

УДК 577.152.192.31; 547.99

ИЗУЧЕНИЕ ОКИСЛЕНИЯ N,N,N',N'-ТЕТРАМЕТИЛ-*n*-ФЕНИЛЕНДИАМИНА ДЛЯ ВЫЯСНЕНИЯ РАЗЛИЧИЙ В МЕХАНИЗМАХ БИОКАТАЛИТИЧЕСКОЙ И ХИМИЧЕСКОЙ ПОЛИМЕРИЗАЦИИ АНИЛИНА

О.В. Морозова¹, М.Е. Хлупова¹, И.С. Васильева¹, Г.П. Шумакович¹,
Е.А. Зайцева², А.И. Ярополов^{1*}

(¹Институт биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН; ²кафедра химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова; *e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru)

Реакции химической и ферментативной полимеризации анилина имеют существенные различия, для выяснения которых было изучено окисление N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД) с использованием пероксидисульфата аммония и высоко редокс-потенциальной лакказы *Trametes hirsuta*. В отличие от реакции, катализируемой лакказой, химическое окисление ТМФД протекает в две стадии. Образующийся на первой стадии катион-радикал окисляется пероксидисульфатом ионом до хиноиддиимина, который может взаимодействовать с исходным ТМФД. Кинетику образования катион-радикала ТМФД^{•+} исследовали методами УФ-видимой спектроскопии и ЭПР-спектроскопии. Полученные данные позволили сделать предположение о различии в механизмах химической и ферментативной полимеризации анилина.

Ключевые слова: биокатализ, лакказа, анилин, полимеризация, тетраметил-*n*-фенилендиамин, механизм окисления.

Полианилин (ПАНИ) относится к наиболее интенсивно исследуемым электропроводящим полимерам благодаря стабильности в условиях окружающей среды, низкой стоимости, простоте получения и уникальным физико-химическим характеристикам. Эти свойства ПАНИ определяют широкие перспективы его использования в разных областях [1–3]. Как правило, ПАНИ получают химическим методом в сильноокислой среде с использованием таких окислителей, как пероксидисульфаты, перманганаты и соли трехвалентного железа. Реакция химической полимеризации анилина протекает по автокаталитическому механизму с большим периодом индукции [4]. В процессе реакции происходит образование радикалов анилина и промежуточных продуктов его полимеризации, а также окислителя (например, пероксидисульфата аммония) [5]. Химическая полимеризация анилина – сложная многостадийная реакция, в результате которой наряду с электропроводящим ПАНИ образуются различные побочные продукты.

Ферментативный способ получения ПАНИ представляет собой весьма привлекательную альтернативу традиционному химическому методу. В качестве катализаторов окислительной полимеризации анилина мономера перспективны

высокопотенциальные грибные лакказы [6]. Лакказа (*n*-дифенол:кислород оксидоредуктаза, КФ 1.10.3.2) катализирует окисление широкого круга органических соединений, в том числе анилина, атмосферным кислородом, который восстанавливается в процессе реакции до воды [7–10]. Таким образом, биокаталитическое получение анилина привлекательно с экологической точки зрения.

Ранее было показано, что ферментативная полимеризация анилина протекает в «мягких» условиях (слабокислые растворы, комнатная температура) без индукционного периода: электропроводящий ПАНИ образуется сразу после иницирования реакции ферментом [11–13].

Для изучения химической и ферментативной полимеризации анилина мы использовали N,N,N',N'-тетраметил-*n*-фенилендиамин (ТМФД). ТМФД хорошо растворяется в воде и легко окисляется до стабильного катион-радикала [14]. Из-за наличия метильных заместителей в аминогруппах ТМФД, в отличие от анилина, не способен к полимеризации. Сравнивая реакции ферментативного и химического окисления ТМФД, можно определить, в чем состоит различие начальных стадий ферментативной и химической полимеризации анилина.

Настоящая работа посвящена исследованию реакции окисления ТМФД с участием лакказы и пероксидисульфата аммония в целях выяснения различий в начальных стадиях ферментативной и химической полимеризации анилина.

Экспериментальная часть

Реактивы. В работе использованы реактивы: K_2HPO_4 , NaOH, лимонная кислота, 2,2'-азинобис(3-этилбензтиазолин-6-сульфонат) (АБТС), ТМФД («Sigma-Aldrich», США). Анилин («Sigma-Aldrich», США) был очищен вакуумной перегонкой. Все растворы были приготовлены с использованием деионизированной воды, полученной на установке «Milli Q-system» («Millipore», США).

