

AZ α -KIMOTRIPSZIN STABILITÁSA ÉS MŰKÖDÉSE SZERVES OLDÓSZERES KÖZEGBEN

DOKTORI (PHD) ÉRTEKEZÉS TÉZISEI

KÉSZÍTETTE: LÁSZLÓ KINGA

TÉMAVEZETŐ: LEHOCZKINÉ DR. SIMON MÁRIA

SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM
TERMÉSZETTUDOMÁNYI KAR
BIOKÉMIAI TANSZÉK
SZEGED 2002

BEVEZETÉS

Az enzimek általában enyhe körülmények között (pH, hőmérséklet, nyomás) katalizálnak kémiai átalakulásokat nagy specifitással (kemo-, enantio- és regiospecifitás), mely igen vonzóvá teszi alkalmazásukat. Napjainkban széles körben használják az enzimeket a klinikai- és élelmiszeripari analitikában, katalizátorként gyógyszerek, élelmiszerek előállítására, és fontos szerepet játszanak a modern biotechnológiában is.

A hagyományos, vizes rendszerekben működő és ismert biokatalitikus folyamatok mellett egyre nagyobb teret hódít az enzimek nem hagyományos közegben való alkalmazása. Nem hagyományos közeg lehet pl. szerves oldószer, szuperkritikus folyadék, vagy gáz halmazállapotú reakció közeg. Ezek közül a legdinamikusabban a szerves oldószeres rendszerek kutatása fejlődött és fejlődik a mai napig is.

A kevés vizet tartalmazó, szerves oldószeres közegben megvalósított enzimkatalízisnek számos előnye van a vizes rendszerekkel szemben: szerves oldószerben az apoláros szubsztrátok oldékonysága nő, a szerves oldószerből számos termék olcsón és könnyen kinyerhető, nincs mikrobiális fertőződés, nincsenek mellékreakciók, megváltozhat a reakció kinetikája, eltolódhat a termodinamikai egyensúly. A reakciók termodinamikai egyensúlyának eltolódása azt eredményezi, hogy a vizes közegben hidrolázként működő enzimek, szerves oldószeres közegben szintetázként tudnak viselkedni.

A szerves oldószeres hatással vannak a **fehérjék szerkezetére**, s így befolyásolják az enzimek aktivitását, stabilitását is. Ha a szerves oldószer az enzim aktív centrumába vagy annak közelébe kötődik, ezzel jelentősen befolyásolhatja az enzimreakciót. A szerves oldószeres molekulái oldatban igyekeznek a vízmolekulákat átrendezni, elvonni a fehérje hidrátburkától, s ezzel kedvezőtlenül befolyásolhatják azokat a kölcsönhatásokat, amelyek felelősek a fehérjék natív konformációjának fenntartásáért (Arakawa és Goddette, 1985). Változhat a közegetől függően a hidrogén-hidak, elektrosztatikus kölcsönhatások mennyisége, gyengülhetnek a hidrofób kötőerők (Battistel és Bianchi, 1993). Számos irodalmi adat tanuskodik arról, hogy a másodlagos szerkezeti elemek százalékos megoszlása is jelentősen eltérhet a vizes közegben tapasztalttól és ez az eltérés nagy mértékben függ az oldószer természetétől és koncentrációjától (Simon és mtsai, 2001).

A szerves oldószeres biokatalízisben kulcsfontosságú szerepe van a **víznek**, ha nagyon kevés is a víz a rendszerben, de mindig jelen kell lennie a katalízis során (Adlercreutz, 1991). A víznek kettős szerepe van: egyrészt fenntartja az enzim katalitikusan aktív konformációját, biztosítja az enzim működéséhez szükséges flexibilitást, másrészt szükség van rá az inaktiválódási folyamatokban is. A víz jelenléte, mennyisége a közegben jelentősen befolyásolja az enzim által katalizált reakciót is.

