



LAKKÁZ-ENZIM RÖGZÍTÉSE VEZETŐ POLIMER MÁTRIXBAN MAGNETIT NANORÉSZECSKÉK SEGÍTSÉGÉVEL

Tudományos Diákköri Dolgozat

KÉSZÍTETTE:

Kormányos Attila

II. éves vegyész MSc hallgató

TÉMAVEZETŐK:

Dr. Visy Csaba *egyetemi tanár*

Dr. Janáky Csaba *tanársegéd*

Endrődi Balázs *PhD hallgató*

Szegedi Tudományegyetem Természettudományi és Informatikai Kar

Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszék

2012.

Tartalomjegyzék

1.	Bevezetés.....	3
2.	Irodalmi áttekintés.....	5
2.1	A vezető polimerekről általában	5
2.2	Lehetőségek vezető polimerek előállítására	6
2.3	A polipirrol tulajdonságai, szintézise	8
2.4	A magnetit nanorészecskék tulajdonságai, szintézise	10
2.5	A lakkáz-enzim	11
2.6.	Vezető polimer alapú nanokompozitok.....	13
2.6.1.	Magnetit nanorészecskét tartalmazó, vezető polimer alapú nanokompozitok	14
2.6.2.	Bionanokompozitok	16
2.7.	Témaválasztás és célkitűzés	18
3.	Kísérleti rész	20
3.1.	Felhasznált vegyszerek.....	20
3.2.	Alkalmazott eljárások, felhasznált műszerek	20
3.2.1.	Elektrokémiai polimerizáció	20
3.2.2.	Ciklikus voltammetria	21
3.2.3.	Mérések kivitelezése forgó korongelektrodon	22
3.2.4.	Lineáris voltammetria	24
3.2.5.	Elektrokémiai kvarckristály nanomérleg (EQCN) technika	24
3.2.6.	Infravörös spektroszkópia	25
3.2.7.	Transzmissziós elektronmikroszkópia	27
4.	Kísérleti eredmények	28
4.1.	Lakkáz-enzim immobilizációja magnetit nanorészecskék felületén	28
4.1.1.	Szintézismódszer kidolgozása.....	28
4.1.2.	A szintézis sikerességének igazolása	30
4.2.	A hibrid rétegek szintézise	32
4.3.	Az elkészített vékonyrétegek összehasonlító vizsgálata	33
4.3.1.	Elektrokémiai kvarckristály nanomérleggel (EQCN) végzett vizsgálatok	33
4.3.2.	ATR-FT-IR spektroszkópiás vizsgálatok.....	34
4.3.3.	Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatok	35
4.4.	A hibrid rétegek összehasonlító elektrokémiai vizsgálata	37

4.4.1. Ciklikus voltammetriás mérések	37
4.4.2. Mérések forgó korongelektrodon	42
5. Összefoglalás	44
6. Irodalomjegyzék.....	45
Köszönetnyilvánítás	49

1. Bevezetés

A polimerek olyan makromolekulák, melyek nagyszámú ismétlődő egységből (monomer) épülnek fel, melyeket kémiai kötések kapcsolnak össze. Eredetüket tekintve megkülönböztethetünk természetes polimereket, ilyen például a cellulóz, kaucsuk, illetve a DNS és RNS, illetve szintetikus úton előállítottakat, például a polietilén (PE), teflon (PTFE), poli(vinil-klorid) (PVC), ezeket műanyagoknak nevezzük. Az első, mesterséges makromolekulát, a bakelitet, 1907-ben a flamand Leo Hendrik Baekeland állította elő. Az azóta eltelt száz év alatt a műanyagok népszerűsége egyre csak nőtt, manapság már az élet minden területén találkozhatunk velük. Közös tulajdonságuk igen jó szigetelőképességük, a mindennapi alkalmazás jelentős hányada ezen sajátság kiaknázásán alapul, pl. különféle vezetékek, elektromos berendezések, eszközök bevonataként.

Közel négy évtizeddel ezelőtt felfedezték a polimerek egy olyan csoportját, mely a fent említett szigetelő képesség helyett, a megfelelő körülmények biztosításával elektromos vezetést mutat. Ezen anyagok a *vezető polimerek*, melyek fajlagos vezetése akár az igen jól vezető fémekre jellemző értékeket is elérheti (pl. réz, ezüst, stb.). A műanyagokra jellemző kedvező tulajdonságaik, illetve a széles tartományban megváltoztatható elektromos vezetés miatt hamar a tudományos és ipari érdeklődés középpontjába kerültek.

A vezető polimerek története¹ azonban ennél jóval régebbre, a 19. századba nyúlik vissza. 1862-ben Henry Letheby elektrokémiai úton, kénsavas anilinoldatból választott le polianilint. Tapasztalatait ekképpen jegyezte le: „... az anódon gyorsan kékeszöld színezék képződik. Ez az anyag redukálószer hatására elszíntelenedik, oxidálószerrel kezelve kék színét visszanyeri.”. 1976-ben a Tokiói Műszaki Egyetemen (véletlenül) adalékolt transz-poliacetilént állítottak elő, mely igen tekintélyes vezetéssel rendelkezett. Ez váratlan tapasztalat felkeltette Hideki Shirakawa és munkatársai figyelmét, így a későbbiekben behatóan tanulmányozták a fémes színű, új anyagot. Ennek során jóddal adalékolták a polimert, melynek következtében fajlagos vezetése nyolc nagyságrenddel megnőtt. A tapasztaltakat A. G. MacDiarmid magyarázta, aki munkatársával, A. J. Heegerrel a Pennsylvanai egyetemen próbált hasonló anyagokat előállítani.

A 80-as években Diaz és munkatársai elektrokémiai oxidációval állítottak elő vékony polimer filmeket, s innen datálható a polianilin, illetve más, elektrokémiailag aktív vezető polimerek megjelenése és alkalmazása. Ezt követően megindult a kutatási terület robbanásszerű fejlődése, mely manapság olyannyira jelentőssé vált, hogy Shirakawa, Heeger és MacDiarmid munkásságát 2000-ben kémiai Nobel-díjjal ismerték el.^{2,3,4}



1.1. ábra: Akik 2000-ben elnyerték a *Nobel-díjat*: H. Shirakawa, A. J. Heeger, A. G. MacDiarmid[†].

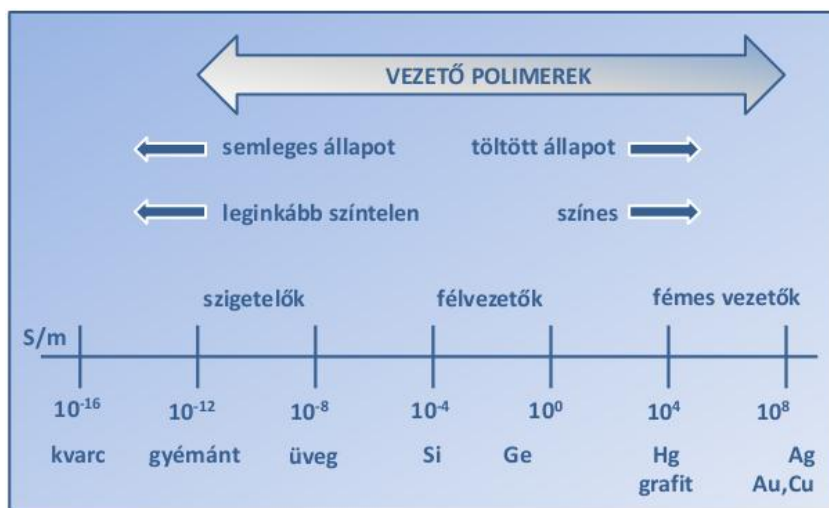
Kedvező tulajdonságaiknak köszönhetően a vezető polimerek alkalmazása napjainkban igen széleskörű: elektromos vezetésük változtathatóságát például különféle gázérzékelők készítésénél¹, töltéstároló képességüket áramforrások, szuperkondenzátorok⁵ előállításánál használják ki. Különleges elektrooptikai tulajdonságaik következtében igen alacsony hőmérsékleten is működőképes¹ kijelzőket, valamint „okos ablakokat” fejlesztettek ki, míg elektrokatalitikus tulajdonságaikat különféle szenzorokban, vagy szelektív szintézisek⁶ esetén alkalmazzák ki.

