



SZEGEDI TUDOMÁNYEGYETEM

Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

Kémia BSc

TDK DOLGOZAT

**Réteges kettős hidroxid-alapú multifunkcionális
nanokompozitok fejlesztése**

Kónya Zsuzsanna

Témavezetők:

Szerlauth Adél, PhD hallgató

Dr. Szilágyi István, egyetemi docens

Szeged

Lezárás dátuma: 2024.06.19.

Tartalmi összefoglaló

Antioxidánsokat és proteáz enzimeket a legkülönbözőbb ipari szektorok évtizedek óta alkalmaznak, azonban előnytelen tulajdonságaik (pl.: hő-, pH-, fényérzékenység, csekély vízdoldhatóság, fokozott reaktivitás) korlátozhatják felhasználásukat. A felsorolt hátrányok kiküszöbölésére a molekulák hordozón való rögzítése jelenthet megoldást, melyre a réteges szerkezetű, biokompatibilis, és változatos összetétellel előállítható réteges kettős hidroxidok (LDH-k) megfelelő jelölteknek bizonyulnak. Munkánk során tannint (TA) és papaint (PPN) rögzítettünk LDH-k felületén a molekulák stabilizálása és egy kombinált hatású, antioxidáns és proteáz aktivitással rendelkező nanokompozit előállítása érdekében.

A két biomolekula immobilizációja céljából Mg/Al LDH-t állítottunk elő együttes lecsapással, a termék szerkezeti tulajdonságait porröntgen diffraktometriás mérésekkel határoztuk meg. Ezt követően elektroforetikus- és dinamikus fényszórás mérésekkel vizsgáltuk a részecskék töltését és hidrodinamikai sugarát változó TA- és PPN-koncentrációk mellett. A pozitív többlettöltésű LDH-részecskék felületén először a TA-t rögzítettük, majd az így áttöltött, negatív töltésű felületen immobilizáltuk a PPN-t elektrosztatikus kölcsönhatások révén. A ζ -potenciálok és a hidrodinamikai sugár változásából számítható stabilitási arányok alapján meghatároztuk a kolloidstabilitás szempontjából ideális TA- és PPN-dózist, mely 200 mg/g volt mindkét esetben.

Az immobilizáció sikerességének igazolására UV-Vis és Raman-spektroszkópiás méréseket alkalmaztunk. Az előállított LDH-ről és LDH/TA/PPN nanokompozitról transzmissziós elektronmikroszkóppal készítettünk felvételeket, melyek segítségével vizsgáltuk a két rendszer morfológiai tulajdonságait.

Az antioxidáns és hidrolitikus aktivitást DPPH- és proteáz-tesztel vizsgáltuk, melyet megismételtünk az 50°C-on hőkezelt mintákkal is, illetve összehasonlítottuk az oldatbeli és az immobilizált rendszerekkel kapott adatokat. Eredményeink hozzájárulhatnak kettős hatású antioxidáns-proteáz rendszerek fejlesztéséhez, melyek a kozmetikai- és élelmiszeripar egyes területein nagy érdeklődésre tarthatnak számot.

Kulcsszavak: LDH, tannin, papain, antioxidáns aktivitás, proteáz aktivitás, kombinált hatás

Tartalomjegyzék

1. Bevezetés	6
2. Irodalmi áttekintés	9
2.1. Antioxidánsok és szabadgyökök	9
2.2. Proteáz enzimek	12
2.3. Réteges kettős hidroxidok	15
2.3.1. Antioxidánsok rögzítése LDH hordozókon	17
2.3.2. LDH-k kolloidstabilitása	18
3. Céltűzés.....	21
4. Kísérleti eszközök és módszerek	22
4.1. Felhasznált eszközök.....	22
4.2. Felhasznált anyagok	22
4.3. Szintézisek.....	23
4.3.1. Mg/Al réteges kettős hidroxidok előállítása.....	23
4.3.2. Dinamikus fényszórásméréshez szükséges oldatok	23
4.3.3. Elektroforetikus mobilitás méréshez szükséges oldatok	23
4.3.4. Oldatbeli TA- és PPN-koncentráció meghatározása	24
4.3.5. DPPH-teszt	25
4.3.6. Proteáz aktivitás vizsgálata	26
4.3.7. Hőkezelés	28
4.4. Kísérleti és vizsgálati módszerek	28
4.4.1. Porróntgen diffraktometria	28
4.4.2. Dinamikus fényszórás- és elektroforetikus mobilitás mérések	28
4.4.3. UV-látható spektrofotométer.....	29
4.4.4. Raman-spektroszkópia	29
4.4.5. Transzmissziós elektronmikroszkópia	29
5. Eredmények és értékelésük.....	30

5.1. Mg/Al-LDH szerkezetének vizsgálata	30
5.2. Ideális TA- és PPN-dózis meghatározása	30
5.3. Oldatbeli TA- és PPN-koncentráció meghatározása	34
5.4. Szerkezeti és morfológiai tulajdonságok jellemzése.....	38
5.5. Antioxidáns aktivitás vizsgálata.....	40
5.6. Proteáz aktivitás vizsgálata	42
6. Összefoglalás	45
Irodalomjegyzék	47
Köszönetnyilvánítás.....	51

Rövidítésjegyzék:

Rövidítés	Magyar megfelelő
CBB	Coomassie Brilliant Blue G-250
DLS	Dinamikus fényszórás
DPPH	2,2-difenil-1-pikrilhidrazil
EC ₅₀	Hatásos koncentráció
EM	Elektroforetikus mobilitás
EtOH	Etil-alkohol
F-C-reagens	Folin-Ciocalteu-reagens
LDH	Réteges kettős hidroxid
PPN	Papain
R _h	Hidrodinamikai sugár
ROS	Reaktív oxigénszármazékok
TA	Tannin
TEM	Transzmissziós elektronmikroszkóp

1. Bevezetés

Mind az élő szervezetek kiegyensúlyozott működéséhez, mind különböző ipari folyamatok megfelelő lejátszódásához szükség van antioxidánsok gyökfogó és enzimek katalitikus funkcióira. Az antioxidánsok a szabadgyököket hatástalanítják vagy azok termelődését akadályozzák meg [1], az enzimek pedig speciális működésükkel (pl.: fehérjebontó tulajdonság) különféle reakciókat katalizálnak [2].

Az antioxidánsok a szabadgyökökkel egyensúlyt tartva gátolják az oxidatív stressz és az általa indukált betegségek, köztük a rákos megbetegedések kialakulását [3]. Molekuláris és enzimátikus képviselőik egyaránt fontos szerepet töltenek be a szabadgyökök okozta lipidperoxidáció és DNS-károsodás megakadályozásában, azonban a megfelelő antioxidáns-koncentráció szinten tartásához egyre fontosabbá válik azok pótlása exogén forrásokból. Változó életmódunk, az egyre nagyobb mértékű környezet-szennyezés és a káros szenvedélyek, köztük a dohányzás fokozott szabadgyöktermeléssel járnak, melynek ellensúlyozására nem elegendő az endogén antioxidánsok védelmi rendszere. Jótékony hatásai ismerete okán számos étrendkiegészítő van kereskedelmi forgalomban, azonban egy változatos és kiegyensúlyozott étrend egyaránt képes fenntartani az egyensúlyt [1, 4]. Az antioxidánsok nemcsak szervezetünk védelme miatt váltak gyakori hatóanyagokká gyógyszeripari készítményekben, hatásmechanizmusukat változatos módon hasznosítják különböző ipari szektorokban. Az általunk fogyasztott kellemes illatú, színű, ízű és textúrájú élelmiszeripari termékek legtöbb esetben különböző adalékanyagok és tartósítószerrel segítségével felelnek meg a fogyasztói elvárásoknak [5]. A bőrgyógyászati és kozmetikai ipar krémek, gélek hatóanyagaként, de azok tartósítására szintén előszeretettel alkalmazza ezen vegyületeket a gyors oxidatív bomlás elkerülése végett [6]. Széleskörű felhasználásukat korlátozhatja csekély vízoldhatóságuk, fokozott reaktivitásuk, bomlékonyságuk és egyéb környezeti hatásokkal szemben mutatott érzékenyséjük; ezen tényezők részletes feltérképezése és kiküszöbölése igen bonyolulttá és költségessé teheti az ipari felhasználásukat [5, 6].

A proteázok – azaz a peptidkötések hidrolízisére képes hidroláz enzimek – az ipari enzimek piacának közel 60%-át teszik ki [2, 7]. Felhasználásuk elterjedésével először egyszerű, fehérjebontó enzimek szerepét töltötték be; ezen vegyületek fontosságát és pontos biológiai szerepét csak későbbi kutatások azonosították. Fehérjék bontásával új peptidek és aminosavak keletkeznek, melyek lokalizációjáért és aktivitásáért egyaránt ezen enzimek felelősek. A fehérjék közötti kölcsönhatások vezérlésével, jelátviteli

folyamatok szabályozásával és új bioaktív molekulák képzésével közvetlen hatással vannak számtalan biológiai folyamatra és jelenségre, köztük a DNS-replikációra és transzkripcióra, sejtdifferenciálódásra, sebgyógyulásra, véralvadásra, gyulladásokra és a termékenységre. A felsoroltakból adódóan ezen enzimek hatékonysága összefüggésben áll a sejtek – és ebből fakadóan az élő szervezetek – túlélésével és halálával, a jól működő rendszer megzavarása rákos, neurodegeneratív, kardiovaszkuláris és gyulladásos eredetű betegségek kialakulását eredményezheti [8]. Érthető hát, hogy a proteázok a legértékesebb kereskedelmi forgalomban lévő enzimek közé tartoznak; legnagyobb mennyiségben a mosószer-, gyógyszer-, élelmiszer- [2] és kozmetikai ipar [9] alkalmazza őket, de fontos szerepet töltenek be szintézisek biokatalizátoraként is [7, 8]. Az enzimek felhasználását azonban – az antioxidánsokhoz hasonlóan – nehezítik az ipari folyamatok során alkalmazott szélsőséges hőmérséklet-, nyomás- és pH-viszonyok; a nem megfelelő környezet a biomolekulák denaturálódását és ezáltal aktivitásuk elvesztését okozhatja. A biotechnológia gyors fejlődésének hála mára van lehetőség a legtöbb enzim költséghatékony előállítására és módosítására, azonban így is problémát jelenthet aktivitásuk gyors csökkenése, a reakcióelegytől való elválasztásuk és többszöri felhasználásuk [7, 10].

Az előnytelen tulajdonságok kiküszöbölésére megoldást jelenthet a hatóanyagok valamilyen szilárd hordozón való rögzítése. Az immobilizáció a megkötött vegyülettől függően történhet természetes szerves- [11], mesterségesen előállított szerves- [12] vagy szervetlen [13] hordozón; a megkötődés alapja kovalens kötések kialakítása, elektrosztatikus kölcsönhatások létrejötte, vagy van der Waals-vonzóerők jelenléte [10]. A szervetlen hordozók csoportjába tartozó réteges kettős hidroxidok (LDH-k) pozitív többlettöltéssel rendelkező, brucithoz hasonló rétegekből álló rendszerek. A hidroxidionok által kialakított oktaéderek közepén két- és háromértékű fémionok állnak, ezek leggyakrabban Mg(II)-, Ca(II)-, Ni(II)-, Cr(III)-, Al(III)- vagy Fe(III)-ionok; a pozitív töltést rétegeközi anionok ellensúlyozzák [14]. Az LDH-k több szempontból is kiváló potenciális hordozónak bizonyulnak. Változatos összetételben előállíthatók, így a felhasználási területtől függően „személyre szabhatók”. Nagy fajlagos felületük lehetővé teszi molekulák rögzítését a részecskék felületén, réteges szerkezetük azonban a rétegeközi anionok cseréjére is lehetőséget biztosít. Biokompatibilis, nagy mechanikai- és kémiai stabilitással rendelkező rendszerek, így szélsőséges körülmények között is hatékonyan

alkalmazhatók. Mindemellett előállításuk viszonylag olcsó, mely igen fontos ipari szempont [14, 15].

Antioxidáns molekulák és enzimek együttes rögzítésével stabilitásuk növelése mellett [7] lehetőség adódhat olyan kettős hatású nanokompozitok előállítására, melyek egyaránt rendelkeznek gyökfogó-, illetve katalitikus tulajdonsággal. Immobilizáció esetén a reagens és a kezelt rendszer elválasztása jóval egyszerűbb, emellett az immobilizált hatóanyagok hosszabb ideig megőrizhetik aktivitásukat, így a rögzítés megkönnyítheti azok többszöri felhasználását [10].

Tannint (TA-t) és papaint (PPN-t) egyaránt alkalmaznak a bőrgyógyászati- és kozmetikai iparban a két vegyület gyulladásgátló, sebgyógyulást serkentő és antimikrobiális hatásai miatt [16-18]. A TA szerkezetéből adódóan nagy aktivitással rendelkező antioxidáns, szabadgyökök hatástalanításával akadályozza meg az oxidatív stressz kialakulását. Kozmetikai szerek adalékanyagaként hatásmechanizmusa „öregedésgátló” és ránceltávolító tulajdonságaiban nyilvánul meg [19]. A PPN proteáz enzimként kiváló hámlasztó hatóanyag lehet különböző krémek vagy arcmaszkok formájában [9]. Antibakteriális, antivirális és antioxidáns jellegük miatt a TA és a PPN biológiai úton lebomló, természetes eredetű csomagolóanyagok adalékanyagai is lehetnek [20, 21]. LDH-kat ugyancsak használnak biofilmek stabilizálására, így joggal merül fel gondolat a három anyag egyesítésével kapcsolatban [22]. A TA használatát a molekula fokozott reaktivitása gátolja, hiszen a szabadgyökök mellett számos más vegyületcsaláddal képes reakcióba lépni [17]; a PPN ezzel szemben igen bomlékony, így aktivitásának megőrzése és hosszú távú tárolása okozhat problémát [2, 7]. A két biomolekula LDH-n való rögzítésével tehát azok stabilitásának növelése mellett olyan kombinált hatású, biokompatibilis nanokompozitok állíthatók elő, melyek a fentebb említett területeken jelenthetnek előrelépést.

2. Irodalmi áttekintés

2.1. Antioxidánsok és szabadgyökök

A szabadgyökök egy vagy több párosítatlan vegyértékelektronnal rendelkező részecskék, melyek szerkezetükből fakadóan fokozott reaktivitással bírnak. Különböző molekulákkal kémiai reakcióba lépve megváltoztathatják azok felépítését és funkcióját, így a szervezet szempontjából pozitív és negatív hatású folyamatokat is indukálhatnak. A szabadgyökök csoportjába tartozó reaktív oxigén (ROS) és nitrogén származékok (RNS) élő szervezetekre gyakorolt hatásainak vizsgálata a változó életmód és a növekvő környezetszennyezés miatt egyre inkább előtérbe kerül. Eredetüket tekintve lehetnek endogének vagy exogének: keletkezhetnek intracelluláris folyamatok melléktermékeként, például enzimreakciók során, vagy a szervezetbe kerülhetnek külső forrásokból, így radioaktív sugárzás és dohányzás hatására, illetve egyéb szennyezőanyagok formájában [4].

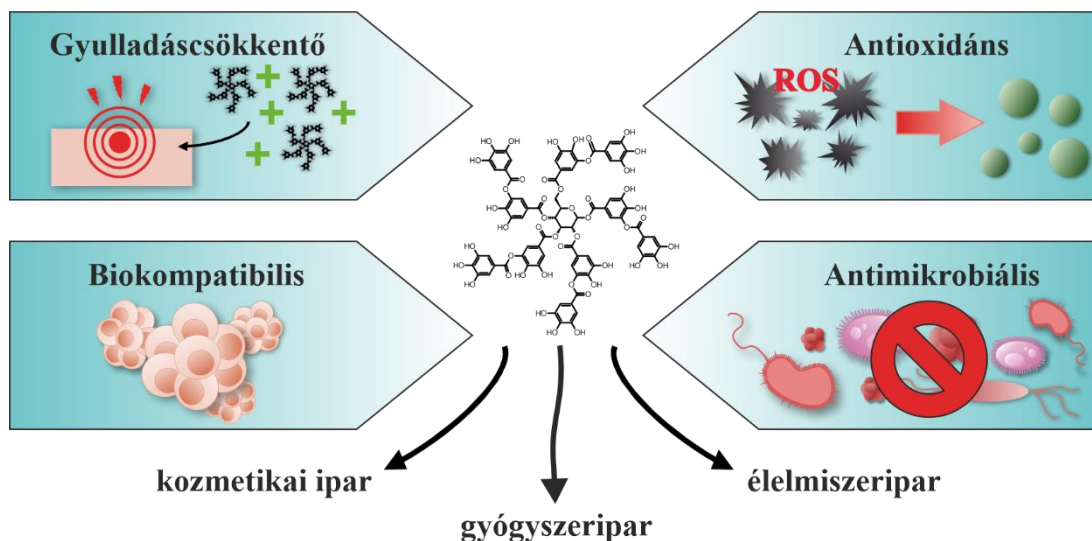
Az antioxidánsokkal egyensúlyt tartva a ROS pozitív hatásai érvényesülnek, jelátviteli folyamatok szabályozásával és patogének eltávolításával támogatják a szervezet megfelelő működését. Magas koncentrációjuk esetén azonban károsíthatják a sejtalkotókat, fokozott termelődésük ún. oxidatív stresszhez vezethet [3]. Az egyik legreaktívabb szabadgyök, a hidroxilgyök ($\text{OH}\cdot$) a DNS bármely alkotóját károsíthatja, okozhat szál töréseket, bázismódosításokat, emellett keresztkötések képződését. Ezen folyamatok elősegítik rákos sejtek megjelenését és túlélését, mivel hatással lehetnek a jelátviteli folyamatokra és replikációs hibákat eredményezhetnek. A gyökök a DNS-en kívül a lipidekkel és fehérjékkel is reakcióba léphetnek; a lipidperoxidáció során keletkező malondialdehid és 4-hidroxinon-2-énal molekulák karcinogén hatással bírnak, míg fehérjék és gyökök reakciója a fehérjeláncok törését és láncok közötti keresztkötések kialakulását eredményezheti. Ezen folyamatok neurodegeneratív, gyulladásos vagy kardiovaszkuláris eredetű, illetve rákos megbetegedések kialakulását okozhatják [1, 4].

