

Válaszok

Kazinczyné Dr. Vas Mária tudományos tanácsadó, az MTA doktora bírálatára

Nagyon köszönöm Kazinczyné Dr. Vas Máriának a doktori értekezésem alapos és részletes bírálatát. Köszönöm dicsérő megjegyzéseit, kritikai észrevételeit és tanácsait. Megjegyzéseire és kérdéseire a következőket válaszolnom:

Megjegyzések:

„Formai szempontból azonban mégis van néhány megjegyzésem, mégpedig az értekezésben használt nevezéktannal és rövidítésekkel kapcsolatban. Pl. a 4. oldalon azt írja, hogy a hemicellulóz glükózból és más monoszacharidból épül fel. Sajnos ez így nem egészen helyes, mivel a hemicellulóznak, nevével ellentétben, nincs szerkezetileg köze a cellulózhoz, ugyanis egyáltalán nem tartalmaz 6-szénatomos glükóz-egységeket, hanem kizárólag 5-szénatomos pentózok (nevezetesen a D-xilóz és D-arabinóz) polimerje. – A pektin szerkezeti részletét ugyan szépen szemlélteti a 4. ábra (5. old.), így megérdemelte volna azt is, hogy a galakturonsav mellett a ramnóz nevű alkotóeleme is pontosabban, a nomenklatúra szerinti nevéen is meg legyen említve, nevezetesen L-ramnóz = 6-dezoxi-L-mannóz-ként, ami szerkezetére is utalna. Ehhez kapcsolódóan kérdezem, hogy az 5.b. ábrán feltüntetett glükomannán nevű polimerek pontosan melyik vegyülettípushoz tartoznak?

A nevezéktanhoz kapcsolódik, hogy sajnos több esetben a rövidítések nem következetesek. Pl. az endoglükánáz a rövidítésjegyzékben EG-ként, a 38. old.-on pedig EGlu-ként szerepel. Továbbá, a pektináz enzimekből ötféle szerepel a 13. ábrán (20. old.) és rövidítésjegyzékben is, de a poligalakturonázt a 20. old.-n PG-nek, viszont a rövidítésjegyzékben és a 38. old.-n is PGal-nak rövidíti. Az ilyen apró hibák, elírások néha nagyon bosszantóak, és sajnos rontják a dolgozat olvashatóságát.”

Válasz:

- Az értekezés 4. oldalán a hemicellulózok definícióját az irodalomjegyzékben is hivatkozott három, angol nyelvű [6,7,1] – a fa- és cellulózkémia, valamint a cellulózgyártás területén elismert – szakkönyv alapján adtam meg. Mindhárom szerint a hexózok, és ezen belül a D-glükóz, továbbá a D-galaktóz és a D-mannóz is alkotóelemei a hemicellulózoknak. Ezt a definíciót erősítik az 5.b ábrán jelzett glükomannánok is, amelyek a keményfák jellemző hemicellulóz heteropolimerjei. A glükomannánokban a glükóz és mannóz egységek $\beta(1-4)$ -glikozidos kötéssel kapcsolódnak egymáshoz, és arányuk körülbelül 1:2.
- A nevezéktanra és rövidítésekre vonatkozó kritikai megjegyzését elfogadom és köszönöm. Egyetértek bírálóval, hogy az ilyen apró hibák megnehezítik a dolgozat olvasását és rontják a dolgozatról alkotott képet.

Kérdések és megjegyzések:

1. Az értekezés 24. b. ábráján (50. old.), ami a pamutmaghéj xilanázos kezelésének hatását szemlélteti, a „kezeletlen” és a „kontroll” minták között pontosan mi a különbség? Amennyiben a „kezeletlen” az enzimes előkezelés nélküli minta esetén mutatja a lúg hatására történő lignin-kioldódást, akkor mi a „kontroll”? A leírás szerint a kontroll pufferes előkezelést jelent, szintén enzim távollétében. Az ábra szerint e már önmagában is jelentősen segíti a lignin lúg általi kioldódását! Mit gondol, ha ez valóban így van, mi ennek a magyarázata?

