



Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem
Vegyéssz mérnöki és Biomérnöki Kar
Oláh György Doktori Iskola

A poli(3-hidroxi butirát) jellemzése és alkalmazása hatóanyag hordozó mátrixként

Tézisfüzet

Szerző: Polyák Péter
Témavezető: Pukánszky Béla

Műanyag- és Gumiipari Laboratórium
Fizikai Kémia és Anyagtudományi Tanszék
Budapesti Műszaki és Gazdaságtudományi Egyetem

Polimerfizikai Kutatócsoport
Anyag- és Környezetkémiai Intézet
Természettudományi Kutatóközpont
Magyar Tudományos Akadémia

1. Bevezetés

A biopolimereket taglaló irodalom rendkívül szerteágazó ugyan, azonban ha mégis megkíséreljük az egész tudományterület áttekintését, akkor az első és legfontosabb konklúzióink az lehet hogy az ezzel foglalkozó kutatási projekteknek nem csak a száma, egyben a népszerűsége, hivatkozottsága is folyamatosan növekszik. Az elmúlt évtizedekben a biopolimerek vizsgálatát illetve alkalmazási lehetőségeit célzó kutatások egy marginálisnak mondható tudományágból kinőték magukat az egyik legjelentősebb, ipari potenciállal is bíró ágazattá. A megújuló alapanyagforrásból származó, illetve biológiailag lebontható polimerek legfontosabb képviselője, a poli(3-hidroxibutirát) (PHB) például a fermentációjának^{1,2} optimalizálását célzó kutatások sikere miatt napjainkban már a laboratóriumi, félüzemi kísérleteket messze maga mögött hagyva vált egy ipari léptékben előállított és felhasznált alapanyaggá.

Mindez természetesen számottevően befolyásolja a PHB árát és hozzáférhetőségét is. Míg a biopolimerek családjába sorolható kompetitorok ára gyakran gátló faktorként hat az azok vizsgálatát célzó kutatásokra, addig a PHB a fermentációjának több ciklusban lezajlott méretnöveléséből fakadóan ma már akár a politejsavval (PLA) összemérhető árban is beszerezhető, így kutatása, felhasználási lehetőségeinek vizsgálata nem ró komoly anyagi terhet az azt kivitelező illetve finanszírozó kutatóintézetre. A fentiek miatt a PHB mára a biopolimerek családjának egyik legjelentősebb képviselőjévé vált, a PLA-val történő összehasonlítást célzó cikkek egyik konklúziója pedig gyakran az, hogy számos területen érdemes lehet a PHB-t preferálni³.

A fent részletezett tendencia természetesen befolyásolja a biopolimereket feldolgozó, azokat hasznosító, vagy kimondottan azokra épülő tudományterületeken megfigyelhető tendenciákat is. A mikrobiális poliészterek kutatásának eredményei például lehetővé tették, hogy azokból különböző sebészeti eszközöket, vagy akár implantátumokat gyárthassanak az orvosi biológia területére szakosodott cégek, de

¹ Sharma, V., Misra, S., Srivastava, A., K., *Biocatal Agric Biotechnol.* **10**, 122-129, (2017)

² Wu, W., Lai, S. Y., Jang, M. F., Chou, Y. S., *J. Process Control* **23**, 1159-1168, (2013)

³ Graupner, N., Müssig, J., *Compos Part A Appl Sci Manuf.* **42**, 2010-2019, (2011)

megemlíthetjük akár a kontrollált hatóanyag-leadást lehetővé tévő mátrixok előállítását is, amelyek alapanyagaként egyre inkább a PHB-t preferálják⁴.

A PHB népszerűségének, illetve az orvosi biológia területén megfigyelhető térhódításának hátterében azonban nyilvánvalóan nem csak az ár csökkenése áll. A gyógyászati célokra felhasználni kívánt anyagokkal szembeni legfontosabb elvárás a biokompatibilitás, aminek a PHB maradéktalanul eleget is tesz. Mi több, a PHB teljes, monomerjeire történő metabolizise 3-hidroxi-butánsavat eredményez, ami az emberi vérben természetes körülmények között is megtalálható ketontestek egyike, így biztosak lehetünk benne, hogy a PHB *in vivo* alkalmazása nem fejt ki károsító hatást az élő szervezetre⁵.

