

Opponensi vélemény, Adányiné Dr. Kisbocskói Nóra

**Immun- és bakteriális szenzorok fejlesztése optikai hullámvezető fénymodus – spektroszkópiai detektálással, és alkalmazásuk az élelmiszerbiztonság valamint a környezetvédelem területén**

című, az MTA doktora cím elnyerése érdekében beadott dolgozatáról.

A szelektív kémiai érzékelők a kémiai analízis fontos eszközei. Biológiai, biokémiai jelenségek szenzorkutatásba történő bevonásával nagymértékben bővültek a lehetőségek a tématerületen. Egyrészt a biológiai jelenségek igen nagy szelektivitás elérését teszik lehetővé, másrészt megsokszorozódott a szenzorok segítségével, egyszerű mintaalkészítési és mérési protokoll mellett meghatározható anyagok száma.

Az elsőként kifejlesztett bioszenzorról szóló közleményt Clark 1962-ben, tehát több mint egy fél évszázada publikálta. Azóta igen nagyszámú-, bioszenzorok készítéséről, bioszenzor készítési lehetőségek kipróbálásáról szóló közlemény jelent meg. Bioszenzorok fejlesztésére, alkalmazására irányuló munkáról számotadó tudományos folyóiratok, konferenciák jelzik a területen folyó intenzív munkát. A kifejlesztett, bemutatott bioszenzorok közül azonban csak néhány nyert széleskörű gyakorlati alkalmazást. Ennek oka abban keresendő, hogy az alkalmazási területek alapos felmérésére, az egyes területeken előnyösen alkalmazható módszerek részletes kidolgozására, a módszerek validálásának áldozatos munkájára kevesen vállalkoznak.

Adányiné Kisbocskói Nóra dolgozata új típusú bioszenzorok fejlesztésével az azokat alkalmazó módszerek kidolgozásával foglalkozik. Míg a bioszenzorok fejlesztésével kapcsolatos kutatások jó része a klinikai analízis területén felmerülő problémák megoldására irányul, addig ő élelmiszerek tesztelésére alkalmas, élelmiszerekben igen kis koncentrációban jelenlévő káros anyagok, mikroorganizmusok jelzésére, mennyiségének becslésére alkalmas szenzorok és módszerek kidolgozására koncentrált. Az élelmiszerbiztonság ellenőrzése napjainkban fontos gyakorlati probléma. A szelektív bioszenzorokat alkalmazó, költséghatékony gyors teszt módszerek igen jól illeszkednek az élelmiszerbiztonság ellenőrzése területének gyakorlatához.

Általánosan szólva a bioszenzorok működése szelektív biológiai anyagfelismerésen és megfelelő jelképzésen alapul. A dolgozatban leírt munkában tudományos együttműködések során készített immunreagensek segítségével történik az anyagfelismerés. A jelképzés pedig az antigén- antitest kötődésnek nyomjelzés mentes detektálását lehetővé tevő, újszerű, hullám vezető optikai technikán alapul.

A fentiek alapján nyilvánvaló, hogy a dolgozat a gyakorlat számára fontos kutatások eredményeiről szól. A művelt tématerület a tudományos érdeklődés fókuszában van. A jelölt munkájában a bioszenzorok fejlesztése területén újszerű irányokat, lehetőségeket tanulmányoz sikeresen.

Az összesen 135 oldalas dolgozat érdemi része kétoldalas „Bevezetés”-sel kezdődik. Ebben a szerző körvonalazza az élelmiszer analízis, az élelmiszerbiztonság ellenőrzés területén felmerülő problémákat. Említi a bioszenzor kutatás kezdetét, irányát, saját részvételét a fejlesztő munkában.

Ezután következik a számos alfejezetet magában foglaló 26 oldalas „2. Irodalmi Áttekintés”

A 2.1. Fejezet általánosan szól a bioszenzorokról keverve történetet, működési mechanizmust, jelképzést stb.

Ezután a 2.1.1. rész címe „Immunszenzorok” Ez vitatható, kevésbé szól ugyanis szenzorokról, inkább általánosan említi az immunreakción alapuló módszerek fajtáit. Szól a nyomjelzéses és a direkt jelképzés lehetőségéről.

A 2.1.2. rövid rész címe „Mikrobiális szenzorok”. Ez sem tűnik szerencsésnek. A mikroorganizmusok alkalmazásával készített szenzorok többféleképpen lehetnek a működési mechanizmus szerint. Lehet, hogy az anyagfelismerés a metabolizmus sebességének változásán alapul, lehet, hogy a növekedésen, vagy felülethez kötődésen, film vastagság változásán. Ha az immunreakción alapuló szenzorról szól az egyik rész, akkor a másik résznek is célszerű a működési mechanizmus szerint tárgyalni a következő azonos „rangú” részt. Lehetne biokatalízisen alapuló szenzorokról, DNS hibridizáción alapuló szenzor, aptamer szenzor stb.

A következő, 2.2. fejezet címe „Detektálási eljárások” Helyesebb lenne talán a „Bioszenzorok működését lehetővé tevő egyes jelképzési módszerek” cím.

