

УДК 577.152.192:541.64

## КАТАЛИЗИРУЕМАЯ ЛАККАЗОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИЯ АНИЛИНА НА МНОГОСТЕННЫХ УГЛЕРОДНЫХ НАНОТРУБКАХ: ВЛИЯНИЕ ПОВЕРХНОСТНЫХ КАРБОКСИЛЬНЫХ ГРУПП НА СВОЙСТВА ПОЛИАНИЛИНА

© 2019 г. Г. П. Шумакович<sup>1</sup>, М. Е. Хлупова<sup>1</sup>, И. С. Васильева<sup>1</sup>, Е. А. Зайцева<sup>2</sup>,  
Е. В. Громова<sup>3</sup>, О. В. Морозова<sup>1</sup>, А. И. Ярополов<sup>1, \*</sup>

<sup>1</sup>Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр

“Фундаментальные основы биотехнологии” Российской академии наук, Москва, 119071, Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991, Россия

<sup>3</sup>Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова, Москва, 117997, Россия

\*e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 08.02.2018 г.

После доработки 02.07.2018 г.

Подписано в печать 25.07.2018 г.

Композит полианилин/карбоксилированные многостенные углеродные нанотрубки был синтезирован с использованием грибной лакказы *Trametes hirsuta* в качестве катализатора окислительной полимеризации анилина. Атмосферный кислород являлся окислителем. Димер анилина, адсорбированный на поверхности углеродного наноматериала, служил ускорителем ферментативной полимеризации анилина. Синтез проводили в деионизированной воде в отсутствие кислотного допанта. Изучена структура, морфология и электрохимические характеристики полученного нанокompозита. Показано, что карбоксильные группы на поверхности многостенных углеродных нанотрубок обеспечивали электрохимическую активность полианилина при нейтральных значениях pH раствора.

**Ключевые слова:** лакказа, ферментативная полимеризация, нанокompозиты, полианилин, карбоксилированные многостенные углеродные нанотрубки, допирование

**DOI:** 10.1134/S0555109919010161

Известно, что оксидоредуктазы катализируют окислительную полимеризацию различных ароматических соединений [1–3]. Природным продуктом полимеризации этих соединений является лигнин. В качестве субстратов оксидоредуктаз можно также использовать и техногенные соединения, такие как анилин, тиофен, пиррол и их производные, в результате полимеризации которых образуются электропроводящие полимеры (ЭПП) [4–9]. Так как эти полимеры имеют плохие эксплуатационные характеристики их, как правило, используют в составе композитов.

Углеродные нанотрубки (УНТ) обладают уникальными механическими и электрическими свойствами. Этот углеродный наноматериал перспективен для получения композитов на основе ЭПП. УНТ можно рассматривать как “твердые” матрицы для полимеризации мономеров. Локальное окружение исходного субстрата (pH, заряд матрицы и мономера и концентрационные эффекты), а также возможность формировать на матрицах упорядоченное расположение мономера с последующей его ферментативной полимеризацией, составляет

особенность матричной полимеризации, позволяющей направлять ферментативную реакцию в нужном направлении.

Композиты ЭПП/УНТ могут быть использованы в различных устройствах, например, суперконденсаторах и био-/хемосенсорах, для защиты поверхностей от электромагнитного излучения, в биоэлектронике и др. [10–13]. Традиционный способ получения композитов ЭПП/УНТ включает химическую полимеризацию мономера с использованием больших количеств окислителя в присутствии кислотных допантов, обеспечивающих электропроводность полимеров. Допантами называют доноры или акцепторы электронов, которые при взаимодействии с основной цепью полимера приводят к образованию на ней зарядов, обуславливающих электропроводность полимера. Допанты выполняют роль заряд-компенсирующих анионов положительно заряженной цепи полимера. В качестве допантов используют сильные низкомолекулярные кислоты и полимерные сульфокислоты.

Химическая полимеризация мономеров кинетически не контролируемый процесс [14], и полимер образуется не только на поверхности углеродных нанотрубок, но и в объеме раствора. Альтернативой химическому способу является ферментативный синтез с участием оксидоредуктаз, в частности лакказы, который протекает в “мягких” условиях в кинетически контролируемом режиме [15, 16].

Известно, что при  $\text{pH} > 3.0$  в отсутствие матрицы электропроводящий полианилин (ПАНИ) находится в дедопированном состоянии, то есть полимер электрохимически неактивен и неэлектропроводен [17].