Bár a biokompatibilitás nyilvánvalóan a legfontosabb kritériuma a mikrobiális poliészterek *in vivo* körülmények között történő biztonságos használatának, meg kell jegyeznünk azt is, hogy az emberi testbe bejutó polimer mátrixú implantátum vagy hordozó teljes életciklusát ismernünk kell ahhoz, hogy használata semmiféle veszélyt ne jelentsen, így vizsgálnunk kell a polimer lebomlását, valamint annak időfüggését is. Nem meglepő tehát hogy a vonatkozó irodalomban mind a PHB hidrolitikus⁶, mind annak enzimátikus⁷ degradációját vizsgáló cikkekre találhatunk példát, fontos azonban kiemelnünk, hogy a publikációk elsöprő többsége egyáltalán nem foglalkozik a folyamat időfüggésével, ami nélkül egy PHB alapú orvosi biológiai eszköz életciklusának tervezése rendkívül nehézkes.

A fentiek mellett más jellegű kutatási eredmények, ismeretek hiánya is gátat szabhat a PHB további piaci térhódításának. Az irodalom alaposabb vizsgálata nyilvánvalóvá teheti például, hogy a PHB hatóanyag-hordozó-mátrixként történő alkalmazásában is komoly lehetőségek rejlenek^{8,9}, ugyanakkor az is feltűnhet, hogy a

⁴ Zhang, J., Shishatskaya, E. I., Volova, T. G., da Silva, L. F., Chen, G. Q., *Mater. Sci. Eng. C.* **86**, 144-150, (2018)

⁵ Pouton, C. W., Akhtar, S., *Adv Drug Deliv Rev.* **18**, 133-162, (1996)

⁶ Holland, S. J., Jolly, A. M., Yasin, M., Tighe, B. J., *Biomaterials* **8**, 289-295, (1987)

⁷ Tanio, T., Fukui, T., Shirakura, Y., Saito, T., Tomita, K., Kaiho, T., Masamune, S., *Eur J Biochem.* **24**, 71-77, (1982)

⁸ Barouti, G., Jaffredo, C. G., Guillaume, S. M., *Prog Polym Sci.* **73**, 1-31, (2017)

⁹ Sokolsky-Papkov, M., Agashi, K., Olaye, A., Shakesheff, K., Domb, A. J., *Adv Drug Deliv Rev.* **59**, 187-206, (2007)

kioldódás időfüggésének mennyiségi leírására javaslatot tevő publikációk száma rendkívül csekély. Azon kutatók, akik mégis vállalkoztak erre a feladatra, gyakran fél- vagy kizárólag empirikus összefüggéseket javasolnak, illetve alkalmaznak^{10,11}, ahol a paraméterek fizikai tartalma vitatható, vagy egyáltalán nincs. Ez problémát jelenthet például akkor, ha a kioldódás időfüggését a fizikai kémia alapvetéseinek matematikai formalizmusában szereplő paraméterekkel (pl. a diffúziós koefficienssel) szeretnénk kvantitatíve jellemezni, erre ugyanis a pillanatnyilag fellelhető modellek csak rendkívül korlátozott keretek között nyújtanak lehetőséget.

Ezen dolgozat elsődleges célja, hogy a PHB-t illetve annak alkalmazási lehetőségeit vizsgáló kutatások eredményeként rendelkezésre álló ismeretinket a lehető legjobban kibővítse, megoldást kínáljon a hatóanyag-hordozóként történő felhasználás problémáira, illetve nem utolsósorban, hogy még tovább növelje a PHB-ben rejlő ipari potenciált. Ennek elérése érdekében célunk a PHB hidrolitikus, illetve enzimátikus degradációjának a lehető legrészletesebb feltárása, illetve jellemzése volt, úgy mechanizmus, mint reakciókinetika tekintetében. A tervezhető *in vivo* életciklust lehetővé tevő vizsgálatok mellett javaslatot tettünk a PHB hatóanyag-hordozóként történő felhasználására is, illetve a dolgozat záró fejezeteiben bemutatunk olyan új eljárásokat, amelyekkel nem csak a kioldódást jellemző diffúziós koefficiens meghatározása, hanem egyben a folyamat nyomon követése is szignifikánsan egyszerűbbé válik.