Válasz:

A 24.b ábra a NaOH-os kezelés során kioldódó lignin koncentrációját szemlélteti a xilanáz enzim hidrolízis, mint előkezelés paramétereinek a függvényében. A kezeletlen minta esetén nem alkalmaztunk semmilyen előkezelést, a kontroll minta esetén pedig csak pufferes (pH 7) előkezelést alkalmaztunk. Az eredmények azt bizonyítják, hogy az előkezelés - akár pufferes, akár xilanáz enzim - jelentős hatást gyakorol az azt követő lúgos kezelés eredményességére és segíti a lignin kioldódását.

A pufferes kezelés kb. 10 %-os tömegvesztést okoz. Feltételezhető, hogy a folyamat során elsősorban a vízoldható poliszacharidok (pl. elágazott szerkezetű hemicellulózok) és szerves anyagok, valamint más kismolekulás anyagok (pl. monoszacharidok, színes vegyületek) kerülnek oldatba. A mért értékek azt bizonyítják, hogy az így kialakuló új szerkezet hozzáférhetősége a lúgoldat számára javul, és ennek köszönhetően a pufferrel előkezelt mintából a lignin eltávolítása nátrium-hidroxid oldattal eredményesebb, mint a kezeletlen mintából.

2. Az előbbihez kapcsolódik a 7. táblázat (50. old.) adatainak az értelmezése. Ennek első két sora nem érthető, hiszen itt nem volt jelen enzim, mégis xilanáz-hatás van bemutatva! A világossági tényező (L^+) mérőszáma hogyan van meghatározva? (42,1-ről 40,0-re csökken a pamutmaghéj lúgos kezelésekor, viszont enzimes kezelésnél nő 42,1-ről 45-re.) Az előbbi sötétedést, az utóbbi világosodást jelent, de milyen mértékűt?

Megjegyzem, hogy ezek a skálák a Módszerekben sincsenek meghatározva! Továbbá, miért okozhat a lúgos kezelés sötétedést?

Válasz:

Bíráló 7. táblázatra vonatkozó kritikai megjegyzésével egyetértek és elfogadom. Biztosan könnyebben érthető és egyértelmű lett volna, ha a kontroll kezelése eredményeit elkülönítve, a táblázat bontásával adom meg, és nemcsak a táblázat lábjegyzetében jelzem, hogy az első két sor a kontroll kezelésekre vonatkozó értékeket tartalmazza.

Bíráló kritikai megjegyzését, hogy a módszerek fejezetben nem értelmezem a világossági tényezőt, elfogadom. Az értekezés egy korábbi, az elővételre benyújtott változatában részletesebben mutattam be a kutatómunka során alkalmazott mérési módszereket. Az egyik (elő)bíráló javaslatára azonban jelentősen csökkentettem a Módszerek fejezetet.

A kutatómunka során a színt (jelen esetben a pamutmaghéjból préselt pasztillák színét) a CIELab színtérben mértük (értekezés 43. oldal). A derékszögű koordinátákkal (L^* , a^* , b^*) megadott színtér függőleges tengelye a világosság tengely (L^*). Az L^* koordináta alkalmazható a mért minta világosságának a jellemzésére. Maximális értéke 100, ami valójában a színmérő készülékhez tartozó fehér etalon (csempe) felületének a világossága (Lukács, Gy.: Színmérés, Műszaki Könyvkiadó, 1982). Mi is az L^* -ot mértük, és ezt, valamint az L^* egy adott kezelés hatására bekövetkező változását (ΔL^*) adtuk meg.

A világosodás mértékére vonatkozó kérdés egzakt megválaszolása ma már nehéz, mivel a színkülönbség (ΔE^*) értékeket nem adtuk meg a publikációban, csak a világosság különbségeket. A színkülönbség értékétől függően két szín között a szemmel észlelt különbség lehet pl. *nem észrevehető* ($\Delta E < 0,5$) vagy *szemmel jól látható* ($\Delta E^* 3,0-6,0$), stb. Mivel az alkalmazott kezelése során világosodás is (ΔL^* pozitív) és elszíntelenedés is bekövetkezik (a lignin eltávolítása miatt), feltételezésem szerint a színváltozás mértéke a NaOH-dal kezelt és az enzimezett+NaOH-dal kezelt pamutmaghéj minták között, az intenzívebb xilanázos előkezelések (nagyobb enzimkoncentráció és/vagy hosszabb kezelési idő) alkalmazása esetén a *szemmel jól látható* minősítést kapná.