Külön részfejezetet szán a „jelölésmentes detektálási módszereknek” 2.2.1. majd néhány módszerről ír külön, azonos szintű részfejezetben. (2.2.2. OWLS, 2.2.3. SPR, QCM, 2.2.4. ellipszometria). Ezen technikák mindegyike képes jelölésmentes esetben is detektor jelet produkálni, ha anyag kötődés jön létre a detektor felületén. (Az 2.2.1. alá rendelt részei lehetnének helyesebben az említett 2.2.2. stb. részek) Így az alkalmazott címek és szerkezet vitatható. Nem tartom szerencsésnek az egyes jelképző technikáknak az irodalomból vett, különböző stílusú ábrák segítségével történő bemutatását. Különösen nem szerencsés a 2.4. ábra. Ez egy mérési elrendezést mutat. A QCM működésének elve helyett (ezt ígéri az ábra cím)

14. oldal „A 70-es években jött létre az integrált optika” nem világos ennek a jelentése. Mit ért ez alatt?

„a szögmérés elérhető pontossága összemérhető a fényforrás monokromatikusságának mértékével, a hullámvezető anyagának hőstabilitásával” pontosság?, reprodukálhatóság?, relatív szórás? mit ért ez alatt? Hasonló nem jól kifejtett állítást mond az érzékenységről összehasonlítva azt a SPR detektálás érzékenységgel.

16. old. „Az OWLS eljárás” inkább detektálási technika, mérés technika nem eljárás

A 2.3. Fejezet ismerteti a becsatolási szög változásán alapuló jelképző rendszert, annak sajátosságait.

Alfejezetben (2.3.1.) kerül sor a munkában alkalmazott jelképző módszer elméleti alapjainak ismertetésére. Néhány megjegyzést kell tennem ezzel a résszel kapcsolatban.

- Az érzékelő felületre adszorbeált anyag tömegének a becsatolási szögből a törésmutatókból és a  $dn/dc$  anyagi állandó értékéből történő kiszámítására adott levezetés hiányos. Részletesebb, hasonló levezetés található Veres János doktori értekezésében.

- 2.6. ábra Néhány betű jelentése nem adott ( $k_1$ ,  $a$ ,  $a'$ , ) A rács szerepe nem látszik jól az ábrán. Az egyenletek és az ábra csak részben használ azonos jelöléseket. Az ábrán nem egyértelmű, hogy mi az említett „film”.

- A 2.1. és a 2.6. ábra nincs összhangban. A 2.6. ábrán a rács fogazatát a hullámvezető rétegtől elválasztó vonal és a sötéttel jelzett „farkasfog” rész megjelenítése értelemzavaró.

- „A levezetésben szereplő  $n_F$ ,  $n_C$ ,  $n_S$  törésmutatók és a hullámvezető  $d_F$  vastagsága” Nem látok néhány jelet a levezetésben az említettek közül.

17. old. „A levezetésben szereplő  $n_F$ ,  $n_C$ ,  $n_S$  törésmutatók és a hullámvezető  $d_F$  vastagsága ismert, azaz mérhető” - $n_C$  nem szerepel a levezetésben, csak a 9. egyenletben tűnik fel.

- „ $\lambda_0$  a lézer hullámhossza” nyilván a lézer által kibocsátott fény hullámhosszáról van szó.

- A levezetés részletesebb leírása, megfelelő ábra alkalmazásával célszerű lenne.

A fejezet utolsó sorában a „magyarozatára” szó nem helyes.

A 2.3.2. rövid rész az elektrokémiai és az OWLS technika kombinált alkalmazásáról szól.

- 18. oldal Vörös János 2002-es cikkére hivatkozva írja, hogy „Pt referencia- és Ag segédelektrod is helyet kapott”. Elektrokémiai mérésekben inkább Pt segédelektrodot és Ag kvázi referencia vagy Ag/AgCl referencia elektrodot használunk. Miért alkalmaztak a hagyományostól eltérő elrendezést?

- 19. oldal „Az ITO réteg elektronátadási képessége a felületén heterogén” ?? Mit ért ez alatt? Az elektród folyamatok általában heterogén reakciók!

A 2.4. fejezet a hullámvezető szenzorok felületének érzékenyítésére szolgáló anyagfelismerő bioréteg kialakításának problémáival kapcsolatos irodalmi előzményeket tárgyalja.

A következő, 2.5. fejezet címe „Immunszenzorok az élelmiszerbiztonság és a környezetanalitika területén”. A fejezet első féloldali része szól immunanalitikai szenzorokról főleg a jelölt munkáját említve. A további alfejezetek a jelölt által vizsgált szennyező komponensek sajátosságairól, analíziséről szólnak. Kevés említés történik immunanalízisről. Így a fejezet címe vitatható.

A zearalenon „kémiai szerkezetét tekintve rezorcilakton” – helyesebben rezorcilsav lakton.

Az aflatoxinokat „kémiailag benzpirén szerkezetű többszörösen konjugált, policiklusos vegyületek, közé sorolja. (25. oldal) Ez nyilvánvaló tévedés.

A 2.10. ábrán kétszer szerepel a bemutatott ochratoxin A neve.

A 2.11. ábrán bemutatott deoxinivalenol szerkezeti képlete  $R_1$ - $R_5$  öt jelzett csoportot tartalmaz. Az egyes R csoportok mibenlétét nem adja meg. Ez hiányosság.

A „lipidkettősrétegek”-et két szóba írjuk.

- 24. oldal „a trifluralint az EU endokrin zavaró vegyületnek minősítette”. - Nyilván nem az EU, hanem annak egy szerve, bizottsága.

- 27. oldal „a mikotoxinok megengedett határértékét, - Gondolom azok koncentrációjának van határértéke.

- 29. oldal „nem célszervezetek szervezetébe jutva”- ügyetlen fogalmazás!

Az irodalmi áttekintés utolsó (2.6.) része baktérium kimutatására alkalmas módszerek, mikrobiológiai érzékelők alkalmazásáról továbbá új bioszilika alapú hordozóra történő mikroorganizmus rögzítő eljárás irodalmáról szól.