2. Kísérleti rész

Kísérleteink alapanyagát, a Mirel M2100 néven forgalmazott PHB-t, granulált formában vásároltuk a Metabolix Ltd.-től. A granulátumokból préseléssel, illetve oldatból öntéssel filmeket (2. illetve 3. fejezet), illetve vizes szuszpenziót készítettünk (4. fejezet). A fentiek mellett PHB-ből szálas szerkezetű scaffoldot (sejtkultúra tenyésztéséhez használható vázanyagot) is előállítottunk nedves szálképzéses technológiával (5. fejezet). A dolgozat fennmaradó fejezeteiben kizárólag amorf PHB filmekkel dolgoztunk,

¹⁰ Mitran, R. A., Matei, C., Berger, D., Băjenaru, L., Moisescu, M. G., *Eur J Pharm Biopharm.* **127**, 318-325, (2018)

¹¹ Xu, X., Al-Ghabeish, M., Krishnaiah, Y. S. R., Rahman, Z., Khan, M. A., *Int J Pharm.* **494**, 31-39, (2015)

amelyek viszont ezúttal már hatóanyag-hordozó mátrixként is funkcionáltak. Az alkalmazott hatóanyag quercetin (6. fejezet) illetve fukszin (7. fejezet) volt.

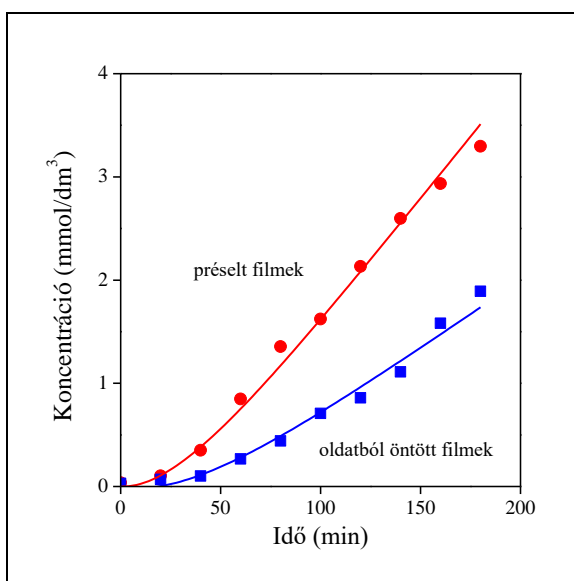
A PHB degradációját célzó kísérleteket NaOH vizes oldatában (hidrolitikus degradáció), illetve a *Bacillus Megaterium* törzs PHB depolimeráz enzim molekuláit tartalmazó pufferben (enzimatis degradáció) viteleztük ki. A folyamatokat UV-Vis spektrofotométer, HPLC illetve LC-MS berendezésekkel követtük nyomon. A dolgozat második felében bemutatott hatóanyag-leadás időfüggésének analízisét célzó méréseinket etanolban, illetve PBS pufferben hajtottuk végre, függően attól, hogy quercetin vagy fukszin volt a hordozott hatóanyag. A mennyiségi analízishez UV-Vis spektrofotométert, illetve fényképezőt használtunk, az így rögzített képeket a MATLAB fejlesztői környezetében konvertáltuk koncentrációgradiensekké.

3. Eredmények

Munkánk során mind a PHB hidrolitikus, mind annak enzimatis degradációját részletekbe menően vizsgáltuk, eredményeink alapján egyértelműen elmondható hogy a lebontás folyamata mindkét úton lehetséges. Meg kell azonban jegyeznünk azt is, hogy a kielégítőnek mondható sebességgel kivitelezett hidrolitikus degradációhoz magas pH értékű közegre van szükségünk, ami jellemzően nem található meg az emberi szervezetben, így ha egy olyan PHB molekulából felépülő terméket szeretnénk előállítani, ami *in vivo* körülmények között lebomlik, akkor érdemes lehet katalizátorként enzim molekulákat választanunk.

