



**BUDAPESTI MŰSZAKI ÉS GAZDASÁGTUDOMÁNYI EGYETEM**  
**SZERVES KÉMIA ÉS TECHNOLOGIA TANSZÉK**  
**ALKALMAZOTT BIOTECHNOLÓGIA ÉS ÉLELMISZERTUDOMÁNYI TANSZÉK**

**2013**

**OTDK dolgozat**

# **$\beta$ -galaktozidáz szárítása és formulálása elektrosztatikus nanoszálképzéssel**

**Készítette: Vass Panna**

**Témavezetők: Dr. Marosi György**

**Dr. Nagy Zsombor Kristóf**

**Konzulensek: Wagner István**

**Fehér Csaba**

**Lezárás dátuma: 2014. május 1.**

# TARTALOMJEGYZÉK

|          |                                                                                |    |
|----------|--------------------------------------------------------------------------------|----|
| 1.       | Bevezetés.....                                                                 | 3  |
| 2.       | Szakirodalmi áttekintés .....                                                  | 4  |
| 2.1.     | Biohatóanyagok.....                                                            | 4  |
| 2.2.     | Fehérjék.....                                                                  | 5  |
| 2.3.     | $\beta$ -galaktozidáz enzim.....                                               | 6  |
| 2.3.1.   | Laktóz intolerancia .....                                                      | 7  |
| 2.3.2.   | A laktóz intolerancia kezelési módjai.....                                     | 8  |
| 2.4.     | Enzimek stabilizálása .....                                                    | 9  |
| 2.5.     | Enzimek immobilizálása .....                                                   | 10 |
| 2.6.     | Elektrosztatikus nanoszálképzés .....                                          | 11 |
| 2.6.1.   | Az elektrosztatikus nanoszálképzés biotechnológiai alkalmazásai .....          | 13 |
| 2.6.2.   | Az elektrosztatikus nanoszálképzés méretnövelése.....                          | 14 |
| 3.       | Felhasznált anyagok, kísérleti módszerek .....                                 | 17 |
| 3.1.     | Felhasznált anyagok .....                                                      | 17 |
| 3.1.1.   | Laktáz enzim .....                                                             | 17 |
| 3.1.2.   | Orto-nitrofenol- $\beta$ -galaktopiranozid (ONPG) .....                        | 17 |
| 3.1.3.   | Cukrok.....                                                                    | 17 |
| 3.1.4.   | Polimerek.....                                                                 | 17 |
| 3.1.4.1. | Polivinil-pirrolidon (PVP K-30, K-90).....                                     | 17 |
| 3.1.4.2. | Polivinil-alkohol (PVA) .....                                                  | 18 |
| 3.1.4.3. | Polietilén-glikol (PEG).....                                                   | 18 |
| 3.1.4.4. | Politejsav (PLA) .....                                                         | 18 |
| 3.1.5.   | Tween® 80 (Polioxietilén- szorbitán- monooleát).....                           | 18 |
| 3.2.     | Felhasznált eszközök, mintakészítés .....                                      | 19 |
| 3.2.1.   | Elektrosztatikus szálhúzó berendezés.....                                      | 19 |
| 3.2.2.   | A $\beta$ -galaktozidáz enzim beágyazása vízdoldható polimer nanoszálakba..... | 20 |
| 3.2.3.   | Elektrosztatikus szálképzés méretnövelése .....                                | 21 |

|          |                                                                                     |    |
|----------|-------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 3.2.4.   | A $\beta$ -galaktozidáz enzim beágyazása vízdoldhatatlan polimer nanoszálakba ..... | 22 |
| 3.3.     | Vizsgálati módszerek .....                                                          | 22 |
| 3.3.1.   | Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat (SEM - Scanning Electron Microscope) .....  | 22 |
| 3.3.2.   | Aktivitásmérés .....                                                                | 22 |
| 3.3.2.1. | Oldatkészítés a szabad enzimből .....                                               | 22 |
| 3.3.2.2. | Oldatkészítés a vízdoldható polimerekkel készült mintákból .....                    | 23 |
| 3.3.2.3. | Mintaelőkészítés a vízdoldhatatlan polimerrel készült mintából.....                 | 23 |
| 3.3.2.4. | Reakció menete .....                                                                | 23 |
| 3.3.2.5. | Spektrofotometriás aktivitásmérés ONPG-vel .....                                    | 23 |
| 3.3.2.6. | Folyadékkromatográfiás aktivitásmérés laktózzal (HPLC).....                         | 25 |
| 3.3.3.   | A minták tárolása.....                                                              | 26 |
| 4.       | Eredmények és értékelésük .....                                                     | 27 |
| 4.1.     | $\beta$ -galaktozidáz beágyazása vízdoldható polimer nanoszálakba .....             | 27 |
| 4.1.1.   | A szálképzés hatása a biológiai aktivitásra.....                                    | 29 |
| 4.1.2.   | Negyedéves stabilitási eredmények.....                                              | 31 |
| 4.1.3.   | PVP K90-el készült minta vizsgálata .....                                           | 34 |
| 4.1.3.1. | Szubsztrátkoncentráció hatása az enzimaktivitásra .....                             | 34 |
| 4.1.3.2. | Hőmérséklet és pH hatása az enzimaktivitásra.....                                   | 36 |
| 4.1.3.3. | A tárolási hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra .....                             | 38 |
| 4.1.4.   | 1 éves stabilitási eredmények .....                                                 | 39 |
| 4.1.5.   | Reprodukálhatóság vizsgálata .....                                                  | 41 |
| 4.1.6.   | Méretnövelhetőség vizsgálata .....                                                  | 42 |
| 4.2.     | $\beta$ -galaktozidáz beágyazása vízdoldhatatlan polimer nanoszálakba.....          | 43 |
| 5.       | Összefoglalás.....                                                                  | 45 |
| 6.       | Mellékletek.....                                                                    | 46 |
| 7.       | Irodalomjegyzék.....                                                                | 50 |

## 1. BEVEZETÉS

Az elmúlt évtizedekben egyre nagyobb fejlődés mutatkozik a biotechnológia egy speciális ága, a humán egészségügyi biotechnológia terén, melynek következtében napjainkban a biotechnológiai eredetű gyógyszerkészítmények szerepe rohamosan növekszik. A biotechnológia jelenlegi és várhatóan tovább erősödő térnyerése a gyógyszerkutatásban a készítményfejlesztést is új kihívások elé állítja, mivel e hatóanyagok rendkívül érzékenyek a fizikai és kémiai paraméterekre, ami nagyban megnehezíti szilárd formulálásukat.

TDK munkám során a tejcukorérzékenység kezelésére alkalmazott  $\beta$ -galaktozidáz enzim szilárd formulálásának lehetőségét vizsgáltam. Egyes becslések szerint világszerte a felnőtt lakosság mintegy 70%-a nem képes megfelelően lebontani a tejcukrot, melynek oka a laktáz enzim csökkent működése vagy termelésének teljes hiánya. Az enzim pótlásával a fellépő panaszok megszüntethetők.

Munkám során célkitűzésem az volt, hogy olyan hatékony és kíméletes szárítási technológiát fejlesszek, ami versenyképes alternatívát jelenthet a jelenleg elterjedt – viszont idő és energiaigényes – szárítási módszerekkel (pl. fagyasztva szárítás) szemben.

Az általam alkalmazott technológia az elektrosztatikus nanoszálképzés volt. Ez az eljárás a textiliparban már széles körben elterjedt, azonban a gyógyszeripari alkalmazása még csak kezdeti fázisban van. Előnye, hogy rendkívül kíméletes, pillanatszerű szárítást biztosít, emellett folyamatos, és alacsony energiaigényű technológia, amiből következően gazdaságos termelést tesz lehetővé. További pozitívum, hogy a módszer méretnövelése már megoldott, akár napi 10 kg-os termelés is megvalósítható, ami lehetőséget ad az ipari méretű termelésre is.

## 2. SZAKIRODALMI ÁTTEKINTÉS

### 2.1. Biohatóanyagok

A gyógyszerfejlesztés történetében eddig három olyan nagy áttörést figyelhettünk meg, melyek során forradalmian új dolgok láttak napvilágot. A világon az első izolált alkaloid a morfin volt 1804-ben, amit végül a Merck vitt piacra 1827-ben<sup>1</sup>. A második áttörést a kémiai úton szintetizált gyógyszerek jelentették, melyek legjelentősebb képviselője az aszpirin. Napjainkban ezek a hatóanyagok uralják a világ főbb gyógyszerpiacait. Az 1970-es években megjelenő, az emberi betegségek gyógyítására alkalmazott, rekombináns DNS vagy biotechnológiai eredetű biohatóanyagok jelentették a harmadik nagy áttörést. A rekombináns humán inzulin bevezetése óta az utóbbi évtizedekben a humán egészségügyi, vagy más néven piros biotechnológia robbanásszerű növekedésnek indult<sup>2,3</sup>.

Egy jelentés szerint az USA-ban a humán biotechnológiából származó árbevétel az 1996-os 20 milliárd dollárról 2008-ra 70,1 milliárd dollárra emelkedett, amivel párhuzamosan a kutatás és fejlesztésre fordított pénzmennyiség is csaknem háromszorosára nőtt<sup>4</sup>. A növekedést az is jól mutatja, hogy míg 2003-ban egy biohatóanyag sem szerepelt a 15 legnagyobb árbevételt produkáló gyógyszerek között, addig tíz évvel később, 2013-ban már 6 biotechnológiai eredetű készítmény is felkerült erre a listára<sup>5</sup>. Az elmúlt években az ezekhez kapcsolódó árbevétel növekvő tendenciát mutatott, néhány hatóanyag esetében pedig az évi 5 milliárd dollárt is meghaladta<sup>6</sup>.

E jelenség hátterében a biotechnológia általános fejlődése mellett az állhat, hogy a konvencionális gyógyszerek kutatási és fejlesztési költségei az elmúlt évtizedekre soha nem látott méreteket öltöttek, és ezzel egy időben az újonnan elfogadott és piacra vitt originális gyógyszerkészítmények száma drasztikus csökkenést mutatott az egyre szigorodó engedélyeztetési eljárásoknak köszönhetően<sup>7</sup>. Emellett az újonnan fejlesztett konvencionális kismolekulás hatóanyagok nagy része a BCS (Biofarmáciai Osztályozási Rendszer) második osztályába tartozik, azaz rossz vízoldhatóságú, ami gyógyszertechnológiai szempontból jelentős kihívást jelent, hiszen a nem megfelelő kioldódás alacsony biohasznosulással jár együtt. Mindezeket figyelembe véve nem meglepő, hogy a mind a gyógyszerkutatás, mind a gyógyszertechnológia területén nagy igény mutatkozik a hagyományostól eltérő fejlesztésekre, melyek segítségével tovább javítható az emberi életminőség, és ezáltal új lendületet adhatnak az iparágnak.

## 2.2. Fehérjék

A biohatóanyagok definíciója nem teljesen egységes, de a kifejezés olyan terápiás hatású anyagokra utal, melyeket biotechnológiai úton állítottak elő és sejtekből, vagy a sejtek aktív részéből származnak. A hatóanyagcsoport terápiás szempontból legjelentősebb képviselői a fehérjék, köztük az antitestek, enzimek, véralvadási faktorok és peptid hormonok.

A fehérjék számtalan előnyös tulajdonsággal rendelkeznek a konvencionális gyógyszerekhez képest. Ezek közé tartozik a nagy specificitás, mely kevesebb mellékhatást és alacsonyabb dózist eredményez, az alacsony toxicitás, és az alacsony nem-specifikus és más hatóanyagokkal való kölcsönhatás, így más gyógyszerek szedése nem befolyásolja hatásukat. Ezen felül bizonyos betegségek esetén, mint az enzimhiányok, genetikai és degeneratív betegségek vagy fehérje-diszfunkciók, a peptidekből és fehérjékből készült készítmények váltak napjainkban a leggyakrabban alkalmazott gyógyszerekké<sup>8</sup>.

A fő különbség e hatóanyagok és az úgynevezett kismolekulás hatóanyagok között a strukturális komplexitásban keresendő. A fehérjék esetén már a negyedleges térszerkezet megváltozása is befolyással van a biológiai aktivitásra, így a fehérjékre jellemző a nagyfokú érzékenység a fizikai és kémiai környezetre (pH, hőmérséklet, nyomás, ionkoncentráció) és az alacsony stabilitás vizes közegben, ami azért jelent nehézséget, mivel az előállítás végén általában vizes oldat vagy szuszpenzió tartalmazza a hatóanyagot<sup>9</sup>. és ez korlátozza a termék biohasznosulását, szállíthatóságát és stabilitását.

A fehérjék csoportján belül nagy jelentőséggel bírnak az enzimek. Működésük minden sejtünkben nélkülözhetetlen, így az emberi szervezet számára is létfontosságúak. Eddig 3000 különböző humán enzimet azonosítottak melyek több, mint 10 000 reakciót katalizálnak<sup>10</sup>. Egészségügyi alkalmazásuk igen széleskörű, köszönhetően a fent említett, fehérjékre jellemző nagyfokú specifitásnak és az egyedi katalitikus hatásnak. A terápiás enzimek legsikeresebben a citotoxikus anyagok eltávolítására, a vérrendszert érintő életveszélyes betegségek és az igen gyakori enzimhiányos állapotok kezelésére alkalmazhatóak.

Az enzimhelyettesítési terápia (ERT - enzyme replacement therapy) során általában intravénás infúzió segítségével adagolják a páciensnek a hiányzó vagy a szervezetében csökkent működést mutató enzimet. Ez a kezelési módszer ma a rekombináns enzimtechnológiának köszönhetően már több, egyébként súlyos, gyakran halálos betegség

esetén alkalmazott, úgy, mint Fabry-szindróma<sup>11</sup>, Gaucher-kór<sup>12</sup>, Pompe-kór<sup>13</sup>, illetve mukopoliszacharidózis<sup>14</sup>.

A cisztás fibrózis (CF) az egyik leggyakoribb veleszületett anyagcserebetegség, ami a külső elválasztású mirigyek kóros váladéktermelésével jár. Ez a súlyos betegség mai ismereteink szerint nem gyógyítható, viszont tünetileg kezelhető különböző DNáz enzim tartalmú inhaláló készítményekkel, melyek nagymértékben javítják a betegek életminőségét.

Kutatások során megállapították, hogy a rákos megbetegedések kezelésében is jelentős eredmények érhetőek el enzim terápia segítségével. Nemrégiben kimutatták, hogy a pegilált arginin deamináz, egy argininbontó enzim gátolhatja a melanóma és a hepatocelluláris karcinóma (májsejtrák) kialakulását<sup>15</sup>. Mikrobiális glutamináz-aszparagináz enzim esetén bizonyították az akut leukémiák esetén fellépő terápiás hatásokat, aminek következenyeként napjainkban az enzimet kemoterápiás gyógyszerként forgalmazzák (Elspar)<sup>16</sup>.

Tanulmányok bizonyítják, hogy proteolitikus enzimek (PEP – pankréász enzimpótló készítmények) sikeresen alkalmazhatóak gasztrointesztinális betegségek kezelésére illetve gyulladáscsökkentő hatásuk is ismert<sup>17</sup>. Számtalan enzim emellett kitűnő antimikrobás illetve alvadásgátló hatással is rendelkezik.

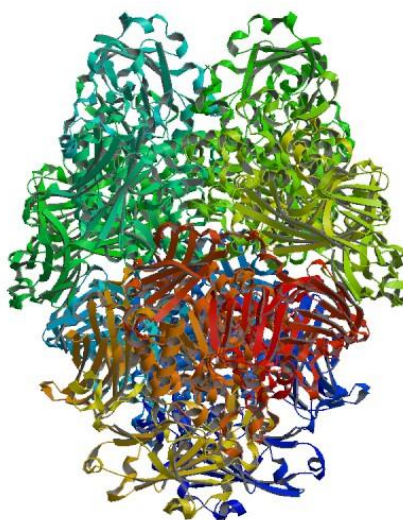
A dolgozat alapjául szolgáló kísérletek során a laktóz intolerancia kezelésére széles körben alkalmazott  $\beta$ -galaktozidáz enzimmel, mint modell biohatóanyaggal dolgoztam, melynek tulajdonságait a következő fejezet tárgyalja.

### **2.3. $\beta$ -galaktozidáz enzim**

A  $\beta$ -galaktozidáz (röviden laktáz) (1. ábra) egy a vékonybél sejtjei által termelt enzim, mely a  $\beta$ -1,4-D-galaktozidos kötések hidrolízisét katalizálja. A legfontosabb ilyen kötést tartalmazó szubsztrát a laktóz, melyet az enzim glükózzá és galaktózzá bont.

Az enzim számtalan egyéb forrásból is származhat (állati, növényi, mikrobiális) és tulajdonságai (szubsztrát specificitás, hőmérséklet és pH optimum) ennek megfelelően eltérhetnek<sup>18</sup>. A biotechnológiai felhasználás szempontjából a legnagyobb jelentőséggel a mikrobiológiai eredetű enzimek bírnak, tekintettel a mikroorganizmusok könnyű kezelhetőségére, magas szaporodási rátájára és a magas termelési hozamra. A leggyakrabban

felhasznált mikroorganizmusok az *Aspergillus niger*, *Aspergillus oryzae* és a *Kluyveromyces lactis*<sup>19</sup>.

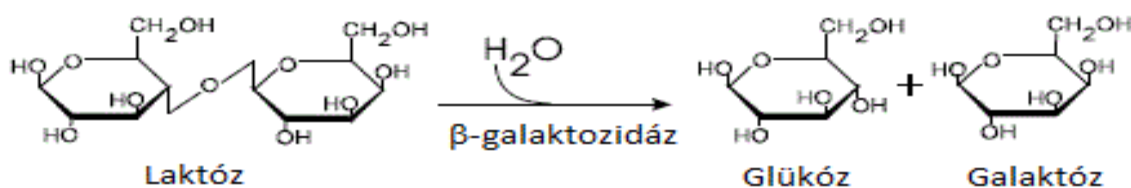


**1. ábra A  $\beta$ -galaktozidáz térszerkezete (forrás: Protein Data Bank)**

A laktáz mellett, hogy nagyszerű modellt szolgáltasson a fehérjékkel foglalkozó kutatások számára, egy nagyon széles körben elterjedt betegség, a laktóz intolerancia kezelésére is alkalmazható, így vizsgálata gyógyászati megfontolásokból is megalapozott.

### **2.3.1. Laktóz intolerancia**

A tejcukor, más néven laktóz egy diszacharid, amely sok élelmiszerben megtalálható. Természetes formában, legnagyobb mennyiségben a tejben és tejtermékekben (vaj, sajt, joghurt, tejszín) fordul elő. A tejtermékek a kiegyensúlyozott, teljes értékű táplálkozás fontos részei: a szervezetet kalciummal és más ásványi anyagokkal, fehérjékkel és vitaminokkal látják el. Emésztése során a  $\beta$ -galaktozidáz a laktózt két monoszachariddá, glükózzá és galaktózzá hidrolizálja (2. ábra), amik már képesek felszívódni a véráramba, és ezáltal energiát szolgáltatnak.



**2. ábra Laktóz hidrolízise  $\beta$ -galaktozidáz enzimmel**

A laktóz intolerancia vagy tejcukor érzékenység egy olyan enzimhiányos vagy csökkent enzimműködéses emésztési zavar, melynek során a vékonybélben nem termelődik szükséges mennyiségű enzim, vagy annak működése nem megfelelő. A le nem bontott tejcukor ez esetben eléri a vastagbelet, ahol bakteriális bomlásnak indul és eközben olyan anyagok, pl. gázok keletkeznek, melyek jellegzetes gasztrointesztinális panaszokat okoznak (puffadás, hasi görcsök, bélkorgás, ozmotikus hasmenés, fejfájás).

A tejcukorérékenység egyénenként eltérő mértékű lehet, sokaknál csak nagyobb mennyiségű tej okoz problémákat, másoknál már egy kevés tejszín elfogyasztása is tüneteket okoz<sup>20</sup>. A laktóz intolerancia kialakulása szerint több típusba sorolható:

- 1) Primer vagy elsődleges felnőttkori tejcukorérékenység: Csecsemőkor után, bármilyen életkorban kialakulhat, genetikai oka van. Nem gyógyítható, de jól kezelhető állapot.
- 2) Szekunder vagy másodlagos felnőttkori (ún. szerzett) laktózérékenység: Számtalan oka lehet, bármilyen olyan hatás, ami a vékonybélben lévő laktáztermelő sejteket károsítja (pl. antibiotikumok, hasmenés, Crohn betegség). Ennek következménye a laktáz termelésének csökkenése vagy megszűnése.
- 3) Veleszületett laktóz intolerancia: Nagyon ritkán fordul elő, ebben az esetben már az újszülött szervezete sem képes az enzim termelésére.

A betegség kezelésében fontos szerepe van a diétának, de a tejtermékek elhagyása veszélyekkel jár, mivel a szervezet hosszú távon nem nélkülözheti a tejben és tejtermékekben található ásványi anyagokat, nyomelemeket és vitaminokat<sup>21</sup>. A legnagyobb problémát ilyen esetben a hiányos  $\text{Ca}^{2+}$  bevitel okozza, amivel megnő a csonttritkulás esélye, mivel a kalcium nélkülözhetetlen a csontok növekedéséhez és újraépüléséhez<sup>22, 23</sup>. A szükséges  $\text{Ca}^{2+}$  mennyisége az életkortól függ, a legnagyobb kockázatnak a csecsemők és kisgyermekek, várandós anyák és az idős emberek vannak kitéve.

### **2.3.2. A laktóz intolerancia kezelési módjai**

A tünetek kezelése megoldható laktózmentes termékek fogyasztásával vagy a laktáz enzim pótlásával. Mivel egyes becslések szerint a világ felnőtt lakosságának 70%-a nem képes megfelelően lebontani a tejcukrot<sup>24</sup>, ezért egyre több irányból és egyre intenzívebb erőfeszítések történnek annak érdekében, hogy hatékony és olcsó laktázkészítmények

kerüljenek piacra. Ezek általában olyan enzimtartalmú tabletták, melyeket étkezés előtt vagy után kell bevenni, és segítségükkel az elfogyasztott ételben lévő laktóz lebontható, mielőtt a vastagbélbe kerülne. Ezzel a laktóz intolerancia kellemetlen tünetei megszüntethetők vagy csökkenthetők, és így a betegeknek nem kell nélkülözniük a tejet és tejtermékeket sem<sup>25</sup>.