A 2000-es években egyre inkább előtérbe kerül egy új kutatási terület, mely a vezető polimerek nanokompozitjait vizsgálja. Kiderült ugyanis, hogy a szerves polimer mátrixba beépíthetők különféle nano-mérettartományba eső részecskék, s az így kialakuló kompozit igen változatos tulajdonságokat mutathat, ami a későbbi alkalmazás szempontjából rendkívül előnyös lehet. Ezen kompozitok mind a polimer, mind a nanorészecske előnyös tulajdonságait magukban hordozzák, így például mágneses, fotokatalitikus viselkedést mutathatnak, a polimerhez képest megnövekedhet a mechanikai stabilitásuk, stb. Megemlítendő, hogy az adott anyag szervesetlen nanorészecskéi igen gyakran a tömbfázisú anyagtól eltérően viselkednek, például a Fe_3O_4 nanorészecskék a 10 nm mérettartományban szuperparamágneses tulajdonságúak, szemben a tömbfázisú anyag ferromágneses sajátságával.⁷ Nanokompozitokat azonban nem csak szervesetlen részecskék beépítésével lehet előállítani. Manapság egyre több olyan publikációt találhatunk, melyekben különféle enzimeket immobilizáltak a polimer mátrixban. Ilyen bionanokompozitok létrehozása azért előnyös, mert egyes biológiailag aktív molekulák (pl. enzimek) katalitikus sajátságokkal bírnak, azaz a polimerrel való kombinációval olyan szelektív elektród nyerhető, mely sokkal érzékenyebb az elektrokatalitikus folyamatokban, mint a polimer önmagában, ezáltal kiszélesítve a gyakorlati felhasználás körét.⁸

2. Irodalmi áttekintés

2.1 A vezető polimerekről általában

Mint azt már a bevezetőben említettem, a vezető polimerek elektromos vezetése, eltérő módon a szigetelő sajátságú műanyagoktól, oxidációval/redukcióval széles tartományban megváltoztatható.



2.1. ábra: A vezető polimerek fajlagos vezetése néhány közismert anyagéhoz viszonyítva.⁹

A 2.1. ábrán látható, hogy a vezető polimerek fajlagos vezetése a szigetelőtől egészen a fémes vezető állapotra jellemző értékig változhat, a polimer oxidáltsági fokától függően. Semleges állapotban szigetelők, egyes esetekben félvezető sajátságúak, míg fokozatosan oxidálva a polimert kialakul a fémekre jellemző fajlagos vezetési érték. A vezetés mechanizmusa szerint három nagyobb csoportot különböztetünk meg, ám ezek nem minden esetben diszkrétek, az egyes kategóriák között lehetségesek átfedések.

A *redoxi* polimerek olyan, valamilyen módon rögzített, egymással akár kovalens kötéssel kapcsolódó, lokalizált centrumokat tartalmaznak, melyek oxidálhatók és redukálhatók. Közöttük az elektronátlépés „átugrással” (hopping) valósul meg. Ezt a kategóriát is kétfelé lehet osztani: az egyik csoportba azon anyagok tartoznak, melyek a kovalensen kötött redox centrumot (zónát) a lánc mentén, vagy függő csoportként tartalmazzák (így itt ez vagy szerves, vagy pedig fémorganikus csoport). A másik csoportba olyan ioncsere-kapacitással rendelkező polimer rendszerek (polielektrolitok) tartoznak, melyeknél a redox aktív ionok elektrosztatikus kölcsönhatással vannak helyhez kötve. Ilyen anyagra példa a poli(viologén)-ek csoportja, vagy a poli(vinilferrocén) (PVF).⁹

Az *ionvezető* polimerek esetén elektromos erőter hatására a lánc mentén elmozduló ionok okozzák a vezetést. Megjegyzendő, hogy ebben az esetben nem feltétlenül szükséges,

hogy az adott polimer vezessen, elég, ha olyan szerkezettel rendelkezik, melyben az ionok migrációja könnyedén megvalósulhat. Ebbe a csoportba tartozik például a Nafion[®], amely a korszerű tüzelőanyag-cellák egyik legfontosabb eleme.⁹

A harmadik eset az, amikor a töltéshordozók magában a polimerben alakulnak ki, majd a lánc mentén vándorolnak az elektromos erőter hatására. Ilyen rendszer akkor hozható létre, ha a makromolekula oxidációjával/redukciójával a lánc mentén töltéshordozókat generálunk. További kritérium, hogy adott anyagnak „meg is kell tartania” a kialakított töltést, majd ennek valamilyen módon irányítottan kell vándorolnia. Ezt a három követelményt teljesítik a konjugált elektronrendszerrel rendelkező anyagok, hiszen a mezomer határszerkezetek egymásba alakulásával a töltéshordozók (elektron, lyuk) a lánc mentén szabadon elmozdulhatnak. Ideális esetben (végtelen hosszú, szakadásmentes polimerlánc) a vezetés eme harmadik típusa ellenállásmentesen valósulna meg. A valós rendszerek esetén azonban különböző okok miatt a konjugációlánc nem folytonos a lánc mentén, helyenként megszakadhat, ezért a konjugáció nem lesz folytonos. Ilyen esetben a konjugált szegmensek között az elektronok „átugrással” tudnak közlekedni, mint azt már a redoxi polimereknél láttuk. Az effektív lánc hossz – mely azt mutatja meg, hogy átlagosan hány monomeregységnyi haladhat az elektron átugrás nélkül – 4-6 között van.¹⁰

A harmadik csoportba tartozó polimereket *elektronvezető* polimereknek nevezzük⁹, ebbe a családba tartozik a jelen munkában vizsgált polipirrol is. Ezen típusú polimerek ionvezető sajátsággal is bírnak, ugyanis az oxidáció után pozitív töltésű filmnek az elektroneutralitás törvénye miatt a makroszkopikusan semlegesnek kell lennie. Ez úgy valósul meg, hogy az oldatból vagy anionok vándorolnak a polimer rétegbe, vagy kationok áramlanak ki onnan, melyek migrációja az ionvezetőknél leírt módon valósul meg.

Látható tehát, hogy az elektronvezető polimerek mindhárom kategória sajátosságait magukon hordozzák. A fent leírtak alapján kijelenthető, hogy az elkészített polimer réteg fajlagos vezetése nagyban függni fog az alkalmazott monomertől és vezetősótól (azaz, hogy milyen anion épül be a töltéskompensáció részeként), a létrejövő polimer szerkezetétől. Ezt a képet árnyalja, ha valamilyen szervesetlen nanorészecskét építünk be a rétegbe. Ezzel ugyanis a polimer tulajdonságait döntően megváltoztathatjuk, ezáltal teljesen új anyagot kapunk, melynek fajlagos vezetése is eltérő lesz.

2.2 Lehetőségek vezető polimerek előállítására

Vezető polimerek előállítására alapvetően két főbb módszert különíthetünk el, az egyik a *kémiai*, a másik az *elektrokémiai* szintézis. A továbbiakban részletesen foglalkozom az

elektrokémiai módszerekkel, ugyanis munkám során ily módon állítottam elő vezető polimer alapú nanokompozitokat, míg a kémiai módszerekre a későbbiekben néhány releváns példát említek meg.

Oxidatív elektrokémiai eljárásokkal igen könnyedén választhatunk le polimer filmeket munkaelektród felületére, ezáltal módosított elektródokat létrehozva. Ezen módszer előnye a kémiai szintézisekkel szemben, hogy a leválasztott polimer azonnal különféle elektrokémiai technikákkal behatóan tanulmányozható, továbbá az elektródként való alkalmazást is megkönnyítheti. Az elektrokémiai módszereket alapvetően két csoportra oszthatjuk: az egyik csoportba a *sztatikus*, míg a másikba a *dinamikus* módszerek tartoznak. *Galvanosztatikus* polimerizáció során állandó áramsűrűséget, míg *potenciosztatikus* esetben állandó potenciált alkalmazva választhatók le a polimer rétegek az elektródfelületre. Mindkét módszer előnye, hogy az áthaladt töltés értékének szabályzásával a kívánt rétegvastagságú, jól definiált film hozható létre, továbbá a potenciál és áramsűrűség helyes megválasztásával a polimer irreverzibilis oxidációja („overoxidation”) is elkerülhető. A dinamikus módszerek (ciklikus voltammetria) előnye, hogy nem korlátozza a monomer diffúziója a polimerizációt.

Voltaképpen az elektrokémiai előállítást az teszi lehetővé, hogy a monomermolekulák, lévén aromás rendszerűek, már sok esetben akár a vízbontáshoz szükségesnél kevésbé pozitív potenciálon oxidálódnak, így lehetőség nyílna a vizes oldatból történő szintézisre is. Az aromás monomer oxidációjakor egy ún. gyökkation keletkezik, melynek élettartama döntő szerepet játszik a polimerizáció sikeressége szempontjából. Polimerfilm csak akkor alakulhat ki a munkaelektrodon, ha a képződött gyökkationok nem túl nagy stabilitásúak, azaz nem diffundálnak el az elektródfelületről, hanem ott a további monomer egységekkel továbbreagálnak. Az sem kedvező, ha a gyökkation túl nagy reaktivitással rendelkezik, mert ez a környezetben található nukleofil anyagokkal (pl. víz) nagyon könnyen elreagál,¹¹ így e mellékfolyamatok eredményeképp sem képződik film az elektródfelületen. Ezen leggyakrabban nem nukleofil karakterű oldószerekkel segíthetünk, ezért a szintézist számos monomer esetében szerves közegben kell elvégezni. Erre példa a nitrobenzol, acetonitril, propilén-karbonát, stb., melyek mind aprotikus, nem nukleofil szerves oldószerek.