Az antioxidánsok olyan vegyületek, melyek már alacsony koncentrációban is képesek a ROS által okozott oxidáció megakadályozására vagy késleltetésére: ez történhet azok hatástalanításával, vagy a már károsított molekulák eltávolításával. Eredetüket tekintve a gyökökhöz hasonlóan lehetnek endogének vagy exogének. Legfontosabb endogén képviselőik pl. az enzimatisz antioxidánsok (glutathion-peroxidáz, kataláz, szuperoxid-dizmutáz), míg az exogén antioxidánsok közé tartoznak a

vitaminok (C- és E-vitamin), karotinoidok (β -karotin, likopin), fenolos molekulák (klorogénsav, kávésav) és flavonoidok (kvercetin, rutin). A glutation-peroxidáz és kataláz enzimek a sejtalkotókban képződő H_2O_2 vízzé redukálását katalizálják. A szuperoxid-dizmutáz három típusa (Cu-Zn-tartalmú, Mn-tartalmú, Fe-Ni-tartalmú) a mitokondriumban vagy citoplazmában keletkező szuperoxid-aniont alakítja H_2O_2 -dá. Az exogén antioxidánsok egyaránt képesek a ROS hatástalanítására vagy a lipidperoxidáció megakadályozására. Az E-vitamin a sejtmembránban egy kevésbé reaktív molekula létrehozásával, míg a C-vitamin a tokoferollal szinergizmusban akadályozza meg a lipidperoxidáció folyamatát. Az élő szervezetek megfelelő működéséhez az endogén antioxidánsok jelenléte mellett elegendő exogén antioxidáns felvétele szükséges, mely a megfelelő étrend kialakításával és szükség esetén étrendkiegészítők fogyasztásával biztosítható [1, 4].

A TA a gallotanninok csoportjába sorolható polifenol (1. ábra). Megtalálható különböző fafélék kérgében és növényekben, nagy koncentrációban van jelen a zöld teában, kávéban és egyes gyümölcsökben (szőlő, gránátalma); felhasználják az élelmiszer-, kozmetikai és bőrcserző iparban. A vegyületet az utóbbi években fokozott érdeklődés övezi antioxidáns, antimikrobiális, daganat elleni, sebgyógyulást serkentő és gyulladásgátló tulajdonságai miatt [16]. Változatos módokon hat kölcsön fehérjékkel, poliszacharidokkal és fémekkel, így a TA-t tartalmazó hibridek az orvostudomány számos területén, fertőzések és rákos megbetegedések kezelésére, bioszenzorok készítésére egyaránt felhasználhatók [17]. A TA a kozmetikai iparban is egyre elterjedtebb, mivel a lipidperoxidáció, DNS-károsodás és oxidatív stressz gátlásával megakadályozza a bőr UV-sugárzás okozta nagymértékű öregedését, emellett a bőr esztétikáját is javítja ráncatlanító hatásával [19]. TA hozzáadásával a természetes úton lebomló csomagolóanyagok stabilitása is növelhető, így az élelmiszeripar ezen területén is alkalmazzák antioxidáns és antimikrobiális tulajdonságai okán [20]. A TA fehérjékkel, így enzimekkel is képes vízben oldódó komplexek kialakítására, azonban a komplexképződés a reakcióba lépő enzimtől függően okozhatja az enzim stabilizálódását, vagy az aktivitás elvesztését. Több kutatás eredménye azt mutatja, hogy kis TA-koncentrációk az enzimaktivitást fokozzák, míg nagyobb TA-dózisok gátolják azt; utóbbi esetben megkezdődik a részecskék fokozott aggregációja, mely blokkolhatja az enzim aktív centrumát, vagy megváltoztathatja annak konformációját [23, 24]. Egyes tanulmányok beszámolnak a TA enzim-stabilizáló hatásáról, mely magasabb

hőmérsékleteken való hőkezelés során is megvédi a makromolekulákat a denaturálódástól, megőrizve azok aktivitását [25]. Ezzel szemben a TA lizozim enzimmel képzett komplexe a hőmérséklet növelésével fokozatosan elveszíti aktivitását [24].



1. ábra: A TA főbb tulajdonságai és lehetséges felhasználási területei.

Antioxidánsokat gyakorlatilag minden ipari szektor alkalmaz: az élelmiszer-, festék- és kozmetikai ipar egyaránt felhasználja azokat tartósítószerként, emellett számos gyógyszeripari alkalmazásuk ismert [17]. Felhasználásukat azonban megnehezíti rossz vízoldhatóságuk, hő- vagy fényérzékenységük és viszonylag nagy reaktivitásuk okozta instabilitásuk. Ezen tulajdonságok finomhangolhatók a molekulák valamilyen hordozón való rögzítésével [6]. A megfelelő hordozón való rögzítés stabilizálhatja a molekulákat, lehetővé teheti azok szabályozott felszívódását, emellett megőrizheti azok hatékonyságát. A klorogénsav az egyik leggyakrabban előforduló természetes eredetű fenolos antioxidáns, azonban szerkezetéből adódóan hő- és fényérzékeny, levegő és nedvesség hatására bomlik. Keresztkötéses kationos keményítőn anioncserével rögzítve nőtt a molekula stabilitása, hosszabb ideig megtartotta antioxidáns aktivitását [11]. A molekuláris antioxidánsok mellett az enzimatisz antioxidánsok immobilizációja is jellemző: szuperoxid-dizmutáz és torma-peroxidáz TiO_2 -nanofilmeken való együttes rögzítésével egy kombinált hatású nanokompozit jött létre, mely kimagasló gyökfogó képességgel bírt az immobilizációt követően is [13].

2.2. Proteáz enzimek

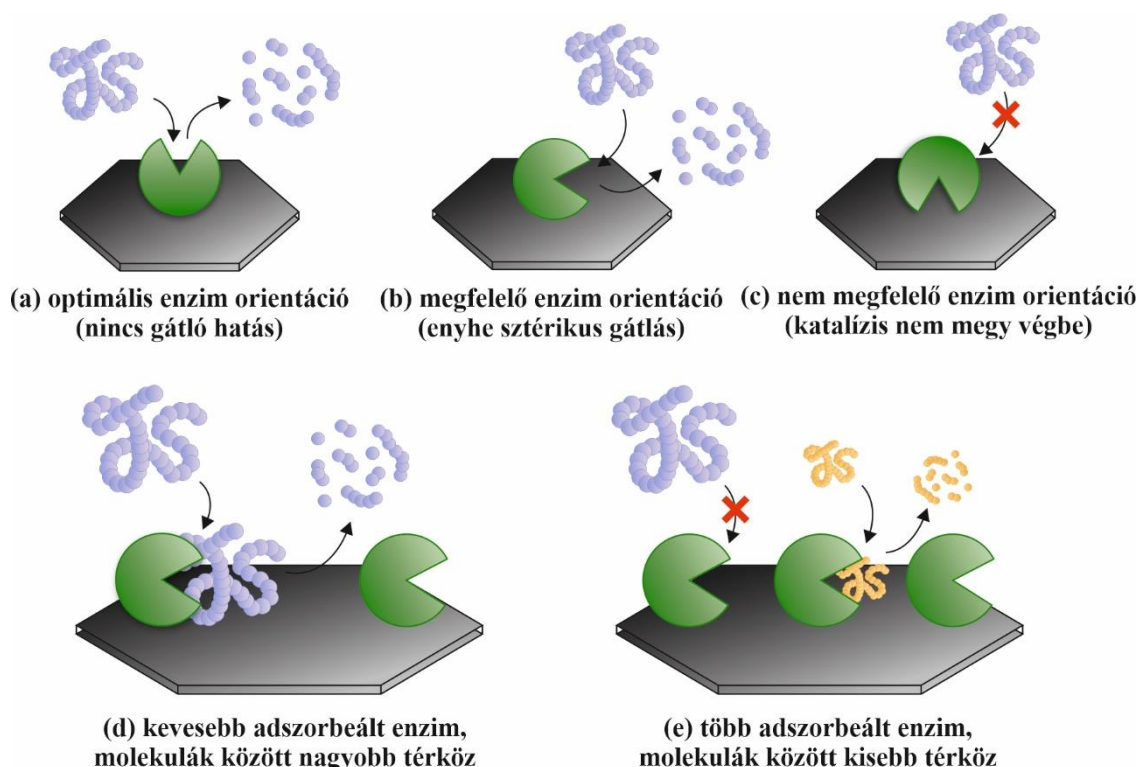
Az enzimek biológiai katalizátorok, melyek növelik az élő szervezetekben lejátszódó biokémiai reakciók sebességét. A ma ismert enzimek legnagyobb része fehérje, de előfordulnak RNS-alapú enzimek, ún. ribozimok is. Az enzimek aktív centrumában elhelyezkedő katalitikus csoportok kötik meg a szubsztrátmolekulák átalakítandó részét; nagyobb részecskék esetén a megkötődést egyéb szubsztrátkötő helyek segítik. Elnevezésük és osztályozásuk nemzetközi nómenklátúra – az általuk katalizált folyamatok természete – szerint történik, mely alapján 6 enzimosztályt különböztetünk meg. Az elektrontranszfer folyamatokat az oxidoreduktáz csoportba tartozó molekulák, a kémiai csoportok áthelyezését a transzferázok végzik. A hidrolázok víz hozzáadásával hasítanak kémiai kötéseket. A liázok szén-szén vagy szén-nitrogén kötéseket hasítanak, az izomerázok egy molekulán belül kémiai csoport vagy kötés áthelyezésére képesek. Végezetül a ligázok nukleozid-trifoszfát hasításával egyidejűleg szén-szén kötést tudnak kialakítani [26].

A hidrolázok csoportjába tartozó proteázok (vagy peptidázok) peptidkötések hidrolízisével a fehérjéket kisebb peptidekre majd aminosavakra bontják. Az aktív centrum szerkezete, azaz a katalízis mechanizmusa alapján hét alcsoportba sorolhatók: megkülönböztetünk szerin-, cisztein-, treonin-, aszparaginsav-, glutaminsav- és metalloproteázokat, illetve aszparagin-peptidliázokat [2]. Mivel mechanizmusukból fakadóan fontos szerepet töltenek be a sejtek túlélésében és megfelelő működésében, rendszerük meghibásodása okozhatja rákos, neurodegeneratív, gyulladásos és kardiovaszkuláris eredetű betegségek kialakulását [8]. A proteázok az ipari enzimek piacának közel 60%-át teszik ki, a legértékesebb kereskedelmi forgalomban lévő enzimek közé tartoznak. Ennek oka felhasználhatóságuk sokszínűsége, mivel az élelmiszer-, gyógyszer-, biotechnológiai és kozmetikai ipar egyaránt alkalmazza őket [2].

A PPN egy cisztein-proteázok csoportjába tartozó hidroláz enzim. Vírusokban, mikroorganizmusokban, növényi és állati szervezetekben egyaránt megtalálható, nagy mennyiségben kinyerhető a *Carica papaya* növény latexéből. Kereskedelmi jelentősége két fontos tulajdonságából fakad: szubsztrátok széles körét képes hatékonyan hidrolizálni, emellett tág hőmérsékleti skálán (25-65°C) és változatos pH-körülmények között (pH = 5-8) is megtartja aktivitását. Ezen előnyei miatt előszeretettel alkalmazzák az élelmiszeriparban [2, 7], antimikrobiális tulajdonsága miatt például csomagolóanyagok stabilizálására [21]. Kozmetikai szerek, köztük arcmaszkok kedvelt adalékanyaga

hámlyasztó hatása miatt [9]; gyógyszeripari termékek (pl.: gélek, krémek, kötszerek) gyakori alapanyaga, mivel a sérült vagy elhalt részek eltávolításával elősegíti a hatékony sebgyógyulást [18]. Sokszínű felhasználhatóságát azonban korlátozza bomlékonysága, illetve hő- és pH-érzékenysége [2, 7].

Az enzimek felhasználását nehezíti az ipari folyamatok során alkalmazott nagy hőmérséklet, nyomás, a változatos pH, emellett a magas elektrolit-koncentráció vagy inhibitorok jelenléte is gátolhatja működésüket. Ezen problémák kiküszöbölésére az immobilizáció jelenthet megoldást [13]. A hordozón való rögzítés megkönnyítheti a rendszer kezelését és lehetővé teszi annak többszöri felhasználását. Immobilizált formában egyszerűbbé válik az enzimek és a reakcióelegy elválasztása is, így azok a termék szennyezésével később nem képesek allergiás reakciók kiváltására. Az enzim-immobilizáció azonban okozhatja a molekulák aktivitásának csökkenését, így létfontosságú a megfelelő hordozó, rögzítési módszer és egyéb körülmények (pl.: enzimkoncentráció, molekulák orientációja, sztérikus gátlások, szubsztrátmolekula mérete) figyelembevétele. Az immobilizált molekulák közül nagyobb szubsztrátok bontására egyedül azok alkalmasak, melyek orientációjukból adódóan képesek a szubsztrát megkötésére aktív centrumaikkban. Ha az aktív centrum a megkötődés irányából fakadóan más proteáz molekulák vagy a hordozó szerkezete által akár részlegesen fedve van, a hidrolízis nem megy végbe. A megkötődés során az aktív centrum konformációja is megváltozhat, mely ugyancsak az aktivitás elvesztését okozhatja. Az enzimaktivitás nagyban függ emellett a rögzített enzimek mennyiségétől: nagy enzimkoncentrációk esetén a molekulák sztérikusan gátolhatják a hidrolízis lejártsódását, ez a jelenség pedig még inkább fokozódik, ha a magas enzimkoncentráció több molekularéteg kialakulását okozza (2. ábra). Szabad formában a PPN a szubsztrát-molekulákkal ütközve indukálhat reakciót, azonban a rögzített enzimek oldatbeli diffúziója jóval lassabb; a részecskék méretéből adódóan a lassú ülepedés és a gátolt hőmozgás is gátolhatja a reakció lejártsódását [7]. Felhasználástól függően a rögzítés történhet különböző mesterségesen előállított szerves (pl.: akrilgyanták), természetes (pl.: cellulóz, keményítő, kitozán) és szervetlen (pl.: zeolitok, nanoszilika) hordozókon [10].



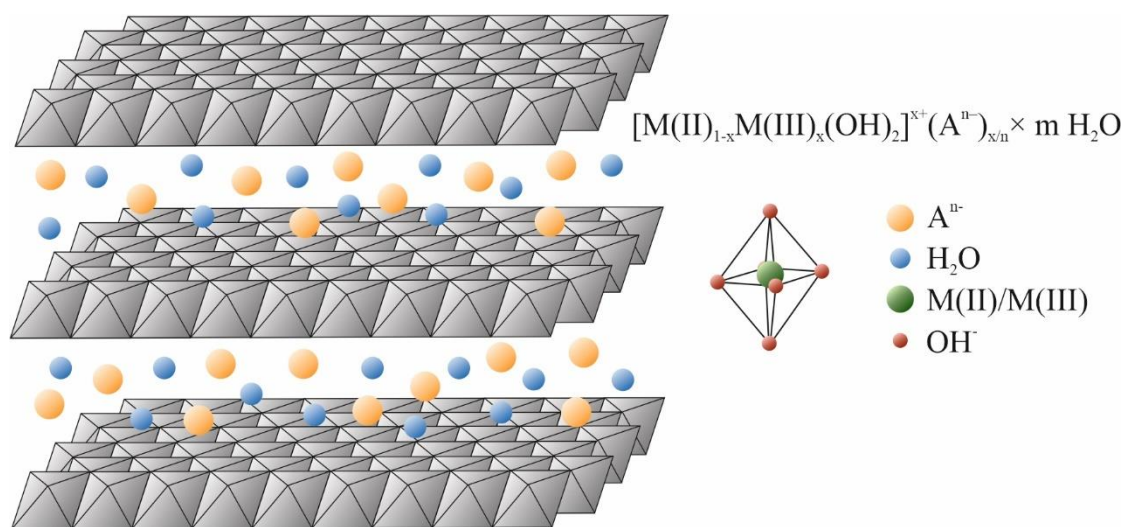
2. ábra: Az immobilizált enzimek aktivitását gátló tényezők sematikus ábrája.

