



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

MTA-SZTE Lendület Biokolloidok Kutatócsoport

Fizika-Kémia osztatlan tanárszak

Többféle enzimaktivitással rendelkező nanozyme kolloid rendszerek fejlesztése

Vörös Attila

Témavezetők:

Dr. Szilágyi István
Dr. Varga Viktória

Szeged

2024

Tartalmi összefoglaló

Az utóbbi évtizedek felfedezése, hogy egyes nanorészecskék (ún. nanozyme-ok) képesek enzimműködést utánozni, viszont a természetes enzimek számos hátrányos viselkedését (pl. nem denaturálódnak, kevésbé érzékenyek a pH-, nyomás-, és hőmérséklet változásaira, és előállításuk költséghatékonyabb) nem mutatják. Az egyik nagy kihívás a területen, hogy olyan nanozyme rendszert hozzunk létre, amely többféle enzim működését párhuzamosan végzi, és nagy kolloidstabilitással rendelkezik. Kutatásunk során komplex, berlini kék (Prussian Blue, PB) nanozyme tartalmú, kolloid rendszereket hoztunk létre a hatékony és széleskörű enzimaktivitás elérése céljából. Egyrészt réz(II) ionokkal dúsított alumínium-szilikát (CuZ) részecskéket, illetve azok polielektrolittal módosított változatát (PCuZ) funkcionizáltunk PB nanokockákkal (PB-PCuZ), másrészt papain (PPN) enzimet adszorbeáltattunk PB nanozyme-okon, és az így keletkezett kompozitokat, illetve azok diszperzióit vizsgáltuk főképp kolloidkémiai és biokatalitikus képesség szempontjából. A polimer templát alapú PB szintézis eredményeként egy igen stabil, jó közelítéssel monodiszperz vizes közegű diszperziót kaptunk. A PPN adszorpció a PB felületi töltésének előjel változásával járt, a kapott PB-PPN hibrid részecske a PB mintához hasonlóan igen stabilnak mutatkozott nagy ionerősségek mellett is, amely a felhasználhatóság szempontjából rendkívül előnyös. Megállapítottuk, hogy a PB nanokockák rendelkeznek szuperoxid dizmutáz- (SOD) és peroxidáz-szerű (POD) enzimaktivitással. Ezen antioxidáns képességek a PPN immobilizálása után sem változnak, viszont a PB-PPN kompozit proteáz aktivitással is bír, amit fehérje hidrolízisen alapuló tesztreakciókkal mutattunk ki. A PB és PCuZ rendszer esetében nanozyme elegy kialakulását tapasztaltuk, ami együttesen tartalmazott PB-PCuZ kompozitot és szabad PB részecskéket is. Stablis diszperzióban jelentős POD aktivitás növekedést tapasztaltunk a funkcionizálatlan PB részecskék aktivitásához képest, ami szinergisztikus működési mechanizmust sejtet a PB és CuZ nanozyme-ok között. Összegezve, a munkánk során kifejlesztett nanozyme részecskék nagy kolloid- és szerkezeti stabilitással bírnak, mialatt képesek oxigéntartalmú szabadgyökök eliminálására és fehérjék hidrolízisére. Az eredmények számottevő érdeklődésre tarthatnak számot főképp ipari eljárásokban, ahol a természetes enzimek alkalmazása nehézkes. Ez hatványozottan igaz azokra az alkalmazásokra, ahol mind a proteáz, mind az antioxidáns hatás elvárt, viszont a természetes enzimek együttes alkalmazása esetében az antioxidáns enzim hidrolízise játszódik le a proteáz által. További terveink között szerepel a fenti kolloid rendszerek tesztelése biológiai rendszerekben.

Tartalomjegyzék

1. Rövidítésjegyzék	5
2. Bevezetés	6
3. Irodalmi áttekintés	8
3.1 Antioxidánsok	8
3.2 Berlini kék nanorészecskék	10
3.3 Zeolit részecskék	11
3.4 Papain enzim	12
3.5 A kolloidstabilitás	12
4. Célkitűzés	15
5. Kísérleti rész	16
5.1 Felhasznált vegyszerek	16
5.2 Szintézismódszerek	16
5.2.1 PB nanokockák szintézise	16
5.2.2 Papainnal funkcionizált PB előállítása	17
5.2.3 Réztartalmú ZSM-5 zeolit (CuZ) szintézise	17
5.2.4 PB-PCuZ kompozitok előállítása	17
5.3 Mérési módszerek	18
5.3.1 Transzmissziós elektronmikroszkópia	18
5.3.2 Elektron paramágneses spektroszkópia	18
5.3.3 Raman spektroszkópia	19
5.3.4 Időfüggő dinamikus fényszórás	19
5.3.5 Elektroforetikus mobilitás mérés	20
5.3.6 UV-látható spektroszkópia	20
5.4 Tesztreakciók	21
5.4.1 SOD teszt	21
5.4.2 POD teszt	22
5.4.3 Proteáz teszt	23
5.4.4 Bradford teszt	23
6. Eredmények	25
6.1 Kompozitok jellemzése és kolloidstabilitásuknak vizsgálata	25
6.2 Antioxidáns tesztek	31
6.3 Az antioxidáns aktivitások hatásmechanizmusának vizsgálata	33
6.4 Proteáz teszt	35

7. Összefoglalás.....	37
8. Irodalomjegyzék.....	39
9. Köszönetnyilvánítás	43

1. Rövidítésjegyzék

Rövidítés

ROS	Oxigén tartalmú szabadgyök
RNS	Nitrogén tartalmú szabadgyök
SOD	Szuperoxid-dizmutáz enzim
POD	Peroxidáz enzim
PRT	Proteáz enzim
CAT	Kataláz enzim
DLS	Dinamikus fényszórás
ELS	Elektroforetikus fényszórás
PVP	Polivinil-pirrolidon
PDADMAC	Poli(diallil-dimetil-ammónium klorid)
PB	Berlini kék
CCC	Kritikus koagulálási koncentráció
DLVO	Derjaguin-Verwey-Landau-Overbeek
PMMA	Poli(metil-metakrilát)
PS	Polisztirol
TMB	3,3',5,5'-tetrametilbenzidin
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkópia
ASP	Adszorpció telítési plató
IEP	Izoelektromos pont
CuZ	Cu(II)-módosított ZSM5 zeolit
PCuZ	PDADMAC-al módosított CuZ
PB-PCuZ	PB és PCuZ részecskékből előállított kompozit
EPR	Elektron paramágneses spektroszkópia

2. Bevezetés

A biológiai szervezetekben és az iparban lejátszódó folyamatok során keletkezhetnek olyan vegyületek, amelyek az élő szervezetre, vagy az ipari termékekre káros hatással vannak. Ezek a szabadgyökök rendkívül reaktívak abból kifolyólag, hogy párosítatlan elektront tartalmaznak. Ha a reakciók során a szabadgyökök egyensúlya felborul, akkor elszabadult oxidatív láncreakciók indulhatnak be, amelyek káros következményekkel járhatnak. Ezt nevezzük oxidatív stressznek, ami az iparban a végtermék minőségének romlását, míg élő szervezetekben megbetegedésekhez vezethet, és az öregedést is ezek az oxidációs folyamatok okozzák.

Az élő szervezetek évmilliók alatt több védekező mechanizmust fejlesztettek ki a szabadgyökök káros hatásaival szemben. Az egyik – és leghatékonyabb – módszer, hogy a sejtekben megtalálhatóak olyan enzimek, amelyek a szabadgyökök bomlását katalizálják, így azok hamarabb elbomlanak, minthogy kárt tennének a sejtek szerkezetében. Ezek az enzimek nem egymagukban, hanem egymással együttműködve, lépésről-lépésre alakítják a reaktív gyököket kevésbé reaktív vegyületekké. Az ilyen folyamatokat kaszkád reakcióknak nevezzük.

Kézenfekvő lenne ezeket az enzimeket közvetlenül használni ipari folyamatok során, ám ez sajnos nem ilyen egyszerű, hiszen az enzimek nagyon érzékenyek a környezeti paraméterekre. A kémhatás, hőmérséklet, nyomás, ionerősség apró változásai is nagyban befolyásolhatják az enzimek működőképességét. Az ipari folyamatok során jelen lehetnek a reakcióelegyben inhibitorok, amelyek akadályozzák a katalízist, ráadásul előállításuk/kinyerésük is sok esetben drága, érzékenyséjük miatt tárolásuk és szállításuk is nehézkes, és nem megfelelő körülmények között a teljes aktivitásukat is elveszíthetik.

Az egyik megoldás az enzimek működőképesség tartományának kiterjesztésére azáltal, hogy szilárd hordozókon immobilizáltatjuk, amelyek megvédik az aktív centrumot a számára káros hatásoktól. Egy hordozó felületén többféle enzimet megkötve olyan rendszereket hozhatunk létre, amelyek különböző enzimaktivitásokat mutatnak, így akár egy teljes kaszkád reakció is lejátszódhat egy hordozón.

A másik megoldást az enzimek helyettesítésére az a felfedezés szolgáltatta, hogy egyes szervetlen nanorészecskék (ún. nanozyme-ok) képesek enzimszerű működéseket utánozni, sokkal szélesebb tartományban képesek hatásuk kifejtésére, mint az enzimek, aktivitásuk mégis vetekszik azokéval. A nanozyme-ok aktivitásának kutatása során nagy figyelmet kell fordítani azok diszperziójának kolloidstabilitására, hiszen a részecskék aggregációja során a felületek

nagysága csökken, amellyel párhuzamosan általában csökken az aktív helyek száma és az aktivitás, valamint biológiai rendszerekben problémát okoz a részecskék aggregációja.

A nanozyme-ok használata önmagukban is alternatívája lehet az enzimeknek, de további lehetőségeket nyit meg, ha a fentebb vázolt módon olyan hordozókon adszorbeáltatunk enzimeket, amelyek maguk is nanozyme-ok, miközben vizsgáljuk, hogy azok kioltják vagy éppen erősítik egymás aktivitását. Így nem csak az enzim tűrőképességét növelhetjük, hanem a rendszert más enzimaktivitásokkal is felruházhatjuk.

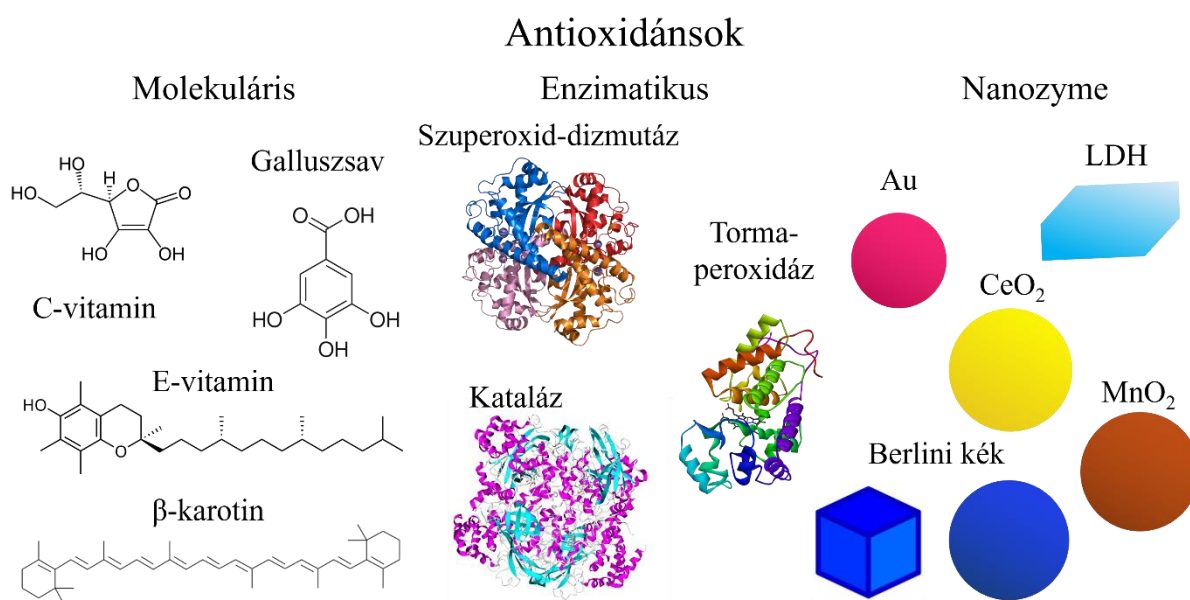
Dolgozatom alapját képező kísérleti munka során polimer bevonattal rendelkező PB nanozyme-ot szintetizáltam, amelynek vizsgáltam kolloidális és morfológiai tulajdonságait. Ezen a részecskén papain enzimet immobilizáltattunk azzal a céllal, hogy vizsgáljuk a kompozit rendszer enzimaktivitását. Kutatásom másik részeként zeolit részecskék ionösszetételének módosításával állítottunk elő réztartalamú zeolitot. Ennek felületén PB nanozyme-okat adszorbeáltuk, majd ezeknek a rendszernek is vizsgáltuk a kolloidstabilitását és biokatalitikus tulajdonságait szabadgyök eliminálási képesség szempontjából.