Előfordulhat azonban, hogy az enzim szájon át történő pótlása nem lehetséges, mivel a beteg érzékeny a készítményben lévő bizonyos segédanyagokra. Ilyen esetekben laktózmentes tejtermékek fogyasztása jelent megoldást, aminek feltétele a hatékony és gazdaságos laktózbontás.

## **2.4. Enzimek stabilizálása**

Mint az már a fentiekben bemutattam, a fehérjékre jellemző a nagyfokú érzékenység a fizikai és kémiai környezetre, ami nagyban megnehezíti az ipari felhasználásukat, és a gyógyszerként való alkalmazásukat. Mivel stabilitásuk vizes közegben alacsony, ezért a víz kíméletes elvonása ezekből a rendszerekből legtöbbször a stabilitás jelentős javulásával jár együtt. Az enzimek hosszú távú eltarthatóságát ezért napjainkban leginkább szárítással vagy az enzim immobilizálásával biztosítják, melynek eredményeként szilárd készítményeket kapunk. A szilárd forma további előnye, a folyékony formulákkal szemben, hogy praktikus felhasználást biztosít, könnyebb tárolást és szállítást tesz lehetővé, ami nagyban elősegíti terápiás alkalmazhatóságát. Azonban az enzimek érzékenysége miatt szárításuk során számos nehézségbe ütközhetünk, és a napjainkban elterjedt szárítási módszerek a nem megfelelő kíméletesség miatt csak mérsékelt hatékonyságúak.

A leggyakrabban alkalmazott szárítási technológiák közül kiemelhetjük a fagyasztva szárítást és a porlasztva szárítást.

Mivel a fagyasztva szárítás (liofilizálás) jelenleg a leggyakrabban alkalmazott szárítási technológia, a szakirodalom kiemelten foglalkozik a fagyasztási és szárítási lépések közben fellépő stresszhatásokkal és ezek lehetséges leküzdésével. A módszer két fő lépésből áll: a fehérjeoldat fagyasztását követően a szárítás során a víz eltávolítása vákuum alatt történik. A fagyasztva szárítás során számos stresszhatás éri a fehérjét, mely annak denaturációját eredményezheti. A fagyasztási lépés során keletkező jégkristály struktúrák jelentősen károsíthatják a fehérjék negyedleges szerkezetét, mely sokszor irreverzibilis aktivitáscsökkenéshez vezet. Ezen kívül a fagyasztás alatt a makromolekulákat károsíthatja a

mikrokörnyezet változása, mint például a növekvő só koncentráció vagy a pH megváltozása, továbbá a fagyasztás sebessége is hatással lehet a makromolekulák aggregálódására. Ezek a hatások csökkenthetők különböző segédanyagok (cukrok, sók, poliolok, polimerek) alkalmazásával illetve a szárítási körülmények megfelelő megválasztásával. A  $\beta$ -galaktozidáz fagyasztva szárítását több kutatás során is vizsgálták, melyek során különböző cukrok (pl. mannitol, inozitol, trehalóz) és sók (pl. kálium-klorid, magnézium-acetát, kálium-citrát) segítségével próbálták javítani a termékben lévő enzim aktivitását és stabilitását. A kutatások során kimutatták, hogy segédanyagok felhasználása nélkül a szárított enzim jelentős mértékben veszít aktivitásából a kiinduláshoz képest<sup>26</sup>. A kísérletek során azt is megállapították, hogy a segédanyagok koncentrációjának megfelelő megválasztásával jelentős javulás érhető el, viszont még így is tapasztaltak aktivitásvesztést<sup>27</sup>. Azon túlmenően, hogy a fagyasztva szárítás nem kellően kíméletes dehidratálási módszer, további jelentős hátránya, hogy rendkívül idő- és energiaigényes technológia, mely csak szakaszosan üzemeltethető.

Egy másik gyakran alkalmazott módszer a porlasztva szárítás, melyet leginkább az élelmiszeriparban használnak. Amellett, hogy a szárítási lépés pillanatszerű, a technológia egyik legfontosabb előnye, hogy a termelési igényeknek megfelelően tervezhető, mivel a folyamat kapacitása nem korlátozott, akár 100 tonna is előállítható vele egy hónapban. Hatásosan ez a technológia is csak segédanyagok felhasználásával alkalmazható. Trehalóz hozzáadása esetén is csupán 70%-os aktivitású szilárd laktáz formát sikerült létrehozni a technológiába<sup>28</sup>. A fagyasztva szárításhoz képest rugalmasabb technológia, viszont hátrányként megemlíthető, hogy jelentős hőstressz érheti az anyagot, valamint a folyamat során nagy mennyiségű fűtött levegő távozik a rendszerből anélkül, hogy a szárításhoz hozzájárulna, így az energiahatékonyság ebben az esetben is roppant alacsony.

## **2.5. Enzimek immobilizálása**

Az enzimek különböző immobilizálási módszerekkel is szilárd formába hozhatóak. A legismertebb immobilizálási technikák közé tartozik a fizikai adszorpció, kovalens rögzítés és hordozóba ágyazás, melyekről részletes tanulmányok találhatóak a szakirodalomban<sup>29</sup>. Az immobilizált enzimek felhasználásával heterogén katalízises reakciók valósíthatók meg, ami lehetőséget ad az immobilizált enzimek újrafelhasználására. Egy immobilizálási technológia szempontjából igen fontos kérdés, hogy a módszerrel előállított szilárd enzimforma a visszaforgatási lépések során megőrzi-e aktivitását.

Egy kutatás során a  $\beta$ -galaktozidáz Concanavalin A-ra történő fizikai adszorpcióját vizsgálták. Az immobilizált enzim a szabad enzim aktivitásának 82%-át őrizte meg, mely több lépéses újratermelés során 25%-al csökkent<sup>30</sup>.

Kitozánhoz kovalensen kötött laktáz vizsgálata során az immobilizálás után 18,4%-os aktivitást tapasztaltak. Az immobilizálás során az enzim termotabilitása nőtt, de az affinitása csökkent ( $K_m$  érték (Michaelis állandó) 2,5x-re nőtt), és 4 lépéses szakaszos újratermelés során a kiindulási aktivitás 20%-al csökkent<sup>31</sup>.

$\beta$ -galaktozidáz polivinil-alkohol (PVA) hidrogélbe ágyazása során 32%-os túlélést sikerült elérni. A beágyazott enzim megőrizte ezt az aktivitást szakaszos újratermelés és 530 óra folyamatos üzemű alkalmazás esetén is, illetve alacsony hőmérsékleten tárolva (4 °C) 2 éves tárolás után is stabil maradt a minta<sup>32</sup>.

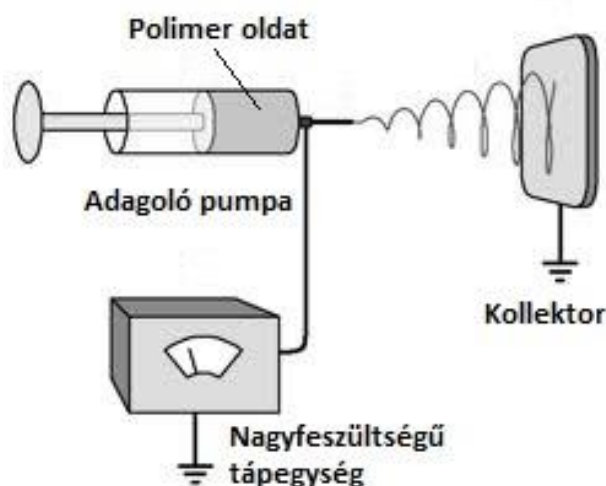
## **2.6. Elektrosztatikus nanoszálképzés**

Az eddig leírtak alapján elmondható, hogy a szilárd formulálás által növelhető az enzimek stabilitása, azonban a hatékonyságot nagyban befolyásolja az alkalmazott módszer és annak körülményei, ezért a folyamat megtervezése nagy körültekintést igényel. Látható, hogy a jelenleg elterjedt különböző szárítási és immobilizálási technológiák felhasználási lehetőségei korlátozottak, mivel nem kellően kíméletesek vagy gazdaságosak és ezért igény van alternatív szárítási technológiák megjelenésére.

Az általam alkalmazott szárítási technológia az elektrosztatikus nanoszálképzés volt, mely a kíméletes és pillanatszerű dehidratáció és a rendkívül gazdaságos termelési lehetőség miatt versenyképes alternatíva lehet az eddigiekben bemutatott technológiák mellett.

Az elektrosztatikus szálképzés (electrospinning) már egy régóta ismert technológia, azonban az elmúlt évtizedekig csak viszonylag kevés figyelmet kapott. A '90-es évektől fejlődése jelentősen felgyorsult, köszönhetően a nanotechnológiai kutatások előretörésének. A technológiát több iparágban is alkalmazzák és további lehetséges alkalmazhatóságát számos területen intenzíven kutatják. Napjainkban a textil és műanyag ipar használja leginkább szűrők<sup>33</sup>, biokatalizátor hordozók<sup>34</sup>, nanokompozitok<sup>35</sup>, szenzorok, védőbevonatok és féláteresztő membránok<sup>36</sup> gyártására, illetve gyógyászati alkalmazásai is ismertek (sebgyógyítás<sup>37</sup>, gyorsított hatóanyagleadás<sup>38</sup>, nyújtott hatóanyagleadás<sup>39,40</sup>).

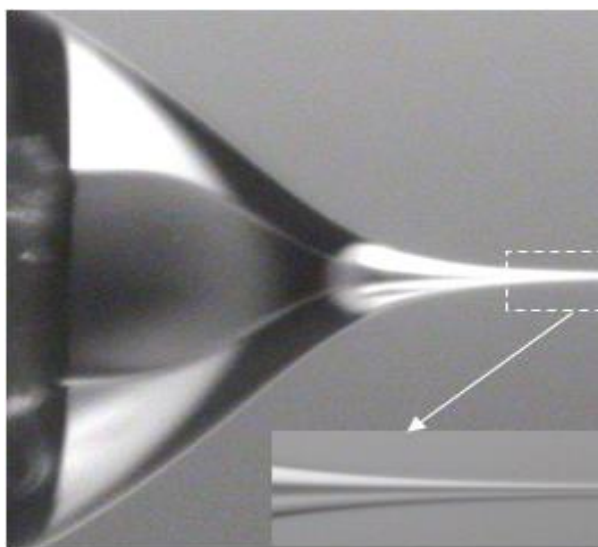
Az elektrosztatikus szálképzés elektromos erőtér segítségével képez nanoszálakat, melyek átmérője szűk méreteloszlást mutat, általában 5-500 nm közé esik<sup>41</sup>. A berendezés (3. ábra) egy kondenzátorhoz hasonlítható, aminek fegyverzetei közé nagyfeszültséget (~10-35 kV) kapcsolnak. Ez az erőtér kölcsönhatásba tud lépni elektromosan vezető folyadékokkal, például különböző polimerek szerves oldószeres vagy vizes oldatával. Ezt általában az anódon helyezik el, a végtermék gyűjtésére használt ellenelektrodát pedig földelik, így közöttük elektrosztatikus erőtér alakul ki. Ennek hatására a polimer oldatcsepp kúp alakot vesz fel, melyet első leírója tiszteletére Taylor-kúpnak neveznek<sup>42</sup> (4. ábra).



**3. ábra Elektrosztatikus szálhúzó berendezés**  
(forrás: <http://www.neotherix.com/technology.php>)

Mikor a Coulomb erő meghaladja a folyadékcsepp felületi feszültségének visszatartó erejét a kúp hegyéből egy vagy több, vékony folyadéksugár lép ki a földpont felé. A kilépő sugár a két kollektor közötti térrészben felgyorsul, megnyúlik, és ez által elvékonyodik, felülete megnő és így az oldószer elpárolgásával a polimer szál megszilárdul.

Mindez a másodperc töredéke alatt játszódik le (~0,1 s), így elmondható, hogy a szárítás pillanatszerű. Ez csak egyike a módszer számtalan előnyének, melyek közül kiemelhető, hogy egyszerű, folyamatos technológia, szobahőmérsékleten és légköri nyomáson alkalmazható és emellett a gyártás energiaigénye rendkívül alacsony.



**4. ábra Taylor-kúp (forrás: <http://www.yflow.com/?q=node/3>)**

Előfordul, hogy a szálképzés során gyöngysor szerű szálak képződnek, illetve a szálak lehetnek laposak és esetenként az átmérőjük méreteloszlása is széles tartományban mozog. A képződő szálak alakja és mérete számtalan paramétertől függ, például az alkalmazott polimer tulajdonságaitól (molekulatömeg, üvegesedési hőmérséklet, oldhatóság) és a polimer oldatának jellemzőitől (viszkozitás, viszkoelasztikus viselkedés, koncentráció, felületi feszültség, elektromos vezetőképesség) is, valamint az oldószer parciális gőznyomása és a környezet relatív páratartalma is hatással lehet a képződő szálak paramétereire. Ezen kívül az oldat adagolás sebessége, az elektromos erőter térerőssége és az elektródok geometriája (és ezáltal az elektromos erőter formája) ugyancsak fontos szerepet játszik a szálképzésben<sup>43</sup>.

Mivel az elektrosztatikus szálképzés igen kíméletes és pillanatszerű szárítást tesz lehetővé, ezért érdemes vizsgálni a biotechnológiai alkalmazásának lehetőségeit. A következő fejezet egy rövid áttekintést nyújt az eddigi hasonló témájú kutatásokról.

#### **2.6.1. Az elektrosztatikus nanoszálképzés biotechnológiai alkalmazásai**

Egy kutatás során PLGA (poli(tejsav-glikolsav)) és PLA-PEG (politejsav-polietilén-glikol) felhasználásával készült nanoszálakba ágyaztak plazmid DNS-t. Megfigyelték, hogy a beágyazott DNS-darab kioldódás után is ép maradt, és továbbra is képes volt a  $\beta$ -galaktozidáz kódolására<sup>44</sup>.

Egyes vírusok (TMV (dohánymozaik vírus), T7, T4,  $\lambda$ ) szálakba ágyazása is sikeresnek bizonyult, megtartva azok biológiai aktivitását<sup>45,46</sup>.

Teljes sejtek és mikroorganizmusok elektrosztatikus szálképzését is vizsgálták, úgy mint *Saccharomyces cerevisiae*<sup>47</sup>, *C. elegans* lárvák<sup>48</sup>, *Xenopus tropicalis* embriók<sup>49</sup>, zebrahal embriók<sup>50</sup>. A legtöbb esetben megállapították, hogy az elektrosztatikus szálképzés után a sejtek képesek voltak szaporodni, azaz a folyamatnak nem voltak negatív hatásai a sejtek életképességére.

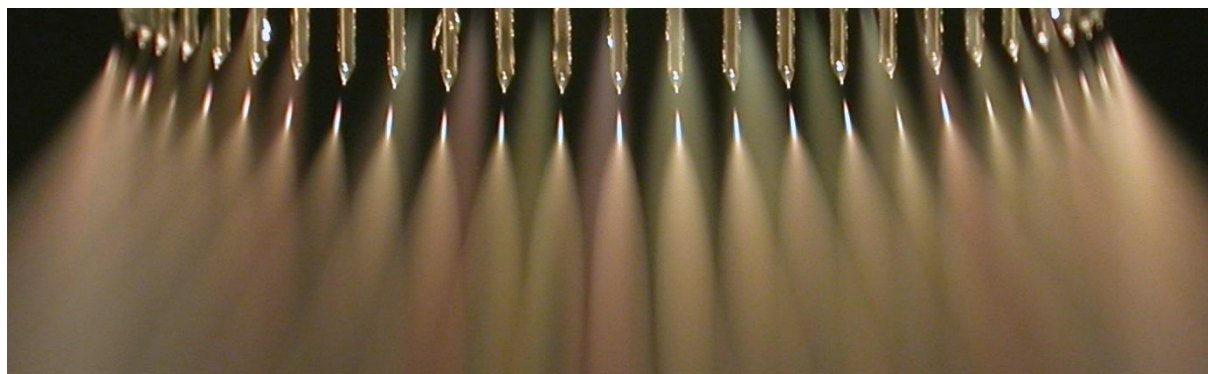
Fehérjékkel történő nanoszálképzésére is már nagyszámú példa található a szakirodalomban, borjú szérum albumin<sup>51</sup>, hemoglobin és mioglobin<sup>52</sup> beágyazása is mind sikeresnek bizonyult.

A technológia a tapasztalatok szerint jól használható enzimek immobilizálására, de ennek vizsgálatával még csak korlátozott számú kutatás foglalkozott. Eddigi kísérletek során lipáz<sup>53, 54</sup>, lizozim<sup>55</sup>,  $\alpha$ -kimotripszin<sup>56</sup>, szuperoxid-diszmutáz<sup>57</sup>, és tirozináz<sup>58</sup> enzimek beágyazása szálképzéssel már megtörtént, különböző polimerek (PEG, PLA, PS (polisztirol), PVA, PAN (poliakrilonitril)) felhasználásával. Az eredmények függtek az alkalmazott polimertől és az immobilizálás típusától (kovalens rögzítés, beágyazás).

### 2.6.2. Az elektrosztatikus nanoszálképzés méretnövelése

A folyamatos gyártás ipari méretű megvalósításának szempontjából nagyon biztató, hogy az elektrosztatikus nanoszálképzés méretnövelése már megoldott, köszönhetően a textilipari és szűréssel foglalkozó fejlesztéseknek. Több technológia is létezik, amit már sikeresen alkalmaztak a technológia méretnövelésére, de jelenleg is fejlesztések folynak az eddig elért termelési eredmények növelésére illetve új elveken alapuló eljárások megvalósítására<sup>59</sup>.

A legegyszerűbb méretnövelési lehetőség a szórófejek megsokszorozása, amit már számos ipari vállalatnál alkalmaznak elsősorban szűrőbetétek gyártására. (5. ábra)



5. ábra Elektrosztatikus szálképzés méretnövelése sok szórófej alkalmazásával

A szórófejek száma akár az 1000 darabot is elérheti. Ennek a megoldásnak az egyik legnagyobb hátránya, hogy egy fej eldugulása esetén a többi fejen jön ki nagyobb mennyiségű anyag, ami zavart okozhat (pl. nem megfelelő száradás). Ez elkerülhető lehet úgy, hogy minden fejhez külön pumpa csatlakozik, viszont ilyen nagyszámú külön pumpa ugyancsak hátrányokkal járna. Egy másik gyakran említett hátránya a sok szórófejes megoldásnak az igen nehézkes tisztíthatóság<sup>60</sup>.

Egy másik elven alapuló méretnövelési lehetőség a szabad folyadékfelszínről történő szálképzés (6. ábra). Ezzel a sok szórófejes esetben említett hátrányok (pl. fejdugulás, tisztíthatóság) nagyrészt kiküszöbölhetőek, és egyben a nagy termelékenység is biztosítható<sup>61</sup>. A szabad folyadékfelszínen megfelelő görbületeket kell kialakítani ahhoz, hogy szálak tudjanak kilépni a felszínről<sup>62</sup>.



**6. ábra Forgó hengeres elektrosztatikus szálképzés**

Napjainkban a legelterjedtebb méretnövelési technológia esetén, melyet főleg szűrők gyártására használnak fel, egy forgó elem, jellemzően henger merül egy kádban elhelyezkedő polimer oldatba, ami forgása révén saját felszínére hordja fel az anyagot<sup>63</sup>. Akár 1,6 méter hosszú hengerek is használhatók, és ezekből többet egymás után téve a termelés meghaladhatja a napi 10 kg-ot.

Az elektrosztatikus erők kombinálhatók egyéb nyújtóerőkkel. Ismertek például olyan nagynyomású porlasztólevegőt alkalmazó eljárások, amelyek viszonylag egyszerűen megvalósíthatók. Ebben az esetben egy hagyományos porlasztófej is alkalmazható, amire nagyfeszültséget kapcsolva megfelelő összetételű oldatból nanoszálak képezhetők. Léteznek nagy sebességgel forgó tárcsákkal megvalósított szálképzési eljárások is, melyek egy részénél jelenleg nem alkalmaznak elektrosztatikus erőket. A szálképzés valamint a szálak megnyúlása e megoldásoknál elsősorban a légellenállás és a fej elfordulásának hatására történik.

A nagysebességű forgótárcsás technológia kombinálható nagyfeszültséggel, ami elsősorban a szálak összegyűjtésében és egyenletes eloszlásában segít. Ennél a technológiánál alkalmazott szórófejet a festő és fényező iparban porlasztásra fejlesztették ki, és jelenleg is autók festésére, fényezésére használják (7. ábra). A nagy teljesítményű és hatékonyságú eljárás tehát már jól bevált, kifinomult ipari technológiának számít. Ebben az esetben a centrifugális és a légellenállási erők mellett az elektrosztatikus erők (nagyobb feszültség, akár 100 kV alkalmazása) is a szálak nyúlását, vékonyodását segítik elő, valamint a porlasztólevegő - amit ugyancsak használ ez a technika - további nyújtóerőt biztosít. Így e technológia esetében mindhárom kiemelt alapelv (nagyfeszültség, porlasztólevegő, nagysebességű tárcsa) szerephez jut.



**7. ábra Autók festésére használt elektrosztatikus forgó porlasztófej (forrás: <http://www.globalspec.com/>)**

### 3. FELHASZNÁLT ANYAGOK, KÍSÉRLETI MÓDSZEREK

#### 3.1. Felhasznált anyagok

##### 3.1.1. Laktáz enzim

A kísérletekhez az Optiferm cég által porlasztva szárítással előállított opti-lactase P nevű laktáz tartalmú port használtam. Az enzimet egy kiválasztott *Aspergillus oryzae* törzs felhasználásával, fermentációs úton állították elő. A kapott enzim optimuma 55 °C-on, 4,5-ös pH-nál van.

