

Funkcionális diszperziók: a kolloidstabilitástól az antioxidáns kompozitokig

Szilágyi István MTA doktori értekezés

VÁLASZ BÁNYAI ISTVÁN PROFESSZOR ÚR OPPONENSI VÉLEMÉNYÉRE

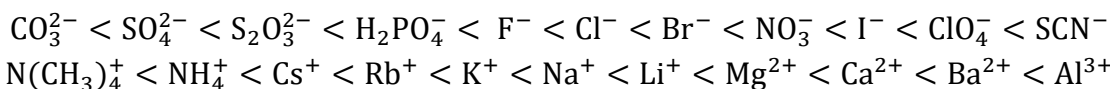
Először is szeretném megköszönni Bányai István professzor úrnak a részletes és pozitív hangvételi bírálatát. Ugyancsak köszönöm a tézispontok elfogadását, illetve az építő jellegű kérdéseket, amelyekre a válaszok az alábbiakban kerülnek ismertetésre.

1. kérdés:

A Bevezetés ismerteti a DLVO elméletet és felhívja a figyelmet az ionspecifikus hatások hiányára, majd a Hofmeister-sorozatot taglalja, illetve a Hardy-Schulze-féle vegyérték szabályt. Ebben a részben kissé szokatlan számomra a közvetlen és közvetett Hofmeister-sorozat fogalmának bevezetése, és így a 4. ábra jelentése. Tudná röviden definiálni a közvetlen és a közvetett fogalmát ezzel kapcsolatban?

Válasz:

Egyetérték a Bírálóval a közvetett és közvetlen Hofmeister sorozat ismertetése túlságosan rövidre sikerült. Bár az elsődleges Hofmeister sorozatot több mint 100 éve megalkotta Franz Hofmeister, ez a téma manapság is nagy figyelmet kap, a publikált cikkek száma százas nagyságrendben mérhető, értelmezése a részecske aggregációs folyamatokra meglehetősen összetett. A határfelületekkel foglalkozó kutatótársadalom által elfogadott Hofmeister sorozat a következőképpen írható fel anionokra és kationokra:



Ebben a tématerület vezető kutatói (például Barry W. Ninham, Werner Kunz és Pierandrea Lo Nostro, lásd 50-51 hivatkozások a doktori műben) is egyetértenek. A relációjelek ugyanazon kolloid részecskék diszperzióinak destabilizálását tekintve a kritikus koaguláló koncentráció (CCC) értékekre alkalmazhatóak. Negatív töltésű részecskék esetén a CCC balról jobbra növekszik, ezt nevezzük közvetlen Hofmeister sorozatnak. Pozitív felületi töltésű részecskék esetén a CCC értékek balról jobbra csökkennek, ami a közvetett Hofmeister sorozatnak felel meg. Azonban Roland R. Netz és munkatársai elméleti számításokon alapuló módszerekkel kapott

eredmények alapján felismerték, hogy ezen sorozatok általában hidrofób karakterű felületek esetében érvényesek, hidrofil jelleg esetén a fenti tendenciák a CCC értékekben megfordulnak (lásd 63. hivatkozás, illetve 4. ábra a doktori műben). Így negatív töltésű hidrofil részecskék esetében a CCC balról jobbra csökken (közvetett sorozat), míg pozitív töltésű hidrofil részecskék esetében a CCC értékek balról jobbra nőnek (közvetlen sorozat).

A fenti tárgyalás bonyolultnak tűnhet, viszont a határfelületekre alkalmazott Hofmeister sorozatra egyszerűbb definíciót nem nagyon lehet adni. A részecske aggregációt tekintve azonban szerencsésebb a többértékű ionokat különválasztani és a Schulze-Hardy szabály szerint tárgyalni, ahogyan a doktori műben is történt.

2. kérdés:

Azt írja a 12 oldalon, hogy a reális nagyságrendű felületi töltés esetében a (4) egyenletben $n = 2$ alkalmazható, sőt a levezetés igazából csak $z:z$ elektrolitokra érvényes. Levezetés van az $n = 6$ értékre (P.C. Hiemenz Colloid and Surface Chemistry 3rd. edition p. 591) és meg is van említve a nagy felületi töltés, mint kritérium. Honnan származik $n = 2$ levezetés? Egyszerűen csak átírjuk a töltést az induló egyenletekben? Ismereteim szerint csak az ellenionnal foglalkozik az elmélet. Hol szerepel a $z:z$ kitétel az elméletben?