3. Irodalmi áttekintés

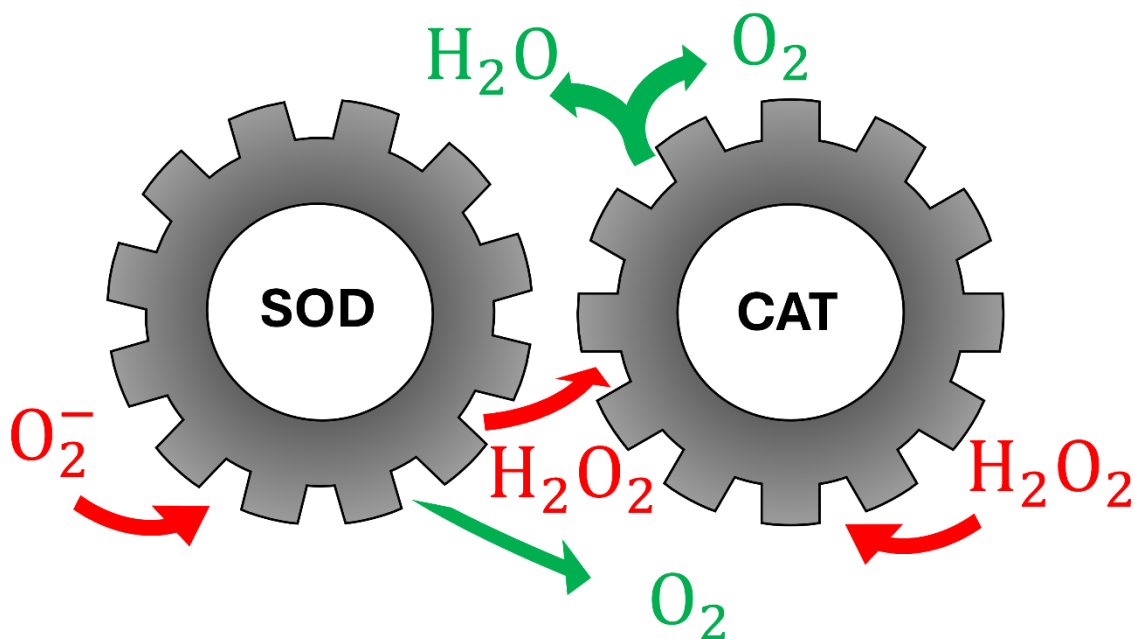
3.1 Antioxidánsok

Az emberi szervezetben vagy az ipari folyamatok során keletkezhetnek olyan anyagok, amelyek káros hatást fejthetnek ki a szervezet működésére vagy az ipari folyamat során előállított termékekre. Ezeknek az anyagoknak egy jelentős részét a szabadgyökök alkotják, amelyek olyan atomok, ionok vagy molekulák, amelyek párosítatlan elektronnal rendelkeznek, így rendkívül reaktívak, ezért számos nem kívánt reakciót idézhetnek elő [1]. Összetételük függvényében beszélhetünk oxigén- (ROS) és nitrogéntartalmú (RNS) szabadgyökökről. Oxidatív stresszről beszélünk, mikor a szervezetben a szabadgyökök egyensúlya felborul [2], ezáltal ellenőrizhetetlen oxidatív folyamatok indulnak be, amelyek számos megbetegedésért felelősek [3]. Egyes kutatások az oxidatív stresszet teszik felelőssé a biológiai szervezetek öregedéséért is. A legkárosabb szabadgyökök között találjuk a szuperoxid gyököt, amely számos szív- és érrendszeri megbetegedés kialakulását okozhatja [4].

Ezen káros hatások elkerülése érdekében használt antioxidánsok blokkolják a szabadgyökök működését, így azok kevesebb káros hatást fejtenek ki [5]. A molekuláris antioxidánsok (pl. vitaminok) a szabadgyökökkel reakcióba lépve állítják le az oxidatív láncreakciókat. Ezek hatékonysága kisebb, mint az enzimatisz antioxidánsoké, de még így is fontos szerepet töltenek be az emberi szervezet működésében [6].



Az antioxidánsok lehetnek enzimek is, amelyek katalizálják a ROS bomlását az oxidatív stressz leküzdésének leghatékonyabb módjaként. Ezek az enzimek együttműködve, egymás után következő katalízisekkel (kaszkád reakciókban) alakítják az ártalmas gyököket ártalmatlan anyagokká. Például SOD enzim képes a szuperoxid gyökök bomlását katalizálni (2. ábra) elemi oxigénre és peroxid-ionra, aminek a bomlását peroxidáz enzimek (kataláz (CAT), torna peroxidáz) képesek katalizálni, így a folyamat végén ártalmatlan anyagok maradnak vissza.



2. ábra: A kaszkád reakciók működésének sematikus ábrázolása. A SOD és a CAT aktivitású enzimek együtt bontják le a káros szuperoxid gyököt.

Habár megfelelő körülmények között az enzimatis antioxiánsok a leghatékonyabbak, használatuk ipari folyamatok során nehézkes, mivel rendkívül érzékenyek a pH-ra, a hőmérsékletre, illetve számos más környezeti tényezőre. Előállításuk sokszor költséges, és érzékenységük miatt tárolásuk és szállításuk is rendkívül körülményes. Éppen ezen nehézségek leküzdése érdekében kezdtek el olyan kutatásokat folytatni, amelyekben enzimeket rögzítettek szilárd hordozók felületén, azzal a céllal, hogy a hordozó megóvja az enzim aktivitását nem ideális körülmények között, ezáltal kiterjesztve azok felhasználhatóságát [7].

Az antioxiáns hatású anyagok egy másik csoportja a „nanozyme-ok”, amelyek olyan szervesetlen anyagokból felépülő nanorészecskék, amelyek biokatalitikus aktivitással is rendelkeznek. Ezek lehetnek fém (Au, Ag, Cu) nanorészecskék, vagy más szervesetlen vegyületek (PB (berlini kék), CeO, LDH (réteges kettős hidroxid)), számos előnyös tulajdonságuk miatt az enzimek alternatívájaként alkalmazhatóak [8]. Előállításuk általában

egyszerű és költséghatékony. Stabil szerkezetük miatt a kémiai stabilitásuk sokkal nagyobb, mint a természetes enzimeké, míg aktivitásuk azokéval összemérhető. Fizikai-kémiai tulajdonságaik finomíthatóak, így a rendszerhez optimalizálhatóak. Mivel toxicitásuk gyakran alacsony és biokompatibilisek, ezért széleskörű orvosi felhasználásokkal rendelkeznek, mint rákellenes szer, öregedésgátló vagy gyulladáscsökkentő [9].

A nanozyme-ok aktivitását jelentős mértékben befolyásolja felületük töltésviszonya és diszperziójuk kolloidstabilitása. Amennyiben a nanozyme kolloid aggregációja kicsi, úgy a részecskék nagy felülete tartósan megmarad, ami az aktív helyek nagy száma miatt növeli az aktivitást. A nanozyme-ok bioaktivitásának vizsgálata során nagyon fontos szempont azok diszperziójának kolloidstabilitása.

Az utóbbi időben igény mutatkozott olyan kutatásokra, amelyekben nem csak egyfajta enzimet immobilizálnak egy hordozó felületén, hanem többfélét, így a szabadgyököket lebontó kaszkád reakciók akár egyetlen hordozórészecske felszínén is lejátszódhatnak. Emellett kísérletek folytak azzal kapcsolatban is, hogy a már magában is biokatalitikus aktivitással bíró részecskék (nanozyme) felszínén kössenek meg enzimet, ezáltal ötvözve a részecske és az enzim aktivitását [10]. Szintén felkapott kutatási terület a nanozyme-ok egymáson történő megkötése ebből a célból [11]. Az immobilizálás során fontos vizsgálni az egyes hordozók felületi és kolloid tulajdonságait, illetve a megkötendő anyagok (enzim, nanozyme) töltését és stabilitását.

3.2 Berlini kék nanorészecskék

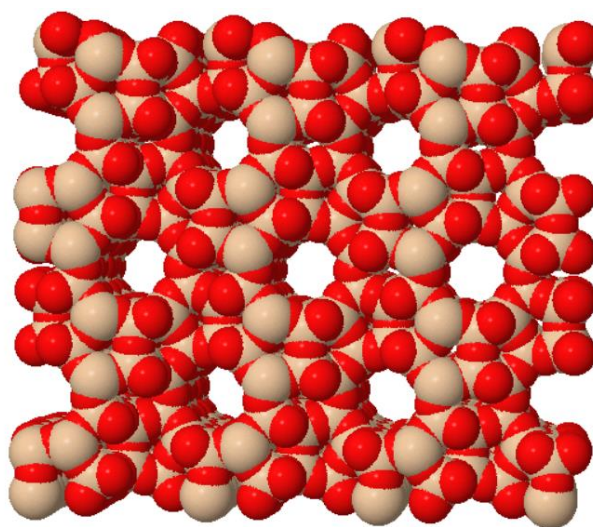
A PB egy vas(II) és vas(III) ionokat is tartalmazó vas-cianid komplex. 1706-ban fedezték fel Berlinben, Poroszország akkori fővárosában – innen az anyag angol neve (Prussian Blue) –, és jellegzetes kék színe miatt kezdetben festékként használták. Olcsó előállíthatósága és erős, ellenálló színe miatt hamar népszerű lett. Receptje az 1720-as évekig titkos maradt, mikor egy német gyógyszerész elküldte azt a Királyi Természettudományos Társaságnak (Royal Society) névtelen megjelenítés céljából [12]. Előállításával kapcsolatban a mai napig folynak kutatások, például azt szem előtt tartva, hogy polimerek segítségével hogyan befolyásolhatóak a keletkező részecskék morfológiai tulajdonságai. Habár a PB történetéből látszik, hogy már több mint három évszázada használt vegyület, az utóbbi 60 évben mégis rengeteg új, az eredetitől teljesen eltérő, de nagyon ígéretes alkalmazási területét fedezték fel. Nanozyme-ként biokompatibilitása miatt számos orvosi felhasználása ismert. Gyulladáscsökkentő hatásának köszönhetően segítheti bőrátültetések hatékonyságát [13], különféle enzimaktivitásaiból kifolyólag

csökkentheti a vastagbélgyulladást az intravénás kezelés mellékhatásai nélkül [14], de az összejt terápia eredményességét is fokozhatja annak köszönhetően, hogy növeli az összejt túlélési képességeit nagy oxidatív stressz esetén az ROS-ek bontásával [15]. PB nanozyme-okat használnak az emberi szervezetben található talliumion eltávolítására, mivel szerkezete alkalmas ioncserére, így képes megkötni a tallium ionokat, majd vizelet formájában távozni a szervezetből. A talliummegkötő hatása szennyvizek esetén is használható, mikor mágneses nanorészecskéket hoznak létre, amik más ionok magas koncentrációja mellett is képesek a tallium megkötésére, majd a PB mágneses tulajdonságának köszönhetően könnyen szűrhetők, ezzel olcsó és egyszerű módszer biztosítva a mérgező fém ionjainak eltávolítására [16].

Kutatások bizonyították, hogy a PB nanozyme képes elbontani a káros szabadgyököket, amellyel gátol oxidációs láncreakciókat. Rendelkezik SOD, CAT és POD aktivitással is, így akár egymaga is képes a szuperoxid gyökök lebontásra kaszkád reakcióban [17]. Ezek az aktivitások a PB-ben megtalálható különböző oxidációs állapotban lévő vasionoknak köszönhető. Mint már említettem, a nanozyme-ok aktivitásvizsgálatának fontos eleme diszperzióik kolloidstabilitása, mivel aktivitásuk sokszor függ az aggregációs tulajdonságaiktól. Emellett felhasználhatóságukat is nagymértékben befolyásolja, hogy milyen a stabilitásuk.

3.3 Zeolit részecskék

A zeolit egy a földfelszínen is megtalálható ásvány, amely szerkezetét tekintve víztartalmú alumoszilikát. Az emberiség a történelem előtti idők óta használja ezt a vulkáni tufákban



3. ábra: A ZSM-5 zeolit szerkezete. A mikropórusoknak köszönhetően sok esetben jó katalizátor, és használható nagy szelektivitású műszerek készítéséhez.

gyakran előforduló ásványt. Kezdetben csak építkezésre szolgált, de az elmúlt évtizedekben ennek az anyagnak is széleskörű felhasználási területeit kezdték kutatni [18]. A kedvező tulajdonságait annak köszönheti, hogy szerkezetében mikropórusok találhatók (3. ábra) [19], így nagy fajlagos felülettel bír. Ezáltal rendkívül alkalmas adszorbeáló anyagnak, amit például levegőtisztítások szűrésében tudnak kihasználni. Emellett a pórusok méretéből kifolyólag alkalmas nagy szelektivitással rendelkező gázérzékelők készítéséhez [20]. A nagy fajlagos felület kedvez a katalitikus tulajdonságoknak is, míg a zeolit nagy ioncserére való hajlamának köszönhetően könnyen változtatható a felület összetétele, így ennek módosítása ígéretes eszköz különféle aktivitású nanozyme-ok előállítására [21].

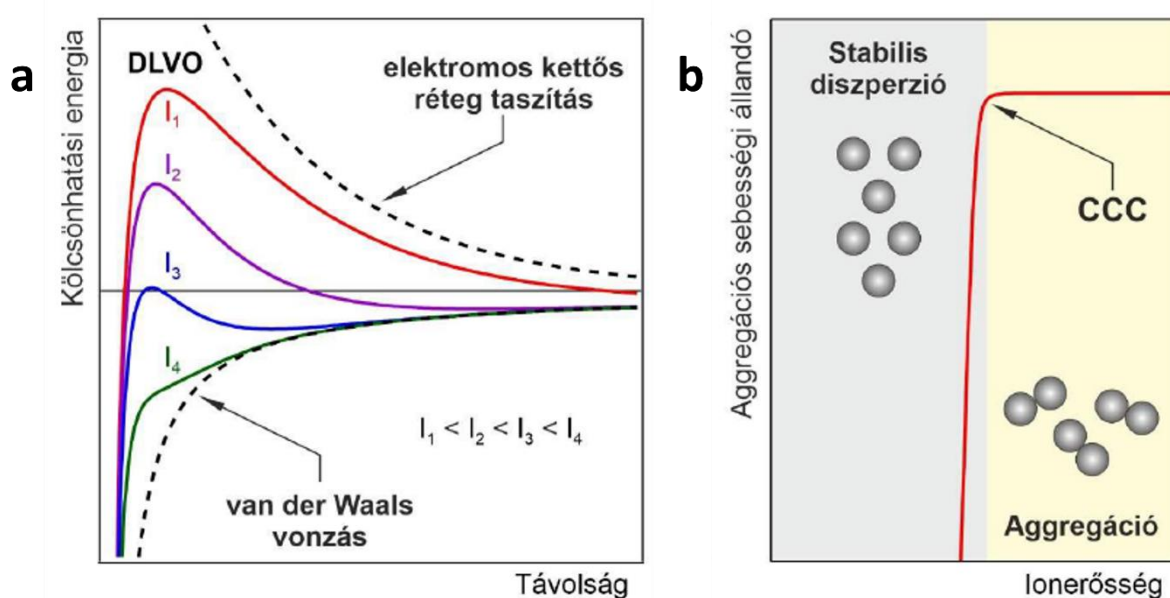
3.4 Papain enzim

A PPN egy proteáz (PRT) enzim, amely azt jelenti, hogy képes polipeptidok és fehérjék bontására azáltal, hogy a bennük található peptidkötéseket hidrolizálja. A természetben megtalálható a nyers papaya gyümölcsben, innen ered a neve. Aktivitásának magyarázata a különleges szerkezetében rejlik [22]. Számos előnyös tulajdonsággal rendelkezik, mint például olcsón előállítható, annak köszönhetően, hogy a papaya minden trópusi területen terem, emellett szezonális korlátai sincsenek, míg maga a papain enzim a pH és hőmérséklet viszonylag széles tartományán működőképes. Éppen ezért felhasználása is széleskörűen a gyógyszeripartól a biotechnológián át a sörfőzésig. Kutatások bizonyítják, hogy a papain immobilizálásra kiválóan alkalmas enzim, sok esetben a felületen való megtapadást követően is megtartja aktivitásának jelentős részét [23].