##### 3.1.2. Orto-nitrofenol-β-galaktopiranozid (ONPG)

Az enzimaktivitás mérésére használt egyik anyag a szintetikus orto-nitrofenol-β-galaktopiranozid (röviden ONPG) volt, melyet a Carbosynth cégtől rendeltük.

Összegképlet:  $C_{12}H_{15}NO_8$

Molekulatömeg: 301,25 g/mol

##### 3.1.3. Cukrok

A folyadékkromatográfiás mérésekhez használt cukrok a Sigma-Aldrich által gyártott laktóz (tisztaság: ≥99%), glükóz (tisztaság: 99,5%) és galaktóz (tisztaság: ≥99%) voltak.

##### 3.1.4. Polimerek

###### 3.1.4.1. Polivinil-pirrolidon (PVP K-30, K-90)

Összegképlet:  $(C_6H_9NO)_n$

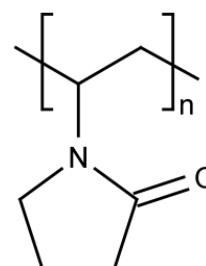
Átlagos molekulatömeg: PVP K-30: ~50 000 Da

PVP K-90: ~1 000 000 Da

Megjelenése: fehér, por

Üvegesedési hőmérséklet: 155 °C

Oldhatóság: vízben jól oldódik



#### 3.1.4.2. Polivinil-alkohol (PVA)

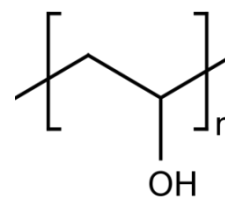
Összegképlet:  $(C_2H_4O)_n$

Átlagos molekulatömeg: 130 000 Da

Megjelenése: fehér, por

Üvegesedési hőmérséklet: 85 °C

Oldhatóság: vízben jól oldódik



#### 3.1.4.3. Polietilén-glikol (PEG)

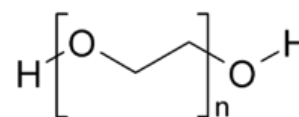
Összegképlet:  $C_{2n}H_{4n+2}O_{n+1}$

Átlagos molekulatömeg: 400 000 Da

Megjelenése: fehér por

Üvegesedési hőmérséklet: 63 °C

Oldhatóság: vízben jól oldódik



#### 3.1.4.4. Politejsav (PLA)

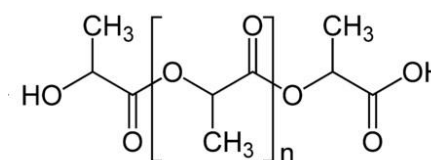
Összegképlet:  $(C_3H_4O_2)_n$

Átlagos molekulatömeg: 160 000 Da

Megjelenése: fehér granulátum

Üvegesedési hőmérséklet: 60-65 °C

Oldhatóság: vízben nem oldódik



#### 3.1.5. Tween® 80 (Polioxietilén- szorbitán- monooleát)

A kísérletek során minden alkalommal az oldatkészítés során a polimer oldathoz 30-80 µl Tween-t adtam, attól függően, hogy milyen volt a kiinduló oldat összetétele. Alkalmazásának célja az volt, hogy csökkentse az oldat felületi feszültségét, és ez által biztosítsa a hatékony szálképzést.

## 3.2. Felhasznált eszközök, mintakészítés

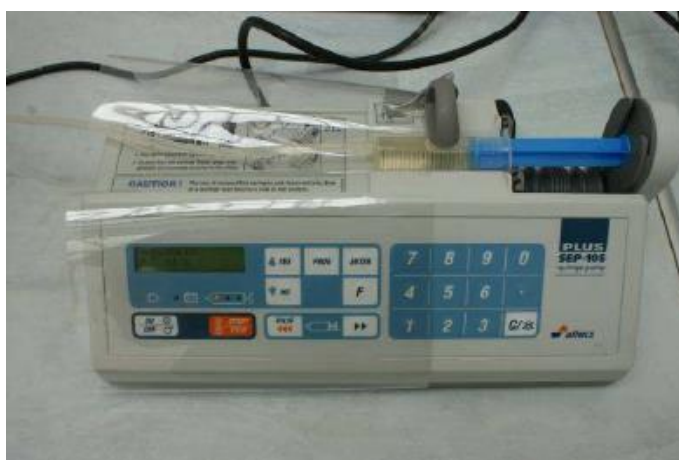
### 3.2.1. Elektrosztatikus szálhúzó berendezés

A laktáz enzim szilárd formulálását elektrosztatikus szálhúzó berendezés (electrospinner) segítségével valósítottam meg (8. ábra). Az általam használt készülék három fő részből áll: egy adagoló pumpával összekötött porlasztó fejből, egy nagyfeszültségű tápegységből, és egy szálgyűjtőből (kollektor).



8. ábra Elektrosztatikus szálhúzó berendezés

Az enzimet tartalmazó polimer oldatot egy programozható pumpa (9. ábra) segítségével jutattam a porlasztó fejre. A pumpán 0,1 ml/h-s pontossággal beállítható az adagolás, így biztosítható a megfelelő szálképzéshez szükséges áramlási sebesség.



9. ábra Adagoló pumpa

A fecskendő hegyétől az oldatot egy vékony szilikon csövön keresztül vezettem el, amelynek végére egy porlasztófejet erősítettem. Szálgyűjtőként egy teflonbevonatú sík fémlapot használtam. A szálhúzás során egy egyenáramú tápot (10. ábra) használtam, melynek feszültsége 5 kV és 65 kV között változtatható.



**10. ábra Nagyfeszültségű tápegység**

A feszültség mellett fontos paraméter a térerősség, mely legegyszerűbben a két elektród közötti távolsággal módosítható. Az általam alkalmazott távolság kb. 12-15 cm volt, attól függően, hogy a szálképzést mi segítette elő jobban. Ezzel az elrendezéssel az egyenletes folyadékadagolásnak köszönhetően több óra folyamatos üzemű elektrosztatikus szálhúzásra volt lehetőségem. Ez alatt az idő alatt megfelelő mennyiségű mintát sikerült előállítani a későbbi vizsgálatokhoz.

### **3.2.2. A $\beta$ -galaktozidáz enzim beágyazása vízdoldható polimer nanoszálakba**

Első lépésként a kiválasztott polimert oldottam desztillált vízben mágneses kevertetés mellett, majd a polimer oldódását követően a szabad enzimet is feloldottam desztillált vízben. Az elkészített oldatok bemérési mennyiségei az 1. táblázatban találhatóak.

**1. táblázat Az elkészített oldatokhoz használt bemérési mennyiségek**

|                | <b>Polimer</b> | <b>Víz</b> | <b>Enzim</b> | <b>Víz</b> |
|----------------|----------------|------------|--------------|------------|
| <b>PVP K90</b> | 1 g            | 4,7 g      | 0,25 g       | 1 g        |
| <b>PVP K30</b> | 1 g            | 1 g        | 0,25 g       | 0,25 g     |
| <b>PVA</b>     | 1 g            | 7,75 g     | 0,25 g       | 1,25 g     |
| <b>PEG</b>     | 0,4 g          | 9 g        | 0,1 g        | 1 g        |

Ezt követően az enzimoldatot automata pipettával a polimer oldatához pipettáztam, és hozzáadagoltam 30-80  $\mu$ l felületaktív anyagot (Tween®) a későbbi szálképzés segítése céljából. Ezután fecskendővel felszívtam a homogén oldatot, majd miután a fecskendőt az automata adagolóba helyeztem, 0,5-1,5 ml/órás adagolási sebességgel (attól függően, hogy melyik szolgálta legjobban a szálképződést) elindítottam a folyamatot. Amint az első csepp megjelent a porlasztófejen, beindítottam a nagyfeszültségű tápegységet, melyet 25-35 kV-ra állítottam. A folyamat végén (kb. 2-3 óra) 200-500 mg anyagot gyűjtöttem össze a kollektorról a későbbi vizsgálatok elvégzéséhez.

### 3.2.3. Elektrosztatikus szálképzés méretnövelése

A méretnöveléses kísérletek során egy Reiter HR Center Bell típusú, sűrített levegővel működő nagysebességű elektrosztatikus porlasztó/szálképző berendezéssel dolgoztam (11. ábra). Az oldatkészítés menete megegyezett az előző pontban leírtakkal. A folyamat során az adagolófej fordulatszáma 30 000 rpm, az alkalmazott feszültség 60 kV és az adagolási sebesség 120 ml/h volt. Az adagolófej és a kollektor távolsága 26 cm volt. A folyamatos üzemelés perisztaltikus pumpa segítségével oldható meg.



11. ábra Reiter HR Center Bell típusú nagysebességű porlasztó berendezés

### **3.2.4. A $\beta$ -galaktozidáz enzim beágyazása vízdíhatatlan polimer nanoszálakba**

A kimért PLA-hoz (1 g) mérlegen kloroformot (19,13 g) adtam hozzá és mágneses keverőn teljes feloldódásig kevertetem (kb. 45 perc). Ezután a polimeroldathoz hozzáadtam 2 ml dimetilformamidot (DMF). Ezt követően a kimért desztillált vízhez (0,671 ml) hozzáadtam az enzimet (0,1 g) és keveréssel feloldottam. Az enzimoldatot automata pipettával belepipettáztam a polimeroldatba, majd ultrahangos kádban tíz percig emulgeáltam. A kialakult emulziót fecskendővel felszívtam és a már előbb ismertetett módon elindítottam a szálképzést. Az adagolási sebességet 8 ml/óra-ra, a feszültséget pedig 30 kV-ra állítottam. A folyamat végén ~0,5 g anyagot gyűjtöttem össze a kollektorról a későbbi vizsgálatok elvégzéséhez.

## **3.3. Vizsgálati módszerek**

### **3.3.1. Pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálat (SEM - Scanning Electron Microscope)**

Annak érdekében, hogy megvizsgálhassam, hogy az enzim beágyazása hatással volt-e a keletkező polimerszálak morfológiájára, pásztázó elektronmikroszkópos vizsgálatokat végeztem. A vizsgálatokat JEOL JSM-6380LA típusú pásztázó elektronmikroszkóppal végeztem 25kV gyorsító feszültség és 10 mm-es mintatávolság mellett, nagy vákuumban. A vizsgált mintákat kétoldalú szén-ragasztóval réz tuskókhoz rögzítettem, majd JEOL 1200 típusú berendezéssel aranyoztam, a töltődés elkerülése érdekében.

### **3.3.2. Aktivitásmérés**

A minták biológiai aktivitását két különböző módon vizsgáltam, egy spektrofotometriás (ONPG) és egy folyadékkromatográfiás (HPLC) módszerrel. Minden esetben a szabad enzim (a kiindulási laktáztartalmú por) és az formulált enzim aktivitását párhuzamosan mértem, hogy az eredmények összehasonlíthatóak legyenek. Az aktivitást unitban adtam meg: 1 unit az az enzim mennyiség, ami 1  $\mu$ mol szubsztrátot alakít át 1 perc alatt 55 °C-on, 4,5-ös pH-n.

#### **3.3.2.1. Oldatkészítés a szabad enzimből**

A szabad enzimből 100 mg-ot mértem be, majd ezt 10 ml desztillált vízben feloldottam, majd hígítási sort készítettem. Az ONPG-vel végzett aktivitásmérés esetén  $10^{-3}$  g/l, a HPLC-s mérés esetén 1 g/l volt a végső enzimoldat koncentrációja az enzimre nézve. Minden hígítási lépésnél alapos vortexelést végeztem.

#### **3.3.2.2. Oldatkészítés a vízdoldható polimerekkel készült mintákból**

A vízdoldható polimerek (PVA, PVP K90 és K30, PEG) felhasználásával készült mintákból első lépésben kimértem 10 mg-ot, majd az anyagot 10 ml desztillált vízben oldottam és ezt követően hígítási sort készítettem. A végső oldat koncentrációja az ONPG-vel végzett mérésnél  $10^{-3}$  g/l, a HPLC-s mérés esetén 1 g/l volt enzimre nézve. Ebben az esetben is minden hígítási lépés előtt az oldatokat alaposan vortexeltem.

#### **3.3.2.3. Mintaelőkészítés a vízdoldhatatlan polymerrel készült mintából**

A politejsavval (PLA) készült minta esetén csak folyadékkromatográfiás méréseket végeztem. Ennél a mintánál nem volt lehetőségem hígítási sort készíteni, és ezért már kiinduláskor 12 mg-ot mértem be, melynek enzimtartalma 1 mg.

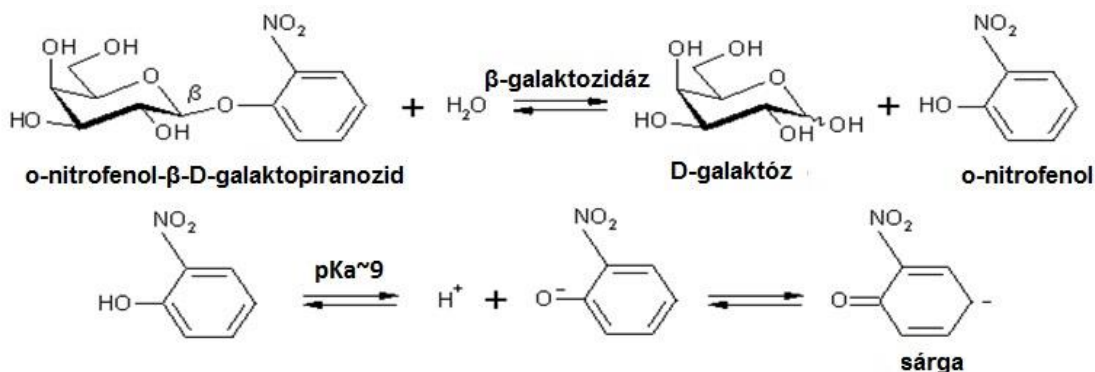
#### **3.3.2.4. Reakció menete**

A végső oldatokból 100  $\mu$ l-t pipettáztam egy kémcsőbe, majd a kémcsőbe keverőmagot helyeztem. A PLA-val készített minta esetén a bemért szilárd minta mellé 100  $\mu$ l desztillált vizet pipettáztam. A legtöbb vizsgálatot négy vagy hat párhuzamossal (ugyanabból a végső oldatból) végeztem. A reakciókat egy vízfürdőben (55 °C) végeztem, ahol a mágneses kevertetés megoldott. A kémcsővekbe kimért  $10^{-3}$  g/l-es oldatokat kémcsőállványban a vízfürdőbe helyeztem és 1 percre temperáltattam őket. Ezután 1,5 ml 4,5-ös pH-jú 0,1 mólos acetát pufferben oldott szubsztrátot pipettáztam a kémcsővekbe. A reakció 10 percre futott, majd a szabad enzim és a vízdoldható polimeres minták esetén 1 ml 1 mólos  $\text{Na}_2\text{CO}_3$  segítségével állítottam le. A PLA-val készített mintánál csipesszel kivettem az immobilizált enzimet a reakcióelegyből, hogy leállítsam a reakciót, majd ebben az esetben is hozzáadtam az elegyhez 1 ml  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ -ot, hogy az esetlegesen lemosódott enzimet is inaktiváljam. A mintákat a vízfürdőből kivéve megvártam, míg szobahőmérsékletre hűlnek, majd spektrofotometria és HPLC segítségével meghatároztam az enzimaktivitást.

#### **3.3.2.5. Spektrofotometriás aktivitásmérés ONPG-vel**

Az o-nitrofenol- $\beta$ -galaktopiranozid (ONPG) egy szintetikus szubsztrát, melyet gyakran használnak a laktáz enzim aktivitásának megállapítására. Felépítése hasonlít a laktózéhoz és így alternatív szubsztrátja a laktáz enzimnek. Az anyag alapállapotban színtelen, viszont ha a  $\beta$ -galaktózidáz is jelen van akkor az ONPG-t galaktózzá és orto-nitrofenollá hidrolizálja (12.

ábra). Ez a második komponens lúgos közegben sárga színű, és így spektrofotométerrel detektálható 420 nm-en. A megjelenő szín intenzitását mérve következtethetünk a reakciósebességre, amivel az enzim a laktózt bontja.



**12. ábra ONPG hidrolízise β-galaktozidáz enzimmel**

A mérés előnye, hogy könnyen és gyorsan kivitelezhető, viszont legnagyobb hátránya, hogy a sárga szín megjelenése pH függő és a legintenzívebben csak 9-es pH felett jelenik meg, ahol az enzim aktivitása már megszűnik. Ezt a problémát úgy küszöböltük ki, hogy a reakciót az enzim pH optimumán futtattam majd 1 mólos Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> hozzáadásával állítottam meg, ami egyben a lúgos pH-t is beállította. A módszer másik hátránya a vele kapott eredmények viszonylag nagy szórása, ami miatt kevésbé precíz, mint a másik általam használt mérési módszer.

A mérést 6 milimólos ONPG oldattal végeztem, majd minden reakcióelegy abszorbanciáját mértem spektrofotométerrel. Minden minta és párhuzamos között a használt küvétát desztillált vízzel kimostam, majd szárazra töröltem.

A spektrofotometriás méréshez szükség volt vak mintára is, melyet a következőképp készítettem: A fent ismertetett módon elkészített törzsoldatokból az enzimet és a szubsztrátot külön-külön kémcsőbe mértem ki, majd ugyanúgy kezeltem őket, mint a többi mintát. A Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub>-ot az enzimhez pipettáztam, majd összeöntöttem az enzimet és a szubsztrátot. Az így kapott oldat abszorbanciáját kivontam a minták abszorbanciájából.

Készülék: Pharmacia Ultrospec III UV/Vis spektrofotométer (13. ábra)



**13. ábra Pharmacia Ultrospec III UV/Vis spektrofotométer**

#### **3.3.2.6. Folyadékkromatográfiás aktivitásmérés laktózzal (HPLC)**

A felhasznált szubsztrát ebben az esetben laktóz volt, amit az enzim glükózzá és galaktózzá hidrolizál. A keletkező cukrok analitikai pontosságú meghatározását folyadékkromatográfiás (High Performance Liquid Chromatography – HPLC) méréssel végeztem (14. ábra). A reakciósebesség számolását a laktózfogyásból végeztem, mivel a laktáz a keletkező monoszacharidok egy részéből transzglykolidáz aktivitása miatt galaktooligoszacharidokat készít, így a glükóz és galaktóz koncentrációk nem használhatók a számításokhoz. A galaktooligoszacharidokat általában probiotikus étrendkiegészítőként használják az élelmiszeriparban<sup>64</sup>.



**14. ábra Folyadékkromatográfiás készülék**

A méréshez 10 g/l-es laktóz oldatot használtam, majd a HPLC-vel végzett méréshez a mintaaoldatokat 0,45  $\mu$ m pórusméretű szűrővel átszűrtem, és ezt követően 700-1000  $\mu$ l-t HPLC mintatartó csövekbe pipettáztam. A készülék indításáig az így előkészített mintákat

hűtve tároltam. A folyadékkromatográfiás készülék adatait és a mérés körülményeit az 2. táblázat tartalmazza.

**2. táblázat HPLC adatai**

|                          |                                                         |
|--------------------------|---------------------------------------------------------|
| <b>Kolonna</b>           | Aminex ion kizárásos HPX-87H (BioRad, Hercules, CA USA) |
| <b>Mozgó fázis</b>       | 5 mM kénsav                                             |
| <b>Áramlási sebesség</b> | 0,5 ml/perc                                             |
| <b>Hőmérséklet</b>       | 65 °C                                                   |
| <b>Detektor</b>          | Shimadzu RID-10A (Shimadzu, Kyoto, Japan)               |

### **3.3.3. A minták tárolása**

A szálhúzással elkészített szilárd mintákat a szabad enzimhez hasonlóan zárt mintatartókban, hűtve (7 °C) tároltam. A tárolási hőmérséklet vizsgálatára egy PVP K90-nel készült mintát szobahőmérsékleten (20-25 °C) hagytam állni.

## 4. EREDMÉNYEK ÉS ÉRTÉKELEÉSÜK

Munkám során azt vizsgáltam, hogy a gyógyszerformulálás területén viszonylag újnak számító elektrosztatikus szálképzés alternatívát nyújthat-e a jelenleg elterjedt biohatóanyag szárítási technológiákkal szemben.

Különböző vízdoldható és vízdoldhatatlan polimerek felhasználásával készített szilárd enzimformák esetén vizsgálni kívántam, hogy az általam alkalmazott eljárás milyen hatással van egy terápiás célra igen gyakran alkalmazott enzimre, a  $\beta$ -galaktozidázra, hogy ezzel a módszerrel lehetséges-e stabil szilárd formula létrehozása, és megoldható-e így egy egyszerűbben és olcsóbban gyártható rendszer kialakítása a laktóz intolerancia hatékony kezelésére. Tanulmányoztam továbbá a tárolási hőmérséklet hatását a készített termékekre, és a minták biológiai aktivitásának változását, stabilitását a tárolási idő függvényében, illetve a technológia méretnövelésének lehetősége mellett a reprodukálhatóságot is vizsgáltam.

### 4.1. $\beta$ -galaktozidáz beágyazása vízdoldható polimer nanoszálakba

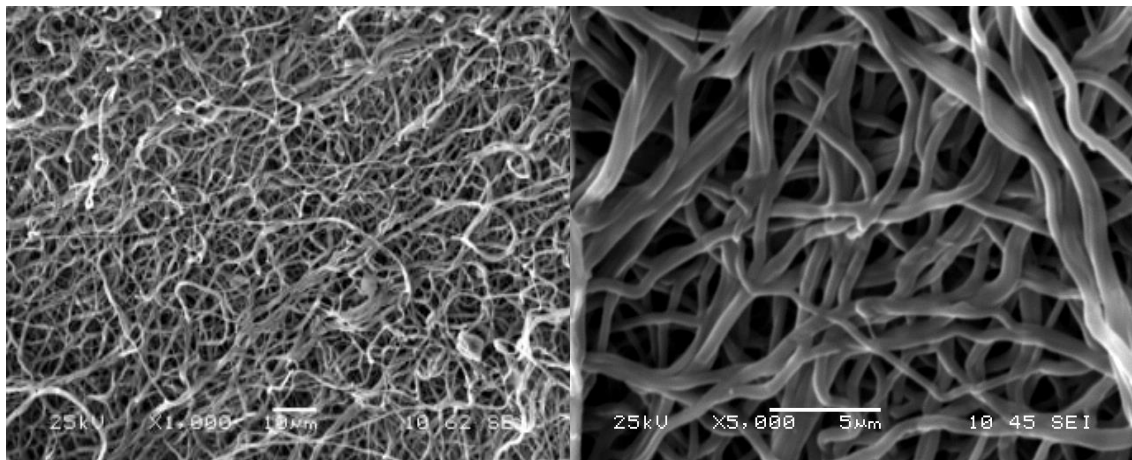
A tanszéken korábban tiszta polimer oldatokkal végzett kísérletek eredményeiből kiindulva meghatároztam az enzimtartalmú polimer oldatok esetében megfelelő szálképzést (egyenletes száilkilépés, megfelelő száradás, szálak termék, stb.) biztosító polimerkoncentrációkat (3. táblázat).