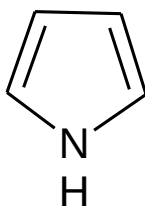
Fontos azt is megemlíteni, hogy a vezetőső igen nagy hatással van a kialakuló polimer réteg sajátságaira, szerkezetére. Az első és egyben legfontosabb követelmény, hogy az alkalmazni kívánt só jól oldódjon az adott közegben, továbbá legyen stabil, ne bomoljon el. Így szerves oldószerek esetén alkálifém sók alkalmazása nem javasolt, annál inkább a tetraalkil-ammónium sóké. További követelmény, hogy az adott vezetőső minél kevésbé legyen nukleofil sajátságú, ebből a szempontból a tetrafluoro-borát és hexafluoro-foszfát a

legjobb. A töltéskompenzáció során a rétegbe áramló anionok a film szerkezetét alapvetően befolyásolják, azaz a kialakuló polimer szerkezete legjobban a beépült anion méretétől, alakjától, töltésétől, solvatációs sajátságaitól fog függeni. A polimer a redukciója után (azaz amikor a rétegből eltávolítjuk az anionokat) is megőrzi eme aniontól eredeztethető szerkezetét és a továbbiakban is az erre jellemző sajátságokat fog mutatni.¹²

Munkaelektrodként leggyakrabban szénelektrodot (pl. glassy carbon-üvegszén), vagy inert nemesfémeket (Pt, Au) alkalmaznak, elkerülendő az elektród anyagának oldódását.

2.3 A polipirrol tulajdonságai, szintézise

A polipirrol volt az első olyan vezető polimer, melynek elektrokémiai szintézisét célzott módon valósította meg F. Diaz munkatársaival 1978-ban, így tudománytörténeti szempontból is igen érdekes. Azóta ez az egyik legbehatóbban tanulmányozott vezető polimer, igen előnyös tulajdonságai miatt. Szerkezetét tekintve a pirrol (C_4H_5N , $M_r=67,09$) egy öttagú, N heteroatomot tartalmazó aromás vegyület. A nitrogén nemkötő elektronpárja a delokalizált elektronrendszer része, így nem tekinthető bázisnak, ellenben ez a nitrogén kissé pozitív töltésű, ezáltal vizes oldatban gyengén savas karaktert mutat.



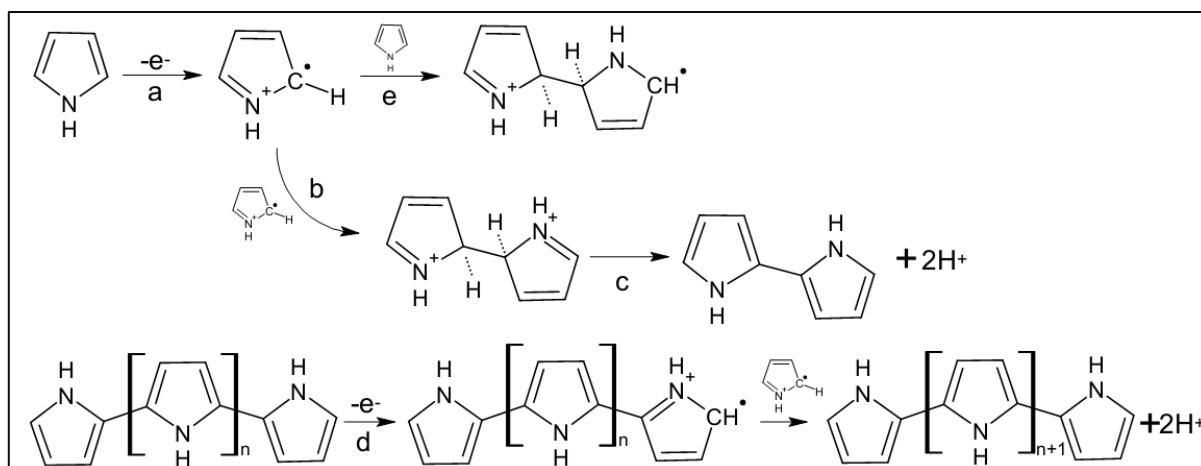
2.2. ábra: A pirrol szerkezeti képlete.

Aromás vegyület révén elsősorban elektrofil szubsztitúciós reakcióban vesz részt, a részlegesen negatívabb 2-es és 5-ös pozícióban. Előnyös tulajdonságai közé tartozik, hogy relatíve kis sűrűségű, továbbá közepesen jól oldódik vízben ($6g/100g\ H_2O^{13}$), így a polimer szintézist vizes oldatban is végre lehet hajtani. Az így nyert polimer mechanikailag ellenálló, továbbá igen jó fajlagos vezetéssel rendelkezik ($100-200\ S/cm$).¹⁴

Polipirrol előállítására számos módszer kínálkozik; léteznek kémiai szintézismódszerek (döntően ebből van több), továbbá igen gyakran a pirrol elektrokémiai oxidációjával történik. Az elektrokémiai szintézismódszerek előnyeit a 2.2. fejezetben már bemutattam, így itt külön erre nem térnék ki. Munkám szempontjából elsődlegesen az elektrokémiai módszerek fontosak, így a továbbiakban az anódos oxidáció során lejátszódó polimerizáció esetén lezajló két lehetséges folyamat mechanizmusával foglalkozok.

Első lépésben a semleges monomer gyökkationná oxidálódik (2.3. ábra, a). A monomer gyökkationok dimerizálódnak (b), majd deprotonálódással egy semleges forma alakul ki (c). A dimer (és általában véve az oligomerek) könnyebben oxidálhatók (kevésbé pozitív potenciálon), ugyanis a konjugáció több monomeregységre való kiterjedése kedvezőbb az elektron eltávolításának szempontjából, azaz a kialakult semleges dimer, trimer, stb. azonnal oxidálódni fog gyökkationná (d). A láncnövekedés monomerkationok oxidált oligomerekkel (kezdetben dimerekkel) való reakciójával következik be. Ezt követően, ha elég nagy a lánc hossz, az egyes oligomerek leválnak az oldatból és az anódon filmet képeznek.^{15,16,17} Ezt a mechanizmust *gyök-gyök mechanizmusnak* nevezzük, mely esetén egy elektronátlépést két kémiai folyamat követ, majd ismét egy elektronátlépés következik. A fentebb ismertetett folyamat szobahőmérsékleten, fény hatására igen könnyen végbemegy, a részlegesen oligomerizálódott pirrol elektropolimerizációja során így egy nem-, vagy igen rosszul vezető filmet kapunk. Kutatócsoportunkban korábban igazolták,¹⁴ hogy a legjobb tulajdonságokkal rendelkező filmet csak frissen desztillált pirrol használatával lehet előállítani, így célszerű az egyes szintézisek előtt a vákuum-desztillációs eljárást elvégezni.

Egy másik értelmezés szerint, melyet az irodalomban *gyök-monomer mechanizmusnak* neveznek, a két gyökkation (monomer- és oligomer gyökkation) közötti erős taszító erő miatt azok nem egymással, hanem a semleges monomermolekulákkal fognak elreagálni oligomer gyökkationná (e). Irodalmi adatok szerint¹⁸ ilyen mechanizmus szerint történik a pirrol elektropolimerizációja ClO_4^- , BF_4^- , PF_6^- anionok jelenlétében. Ezen kisméretű, mozgékony anionok jelenlétében a szintetizált polimer ionvezetőként működik, ugyanis a redukciókor ezen mobilis anionok képesek eltávozni a polimerfilm csatornáin keresztül.¹⁹



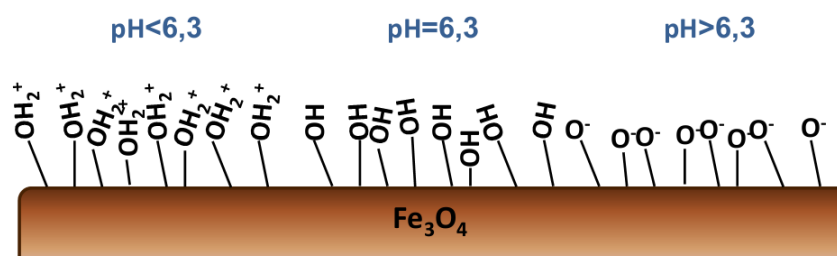
2.3. ábra: A pirrol polimerizációjának kétféle mechanizmusa¹⁴.

A polimer szintézise során meghatározó az alkalmazott potenciál/áramsűrűség szerepe. Ha ezek értéke túl nagy, illetve ha a ciklizálást túl nagy potenciáltartományon végezzük, a polimert könnyen túloxidálhatjuk, mely egy rosszul vezető réteg kialakulásához vezet, melynek szerkezete szabálytalan, rossz tapadású. Kulcsfontosságú továbbá, hogy a polimerizáció után körülbelül 15 percig hagyni kell a réteget relaxálni²⁰, ugyanis ezalatt deszolvatációval alakul ki a jól vezető szerkezetű réteg.