3.5 A kolloidstabilitás

A nanozyme rendszereknél kiemelten fontos azok vizes diszperziójának kolloidstabilitása, mivel legtöbbször vizes közegben alkalmazzuk őket (pl.: vér, sejtplaza, szennyvíz). Egy diszperzió kolloidstabilitása arról ad információt, hogy egy rendszer képes-e megtartani diszperziófokát, azaz képes-e ellenállni az aggregációt okozó hatásoknak. Ez szoros összefüggésben van a kolloidot alkotó nanorészecskék felületének tulajdonságaival. Például, ha a részecskék felszínén nagy felületi töltés található, akkor az ezek között ható elektrosztatikus taszítás stabilizálhatja a rendszert. A felületen immobilizált polimerek is csökkenthetik a diszperzióban tapasztalható aggregációt azáltal, hogy szterikusan gátolják a részecskék összetapadását.

A DLVO (Derjaguin-Landau-Verwey-Overbeek) elmélet, amely a kolloidok aggregációját leíró egyik elmélet arra vezeti vissza a részecskék összetapadását, hogy köztük van der Waals erők vonzó kölcsönhatást fejtenek ki [24]. Emellett a nanorészecskék felületén pH-tól, szerkezettől vagy esetleg töltéssel rendelkező immobilizált anyagtól függően töltés van jelen, amely elektrolitok jelenlétében elektromos kettősréteget hoz létre. Ennek szerkezetét egyrészt a felület közelében lévő elektrosztatikusan erősen kötött ellenionok alkotják, amelyek kifelé nagymértékben árnyékolják a felület töltését, másrészt a részecskétől távolabb elhelyezkedő, gyengébben kötött ellenionok [24], mely a részecskék között elektrosztatikus taszítást eredményez [25]. A DLVO elmélet azon a felismerésen alapszik, hogy ezeknek a hatásoknak az egymáshoz viszonyított mértéke határozza meg a kolloidstabilitást (4.(a) ábra).



4. ábra: A DLVO elmélet által figyelembe vett kölcsönhatások eredő nagysága különböző ionerősségek (I) esetén (a) és a kritikus koagulálási koncentráció megállapítása az aggregációs sebességi állandó - ionerősség függvény alapján.

Míg a vonzó kölcsönhatás csak a részecskék távolságtól, geometriájától és a felület minőségétől függ, addig a taszítást az elektromos kettősrétegek átlapolódása okozza, amely vastagságát viszont erősen meghatározza a rendszer ionerőssége. Az elmélet szerint az ionerősség növelésével az aggregáció sebessége erősen nő, és konstans értéket vesz fel a kritikus koagulálási koncentráció (CCC) felett (4.(b) ábra) [26].

A mérés technikák fejlődésével egyre több eszköz vált elérhetővé az aggregáció és a felületek vizsgálatára, mint például a dinamikus fényszórásmérés (DLS) és az elektroforetikus fényszórásmérés (ELS), amelyek segítségével közvetlenül tudjuk tanulmányozni a koagulálási sebességet és a felületek tulajdonságait. Az újabb mérések rávilágítottak, hogy a DLVO elmélet

számos kölcsönhatást figyelmen kívül hagy, így előfordulhat, hogy egy rendszer működése lényegesen eltér attól, amit a DLVO elmélet szerint várnánk [27].

4. Célkitűzés

Az utóbbi években nagy figyelem fordult az enzimaktivitást mutató nanorészecskék, az ún. „nanozyme”-ok vizsgálatára. Ennek oka, hogy bár ezek a nanorészecskék képesek enzimekhez hasonlóan működni, azok számos negatív tulajdonságát mégsem mutatják, így például kevésbé érzékenyek a nyomás-, hőmérséklet- és pH változásaira, nem denaturálódnak, és előállításuk sokszor költséghatékony is. További előnye ezeknek a rendszereknek, hogy több nanozyme-ból vagy enzimből előállíthatóak olyan kompozitok, amelyek ötvözik az őket felépítő anyagok tulajdonságait, vagy akár erősíteni is képesek egymás aktivitását. Berlini kék és réztartalmú zeolit részecskéket állítunk elő azzal a céllal, hogy több enzimaktivitást ötvöző kompozitokat, kaszkád reakció által vezérelt antioxidánsokat hozzunk létre.

Mivel a nanorészecskék vizes diszperzióban vannak jelen, ezért nagyon fontos tényező a kolloidstabilitás. A szintézisek során minél nagyobb kolloidstabilitású anyagokat terveztünk előállítani, amelyek aggregációs tulajdonságait dinamikus fényszórásméréssel és elektroforetikus mobilitásuk meghatározásával ellenőriztük.

Célul tűztük ki, hogy a szintetizált anyagokból kompozitokat állítsunk elő, kihasználva, hogy az ellentétes felületi töltésű anyagok elektrosztatikusan képesek megkötődni egymás felületén. Nem csak nanozyme-okat, hanem enzimet is adszorbeáltattunk nanorészecskék felszínén, amihez meghatároztuk az egyes részecskék felületi töltését. Ha a részecskék töltésének előjele megegyezik, akkor valamelyik anyagot egy ellentétes töltésű polielektrolittal kezelve tudjuk olyan formára hozni, hogy az már elektrosztatikusan kötődni tudjon a másik részecskéhez. Az előállított kompozitok esetén is fontos tényező, hogy megfelelő kolloidális stabilitással rendelkezzenek, így ezek kolloidstabilitását is kívántuk vizsgálni a fentebb említett módszerekkel.

A nanorészecskék és a kompozitok enzimaktivitását is vizsgáltuk annak megállapítására, hogy az adszorpció mennyire befolyásolja a részecskék aktivitását. Kutatásunk során szuperoxidáz, peroxidáz és a papain enzimmel adszorbeált részecskék esetén proteáz aktivitást vizsgáltunk. Fő célunk, hogy létre tudjunk hozni olyan kompozitokat, amelyben az őket felépítő anyagok jelentős részben megtartják az enzimaktivitásukat. Ezen kívül előfordulhat – a fő célunkon is túlmutatóan –, hogy a kompozitot felépítő anyagok nem csak megtartják aktivitásukat, de még erősíteni is képesek a másik anyag aktivitását. Ezzel olyan enzim aktivitás növekedést tudunk elérni, amely az anyagok külön-külön használatakor nem lenne lehetséges.

5. Kísérleti rész

5.1 Felhasznált vegyszerek

Az alábbi táblázat szemlélteti a kísérletek során felhasznált vegyszereket, tisztaság, gyártó feltüntetésével.

1. táblázat: A kísérletek során felhasznált vegyszerek.

Név (rövidítés)	Tisztaság	Gyártó	Megjegyzés
Réz(II)-acetát	≥98%	Sigma-Aldrich	
H ₂ O ₂	n.a.	Sigma-Aldrich	
Poli(diallil-dimetil-ammónium-klorid) (PDADMAC)	n.a.	Sigma-Aldrich	M ≈ 225 kg/mol
Folin-Ciocalteu reagens	n.a.	Sigma-Aldrich	
Papain (PPN)	≥ 3 U/mg	Sigma-Aldrich	
3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB)	≥99%	Sigma-Aldrich	
CaCl ₂	Reag. min.	VWR	
Kazein	n.a.	VWR	
Gvajakol	99%	VWR	
Nitro kék tertazólium klorid (NBT)	≥98%	VWR	
HCl	n.a.	VWR	37 m/m%
L-tirozin	99%	VWR	
MgCl ₂ · 6H ₂ O	99%	VWR	
Poli-vinilpirrolidon (PVP)	n.a.	VWR	M ≈ 5 kg/mol
KCl	99,5%	VWR	
K ₃ [Fe(CN) ₆]	99%	VWR	
NaCl	99,8%	VWR	
NaOH	98,5%	VWR	
NaH ₂ PO ₃	Reag. min.	VWR	
Na ₂ HPO ₃	Reag. min.	VWR	
Triklórecetsav (TCA)	99,5%	VWR	
Ammónium ZSM-5 zeolit	n.a.	Thermo Scientific	Si:Al 23:1

Kísérleteinkhez egy Adrona vízlágyító rendszerből származó ioncserélt vizet használtunk, amelyet a fényszórásmérésekhez 100 nm pórusméretű Millex fecskendőszűrőn szűrtünk át.

5.2 Szintézismódszerek

5.2.1 PB nanokockák szintézise

A berlini kék (PB) nanokocka szintézisének receptjét a szakirodalomban találtuk [29]. A szintézis során 9,0 g polivinil-pirrolidon (PVP) polimerből és vörösvérlúgsóból (K₃[Fe(CN)₆])

készítettünk oldatot, amelynek kémhatását sósavval pH 2-re állítottuk. Ezt az oldatot 20 órán át 80 °C-on kevertettük. Az oldat először lassan bezöldült, majd sötétkék lett, jelezve a PB kialakulását. A keletkező diszperziót tisztítottuk, többször centrifugáltuk (11000 rpm, 12 percen át) majd mostuk először ioncserélt vízzel és etanollal, majd pH 4-es hidrogén-klorid oldattal. Végül 2000 mg/l koncentrációjú 4-es pH-jú törzsoldatot kaptunk.

5.2.2 Papainnal funkcionális PB előállítása

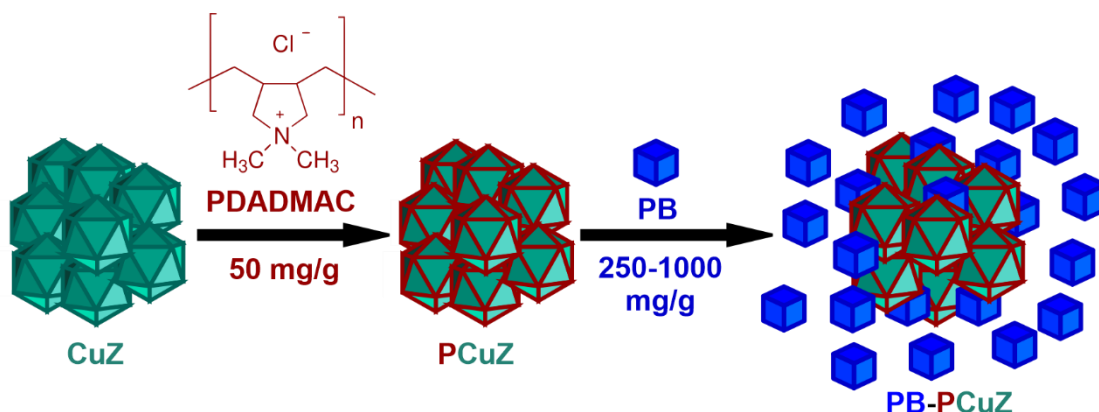
Olyan diszperziót készítettünk, amely 400 mg/l PB-t és 100 mg/l PPN-t tartalmaz, és állni hagytuk fél órán át, hogy az immobilizált és a szabad PB közötti egyensúly beálljon. Ezt a diszperziót a kutatásunk során közvetlenül használtuk a kísérletekben. A dolgozatomban a PB-PPN koncentrációja alatt mindig a benne lévő PB koncentrációját értem.

5.2.3 Réztartalmú ZSM-5 zeolit (CuZ) szintézise

Egy, a szakirodalomban már korábban leírt módszert használtunk a CuZ részecskék szintetizálásához [30]. Ez egy ioncserén alapuló módszer, amely során a zeolit némely ionja réz(II) ionra cserélődik. A szintézis során először az ammónium-ZSM-5-öt réz-acetát oldattal kevertettünk (5mM), majd kevertettük 24 órán keresztül. Ezután a terméket centrifugáltuk, és többször mostuk ioncserélt vízzel, majd 60 °C-on szárítottuk. A zeolitban maradt ammóniumionok eltávolítása érdekében így kapott port 550 °C-on hevítettük.

5.2.4 PB-PCuZ kompozitok előállítása

A PB-PCuZ részecskék szintetizálása során először CuZ port vízben diszpergáltunk, majd ultrahangos kezelésnek vetettük alá, hogy a részecskeméret minél kisebb legyen. Ezután 50 mg/g dózisnak megfelelő PDADMAC-ot adtunk hozzá (azaz 1 g CuZ-hez 50 mg PDADMAC-ot), és megvártuk, hogy a polimer megkötődjön a CuZ felületén, ez fél órát vett igénybe. Végül 250 mg/g vagy 1000 mg/g PB-t adtunk hozzá, és 1 órát vártunk a PB nanokockák immobilizálódására (5. ábra). A PB mennyiségétől függően neveztük a keletkező anyagokat PB-PCuZ(1:4)-hek, illetve PB-PCuZ(1:1)-nek. A mintákat hűtőszekrényben tároltuk 4 °C-on. A kísérletek előtt mindig ultrahangosan kezeltük őket, hogy homogének legyenek.



5. ábra: A PB-PCuZ előállításának sematikus ábrája.

5.3 Mérési módszerek

5.3.1 Transzmissziós elektronmikroszkópia

A TEM mintaelőkészítés során a nanozyme-ok híg diszperziójának (1-2 mg/l) 5 μ l-ét egy szénréteggel bevont Formvar fóliás réz mintatartóra (gridre) cseppentettük, majd szobahőmérsékleten rászárítottunk. A TEM felvételeket egy Jeol JEM-1400Plus típusú műszerrel készítettük 120 kV gyorsítófeszültség alkalmazásával. A részecskeméret-eloszlás meghatározásához ImageJ software-t használtunk.