Az enzimek szerves oldószerek okozta inaktiválódása, stabilitásuk csökkenése komoly problémát jelent felhasználásuk szempontjából, ezért fontos feladat a megfelelő **oldószerek kiválasztása**, a reakciók optimális körülményeinek meghatározása. Mivel egyik oka a fehérjék szerves oldószerekben megfigyelhető inaktiválódásának a hidrátburok sérülése, ezért az enzimek stabilitásának javítására kifejlesztett módszereknek azt kell megcélolniuk, hogy kivédhető, vagy csökkenthető legyen a hidrátburok sérülése. Az enzimek stabilitása szerves oldószeres közegben is javítható a vizes rendszerekből már ismert és széles körben alkalmazott módszerekkel, mint pl. kémiai módosítással, rögzítéssel, illetve "protein engineering"-gel, vagy adalékanyagok hozzáadásával.

A "protein engineering" technológia során előre megtervezett módon, aminosav cserék segítségével (helyspecifikus- és random mutagenézis) állítanak elő módosított biokatalizátort a későbbi felhasználási céloknak megfelelően.

Az enzimek kémiai módosítása gyakorlatilag a fehérje mikrokörnyezetének módosítását jelenti, mely az enzim felületének, tehát közvetlen környezetének megváltozása révén kedvezően befolyásolhatja annak tulajdonságait. Egyik leggyakoribb módja az enzimek kémiai módosításának a biokatalizátor szilárd hordozóhoz rögzítése. Az enzimek hordozóhoz való rögzítése történhet adszorpcióval, ionos kölcsönhatások útján, enzimmolekulák közötti intermolekuláris keresztkötések létrehozásával, szemipermeábilis membránnal való körülzárással, üreges szálakba vagy szemipermeábilis rácsokba zárással. Az enzimek rögzítésére leggyakrabban alkalmazott módszer a **kovalens kötéssel** való rögzítés. Előnye, hogy a hordozó és az enzim között erős kémiai kötés jön létre, hátránya, hogy viszonylag bonyolult, s a kötéshez használt kémiai reagensek hatására az enzimek jelentősen inaktiválódhatnak, mivel a kötésben az aktív centrum aminosav-oldalláncai is részt vehetnek. A kémiai módosulás eredményeként számolni kell az enzim térszerkezetének, a szubsztrát hozzáférhetőségének megváltozásával is.

Bizonyos anyagok, pl. **polihidroxi vegyületek** (poliolok, cukrok), sók és egyéb polimerek adásával is jelentősen növelni lehet az enzimek stabilitását az enzimek mikrokörnyezetének módosítása révén (Gray, 1988). Számos irodalmi adat van arra vonatkozóan, hogy milyen hatást gyakorolnak a polihidroxi vegyületek **vizes közegben** az **oldott enzim** katalitikus aktivitására és hőstabilitására. Tanulmányozták ezeknek az anyagoknak különböző enzimekre kifejtett stabilizáló hatását **szerves közegben** is úgy, hogy az enzimrögzítéseket, illetve a különböző enzimkészítmények előállítását a fentebb említett additívek jelenlétében hajtották végre (**ko-immobilizálás**, ko-liofilizálás). Viszonylag kevesebb adat van arra vonatkozóan, hogy milyen hatást fejtenek ki ezek az anyagok ha a rögzített enzimmel együtt vannak jelen szerves oldószeres közegben.

CÉLKITŰZÉSEK

Munkánk célja az volt, hogy a szerkezeti felépítésében jól ismert szarvasmarha pankreász α -kimotripszin stabilitását és működését tanulmányozzuk különböző szerves oldószerben.

Vizsgálataink során a következő kérdésekre kerestünk választ:

- milyen az oldott enzim stabilitása néhány, kémiai tulajdonságaikban eltérő, vízzel elegyedő és nem elegyedő szerves oldószerben;
- van-e összefüggés az oldószer polaritása és az enzim stabilitása között;
- hogyan befolyásolja a rögzítés (hordozó, rögzítési eljárások) az enzim stabilitását szerves oldószerben;
- kivédhető-e a szerves oldószer okozta inaktiválódás additívek (poliolok) adagolásával;
- célul tűztük ki az α -kimotripszin által katalizált aminosav észteresítési és átészteresítési reakciók összehasonlító vizsgálatát szerves közegben;
- hogyan befolyásolja a rögzítés az enzim szintetáz aktivitását szerves oldószerben.

