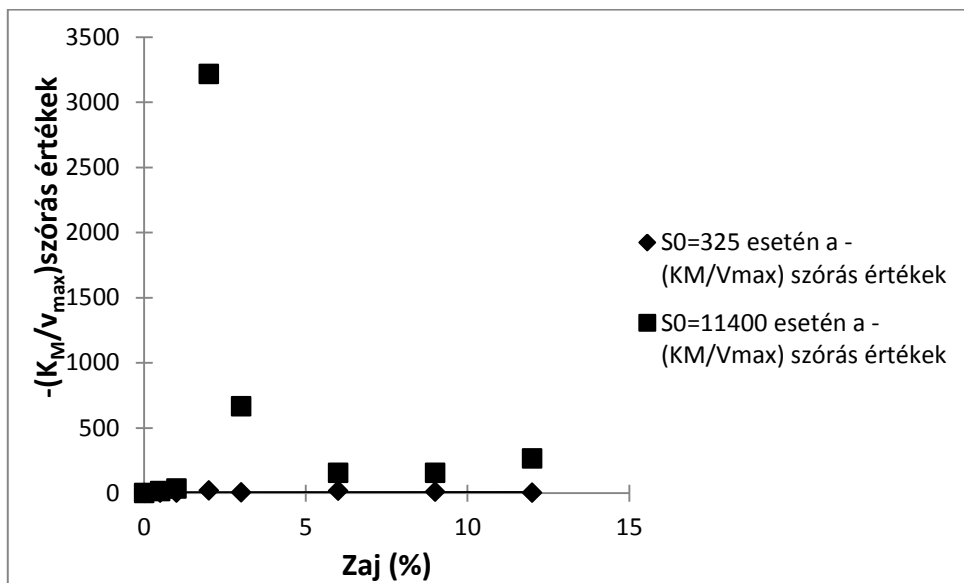
(M4.1.3)-ból kifejezve a maximális reakciósebesség reciprokának (rv) hibáját a következőt kapjuk:

$$\Delta rv = \Delta h_t \cdot \frac{K_M}{S_0} + \left(\frac{K_M}{S \cdot S_0} + \frac{K_M}{S_0^2} + \frac{S}{S_0} \right) \Delta h_S + \frac{K_M}{S_0} \cdot \ln\left(\frac{S}{S_0}\right) \cdot \frac{\Delta Kv}{Kv} \quad (\text{M4.2})$$

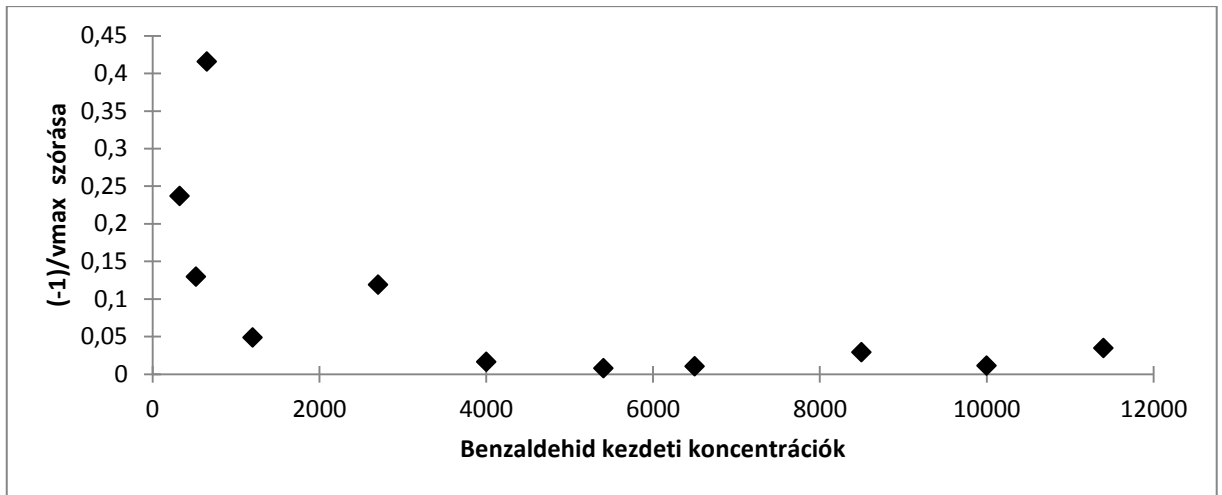
11.3.1 Az (1) regressziós modell Lineweaver–Burk-féle paraméterbecslés esetén tapasztalt véletlenszerű kiugró szórásértékek az alkalmazott zajhatás eredményeként