- 32. oldal „A tejsav baktériumok oxigén jelenlétében hidrogén-peroxidot képezhetnek, ami molekuláris szinten reagálhat a sejtfalakkal, a fehérjékkel és a nukleinsavakkal” - ügyetlen fogalmazás!

- 33. oldal „katalizált reakció mechanizmusa...séma szerint mehet végbe” - A reakció megy végbe, nem a mechanizmusa.

Az egy oldalas „3. Célkitűzések” fejezet egy mondata említi a munka célját „immun és mikrobiális szenzorok fejlesztését”. A szöveg többi része az eredményeket sorolja fel. Ez szokatlan. Az eredményeket az Összefoglalásban és a tézisek részben szokásos összefoglalni.

A dolgozat nyolc oldal terjedelmű „Anyagok és módszerek” című fejezettel folytatódik. A 4.1. Anyagok című alfejezet rövid részeket tartalmaz, amelyekben az egyes kísérlet sorozatokban használt anyagok forrásáról, sajátosságáról kapunk információt. Az egyes részek címei nem szerencsések, nem utalnak a részek tartalmára.

A résszel kapcsolatos megjegyzéseim:

- 35. oldal „általános vegyszer” - Mi az? és miért nem adja meg a forrását?

- 35. oldal isopropalin magyarul izopropalin, pendimethalin magyarul pendimetalin, ethalfluralin magyarul etalfluralin.

A 4. fejezet 4.2. alfejezetében történik az alkalmazott mérőberendezés, az alkalmazott laboratóriumi procedúrák, minta előkészítési módszerek, referencia mérések bemutatása. A szerteágazó kísérleti munka rövid, de azért a szükséges információt tartalmazó módon történő leírása nehéz feladatot jelentett. Ezzel a jelölt többé-kevésbé sikeresen birkózott meg. A 4. 2. alfejezet a munka értékes része.

A munka lényegét nem érintő megjegyzéseim a résszel kapcsolatban a következők:

A 4.2. ábra szövege nem jó. A B ábra ordinátáján tömeg/felület jelenik meg, a szöveg vastagságot említi. A magyarázat alapján a vastagság – borítottság- adszorbeált fehérje/felület egység – jel kalibráció problémája természetesen érthető. A 4.2. ábrával kapcsolatban még

problémát jelenthet, hogy úgy tűnik az valós kísérlet során kapott két regisztrátumot mutat. A leírás a tényleges kísérletről nem szól.

A 38. oldalon megjelöltem néhány pongyolaságot : „foszfáttal pufferolt sóoldatban”, „A kémhatást ammóniával állítottuk be” ? Gázzal,  $\text{NH}_4\text{OH}$  oldattal? Koncentráció?, centrifugálás—sebesség??

- 39. oldal 4 N kénsav 2 mólos a helyes, „a kiválasztott ionok a 264 és 306 amu voltak” - tömegű, fajlagos tömegű??

„l”- lel jelöli a fény hullámhosszát  $\lambda$  a szokásos.

A jelölt által végzett, széleskörű kísérleti munka eredményeit a dolgozat „Eredmények és értékelésük” című 5. fejezete foglalja össze 71 oldal terjedelemben. A fejezet a munka irányainak megfelelő öt alfejezetet tartalmaz.

Az első három alfejezet arról a munkáról szól, amelyben a jelölt ipari partnereivel együttműködve az OWLS technika fejlesztéséhez járult hozzá nagymértékben szem előtt tartva az élelmiszerbiztonsági vizsgálatok igényeit, a jelölésmentes immunanalitikai módszerek fejlesztését.

Az első alfejezet egy átfolyó küvettás FIA rendszer kifejlesztéséről és egy, az immunanalitikai vizsgálatokhoz jól használható hosszabb inkubációs időt lehetővé tevő küvetta készítéséről szól. Az alfejezet rövid. Két, a kereskedelmi készülék fényképét mutató ábrát tartalmaz. Nem világos, hogy a kialakított FIA rendszer kifejlesztésében milyen mértékű munkát végzett a jelölt.

Az 5.2. alfejezet az OWLS technika immunanalitikai alkalmazásához szükséges felületmódosító eljárások vizsgálatával, szilanizált szenzorfelületek kialakításával, azok felületén történő fehérje adszorpció mértékének tanulmányozásával foglalkozik. Az elért eredményekről nemzetközi folyóiratokban megjelent publikációk szólnak.

A különböző módon képzett felületi szilánrétegek vastagságát vizsgálta, az értékeket táblázatban mutatja be. Nem világos azonban, hogy milyen módszerrel történt a szilánréteg vastagságának mérése. Írja, hogy egyes esetekben durva, egyenetlen volt a képződő réteg. Mennyire reprodukálható az alkalmazott vastagságmérő módszer?

- 46. oldal. Kérdésem, hogy: milyen térfogatú térben került sor a gőzfázisú szilanizálásra? Milyen távol volt a lemez a folyadék felülettől?

A felületkezelési módszerek kiválasztása, tanulmányozása során kapott eredmények részletes bemutatására nem került sor a dolgozatban. A fejezet inkább csak a megállapításokat, a levont következtetéseket tartalmazza.

5.6. ábra az OWLS jel változását mutatja. Az anti-BAS oldat dózisok injektálása után a jel növekszik, majd csökken. Mi okozza a csökkenést? A nem specifikusan kötött antitestek deszorpciója? Nem alakul ki egyensúlyi jel. Mi a jel tulajdonképpen? A maximum?