MÓDSZEREK

Az α -kimotripszin rögzítése különböző hordozókhoz

Az α -kimotripszin rögzítését Akrilex C-100 hordozóhoz Szajáni és mtsai (1980) módszere szerint végeztük. A karboxil funkciós csoportok aktiválásához 1-ciklohexil-3-(2-morfolinoetil)karbodiimid meto-p-toluol-szulfonát aktiválószerrel használtunk. Az aktiválást egy lépésben végeztük, tehát a hordozó, az enzim és az aktiválószer együtt volt jelen a rendszerben, mivel az α -kimotripszin nem érzékeny a karbodiimidre.

Az α -kimotripszin rögzítése Akrilex P-100-hoz Kálmán és mtsai (1983) módszere szerint történt. A rögzítést megelőzően p-benzokinonnal aktiváltuk az Akrilex P-100 hordozót, majd ezt követően rögzítettük az enzimet a hordozóra.

Az α -kimotripszin rögzítését p-benzokinonnal aktivált Szilokrómhoz Vértesi és mtsai (1999) módszerével végeztük.

Fehérjetartalmának meghatározása

A rögzítések anyagmérlegének kiszámításához az oldatok fehérjetartalmát Lowry és mtsai (1951) módszere szerint határoztuk meg.

Az α -kimotripszin aktivitásának mérése

Az α -kimotripszin hidrolitikus aktivitásának méréséhez N-acetil-L-tirozin etil észter (ATEE) szubsztrátot használtunk és fotometriás úton követtük nyomon az abszorpció csökkenését 237 nm-en (Schwert és Takenaka, 1955). A reakcióelegy (3 mL) 0,05 M kálium-foszfát puffert (pH 7,0) és 1 M ATEE-t tartalmazott. A reakciót 1-5 U oldott vagy rögzített enzimmel indítottuk. 1 U megfelel annak az enzim mennyiségnek, amely percenként 1 μ mol ATEE hidrolízisét katalizálja pH 7,0-en és 25°C-on.

Stabilitásmérések

Az enzim stabilitását 10-90 tf% szerves oldószert tartalmazó 0,05 M kálium-foszfát pufferben (pH 7,0) vizsgáltuk. Oldott enzim esetén az enzim koncentrációja az inkubálási elegyekben 1 mg mL⁻¹ volt. Rögzített enzimből 5-15 enzimegységeket, valamint a különböző koncentrációjú additívekből különböző mennyiségeket mértünk a reakcióelegyekbe (glükóznál 180 g L⁻¹, szorbitnál 182 g L⁻¹, laktóznál 137 g L⁻¹ és polietilén glikolnál 90 g L⁻¹). A mintákat 60 vagy 120 percig inkubáltuk 25°C-on és adott időpillanatokban mintákat vettünk, majd a minták aktivitásait spektrofotometriásan határoztuk meg.

Észter szintézisek és értékelésük

A direkt észterszintézisekhez és az átészteresítésekhez alkalmazott standard reakcióelegyek (5,125 mL) összetétele a következő volt: 0,05 mmol aminosav szubsztrát, 0,5 mL alkohol, 4,5 mL oldószer, 0,5 mg mL⁻¹ enzim. A reakcióelegyeket 30°C-on 24 órán át folyamatos keverés mellett (450 rpm) inkubáltuk. 3, 6, 9 és 24 óra elteltével mintákat vettünk a reakcióelegyekből, s a keletkezett észterek mennyiségét vékonyréteg kromatográfia és a Gelbase Pro&Gelbase/Gelblot (UVP/Ultra Violet Products) számítógépes program segítségével határoztuk meg.

A víztartalom meghatározása

A reakcióelegyek víztartalmának meghatározását Fischer (1935) jodometriás módszerével végeztük el.

