

МИНОБРНАУКИ РОССИИ

Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования

«САРАТОВСКИЙ НАЦИОНАЛЬНЫЙ ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ
ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ ИМЕНИ Н.Г. ЧЕРНЫШЕВСКОГО»

Кафедра общей и неорганической химии

**Микрочастицы и плёнки полианилина как носители импринтированных
белков**

АВТОРЕФЕРАТ МАГИСТЕРСКОЙ РАБОТЫ

студента 2 курса 251 группы
направления 04.04.01 — «Химия»

Института химии

Анбаги Хайдера Аяд Джабера

Научный руководитель
профессор, д.х.н., доцент

Н. А. Бурмистрова

Заведующий кафедрой:
д.х.н., проф.

И. Ю. Горячева

Саратов 2023

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы. С развитием принципов «зелёной химии» появляется всё большая необходимость использования молекул биологического происхождения, например белков при проведении реакций и анализа. Однако, существует ряд ограничений, обусловленных нестабильностью белковых молекул, их денатурацией в экстремальных условиях и сложностью повторного использования. Одним из подходов к улучшению стабильности белков является иммобилизация. Применение полимерных материалов с высокоразвитой поверхностью в качестве материалов–носителей для молекул белковой природы позволяет [1] обойти ряд ограничений при работе с ними, а также улучшить некоторые свойства молекул белковой природы: стабильность, удобство обращения, активность.

Целью данной работы является выбор оптимальной морфологии ПАНИ для получения биокompозита ПАНИ–импринтированная глюкозооксидаза. Для достижения поставленной цели **поставлены** следующие задачи:

- синтез микрочастиц ПАНИ и плёнок ПАНИ на полистирольной подложке (МТП) и на поверхности микрочастиц SiO_2
- изучение влияния условий полимеризации на свойства частиц и плёнок ПАНИ;
- сравнение эффективности иммобилизации импринтированной глюкозооксидазы (ИБ ГО) на композитных сорбентах на основе ПАНИ.

Краткая характеристика методов исследования. Для решения задач, поставленных в работе, применяли комплекс физических методов исследования: спектрофотометрия, спектрофлуориметрия, сканирующая электронная микроскопия, динамическое рассеяния света. Объектам исследования являлись различные структуры ПАНИ: плёнки ПАНИ на поверхности полистирольной подложки, плёнки ПАНИ на поверхности микрочастиц SiO_2 , микрочастицы

ПАНИ, синтезированные в присутствии поверхностно-активных веществ (ПАВ).

Описание структуры работы. Работа состоит из введения, трёх глав (литературного обзора, экспериментальной части и обсуждения результатов), заключения, списка использованных источников, инструктажа по охране труда и технике безопасности. В тексте работы содержатся рисунки, таблицы и графические иллюстрации. Общий объем работы составляет 52 страницы, включающих 3 таблицы и 17 рисунков. Проанализировано 70 литературных источников.

Научная значимость работы:

— Проведён и охарактеризован синтез плёнок ПАНИ на поверхности МТП и на поверхности микрочастиц SiO_2 , а также синтез микрочастиц ПАНИ в присутствии ПАВ

— Выбрана оптимальная морфология ПАНИ для получения биокompозита ПАНИ–ИБ ГО — ПАНИ@ SiO_2

— Проведено сравнение эффективности иммобилизации ИБ ГО на композитных сорбентах на основе ПАНИ двумя методами — спектрофлуориметрически и колориметрически по реакции Бредфорда.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении описана актуальность темы исследования, раскрыта научная новизна работы и определены основные цели и задачи.

В **первой главе** рассмотрены основные подходы и методы синтеза ПАНИ, приведено влияние условий полимеризации на свойства конечного продукта, рассмотрены существующие материалы–носители биомакромолекул, описаны основные методы определения концентрации белков, приведены их достоинства и недостатки.

ПАНИ является одним из наиболее изученных представителей проводящих полимеров, поскольку характеризуется высокой устойчивостью к воздействию различных факторов окружающей среды, низкой стоимостью, простотой и адаптивностью синтеза, низкой растворимостью в различных растворителях, высокой удельной площадью поверхности [2–4]. Существует два основных метода синтеза ПАНИ: электрохимический и химический [5,6]. Химическая окислительная полимеризация анилина позволяет проводить синтез на любом типе носителя, а также в его отсутствии, что существенно отличает её от электрохимической полимеризации, в которой получение ПАНИ возможно только на поверхности электрода. В зависимости от условий синтеза и самоорганизации зародышей ПАНИ, происходит образование различных морфологических структур: плёнок, гранул, нановолокон, нанотрубок, коллоидных частиц [7].