- 53. oldal „a vákuumszilanizált szenzorok légmentesen voltak lezárva” magyartalan fogalmazás.

Az 5.10. ábra a felületegységre kötődött tömeget azaz, az OWLS jelet mutatja az idő függvényében. Ugyanakkor azt mondja, hogy a hosszabb reakció idő biztosítás érdekében inkubációs küvettában végezték a rögzítést. Hogy készült az ábra? Az ábrán a reagensek,

minták, regeneráló ágens beadási idejét nem jelzi nyilakkal. Így egyes lépések ideje csak nehezen azonosítható. Egy reagens jelzése után több jelváltozás látszik.

Nehezen értelmezhető az alábbi szakasz 53-54. oldalakon. "A mérés elején a legnagyobb jelet az 1%-os borostyánkősav-anhidrid oldattal kezelt szenzorokra kaptuk, a különböző koncentrációjú standardok jele közötti különbség azonban kisebb, mint a többi mérésnél, bizonytalan, gyorsan csökkenő jeleket kaptunk, ezért az 1% borostyánkősav-anhidrides kezelést a továbbiakban nem alkalmaztuk"

- 54. oldal „a szenzor felületén 100µg/ml BSA fehérjét rögzítettünk” – nyilván ilyen koncentrációjú oldatot használtak a valamennyi µg/cm<sup>2</sup> BSA rögzítésre. A fogalmazás pontatlan!

- 54. oldal „standardokra mért jelek lineárisak voltak” függvények lehetnek lineárisak, jelek maguk nem!

- 55. oldal „nem romlott a szenzor érzékenysége” inkább csökkenni szokott az érzékenység „minták mérésnek idejét” – mérésének idejét.

Az ötödik fejezet 5.4. számú alfejezete különböző, az élelmiszerbiztonság szempontjából fontossággal bíró növényvédőszer maradvány, mikotoxin, biogén amin, endokrin zavaró anyag mérésére, jelzésére alkalmas immunszenzorok kifejlesztéséről, vizsgálatáról szól. A jelöltnek sikerült hét anyag mérésére szelektív immunanalitikai elven működő szenzort és módszert kifejlesztenie. A kidolgozott eljárások alkalmasaknak bizonyultak az illető anyagoknak valós mintában lévő rendkívül kis koncentrációjának mérésére. A szenzorokról, módszerekről a tématerület vezető nemzetközi folyóirataiban megjelent közlemények szólnak. Az egyes szenzorok, módszerek kidolgozásához a jelölt több területen, nagy szakértelemmel végzett kutató munkát. Elő kellett állítania megfelelő immun reagenseket, vagy beszerezni azokat együttműködő kollegáktól. Meg kellett oldani a megfelelő érzékenységű és stabilitású szenzor réteg kialakítását az OWLS szenzor chip felületén. Meg kellett állapítani a direkt és a kompetitív detektálási módszerek alkalmazásához szükséges paramétereket, a módszerek mérési tartományát, reprodukálhatóságát, szelektivitását. Valós minták mérésével volt szükséges igazolni a szenzorokat alkalmazó mérési módszerek alkalmazhatóságát, előnyeit. Ezen utóbbi munkában megelégedett az un. spike-olt mintákkal végzett kísérletekkel. Valós, a meghatározandó anyagot nem tartalmazó mintához ismert mennyiségű anyag dózisokat adott és a visszanyerést vizsgálta a kidolgozott új módszerrel és az eredményeket összehasonlította alkalmas, a területen elfogadott módszerrel végzett analízisek eredményeivel. (Az utóbbi vizsgálattal kapcsolatban meg kell jegyezni, hogy az analitikai folyóiratok szívesebben vesznek tényleges valódi minták esetében végzett összehasonlító méréseket az új módszerek alkalmazhatóságának, előnyeinek igazolására.)

A viszonylag hosszú részfejezettel kapcsolatban néhány a lényegét nem érintő megjegyzést kell tennem:

- 57. oldal „kimutatási érzékenység” inkább határ.

5.14., 5.18., 5.21. ábrák - A log koncentráció tengely skála jelölése nem egységes a kis koncentrációkat exponenssel E-X- el a nagyokat számokkal jelöli pl. 100000. Van ennek valami oka?

- 59. oldal. Talán az „érzékenység” helyett a kisebb alsó mérési határ, vagy dinamikus mérési tartomány kifejezés helyesebb volna.

- 59. oldal „a szenzor felületén 10 µg/ml trifluralin-BSA-konjugátumot rögzítettünk” – valószínűleg ilyen koncentrációjú oldatot használtak a felület módosítására. (Ez a kifogásolható egységben megadott adat több helyen előfordul pl. 68. oldal). Kérdésem, hogy a OWLS jelből nem lehetett-e becsülni a módosító réteg tényleges vastagságát? Érdekes módon az 5.16. ábra esetében a  $t=0$  perchez tartozó ordináta érték nulla, pedig már az érzékenyítő BSA konjugátum a felületen van.

- 60. oldal „szenzorhígítással” nem szérum hígításról van szó? micsoda a szenzor itt? Célszerű egy valamit szenzornak nevezni, lehet az a felületi membrán, vagy akár az egész cella. De csak azt nevezzük szenzornak.

- 60. oldal „koncentrációval arányos” – helyesen koncentrációtól függő.