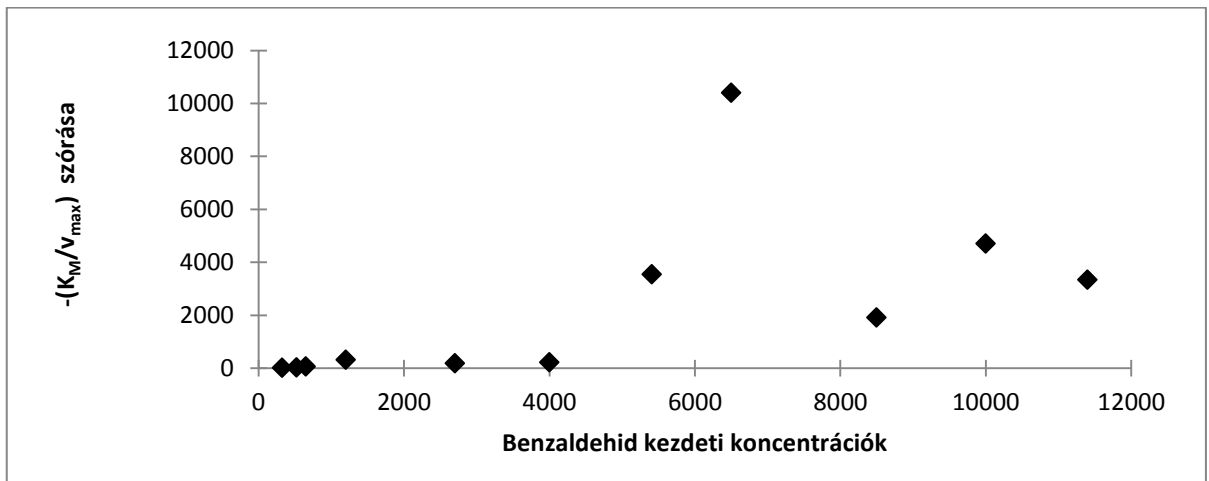
M11.3.1.a ábra. Zajhatása a benzaldehid $-1/v_{max}$ szórásértékeire első-, illetve zérusrendű tartományban (Lineweaver–Burk becslés esetén)



M11.3.1.b ábra. Zajhatása a benzaldehid $-(K_M/v_{max})$ szórásértékeire első-, illetve zérusrendű tartományban (Lineweaver–Burk becslés esetén)



M11.3.2.a ábra. A kiindulási koncentráció hatása a $-1/v_{max}$ becült paraméter szórásértékeire 5%-os zaj esetén (Lineweaver–Burk kettős reciprok becslés)



M11.3.2.b ábra. A benzaldehid kiindulási koncentrációinak hatása a $-(K_M/v_{max})$ becült paraméter szórásértékeire 5%-os zaj esetén (Lineweaver–Burk kettős reciprok becslés)

M11.3.3.a táblázat. Zajhatása a benzaldehid $-1/v_{max}$ és $-(K_M/v_{max})$ becslött értékeire, illetve szórásaira az elsőrendű tartományban a két különböző becslési módszer alkalmazásával, félkövérrel jelölve a véletlenszerű kiugró értékek a Lineweaver–Burk becslés esetén

		(-1)/v _{max} számított érték: -0,01761				-(K _M /v _{max}) számított érték: -11,44809			
Koncentráció: 11400 μmol		(-1)/v _{max} becslött érték		(-1)/v _{max} szórásérték		-(K _M /v _{max}) becslött érték		-(K _M /v _{max}) szórásérték	
Zaj mértéke (%)	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	
0	-0,01761	-0,01760	4,399E-09	2,425E-07	-11,44835	-11,60480	3,493E-05	1,856E-03	
0,05	-0,01767	-0,01731	1,338E-04	1,703E-03	-10,80820	-17,27152	1,062	13,035	
1	-0,01776	-0,02171	2,619E-04	4,333E-03	-10,06726	4,14747	2,080	33,169	
2	-0,01719	-0,48472	6,187E-04	4,194E-01	-14,80304	4199,59890	4,923	3214,814	
3	-0,01800	-0,00150	9,104E-04	8,682E-02	-8,37728	102,47463	7,222	664,069	
6	-0,01695	0,00285	1,754E-03	2,007E-02	-15,73966	-27,14658	13,860	152,726	
9	-0,01507	0,02387	2,647E-03	2,007E-02	-28,38150	-201,83128	21,204	152,961	
12	-0,01459	0,04188	3,424E-03	3,446E-02	-32,35214	-418,99208	27,224	263,315	