5.3.2 Elektron paramágneses spektroszkópia

Az elektron paramágneses spektrumokat (EPR) BRUKER EleXsys E500 spektrométer segítségével vettük fel 9,45 GHz-es 1,3 mW teljesítményű mikrohullámmal, amely 5 G amplitúdójú 100 kHz frekvenciájú sugárzással lett modulálva. A mérések és számítások során a mágneses tér nagyságát G (Gauss = 10^{-4}) egységben adtuk meg. Mivel a mintákat fagyasztott állapotban mértük, így a minta 0,2 ml-éhez 0,05 ml metanolt kevertünk, hogy megakadályozza a víz kikristályosodását. A keveréket EPR kvarc küvettákban, folyékony nitrogén jelenlétében mértük. A tájolásfüggő vonalszélesség paramétereket (α , β és γ) használtuk a vonalszélesség függvény illesztéséhez az alábbi egyenlet alapján:

$$\sigma_{MI} = \alpha + \beta_{MI} + \gamma_{MI},$$

ahol MI a réz(II) ion mágneses kvantumszámát jelenti. Mivel a réz tartalmú anyagok szintetizálása során olyan réz-kloridot használtuk, amely ^{63}Cu -t és ^{65}Cu -t is tartalmaz, ezért a spektrumokat ezen izotópok természetbeni előfordulási arányához kalkuláltuk.

5.3.3 Raman spektroszkópia

A Raman spektrumokat egy Bruker Senterra II Raman mikroszkóppal rögzítettük 532 nm-es 25 mW teljesítményű lézerfényt használva. A méréseink során 32 darab 4 másodperces expozíciós idővel rendelkező mérés eredményét átlagoltuk.

5.3.4 Időfüggő dinamikus fényszórás

A kolloidstabilitás méréséhez dinamikus fényszórásmérő készüléket (LS Instruments) használtunk 3D módban [31], 633 nm hullámhosszúságú lézerfényt alkalmazásával 150° -os szórási szögnél történő detektálással. A műszer által mért szórt fény intenzitások autokorrelációs görbéinek kumuláns illesztéséből kaptuk meg a részecskék diffúziós állandóját (D), amelyből ki tudtuk számítani a részecskék hidrodinamika sugarát a Stokes-Einstein egyenlet segítségével:

$$R_h = \frac{kT}{6\pi\eta D}, \quad (1)$$

ahol k a Boltzmann állandó, T az abszolút hőmérséklet, η pedig a diszpergáló közeg dinamikus viszkozitása (vizes közegben ez 1,001 mPa·s).

Az időfüggő mérések során általában 100 darab 20 másodperces mérést indítottunk egymás után. A korai aggregációs szakaszra egyenest illesztettünk és ennek meredekségéből számítottuk a látszólagos aggregációs sebességi állandó (k) értékét:

$$k = \frac{1}{R_{h0}} \left(\frac{dR_h}{dt} \right)_{t \rightarrow 0}, \quad (2)$$

ahol R_{h0} a kezdeti hidrodinamikai sugár.

A kolloidstabilitást az úgynevezett stabilitási aránnyal jellemeztük (W). Ezt az értéket az alábbi módon számítottuk:

$$W = \frac{k_{gyors}}{k}, \quad (3)$$

ahol a k_{gyors} a nagy ionerősségek mellett mért aggregáció látszólagos aggregációs sebességi állandó értéke. Amennyiben W értéke nagy, úgy a kolloid stabil, míg $W=1$ értéknél az aggregáció igen gyors, így a kolloidstabilitás kicsi.

5.3.5 Elektroforetikus mobilitás mérés

Mikor töltéssel rendelkező részecskére külső elektromos térerősség hat (E), azok sebességre (v) tesznek szert az elektrolitban:

$$v = uE, \quad (4)$$

ahol u az elektroforetikus mobilitás. Az elektroforetikus mobilitás mért értékéből ki tudjuk számítani a részecskék ζ -potenciálját a Smoluchowski egyenlet [25] segítségével:

$$\zeta = -\frac{u\eta}{\varepsilon_{rel}\varepsilon_0}, \quad (5)$$

ahol η az elektrolit dinamikus viszkozitása, ε_{rel} az elektrolit relatív permittivitása, míg ε_0 a vákuum permittivitása.

Vizsgálataink során a zéta-potenciál nagy segítségünkre volt, mivel ez egy kísérletileg könnyen mérhető érték, amely információval szolgált a részecskék felületi töltéséről, illetve a zéta-potenciál változásáról, előjelének megfordulásából következtethettünk arra, ha egy ellentétes töltésű molekula/nanozyme megtapadt annak felületén. A megfelelő elektromos tér kialakulásához az elektroforetikus mobilitást mindig minimum 10 mM ionerősség mellett mértük. Az elektroforetikus mobilitás és a zéta-potenciál méréséhez egy Litesizer 500 (Anton Paar) típusú műszert használtunk.

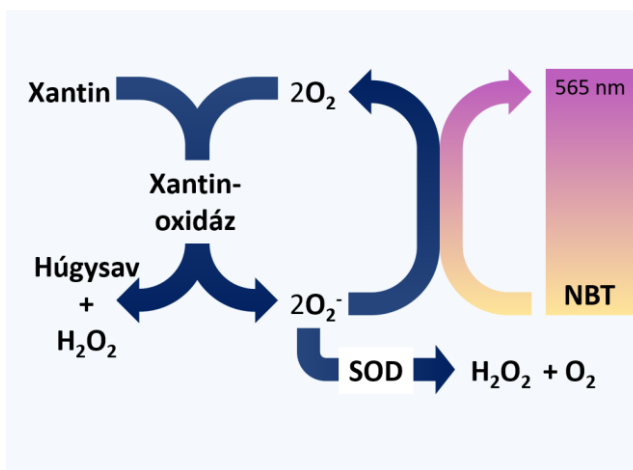
5.3.6 UV-látható spektroszkópia

Kutatásunk során egy Genesys 10S (Thermo Scientific) típusú spektrofotométert használtuk poli(metil-metakrilát) (PMMA) és polisztirol (PS) küvettákkal egyrészt az enzimaktivitás tesztek elvégzéséhez a különböző reagensek koncentrációjának meghatározására, valamint a szabad fehérje koncentráció Bradford teszttel való megállapítására. A méréseket általában egy megfelelő reakcióidő eltelte után (az alábbi tesztreakcióknak megfelelően) a színreakcióre jellemző hullámhossztartományon, vagy adott hullámhosszon végeztük, 1 cm élhosszúságú küvettákban.

5.4 Tesztreakciók

5.4.1 SOD teszt

A SOD aktivitás vizsgálatára Fridovich [32] tesztet alkalmaztunk. Ennek során a xantin húgysavvá és hidrogénperoxiddá bomlik xantin-oxidáz enzim katalízisével (6. ábra). A folyamat közben két elektron felszabadul, amely a reakcióelegyben megtalálható oldott oxigénnel szuperoxid gyököt képez. Ezek a szuperoxid gyökök – miközben elemi oxigénné oxidálódnak – reakcióba lépnek a teszt során a reakcióelegyhez adott NBT festékanyaggal, amelynek színét megváltoztatják (halvány sárgából halvány lilára). Ezt a színváltozást tudjuk



6. ábra: A SOD teszt működési elvének sematikus ábrázolása.

kvantitatíven követni spektrofotométer segítségével 565 nm hullámhosszon. Mikor SOD aktivitású anyagot adunk a reakcióelegyhez, az még az NBT-vel való reakció előtt elbontja a szuperoxid gyököt, így kisebb színváltozást eredményezve a teszt során.

Kutatásaink során úgy állítottuk össze a reakcióelegyet, hogy az 200 μ M xantin, 100 μ M NBT-t, tesztenként különböző mennyiségű nanozyme-ot (általában 0-100 ppm), és 300 ppm xantin oxidázt tartalmazott. Mivel a xantin-oxidáz működéséhez fontos a jól beállított pH, így a teszt során mindig 10 mM foszfátpuffert alkalmaztunk (pH=6,9).

A reakciót 6 percen keresztül folyt, majd az alábbi egyenlet alapján inhibíciót (I) számoltunk az egyes mintákra:

$$I = \frac{\Delta A_0 - \Delta A_s}{\Delta A_0} \cdot 100\% , \quad (6)$$

ahol ΔA_0 az abszorbancia változása 6 perc alatt abban a mintában, amelyben nincs enzimaktivitású anyag, ΔA_s pedig az egyes minták abszorbancia változása azonos idő elteltével. Az így kapott inhibíciós értékeket ábrázoltuk a nanozyme koncentráció függvényében, és az alábbi egyenlet segítségével egyenest illesztettünk a pontokra:

$$I = \frac{I_{max}}{1 + \left(\frac{c_{fél}}{c}\right)^r}, \quad (7)$$

ahol I_{max} a maximális inhibíció, $c_{fél}$ a nanozyme azon koncentrációja, amelynél az inhibíció a maximális érték fele (IC_{50}), r a görbe meredeksége, c pedig a nanozyme koncentráció.

5.4.2 POD teszt

A minták peroxidáz aktivitásának vizsgálatához egy szakirodalomban talált tesztet alkalmaztunk[33]. A teszt során gvajakol és hidrogénperoxid reagál peroxidáz aktivitású anyag katalízisével, amely során tetragvajakol és víz keletkezik. A tetragvajakol maga is színes (barna), így annak mennyisége spektrofotométer segítségével (470 nm) meghatározható.

A teszt során olyan minta sorozatokat készítettünk, amelyekben nanozyme mennyisége állandó, míg a gvajakol mennyisége változik (0-40 mM), és mindegyik diszperzióhoz 2,7 mM mennyiségű H_2O_2 -ot adtunk. Mindegyik oldatot 50 mM koncentrációjú foszfátpufferben készítettük (pH 6,9). A teszt során az így összeállított minták abszorbanciáját mértük 470 nm-en 24 percen keresztül. Az időfüggő abszorbancia mérésből megállapítottuk a reakciósebességet a Lambert-Beer törvény segítségével:

$$v = \frac{m}{l\varepsilon}, \quad (8)$$

ahol m az abszorbancia-idő függvény meredeksége, l a kuvetta hossza cm-ben, amely a mi méréseinkben pontosan 1,0 cm volt, ε pedig a moláris elnyelési koefficiens (amely tetragvajakolra 26,6 1/mM·cm). Az így kapott reakciósebességeket ábrázoltuk a gvajakol koncentrációjának függvényében, majd az így kapott pontokra görbét illesztettünk a Michaelis-Menten egyenlet segítségével:

$$v = \frac{v_{max} \cdot [gvajakol]}{K_M + [gvajakol]}, \quad (9)$$

ahol v_{max} az elméleti maximális sebesség, K_M pedig a Michaelis konstans. Ezen két értékből tudunk arra következtetni, hogy a minták rendelkeznek-e peroxidáz aktivitással, illetve milyen mértékben alkalmas peroxid gyökök bontására.

A szakirodalom egy másik módszert is leír a POD-szerű aktivitás mérésére [34]. Ennek lényege, hogy a H_2O_2 POD aktivitású anyag jelenlétében képes a 3,3',5,5'-tetrametilbenzidin (TMB) oxidálására, így a színtelen TMB-ből egy színes vegyületet létrehozva. A kék színű oxidált TMB 652 nm-en intenzíven elnyel, így ezt mérve spektrofotométerrel meghatározhatjuk egy anyag POD aktivitását. Egy teszt során olyan reakcióelegyet készítettünk, amely tartalmazott

40 mg/l POD aktív anyagot, 0,5 mM TMB-t (10 mM 1:1 arányú dimetil-szulfoxid : víz oldatból) és 10 mM foszfát puffert (pH 6,9). A rendszerhez 15 mM H₂O₂-t adtunk, 10 perc múlva 400-800 nm tartományon felvettük a minták spektrumát. A relatív POD aktivitást a vakmintához képesti eltérésekből számítottuk, ami azt jelenti, hogy a legaktívabb mintát tekintettük 100%-nak.

5.4.3 Proteáz teszt

Ennél az enzimtesztnél azt vizsgáljuk, hogy valamely nanozyme-ok vagy kompozitok képesek-e PRT enzimet utánozni, azaz katalizálják-e fehérjék bomlását azáltal, hogy a bennük lévő peptidkötéseket hidrolizálják. A PRT enzim ugyanis először kisebb egységekre, majd aminosavakra képesek bontani a fehérjét. Ezen enzimaktivitás vizsgálatára mi egy olyan protokolt használtunk, amely a Lowry módszeren alapul [35].

A teszreakcióhoz készített mintasorozat tartalmazott: 100 µl törzsoldatot (100 mg/l PPN vagy 400 mg/l PB-PPN, 2 mM-os nátrium/kalcium-acetát (Na:Ca = 2:1), 4 mM kálium-foszfát tartalmú pH = 7,5 oldatban) és 500 µl kazein törzsoldatot (melynek koncentrációja 6,5 g/l, pH-ját 50 mM foszfát pufferral 7,5-re állítottuk). Vakmintát is készítettünk 100 µl enzim/nanozyme törzsoldatból és 500 µl ioncserélt vízből. A reakciót hagytuk 20 percig lejátszódni, majd a mintákhoz 500 µl 110 mM-os triklórecetsavat adtunk, és temperáltuk azokat 37 °C-on 30 percig. Ezek után a mintákat centrifugáltuk 10 percig 10000 rpm-es fordulatszámon, annak érdekében, hogy eltávolítsuk a diszpergált nanorészecskéket. A felülúszóból leszedtünk 1 ml folyadékot, majd ehhez 0,75 ml 0,5 M-os nátrium-karbonát oldatot adtunk. Ezután újra centrifugáltunk, hogy eltávolítsuk a keletkezett csapadékot. Később 0,1 ml 0,5 M koncentrációjú Folin-Ciocalteu reagenst adtunk a mintához, és 37 °C-on temperáltuk fél órán keresztül. A minták színváltozását spektrofotométerrel mértük 660 nm-en. Végül tirozin kalibrációsorozatot készítettünk, ennek alapján tudtuk megállapítani az egyes minták aktivitását.

5.4.4 Bradford teszt

Bradford teszttel határoztuk meg a PB felületén megtapadt papain fehérje mennyiségét indirekt módon [36]. Ennek a tesztnek a lényege, hogy meg tudjuk mérni a szabad fehérje koncentrációját, majd ezt az fehérje bemérési koncentrációjával összehasonlítva a megkötött fehérje mennyisége meghatározható.