- 61. oldal „Míg a jelek nagysága kissé csökkent a mérések során, a standardok és a vakminta közötti különbség stabil értéket mutatott...” Kérdésem, hogy micsoda a jel itt? A kompetitív módszer esetén a reagens vak minta nagy borítottságot eredményez. A különbség lehet a jel. Lehet, hogy a vak itt nem reagens tartalmú oldatra adott választ jelent? Lehet, hogy sem mintát sem reagenst nem tartalmaz a vak?

- 61. oldal Kérdésem az oldalon közöltekkel kapcsolatban, hogy vajon van-e lehetőség és értelme az OWLS és ELIZA kalibrációs görbék meredekségének összehasonlításának. Más egység, más jelenség (nem ír egységet).

A szelektivitást a jel %-ában adja meg. Függhet-e ez a relatív koncentrációtól, Nem lett volna célszerű más koncentrációban is megnézni a jel arányt. Esetleg a kimutatási határt (vagy azonos jelet adó koncentrációt).

Nem tartom helyesnek a „5.4.1.4.3. ... szenzor statisztikai értékelése címet” a szenzor választ lehet talán statisztikailag értékelni.

- 64. oldal. A dolgozatban többször előforduló megfogalmazási helytelenség: „immunszenzort fejlesztettünk ki .... növényvédőszer meghatározására felszíni vizekből...” ---helyesen : immunszenzort fejlesztettünk ki felszíni vízmintákból történő .... növényvédőszer meghatározására; vagy felszíni vízminták ... koncentrációjának meghatározására.

- 67. oldal „javította ... rontotta az érzékenységet” – helyesen : növelte vagy csökkentette ” alkalmasak voltak” helyesebben alkalmasnak bizonyultak. Az érzékenység és az alsó méréshatár vagy detektálási limit fogalmának keverése itt és máshol is előfordul a dolgozatban.

Az 5.6. táblázatban megadja a visszanyerés százalékot. Van-e annak magyarázata, hogy itt megadja az egyszerűen számolható adatot más táblázatában (pl. 5.3., 5.4. táblázat) viszont nem. Talán helyesebb lett volna a hasonló adatokat tartalmazó táblázatokat egységesen, egyforma oszlop számmal, egységes fejléccel szerkeszteni és úgy illeszteni a dolgozatba.

- 73. oldal „A matrixhatás kiküszöbölésére” tiszta paprikamintákat spike-olva készítettek mintaoldatokat. Kiküszöböli ez a matrix hatást? A minta anyagot nem tartalmazó azonos matrix azonos méretű matrixhatást idézhet elő.

5.26. ábra. Az ábra szöveg indirekt immunszenzort említ. Ez a kompetitív munkamenetre utal? Indirekt módszernek a titrimetriás módszereket szokás nevezni! Az ábrán csak kalibrációs pontok szerepelnek. Az azokra illesztett görbe nem látható, az írottak ellenére.

- 73. oldal „A mesterségesen szennyezett mintákból a 4.3.3. fejezetben leírtak szerint acetonitril-víz kivonatot készítettünk, ...” Az illető helyen nincs leírva az extraktum készítési procedúra! (oldószer elegy összetétel, térfogat, bemért minta mennyiség stb. adatok)

Az alsó méréshatár, detektálási határ megállapítására használt kritériumokat nem találtam a dolgozatban. A  $3\sigma$  kritérium itt nem érvényes.

Az 5.29. ábrán látható „kalibrációs görbének” nevezett adatokhoz nem tartozik jelmagyarázat. Talán nem lett volna felesleges megadni, hogy az egyes markerek milyen bormintára vonatkoznak. A pontokra illesztett görbét nem mutatja az ábra. Így görbe helyett kalibrációs adatok a helyes név.

- 77. oldal „a különböző borok mátrix hatása nem tér el egymástól” a vizsgált három bormintára lehet csak ezt a megállapítást tenni.

- 78. oldal „36,6  $\mu$ l előkezelt DON mikotoxint adtunk” nyilván mikotoxin oldatról van szó! „kimutatási érzékenységet” az micsoda? Koncentráció határ?

Az 5.31. ábrán látható  $\Delta$ tömeg/felület egység a zéró jel és a mintára kapott jel különbségét jelenti. A szövegben adott jelnagyságok összehasonlítására kerül sor. Ez zavaró lehet. Jó lett volna az ábrán vagy a szövegben hangsúlyozni a különbséget az abszolút OWLS jel és a jel csökkenés viszonyát.

„A mesterségesen szennyezett mintákból a 4.3.5. fejezetben leírtak szerint acetonitril-víz kivonatot készítettünk, ...” Az illető helyen itt sincs leírva az extraktum készítési procedúra!

„lineáris méréstartomány” --- Van e olyan az immunanalízisben?

Az angol szakirodalomban használt „M” jelet és a mol/l koncentráció jelölést felváltva használja pl. 82. oldal. Célszerű egy dolgozatban azonos jelölést használni, magyar nyelvű dolgozatban a mol/dm<sup>3</sup> az általánosan javasolt.

Az 5.34. ábrára nincs hivatkozás, vagy magyarázat a szövegben. Így nem tudni, hogy ez a gélelektroforetikus lemez képe mit keres a dolgozatban. Micsoda az ábra szövegében jelzett „7. standard”?

- 83. oldal „Vizsgáltuk a glutáraldehiddel rögzített hisztamin – BSA - konjugátum mennyiségének hatását a jelek nagyságára, stabilitására és a 10 $\mu$ g/ml koncentrációjú oldat alkalmazása bizonyult megfelelőnek.” Szóval két mondatban lenne célszerű megfogalmazni a mondanivalót. Tulajdonképpen a rögzítési lépésre használt oldat koncentrációját változtatta, és nem a rögzített komplex mennyiségét. Így a 10 $\mu$ g/ml koncentrációjú oldatot találta alkalmasnak. (Mást vizsgált, mint amit állít.)