Ферменты. Лакказа базидиального гриба *Trametes hirsuta* была очищена до гомогенного состояния по методике, описанной в работе [15]. Концентрацию белка определяли по разности значений оптической плотности при длинах волн 228,5 и 234,5 нм с использованием калибровочной кривой [16]. Активность фермента измеряли спектрофотометрически с использованием 1 мМ АБТС в качестве хромогенного субстрата ($\lambda = 420$ нм, $\varepsilon = 36000 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) при комнатной температуре в Na-цитратно-фосфатном буфере (pH 4,5). За единицу активности (МЕ) принимали количество фермента, катализирующее окисление 1 мкмоль субстрата за 1 мин. Удельная активность лакказы составляла ~158 МЕ/мг белка.

Методы исследований. Для проведения спектрофотометрических измерений использовали спектрофотометр «UV1240 mini» («Shimadzu»,

Япония) в 50 мМ Na-цитратном буферном растворе (pH 3,8) при температуре 22 °С.

Регистрацию ЭПР-спектров продуктов окисления ТМФД осуществляли на приборе «Рубин» (Новосибирск, Россия) в кварцевых ампулах переменного диаметра. В качестве стандарта использовали сигналы Mn^{2+} , MnO и угля. Число радикалов рассчитывали с помощью метода двойного интегрирования.

Электрохимические эксперименты проводили в 50 мМ Na-цитратно-фосфатного буферного раствора (pH 3,5) при температуре ~22 °С на вольтамперометрическом анализаторе «CV-50W» («BAS», США) по трехэлектродной схеме. В качестве рабочего использовали стеклоуглеродный электрод («BAS», США), электрод Ag/AgCl («BAS», США) служил электродом сравнения, а платиновая проволока – вспомогательным электродом.

Результаты и обсуждение

Электроокисление анилина на стеклоуглеродном электроде протекает при потенциале выше 750 мВ (рис. 1, а). При этом на катодной ветви циклической вольтамперограммы (ЦВА) наблюдаются пики в области ~550 и ~300 мВ, характерные для процесса формирования пленки ПАНИ на поверхности электрода. Электроокисление ТМФД (рис. 1, б) протекает в две стадии. На первой стадии образуется катион-радикал (редокс-процесс в области ~270 мВ), который при дальнейшем окислении переходит в хиноиддиминовую форму (~520 мВ). Необходимо отметить, что после нескольких циклов сканирования потенциа-

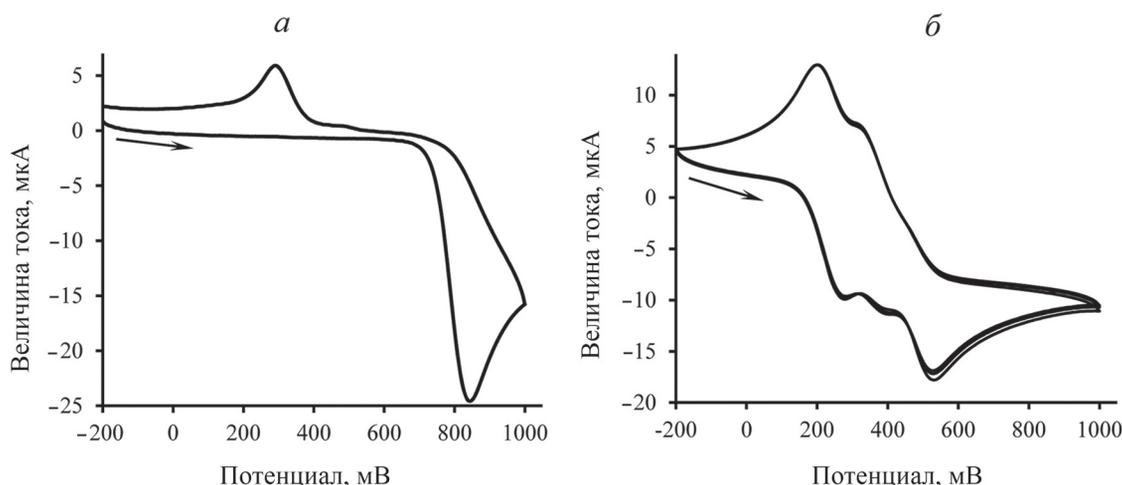


Рис. 1. Циклические вольтамперограммы, записанные в растворе анилина (а) и ТМФД (б). Условия: 50 мМ Na-цитратно-фосфатный буферный раствор (pH 3,5), температура ~21 °С, [анилин] = 1 мМ, [ТМФД] = 1 мМ

