

Nyugat-magyarországi Egyetem

Doktori értekezés tézisei

**Biokatalitikus folyamatok vizsgálata
a környezeti kármentesítésben**

Herke Zoltán

Sopron
2015

Nyugat-magyarországi Egyetem
Erdőmérnöki Kar
Kitaibel Pál Környezettudományi Doktori Iskola

Vezető:
Prof. Dr. Veress Márton DSc.

Program:
Biokörnyezettudományi Program
Programvezető:
Prof. Dr. Albert Levente

Témavezetők:
Dr. Németh Zsolt István
Dr. Cserny Tibor

Bevezetés

A környezeti kármentesítés területén az elmúlt évtizedekben egyre szélesebb körűen alkalmazzák az ún. bioremediációs technológiákat, melyek alapját az élőszervezetekben található enzimek által történő szennyezőanyag lebontás biztosítja. A biokatalitikus vagy bioremediációs technológiák számos előnyvel rendelkeznek más fizikai-kémiai kármentesítésekkel szemben, mint pl., viszonylagosan költséghatékonyak *in situ* alkalmazásaik a terület eredeti funkcióját nem módosítják, illetve más kármentesítési folyamatokkal, elő- és utókezelésként jól kombinálhatóak.

Ugyanakkor a mikrobiológiai eljárások hatékonyságához kapcsolódóan ki kell jelteni, hogy számos korlátozó tényező határt szab alkalmazhatóságuknak. Hátrányuk, hogy meglehetősen időigényesek, továbbá lebontó hatékonyságukat befolyásolja a szennyezett közeg és a szennyező anyagok tulajdonságai.

Biokatalitikus kármentesítési beavatkozások hatékony tervezhetősége, optimálása megköveteli komplex szennyeződés összetétel esetén, hogy pontos képet kapjunk a szennyezőanyagok biokémiai lebontási folyamatainak sajátosságairól.

Éppen ezért doktori munkám célja az enzimatis lebontási sebességet befolyásoló szubsztrát specifikus, gátló és aktiváló hatások érzékelhetőségi vizsgálata volt modell és kísérleti adatsorok felhasználásával.

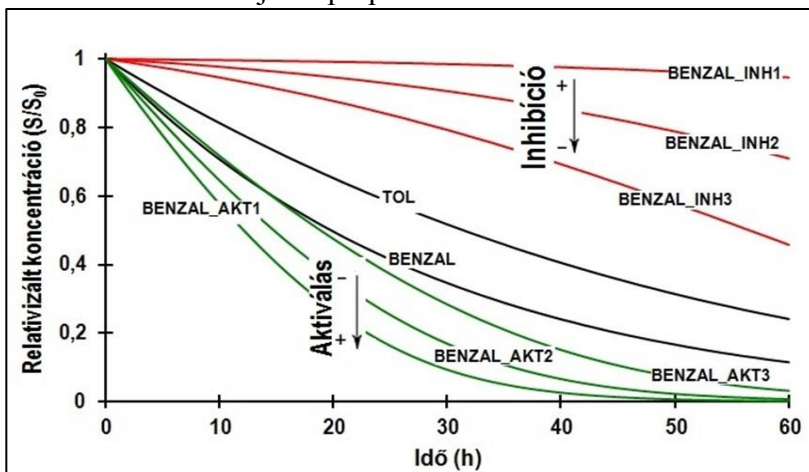
Számítási és kísérleti módszerek

Biodegradáció modellezése

A Michaelis-Menten típusúnak feltételezett biodegradációs reakciók az alábbi összefüggéssel írható le:

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

ahol S – a modell szennyezőanyag, mint kiindulási szubsztrát koncentrációja, P – a keletkező termék koncentrációja, K_M – a biodegradációs lépés Michaelis-konstansta, v_{max} – a biokémiai reakció maximális sebessége. Egyaránt származtattam a modell inhibíciómentes, illetve inhibíciós és aktiválási mechanizmussal módosított feltételekre való megoldásait, továbbá generáltam a szubsztrátok ($S = S(t)$) adatsorait, amelyekhez utólag – az analitikai mérések véletlen hibáit modellezendően – az átlagos koncentráció értékéből származtatott különböző amplitúdóval rendelkező zajt szuperponáltam.



1. ábra. Modell adatsorok egyik reprezentánsa, ahol a benzaldehid és toluol között inhibíciós hatás feltételezett. BENZAL= Benzaldehid inhibíciómentes, TOL= toluol lebontási. BENZAL_INH1-2-3= Benzaldehid lebontására a toluol által kifejtett növekvő erősségű inhibíciós hatás.