Важными структурными характеристиками, обеспечивающими потенциал использования ПАНИ в качестве сорбирующего материала являются большая удерживающая способность, в сочетании с отсутствием пор в структуре и наличием реактивных групп на поверхности ПАНИ [8]. Иммобилизация на поверхности материалов–носителей является наиболее простым и универсальным методом. Возможна различная природа иммобилизации, например физическая посредством гидрофобных и Ван-дер-ваальсовых взаимодействий, ионная или ковалентная. Наиболее оптимальным вариантом иммобилизации является образование монослоя белковых молекул на поверхности носителя.

По результатам анализа литературы показана и обоснована возможность использования ПАНИ в качестве материала-носителя для иммобилизации ИБ ГО. Проведен анализ методов синтеза ПАНИ, выбран метод соответствующий цели работы.

Во **второй главе** приведена информация об используемых реагентах, материалах, оборудовании, и методах синтеза ПАНИ и подходам к стабилизации наиболее оптимальной формы ПАНИ для проведения иммобилизации ИБ ГО.

Синтез ПАНИ на поверхности микротитровального планшета (МТП) проводили по стандартной методике [9] с незначительными изменениями: для синтеза первого слоя ПАНИ смешивали 100 мкл раствора гидрохлорида анилина (C_6H_8ClN) (1,00 моль, HCl 0,2 М) и 100 мкл пероксидисульфата аммония ($(NH_4)_2S_2O_8$) (1,25 моль, HCl 0,2 М), Синтез проводили при температуре 20 °С, постоянном перемешивании в течение 1,5 мин, затем образцы дважды промывали бидистиллированной водой (БД) (300 мкл), трижды раствором аскорбиновой кислоты (300 мкл, 568 мМ) для удаления непрореагировавшего окислителя, а затем промывали раствором ФСБ до нейтральных значений кислотности и высушивали в сушильном шкафу. Синтез второго слоя ПАНИ проводили аналогично в течение 1,5 часов, с использованием более низких концентраций мономера и окислителя: C_6H_8ClN (15,5 ммоль, HCl $0,6 \times 10^{-3}$ М) и $(NH_4)_2S_2O_8$ (17,5 ммоль, HCl $0,6 \times 10^{-3}$ М).

Синтез микрочастиц ПАНИ проводили по адаптированной методике [2] с незначительными изменениями в двух растворителях: БД и HCl . К растворителю (10 мл) добавляли навеску одного из ПАВ в концентрациях, соответствующих критической концентрации мицеллообразования: ТХ-100 — 0,24 мМ; ЦТАБ — 0,89 мМ; ДДС — 8,3 мМ, смесь интенсивно перемешивали при 20 °С в течение 20 мин, после чего вносили навеску гидрохлорида анилина (1 ммоль). Затем в течение 3 часов добавляли 1 мл раствора $(NH_4)_2S_2O_8$ (15 мкмоль) и продолжали перемешивание в течение ночи. Образцы центрифугировали (10 мин, 10 000 g), удаляли надосадочную жидкость, осадок промывали аналогично плёнкам ПАНИ на поверхности МТП.

Синтез плёнок ПАНИ на поверхности SiO_2 проводили по адаптированной методике [10]: в растворе HCl ($0,6 \cdot 10^{-3}$ М, 9 мл) ультразвуковой обработкой диспергировали 50 мг SiO_2 и добавляли 1 мл C_6H_8ClN (1 моль, HCl $0,6 \times 10^{-3}$ М), перемешивали в течение 15 мин для адсорбции молекул мономера на носителе. Затем при постоянном перемешивании вносили 0,2 мл $(NH_4)_2S_2O_8$ (17,5 ммоль, HCl $0,6 \times 10^{-3}$ М). Для завершения синтеза смесь оставляли на ночь при перемешивании. Образцы центрифугировали (10 мин,

10 000 g), удаляли надосадочную жидкость, осадок промывали аналогично плёнкам ПАНИ на поверхности МТП.

Иммобилизацию ИБ ГО (200 мг/мл, ФСБ, рН 7,4) проводили в течение 1,5 ч на поверхности различных форм ПАНИ. Изменение концентрации белка контролировали спектрофотометрическим методом - по реакции Бредфорда использованием красителя Кумасси G-250 [11], и флуоресцентной спектроскопией [12].