Válasz:

A Bíráló észrevételei jogosak, a rövidített doktori műben nem volt lehetőség bővebben kifejteni ezt a kérdést. Az elmúlt évtizedekben sokan foglalkoztak ezzel a témával, a fent említett irodalmi adat mellett még Jacob Israelachvili és Johannes Lyklema munkássága mindenképpen kiemelendő ezen a területen. Az „ $n=2$ levezetés” alapvetően az elektromos kettősrétegek által kifejtett taszítóerőkből, illetve az ezzel összefüggésben levő potenciálviszonyokból következik. Ezek leírására a Debye-Hückel (DH)-féle modellt alkalmazhatjuk a következő feltétel teljesülése esetén:

$$|\psi| \ll \frac{k_B T}{z_{max} e}$$

ahol ψ az elektrosztatikus potenciál, k_B a Boltzmann konstans, T az abszolút hőmérséklet, z_{max} a legnagyobb töltésű ion vegyértéke és e az elemi töltés. Ebben az esetben a potenciál a felülettől való távolsággal (h) a következő egyenlet szerint változik:

$$\frac{d^2 \psi}{dh^2} = \kappa^2 \psi$$

ahol κ az úgynevezett inverz Debye hossz (más néven Debye paraméter), amely definíció szerint:

$$\kappa^2 = \frac{2e^2 I}{\epsilon_0 \epsilon k_B T}$$

ahol ε a közeg relatív permittivitása, ε_0 a vákuum permittivitása és I az ionerősség, amely $z:z$ típusú, c koncentrációjú szimmetrikus elektrolitra:

$$I = z^2 c$$

Tulajdonképpen a $CCC \sim z^2$ összefüggés innen származik, kis töltésű-potenciálú részecskék esetén $z:z$ elektrolitokban a DH megközelítést alkalmazva a potenciálviszonyokra és később az elektromos kettősrétegek által kifejtett erők számítása során. A részletes levezetést a doktori mű T14-es hivatkozásában publikáltuk. Ugyanitt megtalálható a nagy töltésű részecskék esetében alkalmazott Poisson-Boltzmann modell szerinti levezetés is.

A fentiek értelmében a $z:z$ összetétel nem egy „kítétel”, viszont a korábbiakban legtöbbször ilyen típusú elektrolitokra alkalmazták a DH elméletet, ami nem realizisztikus, mivel a többértékű $z:z$ elektrolitok nem túl gyakoriak limitált oldhatóságuk miatt. Természetesen a DH modell levezethető aszimmetrikus ($1:z$) elektrolitra is, ahol az I a következőképpen alakul:

$$I = \frac{z(z+1)c}{2}$$

tehát ebben az esetben megközelítőleg a $CCC \sim z^{1,6}$ összefüggést kapjuk (doktori mű, 11. ábra). Még egyszer szeretném kihangsúlyozni, hogy a DH elmélet kis töltésű-potenciálú részecskékre vonatkozik, nagyobb töltés esetén a potenciálviszonyokra és az elektromos kettősrétegek által kifejtett tasztítóerőkre a Poisson-Boltzmann modell nyújt pontosabb leírást. A Schulze-Hardy szabállyal kapcsolatos ismereteinket a következő publikációban is összefoglaltuk:

G. Trefalt, I. Szilágyi, M. Borkovec, Schulze-Hardy rule revisited, Colloid and Polymer Science 298 (2020) 961-967.

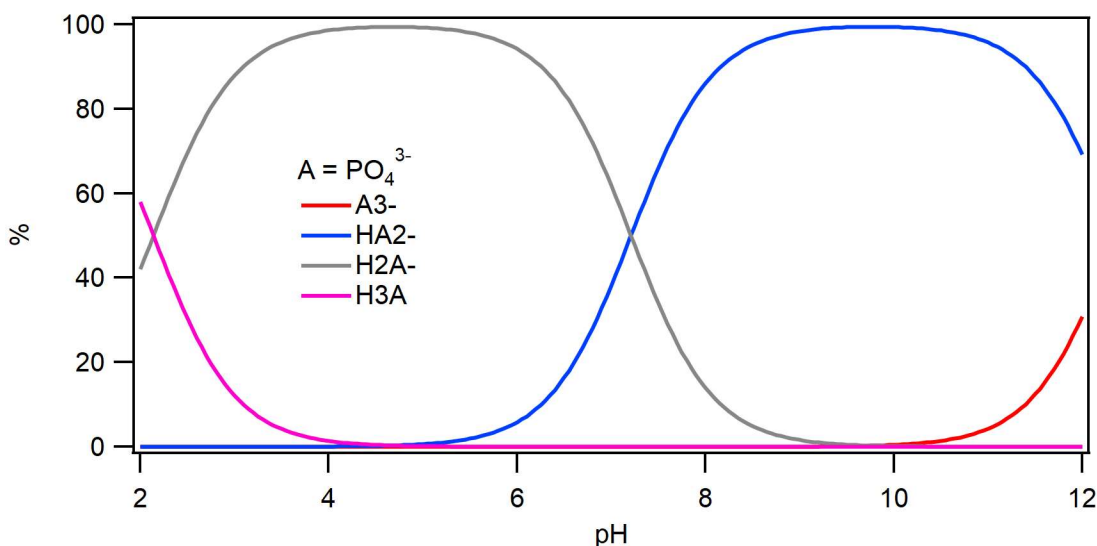
3. kérdés:

Az Egyértékű sók hatása alfejezetben a $H_2PO_4^-$ ion specifikus hatását mutatja (9. ábra). Milyen volt a közeg pH-ja az CCIS meghatározásakor? A pK-k ismeretében mennyi volt a $H_2PO_4^-$ relatív koncentrációja a többi protonált formához képest?

Válasz:

A kérdéses 9. ábrán bemutatott eredmények meghatározásakor pH 10 (negatív töltésű TNS, kör) és pH 4 (pozitív TNS, négyzet) értékek voltak beállítva, hogy vizsgálni tudjuk a TNS részecskék töltés- és elektrolitfüggő aggregációs viszonyait. Valóban ez az információ a szövegben és az ábrafeliratban nem szerepelt, a pH értékek csak az ábrán voltak beszúrva. A PO_4^{3-} és protonált származékjainak aktuális koncentrációit a következő állandók segítségével határoztuk meg: $pK_1=12,35$, $pK_2=7,21$ és $pK_3=2,14$ (Peter M. May által létrehozott „Joint Expert Speciation System” volt a forrás). A számítások elvégzése után azt az eredményt kaptuk, hogy homogén

oldatban pH 4 értéken a H_2PO_4^- molekulák aránya 98,58%, míg pH 10 értéken 0,16%. Ahogyan az alábbi 1v. ábrán bemutatott eloszlásdiagramon is látszik, az utóbbi esetben az uralkodó részecske a HPO_4^{2-} (99,39%) volt.



1v. ábra. Foszfát ion protonálódási egyensúlya során képződött részecskék százalékos eloszlása (%) a pH függvényében. A protonálódási állandók forrása: „Joint Expert Speciation System”.

4. kérdés:

A 25. oldalon a „stabilitási állandók”, meghatározásáról ír. Erre a (3) és az (5) egyenletet alkalmazza. A stabilitási arányról van esetleg szó?

Válasz:

Köszönöm a Bírálónak az észrevételt, valóban itt stabilitási arányról van szó mindkét esetben. Sajnálatos módon itt elírás történt a doktori műben.

5. kérdés:

Szintén magáért beszél a polietilénimin hatása is (18. ábra). Ezzel kapcsolatos kérdésem: Az erő/effektív sugár milyen adat? A korábbi hasonló ábrán csak erő szerepel. Ez egyfajta normalizálás?

Válasz:

Ez is egy nagyon hasznos komment a Bírálótól, ami nem derül ki a kérdéses ábra tárgyalásánál. Az effektív sugár (R_{eff}) alatt a következőt értjük:

$$R_{\text{eff}} = \frac{R_1 R_2}{R_1 + R_2}$$

ahol R_1 és R_2 két különböző gömb alakú részecske, amelyeket az AFM-alapú kolloid próba mérés során közelítünk és távolítunk egymástól, sugarát jelzi. Ugyanakkora méretű részecskék ($R_1 = R_2 = R$) esetében $R_{\text{eff}} = R/2$. Valóban, ez egy normalizálás, ugyanis így lehetőség van különböző méretű részecskék között mért erőhatások összehasonlítására, illetve különféle modellekkel (például Derjaguin-féle megközelítés) számolt értékekkel való összevetésre.

6. kérdés:

A réteges szerkezet megkonstruálása a szekvenciális adszorpció módszerével nagyon értékes kísérleti innováció, ami elvezet a nanorészecskék hangolásához. Egyenes út vezetett innen az enzimikus antioxidánsok rögzítésének megtervezéséhez és kivitelezéséhez. Ennek kapcsán kérdezem. A 21. ábra baloldali részében Michealis-Menten konstansok a görbék illesztéséből származtak? A szövegből modellszámítás tűnik ki. Ha ez utóbbi, akkor a v_{max} és K_m milyen kísérletekből származtak?