EREDMÉNYEK ÖSSZEFOGLALÁSA

Kísérleteink során az α -kimotripszin stabilitását és működését tanulmányoztuk különböző vízzel elegyedő és vízzel nem elegyedő szerves oldószeres közegben.

Eredményeinket a következőkben foglaljuk össze:

1. Az α -kimotripszin stabilitása különbözőképpen változik vízzel elgyedő és vízzel nem elegyedő oldószerekben. A vizsgált vízzel nem elegyedő oldószerekben (etilacetát, toluol) az enzim nagyobb stabilitást mutat, mint az elegyedőkben (aceton, acetonitril, etanol, dioxán, dimetil szulfoxid). A vízzel elegyedő oldószeres közöl acetonban, dioxánban, etanolban és acetonitrilben nagyon hasonlóan viselkedett az α -kimotripszin. Mindegyik oldószerben aktivitása az oldószer mennyiségének növekedésével csökkent, elért egy minimum értéket (50% szerves oldószer), majd az oldószer koncentrációjának további emelésével az enzim aktivitás növekedését figyelhettük meg. Dimetil szulfoxidban ezektől eltérő eredményt kaptunk, kezdetben az oldószer mennyiségének növekedésével ez esetben is csökkent az enzim aktivitása, de 50% oldószerrel inaktiválódott.

A vízzel elegyedő oldószeres közegben az enzim stabilitása a dioxán > aceton > etanol > acetonitril > DMSO sorrendben csökkent. Az oldószer dielektromos állandója és az enzim adott oldószerben megfigyelt stabilitása között fordított arányosság állt fenn.

2. A vizsgált szerves oldószeres közegben az enzim kétféle inaktiválódást mutatott a vizes közegben megfigyelt inaktiválódáshoz hasonlóan.
3. Az enzimet sikeresen rögzítettük Akrilex C-100, Akrilex P-100 és p-benzokinonnal aktivált Szilokrómmal hordozóhoz. Egy gramm száraz hordozóra vonatkoztatva Akrilex C-vel 204,1 U g⁻¹, Akrilex P-vel 50,1 U g⁻¹ és Szilokrómmal 26,7 U g⁻¹ aktivitású enzimet állítottunk elő. Mind a kötődött fehérje, mind pedig a kötődött aktivitás szempontjából az Akrilex C-100 volt a legjobb hordozó az α -kimotripszin rögzítésére.
4. Különböző módszereket (rögzítés, aditívek adása) alkalmaztunk az enzim stabilitásának növelésére szerves oldószeres közegben (etanol, dioxán és acetonitril). Megállapítottuk, hogy a rögzített enzimformák nagyobb stabilitást mutatnak az oldott enzimhez képest, és a

rögzítéssel jelentősen csökkenteni tudtuk az α -kimotripszin szerves oldószerek okozta aktivitás csökkenésének mértékét. Eltérő volt a rögzítéssel elért stabilizáló hatás mértéke a különböző oldószerekben, s különösen etanolban tapasztaltunk nagy mértékű stabilitás fokozódást az oldott enzimhez képest (60 perces inkubálás után maradék aktivitás: oldott enzim 13%, rögzített enzimek 85%).

Összehasonlítva az egyes hordozókat, megállapítottuk, hogy a Szilokróom hordozó alkalmazása volt a legjobb az α -kimotripszin stabilitása szempontjából minden oldószerben. Etanolban nem volt különbség az egyes hordozókra való rögzítéssel elért stabilizálás között. Dioxánban, valamint acetonitrilben pedig hasonló stabilitást mutattak az Akrilex C és P-re rögzített kimotripszinnek.