BENZAL_AKT1-2-3= Benzaldehyd lebontásra a K^+ ion által kifejtett növekvő erősségű aktiválási hatás modellezése.

Kinetikai paraméterek becslése regressziós modellekkel

Az (1) összefüggés formailag egy elsőrendű differenciálegyenlet, melynek $t = 0$, $S = S_0$ kezdeti értékfeltételhez tartozó analitikus megoldását (1.1) implicit egyenlet szemlélteti:

$$K_M \cdot \ln \frac{[S]}{[S_0]} + S - S_0 = v_{max} \cdot t , \quad (1.1)$$

Az (1), ill. az (1.1) egyenlet alapján, az S szubsztrát kinetikai mérési/modellezési eredményeiből lehetséges a lebontási paraméterek, K_M és v_{max} értékeit megbecsülni. Az (1) egyenlet Lineweaver–Burk-féle linearizálásával, a dt/dS és az $1/S$ mennyiségek lineárisan korrelálnak egymással. A reciprokok mennyiségek regressziós egyenesének meredekségéből és tengelymetszetéből a K_M és v_{max} megbecsülhető. Ehhez az $S = S(t)$ kinetikai görbe diszkrét adatsorát numerikusan deriválni szükséges.

Az (1.1) összefüggés becslésének felhasználásához, az egyenlet S implicit tagjai szerint kvázi többváltozós lineáris összefüggéssé alakítandó. $Y = \ln(S/S_0)$ és $X = S$ változók bevezetésével kapjuk:

$$K_M \cdot Y + X - S_0 = -v_{max} \cdot t , \quad (1.1.1)$$

amely háromdimenziós (Y , X , t) síkot határoz meg. Az (1.1.1) egyenlet többváltozós regressziójának együttthatói a keresett biokémiai átalakulás paramétereinek alternatív becslései. A kétféle becslési eljárás pontosságának tesztelése eltérő nagyságú zajhatás és különböző kiindulási szubsztrát koncentrációk alkalmazása mellett történt.

Biokatalitikus kísérletek

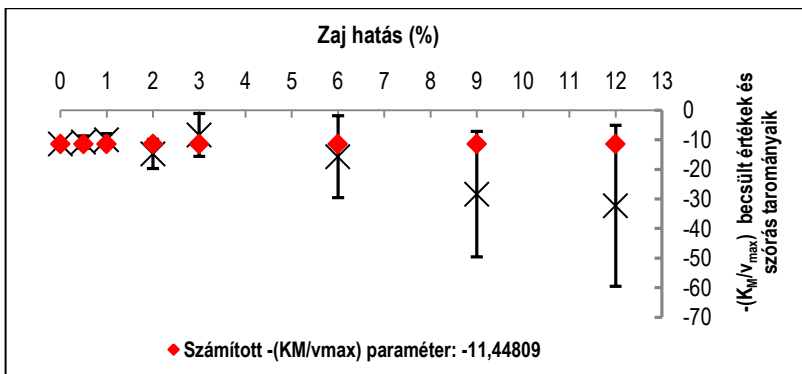
A biokatalitikus kísérletekben résztvevő kiindulási komponenseim (etil-acetát, ciklohexanol, aceton, benzaldehid, diklórmétán, toluol, benzol) potenciális környezetszennyező anyagok voltak. A lebontást végző komponens földigilisztá kivonatok, illetve specifikus szénhidrogénbontó termék volt. Inhibíciómentes adatsorok előállítása esetén a vizsgálandó komponenseket kizárólag csak kivonattal, míg az inhibíciós vagy aktiválási hatás vizsgálat érdekében az egyes szennyező komponenseket egymás jelenlétében illetve egyéb komponensekkel (glutathion, KCl) elegyítettem. A szennyezők időbeli koncentráció változásának nyomon követése GC-MS, GC analitikai technikával történt.

