

**A KARBOXIPEPTIDÁZ A JELLEMZÉSE, RÖGZÍTÉSE;
SZINTETIKUS REAKCIÓK VIZSGÁLATA SZERVES
OLDÓSZERES KÖZEGBEN**



A doktori (PhD) értekezés tézisei

Készítette: Vértesi Adél

**Témavezető: Dr. Lehoczki Endréné Dr. Simon Mária
egyetemi docens**

**JÓZSEF ATTILA TUDOMÁNYEGYETEM
BIOKÉMIAI TANSZÉK
SZEGED
1999**

Bevezetés

Napjaink egyre növekvő környezeti problémái, valamint a klasszikus kémiai eljárásokat felváltó természetes erőforrások alkalmazásának már sok esetben bizonyított hatékonysága fontos hajtóerőt jelent a biológiai kutatások számára. E kutatások szinte kifogyhatatlan témájául az enzimek szolgálnak, a bennük rejlő lehetőségek révén. Előnyös tulajdonságaik (nagy szubsztrátspecifitás, régió-, és enantioszelektivitás, enyhe reakciókörülmények, stb.) ellenére gyakorlati alkalmazásuk csupán néhány felhasználási területre korlátozódott. E korlátozottságot az enzimek aktív konformációjának valamilyen módon történő fixálása, s ezáltal stabilitásuk fokozása, részben feloldotta. Ezek az ún. rögzített enzimek fizikai kölcsönhatással, vagy kémiai kötéssel hordozóhoz kapcsolt, ill. a hordozó által körülzárt enzimek, melyek katalitikus aktivitásukat megőrzik. A rögzített enzimek már folyamatos üzemmódú reaktorrendszerekben is jó hatékonysággal alkalmazhatóak, sok esetben aktivitásvesztés nélkül. Az első enzimrögzítést, egy egyszerű fizikai adszorpción alapuló, 1916-ban kifejlesztett eljárást követve ma a rögzített enzimek az ipar, a gyógyászat, és a laboratóriumi analitika területén is széleskörben elterjedtek.

A stabilizálás mellett a másik kritikus probléma, hogy erősen behatároltnak tekinthető azon szerves szintézisek köre, melyeket a biokatalizátor alkalmazása eredményesen helyettesíthet. Erre megoldást jelenthet újabb enzimek felfedezése, illetve a már jól ismert, az élő rendszerek lebontási folyamataiban szerepet játszó enzimek nem hagyományos közegekben (legtöbb esetben szerves oldószerek jelenlétében) mutatott szintetikus aktivitásának kutatása.

A napjainkban sokoldalúan vizsgált szerves oldószert tartalmazó közegben az oldószert káros hatásával szemben az enzimrögzítés stabilizálhatja az enzimet, hiszen a natív enzimkonformáció ez esetben mesterségesen rögzül, így fennmaradhat, annak ellenére, hogy a szerves oldószert a hidrátburkot károsíthatja. A nem vizes közegű, szerves oldószeres biokatalízis ugyanis egyre nagyobb jelentőségre tesz szert mind a tudományos, mind pedig az ipari kutatási gyakorlatban. A biokatalizátorok egyre szélesebb skáláját, enzimeket, multienzim rendszereket, valamint egész sejteket alkalmaznak kis víztartalmú, vagy vizet nem tartalmazó, nem hagyományos közegekben. Egyre nagyobb mértékben terjeszthető ki a lehetséges szintézisek köre, az egyszerű királis molekuláktól, a nagyobb, komplexebb molekuláig, oligoszacharid származékok, peptidok, nukleotidok, stb. előállításáig.

A nem hagyományos, szerves oldószeres közegben lejátszódó enzimreakciók enyhébb körülményeket igényelnek, mint az ezekkel helyettesített klasszikus kémiai szintézisek. Az enzimek nagy szubsztrátspecifitásuk révén az általuk katalizált szintézisek során régió-, és enantioszelektív átalakulást tesznek lehetővé. A szerves oldószeres közegben megváltozhat a solvatáció, s ennek következtében megváltozhat a reakció kinetikája, illetve eltolódhat a termodinamikai egyensúly. Így hidrolitikus enzimek szintézisre lesznek képesek.

Az enzimrögzítéssel, az ily módon stabilizált enzim tanulmányozásával, az oldott, és a rögzített enzimforma összehasonlító elemzésével, illetve a gyakorlati hasznosítási lehetőségek kutatásával foglalkozó munkánk vizsgálati objektumaként a sajátos szerkezeti tulajdonságokkal rendelkező karboxipeptidáz A (CPA) enzimet választottuk.