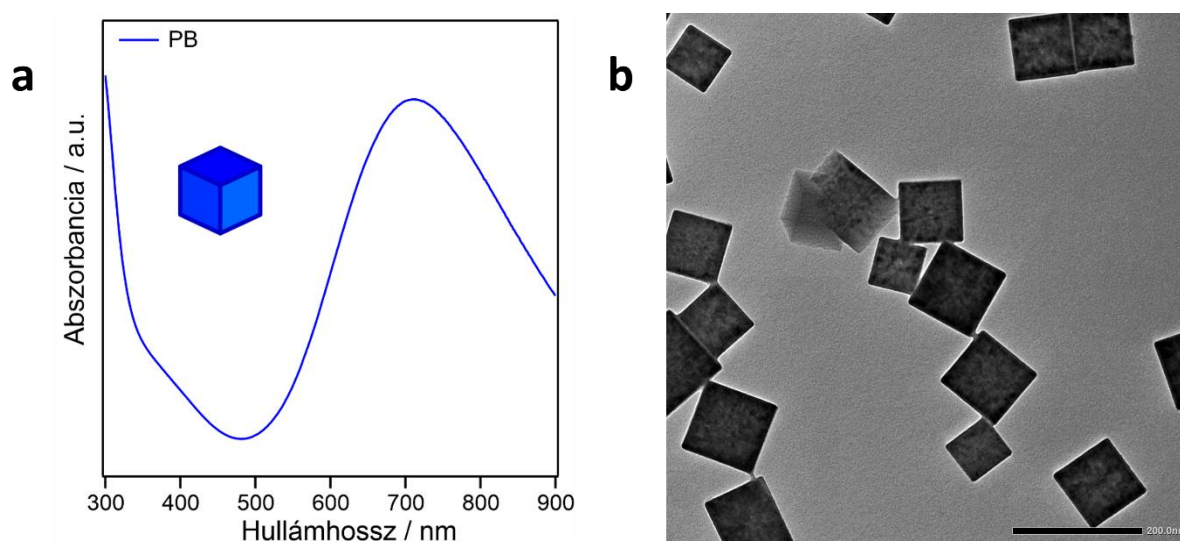
A teszt elvégzése során először Coomassie brillantkék (CBB) törzsoldatot készítettünk: 10 mg CBB porból, 5 ml etanolból és 10 ml 85%-os foszforsavból 100 ml törzsoldatot készítettünk. A papain kalibrációs oldatsorozathoz 0-8 mg/l koncentrációjú papain oldat 0,4 ml-éhez adtunk 1,6

ml CBB reagenst. A reagens a szabad fehérjével színes komplexet képez, melynek abszorbanciája a fehérje mennyiségével arányos, így spektrofotométerrel meghatározható az oldatban jelenlévő fehérje mennyisége. Az anyagokat 5 percig hagytuk reagálni, majd mértük a minták abszorbanciáját 595 nm-en. Hasonlóan jártunk el a 40 mg/l koncentrációjú PB-PPN diszperzió esetében is, így abszorbanciájának változásából következtetni tudunk a szabad fehérje koncentrációjára, ebből pedig a PB felületen megkötött fehérje mennyiségét meghatároztuk.

6. Eredmények

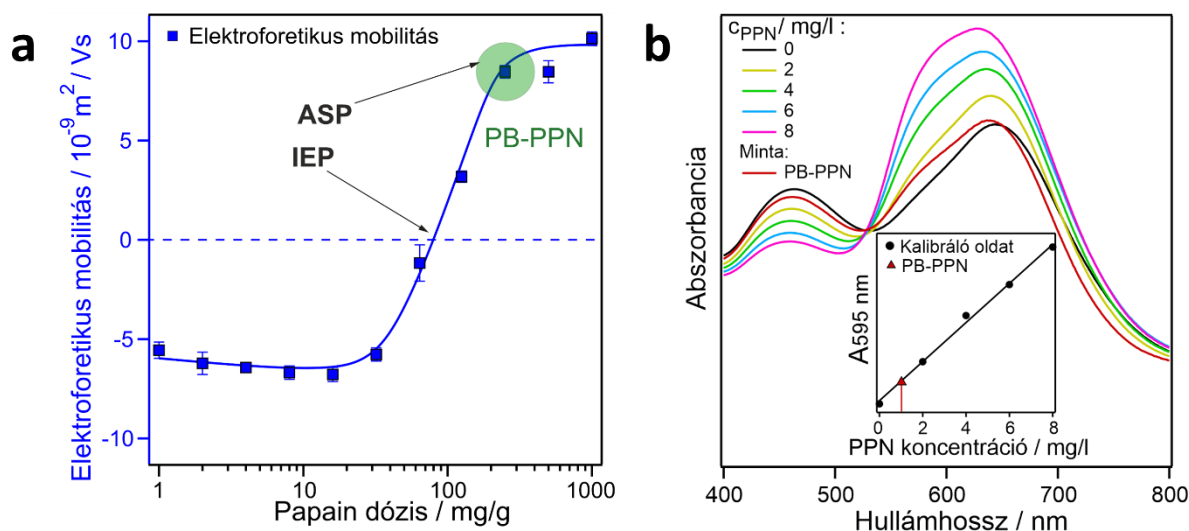
6.1 Kompozitok jellemzése és kolloidstabilitásuknak vizsgálata

Elsőként megvizsgáltuk, hogy valóban sikerült-e PB nanorészecskét előállítanunk. A szintézis termékének abszorbancia spektrumán megközelítőleg 700 nm-en egy széles csúcs figyelhető meg (7.(a) ábra), amelyet a Fe(II)-Fe(III) töltésátviteli sávok okoznak [37]. A nanorészecskék morfológiai jellemzését transzmissziós elektronmikroszkóppal végeztük. A TEM képekből megállapítottuk, hogy a PB részecskéink kocka alakúak, amely a PVP polimer hatásának köszönhető a megfelelő szintézis körülmények között (7.(b) ábra). A részecskék méreteloszlását egyrészt a TEM felvételek alapján, másrészt dinamikus fényszórásmérés segítségével határoztuk meg. A TEM felvételen kisebb aggregátumokat láttunk, amelyek a száradás közben keletkezhettek. Az elsődleges részecskeméret a $94,5 \pm 21,6$ nm, és polidiszperzitási indexe 0,068, tehát a szintézisünk terméke monodiszperznek tekinthető. A pH széles tartományán nagy a PB kolloidstabilitása, de 10-es pH mellett már a részecskék lassú oldódását figyeltük meg.



7. ábra: A PB UV-látható spektruma, amelyen ~ 700 nm-es tartományban nagyfokú elnyelést tapasztalunk (a). A TEM felvétel alapján megállapítottuk, hogy a nanozyme-ok kocka alakúak, és monodiszperz méreteloszlásúak (b).

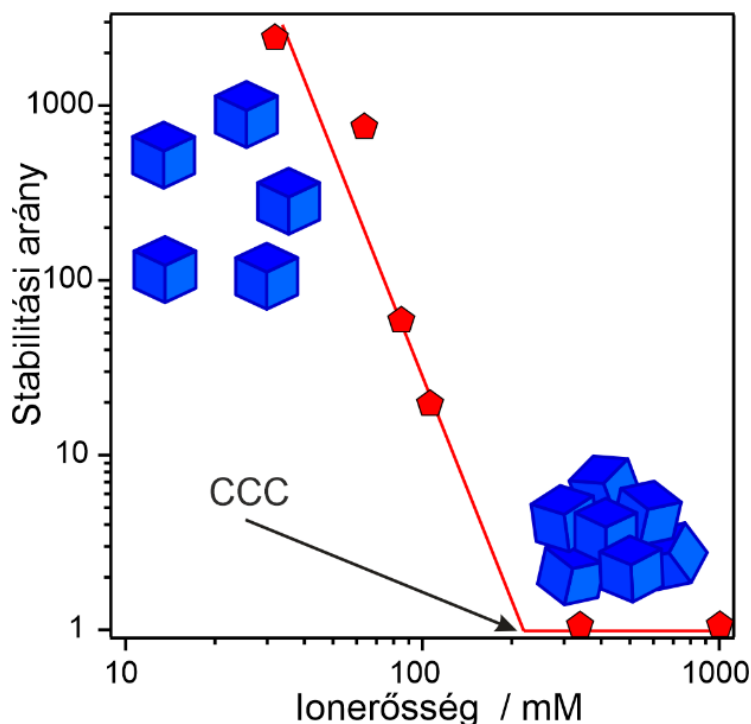
Az elektroforetikus mobilitás mérésének eredményéből meghatározható a felület töltése. A PB felszíne negatív töltésű, hiszen negatív zéta potenciált mértünk. Ennek az eredménynek a további kísérleteink szempontjából is fontos, mert megállapítottuk, hogy kompozit előállításához pozitív töltésű részecskéket vagy polielektrolitokat tudunk elektrosztatikusan megkötni a PB felszínén.



8. ábra: A PB részecskék elektroforetikus mobilitásának változása a PPN dózis függvényében, jelölve az IEP-t és az ASP kezdőpontja. A vonal a szem vezetésére szolgál (a). A Bradford teszt során felvett abszorbcia spektrumok a különböző szabad PPN koncentrációk és a PB-PPN esetében. Benne az 595 nm-en mért abszorbcanciák a PPN koncentrációjának függvényében, pirossal jelölve a PB-PPN kompozitot (b).

Az adott PB, de különböző PPN mennyiségét tartalmazó mintákon mért elektroforetikus mobilitás adatokból megállapítottuk a PPN optimális mennyiségét a kompozitban, az adszorpciós telítési plató (ASP) kezdőpontját (250 mg/g), ahol további papain hozzáadása már nem járul hozzá a PB töltésének növeléséhez, így a további vizsgálatokat ezzel az összetételű kompozittal végeztük (8.(a) ábra). A DLS és az ELS mérések viszont nem adnak információt a papain adszorpciójának mennyiségéről a PB felületén, ezért Bradford tesztet végeztünk a kompozitra. A vizsgálat során a diszperzió 40 mg/l PB-t és 10 mg/l PPN-t tartalmazott, a teszt eredménye azt mutatta, hogy oldatban $\sim 1 \text{ mg/l}$ szabad PPN található (8.(b) ábra), azaz a PPN $\sim 90\%$ -a adszorbeálódott a PB nanokockák felszínén. A PB-PPN-ről készült TEM felvételek nem mutatnak jelentős eltérést a PB-hez képest. Elsődleges részecskeméret $102,4 \pm 23,5 \text{ nm}$, míg a polidiszperzitási index 0,078-nak. A hidrodinamikai sugár és az elektroforetikus mobilitást mértük különböző pH-kon (4-10), amelyek alapján monodiszperz a rendszer, és a felülete lúgos közegben áttöltődik, de az izoelektromos pontnak (IEP) megfelelő pH-n sem tapasztaltunk aggregációt.

A nanozyme-ok potenciális alkalmazása szempontjából fontos a kolloid rendszerek stabilitásának vizsgálata különböző típusú és koncentrációjú elektrolitok jelenlétében. A PB és PB-PPN ellenállásának vizsgálatát a só indukálta aggregációval szemben különböző elektrolitoldatokban végeztük: NaCl, KCl, CaCl₂ és MgCl₂ elektrolitban. A NaCl, KCl és CaCl₂ jelenlétében még nagy ionerősségek mellett se aggregáltak a részecskék, csak MgCl₂ elektrolitban tapasztaltunk aggregációt (9. ábra), de a kritikus koagulálási koncentráció (CCC) ebben az elektrolitban is igen nagy értéknek adódott (714 mM).

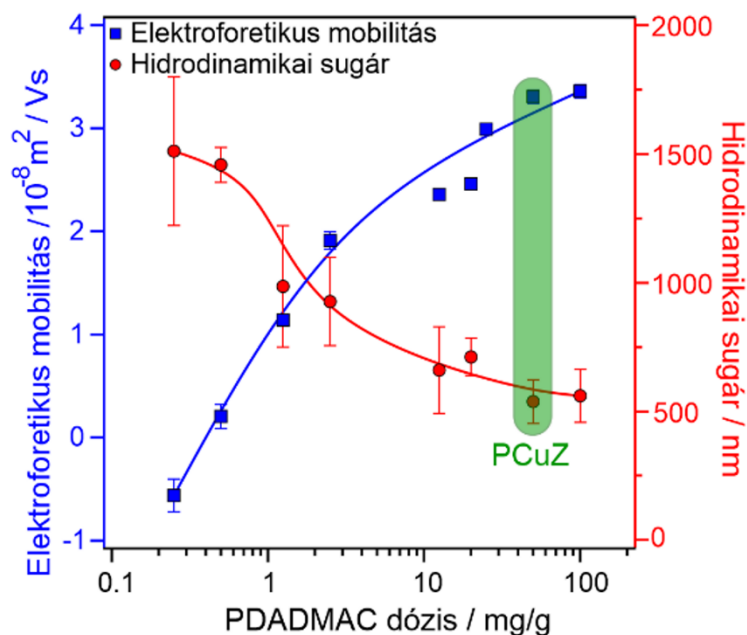


9. ábra: A PB kolloidstabilitásának vizsgálata a nanozyme 40 mg/l koncentrációjánál MgCl₂ elektrolit jelenlétében. A CCC pontot úgy határoztuk meg, hogy az aggregációs és a gyors aggregációs szakaszra egyenest illesztettünk, és megállapítottuk ezek metszéspontját.

Tehát a PB mind a négy tesztelt elektrolit oldatában az ionerősség igen széles skáláján stabil kolloidot alkot. A PB-PPN kompozit sófüggését NaCl és MgCl₂ elektrolitokban mértük, de a PB-vel ellentétben a kompozit MgCl₂ nagy ionerőssége mellett is stabil kolloidálisan. Az eredmények azt mutatják, hogy a PPN immobilizálása növeli a rendszer kolloidstabilitását, és az aggregációt még kétértékű sók oldatában is akadályozza. Ez a hatás nagy valószínűséggel abból származik, hogy a felületen adszorbeált PPN sztérikusán gátolja a PB nanokockák összetapadását.