Mivel nem csak a különböző katalizátorok segítségével kivitelezett degradáció pusztán lehetőségét, hanem egyben a folyamat időfüggését is jellemezni szeretnénk volna, mérési eredményeink ismeretében mind a hidrolitikus, mind az enzimatis degradációra a reakció mechanizmusán alapuló kinetikai modellt dolgozunk ki, amellyel sikeresen tudtuk közelíteni a mért értékeket. A hidrolitikus degradációt mennyiségileg jellemezni képes modellünk a maga minőségében teljesen új, az irodalomban eddig senki nem publikált ilyen típusú modellszámításokat lehetővé tevő matematikai apparátust.

Az enzimatiskus degradáció esetén természetesen más a helyzet, hiszen az enzimkinetika tudománya csaknem egyidős az enzimek kutatásával. Rá kell azonban mutassunk, hogy a pillanatnyilag legerjedtebben használt kinetikai modellek, pl. a Michaelis-Menten modell, homogén fázisú enzimreakciók leírására képes, esetünkben azonban mindenképp számolnunk kell azzal hogy a PHB vízben teljesen oldhatatlan. Mindezek miatt a homogén fázisú enzimreakciókra kifejlesztett modelleket



1. ábra UV-VIS spektrofotométerrel mért termékkoncentráció-értékek az idő függvényében, illetve az azokra illesztett modellszámítás eredménye

módosítanunk kell annak érdekében, hogy képes legyen figyelembe venni a PHB lebontás heterogén jellegét, azaz azt, hogy az enzim molekuláknak elsőként adszorbeálódniuk kell a polimer felszínén, csak ezt követheti az észterkötés hidrolízise. Eredményeink egyértelműen bizonyítják, hogy a heterogén fázisú enzimreakciókra módosított Michaelis-Menten modell kiválóan alkalmas a PHB enzimkatalizált lebontásának jellemzésére (**1. ábra**).

Annak érdekében, hogy a lehető legmélyrehatóbb ismereteket szerezzünk a PHB enzimkatalizált lebontásáról, nemcsak a termékképződés kinetikáját vizsgáltuk, egyben a fent bemutatott két konzekutív lépést egymástól függetlenül is szerettük volna mennyiségileg jellemezni, különös tekintettel az előbbire, a heterogén enzimreakciók jellemző vonása ugyanis, hogy a sebességmeghatározó lépés az enzim molekulák adszorpciója a polimer felületén. Ehhez természetesen időben el kell különíteni egymástól a fenti két folyamatot, amit PCR (polymerase chain reaction) mutagenézis segítségével módosított enzim molekulák alkalmazásával sikerült kiviteleznünk. A

pontmutáció célja az volt, hogy az enzim aktív centrumát inaktiváljuk, a kötő régiót viszont érintetlenül hagyjuk, olyan fehérjéket hozva ezzel létre, amelyek képesek ugyan adszorbeálódni a PHB felületén, az azok láncában megtalálható észterkötések hidrolizálására azonban nem képesek. Ezzel lehetőségünk nyílt arra, hogy a katalízistól szeparáltan vizsgáljuk az adszorpció lejátszódását és kinetikáját, illetve meglehetősen pontosan kimérjük az adszorpció (mint sebességmeghatározó lépés) időállandóját. A PCR mutagenezissel előállított enzimmolekulákat más célokra is sikeresen használtuk, segítségükkel meg tudtuk becsülni például a teljes felületi borítottságnál mérhető, egy darab enzimre vonatkozatható helyigényt.