5.36. ábra. A jelmagyarázat szövege helytelen. A szürke négyzet hisztamint jelent, a zöld pedig immunszenzort. (Nyilván immunszenzorral mért koncentrációt kíván jelezni.) Nem világos a normált HPLC értékek származtatása. Emellett nehéz egyetérteni azzal a megállapítással, hogy a szenzor használható élelmiszer mintákban hisztamin mérésre.

- 85. oldal „az immunszenzorral mért hisztamin koncentrációt a különböző biogén aminok nagy koncentrációban való jelenléte befolyásolja, csak az adott határértéket meghaladó



koncentrációt mutató mintákat kell a további vizsgálatokba bevinni.” Nem egyértelműek a mondottak, emellett a minta koncentrációját nem befolyásolja, legfeljebb a kapott eredményt teszi hamissá. A 5.36. ábra legend-je nem egyértelmű. A HPLC-vel kapott hisztamin és egyéb biogén aminok koncentrációját tünteti fel, az immunszenzorral meg csak egy oszlopot. Valami kiegészítés hiányzik az immunszenzor oszlop megnevezés helyén (pl. össz. optikai jel alapján számított). Kérdéses továbbá, hogy az alkalmazott HPLC-s módszer nem választja-e el az egyes aminokat. Ha a kromatográf külön méri az egyes biogén aminokat akkor hogyan készültek az ábrán látható oszlopok?

Az 5.37. ábrát eredményező kísérlet részletes leírását nem találtam a dolgozatban. Az ábrán látható görbék alakja, a maximum jelleg magyarázatra szorul.

- 88 oldal „A versengő mérés érzékenysége 2 nagyságrenddel kisebb” talán az alsó mérési határ kisebb két nagyságrenddel. (Ne írjunk számot ilyen mondatba, és ne keverjük az érzékenység és az alsó méréshatár fogalmát!)

5.40. Ábra. Csak kalibrációs pontok, nem görbe

- 91. oldal „Lpv fehérje tisztítását nőstény ponty és keleti unka petefészkéből végeztük” – nyilván onnan vettek szövetmintát, és azt tisztították. Igen sok ehhez hasonló vitatható fogalmazás található.

5.12. táblázat. Néhány cella elválasztó vonalat célszerű lett volna kitörölni.

Az 5. Eredmények és értékelésük című fejezet következő, mintegy 24 oldalas, 5.5. számú alfejezete az OWLS technika bakteriális rendszerek esetében jelentkező alkalmazási lehetőségeinek vizsgálatával foglalkozik.

Az alfejezet első része egy új típusú bakteriális szenzor kifejlesztéséről és alkalmazásáról szól. A jelölt elektromosan vezető ITO réteget hordozó OWLS chip felületén, újszerű módon, elektromos potenciál programmal segítve *Lactobacillus plantarum* baktérium kolóniát immobilizált. Az immobilizációs módszer kidolgozása után az így kifejlesztett szenzor segítségével tanulmányozni tudta különböző kémiai hatásoknak a baktérium kolónia életfunkciójára gyakorolt hatását. A *Lactobacillus plantarum* baktériumok egyes élelmiszeripari fermentációs folyamatokban fontos szerepet játszanak. A fermentáció során képződött hidrogén peroxid és egyes savak befolyást gyakorolhatnak a baktériumok életvitelére, szaporodására. Az OWLS technika lehetőséget biztosított a baktériumok vegyszer tolerancia sajátágának vizsgálatára. Az eredményekről vezető folyóiratokban megjelent közlemények szólnak. Az alfejezetben leírtak, újszerűsége, eredményes volta a dolgozat értékes részét képezi.

Néhány kérdés merülhet fel az alfejezetben leírtakkal kapcsolatban:

- 92. oldal. Miért Pt elektródot használt vonatkozási elektródként?

5.44. ábra. Kérdésem, hogy hogyan készítették az elpusztított sejtenyészetből  $10^8$  TKE /ml koncentrációjú oldatot? (Természetesen következtethető az eljárás, az eredeti  $10^8$  TKE /ml-es oldatot a forralás után használta.)

Az EC-OWLS technikával mérte a felülethez kötött sejtek számát. A jeltől hogyan következtetett a sejszámra? Az 5.51. ábrán CFU/ml egységben van megadva. A rövidítések jegyzékében csak TKF van megadva a colony-forming unit rövidítését nem találtam. Hogy küszöbölte ki az előző részben említett sejt duzzadás jelre gyakorolt hatását?

- 97. oldal „A kezeletlen minták esetében EC-OWLS módszerrel vizsgálva úgy találtuk, hogy az inkubációs idő alatt a sejtszám 2 nagyságrenddel nőtt.” Hiányzik, a szövegből, hogy milyen hosszú volt az inkubációs idő. Az ábra alapján valószínűleg 28 órára gondolt a jelölt. A mikro-assay mérés részletes leírását nem találtam meg a dolgozatban, így a sejt koncentráció növekedés értékét az abszorbancia növekedéséből nem lehet becsülni. Kérdésem, hogy végzett-e ilyen becslést az összehasonlítás céljából?