A karboxipeptidáz A (EC 3.4.17.1); peptidil-aminosav-hidroláz) cinktartalmú proteolitikus enzim. Cinktartalma révén a metalloproteázok, míg a hasított C-terminális peptidkötés helye szerint a karboxipeptidázok csoportjába sorolható.

Célkitűzések

1. Munkánk során célul tűztük ki az ismert szerkezeti, és katalitikus tulajdonságokkal rendelkező CPA különböző hordozókhoz rögzített formáinak létrehozását, majd a legnagyobb katalitikus aktivitású rögzített CPA további vizsgálatát.
2. A leghatékonyabb rögzítés érdekében a kiválasztott enzimforma esetében tanulmányoztuk az enzimirögzítés feltételeit, majd vizsgáltuk katalitikus tulajdonságait, stabilitását, és összehasonlítottuk ezeket az oldott enzim megfelelő paramétereivel.
3. A különböző rögzített CPA formákkal peptidok C-terminális „végéről” aminosav hasítást, ill. meghatározást végeztünk. Választ kerestünk arra a kérdésre, hogy a rögzítés után megváltozik-e az enzim hasítási specifikitása.
4. Célunk volt továbbá a CPA stabilitásának, gyakorlati alkalmazhatóságának vizsgálata szerves oldószert tartalmazó közegekben. Ennek részeként stabilitás vizsgálatokat folytattunk az oldott, és a rögzített enzimforma felhasználásával különböző, vízzel elegyedő, valamint nem, illetve korlátozottan elegyedő szerves oldószerek jelenlétében.

5. Vizsgáltuk a CPA-val szerves oldószeres közegben megvalósítható szintetikus reakciókat, így a dipeptidszintézist, az N-acil, (N-védett) aminosavak szintézisét, és az átészteresítést. A gyakorlati felhasználhatóság céljából meghatároztuk azokat a reakciókörülményeket, melyek alkalmazásával maximális átalakulás érhető el.

Módszerek

Az enzimaktivitás meghatározása: A CPA aktivitás mérését a Folk és Schirmer (1963) által kidolgozott módszer szerint végeztük el. Az aktivitásmérő elegy a következő komponensekből állt: 55 mM Tris/HCl puffer (pH 7.5); 550 mM NaCl; és 0.5 mM hippuril-L-fenilalanin. A reakciót 100 μ l enzimoldat (~5 U) hozzáadásával indítottuk. A hippuril-L-fenilalanin hidrolízisét, a 254 nm-nél bekövetkező abszorpció növekedést 25°C-on spektrofotométerrel követtük. Rögzített enzimek esetében a fenti összetételű elegyben 20-100 mg rögzített enzimet szuszpendáltunk, majd a szuszpenziót 1-10 percig 25°C-on kevertettük. Az enzimet megfelelő időközönként hirtelen leszűrtük, és meghatároztuk a szűrlet abszorpció változását 254 nm-nél. Egy enzimegység azzal az enzimmennyiséggel definiálható, amely 1 μ mol hippuril-L-fenilalanint hidrolizál el percenként pH 7.5-ön, és 25°C-on.

Rögzített CPA előállítás: A CPA-t adszorpciós, fizikai kötással Sorsilen hordozón, kovalens kötással pedig Szilokróm-aldehid, p-benzokinonnal aktivált Szilokróm, p-benzokinonnal aktivált Akrilex P 100, és vízdékony karbodiimiddal aktivált Akrilex C 100 hordozókon rögzítettük.

A rögzítési folyamat során az előkezelt (megfelelő pufferrel átmosott, aktivált) hordozót szuszpendáltuk enzimoldatban. A meghatározott mennyiségű enzimet, az előkezelés során alkalmazott pufferben oldottuk. A szuszpenziókat a Szilokróm aldehid kivételével 24 órán át kevertettük 4°C-on. Ez utóbbi hordozónál a kötés 4°C-on 3 órát vett igénybe. Az inkubálást követően a szuszpenziókat szűrtük, majd a rögzített enzimeket megfelelő pufferekkel alaposan átmostuk a nem, illetve gyengén kötődött fehérjék eltávolítása érdekében (Simon és mtsai. 1992; Kálmán és mtsai. 1983; Kotormán és mtsai.1986). A rögzített enzimeket általában 4°C-on, az utolsó mosásnál is alkalmazott pufferben tároltuk felhasználásig.