A PPN immobilizációja szintén fontos ipari szempont. A különböző szerves makromolekulák (pl.: agaróz-, cellulóz-, kitozán- vagy alginátgyöngyök) már hosszabb ideje kedvelt hordozók, mivel kereskedelmi forgalomban változatos részecske- és pórusméret-eloszlásban megtalálhatók, emellett viszonylag inerteek. Ideális közeg lehet emellett valamilyen szintetikus polimergyöngy vagy membrán, melyek felhasználhatók az élelmiszer-, szennyvíz- és gyógyszeriparban. A szervetlen hordozók (pl.: zeolitok, fém-oxidok, szén-szerkezetek) mechanikai, kémiai és hőstabilitásuk, illetve kiemelkedően nagy fajlagos felületük miatt ugyancsak számos területen alkalmazott anyagok (pl.: elektronikai ipar, bioszenzorok, elemek, napelemek, fotokatalitikus hidrogéntermelés) egyaránt alkalmasak [7, 18]. Szulfát-csoportok által negatívan töltött latexrészecskéken immobilizálva a PPN enzimatisztikus tulajdonsága mellett gyökfogó képességét is megőrizte [12]; ezüsttel és TA-nal módosított CuFe_2O_4 nanorészecskéken rögzítve annak antibakteriális hatása is megnövekedett [27]. A PPN bakteriális cellulózon való immobilizációjával egy bioaktív kötszert hoztak létre, mely az enzim fehérjebontó tulajdonságát használja ki. Ilyen, PPN-tartalmú kötszereket előszeretettel alkalmaznak az orvostudományban mechanikai vagy égési sebek, horzsolások és fekélyek kezelésére, így az enzim rögzítésének célja annak stabilizációja és aktivitásának növelése volt [18]. A TA korábban említett komplexképző tulajdonságai ellenére a TA PPN-nal alkotott

komplexeiről és azok viselkedéséről nem áll rendelkezésünkre bővebb információ; azonban a komplexképződés hátrányai immobilizációval mérsékelhetők lehetnek a két molekula reakciójának szabályozásával/gátlásával. Összefoglalva a proteázok, ezen belül a PPN immobilizációval történő stabilizálása környezetkímélés és költséghatékonyság szempontjából is érdekelt technológia.

2.3. Réteges kettős hidroxidok

A réteges kettős hidroxidok (LDH-k) szerkezete a brucit $[\text{Mg}(\text{OH})_2]$ szerkezetéből származtatható oly módon, hogy a rétegeket alkotó Mg(II) -ionok egy részét Al(III) -, vagy egyéb háromértékű fémionokra cseréljük (3. ábra). A rétegeket hidroxidionok által kialakított oktaéderek alkotják, melyek közepén helyezkednek el a fémionok, az oktaéderek pedig éleiken keresztül kapcsolódnak egymáshoz. A háromértékű fémionok jelenléte által létrejövő pozitív többlettöltést ellensúlyozzák a rétegek közötti térben elhelyezkedő hidratált anionok. Az LDH-k általános összegképlete: $[\text{M(II)}_{1-x}\text{M(III)}_x(\text{OH})_2]^{x+}(\text{A}^{n-})_{x/n} \times m \text{H}_2\text{O}$, ahol M(II) és M(III) a két- és háromértékű fémionokat, A^{n-} a rétegek közötti anionokat jelöli.



3. ábra: Réteges kettős hidroxidok általános szerkezete.

LDH-k változatos módszerekkel előállíthatók. Együttes lecsapás során a kiválasztott fémsókat megfelelő arányban tartalmazó vizes oldathoz – mely tartalmazza a rétegek közé építendő anionok oldatát is – a pH állandó értéken tartásának érdekében lúgot (pl. NaOH) adagolunk. Fokozatos lúgadatagolás esetén alacsony túltelítettséget érünk el, mivel ebben az esetben a gócnövekedés sebessége meghaladja a góképződés

sebességét. Gyors hozzáadás során magas túltelítettség érhető el, melynek hatására a kristályossági fok csökken. A M(II)/M(III) fémion-arány változtatásával szabályozható a rétegek közötti anionok mennyisége. A homogén méreteloszlás érdekében a reakció után általában hőkezelést alkalmaznak [14].

Lúg hozzáadása helyett használhatunk karbamidot [$\text{CO}(\text{NH}_2)_2$] is, mely két lépésben hidrolizál. A hidrolízis termékei az oldat pH-ját a hőmérséklettől függően 9 körüli értékre állítják be, mely alkalmas egyes típusú LDH-k (pl.: M(II) = Mg, Zn, Ni) előállítására. Nikkelt és háromértékű fémionként Al(III)-, Cr(III)-, Mn(III-) vagy Fe(III)-ionokat tartalmazó LDH-k elektrokémiai úton is előállíthatók, az így kapott termékek szerkezete az $\alpha\text{-Ni}(\text{OH})_2$ szerkezetéhez hasonlít. Egyéb előállítási módszer lehet a szol-gél eljárás, mely során fém-alkoxidok adják a kiindulási oldatot, eredményül pedig egy kisebb kristályossági fokú LDH-t kapunk [14].

A szintézis után ugyancsak van lehetőség az elkészült LDH összetételének befolyásolására. Anioncserés módszer során az LDH-t a kívánt anionokat tartalmazó oldatba helyezzük a rétegek közötti anionok cseréjének céljából. Ioncsere akkor játszódik le, ha az oldatban lévő ionok erősebb elektrosztatikus kölcsönhatást tudnak kialakítani a rétegeket alkotó fémionokkal, mint a kiindulási anionok. A folyamat sikeressége emellett függ a rétegtávolságtól, az összetételtől és a pH-tól. Az LDH-k szerkezete módosítható az ún. memóriaeffektus felhasználásával is. Kalcinálás során az LDH-kból a megfelelő fémoxid-keverék képződik. Ha ezt a keveréket vizes oldatba helyezzük, az képes az LDH réteges szerkezetének rekonstrukciójára: a víz a hidroxidionokat szolgáltatja, az anionok pedig a rétegek közé fognak beépülni. Mivel az anionok nem kell, hogy egyezzenek a kalcinálás előtti anionokkal, ezzel a módszerrel is lehetőség van a rétegek közötti anionok cseréjére [14].

Réteges szerkezetük, nagy kémiai- és hőstabilitásuk, nagy fajlagos felületük, az anioncsere lehetősége, valamint nem utolsósorban biokompatibilitásuk miatt az LDH-k kedvelt alapanyagai számos ipari szektornak. Alkalmazzák őket mezőgazdasági (pl.: adszorbens, anioncserélő), gyógyszeripari (pl.: gyógyszerhordozók), műanyag- és kerámiaipari területeken, emellett fontos szerepet töltenek be ipari folyamatok katalízisében [15, 28]. LDH-k élelmiszeripari csomagolóanyagok adalékanyagaként javítják azok mechanikai- és hőstabilitását, gyártásuk emellett környezetkímélő és költséghatékony [22].

2.3.1. Antioxidánsok rögzítése LDH hordozókon

Az LDH-k rétegei között vagy a részecskék felületén egyaránt rögzíthetők molekulák, azaz ezen rendszerek kiváló hordozóként viselkednek számtalan vegyületcsalád esetében. Az immobilizáció történhet anioncserével, a memória-effektus kihasználásával vagy együttes lecsapással. A rögzíteni kívánt molekulák az LDH rétegei között, vagy – a választott molekula mérete vagy egyéb interkalációt megakadályozó paraméterek miatt – az LDH felületén fognak megkötődni. A rögzítéssel elérhető a hatóanyagok szabályozott felszívódása, emellett kimutatták, hogy az LDH-kon megkötött hatóanyagok aktivitása legtöbbször nem változik, vagy csupán kismértékben csökken le a szabad molekulákéhoz képest. Számos gyulladásgátló, cukorbetegség és szívrendszeri betegségek elleni szer rögzítését vizsgálták, de sor került antibiotikumok (pl.: Cefazolin), antioxidánsok (pl.: fahéjsav), aminosavak (pl.: fenilalanin) és nukleinsavak (pl.: RNS) immobilizációjára is [28].

Antioxidánsok LDH-n való rögzítésével ugyancsak növelhető azok stabilitása. Az alacsony vízzoldhatóságú ellagsavat LDH-n való immobilizációval stabilizálták, így a vegyület megőrizte magas antioxidáns aktivitását. A szerves oldószerrel és polielektrolittal módosított kompozit további stabilitásra tett szert, így alkalmazhatóvá vált olyan területeken (pl.: élelmiszer-, kozmetikai, textilipar), ahol magas koncentrációban jelen lévő szabadgyökök hatástalanítása szükséges [6]. A karnozin és galluszsav felhasználását megnehezíti azok könnyű oxidálhatósága és pH-érzékenysége. Ezek kiküszöbölésére a két antioxidánst Mg/Al-LDH-n rögzítették ioncserével és együttes lecsapással. A rögzítést követően stabilitásuk jelentős mértékben nőtt a szabad molekulákéhoz képest, emellett immobilizálva is kiváló gyökfogó tulajdonsággal rendelkeztek [28, 29]. Az LDH-k biokompatibilitásából adódóan azok felhasználhatók kozmetikai célokra is. A ferulasav szabadgyökfogó képessége mellett véd az ibolyántúli káros sugárzással szemben, így megfelelő adalékanyaga lehet napvédő szereknek. A molekula Mg/Al-LDH-ba való interkalációjával az megtartotta antioxidáns aktivitását, emellett a rögzítés javította UV-sugárzással szemben mutatott tulajdonságait 300 nm körüli hullámhosszon [30].

TA-t tartalmazó LDH-kat szennyezőanyagok megkötése céljából korábban már állítottak elő [31], azonban a molekula antioxidáns aktivitásának megőrzésével kevés tanulmány foglalkozik. Egy kutatócsoportunkban végzett korábbi kutatás során együttes lecsapással és adszorpcióval készítettek LDH/TA kompozitokat: az adszorpcióval

előállított LDH/TA esetén a molekulák az LDH felszínével merőlegesen kötődtek meg, mely fokozott aktivitást eredményezett. A vizsgált kompozit nagyobb aktivitást mutatott, mint a szabad TA molekulák, emellett gyökfogó képességét több használat után is megőrizte jelentős csökkenés nélkül [32].

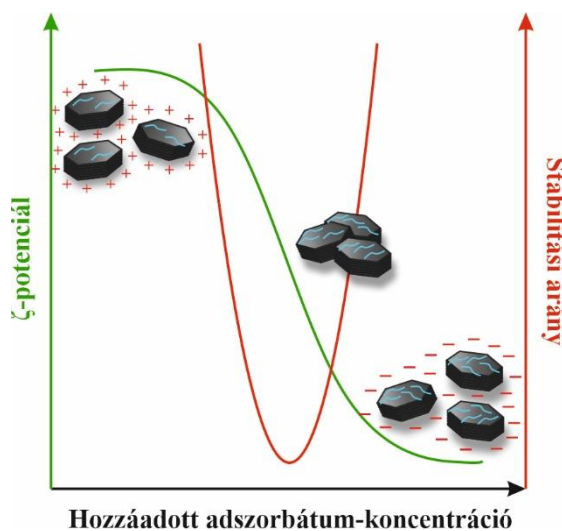
Az LDH-k enzimek immobilizációjára ugyancsak alkalmasak. Nitroreduktáz enzimet együttes lecsapással és adszorpciós módszerrel Mg/Al-LDH-n immobilizálva olyan nanohibridet állítottak elő, mely szilárd formában tárolva hetekig megőrizte aktivitását. A kialakított kompozitot üveges szén elektródra juttatva megállapították, hogy a módosított elektród megfelelő lehet nitrovegyületek kimutatására [33]. A kutináz enzim több poliészter hidrolízisére képes, Mg/Al-LDH-n való rögzítésével pedig jelentős mértékben nőtt hőstabilitása. Az előállított kutináz-LDH hibrid [poli(butilén-szukcinát-ko-adipát)]-ban elosztatva a megfelelő közeg hatására 24 óra alatt képes volt a polimer lebontására, a reakció végén visszamaradt oligomerek és monomerek mellett kémiai úton újrahasznosíthatók voltak. Ezen eredmények új utakat nyithatnak rövid időn belül lebomló polimerek előállítása terén [34]. PPN LDH-n való rögzítésével és annak aktivitásával korábbi tanulmányok nem foglalkoztak, azonban stabilizálásával a molekula olyan területeken is alkalmazhatóvá válna, ahol hőérzékenysége vagy bomlékonysága miatt jelenleg nem használható szabad formában.

2.3.2. LDH-k kolloidstabilitása

Felhasználási területüktől függően fontos szempont az LDH-diszperziók kolloidstabilitásának finomhangolhatósága. A felületi töltéssel rendelkező részecskék oldatbeli stabilitását a DLVO-elmélet írja le, mely négy kutató, Derjaguin, Landau, Verwey és Overbeek nevéhez fűződik. A modell szerint a töltéssel rendelkező, elektrolit oldatba diszpergált részecskék közötti erőviszonyokat a vonzó van der Waals-erők és az elektromos kettősrétegek közötti taszító kölcsönhatások eredője határozza meg. Mivel a van der Waals-erők kis hatótávolságú vonzó kölcsönhatások, melyek adott anyag esetén állandók, az eredő potenciálgörbe alakja a taszító kölcsönhatások függvényében változik. Ha erős taszító kölcsönhatások vannak jelen a részecskék között, az eredő potenciálgörbe maximummal rendelkezik, azaz a részecskék aggregációja energiaigényes folyamat. Ha a potenciálgát nagymértékben meghaladja a hőmozgásból származó energiát, nem történik meg az aggregáció. Az elektrolitkoncentráció növelésével a taszítás mértéke csökkenthető, mely hatására egyre több részecske fog dimereket képezni, mivel a

potenciálját és a hőmozgásból származó energia különbsége is csökken. Ha a potenciálját eltűnik, minden ütközés dimerképződéshez vezet; azt az elektrolitkoncentrációt, melyen ez megtörténik, kritikus koagulációs koncentrációnak nevezzük [35].

Elektrosztatikus kölcsönhatások révén kolloidrészecskék felületén egyéb molekulák vagy ionok adszorbeálódhatnak, melynek mértéke függ a hozzáadott adszorbátum koncentrációjától. Az adszorpció a töltésviszonyok, így a kolloidrészecskék stabilitásának megváltozásával járhat (4. ábra). Alacsony adszorbátum-koncentrációk esetén az oldatban lévő összes molekula vagy ion megkötődik a kolloidrészecskék felületén; a rendszer stabil, nem történik aggregáció. A dózist növelve nő a felületen megkötődött molekulák vagy ionok mennyisége, a részecskék eredeti töltése fokozatosan leárnyékolódik. Izelektromos pontnak (IEP) nevezzük azt a részecskekoncentrációt, melyen megtörténik a töltésviszonyok kiegyenlítődése. Ilyenkor a rendszer destabilizálódik, mivel a kolloidrészecskék közötti vonzóerők dominálnak, azok aggregálódnak. A dózis további növelésével a diszperzió újból stabilizálódik, mivel megtörténik a kolloid-részecskék áttöltése, így az azok közötti taszító kölcsönhatások lépnek előtérbe [35].



4. ábra: LDH-k töltésviszonyainak és kolloidstabilitásának változása erősen adszorbeálódó, ellentétes töltésű részecskék adszorpciója során.

A kolloid rendszer stabilitását a DLVO-erőkön kívül egyéb tényezők is befolyásolhatják. Ezen hatások közé tartoznak a hidrofób kölcsönhatások, a hidratációs hatások, a Born-féle taszítás és az adszorbeált vegyületek egyéb hatásai. Hidrofób kölcsönhatások léphetnek fel olyan részecskék között, melyek hidrofób felülettel

rendelkeznek, ezáltal nem képesek vízmolekulák megkötésére. A részecskék között ebben az esetben vonzás alakul ki, mivel a közöttük elhelyezkedő vízmolekulák kiszorulnak a többi vízmolekula irányába, ez pedig a részecskék koagulációjához vezethet. Ezzel szemben a felületen megtalálható ionos és hidrofíl csoportok, illetve az ellenionok hidratációja megnövelheti a részecskék közötti taszítóerők mértékét, ezzel stabilizálva a diszperziót. Egyéb molekulák felületen történő adszorpciója ugyancsak stabilizálhatja a kolloidot, mivel sztérikus és elektrosztatikus hatásokkal növelhetik a részecskék közötti taszítóerők mértékét. Az említett sztérikus gátlások nagyobb molekulák adszorpciója esetén, magas felületi borítottságnál léphetnek fel [36].