В третьей главе обсуждаются полученные результаты и устанавливается наиболее оптимальная форма ПАНИ для иммобилизации ИБ ГО

Синтез ПАНИ на поверхности МТП из полимеризационной смеси, содержащей низкие концентрации компонентов затруднен ввиду низкой удерживающей способности мономера на поверхности МТП — рисунок 1, использование высоких концентраций для предварительной модификации позволяет сформировать плёнки ПАНИ на поверхности МТП.

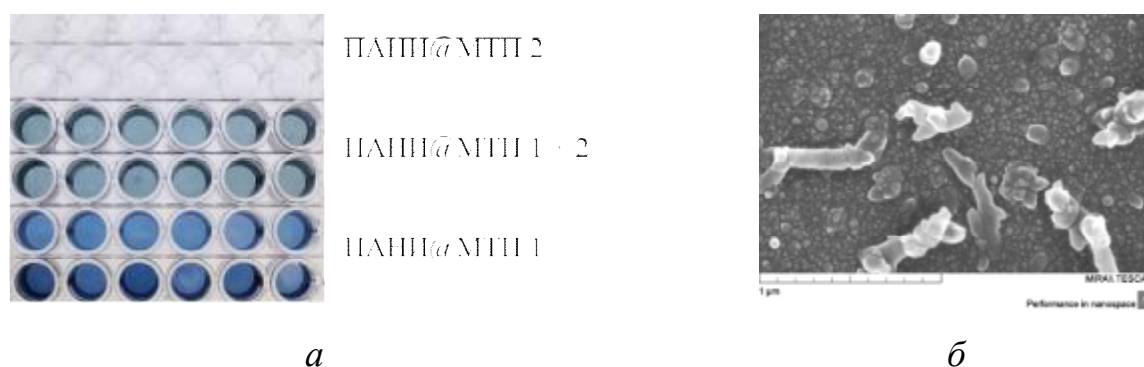


Рисунок 1 — (а) Поверхность МТП после синтеза ПАНИ@МТП 1, ПАНИ@МТП 2 и ПАНИ@МТП 1 + 2, (б) СЭМ-изображения структур ПАНИ@МТП 1 + 2

Присутствие ПАВ различных типов (анионогенные, катионогенные и неионогенные) и кислотность среды влияют на морфологию и цвет растворов ПАНИ, что продемонстрировано на рисунке 2. Кроме того, полученные микро- и наночастицы ПАНИ характеризуются различными выходами реакции и степенью осаждения. Наибольшее количество ПАНИ получено при синтезе в HCl

в присутствии ДДС (додецилсульфат натрия) и синтезе в водной среде в присутствии ЦТАБ (цетилтриметиламмония бромид). Наилучшее осаждение при центрифугировании наблюдалось для ПАНИ@ЦТАБ Н₂О, ПАНИ@ЦТАБ НСl, ПАНИ@Тритон Х-100 НСl.

Средний размер микрочастиц, синтезированных в присутствии ПАВ, полученный методом динамического рассеяния света составил для ДДС Н₂О — 250±20 нм, ДДС НСl — 200±10 нм, для ТХ-100 Н₂О — 50±5 нм, Тритон Х-100 НСl — 100±20 нм, ЦТАБ Н₂О — 200±30 нм, ЦТАБ НСl — 150±10 нм.

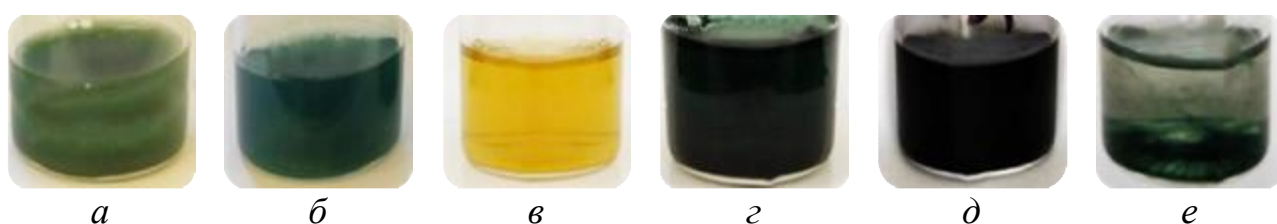


Рисунок 2 — Растворы микрочастиц ПАНИ, синтезированных в присутствии различных ПАВ при различной кислотности: (а) ДДС Н₂О, (б) ДДС НСl, (в) Тритон Х-100 Н₂О, (г) Тритон Х-100 НСl, (д) ЦТАБ Н₂О, (е) ЦТАБ НСl

Синтез на поверхности материала-носителя, например SiO₂, характеризующихся хорошей осаждаемостью, высокой удельной площадью поверхности, а также возможностью выбора начального размера частиц для проведения синтеза позволил получить частицы ПАНИ@SiO₂, представленные на рисунке 3 со средним размером 39±5 нм.