M11.3.3.b táblázat. Zajhatása a benzaldehid $-1/v_{max}$ és $-(K_M/v_{max})$ becslött értékeire, illetve szórásaira az zérusrendű tartományban a két különböző becslési módszer alkalmazásával, félkövérrel jelölve a véletlenszerű kiugró értékek a Lineweaver–Burk becslés esetén

		(-1)/v _{max} számított érték: -0,01761				-(K _M /v _{max}) számított érték: -11,44809			
Koncentráció: 325 μmol		(-1)/v _{max} becslött érték		(-1)/v _{max} szórásérték		-(K _M /v _{max}) becslött érték		-(K _M /v _{max}) szórásérték	
Zaj mértéke (%)	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	Többváltozós lineáris becslés	Lineweaver–Burk-féle regressziós becslés	
0	-0,01761	-0,02088	1,645E-08	1,997E-02	-11,44810	-12,47562	9,675E-07	1,503E-03	
0,05	-0,01731	0,01843	5,267E-04	1,554E-01	-11,47067	-13,44356	0,031	0,972	
1	-0,01748	0,20639	3,969E-04	1,988E-01	-11,46033	-16,67898	0,023	1,234	
2	-0,01999	0,04150	1,206E-03	3,230E+00	-11,23934	-13,77381	0,070	19,104	
3	-0,02118	-0,73262	3,040E-03	8,273E-01	-11,18468	7,28316	0,178	4,604	
6	-0,02909	2,36036	6,274E-03	3,374E+00	-10,46210	0,01746	0,358	16,176	
9	-0,00893	-0,75970	6,861E-03	1,055E+00	-12,39439	11,61245	0,423	8,109	
12	-0,03399	-0,51221	9,042E-03	2,367E-01	-9,99326	2,14991	0,505	1,058	

11.4 Biológiai (giliszta) extraktum előállítása a modell szennyező anyagok biokatalitikus lebontásához

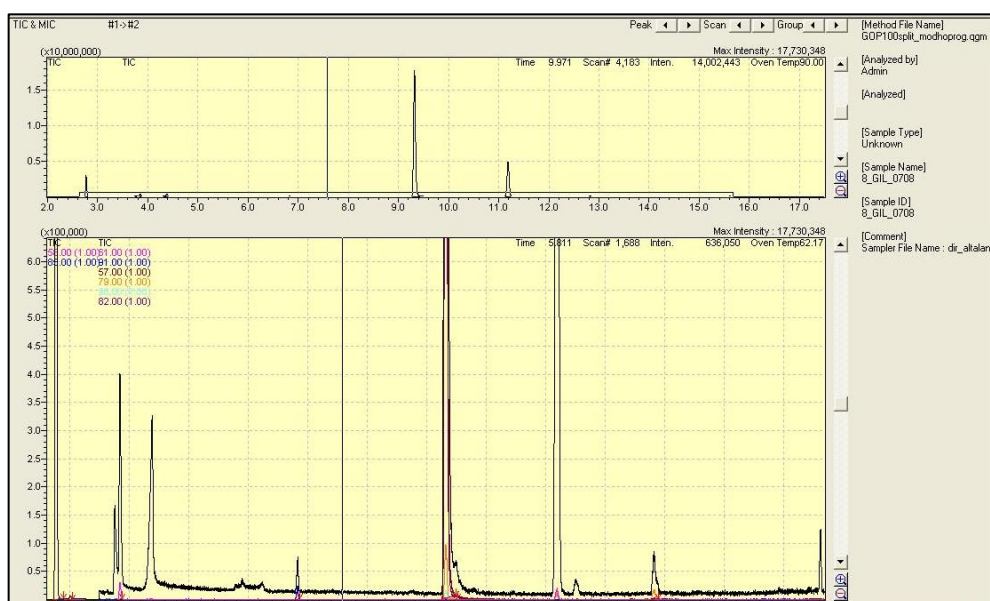
Mintaelőkészítés:

Egyenlő tömegarányú földi giliszta és kvarchomok dörzsmozsárban való homogénezálását (fém eszközök használatának mellőzése javasolt) követően, a keverék és 10 ml fiziológias pH-jú K-NA-P puffer bemérése műanyag 50 ml-es centrifugacsőbe.