2.4 A magnetit nanorészecskék tulajdonságai, szintézise

A magnetit a vas egyik oxidja, összegképlete Fe_3O_4 . Történeti érdekesség, hogy ez volt az egyik első anyag, melynek kristálystruktúráját röntgendiffrakcióval vizsgálták.²¹ A tömbi fázis kristályainak elemi cellája laponcentrált kockarács.⁷ A vas-oxidok között igen különleges, ugyanis ez az egyetlen, melyben az egyes Fe atomok oxidációs száma eltérő (két db +3-as, illetve egy db +2-es oxidációs állapotú vas alkotja). Az egyik legfontosabb tulajdonsága a mérettől függő mágneses sajátság.²² Tömbi fázis esetén a magnetit ferromágneses, azonban a méretet fokozatosan csökkentve, 10 nm alatt szuperparamágneses viselkedést mutat. További sajátságuk, hogy a vegyes vegyértékű vastartalmának köszönhetően képesek bizonyos reakciókat katalizálni (pl. H_2O_2 bomlása, O_2 redukció, stb.).

A különféle vas-oxidok (nagyon sok más fém-oxidra is igaz ez) további közös tulajdonsága, hogy felületüket hidroxil-csoportok borítják. Víztelenes körülmények között a felületi vas atomok koordinációs zónája telítetlen lehet. Mivel atompályáik betöltetlenek, Lewis savként, azaz e^- -pár akceptorként fognak viselkedni. Vizes közegben ezért a vízmolekulák koordinációja kedvezményezett. A koordinálódás után disszociálnak, ezáltal a felületet OH-csoportok borítják. Ez a folyamat igen rövid idő alatt (akár percek, de legfeljebb órák) lejátszódik. Az 1 nm^2 -nyi felületen koordinálódott OH^- -csoportok száma az irodalmi adatok alapján 5 körüli értéknek adódott.⁷



2.4. ábra: A magnetit felülete különböző pH-kon (csak az adott pH-tartományon többségben lévő formát ábrázoltam).

Az oldat kémhatásától függően ezen OH-csoportok protonált és deprotonált formában is jelen lehetnek (2.4. ábra). A semleges pH közelében van egy pont, amikor a felület töltése összességében semleges, ezt PZC-nek nevezzük (potential of zero charge). Az irodalmi adatok a magnetit esetén meglehetősen vegyes képet mutatnak (pH=6-7 között), én a legfrissebb eredményt fogadtam el, melyben a PZC pH=6,3-nak adódott.²³

Magnetit nanorészecskéket sokféleképpen előállíthatunk, melyet az alábbiakban néhány példán keresztül szemléltetek a teljesség igénye nélkül:⁷

- Fe(II)-szulfid bontása 500 °C-on: $FeS_2 + 5O_2 \rightarrow Fe_3O_4 + 3S + 3SO_2$
- Hematit redukciója 400 °C-on 5% H₂ és 95% Ar-t tartalmazó, vízgőzzel telített atmoszférában, oxigénmentes körülmények között.
- Fe(NO₃)₃ oldat elektrolízise
- Fe(II) vagy Fe(III)-oxalát hőbontása.

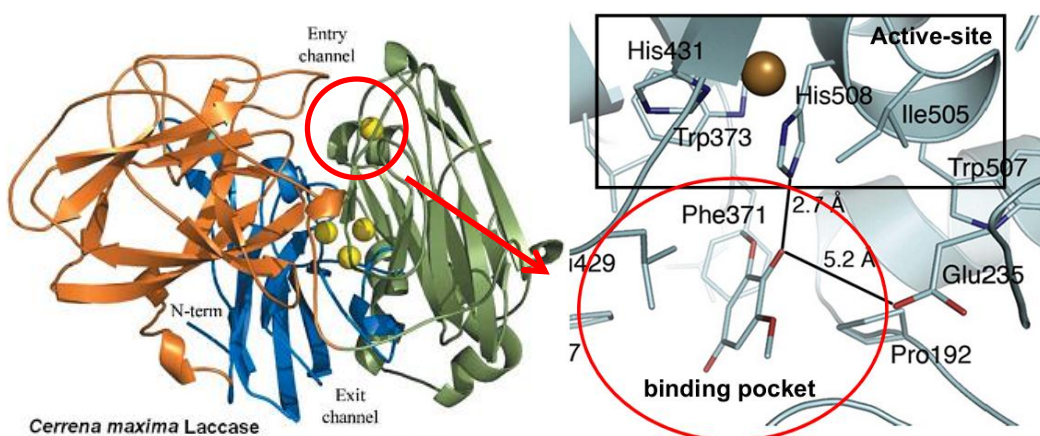
Az általunk használt magnetitet koprecipitációs (együttes leválasztás) módszerrel állították elő, így ezt a módszert mutatom be részletesen. Az előállítás vizes közegben megy végbe, megfelelő mennyiségű Fe(II)-kloridot tartalmazó oldathoz, Fe(III)-klorid tartalmú oldatot adnak, majd folyamatos kevertetés mellett meglúgosítják a rendszert. A kivált csapadékot mossák, szűrik.²⁴ Reakcióegyenlet: $2Fe^{3+} + Fe^{2+} + 8OH^- \rightarrow Fe_3O_4 + 4H_2O$

2.5 A lakkáz-enzim

A lakkázok olyan réztartalmú enzimek, melyek különféle fenolos komponensek egyelektronos oxidációját katalizálják, miközben az oxigén vízzé redukálódik (oxigén-oxidoreduktázok). A legfőbb forrásai különféle gombák, melyek közül a legfontosabb a Basidiomycetes. A természetben igen fontos szerepet játszanak a lignifikációs (lignin beépülése a sejtfalba, „fásodás”) és delignifikációs folyamatokban. Köszönhetően széles tartományú szubsztrát-specifikusságuknak, mediátorok jelenlétében nem fenolos komponensek oxidációja is lehetséges.²⁵ Ezen sajátság alapján a lakkázokat széleskörűen alkalmazzák egyes ipari folyamatokban (ezáltal valamelyest környezetbarátabbá téve azokat) és környezetvédelmi problémák megoldásában, melyet Couto és Herrera széleskörűen összefoglalt.²⁶ Ilyen lehet például a fehérités, papírfehérités (biobleaching), bioszenzorok, italfeldolgozási eljárások, aszkorbinsav meghatározás, stb. Sikeresen alkalmazták klórfenolok, alkének, színezékek, policiklusos aromás vegyületek, stb. eltávolítására.

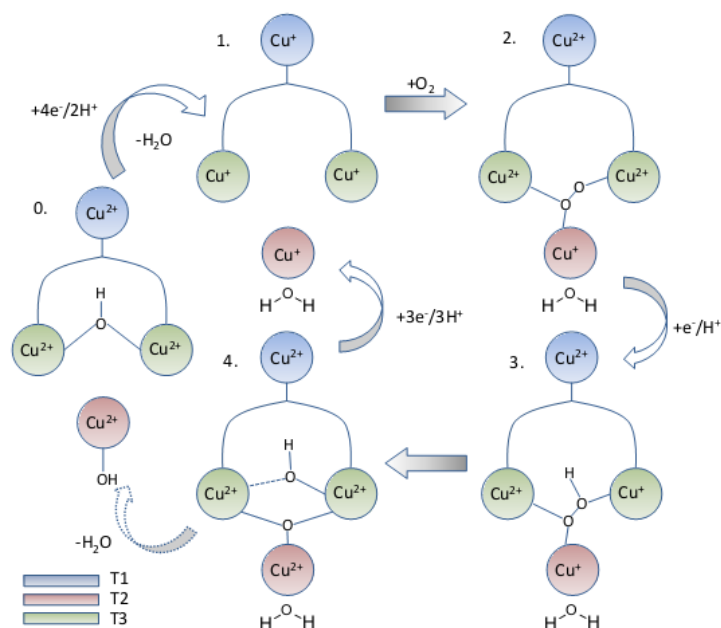
A különféle lakkáz-enzimek szerkezeti felépítése nagyon hasonló. Alapvetően három doménből állnak, melyek β -hordó topológiájúak. Az aktív centrum megegyezik, viszont a struktúra többi része viszonylag nagyfokú diverzitást mutat. Tömegük általában 60-80 kDa között változik, viszont akad példa ennél jóval kisebb, illetve nagyobb tömeggel rendelkező lakkázra is.²⁵ A negyedleges szerkezet röntgenkristallográfiával meghatározható²⁷ (egy ilyen példát mutat be a 2.5. ábra is). A multi réz enzimek további közös sajátossága, hogy aktív centrumukban négy réz atomot tartalmaznak. Ezen atomok három kategóriába sorolhatók:^{25,27,28,29}

1. **T1** Cu-1db, abszorpciós maximuma 600 nm-en van (töményebb oldat esetén a kék színért felelős), ESR-aktív
2. **T2** Cu-1db, szintelen, ESR-aktív
3. **T3** Cu-2db, egy OH-hídon keresztül kapcsolódnak egymáshoz (erős antiferromágneses csatolást biztosít), nagyon gyenge elnyelés 330 nm-en, nem ESR-aktív, a T2 rézzel egy három magvú klasztert képeznek

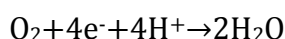


2.5. ábra: Egy tipikus lakkáz-szerkezet, illetve a szubsztrát kötőhely rajza.²⁸

A mechanizmus oxigén redukció esetében legegyszerűbben úgy írható le, hogy a szubsztrát megkötődik az aktív centrumban, majd oxidálódik, ezáltal elektrontranszfer történik a T1-es rézre (1). Innen az elektron a T2+T3 klaszterre kerül (2), majd itt megtörténik az oxigén redukciója vízzé (3).^{25,27,28,29}



2.6.ábra: A lakkáz-enzim oxigén redukciójának feltételezhető mechanizmusa.²⁸



Látható, hogy 1 mol oxigén redukciójához 4 mol elektron szükséges.