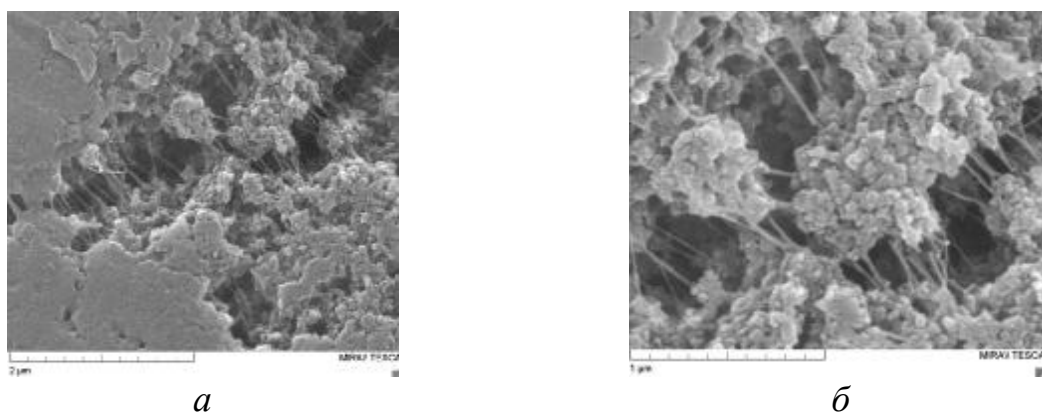


Рисунок 3 — СЭМ-изображения структур ПАНИ@SiO₂ при увеличении 50×10³ (а) и 100×10³ (б) раз

Спектрофлуориметрия является надежным и универсальным методом определения концентрации белка, характеризующимся высокой чувствительностью, широким линейным диапазоном, воспроизводимостью, неdestructивностью, быстротой и специфичностью. На рисунке 4 представлена градуировочная зависимость, построенная по значениям максимума интенсивности испускания ($\lambda_{исп}$) = 345 нм и длине волны возбуждения ($\lambda_{возб}$) = 280 нм растворов ГО с известной концентрацией, а также значения концентрации ИБ ГО, рассчитанные по уравнению градуировочного графика.

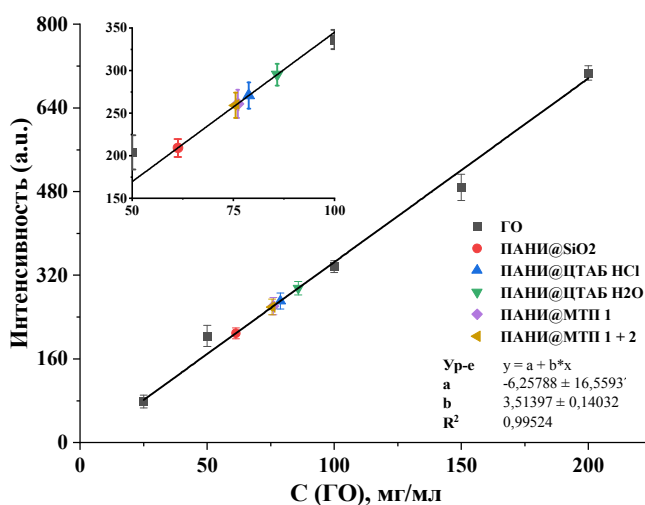


Рисунок 4 — Градуировочная зависимость ГО со значениями интенсивности ИБ ГО после иммобилизации

Наибольшая степень сорбции, рассчитанная по изменению интенсивности флуоресценции, наблюдается для ПАНИ@SiO₂ — 69 %, наименьшая — для частиц ПАНИ@ЦТАБ H₂O — 57 %

Проведение реакции Бредфорда с использованием Кумасси G–250 является более распространенным методом определения концентрации белков и ферментов в анализируемой среде, что обуславливается быстротой образования комплекса комплекса Кумасси–белок, происходящее в течение нескольких минут и характеризующееся сдвигом полосы поглощения красителя в длинноволновую область. Реакция комплексообразования является чувствительной по от-

ношению к большому количеству белков, необходимые реактивы для проведения анализа являются коммерчески доступными, немаловажным фактором является возможность проведения анализа в микропланшетном формате, позволяя снизить требуемые объёмы образца и реагентов. Результаты изменения концентрации ИБ ГО после иммобилизации, определённые методом Бредфорда представлены на рисунке 5