Válasz:

A kérdéses ábra bal oldalán folytonos vonallal láthatóak a kísérletileg meghatározott reakciósebesség értékekre illesztett adatok, amelyek az ábrán beszúrt Michaelis-Menten egyenlettel kerültek kiszámításra. A jobb oldalon található konstansok 7 napon át minden egyes nap felvett mérési adatokra (reakciósebesség-gvajakol koncentráció görbék, mint a bal oldalon) illesztett görbékből lettek meghatározva. Ez valóban nem volt egyértelműen megfogalmazva, köszönöm az észrevételt ismét.

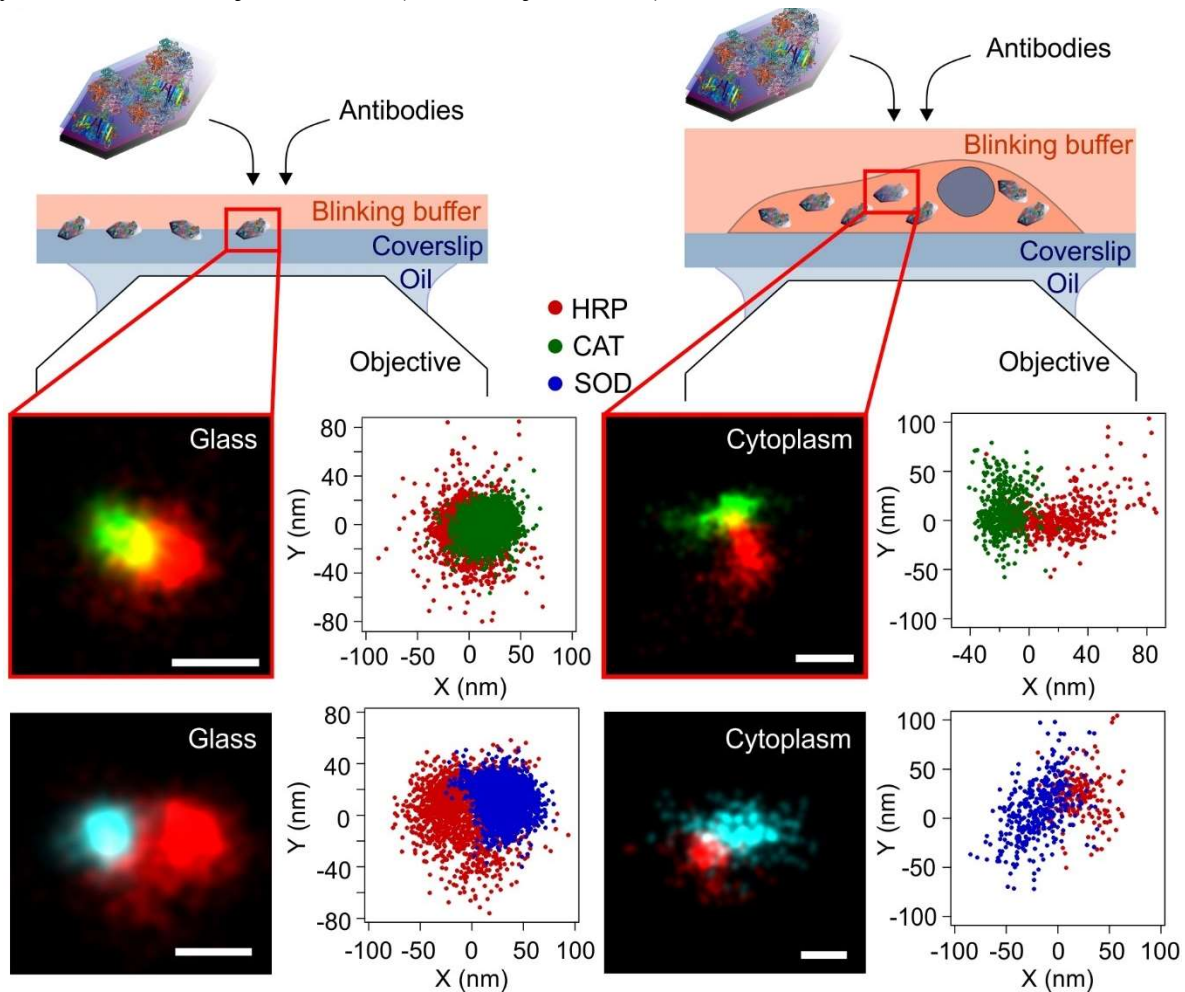
7. kérdés:

A 41. oldalon a kompozitok bejutását a sejtbe a HRP enzim megtalálásával igazolta. Biztos, hogy az egész nanorészecske bejutott a sejtbe? Nem csak az enzim hagyta el, önálló útra térve?