A dolgozat fent bemutatott fejezeteinek keretein belül meghatározott sebességi koefficiensek, illetve az ezek segítségével paraméterezhető kinetikai modellek ismeretében minden további nélkül tervezhető a PHB *in vitro* vagy *in vivo* lebontása, így a polimert akár hatóanyag-hordozóként is alkalmazhatjuk. Ehhez természetesen szükségünk van egy erre alkalmas mátrixra, amelyet számos eljárással elő lehet állítani, mi azonban ragaszkodtunk a laboratóriumunkban kifejlesztett, nedves szálképzésen

alapuló technikához. Ennek háttérében az áll, hogy a konvencionálisan alkalmazott electrospinning segítségével kimondottan nehéz szűk méreteloszlású PHB scaffoldok előállítását, míg a saját módszerünkkel ez olyannyira megvalósítható (lásd **2. ábra**), hogy nemcsak a méret szerinti szórást tudjuk alacsony értéken tartani, hanem a szálak vastagságát is

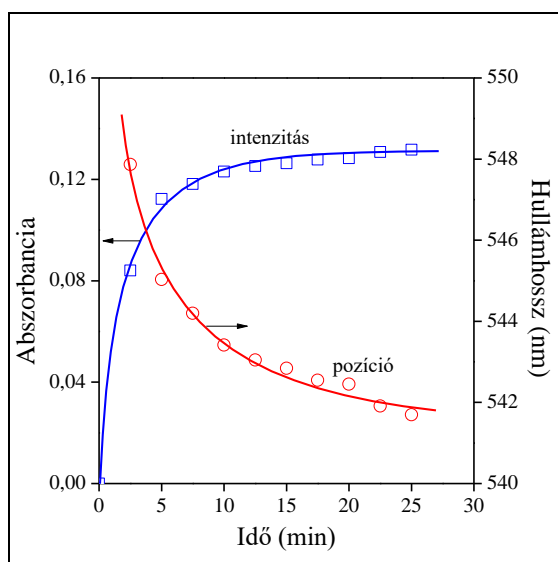


2. ábra PHB szálak digitális optikai mikroszkóppal készített képe. A szálképzés sebessége 0.08 ml/min volt.

finomhangolhatjuk. A laboratóriumunkban kifejlesztett szálképzési technológia további előnye, hogy segítségével hatóanyaggal töltött szálak is probléma nélkül előállíthatók, mérési eredményeink bizonyították ugyanis, hogy a hatóanyag molekuláinak jelenléte

nem befolyásolja számottevően a szálképzési sebesség-szálvastagság karakterisztikát, így a hatóanyagot hordozó PHB szálak átmérőjét is egy kimondottan széles tartományban tudjuk tetszőleges értékre állítani.

Nemcsak a fentiekben bemutatott hatóanyag-hordozó mátrixok előállításával és jellemzésével foglalkozunk azonban, hanem nagy hangsúlyt fektettünk a PHB-ből történő hatóanyag-kioldódás kinetikájának jellemzésére is. Ezen kutatásaink részeként kifejlesztettünk egy olyan eljárást, ami lehetővé teszi hatóanyagok diffúziós koefficiensének meghatározását amorf PHB filmekben. Eljárásunk a konvenciókkal szakítva nem permeációs vizsgálatokon vagy a permeánsban történő duzzasztáson alapul (szilár halmazállapotú hatóanyagok esetén erre még elviekben sem lenne lehetőség), hanem koncentrációgradiensek amorf PHB tömbfázisban történő létrehozásán, illetve ezen koncentrációgradiensek időfüggésének mennyiségi analíziséen. Eljárásunkkal a



3. ábra Hipszokrom eltolódás során megfigyelhető változás az abszorpciós csúcs magasságában (□), illetve a csúcs pozíciójában (○)

kiválasztott hatóanyag diffúziós koefficiensé költséghatékonyan és megbízhatóan határozható meg – ez utóbbit igazolja az is, hogy az általunk mért értékek jól közelítik az irodalomban korábban publikált, de más technikával meghatározott adatokat.

A szakmai fejezetek zárásaként a kromatikus csúcseltolódás (3. ábra) mennyiségi analízisére épülő, a hatóanyag-leadás kinetikájának gyors és költséghatékony analíziséét célzó eljárásunkat

mutatjuk be. Ennek elvi hátterét az adja, hogy a hatóanyagot körülvevő molekulák anyagi minősége a kioldódás során mindenképp megváltozik, így a molekula elektronfelhője is

másként torzul. Ez azonban maga után vonja az adszorpciós karakterisztika megváltozását is, így a kioldóközegbe kijutott hatóanyag elnyelési csúcsai módosulni fognak. Ez a jelenség mérésink szerint kiválóan alkalmas arra, hogy segítségével egy darab küvétán belül is nyomon kövessük a hatóanyag hordozóból történő kijutását.