5. Additívek (glükóz, szorbit, laktóz és a polietilén glikol 8000) hatását a rögzített enzimformák stabilitására vizsgáltuk 50% acetonitrilt, etanolt vagy dioxánt tartalmazó közegben. A legnagyobb stabilizáló hatást glükóznál 180 g L^{-1} , szorbitnál 182 g L^{-1} , laktóznál 137 g L^{-1} és polietilén glikolnál 90 g L^{-1} koncentrációk alkalmazásával érték el. Csaknem mindegyik additív mindhárom oldószerben stabilizáló hatást fejtett ki a rögzített enzimekre. Az Akrilex-enzimeknél az additívek stabilizáló hatása kisebb mértékű volt a Szilokróom-enzimhez képest. Az additívek hatása az Akrilex C- és az Akrilex P-kimotripszinre a glükóz kivételével általában hasonló volt mindegyik oldószerben. Etanolban és dioxánban a legtöbb esetben nagyon hasonló hatást fejtettek ki az egyes additívek. Az acetonitril inaktíválta a legnagyobb mértékben az α -kimotripszint (60 perc inkubálás után Akrilex C-enzim aktivitása 34%, Akrilex P-enzim 27%, Szilokróom-enzim 56%), viszont az additívek stabilizáló hatása éppen acetonitrilben volt a legnagyobb mértékű (60 perc inkubálás után Akrilex C-enzim aktivitása 75-80%, Akrilex P-enzim 70-85%). Szilokróom-kimotripszinnél az additívekkel acetonitrilben, a polietilén glikol kivételével jelentős aktiválódást tapasztaltunk. Az acetonitril tartalmú elegyben tapasztalt nagy mértékű stabilizáló hatás Akrilex-C-enzimnél szorbittal (80%), Akrilex P-enzimnél glükóz jelenlétében (107%), Szilokróom-kimotripszinnél pedig laktózzal volt a legkifejezettebb. Ez utóbbi esetben az enzim jelentős aktiválódását figyeltük meg.

A stabilizálószer jelenlétében a 60 perces inkubálás során a vizes kontroll 100%-ához viszonyítva nem, vagy legfeljebb 10-30%-kal csökkent az α -kimotripszin aktivitása,

vagyis az oldószerek okozta inaktiválódást additívek alkalmazásával sikerült jelentős mértékben kivédeni.

6. Vizsgáltuk az α -kimotripszin szintetáz aktivitását is szerves oldószerekben, N-acetil-L-tirozin alkoholokkal való direkt észteresítési, és N-acetil-L-tirozin etil észter alkoholokkal való átészteresítési modell reakciók segítségével. Összehasonlítva a kísérleti körülményeket, hasonlóságot tapasztaltunk a direkt- és átészteresítés között az optimális körülmények közül az alkohol és aminosav szubsztrát koncentrációban, pH-ban és víztartalomban. Mindkét reakció esetén a maximális konverziót 10% alkohol- és 9,75 mM aminosav szubsztrát koncentrációknál kaptuk. Az optimális pH és víztartalom tekintetében csak nagyon kis eltérést tapasztaltunk, az észteresítés pH 7,0-en és 2,8% víztartalom mellett, az átészteresítés pedig pH 7,5-en és 3,3% víztartalomnál ment végbe maximális konverzióval. Lényeges eltéréseket találtunk az optimális hőmérséklet és enzim koncentráció esetében, ugyanis amíg az észteresítésnél 30°C-on és 1,5 mg mL⁻¹ enzim koncentrációval, addig az átészteresítésnél 40°C-on és 0,5 mg mL⁻¹ enzim koncentrációval értük el a maximális kitermelést.

A maximális észterhozamok eléréséhez szükséges idő direkt észteresítéssel: 24 óra, átészteresítéssel: 4 óra. A reakcióelegyekben a maximális észterhozam eléréséig (direkt észteresítés: 83,9%, átészteresítés: 91,4%) az enzim mindkét esetben kiindulási hidrolitikus aktivitásának mintegy 80%-át megőrizte.

7. A különböző rögzített enzimeket (Akrilex C-100, Akrilex P-100 és p-benzokinonnal aktivált Szilokrómm) felhasználva észteresítési és átészteresítési reakciókban (az oldott enzimmél meghatározott optimalizált körülmények között) kimutattuk, hogy a p-benzokinonnal aktivált Szilokrómm-enzimmal volt a legjobb a kitermelés a direkt észteresítési reakcióban (31,3% kitermelés), míg az Akrilex P hordozóra rögzített enzim az átészteresítésben bizonyult a legjobbnak (50,5% kitermelés).