Az alkalmazott lúgos kezelés hatására bekövetkező sötétedés hasonló a cellulózgyártás során tapasztalt rost (pulp) sötétedéséhez. A lignocellulóz rendszerek lúgos degradációja során megfigyelhető sötétedésért elsősorban a lignin komponens a felelős, mégpedig a ligninben jelen lévő ún. leukokromofór szerkezetek, amelyek az oxigén jelenlétében végrehajtott lúgos feltárás során kromofór-csoportokká alakulnak és sötétebb (továbbá telítettebb) színt eredményeznek. Hozzájárulhatnak a sötétebb (továbbá telítettebb) szín kialakulásához a poliszacharid alkotók oxidációja során keletkező kromofór csoportok (pl. karbonil-csoport) is [Sjöström E. Wood chemistry. Fundamentals and applications. Academic Press, London (1981)].

3. A 25. ábrán (52. old.) történő EDTA-koncentráció megadása eléggé rendhagyó: mmol EDTA/ml enzim. Ha egyszerűsítünk, akkor mol/liter = M-t kapunk! Ezt azonban nem tartom valószínűnek, mert az EDTA-t általában mM-s koncentrációban szokták alkalmazni! Gondolom azt is, hogy az EDTA-t nem a tömény enzimoldatba tették, hanem először az enzimet hígították! – Ugyanígy szokatlan az 52. oldal közepén megadott 1 mM EDTA/g szövet, de ennek így nem látom értelmét! A mM mindig térfogatra (1 literre) és nem súlyra (g) vonatkozik!

Továbbá, azt a tényt, hogy az EDTA és pektináz együttes alkalmazása hatásos csak a Ca²⁺-ionok eltávolításában, nem a szerkezet bezáródásával, hanem kissé másképp magyarázám. Ha az EDTA folyamatosan jelen van az enzim mellett, akkor a szerkezet részleges megbontásakor felszínre kerülő Ca²⁺-ionokat képes komplexbe vinni, s ezáltal a pektin újabb és újabb részletei válhatnak hozzáférhetővé a pektináz enzim számára.

Válasz:

A textilkémiában és -technológiában a hatóanyag (pl. NaOH, EDTA, színezék) mennyiségét általában a szálanyag (pl. szövet, fonal, laza szál) tömegére vonatkoztatva adjuk meg. Az 1 mM EDTA/g szövet tehát azt jelenti, hogy a kezelőoldatban (ami jelen esetben a puffer, vagy a híg enzimoldat volt) az EDTA mennyisége 1 g szövetre vonatkoztatva 1 mM. (A fürdőaránytól függően azonban a kezelőoldat EDTA koncentrációja akár több nagyságrenddel is kisebb lehet.) Ennek analógiájára az EDTA enzimre (illetve az enzimaktivitásra) gyakorolt hatásának a vizsgálata során az EDTA mennyiségét az enzim egységni mennyiségére (jelen esetben térfogatra) vonatkoztatva adtuk meg és az EDTA-t a hígított enzimoldathoz adtuk.

Az EDTA és a pektináz enzim együttes alkalmazásának a hatásosságát – akár a kalciumionok, akár a lignin eltávolításában – az értekezésben nem a szerkezet bezáródásával magyaráztam, hanem azzal, hogy „a pektinben található kalcium-keresztkötések megszűnésével kialakuló nyitott szerkezet hozzáférhetővé teszi a pektint az enzim számára,” (52. oldal alul). Ez a magyarázat nagyon hasonló a Bíráló által javasolt magyarázathoz. A szerkezet bezáródásával az EDTA-val végzett előkezelés után jellemeztem a len szubsztátumot.

Az eredmények azt bizonyítják, hogy az EDTA önmagában is és a pektináz enzimmel együtt alkalmazva is hatásos a kalcium-ionok eltávolításában és nem azt, hogy „az EDTA és pektináz együttes alkalmazása hatásos csak a Ca²⁺-ionok eltávolításában.”