Mediátor jelenlétében a reakció teljesen azonos módon játszódik le, annyi különbséggel, hogy ekkor maga az oxidált állapotú mediátor veszi el az elektront a szubsztráttól, ezáltal redukálódva. Ezek után az elektront az aktív centrumba bekötve átadja az enzimnek, majd a mechanizmus a fent leírtak szerint megy végbe. Mediátorokat akkor alkalmazhatnak egy ilyen reakció során, ha az enzimnek nem elég nagy a redox potenciálja, hogy a kívánt komponenst oxidálja. Ilyenkor nagyobb redox potenciálú mediátor ezt könnyedén megteszi, ezáltal lehetővé téve például akár nem aromás rendszerek oxidációját is. Tipikus mediátor például a 2,2'-azino-bisz(3-etil-benzitiazolin-6-szulfonsav) (ABTS), vagy az 1-hidroxibenzotriazol (HBT).

2.6. Vezető polimer alapú nanokompozitok

Az elmúlt évtizedben egyre jobban előtérbe kerül egy új kutatási terület, mely a vezető polimer alapú nanokompozitokat tanulmányozza. Ezen anyagok előállításától azt várják, hogy maga a kompozit előnyösebb tulajdonságokkal rendelkezzen, mint a polimer, vagy a nanorészecske külön-külön. A megfelelő körülmények között gyakorlatilag bármilyen nanorészecske beépíthető a polimer mátrixba, így belátható, hogy a tudományterület hatalmas lehetőségeket rejt. A polimer és nanorészecske kombinációjával kialakított hibrid esetén számos előnyös tulajdonság jelentkezhethet: megnövekedhet a mechanikai stabilitás, a

katalitikus aktivitás, mikrohullámú elnyelést, szuperkapacitív, fotokatalitikus sajátságokat mutathatnak, stb.^{5-6, 8, 30}

Nanokompozitokat kémiai és elektrokémiai úton is előállíthatunk. Az alábbiakban a magnetit nanorészecskék polimer mátrixba való beépítésének lehetőségeit részletezem röviden, néhány egyszerű példán keresztül bemutatva.

2.6.1. Magnetit nanorészecskét tartalmazó, vezető polimer alapú nanokompozitok

Polimer/magnetit hibridek előállítására többféle módszer is ismeretes.

Kémiai szintézis: Alapvetően kétféle megközelítés létezik magnetit tartalmú kompozit anyagok szintézisére. Az egyik, amikor *in situ* módon mind a nanorészecskét, mind pedig magát a polimert azonos oldatból állítjuk elő. A polimerizációt olyan oldatban hajtják végre melybe előzetesen beletették a monomert, illetve a nanorészecske előállításához szükséges prekursorokat. A polimer és a nanorészecske azonos időben, egyazon közegben jön létre, kialakítva a nanokompozitot. A módszer igen kényelmes, gyorsan végrehajtható. Alkalmazhatósága korlátozott, leginkább különleges struktúrák kialakítására használják (nanocső, core-shell, stb.). Erre egy példa, amikor a magnetit szintéziséhez megfelelő koncentrációarányú Fe(II)/Fe(III) sókat tartalmazó oldathoz anilint adagolnak, majd az elegyet meglúgosítva néhány órán át kevertetik azt. A leváló fekete por a vizsgálatok szerint polianilin/magnetit nanokompozit.³¹

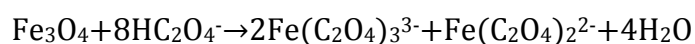
A másik megközelítés szerint először szintetizáljuk a magnetit nanorészecskéket, majd szolt készítünk belőlük és a monomert ehhez a szolhoz adagoljuk. A fiziszorpciós folyamatok lejátszódása után a rendszerhez valamilyen oxidálószerrel adagolva (FeCl_3 , ammónium-peroxo-diszulfát- $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$, kálium-peroxo-diszulfát- $\text{K}_2\text{S}_2\text{O}_8$, stb.), leválik a polimer, magába zárva a nanorészecskéket. Az eljárás alkalmazásával különféle, igen érdekes szerkezettel bíró nanokompozitok^{32,33} állíthatók elő. Erre egy példa, amikor magnetit szolhoz nátrium-dodecilszulfátot, anilin monomert és $(\text{NH}_4)_2\text{S}_2\text{O}_8$ -ot adnak, majd az elegyet 10 órán át 0-5 °C-ra termosztálva kevertették. A be nem épült nanorészecskéket HCl-val való mosással eltávolítva, majd a terméket szárítva ún. core-shell szerkezetű polianilin/magnetit nanokompozitot kaptak.³³

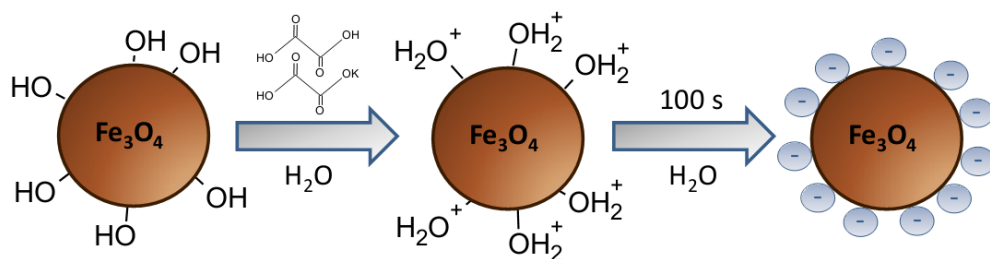
Elektrokémiai szintézis: Számos szempontból igen előnyös, ha a kompozit szintézisét elektrokémiai eljárásokkal hajtják végre. A kompozit ilyenkor egy munkaelektrod felületére válik le egy módosított felületű elektródot képezve, melyet különféle elektrokémiai, elektroanalitikai eljárásokkal közvetlen vizsgálhatunk. Ilyenkor a monomert és vezetőst tartalmazó oldathoz megfelelő mennyiségű magnetit szolt adva, majd az elektropolimerizációt

végrehajtva nanokompozitot kapunk. Az elektrokémiai szintézis során a fő kihívást a nanorészecskék számottevő mennyiségének beépítése jelenti. Ennek oka abban keresendő, hogy míg a kémiai szintézisek esetén van egy hajtóerő (a nanorészecskékre, mint gócokra válik le a polimer), addig itt ez a körülmény nem áll fenn. Ez azt eredményezi, hogy, a nanorészecske és a polimer közötti specifikus kölcsönhatás hiányában az elektródfelületre leváló nanokompozit csak nagyon kevés nanorészecskét fog tartalmazni.

Munkám során elektropolimerizációs módszerrel, vizes közegben szintetizáltam nanokompozitokat, így a továbbiakban röviden bemutatom, hogy kutatócsoportunkban hogyan állítottunk elő nagy magnetit tartalmú, vezető polimer alapú nanokompozitokat egy, az irodalomban található speciális recept alapján.³⁴ Korábban már leírtam, hogy elektrokémiai úton csak csekély magnetit tartalmú kompozitot lehet előállítani, a kutatások így manapság abba az irányba mennek, hogy minél több olyan módszert találjanak, melyek segítségével a kompozit magnetit tartalma megnövelhető.