- 98. oldal. Sejtnövekedés, sejtek szaporodása, sejt koncentráció növekedés kifejezéseket azonos jelenség jelzésére használja. A sejtnövekedés helyett mindenképpen a sejt szám növekedést gondolom helyes kifejezésnek. Az OD – gondolom optikai denzitást – jelző rövidítés nincs a rövidítések jegyzékében. Érdekes módon az 5.52. ábra tengelyén az A (abszorbancia) van feltüntetve. Van-e annak oka, hogy az 5.51. és az 5.52. ábrán az inkubációs idők különböznek. Azonos inkubációs idő jobb összehasonlítást tenne lehetővé.

Az 5.5. Alfejezet következő, rövid, kétoldalas 5.5.2. része Escherichia coli sejtek mérésére kifejlesztett, OWLS alapérezékelőre épülő immunszenzorról szól. A szenzor működésének vizsgálata során úgy találták, hogy az elpusztult sejtek azonos koncentrációban nagyobb jelet produkálnak a szenzoron az élőknél. Vajon miért kötődnek jobban az elpusztított coli baktériumok az immunszenzor felületéhez, mint az élők? Van-e erre magyarázat? Használhatóbb analitikai eszköz lenne az immunszenzor, ha az élő, fertőzni képes baktériumokat detektálná lehetőleg szelektíven. Az észlelt sajátság nem előnyös élelmiszer minőségellenőrzésre szolgáló alkalmazás lehetősége szempontjából. Ennek megfelelően érthető, hogy az előkísérletek után nem került sor a jelenség okainak felderítésére, további fejlesztő munkára.

Az 5.5.3. tizenhárom oldal terjedelmű alfejezet bioszilika rétegnek OWSL szenzor felületén történő kialakításával, a réteg sajátságainak vizsgálatával, a réteg alkalmazásával készített bioszenzorok készítésével, azok alkalmazási lehetőségeinek vizsgálatával foglalkozik. Az érdekes eredményekről szóló munkáról a jelölt a közelmúltban vezető nemzetközi folyóiratokban megjelent, első szerzős közleményekben számolt be. A bioszilika réteg képzésére szilikatein enzim által katalizált reakciót, és FIA technikát használ. A szilikatein enzim felfedezésére csak a közelmúltban, a múlt század végén került sor. A szilikatein enzim által katalizált reakcióban keletkező porózus bioszilika rétegek készítése, annak nanobiotechnológiai alkalmazása nagymértékben az érdeklődés középpontjában van. A jelölt által elért eredmények fontosságához, újszerűségéhez nem férhet kétség.

A résszel kapcsolatban néhány a munka értékét nem befolyásoló kérdés, merülhet fel:

5.56. ábra. Az olvasó úgy gondolja, hogy az enzim oldat injektálása után kapott jel a monomer injektálás után tovább növekszik, ahogy a polimer épül a felületen az adszorbeált enzim katalizálta folyamatban. A jel azonban nulláról indul. Vajon az ábrák különbség jelet mutatnak? Hasonló gondolat merül fel az 5.57. ábra esetében is. A polimer nem mosódik le, így a C jelnek tömeg/ felület a további növekedését kell mutatni, ahogy az ismételt enzim injektálás után enzim adszorpció történik.

- 102. oldal. Korábban megállapította, hogy „A szilanizált felület kevésbé alkalmas a bioszilika-réteg adszorpciójához”. Mégis azt alkalmazza az áramlási sebesség hatásának vizsgálatához (5.56. ábra). Lehet, hogy csak az ábra címe téves? Arra utal, hogy az ábrán a jel jóval nagyobb, mint a szilanizált STO felületnél mutatott jel (előző ábra).

Az 5.58. ábra diszkussziója során a harmadik injektálás után az előzőknél kisebb jelet kapott. Ezt a szenzor felület telítődésével magyarázza. Ugyanakkor az enzim képes továbbra is

katalizálni polimer réteg képződését. Az adszorbeálódott biopolimer alapréteghez további rétegek kötődhetnek. Nem feltétlenül a felület adszorpciós telítése kell, hogy domináljon itt. Vajon nem lehet a csökkenés oka az, hogy a bioszilika réteg vastagsága meghaladja az evanescens tartományét, így a lézer sugár már nem detektálja az evanescens tartományán kívül eső réteg növekedését?

A felületi bioszilikaréteg képződéssel kapcsolatos ábrák tartalmazzák a szilikatein enzim injektálása után kapott jelet. Az enzim katalizálta reakcióban keletkező poliszilika réteg kialakulását mutató jel azonos oszlopdiagramon kerül bemutatásra. Valószínűnek látszik az 5.58. ábra alapján, hogy az enzim adszorpciót jelző jel feletti jelnövekedést mutatják a TEOS injektálás utáni jelek. Ez azonban nehezen következtethető a leírottakból. Kérdésem továbbá az oszlopdiagramok értelmezésével kapcsolatban, hogy vajon a jelek alakulásában a detektálási mélység korlátozott voltának nincs-e szerepe?

Az 5.60. ábra azonos enzim oldat mennyiségek injektálása és különböző koncentrációjú TEOS oldatok injektálása után kapott jeleket mutat. Az enzim injektálásra kapott jelek jelentősen különböznek. A különbségek nagyobbak látszanak, mint a mutatott szórás értékek. Kérdésem, hogy ez a szenzorfelületek közötti különbség nem befolyásolja-e az optimális koncentráció megállapítását.

- 104. oldal „enzimgátlás lépett fel” Az enzim katalizálta folyamatok esetében, nagy szubsztrát koncentráció okozta reakció sebesség-csökkenést inkább szubsztrát inhibíciónak nevezném.