Цель работы — без применения каких-либо кислотных допантов получить композит ПАНИ/многостенные углеродные нанотрубки (МУНТ) с использованием лакказы базидиального гриба *T. hirsuta* в качестве катализатора и димера анилина N-фенил-*n*-фенилендиамин, адсорбированного на карбоксилированных МУНТ, в качестве ускорителя ферментативной реакции [18].

## МЕТОДИКА

В работе был использован анилин (АН) (“Лаб-Тех”, Россия), очищенный вакуумной перегонкой, и N-фенил-*n*-фенилендиамин (АД) (“Sigma-Aldrich”, США) без дополнительной очистки. В качестве токоотвода при изготовлении композитного электрода использовали углеродную фольгу “Графлекс” (“Унихимтех”, Россия). Многостенные углеродные нанотрубки Таунит-М (“НаноТех Центр”, Россия) были предварительно обработаны концентрированной азотной кислотой при 70°C, а затем промыты деионизированной водой до нейтрального значения pH (они обозначены как фМУНТ). В работе использовали деионизированную воду, полученную на установке Simplicity (“Millipore”, США).

Лакказу с удельной активностью 140 МЕ/мл, получали из культуральной жидкости базидиального гриба *Trametes hirsuta* согласно методу [19]. За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего окисление 1 мкмоль диаммониевой соли 2,2'-азино-бис(3-этилбензотиазолин-6-сульфоновой) кислоты за 1 мин при pH 4.5.

АД предварительно адсорбировали на поверхности фМУНТ, а его избыток, не связавшийся с поверхностью углеродного наноматериала, отмывали деионизированной водой.

Композит ПАНИ/фМУНТ получали *in situ* полимеризацией АН в отсутствие допантов и компонентов буферных смесей на поверхности фМУНТ. 10 мг фМУНТ с предварительно адсорбированным АД диспергировали в 10 мл деионизированной воды в ультразвуковой ванне (“FinnSonic”, Финляндия). Затем к дисперсии добавляли

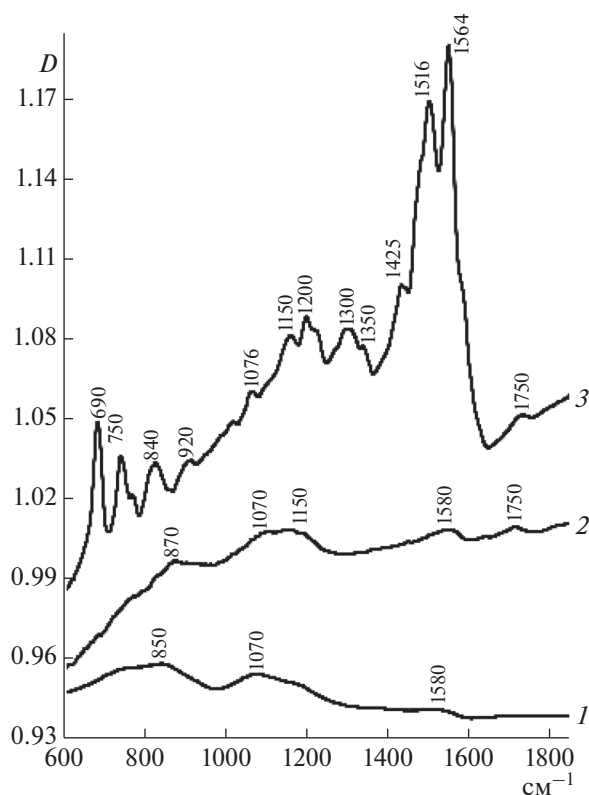
АН в весовых соотношения АН/фМУНТ = 2 : 1; 5 : 1 и 10 : 1 и инициировали реакцию добавлением лакказы. Удельная активность фермента в реакционной среде составляла ~0.6 МЕ/мл. Полимеризацию проводили в аэробных условиях в течение 24 ч при комнатной температуре и постоянном перемешивании. Затем осадок ПАНИ/фМУНТ отделяли центрифугированием, промывали деионизированной водой, высушивали при 70°C до постоянного веса и использовали в дальнейших исследованиях. Для сравнения в аналогичных условиях был синтезирован композит на основе исходных (не карбоксилированных) МУНТ с весовым соотношением АН/МУНТ = 2 : 1.