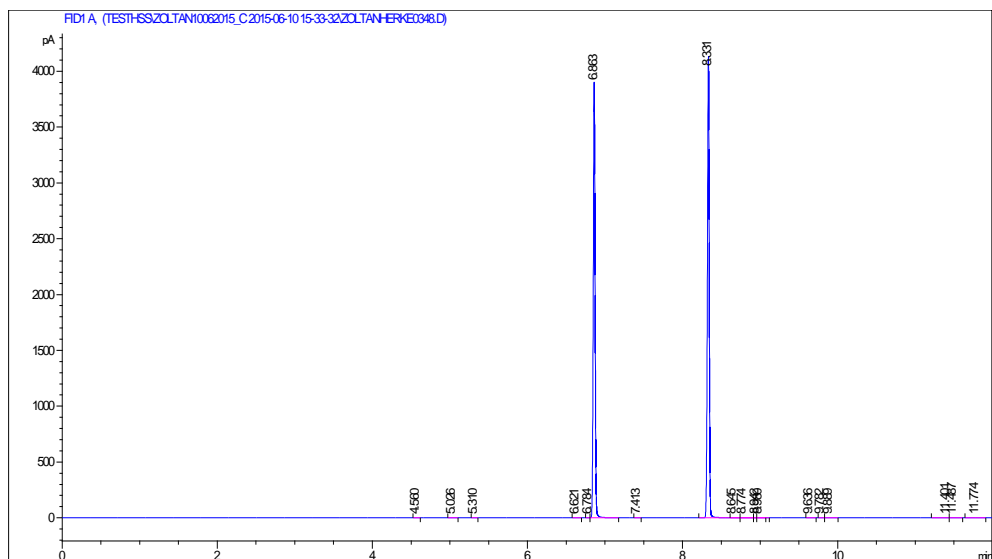
Extrakció:

20°C-on 15 percen keresztül először 6000, majd a felúszót leválasztva illetve azt ismételtén 18000 fordulat/perc sebességgel 5 percig centrifugáljuk. Az így kapott kivonat alkalmas szennyező anyagok biokatalitikus lebontásának vizsgálatára GC-MS analitikai technikával.

11.5 GC, illetve GC-MS analízisek egy-egy reprezentáns kromatogramja

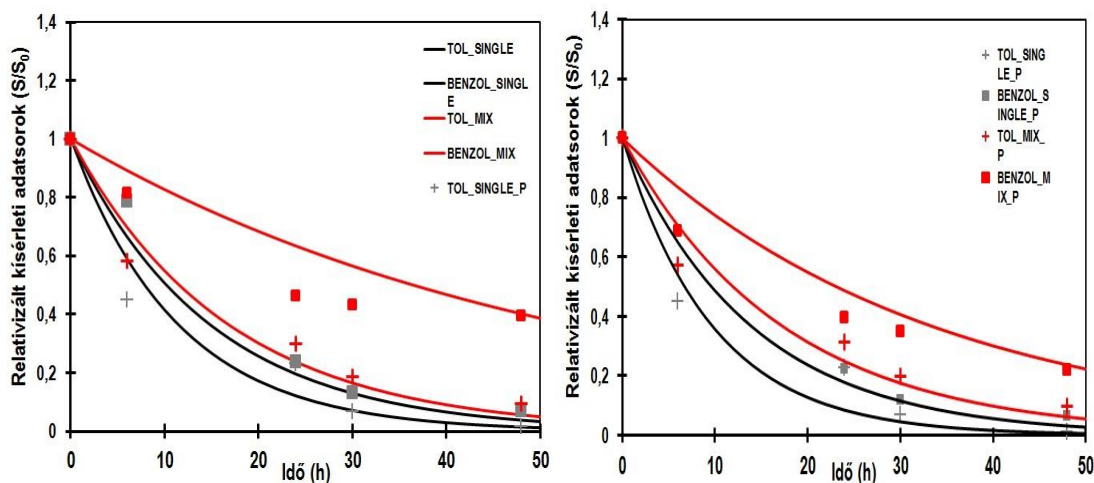


M3.1. ábra. Gilisztaextraktummal végzett biokatalitikus kísérlet GC-MS kromatogramja



M3.2. ábra. Szénhidrogénbontó biokatalitikus termékkel végzett kísérlet GC kromatogramja

11.6 Benzol-toluol biokatalitikus párhuzamos kísérletek lebontási relativizált kinetikai görbéi és koncentráció értékei



M6.a. és b. ábra. Biokatalitikus termékkel végzett benzol és toluol három párhuzamos kísérlet lebontási, relativizált kinetikai görbéinek eredményei (harmadikat lásd a dolgozat szövegtörzsében 28. ábra.) Az egyes pontok az ábrán a relativizált kísérleti koncentráció adatokat jelöli, míg a vonalak pontokra illesztett exponenciális függvényvel nyert „kvázi” mérési kinetikai adatsorokat jelöli. „SINGLE”: az adott komponens önmagában, „MIXED” a két komponens keverékeként történt a vizsgálat.