**3. táblázat Elektrosztatikus szálképzéshez felhasznált oldatok polimer koncentrációi**

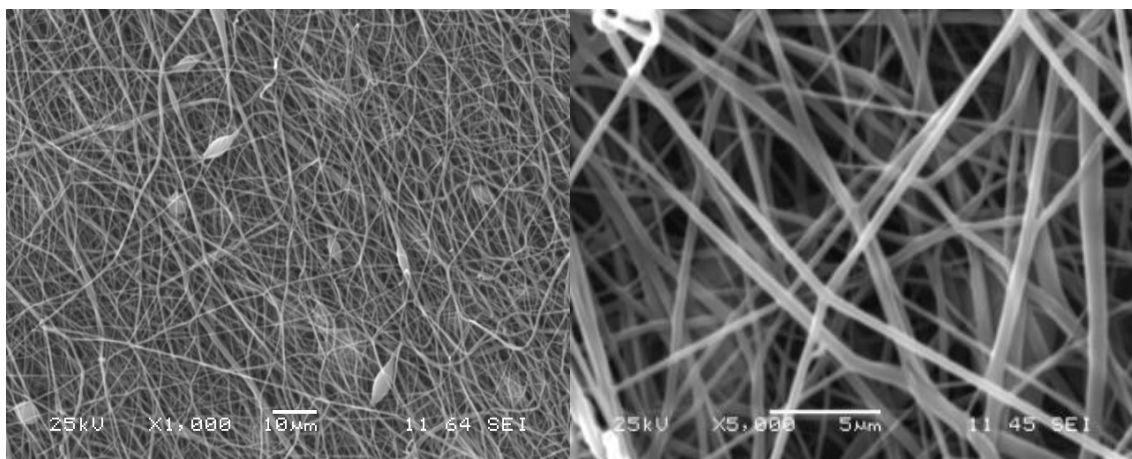
| <b>Polimer</b> | <b>Kiindulási oldat koncentrációja (m/m%)</b> |
|----------------|-----------------------------------------------|
| PVA            | 9,8%                                          |
| PVP K90        | 14,5%                                         |
| PVP K30        | 40%                                           |
| PEG            | 3,8%                                          |

A szálképzést követően az elkészült mintákról pásztázó elektronmikroszkópos (SEM) felvételeket készítettem (15. ábra) a képződő nanoszálak morfológiájának vizsgálata céljából.

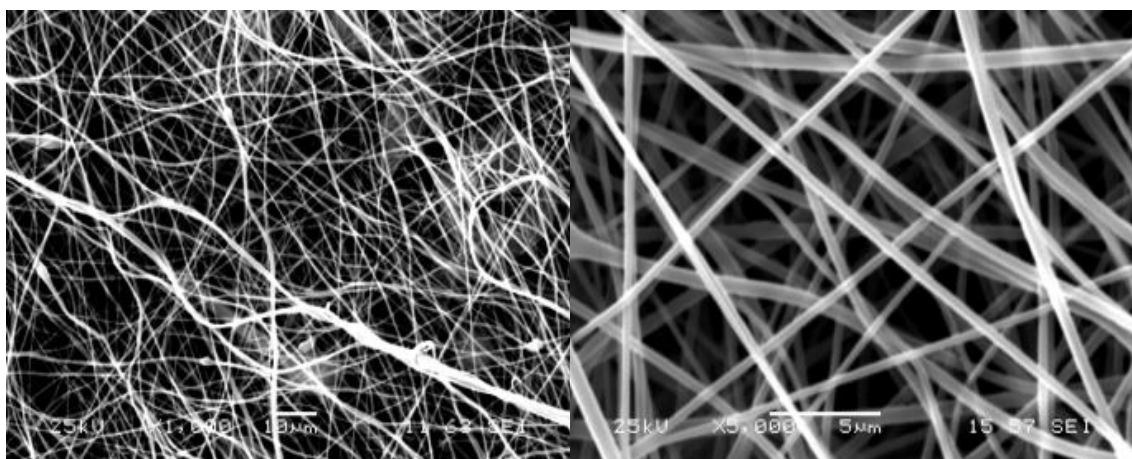
A felvételekről jól látszik, hogy a folyamat során sikerült egységes, szálas termékeket előállítani, ahol a szálak átmérője a mikronos-szubmikronos tartományba esik.



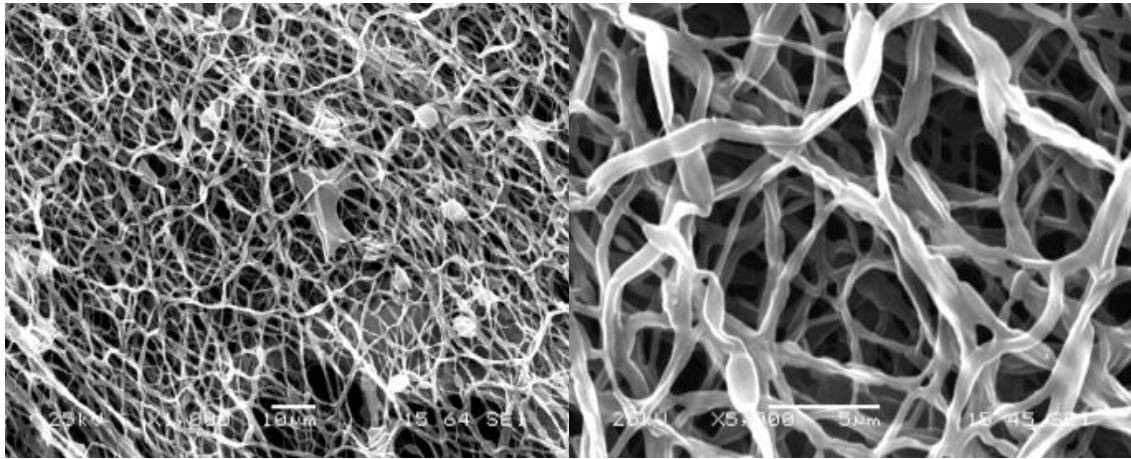
(a)



(b)



(c)

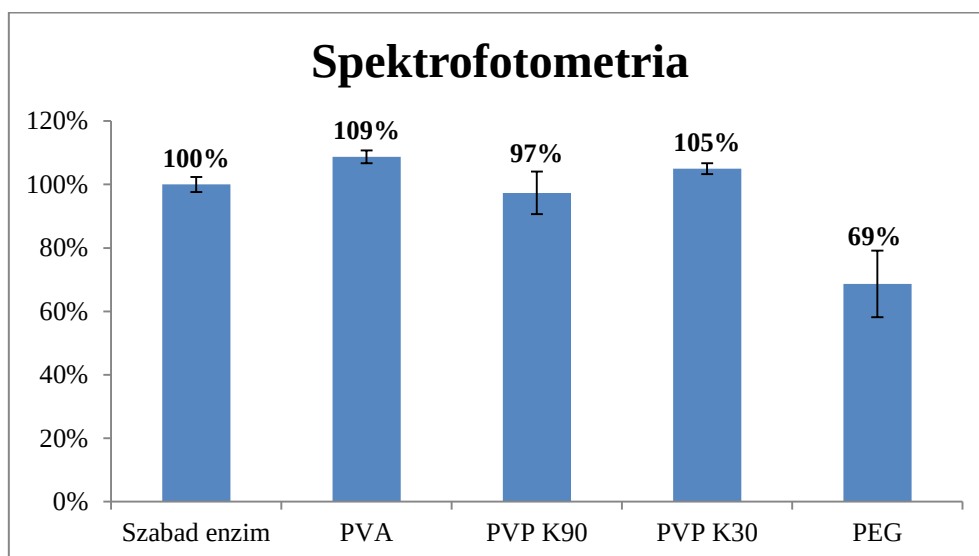


(d)

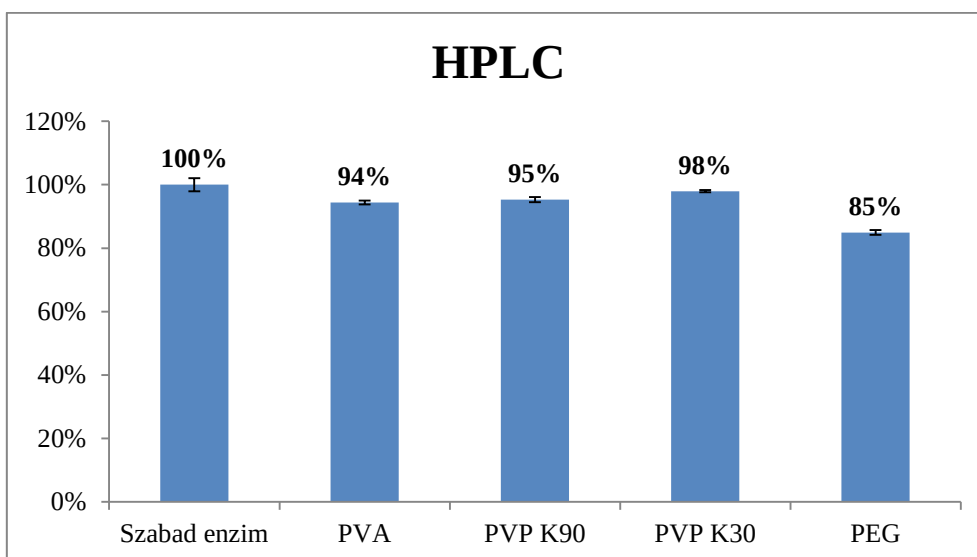
**15. ábra Különböző polimerekbe ágyazott  $\beta$ -galaktozidáz enzim pásztázó elektronmikroszkópos felvételei különböző nagyítások mellett. (a) PVA 1000x-es és 5000x-es nagyítás; (b) PVP K90 1000x-es és 5000x-es nagyítás; (c) PVP K30 1000x-es és 5000x-es nagyítás; (d) PEG 1000x-es és 5000x-es nagyítás**

#### 4.1.1. A szálképzés hatása a biológiai aktivitásra

Az elektrosztatikus szálképzést követően a legfontosabb kérdés, hogy a különböző polimerekből előállított enzimtartalmú nanoszálak milyen aktivitással bírnak, tehát hogy a szálképzés milyen hatással volt a laktáz enzimre. A szabad (kiindulási) és formulált enzim aktivitását két különböző módszerrel mértem a korábbiakban leírtak szerint annak érdekében, hogy megállapítsam, sikerült-e biológiai aktivitással bíró szilárd formát létrehozni. Az alábbiakban a kapott eredményeket tárgyalom.



(a)



(b)

**16. ábra A szálképzés után (a) spektrofotometriás; (b) HPLC-s módszerrel mért aktivitások a szabad enzimhez viszonyítva**

A szálképzés után közvetlenül mért aktivitások alapján (16. ábra) megállapítható, hogy a szárítás sikeres volt, mindegyik polimer esetén sikerült olyan szilárd formát létrehozni, mely megőrizte katalitikus aktivitását. A módszer kíméletességét jól szemlélteti, hogy 2 polimer esetén (PVA, PVP K30 és K90) a beágyazott enzim aktivitása közel volt a szabad enziméhez. Egyedül a PEG esetén figyeltem meg nagyobb különbséget (~20-30%), viszont még ez a csökkenés sem haladja meg az irodalmi bevezetőben részletezett technológiák esetén tapasztalt átlagos aktivitásvesztést (Lásd: 2.4. és 2.5. fejezet).

Az Európai Élelmiszerbiztonsági Hatóság (EFSA) ajánlása szerint egy laktóztartalmú étkezéshez 4500 FCC (Food Chemicals Codex) unit laktáztartalmú gyógyszerkészítmény használata javasolt<sup>65</sup>. 1 FCC unit az az enzimmennyiség, ami 1  $\mu\text{mol}$  ONPG-t alakít át 1 perc alatt 37 °C-on, 4,5-ös pH-n. A későbbi mérési eredményekből kiderül, hogy az optimális hőmérsékleten mért aktivitás 40%-ra csökken 37 °C-on mérve (Lásd: 4.1.3.2 fejezet). Ezzel egy közelítő becslés adható arra vonatkozóan, hogy mekkora mennyiségű szálhúzott minta tartalmazza a szükséges enzimmennyiséget. Körülbelül 30 mg formulált termék szükséges a hatásos dózishoz, ami elegendően kis mennyiség egy hatásos gyógyszerforma előállításához.

Így megállapítható, hogy az elektrosztatikus szálképzés alkalmas a laktáz enzim szilárd formulálására, hiszen kíméletes szárítást biztosít és már 30 mg termék tartalmazza a hatásos

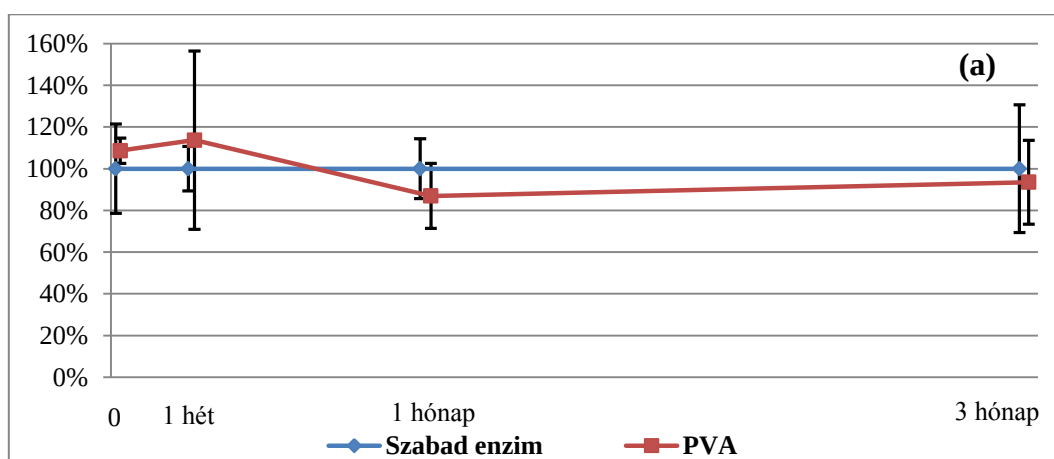
dózisnak megfelelő enzim mennyiséget, mely eredmények biztatóak a technológia felhasználásának szempontjából.

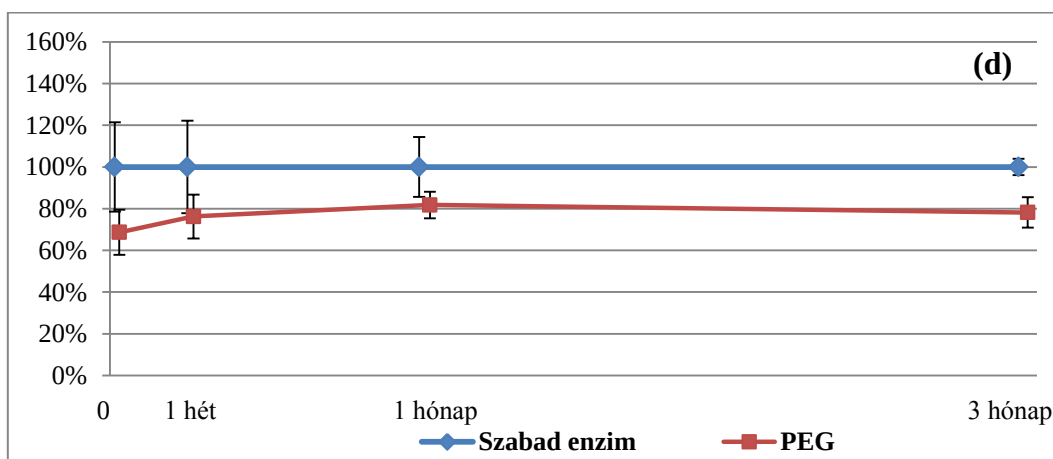
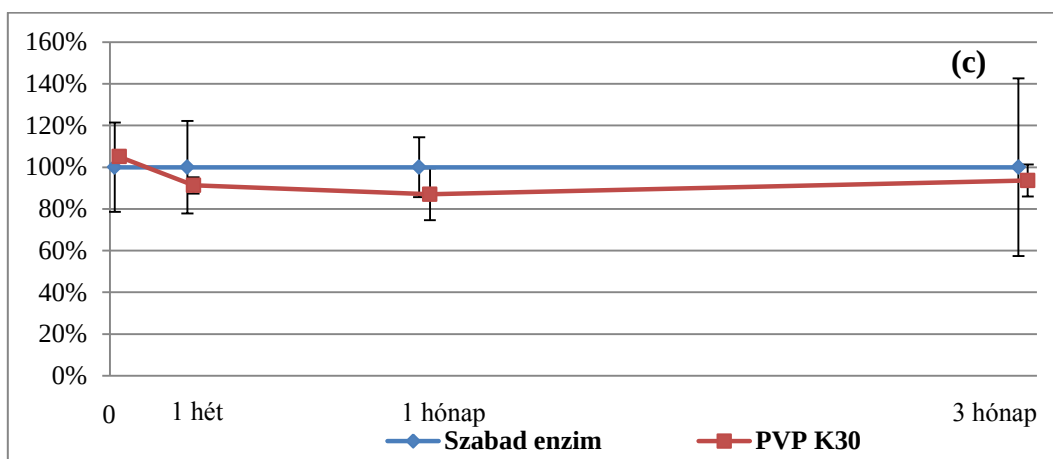
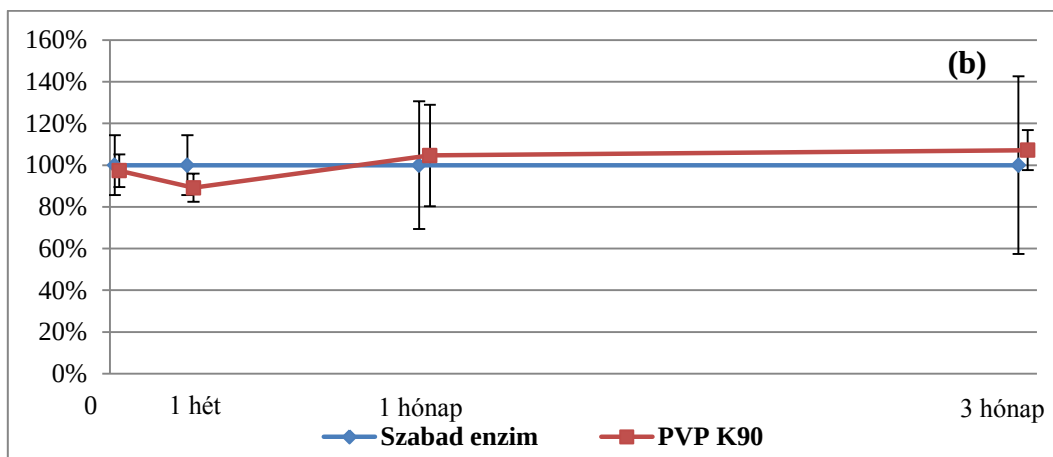
A 16. ábrán látható diagramokból a két mérési módszer közötti különbség is kitűnik. A spektrofotometriás módszer számtalan előnye mellett (egyszerű, gyorsan elvégezhető) számolnunk kell a mérés hátulütőivel is, például megfigyelhető, hogy az ezen az úton kapott mérési eredmények szórása jóval nagyobb, mint a kicsit bonyolultabb és időigényesebb folyadékkromatográfiás eredményeké. Az egyes esetekben jelentkező 100%-nál nagyobb aktivitás is a mérési módszer bizonytalanságára vezethető vissza.

Miután megbizonyosodtam arról, hogy az elektrosztatikus szálképzés elegendően kíméletes technológia biohatóanyagok szárítására, megvizsgáltam, hogy az így előállított minták milyen stabilitással bírnak az idő függvényében, mivel egy hatóanyag szilárd formulálása csak abban az esetben mondható sikeresnek, amennyiben a hatóanyag aktivitása hosszú távon is fennmarad.

#### 4.1.2. Negyedéves stabilitási eredmények

A stabilitásvizsgálat során szabályos időközönként (1 hét, 1 hónap, 3 hónap) párhuzamosan mértem a szárított és a szabad enzim aktivitását, hogy az eredmények összehasonlíthatóak legyenek. A szabad enzim aktivitását tekintetem 100%-nak és erre vonatkoztattam a formulált mintákból kapott eredményeket. Az alábbiakban a spektrofotometriás és HPLC-s mérések eredményeit tárgyalom.



