

Pannon Egyetem Vegyészmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskola

ENZIMEK STABILITÁSÁNAK NÖVELÉSE ENZIM NANORÉSZECSKÉK SZINTÉZISÉVEL

DOI:10.18136/PE.2018.685 DOKTORI (PH.D.) ÉRTEKEZÉS

> KÉSZÍTETTE: HEGEDÜS IMRE Okl. vegyész

Konzulens: Dr. Nagy Endre Professor emeritus



Pannon Egyetem Bio-Nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet

2018

ENZIMEK STABILITÁSÁNAK NÖVELÉSE ENZIM NANORÉSZECSKÉK SZINTÉZISÉVEL

Az értekezés doktori (PhD) fokozat elnyerése érdekében készült a Pannon Egyetem Vegyészmérnöki és Anyagtudományok Doktori Iskolája keretében

Bio-, környezet- és vegyészmérnöki tudományok tudományágban

Írta: Hegedüs Imre

Konzulens: Dr. Nagy Endre professor emeritus

Elfogadásra javaslom (igen / nem)

(konzulens)

Az értekezést bírálóként elfogadásra javaslom:

Bíráló neve: igen /nem

(bíráló)

Bíráló neve: igen /nem

..... (bíráló)

A jelölt az értekezés nyilvános vitáján%-ot ért el.

Veszprém,

(a Bíráló Bizottság elnöke)

A doktori (PhD) oklevél minősítése..... Veszprém,

(az EDHT elnöke)

Tartalomjegyzék

Kivonat	6
Abstract	7
Auszug	8
1 Bevezetés, célkitűzések	9
2 Irodalmi áttekintés	11
2.1 Az enzimek működésével kapcsolatos alapvető definíciók: aktivitás, stabilitás, féléletidő	11
2.2 Az enzimműködés hatékonyságának növelésére irányuló technológiák	12
2.2.1 Az enzim stabilitását befolyásoló tényezők	12
2.2.2 Hagyományos enzimstabilizáló technikák	12
2.2.3 A nanoméretű hordozók hatásai az enzimek hatékonyabb működésére	13
2.3 Az enzim tartalmú összetett nanobioanyagok osztályozása	14
2.3.1 Alapvető definíciók	14
2.3.2 A nanobiokompozitok felosztása az előállítás technikája szerint	16
2.3.2.1 "Grafting onto" szintézis	16
2.3.2.2 "Grafting from" szintézis	18
2.3.2.3 Onszervező nanorészecskék	18
2.4 Enzim nanorészecskék	19
2.4.1 Definició	19
2.4.2 Az enzim nanoreszecskek stabilitasa	20
2.4.5 Kovia torteneti attekintes	20
2.4.4 Az enzim nanoreszecskek (biokonjugatumok) eloauttasa	21
2.4.4.1 A tenerjek modositasa	21
2.4.4.2 A polimerek osztalyozasa	24
2.4.5 Az enzim nunoreszecskek elouuttasa 2.4.5 1 Előéllítég hérom lénéghon	25
2.4.5.1 Eloannas narom repesten	23
2.4.5.2 Kettepeses etoatitas	20
2.4.0 Az enzim nunoreszecskek jeinasznausa 2.5 A kísárlatainkhaz falhasznált anzimak	27
2.5 A Risel retemand in a senare enzine	28
2.5.1 a-kinon ipszin 2.5.2 Celluláz enzim komplex	20
2.5.2 Cennul entit komplex	20
3 Kisérleti rész	30
3 1 Felbasznált anvagok	30
3 2 Alkalmazott herendezések	30
3.2 Firaimazott berendezesek	30
3 2 2 Enzim nanorészecskék előállítása két lépésben	30
3.3 Alkalmazott módszerek	31
3.3.1 Enzim nanorészecskék előállítása három lépésben	31
3.3.2 Enzim nanorészecskék előállítása két lénésben	
3.3.3 Enzim nanorészecskék előállítása két lépésben (saját módszer)	
3.3.4 Az egy enzim molekulára eső módosított aminocsoportok számának meghatározása	33
3.3.5 Aktivitásmérések	33
3.3.5.1 α -kimotripszin	33
3.3.5.2 Celluklaszt BG celluláz enzim komplex	34
3.3.5.3 β-D-mannozidáz (Thermobifida fusca)	34
3.3.5.4 Endoxilanáz A (Thermobifida fusca)	35
3.3.5.5 β -D-xilozidáz (<i>Thermobifida fusca</i>)	35
3.3.5.6 Endomannanáz (Thermobifida fusca)	35
3.3.6 Enzim nanorészecskék méretének meghatározása dinamikus fényszórás méréssel	35
3.3.7 Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvétel készítése	35
3.3.8 Stabilitás vizsgálatok	36
3.3.8.1 Tárolási stabilitás	36

3.3.8.2 Mechanikai stabilitás	36
3.3.8.3 pH-stabilitás	36
3.3.8.4 Hőstabilitás	36
3.3.8.5 Enzimek féléletidejének számítása	36
3.4 Kísérleti eredmények három lépésben előállított enzim nanorészecskékkel	37
3.4.1 u-kimotripszin enzim	37
3.4.1.1 Az enzim nanorészecskék detektálása	37
3.4.1.2 Az enzim nanorészecskék méreteloszlása a szintézis során	37
3.4.1.3 Az enzim nanorészecskék aktivitásának változása a szintézis során	38
3.4.1.4 Az enzim nanorészecskék tárolási stabilitása	39
3.4.1.5 A beburkolt α-kimotripszin enzim nanorészecskék mechanikai stabilitása	40
3.4.1.6 Az enzim nanorészecskék pH-stabilitása	42
3.4.2 Celluláz enzim komplex	43
3.4.2.1 A celluláz enzim nanorészecskék detektálása	43
3.4.2.2 A celluláz enzim nanorészecskék méreteloszlása	45
3.4.2.3 A polimer réteg hatása a celluláz enzim nanorészecskék aktivitására	46
3.4.2.4 A celluláz enzim nanorészecskék tárolási stabilitása	48
3.4.2.5 A celluláz enzim nanorészecskék aktivitásának hőmérsékletfüggése	48
3.4.2.6 A celluláz enzim nanorészecskék hőstabilitása	49
3.4.2.7 A celluláz enzim nanorészecskék pH-stabilitása	52
3.4.3 Hemicelluláz enzimek	52
3.4.3.1 A hemicelluláz enzimek aktivitásának változása a szintézis során	52
3.4.3.2 A hemicelluláz enzimek méreteloszlása a szintézis során	53
3.4.3.3 A hemicelluláz enzimek stabilitása	54
3.5 Kétlépéses, saját fejlesztésű módszerrel előállított enzim nanorészecskék	55
3.5.1 Az uj eljaras hatekonysaga	56
3.5.1.1 Az egy enzim molekulara juto modosított csoportok szamanak meghatarozasa	56
3.5.1.2 Az aktivitasok merese az egyes reszlepesek között	36
3.5.1.5 Mereteloszias	50
5.5.2 Cettutaz enzimek	37
2.5.2.1 Hostabilitas	37
2.5.2.1 Machanikai atahilitéa	30
2.5.2.2 Hőgtabilitág	50
3.5.5.2 Hostavillas	60
3.6] A bárom ós a kátlánásas módszar összahasonlítása	60
3.6.2 Az anzim nanorászacskákkánt stabilizált anzimak jallamzőinak összahasonlása más stabilizálási	00
5.0.2 Az enzin nunoreszecskekkeni subiliziti enzinek jettemzőinek összenüsönüsű műs subilizitűsi mádszorokkol	62
3 6 2 1 Aktivitások összehasonlítása	62
3.6.2.2 Stabilitások összehasonlítása	63
•	05
4 Osszefoglalás	65
A szövegben előforduló rövidítések jegyzéke	68
Irodalomjegyzék	69
Tézisek	77
Theses	79
Tudományos publikációk	81
Köszönetnyilvánítás	84
FÜGGELÉK	85

Kivonat

Az enzimek működési idejének meghosszabbítása, azaz az enzim stabilizálása alapvetően fontos a gazdaságosabb ipari alkalmazásokhoz. A hagyományos enzim stabilizálási technikák nagy hátránya a stabilizált enzimek aktivitásának jelentős mértékű csökkenése a katalitikus folyamat során. Másrészt a hordozók mérete legtöbbször jelentős diffúziós gátlást okozhat, amely csökkenti a diffúziós anyagtranszport és ezzel a biokémiai folyamat sebességét. A hordozó méretének csökkentése nanotechnológia alkalmazásával ezért igen nagy jelentőségű.

Az enzimek ipari alkalmazhatóságának javítása céljából a jelölt olyan enzim nanorészecskéket állított elő, amelyekben cél szerint minden egyes enzim molekula elkülönítetten beburkolásra kerül egy hozzávetőleg 3-5 nm vastag térhálós polimer réteggel. A kutatás célja annak megvizsgálása volt, hogy, lehetséges-e az enzim nanorészecskék kialakításával stabilizálni ipari alkalmazhatóság szempontjából fontos enzimeket, pl. celluláz enzim komplexeket, hemicellulázokat, amelyeket nagy mennyiségben alkalmaznak bioüzemanyagok előállításához. Ezért α -kimotripszin enzimen végzett eredményes kísérleteket követően a jelölt celluláz, illetve hemicelluláz enzimekből alakított ki enzim nanorészecskéket.

Az enzim nanorészecskék előállításához a jelölt két irodalmi módszerből indult ki (Kim és Grate, 2003; Yan *et al.*, 2006a). A két módszer alkalmazásának tapasztalatai alapján egyszerűbb és hatékonyabb eljárást dolgozott ki. Az új szintézis módszerben a felületmódosításhoz akrilsav-klorid, könnyen bomló reagenst használt, gélkromatográfiás oldatcsere helyett dialízissel tisztította a terméket. Az enzim nanorészecskék előállítását vizes oldatban végezte egyetlen puffer oldat alkalmazásával.

A jelölt kísérleti eredményei szerint valamennyi vizsgált enzim (α -kimotripszin, *T. reesei*-ből izolált celluláz enzim komplex, valamint *T. fusca*-ból izolált β -D-xilozidáz, β -D-mannozidáz, endocelluláz és endomannanáz) negyven-nyolcvanszor stabilabbnak bizonyult a természetes formában reagáló enzimeknél. Az α -kimotripszin és a celluláz enzimek jelentős pH-stabilitással is rendelkeznek, α -kimotripszin esetében pH = 1,5 értéken is megőrizték eredeti aktivitásuk felét, celluláz enzim komplex esetében pH = 1,5 és pH = 12 értékeken ugyanolyan aktivitást mutattak, mint a működésük optimális pH értéken (pH = 5-6). A kezelt celluláz és a hemicelluláz enzimek megőrizték katalitikus aktivitásukat és igen jó hőstabilitást mutattak, 80 °C-on közel olyan stabil volt, mint alacsonyabb hőmérsékleteken.

Abstract

In order to make the industrial application of enzymes as biocatalysts more attractive, due to its increased stability, single enzyme nanoparticles were synthesized, where each enzyme molecule was covered individually by an approximately 3-5 nm thick cross-linked polymer layer. The main goal of the research was to investigate, how the above-mentioned method can stabilize the industrially important enzymes, e. g. cellulase enzyme complexes and hemicellulase enzymes, which are used on a large scale in industry. Therefore, after successful experiments, carried out with α -chymotrypsin enzyme, cellulase enzyme complexes and hemicellulase enzymes were prepared as enzyme nanoparticles. The thin polymer layer, synthesized around a single enzyme molecule, did not hinder even the large polymer molecules to be bound to the cellulase enzyme enabling it to exert its biocatalytic activity.

Two methods were studied in the literature to synthesize single enzyme nanoparticles (Kim and Grate, 2003; Yan *et al.*, 2006a). A new method was developed by the candidate from the experiences of these two methods. The surface modification was carried out by acryloyl chloride reagent breaking down easily in aqueous solution and the unreacted reagents were separated by dialysis membrane instead of more complex gel chromatography. Synthesis itself was realized in aqueous solution and only one single buffer solution was used for it.

It has been proved that all of the investigated enzymes (α -chymotrypsin, cellulase enzyme complex isolated from *T. reesei*, and β -D-xylosidase, β -D-mannosidase, endocellulase and endomannanase enzymes isolated from *T. fusca*) are 40-80 times more stable in the form of single enzyme nanoparticles than that of the native (untreated) enzymes. Single enzyme nanoparticles prepared from α -chymotrypsin and hemicellulase enzymes retain their stability at stirring at 150 rpm, while natural ones lose it. Enzyme nanoparticles prepared from α chymotrypsin and cellulase enzymes have good pH stability. Single chymotrypsin enzyme nanoparticles retain about the half of their original activity at the values of pH = 1.5 and pH = 8 and cellulase enzyme nanoparticles have the same activity value at these pH-values as that of its activity at optimal pH value (pH = 5-6). Cellulase and hemicellulase enzyme nanoparticles are of excellent heat stability. Stability of these nanoparticles is as high, at 80 °C, as that at about 50 °C.

Auszug

Die Verlängerung der vollen Enzymaktivität, das heisst die Stabilisisierung der Enzyme, von grundlegender Wichtigkeit in der industriellen Anwendung. Die traditionellen Enzymstabilisationsmethoden haben den grossen Nachteil, dass die Aktivität der stabilisierten Enzyme während des Stabilisationsprozesses zurückgeht, anderseits verursacht die Grösse der Träger in den meisten Fällen eine Diffusionhinderung, die die Geschwindigkeit des Prozesses verringert. Die Verminderung der Trägergröße mittels der Nanotechnologie hat eine grosse Bedeutung.

Zur Verbesserung der industriellen Anwendung der Enzyme habe ich separate Enzymnanoteilchen hergestellt, wobei jedes einzelne Enzymmolekül zielorientiert mit einer vernetzten Polymerschicht von zirka 2-5 Nanometer einzeln eingehüllt wurde. Das Ziel meiner Forschung war, die Möglichkeit der Stabilisierung der industriell so bedeutenden Enzyme wie zum Beispiel Cellulaseenzymkomplexe, Hemicellulasen mit der Herstellung von Enzymnanoteilchen zu untersuchen. So habe ich nach den erfolgreichen Experimenten mit Chymotrypsinenzym aus Cellulase- und Hemicellulaseenzymen einzelne Enzymnanoteilchen erzeugt. Die Cellulase- und Hemicellulaseenzyme sind in der Papierindustrie weitergehend bei der Herstellung von Bioetanol sehr wichtig.

Nach eine der Methoden (Kim und Grate, 2003) läuft die Erzeugung der einzelnen Enzymnanoteilchen in drei Schritten, die Oberflächenveränderung der Enzymmoleküle in wässriger Lösung, eine Polymerisation in organischer Lösung und die Quervernetzung zwischen den entstandenen Polymerfasern in wassriger Lörung. Nach der zweiten Methode (Yan *et al.*, 2006a) geschieht die Veränderung der Oberflache der Enzymmoleküloberflächen und Vernetzung in einem Schritt. Aufgrund der Erfahrungen mit den obigen Methoden habe ich einen einfacheren und wirksameren Prozess ausgearbeitet. Es wurde das leicht zerfallende Acrylsäure-Chlorid zu der Oberflächenveränderung verwendet und das Produkt mit Dialyse anstatt Gelkromatography gereinigt. Die Herstellung der Enzymnanoteilchen wurde in wässriger Lösung durchgeführt mit Anwendung einer einzigen Buffer Lösung.

Alle von mir untersuchten Enzyme (Chymotrypsin, ß-Xilosidase, ß-Mannonidase, Endocellulase, Endomannanase) haben sich als vierzig- achtzigmal stabiler erwiesen als die Ausgangsenzyme. Die einzelnen Enzymnanoteilchen haben ihre Stabilität sogar bei Schütteln von 150 rpm bewahrt. Chymotriyspin und die Cellulaseenzyme haben auch je eine pH-Stabilität. Bei dem pH-Wert von 1,5 und 12 hat das Chymotripsin die Hälfte seiner originalen Stabilität, die Cellulaseenzymkomplexe weisen bei diesen pH-Werten dieselbe Stabilität auf wie bei dem pH-Optimum. Die Cellulase- und Hemicellulaseenzyme haben auch eine Wärmestabilität, sie zeigen eine ähnliche Stabilität bei 80 Grad Celsius wie bei niedrigen Temperaturen.

1 Bevezetés, célkitűzések

Az enzimek katalitikus aktivitással rendelkező fehérjék. Rendkívül specifikusak és a működésük során alig, vagy egyáltalán nem keletkeznek melléktermékek, ezért az enzimek az ipar számára ideális katalizátort jelenthetnek. Az enzimes biokatalízis általában régióspecifikus, kemospecifikus és sztereospecifikus reakciókat jelent szemben a hagyományos kémiai eljárásokkal. Ma egyre elterjedtebben helyettesítik a hagyományos katalizátorokat enzimekkel, mert azok alkalmazása környezetkímélő és hatékony technológiát jelent a molekulák kémiai átalakítását tekintve hagyományos műveleti lépésekkel szemben (1. táblázat).

	Előnyök		Hátrányok	Irodalom
Felülmúlják a kémiai katalizáto- rokat, mert	 Az enzimek erősen szubsztrátum és reakció specifikusak; nem hoznak létre mellékterméket; nem szennyezik a környezetet. 			(da Costa Sousa <i>et al.</i> ,
Költségha- tékonyak, mert	 kevés vegyszert igényelnek; kis energia- befektetéssel működtethetők; enyhe reakciókörül- ményeket igényelnek. 	Költségi- gényesek, mert	 az enzimek érzékenyek, könnyen elveszítik aktivitásukat; az enzimek előállítása sok esetben költséges; alacsony a mechanikai stabilitásuk. 	2009; Binod <i>et al.</i> , 2010; Moreno <i>et al.</i> , 2015)
Nem szükséges	 speciális korrózióálló reaktor; a vegyipari hulladékok kezelése; méregtelenítés. 	A művelet igényelhet	 több enzim esetében nehézkes optimalizálást és szabályozást; sok esetben kereskedelmi forgalomban nem kapható enzimeket; olykor kofaktor regenerálást. 	(Taherzadeh and Karimi, 2008; Saritha <i>et al.</i> , 2012)

1. táblázat Az enzimes ipari műveletek előnyei és hátrányai a hagyományos műveletekkel szemben

Az ipari enzimes biokatalízis a biotechnológia "harmadik hullámát" jelenti a gyógyszeripari (vörös biotechnológia) és a mezőgazdasági (zöld biotechnológia) "hullámot" követően (Marrs *et al.*, 1999). Az ipari enzimekkel megvalósuló biokatalízis része a tiszta vegyipart megteremtő ún. "fehér biotechnológiának", amelynek három fő jellemvonása, hogy 1) kőolajtól független, megújuló nyersanyagokat használ, 2) nem bocsát ki a feltétlenül szükségesnél több CO₂-ot és 3) energiatakarékos (Hetényi *et al.*, 2008). Az ipari enzim felhasználáson alapuló biotechnológiai kutatások tehát a fenntartható fejlődés megvalósítása szempontjából is kiemelt jelentőségűek.

Az enzimek legfontosabb ipari alkalmazásai közül kiemelt jelentőségűek a gyógyszeripar (41%), az élelmiszeripar, az állati takarmányozás (17%), a detergens gyártás (17%), a bőr és papírgyártás (17%) valamint a textilipari alkalmazások (8%) (Iyer és Ananthanarayan, 2008). A második generációs bioetanol gyártásban a lignocellulóz hidrolízise gyakran celluláz enzimekkel történik. A bioetanol előállításának a forgalma folyamatosan növekszik. Az Európai Unió előírása szerint 2020-ig az összes üzemanyag forgalom 10%-át kell kitennie bioüzemanyagoknak (Xavier *et al.*, 2010). A globális piacon az

enzimek jelentik az egyik legstabilabb terméket, ugyanis valamennyi területen a felhasznált mennyiségük folyamatosan nő. Az ipari enzimek az éves forgalma 2016-ban mintegy 5 milliárd dollár volt és 2021-re 6,3 milliárd dolláros forgalmat jósolnak, az öt éves periódusban évente mintegy 4,7%-os forgalomnövekedéssel számolva (BBC Research, 2017).

Az enzimek ipari hasznosításának egyik nagy korlátja rövid életidejük, amely lényegesen növelheti a biokatalitikus folyamatok költségeit (1. táblázat), ezért az enzim működési idejének meghosszabbítása, amelyet különböző stabilizálási technikákkal hajtanak végre, igen fontos. Az enzimek rövid életidejének oka az enzimek érzékenysége környezetük kis változásaira (pH, ionerősség, hőmérséklet, stb.) (Iyer és Ananthanarayan, 2008). A hagyományos enzimstabilizálási technikák - mint pl. az enzimek rögzítése különböző hordozókra – gyakori hátránya, hogy a viszonylag nagyméretű hordozók akadályozzák az enzimek és a szubsztrátum mozgását és emiatt lassul a szubsztrátumok anyagtranszportja az enzimek aktív centruma felé. A rögzített enzimek hatékonysága növelhető a hordozó részecske méretének csökkentésével (Wang, 2006). A nanoméretű termékeket előállító eljárások elterjedése számos lehetőséget nyújt a hordozó részecskék méretének csökkentésére. A kisebb méretű hordozó esetében megnő a szabad fajlagos felület nagysága, amelyhez az enzimet rögzíteni lehet, ezáltal kevesebb hordozóra van szükség ugyanannyi enzim reaktorba juttatásához. Ha a hordozó méretét néhány nanométeresre csökkentjük, ez a hatás még szembetűnőbb, ugyanakkor a nano mérettartomány következtében újabb kedvező hatások jelenhetnek meg, amelyek tovább növelik a stabilizált enzimek hatékonyságát (Wang, 2006; Gao és Ma, 2012).

Értekezésem alapjául szolgáló munkám célja különböző enzimek stabilizálása volt. Az enzim stabilizálásának a lényege, hogy az enzimet vékony, porózus polimerréteggel vonom be különböző kémai módszerekkel. Az enzimek stabilitási paramétereinek meghatározásához az ipari alkalmazhatóság volt a fő szempont. Célom elérése érdekében olyan enzimmódosítást alkalmaztam, amely az enzim méretével összevethető méretű – néhány nanométeres – egyedi enzim nanorészecskéket állít elő és ez által a stabilizált enzimek lényegében molekulárisan oldott állapotban vannak jelen a folyadékban és könnyen diffundálhatnak. Ugyanakkor a stabilizáló réteg olyan vékony és annyira porózus, hogy nem gátolja számottevő mértékben a szubsztrátum molekuláknak az enzim aktív centrumához történő diffúzióját, illetve a termék eltávozását az enzim felületéről, tehát lényegében nem gátolja magát az enzimkatalitikus aktivitást. Ezáltal a hagyományos enzimek sokkal szélesebb körben használhatóak az iparban és a felhasznált mennyiségük is csökkenthető, mert egy reakció ciklus után az aktivitásukat megőrzött enzimek újra, több cikluson keresztül felhasználhatóak.

Kutatómunkám célja az enzim stabilitásának növelése kémiai előkezeléssel, amely elősegítheti e biokatalizátor gazdaságosabb alkalmazását. Az irodalmi adatok alapján az enzimek bevonása vékony, áteresztő térhálós polimer réteggel (Kim és Grate, 2003; Yan *et al.*, 2006a) lényegesen növelheti a stabilitást.

Az elvégzett kísérleti munka rövid áttekintése:

- Megismételtem az irodalomban, az enzim nanorészecskékkel végzett kísérleteket (Kim és Grate, 2003). Az α-kimotripszin enzimmel állítottam elő egyedi enzim nanorészecskéket.
- 2. Vizsgáltam az egyedi enzim nanorészecskék aktivitását a pH függvényében.
- 3. Ipari szempontból jelentős enzimeket (celluláz és hemicelluláz enzimek) is stabilizáltam.
- 4. Megvizsgáltam a fenti enzimek hő- és pH stabilitását.
- 5. Új, általam módosított, csak vizes közeget igénylő eljárást alkalmaztam az enzímek bevonására; ez lehetővé tette érzékenyebb enzimek (β -xilozidáz, β -mannozidáz) ily módon történő stabilizálását is.

2 Irodalmi áttekintés

2.1 Az enzimek működésével kapcsolatos alapvető definíciók: aktivitás, stabilitás, féléletidő

Az enzimek aktivitása az időegység alatt átalakított szubsztrátum mennyisége. Az enzimek működése számszerűen jellemezhető aktivitásuk megadásával, ha figyelembe vesszük az adott aktivitást kifejtő enzimek mennyiségét is. Ez a szám az enzimek specifikus aktivitása, ld. (1) egyenlet:

Az enzimek és általában a fehérjék előállításuk, tárolásuk és ipari alkalmazásuk során könnyen elveszíthetik aktivitásukat a szerkezetük átalakulása következtében (Iyer és Ananthanarayan, 2008). Az enzimek aktivitással jellemezhető működésének elvesztése a denaturáció, amely egy másik, inaktív harmadlagos szerkezet kialakulását jelenti. A fehérjét alkotó polipeptid lánc széttekeredésével ("unfolding") olyan rendezetlen szerkezet jön létre, ahol már nem illeszkedik a szubsztrátum az enzim aktív centrumába a kulcs-zár mechanizmus szerint, ezért az enzim a működését már nem tudja kifejteni. Ez a széttekeredés lehet reverzibilis, vagyis a széttekeredett fehérje konformációja visszaalakulhat az aktív konformációvá. Ezt a visszatekeredést refoldingnak nevezzük. Az enzimek stabilitásánál megkülönböztethetünk termodinamikai vagy konformációs stabilitást és hosszú távú vagy kinetikai stabilitást (Polizzi et al., 2007). A termodinamikai stabilitás az enzim konformációjának a széttekeredéssel szembeni ellenállását jellemzi, míg a kinetikai stabilitás az irreverzibilis behatásokkal szembeni ellenállást jelenti (pl. az enzimkatalítikus aktivitás megtartása). Az enzimek destabilizálódása a Lumry-Eyring modell (Lumry és Eyring, 1954) szerint két lépésből áll: egy reverzibilis széttekeredésből és egy irreverzibilis aggregációból, ahol az enzimek kicsapódnak és működésüket végleg elveszítik (2).

$$\begin{matrix} k_{U} & k_{I} \\ [N] \rightleftharpoons [U] \rightarrow [I] \\ k_{F} \end{matrix}$$
 (2)

ahol [N] az enzim természetes működőképes konformációjának a koncentrációja az oldatban;
 [U] a széttekeredett (unfolded) konformációjú enzim koncentrációja az oldatban;

[I] az irreverzibilisen kicsapódott enzim koncentráció az oldatban;

k_U az enzim reverzibilis széttekeredésére jellemző sebességi állandó;

k_F az enzim reverzibilis összetekeredésére jellemző sebességi állandó;

k_I az enzim irreverzibilis széttekeredésére jellemző sebességi állandó.

Az enzimmolekula alapesetben az N természetes aktív állapotában egyensúlyban van a félig denaturált, inaktív U állapottal. Magasabb hőmérsékleten az enzim hajlamos a széttekeredésre. Azt a hőmérsékletet, ahol (N) = (U) az enzim T_m ún. denaturációs (olvadási) hőmérsékletének nevezzük. T_m értéke eltérő lehet, általában 50-80 °C között változik (Misset és van Dijk, 1998). Megjegyzendő, hogy ez leegyszerűsített modell, a valóságban nagyon sok reverzibilis lépés vezet az enzimek inaktiválódásához (Baici, 2015). Az enzimek stabilitását un. féléletidejükkel (t_{1/2}) jellemezhetjük. Az enzimek féléletideje az az időtartam, ami alatt az enzim fajlagos aktivitása felére csökken.

2.2 Az enzimműködés hatékonyságának növelésére irányuló technológiák

Az enzimek ipari alkalmazhatósága szempontjából alapvető tulajdonság az enzimek rövid életideje (alacsony stabilitás érték) és a külső környezet (hőmérséklet, pH, ionerősség, oldószer minősége, mechanikai igénybevétel) változásaira való érzékenységük, vagyis az enzimek a nem optimális körülmények hatására könnyen széttekeredhetnek és ezzel elveszíthetik aktivitásukat. Az enzimek stabilitásának növelése tehát a fehérje molekulák széttekeredésének megakadályozását jelenti. Az életidő, azaz az aktivitásuk megőrzésére sok lehetőség kínálkozik. Hosszabb életidővel rendelkező enzimekből kevesebb mennyiség elegendő, ugyanakkor növekedik az enzim reaktorok működési ideje és kibővülnek az enzim újrafelhasználásának lehetőségei is (Kim *et al.*, 2006a).

2.2.1 Az enzim stabilitását befolyásoló tényezők

Az enzimek stabilitását molekuláris szinten belső, a molekula sajátosságaiból adódó, illetve külső, a molekuláris környezet megváltozásaiból adódó összetevőkre lehet bontani (Iyer és Ananthanarayan, 2008).

1) Az enzim stabilitását befolyásoló belső, vagy "intrinsic" tényezők: a) az aminosav összetétel, b) az ún. stabilizáló szekvenciák az aminosavak között, c) hidrogén hidak, d) hidrofób kölcsönhatások e) diszulfid hidak, f) ha léteznek alegységek, akkor az alegységek közötti stabilizáció és oligomerizáció.

2) Az enzimek stabilitását befolyásoló külső vagy környezeti tényezők az enzim molekula optimális működéséhez szükséges fizikai és kémiai feltételek (hőmérséklet, pH, ionerőség).

Valamennyi felsorolt tényező befolyásolható és általuk az enzim stabilitása növelhető. Különböző technikákkal olyan mikrokörnyezetet biztosíthatunk az enzim molekulák számára, amelyben az optimális környezeti feltételek megmaradnak és ez által az enzim meg tudja őrizni katalítikus aktivitását (Iyer és Ananthanarayan, 2008) (ld. 2.2.2 alfejezet).

2.2.2 Hagyományos enzimstabilizáló technikák

Az enzimek élettartamának növelése, vagyis az enzim stabilizálásának hagyományos módszerei 1) az enzim valamilyen hordozó részecskéhez történő rögzítése (immobilizáció) 2) az enzim felületének módosítása, amellyel megváltozhatnak oldhatósági tulajdonságai, 3) a fehérje mérnökséggel 4) a reakcióközeg mérnökség. A legfontosabb hagyományos enzimstabilizáló technikákat az 1. ábrán szemléltetem. A sárga E jelzésű kerek elemek enzim molekulákat szimbolizálnak, a piros pontok kovalens kötéseket jelentenek az enzimek felületén.

1) Az enzim stablilzálási technikák közül a leggyakrabban használt technológia az enzim rögzítése szilárd hordozóhoz (enzim immobilizáció). A rögzítés a hordozó anyag üregeibe vagy felületére történhet adszorpcióval, illetve kovalens kötéssel (Tischer és Kasche, 1999; Livage et al., 2001; Datta et al., 2013). Az enzimek rögzítésének meghatározó tényezői: a) az enzim, b) a mátrix vagy hordozó, amihez az enzimet rögzítik és c) a rögzítés módja (Mahmoud és Helmy, 2009). Az enzim molekula és a hordozó közötti több ponton történő kötés csökkentheti az enzim széttekeredés (unfolding) sebességét és ilyen módon növelheti az enzim működésének stabilitását (Rayalu et al., 2012). Az enzim rögzítése a katalizátor újrafelhasználás, a folyamatos működés és a termék tisztítása szempontjából is jelentős, azonban a rögzített enzim aktivitása jelentősen csökkenhet (Demirjian et al., 1999) (1. ábra).



1. ábra Az enzimstabilizálás hagyományos technikái

2) Az *enzimmódosítás* az enzim molekula olyan kovalens reakciójával definiálható, amely funkciós csoportok vagy polimerek felszínhez kötődésével megváltoztathatja a felszíni tulajdonságokat és az enzim stabilabb működését eredményezheti (Tischer és Kasche, 1999; Mozhaev, 1993; Desantis és Jones, 1999; Govardhan, 1999) (1. ábra).

3) A *fehérjemérnökség* a fehérje aminosav szekvenciájának molekuláris biológiai módszerekkel történő megváltoztatását jelenti (pl. irányított evolúció vagy helyspecifikus mutagenezis) egy stabilabb belső szerkezet elérése érdekében (Arnold *et al.*, 2001; Lehmann és Wyss, 2001; Brannigan és Wilkinson, 2002; O'fagain, 2003) (1. ábra).