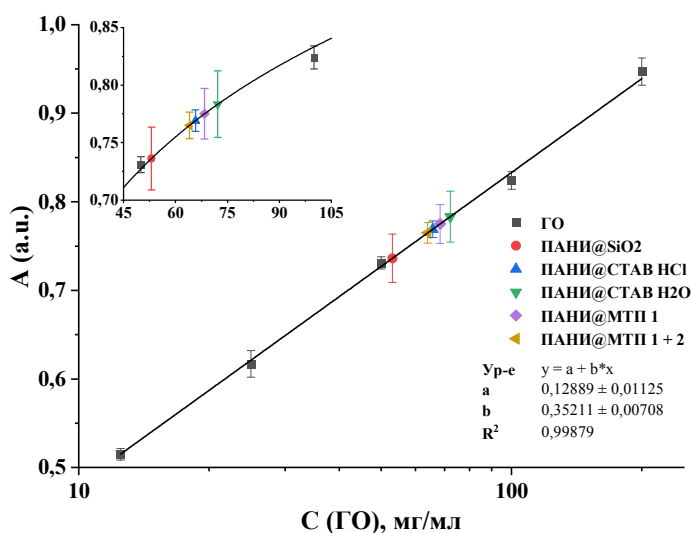


Рисунок 5 — Градуировочная зависимость поглощения стандартных растворов ГО и ИБ ГО после иммобилизации при $\lambda_{\text{макс}} = 595 \text{ нм}$

Наибольшая степень сорбции составляет 74 % — ПАНИ@SiO₂, что соответствует результатам, полученным флуоресцентной спектроскопией. Однако на результаты анализа могут влиять загрязняющие агенты, например детергенты, восстановители или липиды, которые могут связываться с красителем и мешать комплексообразованию.

Заключение:

1. Изучено влияние условий полимеризации на морфологию ПАНИ и на значения степени сорбции импринтированных белков
2. Установлена оптимальная форма ПАНИ для иммобилизации импринтированных белков — ПАНИ@SiO₂

3. Степень сорбции импринтированной ГО на поверхности ПАНИ@SiO₂ составила 74 % по реакции Бредфорда и 69 % согласно данным флуориметрии

СПИСОК ИСПОЛЬЗОВАННЫХ ИСТОЧНИКОВ

1. Brady D., Jordaan J. Advances in enzyme immobilisation // *Biotechnol Lett.* 2009. Vol. 31, № 11. P. 1639–1650.
2. Hassan P.A. et al. Polyaniline nanoparticles prepared in rodlike micelles // *Langmuir.* 2004. Vol. 20, № 12. P. 4874–4880.
3. El-Rahman M.K.A. et al. Design of a stable solid-contact ion-selective electrode based on polyaniline nanoparticles as ion-to-electron transducer for application in process analytical technology as a real-time analyzer // *Sensors and Actuators, B: Chemical.* Elsevier B.V., 2015. Vol. 208. P. 14–21.
4. Liao G., Li Q., Xu Z. The chemical modification of polyaniline with enhanced properties: A review // *Progress in Organic Coatings.* 2019. Vol. 126, № October 2018. P. 35–43.
5. Boeva Z.A., Sergeyev V.G. Polyaniline: Synthesis, properties, and application // *Polymer Science - Series C.* 2014. Vol. 56, № 1. P. 144–153.
6. Presnyakov K.Y. et al. Molecularly imprinted polyaniline: Synthesis, properties, application. A review // *Izvestiya of Saratov University. Chemistry. Biology. Ecology.* 2022. Vol. 22, № 2. P. 142–149.
7. Stejskal J., Sapurina I., Trchová M. Polyaniline nanostructures and the role of aniline oligomers in their formation // *Progress in Polymer Science.* 2010. Vol. 35, № 12. P. 1420–1481.
8. Purcena L.L.A. et al. The immobilization of trypsin onto polyaniline for protein digestion // *Materials Science and Engineering: C.* 2009. Vol. 29, № 4. P. 1077–1081.
9. Pidenko P.S. et al. Molecularly imprinted polyaniline for detection of horseradish peroxidase // *Anal Bioanal Chem.* 2020. Vol. 412, № 24. P. 6509–6517.
10. Ayadi C. et al. Molecularly imprinted polyaniline on silica support for the selective adsorption of benzophenone-4 from aqueous media // *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects.* 2019. Vol. 567. P. 32–42.

11. Bradford M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding // Analytical Biochemistry. 1976. Vol. 72, № 1. P. 248–254.

12. Simonian M.H., Smith J.A. Spectrophotometric and Colorimetric Determination of Protein Concentration // CP Molecular Biology. 2006. Vol. 76, № 1.