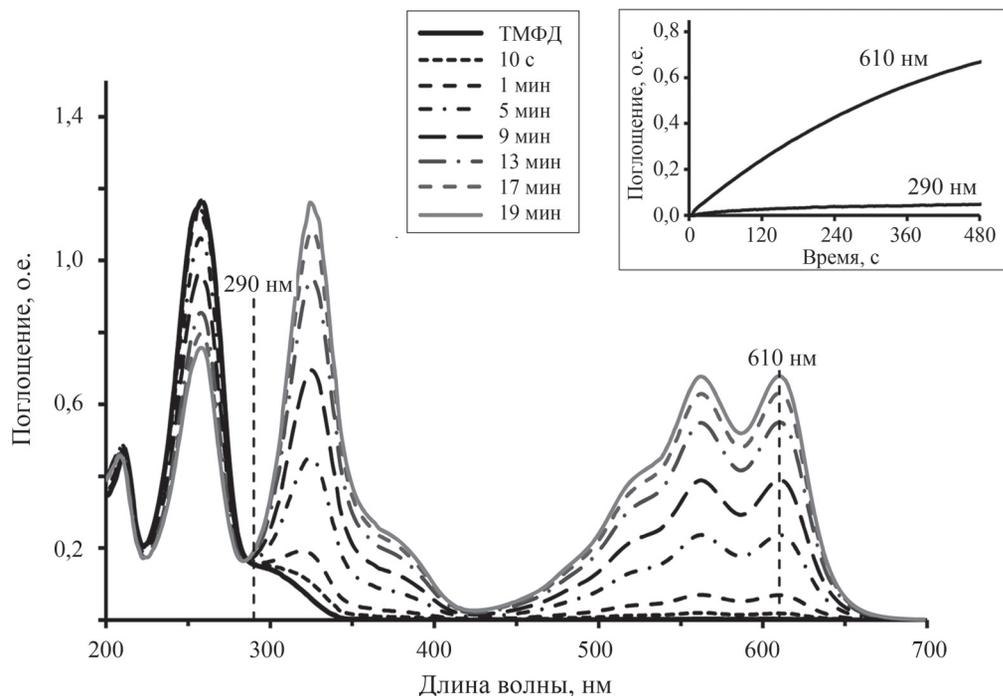


Рис. 2. Изменение во времени УФ-видимых спектров продуктов ферментативного окисления ТМФД ([ТМФД] = 0,08 мМ, активность фермента 0,1 МЕ/мл). Вставка: Кинетика накопления продуктов ([ТМФД] = 0,05 мМ, активность фермента 0,5 МЕ/мл)