A CuZ-t PDADMAC-kal kezeltük annak érdekében, hogy a pozitív töltésű polielektrolit megkötődésével a zeolit felülete pozitív töltésű legyen és kompozitot állíthassunk elő a PB és

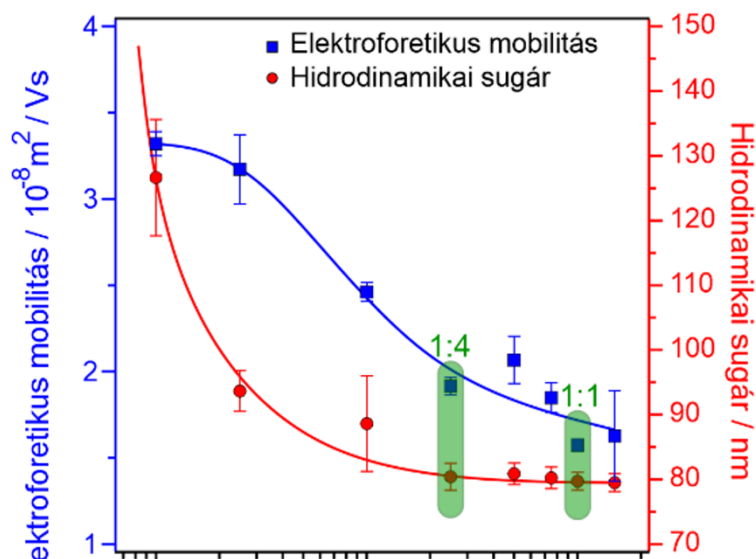
CuZ felhasználásával. 40 mg/l koncentrációjú CuZ szuszpenziót változó koncentrációjú PDADMAC-cal kezeltük, és ELS-sel, illetve DLS-sel határoztuk meg a részecskék elektroforetikus mobilitását, valamint hidrodinamikai sugarát (10. ábra). A CuZ kezdetben negatív elektroforetikus mobilitási értéke igen kis koncentrációjú PDADMAC hatására (0,6 mg/g) is eléri az IEP értékét, majd a PDADMAC koncentráció további emelésével a részecskék elektroforetikus mobilitás értéke áttört, és ~ 50 mg/g koncentrációnál eléri az ASP-t. Ennél nagyobb koncentrációk esetén az elektroforetikus mobilitás értéke nem változik számottevő mértékben. Azonos PDADMAC koncentráció tartományban követtük nyomon a CuZ részecskék hidrodinamikai sugarát, mint amelyeken a mobilitásmérést végeztük. A polimer nagy koncentrációjánál a CuZ 500 nm-re csökkent. Az elektroforetikus mobilitás és a hidrodinamikai sugár változásának tendenciáiból arra következtethetünk, hogy a pozitív töltésű részecskék között elektrosztatikus tasztítás lép fel, amely megakadályozza az aggregációt. A további vizsgálatainkat az 50 mg/g polielektrolit tartalmú részecskével (PCuZ) végeztük, mivel ennek méretét és elektroforetikus mobilitást megfelelőnek találtuk.



10. ábra: A CuZ hidrodinamikai sugarának (piros) és elektroforetikus mobilitásának (kék) vizsgálata különböző PDADMAC dózisok esetén. A zöld sáv jelzi a további vizsgálatokhoz használt PCuZ kompozit összetételét. A görbék a szem vezetésére szolgálnak.

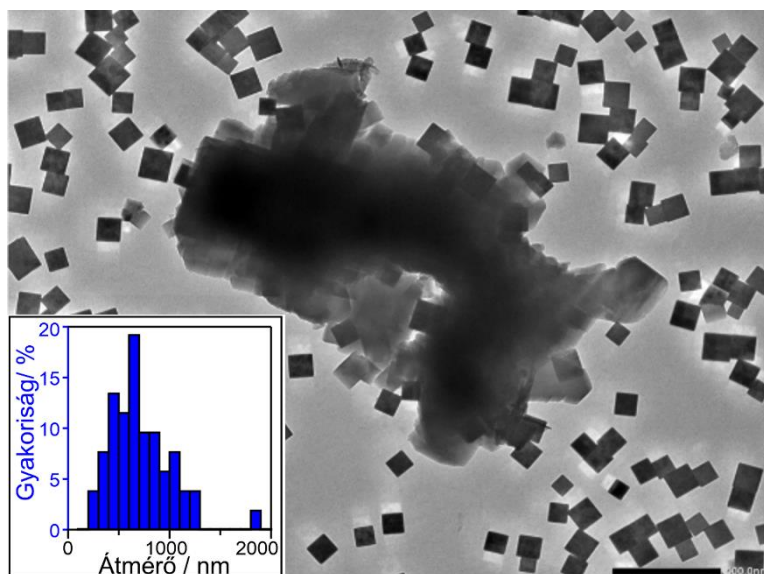
A PCuZ-t kezeltük PB egyre növekvő dóziséval kezeltük 10-1500 mg/g tartományban, miközben nyomon követtük az elektroforetikus mobilitás és a hidrodinamikai sugár változását. Abból, hogy a 3DLS-sel szinte csak a PB részecske méretét tudtuk mérni, arra következtettünk, hogy a PB jelentős része nem tapadt meg a PCuZ felületén (11. ábra). Az mért elektroforetikus

mobilitás értékek is ezt a feltételezésünket erősítik, hiszen a PB csökkentette a PCuZ felületének töltését, de az előjele nem fordult meg, azaz a PB nem tudta áttölteni a PCuZ felületét. Ezen mérések eredmények alapján a további vizsgálatainkat a PB és a PCuZ 1:1 (PB-PCuZ(1:1)) és 4:1 (PB-PCuZ(4:1)) tömegarányú kompozittal végeztünk.



11. ábra: A PCuZ hidrodinamikai sugara (piros) és elektroforetikus mobilitása (kék) a PB dózisának függvényében, valamint a további vizsgálatokhoz választott összetételek (zöld sáv). A görbék a szem vezetésére szolgálnak.

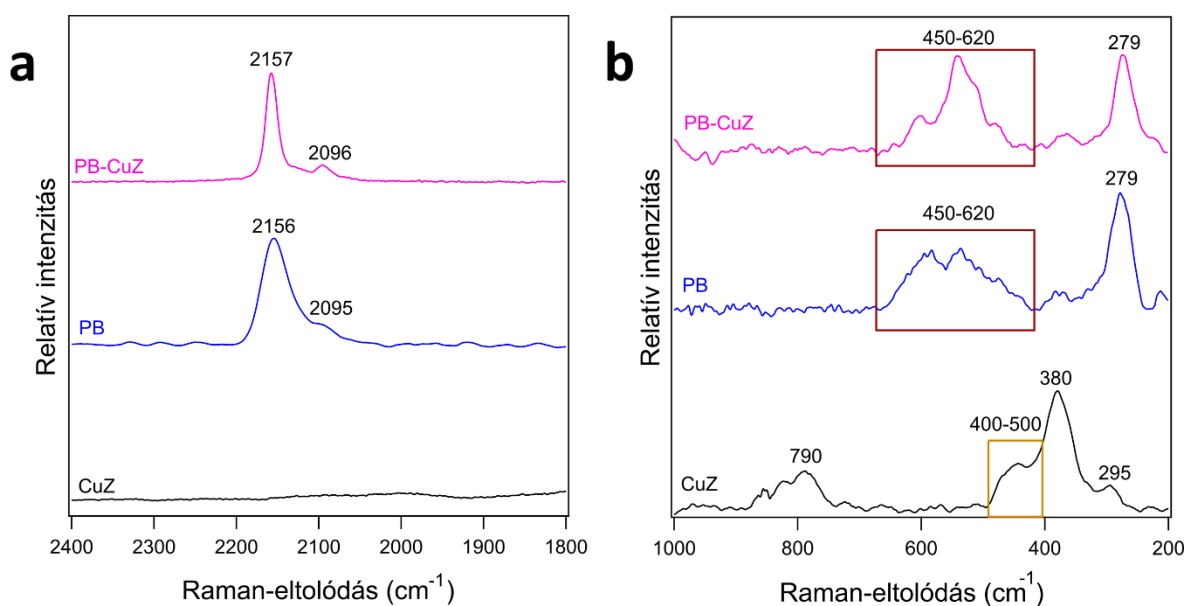
A részecskék TEM-mel készült morfológiai vizsgálata megmutatta, hogy a CuZ szárítás közben enyhén aggregálódik. Az elsődleges részecskeméret közel μm -es nagyságrendű és szabálytalan alakú, illetve a polidiszperzitási indexe igen nagy, ahogy ezt a diszperzió méreteloszlása is mutatja (12. ábra).



12. ábra: A PB-PCuZ mintáról készült TEM felvétel és a felvételek alapján meghatározott PCuZ részecskék méreteloszlása (belső ábra).

A kompozitok mikroszkópos felvételei azt mutatják, hogy a PB részecskének csak töredéke található a PCuZ felületén megtapadva, míg jelentős többsége szabadon diszpergálva található meg, ezzel is bizonyítva, hogy a heteroaggregáció, amelyet az ellentétes töltésű részecskék között ható Coulomb vonzás hajt, csak részben ment végbe, ahogy erre már a DLS és ELS vizsgálatokból is következtettünk.

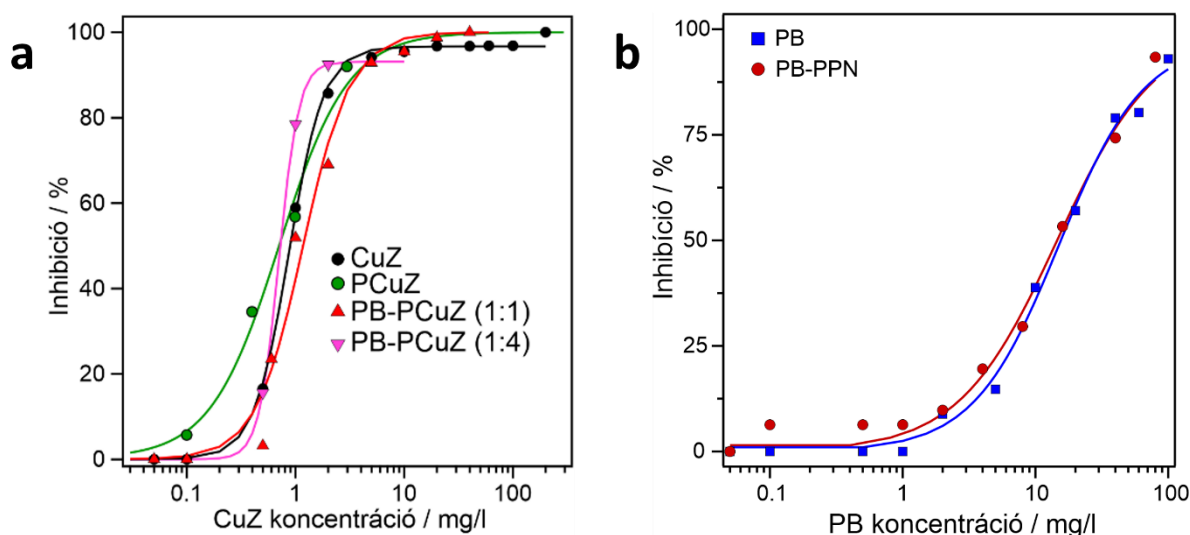
Az általunk szintetizált részecskék és a PB-PCuZ(1:1) kompozit Raman spektrumának felvételével (2400-1800 és 1000-200 $1/\text{cm}$ tartományban) vizsgáltuk az anyagszerkezetüket. A spektrumokat a 13. ábra szemlélteti. A PB esetén kapott 2156 $1/\text{cm}$ -es nagyobb, valamint a 2095 $1/\text{cm}$ -es alacsonyabb csúcs megfelel a $(\text{C} \equiv \text{N})$ nyújtási rezgésének és az $(\text{Fe}^{\text{II}} - \text{CN} - \text{Fe}^{\text{III}})$ hajlítási rezgésének, tehát a PB tartalmaz vas(II) és vas(III) ionokat is [38]. Továbbá csúcsokat mértünk 450-620 $1/\text{cm}$ tartományon és 279 $1/\text{cm}$ -en, amely a $(\text{Fe} - \text{C})$ nyújtási rezgésének tartományához, illetve a $(\text{Fe} - \text{CN} - \text{Fe})$ hajlítási rezgéséhez rendelhető. A CuZ minta esetén 790 $1/\text{cm}$ -en és 400-500 $1/\text{cm}$ -en megjelenő csúcsok a szilícium-oxigén kötésekre jellemzőek, míg a 295 $1/\text{cm}$ -es és a 380 $1/\text{cm}$ -es csúcs $(\text{T} - \text{O} - \text{T})$ kötésekkel feltételez, ahol a T valamely tetraéderesen koordinált központi atom, esetünkben leginkább szilícium[39].



13. ábra: Az általunk szintetizált minták Raman spektuma nagy(a) és kicsi(b) hullámszámú tartományban. Az ábrán jelöltem a fontosabb csúcsokat.