4) A *reakcióközeg mérnökség* ezzel szemben az enzim körüli közeg változtatásával módosítja az enzim szerkezetét. Alkalmazhatnak nem vizes reakcióközeget, vagy változtathatják a reakcióközeg ionösszetételét (Klibanov, 2001; Lee és Dordick, 2002) (1. ábra). Újabban elterjedt enzimstabilizáló módszerek

5) a keresztkötött enzim-kristályok (crosslinked enzyme crystals) (Cui és Jia, 2015), vagy

6) a keresztkötött enzim-aggregátumok (crosslinked enzyme aggregates) (Schoevaart *et al.*, 2004) kialakítása.

2.2.3 A nanoméretű hordozók hatásai az enzimek hatékonyabb működésére

Az enzimműködés hatékonysága javítható a hordozó anyag szerkezetének változtatásával (pl. pórusos anyagok használatával az enzim molekulák nem csak a hordozó felületén, hanem a pórusok üregeiben is megkötődhetnek), vagy a hordozó méretének csökkentésével. A nanoméretű hordozók tágabb definíció szerint 500 nanométernél kisebb átmérőjűek, azonban igazából az 50 nm-nél kisebb hordozók esetében beszélhetünk különleges fizikai-kémiai tulajdonságokkal rendelkező nano-hordozókról (ld. alább). Az

enzimhordozók méretének csökkentése több szempontból is előnyösebb:

1) a kisméretű hordozó részecskék nagyobb fajlagos felületet biztosítanak az enzim rögzítéséhez, ezért a hordozóból kevesebb mennyiség is elegendő ugyanannyi enzim rögzítéséhez.

2) Az 50 nm-nél kisebb mérettartományban az enzimek a hordozókkal együtt nem tekinthetők már külön (szilárd) fázisnak az oldatban. Ennek következtében a nanoméretű részecskék viszonylag szabad diffúziója az oldatban segíti az enzimek hatékonyabb működését (Jia *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2007), közel tudnak jutni a nagyobb méretű szubsztrátumokhoz (pl. kristályos cellulóz) és emiatt a szabad enzimekhez hasonlóan viselkednek (Jia *et al.*, 2003).

3) Ugyanakkor az enzim stabilitás tekintetében hasonlít a rögzített enzimekéhez, oldatban mégis úgy viselkedik, mintha nem lenne rögzített (Wang, 2006).

Az enzim méretével összemérhető térbe (pl. mikroemulziók) zárva az enzimet szintén csökken az enzim széttekeredésének a valószínűsége (Daubresse *et al.*, 1994). Üreges szilárd hordozó belsejében, pl. mesterséges sejtre emlékeztető, 100 μ m-nél kisebb méretű polimer kapszulába zárt α -kimotripszin enzim fél életideje 143-szorosára nő (Wang *et al.*, 2005b). Az enzim kovalens hozzákapcsolása több ponton egy polimer hálóhoz sokkal nagyobb mértékben növeli az enzim stabilitását, mint a fizikai adszorpció felületekre (Mozhaev *et al.*, 1990a; Mozhaev *et al.*, 1990b; Mozhaev, 1993). Az utóbbi évtizedben ugrásszerű fejlődésnek indultak az enzimek, illetve fehérje természetű biológiailag aktív makromolekulák nanométeres mérettartományba eső kompozitjainak a kutatása.

2.3 Az enzim tartalmú összetett nanobioanyagok osztályozása

2.3.1 Alapvető definíciók

A nanoméretű hordozók segítségével stabilizált enzimek, illetve általában a nanoméretű összetett anyagok megkülönböztetésére különböző fogalmakat használnak. Ezért az egyedi enzim nanorészecskék tárgyalása előtt érdemes tisztázni ezeket a sokszor átfedő, vagy rokon értelmű fogalmakat. Az egyes fogalmak jelentésébe tartozó tartalmakat (fogalmi mezőket), illetve azok átfedéseit a 2. ábrán Venn-diagram alapján mutatom be, ahol az egyes fogalmi mezőket, mint halmazokat ábrázoltam és személetesen látszik, hogy melyik halmaz melyiknek a részhalmaza, vagy melyik halmaznak melyikkel van átfedése, azaz értelmezési tartományaik átfedik egymást.

A nanobiotechnológia, vagy bionanotechnológia (olykor nanobiológiának is nevezik) a nanotechnológia és a biológia határterületén elhelyezkedő tudományág. Tartalmát tekintve a szerkezeti molekuláris biológia és a molekuláris nanotechnológia közötti összefüggéseket tanulmányozza, illetve tárja fel, valamint ezen összefüggések segítségével állít elő új tulajdonságokkal rendelkező anyagokat (Gazit, 2007; Boisseau *et al.*, 2007). A nanokémia a nano-termékek előállításának kémiájával foglalkozik (Ozin és Cademartiri, 2009).

A kompozit anyagok vagy összetett anyagok két vagy több különböző anyagi minőségű összetevőből álló összetett anyagi rendszerek, amelyek az egyes összetevőkétől eltérő fizikai, vagy kémiai tulajdonságokkal rendelkeznek (Cantwell és Morton, 1991). Biokompozit anyagoknak nevezzük az olyan összetett felépítésű anyagokat, ahol legalább az egyik összetevő biológiai eredetű (Fowler *et al.*, 2006). Nanokompozit anyagnak nevezzük azokat a kompozit anyagokat, amelyeknél legalább az egyik összetevő mérete a nano mérettartományba esik (Kumar, 2010). Nanobiokompozit anyagoknak nevezzük az olyan nanokompozitokat, amelyeknél legalább az egyik összetevő biológiai eredetű (Roach *et al.*, 2007). A nanobiokompozitok tehát a nanokompozitok és a biokompozitok halmazának metszetei (2. ábra).

A hibrid anyagok, vagy nanohibridek olyan nanokompozitok, ahol minden összetevő a nano mérettartományba esik (Kickelbick, 2007). Biomolekula/nanoanyag hibrid rendszerek esetében az egyik nanoméretű összetevő biológiai eredetű (Zahavy *et al.*, 2012). A nanobiohibridek tehát a nanobiokompozitok közé sorolhatók (2. ábra).

A biokonjugáció két vagy több molekula összekapcsolását jelenti, amely által olyan új komplexet kapunk, amely megőrzi az összekapcsolt molekulák tulajdonságait. A természetes vagy a szintetikus összetevők az egyéni sajátságaikkal kémiailag kombinálhatók és ez által olyan egyedülálló tulajdonságokkal rendelkező anyagokat lehet létrehozni, amelyek jellemzői finoman szabályozhatók (Hermanson, 2008). Az enzim nanorészecskék egyszerre beletartoznak a nanozimek, nanobiokonjugátumok és nanogélek fogalomkörébe, ezekkel az elnevezésekkel is szokták őket illetni az irodalomban, habár nem fedik le teljesen azokat (részletesebben ld. a 2.3.1 fejezetet). A különböző fogalmak szerinti besorolásokat a 2. ábrán rendszereztem.



2. ábra Az enzim nanorészecskék besorolásával kapcsolatos fogalmi mezők halmazábrája (Venn-diagramja). A kompozit anyagok lehetnek nanokompozitok és biokompozitok. Ez utóbbiak halmazainak metszetébe tartoznak a nanobiokompozit anyagok. A nanohibrid rendszerek részei a nanokompozit anyagoknak, de nem csak nanobiokompozitok, viszont a nanobio hibrid rendszerek csak nanobiokompozitok lehetnek. Hasonlóan a nanokonjugátumok a nanohibrid rendszerek részhalmaza, de nem csak nanobio hibrid rendszerek tartoznak közéjük, szemben a nanobio konjugátumokkal, amely a nanokonjugátumok részhalmaza. A nanogélek nanokonjugátumok, de természetesen nem csak nanobiokonjugátumok lehetnek. A nanogélek és a nanozimek halmazának metszetébe tartoznak az egyedi enzim nanorészecskék (Hegedüs és Nagy, 2014 alapján).

Nézzünk még néhány rokon kifejezést, amely az irodalomban előfordul. Reaktív nanokolloidok és mikrorendszerek alatt általában nanorészecskéket értenek, melyekhez különböző funkcionális csoportokat kötnek (Elaissari, 2008). Nagyjából egymásnak megfeleltethető megnevezések a funkcionális vagy multifunkcionális nanorészecskék (Sajja *et al.*, 2009), a funkcionális nanoszerkezetek ("functional nanostructures") (Perez *et al.*, 2010), a funkcionális nanorendszerek ("functional nanosystems"), vagy integrált nanorendszerek ("integrated nanosystems") (Whang *et al.*, 2003), valamint az együttműködő nanorendszerek ("cooperative nanosystems") (Wang és Zhou, 2010). A nanozimek nanotechnológiailag módosított enzimek, tulajdonképpen biokonjugátumok (Pasquato *et al.*, 2005).

A fehérje tartalmú nanobiokompozitokat feloszthatjuk 1) az előállítás technikája szerint, 2) a kompozit anyag minősége, illetve szerkezete szerint, valamint 3) a kompozit anyagok felhasználása szempontjából. Felhasználás szempontjából a legfontosabb nagy csoportok: a) szenzorikai felhasználás, b) az ipari reaktorokban biokatalizátorként való felhasználás és c) gyógyszeripari felhasználás, ahol a kompozit anyag gyógyszerhatóanyag, illetve hatóanyag hordozó is egyben.

2.3.2 A nanobiokompozitok felosztása az előállítás technikája szerint

Az egyedi enzim nanorészecskék előállításának megértése szempontjából fontos áttekinteni a nanobiokompozitok felosztását a szintézisük típusa szerint. Az előállítás módja szerint tehát megkülönböztethetünk I) ún. "grafting onto" technikákat, amikor első lépésben elkészítjük a nanométeres mérettartományba eső összetett (kompozit) anyagot és csak ezután egy következő, második lépésben rögzítjük hozzá a fehérje természetű biológiailag aktív makromolekulákat (Ge et al., 2009a); II) ún. "grafting from" technikákat, ahol a hordozó anyagot közvetlenül a fehérje/enzim felületére szintetizálják ún. "in situ" polimerizációval. Ebben az esetben a hordozót in situ szintézissel állítjuk elő és az általában teljesen körülveszi az enzimet (Ge et al., 2009a).

III) Az ún. önszerveződő rendszerek esetében külső beavatkozás nélkül, csupán a komponenseket a reakcióközegbe juttatva spontán módon kialakulnak a nanobiokompozit anyagok (Ge et al., 2009a). A kölcsönhatás lehet elektrosztatikus, hidrofób, vagy egyéb ún. nem kovalens, gyenge kölcsönhatás. Az általunk tanulmányozott enzim nanorészecskék előállításának is részét képezik önszerveződésen alapuló részlépések, ezért röviden érdemes ezeket a technikákat is áttekinteni.

2.3.2.1 "Grafting onto" szintézis

A "*grafting onto" szintézis* esetén például a kompozit anyag lehet szervetlen és szerves is (3. ábra).

1) A szervetlen összetevők kiterjedésük szerint lehetnek a) nanorészecskék (0 dimenziós hordozó), pl. fém nanorészecskék (Brennan *et al.*, 2006; Xu *et al.*, 2007; Phadtare *et al.*, 2004; You *et al.*, 2006; Manea *et al.*, 2004; Gole *et al.*, 2001; Cai *et al.*, 2006), vagy mágneses nanorészecskék (Dyal *et al.*, 2003; Tsang *et al.*, 2006; Herdt *et al.*, 2007), illetve szilika nanorészecskék (Chan *et al.*, 2017), vagy egyéb nanorészecskék (pl. CdS, arany) (Narayaan *et al.*, 2007; Du *et al.*, 2014); b) nanocsövek (1 dimenziós hordozók) pl. egyfalú szén nanocső (Asuri *et al.*, 2006); c) nanorétegek (2 dimenziós hordozó) pl. grafén (Shao *et al.*, 2010); d) mezopórusos gél (3 dimenziós hordozó) pl. mezopórusos szilika gél (Kim *et al.*, 2006a) vagy mezoszerkezetű hab (Zhang *et al.*, 2005).

2) A biokompozitok leggyakoribb alkotói polimerek. Lehetnek szerves-szervetlen hibrid kopolimerek vagy tisztán szerves komponensekből álló polimerek (Cummings *et al.*, 2013). A polimerek szerkezete szerint megkülönböztethetünk

a) nanorészecskéket (Palocci et al., 2007; Tang et al., 2006; Tang et al., 2007a; Tang et al., 2007b),

b) polimer szálakat (Jia et al., 2002; Kim et al., 2005), illetve peptid nanocsöveket (Yu et al., 2005),



3. ábra "Grafting onto" szintézis technikákkal előállított enzim-nanobiokompozitok. A kompozit anyag lehet szerves vagy szervetlen és a kiterjedése szerint 0 dimenziós (nanorészecske), 1 dimenziós (pl. nanocső), 2 dimenziós (nanorétegek) és 3 dimenziós (pl. polimer térhálók).



4. ábra "Grafting from" szintézis technikákkal előállított enzim-nanobiokompozitok. Az enzimeket körülvevő rétegek állhatnak szervetlen és szerves komponensekből. Az enzim molekula tekinthető egyetlen hatalmas monomernek is, amihez kapcsolódnak a polimer szálak többi monomerei ("Grafting from macromonomers"). Egyes esetekben maga az enzim molekula a polimerizáció iniciátora is ("Grafting from macroiniciators").

c) fehérje-polimer rétegeket, pl. dendrimer-enzim kompozitokat, ahol a fehérje molekulák, illetve a velük méretben és alakban azonos dendrimer gömbök váltakozva alkotnak monomolekuláris rétegeket, vagy térhálós szerkezeteket (Ariga *et al.*, 2014; Zeng *et al.*, 2007),

d) nanoméretű üreges, térhálós polimer hordozókat, amelyek üregeiben találhatók a fehérjék, illetve enzimek (3. ábra). A térhálót kialakító polimer lehet hagyományos térhálós polimer (Gill és Ballesteros, 2000), vagy hiperelágazásos polimer (Ge *et al.*, 2007) (az elágazásos polimerek típusairól bővebben a 2.4.4.2 alfejezetben olvashatunk).

2.3.2.2 "Grafting from" szintézis

A "*Grafting from" szintézis* esetében az enzimeket körbevevő térhálós polimer réteg felfogható a nanogélek egy speciális fajtájának is. A "grafting from" technikával előállított nanobiokompozitokat (más néven – ebben az esetben – fehérje nanorészecskéket) is osztályozhatjuk a fehérjék felületén kialakított réteg anyagi minősége szerint (4. ábra).

1) Szervetlen összetevők esetén a burok lehet

a) pórusos szervetlen anyag, pl. mezopórusos szilika (Ma et al., 2004; Hong et al., 2017), vagy

b) un. szuperparamágneses tulajdonságokkal rendelkező, tehát külső mágneses térre reagáló, de mágneses tulajdonságait mágneses tér nélkül elvesztő fém klaszterekkel beburkolt enzimek (Hong *et al.*, 2007; Yang *et al.*, 2008);

c) üreges héjak pl. fémhéj (Kumar *et al.*, 2005), vagy mezopórusos szilika héj (Sharma *et al.*, 2005; Madadlou *et al.*, 2010; Ariga *et al.*, 2013) (4. ábra).

2) Szerves összetevők esetében a fehérje nanorészecskék körül kialakított burok lehet

a) térhálós polimer gél (szerves-szervetlen hibrid szilika gél (Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2006b; Hegedüs és Nagy, 2009a; Hegedüs és Nagy, 2009b, Gu *et al.*, 2009), vagy

b) akrilamid-biszakrilamid térhálós gél (Yan et al., 2006a; Hegedus és Nagy, 2015);

c) dendronokból álló (dendrozimek) (Khosravi et al., 2012) (4. ábra).

További felosztások: Ge *et al.* (2009a) további altípusokat különítenek el az előállítás kémiája szempontjából:

A) *Grafting from macromonomers*: ebben az esetben a módosított fehérje egy nagyméretű kiindulási monomer (macromonomer) és erre épülnek fel a polimer szálak (Kim és Grate, 2003; Kim *et al.*, 2006; Hegedüs és Nagy, 2009a; Hegedüs és Nagy, 2009b; Yan *et al.*, 2006a; Yan *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2008).

B) *Grafting from macroiniciators*: itt a módosított fehérje nem csak makromonomer, hanem egyben a fehérje felületéről kiinduló polimerizáció iniciátora is (Heredia *et al.*, 2005; Lele *et al.*, 2005; Nicolas *et al.*, 2006; Boyer *et al.*, 2007; Liu *et al.*, 2007; De *et al.*, 2008). Előfordulhat, hogy az enzimek aktivitása nem csökken, hanem éppenséggel nő a polimer összetett anyag hatására (Ge *et al.*, 2007; Yadav *et al.*, 2011a).

2.3.2.3 Önszervező nanorészecskék

Az önszerveződés történhet úgy, hogy az enzimek és polimerek egyaránt amfifilek és felismerik egymást (Zhu és Wang, 2004; Wang *et al.*, 2005a; Zhu és Wang, 2005; Velonia *et al.*, 2002; Boerakker *et al.*, 2002; Reynhout *et al.*, 2007). Különböző polimereket, pl. polisztirol, politejsav, poli(metil-metakrilát), vagy poli(etilén-glikol), kovalensen az enzimekhez kötve olyan felületaktív anyaghoz hasonló hatalmas molekulákat kapnak, amelyek képesek olaj/víz kétfázisú rendszerben katalitikus aktivitással rendelkező monomolekuláris filmet alkotni (Zhu és Wang, 2004; Wang *et al.*, 2005a; Zhu és Wang, 2005). A felületaktív óriásmolekulák kialakíthatnak még nanocsöveket (Velonia *et al.*, 2002) és micellákat (Boerakker *et al.*, 2002) is. Érdekességként megjegyezhető, hogy a mesterséges

sejtek kialakításának irányában nagy előrelépést jelenthet, hogy DNS-templátot is elő lehet állítani hasonló technikákkal (Claridge *et al.*, 2008).

A másik lehetőség amfifil blokk-kopolimerek által a liposzómákhoz hasonló nanorészecskéket kialakítása, mint pl. az ún. polimer micellák (Shidhaye *et al.*, 2008), vagy polimerszómák (Vriezema *et al.*, 2007; Bruns *et al.*, 2013; Kowalczuk *et al.*, 2014). A transzmembrán fehérjék működését is sikerült rekonstruálni ABA triblokk kopolimerek által alkotott membránon (Nardin *et al.*, 2000; Meier *et al.*, 2000). A polimerszómák belsejében magas enzim koncentráció érhető el. Több egymás működését kisegítő enzim egyszerre is működhet a polimerszómákban. Nemcsak megnöveli a termék előállításának sebességét, hanem izolálja is az átmeneti formákat a környezetüktől, ezáltal megakadályozza mellékreakciók kialakulását (Broz *et al.*, 2006). A transzmembrán proteineknek a polimerszómák membránjába való ültetésével a szubsztrátumok bejuthatnak a polimerszóma belsejébe, illetve szabályozhatóvá válik a nanoreaktorokban a molekulák áramlási sebessége (Meier *et al.*, 2000; Broz *et al.*, 2006).

2.4 Enzim nanorészecskék

Értekezésem témájául az egyedi enzim nanorészecskék kialakítását és stablitásuk vizsgálatát tűztem ki. Ennek oka az volt, hogy a sokfajta biokonjugátum közül az egyedi enzim nanorészecskék stabilitása kiemelkedően magas (ld. 4.4.2. fejezet). Ezért az enzim nanorészecskék az ipari felhasználás szempontjából a leghatékonyabbnak tűnnek, hiszen a hosszú életidő alkalmassá teheti őket az újrafelhasználásra. Az újra felhasznált enzimből kevesebb elegendő és csökkennek az ipari műveletek költségei.

További szempont volt az enzim nanorészecskék jó hő és pH-stabilitása, ami tovább fokozza hatékonyságukat (magasabb hőmérsékleten nagyobb sebességgel játszódnak le az enzim katalítikus reakciók) és szélesíti felhasználásuk kereteit (a pH-optimumtól eltérő környezetben is működőképesek maradnak).

2.4.1 Definíció

Miután vázlatos képet alkottunk a nanobiokompozitok, illetve biokonjugátumok szerteágazó definícióiról és ezek közé besoroltuk, pontosabban definiálhatjuk az enzim nanorészecskéket, mint enzim-polimer nanobio-konjugátumokat.

A "grafting from" módszerrel előállított, néhány nanométeres vastagságú réteggel beburkolt biológiailag aktív molekulát tartalmazó konjugátumokat enzim nanorészecskéknek (single enzyme nanoparticles) nevezzük, ha a beburkolt molekula enzim, vagy általánosabban, fehérje nanorészecskének, ha a beburkolt molekula fehérje. Abban az esetben, amikor egyetlen enzim molekulát vesz körül a konjugátum rétege, egyedi enzim nanorészecskéről (single enzyme nanoparticle) beszélünk. Az egyedi enzim nanorészecskék a burok stabilizáló hatása miatt stabilisabbak és aktivitásuk sem csökken jelentős mértékben (Kim és Grate, 2003; Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2006b), ld. 4. ábra 2./a) és 2./b).

Sok esetben nem sikerül az enzimet molekulárisan oldani, mert elkerülhetetlen, hogy az enzimek összetapadjanak az oldódásuk során és nem egyetlen, hanem néhány enzimet burkolunk be a korábban említett rétegekkel (pl. celluláz enzim komplex esetén). Az ilyen esetekben elhagyjuk az egyedi jelzőt és enzim nanorészecskékről beszélünk. Az (egyedi) enzim naiorészecskék egy-két nagyságrenddel stabilisabb katalitikus aktivitást mutatnak és a kialakított réteg nagy porozítása, valamint kis mérete (mintegy 3 nm vastagságú) miatt a szubsztrátum szabad mozgása sem korlátozódik jelentős mértékben (Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2006b; Hegedüs és Nagy, 2009a; Hegedüs és Nagy, 2009b; Yan *et al.*, 2006a). Az enzim nanorészecskéket, vagyis azt a technikát, amellyel molekulánként a fehérjéket a méretükkel

összevethető vastagságú polimer réteggel veszik körbe szerzőnként, illetve szakterületenként további elnevezésekkel illetik: nanogélbe ágyazott enzimeknek (Yan *et al.*, 2006a), fehérje nanogéleknek (Ge *et al.*, 2011), fehérje nanokapszuláknak (Yan *et al.*, 2010), dendrozimeknek (Khosravi *et al.*, 2012), illetve polimer-fehérje konjugátumoknak (Zhu *et al.*, 2011).

2.4.2 Az enzim nanorészecskék stabilitása

Az enzimek stabilitása az un. féléletidejükkel jellemezhető (ld. 2.1 fejezet). A nanoméretű hordozóba rögzített enzimek aktivitása egyik esetben sem csökken 50% alá, sőt lipáz enzimek esetében – feltehetőleg a polimer hidrofób jellege miatt – jelentős mértékű aktivitásnövekedést is tapasztaltak a természetes állapotú enzim aktivitásához képest (Ge *et al.*, 2009b). Stabilitás tekintetében azonban az enzim nanorészecskék kitűnnek a többi nanoméretű enzim kompozit közül. Míg a legtöbb esetben a nanoméretű hordozókban történő stabilizálás csak néhányszoros, maximum 10-15-szörös stabilitásnövekedéssel jár, az enzim nanorészecskék esetében az irodalomban csaknem háromszázszoros, saját méréseink alapján is hetvenötszörös stabilitásnövekedés érhető el (Kim et al, 2006b, Hegedus and Nagy, 2009a).

Ez a jelentős stabilitásnövekedés annak köszönhető, hogy az enzim nanorészecskék többféle stabilizáló technika előnyeit is egyesítik magukban:

i) A nanoméretű hordozóhoz történő rögzítéshez hasonlóan a kis mérettartomány homogén eloszlást biztosít az enzimek számára a reakciótérben, ezáltal a szabad enzimekhez hasonló hatást tudnak kifejteni. Nagy szubsztrátumok pl. kristályos cellulóz polimerek esetében különösen fontos, hogy azok térben is jól hozzá tudjanak férni az enzimekhez (Jia *et al.*, 2003; Hu *et al.*, 2007).

ii) A polimer-hálóhoz rögzített enzimekhez hasonlóan a több ponton történő rögzítés nagy stabilitást biztosít az enzimek számára, mert akadályozza azok széttekeredését, harmadlagos szerkezetük elveszítését (ld. még 2.2.3 fejezet) (Mozhaev *et al.*, 1990a; Rayalu *et al.*, 2012).

iii) Ezen kívül a polimer háló a makroszkópikus környezettől többé-kevésbé elkülönülő mikrokörnyezetet biztosít az enzimnek, amely tovább növeli az enzim stabilitását (pl. a pH változásaira feltehetőleg a polimer háló mikrokörnyezetre ható pufferelő hatása miatt kevésbé érzékenyek az enzim nanorészecskék) (Gao és Ma, 2012).

iv) Ugyanakkor a polimer háló nagyon vékony (kb. 3-5 nm vastag) és rendkívül porózus, ezért nem akadályozza jelentős mértékben a szubsztrátum molekuláknak az enzim aktív centrumához történő szabad eljutását (Kim és Grate, 2003).

v) Mindazonáltal ez a vékony polimer háló elég rugalmas is ahhoz, hogy az enzim működéséhez szükséges intramolekuláris elmozdulásokat, konformáció változásokat ne akadályozza, ami szintén hozzájárul az enzim szabad állapotához hasonló működéséhez.

Az enzim molekula méretével összevethető méretű kistérfogatú üregbe zárt enzimek működéséhez hasonlóan az enzim nanorészecskéknek is jelentős mértékben megnő a stabilitásuk. Az enzim nanorészecskék felfoghatók, mint különálló porózus polimer burokba foglalt enzim nanoreaktorok, sok esetben egyetlen enzim molekulából is állhatnak, ezért úgy is tekinthetőek, mint az első mesterséges tervezésű monomolekuláris enzim nanoreaktorok (Liu *et al.*, 2015a; Suthiwangcharoen és Nagarajan, 2014).

2.4.3 Rövid történeti áttekintés

Enzimek polimer hordozóhoz történő rögzítésével az 1970-es évek óta foglalkoznak (Abuchowski *et al.*, 1977). Az enzim nanorészecskék előállításával kapcsolatos technika első lépéseit az ún. hidrofób ionpárosodás ("hydrophobic ion-pairing") technika kidolgozása jelentette, amely segítségével enzimeket lehetett oldani apoláris oldószerekben úgy, hogy az

enzimek felülete közvetlenül érintkezzen az oldószerrel, ezáltal további szintézist lehessen végrehajtani az enzim molekulák felületéről kiindulva anélkül, hogy az enzimek elveszítenék funkciójukat (Paradkar és Dordick, 1994). Kiderítették, hogy mintegy 30 detergens molekulára van szükség egyetlen enzim molekula olyan mértékű befedéséhez, hogy az optimálisan oldódni tudjon apoláris oldószerekben is (Paradkar és Dordick, 1994). A hasonló módon stabilizált enzim detergens komplexek meglepően jó hőstabilitással rendelkeznek, akár 110 °C-on is működhetnek (Manning *et al.*, 1995; Abe *et al.*, 1997). Ezt a módszert felhasználva enzimeket szerves oldószerben vinil polimerbe ágyaztak (Wang *et al.*, 1997). A következő lépés az volt, hogy a hidrofób ionpárosodás módszerrel szerves oldószerben molekulárisan oldott enzim molekulák felületéről kiindulva polimerizációt hajtottak végre (Kim és Grate, 2003) és ezzel megteremtették egy új és ígéretes enzim-polimer technológia alapjait.

2.4.4 Az enzim nanorészecskék (biokonjugátumok) előállítása

Az enzim nanorészecskék tulajdonképpen enzim-polimer nanokonjugátumok. A biokonjugáció két vagy több molekula összekapcsolását jelenti, amely által olyan új komplexet kapunk, amely megőrzi az összekapcsolt molekulák tulajdonságait. A természetes vagy a szintetikus összetevők az egyéni sajátságaikkal kémiailag kombinálhatóak és így olyan egyedülálló tulajdonságokkal rendelkező anyagokat lehet létrehozni, amelyek jellemzői finoman szabályozhatók (Hermanson, 2008). Az enzim nanorészecskék előállításánának tárgyalásánál először általánosan tekintjük át a lehetőségeket az enzimek (fehérjék) és a polimerek szempontjából. A biokonjugátumok előállítása a fehérje molekula felületének módosításából és egy ezt követő lépésben a tulajdonképpeni konjugációs eljárásból áll.

2.4.4.1 A fehérjék módosítása

Sokoldalú felhasználási lehetőségeik és speciális funkcióik miatt a módosítási vagy konjugációs technikák leggyakoribb célmolekulái a fehérjék. A módosítás általában úgy történik, hogy a fehérje molekula megőrizze specifikus kapcsolódási képességét a természetes célmolekulájához, vagy enzimek esetében az enzim aktív centruma működőképes maradjon. A módosításra vagy konjugációra legalkalmasabb aminosavak a fehérjék felszínén helyezkednek el, hidrofil oldalcsoportokat tartalmaznak és ezen felül az oldalláncaik csoportjai ionizálhatóak. Ilyen aminosav az aszparaginsav, a glutaminsav, a lizin, az arginin, a cisztein, a hisztidin és a tirozin (5. ábra).



5. ábra Polarizált oldallánccal rendelkező aminosavak (Hermanson, 2008)

Nem protonált állapotában mindegyik aminosav oldallánc a fentiek közül potenciális nukleofil reagensként vesz részt addíciós reakciókban. A két leggyakrabban használt aminosav oldalláncon található funkciós csoport a karboxil csoport és az amino csoport. Az aszparaginsav és a glutaminsav aminosavak oldalláncán található karboxil csoport származékai észterek, tioészterek, amidok vagy hidrazid származékok lehetnek (6. ábra). Ezek a lehetséges származékok karbodiimid amin képző ágensekkel, illetve aktív észtereken, vagy reaktív karbonil átmeneteken keresztül jöhetnek létre (6. ábra) (Hermanson, 2008).



6. ábra A karboxil csoportok származékai: acil származékok (Hermanson, 2008) A zöld R csoport a fehérjelánc, míg a kék R' csoportok az un. reaktív csoportok, amiket felviszünk a fehérje/enzim molekulák felületére

Az aktivált karboxilátok párt alkothatnak az amin tartalmú nukleofilekkel, amid származékokat képezve (6. ábra). A hidrazid tartalmú komponensek szintén aminná alakulhatnak. A szulfhidrilek, mivel reaktívak és a tioészter kötésnek köszönhetően viszonylag instabil származékok, kicserélődhetnek más nukleofilekkel, pl. aminokkal, vagy vizes oldalban hidrolizálhatnak (Hermanson, 2008).

Az általunk használt fehérje módosítások kiindulási helyei az enzim felületén található aminosavak oldalláncainak primer amin csoportjai (un. ε -amino csoportok). A lizin, az arginin és a hisztidin ionizálható amin csoportokat tartalmazó oldalláncokkal rendelkezik és a fehérje *N*-terminális α -amino csoportjával együtt a semlegeshez közeli pH-értéken hozzájárulnak a fehérjét körbevevő pozitív töltésháló kialakításához. A lizin ε -amino-csoportjának pK_a-ja (9,3-9,5) magasabb az α -amino csoport pK_a értékénél (7,6-8,0). A pK_a értékek alatti pH-értékeken az amin csoportok protonáltak és pozitív töltéssel rendelkeznek, az e feletti pH értékeken nem protonáltak és nincs töltésük. Az argininnak erősen pozitív amino csoportja van az oldalláncán, amit guanidino csoportnak neveznek, (pK_a > 12), gyakorlatilag mindig protonált. A hisztidin imidazol gyűrűje enyhén savas körülmények között is protonált lehet (pK_a = 6,7-7,1) (Hermanson, 2008).



7. ábra Amin oldalláncú aminosavak módosítási lehetőségei (Hermanson, 2008)

Ezek az amin-tartalmú oldalláncok a fehérje molekula felületén helyezkednek el és ezért könnyen módosíthatók. A legjelentősebb reakciók az alkilezések és az acilezések, mint azt a 7. ábra mutatja. Az alkilezésnél az aktív alkil csoport átmegy a nukleofil aminhoz egy hidrogén kilépéssel. Acilezésnél addíció megy végbe az aktív acil csoport és az amin között. Az alkilező reagensek elég változatosak és a reakciók bonyolultak. Aktivált karboxilátokkal (acilezés) amin-származékokat képeznek. Az acilezés általános sémáját láthatjuk a 8. ábrán. Ilyen acilezés lehet pl. enzim molekulák felületén az aminosavak ε-amino-csoportjainak akrilsav-kloriddal történő reagáltatása, aminek eredményeként akrilcsoportok kerülnek az enzim molekulák felületére (Kim és Grate, 2003), ld. 2.4.5.1 alfejezet.