Stabilitásvizsgálatok: A hőinaktiválódási vizsgálatok (45-60°C) 100 mM Tris/HCl pufferben pH 7.5-ön történtek. A pH stabilitásvizsgálatokat 100 mM kálium-foszfát pufferben (pH 5.5-7.5), és 100 mM Tris/HCl pufferben (pH 7.5-8.5) végeztük. Megfelelő inkubációs periódusok után a mintákat hirtelen lehűtöttük 0-4 °C-ra majd a maradék aktivitásokat 25 °C-on a standard módszer szerint mértük.

C-terminális aminosav meghatározás, HPLC analízis: 1 mg/ml koncentrációjú oldatokat készítettünk desztillált vízben (melynek pH-ját Na₂CO₃ -tal pH 7.5-re állítottuk) a peptidekből (di-heptapeptid), majd a mintákat 30°C-on keverés mellett 2 U enzymaktivitás jelenlétében inkubáltuk. Óránként 500 µl mintákat vettünk. A rögzített enzimet a mintákból mérés előtt szűréssel távolítottuk el. A peptidhidrolízis során felszabaduló aminosavak minőségi, mennyiségi azonosítását vékonyrétegekromatográfia mellett HPLC-vel végeztük.

Vékonyrétegekromatográfia: A peptidhasítás során felszabaduló aminosavak, a dipeptidek, valamint az előállított N-védett aminosavak,

aminosav észterek kimutatására, minőségi, és mennyiségi meghatározására vékonyrétegekromatográfiát alkalmaztunk. A kromatográfiához alumíniumlemezre készített szilikagél rétegeket (DC-Alufolien Kieselgel 60, ill. Kieselgel 60 F₂₅₄, Merck) használtunk fel. Az N-védett aminosav észterek, ill. N-védett aminosavak kimutatását a 254 nm-en mutatott fluoreszcenciájuk alapján megfelelő fluoreszcens festékkel kezelt alumíniumlemezre vitt szilika-rétegen végeztük. Futtatóelegyként 1-butanol-jégecet-víz 4:1:1 (v/v) arányú elegyét alkalmaztuk. A szabad aminocsoportok előhívása ninhidrin előhívóval, Dévényi (1971) módszere szerint történt. A vékonyrétegekromatográfiánál kapott foltok kiértékelésére a GelBase/GelBlot Pro (UVP, U.K.) computer programot alkalmaztuk, ismert koncentrációjú standardok felhasználásával.

A karboxipeptidáz A stabilitása szerves oldószerekben:

Az enzim szerves oldószerrel szemben mutatott stabilitásának tanulmányozását Tris/HCl pufferben (100 mM, pH 7.0) a szerves oldószer megfelelő mennyiségének jelenlétében (20-90%) végeztük. A mintákat szobahőmérsékleten, megfelelő ideig (0-120 perc) inkubáltuk, intenzív keverés, mellett, majd aliquotok vételével a standard aktivitásmérő módszer alapján határoztuk meg a maradék aktivitást.

A karboxipeptidáz A szintetikus reakciói: Szerves oldószerrel tartalmazó közegekben CPA-val dipeptidszintézist, aminosavak N-acilezését, valamint átészteresítést hajtottunk végre. A reakcióelegy tartalmazta oldva a szükséges szubsztrátokat, megfelelő pH-jú pufferelt vízmennyiséget, és a szerves oldószerrel, ami esetünkben általában acetonitril volt. A reakciót enzimszuszpenzió hozzáadásával indítottuk, és az elegyet 450 rpm-en kevertettük 30-37°C-on. A minták

víztartalmának meghatározását Karl-Fischer titrálással végeztük (Mázor, 1971). A megfelelő inkubációs periódusok után mintákat vettünk, és vékonyrétegekromatográfiával azonosítottuk a terméket.

Összefoglalás

Kísérleteink során előállítottuk a CPA enzim különböző hordozókhoz rögzített formáit, és az Akrilex C 100 hordozó esetében meghatároztuk a rögzítés optimális feltételeit. Az Akrilex C 100-CPA-nak vizsgáltuk a katalitikus tulajdonságait, és a stabilitását, továbbá összehasonlítottuk az oldott formával. Különböző hosszúságú peptidek (diheptapeptid) C-terminális aminosav hasításán keresztül mutattuk be a rögzített CPA gyakorlati alkalmazhatóságát, ill. az oldott enzimhez képest, a rögzítés során bekövetkezett hasítási specifitás változást.