11.7 Regressziós egyenesek Statsdirect-tel végzett kovariancia analízise (ANCOVA)

11.7.1 Modell adatsorok

11.7.2 Autokorrelációs és inhibíciós regressziós egyenesek kovariancia analízise

Grouped linear regression

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Common slope	4,081923	1	4,081923	2241,685744 P < 0,0001
Between slopes	0,022447	1	0,022447	12,327036
P = 0,0008				
Separate residuals	0,120181	66	0,001821	
Within groups	4,22455	68		

Common slope is significant
Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benzaldehyde) vs. *slope 2* (BENZAL_INH3) = 1,042998 vs. 1,210482
Difference (95% CI) = 0,167484 (0,072242 to 0,262725)
t = -3,510988 P = 0,0008

Covariance analysis

Uncorrected:

<u>Source of variation</u>	<u>YY</u>	<u>xY</u>	<u>xx</u>	<u>DF</u>
Between groups	-3,30E-17	3,80E-16	0,7999691	
Within	4,22455	3,669955	3,299565	68
Total	4,22455	3,669955	4,099534	69

Corrected:

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Between groups	0,796533	1	0,796533	374,176536
Within	0,142627	67	0,002129	
Total	0,93916	68		

P < 0,0001

Corrected Y means ± SE for baseline mean predictor of 0,610319:

Y' = 0,638029 ± 0,008258

Y' = 0,400224 ± 0,008258

Line separations (common slope = 1,112254):

Lines not parallel

line 1 (Benzaldehyde) vs. *line 2* (BENZAL_INH3) vertical separation = 0,237805

95% CI = 0,213267 to 0,262344

t = 19,343643 (67 df) P < 0,0001

11.7.3 Referencia és inhibíciós regressziós egyenesek kovariancia analízise

Grouped linear regression

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Common slope	5,286404	1	5,286404	889,378112 P < 0,0001
Between slopes	1,669637	3	0,556546	93,632578
P < 0,0001				
Separate residuals	0,784599	132	0,005944	
Within groups	7,74064	136		

Common slope is significant
Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benzaldehyde) vs. *slope 2* (BENZAL_INH3) = 0,912969 vs. 1,14127

Difference (95% CI) = 0,228301 (0,063265 to 0,393336)

t = -2,736391 P = 0,0071

slope 1 (Benzaldehyde) vs. *slope* 3 (BENZAL_INH2) = 0,912969 vs. 1,984609
 Difference (95% CI) = 1,07164 (0,817567 to 1,325713)
 t = -8,343311 P < 0,0001
slope 1 (Benzaldehyde) vs. *slope* 4 (BENZAL_INH1) = 0,912969 vs. 9,923527
 Difference (95% CI) = 9,010558 (7,806686 to 10,21443)
 t = -14,805372 P < 0,0001
slope 2 (BENZAL_INH3) vs. *slope* 3 (BENZAL_INH2) = 1,14127 vs. 1,984609
 Difference (95% CI) = 0,84334 (0,576115 to 1,110564)
 t = -6,242732 P < 0,0001
slope 2 (BENZAL_INH3) vs. *slope* 4 (BENZAL_INH1) = 1,14127 vs. 9,923527
 Difference (95% CI) = 8,782257 (7,575541 to 9,988973)
 t = -14,396239 P < 0,0001
slope 3 (BENZAL_INH2) vs. *slope* 4 (BENZAL_INH1) = 1,984609 vs. 9,923527
 Difference (95% CI) = 7,938918 (6,716838 to 9,160998)
 t = -12,850191 P < 0,0001

Covariance analysis

Uncorrected:

<u>Source of variation</u>	<u>YY</u>	<u>xY</u>	<u>xx</u>	<u>DF</u>
Between groups	1,38E-15	5,41E-15	7,2105413	
Within 7,74064	4,650281	4,090705	136	
Total 7,74064	4,650281	11,301245	139	

Corrected:

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Between groups	3,372888	3	1,12429661,844058	
Within 2,454236	135	0,01818		
Total 5,827124	138			

P < 0,0001

Corrected Y means ± SE for baseline mean predictor of 0,729508:

Y' = 0,912706 ± 0,033098
 Y' = 0,517384 ± 0,022805
 Y' = 0,358674 ± 0,02432
 Y' = 0,224903 ± 0,028039

Line separations (common slope = 1,136792):