Tetrahedrális átmeneti forma

8. ábra Az aminok acilezésének mechanizmusa (Hermanson, 2008) A zöld R csoportok itt is a fehérjeláncot szimbolizálják, míg a kék R' csoportok az un. reaktív csoportokat.

2.4.4.2 A polimerek osztályozása

Az utóbbi években egyre több olyam enzim nanorészecskét állítanak elő, amelyeket nem térhálós polimerekkel, hanem különböző fajta un. elágazásos polimerekkel vonnak be (Khosravi *et al.*, 2012; Zeng *et al.*, 2007; Ge *et al.*, 2007). Az elágazásos polimerek versenyeznek a térhálós polimerekkel könnyű előállíthatóság, biokompatibilitás (Caminade *et al.*, 2015), valamint a biodegradabilitás és a hordozó funkció (Gao és Yan, 2004; Yan *et al.*, 2006b) tekintetében egyaránt. Ezért érdemes megvizsgálni a polimereket elágazás szempontjából is (9. ábra).



9. ábra Az elágazásos (dendritikus) polimerek besorolása a polimerek osztályaiba és főbb típusaik. A polimerek térszerkezet szempontjából feloszthatók (I) ciklikus, (II) lineáris, (III) elágazó és (IV) térhálós polimerekre. Az elágazó polimerek lehetnek (1) ojtásos vagy ojtott, (2) dendritikus és (3) csillag polimerek. A dendritikus polimerek közé tartozak (A) a dendronok és a dendrimerek, (B) a lineáris-dendritikus hibrid polimerek, (C) a dendronizált polimerek, (D) a hiperelágazásos polimerek, (E) a többszörösen ojtott kopolimerek, (F) a többkarú csillag polimerek és a (G) hiperelágazásos kopolimrek (Hegedüs és Nagy, 2014 alapján)

A polimereket térszerkezetük alapján feloszthatjuk I. ciklikus v. gyűrűs, II. lineáris, III. elágazó és IV. térhálós polimerekre. Az elágazásos polimereknek három alosztályát különböztethetjük meg: 1) ojtásos v. ojtott kopolimerek, 2) dendritikus polimerek és 3) csillag

polimerek. A dendritikus polimerek tovább csoportosíthatók: A) dendronok és dendrimerek, B) lineáris polimer-dendrimer hibridek, C) dendrigraftok vagy dendronizált polimerek, D) többszörösen ojtott polimerek, E) hiperelágazásos polimerek, (F) többkarú csillag polimerek valamint (G) hipergraftok vagy hiperelágazásos kopolimerek (Fréchet és Tomalia, 2001). A dendrimerek (9. (A) ábra) és a dendronok (9. (B) ábra bal oldali része) kizárólag ún. elágazó egységekből (branching unit) épülnek fel. Ez azt jelenti, hogy ezek a polimerek minden lehetséges elágazási pontnál elágaznak, az elágazások száma tehát maximális. Ez egy homogén, szigorú térszerkezet kialakulását okozza, ami elméletileg tökéletes monodiszperz méret és tömegeloszlást von maga után. Az utolsó három csoport (E-G) esetében a térszerkezet, illetve az elágazások kialakulása véletlenszerű (9. ábra).

A felsorolt elágazásos polimerek közül hatékony az ún. hiperelágazásos polimerek használata enzimek stabilizálására pl. hiperelágazásos aromás poliamidok (Cosulich *et al.*, 2000). A biológiailag aktív anyagokkal képzett konjugátumok esetében a hiperelágazásos polimereknek két fő tulajdonságuk került előtérbe, a biológiai bonthatóság és a hordozó funkció (Gao és Yan, 2004; Ballauff and Lu, 2007). A hiperelágazásos polimerek konjugálása történhet ún. felületről indított polimerizációval (surface initiated polymerization) (Jordan *et al.*, 2006a; Jordan *et al.*, 2006b), nagy szelektivitású és hatékonyságú ún. klikk reakciókkal (Iha *et al.*, 2009) és reverzibilis addíciós-fragmentációs láncátadásos gyökös polimerizációval (röviden: RAFT-polimerizáció; Reversible Addition-Fragmentation chain Transfer Polymerization) (Gregory és Stenzel, 2012).

2.4.5 Az enzim nanorészecskék előállítása

2.4.5.1 Előállítás három lépésben

A Kim és Grate (2003) által kifejlesztett ún. egyedi enzim nanorészecskék (single enzyme nanoparticles, SENs) előállításának esetében elméletileg minden egyes enzim részecskét néhány nanométer vastagságban térhálós polimer réteggel vontak be (Kim és Grate, 2003). Az előállítás három lépésből áll: 1) az enzimek felületének módosítása (primer amin csoportok vinil csoporttá alakítása akrilsav-kloriddal). 2) A hidrofób ionpárosodással hexánban oldott enzim molekulák felületéről kiinduló polimerizáció. 3) Keresztkötések kialakítása a polimer szálak között újra vizes közegben (a leágazó trimetoxi-szilil csoportok egymással kapcsolódnak, ortogonális polimerizáció) (Kim *et al.*, 2006b). Az egyes lépéseket a 10. ábra szemlélteti.

A módszer első leírása szerint (Kim és Grate, 2003) első lépésben a felszíni lizin aminosavak szabad aminocsoportjait akrilsav-kloriddal módosítják. Kis mennyiségű felületaktív anyagot használva a módosított fehérjét ún. hidrofób ion-pár formában ("hydrophobic ion-pairing") oldódik hexánban. A következő, polimerizációs lépésnél az enzim szabad felszínére van szükség hexán fázisban, amihez elengedhetetlen az ionpár képzéssel történő oldódás. Vinil csoportot és trimetoxiszilil csoportot egyaránt tartalmazó szilil monomereket adva a hexános reakció elegyhez szabad gyökös vinil polimerizációt indítanak ultraibolya fénnyel (365 nm) történő gyökképzéssel és lineáris polimereket kapnak, amelyek az enzim felszínéhez kapcsolódnak.

Az enzim molekulákhoz kötött polimer intermediert vizes oldatba juttatva, a leágazó trimetoxi-szilil csoportok egymással kapcsolódnak, minden egyes enzim molekula körül keresztkötött polimer hálózatot eredményezve. Ez jelenti a második, ortogonális polimerizációs lépést. A finoman szabályozható koncentráció viszonyok helyes beállítása esetén a térhálót létrehozó kötések zömében az egyes enzim molekulák felületén található polimer szálak között jönnek létre.

A módszer előnye, hogy egyszerűen detektálható a polimer burok az enzimek körül

transzmissziós elektronmikroszkóppal. Fel kell cseppenteni egyetlen cseppet az elektronmikroszkóp tárgylemezére és szárítás után közvetlenül vizsgálható a minta külön festési eljárás nélkül. A Si atomok az elektronmikroszkópban "eletrondenzek" (elektronszórók), vagyis az elektron nyalábot erősen eltérítik, ezért a mintáról létrejött képben a Si atomot tartalmazó polimer-rétegek sötét foltként láthatóvá válnak.



10. ábra Enzim nanorészecskék előállítása háromlépéses módszerrel: az enzim módosítását követően polimerizáció indul az enzim felületéről, a módosított helyekről, végül a polimer réteget térhálósítjuk.

2.4.5.2 Kétlépéses előállítás

Yan *et al.* (2006a) egy lépésben állítottak elő térhálós polimer védőréteget enzim molekulák felületén (az enzim felületének módosításával együtt két lépésben). Eredményül ugyancsak enzim nanorészecskéket kaptak, csak a stabilizáló rétegként szolgáló polimer kémiailag eltérő.



11. ábra Enzim nanorészecskék előállítása vizes közegben, két lépésben

A felületmódosítást amino-antipirin jelenlétében dimetil-szulfoxidban oldott *N*-akriloxiszukcinimiddel hajtják végre, amely az enzim molekulák felületén található tercier aminocsoportokat alakítja át vinilcsoportokká (Yan *et al.*, 2006a) (11. ábra). A felesleges reagensek eltávolításához méretkizárásos kromatográfiát használnak. A következő lépésben az enzim molekulák felületén akrilamid-biszakrilamid kopolimert alakítanak ki (Yan *et al.*, 2006a).

A módszer előnye, hogy minden lépés vizes fázisban történik és nincs szükség az enzim molekulák átjuttatására egyik fázisból a másikba (pl. vizes fázisból szerves fázisba), ezáltal nincs veszteség az enzim nanorészecskék előállítása során. Másrészt a polimer réteggel körülvett enzim molekulák mennyiségének a detektálása is lehetséges, mert a polimer réteg az enzimek körül nem nyel el a 280 nm körüli tartományban, ezáltal nem árnyékolja le az enzim molekulákat és azok koncentrációja pontosan meghatározható.

2.4.6 Az enzim nanorészecskék felhasználása

Az enzim nanorészecskék, általánosabban fehérje nanorészecskék alkalmazási területei az utóbbi néhány évben nagyon kiszélesedtek. A klasszikus alkalmazási területek enzimek ipari felhasználásánál olyan stabilizált enzimek előállítása, amelyek polimer hordozóhoz rögzítettek, mégis a méretüknél fogya molekulárisan oldódnak és nem alkotnak külön fázist a reakciótérben. Ezeket az enzim nanorészecskéket mezopórusos szilika gél belső járataiba rögzítve még stabilisabb komplexet kapunk (Kim et al., 2006b). Felhasználhatóak enzim alapú bioüzemanyag cellák működtetéséhez (Kim et al., 2006c). Mágneses enzim nanorészecskéket is előállítottak (Yang et al., 2008; Yang és Zhang, 2013), amelyek a reagáltatás befejezése után a reaktorból könnyen összegyűjthetőek és újra felhasználhatóak. Az utóbbi években sok ipari jelentőségű enzimet stabilizáltak enzim nanorészecskeként, például karbon anhidrázt (Yadav et al., 2011a és 2011b), lipázokat (Ge et al., 2007; Ge et al., 2008; Ge et al., 2009b; Liu és Hua, 2014; Wang et al., 2014; Ji et al., 2016). torma peroxidázt (Baeza et al., 2014; Beloqui et al., 2016), lakkázt (Jia et al., 2013; Jia et al., 2016), glükóz oxidázt (Beloqui et al., 2016), acetilkolin-észterázt (Ebadi et al., 2015), urát oxidázt (Liu et al., 2011), stb. Kataláz enzim nanorészecske meghajtású nanomotort is előállítottak (Simmchen et al., 2014).

Jelentős lehet az enzim nanorészecskék szenzorikai felhasználása is. Például enzimpoliamidoamin (PAMAM) dendrimer nanobiokompozitokat (Zeng *et al.*, 2007), vagy beburkolt torma-peroxidáz-ferrocénszármazék rétegeket (Peng *et al.*, 2009) alakíthatnak ki elektródok felületén.

Ígéretes területet jelent a fehérje nanorészecskék gyógyászati felhasználása. A fehérjék köré szintetizált polimer réteg megakadályozza, hogy a bontó enzimek hozzáférhessenek a fehérjéhez, ezáltal a fehérje nanorészecskék biológiai stabilitásuk növekszik (Liu *et al.*, 2015b). Sőt, a megfelelő kémiai tulajdonságokkal rendelkező réteggel beburkolt fehérje nanorészecskék a sejtmembránon endocitózissal átjuthatnak és a sejt belsejébe kerülhetnek (Yan *et al.*, 2010). A fehérje nanorészecskék új, sejten belüli célzott szállító funkcióval rendelkező anyagokat is jelentenek, amelyek a lizoszómába juttatják a beburkolt fehérje ki tudja fejteni élettani funkcióját a sejtben (Yan *et al.*, 2010), ezáltal az enzim nanorészecskéknek akár enzim terápiás felhasználása is lehetővé válhat (Ramsden, 2008; Arnfast, 2014). Bíztató eredményeket kaptam bovin serum albumin nanorészecskéknek a vér-agy gáton történő átjuttatásával (Hegedüs *et al.*, 2014). Ezeknek az eredményeknek a taglalása azonban már meghaladná a dolgozat kereteit.

2.5 A kísérleteinkhez felhasznált enzimek

2.5.1 α -kimotripszin

A kísérleteink alapjául szolgáló irodalomban (Kim és Grate, 2003; Kim *et al.*, 2006a és 2006b) α -kimotripszin enzimet használtak az enzim nanorészecskék előállításához és ezek stabilitását vizsgálták. A kimotripszin az egyik legtöbbet tanulmányozott és legjobban ismert enzim. Az α -kimotripszin a hasnyálmirigyben termelődő enzim, fehérjebontó funkcióval rendelkezik (szerin proteáz). A kimotripszin enzim nagyon stabil szerkezettel rendelkezik: három polipeptid lánc kapcsolódik össze két diszulfid-híddal (ld. F1 Függelék; Appel, 1986). pH = 7,8-on és 37 °C-os hőmérsékleten működik optimálisan. Előnyei, hogy jól ismert és nagyon stabil szerkezettel rendelkezik.

2.5.2 Celluláz enzim komplex

Az α -kimotripszin enzimmel előállított enzim nanorészecskékkel végzett kísérletek eredményeit felhasználva további kísérleteink tervezése során olyan ipari alkalmazási lehetőségeket vizsgáltam, amelyek jelentős gyakorlati felhasználási lehetőségeket jelentenek az enzim nanorészecskék számára. Az iparban nagy kereslet mutatkozik olyan enzimekre, amelyek nagy stabilitással rendelkeznek és szélsőséges körülmények között is – pl. intenzív rázatás, magasabb hőmérséklet, vagy az optimálistól eltérő pH – csak nagyon keveset, vagy semmit sem veszítenek aktivitásukból és működőképesek maradnak.

Egy ilven alkalmazási lehetőséget jelentett celluláz enzim komplexek stabilizálása enzim nanorészecskék formájában. A cellulózbontó (celluláz) enzimek stabilizálása konkrétan kapcsolódik az intézetünkben folyó tudományos kutatási témákhoz (mezőgazdasági hulladékok hasznosítása bioetanol előállítása céljából). A biomassza legelterjedtebb molekulája a lignocellulóz. Szerkezete összetett, különböző, öt és hat szénatomszámú cukor építőegységekből, valamint heterogén alkotó elemekből (lignin) áll (Pauly és Keegstra, 2008). Ipari szempontból a lignocellulóz legfontosabb összetevője a cellulóz. A cellulóz enzimatikus hidrolízisével glükózt állítanak elő, amelyet etanollá fermentálnak (ún. második generációs bioetanol). A cellulóz a legstabilisabb biopolimer. Ezért a cellulóz bontásához több, különböző enzim együttes működése szükséges. A cellulózbontó enzimek (cellulázok) főbb típusai: 1) endoglükanáz, amely a cellulóz rost belső, kevésbé kristályos részein a cellulóz láncokat hasítja, ezáltal szabad láncvégeket állít elő, 2) az exoglükanázok az így kialakult szabad láncvégektől kezdve lebontják a cellulóz láncokat cellobióz dimer egységekké, 3) a béta-glükozidáz enzim a cellobióz egységeket bontja glükózzá (Fan et al., 2009; ld. F2 Függelék). Ennek a három fő enzim-csoportnak további altípusaik lehetnek. Az általunk használt Celluclast BG márkanevű celluláz enzim komplex Trichoderma reesei organizmusból izolált celluláz enzim komplexet tartalmaz. Az enzim komplex pH optimuma enyhén savas (4,5 – 6.0) pH értékeken van, hőmérsékleti optimuma 50 °C. Az enzim komplex előnye, hogy közvetlenül felhasználható a konkrét alkalmazások esetén (lignocellulóz eredetű cellulóz biomassza enzimatikus hidrolízise glükózzá), a cellulózt képes teljesen glükózzá bontani. Azonban az enzimek nem kapcsolódnak össze celluloszómává, azaz egyetlen óriásmolekulává, hanem különállóan, szabadon vannak jelen (Nidetzky et al., 1994), ami megkönnyíti az enzim nanorészecskék előállítását. Ez azért lehet hátrányos, mert abban az esetben, ha több enzim molekula kerül egyetlen polimer hálóban beburkolásra, kisebb valószínűséggel tudnak úgy elrendeződni, hogy a cellulóz óriásmolekulát megfelelően bonthassák. A hemicellulóz és a lignin bontásához további enzimek szükségesek.

2.5.3 Thermobifida fusca hemicelluláz enzimek

A hemicellulóz a növényi sejtfalak második legnagyobb mennyiségben jelen lévő komponense (Saha, 2003). A legjelentősebb hemicellulóz a xilán, amely xilóz egységekből épül fel β -D-1,4-glikozidos kötésekkel. A másik jelentős hemicellulóz frakció a mannán, amely mannóz, vagy mannóz és glükóz egységekből épül fel szintén β -D-1,4-glikozidos kötésekkel. A hemicellulózok összekapcsoló szerepet töltenek be a lignin és a cellulóz között (Pauly és Keegstra, 2008).

A sejtfalat alkotó poliszacharidok lebontásához számtalan hidroláz funkciójú enzim szükséges. A cellulóz bontását végző enzimek működési elvéhez hasonlóan az endoxilanáz és az endomannanáz enzimek a xilánt és a mannánt a lánc belsejében hasítják. Az így képződő xilo- és mannooligoszacharidokat pedig β -D-xilozidáz és β -D-mannozidáz enzimek bontják tovább xilóz és mannóz végtermékekké. A különböző oldalláncok eltávolításához további enzimek szükségesek (Fan *et al.*, 2009).

A cellulázok, illetve hemicellulázok ipari felhasználása leginkább a papíriparban történik. A hemicellulázok is jelentős szerepet játszhatnak a másodgenerációs (lignocellulóz alapú) bioeanol előállításának hidrolízis lépésében is (Jouzani and Taherzadeh, 2015). Egy másik felhasználási terület az oligoszacharidok szintézise (Dhiman *et al.*, 2008). A biotechnológiában nagyon gyakran használják a hőtűrő mikroorganizmusok enzimeit (Turner *et al.*, 2007). Számos előnye van ugyanis annak, ha az anyagokat magasabb hőmérsékleten lehet reagáltatni egymással:

1) a hőmérséklet növelésével nő az enzimatikus reakció sebessége. Viszont szemben a hagyományos kémiai reakciókkal, ahol 10 °C hőmérséklet-növekedés hatására a reakciósebesség kétszeresére nő (Q_{10} szabály), enzimkatalitikus reakciók esetén ez a növekedés sok esetben ennél kisebb lehet (Wallenstein *et al.*, 2010).

2) Magasabb hőmérsékleten változik bizonyos szerves szubsztrátumok oldhatósága, csökken a viszkozitásuk, nő a diffúziós állandójuk, ezáltal könnyebben hozzáférhetővé válnak az enzimek számára. Különös jelentőségűek azok a reakciók, amelyek a kevésbé oldódó hidrofób anyagok átalakítását végzik.

A termofil baktériumok 50-80 °C közötti tartományban szaporodnak a legjobban (Haki és Rakshit, 2003). A *Thermobifida* fajok a komposztban és a talajban előforduló Gram-pozitív baktériumok. A *Thermobifida fusca* a legintenzívebben kutatott faj ebben a törzsben és a termofil, cellulolitikus baktériumok modell organizmusa. A *Thermobifida fusca* komposztlakó termofil, aerob, összetett hidroláz rendszerrel rendelkező cellulózbontó baktérium (Wilson, 2004). Míg a celluláz enzim rendszeréről rengeteg adat áll rendelkezésre, a faj hemicelluláz enzim rendszere alig ismert, holott a hemicelluláz rendszer is éppen olyan összetett lehet, mint a celluláz rendszer. A hő a mezofil és termofil baktériumok oxidáló tevékenysége során termelődik. Megjegyzendő, hogy a termobifida nemzetséghez tartozó új fajt (*Thermobifida cellulolytica*) Magyarországon izolálták (Kukolya *et al.*, 2002).

A *Thermobifida fusca* baktériumok morfológája sok szempontból hasonlít a gombákéhoz. A gombafonalakhoz hasonló ún. pszeudohifát alkotnak és a spórákhoz hasonló alakzatokat is alkothatnak. Cellulóz jelenlétében a sima felszínű pszeudohifa fonalak szemcséssé válnak, rajtuk a celluloszómához hasonló képletek jelennek meg. A *Thermobifida* fajok valójában nem alkotnak valódi celluloszómát, mert hiányzik belőlük a szkaffoldin kötő fehérje (Kukolya *et al.*, 2002). A hemicellulóz bontó enzimek a cellulázokhoz hasonlóan működésük folyamán meghatározott térbeli elrendeződést vesznek fel, adott arányban vannak jelen és összehangolt a működésük. A *Thermobifida fusca* speciesből izolált hemicellulázok hőmérsékleti optimuma 50 °C. Előnyös tulajdonságuk, hogy akár 80 °C-on is működőképesek maradnak néhány percig. A *Thermobifida fusca*-ból izolált β -D-xilozidáz és β -D-mannozidáz enzim biokémiai jellemzőit az F3 és F4 függelékben foglaltam össze.

3 Kísérleti rész

3.1 Felhasznált anyagok

A kísérleteim során felhasznált laboratóriumi vegyszereket, illetve biológiailag aktív anyagokat és főbb jellemzőiket a 2. táblázatban foglaltam össze. Ezeknek a vegyszerek a többségét oldószerként, vagy reagensként használtam az enzim nanorészecskék két különböző módszerrel történő előállításához.

3.2 Alkalmazott berendezések

3.2.1 Enzim nanorészecskék előállítása három lépésben

A módszer leírását a 2.4.5.1 fejezetben részletezem. Az előállításhoz használt eszközök a következők voltak: az enzimmódosítás alatt a hőmérsékletet Julaba F12 kriosztáttal tartottam 0 °C-on. Az akrilsav-klorid beadagolásához 5 µl-es saválló gázkromatográfiás fecskendőt használtam. A polimerizációs lépés kettős falú üvegedényben történt, amely esetében a köpeny a reakciótér csapvíz áramoltatással történő hűtésére szolgált. A polimerizációs reakciót Vilber Lourmat UV-lámpával világítottam meg. A felületükön polimerizált enzimek szűrése 0,1 µm-es pórusátmérőjű fecskendőszűrővel történt (Millipore). Az abszorpciós spektrumok felvételét és az enzimaktivitások mérését Biochrom 4060 UV-vis spektrofotométerrel (Pharmacia) végeztem. A Celluclast BG celluláz enzim komplex aktivitásának vizsgálatához (DNS-próba), valamint 80 °C-on történő stabilitás vizsgálathoz Kutesz Type 662 kémcsőmelegítőt használtam. Az enzim minták mechanikai stabilitásának vizsgálatához New Brunswick Scientific G24 inkubátor rázógépet használtunk. Az enzim nanorészecskék méreteloszlását a dinamikus fényszórás mérésével Malvern Zetasizerrel végeztem (Nano series Nano-ZS, Malvern Instruments Ltd. Worcestershire, England). Az enzim nanorészecskékről képfelvételek JEOL-1200X transzmissziós elektronmikroszkóppal (TEM) készültek (80 kV-os gyorsító feszültségen).

3.2.2 Enzim nanorészecskék előállítása két lépésben

Az előállítás módját a 2.4.5.2 fejezetben adtam meg. A használt műszerek a következők voltak: az enzimmódosítás alatt a hőmérsékletet Julaba F12 kriosztáttal tartottam 0 °C-on. Az akrilsav-klorid beadagolásához 5 μl-es saválló gázkromatográfiás fecskendőt használtam. Az enzimek koncentrációjának, aktivitásának, valamint stabilitásának meghatározásához szükséges abszorbancia értékeket T80+ UV/VIS spektrométerrel (PG Instruments Ltd) mértem. A Celluclast BG celluláz enzim komplex 80 °C-on történő stabilitás vizsgálatához Kutesz Type 662 kémcsőmelegítőt használtam. A rázatásos stabilitásvizsgálatokat IKA KS4000i kontrol termosztálható rázógéppel végeztem.

2.1	táblázat	Felhasznált	anyagok
-----	----------	-------------	---------

Anyag neve	Tisztaság	Forgalmazó	
Borjú szérumból izolált α-kimotripszin enzim		Fluka	
Akrilsav klorid	purum, >=96%	Fluka	
Nátrium-bisz(2etilhexil)szulfoszukcinát,	Purum, >=96,0%	Fluka	
vagy aerosol OT (AOT)	(TLC)	Гика	
1,3-bisz(trisz(hidroximetil)metilamino)-propán	o r	Sigma	
vagy Bisz-Trisz propán	a. 1.	Sigilia	
Dinátrium-hidrogén-foszfát	a. r.	Spektrum-3D, Scharlau	
Kálium-dihidrogén-foszfát	Puriss.	Spektrum-3D, Scharlau	
Kálcium-klorid	szárított, a.lt.	Reanal	
2-propanol	a. r., >= 99,0%	Spektrum-3D, Scharlau	
<i>n</i> -hexán	Multisolvent, 96%- os	Spektrum-3D, Scharlau	
[3-(metakriloxi)propil]-trimetoxiszilán	>=98%	Fluka	
2,2'-azo-bisz(1,3-dimetilvaleronitril)	purum, >=98%	Fluka	
N-acetil-L-tirozin-etilészter	>=98%	Sigma	
3,5-dinitro-szalicilsav	>=98%	Sigma	
Paranitrofenil- β -D-mannopiranozid	>=98%	Sigma	
Paranitrofenil-β-D-glükozid	98%	Sigma	
Paranitrofenil-β-D-xilopiranozid	>=98%	Sigma	
Fenol	a. r.	Sigma	
Nátrium-metabiszulfit (nátrium-piroszuilfit)	a. t.	Spektrum-3D	
nátrium-hidroxid	Puriss.	Spektrum-3D	
Kálium-nátrium-tartarát x $4H_2O$	Puriss.	Spektrum-3D	
Akrilamid	a. r.	Sigma	
Biszakrilamid	a. r.	Sigma	
Ammónium-peroxo-diszulfát	a. t.	Spektrum-3D	
Tetrametil-etilén-diamin	a. r.	Sigma	
Celluclast BG celluláz enzim-komplex		Novozymes	
β-D-mannozidáz (Thermobifida fusca GH2 beta-			
mannosidase swiss_prot entry name:	>=95%	az anzimaliat Dr. Dama Taráz	
Q47RG4_THEFY)		(Debreachi Equator	
Mutáns β -D-mannozidáz (<i>Thermobifida fusca</i>)	>=95%	Genetikai és Alkalmazott	
Endomannanáz (Thermobifida fusca)	>=95%	Mikrobiológiai Tanszék)	
β -D-xilozidáz (<i>Thermobifida fusca</i> GH43 beta- xylosidase: swiss-entry: Q47PG8 THEFY)	>=95%	izolálta és tisztította	
Endoxilanáz A (<i>Thermobifida fusca</i>)	>=95%		

3.3 Alkalmazott módszerek

3.3.1 Enzim nanorészecskék előállítása három lépésben

A módszer részletes leírása a 2.4.5.1 alfejezetben található. Az előállítás során a reakcióelegy hűtéséhez kettős falú edényt használtunk, amelynek anyaga még nem nyeli el a szintézishez használt 365 nm hullámhosszúságú ultraibolya fényt (11. ábra).



11. ábra Enzim nanorészecskék előállításához használt kettős falú edény vázlata

3.3.2 Enzim nanorészecskék előállítása két lépésben

Az eredeti kétlépéses szintézis módszer leírása a 2.4.5.2 alfejezetben található. Az előállítás lényege, hogy mind az enzimmódosítás, mind a polimerizáció vizes közegben történik. A polimerizáció egy lépésben játszódik le. Ezzel a módszerrel – megfelelő festés mellett - lehet következtetni a módosított felületi primer aminocsoportok mennyiségére és ebből a molekulánként kialakuló polimer szálak méretére, illetve a szálanként beépülő biszakrilamid monomerek számára, ami arányos az oligomer szálak között kialakuló keresztkötések számával. A molekula felületén kialakuló keresztkötések mennyiségéből a térhálósodott nanogél pórusainak méretére is következtetni lehet.

3.3.3 Enzim nanorészecskék előállítása két lépésben (saját módszer)

A Yan *et al.* (2006b) által kidolgozott enzim nanorészecskéket előállító módszer első lépésében az enzim molekulák felületének módosítása ugyanazt eredményezi, mint a Kim és Grate. (2003) által alkalmazott módszer esetében az enzim molekula felületén elhelyezkedő primer aminocsoportok alakulnak át vinilcsoportokká. Mindkét módszer esetében ez a lépés képezi az enzim molekulák felületéről kiinduló polimerizáció alapját. A Yan *et al.* (2006b) által alkalmazott módszer esetében azonban az *N*-akrilszukcimid reagenst dimetil-szulfoxidban oldják és ez a reagens nagymértékben károsíthatja magát az enzimet is, valamint amino-antipirint használnak stabilizátornak. Az el nem reagált enzimkárosító anyagokat, valamint a dimetil-szulfoxid oldószert méretkizárásos kromatográfiával távolítják el a reakció befejeződése után a reakció elegyből. Ezzel szemben az általam használt akrilsav-klorid az enzim molekulákkal 0 °C-on reagáltatva ugyancsak az enzim molekulák felületén található amincsoportok akrilezését eredményezi. A maradék, el nem reagált akrilsav-klorid a hőmérséklet emelkedésével spontán elbomlik, a jelen lévő vízzel metil-akriláttá és sósavvá bomlik. A keletkező sósavat a jelen lévő pufferek megkötik. Az oldószer 10 kDa-os vágóéllel rendelkező dialízis membránnal tisztítható.

A szintézis következő lépéséhez a Yan *et al.* (2006b) által leírt akrilamid-biszakrilamid 1:10 arányú keverékével térhálós polimer réteget alakítottam ki az enzim molekulák körül. A jelen lévő biszakrilamid monomerek a felelősek a térháló kialakulásáért, mert keresztkötéseket képesek kialakítani két polimer szál között. A hozzáadott monomer mennyiségeket úgy számítottam, hogy az enzim molekulák felületén szintetizálódó egy-egy rövid polimer szál 10 db monomer egységből álljon. Ezek között már statisztikailag nagy valószínűséggel fordul elő biszakrilamid monomer és ezért kialakulhat a térhálós polimer szál képződik egy enzim molekula felületén (ld. 3.3.4 fejezet). A felületén módosított enzimet tartalmazó oldathoz ammónium-perszulfátot és tetrametil-etiléndiamint (TEMED-et) adtam, majd 10:1 arányban akrilamid és biszakrilamid monomereket adtam hozzá. A reakció ioncserélt és oxigén-mentesített vízben, N₂-atmoszférában játszódott le.

3.3.4 Az egy enzim molekulára eső módosított aminocsoportok számának meghatározása

Festési eljárás alkalmazásával meg lehet határozni az elreagált primer aminocsoportok számát a módosított enzim molekulák felületén (Yan *et al.*, 2006a, *Supp. inf*). A felületmódosító lépés előtt és után egyaránt megfestjük az enzim molekulákat fluoreszceinizotiocianát fluoreszcens festékkel, amely a primer aminocsoportokkal reagál el. Megnézzük a megfestett enzim molekulák elnyelését a festékre jellemző hullámhosszon. Az enzim koncentrációk, illetve a moláris extinkciós koefficiensek ismeretében ki lehet számolni, hogy egy enzim molekulára hány festék molekula jut a felületmódosító lépés előtt és után. A két érték különbségéből következtetni lehet arra, hogy enzim molekulánként hány aminocsoport reagált el és alakult át vinilcsoporttá. Az eredeti leírásban fluoreszceint használtak festékként (Yan *et al.*, 2006a, *Supp. inf*). A festést fluoreszcein-izotiocianáttal végeztem.

Az elreagált aminocsoportok számának meghatározását a következőképpen végeztem: 15 ml 0,2 M-os pH = 7,0 foszfát pufferben oldott β -D-mannozidázt illetve felületén módosított (akrilezett) β -D-mannozidázt reagáltattam háromszoros feleslegben alkalmazott fluoreszceinizotiocianáttal 2 órán keresztül 25 °C-on. Ezután a maradék festéket mindkét minta esetében dialízissel távolítottam el a reakcióelegyből. A dialízishez 10 kDa-os vágóéllel rendelkező, 12 mm-es átmérőjű dialízis csövet használtam. A dialízist 2 × 6 órán keresztül 4 °C-on, 1,5 1 0,2 M-os pH = 6,8 trisz(hidroximetil)aminometán (Trisz)-pufferrel végeztem, ennek következtében az el nem reagált festék tízezerszeresére hígult. Mindkét terméknek mértük az elnyelését 280 nm-en (pontos enzim koncentrációhoz) és 493 nm-en (az enzimhez kötött festék molekulák pontos koncentrációjához).