4. Tézisek

1. A PHB hidrolitikus degradációjának részletekbe menő analízise segítségével sikerült bizonyítanunk, hogy a PHB degradációja nem csak a polimer felületén, hanem az egész tömbfázisban is képes lejátszódni. Kimutattuk továbbá azt is, hogy a PHB láncok tördelődése a láncvégekhez közeledve nagyobb valószínűséggel játszódik le [1].
2. Felhasználva, hogy az észterkötés báziskatalizált hidrolízise egy S_N2 típusú bimolekuláris nukleofil szubsztitúció, egy irodalmi előképpel nem rendelkező kinetikai modellt alkottunk, ami a hidrolízis mechanizmusa mellett képes figyelembe venni az egyes bomlástermékek degradáló közegbe történő diffúzióját is. Modellünk ezáltal kimondottan pontosan képes akár a monomer vizes tömbfázisban mérhető koncentrációjának leírására is [1].
3. Méréseink egyértelműen igazolták, hogy a PHB enzimkatalizált lebontása egy kétlépéses folyamat, amely során elsőként az enzim-molekulák adszorbeálódnak a polimer felületén, amit a hidrolízis állandó sebességgel közelíthető fázisa követ. Mindezek figyelembevételével a Michaelis-Menten modell heterogén fázisú enzimreakciókra módosított változatát dolgoztuk ki, ami alkalmasnak bizonyult a mért adatok pontos leírására [2].
4. PCR mutagenézis segítségével olyan inaktivált enzim-molekulákat hoztunk létre, amelyek csak adszorbeálódnak a polimer felületén, a hidrolízist nem katalizálják. Ezen molekulák alkalmazásával sikeresen tudtuk a katalízistól függetlenül vizsgálni az adszorpció folyamatát, illetve meghatározni (az irodalomban elsőként) annak időállandóját. Az inaktivált enzim segítségével egy depolimeráz helyigényét is meg tudtuk becsülni [3].
5. Rendkívül kis átmérő szerinti szórással jellemezhető, szálás szerkezetű PHB scaffoldot állítottunk elő egy nedves szállképzésen alapuló technikával, amelyet

azután sikeresen alkalmaztunk hatóanyag-hordozó mátrixként is. Fick II. törvénye hengersizmetrikus diffúzióra felírt esetének numerikus megoldásával le tudtuk írni a kioldódás időfüggését, illetve meg tudtuk becsülni a diffúziós koefficiens, mindezt úgy, hogy nem kellett bevezetnünk empirikus faktorokat [5].

6. Kifejlesztettünk egy eljárást a diffúziós koefficiens amorf PHB filmekben történő meghatározására, ami szemben a konvencionális, permeáción alapuló vizsgálatokkal, koncentrációgradiens létrehozására, illetve annak időfüggésének mennyiségi analizisére épül. Az időfüggő koncentrációgradiensekre sikeresen illesztettük Fick II. törvényének numerikus megoldásait, amelyek illesztési paraméterként közvetlenül szolgáltatják a keresett diffúziós koefficiens [4].
7. Megalkottunk egy olyan új, kioldásvizsgálat mennyiségi analizisét lehetővé tevő eljárást, ami a hatóanyag molekuláinak fázistranzió során megfigyelhető kromatikus csúcseltolódásán alapul. Miközben a hatóanyag átkerül a hordozóból a vizes fázisba, megváltozik az azt körülvevő molekulák anyagi minősége, így a hatóanyag elektronfelhője másként torzul. Ennek hatására változik a fotonabszorpciós karakterisztika, ami spektrofotometrikan jól nyomon követhető, az így gyűjtött adatok alapján pedig a kioldódás kinetikája Fick II. törvényének numerikus megoldásával leírható, sőt akár előre is jelezhető [6].