Szerves oldószert tartalmazó (20-90 %) rendszerekben vizsgáltuk az oldott CPA stabilitását, s kis víztartalmú közegekben, 90 % szerves oldószert jelenlétének hatását tanulmányoztuk az oldott, és a rögzített Akrilex C 100-CPA enzimforma aktivitására, stabilitására. Az oldott, és rögzített CPA-val különböző szerves oldószeres közegekben szintetikus reakciókat: „N-acil aminosavak” (dipeptidszintézis, aminosavak N-védelmé) szintézisést, átészteresítést vizsgáltunk, ill. meghatároztuk ezek optimális feltételeit.

Kísérleti eredményeinket a következőkben foglalhatjuk össze:

1. Kísérleteink során CPA-t adszorpcióval rögzítettük Sorsilenen, valamint kovalens kötással négy különböző jellegű hordozóhoz, a Szilokróm aldehidhez, a p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz, a

(hippuril-L-fenilalanin szubsztrátra) kissé magasabb, mint az oldotté [1].

4. Az összehasonlító jellegű stabilitási, inaktiválódási (hő, pH, urea) vizsgálataink is azt bizonyították, hogy az enzim Akrilex C 100 hordozóhoz rögzítése révén megnövekedett hő-, és ureával szembeni stabilitással rendelkezett. Különösen szembevetendő különbségeket tapasztaltunk 60°C-on, valamint a hőinaktiválódás pH függésének vizsgálatánál pH 8.5 alkalmazása esetén [1]. Az Akrilex C 100-CPA mintegy harmincszoros ismételt felhasználás után sem veszített kiindulási aktivitásából, és viszonylag csekély aktivitásvesztéssel tárolható a különböző (pH 5.5-8.5) pH-jú pufferekben. A CPA Akrilex C 100-on való rögzítésével tehát jó stabilitású, katalitikus aktivitását hosszan megőrző rendszert hoztunk létre [1].
5. Az oldott, és a különböző rögzített CPA formák felhasználásával különböző peptidok C-terminális aminosavának meghatározását végeztük el, és kísérleteink eredményei azt mutatták, hogy a rögzített enzimformák hasítási specificitása az oldottétól eltérő. Ezeknek a változásoknak oka lehet egy szterikus gát, a hordozó, és az enzim között kialakult kapcsolat, elektrosztatikus kölcsönhatások, melyek a CPA katalízist befolyásolták. A legkisebb különbséget az erősen hidrofíll jellegű, polianionos Akrilex C 100-ra rögzített CPA esetében állapítottunk meg, amely valamennyi vizsgált peptid C-terminális aminosavát lehasította, és az oldotthoz képest csupán sebességbeli eltéréseket tapasztaltunk. Az aminosav hasítás eredménye alapján arra következtethettünk, hogy a hordozó hidrofíll

jellege (aquafilicitása) egyik döntő fontosságú paraméterként határozza meg a hozzá rögzített enzim katalitikus sajátosságait [1].

6. Vizsgáltuk az oldott-, és a rögzített CPA aktivitását különböző, vízzel elegyedő, korlátozottan elegyedő, és nem elegyedő oldószerekben. A rendszer növekvő oldószer koncentrációja minden esetben csökkentette az oldott enzim aktivitását. A csökkenés mértéke vízzel elegyedő oldószerekben kisebb mértékű volt, mint a vízzel nem, ill. korlátozottan elegyedő oldószerekben. Feltehetőleg a vízzel elegyedő oldószerek képesek az enzimmolekula hidrátburkának összetételét az oldószer molekuláival módosítani az enzim konformáció fenntartásában jelentős szerepet játszó kölcsönhatásrendszer nagyobb mértékű módosítása nélkül. Kivételt képezett a dimetil-szulfoxid, amely igen erőteljesen inaktíválta a CPA-t. 90 %-os oldószer koncentrációnál összehasonlítottuk az oldott, és az Akrilex C 100-CPA viselkedését, és a rögzített enzimformát valamennyi oldószerben stabilabbnak találtuk, ami jól egyezik az előzőekben megállapítottakkal. Különösen szembetűnő volt a rögzített enzim etanolban, és toluolban tapasztalt aktiválódása, ill. a 90 %-os DMSO-ban mutatott viszonylag magas aktivitása [2].
7. Vizsgáltuk, hogy a CPA képes-e szerves oldószeres közegben szintetikus reakciók katalízisére. Ennek a kísérletsorozatnak a keretében először CPA-val dipeptidszintézist végeztünk. A dipeptidszintézishez védőcsoport nélküli aminosavakat használtunk, és legjobb szubsztrátnak az L-Phe-t találtuk. E reakcióhoz legalkalmasabb oldószer az acetonitril volt. Megállapítottuk a Phe-Phe szintézis körülményeit, a reakcióelegy optimális hőmérsékletét (30°C), pH-ját (pH 5.5), a közeg víztartalmát (10%), majd