3.3.5 Aktivitásmérések

Mind a természetes, burok nélküli, mind pedig a kétfajta polimer réteggel beburkolt enzim aktivitását ugyanazon fajta enzim esetében ugyanazzal a módszerrel határoztuk meg.

3.3.5.1 α -kimotripszin

A beburkolt α -kimotripszin aktivitását Garrel és Cuchillo módszerével az UV-elnyelés időbeli változásának követésével mértem (Garrel és Cuchillo, 1985). A méréshez módosított szubsztrátumot, *N*-acetil-L-tirozin-etilésztert használtam. A reakcióelegyben az enzim koncentrációja 10 - 33 µg/cm³ (0,4 - 1,33 nM) között változott. Az *N*-acetil-L-tirozin-etilészter módosított szubsztrátum enzimatikus hidrolízisét spektrofotometriásan mértük 244 nm-en az abszorbancia időbeli változásának mérésével. A szubsztrátum koncentrációja 2,0 mM volt 0,01 M-os foszfát-pufferben pH = 7,8-on. Az aktivitásmérés a következő módon történt: 25

°C-on 1,0 ml szubsztrátum oldatot $0,5 \times 0,5$ cm-es küvettába pipettáztam. Ehhez 2,0 ml enzim-oldatot adtam. Gyors összerázást követően az oldat abszorbanciáját 244 nm-en mértem. A módosított szubsztrátum moláris extinkciós koefficiensének ismeretében az enzimatikus hasítás következtében kialakuló koncentráció változás időbeli változása, így az enzim aktivitása kiszámítható.

3.3.5.2 Celluklaszt BG celluláz enzim komplex

Korábbi kísérleteinkben (Hegedüs és Nagy, 2009), valamint az irodalomban szereplő vizsgálatokban (Kim *et al.*, 2006a és 2006b) is csak viszonylag kis méretű szubsztrátumot használtak a polimer réteggel beburkolt enzimek aktivitásának meghatározására. Kérdéses maradt, hogyan viselkedik a preparált enzim abban az esetben, ha nagyméretű, a természetben előfordulóhoz hasonló szubsztrátummal, makromolekulákkal, illetve biopolimerekkel találkozik. Ezért cellulózt, szűrőpapír csíkot (Whatman-féle szűrőpapír) használtunk szubsztrátumként, amely a természetben, illetve az ipari körülményekhez legjobban hasonlító módon van jelen a rendszerben.

A celluláz enzim komplex beburkolását Celluklaszt BG multienzim komplexen végeztem (Novozymes). A készítmény alapanyaga *Trichoderma reesei* gomba celluláz enzim komplexe. A gomba a cellulázokat nem celluloszóma formájában tartalmazza, hanem különálló enzimek formájában. A készítmény szilárd formában, apró szemcsékként tartalmazza az enzim komplexet, amelyet használat előtt 10 percig szonikáltam.

A celluláz enzim komplex működését az ún. totális celluláz aktivitás mérésével vizsgáltam (szűrőpapíros vizsgálat) (Ghose, 1987). A módszer lényege röviden a következő: szubsztrátumként 6 cm × 1 cm méretű szűrőpapír csíkokat használtam (Whatman-féle szűrőpapír). A szűrőpapír csíkokat összetekerve kémcsőbe helyeztem, amelyhez 1,0 ml pH = 4,80 0,05 mM-os citrát puffert és 0,5 ml 0,1 mg/ml-es koncentrációjú enzim-oldatot adtam. Az elegyet 50 °C-on inkubáltam 1 órán keresztül. Ezt követően a celluláz enzim komplex aktivitását a glükóz bomlási termék mennyiségének detektálásával határoztuk meg. A glükóz mennyiség meghatározásához ún. DNS-próbát használtam (Miller, 1959). Minden mintához 3,0 ml 3,5-dinitroszalicilsavat (DNS) tartalmazó reagenst adtam, 10 perces forralás után 540 nm-en mértem az oldat elnyelését. Mindegyik mérési ponthoz három párhuzamos mintát készítettem és ezek elnyelés értékeit átlagoltam. Az oldat elnyelése arányos a jelen lévő redukáló cukor mennyiségével, ami arányos az enzim-rendszer cellulóz-bontó aktivitásával. Kontrollként háromféle vak mintát használtam, az egyiknél nem volt jelen szubsztrátum, a másiknál nem volt jelen enzim a vizsgált mintában, a harmadik vak próbánál pedig sem enzim, sem szubsztrátum nem volt jelen. A háromféle vak minta abszorbancia értékeit minden esetben levontam a vizsgált minták abszorbancia értékeiből. A glükóz koncentráció meghatározásához kalibrációs egyenest vettem fel 0,05 mg/ml - 0,5 mg/ml-es ismert pontos koncentrációjú glükóz oldatok használatával.

3.3.5.3 β-D-mannozidáz (*Thermobifida fusca*)

A β -D-mannozidáz aktivitását, *para*-nitrofenil- β -D-mannopiranozid (*pNP-\beta*-D-man) mesterséges szubsztrátum segítségével határoztam meg, foszfát–citrát pufferben (citromsav/Na₂HPO₄; 10 mM, pH = 6,0), 50 °C-on, 1 ml reakcióelegyben (Bouquelet *et al.*, 1978). Egy tipikus aktivitás meghatározás a következőképpen történt: a reakcióelegy 30 µl (5 mM) *pNP-\beta*-D-man szubsztrátumot, 940 µl puffert és 10 µl enzim oldatot tartalmazó (a 0,13 mM koncentrációjú enzim mintából százszoros hígítású, 1,3 µM-os) enzimtörzsoldatot készítettem 10 mM foszfát-citrát pufferben (pH = 6,0), ebből az enzim-törzsoldatból vettem ki 10 µl-t az aktivitásméréshez). A reakciót 2 perces, 50 °C-on történő előinkubálás után, minden esetben az enzim hozzáadásával indítottam el. A mintákban lévő enzimek működését 5 perces

reakcióidő után a pH lúgosításával, 2 ml Na-borát puffer (0,2 M, pH = 10,0) hozzáadásával állítjuk le. A minták elnyelését 400 nm-en mérjük. 3 ml térfogatú, 0,5 cm élhosszúságú kvarcküvettát használtunk. A hidrolízis során felszabadult para-nitrofenolát ionok mennyisége a mért abszorbancia adatokból kiszámítható a para-nitrofenolát moláris extinkciós koefficiensének ismeretében ($\varepsilon = 17, 3 \times 10^3 \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$).

A beburkolt enzim esetében az aktivitás mérését a következőképpen végeztem: az enzim nanorészecskék előállítása során az utolsó lépésnél a terméket vizes fázisba (0,05 M citrát-foszfát-puffer, pH = 6,0) extraháltam és ennek mértem az aktivitását. Az aktivitásmérésnél ügyeltem, hogy a beburkolt enzimet tartalmazó hígabb oldat és a kontrollként használt természetes enzim hasonló koncentrációban legyen jelen a mérés során. Egy tipikus aktivitás meghatározás a következőképpen történt: a beburkolt enzim termék koncentrációja mintegy 0,02 mg/ml. Az aktivitásméréshez a következő koncentrációkat használtam: 100 µl beburkolt mannozidáz enzim, 30 µl szubsztrátum, 870 µl puffer (0,05 M citrát p., pH = 6,0). 50°C-on 5 percig reagáltattam. A reakciót leállítottam a 2 ml pH = 10,0-es Na-borát pufferrel.

3.3.5.4 Endoxilanáz A (Thermobifida fusca)

Szubsztrátumként 1%-os xilán-oldatot használtunk (1 óra inkubálás 50 °C-on), a felszabaduló cukor termék mennyiségét DNS-próbával határoztuk meg (Miller, 1959) (ld. 3.3.5.2 alfejezet).

3.3.5.5 β -D-xilozidáz (*Thermobifida fusca*)

A β -D-mannozidáznál leírt aktivitásmérés (ld. 3.3.5.3 alfejezet) használható itt is azzal a különbséggel, hogy az enzim szubsztrátuma *para*-nitrofenil- β -D-xilopiranozid (*p*NP-xyl). Az aktivitás méréséhez használt térfogatok: *p*NP-xyl szubsztrátum 30 µl, enzim natív enzim esetén 15 µl, beburkolt enzim esetén 100 µl, továbbá pufferrel 1000 µl-re hígítva. 5 percig 50 °C-on inkubáltam az elegyet, majd a reakciót 2 ml pH = 10,0-es Na-borát pufferrel állítottam le.

3.3.5.6 Endomannanáz (Thermobifida fusca)

Az aktivitásmérésnél 740 μ l pH = 7,00; 20 mM-os foszfát pufferhez (KH₂PO₄/Na₂HPO₄) 250 μ l 0,5%-os mannánt és 10 μ l endomannanáz enzim törzsoldatot adtam. Az elegyet 50 °C-on 10 percig inkubáltam, majd 1 ml DNS-reagenst adtam hozzá és 10 percig 100 °C-on forraltam. Ezután jeges fürdőbe helyezve hűtöttem, majd 335 μ l 40%-os K-Na-tartarátot adtam hozzá és az oldat abszorbanciáját 575 nm-en mértem.

3.3.6 Enzim nanorészecskék méretének meghatározása dinamikus fényszórás méréssel

Az enzimek és az enzim nanorészecskék méretét dinamikus fényszórás méréssel határoztam meg Malvern Zeta-sizer készülék segítségével. Egy tipikus minta 1 ml legalább 1 mg/ml koncentrációjú enzim vagy enzim nanorészecske oldat volt. Az oldatot 25 °C-on inkubáltam és minden mérést 10-15 alkalommal megismételtem, majd a kapott eredményeket átlagoltam.

3.3.7 Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) felvétel készítése

A mintakészítés menete a Kim és Grate, (2003) által kidolgozott módszerrel, MAPS monomerekből kialakított rétegek esetén a következőképpen történt: az enzim-oldatból

egyetlen cseppet az elektronmikroszkóp tárgylemezére helyezünk, majd megszárítjuk. A minta nem igényel külön festést, mert az enzim körül kialakított polimer burokban található Si atomok önmagukban elegendően "elektrondenzek" (elektronszórók) ahhoz, hogy képet lehessen alkotni velük transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálat során (ld. még 2.4.5.1 alfejezet).

3.3.8 Stabilitás vizsgálatok

3.3.8.1 Tárolási stabilitás

A tárolási stabilitást kétfajta hőmérsékleten (hűtő tárolási hőmérsékletén, +4 °C-on, valamint szobahőmérsékleten, +20 °C-on, illetve +22 °C-on) vizsgáltam. Ezeknél a méréseknél a mintákat nem rázattam. Az inkubálás során meghatározott időközönként mintát vettem a beburkolt enzimekből és a kontrollként használt természetes enzimekből és ezek aktivitását hasonlítottam össze. Három párhuzamos aktivitásmérést végeztem és ezeket átlagoltam.

3.3.8.2 Mechanikai stabilitás

A mechanikai stabilitást különböző hőmérsékleteken és rázatási intenzitással végeztem. Az enzim minták mechanikai stabilitásának vizsgálatához 27 °C-on és 37 °C-on 150 ill. 250 rpm-mel New Brunswick Scientific G24 inkubátor rázógépet használtam. Magasabb hőmérsékleteken (50 °C és 80 °C) a rázatásos stabilitásvizsgálatokat (150 rpm) IKA KS4000i kontrol termosztálható rázógéppel hajtottam végre. Mindkét esetben az adott hőmérsékleten való inkubálás mellett vízszintes irányú, körkörös rázatás történt.

3.3.8.3 pH-stabilitás

A polimer védőréteggel bevont kimotripszin és celluláz enzim-komplexek pHstabilitását a következő módon mértük: a szubsztrátumot és az enzimet tartalmazó elegyek pH-ját kb. 1 mólos sósav oldattal 1,5-ös pH-ra savanyítottam, illetve NaOH-dal pH = 12-re lúgosítottuk. Az oldatok pH-ját pH mérővel ellenőriztem az aktivitásmérés előtt és után is. Hasonlóképpen cc. ecetsavval pH = 3,5-re, illetve Na₂HPO₄-dal pH = 9 értékekre állítottuk be mind a természetes, mind a beburkolt enzimek elegyének pH-ját. Az adott pH-jú oldatokkal a korábban leírt módon aktivitásmérést végeztem.

3.3.8.4 Hőstabilitás

A kimotripszin enzim hőstabilitásának vizsgálatához 27 °C-on és 37 °C-on New Brunswick Scientific G24 inkubátor rázógépet használtam. A celluláz és hemicelluláz enzimek hőstabilitását 50 °C-on és 80 °C-on a IKA KS4000i kontrol termosztálható rázógéppel végeztem.

3.3.8.5 Enzimek féléletidejének számítása

Az enzimek stabilitásának összehasonlításához az enzimek féléletidejét számoltam ki és ezeket az értékeket hasonlítottam össze. Az enzimek féléletideje az az időtartam, amely alatt az enzim aktivitásának értéke a felére csökken (ld. még 2.1 fejezet). Ez az érték jellemzi az enzimek stabilitását: a stabilabb enzimek féléletideje hosszabb.

Az enzim nanorészecskék stabilitásnövekedését úgy számszerűsítettem, hogy a fenti módon meghatározott féléletidejük és a természetes enzimek féléletidejének a hányadosát vettem.
3.4 Kísérleti eredmények három lépésben előállított enzim nanorészecskékkel

3.4.1 a-kimotripszin enzim

Elsőként Kim és Grate (2003) alkalmazták a három reakciólépésből álló szintézist α -kimotripszin enzim alkalmazásával. E kísérletek reprodukálásával kezdtem a stabilizálási kísérleteimet.

3.4.1.1 Az enzim nanorészecskék detektálása

Transzmissziós elektronmikroszkópos felvételekkel bizonyítottam az enzimet körülvevő polimer réteg kialakulását α-kimotripszin enzim esetében (13. ábra) (Hegedüs és Nagy, 2009a). Az enzim nanorészecskéket külön festés nélkül, a polimer réteget alkotó trimetoxiszilil csoportok erős elektronsugarakat visszaverő képessége miatt detektálni lehet. Az elektronmikroszkópos felvételen látszik, hogy az enzimek világos, közel kör alakú foltként jelennek meg. A polimer nanoréteg pedig a világos foltokat koncentrikusan körbevevő sötét körgyűrűként jelenik meg (13. ábra). A kisebb méretű részecskék különálló α-kimotripszin enzim molekulák, amelyeket egyenként sikerült beburkolni a polimer védő réteggel. A polimer réteg vastagságát 3-7 nm-re becsüljük. A nagyobb méretű részecskék esetében a preparálás során az enzim molekulák összetapadtak, nem váltak szét és így kerültek a szubsztrátum diffúziós útjának néhány beburkolásra. Várhatóan nanométeres megnövekedése a pórusos polimer rétegen keresztül az enzim aktív centrumához nem okoz lényeges aktivitás csökkenést.



13. ábra α-kimotripszin enzim nanorészecskék transzmissziós elektronmikroszkópos detektálása

3.4.1.2 Az enzim nanorészecskék méreteloszlása a szintézis során

Dinamikus fényszórás méréssel, Malvern Zeta-Sizer készülékkel, követtem az enzim nanorészecskék méreteloszlását is. A 14. ábra több mérési eredményt is tartalmaz egyetlen grafikonon ábrázolva. A grafikon a vizsgált részecskék számának százalékos eloszlását ábrázolja a méret logaritmusának függvényében. A "Mód. CT" jelű görbe az első lépést, vagyis az α -kimotripszin enzim molekulák felületének módosítását követő méreteloszlást ábrázolja vizes oldószerben. A módosított α -kimotripszin enzim molekulák méreteloszlása gyakorlatilag megegyezik a kiindulási természetes α -kimotripszin enzim molekulák éval. A logaritmikus skálán leolvasható, hogy az α -kimotripszin enzim molekulák mérete nagyrészt 2 és 4 nm közötti tartományba esik.



14. ábra α-kimotripszin enzim nanorészecskék méreteloszlása az előállítás egyes lépéseit követően

A "CT/*n*-hexán" görbe a felületükön módosított és ion-párral hexán fázisban molekulárisan oldott α -kimotripszin enzim molekulák eloszlását ábrázolja. Látható, hogy az ionpárral apoláris oldószerben oldott enzim molekulák eloszlása nagyobb mérettartományban van, mint a természetes, illetve a felületükön módosított α -kimotripszin enzim molekuláké. A méreteloszlás görbének a legnagyobb része még így is 10 nm alatt van, a görbe maximuma 6 és 8 nm közötti tartományban található. A méret növekedésének feltételezhetően az az oka, hogy a hidrofób ionpárosodás során az enzim molekulák felületén az AOT detergensből réteg képződik és ez a réteg okozza az enzim molekulák felületén az AOT detergensből réteg növekedését. A méreteloszlás mintegy 3 nm-rel tolódik el a természetes, illetve a módosított α -kimotripszin enzimek méretének eloszlásától. Ez azt jelenti, hogy mintegy másfél nanométer vastagságú detergens réteg van jelen átlagosan az enzim molekulák felületén. A méreteloszlás görbe egyúttal azt is bizonyítja, hogy az α -kimotripszin enzim molekuláknak hidrofób ionpárosodás segítségével történő hexán fázisba juttatása valóban molekuláris oldódással jön létre, a képződő enzim molekula – detergens részecskék méreteloszlása jóval alatta marad az 50 nm-es határnak, ami felett kolloid részecskéknek tekinthetők.

A 14. ábrán található "SEN-CT" jelű görbe mutatja a [3-(metakriloxi)propil]trimetoxiszilán szerves-szervetlen hibrid polimer réteggel beburkolt és vizes fázisba átvitt α kimotripszin enzim nanorészecskék méreteloszlását.

3.4.1.3 Az enzim nanorészecskék aktivitásának változása a szintézis során

Nyomon követtem, hogy az α -kimotripszin enzim aktivitását hogyan befolyásolják az enzim nanorészecskék előállításának lépései során az egyes szintézislépések. Elsőként a felületmódosítás enzim aktivitásra gyakorolt hatását vizsgáltam. A felületmódosítás után, amely desztillált vízben történt, a módosított α -kimotripszin enzimet tartalmazó oldatot

kétszeres koncentrációjú puffer oldattal hígítottam és az aktivitását a természetes enzimnél alkalmazotthoz hasonló körülmények között mértem. Nem tapasztaltunk eltérést az aktivitások között.



15. ábra Kimotripszin enzim aktivitásának változása 365 nm-es UV-fénnyel történő besugárzás után

Ezt követően a hidrofób ionpár képzés, illetve a hexánban való oldás hatását vizsgáltam az α -kimotripszin enzim aktivitására. Ehhez a felületén módosított α -kimotripszin enzimet a kísérletek leírásában alkalmazott körülményekhez hasonlóan AOT-vel reagáltattam, hexánban oldottam és az oldást követően extrakcióval újra vizes fázisba juttattam. A vizes oldatban mértem az enzim koncentrációját, valamint az enzim aktivitását. Az enzim aktivitása meglepő módon nem változott.

A polimerizációs lépéshez hasonló körülmények között vizsgáltam a 365 nm-es UV fény hatását a hexánban oldott módosított CT enzim aktivitására. Azt tapasztaltam, hogy 8 óra alatt az enzim aktivitás az eredetinek 60-70 %-ára csökken (15. ábra). A megelőző lépések során mérhető aktivitás csökkenést nem tapasztaltam. Ez azt jelenti, hogy az enzim-polimer nanobiokompozit aktivitásának csökkenését jórészt, vagy teljes egészében az UV-besugárzás okozza.

3.4.1.4 Az enzim nanorészecskék tárolási stabilitása

Vizsgáltuk a SEN-CT hűtőben, + 4 °C-on (16. ábra), illetve szobahőmérsékleten (20 °Con) történő tárolás közben történő aktivitás változását is (17. ábra). A 16. ábrán látható, hogy mindkét esetben az enzim-polimer nanobiokompozit stabilisabb, mint a szabad, polimer védőréteggel be nem burkolt kimotripszin enzim (CT). A +4 °C-on történő tárolás során a természetes α -kimotripszin enzim aktivitása már mintegy 30 nap után az eredeti aktivitásának 30%-ára csökken, 180 nap után pedig már a 10%-ot sem éri el. Ezzel szemben az α kimotripszin enzim nanorészecskék aktivitása közel 300 nap után is megközelíti eredeti aktivitásuk 80%-át (16. ábra).



16. ábra Természetes (*) és védőrétegbe burkolt (•) α-kimotripszin enzim nanorészecskék tárolási stabilitása 4 °C-on

20 °C-on történő tárolás során a kontrollként használt szabad α -kimotripszin enzim aktivitása 10 nap után alig haladja meg eredeti aktivitásának a 30%-át, 26 nap után kevesebb, mint az eredeti 15%-a. A beburkolt α -kimotripszin enzim nanorészecskék aktivitása viszont 16 nap után is 80% körüli érték és 26 nap után is meghaladja még az 50%-ot (17. ábra).



17. ábra Természetes (♦) és védőrétegbe burkolt (•) α-kimotripszin enzim nanorészecskék stabilitása 20 °C-on

3.4.1.5 A beburkolt α-kimotripszin enzim nanorészecskék mechanikai stabilitása

Ennél extrémebb körülmények között - rázatás közben és magasabb hőmérsékleten még nagyobb eltérést tapasztalhatunk a SEN-CT enzim és a kontroll CT enzim stabilitásaiban. 27 °C-on 150 rpm-mel történő rázatás során a természetes α-kimotripszin enzim molekulák az idő függvényében exponenciálisan csökkenő aktivitást mutatnak. Mintegy 240 óra inkubálást követően csak eredeti aktivitásuk negyedével rendelkeznek. Ezzel szemben a beburkolt α kimotripszin enzim nanorészecskék aktivitása ekkor még jelentős. Kb. 330 óra inkubálást követően a természetes α -kimotripszin enzimek aktivitása eredeti aktivitásuk tizedrészére csökken, ezzel szemben a beburkolt α -kimotripszin nanorészecskék aktivitása az eredeti 60%-a marad (18. ábra). Az enzim nanorészecskék stabilitásának időbeli lefutását ábrázoló görbén ennél a pontnál törés mutatkozik, és aktivitásuk meredekebben csökken, mint korábban, de még 500 óra inkubálást követően is megőrzik aktivitásuk mintegy negyedét, miközben a természetes kimotripszin enzimek aktivitása már alig mérhető (2-3%).



18. ábra Természetes (♦) és védőrétegbe burkolt (●) α-kimotripszin enzim nanorészecskék stabilitása 27 °C-on, 150 rpm-mel történő rázatás során



19. ábra Természetes (♦) és védőrétegbe burkolt (●) α-kimotripszin enzim nanorészecskék stabilitása 37 °C-on, 250 rpm-mel történő rázatás során

A hőmérséklet és a rázás sebességének emelésével még élesebben elválik a természetes α -kimotripszin enzim és az enzim nanorészecskék stabilitásának görbéje, a különbség még szembetűnőbb. 37 °C-on 250 rpm-mel történő rázatás hatására a szabad enzim aktivitása már egy óra inkubálást követően is eredeti aktivitásának negyedrészére csökken, két óra inkubálást követően pedig aktivitása teljesen eltűnik (19. ábra). A beburkolt α -kimotripszin enzim nanorészecskék aktivitása is kezdetben meredeken csökken, azonban ez a meredek aktivitás csökkenés az inkubáció 2. órája körül megáll és 19 óra múlva is eredeti aktivitásának 50%-át adja. A beburkolt α -kimotripszin enzim nanorészecskék aktivitásának 50%-át követően lineárissá válik és 90 óra után is megőrzik eredeti aktivitásuk 10%-át.

Körülmények		t _{1/2}	(óra)	Rel. t _{1/2}
Т	Rázatás	Natív SEN-		SEN-CT/
(°C)	(rpm)	СТ	СТ	Natív CT
4	_	864*	12000*	13.9
20	-	120	648	5.4
27	150	110,0	650	5,9
37	250	0,5	37	74,0

3. táblázat Természetes és polimerrel borított (SEN) α-kimotripszin enzim (CT) aktivitásainak féléletidői (t_{1/2}).

* Becsült értékek. A becslést logaritmikus skálán való ábrázolás mellett a görbékre illesztett egyenesekkel végeztük. Ahol elérik az 50%-os aktivitás értéket, az az időpont a felezési idő.

Az enzim aktivitásának felezési időit a 3. táblázatban foglaltam össze. Mivel a természetes enzimek aktivitása általában exponenciálisan csökken az idő függvényében, jellemezhető az ún. felezési idővel, vagy féléletidővel ($t_{1/2}$) (ld. 2.1 fejezet). Az enzim stabilitásának felezési ideje azt az időtartamot jelenti, amely alatt az enzim aktivitása felére csökken. A felezési időket úgy számoltuk, hogy logaritmikus skálát alkalmazva az aktivitásidő grafikonokra egyenest illesztettünk és amikor az egyeneseknek a kiindulási aktivitás felét elérték, azt az időpontot tekintettük $t_{1/2}$ -nek. Az enzim nanorészecskék aktivitásának időbeli lefutása a szabad enzimek hasonló görbéinél összetettebb. Egy kezdeti, meredek csökkenést követően aktivitás értékek kevésbé meredeken csökkennek. Az enzim nanorészecskék felezési idejének számításánál ezt a kevésbé meredek lefutású görberészt vettük figyelembe (3. táblázat).

3.4.1.6 Az enzim nanorészecskék pH-stabilitása

Megvizsgáltam a SEN-CT enzim stabilitását különböző pH-tartományokban és azt találtam, hogy a szabad enzimmel összehasonlítva (CT) extrém savas és erősen lúgos pH értékek esetében sem csökken a beburkolt enzim aktivitása 50% alá, míg ezeken a szabad enzime már nem képes működni (20. ábra). A szabad α -kimotripszin enzimnek és az enzim nanorészecskének is a legnagyobb az aktivitása az optimális pH-értéken (pH =7,8). Az enzimek aktivitása ennél savasabb és lúgosabb pH-n is kevesebb. A 20. ábrán látható, hogy a szabad α -kimotripszin enzimnek már gyengén savas (pH = 6,5) oldatban is 20% alá csökken az aktivitása az optimális pH-értéken mért aktivitása ugyanezen a pH-értéken még 80%-a a kiindulási, optimális pH-értéken mért aktivitásának. Extrém savas (pH = 1,5) körülmények között a szabad α -kimotripszin enzimnek már egyáltalán nincs aktivitása, az enzim nanorészecskék viszont eredeti aktivitásuk felét megőrizve még működőképesek maradnak.



20. ábra Természetes (♦) és védőrétegbe burkolt (●) α-kimotripszin enzim nanorészecskék aktivitása különböző pH-értékeken

3.4.2 Celluláz enzim komplex

3.4.2.1 A celluláz enzim nanorészecskék detektálása

A celluláz enzim nanorészecskék detektálása az α-kimotripszin enzim nanorészecskék detektálásához hasonló módon történt (ld. 4.1.1 alfejezet). Külön festés nélkül, transzmissziós elektronmikroszkóppal detektálni lehet az enzim nanorészecskék körül kialakult polimer réteget a trimetoxiszilil csoportok elektronsugarakat visszaverő hatása miatt.



21. ábra Celluláz enzim nanorészecskék transzmissziós elektronmikroszkópos felvétele

Az enzimek ebben az esetben is világos foltként jelennek meg, a polimer nanoréteg pedig sötét körgyűrűként különül el a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételen (21. ábra). A felvételen látható részecskék mérete 10-30 nm között változik, a polimer rétegnek

megfelelő sötét körgyűrűk azonban egységesen 3-5 nm vastagságúaknak tűnnek. A részecskék méretének heterogenitása lehet az elektronmikroszkópos felvétel előkészítése során képződött műtermék is (a mintapreparálás, szárítás során az egyes nanorészecskék összetapadhatnak nagyobbakká), vagy az enzim nanorészecskék előállítása során tapadhatnak össze az enzim molekulák.



22. ábra Celluláz enzim nanorészecskék transzmissziós elektronmikroszkópos felvétele A) 50 °C, B) 80 °C, C) 100 °C hőmérsékleten történt egy órás inkubálások után

Megvizsgáltuk a különböző hőmérsékleteken előkezelt celluláz enzim nanorészecskék transzmissziós elektronmikroszkópos képét is (22. ábra). Az ábrán látható, hogy 1 óra 50 °C- on történő inkubálást követően az eddig különálló enzim nanorészecskék nagyobb egységekké aggregálódnak (22. A ábra). A képből azonban nem lehet messzemenő következtetéseket levonni, hiszen az enzim nanorészecskék összeállása nagyobb részecskékké lehet reverzibilis is, illetve kialakulhat a minta transzmissziós elektronmikroszkópos vizsgálatát megelőző preparálás során (szárítás) is. Azonban ez az agglomeráció indokolná az enzim nanorészecskék aktivitásának viszonylag gyors kezdeti csökkenését az inkubáció során (ld. később). 80 °C-on 1 órán keresztül történő inkubáció során még jobban megváltozik a minta elektronmikroszkópos képe (22. B ábra). Úgy tűnik, hogy az eddig különálló enzim nanorészecskék polimer burkai felszakadoznak, nagyobb részek alakulnak ki. A minta még tartalmaz néhány kisebb, elkülönült enzim nanorészecskét, ugyanakkor döntően a mintegy 100 nm méretű, vagy még nagyobb nagyobb, szürke masszából álló csomók uralják a képet.

Ez már nem magyarázható másképp, mint hogy az enzim nanorészecskék polimer burkai felszakadoznak, megsérülnek, a korábban észlelt rendezett struktúra megszűnik, az enzimek valószínűleg degenerálódnak. 100 °C-on 1 órán keresztül történő inkubálását követően még inkább egyértelmű az enzim nanorészecskék szerkezetének a felbomlása, az elektronmikroszkópos kép teljesen homogén, szürke tömeget mutat, amelyek valószínűleg a szétesett polimer burkok rendezetlen részei (22. C ábra).

3.4.2.2 A celluláz enzim nanorészecskék méreteloszlása

			Diam. (nm)	% Number	Width (nm)
Z-Average (d.nm):	22,76	Peak 1:	10,71	100,0	3,356
Pdl:	0,238	Peak 2:	0,000	0,0	0,000
Intercept:	0,833	Peak 3:	0,000	0,0	0,000
Result quality :	Good				



23. ábra Celluláz enzim nanorészecskék méreteloszlása a szintézis lépései folyamán.

A 23. ábra az enzim részecskék méreteloszlását mutatja logaritmikus skálán a szintézis fázisaiban. A "CK/víz" jelzésű görbe a vízben oldott celluláz enzim komplex méreteloszlását mutatja szonikálás nélkül. A "CK_{szon}/víz" görbe szonikálás után mutatja a celluláz enzim komplex méreteloszlását. A "CK/n-hexán" grafikon az ionpár képzéssel hexánban oldott celluláz enzim molekulák méreteloszlását, a "SEN-CK/víz" címkéjű görbe pedig az elkészült enzim nanorészecske termék méreteloszlását mutatja. Látható, hogy a szonikálás hatására a méret-eloszlás kiszélesedik, nagyobb számban jelennek meg kisebb méretű (valószínűleg össze nem tapadt) enzim molekulák. Az eloszlásgörbék csúcsa is 8 nm-ről 6 nm-re csökken. A

hexánban oldott ion-pár komplex méreteloszlása még szélesebb, mint a szonikálás után kapott szabad enzim molekuláké, az eloszlásgörbe csúcsa is eltolódik 10 nm közeli értékekre. Ez azért van, mert az ion-pár komplex mérete nagyobb, mint a szabad enzimeké. Az enzim nanorészecske termékek méreteloszlás görbéjének csúcsa még nagyobb, mintegy 20 nm-es érték felé tolódik el, jelezve, hogy a termékként kapott enzim nanorészecskék mérete a polimer réteg miatt tovább nő (23. ábra, "SEN-CK/víz" görbe). Lehetséges azonban az is, hogy több, akár különböző funkcióval rendelkező enzim molekula kerül egy darab, polimer nanoréteg által kialakított összefüggő burokba.