4. Mint enzimológus, igen érdekesnek tartom az ultrahangos kezelés hatását az enzimaktivitásra. Nevezetesen, hogy *szubsztrát távollétében* UH-s kezelésnek alávetett cellulóz enzim szűrőpapír-lebontó aktivitása elég nagymértékű, akár 20-25 %-os csökkenést mutatott (18. táblázat illetve 40. ábra). Ugyanakkor az enzim őrölt pamut *szubsztrát jelenlétében* végzett UH-s kezelése jelentős, akár többszörös aktivitás-növekedést okozott (43.-45. ábrák). Természetesen, mint minden heterogénfázisú reakciónál, az UH-s kezelésnél

bekövetkező mikroáramlások, a kavitációs buborékok szétropanása, reflektor alkalmazása és a szubsztrát részecskeméretének csökkentése is kedvező hatású az enzimek katalízisre. Azonban tudjuk azt is, hogy a *szubsztrát jelenlétében* kialakuló ES-komplexben az enzimek konformációja az aktív formában stabilizálódik: a szubsztrát megvédi az enzimet a szerkezetét károsító hatásokkal szemben. – Valószínűleg ez történt akkor is, amikor a celluláz enzimet az őrlött pamut szubsztrátja jelenlétében tették ki UH-s kezelésnek, ahogy azt az értekezésben bemutatott adatok mutatják.

Válasz:

Egyetértek Bírálóval abban, hogy ultrahanggal segített heterogén fázisú enzimek katalizált folyamatokban számos, a Bíráló által is felsorolt tényező befolyásolja a termékképződést, továbbá abban is, hogy „a szubsztrát megvédi az enzimet a szerkezetét károsító hatásokkal szemben.” A celluláz enzimmel, valamint a szilárdfázisú fermentációval végzett kísérleteink eredményei mindkét megállapítást megerősítik.

5. Megkérdezném, hogy tud-e arra vonatkozóan becslést adni, hogy a textilipar mely hányada használja már jelenleg is az enzimes textil-kikészítő technológiákat? – Továbbá, lemérhető-e ezeknek a pozitív hatása a víz- és energiagazdálkodásunkra?

Válasz:

Nem találtam adatot arról, hogy milyen arányban alkalmazzák az enzimes folyamatokat a textil-kikészítési technológiákban. Bár készülnek ilyen felmérések, de ezek nem hozzáférhetők a kutatók számára. Csak elvétve találhatunk információt egy-egy összefoglaló cikkben vagy könyvfejezetben arról is, hogy például a textiliparban alkalmazott enzimek a teljes ipari enzimek felhasználásán belül milyen arányt képviselnek. Egy 2015-ben kiadott könyvben közölt adat szerint az ipari enzimek 10 %-át a textil-kikészítésben használják (DOI: 10.1533/9780857098450.1.153). Ebbe beleértendő az írtelenítésben már régóta alkalmazott amiláz enzimek is és az új enzimes technológiákban alkalmazott enzimek is, mint pl. a cellulázok és pektinázok.

Az egyre szigorodó környezetvédelmi előírások és a fenntarthatóságra való törekvés miatt az utóbbi időben nagy nyomás nehezedik a textiliparra, és ezen belül elsősorban a textil-kikészítésre, hogy a környezetszennyező, víz-, vegyszer- és energiaigényes technológiák helyett környezetbarát alternatívákat vezessen be az ipari gyakorlatba. A kilencvenes évek végétől kezdődően a textilipari termelés jelentős hányada a távol-keletre helyeződött át és Kína vált a világ vezető textil- és ruházati termék exportőrévé. Az enzimegyártó és forgalmazó cégek pedig „követték” a textilipari termelést és minden segítséget megadnak ahhoz, hogy az enzimes technológiák egyre nagyobb hányadot képviseljenek a nedves textil-kikészítési technológiákban. Kínában például a Novozymes – a világ legnagyobb enzimegyártó cége – a termelést segítő szolgáltatási hálózat kialakításán túl egy 200 kutatót alkalmazó kutatás-fejlesztési intézetet is létrehozott biotechnológiai kutatásokra és az ipari megvalósítás segítésére.