Új eredmények tézisszerű ismertetése

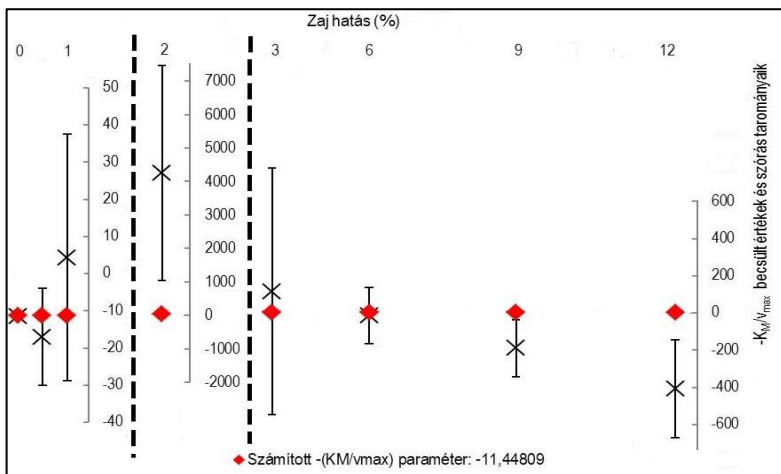
1. tézis

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

A többváltozós lineáris megközelítés (1.1.1 egyenlet) kiküszöböli a Lineweaver–Burk-féle eljárás esetén szükséges differenciálási lépésközből eredő torzító hibát, aminek következtében tapasztalhatók az extrém nagy kiugróértékek. További előnye, hogy az adatsorra szuperponált zajhatást részlegesen tompítja. Mindezek eredményeképpen nagyságrendekkel pontosabb, kisebb szórásértékű becslést tesz lehetővé. Ezt szemléltetik a $-(K_M/v_{max})$ paraméterbecslés esetén az alábbi 2.a.-b. ábrák kétféle becslés esetén.



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



2.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

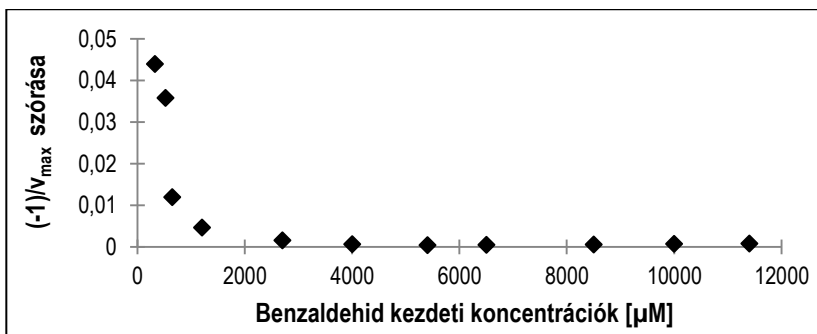
2. tézis

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 3. ábra a modellezett adatok felhasználásával érzékeltet.



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

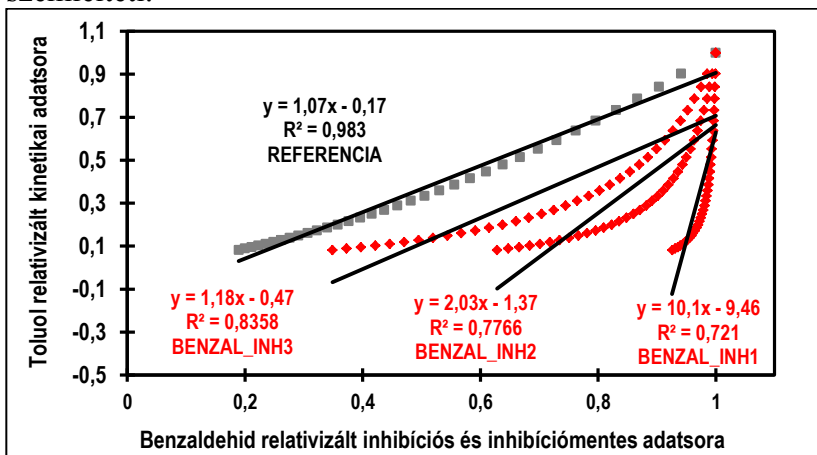
Ez a megállapítás, egyben rávilágít a Lineweaver–Burk-féle becslés egyik gyengeségére is (HERKE & NÉMETH, 2011), ugyanis a legkisebb szubsztrát koncentrációhoz tartozó és ezáltal a legnagyobb mérési hibával meghatározott kezdeti sebesség adatok reciprokai lesznek a legnagyobb számértékűek. Ezáltal befolyásolva majd az illesztett egyenes paramétereit, így téve pontatlanná a v_{max} becslését.