3.4.2.3 A polimer réteg hatása a celluláz enzim nanorészecskék aktivitására

Vizsgáltam a polimer réteg vastagságának hatását az enzim aktivitására (24. ábra). Igyekeztem az ultraibolya sugárzásnak a korábbi kísérletek során kimért károsító hatását csökkenteni azzal, hogy a besugárzási időt csökkentettem két órára. Hasonló körülmények között a hexán fázisba oldott Celluclast BG enzim-komplexhez 1, 2, illetve 4x mennyiségű monomert adtam, amely aztán a kísérlet során feltételezhetően 1, 2, illetve 4x hosszúságú polimer-láncokká szerveződött az enzim-komplex molekulák felületén. (A polimer szálaknak a hosszúsága azonban nem áll egyenes arányban az enzimeket körülvevő burok nagyságával, mert a polimer szálak vélhetően a térben elhajlanak, kanyarognak.) A nagyobb mennyiségű monomer hozzáadásával a keresztkötések kialakulásának valószínűsége az egyes polimer szálak között megnő, ezért az enzimeket körbevevő polimer réteg tömörsége is megnő, jóval kevésbé lesz porózus, azonban jobban képes stabilizálni az enzimeket. A különböző vastagságú polimer réteggel beburkolt enzim-komplexek rendre mintegy 60, 50 és 40%-os aktivitást mutattak a kiindulási kezeletlen enzim-komplexhez képest (24. ábra). Ez azt mutatja, hogy a polimer-réteg bizonyos mértékben akadályozza az enzim-komplex működését, de még négyszeres polimer mennyiség esetén is működik az enzim. A polimer réteg vastagságának hatása az enzim stabilitására különböző körülmények között további kísérletek tárgya lehet.



24. ábra Celluclast BG celluláz enzim-komplex aktivitásának változása a hozzáadott monomer mennyiségével



25. ábra. Különböző vastagságú polimerréteggel készült celluláz enzim nanorészecskék. A) A szokásosan használt monomer mennyiség felével, B) a szokásos monomer mennyiséggel és C) a szokásos monomer mennyiség négyszeresével bevonva. A minták 50 °C-on, egy órán keresztül történő inkubálás után készültek.

A transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek különböző mennyiségű monomer hozzáadásával készült enzim nanorészecskék 1 órás 50 °C-on történő inkubálást követő képét mutatják (25. ábra). Mindhárom esetben látható, hogy a mintegy 10 nm átmérőjű enzim nanorészecskék nagyobb, 50-100 nm-es aggregátumokat képeznek. (Ezek az aggregátumok kialakulhattak a szintézis után is, az elektronmikroszkópos vizsgálat előtt, a minta beszárításakor.) A monomer mennyiségét felére csökkentve (A), illetve négyszeresére növelve (C) nem látható jelentős különbség az enzim nanorészecskéket körbevevő polimer réteg vastagságában a szokásos monomer mennyiség alkalmazásával előállított enzim nanorészecskék elektronmikroszkópos képéhez viszonyítva (B).

3.4.2.4 A celluláz enzim nanorészecskék tárolási stabilitása

Összehasonlítottam a természetes és polimer réteggel borított enzim-komplex stabilitását szobahőmérsékleten (20 °C) rázás nélkül (26. ábra). Az eredmények azt mutatják, hogy hasonlóan a kimotripszin enzim stabilitás vizsgálatainál tapasztalt görbe lefutásokhoz, a Celluclast BG enzim-komplex polimer réteggel beburkolt kompozitjának stabilitása először a natív enzim-komplexéhez hasonló módon meredeken csökken, majd mintegy 40%-os aktivitás csökkenés után az enzim-komplex stabilitásának grafikonja enyhén csökkenő tendenciájú lineáris szakaszt mutat. 3 nap inkubálást követően a természetes celluláz enzim komplex aktivitása felére csökken, míg az celluláz enzim nanorészecskék aktivitása eredeti aktivitásuk 66%-a. Azonban 14 nap inkubálást követően a természetes celluláz enzim komplex aktivitás teljesen eltűnik, szemben a celluláz enzim nanorészecskékkel, melyek aktivitása még 56%-a a kiindulási aktivitás értéknek. Sőt, 110 nap inkubálást követően is még őrzi eredeti aktivitása 35%-át.



26. ábra Természetes (♦) és beburkolt (●) Celluclast BG celluláz enzim-komplex stabilitása 20 °C-on, rázatás nélkül

3.4.2.5 A celluláz enzim nanorészecskék aktivitásának hőmérsékletfüggése

Megvizsgáltam a celluklaszt enzim-rendszer aktivitásának hőmérséklet-függését is (27. ábra). A vizsgálat úgy történt, hogy egy órán át inkubáltam az enzimet és szűrőpapírcsík szubsztrátumot tartalmazó elegyet az adott hőmérsékleteken, majd mértem a keletkezett cukor mennyiségét a DNS-próbával. Az egyes minták aktivitását a hőmérsékleti optimumon (50 °C-on) mért aktivitásukhoz viszonyítottam, amelyet 1-nek vettem. Az eredmények azt mutatják, hogy a természetes enzim-komplexnek a hőmérséklet emelkedésével fokozatosan csökken az aktivitása. 60 °C-on az optimális hőmérsékleten mérhető aktivitásának mintegy 90%-át mutatja, 70 °C-on még 60%-át, 80 °C-on pedig már csak körülbelül 10%-át. Ha az enzim nanorészecskék előállításánál az irodalomban megadott monomer mennyiség felét adom hozzá a reakció elegyhez 60 °C-on és 70 °C-on az enzim nanorészecskék aktivitása gyakorlatilag megegyezik a természetes enzimek aktivitásával. 80 °C-on már különbözik a két minta aktivitása, a vékonyabb réteggel beburkolt enzim nanorészecskék aktivitása valamivel több, mint 40%, szemben a természetes celluláz enzimek mintegy 10%-os aktivitásával az 50 °C-on mért aktivitás értékekhez képest. Ezzel szemben az irodalomban adott mennyiségű és a négyszeres mennyiségű monomerrel beburkolt enzim aktivitása 50 °C és 80 °C között gyakorlatilag ugyanakkora marad. Míg magasabb hőmérsékleten (100 °C-on) a természetes celluláz enzim komplex aktivitása gyakorlatilag eltűnik, ezzel szemben az egyszeres réteggel beburkolt enzim komplex aktivitása gyakorlatilag eltűnik, eredeti aktivitásának 40%-át megőrzi.



27. ábra Természetes (◆, kék) és beburkolt Celluclast BG enzim-rendszer működésének hőmérséklet-függése. A (▲, barna) 0,5 ×, a (●, piros) 1 × és a (■, zöld) 4 × mennyiségű monomerrel beburkolt enzimek aktivitását jelöli.

3.4.2.6 A celluláz enzim nanorészecskék hőstabilitása

A 20°C-on mért tárolási stabilitás görbékhez hasonló lefutás tapasztalható intenzívebb körülmények között, 37 °C-on, 150 rpm keverési fordulatszámmal történő rázatás során (28. ábra). Egy napos inkubálást követően a fenti körülmények között a természetes celluláz enzim komplex aktivitása valamivel kevesebb, mint a fele a kiindulási értéknek (46%), ezzel szemben a celluláz enzim nanorészecskék aktivitása a kezdeti aktivitásának a kétharmada (65%-a). Hat nap inkubálást követően a természetes celluláz enzim komplexnek már nem mérhető aktivitása, a beburkolt enzimek aktivitása viszont még mindig 40%-a az eredetinek. Megállapítható, hogy az előkezeléssel lényegesen megnövelhető az enzim stabilitása, bár ha csökkenő aktivitással is, de hosszú ideig megőrzi aktivitását 37 °C-on.

A szokásos mennyiségű monomerrel beburkolt celluláz enzim nanorészecskék hőstabilitását 80 °C-on, rázatás nélkül vizsgáltam (29. ábra). A természetes celluláz enzim komplex egy óra inkubálást követően eredeti aktivitásának kevesebb, mint negyedével rendelkezik, míg az enzim nanorészecskék megőrzik eredeti aktivitásuk 80%-át. Két óra inkubálást követően a természetes enzimek aktivitása már csak tizede az eredetinek, míg az enzim nanorészecskék még rendelkeznek eredeti aktivitásuk több mint kétharmadával. A természetes enzim aktivitása fokozatosan csökken, 6 óra inkubálást követően teljesen eltűnik. Az enzim nanorészecskék aktivitása 2 óra inkubálást követően azonban kevésbé csökken, mint az első két órában, a stabilitásuk görbéje egy rövid, kezdeti, gyorsan csökkenő periódust követően egy lassan csökkenő, közel lineáris szakaszba lép át. Hat óra inkubálást követően, amikor a természetes enzimek gyakorlatilag már nem mutatnak aktivitást, az enzim nanorészecskék még rendelkeznek eredeti aktivitásuk csaknem 60%-ával, sőt, még 12 óra inkubálást követően is megtartják eredeti aktivitásuk több mint 40%-át (29. ábra).



28. ábra Természetes (◆) és beburkolt (●) Celluclast BG enzim-komplex stabilitása 37 °C-on, 150 rpm-mel rázatva

Megvizsgáltam a polimer réteg vastagságának hatását is az enzim részecskék hőstabilitására (30. ábra). A mintákat 80 °C-on inkubáltuk 150 rpm-es rázatás közben. Látható, hogy a természetes enzim aktivitása mintegy egy óra alatt gyakorlatilag elveszik. A három lépésben előállított trimetoxiszilil funkciós csoportokat tartalmazó, normál rétegvastagságú védőréteggel ellátott enzim nanorészecskék aktivitása (30. ábra) mintegy 6 órán keresztül alig csökken, a kiindulási aktivitás 65%-a, azonban ezt követően egy gyors aktivitás csökkenés történik és 10 óra elteltével az enzim nanorészecskék aktivitása az eredetinek csupán a 30%-a. A négyszeres mennyiségű monomerrel előállított, vastagabb polimer réteget tartalmazó enzim nanorészecskék esetében (30. ábra) a relatív aktivitás csak a kiindulási érték 80%-ára csökken a vizsgált 10 óra alatt, viszont az abszolút fajlagos aktivitás ebben az esetben az előállítás veszteségeit is beleszámítva csak mintegy 5%-a a kiindulási natív enzim fajlagos aktivitásának. Tehát megállapíthatjuk, hogy vastagabb réteggel ellátott enzim nanorészecskék stabilisabbak ugyan, azonban aktivitásuk csökken a vékonyabb réteggel beburkolt enzimhez hasonlítva.



29. ábra Természetes (◆, kék) és beburkolt (●, piros) Celluclast BG enzim-komplex stabilitása 80 °C-on rázatás nélkül



30. ábra Különböző rétegvastagságú celluláz enzim nanorészecskék hőstabilitása 80 °C-on (◆ – természetes celluláz enzim, ● – celluláz enzim nanorészecskék szokásos vastagságú polimer réteggel, ■ – celluláz enzim nanorészecskék négyszeres mennyiségű monomerből készített polimer réteggel)

3.4.2.7 A celluláz enzim nanorészecskék pH-stabilitása

A celluláz enzim nanorészecskék aktivitását különböző pH-értékeken is vizsgáltam 50 °C-on, 1 óra inkubációt követően (31. ábra). Az általunk használt celluláz enzim komplex pH-"optimuma" pH = 5,5-ös érték körül van. Erősen savas (pH = 1,5) és erősen lúgos (pH = 12,0) értékeken a kontrollként használt kezeletlen celluláz enzim komplex aktivitása tizedrészére, illetve harmadrészére csökken. Az előkezelt celluláz enzim részecskék aktivitása ezeken a pH-értékeken változatlan marad, ugyanannyi, mint az optimális pH = 5,5-ös értéken.



31. ábra Celluláz enzim nanorészecskék aktivitása különböző pH-értékeken (

 természetes celluláz enzim,
 celluláz enzim nanorészecskék)

3.4.3 Hemicelluláz enzimek

A celluláz enzimek sikeres stabilizálását követően az ipari szempontból szintén értékes hemicelluláz enzimeket is stabilizáltam a háromlépéses módszerrel. A hemicellulázok ipari jelentőségéről, valamint a *Thermobifida fusca* termofil baktériumokról és a belőlük izolált hemicelluláz enzimekről a 2.5.3 fejezetben írtam.

3.4.3.1 A hemicelluláz enzimek aktivitásának változása a szintézis során

A β -D-mannozidáz enzim esetében az enzim nanorészecskék előállítása során az enzim módosítását követő lépésben a hidrofób ionpárok kialakításával *n*-hexánban történő oldás csak kis hatékonysággal működött, az enzimeknek csak maximum kis százaléka ment át szerves fázisba. A polimer réteg kialakítása, illetve a vizes fázisba történő extrakció során is csökkent az enzimek mennyisége. A terméket ezután vizes fázisba (0,05 M citrát-puffer, pH = 6,0) extraháltuk és ennek aktivitását mértük. A beburkolt enzim termék koncentrációja mintegy 0,02 mg/ml. A számolt aktivitás az eredeti 48-67%-a (4. táblázat)

A β -D-xilozidáznál az enzim törzsoldat hígított részleteinek szonikálása után az eredeti enzim 15%-a megy át szerves fázisba. Szonikálás nélkül nem tapasztalható oldódás a hidrofób

hexán, ami minden bizonnyal az enzimek összetapadása miatti nagy méretének köszönhető. A polimer réteg kialakítása után a terméket citrát pufferbe extraháltuk (0,05 M, pH = 6,0). A beburkolt β -D-xilozidáz enzim aktivitása 55,3-59,0%-a az eredetinek (ld. 4. táblázat).

	β-D- mannozidáz	Mutáns β-D- mannozidáz	β -D-xilozidáz	Endomannanáz
Elkészült enzim nanorészecske kitermelés (η)	9,2-11,55%	19,72%	9,04%	4,46-7,33%
Relatív aktivitás (%)	48-67%	nem mértem	55-59%	63%

4. táblázat A négyféle hemicelluláz enzimből előállított enzim nanorészecske kitermelése (η = kiinduási enzimmennyiség/termék mennyiség molban) és relatív aktivitásuk

Az endomannanáz enzimből 5-7%-ban sikerült enzim nanorészecskéket előállítani, azonban a termék aktivitása meglehetősen jó, a natív enzim 63%-a. A mutáns β -D-mannozidáz 19,72%-ából sikerült enzim nanorészecskéket előállítani, a mutáns enzim aktivitását nem vizsgáltam (4. táblázat).

Sajnos az enzimek közül az endomannanázból, a mutáns β -D-mannozidázból és a β -D-mannozidázból csak kis mennyiség állt rendelkezésre, ezért csak korlátozott számú mérést végeztem ezzel az enzimmel.

3.4.3.2 A hemicelluláz enzimek méreteloszlása a szintézis során

Dinamikus fényszórás méréssel vizsgáltam a háromlépéses módszerrel előállított hemicelluláz enzim nanorészecskék méreteloszlását is (32. ábra). Az endomannanáz enzim (EM) esetében az egyes szintézis lépések során is vizsgáltam az enzim nanorészecskék méreteloszlását. A 32. ábra a) részében az EM/víz eloszlásgörbe mutatja a természetes emdomannanáz enzim molekulák vízben való oldódása után mérhető méreteloszlást. Az enzim molekulák méreteloszlása zömében 10 nm-nél kisebb mérettartományban mozog és az eloszlásnak a csúcsa 5-6 nm között van. Az enzim molekulák hidrofób ionpárosodással hexán oldószerben való oldása során (32a ábra, SEM-EM/víz méreteloszlás görbe) a részecskék mérete nagyobb lesz, a méreteloszlás görbe csúcsa 5-6 nm-ről 9-10 nm-re nő. Az elkészült endomannanáz nanorészecskék méreteloszlása (EM/hexán görbe) már 10 nm felett van és az eloszlás-görbe csúcsa 10,5 nm-nél van. Az endomannanáz enzim nanorészecskék előállításának lépései során felvett méreteloszlás görbék egy csúccsal rendelkeznek, amely 10 nm körül van, tehát különálló enzim molekulák kerülnek beburkolásra. A részecskék mérete az előállítás során nő. A hő tűrő T. fusca organizmusból izolált hemicelluláz enzimekből előállított enzim nanorészecske termékek méreteloszlásának vizsgálatakor határozott csúcsokból álló méreteloszlás görbéket kapunk.(32b ábra). Az endomannanáz (SEN-EM görbe) és a mutáns mannozidáz (SEN-MM görbe) méreteloszlás görbéinek a csúcsai egyaránt 10 nm és 20 nm között vannak (10,5 nm és 11 nm). Ezzel szemben a β -D-mannozidáz (SEN-MN görbe) és a β -D-xilozidáz (SEN-XI görbe) enzim nanorészecskék méreteloszlása jóval nagyobb értéket mutat, mint ami az enzim nanorészecskék méreteloszlására várható volna (60-70 nm). Az eloszlásgörbék azt mutatják, hogy ezek az enzim nanorészecskék előállításuk során összetapadtak és nagyobb aggregátumokként vannak jelen.



32. ábra a) Egy hemicelluláz (endomannanáz, EM) méreteloszlása a háromlépéses szintézis során, b) a különböző hemicelluláz enzim termékek méreteloszlása (SEN-EM = endomannanáz enzim nanorészecskék, SEN-MM mutáns mannozidáz enzim nanorészecskék, SEN-MN = β -D-mannozidáz enzim nanorészecskék, SEN-XI = β -D-xilozidáz enzim nanorészecskék)

3.4.3.3 A hemicelluláz enzimek stabilitása

A háromlépéses módszerrel csak kis hatásfokkal sikerült előállítani enzim nanorészecskéket a *T. fusca* hő tűrő organizmusokból izolált hemicelluláz enzimekből. Ezért csak kevés stabilitásmérést tudtunk végezni. A híg oldatok tovább növelték a párhuzamos stabilitásmérések szórását. A hő tűrő organizmusokból izolált enzimek működőképesek maradnak magasabb hőmérsékleten is, azonban nem stabilak, még alacsonyabb hőmérsékleten is viszonylag gyorsan elveszítik az aktivitásukat.

A *T. fusca* organizmusból származó hemicelluláz enzimekből három lépésben előállított enzim nanorészecskék közül csak a β -D-xilozidáz enzim stabilitását sikerült vizsgálni, mert ezt az enzimet tudtuk előállítani olyan mennyiségben, amelynek már mérhető az aktivitása akár több alkalommal is. A β -D-xilozidáz enzim nanorészecskék tárolási stabilitását vizsgáltam +4 °C-on (hűtőben tartva), rázatás nélkül. Az aktivitás időbeli lefutása exponenciális csökkenést mutat, már 50 nap alatt teljesen elveszíti a működését (33. ábra). A beburkolt β -D-xilozidáz enzim aktivitása ekkor még mintegy a fele a kiindulási értéknek. Ezt sokáig megtartja és csak lassan csökken a beburkolt enzim aktivitása, 117 nap után is még a kiindulási értékének mintegy 40%-a.



33. ábra Természetes (\blacklozenge) és beburkolt (\blacklozenge) β -D-xilozidáz enzim stabilitása 4 °C-on

3.5 Kétlépéses, saját fejlesztésű módszerrel előállított enzim nanorészecskék

A hemicelluláz enzimekből előállítható enzim nanorészecskék kis mennyisége hatékonyabb módszer kidolgozására ösztönzött, amely alkalmas enzim nanorészecskék előállítására a külső változásaira érzékenyebb enzimekből is. Az enzim nanorészecskék körnvezet hemicellulázokból történő előállítása során az egyes részlépések végén képződött termékek mennyiségének vizsgálatából látható, hogy a hemicellulázokból készített enzim nanorészecskék előállításának kis hatékonysága elsősorban annak köszönhető, hogy a szintézis első részlépésének végén a felületükön módosított hemicelluláz enzimeket kis hatékonysággal lehet hidrofób ionpár képzés módszerével vizes fázisból apoláris hexán fázisba juttatni. Ezért olyan alternatív előállítási módszert kerestem, amely nem tartalmaz olyan, az enzimek mikrokörnyezetében a pH és az ionerősség drasztikusabb megváltozásával járó részlépést, amely inaktiválja az érzékenyebb enzimeket.

Yan *et al.* (2006a) olyan kétlépéses módszerrel állítottak elő enzim nanorészecskéket, amely nem tartalmazott fázisátmenetet, mind az enzim felületének módosítása, mind a polimer-réteg kialakítása az enzim körül vizes oldatban történik. Ezért e módszerrel kiküszöbölhető a hemicellulázokhoz hasonló érzékenyebb enzimek esetében az előállítás során bekövetkező nagyfokú denaturáció (a módszer részletes leírását ld. 3.3.3 fejezet).

Hasonlóan a Kim és Grate (2003) által kidolgozott módszerhez Yan *et al.* (2006a) módszerében az első lépés a felületmódosítás. A módosítás mindkét esetben az enzimek felületén található primer amino csoportokból indul ki, melyek mindkét esetben akrileződnek, csupán a reagens különbözik a két szintézis esetében (ld. 3.3.3 fejezet). Ezért a két eljárás tapasztalataiból egy új szintézist dolgoztam ki, amely magában foglalja mindkét irodalmi forrás előnyeit (ld. 3.3.3 fejezet). Az új eljárás egyszerűbb, gyorsabb és hatékonyabb az irodalomban leírtaknál. A módszer további előnye, hogy nagyobb mennyiségű enzim nanorészecskék előállítására is alkalmas, míg a Yan *et al.*(2006a) által leírt eljárás esetében a méretkizárásos kromatográfia miatt az előállítható enzimek mennyisége erősen korlátozott.

3.5.1 Az új eljárás hatékonysága

3.5.1.1 Az egy enzim molekulára jutó módosított csoportok számának meghatározása

A β -D-mannozidáz enzimben 7 db, az oldalláncában szabad primer amin csoportot tartalmazó aminosav található. Az irodalom szerint az enzim molekulák felületén a primer lizil-amin csoportok akrileződnek. A referencia irodalomban arról számolnak be (Yan *et al.*, 2006a, *suppl. mat.*), hogy torma peroxidáz enzim esetében 6 lizil csoportból 5 (4,9 ± 0,3) akrileződött. A kontroll, nem akrilezett β -D-mannozidáz oldatban kb. 9 fluoreszcein-izotiocianát molekula jut egy mannozidáz molekulára. Az akrilezés után megfestett β -D-mannozidáz enzimek esetében az egy enzim molekulára jutó festék molekulák száma 3. A kettő különbsége 6, tehát elmondható, hogy az egy β -D-mannozidáz enzim molekulár hat primer felületi amino csoport módosult akril csoporttá. Ez azt jelenti, hogy egy β -D-mannozidáz enzim molekuláról hat oligomer lánc indulhat a polimerizációs lépésben és ezek kapcsolódhatnak keresztkötésekkel, egymással nanoréteget kialakítva. Ennek segítségével kiszámítható, hogy mekkora monomer mennyiséget érdemes elreagáltatni ahhoz, hogy kb. 10 monomer hosszúságú oligomereket szintetizáljunk az enzimek felületére és ezek közül nagy valószínűséggel egy biszakrilamid lesz, amely lehetővé teszi az enzim molekula körül kialakult polimer réteg térhálósodását.

3.5.1.2 Az aktivitások mérése az egyes részlépések között

A β -D-mannozidáz enzimnek az aktivitását kiindulási állapotában mértem, valamint közvetlenül a felületmódosító lépést követően, a felület aktív csoportjainak meghatározásához használt festés után, az el nem reagált festék molekulák eltávolításához használt dialízist követően, végül a nanorétegnek az enzim molekulák körüli kialakítása után. Az adatokat az 5. táblázatban foglaltam össze. Látható, hogy a felület-módosítás csak kis mértékben csökkenti a β -D-mannozidáz enzim aktivitását, a festési eljárás, illetve a dialízis eljárás már nagyobb mértékben csökkenti, de az enzim aktivitása még mindig mintegy 80%-a a kiindulásinak. A polimer nanoréteg már jelentős mértékben csökkenti az enzim aktivitását, az csupán 12%-a a kiindulási enzim aktivitásnak. Megállapíthatjuk tehát, hogy a kétlépéses, vizes oldószerben lejátszódó módszer esetében az utolsó, a polimer nanoréteget kialakító lépés alkalmával csökken jelentősen a vizsgált enzim aktivitása.

	A ₂₈₀	c _{enzim} , mg/ml	V _{enzim} , ml	Idő, s	A_{400}	c _{szubsztrátum} , μmol	Aktivitás, µkatal	Specifikus aktívitás, µkatal/mg
Kiindulás	1,860	0,600	0,03	120	0,524	7,178	0,060	3,323
Módosítás után	1,860	0,600	0,03	120	0,486	6,658	0,055	3,082
Festés után	1,980	0,600	0,03	120	0,422	5,781	0,048	2,676
Dialízis után	1,436	0,463	0,03	300	0,788	10,795	0,036	2,589
Polimerizáció után	0,969	0,313	0,03	300	0,081	1,103	0,004	0,392

5. táblázat A β -D-mannozidáz enzim elnyelésének és aktivitásának változása a szintézis egyes lépései után

3.5.1.3 Méreteloszlás

Az enzim nanorészecskék méreteloszlását β -D-xilozidáz enzim esetében vizsgáltam. A natív β -D-xilozidáz enzimek átlagos mérete mintegy 8,5 nm, az enzim nanorészecskék mérete 11,0 nm körüli mérettartományban van (34. ábra).



34. ábra Természetes A) és akrilamid/biszakrilamid kopolimerrel bevont és B) β-xilozidáz enzimek méreteloszlása

3.5.2 Celluláz enzimek

A *T. reesei* organizmusból származó Cellulclast BG celluláz enzim komplex (ld. 2.5.2 alfejezet) hőstabilitását 80 °C-on rázatás nélkül vizsgáltam.



3.5.2.1 Hőstabilitás

35. ábra *Trichoderma reesei* organizmusból izolált természetes (◆) és akrilamid géllel stabilizált celluláz enzim nanorészecskék (●) stabilitásának vizsgálata 80 °C-on

A kétlépéses módszerrel előállított celluláz enzim nanorészecskék stabilitása hasonlóan jó értékeket mutat a háromlépéses módszerrel szintetizált celluláz enzim nanorészecskék stabilitásához viszonyítva. A 80 °C-on történő inkubálás (rázatás nélkül) esetében, a természetes celluláz enzim komplex aktivitása nagyon gyors ütemben csökken, már negyed óra alatt a kezdeti aktivitásának kevesebb, mint 40%-ára, egy óra inkubálást követően pedig gyakorlatilag inaktiválódik (35. ábra). Az akrilamid-biszakrilamid térhálós polimerrel két lépésben, vizes oldószerben stabilizált celluláz enzim nanorészecskék aktivitásának időfüggése (ld. 35. ábra) hasonló lefutást mutat, mint a három lépésben

stabilizált celluláz enzim nanorészecskéké (vö. 29. ábra). Egy kezdeti, viszonylag gyors aktivitás csökkenést követően az aktivitás értékek sokáig nem csökkennek, hanem egy meghatározott szinten (az eredeti aktivitás értékek mintegy 50%-án) maradnak. Még 6 óra után is több mint eredeti aktivitásának fele megmarad és 12 óra inkubálását követően is alig csökken 50% alá. Ezzel szemben a természetes celluláz enzim aktivitása már 1 óra, ugyanilyen körülmények között történő, inkubálást követően is nulla lesz.

3.5.3 Hemicelluláz enzimek

Kísérleteim egy bioetanol előállítással kapcsolatos, az "Élelmiszerbiztonság fokozása gabona alapanyagok mikotoxin szennyezettségének csökkentésével – Mikostop" elnevezésű TECH_08-A3/2-2008-0385 számú projekthez kapcsolódtak, amely esetében a feldolgozni kívánt anyag (szeszmoslék) zömében xilán hemicellulózt tartalmazott (ld. 4.4 fejezet), ezért a rázatásos kísérleteket a gyakorlati alkalmazhatóság szempontjából a xilánbontó enzimekre (β -D-xilozidáz és endoxilanáz, v. xilanáz) korlátoztam.



36. ábra Természetes (♦) és akrilamid géllel stabilizált (●) endoxilanáz enzim nanorészecskék stabilitása 50 °Con 150 rpm-es rázatással

3.5.3.1 Mechanikai stabilitás

A stabilitás vizsgálatokat 50 °C-on végeztük, 150 rpm-mel történő rázatással. A kísérletek során kétfajta enzimet vizsgáltunk, endoxilanázt (36. ábra) és β -D-xilozidázt (37. ábra). A 36. és 37. ábrákon is a relatív aktivitásokat ábrázoltuk az idő függvényében, ahol a kiindulási aktivitás értékeket 1-nek vettük és ehhez viszonyítottuk az aktivitások időbeli változását. A 36. ábrán a természetes endoxilanáz enzim és az endoxilanáz nanorészecskék aktivitás értékeit láthatjuk az idő függvényében. Az endoxilanáz esetében már 1 óra inkubálást követően a természetes endocelluláz enzim aktivitása az eredeti aktivitásának mintegy 60%-ára csökken, két óra inkubálást követően pedig 40%-ára, ezzel szemben az endoxilanáz enzim nanorészecskék egy óra inkubálást követően még megőrzik eredeti aktivitásuk mintegy 85%-át, két óra inkubálást követően pedig mintegy 2/3-át (66%-át). Az igazi különbség azonban csak ezután mutatkozik a természetes endoxilanáz enzim és az endoxilanáz enzim nanorészecskék stabilitásában. A kezdeti viszonylag gyors csökkenés ugyanis mintegy 10 óra

inkubálást követően az enzim nanorészecskék aktivitásában erőteljesen lelassul és a beburkolt endoxilanáz enzimek napokig megőrzik eredeti aktivitásuknak mintegy a felét. Ezzel szemben a természetes endoxilanáz enzimek aktivitása ezalatt az idő alatt folyamatosan csökken, végig a néhány százalékos értékeken marad, végül 72 óra inkubálást követően az aktivitás már csak kb. 3%-a a kiindulásinak.



37. ábra Természetes (*) és akrilamid géllel stabilizált (•) β-D-xilozidáz enzim nanorészecskék stabilitása 50 °C-on 150 prm-mel történő rázatást követően

Hasonló eredményeket kapunk β -D-xilozidáz enzim esetében ugyancsak 50 °C-on 150 rpm-mel történő rázatás folyamán (37. ábra). Három óra inkubálást követően a természetes β -D-xilozidáz enzim esetében erőteljes aktivitás csökkenés mutatkozik, a mért aktivitás kevesebb, mint kiindulási fele. Hat óra inkubációt követően ez az érték már csak mintegy 20%-a a kezdeti aktivitásának. Ugyanakkor a β -D-xilozidáz enzim nanorészecskék aktivitása 3 óra inkubálást követően csupán az eredeti, inkubáció előtti értékük 80%-ára csökken és 6 óra inkubálást követően sem megy 70% alá. Egy napos inkubációt követően a β -D-xilozidáz enzim nanorészecskék aktivitása 60%-a az eredeti aktivitásuknak, míg a természetes β -D-xilozidáz enzim aktivitása csupán 5%-a az eredetinek. Ezt követően a β -D-xilozidáz enzim nanorészecskék aktivitása beáll 60% körüli értékre és gyakorlatilag nem csökken 3 nap (72 óra) inkubálást után sem erről az értékről. Ezzel szemben 72 óra inkubálást követően a természetes β -D-xilozidáz enzim aktivitása gyakorlatilag elvész, alig mérhető.

3.5.3.2 Hőstabilitás

A Thermobifida fusca organizmusból izolált β -D-xilozidáz enzim aktivitását 80 °C-on és 150 rpm-mel történő rázatás mellett csak 24 óráig vizsgáltam, mert az enzim stabilitása ilyen körülmények között gyorsan lecsökkent. A 38. ábrán látható, hogy a természetes, burok nélküli β -D-xilozidáz enzim már fél óra inkubálás után gyakorlatilag elveszítette teljes aktivitását, ezzel szemben a beburkolt β -D-xilozidáz enzim még mintegy 24 óra inkubálást követően is működőképes maradt megőrizve eredeti aktivitása csaknem 20%-át.

A természetes enzim gyors aktivitáscsökkentése talán magyarázható a β -D-xilozidáz szerkezetéből adódó működési sajátságaival. A legfrissebb eredmények alapján elmondható,

hogy a *T. fusca* organizmusból izolált β -D-xilozidáz ún. multimer, négy enzim molekulából álló homotetramer negyedleges szerkezettel rendelkezik (Fekete *et al.*, 2012). Az enzimek negyedleges szerkezetét nagyon finom kölcsönhatások alakítják ki, ezért még érzékenyebbek a külső környezet változásaira (Fernandez-Lafuente, 2009). Az eredmények azt mutatják, hogy a beburkolt enzim 80 °C-on, 150 rpm-mel történő rázatás során legalább 50-szer stabilabb, mint a burok nélküli enzim.