Lines not parallel

line 1 (Benzaldehyde) vs. *line* 2 (BENZAL_INH3) vertical separation = 0,395321

95% CI = 0,316802 to 0,47384

t = 9,957172 (135 df) P < 0,0001

line 1 (Benzaldehyde) vs. *line* 3 (BENZAL_INH2) vertical separation = 0,554032

95% CI = 0,463523 to 0,644541

t = 12,106086 (135 df) P < 0,0001

line 1 (Benzaldehyde) vs. *line* 4 (BENZAL_INH1) vertical separation = 0,687803

95% CI = 0,585694 to 0,789912

t = 13,321684 (135 df) P < 0,0001

line 2 (BENZAL_INH3) vs. *line* 3 (BENZAL_INH2) vertical separation = 0,158711

95% CI = 0,092364 to 0,225058

t = 4,730889 (135 df) P < 0,0001

line 2 (BENZAL_INH3) vs. *line* 4 (BENZAL_INH1) vertical separation = 0,292482

95% CI = 0,220275 to 0,364688

t = 8,010899 (135 df) P < 0,0001

line 3 (BENZAL_INH2) vs. *line* 4 (BENZAL_INH1) vertical separation = 0,133771

95% CI = 0,068167 to 0,199375

t = 4,032669 (135 df) P < 0,0001

11.7.4 Referencia és aktiválási regressziós egyenesek

Grouped linear regression

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Common slope	4,58155	1	4,58155	1747,769242 P < 0,0001
Between slopes	0,046919	3	0,01564	5,966197
				P = 0,0008
Separate residuals	0,346021	132	0,002621	
Within groups	4,974489	136		

Common slope is significant
Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benz_ref) vs. slope 2 (Benz_akt3) = 0,756825 vs. 0,632944

Difference (95% CI) = 0,12388 (0,033645 to 0,214116)

t = 2,715654 P = 0,0075

slope 1 (Benz_ref) vs. slope 3 (Benz_akt2) = 0,756825 vs. 0,594631

Difference (95% CI) = 0,162193 (0,073133 to 0,251254)

t = 3,60242 P = 0,0004

slope 1 (Benz_ref) vs. slope 4 (Benz_akt1) = 0,756825 vs. 0,579126

Difference (95% CI) = 0,177699 (0,088097 to 0,267301)

t = 3,922958 P = 0,0001

slope 2 (Benz_akt3) vs. slope 3 (Benz_akt2) = 0,632944 vs. 0,594631

Difference (95% CI) = 0,038313 (-0,042909 to 0,119535)

t = 0,93308 P = 0,3525

slope 2 (Benz_akt3) vs. slope 4 (Benz_akt1) = 0,632944 vs. 0,579126

Difference (95% CI) = 0,053818 (-0,027997 to 0,135634)

t = 1,301199 P = 0,1955

slope 3 (Benz_akt2) vs. slope 4 (Benz_akt1) = 0,594631 vs. 0,579126

Difference (95% CI) = 0,015506 (-0,065013 to 0,096024)

t = 0,380926 P = 0,7039

Covariance analysis

Uncorrected:

<u>Source of variation</u>	<u>YY</u>	<u>xY</u>	<u>xx</u>	<u>DF</u>
Between groups	-2,69E-15	-2,81E-16	1,6475353	
Within	4,974489	7,26111	11,507837	136
Total	4,974489	7,26111	13,155372	139

Corrected:

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Between groups	0,573778	3	0,19125965	7,0987
Within	0,39294	135	0,002911	
Total	0,966718	138		

P < 0,0001

Corrected Y means \pm SE for baseline mean predictor of 0,366031:

$Y' = 0,558328 \pm 0,00949$

$Y' = 0,648026 \pm 0,009127$

$Y' = 0,704065 \pm 0,009179$

$Y' = 0,739647 \pm 0,009324$

Line separations (common slope = 0,630971):

Lines not parallel

line 1 (Benz_ref) vs. line 2 (Benz_akt3) vertical separation = -0,089699

95% CI = -0,115593 to -0,063804

t = -6,850706 (135 df) P < 0,0001

line 1 (Benz_ref) vs. line 3 (Benz_akt2) vertical separation = -0,145738

95% CI = -0,172258 to -0,119217
 t = -10,868158 (135 df) P < 0,0001
line 1 (Benz_ref) vs. *line 4* (Benz_akt1) vertical separation = -0,181319
 95% CI = -0,208379 to -0,15426
 t = -13,25193 (135 df) P < 0,0001
line 2 (Benz_akt3) vs. *line 3* (Benz_akt2) vertical separation = -0,056039
 95% CI = -0,081697 to -0,030381
 t = -4,319407 (135 df) P < 0,0001
line 2 (Benz_akt3) vs. *line 4* (Benz_akt1) vertical separation = -0,091621
 95% CI = -0,117532 to -0,065709
 t = -6,992999 (135 df) P < 0,0001
line 3 (Benz_akt2) vs. *line 4* (Benz_akt1) vertical separation = -0,035582
 95% CI = -0,061149 to -0,010015
 t = -2,752342 (135 df) P = 0,0067