5. Publikációk listája

A dolgozat alapját képező publikációk

1. Polyák, P., Szemerszki, D., Vörös, Gy., Pukánszky, B.: Mechanism and kinetics of the hydrolytic degradation of amorphous poly(3-hydroxybutyrate), *Polymer Degradation and Stability* **140**, 1-8 (2017)
DOI:10.1016/j.polymdegradstab.2017.03.021; IF:3.193; I:3(3); [80%]
2. Polyák, P., Dohovits, E., Nagy, G.N., Vértessy, B.G., Vörös, G., Pukánszky, B.: Enzymatic degradation of poly-[(R)-3-hydroxybutyrate]: mechanism, kinetics, consequences, *International Journal of Biological Macromolecules* **112**, 156-162 (2018)
DOI:10.1016/j.ijbiomac.2018.01.104; IF:3.909; I:2(2); [80%]

3. Polyák, P., Urbán, E., Nagy, G.N., Vértessy, B.G., Pukánszky, B.: The role of enzyme adsorption in the enzymatic degradation of an aliphatic polyester, *Enzyme and Microbial Technology* **120**, 110-116 (2019)
DOI:10.1016/j.enzmictec.2018.10.005; IF:2.804; I:0(0); [80%]
4. Polyák, P., Szemerszki, D., Benke, H.C., Pukánszky, B.: A novel method for the determination of diffusion coefficients in amorphous poly(3-hydroxybutyrate), *Polymer Testing* **63**, 342-348 (2017)
DOI:10.1016/j.polymertesting.2017.08.037 IF:2.247 I:2(2) [80%]

Kéziratok

5. Polyák, P., Bartha, K., Benke, H.C., Pukánszky, B.: Quantitative determination of release kinetics from fibrous poly(3-hydroxybutyrate) scaffolds, *in preparation*
6. Polyák, P., Tilinger, D.M., Pukánszky, B.: A simple spectroscopic method for the determination of the release kinetics of drugs from PHB, *in preparation*

További publikációk

1. Polyák, P., Hári, J., Pukánszky, B.: A halloysit mint ásványi töltőanyag és polipropilén kompozitjainak tulajdonságai, *Műanyag és Gumi* **50**(4), 156-159 (2013)
2. Kocsis, K., Polyák, P., Hári, J., Janecska, T., Földes, E., Pukánszky, B.: Természetes antioxidánsal módosított halloysit nanocső stabilizáló hatásának vizsgálata polietilénben, *Műanyag és Gumi* **51**(10), 395-399 (2014)
3. Kirschweg, B., Polyák, P., Pukánszky, B., Vörös, Gy.: A poli(3-hidroxibutirát) hidrolitikus degradációja, *Polimerek* **1**(5), 136-140 (2015)
4. Hári, J., Polyák, P., Mester, D., Mičušík, M., Omastová, M., Kállay, M., Pukánszky, B.: Adsorption of an active molecule on the surface of halloysite for controlled release application: interaction, orientation, consequences, *Applied Clay Science* **132-133**, 167-174 (2016)
5. Polyák, P., Rácz, P., Rózsa, P., Nagy, G.N., Vértessy, B.G., Pukánszky, B.: The novel technique of vapor pressure analysis to monitor the enzymatic degradation of PHB by HPLC chromatography, *Analytical Biochemistry* **521**, 20-27 (2017)

6. Polyák, P., Farkas, Á.E., Somogyi, B., Pukánszky, B.: Poli(3-hidroxi-butirát) mikroszemcsék előállítása és alkalmazása hatóanyag-hordozó mátrixként, *Polimerek* 4(1), 26-32 (2018)
7. Hegyesi, N., Hodosi, E., Polyák, P., Balogh-Weiser, D., Pukánszky, B.: Controlled degradation of poly- ϵ -caprolactone for resorbable scaffolds, *in preparation*
8. Hegyesi, N., Zhang, Y.C., Kohári, A., Polyák, P., Sui, X.F., Pukánszky, B.: Enzymatic degradation of PLA/cellulose nanocrystal composites, *submitted to Biomacromolecules*