38. ábra Természetes (*) és akrilamid géllel stabilizált (•) β-xilozidáz enzim nanorészecskék stabilitása 80 °Con 150 prm-mel történő rázatást követően

3.6 Az eredmények értékelése

3.6.1 A három és a kétlépéses módszer összehasonlítása

A β -D-mannozidáz (*Thermobifida fusca*) és a *T. reesei* organizmusból származó celluláz enzim komplexek (Celluclast BG) esetében mindkét módszerrel elvégeztem az enzim nanorészecskék előállítását, ezért lehetőség kínálkozik arra, hogy összehasonlítsuk a kétféle enzim nanorészecskeként való enzimstabilizálási módszert [a háromlépéses, Kim és Grate (2003) által kidolgozott, illetve a kétlépéses, Yan *et al.* (2006a) alapján a szerző által kidolgozott módszert] hatékonyság szempontjából. Az összehasonlításhoz ismernünk kell mindkét enzimstabilizáló módszer esetében az eredményül kapott enzim nanorészecskék abszolút aktivitási értékeit is, amely értékek alapján ugyanakkora kiindulási enzim mennyiség esetében össze lehet hasonlítani a két módszer hatékonyságát az egyes lépések közötti veszteségeket is figyelembe véve.

A 6. táblázatban látszik, hogy a Kim és Grate (2003) által kifejlesztett háromlépéses, valamint az új, kétlépéses módszer esetében hogyan változik a termék aktivitása a kiindulási anyaghoz képest. Azt tapasztaltam, hogy a háromlépéses módszernél a fázisátmenetek miatt nagy az anyagveszteség. A *Thermobifida fusca* hemicellulázok esetében a hidrofób ionpárosodást kísérő pH-változás miatt az enzimek egy része kicsapódik, ezért ott igen jelentős anyagveszteséggel számolhatunk. A β -D-mannozidáz esetében ezért csupán a kiindulási aktivitás 3%-át lehet mérni a termék esetében. A hidrofób ionpárosodás után a β -D-

mannozidáz enzimnek csupán 7%-a marad működőképes. Ennek a mennyiségnek a 70%-át sikerül átvinni a vizes oldószerből hexánba, ahol lejátszódik a polimerizáció az enzim molekulák felületéről kiindulva. Ezt követően hexánból újra vizes oldószerbe extrahálom a terméket, amely a mérések szerint mintegy 60%-os hatékonysággal történik. (Ebben benne van az n-hexánban maradt és az extrakció során irreverzibilisen kicsapódott enzimek mennyisége is.) Ezek a veszteségek összeszorzódnak és így jön ki végül a 3%-os érték, amely a kiindulási enzim mennyiségnek csak kis része. A kétlépéses, egy edényben ("one pot") lejátszódó előállítás esetében viszont ez az arány 15,4%-ra javul. Itt nincs anyagveszteség a fázisátmenetek miatt, hiszen végig vizes közegben játszódik le a reakció, illetve a hidrofób ionpárosodás sincs. A celluláz enzim komplex (Celluclast BG) esetében hasonlóan javul az arány a kétlépéses módszerrel történő előállítással (15-25%-ról 47%-ra). A Kim és Grate (2003) által használt módszer esetében a celluláz enzimeknél is van némi veszteség a hidrofób ionpárosodás következtében (60%), illetve a vízből hexánba (70%) és hexánból vízbe (60%) történő extrakció során, amelyek eredményeként az eredményül kapott celluláz enzim nanorészecskék abszolút aktivitása 15-25%-a a kiindulási enzim aktivitásának. Ugyanez az érték az általam használt módszer esetében 47% (6. táblázat).

6. táblázat Az egyes enzimek mennyiségeinek és abszolút aktivitásainak csökkenése az enzim nanorészecskék különböző módszerekkel történő előállítása során

Előállítás módszere	Kim és Grate (2003) (3 lépéses)	Új módszer (2 lépéses)
β-D-mannozidáz (Thermobifida fusca)	7%*70%*60% = 3%	15,4%
Celluláz(Celluclast BG)	60%*70%*60% = 25%	47%



39. ábra Különböző módszerekkel előállított celluláz enzim komplexek abszolút aktivitásának összehasonlítása (◆ = Celluclast BG celluláz enzim komplex burok nélkül; ▲ = Celluclast BG enzim nanorészecskék Kim és Grate. (2003) módszerével; ● = Celluclast BG enzim nanorészecskék az új, kétlépéses módszerrel, a szükségesnek megfelelő gyökös iniciátor hozzáadásával)

A 39. ábrán a különböző módszerekkel előállított celluláz enzim nanorészecskék fajlagos aktivitásai láthatók. A celluláz enzim komplexek stabilitását 80 °C-on, rázatás nélkül vizsgáltam. Egy óra inkubálást követően a természetes celluláz enzim komplex aktivitása gyakorlatilag nullára csökken, ezzel szemben mindkét fajta enzim nanorészecske mutat aktivitást. Az új, kétlépéses módszerrel előállított celluláz enzim nanorészecskék fajlagos aktivitása már az inkubálás előtt 47%-a az ugyanakkora koncentrációban jelen lévő természetes enzim fajlagos aktivitásának. Ezzel szemben a Kim és Grate (2003) módszerével, három lépésben előállított Celluclast BG enzim nanorészecskék fajlagos aktivitása csupán mintegy a tized része a természetes enzim fajlagos aktivitásának. Az inkubálás során mindkét fajta celluláz enzim nanorészecske veszít fajlagos aktivitásából. 12 óra 80 °C-on történő inkubálást követően még a kétlépéses módszerrel előállított enzim nanorészecskék fajlagos aktivitása 23,6%-a, ezzel szemben a háromlépéses módszerrel előállított enzim kiindulási fajlagos aktivitásának.

A fajlagos aktivitások ezen összehasonlítása szemléletesen bizonyítja a kétlépéses módszerrel előállított enzim nanorészecskék nagyobb hatékonyságát a háromlépéses módszerrel előállított enzim nanorészecskékhez képest.

3.6.2 Az enzim nanorészecskékként stabilizált enzimek jellemzőinek összehasonlása más stabilizálási módszerekkel

A következőkben összehasonlítjuk eredményeinket az irodalomban található hasonló módszerekkel kapott értékekkel és ez alapján értékeljük azokat. Meg kell jegyezni, hogy viszonylag kevés irodalom áll rendelkezésre akár a hasonló technikák vonatkozásában is, enzim nanorészecskékkel (single enzyme nanoparticles) pedig még kevesebb publikáció foglalkozik.

3.6.2.1 Aktivitások összehasonlítása

A hagyományos enzimstabilizáló módszerek hátránya, hogy jelentős mértékben csökken a stabilizálni kívánt enzim aktivitása. Ez a stabilizációs technikák esetében általában 50% alatti (Brena *et al.*, 2013), de található 27-szeres aktivitás csökkenés is (Schmidtke, 1996).

Enzim	Szintézis módszer	Stabilizáló réteg	Aktivitás	Irodalom
szénsav anhidráz	"grafting from" in situ gyökös polimerizáció	kitozán polimer	CO ₂ megköt és 420%	Yadav <i>et al.</i> , 2011a
	"grafting from"	poliakrilamid nanogél	78-122%	Ge et al., 2009b
Candida rugosa lipáz	"grafting from" in	poli(akrilamid/ glicidil-metakrilát)	$105 \pm 2\%$	Xu et al. (2012)
	polimerizáció	poli(akrilamid/N-izopropilakril- amid)	143%	Du et al. (2013)
<i>T. reesei</i> celluláz	"grafting from" <i>in</i> situ gyökös polimerizáció	poli(akrilamid-biszakrilamid)	47%	Hegedüs <i>et al.</i> , 2012
α-kimo- tripszin	"grafting from" in situ gyökös polimerizáció	poli(3-(trimetoxiszilil)-propil- metakrilát)	45-46%	Kim <i>et al.</i> , 2006a

7. táblázat Enzimek aktivitása enzim nanorészecskeként történő stabilizálásuk esetén

Ezzel szemben a "grafting from" módszerrel kialakított enzim nanorészecskeként

történő stabilizálás esetén az aktivitás nem csökken jelentős mértékben, sőt, találhatunk kivételes példákat aktivitásnövekedésre is (Yadav *et al.*, 2011a; Ge *et al.*, 2009b, Xu *et al.*, 2012; Du *et al.*, 2013; ld. 7. táblázat). (Az aktivitásnövekedés általában összefügghet a szubsztrátum hidrofób jellegével, hiszen zömében lipáz enzimekről van szó.) Ez a technika tehát kiválónak mutatkozik az enzimek aktivitásának megtartására is stabilizálásuk mellett. Saját eredményeinket (Hegedüs *et al.*, 2012) összehasonlítva a hasonló technikát alkalmazó szerzőkével (Kim *et al.*, 2006a) megállapítható, hogy sikerült megőrizni az enzim aktivitását az irodalomban található mértékben (7. táblázat).

Az eredmények alapján kijelenthető, hogy az enzim nanorészecskék aktivitása csökken ugyan a természetes enzimek aktivitásához képest, azonban a csökkenés mérsékelt, összevethető az irodalmi értékekkel és jóval nagyobb aktivitás értékeket mérhetünk, mint a hagyományos módon stabilizált enzimek esetében.

3.6.2.2 Stabilitások összehasonlítása

A 8. táblázatban összehasonlítottam néhány az irodalomban talált nanoméretű hordozókkal történő enzimstabilizáló módszert az általam is alkalmazott enzim nanorészecske kialakító módszerrel. A relatív aktivitások minden esetben a nanoméretű hordozóhoz rögzített enzimek aktivitásainak és az ugyanolyan mennyiségű természetes enzim aktivitásának a hányadosai. Az enzimek stabilitásainak változását a stabilizált enzim és a természetes enzim féléletidejeinek hányadosaival számszerűsítettem. Az enzim nanorészecskék esetében a féléletidőt a gyors aktivitáscsökkentést követő szakaszban a függvény logaritmusára illesztett egyenessel közelítettem (ld. 3.3.7.5 fejezet, illetve Kim *et al.*, 2006a). Az irodalomban talált egyéb módszerek esetében tapasztalt stabilitásnövekedéseket összehasonlítva az enzim nanorészecskékkel megállapítható, hogy habár a többi módszer esetében a stabilizált enzimek aktivitása a módszerek esetében kielégítő, stabilitásuk legfeljebb hússzoros féléletidő növekedéssel jellemezhető (8. táblázat).

Stabilizáló ágens	Vizsgált enzim	Relatív aktivitás, %	Stabilitás növekedés	Referencia
Mezopórusos szilika hab	Torma peroxidáz	65,3	>5	Zhang et al., 2005
Enzim-nanogél	Lipáz	>80	>17	Ge et al., 2008
Mágneses nanogél	α-kimotripszin	59,3	>7	Hong et al., 2007
Egyedi enzim nanogél	Torma-peroxidáz	>80	9	Yan et al., 2006a
Hiperelágazásos polimer nanogömbök	Lipáz	>100	3	Ge et al., 2007
Egyedi enzim nanorészecskék	α-kimotripszin	60-70	282	Kim et al., 2006
Enzim nanorészecskék	α-kimotripszin	48-73	74	Hegedüs és Nagy, 2009a

8. táblázat Különböző módszerekkel stabilizált nanoméretű enzim kompozitok aktivitás és stabilitás változása

Ezzel szemben az egyedi enzim nanorészecskék stabilitása csaknem háromszázszorosa a természetes enzimekének (8. táblázat, Kim *et al.*, 2006a) az irodalmi adatok szerint. Saját eredményeim alapján is mintegy 75-szörös stabilitásnövekedésről tudok beszámolni (8. táblázat, Hegedüs és Nagy, 2009a). Hozzá kell tenni, hogy a 8. táblázatban a relatív aktivitásokkal számoltam, vagyis az aktivitás értékek nem a szintézis kiindulási enzimmennyiségére vonatkoznak, hanem az eredményül kapott enzimmennyiségekre, amelyek jelentősen kisebbek lehetnek a kiindulásiaknál.

A 9. táblázatban összehasonlítottam az irodalomban talált különböző módon vizsgált stabilitásokat is saját eredményeimmel. A táblázat alapján leszűrhető, hogy mind az általam előállított enzim nanorészecskék tárolási stabilitása, valamint hőmérsékleti optimumon

mérhető aktivitásuk jó (20 – 80-szoros féléletidő növekedéssel jellemezhető), szemben a más módszerekkel stabilizált enzimek stabilitás növekedésével (pl. háromszoros stabilitásnövekedés Ge *et al.*, 2007).

Stabilitás tipusa	Enzim	Stabilizáló réteg	Stabilitás növekedés	Irodalom
Tárolási	α-kimotrip- szin, (20 °C)	Poli(3- (trimetoxiszilil)- propil-metakrilát)	282	Kim és Grate, 2003 Kim <i>et al.</i> , 2006a, Kim <i>et al.</i> , 2006b
stabilitás	celluláz, (4 °C)	Poli(3- (trimetoxiszilil)- propil-metakrilát)	kb. 25	Hegedüs és Nagy, 2009a
	lipáz	hiperelágazásos polimer (aromás poliamid)	3	Ge et al., 2007
	a himotria Doli(2	D_{a} 1:/2	710	Kim <i>et al.</i> , 2006a
Hőmérsékleti optimum	a-kimotrip- szin, (37 °C)	(trimetoxiszilil)- propil-metakrilát)	kb. 80	Hegedüs és Nagy, 2009a
	celluláz, (50 °C)	Poli(3-(trimetoxi- szilil)-propil- metakrilát)	kb. 20	Hegedüs és Nagy, 2012
	lipáz (80 °C)	hiperelágazásos polimer (aromas poliamid)	3	Ge et al., 2007
Hőstabilitás	Cellulase (80 °C)	Poli(3- (trimetoxiszilil)- propil-metakrilát)	kb. 20	Hegedüs és Nagy, 2012
	β-D-xilozidáz (80 °C)	Poli(akrilamid- biszakrilamid)	kb. 280	Hegedüs és Nagy, 2015

9. táblázat Enzimek stabilitásainak összehasonlítása enzim nanorészecskeként történő stabilizálásuk esetén

Az egyedi enzim nanorészecskékként történő stabilizálás ennél jóval nagyobb, akár százszoros stabilitásnövekedést okozhat (Kim és Grate, 2003; Kim *et al.*, 2006a; 2006b). A hőstabilitás tekintetében is jelentősen jobb eredményeket értem el az irodalomban leírt értékeknél (3-szoros stabilitásnövekedés, Ge *et al.*, 2007). 80 °C-on celluláz enzim komplex esetében mintegy hússzoros, β -D-xilozidáz enzim esetében pedig 280-szoros féléletidő növekedést mértem.

A 8. és 9. táblázat alapján tehát kijelenthetjük, hogy nagyon jó stabilitás értékek kaphatók enzim nanorészecskék esetében, amely jóval meghaladja az irodalomban talált nanoméretű hordozóhoz történő rögzítéssel stabilizált enzimek stabilitás értékeit.

4 Összefoglalás

Enzim nanorészecskéket állítottam elő kimotripszin, celluláz és hemicelluláz enzimekből stabilitásuk növelése céljából. Az enzim nanorészecskék különálló, néhány nanométeres, az enzim méretével összemérhető vastagságú burokban tartalmazzák az enzim molekulá(ka)t, amelyek a burok védőhatása miatt stabilabbak (Kim és Grate, 2003; Kim *et al.*, 2006a; Kim *et al.*, 2006b; Hegedüs és Nagy, 2009a).

Az enzimek ipari hasznosításának egyik nagy korlátja a rövid életidejük. Az enzimek működési idejének meghosszabbítása, azaz az enzim aktivitásának hosszabb ideig fenntartása alapvetően fontos a gazdaságosabb ipari alkalmazásokhoz. A hagyományos, immobilizálással végrehajtott enzim stabilizálási technikák nagy hátránya hogy a hordozók mérete diffúziós gátlást okozhat, amely csökkenti a folyamat hatékonyságát. A hordozó méretének csökkentése nanotechnológia alkalmazásával ezért igen nagy jelentőségű.

Az 50 nm-nél kisebb enzim nanobiokonjugátumok előállítása módjának három fő iránya van. Az egyik, az ún. "grafting onto" módszerek esetében a hordozó anyagát külön lépésben először szintézissel előállítjuk, majd ehhez kötjük az enzimet egy következő lépésben. A másik, un. "grafting from" eljárás során enzim molekulák felületéről növesztenek polimer réteget, ezt térhálósítják és az enzimek stabilizálása úgy valósul meg, hogy az enzim molekulák szabad mozgása az oldatban gyakorlatilag nem korlátozódik. Ez utóbbi módszert használtam a doktori munkám során az enzim stabilizálásának lényeges javítása céljából.

Az enzim nanorészecskék "grafting from" módszerrel kialakított nanobiokompozitok, ahol minden egyes enzim molekula elkülönítetten beburkolásra kerül egy néhány nanométer, mintegy 3-5 nm vastag térhálós polimer réteggel.

Kutatásom célja az volt, hogy megvizsgáljam, hogy lehetséges-e a fent említett módszerekkel stabilizálni iparilag jelentős enzimeket, pl. celluláz enzim komplexeket, hemicellulázokat, amelyeket nagy mennyiségben alkalmaznak bioüzemanyagok előállításához.

Az enzim nanorészecskék előállításához kétféle módszert alkalmaztam. Az egyik módszer szerint az előállítás három lépésben történik (Kim és Grate, 2003). Először az enzim felületét módosítottam, a primer amin csoportokat akril csoportokká alakítottam. Ezt követően az enzim molekulákat egy speciális módszer, ún. hidrofób ionpárosodás segítségével úgy juttattam szerves oldószerbe (*n*-hexánba), hogy abban molekulárisan oldódnak, a felületük közvetlenül érintkezik az oldószer felületével, ugyanakkor az enzimek mégsem denaturálódnak. Az *n*-hexánban, második lépésként, *in situ* polimerizációt hajtunk végre, közvetlenül az enzim molekulák felületéről, a korábban módosított helyekről kiindulva. A polimerizációhoz egy trimetoxiszilil csoportokat tartalmazó szerves/szervetlen hibrid polimert használtam ([3-(metakriloxi)propil]-trimetoxiszilán monomerekből). Végül a kialakított rövid láncokat, amelyek teljesen körbeveszik az enzim molekulák felületét, egy harmadik lépésben keresztkötések kialakításával térhálósítottam.

Érzékenyebb enzimek nehezen, vagy egyáltalán nem voltak oldhatók hexánban, mert az oldási lépések során denaturálódtak. Ezért egy olyan módszert szükséges alkalmazni, amely nem igényel fázisváltoztatást. Yan *et al.* (2006a) által publikált módszerből kiindulva egy eljárást dolgoztam ki, amellyel az enzimek polimer réteggel történő beburkolása vizes oldószerben két lépésben lejátszódik. Az első lépés az enzim molekulák felületének módosítása a primer amin csoportok akril csoporttá alakításával, könnyen bomló akrilsavklorid reagens segítségével. Ezt követi az akrilamid-biszakrilamid kopolimer kialakítása vizes oldószerben. A biszakrilamid komponensek keresztkötő ágensekként is funkcionálnak, ezért a láncnövekedés és a térhálósítás egy lépésben történik. Ezzel a módszerrel sikeresen burkoltam be olyan enzimeket, amelyeket a szerves oldószert igénylő módszerrel, azaz a fenti háromlépéses módszerrel, nem lehetett.

Az irodalomban alkalmazott, fent említett (Kim és Grate, 2003) eljárással kimotripszin enzim nanorészecskéket állítottam elő háromlépéses módszerrel, hexánban történő molekuláris oldás és az enzim molekulák felületéről kiinduló *in situ* polimerizáció segítségével. Transzmissziós elektronmikroszkópos, valamint méreteloszlás méréssel igazoltam, hogy az előállított enzim nanorészecskék tíz nanométer körüli mérettartományban vannak és polimer nano-réteg körülveszi az egyes enzim molekulákat. Az így előállított kimotripszin enzim nanorészecskék aktivitása az eredeti természetes enzim aktivitásának mintegy 70%-a volt. Az kimotripszin enzim nanorészecskék stabilitása mintegy 40-80-szor nagyobb volt a körülményektől függően. Például 37 °C-on 250 rpm-mel történő rázatás mellett a kimotripszin enzim nanorészecskék még 90 óra inkubálást követően is mutattak aktivitást, míg a természetes kimotripszin enzimek már két óra inkubálást követően elveszítették aktivitásukat. Savas és lúgos pH-n (pH = 1,5 és pH = 9,0) is megőrizték eredeti aktivitásuk mintegy felét, míg a természetes enzimek ezeken a pH értékeken már teljesen inaktívnak bizonyultak.

Az enzim nanorészecskéket előállító technikát sikeresen alkalmaztam cellulózbontó multifunkcionális enzim komplexre (Celluláz enzim komplex) is. A termék nanoméretű méreteloszlását itt is igazoltuk transzmissziós elektronmikroszkópos felvételekkel, valamint Zeta sizer műszerrel. Igazolást nyert, hogy óriásmolekula szubsztrátumot, cellulóz rostokat is képesek elbontani az előkezelt, azaz az enzim nanorészecskék. A celluláz enzim nanorészecskék stabilitása hasonlóan jónak bizonyult, sőt, magas hőmérsékleten, 80 °C-on is megőrizték aktivitásukat. Például 80 °C-on történő kezelés során (rázatás nélkül) a természetes, kezelés nélküli celluláz enzim komplexek aktivitása már 2 óra inkubálást követően is 10% alá csökkent, 5 óra elteltével pedig eltűnt, addig a celluláz enzim nanorészecskék még 12 óra elteltével is megőrizték eredeti aktivitásuk több, mint 40%-át. Erősen savas és lúgos körülmények között (pH = 1,5 és pH = 12,0) a celluláz enzim nanorészecskék változatlanul megőrizték aktivitásukat, míg a természetes celluláz enzim kativitása csupán 10 – 30%-a volt az optimális (pH = 5,5) pH értéken mért aktivitásuknak.

Érzékenyebb hemicelluláz enzimeket nem, vagy csak kis hatékonysággal sikerült bevonni ezzel a háromlépéses technikával. A hidrofób ionpárosodás lépés során ezek az enzimek kicsapódtak. Ezekhez az enzimekhez egy új, kétlépéses stabilizáló módszert alkalmaztam, amely eljárás során nem kell szerves oldószerben oldani az enzim molekulákat, végig vizes oldószerben, két lépésben lehet kialakítani a nano-réteget az enzim molekulák felületén. Ezzel a módszerrel is hatékonyan tudtam a celluláz enzimeket stabilizálni, mind a pH-stabilitásuk, mind a hőstabilitásuk jelentős volt, ezen kívül jobb hatásfokkal sikerült kialakítani az enzim nanorészecskéket, mert nem kellett számolni a szerves oldószerbe történő fázisátmenetnél tapasztalható veszteséggel. 80 °C-on 150 rpm-mel történő rázatás során a természetes celluláz enzimek aktivitása már 1 óra inkubálást követően eltűnt, addig az akrilamid-biszakrilamid réteggel stabilizált celluláz enzim nanorészecskék stabilitása még 12 óra inkubálást követően is mintegy 50%-a volt a kiindulási aktivitás értékeknek.

A korábban részletezett kétlépéses módszert sikeresen alkalmaztuk speciális celluláz és hemicelluláz enzimekre is (endocelluláz, endoxilanáz, β -D-xilozidáz, β -D-mannozidáz), amelyeket a hő tűrő *Thermobifida fusca* gombákból izoláltak. Az endoxilanáz, a β -Dmannozidáz és az endocelluláz enzimek stabilitása enzim nanorészecskeként akrilamidbiszakrilamid réteggel 50 °C-on 150 rpm-mel történő rázatás során 72 óra inkubálást követően sem csökkent 50% alá 50 °C-on, míg a natív enzimek rendre elveszítették aktivitásukat. 80 °C-on történő inkubálást során és 150 rpm-mel történő rázatás során β -Dxilozidáz enzim nanorészecskék 24 óra inkubálást követően is megőrizték aktivitásuk 20%-át, miközben a natív enzimek már fél óra inkubálást követően sem rendelkeztek aktivitással.

Az enzim nanorészecskék létrehozásával jelentős mértékben meg tudtam növelni ipari

eljárásokhoz elterjedten használt enzimek, mint cellulázok, hemicellulázok (β -D-xilozidáz, β -D-mannozidáz, endoxilanáz) működési idejét, csökkentve ezzel az enzimek alkalmazásának költséghányadát.

A szövegben előforduló rövidítések jegyzéke

η	kitermelés (a termék anyagmennyisége/várható ideális anyagmennyiség)
AOT	nátrium-bisz(2etilhexil)szulfoszukcinát vagy aerosol OT
Celluclast BG	T. reesei-ből izolált ipari celluláz enzim komplex márkaneve
СК	Celluclast BG celluláz enzim komplex
СТ	α -kimotripszin enzim
DNS	dinitro-szalicilsav
EM	endomannanáz enzim
MAPS	[3-(metakriloxi)propil]-trimetoxiszilán
MM	mutáns β -D-mannozidáz enzim
MN	β -D-mannozidáz enzim
NCK	Kim és Grate (2003) módszerével előállított celluláz enzim nanorészecskék
NCK _A	az új módszerrel előállított celluláz enzim nanorészecskék
PAMAM	poliamidoamin dendrimer
pNP-β-D-man	<i>para</i> -nitrofenil-β-D-mannopiranozid
<i>p</i> NP-xyl	<i>para</i> -nitrofenil-β-D-xilopiranozid
RAFT polimerizáció	" <u>R</u> eversible <u>A</u> ddition <u>F</u> ragmentation chain <u>T</u> ransfer" polimerizáció
SEN	"single enzyme nanoparticles", (egyedi) enzim nanorészecskék,
TEMED	tetrametil-etiléndiamin
TEM	transzmissziós elektronmikroszkóp
UV fény	ultraibolya fény
XI	β -D-xilozidáz enzim

Irodalomjegyzék

- Abe K., Goto M., Nakashio F. Surfactant-chymotrypsin complex as a novel biocatalyst in organic media. *Journal of Fermentation and Bioengineering*, **1997**, *83* (6), 555-560.
- Abuchowski A., McCoy J.R., Palczuk N.C., van Es T., Davis F.F. Effect of covalent attachment of polyethylene glycol on immunogenicity and circulating life of bovine liver catalase. *Journal of Biological Chemistry*, 1977, 252, 3582-3586.
- Appel W. Chymotrypsin: Molecular and Catalytic Properties. Clinical Biochemistry, 1986, 19, 317-322.
- Ariga K., Ji Q., Mori T., Naito M., Yamauchi Y., Abe H., Hill J.P. Enzyme nanoarchitectonics: organization and device application. *Chemical Society Reviews*, 2013, 42, 6322-6345.
- Ariga K., Yamauchi Y., Rydzek G., Ji Q., Yonamine Y., Wu K.C.-W., Hill J.P. Layer-by-layer Nanoarchitectonics: Invention, Innovation, and Evolution. *Chemistry Letters*, 2014, 43, 36-68.
- Arnfast L., Madsen C.G., Jorgensen L., Baldursdottir S. Design and processing of nanogels as delivery systems for peptides and proteins. *Therapeutic Delivery*, 2014, 5, 691-708.
- Arnold, F.H., Wintrode, P.L., Miyazaki, K. and Gershenson, A. How enzymes adapt: lessons from directed evolution. *Trends in Biochemical Sciences*, **2001**, *26*, 100-106.
- Asuri P., Karajanagi S.S., Dordick J.S., Kane R.S. Directed assembly of carbon nanotubes at liquid-liquid interfaces: Nanoscale conveyors for interfacial biocatalysis. *Journal of American Chemical Society*, **2006**, *128*, 1046-1047.
- Baeza A., Guisasola E., Torres-Pardo A., Gonzalez-Calbet J.M., Melen G.J., Ramirez M., Vallet-Regi M. Hybrid enzyme-polymeric capsules/mesoporous silica nanodevice for *in situ* cytotoxic agent generation. *Advanced Functional Materials*, 2014, 24, 4625-4633.
- Baici, A. Kinetics of Enzyme-Modifier Interactions. Springer-Werlag, Wien, 2015.
- Ballauff M, Lu Y. "Smart" nanoparticles: Preparation, characterization and applications. *Polymer*, **2007**, 48 (7), 1815-1823.
- BBC Research (2017) in report BIO030J Global Markets for Enzymes in Industrial Applications.
- Beloqui A., Baur S., Trouillet V., Welle A., Madsen J., Bastmeyer M., Delaittre G. Single-Molecule Encapsulation: A Straightforward Route to Highly Stable and Printable Enzymes. *Small*, **2016**, *12*, 1716-1722.
- Binod P., Sindhu R., Singhania R.R., Vikram S., Devi L., Nagalakshmi S., Kurien N., Sukumaran R.K., Pandey A. Bioethanol production from rice straw: An overview. *Bioresource Technology*, **2010**, *101*, 4767-4774.
- Boerakker M.J., Hannink J.M., Bomans P.H.H., Frederik P.M., Nolte R.J.M., Meijer E.M., Sommerdijk N.A.J.M. Giant amphiphiles by cofactor reconstitution. *Angewandte Chemie, International Edition*, **2002**, *41*, 4239-4241.
- Boisseau P., Houdy P., Lahman M. Nanoscience: Nanobiotechnology and Nanobiology. Springer, Heidelberg, Dordrecht, New York, 2007.
- Bouquelet S., Spik G., Montreuil J. Properties of a β -D-mannosidase from Aspergillus niger. Biochimica et Biophysica Acta, **1978**, 522, 521-530.
- Boyer C., Bulmus V., Liu J.Q., Davis T.P., Stenzel M.H., Barner-Kowollik C. Well-defined protein-polymer conjugates via in situ RAFT polymerization. Journal of American Chemical Society, 2007, 129, 7145-7154.
- Brannigan, J.A., Wilkinson, A.J. Protein engineering 20 years on. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, **2002**, *3*, 964-970.
- Brena B., González-Pombo P., Batista-Viera F. Immobilization of Enzymes: A Literature Survey. *in*: Guisan J.M. (*Ed.*) Immobilization of Enzymes and Cells. Humana Press, Madrid, **2013**, 15-32.
- Brennan J.L., Hatzakis N.S., Tshikhudo T.R., Dirvianskyte N., Razumas V., Patkar S., Vind J., Svendsen A., Nolte R.J.M., Rowan A.E., Brust M. Bionanoconjugation via click chemistry: The creation of functional hybrids of lipases and gold nanoparticles. *Bioconjugate Chemistry*, 2006, 17, 1373-1375.
- Broz P., Driamov S., Ziegler J., Ben-Haim N., Marsch S., Meier W., Hunziker P. Toward intelligent nanosize bioreactors: A pH-switchable, channel-equipped, functional polymer nanocontainer. *Nano Letters*, 2006, 6, 2349-2353.
- Bruns N., Lörcher S., Makyła K., Pollarda J., Renggli K., Spulber M. Combining polymers with the functionality of proteins: new concepts for atom transfer radical polymerization, nanoreactors and damage self-reporting materials. *Chimia (Aarau)*, **2013**, *67*, 777-781.
- Cai W., Xu Q., Zhao X., Zhu J., Chen H. Porous gold-nanoparticle-CaCO₃ hybrid material: Preparation, characterization, and application for horseradish peroxidase assembly and direct electrochemistry. *Chemistry* of Materials, 2006, 18, 279-284.
- Caminade A.-M., Yan D., Smith D.K., Dendrimers and hyperbranched polymers. *Chemical Society Reviews*, 2015, 44, 3870-3873.