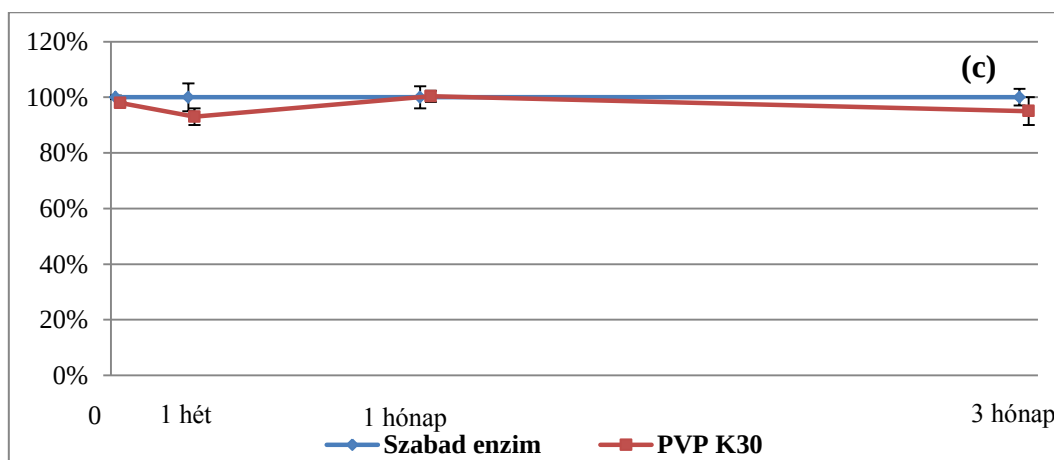
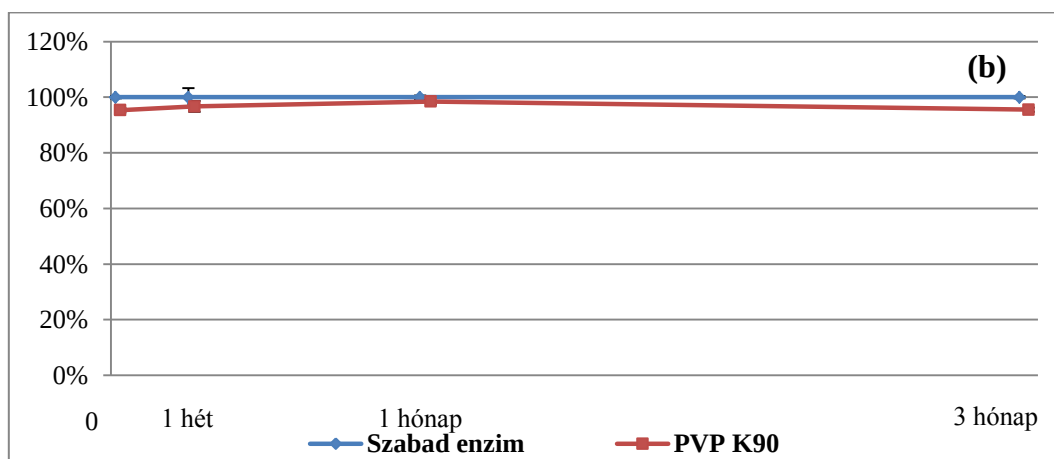
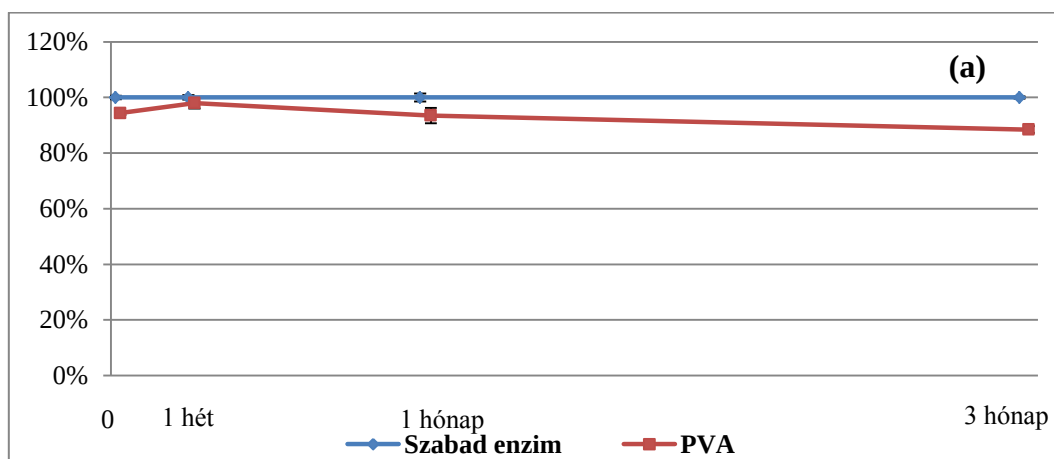


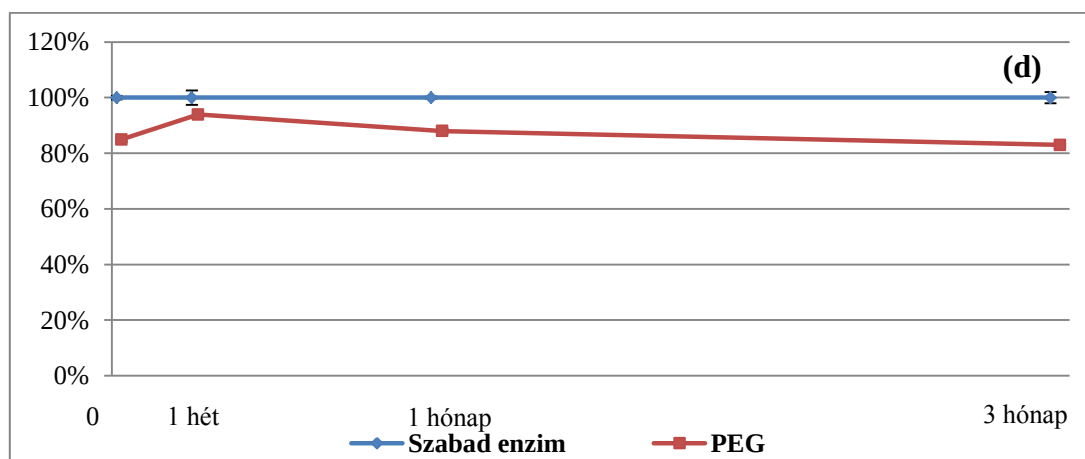
**17. ábra Spektrofotometriás stabilitási eredmények 3 hónap elteltével (a) PVA; (b) PVP K90; (c) PVP K30; (d) PEG felhasználásával készült minták esetén**

(A diagramokon a pontok kis távolsága nem időbeli különbséget mutat, csak a szórás megjeleníthetősége miatt vannak eltolva egymáshoz képest.)

(Nagyobb méretben lásd: 6. Mellékletek.)

A 17. ábrán látható diagramok mutatják az ONPG-vel mért negyedéves stabilitási eredményeket, melyek alapján megállapítható, hogy a kiinduláshoz képest 3 hónap után sem történt jelentős változás, a PVA-ba és a két PVP-ba ágyazott enzimek esetében kapott szinte összes aktivitási érték 90% és 100% közé esett. Emellett a PEG-ba ágyazott enzim relatív aktivitása végig 80%-osnak mutatkozott, további csökkenés nem volt megfigyelhető.





**18. ábra Folyadékkromatográfiás stabilitási eredmények 3 hónap elteltével (a) PVA; (b) PVP K90; (c) PVP K30; (d) PEG felhasználásával készült minták esetén**  
(Nagyobb méretben lásd: 6. Mellékletek.)

A kiváló stabilitási eredményeket megerősítették a HPLC-s mérésből kapott adatok (18. ábra), mivel itt is a kiindulási értékekhez hasonló eredmények születtek, viszont - a mérés pontosságának köszönhetően - jóval kisebb ingadozás volt tapasztalható.

Az így kapott negyedéves stabilitás azért is mondható jelentős eredménynek, mivel az elkészítés során semmilyen stabilizálószer vagy más adalékanyagot nem alkalmaztam, melyek nélkül a napjainkban leggyakrabban használt szárítási módszerek (fagyasztva szárítás, porlasztva szárítás) csak nagyon alacsony hatékonysággal alkalmazhatóak. (Lásd: 2.4. fejezet.)

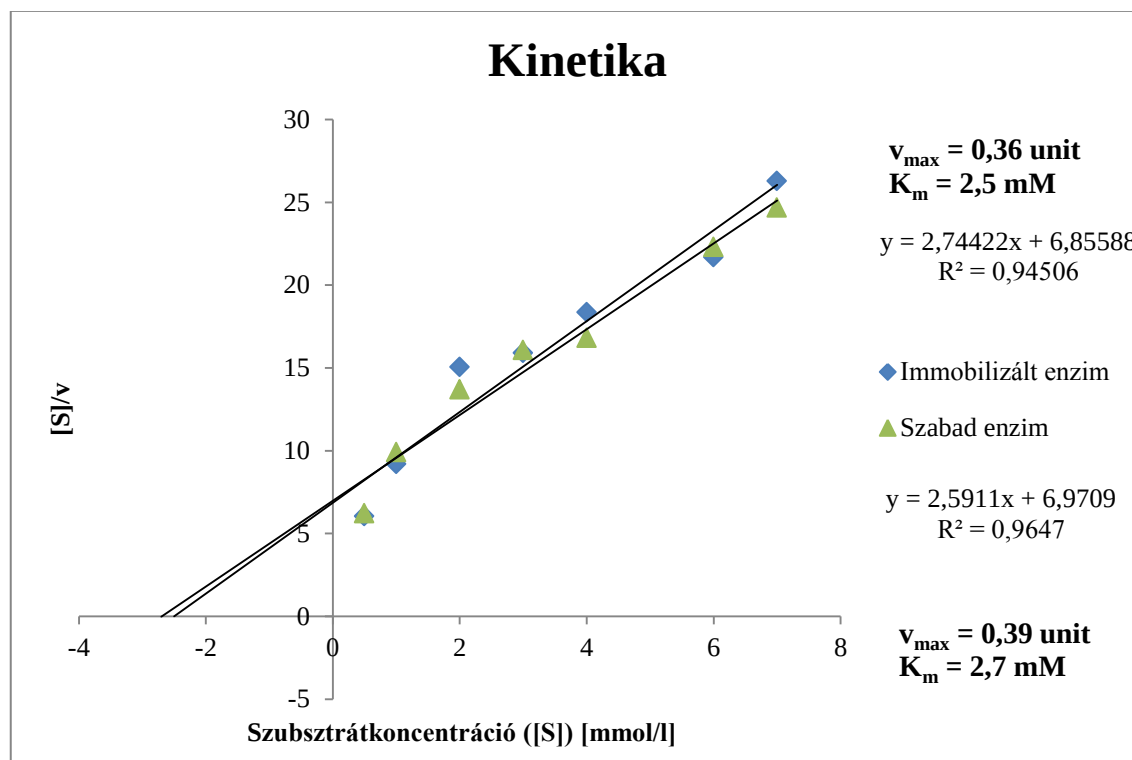
Mivel a legjobb stabilitási eredményeket a PVP-vel készített minták mutatták, ezért egy PVP K90 felhasználásával készült mintával végeztem további vizsgálatokat a szubsztrátkoncentráció, hőmérséklet, pH és tárolási hőmérséklet hatásának vizsgálatára.

#### **4.1.3. PVP K90-el készült minta vizsgálata**

##### **4.1.3.1. Szubsztrátkoncentráció hatása az enzimaktivitásra**

Egy adott enzim által katalizált reakciót legjobban a kinetikai paraméterekkel (maximum reakciósebesség és a Michaelis állandó) lehet jellemezni. Ezek az értékek függnak a reakciókörülményektől, de ha ezek állandóak, akkor jellemzőek az enzimre. Ezért kísérleteket végeztem a kinetikai paraméterek meghatározására. Ezt úgy vizsgáltam, hogy növekvő szubsztrátkoncentrációknál mértem a szabad és a formulált enzim aktivitását, majd a kapott

eredményeket a Hanes-Langmuir-Woolf féle linearizálási módszerrel linearizáltam (19. ábra), és az egyenes illesztése után becsültem a paraméterek értékét.



19. ábra Hanes-Woolf linearizálási módszer

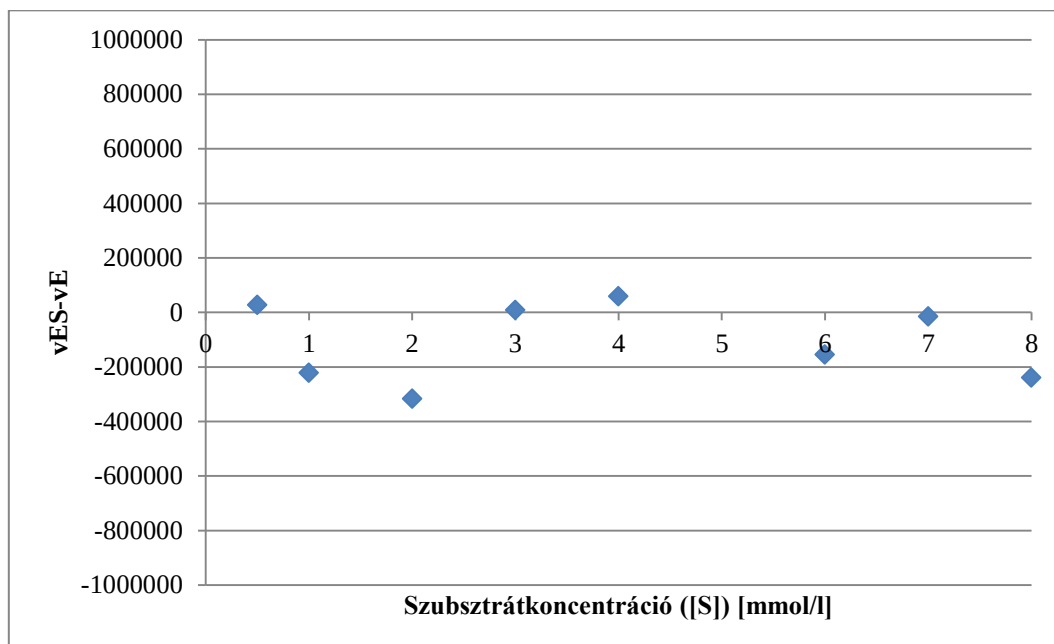
A becsült paraméter értékeket az alábbi táblázatban (4. táblázat) foglaltam össze. 1 unit az az enzimmennyiség, ami 1  $\mu\text{mol}$  szubsztrátot (itt: ONPG) alakít át 1 perc alatt 55 °C-on, 4,5-ös pH-n.

4. táblázat A becsült paraméterek

|                                                        | Szabad enzim | PVP K90   |
|--------------------------------------------------------|--------------|-----------|
| <b>Maximum reakciósebesség (<math>v_{\max}</math>)</b> | 0,39 unit    | 0,36 unit |
| <b>Michaelis állandó (<math>K_m</math>)</b>            | 2,7 mM       | 2,5 mM    |

Annak érdekében, hogy meggyőződhsek arról, hogy a különböző szubsztrátkoncentrációknál mért aktivitások a szabad és a formulált enzim esetén csak a véletlen ingadozásnak köszönhetően különböznek, statisztikai próbát végeztem. A szabad és számképzett mintákkal mért reakciósebességek eltéréseit a szubsztrátkoncentráció függvényében ábrázoltam (20. ábra). Az ábráról jól látszik, hogy a reakciósebességek közötti különbségek nulla körül ingadoznak. Statisztikai próbával is vizsgáltam, hogy a két minta

reakciósebességeinek várható értékei megegyeznek-e. A különbségekre végzett egymintás t-próba „p” értéke 0,170, tehát 0,05-ös szignifikanciaszinten a várható érték egyenlősége elfogadható, azaz a statisztikai próba alapján elmondható, hogy a reakciósebességek közötti különbség nem szignifikáns, a véletlen ingadozás okozhat ilyen eltéréseket.



**20. ábra A szabad és formulált enzimmel mért reakciósebességek különbségei a szubsztrátkoncentráció függvényében**

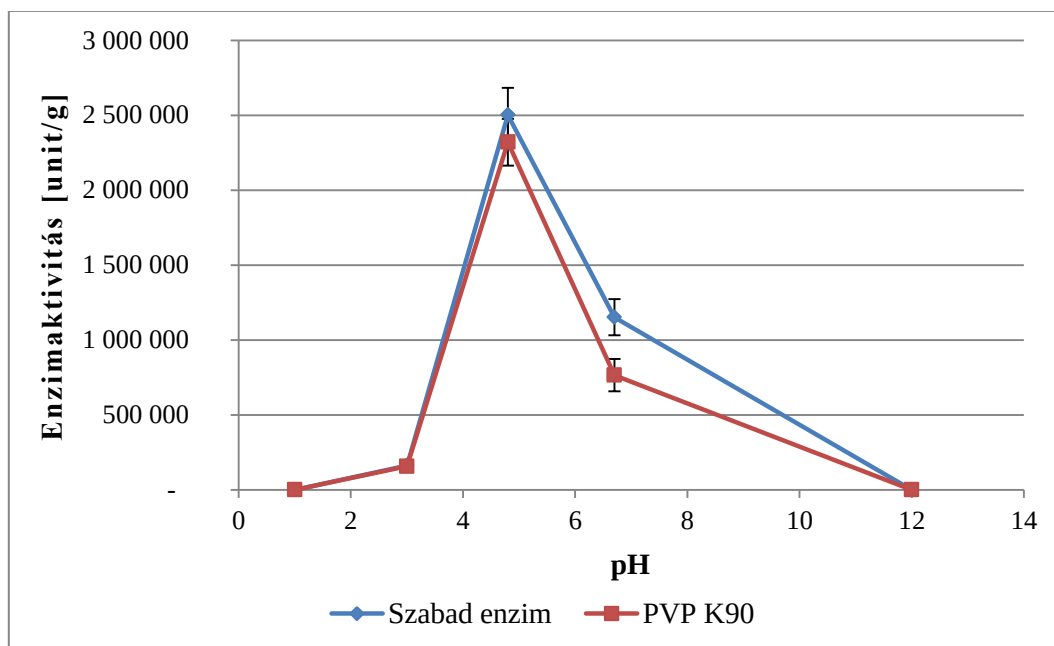
Mivel a számolt kinetikai paraméterek nagyon közel esnek egymáshoz, így nagy biztonsággal mondható, hogy a szabad és a beágyazott enzim katalitikus hatása megegyezik. Ezt a feltételezést a statisztikai próba alátámasztja.

#### **4.1.3.2. Hőmérséklet és pH hatása az enzimaktivitásra**

Az enzimek aktív része gyakran ionizálható csoportokat tartalmaz, melyek megfelelő térszerkezete szükséges a hatékony működéshez. Emiatt a pH és a hőmérséklet befolyásolja az enzimkatalizált reakciók sebességét, mivel ezek változása hatással van a makromolekulában található oldalláncok konformációjára. Az enzimek immobilizálása esetén általában kiszámíthatatlan, hogy a pH és hőmérséklet – aktivitás profilok hogyan változnak, egyes esetekben csökken vagy nő az optimális pH vagy hőmérséklet, máskor semmilyen változás nem tapasztalható.<sup>66</sup>

Emiatt vizsgáltam a különböző pH-k és hőmérsékletek hatását az enzimaktivitásra úgy, hogy különböző pontokban (pH: 1; 3; 4,8; 6; 12 és hőmérséklet: 37 °C; 45 °C; 50 °C; 55 °C;

65 °C) mértem a szabad és a formulált enzimforma aktivitását. A következőkben az így kapott eredményeket tárgyalom.

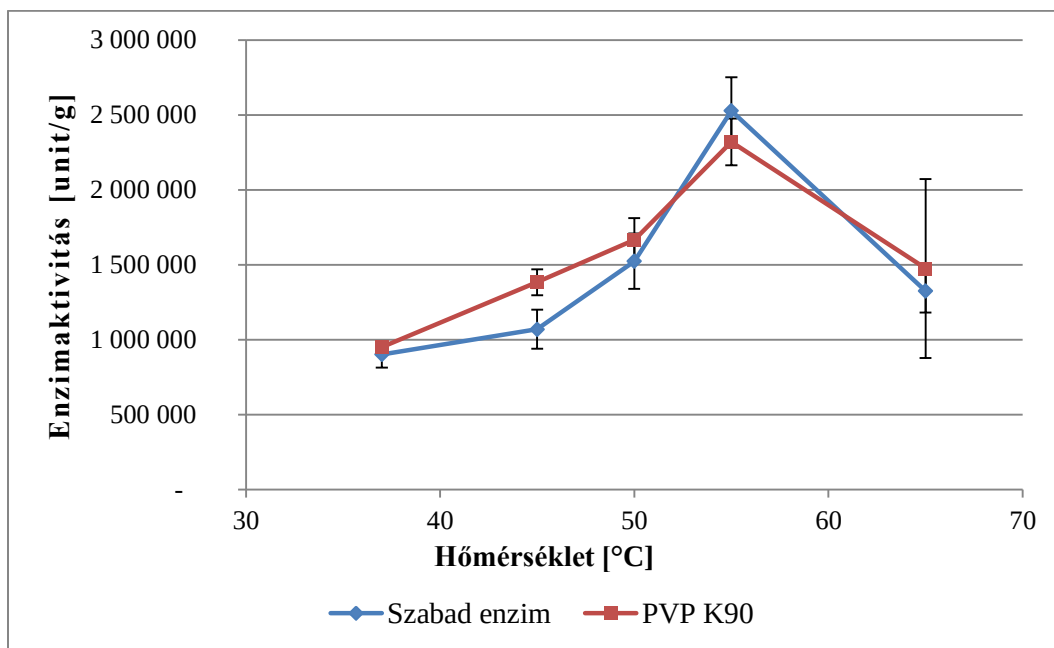


**21. ábra A pH hatása a beágyazott enzim aktivitására**

A 21. ábra mutatja a pH változtatásával kapott aktivitásprofil mind a szabad, mind a formulált enzim esetén. Ez alapján megállapítható, hogy a pH optimum mindkét enzimformánál ugyanott található, illetve a profilok lefutása is hasonló a két esetben. Savas pH tartományban a szabad és szálcépzett enzim között nem volt megfigyelhető különbség, viszont a pH emelésével a formulált enzim aktivitása kis mértékben csökkent a szabad formához képest.

A 22. ábra mutatja a különböző hőmérsékletek függvényében mért enzimaktivitást. Megállapítható, hogy a szálcépzés nem volt hatással az enzimműködés optimális hőmérsékletére, viszont a formulált enzim esetén alacsonyabb hőmérsékleten (45 °C) magasabb aktivitást mértem, mint a szabad formánál.