3. Célkitűzés

Kutatásunk során TA és PPN LDH-n való rögzítésével a molekulák stabilizálását, és egy kettős hatású LDH/TA/PPN nanokompozit előállítását tűztük ki célul. A biomolekulák rögzítésével célunk volt azok gyökfogó és fehérjebontó tulajdonságának megőrzése, emellett egy olyan kettős hatású rendszer kifejlesztése, mely felhasználhatóvá válik olyan területeken (kozmetikai és élelmiszeripar), ahol a két vegyületcsalád együttes alkalmazása előnyökkel járhat.

Első lépésként Mg/Al-LDH-k együttes lecsapással való előállítását tűztük ki célul, a termék LDH-szerkezetét porröntgen diffraktometriás mérésekkel kívántuk igazolni. A két biomolekula LDH-n való rögzítése érdekében egy ideális TA- és PPN-dózis meghatározása volt a cél, ennek elvégzéséhez dinamikus fényszórás és elektroforetikus mobilitás méréseket terveztünk. Egy megfelelő összetétel kiválasztását követően az LDH-k felületén a TA megkötése után a PPN rögzítése volt célunk. A rögzítéssel a két molekula stabilitásnak növelését és kombinált használatuk megkönnyítését terveztük. A két vegyület adszorpcióját követően az immobilizáció sikerességét UV-Vis-alapú fehérjemeghatározási teszt végrehajtásával és Raman-spektroszkópiás felvételek készítésével kívántuk bizonyítani. A kompozit morfológiájának vizsgálata céljából transzmissziós elektronmikroszkópos felvételek készítését terveztük.

A rögzítés sikerességének feltérképezése után az antioxidáns és proteáz aktivitások meghatározására alkalmas tesztek (DPPH-teszt és proteáz-teszt) elvégzését terveztük a két biomolekula, azok keveréke, illetve az LDH/TA/PPN nanokompozit esetén. A nanokompozit hőstabilitásának vizsgálata érdekében a teszteket 50°C-on való hőkezelést követően is elvégeztük, mivel a szabad molekulákéhoz képest nagyobb (hő)stabilitás kialakítása volt a cél. A hőkezelés hatására bekövetkező esetleges összetételi változásokat ugyancsak Bradford-teszttel kívántuk meghatározni.

4. Kísérleti eszközök és módszerek

4.1. Felhasznált eszközök

- WTW inoLab® pH 7310 pH-mérő
- Ultrahangos kád (VWR USC-TH)
- Thermo Scientific Genesys 10S UV/látható spektrofotométer
- VWR V-1200 spektrofotométer
- Anton Paar Litesizer 500
- Ortoalresa Unicen 21 centrifuga
- Thermo Fisher Scientific mySPIN 12 minicentrifuga
- Velp Scientifica Arex fűthető mágneses keverő
- Tecnai G2 Transzmissziós elektronmikroszkóp
- Bruker Senterra II Raman

4.2. Felhasznált anyagok

- kristályvizes magnézium-nitrát, $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2 \times 6 \text{H}_2\text{O}$
- kristályvizes alumínium-nitrát, $\text{Al}(\text{NO}_3)_3 \times 9 \text{H}_2\text{O}$
- nátrium-hidroxid, NaOH, (4 M oldat)
- tannin, $\text{C}_{76}\text{H}_{52}\text{O}_{46}$
- papain
- etanol, $\text{C}_2\text{H}_5\text{OH}$ (95%-os oldat)
- 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil, $(\text{C}_6\text{H}_5)_2\text{NN}[\text{C}_6\text{H}_2(\text{NO}_2)_3]_2$
- kazein
- L-tirozin
- triklórecetsav, CCl_3COOH
- kristályvíz mentes nátrium-karbonát, Na_2CO_3
- Folin-Ciocalteu-reagens (2 M oldat)
- kristályvizes dikálium-hidrogén-foszfát, $\text{K}_2\text{HPO}_4 \times 3 \text{H}_2\text{O}$
- kristályvizes nátrium-acetát, $\text{CH}_3\text{COONa} \times 3 \text{H}_2\text{O}$
- kalcium-acetát, $(\text{CH}_3\text{COO})_2\text{Ca}$
- Coomassie® Brilliant Blue G-250
- ortofoszforsav, H_3PO_4 (85%-os oldat)

A szükséges anyagokat a VWR International-tól és a Sigma Aldrich-tól szereztük be analitikai tisztaságban. Kísérleteink során fordított ozmózissal ionmentesített vizet (Adrona B30 víztisztító rendszer) használtunk.

4.3. Szintézisek

4.3.1. Mg/Al réteges kettős hidroxidok előállítása

Az alkalmazott Mg/Al LDH-kat együttes lecsapással állítottuk elő. Első lépésként készítettünk egy, a $\text{Mg}(\text{NO}_3)_2$ -ra nézve 0,2 M-os, az $\text{Al}(\text{NO}_3)_3$ -ra nézve 0,1 M-os törzsoldatot. A fém sók oldatához állandó kevertetés mellett, N_2 -atmoszféra alatt a $\text{pH}=10$ érték eléréséhez szükséges mennyiségű 4 M-os NaOH-oldatot adtunk. A mintát egy órányi kevertetés után 10 percig 4200 rpm-en centrifugáltuk, ezután ioncserélt vízzel háromszor mostuk (10 perc, 4200 rpm). Reszuszpendálás után az LDH-diszperziót autoklávba öntöttük, egy éjszakára 120°C -ra állított szárítószekrénybe helyeztük, majd az előzőekhez hasonlóan centrifugáltuk és ioncserélt vízzel háromszor mostuk. Az így kapott LDH-t 50°C -os szárítószekrényben kiszárítottuk.

4.3.2. Dinamikus fényszórásméréshez szükséges oldatok

A TA-dózisfüggő stabilitásmérések elvégzéséhez az LDH-ből 100 mg/L koncentrációjú diszperziót készítettünk pH 6-os szűrt vízzel. A mérések során a vizsgált mintákban az LDH koncentrációját (10 mg/L) és az ionerősséget (1 mM NaCl-oldat) állandó értéken tartva fokozatosan növeltük a TA-koncentrációt 0-1000 mg/g tartományon belül. Az össztérfogat minden esetben 2 mL volt.

A PPN-dózisfüggő stabilitásmérésekhez olyan diszperziókat állítottunk elő, melyek 10 mg/L LDH-t, 200 mg/g TA-t, 1 mM NaCl-t és 0-1000 mg/g tartományban változó mennyiségű PPN-t tartalmaztak. A teljes adszorpció elérése érdekében az LDH-t 1 éjszakán át állni hagytuk mind a TA, mind a PPN hozzáadása után.

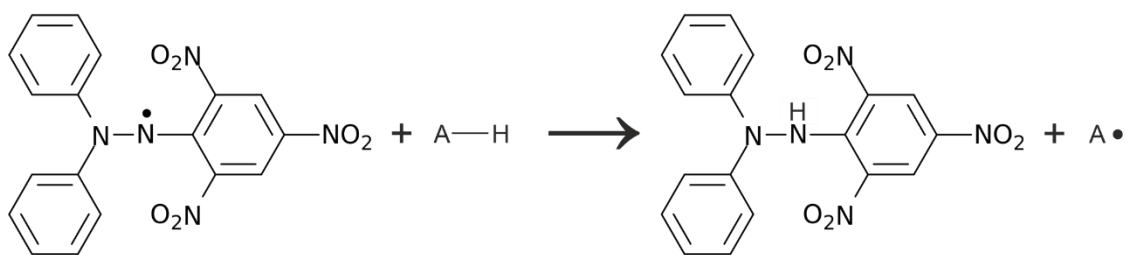
4.3.3. Elektroforetikus mobilitás méréshez szükséges oldatok

A mobilitás mérésekhez az előző pontban részletezett törzsoldatokat használtuk. A TA-dózisfüggő mérések esetén a TA hozzáadása után a mintákat egy éjszakán át állni hagytuk a teljes adszorpció lejátszódása érdekében. A PPN-dózisfüggő mérésekhez szükséges

Az oldatbeli TA- és PPN-koncentráció meghatározásához LDH/TA és LDH/TA/PPN kompozitokat állítottunk elő, melyekben a TA és PPN koncentrációja 200-200 mg/L volt, ennek megfelelően 1000 mg/L LDH-t tartalmaztak. A méréshez használt LDH/TA és LDH/TA/PPN törzsoldatokat 5 percig 5000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszóból 0,4 mL-t adtunk az 1,6 mL CBB-oldathoz, majd 5 perc elteltével felvettük az oldatok spektrumát 400-800 nm intervallumon.

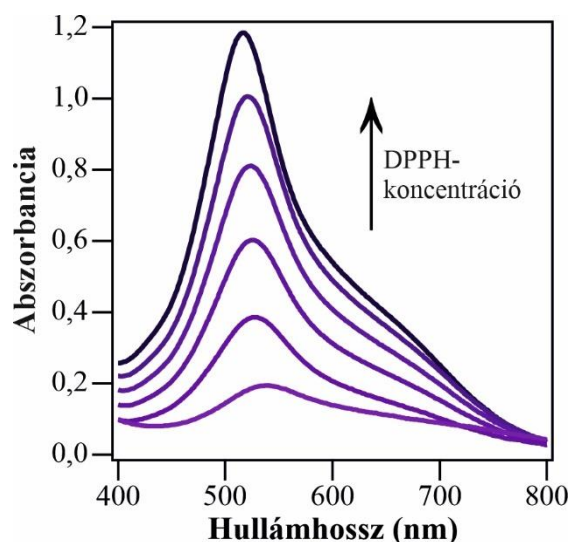
4.3.5. DPPH-teszt

A DPPH-teszt egy antioxidáns aktivitás mérésére alkalmas módszer, mely során egy viszonylag stabil nitrogéngyök, a 2,2-difenil-1-pikrilhidrazil (DPPH) redukálódik az antioxidáns molekulák hatására. A reakció során 2,2-difenil-1-pikrilhidrazin keletkezik, míg a TA-molekulák deprotonálódnak (6.ábra).



6. ábra: DPPH redukciója antioxidáns (A) hatására.

Gyök formájában a DPPH-nak 515 nm hullámhosszon van fényelnyelési maximuma (7. ábra), etanolban oldva sötétlila oldatot képez. A redukció hatására az oldat fokozatosan besárgul, az elnyelés mértéke lassan lecsökken. Az 515 nm-en mért abszorbancia értékek segítségével meghatározható a hatásos koncentráció (EC_{50}), mely azt az antioxidáns koncentrációt jelenti, ami az oldatban lévő gyökök mennyiségét a felére képes csökkenteni [39].



7. ábra: A DPPH-oldat fényelnyelési spektruma 400 és 800 nm között (a nyíl a DPPH-koncentráció növekedését jelöli).

A teszthez 48 mg/L koncentrációjú DPPH-oldatot készítettünk, oldószerként EtOH-t használtunk. A tesztet elvégeztük TA-nal, TA-PPN keverékkel és LDH/TA/PPN kompozittal. A szükséges LDH/TA/PPN kompozitból készített diszperzió 500 mg/L LDH-t, 100 mg/L TA-t és 100 mg/L PPN-t tartalmazott. A mérések során a küvetákban lévő 1500 μ L DPPH-oldatot 3000 μ L-re egészítettük ki a vizsgált oldattal és szűrt vízzel, az antioxidáns koncentrációjának fokozatos növelésével. 517 nm-en követtük az abszorbancia változását addig, míg az beállt egy állandó értékre, azaz a gyök és az antioxidáns között már nem játszódott le reakció: a mérési idő minden esetben 30 percrek adódott. A 30 perc letelte után mért abszorbancia értékek (A) és az antioxidánst nem tartalmazó DPPH-oldat abszorbanciája (A_0) hányadosaként az oldatban maradt redukálatlan DPPH mennyisége megadható, mely segítségével az EC_{50} értékek kiszámíthatók.

$$\text{DPPH (\%)} = \frac{A}{A_0} \times 100 \quad (1)$$

4.3.6. Proteáz aktivitás vizsgálata

Proteáz enzimek aktivitásának vizsgálatára változatos tesztek alkalmazhatók. Munkánk során a PPN proteáz aktivitásának vizsgálatára a Lowry-módszert alkalmaztuk, mely szubsztrátként kazeint használ, amit a proteáz a teszt során hidrolizál [40]. Bomlás közben kisebb peptidek és aminosavak keletkeznek, köztük tirozin is, amellyel a Folin-Ciocalteu-reagens (F-C-reagens) kék színű komplexet képez. A képződő komplex fényelnyelését

660 nm-en vizsgálva, az ezen hullámhosszon mért abszorbancia értékek és egy kalibrációs görbe alapján meghatározható az enzim proteáz aktivitásának mértéke.

A kalibrációs görbe felvételéhez ismert koncentrációjú (1,1 mM) tirozin oldatot készítettünk, ennek különböző térfogatait reagáltattunk a F-C-reagenssel. A küvettákban lévő tirozin anyagmennyiségét 6-70 μM koncentrációtartományban változtattuk. A mintákat 30 percig 37°C-on inkubáltuk, 10 percig 10000 rpm-en centrifugáltuk, majd a 660 nm-en feljegyzett abszorbancia értékekre egyenest illesztettünk. A kalibrációs görbe segítségével ekvivalens felszabadult tirozin anyagmennyiség számolható, melyek alapján megadható a proteáz aktivitása U/mL egységekben. A méréseket elvégeztük PPN-nal, TA-PPN keverékkel és LDH/TA/PPN kompozittal. A teszt során vizsgált törzsoldatok minden esetben 250 mg/L PPN-t, és a korábban kiválasztott arányoknak megfelelő mennyiségű TA-t és LDH-t tartalmaztak.

A kazein-oldatot, az LDH- és a PPN-törzsoldatot 50 mM-os, pH=7,5-es foszfát pufferben készítettük el, míg a TA-t pH=7,5-es acetát pufferben (10 mM Na-acetát és 5 mM Ca-acetát) oldottuk. Az egységes mennyiségű (0,5 mL) kazein-oldatokat növekvő koncentrációjú PPN-t tartalmazó oldattal (0 - 0,1 mL) reagáltattuk, majd 20 percig állni hagytuk. A reakciót 0,5 mL 110 mM-os triklórecetsav-oldattal állítottuk le, majd az egységes térfogat (1,1 mL) elérése érdekében megfelelő mennyiségű szűrt vizet adtunk a mintákhoz. A mintákat 30 percig 37°C-on inkubáltuk, majd 10 percig 10000 rpm-en centrifugáltuk. A felülúszókból azonos térfogatokat (0,3 mL) kimérve azokat 0,75 mL 500 mM-os Na_2CO_3 -oldattal és 0,1 mL 0,5 M-os F-C-reagenssel elegyítettük, a lépés során a korábban felszabadult tirozin a F-C-reagenssel kék színű komplexet képzett. Az oldatokat ismét 30 percig 37°C-on inkubáltuk, majd 10 percig 10000 rpm-en centrifugáltuk. A lecentrifugált oldatok abszorbanciáját 660 nm-en, spektrofotométerrel vizsgáltuk.

A mérések során feljegyzett abszorbancia értékek és a kalibrációs görbe egyenlete alapján ekvivalens tirozinkoncentrációt számítottunk, melyből megadható a F-C-reagenssel komplexet alkotó tirozin anyagmennyisége. A vizsgált rendszer aktivitását U/mL egységekben adtuk meg az alábbi egyenlet segítségével:

$$\text{Aktivitás} \left(\frac{\text{U}}{\text{mL}} \right) = \frac{n_{\text{tir,ekv}} \times V_{\text{reakció}}}{t_{\text{reakció}} \times V_{\text{PPN}} \times V_{\text{fotométer}}} \quad (2)$$

ahol $n_{\text{tir,ekv}}$ a kiszámított ekvivalens tirozin anyagmennyiség, $V_{\text{reakció}}$ a reakcióelegy össztérfogata (1,15 mL), $t_{\text{reakció}}$ a kazein bomlásakor eltelt idő (20 perc), V_{PPN} a kazein oldathoz hozzáadott PPN-t tartalmazó oldat térfogata (0 – 0,1 mL) és $V_{\text{fotométer}}$ az

abszorbancia mérésekor használt oldat térfogata (1 mL). Egy egységnyi proteáz-aktivitás annak az enzim anyagmennyiségnek felelt meg, mely 1 µg/mL mennyiségű tirozin felszabadításához szükséges 1 perc alatt.

4.3.7. Hőkezelés

A hőstabilitás változásának vizsgálatához az adott mintákat 2 órán keresztül 50°C-on inkubáltuk, majd a mérések végzése előtt azokat hagytuk visszahűlni szobahőmérsékletre.

4.4. Kísérleti és vizsgálati módszerek

4.4.1. Porrtöntgen diffraktometria

Az LDH-ról készített diffraktogramok felvételéhez egy Philips típusú porrtöntgen diffraktométert (PXRD) használtunk. A méréseket 0,1542 nm hullámhosszúságú CuKα sugárzás alkalmazásával, $2\theta = 5-80^\circ$ tartományban végeztük.