Электрохимические измерения проводили методом циклической вольтамперометрии в трехэлектродном режиме с использованием биоаналитического анализатора CV-50W (“BAS”, США). В качестве электрода сравнения применяли хлор-серебряный электрод (“BAS”, США), а вспомогательным электродом служила платиновая пластина. Рабочим электродом служила графитовая фольга с нанесенным композитом, для изготовления которого известный объем спиртовой дисперсии композита наносили на поверхность углеродной фольги без связующего и высушивали.

Морфологию образцов изучали методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ) с использованием сканирующего электронного микроскопа Supra 40VP (“Carl Zeiss Microscopy GmbH”, Германия). ИК-Фурье спектроскопии (Fourier transformed infrared spectroscopy, FTIR) проводили по стандартной методике с использованием таблеток KBr на спектрометре Frontier FT-IR/FIR (“PerkinElmer Inc”, США).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

**Карбоксилирование поверхности МУНТ.** При обработке МУНТ кислотами-окислителями нарушается система сопряжения  $\pi$ - $\pi$  связей внешней графитовой поверхности нанотрубок, в результате чего на поверхности МУНТ образуются гидрофильные карбоксильные группы [20–22], что приводит к гидрофилизации поверхности углеродного наноматериала и, как следствие, к улучшению его совместимости с полярными растворителями. Обработка МУНТ концентрированной азотной кислотой позволила получить стабильные дисперсии фМУНТ в воде. Изучение исходных и карбоксилированных фМУНТ методом ИК спектроскопии с преобразованием Фурье (рис. 1, 1 и 2) показало, что на обоих спектрах присутствуют полосы поглощения, соответствующие валентным колебаниям ароматического кольца ( $1580 \text{ см}^{-1}$ ) и деформационным колебаниям связи C–H ( $1070$  и  $820\text{--}900 \text{ см}^{-1}$ ). После обработки азотной кислотой на поверхности фМУНТ



**Рис. 1.** ИК-Фурье спектры исходных МУНТ (1), карбоксилированных фМУНТ (2) и композита ПАНИ/фМУНТ, синтезированного при исходном весовом соотношении АН/фМУНТ = 2 : 1 (3).

образовывались карбоксильные группы, имеющие характерные полосы колебания связей в области  $1750\text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}=\text{O}$ ) и  $1180\text{ см}^{-1}$  ( $\text{C}-\text{O}$ ) [20, 22].

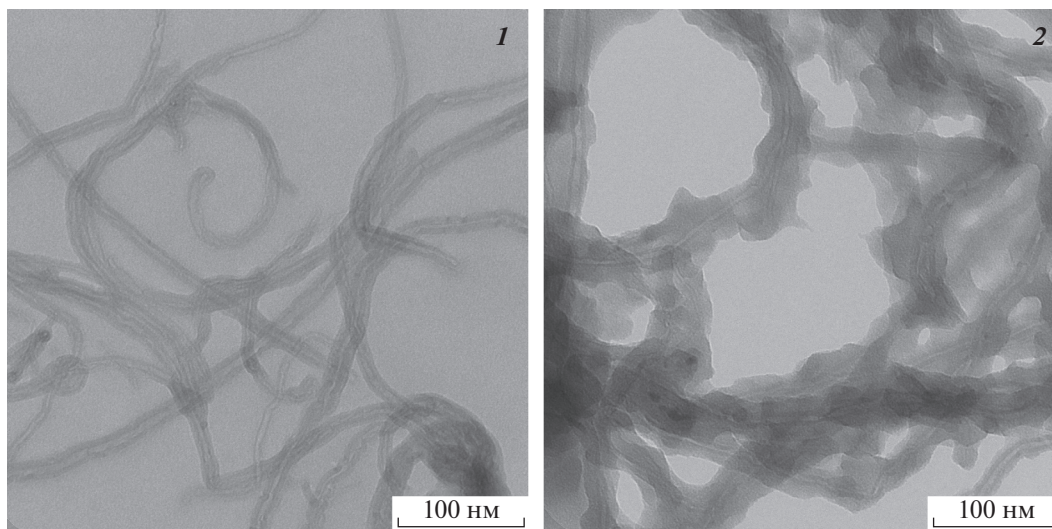
**Физико-химические характеристики синтезированного ферментативно композита.** В полученном композите ПАНИ/фМУНТ определяли структу-

ру повторяющихся звеньев ПАНИ, морфологию, электропроводность и электрохимическую стабильность.