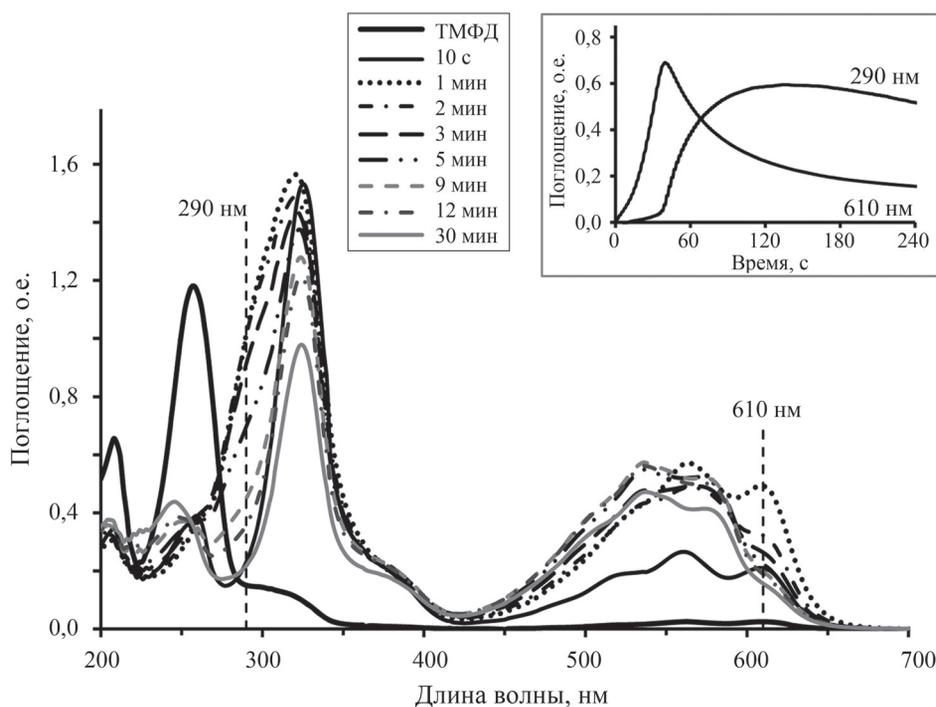


Рис. 3. Изменение во времени УФ-видимых спектров продуктов химического окисления ТМФД ([ТМФД] = 0,08 мМ, [(NH₄)₂S₂O₈] = 0,016 мМ). Вставка: Кинетика накопления продуктов ([ТМФД] = 0,05 мМ, [(NH₄)₂S₂O₈] = 0,1 мМ)

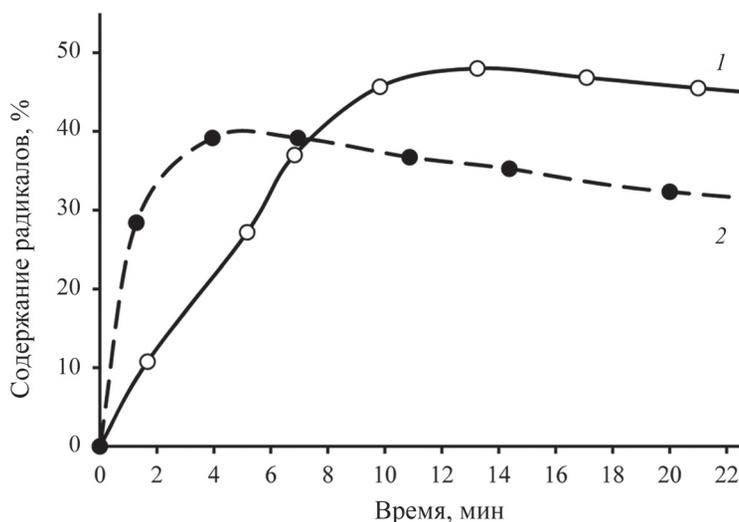


Рис. 4. Динамика изменения относительного количества катион-радикалов в процессе ферментативного (1) и химического (2) окисления ТМФД ($[ТМФД] = 0,5$ мМ; $[(NH_4)_2S_2O_8] = 1$ мМ; активность фермента 2 МЕ/мл)

ла вид ЦВА не меняется. Это свидетельствует об отсутствии полимеризации ТМФД.

Известно, что продукты окисления ТМФД имеют на УФ-видимых спектрах характерные полосы поглощения (560 и 610 нм для катион-радикала [17] и 290 нм для хиноиддииминной формы [18]), что облегчает их идентификацию и позволяет использовать в экспериментах метод УФ-видимой спектроскопии.

При лакказы-катализируемом окислении ТМФД происходит постепенное накопление катион-радикала, о чем свидетельствует увеличение поглощения в области 560 и 610 нм, с одновременным уменьшением пика исходного ТМФД в области 260 нм (рис. 2). При этом образование хиноид-

дииминной формы ТМФД не происходит (рис. 2, вставка). Были определены кинетические параметры реакции ферментативного окисления ТМФД: $V_{\text{макс.}} = 0,29$ мМ/мин, $K_M = 2,91$ мМ.

При химическом окислении ТМФД в течение ~ 1 мин поглощение в областях, соответствующих катион-радикалу (рис. 3), резко увеличивается, а затем уменьшается. Одновременно на спектрах появляется плечо в области 290 нм, что обусловлено образованием хиноиддииминной формы ТМФД²⁺, происходящим с индукционным периодом (рис. 3, вставка). Хиноиддииминная форма и исходный ТМФД взаимодействуют с образованием катион-радикала.