4.4.2. Dinamikus fényszórás- és elektroforetikus mobilitás mérések

A dinamikus fényszórás- (DLS) és elektroforetikus mobilitás (EM) méréseket egy Anton Paar Litesizer 500 típusú dinamikus fényszórásmérő berendezéssel végeztük. A műszer fényforrása egy 40 mW-os, 638 nm hullámhosszúságú félvezető lézer; a szórt fény detektálása mindkét típusú mérés esetén 175° -nál történt. A hidrodinamikai sugár a Stokes-Einstein egyenlet alapján meghatározható [41]:

$$R_h = \frac{k_B \times T}{6 \times \pi \times \eta \times D} \quad (3)$$

ahol R_h a hidrodinamikai sugár, k_B a Boltzmann állandó, T a hőmérséklet, η a közeg viszkozitása.

A DLS mérések eredményeiből meghatározott stabilitási arányok (W) az alábbi módon számíthatók [42]:

$$W = \frac{\left. \frac{1}{R_h(0)} \frac{dR_h(t)}{dt} \right|_{t \rightarrow 0 \text{ (gyors)}}}{\left. \frac{1}{R_h(0)} \frac{dR_h(t)}{dt} \right|_{t \rightarrow 0}} \quad (4)$$

ahol R_h a hidrodinamikai sugár és t az idő. A számlálóban található gyors aggregációt jellemző függvény 1 M NaCl-koncentráció mellett határozható meg. Ebben az esetben minden ütközés dimerek képződését okozza, az aggregáció gyors ($W = 1$). A kisebb NaCl-koncentráció esetén mért értékeket ezen értékhez viszonyítjuk: minél lassabb az aggregáció, azaz minél stabilabb a rendszer, annál nagyobb lesz W értéke.

A ζ -potenciálok a Smoluchowski-egyenlet [35] alapján, a műszer által mért EM értékekből lettek meghatározva:

$$\zeta = \frac{u \times \eta}{\epsilon_0 \times \epsilon} \quad (5)$$

ahol u az elektroforetikus mobilitás, η a közeg viszkozitása, ϵ_0 a vákuum dielektromos állandója és ϵ a közeg dielektromos állandója.

4.4.3. UV-látható spektrofotométer

A DPPH-tesztek és a Bradford-tesztek végzéséhez Thermo Scientific Genesys 10S típusú, a proteáz-tesztek elvégzéséhez VWR V-1200 típusú spektrofotométert használtunk. A méréseket a DPPH-teszt esetén 517 nm-en, a proteáz-teszt során 660 nm-en, míg a Bradford-tesztet 400-800 nm-es hullámhossz tartományon végeztük.

4.4.4. Raman-spektroszkópia

A Raman spektrumokat egy Bruker Senterra II Raman mikroszkóppal rögzítettük. A mérések során 785 nm hullámhosszú, 50 mW teljesítményű lézert használtunk. A végső spektrumokat 32, 4 s expozíciós idővel rögzített spektrum átlagából kaptuk. A felvételek kiértékelését, a csúcsok felbontását az Origin szoftver segítségével végeztük.

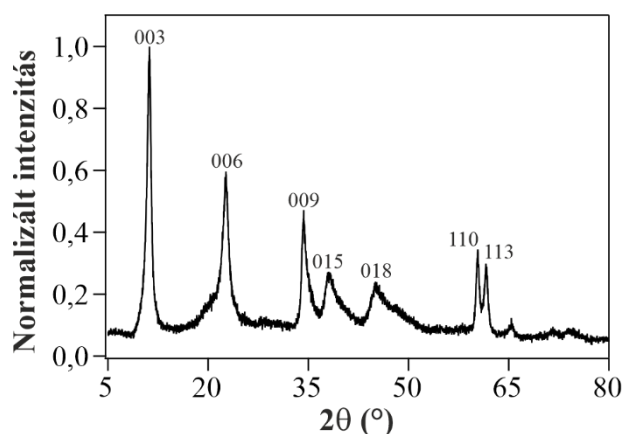
4.4.5. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A részecskék méretének és morfológiájának vizsgálatát transzmissziós elektronmikroszkópiával végeztük. A TEM-felvételek egy Tecnai G2 típusú műszerrel készültek, wolfram katód és 120 kV gyorsítófeszültség alkalmazásával.

5. Eredmények és értékelésük

5.1. Mg/Al-LDH szerkezetének vizsgálata

Az együttes lecsapással előállított LDH szerkezetének vizsgálatához porröntgen diffraktometriás (PXRD) méréseket végeztünk, melyekkel az LDH kristályszerkezetéről kaptunk információkat. Általánosságban elmondható, hogy az általunk előállított termékek a Mg/Al-LDH lamellás szerkezetének megfelelő tulajdonságokkal rendelkeztek, a várt szerkezetnek megfelelő diffraktogramot kaptunk (8.ábra) [43].



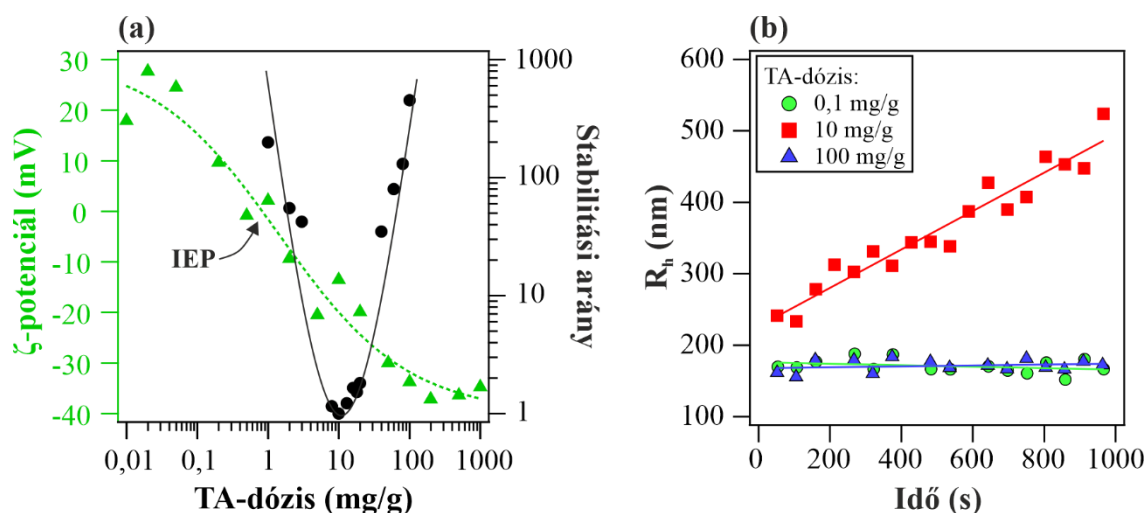
8. ábra: Mg/Al-LDH diffraktogramja.

5.2. Ideális TA- és PPN-dózis meghatározása

Első lépésként egy stabil LDH/TA rendszer létrehozásához szükséges TA-dózis meghatározása volt a cél, melyhez dózisfüggő DLS- és EM-méréseket végeztünk. A mérések során az elkészített LDH diszperzióhoz növekvő koncentrációban TA-oldatot adagoltunk és vizsgáltuk a ζ -potenciálok és a stabilitási arányok változását (9.a ábra).

Alacsony TA-dózisoknál a részecske töltése nem változik jelentősen, azonban 0,1 mg/g koncentrációnál a töltés fokozatosan csökkenni kezdett. A dózist tovább emelve 1 mg/g TA-koncentráció mellett a részecskék semleges töltésűek lettek, a ζ -potenciál eléri a 0 mV-ot. Ezt a TA-dózist, melyen a részecskék töltését leárnyékolja az adszorbeálódott molekulák töltése, izoelektromos pontnak (IEP) nevezzük. A TA-koncentráció fokozatos növelésével további csökkenést észleltünk a részecskék töltésében, a TA-molekulák adszorpciójával a részecskék áttöltődését értük el. Egy bizonyos dózist meghaladva a töltés beáll egy állandó, negatív értékre ($\sim$ 35 mV). Ezt a szakaszt adszorpciós telítési platónak (ASP) nevezzük, mely során a részecskék teljes felülete TA-molekulákkal

borított és a feleslegben hozzáadott adszorbeátum oldatban marad. Elmondható tehát, hogy az eredetileg pozitív töltésű LDH-részecskék a TA-molekulák adszorpciójának következtében áttöltődtek, és már 100 mg/g-os dózistól egy stabil negatív töltésű rendszer alakult ki.



9. ábra: LDH diszperzió különböző TA-dózisok mellett mért ζ -potenciál értékei és stabilitási arányai (a) és a hidrodinamikai sugár (R_h) változása az idő függvényében különböző TA-dózisok hatására (b). A méréseket pH = 6, 1 mM ionerősség és 10 mg/L LDH-koncentráció mellett végeztük (az ábrán szereplő TA-dózis (mg/g) az oldatban lévő LDH-mennyiséghez viszonyított érték).

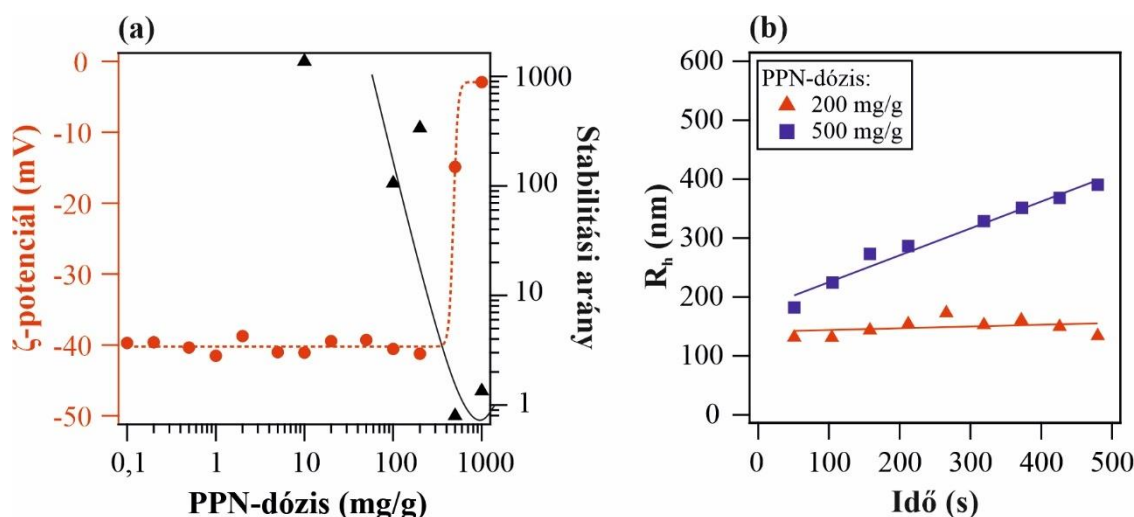
A stabilitási arányok a részecskék töltésének változásával, a DLVO-elmélettel és egyéb nem-DLVO-erők megjelenésével magyarázhatók. Alacsony TA-dózisok esetén (0,1 mg/g) a rendszer stabil, a hidrodinamikai sugár időben nem változik, mivel a részecskék között a taszító elektrosztatikus kölcsönhatások dominálnak (9.b ábra). Ebben az esetben a részecskék felületét még olyan mennyiségű TA borítja, hogy az nem elegendő a részecskék töltésének leárnnyékolásához, a részecskék pozitív töltésűek. A pozitív töltésű részecskék között az elektrosztatikus taszító erők dominálnak, így a rendszer stabil, aggregáció nem következik be, a stabilitási arány nagy (9.a ábra). A TA-koncentráció emelésével elérjük az IEP-et, ahol a részecskék eredeti pozitív töltése az ellentétes töltésű biomolekulák adszorpciója miatt semlegesítődik, tehát a DLVO-elmélet szerint a részecskék aggregációját várnánk. Ekkor azonban a rendszer a várttól eltérően nagy stabilitással rendelkezett, a hidrodinamikai sugár nem változott jelentősen időben. Ez a nem-DLVO-erőkkel magyarázható. A nagy méretű TA adszorpciójának következtében a részecskék között szterikus hatás lép fel, mely a koloid rendszer stabilizálódását, nagy stabilitási arányt eredményez. A részecskék közeledésekor az adszorbeálódott TA-

molekulák hatására megnő a részecskék közötti térben az ozmózisnyomás, mely a részecskék közötti taszítás megnövekedését eredményezi [36]. Emiatt a részecskék semleges töltésének ellenére is a rendszer stabil, aggregáció nem következik be. A dózis további növelésével (10 mg/g) részecskék töltése átvált negatívba, azonban a negatív töltés mértéke nem elegendő a rendszer stabilizálásához, a részecskék között a vonzó van der Waals-erők dominálnak. Ilyen esetben egyre több ütközés vezet aggregátumok kialakulásához, a hidrodinamikai sugár jelentős mértékben növekszik az idő függvényében, azaz a rendszer stabilitása lecsökken ($W \sim 1$). A TA-dózist tovább emelve (100 mg/g) bekövetkezik a részecskék áttöltése, melynek következtében újra a taszító kölcsönhatások kerülnek előtérbe, a hidrodinamikai sugár nem változik, a részecskék stabil rendszert alkotnak, aggregáció nem következik be. Összefoglalva, az LDH-részecskék TA-molekulákkal való funkcionálizálása egyezést és eltérést is mutat a DLVO-elmélettől, megjelennek a nem-DLVO-erők is. A DLVO elmélettel jó egyezést mutató U-alakú görbe megjelenik, azonban a nagyobb TA dózisok irányába eltolódva, ami a sztérikus stabilizáló hatás következménye.

A fenti mérések alapján megállapítottuk, hogy 100 mg/g felett egy nagy kolloidstabilitással bíró, negatív töltésű LDH/TA rendszert kapunk. A TA-dózis növelésével a ζ -potenciál és stabilitási arány értékek nem változnak jelentősen, így a PPN adszorpciójához a teljes borítottság elérése céljából a további méréseket 200 mg/g-os TA-dózis mellett végeztük.

A PPN LDH/TA felületen végbemenő adszorpcióját dóziszfüggő ζ -potenciál és DLS mérésekkel követtük. A mérések során az előre elkészített LDH/TA diszperziókhoz – a TA adszorpciójához hasonlóan – növekvő koncentrációban PPN-t adagoltunk és vizsgáltuk a ζ -potenciálok és a hidrodinamikai sugarak változását. A különböző PPN-dózisos esetén mért ζ -potenciál értékek és a stabilitási arányok változását a 10.a ábra szemlélteti.

A PPN esetén a TA-tól eltérő módon viszonylag magas dózsig (200 mg/g) nem történik változás a rendszer töltésében (10.a ábra), majd a töltés 500 mg/g dózisonál hirtelen növekedésnek indult. A PPN-koncentráció további növelésével a molekulák árnyékoló hatása egyre jelentősebbé válik, mely hatására a ζ -potenciál növekedni kezdett. A részecskék teljes áttöltődését 1000 mg/g dózisonál sem értük el, a ζ -potenciál ~ 0 mV, tehát a legnagyobb alkalmazott dózis esetén értük el a rendszer izoelektromos pontját.



10. ábra: LDH diszperzió különböző PPN-dózisok mellett mért ζ -potenciál értékei és stabilitási arányai (a) és a hidrodinamikai sugár (R_h) változása az idő függvényében különböző PPN-dózisok hatására (b). A méréseket pH = 6, 1 mM ionerősség és 10 mg/L LDH-koncentráció mellett végeztük (az ábrán szereplő PPN-dózis (mg/g) az oldatban lévő LDH-mennyiséghez viszonyított érték).