3. tézispont

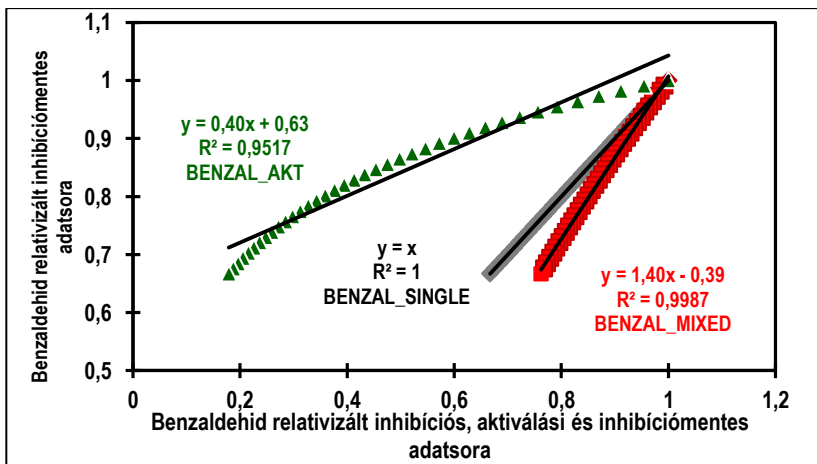
Szennyező komponensek azonos feltételek (önmagukban, illetve keverékként) mellett történő enzimatis lebonatási adatsorai korrelálhatnak egymással. A korreláltatott adatokra illesztett regressziós egyenes paramétereit (meredekség és tengelymetszet) az enzimaktivitást befolyásoló hatás következményeként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

A referencia adatsor regressziós egyenes paramétereit vizsnyított 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 (HERKE et al.

2015). A tézisponthoz tartozó egy-egy példát modell, inhibíciós adatok esetén a 4.a. ábra, míg kísérleti adatokkal a 4.b. ábra szemlélteti.



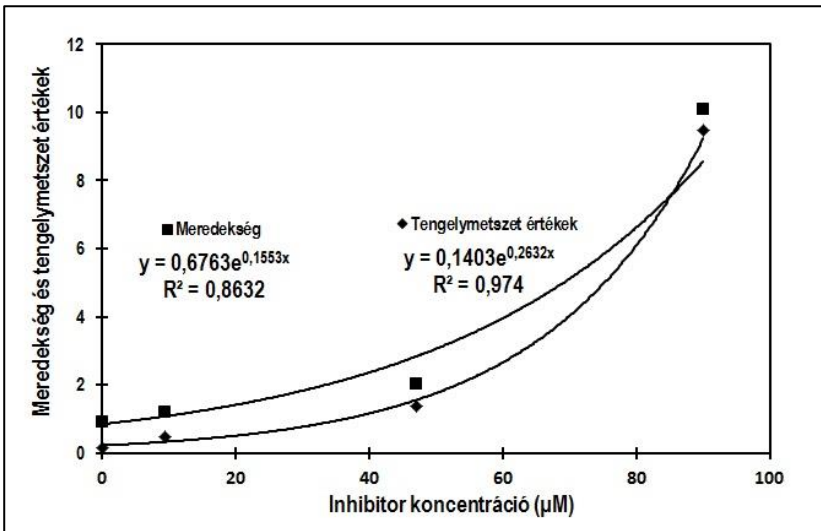
4.a. ábra. Különböző erősségű inhibíciós hatás indikálása a modell szubsztrátok relativizált adatsorainak korreláltatásával



4.b. ábra. Eltérő összetételű benzaldehid minták gilisztá extraktummal végzett kísérleti adatsorainak korreláltatása. A „BENZAL_MIXED” a vizsgált szennyezők keverékét, a „BENZAL_AKT” benzaldehid és KCl keverékét jelöli, míg a „BENZAL_SINGLE” esetében csak benzaldehid szerepelt a mintában.

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.