A frissen desztillált pirrolt és magnetitet tartalmazó oldathoz egy speciális vezetősót, kálium-tetraoxalátot adunk, majd galvanosztatikusan leválasztjuk a polimert. Ismert, hogy a különféle savas oxalát-oldatokban az egyes vas-oxidok egy idő után feloldódnak. A magnetittel is ez történne, ezért a polimerizációs oldat elkészítése, majd a magnetit-szol hozzáadása és az elegy homogenizálása után a polimerizációt azonnal végrehajtjuk. A magnetit nanorészecskék beépülése a polimer mátrixába egy összetett folyamat eredményeképpen valósul meg. Mint azt már a 2.4. fejezetben említettem, a részecskék felületén hidroxil-csoportok találhatóak, melyek a közeg pH-jától függően protonált, vagy deprotonált állapotban vannak jelen. Mivel az általunk alkalmazott vezetősó miatt savas az oldat, esetünkben az -OH_2^+ forma lesz jelen, mely által a nanorészecske felülete pozitív töltésűvé válik. A nanorészecskék oldódásának első lépéseként az oxalát-ionok adszorbeálódnak a pozitív töltésű felületen. Ezt követően a reakció eredményeképpen a felületen vegyes Fe(II)/Fe(III)-oxalát anion alakul ki, mivel a magnetit szerkezetéből eredően a felületen egyaránt találhatóak Fe(II)-, illetve Fe(III)-ionok is. A módosított magnetit nanorészecskék negatív felületi töltéssel rendelkeznek. Az itt leírtakat a 2.7. ábra mutatja be sematikusán. Az így kialakult „anion” a töltéskompenzáció részeként beépül a polimer rétegbe. Az oldódás reakcióegyenlete az alábbiakban látható:





2.7. ábra: A magnetit nanorészecskék felületmódosulásának sematikus rajza a polimerizációs körülményeket modellezve.

Azt, hogy a képződött polimer rétegben ténylegesen magnetit nanorészecskék találhatók, korábban kutatócsoportunk transzmissziós elektronmikroszkópos technikával igazolta.³⁴

2.6.2. Bionanokompozitok

A vezető polimer mátrixba nem csak szervetlen nanorészecskék rögzíthetők, hanem különféle enzimek és egyéb, biológiailag aktív makromolekulák is. A gyakorlati felhasználás szempontjából előnyös, ha az enzimet vezető polimer mátrixba immobilizálunk, mert az adott enzim által katalizált reakció folyamatát elektrokémiai mérőmódszerekkel egyszerűen és közvetlenül nyomon követhetjük, továbbá az enzim rögzítése az elektródfelületen nehézkes, mert elveszíti az elektroaktivitását, azaz a polimer ezen a problémán is segít, sőt akár a mediátor szerepét is betöltheti..... Ezen az elven különféle bioszenzorok alakíthatók ki, attól függően, hogy az analit koncentrációjára vagyunk kíváncsiak, vagy csak az adott speciesz jelenlétét akarjuk kimutatni.^{35,36,37,38} Mivel nem csak enzimek, hanem antitestek, antigének is immobilizálhatók, egyszerűen kialakíthatók az immunelemzésen alapuló szenzorok is.³⁹ Egy másik, igen közkedvelt felhasználási mód, ha magát a bionanokompozitot egy tüzelőanyag-cella elektródjaként alkalmazzák.^{40,41}

Ahhoz, hogy az elkészített szenzor tartósan működőképes legyen, kulcsfontosságú, hogy az enzim bennmaradjon a polimer mátrixban. Tudományos Diákköri Munkám során a lakkáz-enzim immobilizációjával foglalkoztam behatóbban, így az alábbiakban a szakirodalomban fellelhető technikai megoldásokról írok. Ezen módszerek azonban az enzimek java részénél és a különféle egyéb biológiailag aktív makromolekulák esetén is használhatóak.

Alapvetően két nagyobb csoportra bonthatók az enzim-immobilizációs módszerek. Az első csoport, amikor az enzimet nem rögzítik előzetesen, csak becsapdázódik a polimerizáció során a polimerbe. Ebbe a csoportba soroltam továbbá az olyan szintéziseket, amikor az enzimet az elektródfelületre szárítják, és rá/közé-polimerizálnak, illetve amikor csak fiziszorpciós kölcsönhatások vannak jelen. A másik csoportba azok a megoldások tartoznak,

amikor az enzimet egy rövidebb-hosszabb eljárás (reakciók sorozata+különböző technikai lépések, úgy, mint: mosás, szárítás, diszpergálás, stb.) során kemisorbeáztatják a polimer által módosított elektródfelületen, vagy egy nanorészecskén. Könnyen belátható, hogy az első csoportba tartozó módszerek könnyűek, gyorsan kivitelezhetők, azonban a gyengébb és nem specifikus kölcsönhatás miatt nem biztos, hogy szenzorikai célokra hosszú távon alkalmazható elektród konstrukciót eredményeznek. A második csoportba tartozók szintézise ugyan hosszú ideig tarthat és esetenként körülményes, viszont az erősebb, kemisorpciók kölcsönhatás miatt tartósabb kompozitot kapunk.

Enzim-immobilizáció becsapódással: A legegyszerűbb módszer az, amikor a polimerizációs oldathoz hozzáadjuk a monomer és a vezetősó mellé a kívánt mennyiségű enzimet, majd leválasztjuk a polimert elektrokémiai úton. Ilyenkor az elektródfelület közvetlen közelében lévő enzimet a növekvő polimer réteg magába zárja. A kialakult nanokompozit nagyon kevés enzimet tartalmaz, azonban ez nem feltétlenül jelenti azt, hogy az enzimaktivitás nem detektálható. Az alapötletet kissé módosítva általában az elektródfelületre leválasztanak egy kezdeti, nagyon vékony réteget, majd az enzim tartalmú oldatba téve (vagy az enzimes oldatot a rétegre cseppentve) vagy várnak, míg lejátszik egy fizisorpciók kölcsönhatás, vagy pedig azonnal leválasztanak még egy réteg polimert, becsapódva az enzimet.⁸

Kémiai polimerizációnál egy igen érdekes technikai megoldást alkalmaznak: maga az enzim lesz az oxidálószer, mely kialakítja az oldatban a gyökkationokat. Emlékezzünk, a lakkáz oxidálni képes a különböző fenolos komponenseket, így egyes aromás szerkezetű monomereket is. Ezt a módszert leggyakrabban pirrol⁴² és anilin⁴³ polimerizációja során használják ki. A polimerizáció lényegesen lassabb, mint az elektrokémiai leválasztás esetén, azonban az oldatban, folyamatos kevertetés mellett kialakuló oligomerek sokkal nagyobb mennyiségű enzimet zárnak magukba. A szintézis többféleképpen is végrehajtható, léteznek homogén módszerek (pl. az előbb említett kettő), illetve heterogén módszerek is, mely során a fázishatáron lejátszódó polimerizációt alkalmaznak.⁴² Az elektrokémiai vizsgálatokhoz ezek után a kompozitot általában az elektródfelületre szárítják.

Enzim-immobilizáció fizisorpcióval: Egy másik lehetőség, amikor az elektródfelületen előzetesen fizisorbeáztatják az enzimet, majd erre polimer oldatot cseppentenek, esetleg a módosított elektródot használva az enzimre polimert választanak le elektrokémiai polimerizációval. Erre egy példa: már korábban megfigyelték, hogy a lakkáz különösen jól fizisorbealódik szén felületeken, ezért egy ilyen elektródra cseppentettek fel lakkáz tartalmú oldatot, majd a száradást megvárva, Nafion[®]-t, így létrehozva a kompozitot.⁴⁴

Enzim-immobilizáció kemiszorpcióval: Az ebbe a csoportba tartozó módszerek sajátja, hogy az enzimet valamilyen funkciós csoporton keresztül kovalens kötással az elektródfelülethez, a polimerhez, vagy valamilyen nanorészecske felületéhez kötik, majd erre polimerizálnak. Általában a felületi hidroxil-csoportokat használják ki. Ezen módszerek alapja általában, hogy először a felületet módosítják például szilanizálással. Az alkalmazott szilán úgy van funkcionálva, hogy az egyik oldallánccal az enzim kovalens kötést tudjon kialakítani. A szakirodalomban leggyakrabban 3-aminopropil-trietoxiszilánt (APTES) alkalmaznak,^{36,45,46} ám előfordulnak merkapto-funkcionált szilánok, stb. is. A felület azonban nem csak szilanizálással módosítható, hanem pl. különféle többértékű karbonsavakkal,⁴⁷ vagy megfelelően funkcionált foszfonsavval⁴⁸ is. Ezt követően általában egy glutáraldehiddel való reakció következik, mely egy formil-funkciót alakít ki (ahol karboxil-, vagy formil-csoportok vannak, ott erre nincs szükség). A feltételezhető mechanizmus szerint maga az enzim aminos-csoportokat tartalmazó oldalláncai reakcióba lépnek a karboxil-, illetve formil-csoportokkal, kovalens kötést létesítve. Ezzel az enzim immobilizációja megvalósult, már csak a polimerizáció van hátra. Egy másik érdekes immobilizációs technika az, amikor maga a polimer rendelkezik karboxil-funkcióval, így ezen hosszadalmas reakciólépésekre nincs szükség. Ilyenre példa, ha először 3-metiltiofén/tiofén-3-ecetsav kopolimert választunk le, majd az elektródot az enzimet tartalmazó oldatba mártjuk. A tiofén-3-ecetsav karboxil-csoportjaival az enzim kovalens kötést alakít ki a fent ismertetettek szerint, létrehozva a bionanokompozitot.⁴⁹

2.7. Témaválasztás és célkitűzés

Kutatócsoportunk a 80-as évek végétől kezdve tanulmányozza az elektromosan vezető szerves polimerek redoxi átalakítását és az azt kísérő jelenségeket, úgy, mint ion- és oldószermozgást, valamint az optikai spektrum változásait. Az elmúlt évek során a csoport érdeklődése a vezető polimerek kompozitjai felé fordult. Ezen új típusú nanohibrid anyagok, melyek leginkább szervesetlen nanorészecskékkel alkotott kompozitok, igen változatos és előnyös tulajdonságokkal rendelkeztek, mint például fotokatalitikus hatás, mágneses tulajdonságok. Emellett sikerrel járt a B12 vitamin polimerfilmben történő feldúsítása nanorészecskéken történő adszorpció útján.