На ИК-Фурье спектре (рис. 1, 3) композита ПАНИ/фМУНТ присутствовали полосы поглощения в области  $1564$  и  $1516\text{ см}^{-1}$ , соответствующие колебаниям хиноиддиминовых и фенилендиаминных единиц ПАНИ в эмеральдиновом состоянии окисления [23]. Полосы поглощения в области  $1280$ – $1350\text{ см}^{-1}$  относились к  $\text{C}-\text{N}$  колебаниям вторичных ароматических аминов, а в области  $1200$ – $1225$  и  $650$ – $900\text{ см}^{-1}$  – к деформационным колебаниям  $\text{C}-\text{H}$  связи в 1,4-замещенных ароматических структурах [24, 25].

Морфологию фМУНТ и ферментативно синтезированных композитов изучали методом просвечивающей электронной микроскопии. На рис. 2 представлены ПЭМ-изображения (1) фМУНТ, модифицированных АД, и композита ПАНИ/фМУНТ, синтезированного при исходном весовом соотношении АН/фМУНТ = 2 : 1 (2). Как видно на рис. 2, в результате катализируемой лакказой полимеризации анилина на поверхности фМУНТ образовывался достаточно однородный слой полимера. Кроме того, в композите отсутствовал полимер, не связанный с поверхностью фМУНТ.

Известно, что ПАНИ, синтезированный без допантов при нейтральных или слабо кислых значениях рН реакционной среды, имеет разветвленную структуру и не обладает электропроводностью и электрохимической активностью [24, 26]. Для выяснения влияния заряженных групп на поверхности “твердой” матрицы на электрохимическую активность ПАНИ в составе композита ПАНИ/фМУНТ синтез проводили в деионизированной воде.



**Рис. 2.** ПЭМ-изображения фМУНТ с адсорбированным АД (1) и композита ПАНИ/фМУНТ (2).

Композиты ПАНИ/фМУНТ, полученные при различных весовых соотношениях мономера и фМУНТ, проявляли электрохимическую активность (рис. 3, 1–3). На циклических вольтамперограммах видны катодные и анодные максимумы токов, соответствующие редокс-превращению ПАНИ в составе композитов. Необходимо отметить, что удельная электрохимическая емкость композитов значительно уменьшалась при увеличении весового соотношения АН/фМУНТ. Это можно было объяснить тем, что только ПАНИ, связанный с поверхностью карбоксилированных фМУНТ, обладал электрохимической активностью, а образовавшийся в объеме реакционной среды “свободный” полимер не был электропроводящим и оказался “балластом”, уменьшающим удельную емкость композитов. В то же время ПАНИ в композите, синтезированном с использованием исходных МУНТ, также не обладал электрохимической активностью (рис. 3, 4).

Таким образом, влияние “твердой” матрицы (фМУНТ) на электроактивность полимера в составе композита определялось наличием заряженных карбоксильных групп на поверхности углеродного наноматериала.

Было изучено влияние рН на электрохимическую активность ПАНИ в составе композита, синтезированного при исходном весовом соотношении АН/фМУНТ = 2 : 1. Известно, что при использовании низкомолекулярных кислот в качестве допантов взаимодействие между допантом и цепью ПАНИ при рН > 3.0 нарушается и полимер переходит в дедопированное состояние [17]. Эта форма ПАНИ является электрохимически неактивной и неэлектропроводной. Методом циклической вольтамперометрии было показано, что даже при рН 7.0 ПАНИ в составе композита ПАНИ/фМУНТ обладал электрохимической активностью (рис. 4).

Как видно на рис. 4, при увеличении рН раствора возрастала необратимость реакции окисления/восстановления ПАНИ в составе композита. Тем не менее, полимер оставался электрохимически активным при нейтральных значениях рН раствора. По-видимому, в результате многоочечного электростатического взаимодействия положительно заряженной основной цепи ПАНИ с карбоксильными группами матрицы, образовывался прочный комплекс ПАНИ/фМУНТ, который не разрушался при повышении рН раствора до нейтральных значений.