11.7.5 Kísérleti adatsorok

11.7.6 Földgizsztatá extraktummal végzett biokatalitikus kísérletekből származtatott regresszió egyenesek kovariancia analízise

Grouped linear regression

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Common slope	0,834843	1	0,834843	4904,690442 P < 0,0001
Between slopes	0,258048	2	0,129024	758,014906
				P < 0,0001
Separate residuals	0,018383	108	0,00017	
Within groups	1,111274	111		

Common slope is significant
 Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benzaldehid inhibíciós adatsora) vs. *slope 2* (Benzaldehd mentes adatsora) = 1,399853 vs. 1

Difference (95% CI) = 0,399853 (0,326724 to 0,472982)

t = 10,838079 P < 0,0001

slope 1 (Benzaldehid inhibíciós adatsora) vs. *slope 3* (Benzaldehid aktiválási adatsora) = 1,399853 vs. 0,403218

Difference (95% CI) = 0,996635 (0,93458 to 1,058691)

t = 31,834463 P < 0,0001

slope 2 (Benzaldehd mentes adatsora) vs. *slope 3* (Benzaldehid aktiválási adatsora) = 1 vs. 0,403218

Difference (95% CI) = 0,596782 (0,550805 to 0,642759)

t = 25,728815 P < 0,0001

Covariance analysis

Uncorrected:

<u>Source of variation</u>	<u>YY</u>	<u>xY</u>	<u>xx</u>	<u>DF</u>
Between groups	1,01E-14	3,61E-16	3,5861742	
Within	1,111274	1,508967	2,727436	111
Total	1,111274	1,508967	6,313609	113

Corrected:

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
----------------------------	------------	-----------	------------	-----------

Between groups	0,474197	2	0,23709894,348268
Within	0,276431	110	0,002513
Total	0,750628	112	

P < 0,0001

Corrected Y means \pm SE for baseline mean predictor of 0,729797:

Y' = 0,75266 \pm 0,009261

Y' = 0,776096 \pm 0,008719

Y' = 0,971545 \pm 0,011115

Line separations (common slope = 0,553255):

Lines not parallel

line 1 (Benzaldehyd inhibíciós adatsora) vs. *line 2* (Benzaldehyd mentes adatsora) vertical separation = -0,023437

95% CI = -0,04637 to -0,000503

t = -2,02524 (110 df) P = 0,0453

line 1 (Benzaldehyd inhibíciós adatsora) vs. *line 3* (Benzaldehyd aktiválási adatsora) vertical separation = -0,218885

95% CI = -0,251837 to -0,185933

t = -13,163832 (110 df) P < 0,0001

line 2 (Benzaldehyd mentes adatsora) vs. *line 3* (Benzaldehyd aktiválási adatsora) vertical separation = -0,195449

95% CI = -0,22661 to -0,164287

t = -12,429746 (110 df) P < 0,0001

11.7.7 Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (benzaldehyd-toluol)

Grouped linear regression

Source of variation	SSq	DF	MSq	VR
Common slope	2,478069	1	2,478069	1743,733846 P < 0,0001
Between slopes	0,026925	1	0,026925	18,94612
	P < 0,0001			
Separate residuals	0,133586	94	0,001421	
Within groups	2,63858	96		

Common slope is significant

Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benzaldehyd önmagában) vs. *slope 2* (Benzaldehyd MIXBEN) = 0,756394 vs. 1

Difference (95% CI) = 0,243606 (0,132483 to 0,354728)

t = -4,352714 P < 0,0001

Covariance analysis

Uncorrected:

Source of variation	YY	xY	xx	DF
Between groups	1,405555	3,093323	6,8077341	
Within	2,63858	3,143623	3,987931	96
Total	4,044135	6,236946	10,795665	97

Corrected:

Source of variation	SSq	DF	MSq	VR
Between groups	0,280372	1	0,280372	165,941272
Within	0,160511	95	0,00169	

Total 0,440883 96
 P < 0,0001

Corrected Y means \pm SE for baseline mean predictor of 0,548712:

$Y' = 0,780522 \pm 0,007995$

$Y' = 0,604513 \pm 0,007995$

Line separations (common slope = 0,788284):

Lines not parallel

line 1 (Benzaldehyd önmagában) vs. *line* 2 (Benzaldehyd MIXBEN) vertical separation = 0,176009

95% CI = 0,148884 to 0,203134

t = 12,881819 (95 df) P < 0,0001

11.7.8 Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (toluol-benzol)