6.2 Antioxidáns tesztek

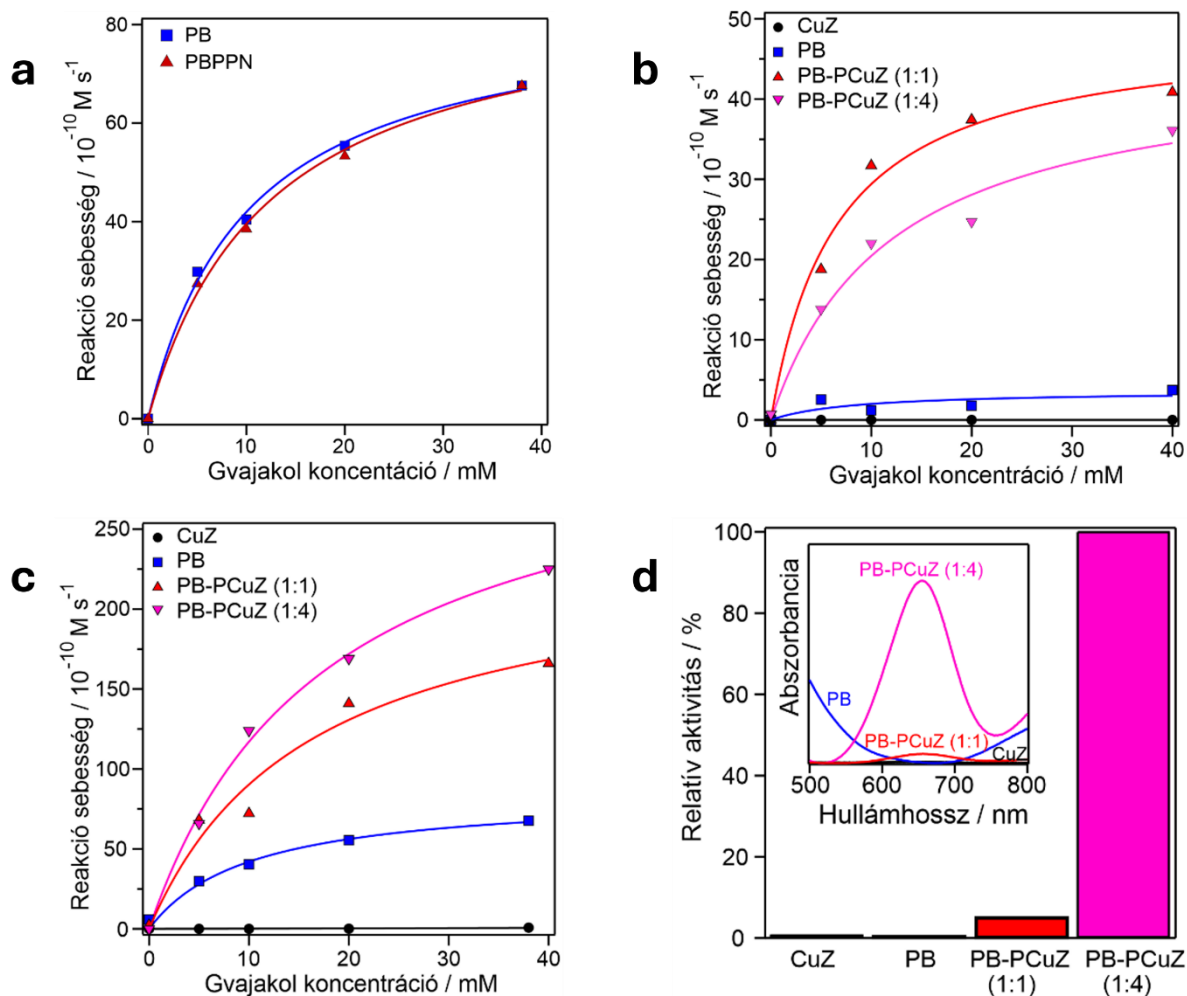
Célkitűzéseinknek megfelelően arra is kíváncsiak voltunk, hogy az általunk előállított kompozitok milyen enzimatis aktivitással/aktivitásokkal rendelkeznek, ezért a nanozymekon és a kompozitokon a módszerek között részletezett enzimteszteket hajtottuk végre.



14. ábra: A SOD tesztek során mért inhibíciók a részecskekoncentráció függvényében és a mért pontokra illesztett görbék a CuZ (a) és a PB (b) kompozitokra.

SOD tesztel arra kerestük a választ, hogy a rendszereink alkalmasak-e szuperoxid gyökök eliminálására. Az egyes anyagokra számolt inhibíció értékeket az 14. ábra tartalmazza. Mint azt az ábra is mutatja, az általunk előállított összes anyag rendelkezik SOD aktivitással, de a CuZ-t tartalmazó kompozitok aktivitása (14.(a) ábra) egy nagyságrenddel nagyobb, mint a csak PB-t tartalmazóké (14.(b) ábra). A zeolit tartalmú kompozitok IC_{50} értéke megközelítőleg megegyezik (CuZ: $0,90 \pm 0,02$ mg/l, PCuZ: $0,6 \pm 0,1$ mg/l, PB-PCuZ(1:1): $1,2 \pm 0,1$ mg/l, PB-PCuZ(1:4): $0,7 \pm 0,2$ mg/l) PB-tartalomtól függetlenül, amelyből arra következtethetünk, hogy ezekben a kompozitokban az aktivitást inkább a CuZ okozza. Feltételezhető, hogy a szuperoxid gyökök képesek adszorbeálódni a zeolit szerkezetébe, ahol a Cu(II) ionok felváltott redukciója és oxidációja katalizálja a szuperoxid gyökök bomlását elemi oxigénre és peroxid gyökre, mind ahogy ez a szuperoxid-dizmutáz enzimben is történik. Azt, hogy a PB és a PB-PPN IC_{50} értékei egy nagyságrenddel nagyobbak (PB: $15,0 \pm 1,6$ mg/g; PB-PPN: $14,6 \pm 1,2$ mg/g), mint a többi anyagé, valószínűleg a PB felszínén megtapadt PVP enzim okozza azáltal, hogy blokkolja a nanokockák aktív helyeit, ezzel csökkentve az enzimaktivitást.

további antioxidáns hatások keresését peroxidáz teszt elvégzésével folytattuk, ahol azt vizsgáltuk, hogy a rendszerünk képes-e peroxid gyököket eliminálni. A tesztet a már leírt módon végeztük. Az 13.(b-c) ábrán látható, hogy a CuZ nem rendelkezik PRT aktivitással, de a PB és a PB-PPN kisebb mértékben képes peroxid gyökök bontására, mint a szakirodalomban leírt többi PB nanozyme [40], amely aktivitás csökkenésnek szintén a felületen megtapadt PVP lehet az oka. A PB-PPN a PB-vel hasonló mértékben aktív (15.(a) ábra), tehát a PPN megkötődése nem akadályozza a PB nanokockát a katalízis során.



15. ábra: A PB és a PB-PPN POD aktivitásának vizsgálata: a meghatározott reakciósebesség a gvajakol koncentrációjának függvényében (40 mg/l PB) a PB-PPN kompozit (a) és a CuZ rendszer esetében 10 mg/l (b) és a 40 mg/l (c) PB koncentráció esetén. A pontosra Michaelis-Menten egyenlet segítségével illesztettünk görbét. A PB és CuZ mintákon elvégzett TMB teszt eredménye (d). Az egyes mintákra mért abszorbancia spektrumok (belső ábra), és az ezekből meghatározott relatív aktivitások.

A 10 mg/l PB-t tartalmazó minták esetén a zeolit nem rendelkezik POD aktivitással, míg a 10 mg/l koncentrációjú PB aktivitása is minimális. Ennek ellenére a PB-PCuZ kompozitok esetén egy nagyságrenddel nagyobb aktivitást tapasztaltunk, mint a borítatlan PB részecske esetén, amelyből látható, hogy a CuZ felerősíti a PB peroxidáz aktivitását. Az 1:1 arányú kompozit

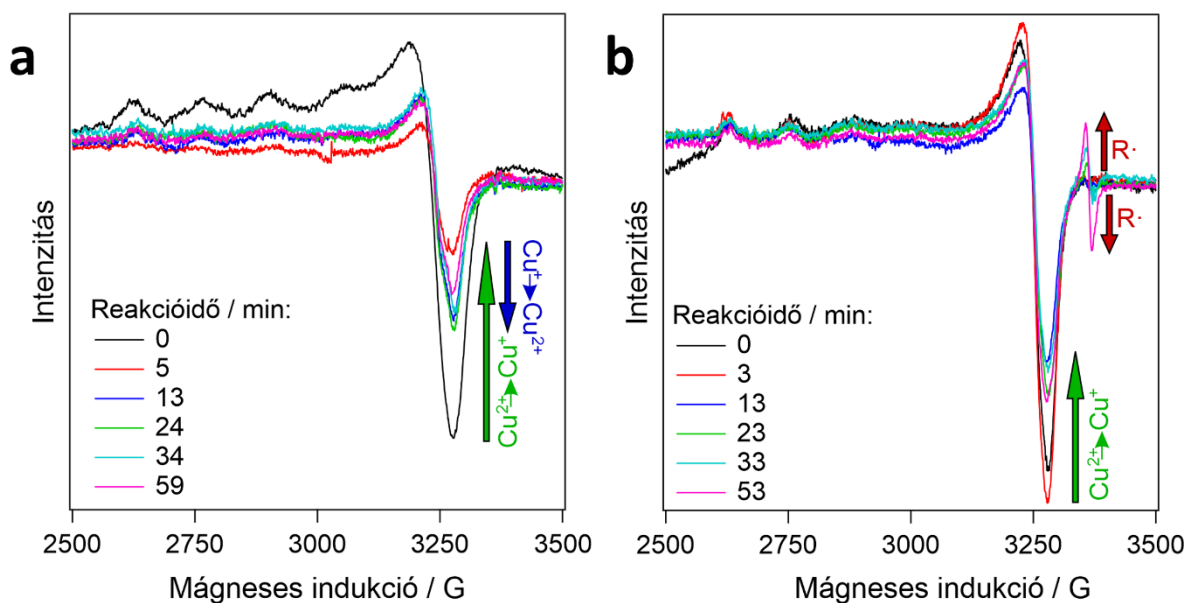
esetén nagyobb erősítés tapasztalható, mint 4:1 arányúnál (15.(b) ábra). A 40 mg/l PB tartalmú mintákon mért POD teszteknel is megfigyelhető, hogy a CuZ erősíti a PB aktivitását, de kisebb mértékben, és ebben az esetben a 4:1 arányú kompozit aktivitása a magasabb (15.(c) ábra). Ez alátámasztja, hogy a CuZ aktívan közrejátsszik a PB aktivitásának növelésében, ugyanis a 4:1 arányú kompozitban a zeolit koncentrációja magas (160 mg/l), amely növeli az aktív helyek számát a mintában.

A TMB tesztek is hasonlóan ígéretes, komplex enzimaktivitású rendszer ígéretét mutató eredményekre vezettek. A 13.(d) ábráról jól látható, hogy a PB és a CuZ kicsi aktivitással rendelkezik, míg a kompozitok nagy aktivitással rendelkeznek. A PB-PCuZ(4:1) megközelítőleg hússzor annyira aktív, mint a PB-PCuZ(1:1). A fenti eredmények is azt az elméletet erősítik, hogy a PCuZ szinergisztikus hatást fejt ki, hiszen magában nem rendelkezik POD aktivitással, de képes fokozni a PB aktivitását. Nagy valószínűséggel az annak köszönhető, hogy a PB és a TMB képes megkötődni a PCuZ felületén, ahol ideálisak a körülmények a reakció lejátszódásához.

6.3 Az antioxidáns aktivitások hatásmechanizmusának vizsgálata

Az EPR spektrumok készítésével, és azok vizsgálatával térképeztük fel az általunk zeolitból előállított antioxidáns hatású kompozitok felületén lejátszódó reakciók mechanizmusát. Mivel célunk az enzimtesztek során legjobban szereplő kompozitok vizsgálata volt, így a SOD mechanizmusát a puszta PCuZ részecskén (16. (a) ábra), míg a POD aktivitást a PB-PCuZ(1:4) összetételű rendszeren vizsgáltuk (16. (b) ábra), hiszen ezeknek volt a legnagyobb aktivitásuk az adott teszteken. A spektrumok felvételét a tesztekhez képest nagyobb részecskekoncentráció mellett végeztük el, mivel a részecskék koncentrációját növelni kellett annak érdekében, hogy azok EPR készülék segítségével észlelhetőek legyenek. A reakcióidő mindkét esetben 1 óra volt, miközben többször is mértük az EPR spektrumot.

A SOD teszt esetén (16.(a) ábra) a reakció kezdetén (3. perc) a Cu(II) ion mennyiségének csökkenése figyelhető meg. Ez annak köszönhető, hogy a O_2^- gyökök első körben redukálják a Cu(II) ionokat Cu(I) ionokká. Az idő múlásával azt figyelhetjük meg, hogy a Cu(II) ionok jele újra erősödni kezd, amelyet az okoz, hogy a Cu(I) ionok a reakcióelegyben található további O_2^- gyököket O_2^{2-} ionokká redukálják, miközben ők maguk visszaoxidálódnak Cu(II)-vé. Ezek alapján a PCuZ felületén lejátszódó reakciók nagyban emlékeztetnek a natív szuperoxid-dizmutáz enzim működésére, hiszen abban is a Cu(I) és Cu(II) állapota közötti felváltott redukció és oxidáció bontja a szuperoxid gyököket.

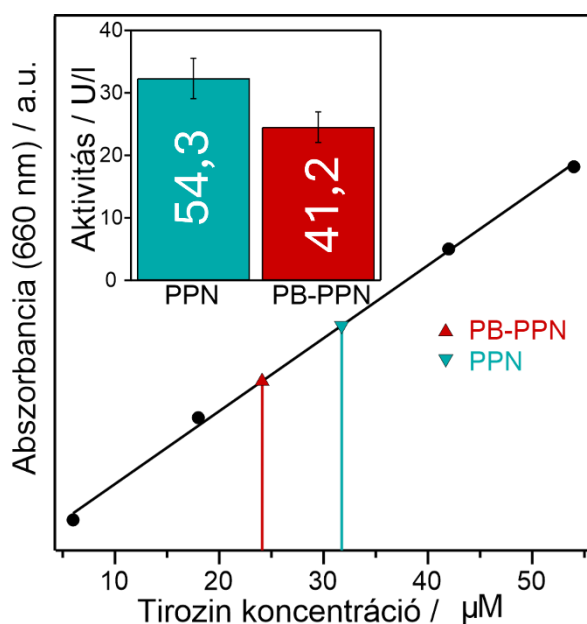


16. ábra: A 200 mg/l koncentrációjú CuZ-vel végzett SOD teszt során felvett EPR spektrum (a), és a 200 mg/l CuZ tartalmú PB-PCuZ(1:1) kompozittal végzett POD teszt (b) során megfigyelt EPR spektrumok a reakció lefolyásának különböző időpillanataiban.

A POD teszt esetén nem számítottunk arra, hogy a PCuZ a rézionokkal történik valamilyen reakció, hiszen ez az anyag magában nem POD aktív. Ennek ellenére a ERP spektrumokon végzett vizsgálataink azt mutatták, hogy reakció során a Cu(II) ionok mennyisége csökken a zeolit felületén (16.(b) ábra). Ez azt jelenti, hogy a rézion központok fontos szerepet töltenek be a szinergisztikus hatás kialakításában. Emellett megfigyelhető még egy elválkozás az EPR spektrumon a reakció lejátszódása közben. Ez feltehetően a gvajakol átmeneti dimer gyöke[42], amely kapcsolódhat a PB vasionjaihoz, vagy a PCuZ rézionjaihoz.

6.4 Proteáz teszt

Proteáz tesztet csak szabad PPN enzimmal és a PB-PPN részecskével végeztük (17. ábra). A teszt során a PPN koncentráció azonos volt mindkét mintában, azaz 100 mg/l koncentrációjú PPN és 400 mg/l koncentrációjú PB-PPN, amely a fentebb említett PB és PPN aránya miatt 100 mg/l PPN-t tartalmazott. A szabad PPN 54,3 U/l (egység/liter), míg a PB-PPN 41,2 U/l aktivitást mutatott, tehát a PPN az immobilizációt követően megtartotta eredeti PRT-aktivitásának 75,9 %-át.