- Cantwell W.J., Morton J. The impact resistance of composite materials a review. *Composites*, **1991**, 22 (5), 347-362.
- Chan C., Sepunaru L., Sokolov S.V., Katelhon E., Young N.P., Compton R.G. Catalytic activity of catalasesilica nanoparticle hybrids: from ensemble to individual entity activity. *Chemical Science*, **2017**, *8*, 2303-2308.
- Claridge S.A., Mastroianni A.J., Au Y.B., Liang H.W., Micheel C.M., Fréchet J.M.J., Alivisatos A.P. Enzymatic ligation creates discrete multinanoparticle building blocks for self-assembly. *Journal of American Chemical Society*, 2008, 130, 9598-9605.
- Cosulich M. E., Russo S., Pasquale S., Mariani A. Performance evaluation of hyperbranched aramids as potential supports for protein immobilization. *Polymer*, **2000**, *41*, 4951-4956.
- Cui J.D., Jia S.R. Optimization protocols and improved strategies of cross-linked enzyme aggregates technology: current development and future challenges. Critical Reviews in Biotechnology, **2015**, *35* (1), 15-28.
- Cummings C., Murata H., Koepsel R., Russell A.J. Tailoring enzyme activity and stability using polymer-based protein engineering. *Biomaterials*, **2013**, *34*, 7437-7443.
- Cummings C., Murata H., Koepsel R. Russell A.J. Dramatically increased pH and temperature stability of chymotrypsin using dual block polymer-based protein engineering. *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 763-771.
- da Costa Sousa L., Chundawat S.P.S., Balan V., Dale B.E. "Cradle-to-grave" assessment of existing lignocellulose pretreatment technologies. *Current Opinion in Biotechnology*, **2009**, *20*, 339-347.
- Datta S., Christena L.R., Rajaram Y.R.S. Enzyme immobilization: an overview on techniques and support materials. *3 Biotech*, **2013**, *3*, 1-9.
- Daubresse C., Grandfils C., Jerome R., Teyssie P. Enzyme immobilization in nanoparticles produced by inverse microemulsion polymerization. *Journal of Colloid and Interface Science*, **1994**, *168*, 222-229.
- De P., Li M., Gondi S.R., Sumerlin B.S. Temperature-regulated activity of responsive polymer-protein conjugates prepared by grafting-from via RAFT polymerization. Journal of American Chemical Society, 2008, 130, 11288-11289.
- Demirjian D., Moris-Varas F., Gololobov M., Calugaru S. Biocatalysis in chemical processing. *Chemical Process*, 1999, 62, 57-58.
- Desantis G., Jones, J.B. Chemical modification of enzymes for enhanced functionality. *Current Opinion in Biotechnology*, **1999**, *10*, 324-330.
- Dhiman S.S., Sharma J., Battana B. Industrial applications and future prospects of microbial xylanases: a review. *BioResources*, **2008**, *3* (4), 1377-1402.
- Du J., Jin1 J., Yan M., Lu Y. Synthetic Nanocarriers for Intracellular Protein Delivery. Current Drug Metabolism, 2012, 13, 82-92.
- Du M., Lu D., Liu Z. Design and synthesis of lipase nanogel with interpenetrating polymer networks for enhanced catalysis: Molecular simulation and experimental validation. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2013**, 88, 60-68.
- Du J., Jin J., Liu Y., Li J., Tokatlian T., Lu Z., Segura T., Yuan X.B., Yang X., Lu Y. Gold-nanocrystalenhanced bioluminescent nanocapsules. *ACS Nano* **2014**, *8*, 9964-9969.
- Dyal A., Loos K., Noto M., Chang S. W., Spagnoli C., Shafi K., Ulman A., Cowman M., Gross R. A. Activity of *Candida rugosa* lipase immobilized on γ-Fe₂O₃ magnetic nanoparticles. *Journal of American Chemical Society*, 2003, 125, 1684-1685.
- Ebadi S.V., Fakhrali A., Ranaei-Siadat S.O., Gharehaghaji A.A., Mazinani S., Dinari M., Harati J. Immobilization of acetylcholinesterase on electrospun poly(acrylic acid)/multi-walled carbon nanotube nanofibrous membranes. *RSC Advances*, **2015**, *5*, 42572-42579.
- Elaissari A. (*Ed.*), Colloidal Nanoparticles In Biotechnology. John Wiley & Sons, Inc., Hoboken, New Jersey, **2008**.
- Fan Z., Wagschal K., Chen W., Montross, M.D., Lee, C.C., Yuan L. Multimeric Hemicellulases Facilitate Biomass Conversion. *Applied Environmental Microbiology*, 2009, 75 (6), 1754-1757.
- Fekete Cs., A., Kiss L. Purification and Characterization of a Recombinant β-D-xylosidase from *Thermobifida fusca* TM51. *Protein Journal*, **2012**, *31* (8), 641-650.
- Fernandez-Lafuente R. Stabilization of multimeric enzymes: Strategies to prevent subunit dissociation. *Enzyme* and Microbial Technology, **2009**, 45, 405-418.
- Fowler P.A., Hughes J.M., Elias R.M. Biocomposites: technology, environmental credentials and market forces. *Journal of the Science of Food and Agriculture*, **2006**, *86*, 1781-1789.
- Fréchet J.M.J., Tomalia D.A. Dendrimers and other dendritic polymers. West Sussex: Wiley, 2001.
- Gao C., Yan D. Hyperbranched polymers: from synthesis to applications. *Progress in Polymer Science*, **2004**, 29, 183-275.
- Gao F., Ma G. Effects of Microenvironment on Supported Enzymes. Topics in Catalysis, 2012, 55, 1114-1123.
- Garrel J., Cuchillo C.M. Different kinetic patterns in the alpha-chymotrypsin-catalysed hydrolysis of synthetic ester substrates. *FEBS Letters*, **1985**, *190* (2), 329-332.

- Gazit E. Plenty of room for biology at the bottom: An introduction to bionanotechnology. Imperial College Press, **2007**.
- Ge J., Yan M., Lu D., Zhang M., Liu Z. Hyperbranched polymer conjugated lipase with enhanced activity and stability. *Biochemical Engineering Journal*, **2007**, *36*, 93-99.
- Ge J., Lu D., Wang J., Yan M., Lu Y., Liu Z. Molecular fundamentals of enzyme nanogels. *Journal of Physical Chemistry B*, **2008**, *112*, 14319-14324.
- Ge J., Lu D., Liu Z., Liu Z. Recent advances in nanostructured biocatalysts. *Biochemical Engineering Journal*, **2009a**, 44 (1), 53-59.
- Ge J., Lu D., Wang J., Liu Z. Lipase nanogel catalyzed transesterification in anhydrous dimethyl sulfoxide. *Biomacromolecules* **2009b**, *10*, 1612-1618.
- Ge J., Yan M., Lu D. N., Liu X. Z., Liu Z. Preparation and Characterization of Single-Enzyme Nanogels, In: Nanoscale Biocatalysis: methods and protocols (*Ed.*:) Wang P. *Methods in Molecular Biology*, **2011**, *743*, 119-130.
- Ghose T.K., Measurement of cellulase activities. Pure and Applied Chemistry, 1987, 59 (2), 257-268.
- Gill I., Ballesteros A. Bioencapsulation within synthetic polymers (Part 1): sol-gel encapsulated biologicals. *Tibtech*, **2000**, *18*, 282-296.
- Gole A., Dash C., Soman C., Sainkar S. R., Rao M., Sastry M. On the preparation, characterization, and enzymatic activity of fungal protease-gold colloid bioconjugates. *Bioconjugate Chemistry*, 2001, 12, 684-690.
- Govardhan, C. P. Crosslinking of enzymes for improved stability and performance. Current Opinion in Biotechnology, 1999, 10, 331-335.
- Gregory A., Stenzel M. H. Complex polymer architectures via RAFT polymerization: From fundamental process to extending the scope using click chemistry and nature's building blocks. *Progress in Polymer Science*, 2012, 37, 38-105.
- Gu Z., Yan M., Hu B., Joo K.L., Biswas A., Huang Y., Lu Y., Wang P., Tang Y. Protein nanocapsule weaved with enzymatically degradable polymerie network. *Nano Letters*, **2009**, *9*, 4533-4538.
- Haki G.D., Rakshit S.K. Developments in industrially important thermostable enzymes: a review. *Bioresource Technology*, **2003**, *89* (1), 17-34.
- Hegedüs I., Nagy E. Improvement of enzyme stability as single enzyme nanoparticles. *Chemical Engineering Science*, **2009a**, *64*, 1053-1060.
- Hegedüs I., Nagy E. Comparision of the structure and the stability of single enzyme nanoparticles. *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, **2009b**, *37* (2), 123-130.
- Hegedüs I., Nagy E. A dendrimerek eliállítása és felhasználásuk. Magyar Kémiai Folyóirat, 2009c, 115, 25-33.
- Hegedüs I., Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs.A. Stabilization of hemicellulase enzymes with nano-layer. *Studia Universitatis Babes-Bolyai series Chemia*, **2010**, *54*, 53-62.
- Hegedüs I., Faragó E., Kálmán M., Nagy E. Egyedi fehérje nanorészecskék orvosi alkalmazása: hatóanyag átjuttatás a vér-agy gáton. *Műszaki Szemle*, **2011**, *56*, 10-20.
- Hegedüs I., Hancsók J., Nagy E. Stabilization of the cellulase enzyme complex as enzyme nanoparticle. Applied Biochemistry and Biotechnology, 2012, 168, 1372-1383.
- Hegedüs I., Kiss-Tóth Dojcsak É., Juhászné Szalai A., Lovrity Z., Emmer J., Koska P., Fodor B., Nagy E. Single Hemoglobin Nanocapsules as Test Materials for Artificial Blood. *Periodica Politechnica Chemical Engineering*, 2014, 58 (Sup), 11-16.
- Hegedüs I., Nagy E., Chapter 14. Stabilization Techniques of Single Enzymes as Nanoparticles or Enzyme-Nano Bioconjugates *in*: Biotechnology Vol. 10: Nanobiotechnology, *ed.*: J. N. Govil, (In 12 Vols), Studium Press LLC, USA, **2014**, 323-361.
- Hegedüs I., Nagy E. Stabilization of activity of cellulase and hemicellulase enzymes by covering with polyacrylamide layer. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, **2015**, *95*, 143-150.
- Herdt A.R., Kim B., Taton T.A. Encapsulated magnetic nanoparticles as supports for proteins and recyclable biocatalysts. *Bioconjugate Chemistry*, **2007**, *18*, 183-189.
- Heredia K.L., Bontempo D., Ly T., Byers J.T., Halstenberg S., Maynard H.D. In situ preparation of protein -"Smart" polymer conjugates with retention of bioactivity. Journal of American Chemical Society, 2005, 127, 16955-16960.
- Hermanson G.T. Bioconjugate techniques. Academic Press, Elsevire, 2008.
- Hetényi K., Németh Á., Sevella B. Fehér biotechnológiai kutatások. Magyar Kémiai Folyóirat, 2008, 114 (3), 102-106.
- Hong J., Xu D., Gong P., Ma H., Dong L., Yao S. Conjugation of enzyme on superparamagnetic nanogels covered with carboxil groups. *Journal of Chromatography B*, **2007**, *850* (1-2), 499-506.
- Hong S.-G., Kim B. C., Na H.B., Lee J., Youn J., Chung S.-W., Lee C.-W., Lee B., Kim H. S., Hsiao E., Kim S.H., Kim B.-G., Park H.G., Chang H.N., Hyeon T., Dordick J.S., Grate J.W., Kim J. Single enzyme nanoparticles armored by a thin silicate network: Single enzyme caged nanoparticles. *Chemical Engineering*

Journal, 2017, 322, 510–515.

- Hu G-H, Hoppe S, Feng L-F, Fonteix Ch. Nano-scale phenomena and applications in polymer processing. *Chemical Engineering Science*, **2007**, *62* (13), 3528-3537.
- Iha R.K., Wooley K.L., Nyström A.M., Burke D.J., Kade M.J., Hawker C.J. Applications of Orthogonal, "Click" Chemistries in the Synthesis of Functional Soft Materials. *Chemical Reviews*, 2009, 109 (11), 5620-5686.
- Iyer P.V., Ananthanarayan L. Enzyme stability and stabilization—Aqueous and non-aqueous environment. *Process Biochemistry*, **2008**, *43* (10), 1019-1032.
- Ji X., Liu J., Liu L. Zhao H. Enzyme-polymer hybrid nanogels fabricated by thiol-disulfide exchange reaction. *Colloids and Surfaces B: Biointerfaces*, **2016**, *148*, 41-48.
- Jia H.F., Zhu G.Y. Vugrinovich B., Kataphinan W., Reneker D.H., Wang P., Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnology Progress*, **2002**, *18*, 1027-1032.
- Jia H., Zhu G., Wang P. Catalytic behaviors of enzymes attached to nanoparticles: the effect of particle mobility. *Biotechnology & Bioengineering*, **2003**, *84*, 406-414.
- Jia H., Zhong C., Huang F., Wang C., Jia L., Zhou H., Wei P. The preparation and characterization of a laccase nanogel and its application in naphthoquinone synthesis. *ChemPlusChem*, **2013**, 78, 451-458.
- Jia H., Gao Z., Ma Y., Zhong C., Wang C. Zhou H., Wei P. Preparation and characterization of a highly stable phenoxazinone synthase nanogel. *Chemistry Central Journal*, 2016, 10, 34.
- Jordan R., Advincula R., Buchmeiser M.R., Dyer D.J., Fukuda T., Goto A., Matsuda T., Ohno K., Tsujii Y., Yamamoto S. (*Ed.*) Surface-Initiated Polymerization I. (*Advances in Polymer Science 197*), Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, **2006a**.
- Jordan R., Akgun B., Baum M., Bergbreiter D.E., Bhat R.R., Blickle C., Boyes S.G., Brittain W. J., Foster M.D., Genzer J., Granville A.M., Kippenberger A.M., Mirous B.K., Naji A., Netz R.R., Seidel C., Tomlinson M.R., Wu T., Zhao B. (*Ed.*) Surface-Initiated Polymerization II. (*Advances in Polymer Science 198*), Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, 2006b.
- Jouzani, G.S., Taherzadeh, M.J. Advances in consolidated bioprocessing systems for bioethanol and butanol production from biomass: a comprehensive review. *Biofuel Research Journal*, **2015**, *5*, 152–195.
- Khosravi A., Vossoughi M., Shahrokhian S., Alemzadeh I. Nano reengineering of horseradish peroxidase with dendritic macromolecules for stability enhancement. *Enzyme and Microbial Technology*, **2012**, *50* (1), 10-16.
- Kickelbick G. (Ed.), Hybrid Materials: Synthesis, Characterization, and Applications. Wiley, 2007.
- Kim J., Grate J.W. Single-enzyme nanoparticles armored by a nanometer-scale organic/inorganic network. *Nano Letters*, **2003**, *3*, 1219-1222.
- Kim B.C., Nair S., Kim J., Kwak J.H., Grate J.W., Kim S.H., Gu M.B. Preparation of biocatalytic nanofibres with high activity and stability via enzyme aggregate coating on polymer nanofibers. *Nanotechnology*, 2005, 16, S382-S388.
- Kim J., Grate J.W., Wang P. Nanostructures for enzyme stabilization. *Chemical Engineering Science*, **2006a**, *61* (3), 1017-1026.
- Kim J., Jia H., Lee C. won, Chung S. wook, Kwak J.H., Shin Y., Dohnalkova A., Kim B.G., Wang P., Grate J.W. Single enzyme nanoparticles in nanoporous silica: A hierarchical approach to enzyme stabilization and immobilization. *Enzyme and Microbial Technology*, 2006b, 39, 474-480.
- Kim J., Jia H., Wang P. Challenges in biocatalysis for enzyme-based biofuel cells. *Biotechnology Advances*, **2006c**, *24*, 296-308.
- Klibanov A.M. Improving enzymes by using them in organic solvents. Nature, 2001, 409, 241-246.
- Kowalczuk A., Trzcinska R., Trzebicka B., Müller A.H.E., Dworak A., Tsvetanov C.B. Loading of polymer nanocarriers: Factors, mechanisms and applications Dedicated to Prof. Stanislaw Penczek on the occasion of his 80th birthday. *Progress in Polymer Science*, 2014, 39, 43-86.
- Kukolya J., Nagy I., Láday M., Oravecz O., Máraligeti K., Hornok L. Thermobifida cellulolytica sp. nov., a novel lignocellulose-decomposing actinomycete. International Journal of Systematic and Evolutionary Microbiology, 2002, 52, 1193-1199.
- Kumar R., Maitra A.N., Patanjali P.K., Sharma P. Hollow gold nanoparticles encapsulating horseradish peroxidase. *Biomaterials*, 2005, 26, 6743-6753.
- Kumar, C. (Ed.) Nanocomposites. 2010, Wiley-VCH Werlag GMBH, Weinheim
- Lee M.Y., Dordick J.S. Enzyme activation for nonaqueous media. *Current Opinion in Biotechnology*, **2002**, *13*, 376-384.
- Lehmann M., Wyss M. Engineering proteins for thermostability: the use of sequence alignments versus rational design and directed evolution. *Current Opinion in Biotechnology*, **2001**, *12*, 371-375.
- Lele B.S., Murata H., Matyjaszewski K., Russell A.J. Synthesis of uniform protein-polymer conjugates. *Biomacromolecules*, **2005**, *6*, 3380-3387.
- Liu J.Q., Bulmus V., Herlambang D.L., Barner-Kowollik C., Stenzel M.H., Davis T.R. *In situ* formation of protein-polymer conjugates through reversible addition fragmentation chain transfer polymerization.
Angewandte Chemie, International Edition, 2007, 46, 3099-3103.

- Liu Z., Lu D., Yin L., Li J., Cui Y., Chen W., Liu Z. Strengthening the stability of a tunnel-shaped homotetramer protein with nanogels. *The Journal of Physical Chemistry B*, **2011**, *115*, 8875-8882.
- Liu Y., Hua X. Production of biodiesel using a nanoscaled immobilized lipase as the catalyst. *Catalysis Letters*, **2014**, *144*, 248-251.
- Liu J., Yang Q., Li C., Towards efficient chemical synthesis via engineering enzyme catalysis in biomimetic nanoreactors. *Chemical Communication*, **2015a**, *51*, 13731-13739.
- Liu Y., Li J., Lu Y. Enzyme therapeutics for systemic detoxification. *Advanced Drug Delivery Reviews*, **2015b**, 90, 24-39.
- Livage, J., Coradin, T., Roux, C. Encapsulation of biomolecules in silica gels. *Journal of Physics-Condensed Matter*, 2001, 13, R673-R691.
- Lumry, R., Eyring. H.: Conformation changes of proteins, Journal of Physical Chemistry, 1954, 58 110-120.
- Ma, D., Li, M., Patil A.J., Mann, S. Fabrication of Protein/Silica Core–Shell Nanoparticles by Microemulsion-Based Molecular Wrapping. Advanced Materials, 2004, 16 (20), 1838-1841.
- Madadlou A., Iacopino D., Sheehan D., Emam-Djomeh Z., Mousavi M.E. Enhanced thermal and ultrasonic stability of a fungal protease encapsulated within biomimetically generated silicate nanospheres. *Biochimica et Biophysica Acta*, **2010**, *1800*, 459-465.
- Mahmoud D.A.R., Helmy W.A. Potential Application of Immobilization Technology in Enzyme and Biomass Production. *Journal of Applied Sciences Research*, **2009**, *5* (12), 2466-2476.
- Manea F., Houillon F.B., Pasquato L., Scrimin P. Nanozymes: Gold-nanoparticle-based transphosphorylation catalysts. *Angewandte Chemie, International Edition*, **2004**, *43*, 6165-6169.
- Manning M.C., Matsuura J.E., Kendrick B.S., Meyer J.D., Dormish J.J., Vrkljan M., Ruth J.R., Carpenter J.F., Sheftert E. Approaches for increasing the solution stability of proteins. *Biotechnology and Bioengineering*, 1995, 48(5), 506-512.
- Marrs B., Delagrave S., Murphy D. Novel approaches for discovering industrial enzymes. *Current Opinion in Microbiology*, **1999**, *2*, 241-245.
- Meier W., Nardin C., Winterhalter M. Reconstitution of channel proteins in (Polymerized) ABA triblock copolymer membranes. *Angewandte Chemie, International Edition*, **2000**, *39*, 4599-4602.
- Miller, G. L. Use of dinitrosalycilic acid reagent for determination of reducing sugar. *Analytical Chemistry*, **1959**, *31*, 426-428.
- Misset O., van Dijk A. Diagnosing the inactivating process of enzymes. *Progress in biotechnology*, **1998**, *15*, 3-18.
- Moreno A.D., Ibarra D., Alvira P., Tomás-Pejó E., Ballesteros M. A review of biological delignification and detoxification methods for lignocellulosic bioethanol production. *Critical Reviews in Biotechnology*, **2015**, *35*, 342-354.
- Mozhaev V.V. Mechanism-based strategies for protein thermostabilization. *Trends in Biotechnology*, **1993**, *11*, 88-95.
- Mozhaev V.V., Melik-Nubarov N.S., Sergeeva M.V., Siksnis V., Martinek K. Strategy for stabilizing enzymes, Part One: increasing stability of enzymes via their multi-point interaction with a support. *Biocatalysis*, **1990a**, *3*, 179-187.
- Mozhaev V.V., Sergeeva M.V., Belova A.B., Khmel'nitskii Y.L. Multipoint attachment to a support protects enzyme from inactivation by organic solvents: α-chymotrypsin in aqueous solutions of alcohols and diols. *Biotechnology and Bioengineering*, **1990b**, *35*, 653-659.
- Narayaan S.S., Sarkar R., Pal S.K. Structural and functional characterization of enzyme-quantum dot conjugates: Covalent attachment of CdS nanocrystal to α-chymotrypsin. *Journal of Physical Chemistry C*, **2007**, *111*, 11539-11543.
- Nardin C., Thoeni S., Widmer J., Winterhalter M., Meier W. Nanoreactors based on (polymerized) ABA-triblock copolymer vesicles. *Chemical Communication*, 2000, 16, 1433-1434.
- Nicolas J., San Miguel V., Mantovania G., Haddleton D.M. Fluorescently tagged polymer bioconjugates from protein derived macroinitiators. *Chemical Communication*, **2006**, *46*, 4697-4699.
- Nidetzky B., Steiner W., Hayn M., Claeyssens M. Cellulose hydrolysis by the cellulases from *Trichoderma reesei*: a new model for synergistic interaction. *Biochemical Journal*, **1994**, 298, 705-710.
- O'fagain C. Enzyme stabilization recent experimental progress. *Enzyme and Microbial Technology*, **2003**, *33*, 137-149.
- Ozin, G.A., Cademartiri L. Nanochemistry: What Is Next? Small, 2009, 5 (11), 1240-1244.
- Palocci C., Chronopoulou L., Venditti I., Cernia E., Diociaiuti M., Fratoddi I., Russo M.V. Lipolytic enzymes with improved activity and selectivity upon adsorption on polymeric nanoparticles. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 3047-3053.
- Paradkar, V.M., Dordick, J.S. Aqueous-like activity of alpha-chymotrypsin dissolved in nearly anhydrous organic solvents. *Journal of American Chemical Society*, 1994, 116, 5009-5010.

- Pasquato L., Pengo P., Scrimin P. Nanozymes: Functional Nanoparticle-based Catalysts. Supramolecular Chemistry, 2005, 17, (1-2), Special Issue: XIIIth International Symposium on Supramolecular Chemistry, 163-171.
- Pauly M., Keegstra K. Cell-wall carbohydrates and their modification as a resource for biofuels. *The Plant Journal*, 2008, 54, 559-568.
- Peng Y., Jiang D., Su L., Zhang L., Yan M., Du J., Lu Y., Liu Y.N., Zhou F. Mixed monolayers of ferrocenylalkanethiol and encapsulated horseradish peroxidase for sensitive and durable electrochemical detection of hydrogen peroxide. *Analytical Chemistry*, 2009, 81, 9985-9992.
- Perez A., Mélinon P., Dupuis V., Bardotti L., Masenelli B., Tournus F., Prével B., Tuaillon-Combes J., Bernstein E., Tamion A., Broyer N. M., Pellarin M., Del Fatti N., Vallée F., Cottancin E., Lermé J., Vialle J.L., Bonnet C., Maioli P., Crut A., Clavier C., Rousset J.L., Morfin F. Functional nanostructures from clusters. *International Journal of Nanotechnology*, **2010**, 7 (4-8), 523-574.
- Phadtare S., Vinod V.P., Mukhopadhyay K., Kumar A., Rao M., Chaudhari R.V., Sastry M. Immobilization and Biocatalytic Activity of Fungal Protease on Gold Nanoparticle-Loaded Zeolite Microspheres. *Biotechnology* and Bioengineering, 2004, 85, 629-637.
- Polizzi K.M., Bommarius A.S., Broering J.M., Chaparro-Riggers J.F. Stability of biocatalysts. Current Opinion in Chemical Biology, 2007, 11, 220-225.
- Ramsden J. (Ed.) Biomedical surfaces. Artech House, Boston, London, 2008.
- Rayalu S., Yadav R., Wanjari S., Prabhu C., Mushnoori S.C., Labhsetwar N., Satyanarayanan T., Kotwal S., Wate S.R., Hong S.G., Kim J. Nanobiocatalysts for carbon capture, sequestration and valorisation. *Topics in Catalysis*, 2012, 55, 1217-1230.
- Reynhout I.C., Cornelissen J.J.L.M., Nolte R.J.M. Self-assembled architectures from biohybrid triblock copolymers. *Journal of American Chemical Society*, **2007**, *129*, 2327-2332.
- Roach P., Eglin D., Rohde K., Perry C.C. Modern biomaterials: a review bulk properties and implications of surface modifications. *Journal of Materials Science: Materials in Medicine*, 2007, 18 (7), 1263-1277.
- Saha, B.C. Hemicellulose bioconversion. *Journal of Industrial Microbiology and Biotechnology*, **2003**, *30*, 279-291.
- Sajja H.K., East M.P., Mao H., Wang A.Y., Nie S., Yang L. Development of Multifunctional Nanoparticles for Targeted Drug Delivery and Non-invasive Imaging of Therapeutic Effect. *Current Drug Discovery Technologies*, 2009; 6 (1), 43-51.
- Saritha M., Arora A., Lata. Biological Pretreatment of Lignocellulosic Substrates for Enhanced Delignification and Enzymatic Digestibility. *Indian Journal of Microbiology*, **2012**, *52*, 122-130.
- Schoevaart R., Wolbers M.W., Golubovic M., Ottens M., Kieboom A.P.G., van Rantwijk F., van der Wielen L.A.M., Sheldo R.A. Preparation, Optimization, and Structures of Cross-Linked Enzyme Aggregates (CLEAs). *Biotechnology and Bioengineering*, 2004, 87, (6), 754-762.
- Schmidtke J.L., Wescott C.R., Klibanov A.M. The Mechanistic Dissection of the Plunge in Enzymatic Activity upon Transition from Water to Anhydrous Solvents. *Journal of American Chemical Society*, **1996**, *118*, 3360-3365.
- Shao Y., Wang J., Wu H., Liu J., Aksay I.A., Lin Y. Graphene Based Electrochemical Sensors and Biosensors: A Review. *Electroanalysis*, **2010**, *22* (10), 1027-1036.
- Sharma R.K., Das S., Maitra A. Enzymes in the cavity of hollow silica nanoparticles. *Journal of Colloid and Interface Science*, **2005**, 284, 358-361.
- Shidhaye S., Lotlikar V., Malke S., Kadam V. Nanogel Engineered Polymeric Micelles for Drug Delivery. *Current Drug Therapy*, **2008**, *3*, 209-217.
- Simmchen J., Baeza A., Ruiz-Molina D., Vallet-Regí M. Improving catalase-based propelled motor endurance by enzyme encapsulation. *Nanoscale*, 2014, 6, 8907-8913.
- Suthiwangcharoen N., Nagarajan R. Enhancing enzyme stability by construction of polymer-enzyme conjugate micelles for decontamination of organophosphate agents. *Biomacromolecules*, **2014**, *15*, 1142-1152.
- Taherzadeh M.J., Karimi K. Pretreatment of lignocellulosic wastes to improve ethanol and biogas production: A review. *Int. J. Mol. Sci.* 2008, *9*, 1621-1651.
- Tang Z-X., Qian J-Q., Shi L-E. Characterizations of immobilized neutral proteinase on chitosan nano-particles. Process Biochemistry, 2006, 41 (5), 1193-1197.
- Tang Z-X., Qian J-Q., Shi L-E. Characterizations of immobilized neutral lipase on chitosan nano-particles. *Materials Letters*, **2007a**, *61* (1), 37-40.
- Tang Z-X., Shi L-E., Qian J-Q. Neutral lipase from aqueous solutions on chitosan nano-particles. *Biochemical Engineering Journal*, 2007b, 34 (3), 217-223.
- Tischer W., Kasche, V. Immobilized enzymes: crystals or carriers? Trends in Biotechnology, 1999, 17, 326-335.
- Tsang S.C., Yu C.H., Gao X., Tam K. Silica-encapsulated nanomagnetic particle as a new recoverable biocatalyst carrier. *Journal of Physical Chemistry B*, **2006**, *110*, 16914-16922.
- Turner, P., Mamo, G., Nordberg, E. Potential and utilization of thermophiles and thermostable enzymes in

biorefining. Microbial Cell Factories, 2007, 6 (9), 1-23.

- Velonia K., Rowan A.E., Nolte R.J.M., Lipase polystyrene giant amphiphiles, Journal of American Chemical Society, 2002, 124, 4224-4225.
- Vriezema D.M., Garcia P.M.L., Oltra N.S., Hatzakis N.S., Kuiper S.M., Nolte R.J.M., Rowan A.E., van Hest J.C.M. Positional assembly of enzymes in polymersome nanoreactors for cascade reactions. *Angewandte Chemie, International Edition*, 2007, 46, 7378-7382.
- Wallat J.D., Rose K.A., Pokorski J.K. Proteins as substrates for controlled radical polymerization. *Polymer Chemistry*, 2014, 5, 1545-1558.
- Wallenstein M., Allison S.D., Ernakovich J., Steinweg J.M., Sinsabaugh R. Controls on the temperature sensitivity of soil enzymes: a key driver of in situ enzyme activity rates. *in*: Shukla G., Varma A. (*Eds.*) Soil Enzymology. Springer, Berlin Heidelberg, Germany, 2010, 245-258.
- Wang P., Sergeeva M.V., Lim L., Dordick J.S. Biocatalytic plastics as active and stable materials for biotransformations. *Nature Biotechnology*, 1997, 15, 789–793.
- Wang Y., Caruso F. Mesoporous silica spheres as supports for enzyme immobilization and encapsulation. *Chemistry in Materials*, **2005**, *17*, 953-961.
- Wang L., Zhu G., Wang P., Newby B. Z. Self-assembling of polymer-enzyme conjugates at oil/water interfaces. *Biotechnology Progress*, 2005a, 21, 1321-1328.
- Wang P., Ma G., Liao L., Gao F. Construction of multienzyme bioactive systems using a multiscale design approach. *China Particuology*, 2005b, 3, 304-309.
- Wang P. Nanoscale biocatalyst systems. Current Opinion in Biotechnology, 2006, 17, 574-579.
- Wang Y., Zhou W. A review on inorganic nanostructure self-assembly. Journal of Nanoscience and Nanotechnology, 2010, 10, 1563-1583.
- Wang R., Zhang Y., Lu D., Ge J., Liu Z., Zare R.N. Functional protein-organic/inorganic hybrid nanomaterials. Wiley Interdisciplinary Reviews: Nanomedicine and Nanobiotechnology, 2013, 5, 320-328.
- Wang R., Zhang Y., Ge J., Liu Z. Activation of enzyme nanogel in organic solvents by PEG-substrate joint imprinting. RSC Advances, 2014, 4, 40301-40304.
- Whang D., Jin S., Wu Y., Lieber C.M. Large-Scale Hierarchical Organization of Nanowire Arrays for Integrated Nanosystems. *Nano Letters*, 2003, 3 (9), 1255-1259.
- Wilson, D.B. Studies of *Thermobifida fusca* plant cell wall degrading enzymes. *The Chemical Record*, **2004**, *4* (2), 72-82.
- Xavier, A.M.R.B., Correia M.F., Pereira S.R., Evtuguin D.V. Second-generation bioethanol from eucalypt sulphite spent liquor. *Bioresource Technology*, **2010**, *101* (8), 1873-2976.
- Xu J., Zeng F., Wu S., Liu X., Hou C., Tong Z. Gold nanoparticles bound on microgel particles and their application as an enzyme support. *Nanotechnology*, **2007**, *18*, 265704.
- Yadav R., Satyanarayanan T., Kotwal S., Rayalu S. Enhanced carbonation reaction using chitosan-based carbonic anhydrase nanoparticles. *Current Science*, **2011a**, *100* (4), 520-524.
- Yadav, R., Labhsetwar, N., Kotwal, S., Rayalu, S. Single enzyme nanoparticle for biomimetic CO₂ sequestration. *Journal of Nanoparticle Research*, **2011b**, *13*, 263-271.
- Yan M., Ge J., Liu Z., Ouyang P. Encapsulation of single enzyme in nanogel with enhanced biocatalytic activity and stability. *Journal of American Chemical Society*, 2006a, 128, 11008-11009.
- Yan M., Ge J., Dong W., Liu Z. Ouyang P. Preparation and characterization of a temperature-sensitive sulfobetaine polymer-trypsin conjugate. *Biochemical Engineering Journal*, 2006b, 30, 48-54.
- Yan M., Liu Z., Lu D., Liu Z. Fabrication of single carbonic anhydrase nanogel against denaturation and aggregation at high temperature. *Biomacromolecules*, 2007, 8, 560-565.
- Yan M., Du J., Gu Z., Liang M., Hu Y., Zhang W., Priceman S., Wu L., Zhou Z. H., Liu Z., Segura T., Tang Y., Lu Y. A novel intracellular protein delivery platform based on single-protein nanocapsules. *Nature Nanotechnology*, 2010, 5, 48-53.
- Yang Z., Shihui S., Chunjing Z. Magnetic single-enzyme nanoparticles with high activitiy and stability. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, **2008**, *367*, 169-175.
- Yang Z., Zhang C. Single-enzyme nanoparticles based urea biosensor. *Sensors and Actuators B: Chemical*, **2013**, *188*, 313-317.
- You C., Agasti S.S., De M., Knapp M.J., Rotello V.M. Modulation of the catalytic behavior of α-chymotrypsin at monolayer-protected nanoparticle surfaces. *Journal of American Chemical Society*, **2006**, *128*, 14612-14618.
- Yu L., Banerjee I. A., Gao X., Nuraje N., Matsui H. Fabrication and application of enzyme-incorporated peptide nanotubes. *Bioconjugate Chemistry*, 2005, 16, 1484-1487.
- Zahavy E., Ordentlich A., Yitzhaki S., Shafferman A. (*Ed.*) Nano-Biotechnology for Biomedical and Diagnostic Research. Springer, Dordrecht Heidelberg London New York, **2012**.
- Zeng Y.L., Huang H.W., Jiang J.H., Tian M.N., Li C.X., Tang C.R., Shen G.L., Yu R.Q. Novel looped enzymepolyamidoamine dendrimer nanohybrids used as biosensor matrix. *Analytica Chimia Acta*, 2007, 604, 170-

176.