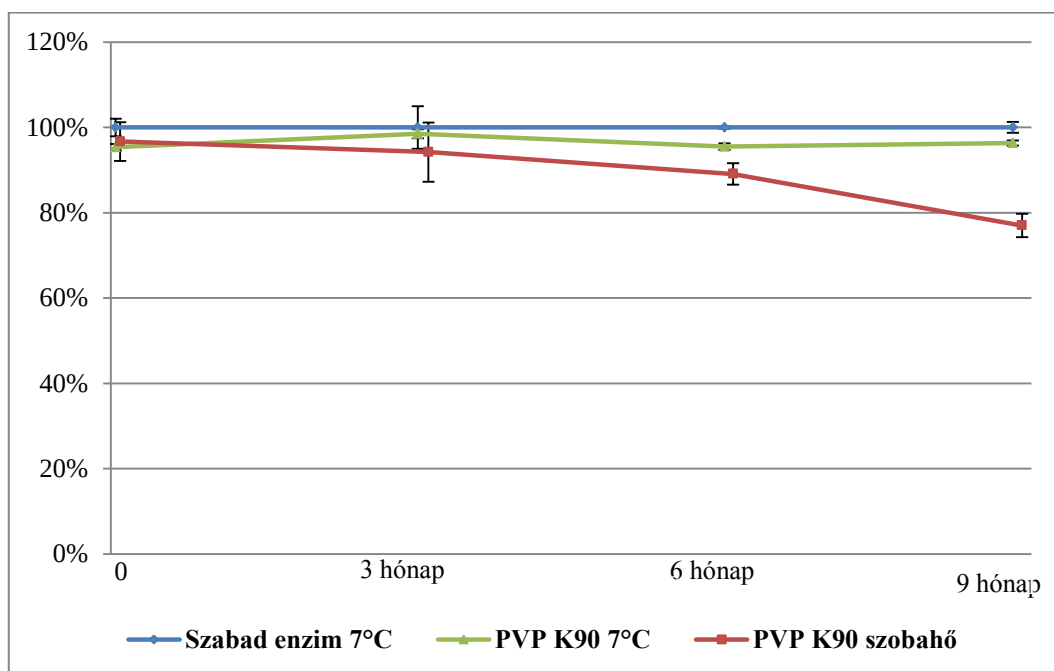
A fent közölt három vizsgálatot (szubsztrátkoncentráció, pH és hőmérséklet hatása) egyelőre csak ONPG-vel végeztem, a későbbiekben szükség lehet a kísérletek ismételtesére HPLC segítségével, hogy a szabad és szálcépzett enzim katalitikus hatásának azonossága a kisebb ingadozást mutató mérési módszerrel is bizonyított legyen.



**22. ábra A hőmérséklet hatása a beágyazott és a szabad enzim aktivitására**

#### 4.1.3.3. A tárolási hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra

Munkám során vizsgáltam a tárolási hőmérséklet hatását az enzimaktivitásra.



**23. ábra A tárolási hőmérséklet hatása az enzimaktivitásra (HPLC-s eredmények)**

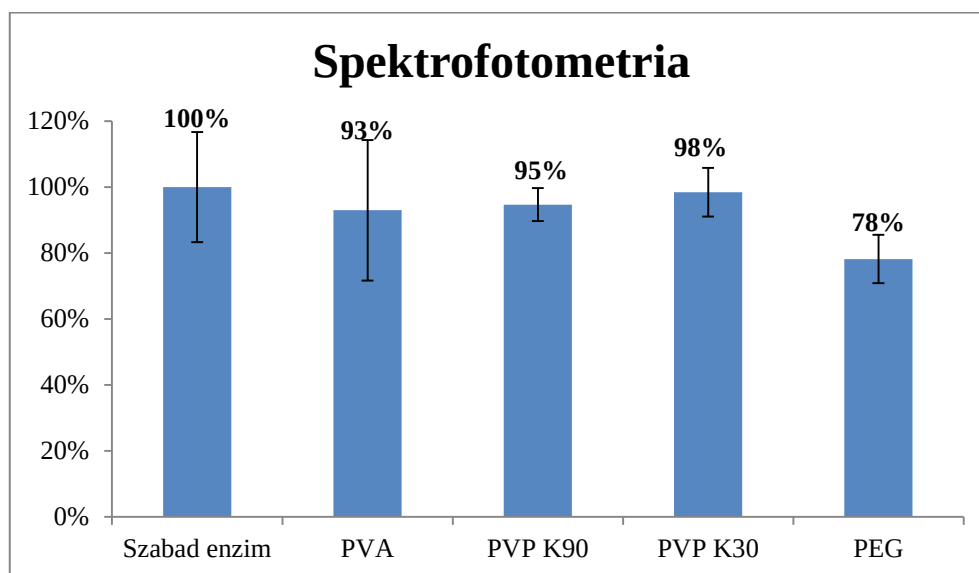
A 23. ábrán jól látható, hogy a szobahőmérsékleten tárolt minta esetén az idő előrehaladtával az enzimaktivitás lassú csökkenése volt megfigyelhető, de ez a csökkenés 9

hónap szobahőmérsékleten való tárolás után is csak 23%-os volt. A stabilitás feltehetően tovább javítható különböző stabilizáló szerekkel, illetve a tárolási körülmények változtatásával. Ez az eredmény a gyógyszerként való felhasználás szempontjából biztató, mivel a szobahőmérsékleten is tárolható készítmények nagyban megkönnyítik az alkalmazást, valamint piaci terjesztésük is szélesebb körben lehetséges, mint a csak hűtve tárolhatóaké.

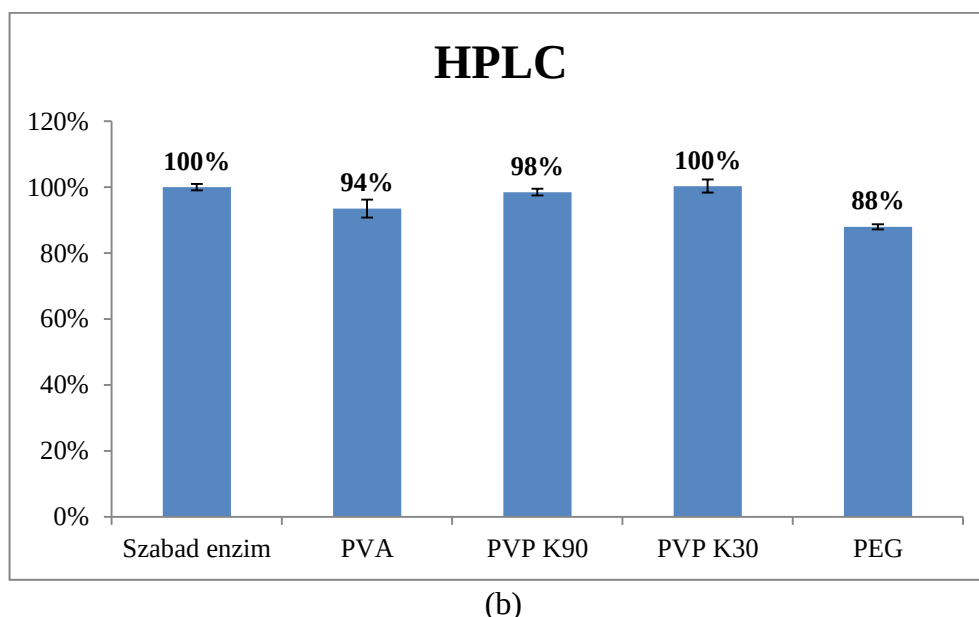
#### 4.1.4. 1 éves stabilitási eredmények

A gyógyszeripari felhasználhatóság szempontjából fontos kérdés a hosszú távú stabilitás, így ennek vizsgálatára a különböző vízdoldható polimerekkel készült mintákat az előállítás után 1 évvel is megvizsgáltam, mérve az aktivitásukat.

A 24. ábrán látható eredményeket összehasonlítva a kiinduláskor kapott adatokkal megállapítható, hogy nem történt jelentős változás, mindegyik polimer esetén a szilárd formánál még 1 év elteltével is ugyanolyan aktivitást mértem, mint közvetlenül a szálképzés után. Ezzel az összes alkalmazott polimer esetén sikerült igazolni a hosszú távú stabilitást, a legjobb eredmények mégis a PVP felhasználásával születtek, mivel közel 100%-os aktivitás volt megfigyelhető mindkét molekulatömegű polimer esetén. A különböző polimerek alkalmazásával kapott eltérő eredmények alapján megállapítható, hogy a polimer megválasztása befolyással lehet a szárított enzim aktivitására.



(a)



**24. ábra Stabilitási eredmények 1 éves tárolás után (a) spektrofotometriás és (b) HPLC-s módszerrel**

A szabad enzim aktivitásának időbeli ingadozását az 5. táblázatban látható, különböző szubsztrátokkal mért aktivitásadatok mutatják. Az aktivitásokból látszik, hogy a szabad enzim aktivitása nem csökkent az idő előrehaladtával, az adatok különbségei a mérések bizonytalanságával és a különböző időpontok hatásával magyarázhatóak. A két szubsztrát közötti különbség az eltérő  $K_m$  értékből következik, melyben több nagyságrend eltérés van<sup>19</sup>. A  $K_m$  érték mutatja meg az enzim affinitását egy adott szubsztráthoz. Mivel nem volt megfigyelhető csökkenés a szabad enzim aktivitásában az idő előrehaladtával, így megállapítható, hogy a dolgozatban alkalmazott normálási módszer megfelelő.

**5. táblázat Szabad enzimmel mért fajlagos aktivitásadatok**

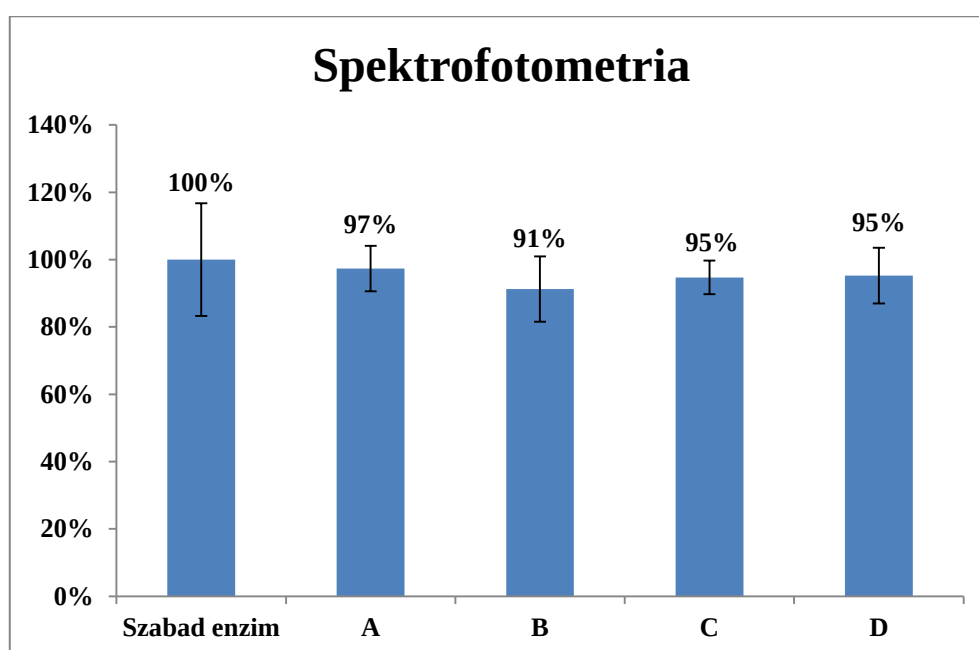
| Dátum            | Fajlagos aktivitás (unit/g) |        |
|------------------|-----------------------------|--------|
|                  | ONPG                        | Laktóz |
| 2012. április    | 2 107 354                   | 13 736 |
| 2012. július     | 2 348 094                   | 14 673 |
| 2012. november   | 2 337 627                   | 14 395 |
| 2013. január     | 2 225 409                   | 13 594 |
| 2013. március    | 2 467 742                   | 14 050 |
| 2013. június     | 2 143 116                   | 14 798 |
| 2013. szeptember | 2 064 845                   | 14 265 |

#### 4.1.5. Reprodukálhatóság vizsgálata

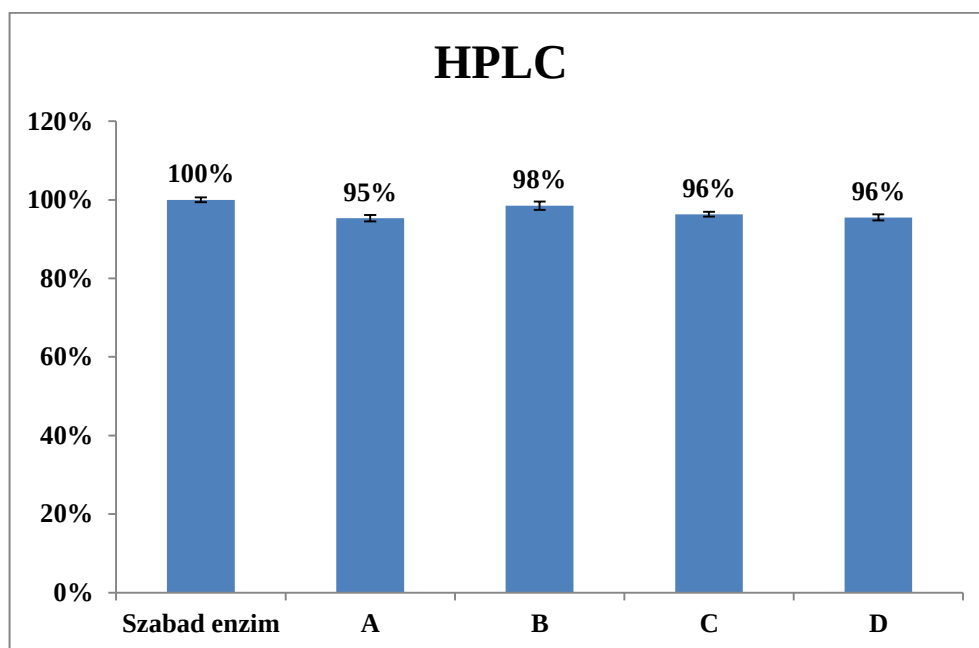
Az ipari alkalmazhatóság szempontjából fontos kérdés a technológia reprodukálhatóságának vizsgálata, mivel a gyógyszerkutatás területén a gyártási tételek, illetve a forgalomba kerülő készítmények közötti nagy hatóanyagingadozás nem engedhető meg.

E kérdés tanulmányozására a kutatás során 4 különböző időpontban készítettem PVP K90-ből készült mintákat, hogy vizsgáljam a módszer reprodukálhatóságát.

A különböző betűk (A,B,C,D) jelölik a különböző időpontokban készült PVP K90 mintákat. A 25. ábrán bemutatott eredmények mindegyik esetben a szálképzés után 1 évvel mért aktivitásokat mutatják. Ezekből látható, hogy az értékek közel esnek egymáshoz, így következtetésként levonható, hogy az adatok alátámasztják az elektrosztatikus szálképzéssel történő szárítás reprodukálhatóságát. A technológia ezen megbízhatósága az elektrosztatikus szálképzést roppant vonzóvá teszi az ipari alkalmazás szempontjából.



(a)



(b)

**25. ábra A 4 különböző szálhúzott minta (A, B, C, D) stabilitáseredményei 1 év után (a) spektrofotometriával (ONPG); (b) HPLC-vel (laktóz) mérve**

#### **4.1.6. Méretnövelhetőség vizsgálata**

A korábbiakban bemutatott technológia méretnövelhetősége kulcsfontosságú kérdés a későbbi ipari alkalmazások megvalósításához, ezért munkám során fontos feladat volt a technológia méretnövelhetőségének vizsgálata.

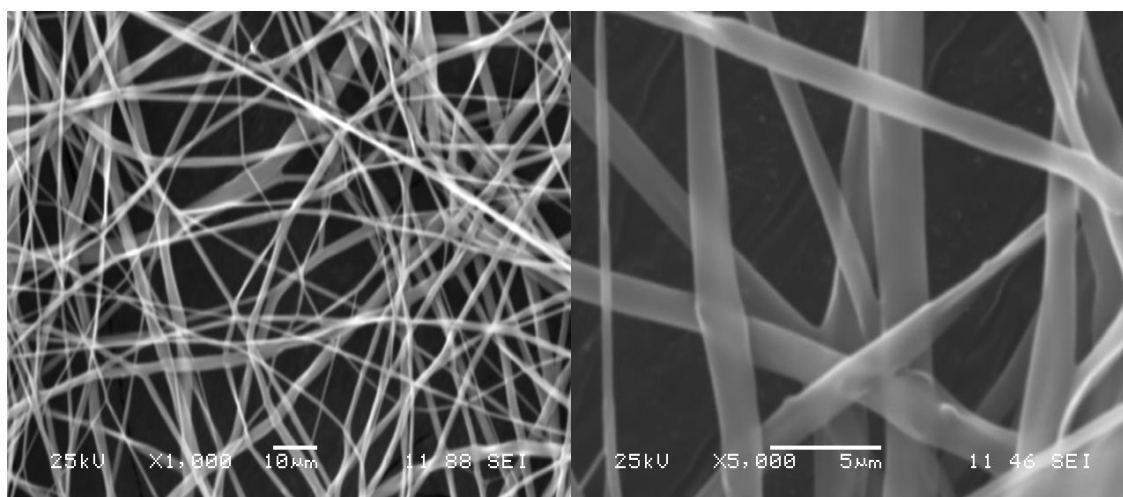
Az általam alkalmazott sűrített levegővel működő nagysebességű elektrosztatikus szálképzés során a hagyományos elektrosztatikus szálképzéssel elérhető termelékenységet 1-3 ml/h-ról 120 ml/h-ra sikerült növelni, ami legalább negyvenszeres kapacitásnövekedést jelent. A kísérlet során PVP K90 felhasználásával készítettem enzimtartalmú szálhúzott terméket, mely közvetlenül az előállítás után spektrofotometriás aktivitásméréssel 103%-os relatív aktivitást mutatott. Ez azt bizonyítja, hogy a módszer nagyobb méretben is megfelelően kíméletes.

A korábban tárgyaltaknak megfelelően 30 mg szálképzett termék is tartalmazza a hatásos dózist. Méretnövelt elektrosztatikus szálképzéssel ipari léptékben már napi 10 kg-os termelésre is van lehetőség, ami azt jelenti, hogy naponta több, mint 300 000 hatásos dózist tartalmazó végtermék állítható elő.

#### 4.2. $\beta$ -galaktozidáz beágyazása vízoldhatatlan polimer nanoszálakba

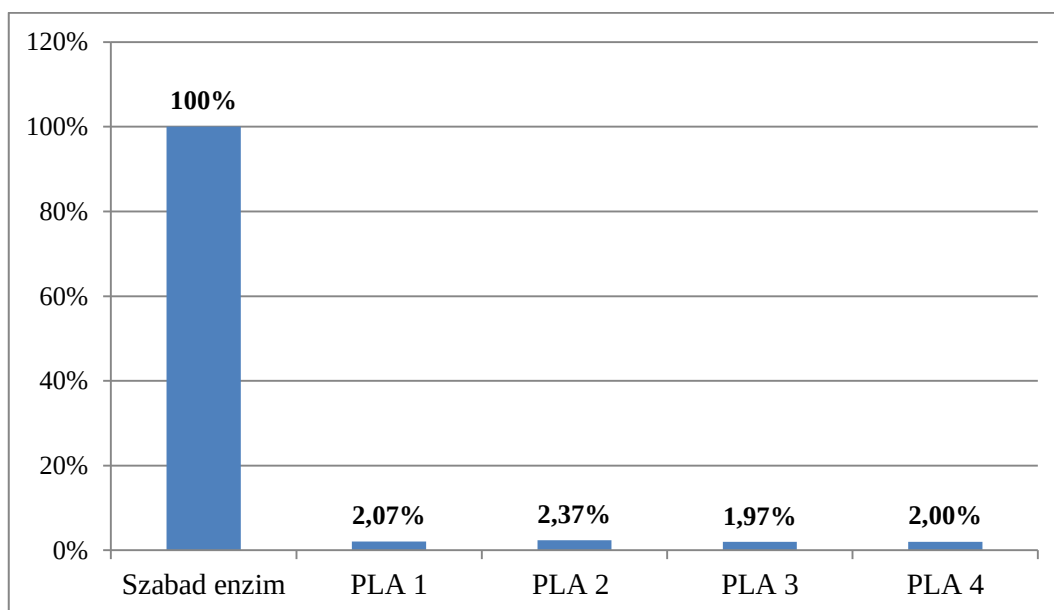
A  $\beta$ -galaktozidázt az élelmiszeriparban a tejben található laktóz bontása mellett tejsavó feldolgozására és probiotikus galaktooligoszacharidok termelésére is felhasználják. Ezekre a feladatokra a legalkalmasabb egy laktáz tartalmú vízoldhatatlan rendszer, mely azon kívül, hogy felhasználható az előbb említett folyamatokban, lehetővé teszi az enzim többszöri felhasználását, illetve segítségével folyamatos üzemű laktózmentesítés is megvalósítható lehet.

Munkám során politejsav (PLA) felhasználásával is végeztem elektrosztatikus szálhúzási kísérleteket, melyek során azt vizsgáltam, hogy az így módon előállított immobilizált  $\beta$ -galaktozidáz alkalmas lehet-e a fent leírt feladatokra.



**26. ábra PLA nanoszálakba ágyazott  $\beta$ -galaktozidáz enzim pásztázó elektronmikroszkópos felvétele 1000x-es és 5000x-es nagyítás mellett**

Az elektrosztatikus szálhúzáshoz használt polimer oldat 6,6 m/m%-os volt. A szálképzett termék 8,5 m/m%-os az enzimre nézve, melyről pásztázó elektronmikroszkópos felvételeket készítettem (26. ábra). Az elkészített minta felhasználásával visszaforgatási méréseket végeztem, melyek eredményeit az alábbiakban közlöm.



**27. ábra A PLA-val készült minta visszaforgatási eredményei HPLC-vel mérve. (A PLA utáni számok a visszaforgatási lépést jelzik)**

A mérési eredményekből (27. ábra) látható, hogy a PLA-val készült minta aktivitása erősen csökkent a szabad enziméhez képest. Ennek oka, hogy a szálképzés előtti mintaelőkészítés során az enzim szerves oldószerek ( $\text{CHCl}_3$ , DMF) jelenlétében került az ultrahangos kádba, mivel mind a szerves oldószerek, mind a szonikálás károsíthatják a fehérjét. Ebben az esetben sem alkalmaztam semmilyen adalékanyagot a folyamat során, így a későbbiekben vizsgálható lehet különböző stabilizálószer hatása az aktivitásra. Ezen kívül a beágyazott enzimet körülvevő polimer miatt diffúziós gát alakulhat ki az immobilizált laktáz és a szubsztrát között, ami ugyancsak eredményezhet csökkent reakciósebességet.