17. ábra: A szabad PPN (10 mg/l, zöld) és a PB-PPN (40 mg/l, piros) proteáz egység/l-ben kifejezett (U/l) aktivitásának vizsgálata (belső ábra). A PB és a PB-PPN mintákra mért abszorbanciák elhelyezve a tirozin aktivitásból mért (fekete) kalibrálógörbén.

Habár az enzimek immobilizálása közben az aktivitásuk általában csökken [41], amit az enzimek konfigurációjának változása okoz, a PPN képes aktivitásának megtartására, miközben megtapad egy hordozó felületén [23], ahogy ez az általunk előállított PB-PPN esetében is történt.

Munkánk során a PPN segítségével sikerült növelnünk a PB stabilitását miközben mind a PB, mind a PPN megtartotta eredeti aktivitásának jelentős részét. Ez az eredmény azért is tart számot nagy érdeklődésre, mivel a PPN enzim nehezen alkalmazható együtt más enzimekkel, mert alkalmas azok bontására. Mi kifejlesztettünk egy olyan rendszert, amely POD és SOD aktivitáson kívül PRT aktivitást is mutat és nagy stabilitással bír. A zeolit részecskék ioncserével történő módosításával sikerült egy nagy SOD aktivitással rendelkező rendszert létrehozunk,

amely képes fokozni a PB POD aktivitását azáltal, hogy megfelelő környezetet teremt a katalízis lejátszódásához.

7. Összefoglalás

Kutatásunk során olyan komplex nanozyme rendszereket állítottunk elő, melyek összetevői különböző enzimaktivitással rendelkeznek, így a belőlük képzett kompozitok alkalmasak lehetnek kaszkád reakcióban, szabadgyök lebontási folyamatokban való alkalmazásban. Enzim aktivitással rendelkező komponensként - PVP polimer segítségével - kocka alakú PB nanozyme-ot szintetizáltunk, amit papain fehérjével felületmódosítottunk. A kísérleti munka során ammónium-ZSM5 zeolit részecskében ioncsere segítségével réz(II) ionokat adszorbeáltatva szintetizáltunk enzim hordozót, amin a PB nanorészecskéket immobilizáltuk, így módon egy másik enzim komplexet létrehozva.

A szintézis termékét TEM-mel, dinamikus fényszórásméréssel és az UV-látható spektrumának felvételével karakterizáltuk. Kocka alakú részecskékből álló, nagy kolloidstabilitású, monodiszperz kolloidot kaptunk termékként. A részecskék élhossza a TEM felvételek alapján megközelítőleg 100 nm nagyságúnak mértük. A nanozyme-ok kolloidstabilitásának vizsgálata során különböző elektrolitokban növekvő ionerősség mellett aggregációs kinetikai méréseket végeztünk. A PB esetében azt tapasztaltuk, hogy még nagy ionerősségek mellett is csak MgCl_2 elektrolit jelenlétében tudtunk aggregációt elérni, ezzel is igazolva a PB jelentős kolloidstabilitását.

A felületi funkcionálizálás során a részecskék elektroforetikus mobilitásának és hidrodinamikai sugarának mérésével nyomon követtük a PPN megtapadását a PB felületén, illetve a PDADMAC adszorpcióját a zeolit felületén, így megállapítva az adszorpció telítési platóhoz tartozó PPN/PDADMAC dózist annak érdekében, hogy a felületet áttöltse. A PCuZ részecskéket végül PB-vel kezeltük, amely során azt tapasztaltuk, hogy a PB nem képes áttölteni a PCuZ felületét, így az adszorpció csak részlegesen valósul meg. Kiválasztottunk két különböző PB:PCuZ arányt, amellyel később az enzimteszteket végeztük.

A kolloidtulajdonságok vizsgálata után áttértünk a részecskék és kompozitok biokatalitikus aktivitásának vizsgálatára. SOD aktivitással minden általunk vizsgált részecske rendelkezik. A CuZ-t tartalmazó anyagok nagyjából egy nagyságrenddel nagyobb aktivitással rendelkeznek, mint a csak PB-t tartalmazó részecskék. Az általunk szintetizált PB aktivitása lényegesen elmarad az irodalomban leírt többi PB aktivitásától, amit okozhat a felületen megtapadt PVP.

Peroxidáz aktivitással az általunk szintetizált anyagok közül csak a PB rendelkezik, a CuZ magában nem POD aktív, de megfigyeltük, hogy a PCuZ képes erősíteni a PB aktivitását. Minél több PCuZ található a rendszerben, a PB annál gyorsabban képes a hidrogén-peroxid bontására,

tehát a CuZ úgy működik egy katalizátor, ami annak köszönhető, hogy a CuZ felülete ideális körülményeket teremt a reakció lejátszódásához.

A fehérjét tartalmazó rendszereket jellemeztük proteáz aktivitását szempontjából is. A teszt eredményéből megállapítottuk, hogy a PPN az immobilizálás után is megtartotta eredeti aktivitásának megközelítőleg 90%-át.

Sikerült olyan kolloidálisan stabil PB-PPN rendszert előállítanunk, amelyben egy nanozyme felületén enzim adszorbeálódott, és eközben a kompozitot felépítő anyagok megtartották eredeti aktivitásukat. A zeolit részecskén PB nanozyme-ot immobilizáltunk, amelynek köszönhetően a PB POD aktivitását sokszorosára tudtuk növelni.

8. Irodalomjegyzék

1. D'Autreaux, B. and M.B. Toledano, *ROS as signalling molecules: mechanisms that generate specificity in ROS homeostasis*. Nature Reviews Molecular Cell Biology, 2007. **8**(10): p. 813-824.
2. Sies, H., *Oxidative stress: Oxidants and antioxidants*. Experimental Physiology, 1997. **82**(2): p. 291-295.
3. Sies, H., C. Berndt, and D.P. Jones, *Oxidative Stress*. Annual Review of Biochemistry, 2017. **86**: p. 715-748.
4. Winterbourn, C.C., *Reconciling the chemistry and biology of reactive oxygen species*. Nature Chemical Biology, 2008. **4**(5): p. 278-286.
5. Lourenco, S.C., M. Moldao-Martins, and V.D. Alves, *Antioxidants of natural plant origins: From sources to food industry applications*. Molecules, 2019. **24**(22): p. 4132.
6. Bouayed, J. and T. Bohn, *Exogenous antioxidants-Double-edged swords in cellular redox state*. Oxidative Medicine and Cellular Longevity, 2010. **3**(4): p. 228-237.
7. Lin, Y.H., Z.W. Chen, and X.Y. Liu, *Using inorganic nanomaterials to endow biocatalytic systems with unique features*. Trends in Biotechnology, 2016. **34**(4): p. 303-315.
8. Zhang, R.F., X.Y. Yan, and K.L. Fan, *Nanozymes inspired by natural enzymes*. Accounts of Materials Research, 2021. **2**(7): p. 534-547.
9. Tian, R.Z., et al., *Rational design and biological application of antioxidant nanozymes*. Frontiers in Chemistry, 2021. **8**: p. 831.
10. Voros, A., et al., *Papain functionalized Prussian blue nanozyme colloids of triple enzymatic function*. Chemical Communications, 2024. **60**(89): p. 13032-13035.
11. Halmagyi, T.G., et al., *Coamplified Nanozyme Cocktails for Cascade Reaction-Driven Antioxidant Treatments*. ACS Appl Mater Interfaces, 2024. **16**(40): p. 54485-54495.
12. Kraft, A., *What a chemistry student should know about the history of Prussian blue*. ChemTexts, 2018. **4**(4).
13. Hou, R., et al., *Prussian Blue Nanozyme Promotes the Survival Rate of Skin Flaps by Maintaining a Normal Microenvironment*. ACS Nano, 2022. **16**(6): p. 9559-9571.
14. Zhao, J.L., et al., *Prussian Blue nanozyme with multienzyme activity reduces Colitis in mice*. Acs Applied Materials & Interfaces, 2018. **10**(31): p. 26108-26117.

15. Sahu, A., et al., *Antioxidant and anti-inflammatory activities of Prussian blue nanozyme promotes full-thickness skin wound healing*. Materials Science and Engineering C-Materials for Biological Applications, 2021. **119**: p. 111596.
16. Zhang, H., et al., *One-pot synthesis of magnetic Prussian blue for the highly selective removal of thallium(I) from wastewater: Mechanism and implications*. Journal of Hazardous Materials, 2022. **423**(Pt A): p. 126972.
17. He, H., et al., *Prussian blue nanozymes: progress, challenges, and opportunities*. Nanoscale, 2023. **15**(31): p. 12818-12839.
18. Colella, C., M.d. Gennaro, and R. Aiello, *Use of Zeolitic Tuff in the Building Industry*. Reviews in Mineralogy and Geochemistry, 2001. **45**(1): p. 551-587.
19. Halmagyi, T.G., et al., *Engineering inorganic nanozyme architectures for decomposition of reactive oxygen species*. Dalton Transactions, 2024. **53**(34): p. 14132-14138.
20. Coronas, J. and J. Santamaria, *The use of zeolite films in small-scale and micro-scale applications*. Chemical Engineering Science, 2004. **59**(22-23): p. 4879-4885.
21. Sun, Q.M., N. Wang, and J.H. Yu, *Advances in catalytic applications of zeolite-supported metal catalysts*. Advanced Materials, 2021. **33**(51): p. 2104442.
22. Amri, E and F. Mamboya, *Papain, a Plant Enzyme of Biological Importance: A Review*. American Journal of Biochemistry and Biotechnology, 2012. **8**(2): p. 99-104.
23. Tacias-Pascacio, V.G., et al., *Immobilization of papain: A review*. International Journal of Biological Macromolecules , 2021. **188**: p. 94-113.
24. Derjaguin, B., *On the repulsive forces between charged colloid particles and on the theory of slow coagulation and stability of lyophobic sols*. Transactions of the Faraday Society, 1940. **35**(3): p. 0203-0214.
25. Delgado, A.V., et al., *Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena*. Journal of Colloid and Interface Science, 2007. **309**(2): p. 194-224.
26. Oncsik, T., et al., *Charging and aggregation of latex particles in aqueous solutions of ionic liquids: Towards an extended Hofmeister series*. Physical Chemistry Chemical Physics, 2016. **18**(10): p. 7511-7520.
27. Diao, Y.J., et al., *Reconciling DLVO and non-DLVO forces and their implications for ion rejection by a polyamide membrane*. Langmuir, 2017. **33**(36): p. 8982-8992.
28. Jobbagy, M. and A.E. Regazzoni, *Anion-exchange equilibrium and phase segregation in hydrotalcite systems: Intercalation of hexacyanoferrate(III) ions*. Journal of Physical Chemistry B, 2005. **109**(1): p. 389-393.

29. Hu, M., et al., *Synthesis of Prussian Blue nanoparticles with a hollow interior by controlled chemical etching*. Angewandte Chemie-International Edition, 2012. **51**(4): p. 984-988.
30. Moreno-Recio, M., J. Santamaria-Gonzalez, and P. Maireles-Torres, *Bronsted and Lewis acid ZSM-5 zeolites for the catalytic dehydration of glucose into 5-hydroxymethylfurfural*. Chemical Engineering Journal, 2016. **303**: p. 22-30.
31. Pal, A., et al., *Extending depolarized DLS measurements to turbid samples*. Journal of Colloid and Interface Science, 2022. **627**: p. 1-9.
32. Beaucham, C. and I. Fridovich, *Superoxide dismutase - improved assays and an assay applicable to acrylamide gels*. Analytical Biochemistry, 1971. **44**(1): p. 276-287.
33. Doerge, D.R., R.L. Divi, and M.I. Churchwell, *Identification of the colored guaiacol oxidation product produced by peroxidases*. Analytical Biochemistry, 1997. **250**(1): p. 10-17.
34. Alsharif, N.B., et al., *Formulation of antioxidant composites by controlled heteroaggregation of cerium oxide and manganese oxide nanozymes*. Journal of Physical Chemistry C, 2023. **127**(34): p. 17201-17212.
35. Cupp-Enyard, C., *Sigma's non-specific protease activity assay - Casein as a substrate*. Journal of Visualized Experiments, 2008. **19**: p. e899.
36. Bradford, M.M., *Rapid and sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing principle of protein-dye binding*. Analytical Biochemistry, 1976. **72**(1-2): p. 248-254.
37. Uemura, T. and S. Kitagawa, *Prussian Blue nanoparticles protected by poly(vinylpyrrolidone)*. Journal of the American Chemical Society, 2003. **125**(26): p. 7814-7815.
38. Moretti, G. and C. Gervais, *Raman spectroscopy of the photosensitive pigment Prussian blue*. Journal of Raman Spectroscopy, 2018. **49**(7): p. 1198-1204.
39. Attila, Ö., et al., *3D Raman spectroscopy of large zeolite ZSM-5 crystals*. Chemistry-a European Journal, 2019. **25**(29): p. 7158-7167.
40. Alsharif, N.B., et al., *A colloid approach to decorate latex particles with Prussian blue nanozymes*. Journal of Molecular Liquids, 2020. **309**: p. 113066.
41. Rodrigues, R.C., et al., *Modifying enzyme activity and selectivity by immobilization*. Chemical Society Reviews, 2013. **42**(15): p. 6290-6307.

42. Taurog, A., M.L. Dorris, and F.S. Guziec, *An unexpected side reaction in the guaiacol assay for peroxidase*. Analytical Biochemistry, 1992. **205**(2): p. 271-277.

9. Köszönetnyilvánítás

Köszönetet szeretnék mondani Prof Dr. Tóth Ágotának, a Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék vezetőjének, hogy lehetőséget biztosított, hogy a tanszéken végezzem kutatásaimat.

Szeretném megköszönni a munkám során nyújtott segítségét Dr. Szilágyi Istvánnak, aki lehetőséget biztosított számomra, hogy kutatásomat az MTA-SZTE Lendület Biokolloidok Kutatócsoportban végezzem. Külön szeretném megköszönni a számomra nyújtott szakmai segítséget Dr. Halmágyi G. Tibornak Dr. Sáringer Szilárdnak és Dr. Varga Viktóriának. Az EPR és az XPS mérések lehetőségét köszönöm Dr. May V. Nórának és Dr. Samu Gergelynek.