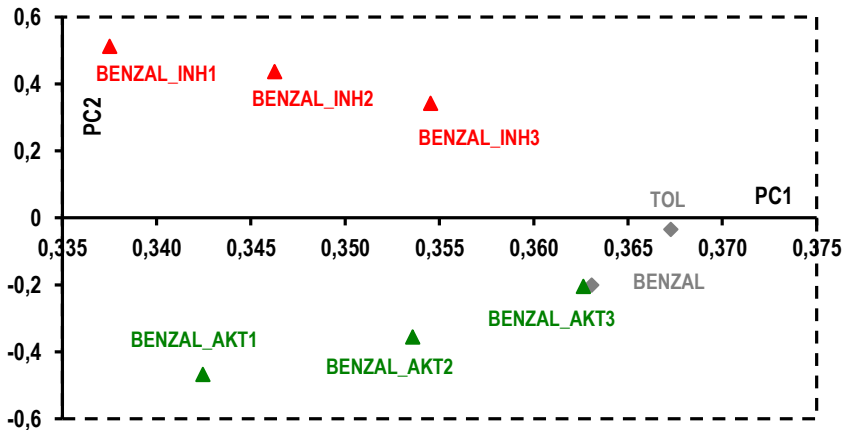
5. ábra. Inhibitor koncentrációk és a regressziós paraméterek közötti kapcsolat exponenciális függvénnyel közelítve

Ez a megközelítés további információt szolgáltat az inhibíció érzékelés területén. Inhibitor helyett aktivátor koncentráció értékeket alkalmazva az aktiválási hatás mértéke is számszerűsíthetővé válik hasonló módon.

5. tézispont

Főkomponens-elemzés használatával a kinetikai görbék alaki 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 (HERKE et al. 2015). Modell adatsorok főkomponens-elemzését mutatja be a 6. ábra:



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

A dolgozathoz kapcsolódó publikációk:

Folyóiratcikk

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.)

Konferencia kiadvány / Absztrakt kötet

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I. (2014): Inhibíciós és aktiválási mechanizmusok érzékelési lehetőségei biokatalitikus kármentesítésének alkalmazása során. IN: Bidló A., Horváth A., Szűcs P. (szerk.) (2014): Nyugat-magyarországi Egyetem, Erdőmérnöki Kar, IV. Kari Tudományos Konferencia. NymE Erdőmérnöki Kar, Sopron pp. 95-99.

Z. HERKE, T. CSERNY, B. MAGYAR, ZS. I. NÉMETH (2014): Exploration of enzyme activity change based on correlation and principal component analysis IN:L. ALBERT, P. SZABÓ (editors): Kémia, Környezettudomány, Fenntarthatóság pp. 23-29.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH Zs. I. (2013): Inhibíciós és aktiválási mechanizmusok érzékelési lehetőségeibiolokatalitikus kármentesítések alkalmazása során. In: Bidló András, Szabó Zília (szerk. Nyugat-magyarországi Egyetem, Erdőmérnöki Kar, Kari Tudományos Konferencia: A konferencia előadásainak és posztereinek kivonata. Sopron, Nyugat-magyarországi Egyetem Erdőmérnöki Kar, p. 37.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I. (2013): Enzimkatalitikus mechanizmusok indikálási lehetőségei bioremediációs kármentesítések alkalmazása során, Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, Absztrakt könyv, Hajdúszoboszló, 2013. október 2-4.

Z. HERKE, T. CSERNY, B. MAGYAR, ZS. I. NÉMETH (2013): Evaluation of enzyme kinetic data based on correlation and principal component analysis, Conferentia Chemometrica, Abstract book, Sopron, pp. 203.

Z. HERKE, T. CSERNY, B. MAGYAR, ZS. I. NÉMETH (2012): Exploration of enzymatic degradations by chemometric methods, IN: K. HÉBERGER & T. L. PAP (editors): XIIIth Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, Programme & Book of Abstracts Budapest 25-29. June 2012.

Z. HERKE, T. CSERNY, B. MAGYAR, ZS. I. NÉMETH (2012): Indication of Biocatalytic Mechanisms in Environmental Remediation by Statistical Methods, IN: M. NEMÉNYI, B. HEIL, A. J. KOVÁCS, F. FACSKÓ (editors): International Scientific Conference on Sustainable Development & Ecological Footprint, Sopron, University of West Hungary Press.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I. (2011): Inhibíciós mechanizmusok indikálása szennyező komponensek enzim kinetikai adatainak korrelálásával, IN: LAKATOS F. és SZABÓ Z. (szerk.): Nyugat-magyarországi Egyetem, Erdőmérnöki Kar, Kari Tudományos Konferencia Kiadvány Nyme Kiadó Sopron.

Z. HERKE, T. CSERNY, B. MAGYAR, ZS. I. NÉMETH (2011): Detection of enzyme inhibition by regression analysis of kinetic curves, Conferentia Chemometrica, Abstract book, Sümeg.

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.