Konferencia előadások

1. Polyák, P., Horváth, Zs., Hári, J., Pukánszky, B.: PLA/halloysite nanocomposites: structure and properties, Bipoco 2012, May 27-31, 2012, Siófok, Hungary
2. Polyák, P., Hári, J., Pukánszky, B.: Funkcionális tulajdonságokkal rendelkező halloysit nanocsövek előállítása polimer nanokompozitok fejlesztése céljából, MTA Műanyag és Természetes Polimerek Munkabizottságok ülése, 2013. május 14, Budapest
3. Hári, J., Polyák, P., Pukánszky, P.: Halloysite nanotubes as functional filler in polymer nanocomposites, Eurofillers 2013, August 25-29, 2013, Bratislava, Slovakia
4. Polyák, P., Vágó, B., Hári, J., Tátraaljai, D., Földes, E., Pukánszky, B.: Halloysite nanotubes used as support for quercetin, a novel natural antioxidant for polyethylene, 30th PDDG Meeting, September 1-4, 2013, Paris, France
5. Polyák, P., Hári, J., Omastová, M., Mičušík, M., Pukánszky, B.: Halloysite nanotube as functional filler in polymer nanocomposites, BYPOS 2014, 16-20 June, 2014, Zázrivá, Slovakia
6. Polyák, P., Hári, J., Földes, E., Pukánszky, B.: Halloysite nanotube as functional filler in polyethylene nanocomposites, Eurofillers and Polymer Blends 2015, April 26-30, 2015, Montpellier, France
7. Kirschweng, B., Möring, Zs., Polyák, P., Vörös, Gy., Pukánszky, B.: Hydrolytic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) films: mechanism and kinetics, DVSPM 2015, May 11-13, 2015, Gmunden, Austria

8. Polyák, P., Szemerszki, D., Pukánszky, B.: Determination of diffusion coefficients in amorphous poly(3-hydroxybutyrate) matrices, ABIQG Meeting, 2016. december 8, Budapest, Hungary
9. Polyák, P., Dohovits, E., Pukánszky, B., A PHB enzimátikus degradációja, Oláh György Doktori Iskola Konferencia, 2016. február 11, Budapest
10. Polyák, P., Pukánszky, B.: Quantitative methods for the characterization of the degradation and release kinetics of amorphous poly(3-hydroxybutyrate), ISPAC, June 11-14, 2017, Linz, Austria
11. Polyák, P., Dohovits, E., Nagy, G.N., Vértessy, B.G., Vörös, G., Pukánszky, B.: Enzymatic degradation of poly-[(R)-3-hydroxybutyrate]: mechanism, kinetics, consequences, 33rd PDDG Conference, September 1-5, 2017, Taormina, Italy
12. Faludi, G., Polyák, P., Kirschweng, B., Pukánszky, B.: Hydrolytic degradation of poly(3-hydroxybutyrate) films: mechanism and kinetic description of the reaction, 33rd PDDG Conference, September 1-5, 2017, Taormina, Italy
13. Hegyesi, N., Hodosi, E., Polyák, P., Balogh-Weiser, D., Pukánszky, B.: Controlled degradation of poly- ϵ -caprolactone for resorbable scaffolds, Bipoco 2018, September, 2-6, 2018, Balatonfüred, Hungary
14. Polyák, P., Farkas, Á.E., Somogyi, B., Pukánszky, B.: Preparation and application of poly(3-hydroxybutyrate) microparticles as drug carrier matrices, Bipoco 2018, September, 2-6, 2018, Balatonfüred, Hungary
15. Polyák, P., Szemerszki, D., Benke, H.C., Pukánszky, B.: A novel method for the determination of diffusion coefficients in amorphous poly(3-hydroxybutyrate), Bipoco 2018, September, 2-6, 2018, Balatonfüred, Hungary
16. Polyák, P., Farkas, Á.E., Somogyi, B., Pukánszky, B.: Preparation of monodisperse fractions of poly(3-hydroxybutyrate) particles by chromatographic separation, Bipoco 2018, September, 2-6, 2018, Balatonfüred, Hungary
17. Hegyesi, N., Hodosi, E., Polyák, P., Balogh-Weiser, D., Pukánszky, B.: Halloysite support for an enzyme and its use for the controlled enzymatic degradation of PCL, 8th ICBB, October 24-26, 2018, Budapest, Hungary