Válasz:

Arra, hogy teljes LDH-HEP-HRP-PLL-SOD-HEP nanorészecske kompozit bejutott a sejtbe ebben a rendszerben közvetlen bizonyítékunk nincs. Közvetett bizonyíték viszont, hogy enzim kioldódást nem tapasztaltunk kísérleteink során, tehát a kompozit szerkezetileg stabilis volt a sejten kívül. Ezen kívül a HRP enzim jelenlétét sikerült kimutatni a sejten belül.

A sejtbe jutást alátámasztandó, egy másik rendszerben, amelyben 3 antioxidáns enzimet (SOD, HRP és kataláz) együttesen immobilizáltunk LDH-polielektrolit hordozón szintén a szekvenciális adszorpció módszerével, a következő eredményt kaptuk. A dSTORM technikát, illetve megfelelő antitestekkel az enzimekhez kötött fluoreszkáló festékeket alkalmazva, vizualizálni tudtuk az egyes enzimeket a sejteken belül (2v. ábra, jobb oldal).



2v. ábra. A dSTORM technikával felvett képek fluoreszkáló molekulákkal jelzett enzimeket tartalmazó LDH-alginát-HRP-trimetil-kitozán-SOD-kataláz kompozitról üveg szubsztrátumon (bal oldal), illetve a citoplazmában (jobb oldal), sejtbe való bejutás után (mérétsáv: 50 nm). Emellett látható a fluoroflórok felvillanási gyakorisága az X és Y dimenziókban. Az eredményeket tartalmazó kézirat bírálólat alatt van („minor revision”) az ACS Materials Letters folyóiratban.

Ahogy a 2v. ábra jobb oldalán is látható, az enzimek egymáshoz közel helyezkednek el a sejten belül, illetve a dSTORM által észlelt objektum dimenziója a hordozó LDH részecske méretével megegyezik. Ezen tények ismeretében valószínűsíthetjük a teljes kompozit sejtbe jutását. Mivel

hasonló részecskék-enzimek-polielektrolitok kerültek alkalmazásra a Bíráló által említett LDH-HEP-HRP-PLL-SOD-HEP rendszerben is, ezért valószínűsíthetjük abban az esetben is a teljes kompozit sejtbe jutását.

8. kérdés:

A nanozyme terminológia hangzatos, de ha jól értem, akkor ezek antioxidáns katalizátorok nanoméretben. Jogos ez az elnevezés? A 24. ábrán mutatott Michealis-Menten modellel jól leírható a kinetika, mint kiderül. A reakció mechanizmusa is megegyezik az enzimek reakciómechanizmusával? Tehát léteznek aktív helyek és a katalízis azokon történik? Az ilyen típusú görbék specifikusak az enzimekre?

Válasz:

Egyetértek a Bírálóval, a „nanozyme” elnevezés hangzatos, de valójában ezek a részecskék nanoméretű bioaktív katalizátorok. Viszont a kutató társadalomban a „nanozyme” a terminológia terjedt el, ennek használatát várják a publikációk benyújtása során is, ezért a kutatócsoportban is követjük ezt a vonalat. Továbbá érdekes kérdéseket vet fel a Bíráló a mechanizmus, aktív helyek és specifikusság szempontjából. Viszont ez a terület még viszonylag fiatal, nem tart annyira előre, hogy a fenti kérdéseket egyértelműen megválaszoljam, illetve az eddigi adatok és konklúziók sokszor ellentmondásosak. Rendkívül sok munka vár még a kutatókra ebben a témában. Többek között a pályázó által elnyert és 2022. decemberében indult haladó MTA Lendület pályázat egyik célkitűzése is enzimszerű működéssel rendelkező nanorészecskék és azok kompozitjainak előállítás, jellemzése és alkalmazása. Ezen belül a reakciók mechanizmusának és a katalizátorok specifikusságának részletes vizsgálata, illetve természetes enzimek hasonló tulajdonságaival való összehasonlítása is fontos feladat. Remélhetőleg, a közeljövő eredményeinek köszönhetően, hamarosan sikerül tisztábban látni ezen rendkívül érdekes és ígéretes katalitikus „nanozyme” rendszerek témakörében.

Még egyszer köszönöm Bányai István professzor úr elismerő szavait és építő jellegű megjegyzéseit, illetve azt, hogy téziseimet nyilvános vitára alkalmasnak találta.

Szeged, 2023. január 9.



Dr. Szilágyi István