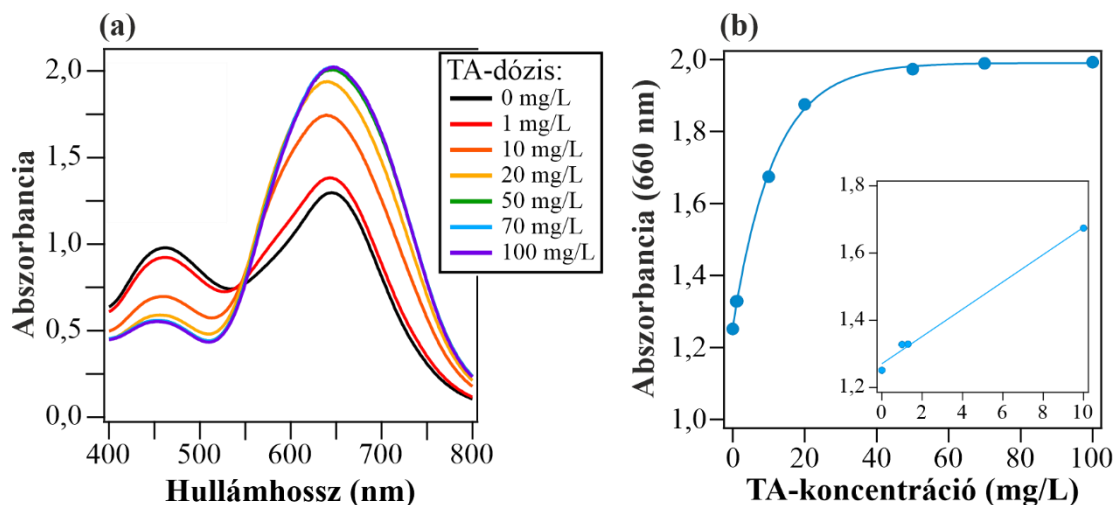
A DLS mérések eredményei a töltésviszonyok változásának megfeleltek; 200 mg/g-os dózis esetén a hidrodinamikai sugár az idő függvényében állandó, mivel a részecskék közötti taszító kölcsönhatások dominálnak, a rendszer stabil. Azonban nagyobb dózisok esetén (500 mg/g) a hidrodinamikai sugár az idő függvényében jelentős növekedést mutat, mivel a PPN adszorpciója következtében – ezáltal a részecskék semlegesítődése miatt – a van der Waals-erők kezdenek dominálni, a részecskék aggregálódnak (10.b ábra). Az aggregációs sebességi együtthatókból számított stabilitási arányok a DLVO-elméletnek megfelelő U-alakú görbét rajzolják ki, mely ugyanezt a tendenciát mutatja be. Kisebb dózisoknál (200 mg/g) a stabilitási arány magas, nem történik aggregáció, a hidrodinamikai sugár időben állandó. A dózis növelésével megkezdődik a stabilitási arányok csökkenése. Nagyobb dózisok esetén (500 mg/g) a stabilitási arány hirtelen 1 körüli értékre csökken, a rendszer destabilizálódik, mivel az IEP közelében a részecskék semlegesítődnek, a hidrodinamikai sugár gyorsan növekszik az idő függvényében.

A mérések alapján kijelenthető, hogy 200 mg/g-os PPN-dózis esetén egy még negatív töltéssel rendelkező, stabil LDH/TA/PPN kolloid diszperzió állítható elő, így PPN esetén is a 200 mg/g dózist választottuk. A továbbiakban előállított LDH/TA/PPN kompozitok LDH-ra nézve minden esetben 200-200 mg/g TA-t és PPN-t tartalmaztak.

5.3. Oldatbeli TA- és PPN-koncentráció meghatározása

Az immobilizációt követően célunk volt annak sikerességének bizonyítása, azaz az oldatban maradt szabad TA- és PPN-koncentráció meghatározása. Ez Bradford-tesztel kivitelezhető, mely egy fehérjekoncentráció meghatározására alkalmas, színváltozáson alapuló kísérleti módszer. A mérés során a CBB az adott enzimmel kék színű komplexet képez, a folyamat az elnyelési spektrum eltolódásával kiválóan nyomon követhető: a festék elnyelési maximuma kezdetben 465 nm-en található, mely a növekvő enzimkoncentrációval lassan eltűnik, míg az új, komplexre jellemző elnyelési maximum 595 nm hullámhossznál jelenik meg. A teszt fő reagense, a CBB festékanyag enzimeken kívül egyéb vegyületcsaládokkal, így hidrolizálható tanninokkal is komplexet képez, azaz jelen esetben TA-koncentráció kimutatására is alkalmas [37, 38].

Első lépésként a CBB-oldathoz különböző koncentrációkban (0-100 mg/L) TA-oldatot adtunk, majd a reakció lejátszódását (5 perc) követően felvettük az oldatok elnyelési spektrumát 400 és 800 nm között (11.a ábra). Az oldatok 660 nm-en felvett abszorbancia értékei alapján kalibrációs görbét szerkesztettünk (11.b ábra).

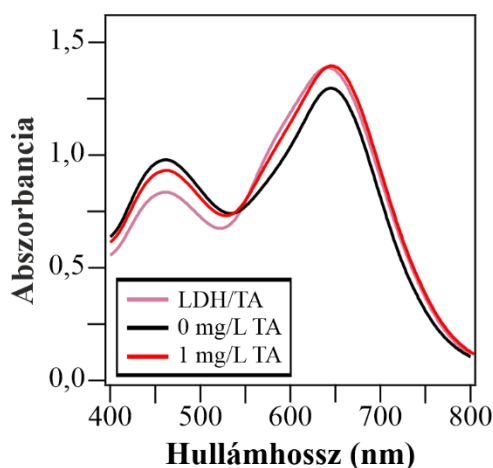


11. ábra: A CBB fényelnyelési spektrumának eltolódása a hozzáadott TA-koncentráció függvényében (a), és a 660 nm-en mért abszorbancia értékek alapján készített kalibrációs görbe (b). A (b) ábrán a jobb alsó sarokba beszúrt grafikon a lineáris szakaszt ábrázolja.

A TA-koncentráció növelésével a 11.a ábrán látható módon a 465 nm-en látható csúcs fokozatosan eltűnt, míg 595 nm-en a komplexképződés hatására az abszorbancia értéke nőtt. Mivel a módszer szempontjából a vizsgált vegyület, annak koncentrációja, a pH, az esetlegesen használt puffer anyagi minősége és dózisa mind befolyásoló tényezők, ezek függvényében a teszt 595 nm-től eltérő fényelnyelési maximumokat produkálhat.

Esetünkben a TA-t tartalmazó oldat abszorpciós maximuma 660 nm hullámhosszon található, míg a festék irodalmi elnyelési maximuma 595 nm-en egy vállként jelenik meg. Ha a 660 nm-en mért abszorbancia értékeket a TA-koncentráció függvényében ábrázoljuk, a kapott kalibrációs görbe telítési jellegű, mivel vegyülettől függően az abszorbancia-változás koncentráció-függése már alacsony dózisoknál is eltérhet a lineáristól [38]. Az abszorbancia változása 0 – 10 mg/L tartományban lineáris.

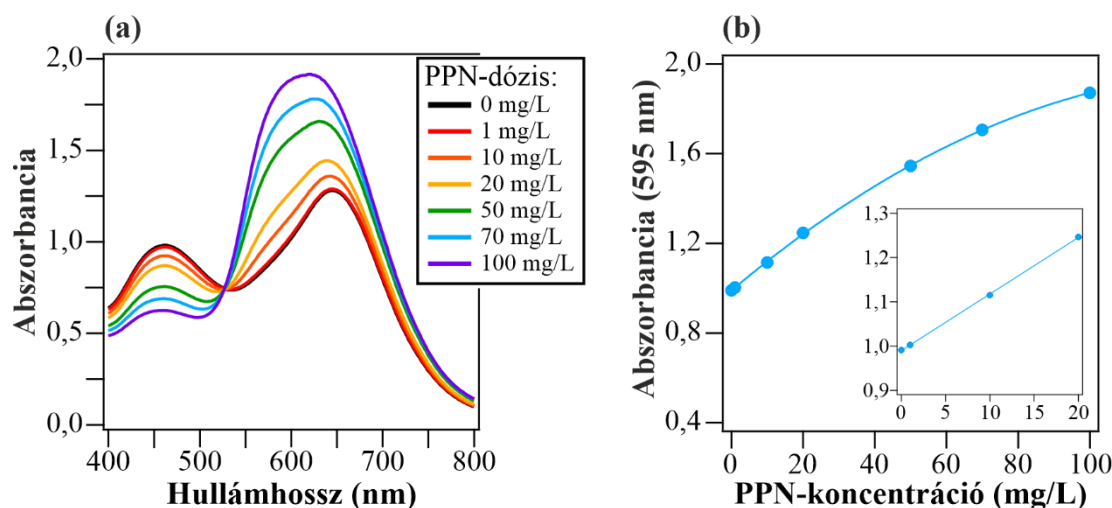
A TA sikeres rögzítésének bizonyítása céljából a mérést elvégeztük LDH/TA diszperzió is. A minta centrifugálása után (5 perc, 5000 rpm) a mérést a felülúszóval hajtottuk végre, ugyanis a TA sikeres rögzítése esetén ezen fázis nem tartalmazhat szabad TA-molekulákat, tehát azok nem tudnak a CBB-vel reakcióba lépve komplexet képezni. A mérés során a küvettában lévő TA-koncentráció 40 mg/L volt, mivel sikertelen adszorpció esetén ezen a koncentráción már egyértelmű eltolódást tapasztaltunk volna a TA-oldatok esetén felvett elnyelési spektrumoktól. Az LDH/TA felülúszójára felvett spektrumot a 12. ábrán szemléltettük.



12. ábra: Az LDH/TA felülúszójára felvett spektrum összehasonlítása a 0 és 1 mg/L koncentrációkon mért spektrumokkal.

A kalibrációs görbék alapján kiszámítható és a 12. ábrán egyaránt látható, hogy az LDH/TA rendszer és az 1 mg/L-es TA-koncentráció esetén felvett spektrum gyakorlatilag átfed egymással, azaz az eredményeket összevetve az összes TA-mennyiség legfeljebb 5%-a van jelen szabad formában az oldatban. Ennek alapján megállapítható, hogy az LDH-hoz hozzáadott TA-mennyiség legalább 95%-a sikeresen adszorbeálódott az LDH felületén, és az oldatban megtalálható, nem adszorbeálódott TA koncentrációja kísérleti hibán belül van.

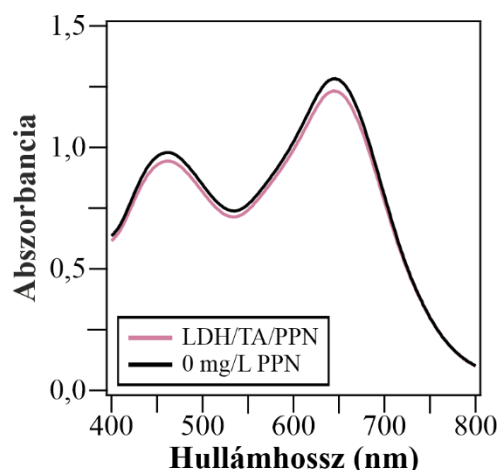
Ezen méréseket megismételtük az oldatbeli PPN-koncentráció meghatározására is a TA esetében ismertetett módon. A CBB-oldathoz növekvő koncentrációban (0-100 mg/L) PPN-t adtunk, majd a reakció lejátszódását követően (5 perc) felvettük az oldatok elnyelési spektrumát 400 és 800 nm között (13.a ábra).



13. ábra: A CBB fényelnyelési spektrumának eltolódása a hozzáadott PPN-koncentráció függvényében (a), és az 595 nm-en mért abszorbancia értékek alapján készített kalibrációs görbe (b). A (b) ábrán a jobb alsó sarokba beszúrt grafikon a lineáris szakaszt ábrázolja.

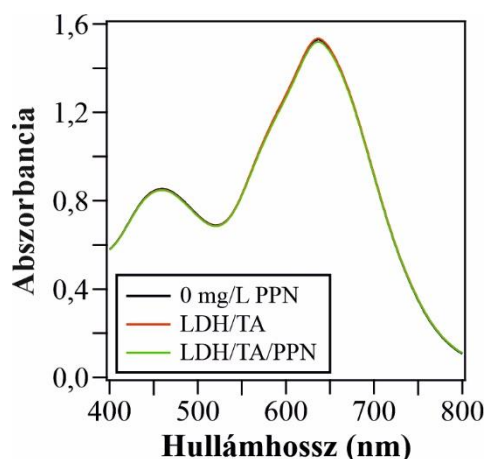
A PPN-koncentráció növelésével a 465 nm környékén látható csúcs fokozatosan csökkent, míg 595 nm környékén ebben az esetben is az abszorbancia növekedését tapasztaltuk. Az 595 nm-en mért abszorbancia értékeket a PPN-koncentráció függvényében ábrázolva 0 – 20 mg/L koncentrációtartományban lineáris összefüggést tapasztaltunk (13.b ábra).

Az LDH/TA/PPN diszperziót a reakció előtt 5 percig 5000 rpm-en centrifugáltuk, majd a reakciót követően a fentebb leírt módon jártunk el. A küvettában a PPN koncentrációja a TA-hoz hasonlóan 40 mg/L volt. A negatív mérési hibából adódóan a kalibrációs görbe alapján pontos oldatbeli PPN-koncentráció nem határozható meg. Utóbbiból következik, azonban a 14. ábrán is látható, hogy az LDH/TA/PPN esetén felvett spektrum gyakorlatilag átfed a PPN-t nem tartalmazó oldat spektrumával, azaz az eltolódás mértékéből és irányából adódóan kijelenthető, hogy a PPN immobilizációja sikeres volt, mérési hibán belül nincs jelen szabad PPN a felülúszóban.



14. ábra: Az LDH/TA/PPN felülűszőjára felvett spektrum összehasonlítása a 0 mg/L koncentráción mért spektrummal.

A későbbi hőstabilitás mérések miatt megvizsgáltuk, hogy az 50°C-on hőkezelt kompozit esetén tapasztalható-e deszorpció. Az LDH/TA és LDH/TA/PPN rendszereket összeállítás után egy éjszakán át állni hagytuk a teljes adszorpció lejátszódása érdekében, majd a mintákat 2 óráig 50°C-os vízfürdőben hőkezeltük. A 2 óra leteltével a mintákat hagytuk visszahűlni szobahőmérsékletre, majd a korábbiakban részletezett körülmények között elvégeztük a tesztet. A mintákat 5 percig 5000 rpm-en centrifugáltuk, a mérést mindkét minta esetén a felülűszóval hajtottuk végre. A hőkezelt minták spektrumait a 15. ábrán tüntettük fel: azok láthatóan nem térnek el a 0 mg/L-es, azaz TA-t vagy PPN-t nem tartalmazó oldat spektrumától, azaz a hőkezelés hatására a molekulák nem deszorbeálódnak az LDH felületéről.

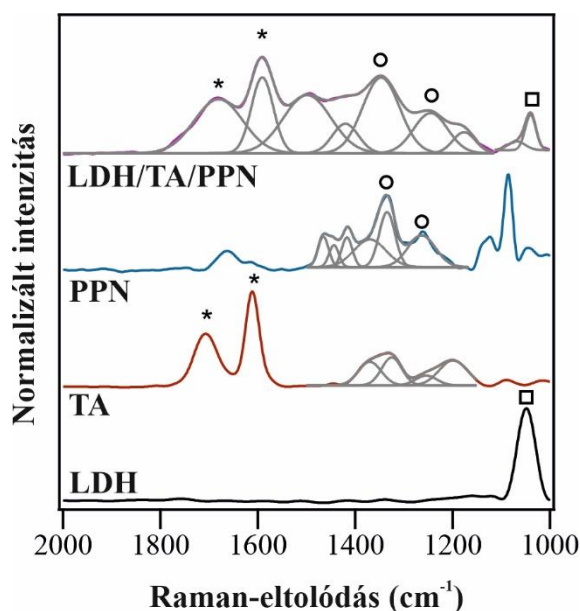


15. ábra: A hőkezelt LDH/TA és LDH/TA/PPN rendszerek felülűszőjára felvett spektrumok és a 0 mg/L biomolekulát tartalmazó CBB-oldat fényelnyelési spektruma.

Ezen mérések összessége bizonyítja, hogy az immobilizáció mindkét biomolekula esetén sikeres volt, az oldatban elhanyagolható, kísérleti hibán belül eső mennyiségű szabad TA és PPN található. Mindemellett az 50°C-on való hőkezelés nem befolyásolja az adszorbeálódott molekulák koncentrációját, azaz magasabb hőmérséklet hatására sem történik deszorpció.

5.4. Szerkezeti és morfológiai tulajdonságok jellemzése

Az előállított LDH/TA/PPN nanokompozit szerkezetének vizsgálata és a két biomolekula jelenlétének bizonyítása érdekében Raman-spektroszkópiás méréseket végeztünk. A 16. ábrán az elkészített Mg/Al-LDH, a TA, a PPN és az LDH/TA/PPN rendszer spektrumait jelenítettük meg.



16. ábra: Az Mg/Al-LDH, a TA, a PPN és az LDH/TA/PPN Raman-spektrumai.