A diagramról az is megfigyelhető, hogy a visszaforgatási lépéseknél az enzimaktivitás nem csökkent, így következtetésként levonható, hogy az elektrosztatikus szálhúzással vízdoldhatatlan polimerbe ágyazott laktáz a megfelelő reakciókörülmények és reakcióidő megválasztásával alkalmas lehet folyamatos laktózmentesítésre ipari léptékben. Ezen feltételezés igazolására a későbbiekben további vizsgálatok elvégzését tervezem.

Az immobilizált laktáz rendszer felhasználásával felépíthető egy laktózmentesítő reaktor, melyben a PLA-ba ágyazott enzimből 1,5 kg-ot felhasználva 100 liter tej lebontása körülbelül fél órába telne. Mivel a méretnövelt elektrosztatikus szálképzési technológia alkalmazásával ez a mennyiség előállítható, így az ipari méretű alkalmazás feltételei adottak. Különböző stabilizáló adalékanyagok felhasználásával az immobilizált enzim stabilitása javítható lehet, amivel a folyamat hatékonysága tovább növelhető.

## 5. ÖSSZEFOGLALÁS

TDK munkám során olyan gyógyszer technológiai eljárások fejlesztésével foglalkoztam, amelyekkel lehetséges biohatóanyagok stabil szilárd formájának előállítása, és emellett hatékony alternatívaként jelenhetnek meg az iparban általánosan alkalmazott szárítási módszerek (pl. fagyasztva szárítás) mellett.

Az általam alkalmazott módszer egy ígéretes nanotechnológiai eljárás, az elektrosztatikus nanoszálképzés volt. Az munkám során vizsgált modell biohatóanyag a gyógyszer- és élelmiszeriparban is fontos  $\beta$ -galaktozidáz enzim volt.

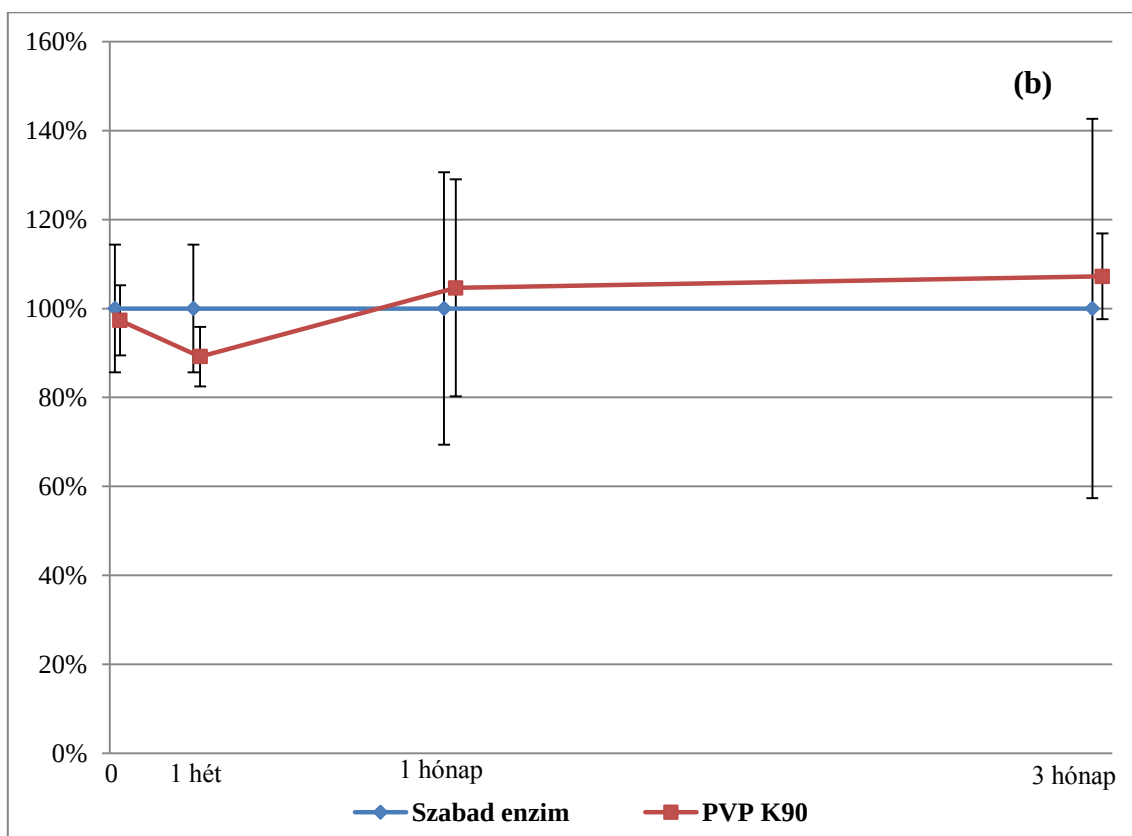
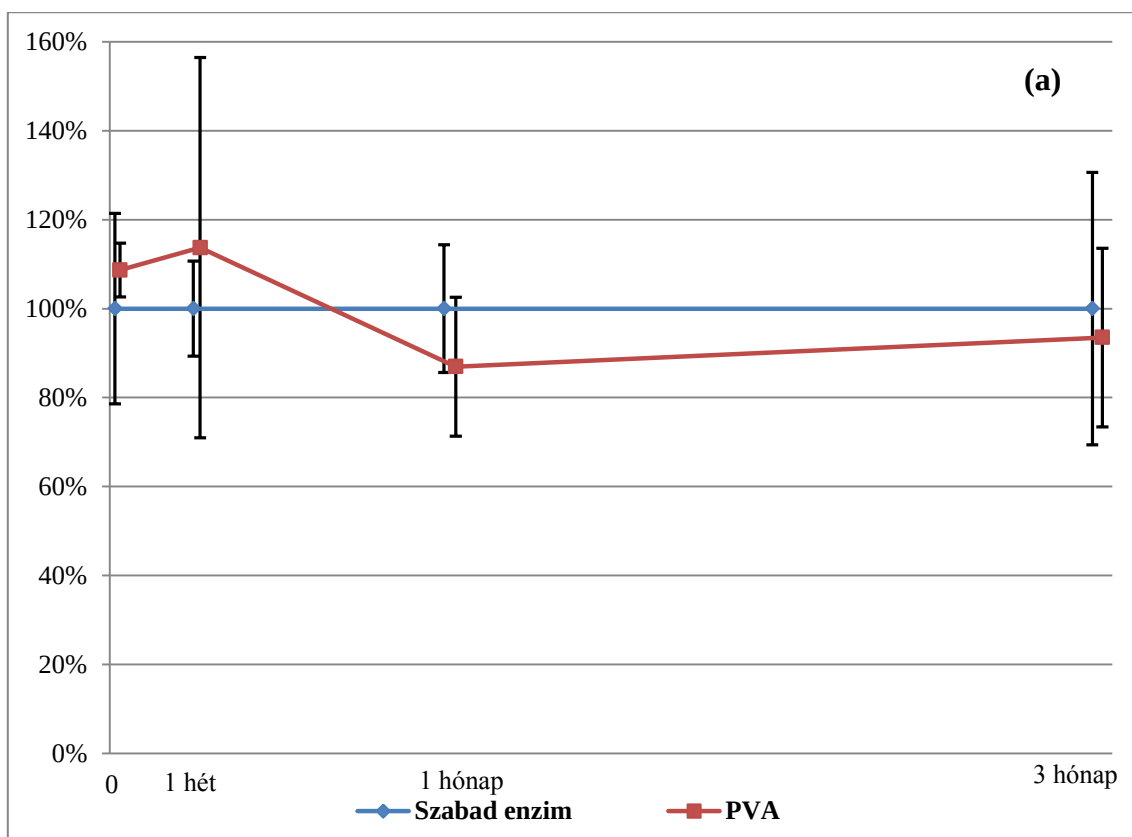
Sikeresen alkalmaztam az elektrosztatikus szálhúzást a  $\beta$ -galaktozidáz enzim szilárd formulálására. A technológia kíméletességét mutatja, hogy a szálképzés után több esetben is az enzim aktivitása közel 100%-os volt és már igen kis mennyiségű minta is tartalmazta a hatásos dózist. A minták az előállítás után 1 évvel is megőrizték kiindulási aktivitásukat, mely hosszú távú stabilitás igen biztató eredmény a gyógyszeripari alkalmazhatóság szempontjából.

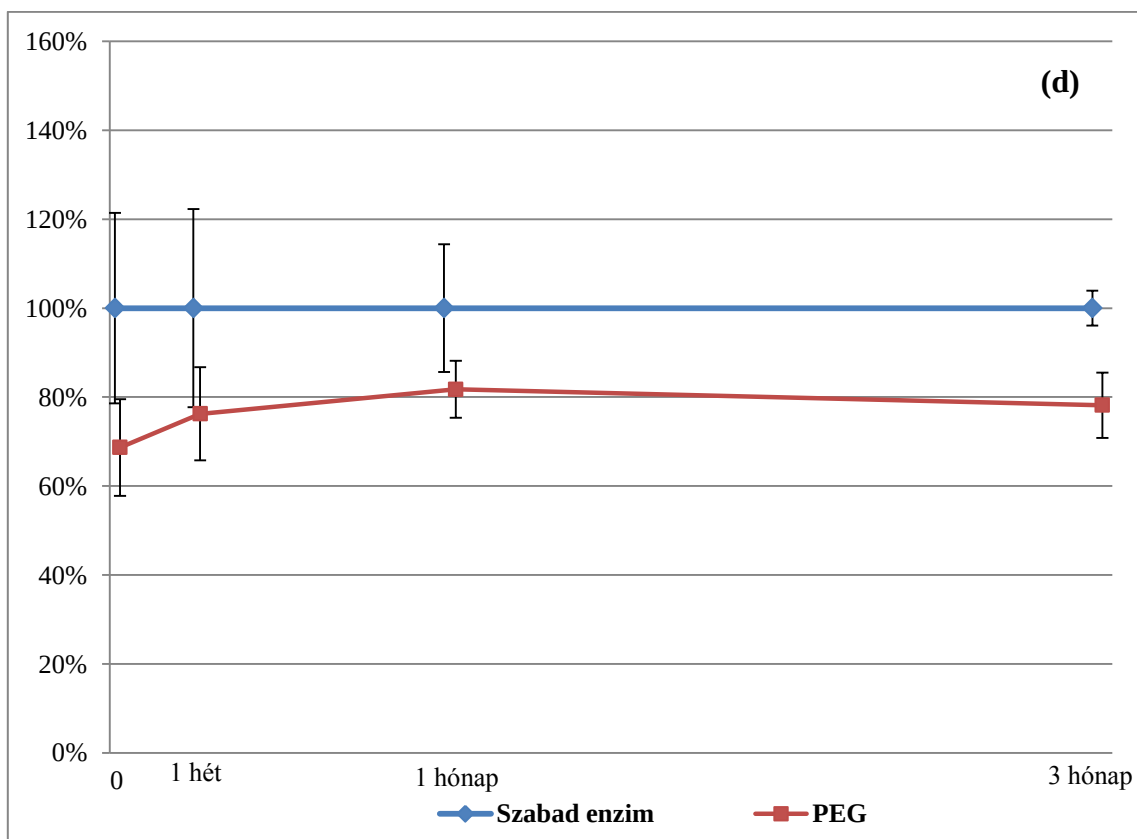
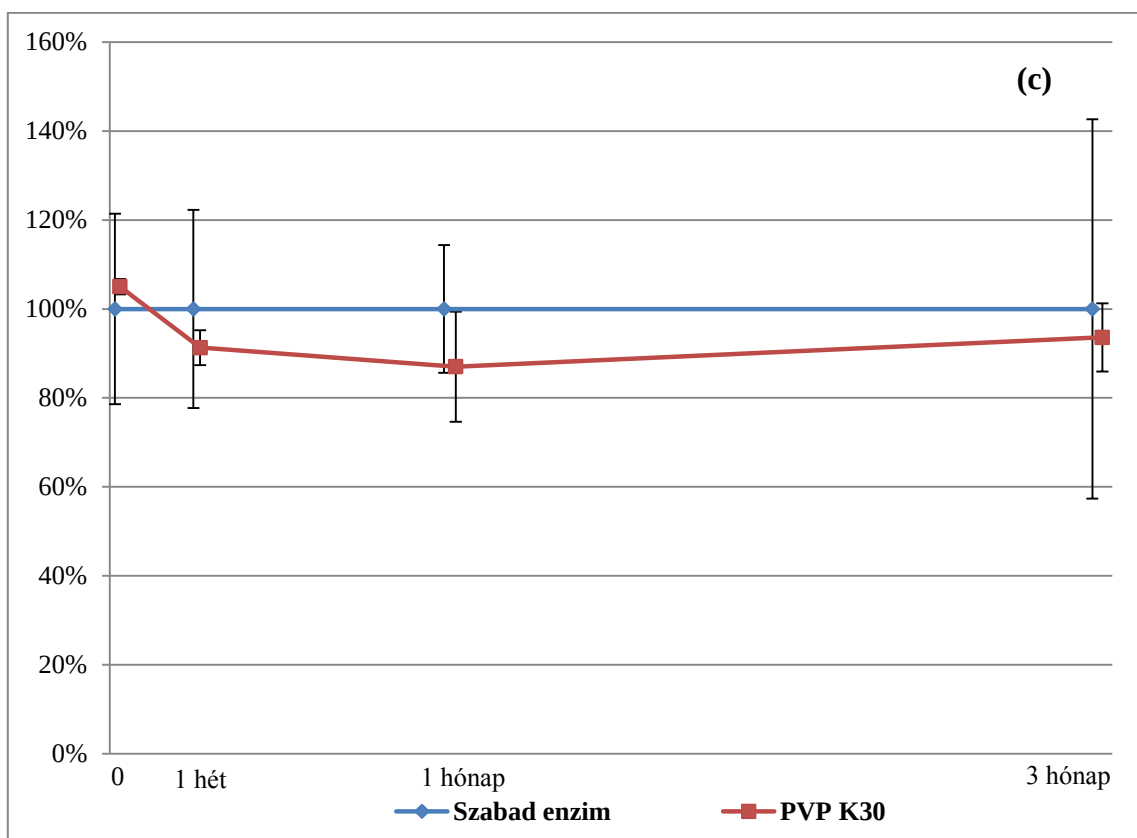
A kísérletek során megállapítottam, hogy az elektrosztatikus szálképzés nincs hatással az enzim pH és hőmérséklet optimumára, illetve nem befolyásolja az enzim katalitikus hatását. Ezen kívül különböző időpontokban készített minták segítségével bizonyítottam a technológia reprodukálhatóságát. A technológia ipari alkalmazhatóságának bizonyítására méretnövelési kísérleteket végeztem. A folyamat során folytonos szálképzést sikerült elérni, ahol a végtermék a szabad enzim aktivitásának 100%-át megőrizte, ami azt jelenti, hogy az elvégzett méretnövelés nem volt negatív hatással az enzim katalitikus hatására.

Az enzim újrafelhasználásának lehetőségét heterogén katalízissal vizsgáltam. A négy körös visszaforgatás alatt nem tapasztaltam aktivitáscsökkenést, így a szálképzéssel szilárd formába hozott enzim felhasználásával lehetőség van az ipari méretű laktózmentesítésre is. Ebben az esetben szálképzés utáni aktivitás növelése céljából szükséges lehet stabilizáló adalékanyagok alkalmazásának vizsgálata.

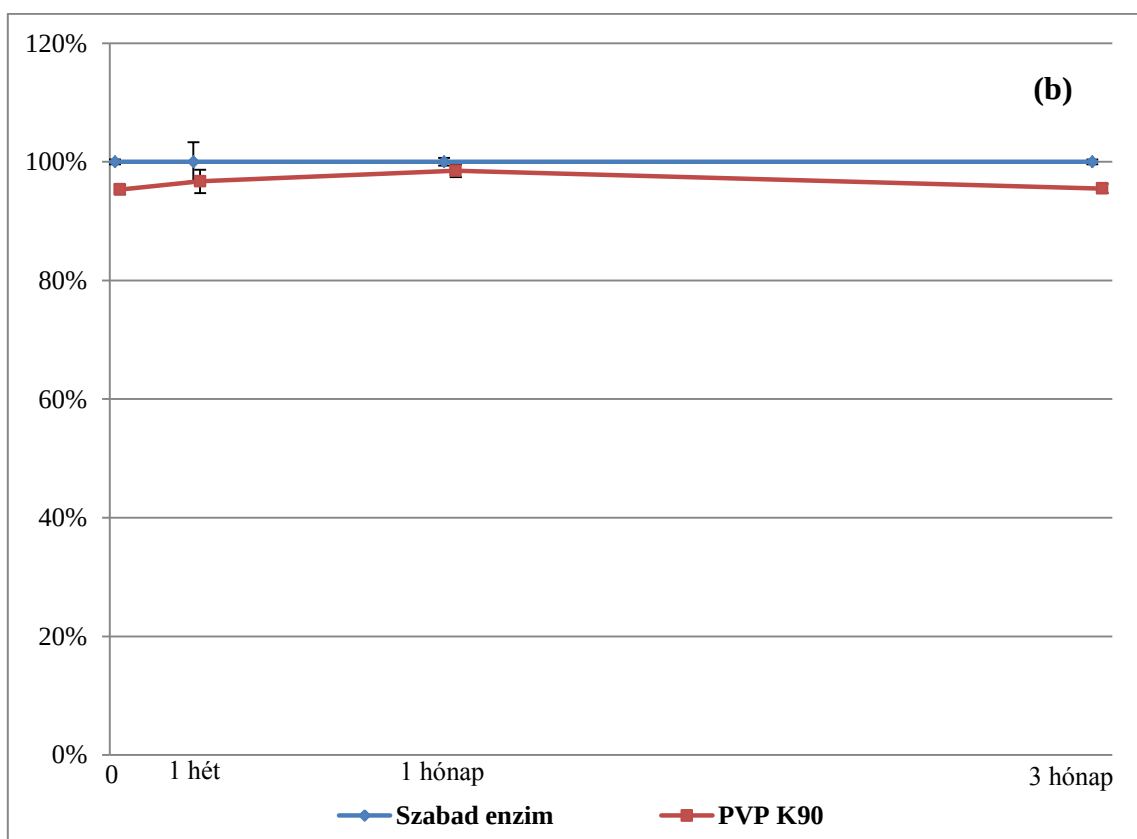
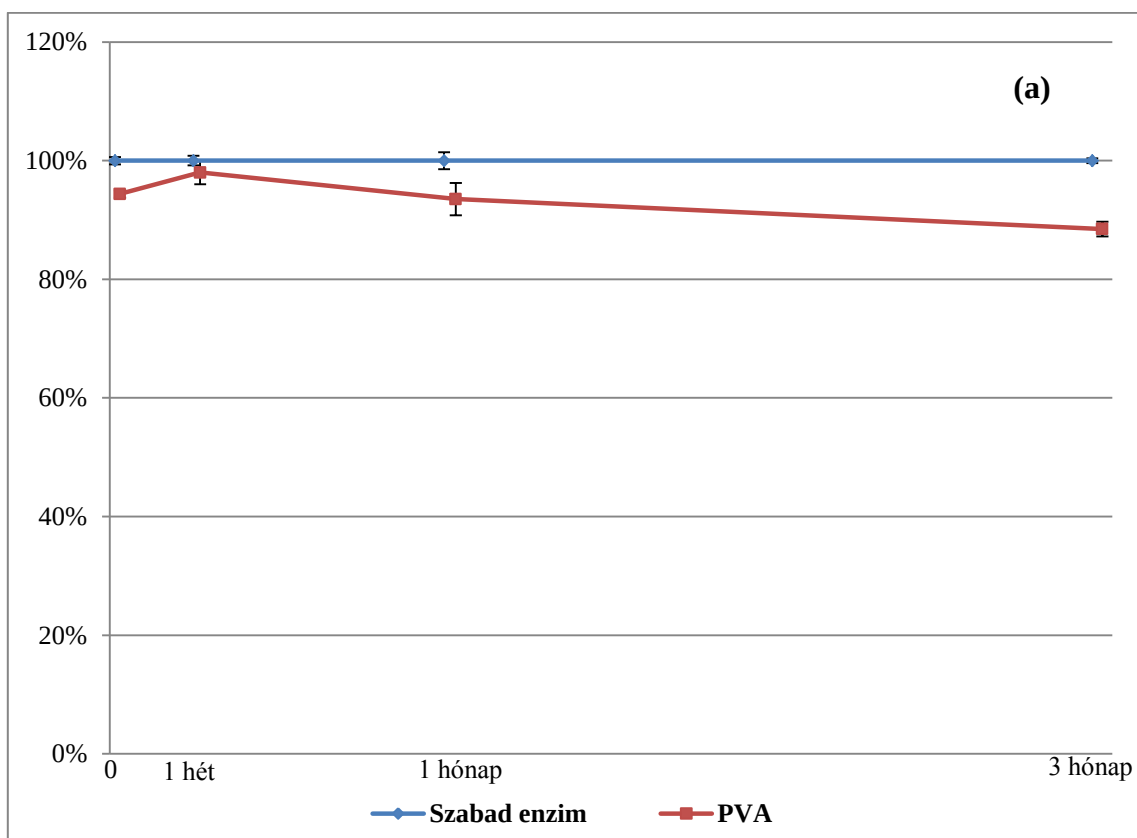
Végül megállapítható, hogy az elektrosztatikus nanoszálképzés hatékony és kíméletes szárítást tesz lehetővé alacsony energiafelhasználással, gyors és folytonos termelést biztosítva. Ennek következtében a technológia hatékony és gazdaságos megoldást nyújt a napjainkban terjedő szilárd biohatóanyag tartalmú készítmények előállítására.