Таким образом, композит ПАНИ/фМУНТ полученный *in situ* ферментативной полимеризацией анилина на поверхности карбоксилированных фМУНТ, обладал электрохимической активностью и электропроводностью, то есть поверхностные карбоксильные группы фМУНТ выполняли роль допанта основной положительно

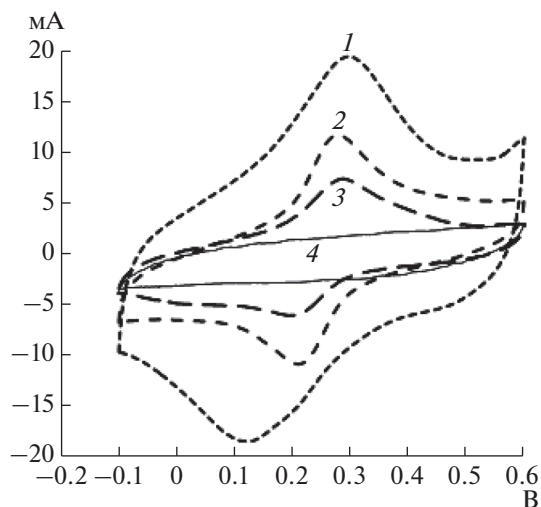


Рис. 3. Циклические вольтамперограммы, записанные на электродах из композитов ПАНИ/фМУНТ, синтезированных при весовых соотношениях АН/фМУНТ – 2 : 1 (1), 5 : 1 (2) и 10 : 1 (3) и композита ПАНИ/МУНТ (4); (Рабочий электролит 1 М  $\text{H}_2\text{SO}_4$ ; скорость изменения потенциала 50 мВ/с)

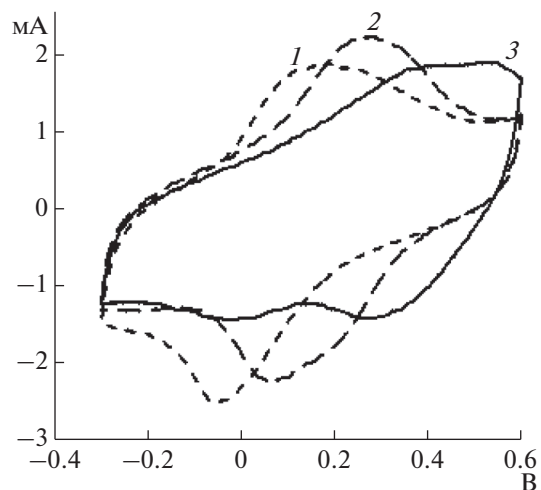


Рис. 4. Циклические вольтамперограммы композита ПАНИ/фМУНТ, записанные при рН 2.8 (1), 5.0 (2) и 7.0 (3). (Рабочий электролит 0.1 М цитратно-фосфатный буфер; скорость изменения потенциала 50 мВ/с).