Eredményeink felhívják a figyelmet a szerves oldószeres biokatalitikus folyamatokban a megfelelő oldószer kiválasztásának fontosságára, mert ez nagyban befolyásolja az enzim aktivitását/stabilitását és a katalizált reakciót. A stabilitás vizsgálatok lehetőséget nyújtanak egyrészt arra, hogy jobban megismerjük az enzimek szerves oldószerekben megfigyelt viselkedését, másrészt segítséget nyújtanak abban, hogy az alkalmas oldószer kiválasztásával hatékonyabbá tudjuk tenni a kívánt reakciókat.

Felhasznált irodalom:

- Adlercreutz, P. (1991) On the importance of the support material for enzymatic synthesis in organic media. Support effects at controlled water activity. *Eur. J. Biochem.* **199**, 609-614
- Arakawa, T., Goddette, D. (1985) The mechanism of helical transition of proteins by organic solvents. *Arch. Biochem. Biophys.* **240**, 21-32
- Battistel, E., Bianchi, D. (1993) Influence of the solvent properties on protein stability in organic media. In: *Stability and Stabilization of Enzymes* (Eds. Tweel, W.J.J., Harder, A., and Buitelaar, R.M.), Elsevier, Amsterdam, 13-20
- Fischer, K. (1935) Neues Verfahren zur massanalytischen Bestimmung des Wassergehaltes von Flüssigkeiten und festen Körpern. *Angew. Chem.* **48**, 394-396
- Gray, C. (1988) Additives and enzyme stability. *Biocatalysis* **1**, 187-196
- Kálmán, M., Szajáni, B., Boross, L. (1983) A novel polyacrylamide-type support prepared by p-benzoquinone activation. *Appl. Biochem. Biotechnol.* **8**, 515-522
- Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L., Randall, R.J.: Protein measurement with the folin phenol reagent. *J. Biol. Chem.* **193**, 265-275 (1951)
- Schwert, G.W., Takenaka, Y. (1955) A spectrophotometric determination of trypsin and chymotrypsin. *Biochim. Biophys. Acta* **16**, 570-575
- Simon, L.M., Kotormán, M., Garab G., Laczkó I. (2001) Structure and activity of α -chymotrypsin and trypsin in aqueous organic media. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **280**, 1367-1371
- Szajáni, B., Ivony, K., Boross, L. (1980) Comparative studies on soluble and immobilized pig kidney aminoacylase. *J. Appl. Biochem.* **2**, 72-80
- Vértesi, A., Simon, L.M., Kiss, I., Szajáni, B. (1999) Preparation, characterization and application of immobilized carboxypeptidase A. *Enzyme Microb. Technol.* **25**, 73-79

TUDOMÁNYOS KÖZLEMÉNYEK

a) Az értekezés témájához kapcsolódó közlemények:

1. L.M. Simon, **K. László**, A. Vértesi, K. Bagi, B. Szajáni: Stability of hydrolytic enzymes in water-organic solvent systems. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **4** (1998) 41-45
2. **K. László**, L.M. Simon: α -Chymotrypsin-catalysed synthesis of N-acetyl-L-tyrosine esters in organic media. *Prog. Biotechnol.* **15** (1998) 713-718
3. L.M. Simon, M. Kotormán, K. Maráczy, **K. László**: N-Acetyl-L-arginine ethylester synthesis catalysed by bovine trypsin in organic media. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **10** (2000) 565-570
4. **K. László**, A. Szava, L.M. Simon: Stabilization of various α -chymotrypsin forms in aqueous-organic media by additives. *J. Mol. Catal. B: Enzymatic* **16** (2001) 141-146
5. **K. László**, L.M. Simon: Comparative study on α -chymotrypsin-catalyzed direct- and transesterification in organic solvents. *Hung. J. Ind. Chem.* (2002) (közlésre előkészítve)

b) Az értekezés témájához kapcsolódó előadások, poszterek:

1. K. Bagi, **K. László**, L.M. Simon, B. Szajáni: Immobilization and characterization of lipase from porcine pancreas (1995), 2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, **P 15** (Szeged, Hungary)
2. A. Vértesi, **K. László**, L.M. Simon, B. Szajáni: Studies on an immobilized carboxypeptidase A (1995), 2nd International Conference of the Hungarian Biochemical Society, **P 16** (Szeged, Hungary)
3. **K. László**, A. Vértesi, K. Bagi, L.M. Simon, B. Szajáni: Effects of polar organic solvents on stabilities of some hydrolytic enzymes (1997), 8th European Congress on Biotechnology, **P 3121** (Budapest, Hungary)
4. **K. László**, L.M. Simon: Synthesis of N-acetyl-L-tyrosine esters catalysed by alpha-chymotrypsin in organic media (1998), Stability and Stabilization of Biocatalysts, **P 70** (Córdoba, Spain)

c) Az értekezés témájához nem kapcsolódó közlemények:

1. L. Simon M., K. Deér A., Bagi K., Vértesi A., **László K.**: Hidroláz enzimek szerepe xenobiotikumok detoxifikálásában balatoni halakban. *A Balaton kutatásának 1997-es eredményei*, MTA Veszprémi Ter. Biz. és MEH Balatoni Titkárság, (1998) 194-198
2. L.M. Simon, **K. László**, M. Kotormán, A. Vértesi, K. Bagi, J. Nemcsók: Effects of synthetic pyrethroids and methidation on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Environ. Sci. Health B* **34** (1999) 819-828
3. L. Simon M., K. Deér A., Kotormán M., **László K.**: Xenobiotikumok hatása balatoni halak hidroláz enzimeinek aktivitására. *A Balaton kutatásának 1998-as eredményei*, MTA Veszprémi Ter. Biz. és MEH Balatoni Titkárság, (1999) 109-112
4. M. Kotormán, **K. László**, J. Nemcsók, L.M. Simon: Effects of Cd²⁺, Cu²⁺, Pb²⁺ and Zn²⁺ on activities of some digestive enzymes in carp (*Cyprinus carpio* L.). *J. Environ. Sci. Health A* **35** (2000) 1517-1526
5. L.M. Simon, **K. László**, M. Kotormán, B. Szajáni: A comparative study of the conformational stabilities of trypsin and α -chymotrypsin. *Acta Biol. Szeged.* **45** (2001) 43-49
6. Zs. Varanka, K. A. Deér, I. Rojik, I. Varanka, **K. László**, T. Bartók, J. Nemcsók, M. Ábrahám: Influence of the polyphenolic tannic acid on the toxicity of the insecticide deltamethrin to fish. A comparative study examining both biochemical and cytopathological parameters. *Acta Biol. Hung.* (2002) (közlésre elfogadva)
7. **K. László**, K. Hantosi, L. Nagy, M. Fekete: Anaemia in pregnancy: iron deficient or not? *Clin. Chem.* (2002) (közlésre elküldve)

d) Az értekezés témájához nem kapcsolódó előadások, poszterek:

1. **László K.**, Kovács Gy., Fekete M.: Beckman Synchron CX7 és Hitachi 717 kémiai analizátorokon végzett összehasonlító vizsgálatok (2000), 50th Congress of the Hungarian Society of Clinical Pathology, **P 2734** (Debrecen, Hungary)
2. Hantosi K., **László K.**, Kovács Gy., Fekete M.: Szolubilis transferrin receptor mint a vashiányos anémia megbízható markere (2001), X. Centenárium Fejér Megyei Orvosnapok, **P 9** (Székesfehérvár, Hungary)
3. Sztrida J.I., Bors R. K., Horváth P., **László K.**, Fekete M.: A diabetes mellitus laboratóriumi diagnosztikája (2001), MOLSZE VII. Nagygyűlése, **P 69** (Bükfürdő, Hungary)