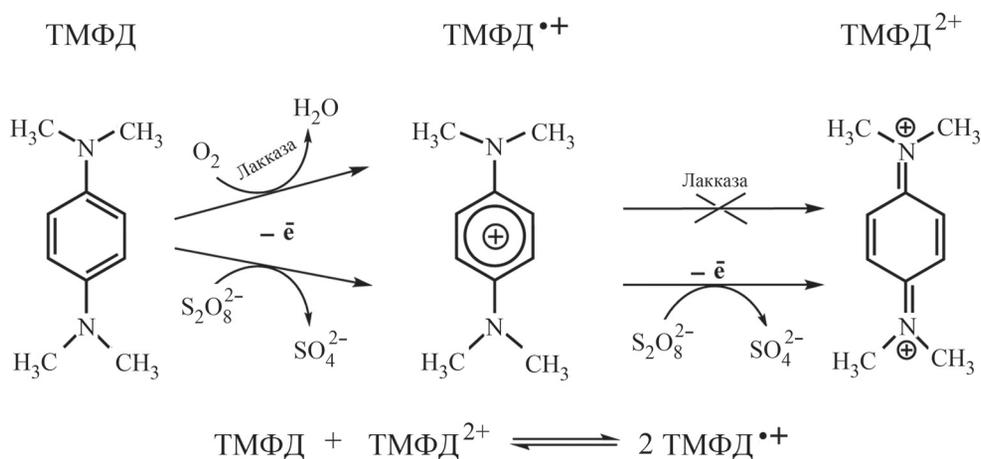


Рис. 5. Схема реакции окисления ТМФД

Образование катион-радикалов в процессе как химического, так и ферментативного окисления ТМФД было подтверждено методом ЭПР (рис. 4). Динамика изменения во времени относительного числа катион-радикалов при химическом и ферментативном окислении ТМФД согласуется с данными УФ-видимой спектроскопии. В процессе химического окисления ТМФД происходит быстрое накопление катион-радикалов, после чего их число постепенно снижается, что может быть связано с дальнейшим окислением катион-радикала до хиноиддииминной формы. При ферментативном окислении накопление радикалов в реакционной системе происходит постепенно (максимум на кривой смещен вправо по сравнению с химическим окислением), после чего их число также медленно снижается.

Как при ферментативном, так и при химическом окислении ТМФД на первой стадии образуется катион-радикал ТМФД^{•+} (рис. 5). В случае химического окисления катион-радикал может окисляться пероксидисульфат ионом до хиноиддииминной формы ТМФД²⁺, которая взаимодействует с исходным ТМФД с образованием катион-радикала.

Таким образом, различие механизмов ферментативного и химического окисления ТМФД заключается в том, что при ферментативном

окислении образуется только катион-радикал ТМФД^{•+}, в то время как в результате химической реакции сначала также образуется ТМФД^{•+}, который далее окисляется пероксидисульфат ионом до *n*-хиноиддиимина ТМФД²⁺. Вследствие такой двухступенчатой реакции накопление ТМФД²⁺ происходит с индукционным периодом. Образующийся хиноиддиимин затем реагирует с исходной формой ТМФД с образованием катион-радикала. Экстраполируя эти данные на реакцию полимеризации анилина, можно предположить, что первая стадия как химической, так и ферментативной полимеризации анилина заключается в образовании анилий катион-радикала. При ферментативной полимеризации эти радикалы взаимодействуют друг с другом, что приводит к росту цепи электропроводящего ПАНИ (эмеральдиновая форма) сразу после инициирования реакции лакказой. При химической полимеризации анилина рост цепи происходит через образование пернигранилина (хиноидной формы ПАНИ), который восстанавливается непрореагировавшим анилином до эмеральдиновой соли ПАНИ.

Работа выполнена при частичной финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-08-00420а).