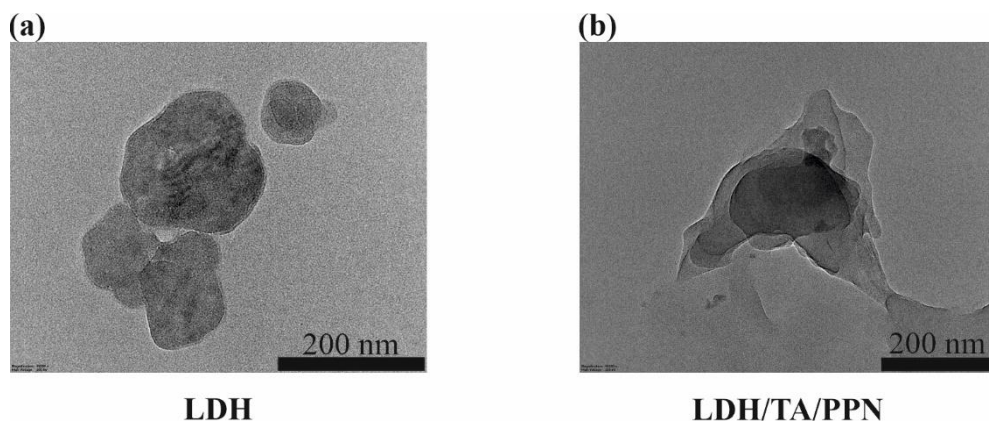
Az NO_3^- -ionok N–O vegyértékrezgéseire utaló sávok az LDH és az LDH/TA/PPN rendszerben egyaránt megtalálhatók 1048 cm^{-1} és 1039 cm^{-1} -nél (□ jelölés) [32]. Az LDH/TA/PPN esetében $1400\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$ tartományon megjelenő csúcsok feltehetően a levegőből megkötött CO_2 -ből származó CO_3^{2-} -ionok C–O vegyértékrezgéseire utaló sávok. A TA jelenlétére az LDH/TA/PPN spektrumán $1590\text{--}1710\text{ cm}^{-1}$ tartományon található sávok utalnak; 1591 cm^{-1} -en az aromás gyűrűk C=C vegyértékrezgéseire, 1680 cm^{-1} -en az észterkötésekben lévő C=O vegyértékrezgéseire köthető sávok jelennek meg (* jelölés). A TA spektrumán az 1324 és 1370 cm^{-1} -nél található sávok a fenolos hidroxilcsoportok hajlító rezgéseire utalnak, míg az 1197 és 1255 cm^{-1} -en látható csúcsok

a C–C és C–O vegyértékrezgésekből származnak [44]. A PPN spektrumán 1266 és 1334 cm^{-1} -en megjelenő sávok az LDH/TA/PPN esetén kissé eltolódva, 1244 és 1345 cm^{-1} -en találhatók; ezen sávok az amid III rezgésekhez köthetők, mely a C–N vegyértékrezgések és az N–H hajlítórezgések együttese ($\circ$ jelölés). A PPN-ra jellemző, amid I rezgéseknek megfelelő 1663 cm^{-1} -en megjelenő sáv az LDH/TA/PPN spektrumában nem jelent meg. A PPN spektrumán megjelenő, 1086 cm^{-1} -nél látható sáv a C–N vegyértékrezgésre utal, míg az 1369-1466 cm^{-1} tartományon található sávok a C–H nyújtó rezgésekből származnak; ezek az LDH/TA/PPN esetén ugyancsak nem láthatók [45]. A TA-ra és PPN-ra jellemző rezgések az LDH/TA/PPN spektrumán minden esetben kismértékben eltolódva jelennek meg, mely megerősíti korábbi feltételezésünket, miszerint a molekulák az LDH felületén adszorbeálódtak. Az adszorpció befolyásolja a molekulák funkciós csoportjainak rezgési tulajdonságait, mely eltolódást eredményez a szabad molekulák rezgési spektrumaiban fellelhető sávokban. A spektrumon fellelhető sávokat és az azokhoz tartozó rezgéseket az 1. táblázatban foglaltuk össze.

1. táblázat: Minták Raman-spektrumain azonosított sávok (ν : nyújtó rezgés, δ : hajlító rezgés).

Raman eltolódás (cm^{-1})	Hozzárendelés	Minta
1048	$\nu(\text{NO}_3^-)$	LDH
1039		LDH/TA/PPN
1086	$\nu(\text{CN})$	PPN
1197, 1255	$\nu(\text{C–C})$, $\nu(\text{C–O})$, $\nu(\text{C–OH})$	TA
1263, 1334		PPN
1244, 1345	Amid III	LDH/TA/PPN
1324, 1370	$\delta(\text{OH})$	TA
1369, 1416, 1442, 1466	$\nu(\text{CH})$	PPN
1612	$\nu(\text{C=C})$	TA
1591		LDH/TA/PPN
1707	$\nu(\text{C=O})$	TA
1680		LDH/TA/PPN
1663	Amid I	PPN
1419, 1499	$\nu(\text{COO}^-)$	LDH/TA/PPN

Az együttes lecsapással készített LDH-k és az adszorpcióval előállított LDH/TA/PPN nanokompozit morfológiai tulajdonságainak vizsgálatára transzmissziós elektronmikroszkóppal készítettünk felvételeket (17. ábra). A felvételeken jól látható, hogy a rendszer morfológiája nem változott a két molekula rögzítése során, emellett az immobilizáció nem eredményezte az LDH-részecskék méretének növekedését; a részecskék átmérője 150-200 nm tartományba esik, ami jó egyezést mutat a DLS-sel meghatározott hidrodinamikai méretekkel.



17. ábra: Az LDH (a) és LDH/TA/PPN (b) rendszerek TEM-felvételei.

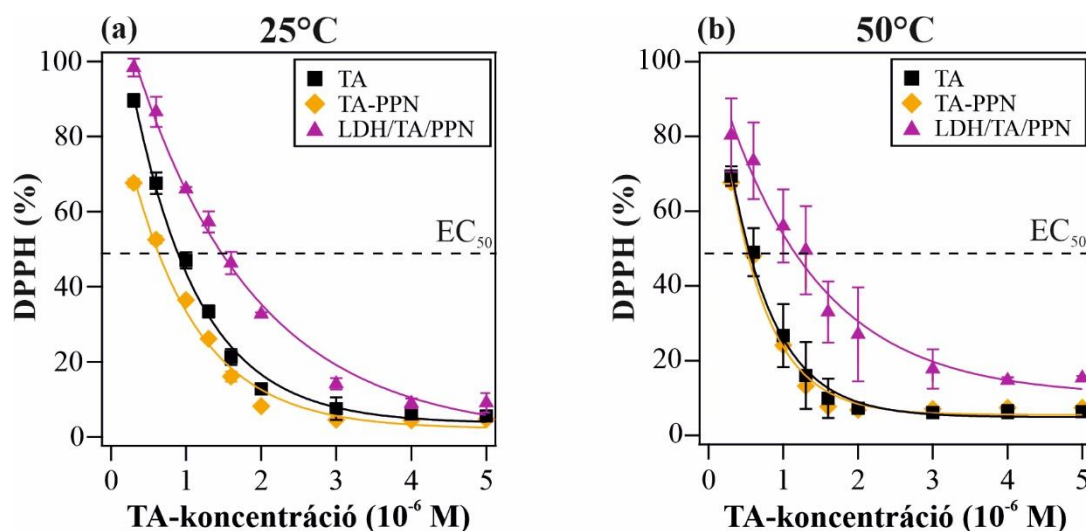
5.5. Antioxidáns aktivitás vizsgálata

Az antioxidáns aktivitás vizsgálatra DPPH-tesztet alkalmaztunk, mely során a DPPH antioxidáns molekulák hatására redukálódik. A teszt során a DPPH eredetileg sötétlila színű oldata besárgul a DPPH redukált formájának megjelenése miatt, így a reakció UV-Vis spektrofotométerrel nyomon követhető. Antioxidáns hozzáadására az abszorbancia-változás üteme egyre lassul, míg beáll egy állandó értékre, azaz az oldatban nem játszódik le további reakció [39].

A DPPH-tesztet elvégeztük TA-nal, TA-PPN keverékkel és az LDH/TA/PPN diszperziókkal, illetve ugyanezen mintákkal 2 órányi 50°C-os hőkezelést követően. A 18. ábrán az oldatban maradt DPPH mennyiségét a hozzáadott TA-koncentráció függvényében ábrázoló görbékét tüntettük fel.

A TA-koncentráció növelésével az oldatban maradt DPPH mennyisége fokozatosan csökken, ez a tendencia mindhárom rendszer esetén megfigyelhető. A 18.a ábrán látható, hogy a rögzítés ellenére a TA megőrizte gyökfogó tulajdonságát, a minták mind jelentős antioxidáns aktivitással rendelkeznek. Ennek alapján elmondható, hogy az immobilizáció nem gátolta jelentős mértékben a részecskék oldatbeli diffúzióját; a

kismértékű aktivitásbeli csökkenés fakadhat a DPPH szerkezetéből, mivel a párosítatlan elektronnal rendelkező N-atomot keretező funkciócsoportok és aromás gyűrűk sztérikus gátlása nehezítheti a rögzített TA és a DPPH reakcióját. A PPN ilyen alacsony koncentrációk esetén, illetve az LDH nem rendelkezett antioxidáns aktivitással egyik hőmérsékleten sem, azaz a kompozit gyökfogó aktivitása a TA-molekulák aktivitásából fakad.



18. ábra: DPPH mennyiségének változása a hozzáadott TA-koncentráció függvényében 25°C-on (a) és 50°C-on (b) a TA, TA-PPN, LDH/TA és LDH/TA/PPN rendszerek esetében.

A hőkezelt minták aktivitása kísérleti hibán belül közel megegyezik a 25°C-on mért értékekkel (18.b ábra), azaz a hőkezelés nem volt jelentős hatással a vizsgált rendszerek gyökfogó képességére. Ezen észrevételeket a számított EC₅₀ értékek is megerősítik, melyeket a 2. táblázatban tüntettük fel.

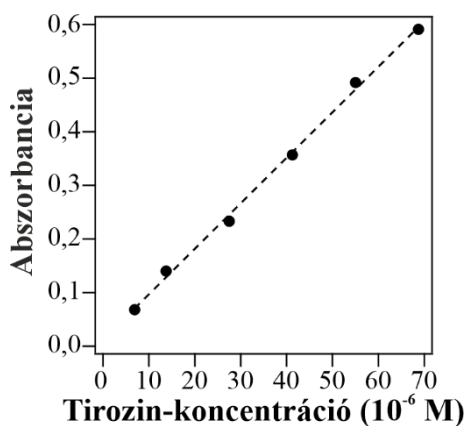
2. táblázat: A DPPH-tesztek alapján kiszámított EC₅₀ értékek TA-tartalmú minták esetén.

Vizsgált rendszer	EC ₅₀ (μM)	
	25°C	50°C
TA	0,87 ± 0,083	0,53 ± 0,061
TA-PPN	0,62 ± 0,094	0,50 ± 0,081
LDH/TA/PPN	1,41 ± 0,166	1,12 ± 0,241

5.6. Proteáz aktivitás vizsgálata

A nanokompozit proteáz aktivitásának vizsgálatára egy Lowry-módszeren alapuló proteáz-tesztet alkalmaztunk, mely során a vizsgált enzim peptidkötések hidrolízisével bontja a teszt szubsztrátját, a kazeint. A kazein bomlásakor kisebb peptidok és aminosavak képződnek, a felszabaduló tirozin pedig F-C-reagenssel kék színű komplexet képez; minél több tirozin képződik a bomlás során, annál nagyobb lesz az oldat fényelnyelése, azaz a reakció UV-Vis spektrofotométerrel nyomon követhető. Az oldatok abszorbanciája a proteázkoncentráció növelésével arányosan változik, melyből következtethetünk a bomlás során felszabadult tirozin anyagmennyiségére, így meghatározható a proteáz aktivitása. Az abszorbancia értékeket minden esetben 660 nm-en olvastuk le, mivel ezen a hullámhosszon az abszorbancia növekedése az enzimkoncentráció növekedésével lineárisan változik [40].

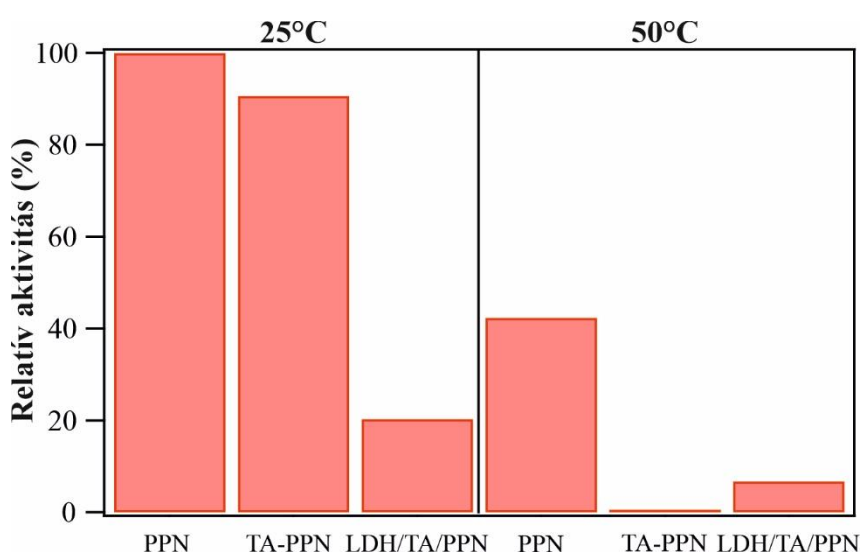
Első lépésként ismert koncentrációjú (0 – 70 μM) tirozin oldatok felhasználásával kalibrációs egyenest vettünk fel (19. ábra). Az oldatok fényelnyelését 660 nm-en vizsgáltuk; az ezen hullámhosszon mért abszorbancia értékeket a tirozinkoncentráció függvényében ábrázolva egyenest kaptunk, melyet a későbbi számítások során alkalmaztunk. A tesztet a PPN, TA-PPN és LDH/TA/PPN rendszerekkel végeztük el, illetve ugyanezen oldatokkal 2 órányi 50°C-os hőkezelést követően.



19. ábra: A tirozin-oldatok segítségével meghatározott kalibrációs görbe.

A PPN aktivitása hőkezelést követően közel felére csökkent, melyből arra következtethetünk, hogy 50°C-on a molekulák egy része denaturálódik, elveszíti aktivitását (20. ábra). A TA és a biomolekulákat nem tartalmazó LDH nem rendelkezett proteáz aktivitással. Szobahőmérsékleten a PPN és TA-PPN keverék kísérleti hibán belül azonos mértékű aktivitással rendelkezett, azonban hőkezelést követően a keverék

gyakorlatilag teljesen elveszítette aktivitását a PPN-nal szemben. A TA a legtöbb fehérjével képes komplexet képezni, így enzimekkel is reakcióba léphet, azonban a komplexképződés enzimaktivásra való hatásával foglalkozó tanulmányok sokszor eltérő következtetéseket vonnak le. Több kutatás eredménye azt mutatja, hogy alacsony TA-koncentrációk esetén a komplexképződés fokozza az enzim aktivitását, míg magasabb TA-koncentrációk az aktivitás elvesztését okozzák [23, 24]. Utóbbi esetben megindul a részecskék fokozott aggregációja, mely blokkolhatja az enzimek aktív centrumait, emellett megváltoztathatja azok konformációját. Esetünkben a TA-PPN keverék hőkezelés hatására mutatott jelentős aktivitásbeli csökkenést. Az irodalomban hasonló jelenséget figyeltek meg a TA lizozim enzimmal képzett komplexe esetén, mely hasonló tendenciát mutatott, a hőmérséklet növelésével a TA-lizozim rendszer fokozatosan elveszítette aktivitását [24]. TA-PPN komplexek kialakulásával és viselkedésükkel, illetve a komplexképződés proteáz aktivitásra való hatásával nem foglalkoznak tanulmányok, így ezek alapján csupán feltételezhető, hogy a TA-lizozim rendszerhez hasonlóan a TA és a PPN között fellépő kölcsönhatások okozzák magasabb hőmérsékleten a PPN proteáz aktivitásának elvesztését.



20. ábra: A PPN, TA-PPN és LDH/TA/PPN rendszerek PPN-ra (25°C) vonatkoztatott relatív proteáz aktivitás értékei.

Az LDH/TA/PPN rendszer jelentősen alacsonyabb proteáz aktivitást mutatott, mint a szabad enzim, mely az enzim-immobilizáció nehézségeiből fakadhat. Ezek közé tartozik például a molekulák nem megfelelő orientációban való rögzítése, enzimrétegek kialakulása és egyéb sztérikus gátlások jelenléte. Ezen tényezők összessége következtében az LDH/TA/PPN rendszer proteáz-aktivitása jelentősen lecsökken a

szabad PPN-hoz képest, hőkezelés hatására ez az aktivitás pedig még alacsonyabb értéket vesz fel. Utóbbi fakadhat a PPN egy részének denaturációjából a hőkezelés hatására, mely a PPN esetén is látható volt. Fontos azonban megjegyezni, hogy az LDH-n rögzített biomolekulák – ugyan minimális – de magasabb aktivitást mutattak 50°C-on, mint az oldatok keveréke, tehát az immobilizálás javított a TA/PPN rendszer proteáz aktivitásán.

Összességében elmondható, hogy a két biomolekula rögzítésével a PPN megtartotta proteáz aktivitását, azonban jelentősen alacsonyabb aktivitással rendelkezett, mint a szabad enzim. Hőkezelés hatására a PPN aktivitása a felére csökkent, ennek megfelelően az LDH/TA/PPN rendszer 50°C-on jelentősen veszített aktivitásából, azonban nagyobb érték volt mérhető, mint az oldatok keverékénél. Magasabb hőmérsékleten a TA-PPN keverék feltehetően komplex-képződés okán nem rendelkezett proteáz aktivitással, azonban a két vegyület LDH-n való rögzítésének komplexképződésre való hatását a teszt eredményei alapján nem tudtuk megállapítani. Mivel a hőkezelt LDH/TA/PPN minta Bradford-teszt eredményei is bizonyítják, hogy az LDH/TA/PPN nanokompozit összetétele nem változott hőkezelés hatására, a molekulák immobilizációjával feltehetően szabályozható vagy megakadályozható a TA-PPN komplexek képződése, azonban a molekulák rögzítésének módja további finomhangolást igényel.