Konferencia és szimpózium előadások

Z. HERKE, T. MASKOW, ZS. I. NÉMETH: An alternative approach to detect the inhibition effects on the environmental biocatalytic processes. 1ST International Symposium for Students and PhD Students „Environmental Biotechnology” 21-22. 05. 2015, Gliwice, Poland.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Inhibíciós és aktiválási mechanizmusok érzékelési lehetőségei környezetszennyező anyagok biodegradációs vizsgálatakor, KeMoMo-QSAR 2014, 2014. május 22-23., Szeged

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Inhibíciós és aktiválási mechanizmusok érzékelési lehetőségei biokatalitikus kár-

mentesítésének alkalmazása során, Kari Tudományos Konferencia, NymE-EMK, Sopron, 2013. december 10.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Enzimkatalitikus mechanizmusok indikálási lehetőségei bioremediációs kármentesítések alkalmazása során, Környezetvédelmi Analitikai és Technológiai Konferencia, Hajdúszoboszló, 2013. október 2-4. (*Poszter előadás*)

Z. HERKE, T. CSERNY, B. MAGYAR, ZS. I. NÉMETH: Evaluation of enzyme kinetic data based on correlation and principal component analysis, Conferentia Chemometrica, Abstract book, Sopron, 8-11. September 2013. (*Poszter előadás*)

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Enzimkinetikai adatsorok feldolgozása korrelációs és főkomponens elemzési módszerekkel, Nyugat-magyarországi Egyetem, Erdőmérnöki Kar, Kémiai Intézet, Sopron, 2013. augusztus 29.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Enzimkinetikai adatsorok feldolgozása korrelációs és főkomponens elemzési módszerekkel: KeMoMo-QSAR 2013, 2013. április 29-30., Szeged

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Statisztikai módszerek alkalmazása enzim mechanizmusok indikálására, VIII. Regionális Természettudományi Konferencia, Szombathely, 2013. január 24.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Exploration of enzymatic degradations by chemometric methods, XIIIth Conference on Chemometrics in Analytical Chemistry, Budapest 25-29. June 2012. (*Poszter előadás*)

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Indication of Biocatalytic Mechanisms in Environmental Remediation by Statistical Methods, International Scientific Conference on Sustainable Development & Ecological Footprint, Sopron 26-27. March 2012. (*Poszter előadás*)

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Inhibíciós mechanizmusok indikálása szennyező komponensek enzimkinetikai adatsorainak korreláltatásával, Nyugat-magyarországi Egyetem, Er-

dőmérnöki Kar, Kari Tudományos Konferencia, Sopron 2011. október 5.

HERKE Z., CSERNY T., MAGYAR B., NÉMETH ZS. I.: Detection of enzyme inhibition by regression analysis of kinetic curves, Conferentia Chemometrica, Sümeg 18-21. September 2011. (*Poszter előadás*)

HERKE Z., NÉMETH ZS. I.: Inhibíciós hatások kimutatása komplex enzim rendszerekben statisztikai módszerekkel, Tudományos Doktorandusz Konferencia, Sopron, 2011. április 13.

Herke Zoltán egyéb publikációi

Konferenciakiadványok / Absztrakt kötet

Zs. I. NÉMETH, R. RÁKOSA, **Z. HERKE**: Revealing Factor Effects on NIR Spectra of Alcohol-water Mixtures by Principal Component Analysis. Conferentia Cemometrica, 2015. szeptember 13-16., Budapest

MÉSZÁROS I., OLÁH V., VERES SZ., LAKATOS Á., RASZTOVITS E., **HERKE Z.** (2010): Analysis of ecophysiological plasticity of European beech provenances in the Hungarian provenance trial. In: Book of Abstracts. COST E52 "Evaluation of beech genetic resources for sustainable forestry" Final Meeting, Burgos, Spain, 4-7 May 2010.

Z. HERKE (2015): Untersuchung biokatalytischer Produkte zum Fremdstoffabbau, DBU-ösztöndíj záró kutatási beszámoló

Konferencia és szimpózium előadások

Zs. I. NÉMETH, R. RÁKOSA, **Z. HERKE**: Revealing Factor Effects on NIR Spectra of Alcohol-water Mixtures by Principal Component Analysis. Conferentia Cemometrica, 2015. szeptember 13-16., Budapest

SÁRAINÉ RAUCH R., **HERKE Z.**: Talajszennyező szénhidrogének bontása biokatalitikus technológiával, „Kármentesítés aktuális kérdései szimpózium 2013”, Budapest, 2013. március 21-22.