meghatároztuk a szintézishez szükséges enzim-, és szubsztrát mennyiséget is. A szubsztrátként használt L-Phe koncentrációfüggése alapján megállapítottuk, hogy a nagyobb koncentrációknál gátolja az enzimműködést. A szintézis a megállapított paraméterek felhasználásával 43 %-os Phe-Phe kitermelést eredményezett. Az oldott enzimmel végrehajtott dipeptidszintézis optimális körülményeinek alkalmazásával, a reakciót különböző rögzített enzimformákkal is elvégeztük. Legnagyobb kitermelést az Akrilex C 100-CPA liofilizált formájának felhasználásával értük el [3].

8. Tekintettel arra a tényre, hogy a CPA peptidáz aktivitása mellett észteráz aktivitással is rendelkezik, szerves közegű átészteresítési reakciót hajtottunk végre az oldott enzimforma felhasználásával N-acetil-L-tirozin etil-észter és 1-butanol szubsztrátként, s ez utóbbi egyben szerves közegként való alkalmazásával. A reakciót a dipeptidszintézisnél magasabb, enyhén lúgos pH-n (pH 7.5) sikerült kiviteleznünk. A reakció során azonban jelentős mennyiségű hidrolitikus termék, N-acetil-L-tirozin keletkezett.
9. A CPA-t alkalmasnak találtuk N-védett aminosavak előállítására. Acetonitrilben, különböző aromás, és alifás (C_1-C_5) szerves savak (acilező komponensek), valamint L-Phe alkalmazásával sikeresen állítottunk elő különböző N-acil-L-fenilalanin aminosav származékokat. Legmagasabb kitermelést a benzoésav, és a hippursav (benzoil-glicin) esetében értünk el. Gyakorlati jelentőségére való tekintettel a dipeptidszintézishez hasonlóan

p-benzokinonnal aktivált Akrix P 100-hoz, és vízdékony karbodiimiddel aktivált Akrix C-100-hoz. Valamennyi rögzített enzimforma rendelkezett katalitikus aktivitással. Az 1 g hordozóra rögzült aktivitásértékek alapján legmegfelelőbbnek a vízdékony karbodiimiddel aktivált, karboxil funkciós csoportokat tartalmazó, poliakrilamid alapú hordozón (Akrix C 100-on) rögzített enzimformát találtuk. Feltehetőleg a hordozó hidrofíl karaktere megfelelően stabilizálta az enzim aktív konformációját [1].

2. Meghatároztuk az Akrix C 100 hordozón történő rögzítés optimális körülményeit. Ennek során vizsgáltuk a rögzítés pH, a rögzítéshez alkalmazott enzimmennyiség, a hordozó aktiválásához alkalmazott vízdékony karbodiimid minőség, és mennyiség függését. Megállapítottuk, hogy a rögzítés számára alkalmas puffer enyhén savas, 5.5-6-os pH-jú, 1 g gélhez 1250 U enzimegységet célszerű alkalmazni, mellyel 20 %-os hatékonyságú rögzítés érhető el. A legmegfelelőbb karbodiimid származék az N-ciklohexil-N'-[β -(N-metilmorfolino)-etil]-karbodiimid-p-toluolszulfonát (CMEC), melynek optimális mennyisége a hordozó: aktiválószer 1:1-es arányával fejezhető ki.
3. Az oldott, és az Akrix C 100-CPA katalitikus sajátságait vizsgálva megállapítottuk, hogy az oldott, és a rögzített enzimforma működésének pH optimuma megegyezik, a rögzített enzimforma hőmérsékleti optimumának mintegy 20°C-os pozitív eltolódásából pedig az Akrix C 100-CPA oldotténál nagyobb stabilitására következtettünk. Az oldott, és a rögzített CPA Michaelis állandóit összehasonlítva úgy találtuk, hogy a rögzített enzimforma K_M értéke