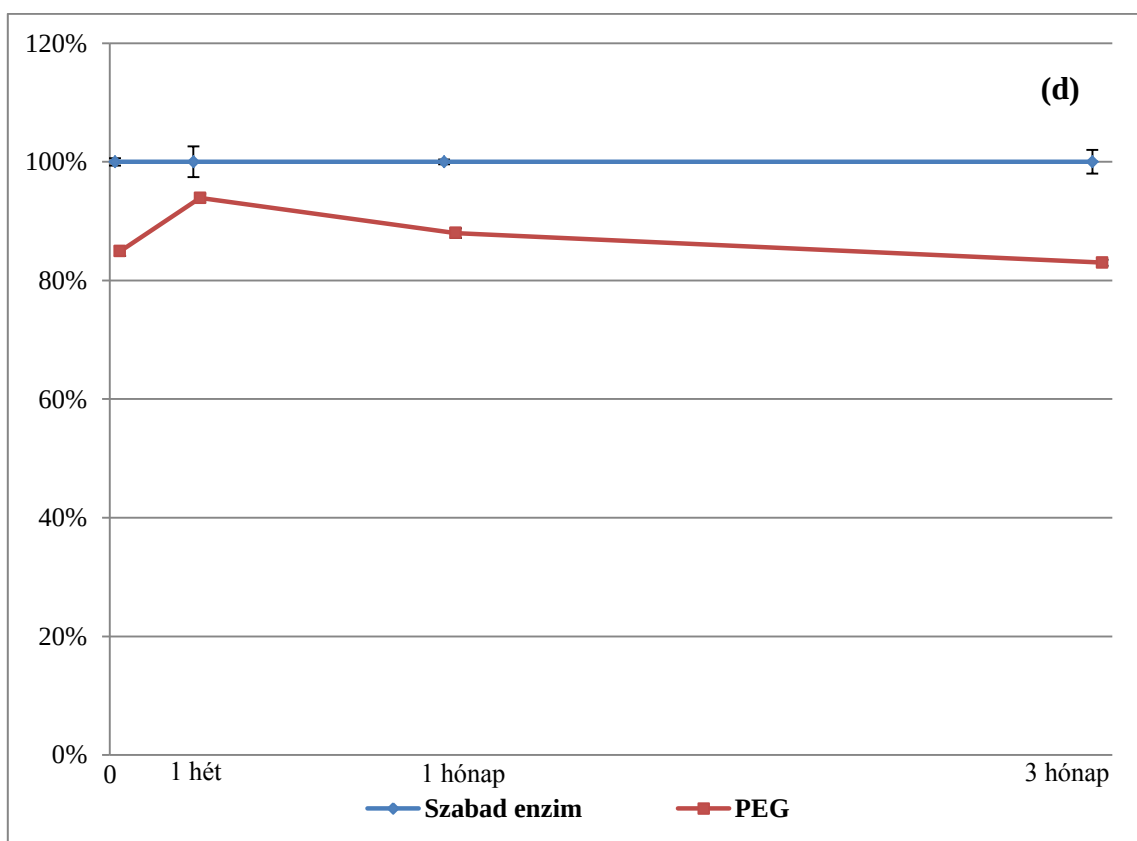
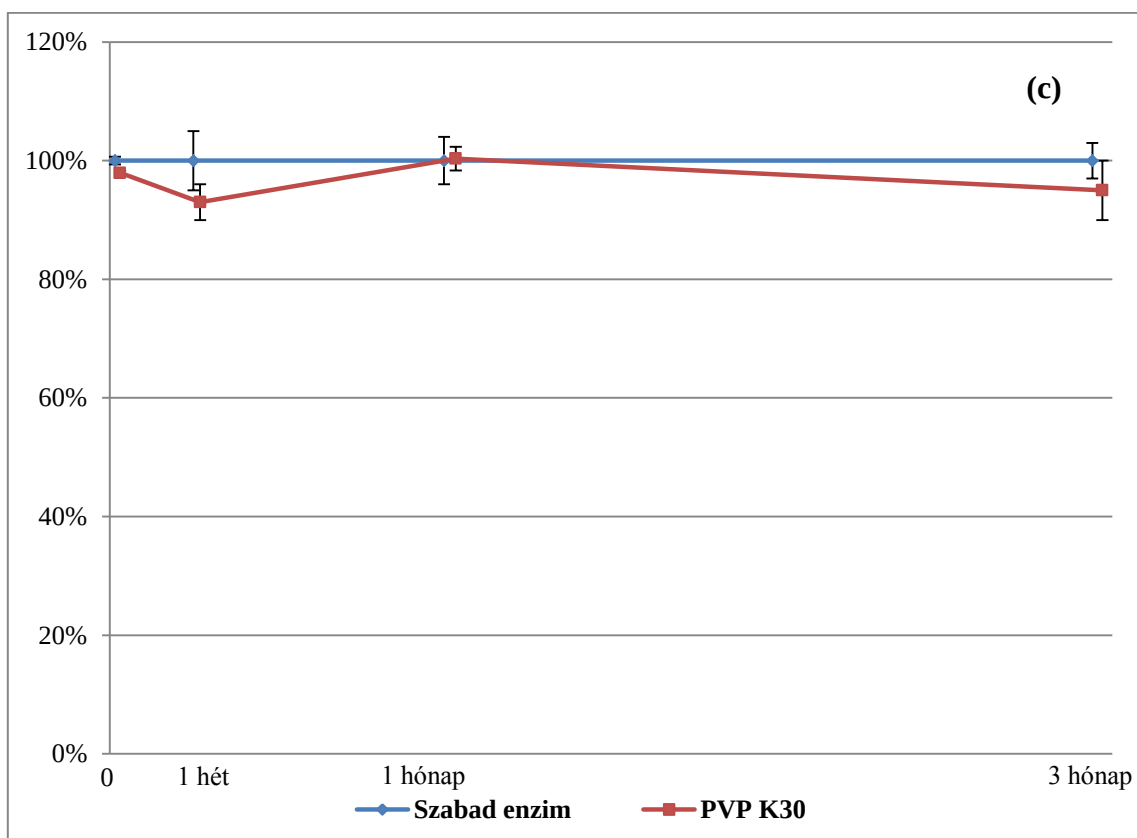
## 6. MELLÉKLETEK





**17. ábra Spektrofotometriás stabilitási eredmények 3 hónap elteltével (a) PVA; (b) PVP K90; (c) PVP K30; (d) PEG felhasználásával készült minták esetén**





**18. ábra Folyadékkromatográfiás stabilitási eredmények 3 hónap elteltével (a) PVA; (b) PVP K90; (c) PVP K30; (d) PEG felhasználásával készült minták esetén**

## 7. IRODALOMJEGYZÉK

---

- <sup>1</sup> T.V. Bilfinger, V. Kushnerik. The use of morphine in surgery: an overview. *Adv Neuroimmunol.* 4:133-144 (1994).
- <sup>2</sup> I. Knezevic, E. Griffiths. Biosimilars – Global issues, national solutions. *Biologicals.* 39:252-255 (2011).
- <sup>3</sup> E. Kiss, Z. Kuluncsics, Z. Kiss, G. Poor. Biotechnológiai fejlesztések a monoklonális antitest-terápiában: a RANK-ligand-gátló antitest. *Orv Hetil.* 151:2137-2144 (2010).
- <sup>4</sup> W. Lazonick, Ö. Tulum. US biopharmaceutical finance and the sustainability of the biotech business model. *Research Policy.* 40:1170-1187 (2011).
- <sup>5</sup> <http://www.drugs.com/> (Letöltés dátuma: 2013. szeptember 15.)
- <sup>6</sup> K. Maggon. Monoclonal antibody "gold rush". *Curr Med Chem.* 14:1978-1987 (2007).
- <sup>7</sup> I. Sanchez-Serrano. The Biopharmaceutical Industry in the Twenty-first Century: Titanic Challenges Ahead. *The World's Health Care Crisis. From the Laboratory Bench to the Patient's Bedside.* II:4:71-100 (2011).
- <sup>8</sup> J. Renukuntla, A.D. Vadlapudi, A. Patel, S.H. Boddu, A.K. Mitra. Approaches for enhancing oral bioavailability of peptides and proteins. *Int J Pharm.* 447:75-93 (2013).
- <sup>9</sup> Y.F. Maa, S.J. Prestrelski. Biopharmaceutical powders particle formation and formulation considerations. *Curr Pharm Biotechnol.* 1:283-302 (2000).
- <sup>10</sup> R. Kaur, B.S. Sekhon. Enzymes as drugs: an overview. *J Pharm Educ Res.* 3:29-41 (2012).
- <sup>11</sup> T. Constantin. Fabry-betegség: diagnosztikai útmutató. *Orv Hetil.* 151:243-249 (2010).
- <sup>12</sup> P. Juhász, B. Tóth, L. Maród, M. Erdős. Időskorban kezdett enzimszubsztitúciós terápia Gaucher-kórban. *Orv Hetil.* 153: 264–270 (2012).
- <sup>13</sup> B. Bereznai, A. Trauninger, I. Gyorgy, K. Szakszon, Z. Almasy, E. Pal, A. Herczegfalvi, K. Vardi Visy, Z. Illes, M.J. Molnar. Pompe-kór fenotípusvariációi, kórlefolyása és az enzimpótló kezelés eredményei: hazai tapasztalatok. *Orv Hetil.* 152:1569-1575 (2011).
- <sup>14</sup> R.J. Desnick, E.H. Schuchman. Enzyme Replacement Therapy for Lysosomal Diseases: Lessons from 20 Years of Experience and Remaining Challenges. *Annu Rev Genomics Hum Genet.* 13:307-335 (2012).
- <sup>15</sup> C.M. Ensor, F.W. Holtsberg, J.S. Bomalaski, M.A. Clark. Pegylated arginine deiminase (ADI-SS PEG20,000 mw) inhibits human melanomas and hepatocellular carcinomas in vitro and in vivo. *Cancer Res.* 62:5443-5450 (2002).

- 
- <sup>16</sup> R. Ln, M. Doble, V.P. Rekha, K.K. Pulicherla. In silico engineering of L-asparaginase to have reduced glutaminase side activity for effective treatment of acute lymphoblastic leukemia. *J Pediatr Hematol Oncol.* 33:617-621 (2011).
- <sup>17</sup> K.H. Weylandt, A. Nadolny, L. Kahlke, T. Kohnke, C. Schmocker, J. Wang, G.Y. Lauwers, J.N. Glickman, and J.X. Kang. Reduction of inflammation and chronic tissue damage by omega-3 fatty acids in fat-1 transgenic mice with pancreatitis. *Biochim Biophys Acta.* 1782:634-641 (2008).
- <sup>18</sup> A.R.C. Braga, P.A. Gomes, S.J. Kalil. Formulation of Culture Medium with Agroindustrial Waste for  $\beta$ -Galactosidase Production from *Kluyveromyces marxianus* ATCC 16045. *Food Bioprocess Technol.* 5:1653-1663 (2011).
- <sup>19</sup> P.S. Panesar, R. Panesar, R.S. Singh, J.F. Kennedy, H. Kumar. Microbial production, immobilization and applications of  $\beta$ -D-galactosidase. *J Chem Technol Biotechnol.* 81:530-543 (2006).
- <sup>20</sup> R. Mattar, D.F.C. Mazo, F.J. Carrilho. Lactose intolerance: diagnosis, genetic, and clinical factors. *Clin Exp Gastroenterol.* 5:113-121 (2012).
- <sup>21</sup> D.L. Swagerty, Jr., A.D. Walling, R.M. Klein. Lactose intolerance. *Am Fam Physician.* 65:1845-1850 (2002).
- <sup>22</sup> S.J. Birge, Jr., H.T. Keutmann, P. Cuatrecasas, G.D. Whedon. Osteoporosis, intestinal lactase deficiency and low dietary calcium intake. *N Engl J Med.* 276:445-448 (1967).
- <sup>23</sup> B. Terjung, F. Lammert. Laktóztolerancia: egy régi probléma új szempontjai (Összefoglaló közlemény). *Orvostovábbk szle.* 14:60-68 (2007).
- <sup>24</sup> D.M. Paige. Lactose Intolerance. *Encyclopedia of Human Nutrition (Third Edition).* 67–73 (2013)
- <sup>25</sup> M.B. Heyman. Lactose intolerance in infants, children, and adolescents. *Pediatrics.* 118:1279-1286 (2006).
- <sup>26</sup> P.R. Santagapita, M.P. Buera. Trehalose–Water–Salt Interactions Related to the Stability of  $\beta$ -Galactosidase in Supercooled Media. *Food Biophysics.* 3:87-93 (2008).
- <sup>27</sup> W. Wang. Lyophilization and development of solid protein pharmaceuticals. *Int J Pharm.* 203:1–60 (2000).
- <sup>28</sup> J. Broadhead, S.K. Rouan, I. Hau, C.T. Rhodes. The effect of process and formulation variables on the properties of spray-dried beta-galactosidase. *J Pharm Pharmacol.* 46:458-467 (1994).
- <sup>29</sup> P.S. Panesar, S. Kumari, R. Panesar. Potential applications of immobilized  $\beta$ -galactosidase in food processing industries. *Enzyme Res.* 2010:1-16 (2010).
- <sup>30</sup> S.A. Ansari, Q. Husain. Lactose hydrolysis by  $\beta$  galactosidase immobilized on concanavalin A-cellulose in batch and continuous mode. *J Mol Catal B: Enzym.* 63:68-74 (2010).

- 
- <sup>31</sup> R. Gaur, H. Pant, R. Jain, S. Khare. Galacto-oligosaccharide synthesis by immobilized *Aspergillus oryzae*  $\beta$ -galactosidase. *Food Chem.* 97:426-430 (2006).
- <sup>32</sup> Z. Grosová, M. Rosenberg, M. Rebroš, M. Šipocz, B. Sedláčková. Entrapment of  $\beta$ -galactosidase in polyvinylalcohol hydrogel. *Biotechnol Lett.* 30:763-767 (2007).
- <sup>33</sup> X.-H. Qin, S.-Y. Wang. Filtration properties of electrospinning nanofibers. *J Appl Polym Sci.* 102:1285-1290 (2006).
- <sup>34</sup> H. Jia, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D.H. Reneker, P. Wang. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnol Prog.* 18:1027-1032 (2002).
- <sup>35</sup> Z.-M. Huang, Y.Z. Zhang, M. Kotaki, S. Ramakrishna. A review on polymer nanofibers by electrospinning and their applications in nanocomposites. *Compos Sci Technol.* 63:2223-2253 (2003).
- <sup>36</sup> K.M. Sawicka, P. Gouma. Electrospun composite nanofibers for functional applications. *J Nanopart Res.* 8:769-781 (2006).
- <sup>37</sup> D.S. Katti, K.W. Robinson, F.K. Ko, C.T. Laurencin. Bioresorbable nanofiber-based systems for wound healing and drug delivery: Optimization of fabrication parameters. *J Biomed Mat Res.* 70:286-296 (2004).
- <sup>38</sup> Z.K. Nagy, K. Nyul, I. Wagner, K. Molnar, G. Marosi. Electrospun water soluble polymer mat for ultrafast release of Donepezil HCl. *Express Polym Lett.* 4:763-772 (2010).
- <sup>39</sup> A. Chunder, S. Sarkar, Y. Yu, L. Zhai. Fabrication of ultrathin polyelectrolyte fibers and their controlled release properties. *Colloids Surf. B.* 58:172-179 (2007).
- <sup>40</sup> E.-R. Kenawy, F.I. Abdel-Hay, M.H. El-Newehy, G.E. Wnek. Controlled release of ketoprofen from electrospun poly(vinyl alcohol) nanofibers. *Mater Sci Eng: A.* 459:390-396 (2007).
- <sup>41</sup> J.M. Deitzel, J.D. Kleinmeyer, J.K. Hirvonen, N.C. Beck Tan. Controlled deposition of electrospun poly(ethylene oxide) fibers. *Polymer.* 42:8163-8170 (2001).
- <sup>42</sup> G. Taylor: Electrically Driven Jets. *Philos Trans R Soc London, Ser. A*, 313: 453-475 (1969)
- <sup>43</sup> A. Greiner, J. H. Wendorff. Electrospinning: A Fascinating Method for the Preparation of Ultrathin Fibers. *Angew Chem Int.* 46:5670-5703 (2007)
- <sup>44</sup> Y.K. Luu, K. Kim, B.S. Hsiao, B. Chu, M. Hadjiargyrou. Development of a nanostructured DNA delivery scaffold via electrospinning of PLGA and PLA-PEG block copolymers. *J Control Release.* 89:341-353 (2003).
- <sup>45</sup> L. Wu, J. Zang, L.A. Lee, Z. Niu, G.C. Horvatha, V. Braxtona, A.C. Wibowo, M.A. Bruckman, S. Ghoshroy, H.-C. zur Loye, X. Li, Q. Wang. Electrospinning fabrication, structural and mechanical characterization of rod-like virus-based composite nanofibers. *J Mater Chem.* 21:8550 (2011).

- 
- <sup>46</sup> W. Salalha, J. Kuhn, Y. Dror, E. Zussman. Encapsulation of bacteria and viruses in electrospun nanofibres. *Nanotechnology*. 17:4675-4681 (2006).
- <sup>47</sup> D. Greigand, S.N. Jayasinghe. Genomic, genetic and physiological effects of bio-electrospraying on live cells of the model yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biomed Mater*. 3:034125 (2008).
- <sup>48</sup> N. Mongkoldhumrongkul, S.C. Swain, S.N. Jayasinghe, S. Sturzenbaum. Bio-electrospraying the nematode *Caenorhabditis elegans*: studying whole-genome transcriptional responses and key life cycle parameters. *J R Soc Interface*. 7:595-601 (2009).
- <sup>49</sup> T.J. Geach, N. Mongkoldhumrongkul, L.B. Zimmerman, S.N. Jayasinghe. Bio-electrospraying living *Xenopus tropicalis* embryos: investigating the structural, functional and biological integrity of a model organism. *The Analyst*. 134:743 (2009).
- <sup>50</sup> J.D.W. Clarke, S.N. Jayasinghe. Bio-electrosprayed multicellular zebrafish embryos are viable and develop normally. *Biomed Mater*. 3:011001 (2008).
- <sup>51</sup> J. Zeng, A. Aigner, F. Czubyko, T. Kissel, J.H. Wendorff, A. Greiner. Poly(vinyl alcohol) nanofibers by electrospinning as a protein delivery system and the retardation of enzyme release by additional polymer coatings. *Biomacromolecules*. 6:1484-1488 (2005).
- <sup>52</sup> C.P. Barnes, M.J. Smith, G.L. Bowlin, S.A. Sell, T. Tang, J.A. Matthews, D.G. Simpson, J.C. Nimitz. Feasibility of electrospinning the globular proteins hemoglobin and myoglobin. *J Eng Fiber Fabr*. 1:16-29 (2006).
- <sup>53</sup> S.-F. Li, J.-P. Chen, W.-T. Wu. Electrospun polyacrylonitrile nanofibrous membranes for lipase immobilization. *J Mol Catal B: Enzym*. 47:117-124 (2007).
- <sup>54</sup> S. Sakai, K. Antoku, T. Yamaguchi, K. Kawakami. Transesterification by lipase entrapped in electrospun poly(vinyl alcohol) fibers and its application to a flow-through reactor. *J Biosci Bioeng*. 105:687-689 (2008).
- <sup>55</sup> D.-z. Yang, Y.-h. Long, J. Nie. Release of lysozyme from electrospun PVA/lysozyme-gelatin scaffolds. *Front Mater Sci China*. 2:261-265 (2008).
- <sup>56</sup> H. Jia, G. Zhu, B. Vugrinovich, W. Kataphinan, D.H. Reneker, P. Wang. Enzyme-carrying polymeric nanofibers prepared via electrospinning for use as unique biocatalysts. *Biotechnol Prog*. 18:1027-1032 (2002).
- <sup>57</sup> P. Chen, Y.-j. Sun, Z.-c. Zhu, R.-x. Wang, X.-d. Shi, C. Lin, Y.-t. Ye. A controlled release system of superoxide dismutase by electrospun fiber and its antioxidant activity in vitro. *J Mater Sci: Mater Med*. 21:609-614 (2009).
- <sup>58</sup> A. Arslan, S. Kiralp, L. Toppare, Y. Yagci. Immobilization of tyrosinase in polysiloxane/polypyrrole copolymer matrices. *Int J Biol Macromol*. 35:163-167 (2005).

- 
- <sup>59</sup> W.-E. Teo, R. Inai, S. Ramakrishna. Technological advances in electrospinning of nanofibers. *Sci Technol Adv Mater.* 12:013002 (2011).
- <sup>60</sup> S.A. Theron, A.L. Yarin, E. Zussman, E. Kroll. Multiple jets in electrospinning: experiment and modeling. *Polymer.* 46:2889-2899 (2005).
- <sup>61</sup> A. L. Yarin, E. Zussman, Upward needleless electrospinning of multiple nanofibers. *Polymer*, 45: 92977-2980 (2004)
- <sup>62</sup> D. Lukas, A. Sarkar, P. Pokorny. Self-organization of jets in electrospinning from free liquid surface: A generalized approach. *J Appl Phys.* 103:084309 (2008)
- <sup>63</sup> H. Niu, X. Wang, T. Lin. Needleless electrospinning: influences of fibre generator geometry. *J Text Ins.* 103: 787-794 (2012)
- <sup>64</sup> J.E. Prenosil, E. Stuker, J.R. Bourne. Formation of oligosaccharides during enzymatic lactose hydrolysis and their importance in a whey hydrolysis process: Part II: Experimental. *Biotechnol Bioeng.* 30:1026-1031 (1987).
- <sup>65</sup> European Food Safety Authority (EFSA). Scientific Opinion on the substantiation of health claims related to lactase enzyme and breaking down lactose (ID 1697, 1818) pursuant to Article 13(1) of Regulation (EC) No 1924/2006. *EFSA Journal.* 7:1236. (2009)
- <sup>66</sup> J.M. Rodriguez-Nogales, A. Delgadillo. Stability and catalytic kinetics of microencapsulated  $\beta$ -galactosidase in liposomes prepared by the dehydration–rehydration method. *J Mol Catal B: Enzym.* 33:15-21 (2005).