- Zhang X., Guan R.-F., Wu D.-Q., Chan K.-Y. Enzyme immobilization on amino-functionalized mesostructured cellular foam surfaces, characterization and catalytic properties. *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, **2005**, *33*, 43-50.
- Zhu G., Wang P. Polymer-enzyme conjugates can self-assemble at oil/water interfaces and effect interfacial biotransformations. *Journal of American Chemical Society*, **2004**, *126*, 11132-11133.
- Zhu G., Wang P. Novel interface-binding chloroperoxidase for interfacial epoxidation of styrene. *Journal of Biotechnology*, **2005**, *117*, 195-202.
- Zhu B., Lu D., Ge J., Liu Z. Uniform polymer-protein conjugate by aqueous AGET ATRP using protein as a macroinitiator. *Acta Biomaterialia*, **2011**, *7*, 2131-2138.

Tézisek

1. tézis

Új, kétlépéses módszert dolgoztam ki enzim nanorészecskék előállítására az irodalomban leirt módszerek tapasztalatai alapján, amely bevonási eljárás gyorsabb, egyszerűbb es hatékonyabb az irodalmi módszereknél.

Az enzim nanorészecskék előállítása során a különálló enzim molekulák körül néhány nanométer vastagságú térhálós polimer réteget szintetizáltam az enzim molekulák felületéről kiindulva. Az új módszer nagy előnye az irodalomban javasolt módszerhez képest, hogy mindegyik lépése vizes fázisban játszódik le, a fehérje, illetve az enzim molekulák felületének módosítását dimetil-szulfoxidban oldott 4-dimetilaminoantipirinnel stabilizált *n*-akriloxiszukcinimid reagens helyett vízben könnyen elbomló reagenssel (akrilsav-kloriddal) végeztem, a felesleges reagenseket a költséges és bonyolult gélkromatográfiás eljárás helyett dialízis membránnal távolítottam el.

2. tézis

Igazoltam, hogy

- az általam kidolgozott kétlépéses módszerrel a szűk méreteloszlású enzim nanorészecskék stabilitása nagyobb a természetes enzimeknél,
- a makromolekulák és az enzim kapcsolódását nem gátolja az enzim körül kialakított porózus polimer réteg.

3. tézis

Elsőként állítottam elő és stabilizáltam többfajta enzimet tartalmazó enzim komplexből, Celluclast BG ipari celluláz enzim komplex (izolálva *T. reesei* organizmusból) felhasználásával enzim nanorészecskéket.

Az új módszer alkalmazásával elsőként állítottam elő enzim nanorészecskéket olyan érzékenyebb enzimek esetében, amelyeket a korábbi módszerekkel nem, vagy csak kis hatékonysággal lehetett (*T. fusca* organizmusokból izolált endocelluláz, β -D-mannozidáz, β -D-xilozidáz, endoxilanáz és endomannanáz enzimeket). Igazoltam, hogy ezek az enzimek sokkal hosszabb ideig képesek megőrizni aktivitásukat, stabilitásuk legalább 50-szer nagyobb, mint a természetes enzimeknek.

4. tézis

Igazoltam, hogy az új eljárással előállított enzim nanorészecskék (celluláz és β -Dxilozidáz enzimek) extrém magas hőmérsékleti körülmények között is működőképesek maradnak.

Pl. a β -D-xilozidáz enzimekből előállított enzim nanorészecskék 80 °C-on, 150 rpmmel 24 óra hosszú rázatás után is megőrizték eredeti aktivitásuknak mintegy 20%-át. Ezzel szemben a természetes β -D-xilozidáz enzimek már egy fél óra inkubációt követően gyakorlatilag elveszítették aktivitásukat.

5. tézis

Kimutattam az α-kimotripszin enzimből és celluláz enzim komplexből előállított enzim nanorészecskék pH-stabilitását extrém pH-értékeken.

A α -kimotripszin enzim nanorészecskék extrém savas (pH = 1,5) körülmények között is megőrzik az optimális pH-értéken (pH = 7,8) mérhető aktivitásuk mintegy felét, ezzel szemben a természetes α -kimotripszin enzimek teljesen inaktívak ezeken a pH-értékeken. Celluláz enzim komplex esetében az enzim nanorészecskék aktivitása gyakorlatilag nem változik sem erősen savas (pH = 1,5) sem pedig erősen lúgos (pH = 12) pH-értéken. Ezzel szemben a természetes celluláz enzimek aktivitása az optimális pH-értéken (pH = 5,5) mérhető aktivitásuknak mintegy 10%-a, illetve mintegy 30%-a ezeken a pH-értékeken.

Theses

Thesis 1:

I have developed a new two-step method modifying the literature one of Yan *et al.*, (2006a) to prepare single enzyme nanoparticles for stabilization of enzyme activity. This new method is simpler and more efficient than methods used in the literature.

A few nanometer thick spatial polymer layer was synthesized around individual enzyme molecule on the surface of the enzyme molecules. In contradiction to the previous methods in the literature, the significant advantage of this new method is that every step of the preparation is realized in aqueous solution and the modification of the surface of the enzyme molecules is proceeded with acryloyl chloride that is broken down easily in water and does not need to use *n*-acryloxysuccimide reagent dissolved in dimethylsulphoxyde and 4-aminopyridine as stabilizer. The unreacted reagents are separated by dialysis membrane instead of the more complex gel chromatography.

Thesis 2:

I have proved that

- the stability of single enzyme nanoparticles prepared by the two-step method, developed by me, has got a much longer lifetime, than that published in the literature,
- larger substrate molecules, e.g. polysaccharides, can also be reacted by the pretreated enzyme, proving the biocatalytic activity of the covered enzyme.

Thesis 3:

I have first prepared and stabilized single enzyme nanoparticles using multiple enzyme complex i.e. industrial cellulase enzyme complex 'Celluclast BG' isolated from *T. reesei* organism.

First, I synthesized single enzyme nanoparticles using sensitive enzymes (*e.g.* endocellulase, β -D-mannosidase, β -D-xylosidase, endoxylanase and endomannanase enzymes) that could not or could hardly be stabilized. It was proved that the stability of these enzymes is at least fifty times higher than that of native ones.

Thesis 4:

I have proved that cellulase and hemicellulase enzymes stabilized by the presented twostep method are even stable at such a high temperatures as well, where native enzymes have not got any activity any more.

One example for hemicellulase enzymes is β -D-xilozidase. Single enzyme nanoparticles prepared by this enzyme have retained about 20% of its original activity for 24-hour incubation time at 80 °C and 150 rpm. In contrary to it, native β -D-xilozidase enzyme loses its activity after a half an hour incubation time.

Thesis 5:

I have proved, that single enzyme nanoparticles synthesized from α -chymotrypsin enzyme and cellulase enzyme complex keep their pH-stability at extreme acidic and basic pH values, as well.

Single α -chymotrypsin enzyme nanoparticles retain about a half of their activity obtained at pH = 7.8, under extremely acidic conditions (pH = 1.5), as well. Contrary to it, native α -chymotrypsin enzyme has not got any activity at pH = 1.5. In the case of cellulase enzyme complex, the activity of enzyme nanoparticles does not decrease significantly at extremely acidic (pH = 1.5) or at extremely basic (pH = 12) pH values. But the activity of native cellulase enzymes at the above-mentioned pH values (pH = 1.5 and pH = 12) lower below 10% and 30% of their activity respectively, comparing it to their original activity measured at pH = 6.0.

Tudományos publikációk

Tudományos folyóiratokban megjelent közlemények

- Hegedüs I., Nagy E. Stabilization of activity of cellulose and hemicellulase enzymes by covering with polyacrylamide layer. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 2015, 95, 143-150. (IF: 2.154); (Független hivatkozások száma: 5 db).
- 2. Hegedüs I., Nagy E., Improvement of chymotrypsin enzyme stability as single enzyme nanoparticles, *Chemical Engineering Science*, 2009, 64, 1053-1060. (IF = 2.136); (Független hivatkozások száma: 45 db).
- **3.** Hegedüs I., Hancsók J., Nagy E., Stabilization of the cellulase enzyme complex as enzyme nanoparticle, *Applied Biochemistry and Biotechnology Part A: Enzyme Engineering and Biotechnology*, 2012, 168 (6), 1372-1383. (IF = 1,893); (Független hivatkozások száma: 7 db).
- **4.** Hegedüs I., Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs. A., Stabilization of hemicellulase enzymes with nano-layer, *Studia Universitatis Babes-Bolyai Seria Chemia*, **2010**, *LIV*, 53 62. (IF = 0,231).
- 5. Hegedüs I., Nagy E., Comparison of the structure and the stability of single enzyme nanoparticles, *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 2009, 37 (2), 123-130. (Független hivatkozások száma: 6 db).
- Hegedüs I., Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs. A., Cellulase and hemicellulase enzymes as single molecular nanobiocomposites, *Hungarian Journal of Industrial Chemistry*, 2011, 39 (3), 341-348. (Független hivatkozások száma: 1 db).
- 7. Hegedüs I., Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs. A., Hemicelluláz enzimek stabilizálása nanoréteggel, *Műszaki Szemle*, 2010, 52, 15-20. ISSN 1454-0746.

A doktori munkához szorosan nem kapcsolódó közlemények

- 8. Nagy E., Dudás J., Hegedüs I. Improvement of the energy generation by pressure retarded osmosis, *Energy*, 2016, *116*, 1323-1333. (IF: 4,520); (Független hivatkozások száma: 6).
- 9. Hegedus, I.L., Sahai, M.A., Labádi, M., Szori, M., Paragi, G., Viskolcz, B., Bottoni, A., Selenocysteine derivatives I. Sidechain conformational potential energy surface of N-acetyl-L-selenocysteine-N-methylamide (MeCO-L-Sec-NH-Me) in its βl backbone conformation, *Journal of Molecular Structure: THEOCHEM*, 2005, 725 (1-3), 111-125. (IF = 1,045); (Független hivatkozások száma: 5).
- Hegedüs I., Kiss-Tóth Dojcsak É., Juhászné Szalai A., Lovrity Z., Emmer J., Koska P., Fodor B., Nagy E., Single Hemoglobin Nanocapsules as Test Materials for Artificial Blood, *Periodica Politechnica Chemical Engineering*, 2014, 58 (Sup), 11–16. (IF = 0,269); (Független hivatkozások száma: 1).
- Nagy E., Hegedüs I., Second generation biofuels and biorefinery concepts focusing on Central Europe, *Chemical Engineering Transactions*, 2015, 45, 1765-1770. (SJR: 1,034); (Független hivatkozások száma: 4).
- 12. Nagy E., Hegedüs I., Description of the Overall Mass Transport during Membrane Gas Separation, *Chemical Engineering Transactions*, 2014, 42, 43-48. (SJR: 1,034); (Független hivatkozások száma: 1).
- 13. Hegedüs I., Faragó E., Kálmán M., Nagy E., Egyedi fehérje nanorészecskék orvosi alkalmazásai: hatóanyag átjuttatás a vér-agy gáton, *Műszaki Szemle*, 2011, 56, 10-20.
- Hegedüs I., Nagy E., A dendrimerek előállítása és felhasználása, Magyar Kémiai Folyóirat, 2009, 115, 25-33.

Könyvfejezet

Hegedüs I., Nagy E., Chapter 1016 Stabilization Techniques of Single Enzymes as Nanoparticles or Enzyme-Nano Bioconjugates *in: Recent Developments in Biotechnology Vol. 10: Nano-Biotechnology, ed*: J. N. Govil, (In 12 Vols), Studium Press LLC, USA, 2014.

Konferenciákon elhangzott előadások és poszterek

- 1. Hegedüs I., Nagy E., Stabilization of cellulase and hemicellulase enzymes as enzyme nanoparticles, I. Innovation in Science Doctoral Student Conference 2014, May 2-3, 2014 Szeged, Hungary, eBook of Abstracts, pp. 93-94. (Electronic version); (előadás).
- 2. Hegedüs I., Nagy E., Enzimek negyedleges szerkezetének stabilizálása enzim nanorészecskék előállításával, *Műszaki Kémiai Napok 2013* Veszprém, **2013**. április 23 25., pp. 201-207. (Előadás).

- **3.** Hegedüs I., Nagy E., Cellulase and hemicellulase degradation using single enzyme nanoparticles, *CAPE* FORUM 2013 Computer Aided Process Engineering Book of Abstracts, **2013**. április 7 10., Graz, Austria, p. 21. (Előadás).
- **4.** Hegedüs I., Nagy E., Stabilization of β-xilosidase with its quaternary structures as enzyme nanocapsules, *Symposium on Weak Molecular Interactions*, 5th and 6th March, **2013**, Book of Abstracts, Pécs, Hungary, pp. 68-69. (Előadás).
- 5. Hegedüs I., Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs. A., Stabilization of cellulase and hemicellulase enzymes as enzyme nanoparticles, *EuroNanoForum* 2011, Budapest, Hungary. (*electronic version*); (Előadás).
- Hegedüs I., Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs. A., Akrilamid réteggel stabilizált egyedi enzim nanorészecskék aktivitásának vizsgálata (Activity measurement of single enzyme nanoparticles using acrylamide layer) Műszaki Kémiai Napok '11 kiadványa, 2011. április 27 – 29., Veszprém, pp. 149-156. (Előadás).
- Hegedüs I., Nagy E.: Hemicelluláz enzimek stabilizálása nano-réteggel (Stabilization of Hemicellulase Enzymes with Nano-layer) "XVI. Nemzetközi Vegyészkonferencia" kiadvány, (Szekció előadások: Biokémia, szerves kémia és vegyészmérnöki tudományok.) Kolozsvár, p. 50. (2010. november 11 – 14.) (Előadás).
- 8. Hegedüs I., Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs. A., Single enzyme nanoparticles using thermostable hemicellulase enzymes, *"Challenges in Physical Chemistry and Nanoscience" (ISACS2)*, 13-16 july, Budapest, Hungary. (Poszter).
- Hegedüs I., Nagy E., Improvement of the stability of hemicellulase enzyme nanobiocomposites, *PROCEEDINGS 36th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, May 24 – 28, (2010) (electronic version, 6 pages). (Előadás).
- **10. Hegedüs I.**, Nagy E., Kukolya J., Barna T., Fekete Cs. A., Hemicellulóz bontó egyedi enzim nanorészecskék előállítása (*Single enzyme nanoparticles with hemicellulolytic activity*), Műszaki Kémiai Napok '10 kiadványa, **2010**. április 27 29., Veszprém, pp. 208-215. (Előadás).
- 11. Hegedüs I., Nagy E., Takács J., Transmission electron microscopic study of the structure of cellulase enzyme complex, 3rd Central and Eastern European Proteomic Conference, 6-9 october, Budapest, Hungary. (Poszter).
- 12. Hegedüs I., Nagy E., Multifunkcionális szupramolukuláris enzimkomplexek stabilizálása nanoréteggel (Stabilization of multifunctional supramolecular enzyme structures with nano-layer), Műszaki Kémiai Napok '09 kiadványa, 2009. április 21-23., Kiadó: Pannon Egyetem, Műszaki Informatika Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém, 2009. pp. 7-13. (Előadás).
- **13.** Hegedüs I., Nagy E., Improvement of cellulase enzyme stability as single enzyme nanoparticles, *PROCEEDINGS 36th International Conference of Slovak Society of Chemical Engineering*, Tatranksé Matliare, Slovakia May 25 29, 2009 p. 61. (printed version), 6 pages (electronic version). (Előadás).
- 14. Hegedüs I., Nagy E., Megnövelt stabilitású enzim-polimer nanobiokompozitok (Single enzyme nanoparticles with enhanced stability), *Műszaki Kémiai Napok '08*, 2008. április 22 24., pp. 268-274, Kiadó: Pannon Egyetem, Műszaki Informatika Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém, 2008. (Előadás).
- **15.** Hegedüs I., Nagy E. Stabilization of enzymes by surrounding them with thin, porous polymer layer, *Book* of Abstracts of the European Congress of Chemical Engineering-6, Copenhagen, 2007. szeptember 16-20., Vol. 1., 371-372. (Poszter).
- 16. Hegedűs I., Nagy E., Kulcsár E., Enzim stabilizálása polimer bevonattal (Polymer Nano-Layer for Enzyme Stabilization), Műszaki Kémiai Napok '07 kiadványa 2007 április 25 27,.pp. 138-141., Kiadó: Pannon Egyetem Műszaki Informatika Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém, 2007. (Előadás).
- **17.** Hegedüs I., Nagy E., Kovács S., Dendrimer –fehérje biokompozit anyagok (Dendrimer-Protein biocomposit materials), *Műszaki Kémiai Napok '07*, 2007 április 25 27., pp. 280-281., Kiadó: Pannon Egyetem, Műszaki Informatika Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém, 2007. (Poszter).
- **18.** Hegedüs I., Nagy E., Kovács S., Enzim molekulák bevonása polimer réteggel stabilitásuk növelése céljából, *NanoBiológia Mini-szimpozion*, 2006 november 10., Pécs. (Poszter).
- **19.** Hegedűs I., Nagy E., Kovács S.: Enzim stabilizálása polimer bevonattal (Polymer nano-layer for Enzyme Stabilization) *Műszaki Kémiai Napok* '06 Kiadvány, 2006. április 25 27., pp. 216-219. Kiadó: Pannon Egyetem, Műszaki Informatika Kar, Műszaki Kémiai Kutató Intézet, Veszprém, 2006. (Poszter).

A doktori munkához szorosan nem kapcsolódó előadások és poszterek

20. Hegedüs I., Nagy E., Stabilization of cellulase and hemicellulase enzymes with biocompatible polymer nanolayer, *International Conference on Bio-Friendly Polymers and Polymer Additives: from Scientific*

Aspects to Processing and Applications, 19 – 21 May, **2014** Budapest, Hungary Program and Book of Abstracts p. 40. (előadás)

- Hegedüs I., Tóth É., Kelemen-Horváth I., Nagy E., Organosolv pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production, *Műszaki Kémiai Napok* 2014 május 14-16. Veszprém, konferencia kiadvány, p. 56. (előadás)
- 22. Kelemen-Horváth I., Tóth É., Hegedüs I., Nagy E., Folyadékkromatográfiás módszer a bioetanol előállítás részfolyamatainak követésére, Műszaki Kémiai Napok 2014 május 14-16. Veszprém, konferencia kiadvány, pp. 68-73. (előadás)
- 23. Hegedüs I., Tóth É., Kelemen-Horváth I., Nagy E., Lignocellulóz biomassza előkezelése bioetanol előállítása céljából, *XIX. Nemzetközi Vegyészkonferencia*, 2013. nov. 21 24. Nagybánya, Románia (előadás)
- Hegedüs I., Tóth É., Kelemen-Horváth I., Nagy E., Organic solvent pretreatment of lignocellulosic biomass for bioethanol production, *1st EuChem Congress on Green and Sustainable Chemistry*, Budapest, 2013. Oct. 13 15. 2013. p. 85. (poszter)
- **25.** Hegedüs I., Nagy E., Nagy E., Hegedüs I., Description of the overall mass transport during membrane gas separation, 8th Conference on Sustainable Development of Energy, Water and Environment Systems, September 22-27., 2013., Dubrovnik, Chroatia, 0874-1 0874-8 (electronic version) (előadás)
- Hegedűs I., Kiss-Tóth Dojcsak É., Juhászné Szalai A., Lovrity Z., Emmer J., Nagy E. Hemoglobin nanoparticles as test materials for artificial blood, 10th Conference on Colloid Chemistry kiadványa, 2012. augusztus 29 – 31., Budapest, p. 73.
- Hegedűs I., Kiss-Tóth Dojcsak É., Juhászné Szalai A., Nagy E., Egyedi fehérje nanorészecskék biológiai rendszerekben (Single protein nanoparticles in biological systems) Műszaki Kémiai Napok 2012 kiadványa, 2012. április 24 26., Veszprém, p. 263. (Előadás).
- 28. Hegedüs I., Faragó E., Kálmán M., Nagy E., Egyedi fehérje nanorészecskék orvosi alkalmazásai (Biomedical applications of single protein nanoparticles), "*VII. Nemzetközi Vegyészkonferencia*" kiadvány, Kolozsvár, 2011. november 3 6. p. 25. (Előadás).
- 29. Hegedus I., Farago E., Nagy E., Kalman M., An attempt to transfer protein molecules through the blood brain barrier, *Neuroscience, SfN Annual Meeting*, 2011. Washington, USA. (Poszter).
- **30.** Hegedüs I., Faragó E., Kálmán M., Nagy E., Toward biomedical application of single enzyme nanoparticles, Transport of single albumin nanoparticles through the blood-brain barrier, *4th European Conference of Chemistry on Life Sciences*, **2011**, Budapest. (Poszter).
- **31.** Hegedüs I., Faragó E., Nagy E., Kálmán M., Transfer of Single Protein Nanoparticles through the Blood Brain Barrier, *8th International Conference of Nanoscience and Nanotecnologies (NN11)*, 12-15 july, **2011**, Thessaloniki, Greece. (Poszter).
- **32.** Hegedüs I., Nagy E., Egyedi enzim nanorészecskék orvosi alkalmazásai (Biomedical applications of single enzyme nanopaticles) *XV. Nemzetközi Vegyészkonferencia* kiadványa, **2009**. november 12 15, Marosvásárhely, Románia. (Előadás).
- **33.** Hegedüs I., Kovács S., Nagy E., Dendrimer-enzyme biocomposite materials, 9th Conference of Colloid Chemistry, October 3-5, 2007, Siófok, Hungary. (Poszter).
- **34.** Hegedüs I., Borbély, G., Kovács, S., Nagy, E., Synthesis and Industrial Application of PAMAM Dendrimers, *1st European Chemistry Congress* 27-31 august **2006**, Budapest Hungary. (Poszter). http://www.euchems-budapest2006.hu/?page=abstractList&action=abstract&topic=13&abstract=2219

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom Dr. Nagy Endre professzor úrnak, hogy elvállalta munkám irányítását, inspiráló, hasznos tanácsokkal látott el. Külön köszönettel tartozom, hogy a Bionanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézetben lehetővé tette, hogy korszerű, izgalmas tudományos területekkel foglalkozhattam, szakmai és emberileg segítséget nyújtott. Köszönöm Dr. Vonderviszt Ferenc professzor úrnak és a Pannon Egyetem Molekuláris- és Nanotechnológiák Doktori Iskolájának, hogy szakmai háttérrel támogatta munkámat.

Köszönet illeti a Bio-nanotechnológiai és Műszaki Kémiai Kutatóintézet valamennyi munkatársát az inspiráló és pozitív munkahelyi légkörért, amely nagyban hozzájárult eredményeim sikeréhez. Külön köszönöm Dr. Kovács Sándornak a szerves kémiai reakciók elvégzéséhez nyújtott segítségét, a reakciók technikai kivitelezéséhez nélkülözhetetlen volt szakmai tapasztalata és kiemelkedő szaktudása. Köszönet illeti Szemesné Dr. Németh Ágnest, aki az enzimek aktivitás mérésének gyakorlati kivitelezésében rengeteg segítséget nyújtott. Ugyancsak kiemelt köszönet illeti Mikóczi Gézánét, aki a laboratóriumi munka mindennapi elvégzésében ösztönző tanácsokkal látott el és folyamatosan segítőkészen támogatta munkámat. Köszönöm továbbá Törcsváryné Kovács Zsuzsannának a technikai segítséget. Köszönöm Dr. Jankovics Hajnalka, Dr. Muskotál Adél, Papné Klein Ágnes és a Nanotechnológiai Tanszék valamennyi munkatársának hathatós segítségét.

Köszönettel tartozom Dr. Kukolya József tanár úrnak (Szent István Egyetem, MKK KTI Környezetvédelmi és Környezetbiztonsági Tanszék, Gödöllő) a hemicelluláz enzimeknek a hőtűrő *Thermobifida fusca* törzsből történő izolálásáért, valamint Dr. Barna Teréz adjunktusnőnek és Dr. Fekete Csaba Attilának (Debreceni Egyetem, Genetikai és Alkalmazott Mikrobiológiai Tanszék) a hemicelluláz enzimek tisztításáért, valamint az enzimek vizsgálatához nyújtott hasznos tanácsokért.

Köszönöm Dr. Takács József tanár úrnak (Semmelweis Orvostudományi Egyetem, II. Anatómiai és Fejlődéstani Intézet, illetve MTA-PPKE-SE Neuro-Infobionikai Kutatócsoport) a transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek elkészítéséhez nyújtott nélkülözhetetlen segítségét.

Köszönöm a Nemzeti Kutatási, Fejlesztési és Innovációs Hivatalnak a GINOP-2.3.2-15-2016-00017 és GINOP-2.2.1-15-2016-00023 projektek keretében az értekezésem elkészítéséhez nyújtott pénzügyi támogatását.

FÜGGELÉK

F1 Az α-kimotripszin enzim szerkezete



 $http://www.sigmaaldrich.com/content/dam/sigma-aldrich/product2/041/c4129-1-l.eps/_jcr_content/renditions/large.jpg$



F2 A Trichoderma reesei-ből származó celluláz enzim komplex működésének sémája

F3: Thermobifida fusca GH43 béta-xilozidáz enzim jellemzői

swiss-entry: Q47PG8_THEFY

Mw:61680 pI:5.45

1 MTSPQVTSSPSREEPRAGTIRNPVLTGFYPDPSILRVGDDYYMATSTFEWYPGVTLHHSR 61 DLVHWRPLGGALTETRLLDLAGRRDGAGVWAPALSYRDGLFFLVFTNVASYSGNFWDAPN 121 YVTTAPDITGPWSDPVPLHSLGFDPSLFHDDDGRSWLLSTSMDWRPGRDAFGGIVAQEFS 181 VRDMKLVGEPVIIFTGTEAGVTEAPHIYKRDGWYYLVTAEGGTQWEHQVTVARSRSVTGP 241 YEVDPAGPALTSRHVPEAPLQKAGHASMVETQHGEWYFAHLTGRPMPPSGRCVLGRETAL 301 QKIEWSSDGWPRVRNAEPLLEVPGPRGLAPHPWPQPSETDHFDDPTPRPEWSTLRRPFDS 361 SWVSLTERPGYLRIRGGQSPAGLHEPSLVARRLQHRACIFEACLEFKPEDFRQMAGITAY 421 YNTROWHYLRINRDDRGGVFAGVLTSDRGIIREVGRRISVTDWPKVFLRAEIDRNDLRFA VSSDGSTWADMGVRLDMSILSDEYAEERFGNDPIMWGFTGAFLGLWAHDMTGAGLPADFD 481 541 FCTYRPQSPS Aminosav összetétel:

 Ala
 (A)
 40
 7,27 %

 Arg
 (R)
 48
 8,73 %

 Asn
 (N)
 9
 1,64 %

 Asp
 (D)
 39
 7,09 %

Cys	(C)	4	0,73	00
Gln	(Q)	13	2,36	00
Glu	(E)	30	5,45	00
Gly	(G)	51	9,27	00
His	(H)	17	3,09	00
Ile	(I)	18	3,27	00
Leu	(L)	43	7,82	00
Lys	(K)	6	1,09	00
Met	(M)	11	2,00	00
Phe	(F)	25	4,55	00
Pro	(P)	47	8,55	00
Ser	(S)	40	7,27	00
Thr	(T)	37	6,73	00
Trp	(W)	20	3,64	00
Tyr	(Y)	18	3,27	00
Val	(V)	34	6,18	00
Asx	(B)	0	0,00	00
Glx	(Z)	0	0,00	9

F4: Thermobifida fusca GH2 beta-mannozidáz enzim jellemzői

swiss_prot entry name: Q47RG4_THEFY

M_w: 93080,20 pI: 4,78

1	MAVRIELRE	ΞN	WVLRADDPAE	VPVEIGPAGI	PATVPGCVHT	DLMAANLIPD	PYQGRNETEL	GWIGRTQWSY
71	TTTFDATAI	LA	EAERIDLECA	GLDTVATVFL	NGTEVGQSRN	MHRSYRFDLR	RALRDGTNEL	RVEFASPYSY
141	ATALRDKLO	GD	RPNAYPEPFQ	FIRKMACNFG	WDWGPTLVTS	GIWRPIHVHA	WHTARLAQVV	PLITVARTHD
211	GSLEGRVL	VR	VEVERSEHGE	DTELVVRVRI	ADREQSIAVP	AGVCRTELEV	TVPDPDLWWP	RGYGDQPLYD
281	LRVDLAAHO	GΕ	ELDTWQRRIG	FRTVELDTGV	DEDGRRFTIV	VNGVPVLVKG	ANWIPDDCFV	SRVGRDRYAA
351	RIDQAVAAN	MV	NLLRVWGGGR	YESEDFYELC	DERGILVWQD	FLFACAAYPE	EPPITEEVEA	EAREVVARLA
421	PYPSLVLWN	NG	NNENIWGYWD	WGWKEELAGR	SWGEGYYLEL	LPRIVAEVDP	TRPYWPGSPY	SGVPDIHPND
491	PRYASIHIV	٧D	VWNEVDYTAY	RNYRPRFVA E	FGFQAPPTYA	TLRSALPGEE	LRPDSPGMLH	HQKAVDGNGK
561	LARGLAPH	FG	NPADFDDWHY	LTQVNQARAI	TLGIEHFRAQ	WPRCTGSVVW	QLNDCWPVTS	WSAVDGEGRR
631	KPLWYALRA	AV	YAERLATVQP	DGDGLVLVVA	NDSNREWTGT	AHLARRALDG	TVLAAADAPF	TVPARGAVRV
701	PLPAEVARE	PG	DATRELITAD	TGARRAYWFF	AEDREIAYPA	PEYDTRVVPR	GADLCVTVTA	RSLLRDLSLF
771	ADRLDPGAR	ΞA	DDMLVTLLPG	ESHTFTVRGG	AHLDPAQVVQ	PPVLRTVNDA	LRAAQDSIPV	
Ala	ι (A)	90	10,84 9	0				
Arg	ſ (R)	77	9,28	0				
Asn	1 (N)	26	3,13 9	0				
Asp) (D)	62	7,47 9	0				
Cys	s (C)	10	1,20 9	0				
Gln	n (Q)	20	2,41 9	20				
Glu	ι (E)	58	6,99 9	20				
Gly	7 (G)	62	7,47 9	20				
His	5 (H)	18	2,17 9	20				
Ile	e (I)	28	3,37 9	20				
Leu	ι (L)	71	8,55 8	0				
Lys	s (K)	7	0,84	0				
Met	: (M)	7	0,84	0				
Phe	e (F)	24	2,89 9	20				
Prc) (P)	60	7,23 9	0				
Ser	(S)	26	3,13 9	20				
Thr	(T)	49	5,90 %	20				
Trp) (W)	30	3,61 9	20				
Tyr	(Y)	29	3,49 9	20 D				
Val	. (V)	76	9,16 9	e e				
Asx	(B)	0	0,00 \$	e e				
Glx	(Z)	0	0,00 9	5				