6. Összefoglalás

Munkánk során a két biomolekula adszorpciójával TA- és PPN-tartalmú, stabil LDH-nanokompozitokat állítottunk elő. Az immobilizáció sikerességét az oldatban maradt szabad TA- és PPN-koncentráció meghatározásával, illetve Raman-spektroszkópiás felvételekkel bizonyítottuk. A két vegyület rögzítésével célunk volt azok antioxidáns és proteáz aktivitásának megőrzése, így ezek vizsgálatára antioxidáns- és proteáz-teszteket végeztünk. A nanokompozit hőstabilitásának feltérképezésére ezen méréseket elvégeztük 50°C-on hőkezelt mintákkal is.

Első lépésként egy stabil nanokompozit előállításához szükséges megfelelő TA- és PPN-dózis meghatározása érdekében dinamikus fényszórás és elektroforetikus mobilitás méréseket végeztünk. Először az ideális TA-koncentrációt állapítottuk meg, mely a töltésviszonyok és a stabilitási arányok alapján 200 mg/g volt. Ezen koncentráción megtörténik az eredetileg pozitív töltésű részecskék áttöltése, emellett a rendszer stabil kolloid diszperziót képezett. A megfelelő PPN-dózis meghatározásához így 200 mg/g TA-t tartalmazó LDH/TA-diszperziót használtunk. A mérések alapján a PPN esetén 200 mg/g-os dózisonál egy negatív töltésű, még stabil rendszert kapunk, így mindkét molekula LDH-ra vonatkoztatott ideális koncentrációja 200 mg/g-nak adódott.

A két vegyület immobilizációjának mértékét az oldatban maradt szabad TA- és PPN-koncentráció meghatározásával, Bradford-teszttel határoztuk meg. Az eredmények alapján a TA és PPN több, mint 95%-a adszorbeálódott az LDH felületén, az oldatok kísérleti hibán belüli, elhanyagolható mennyiségű szabad molekulát tartalmaztak. Az 50°C-on hőkezelt kompozit ugyanezen tendenciákat mutatta, azaz elmondható, hogy a hőkezelés hatására nem tapasztaltunk deszorpciót. Az eredményeket Raman-spektroszkópiás felvételekkel erősítettük meg: az előállított LDH/TA/PPN Raman-spektrumán megjelentek a TA-ra és PPN-ra jellemző csúcsok kissé eltolódva, mely a molekulák felületen való megkötődését igazolták. Kijelenthető tehát, hogy mind a Bradford-teszttel, mind Raman mikroszkópiás mérésekkel igazoltuk, hogy a TA és a PPN sikeresen rögzült az LDH nanorészecskék felületén.

Az immobilizáció célja a két vegyület aktivitásának megőrzése volt, így a TA antioxidáns aktivitásának meghatározására DPPH-tesztet végeztünk, a PPN proteáz aktivitásának vizsgálatára egy nemspecifikus proteáz-tesztet alkalmaztunk. A DPPH-teszt során az oldatban lévő TA lépett reakcióba a DPPH szabadgyökkel. A mérések azt mutatták, hogy az LDH/TA/PPN nanokompozit a molekulák rögzítése ellenére is jelentős

antioxidáns aktivitással rendelkezett, azaz az immobilizáció nem befolyásolta döntő mértékben a TA gyökfogó tulajdonságát. A kompozit 50°C-os hőkezelést követően gyakorlatilag nem veszített aktivitásából, azaz megállapítható, hogy a hőkezelés ugyancsak nem befolyásolta a TA aktivitását. A proteáz-teszt alapja a kazein PPN-indukált bomlásából felszabaduló tirozin és Folin-Ciocalteu-reagens reakciója. A mérések alapján megállapítottuk, hogy az LDH/TA/PPN rendelkezik proteáz aktivitással, tehát az immobilizálás hatására – ugyan csökkent – de a PPN továbbra is megtartotta az aktivitását. Az 50°C-on hőkezelt PPN aktivitása a felére csökkent, azaz hő hatására a PPN egy része denaturálódhatott. Azonban míg a hőkezelt TA-PPN keverék teljesen elvesztette aktivitását, az LDH-n rögzített TA és PPN kismértékű aktivitást mutatott.

Összefoglalva elmondható, hogy az általunk előállított kombinált hatású nanokompozit felhasználható olyan ipari területeken, ahol a gyökfogó és fehérjebontó tulajdonság együttes használata előnyökkel járhat. A kompozit kozmetikai és élelmiszeripari területeken is alkalmazhatóvá válhat, ahol a két biomolekula használatának nagy reaktivitásuk és bomlékonyságuk szab gátat. A továbbiakban célul tűztük ki a kompozit aktivitásának javítását, melyet a molekulák immobilizálásának finomhangolásával tervezünk elérni.

Irodalomjegyzék

- [1] A.M. Pisoschi, A. Pop, *The role of antioxidants in the chemistry of oxidative stress: A review*, Eur. J. Med. Chem. 97 (2015) 55-74.
- [2] J. Fernandez-Lucas, D. Castaneda, D. Hormigo, *New trends for a classical enzyme: Papain, a biotechnological success story in the food industry*, Trends Food Sci. Tech. 68 (2017) 91-101.
- [3] S. Prasad, S.C. Gupta, A.K. Tyagi, *Reactive oxygen species (ROS) and cancer: Role of antioxidative nutraceuticals*, Cancer Lett. 387 (2017) 95-105.
- [4] M. Valko, C.J. Rhodes, J. Moncol, M. Izakovic, M. Mazur, *Free radicals, metals and antioxidants in oxidative stress-induced cancer*, Chem.-Biol. Interact. 160(1) (2006) 1-40
- [5] M. Carocho, P. Morales, I.C.F.R. Ferreira, *Antioxidants: Reviewing the chemistry, food applications, legislation and role as preservatives*, Trends Food Sci. Tech. 71 (2018) 107-120.
- [6] A. Szerlauth, S. Murath, I. Szilagyi, *Layered double hydroxide-based antioxidant dispersions with high colloidal and functional stability*, Soft Matter 16(46) (2020) 10518-10527.
- [7] V. G. Tacias-Pascacio, R. Morellon-Sterling, D. Castaneda-Valbuena, A. Berenguer-Murcia, M.R. Kamli, O. Tavano, R. Fernandez-Lafuente, *Immobilization of papain: A review*, Int. J. Biol. Macromol. 188 (2021) 94-113.
- [8] C. Lopez-Otin, J.S. Bond, *Proteases: Multifunctional enzymes in life and disease*, J. Biol. Chem. 283(45) (2008) 30433-30437.
- [9] T.C. Trevisol, R.O. Henriques, A.J.A. Souza, K. Cesca, A. Furigo, *Starch- and carboxymethyl cellulose-based films as active beauty masks with papain incorporation*, Int. J. Biol. Macromol. 231 (2023) 123258.
- [10] R.A. Sheldon, S. van Pelt, *Enzyme immobilisation in biocatalysis: why, what and how*, Chem. Soc. Rev. 42(15) (2013) 6223-6235.
- [11] D. Simanaviciute, D. Liudvinaviciute, R. Klimaviciute, R. Rutkaite, *Cross-linked cationic starch derivatives for immobilization of chlorogenic acid*, Eur. Polym. J. 93 (2017) 833-842.
- [12] S. Saringer, R.A. Akula, A. Szerlauth, I. Szilagyi, *Papain adsorption on latex particles: charging, aggregation, and enzymatic activity*, J. Phys. Chem. B. 123 (2019) 9984-9991.

- [13] S. Saringer, P. Rouster, I. Szilagyi, *Co-immobilization of antioxidant enzymes on titania nanosheets for reduction of oxidative stress in colloid systems*, J. Colloid Interface Sci. 590 (2021) 28–37.
- [14] J. He, M. Wei, B. Li, Y. Kang, D.G. Evans, X. Duan, *Preparation of layered double hydroxides*, in: Layered Double Hydroxides (2006) pp. 89- 119.
- [15] D.G. Evans, X. Duan, *Preparation of layered double hydroxides and their applications as additives in polymers, as precursors to magnetic materials and in biology and medicine*, Chem. Commun. (5) (2006) 485-496.
- [16] W. Jing, C. Xiaolan, C. Yu, Q. Feng, Y. Haifeng, *Pharmacological effects and mechanisms of tannic acid*, Biomed. Pharmacother. 154 (2022) 113561.
- [17] A. Bigham, V. Rahimkhoei, P. Abasian, M. Delfi, J. Naderi, M. Ghomi, F.D. Moghaddam, T. Waqari, Y.N. Ertas, S. Sharifi, N. Rabiee, S. Ersoy, A. Maleki, E.N. Zare, E. Sharifi, E. Jabbari, P. Makvandi, A. Akbari, *Advances in tannic acid incorporated biomaterials: Infection treatment, regenerative medicine, cancer therapy, and biosensing*, Chem. Eng. J. 432 (2022) 134146.
- [18] N.F. Vasconcelos, A.P. Cunha, N.M.P.S. Ricardo, R.S. Freire, L.A.P. Vieira, A.I.S. Brigida, M.F. Borges, M.F. Rosa, R.S. Vieira, F.K. Andrade, *Papain immobilization on heterofunctional membrane bacterial cellulose as a potential strategy for the debridement of skin wounds*, Int. J. Biol. Macromol 165(Pt B) (2020) 3065–3077.
- [19] R.G. Dare, C.V. Nakamura, V.F. Ximenes, S.O.S. Lautenschlager, *Tannic acid, a promising anti-photoaging agent: Evidences of its antioxidant and anti-wrinkle potentials, and its ability to prevent photodamage and MMP-1 expression in L929 fibroblasts exposed to UVB*, Free Radical Bio. Med. 160 (2020) 342-355.
- [20] M.L. Picchio, Y.G. Linck, G.A. Monti, L.M. Gugliotta, R.J. Minari, C.I.A. Igarzabal, *Casein films crosslinked by tannic acid for food packaging applications*, Food Hydrocolloid. 84 (2018) 424-434.
- [21] V. Prabhawathi, T. Boobalan, P.M. Sivakumar, M. Doble, *Functionalized polycaprolactam as an active food package for antibiofilm activity and extended shelf life*, Colloid. Surface. B. 123 (2014) 461-468.
- [22] S. Kumari, S. Soni, A. Sharma, S. Kumar, V. Sharma, V.S. Jaswal, S.K. Bhatia, A.K. Sharma, *Layered double hydroxides based composite materials and their applications in food packaging*, Appl. Clay Sci. 247 (2024) 107216.

- [23] B. Adamczyk, M. Karonen, S. Adamczyk, M.T. Engstrom, T. Laakso, P. Saranpa, V. Kitunen, A. Smolander, J. Simon, *Tannins can slow-down but also speed-up soil enzymatic activity in boreal forest*, Soil Biol. Biochem. 107 (2017) 60-67.
- [24] J. Su, Y. Sun, Z. Li, Y. Chen, B. Ding, W. Sun, *Effect of tannic acid on lysozyme activity through intermolecular noncovalent binding*, J. Agric. Food Res. 1 (2009) 100004.
- [25] J.M. Nascimento, T.E.H. Leao, T.P. Nascimento, A.S. Conniff, J.M.S. Batista, R.M.P.B. Costa, A.L.F. Porto, A.C.L. Leite, *Evaluation of the influence of temperature on the protein-tannic acid complex*, Int. J. Biol. Macromol. 182 (2021) 2056-2065.
- [26] P.K. Robinson, *Enzymes: principles and biotechnological applications*, Essays Biochem. 59 (2015) 1-41.
- [27] K. Atacan, M. Özacar, M. Özacar, *Investigation of antibacterial properties of novel papain immobilized on tannic acid modified Ag/CuFe₂O₄ magnetic nanoparticles*, Int. J. Biol. Macromol. 109 (2018) 720-731.
- [28] G. Mishra, B. Dash, S. Pandey, *Layered double hydroxides: A brief review from fundamentals to application as evolving biomaterials*, Appl. Clay Sci. 153 (2018) 172-186.
- [29] X. Kong, L. Jin, M. Wei, X. Duan, *Antioxidant drugs intercalated into layered double hydroxide: Structure and in vitro release*, Appl. Clay Sci. 49(3) (2010) 324-329.
- [30] C. Rossi, A. Schoubben, M. Ricci, L. Perioli, V. Ambroggi, L. Latterini, G.G. Aloisi, A. Rossi, *Intercalation of the radical scavenger ferulic acid in hydrotalcite-like anionic clays*, Int. J. Pharm. 295(1-2) (2005) 47-55.
- [31] S. Mallakpour, Z. Radfar, M. Feiz, *Optimization of chitosan/tannic acid@ ZnFe layered double hydroxide bionanocomposite film for removal of reactive blue 4 using a response surface methodology*, Int. J. Biol. Macromol. 209(Pt A) (2022) 747-762.
- [32] A. Szerlauth, Z.D. Konya, G. Papp, Z. Konya, A. Kukovecz, M. Szabados, G. Varga, I. Szilagyi, *Molecular orientation rules the efficiency of immobilized antioxidants*, J. Colloid Interface Sci. 632(Pt B) (2023) 260-270.
- [33] F. Bruna, C. Mousty, P. Besse-Hoggan, I. Batisson, V. Prevot, *Assembly of nitroreductase and layered double hydroxides toward functional biohybrid materials*, J. Colloid Interface Sci. 533 (2019) 71-81.

- [34] A. Romano, A. Rosato, G. Totaro, G. Zanaroli, A. Celli, L. Sisti, *Recycling by-design of plastic through formulation with thermally protected enzymes in layered double hydroxide structures*, J. Clean. Prod. 384 (2023) 135517.
- [35] D.F. Evans, H. Wennerstrom, *The colloidal domain*, John Wiley (1999)
- [36] M. Elimelech, J. Gregory, X. Jia, R.A. Williams, *Particle deposition and aggregation: Measurement, modeling, and simulation*, Butterworth-Heinemann Ltd. (1995)
- [37] M.M. Bradford, *A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding*, Anal. Biochem. 72(1-2) (1976) 248-254.
- [38] W.J. Kilkowski, G.G. Gross, *Color reaction of hydrolyzable tannins with Bradford reagent, Coomassie brilliant blue*, Phytochemistry 51(3) (1999) 363-366.
- [39] W. Brand-Williams, M.E. Cuvelier, C. Berset, *Use of a free-radical method to evaluate antioxidant activity*, LWT - Food Sci. Technol. 28(1) (1995) 25-30.
- [40] C. Cupp-Enyard, *Sigma's Non-specific Protease Activity Assay - Casein as a Substrate*, J. Vis. Exp. 19 (2008) e899.
- [41] H. Holthoff, S.U. Egelhaaf, M. Borkovec, P. Schurtenberger, H. Sticher, *Coagulation rate measurements of colloidal particles by simultaneous static and dynamic light scattering*, Langmuir 12(23) (1996) 5541-5549.
- [42] P. Rouster, M. Pavlovic, E. Horvath, L. Forro, S.K. Dey, I. Szilagyi, *Influence of protamine functionalization on the colloidal stability of 1D and 2D titanium oxide nanostructures*, Langmuir 33(38) (2017) 9750-9758.
- [43] D.G. Evans, R.C.T. Slade, *Structural aspects of layered double hydroxides*, in: Layered Double Hydroxides (2006) pp. 1-87.
- [44] S. Mazurek, I. Fecka, M. Weglinska, R. Szostak, *Quantification of active ingredients in Potentilla tormentilla by Raman and infrared spectroscopy*, Talanta, 189 (2018) 308-314.
- [45] P.T.C. Freire, F.M. Barboza, J.A. Lima, F.E.A. Melo, J.M. Filho, *Raman Spectroscopy of Amino Acid Crystals*, in: Raman Spectroscopy and Applications, IntechOpen (2017) pp. 201-224.

Köszönetnyilvánítás

Köszönettel tartozom témavezetőimnek: köszönöm Szerlauth Adélnak az évek során nyújtott rengeteg segítséget, támogatást és türelmet, illetve köszönöm Dr. Szilágyi Istvánnak munkám során nyújtott segítségét és a lehetőséget, hogy az általa vezetett SZTE-MTA Lendület Biokolloidok Kutatócsoport tagjaként dolgozhattam. A TEM-felvételeket köszönöm Dr. Sáringer Szilárdnak. Köszönöm Prof. Dr. Tóth Ágotának, hogy az általa vezetett tanszéken készíthettem TDK-dolgozatomat.

Szeretném megköszönni az SZTE-MTA Lendület Biokolloidok Kutatócsoport tagjainak munkám során nyújtott támogatásukat. Nem utolsó sorban hálával tartozom családomnak és barátaimnak, hogy mindvégig biztattak és támogattak.