A bioelőkészítés és biokikészítés környezetre gyakorolt hatását a hagyományos vegyszeres technológiával összehasonlítva számos konkrét technológia esetén megvizsgálták. Néhány példát az értekezés 2.3.7 fejezetében én is bemutattam. A bioelőkészítés során elsősorban azt hangsúlyozzák, hogy a folyamat időigénye is és a felhasznált víz mennyisége is jelentősen csökken a vegyszeres előkészítéshez viszonyítva, mivel az enzimes folyamat esetén nincs szükség a semlegesítésre. Kiemelik azt is, hogy az enzimes folyamatok kombinálhatók (pl. írtelenítés-bioelőkészítés; bioelőkészítés-biokikészítés), ami energia megtakarítással is jár. A Novozymes szerint 1 tonna pamut kötött kelme bioelőkészítésekor 70000-90000 liter víz takarítható meg és 1 tonnával csökkenthető a

CO₂ emisszió (<https://www.eurobiz.com.cn/more-for-less-investing-in-innovation-for-chinas-sustainable-growth/>).

6. Milyen távlatot lát a jövőben az enzimek további textilipari alkalmazására?

Válasz:

A környezettudatosság egyre hangsúlyosabban jelenik meg a világon napjainkban. A szabályozók szigorodása, valamint az egyén környezettudatos gondolkodása egyre inkább a környezetbarát technológiák előtérbe kerülését segíti elő. Így van ez a textiliparban is. Azt látjuk, hogy lassan megváltozik a lakosság, és ezen belül elsősorban a fiatalok szemléletmódja, és olyan termékeket preferálnak, amelyeket környezetkímélő technológiákkal állítottak elő. Az enzimes technológiák ma már környezetbarát alternatívát kínálnak elsősorban a cellulóz alapú szálanyagok textilkikészítésének számos részfolyamatára.

A celluláz enzimmel végzett biokikészítés mára napi gyakorlattá vált, mivel a kellemes viselési tulajdonságú (pl. lágy fogású) és a divatirányzatnak megfelelő külső megjelenésű (pl. viseletes hatást keltő) termékek környezetbarát módon, azaz vegyszerek felhasználása nélkül, alacsony hőmérsékleten és a semlegeshez közeli pH-n állíthatók elő. Egyre több helyen alkalmazzák a szakaszos üzemű bioelőkészítést is, aminek előnyeiről az 5. kérdésre adott válaszomban már írtam.

Úgy gondolom, hogy az enzimes technológiák a közeljövőben elsősorban a szintetikus szálak textilkikészítésében jelennek majd meg. A szintetikus szálak [elsősorban a poliészter (PET), a poliamidok (PA) és a poli(akril-nitril) (PAN)] nagyon fontos alapanyagai a textiliparnak és éves termelésük 1990-től kezdődően meghaladja a természetes szálakét. A szintetikus szálak közül a poliészter százalékos aránya az éves teljes szárfelhasználáson belül nagyobb, mint a pamuté (a 2007-es statisztika szerint az adatok 42% és 35,7%).

Számos kutatási eredmény bizonyítja, hogy az enzimes technológiák elsősorban a szintetikus szálak felületi tulajdonságainak a módosításában használhatók eredményesen. Elsődleges cél a szálak nedvesedőképességének a növelése. A hagyományos technológiában savas vagy lúgos hidrolízist alkalmaznak. A folyamat környezetszennyező, továbbá nehezen kontrollálható, aminek következtében egyes száltulajdonságok (pl. szakítószilárdság, szín) kedvezőtlen irányba változhatnak.

A nedvesedőképesség a hidrofób szárfelület enzimekatalizált hidrolízise során kialakuló poláris-csoportok révén is javítható. Mivel az enzimek a szárfelületen hatnak és enyhe körülmények között alkalmazhatók, a tömbi tulajdonságok változatlanok maradnak. Az enzimes folyamat nem igényel speciális berendezést és könnyen beilleszthető a technológiai sorba. A PET szál felületi hidrolízisét pl. kutináz és lipáz enzimekkel valósították meg. A PA szál felületi hidrolízisében pl. proteázok és kutinázok voltak eredményesek. A PAN szálak esetén pedig a hidrofil szárfelületet karboxil- és amid-csoportok kialakítása révén érték el nitrilázok és nitril-hidratázok segítségével.

Végezetül szeretném még egyszer megköszönni Kazinczyné Dr. Vas Máriának az alapos és minden részletre kiterjedő bírálatot. Külön köszönöm, hogy kutatómunkámat igen értékesnek tartja és támogatja az MTA doktori cím odaítélését.

Budapest, 2020. augusztus 18.



Koczkáné Csiszár Emília