Grouped linear regression

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Common slope	6,479349	1	6,479349	1994,342701 P < 0,0001
Between slopes	0,597689	1	0,597689	183,968488 P < 0,0001
Separate residuals	0,34438	106	0,003249	
Within groups	7,421417	108		

Common slope is significant

Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benzol önmagában) vs. *slope* 2 (Benzol MIXBEN) = 0,967469 vs. 1,812387

Difference (95% CI) = 0,844918 (0,721415 to 0,968421)

t = -13,563498 P < 0,0001

Covariance analysis

Uncorrected:

<u>Source of variation</u>	<u>YY</u>	<u>xY</u>	<u>xx</u>	<u>DF</u>
Between groups	0,37172	1,581549	6,7289831	
Within	7,421417	5,614033	4,86428	108
Total	7,793137	7,195582	11,593263	109

Corrected:

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Between groups	2,384992	1	2,384992	270,887112
Within	0,942068	107	0,008804	
Total	3,32706	108		

P < 0,0001

Corrected Y means \pm SE for baseline mean predictor of 0,489114:

$Y' = 0,483072 \pm 0,016456$

$Y' = 0,028429 \pm 0,016456$

Line separations (common slope = 1,154134):

Lines not parallel

line 1 (Benzol önmagában) vs. *line* 2 (Benzol MIXBEN) vertical separation = 0,454643

95% CI = 0,399883 to 0,509403

t = 16,458649 (107 df) P < 0,0001

11.7.9 Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (toluol-benzol)

Grouped linear regression

Source of variation	SSq	DF	MSq	VR
Common slope	3,826794	1	3,826794	1239,733123 P < 0,0001
Between slopes	0,109825	1	0,109825	35,579192 P < 0,0001
Separate residuals	0,160513	52	0,003087	
Within groups	4,097132	54		

Common slope is significant
Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benzol önmagában) vs. *slope* 2 (Benzol MIXBEN) = 0,978836 vs. 1,379404
Difference (95% CI) = 0,400568 (0,265812 to 0,535325)
t = -5,96483 P < 0,0001

Covariance analysis

Uncorrected:

Source of variation	YY	xY	xx	DF
Between groups	0,101537	0,420477	1,7412521	
Within	4,097132	3,44656	3,104106	54
Total	4,198669	3,867037	4,845358	55

Corrected:

Source of variation	SSq	DF	MSq	VR
Between groups	0,842083	1	0,842083	165,090844
Within	0,270338	53	0,005101	
Total	1,112421	54		

P < 0,0001

Corrected Y means ± SE for baseline mean predictor of 0,450968:

Y' = 0,415488 ± 0,015273

Y' = 0,109075 ± 0,015273

Line separations (common slope = 1,110323):

Lines not parallel

line 1 (Benzol önmagában) vs. *line* 2 (Benzol MIXBEN) vertical separation = 0,306414
95% CI = 0,258581 to 0,354246

t = 12,848768 (53 df) P < 0,0001

11.7.10 Biokatalitikus termékkel végzett kísérletekből származtatott regressziós egyenesek kovariancia analízise (toluol-benzol)

Grouped linear regression

Source of variation	SSq	DF	MSq	VR
Common slope	3,883378	1	3,883378	1890,166766 P < 0,0001
Between slopes	0,054032	1	0,054032	26,299371 P < 0,0001
Separate residuals	0,106835	52	0,002055	
Within groups	4,044245	54		

Common slope is significant
Difference between slopes is significant

Slope comparisons:

slope 1 (Benzol önmagában) vs. *slope* 2 (Benzol MIXBEN) = 0,974277 vs. 1,234715
 Difference (95% CI) = 0,260437 (0,158531 to 0,362344)
 t = -5,128291 P < 0,0001

Covariance analysis**Uncorrected:**

<u>Source of variation</u>	<u>YY</u>	<u>xY</u>	<u>xx</u>	<u>DF</u>
Between groups	0,183111	0,506645	1,401825	1
Within	4,044245	3,613335	3,36207	54
Total	4,227355	4,119979	4,763894	55

Corrected:

<u>Source of variation</u>	<u>SSq</u>	<u>DF</u>	<u>MSq</u>	<u>VR</u>
Between groups	0,503389	1	0,503389	165,848549
Within	0,160867	53	0,003035	
Total	0,664256	54		

P < 0,0001

Corrected Y means ± SE for baseline mean predictor of 0,405088:

Y' = 0,373536 ± 0,011446

Y' = 0,147818 ± 0,011446

Line separations (common slope = 1,074735):

Lines not parallel

line 1 (Benzol önmagában) vs. *line* 2 (Benzol MIXBEN) vertical separation = 0,225718

95% CI = 0,190563 to 0,260873

t = 12,87822 (53 df) P < 0,0001