meghatároztuk az N-benzoil-L-fenilalanin szintézis optimális körülményeit, (pH 6.5, 37°C, 8 % víztartalom) szubsztrát-, és enzimkoncentráció függését. 10 mM L-Phe, és 5 mM benzooesav szubsztrátkoncentráció a legmegfelelőbb az N-benzoil-L-Phe szintézis számára. Az L-Phe 10 mM-nál magasabb koncentrációban gátolja az enzim szintetikus aktivitását. A benzooesav koncentrációjának emelésével gátlást nem tapasztaltunk. Feltehetőleg a CPA az adott reakciókörülmények alkalmazásával nagyobb affinitással köti a benzooesavat, s így ennek jelenlétében az L-Phe csak magasabb koncentrációnál töltheti be a szubsztrát szerepét. Noha mindkét folyamat (a dipeptidszintézis, és az aminosavak N-védése) N-acilezési reakcióként fogható fel, az alkalmazott szubsztrátok kémiai karaktere, valamint az optimális reakciókörülmények kismértékű eltérést mutattak.

Az oldott CPA a megfelelő oldószer kiválasztásával magasabb oldószer koncentrációnál is jól megőrizte aktivitását, továbbá jó kitermeléssel 43, ill. 55.2 %-kal szintetizált Phe-Phe dipeptidet valamint N-benzoil-L-fenilalanint. Eredményeink bizonyítják, hogy a CPA alkalmas nem hagyományos, szerves oldószeres közegű dipeptidszintézisre, valamint N-védett aminosavak szintézisére is. Ez utóbbi reakció rögzített enzimformákkal való eredményes végrehajtása pedig az enzim további felhasználása előtt nyithat utat.

Az értekezés alapjául szolgáló közlemények:

[1] **Vértési, A.**, Simon, L.M., Kiss, I., Szajáni, B. 1999. Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enzyme Microb. Technol.* 25: 73-79.

[2] Simon, L.M., László, K., **Vértési, A.**, Bagi, K., Szajáni, B. 1998. Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* 4: 41-45.

[3] **Vértési, A.**, Simon, L.M. 1998. Carboxypeptidase A-catalyzed dipeptide synthesis in organic media. *J. Biotechnol.* 66: 75-82.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

Vértési, A., Bagi, K., Simon, L.M. 1996. Study of the operation of co-immobilized glucose-6-phosphate isomerase and glucose-6-phosphate dehydrogenase in a flow injection system. *Acta Biol. Hung. Szegediensis* 41: 15-22.

Simon, L.M., László, K., Kotormán, M., **Vértési A.**, Bagi, K., Nemcsók, J. 1999. Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio L.*). *J. Environ. Sci. Health B34*: 819-828.

Az értekezés témájához kapcsolódó poszterek:

Vértesi, A., László, K., Simon, L.M., Szajáni, B.: *Studies on an immobilized carboxypeptidase A*. 2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, Szeged, Hungary, August 21-23. 1995.

Vértesi, A., Simon, L.M.: *Studies on the reversed reaction of carboxypeptidase A in organic solvents*. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, Hungary, August 17-21. 1997.

László, K., Vértesi, A., Bagi, K., Simon, L.M., Szajáni, B.: *Effects of polar organic solvents on stabilities of some hydrolytic enzymes*. 8th European Congress on Biotechnology, Budapest, Hungary, August 17-21. 1997.

Az értekezés témájához nem kapcsolódó előadás:

Lehoczkiné, Simon Mária, Kissné, Deér Aranka, Bagi Krisztina, Vértesi Adél, László Kinga: Hidroláz enzimek szerepe xenobiotikumok detoxifikálásában balatoni halakban. A Balaton kutatásának 1997-es eredményei, Veszprém, Előadás kivonat 194-198. oldal.

Társszerzői lemondó nyilatkozat

Alulírott nyilatkozom, hogy a Jelölt téziseit ismerem, a tézisekben foglalt tudományos eredményeket tudományos fokozat megszerzéséhez nem használtam fel, s tudomásul veszem, hogy azokat ilyen célból a jövőben sem használhatom fel.

Dátum 1999. december 10.

Bogi Krisztina

[Signature]

László Kupa

Kiss István

L. Simon Hanna

.....

.....