Munkám során célul tűztük ki egy olyan gyors szintézismódszer kidolgozását, mely esetén egy erős kémiai kölcsönhatás alakul ki az enzim és a magnetit között oly módon, hogy az nem befolyásolja döntően az enzim szerkezetét, és sikerességének igazolását, melynek segítségével magnetit felületén immobilizált lakkáz-enzimet építhetünk be egy jó ismert,

stabil elektroaktivitású polimer, a polipirrol mátrixába. Ezzel a módszerrel többszörös előnyhöz juthatunk, mivel az immobilizációtól azt várjuk, hogy a magnetittel együtt jelentős mennyiségű enzim rögzül a polimerben, továbbá a lehetséges későbbi, oxigénredukciós alkalmazások (pl. tüzelőanyag-cella) során számíthatunk a magnetit hozzájárulására is. Kutatócsoportunkban korábban sikerrel építettünk nagy mennyiségű magnetit nanorészecskét különféle vezető polimer mátrixokba, így a kísérletsorozat megtervezése során elsősorban ezen eredményeinkre támaszkodtam.

3. Kísérleti rész

3.1. Felhasznált vegyszerek

A polimerrétegek előállításához:

- Ioncserélt víz (MilliQ)
- Kálium-tetraoxalát dihidrát ($\text{KH}_3(\text{C}_2\text{O}_4)_2 \cdot 2\text{H}_2\text{O}$; $M_r=254,19$; Sigma-Aldrich)
- NaCl ($M_r=58,44$; Spektrum-3D)
- Pirrol ($\text{C}_4\text{H}_5\text{N}$; $M_r=67,09$; Sigma-Aldrich)
- Magnetit nanorészecske (Fe_3O_4 ; $M_r=231,55$)
- Lakkáz-enzim (*Trametes versicolor*; ≥ 10 U/mg; Sigma-Aldrich)

Az elektródok tisztításához:

- 30 V/V%-os hidrogén-peroxid oldat (H_2O_2 , $M_r=34,02$; Spektrum 3D)
- Kénsav (H_2SO_4 , $M_r=98,08$; Reanal)
- Aceton ($\text{C}_3\text{H}_6\text{O}$, $M_r=58,09$; Reanal)

Az elektrokémiai vizsgálatokhoz:

- Nitrogén gáz (O_2 , $M_r=32,00$; Messer)
- Oxigén gáz (N_2 , $M_r=28,01$; Messer)

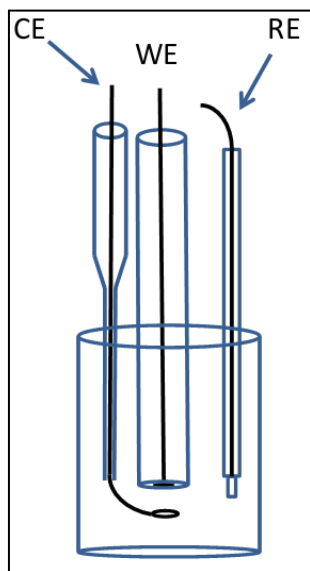
3.2. Alkalmazott eljárások, felhasznált műszerek

3.2.1. Elektrokémiai polimerizáció

Elektrokémiai polimerizációt többféleképpen is kivitelezhetünk, sztatikus technikák esetén az áramsűrűség, vagy az elektródpotenciál értékét tartjuk állandó értéken, és eközben az idő függvényében mérjük a változó mennyiséget, majd ezekből vonjuk le a megfelelő következtetéseket. A j áramsűrűség töltésátviteli folyamatok esetén arányos az elektronátvitel sebességével, ennek következtében a reakciósebességgel is. Idő szerint integrálva megkapjuk az átvitt töltést, mely a leválasztott anyagmennyiséggel lesz arányos, feltételezve, hogy az átvitt töltés mind a polimerizációra fordítódik. A munkaelektrodon lezajló folyamat potenciálját a referencia elektródhoz (pl. Ag/AgCl) képest mérjük. Ez azért tehető meg, mert a referencia elektród egy nehezen polarizálható elektród, potenciálja állandónak tekinthető.

Munkám során az áramsűrűséget tartottuk állandó értéken, azaz *galvanosztatis* módon választottuk le az egyes rétegeket. A már fent említett módon, az átvitt töltést a polimerizáció közben eltelt időből egyszerűen számíthatjuk. A polimerizációt egy klasszikus háromelektrodos cellában végeztük (3.1. ábra). Munkaelektrodként $0,07068 \text{ cm}^2$ felületű,

előzetesen tisztított üvegszén korongelektrodot alkalmaztunk, ellenelektrodként pedig egy platina gyűrűt, mely pontosan a munkaelektrod felületével szemben helyezkedett el. Mivel az üvegszenet nem lehet „piranha-oldattal” (3 rész cc. H_2SO_4 , 1 rész 30%-os H_2O_2) tisztítani (károsítaná az elektrod felületet), az alábbi eljárást alkalmaztuk: az üvegszén elektrodot minden használat előtt políroztuk finomszemcsés alumínával (Al_2O_3), majd 5 percre ultrahangos kádba állítottuk, hogy az alumina nyomoktól megszabaduljunk, ezt egy újabb polírozási és ultrahangozási fázis követte. A polimerizáció előtt a munkaelektrodot acetonnal öblítettük. Referencia elektrodként Ag/AgCl/3M NaCl elektrodot alkalmaztunk, melynek potenciálja +200 mV a standard hidrogén elektróddal (SHE) szemben. A dolgozatom további részében feltüntetett potenciál értékek mindegyikét ehhez a referencia elektródhoz viszonyítva adom meg. Elektrokémiai méréseinket egy Autolab PGSTAT10 készülék segítségével végeztük.

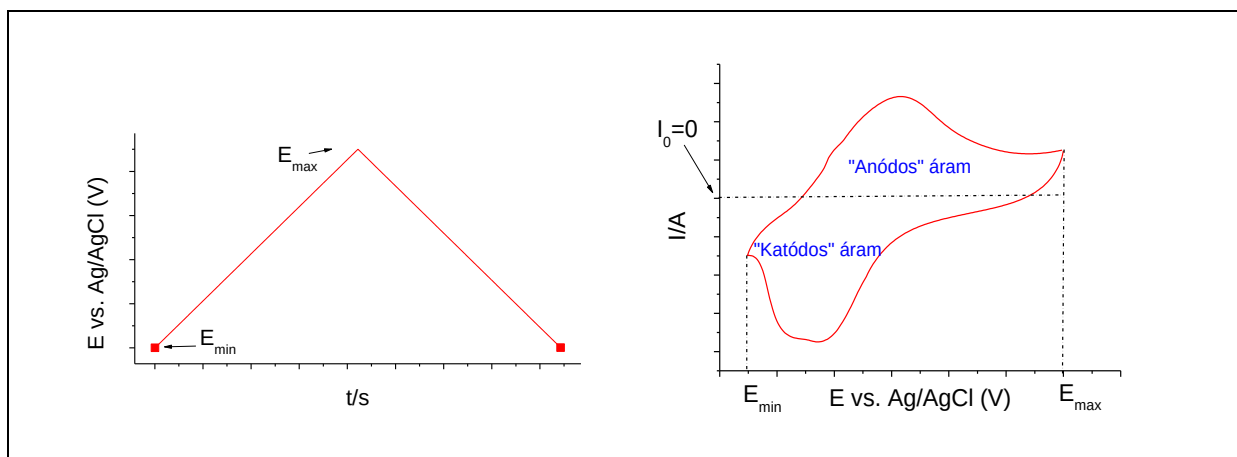


3.1 ábra: A polimerizáció során használt cella sematikus rajza, ahol WE: munkaelektrod, RE: referencia elektrod, CE: ellenelektrod.