Конфликта интересов нет.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhadra S., Khastgir D., Singha N.K., Lee J.H. // Prog. Polym. Sci. 2009. Vol. 34. P. 783.
2. Отрохов Г.В., Морозова О.В., Васильева И.С., Шумакович Г.П., Зайцева Е.А., Хлупова М.Е., Ярополов А.И. // Успехи биологической химии. 2013. Т. 53. С. 355 [Otrokhov G.V., Morozova O.V., Vasil'eva I.S., Shumakovich G.P., Zaitseva E.A., Khlupova M.E., Yaropolov A.I. // Biochemistry (Moscow) 2013. Vol. 78. P. 1539] (DOI: 10.1134/S0006297913130117).
3. Ćirić-Marjanović G. // Synth. Met. 2013. Vol. 177. P. 1.
4. Tzou K., Gregory R.V. // Synthetic Metals 1992. Vol. 47. N 3. P. 267.
5. Lux F. // Polymer 1994. Vol. 35. N 14. P. 2915.
6. Cannatelli M.D., Ragauskas A.J. // Chem. Rec. 2017. Vol. 17. N 1. 122.
7. Yaropolov A.I., Skorobogatko O.V., Vartanov S.S., Varfolomeyev S.D. // Appl. Biochem. Biotechnol. 1994. Vol. 49. P. 257.
8. Solomon E.I., Sundaram U.M., Machonkin T.E. // Chem. Rev. 1996. Vol. 96. P. 2563.
9. Baldrian P. // FEMS Microbiol. Rev. 2006. Vol. 30. P. 215.
10. Морозова О.В., Шумакович Г.П., Горбачева М.А., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Биохимия 2007. Т. 72. N 10. С. 1396 [Morozova O.V., Shumakovich G.P., Gorbacheva M.A., Shleev S.V., Yaropolov A.I. // Biochemistry (Moscow) 2007. Vol. 72. N 10. P. 1136] (DOI: 10.1134/S0006297907100112).
11. Streltsov A.V., Shumakovich G.P., Morozova O.V., Gorbacheva M.A., Yaropolov A.I. // Appl. Biochem. Microbiol. 2008. Vol. 44. P. 264.
12. 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. Vol. 114. P. 928.
13. Shumakovich G., Kurova V., Vasileva I., Pankratov D., Otrokhov G., Morozova O., Yaropolov A. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2012. Vol. 77. P. 105.
14. Rao P. S., Hayon E. // J. Phys. Chem. 1975. Vol. 79. N 11. 1063.
15. Горшина Е.С., Русинова Т.В., Бирюков В.В., Морозова О.В., Шлеев С.В., Ярополов А.И. // Прикл. биохим. микробиол. 2006. Т. 42. N 6. С. 638 [Gorshina E.S., Rusinova T.V., Biryukov V.V., Morozova O.V., Shleev S.V., Yaropolov A.I. // Appl Biochem

- Microbiol 2006. Vol. 42. N 6. P. 558] (DOI: 10.1134/S0003683806060056).
16. Ehresmann B., Imbault P., Well J.H. // Anal. Biochem. 1973. Vol. 54. N 2. P. 454.
17. Neta P., Huie R.E. // J. Phys. Chem. 1985. Vol. 89. N 9. P. 1783.
18. Nickel U., Haase E., Jaenicke W. // Berichte der Bunsen-Gesellschaft. 1977. Vol. 81. N 9. P. 849.

Поступила в редакцию 10.01.2020
Получена после доработки 12.01.2020
Принята к публикации 20.01.2020

STUDY OF N,N,N',N'-TETRAMETHYL-P-PHENYLENEDIAMINE OXIDATION FOR CLARIFICATION OF BIOCATALYTIC AND CHEMICAL ANILINE POLYMERIZATION MECHANISM

O.V. Morozova¹, M.E. Khlupova¹, I.S. Vasil'eva¹, G.P. Shumakovich¹, E.A. Zaitseva²,
A.I. Yaropolov^{1*}

(¹Bach Institute of Biochemistry, Research Centre of Biotechnology RAS; ²Enzymology Division, Chemistry Department, M.V. Lomonosov Moscow State University; *e-mail: yaropolov@inbi.ras.ru)

The chemical and enzymatic polymerization of aniline has significant differences, which were studied by the oxidation of N, N, N', N'-tetramethyl-p-phenylenediamine (TMPD) using ammonium peroxide disulfate and the highly redox potential laccase *Trametes hirsuta*. In contrast to the laccase-catalyzed reaction, the chemical oxidation of TMPD proceeds in two stages. The radical cation formed in the first stage is oxidized by the peroxydisulfate ion to quinoid diimine, which can interact with the original TMPD. The kinetics of the formation of the TMPD^{•+} was studied by UV-visible and EPR spectroscopy. The received results enabled us to make an assumption about the difference in the mechanisms of chemical and enzymatic polymerization of aniline.

Key words: biocatalysis, laccase, aniline, polymerization, tetramethyl-p-phenylenediamine, oxidation mechanism.

Сведения об авторах: Морозова Ольга Владимировна – ст. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. хим. наук (morozova@inbi.ras.ru); Хлупова Мария Евгеньевна – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. биол. наук (dave80@yandex.ru); Васильева Ирина Сергеевна – науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. хим. наук (irinasin@yandex.ru); Шумакович Галина Петровна – ст. науч. сотр. Института биохимии им. А.Н. Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, канд. биол. наук (shumakovich1945@yandex.ru); Зайцева Елена Анатольевна – вед. науч. сотр. кафедры химической энзимологии химического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова, канд. хим. наук (ezaitseva2008@gmail.com); Ярополов Александр Иванович – зав. лабораторией химической энзимологии Института биохимии им. А.Н.Баха ФИЦ Биотехнологии РАН, профессор, докт. хим. наук (yaropolov@inbi.ras.ru).