Az 5.61. ábrán két különböző hőmérséklet melletti enzim katalizálta polimer növekedés jelét láthatjuk. A harmadik jel a spontán polimerizációt mutatja. Nem jelölte, hogy azok a mérések milyen hőmérsékleten történtek. Nem lehet, hogy a nagy szórás a hőmérsékleti különbségekből adódik? Zavaró, hogy a három marker jelentését mutató szövegből kettő a hőmérsékletre utal, a harmadik BSA-injektálásra.

5.64. ábra. Az ábra szövegében célszerű lett volna jelezni az áramlás megszakítás tényét, a jelek alakjának értelmezését segítő.

- 109. oldal „pufferbe adagolva” - helyesen puffer oldatba adagolva, vagy juttatva.

- 113. oldal. „a jelek exponenciálisan növekedtek” - ezt nem látom igazoltnak.

- 113. oldal „a szenzorok alkalmazhatóságát szennyezőanyagok, szermaradványok kimutatásával igazoltuk”. A szenzor jelet adott, hol nőtt a jel, hol csökkent az egyes esetekben viszonylag nagy koncentrációban jelenlevő anyagra. Korainak tartom a megállapítást. A jel változásának oka korán sem felderített. A kialakított eszköz alkalmazhatóságának igazolása, alkalmazási területének felderítése - véleményem szerint még sok munkát igényel. A leírtakat inkább biztató előkísérleteknek gondolom.

A dolgozat 6. négyoldalas fejezete foglalja össze az elért tudományos eredményeket. Az itt megadott tizenegy pont tekinthető Tézispontoknak. A tézispontokkal lényegében egyetértek. Némelyik megfogalmazása lehetne szerencsésebb, illetve rövidebb.

A dolgozat az alkalmazott rövidítések listájával, majd a 317 hivatkozást tartalmazó „Irodalom jegyzék”-kel zárul.

A dolgozathoz mellékelt Tézisfüzet nagymértékben a dolgozat szöveg részeinek kivonata, másolata. Egyes véleményem szerint hibás megállapítás (pl. „Az aflatoxin benzpirén

szerkezetű, többszörösen konjugált, policiklusos vegyület” „Pt-referencia és Ag-segédelektród teszi lehetővé”) a Tézisfüzetben is előfordul. A Célkitűzés rész a célkitűzések megfogalmazása helyett a Tézisfüzetben is eredményeket említ röviden, a dolgozat anyagához hasonlóan.

A dolgozat formailag megfelel a követelményeknek. Általában olvasmányos stílusban íródott. Nem mentes azonban a laboratóriumi szlengektől, helytelenül fogalmazott mondatoktól. Ezek közül többet megjelöltem a dolgozatban. Néhányat az előzőekben említettem.

Újabban folyóiratok kérni szokták a cikkek bírálóit, hogy adja meg a dolgozat erős és gyenge oldalát. Ennek szellemében írom, hogy a jelölt egy újszerű detektálási technikát sikerrel alkalmazott a bioszenzorok fejlesztése területén. Észrevette, hogy a kiváló alsó méréstartományt biztosító OWSL alapérzékelőre építhetők olyan bioszenzorok amelyek különböző élelmiszerbiztonsági mérési probléma megoldására alkalmasak lehetnek. Az alapérzékelő fejlesztést végző kutatókkal együttműködve számos, a bioszenzor készítéshez szükséges felületmódosító módszert, reagens készítési eljárást dolgozott ki sikeresen. Érzékelőket, immunanalitikai módszereket dolgozott ki több igen kis koncentrációban jelenlevő szennyező anyag, mikroorganizmus mérésére. A kidolgozott módszereket mesterségesen szennyezett mintákkal vizsgálta. Az eredményeket a tématerület vezető folyóirataiban közölte. Az eredmények gyakorlati fontosságúak. A fentiek a dolgozat erős oldalát jelentik.

Gyenge oldalként az előzőekben felsorolt, - bár nem kevés - szerkesztési, megfogalmazási pontatlanságok, kisebb hibák, hiányosságok róhatók fel. Ezek tulajdonképpen a munka lényegét nem érintik, egy gondos átnézéssel kiküszöbölhetők lettek volna. Gyenge oldalnak tekinthető továbbá az is, hogy csak kevéssé törekszik az OWLS jel és a különböző paraméterek közötti mennyiségi összefüggések vizsgálatára, az elméleti vonatkozások feltárására.

A jelölt a hazai bioszenzor kutatás jól ismert, kiemelkedő egyénisége. Korábbi, elektrokémiai alapérzékelőre épülő bioszenzorok fejlesztése területén végzett munkájában is igen jelentős eredményeket ért el. Sikeresen vezet hazai projektek-, illetve nemzetközi együttműködés keretében folyó kutatásokat, irányítja fiatal kutatók munkáját. Eredményeiről 47 tudományos közleményben számol be melyek közül 33 nemzetközi tudományos folyóiratban jelent meg. Közleményeinek egyesített hatástényezője 69.6. A cikkekre kapott független hivatkozások száma az MTMT adatbázis szerint 358. Ezek alapján a Hirsch index 14-nek adódik. Teljesíti a fokozat megszerzéséhez szükséges publikációs aktivitási követelményeket.

**A dolgozatban leírt eredményekhez széles területen végzett céltudatos, szorgalmas munka vezetett. Tulajdonképpen a munkát összességében hasznosnak és jónak tartom. Eléri azt a színvonalat, amely alapján sikeres védés esetén az MTA doktora fokozat megadható. Ennek megfelelően javaslom a dolgozat nyilvános védésre bocsátását.**

Pécs, 2014. július 29.

Nagy Géza

egyetemi tanár az MTA doktora