заряженной цепи ПАНИ. Композит проявлял электрохимическую активность при рН 7.0, что не характерно для ПАНИ, допированного низкомолекулярными кислотами.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-04-00378а).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kobayashi S., Uyama H., Kimura S. // Chem. Rev. 2001. V. 101. № 12. P. 3793–3818.
2. Walde P., Guo Z. // Soft Matter. 2011. V. 7. P. 316–331.
3. Hollmann F., Arends I.W.C.E. // Polymers. 2012. V. 4. № 1. P. 759–793.
4. Xu P., Singh A., Kaplan D.L. // Adv. Polym. Sci. 2006. V. 194. P. 69–94.
5. Rumbau V., Pomposo J.A., Eleta A., Rodriguez J., Grande H., Mecerreyes D., Ochoteco E. // Biomacromolecules. 2007. V. 8. № 2. P. 315–317.
6. Nagarajan S., Kumar J., Bruno F.F., Samuelson L.A., Nagarajan R. // Macromolecules. 2008. V. 41. № 9. P. 3049–3052.
7. Kausaite A., Ramanavicius A. // Polymer. 2009. V. 50. № 8. P. 1846–1851.
8. Liu W., Kumar J., Tripathy S., Senecal K.J., Samuelson L. // J. Am. Chem. Soc. 1999. V. 121. № 1. P. 71–78.
9. Vasil'eva I.S., Shumakovich G.P., Morozova O.V., Khlupova M.E., Vasiliev R.B., Zaitseva E.A., Yaropolov A.I. // Chemical Papers. 2018. doi 10.1007/s11696-018-0396-8
10. Zhang Y., Zu L., Lian H., Hu Z., Jiang Y., Liu Y., Wang X., Cui X. // J. Alloys Compounds. 2017. V. 694. P. 136–144.
11. Boeva Z.A., Milakin K.A., Pesonen M., Ozerin A.N., Sergeyev V.G., Lindfors T. // RSC Adv. 2014. V. 4. P. 46340–46350.
12. Milakin K.A., Korovin A.N., Moroz E.V., Levon K., Guiseppi-Elie A., Sergeyev V.G. // Electroanalysis. 2013. V. 25. № 5. P. 1323–1330.
13. Malliaras G.G. // Biochim. Biophys. Acta. 2013. V. 1830. № 9. P. 4286–4287.
14. Tzou K., Gregory R.V. // Synth. Met. 1992. V. 47. P. 267–277.
15. Witayakran S., Ragauskas A.J. // Adv. Synth. Catal. 2009. V. 351. № 9. P. 1187–1209.
16. Streltsov A.V., Morozova O.V., Arkharova N.A., Klechkovskaya V.V., Staroverova I.N., Shumakovich G.P., Yaropolov A.I. // J. Appl. Polym. Sci. 2009. V. 114. № 2. P. 928–934.
17. Su C., Wang G., Huang F. // J. Appl. Polym. Sci. 2007. V. 106. № 6. P. 4241–4247.
18. Otrokhov G.V., Shumakovich G.P., Khlupova M.E., Vasil'eva I.S., Kaplan I.B., Zaitchik B.T., Zaitseva E.A., Morozova O.V., Yaropolov A.I. // RSC Adv/ 2016. V. 6. № 65. P. 60372–60375.
19. Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В., Морозова О.В., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Прикл. биохимия и микробиология. 2006. Т. 42. № 6. С. 638–644.
20. Goyanes S., Rubiolo G.R., Salazar A., Jimeno A., Corcuera M.A., Mondragon I. // Diamond Relat. Mater. 2007. V. 16. № 2. P. 412–417.
21. Datsyuk V., Kalyva M., Papagelis K., Parthenios J., Tasis D., Siokou A., Kallitsis I., Galiotis C. // Carbon. 2008. V. 46. № 6. P. 833–840.
22. Avilés F., Cauich-Rodríguez J.V., Moo-Tah L., May-Pat A., Vargas-Coronado R. // Carbon. 2009. V. 47. № 13. P. 2970–2975.
23. Wei Y., Hariharan R., Patel S.A. // Macromolecules. 1990. V. 23. № 3. P. 758–64.
24. Lim C.H., Yoo Y.J. // Process Biochem. 2000. V. 36. № 3. P. 233–241.
25. Cruz-Silva R., Romero-Garcia J., Angulo-Sanchez J.L., Ledezma-Perez A., Arias-Marin E., Moggio I., Flores-Loyola E. // Eur. Pol. J. 2005. V. 41. № 5. P. 1129–1135.
26. Lux F. // Polymer. 1994. V. 35. № 14. P. 2915–2936.

## Laccase – Catalyzed Aniline Polymerization on Multi–Walled Carbon Nanotubes: Effect of Surface Carboxyl Groups on Polyaniline Properties

G. P. Shumakovich<sup>a</sup>, M. E. Khlupova<sup>a</sup>, I. S. Vasil'eva<sup>a</sup>, E. A. Zaitseva<sup>b</sup>, E. V. Gromova<sup>c</sup>,  
O. V. Morozova<sup>a</sup>, and A. I. Yaropolov<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Bach Institute of Biochemistry, Research Center of Biotechnology of the Russian Academy of Sciences, Moscow, 119071 Russia

<sup>b</sup>Department of Chemistry, Lomonosov Moscow State University, Moscow, 119991 Russia

<sup>c</sup>Pirogov Russian National Research Medical University(RNRMU), Moscow, 117997 Russia

\*e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru

Received February 08, 2018

Revised July 02, 2018

Accepted July 25, 2018

Composites polyaniline/acidic modified multi-walled carbon nanotubes were synthesized using fungal laccase *Trametes hirsuta* as the catalyst of aniline polymerization. Atmospheric oxygen was an oxidant. Only carboxylic groups on multi-walled carbon nanotubes provided electrochemical activity of polyaniline in neutral pH solution without any acidic dopant. Aniline dimer adsorbed on the surface of acidic treated carbon nanomaterial served as accelerator of enzymatic aniline polymerization. The structure, morphology and electrochemical characteristics were investigated.

**Keywords:** laccase, enzymatic polymerization, nanocomposites, polyaniline, multi-walled carbon nanotubes, dopant