3.2.2. Ciklikus voltammetria

A munkaelektrod felületére leválasztott vezető polimer elektrokémiai viselkedését különféle elektrokémiai módszerekkel vizsgálhatjuk. Ezek közül az egyik legáltalánosabb a ciklikus voltammetria, mely információt szolgáltat a polimerfilm elektroaktivitásáról, a leválasztott polimer redoxi viselkedéséről és a töltéskapacitásáról.⁹ A módszer alkalmazása során a polimer-elektrod potenciálját egy általunk választott potenciál-tartományon belül időben lineárisan, háromszög-függvény szerint változtatjuk, s ekközben mérjük az áramot. A 3.2-es ábrán a háromszögjel és egy polipirrolra jellemző ciklikus voltammogram látható. A potenciál növelésével a polimer réteg oxidálódik, míg elérjük E_{max} -ot, majd innentől kezdve

folyamatosan csökken a potenciál értéke, a réteg redukálódik, míg el nem érjük $E_{\min}$ küszöbértéket. Nulla áramerősség (melyet az ábrán szaggatott vonallal jelöltem) felett pozitív az áramerősség értéke (anódos, avagy oxidációs áram), míg e vonal alatt negatív (katódos, avagy redukciós áram). A ciklikus voltammogramokon megjelenő csúcsok helye, s ennek függése a pásztázási sebességtől, az ott mérhető áram, illetve annak megváltozása az egyes pásztázási sebességeknél értékes információkat hordoznak a réteg elektroaktivitásáról, illetve a polimer elektrokémiai viselkedéséről.

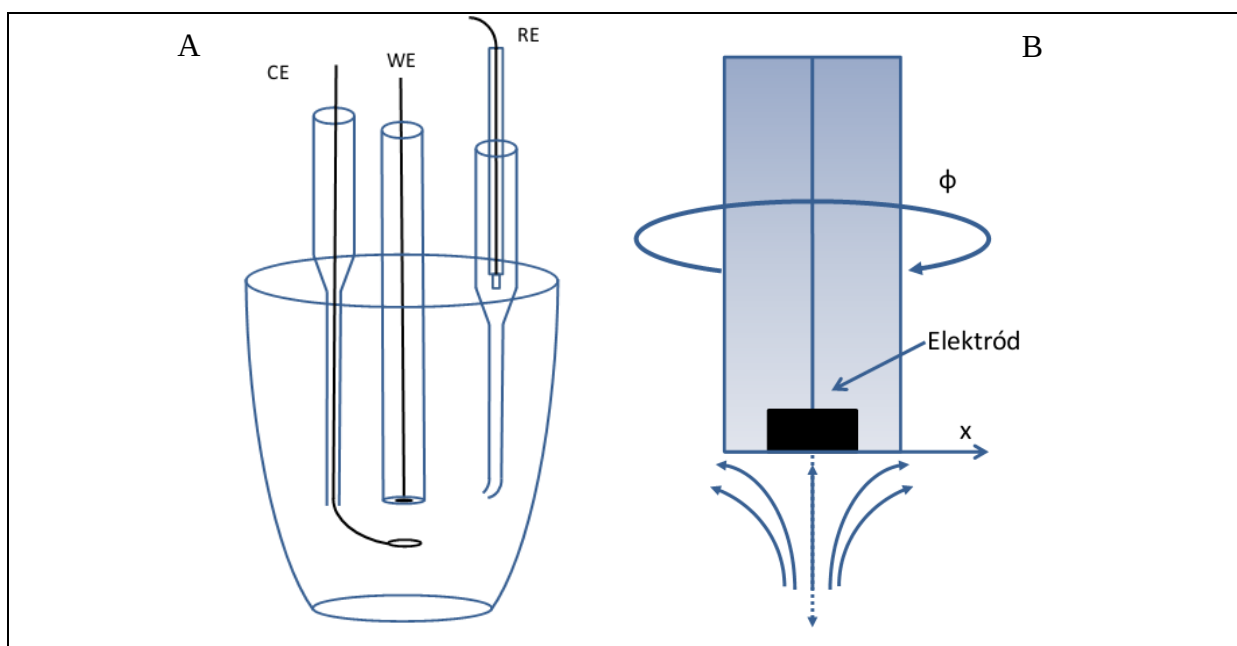


3.2. ábra: Háromszög-függvény, illetve egy ciklikus voltammogram.

Méréseink során a ciklikus voltammogramokat oxigéntartalmú és oxigénmentes környezetben vettük fel, hogy megfigyelhessük mekkora az oldott oxigén redukciójához rendelkezhető töltéstöbblet. Ezen mérések kivitelezéséhez a forgó korongelektroódhoz tartozó, zárt cellát alkalmaztuk.

3.2.3. Mérések kivitelezése forgó korongelektroódon

Az elektrokémiai folyamatok igen gyakori kísérő jelensége, hogy a töltésátvitel gyorsabb, mint a reakcióban résztvevő anyagok transzportja. Ezt egyértelműen jelzi, hogy a potenciál változtatásának hatására az áram nem változik, hanem beáll egy konstans értékre, azaz egy diffúziós *határáram* alakul ki. Ez gyakran igen hátrányos, zavaró lehet, mivel így nem tud kialakulni a maximálisan elérhető reakciósebesség, viszont az analitikai alkalmazás szempontjából nagyon előnyös, mert ez az oldatban reagáló anyag mennyiségére enged következtetni.⁵⁰ Az elektrokémiai folyamatok lejátszódásának kinetikáját forgó korongelektroóddal tanulmányozhatjuk. Az elektroód egy teflonba (vagy más szigetelő anyagba) ágyazott elektroód, melyet egy precízen szabályozható forgatási sebességű motorhoz kapcsolnak.



3.3. ábra: Egy tipikus forgó korongelektrodos elrendezés A), illetve az elektród forgatása során kialakuló áramlásprofil (B).

Előnye, hogy adott forgatási sebességnél (szögsebességnél) a folyadék áramlási profilja, illetve az általános diffúzióegyenlet (az elektrokémiai reakció kinetikája is) peremértékek megadásával számítható. Így olyan összefüggéseket kapunk, melyek kapcsolatot teremtenek az adott potenciálon kialakuló határáramok, illetve a reakcióban elreagáló anyagok koncentrációja, vagy az átlépett elektronok száma között. A potenciál függvényében a rögzített forgatási sebességen mért határáramok a lejátszódó folyamat kinetikai paramétereinek meghatározását is lehetővé teszik, így egy olyan technika van a kezünkben, mellyel a lejátszódó elektródfolyamatokat jellemezhetjük analitikai-, illetve kinetikai szempontból.⁵¹ A 3.3. ábrán egy forgó korongelektrodos cellát, illetve a folyadékra a forgatás során jellemző áramlási profilt mutatom be. Munkám során a forgó korongelektrodos elrendezést lineáris voltammetriával kombinálva az elektródon végbemenő oxigénredukciós reakció során átlépő elektronok számát kívántuk meghatározni. Ezen számérték arról ad felvilágosítást, hogy az O_2 redukciója milyen mechanizmus szerint megy végbe, illetve, hogy a különböző mechanizmusok milyen mértékben járulnak hozzá a bruttó reakcióhoz. A méréseket szobahőmérsékleten végeztük ($25 \pm 0,5$ °C-on).

3.2.4. Lineáris voltammetria

A lineáris voltammetriás mérések esetén a potenciált két küszöbérték között állandó sebességgel változtatjuk. Elve gyakorlatilag a ciklikus voltammetriával azonos, azonban itt a másik küszöbértéket elérve nem fordul meg a potenciál változásának iránya, azaz olyan, mintha egy fél ciklust mérnénk le. A mérőmódszer forgó korongelektróddal kombinálva vizsgálható az egyes elektrokémiai folyamatok lejátszódásának kinetikája

3.2.5. Elektrokémiai kvarckristály nanomérleg (EQCN) technika

A polimerizáció során az elektród felületére polimer réteg válik le, azaz az elektród tömege megváltozik. A tömegváltozás mértékéből következtethetünk a levált polimer mennyiségére. Ennek mérését az EQCN technika tette lehetővé (korábban EQCM-nek nevezték, azonban ez EQCN egyre inkább elfogadott, mivel manapság már ng tömegváltozás is detektálható). Eredetileg a gáztérből az elektródfelületen adszorbeálódó gázmolekulák mennyiségének mérésére fejlesztették ki, azonban bizonyos feltételek mellett oldatfázisban is alkalmazható.⁹

Az elektrokémiai kvarckristály mikromérleg technika azon alapszik, hogy a nagyfrekvenciás rezgéssel (kb. 10 MHz) működő kvarckristály frekvenciája megváltozik, ha például gázmolekulák, vagy maga a polimer részecskéi szorbeálódnak felületén. A detektálás során a kvarc piezoelektromos sajátosságát használjuk ki, azaz a frekvenciaváltozás a feszültség megváltozását vonja maga után, melyet a potenciosztáttal könnyedén követhetünk. Elektrokémiai alkalmazásokban a kristály felülete egy nagyon vékony fémréteggel van bevonva, ezt használjuk munkaelektrodként, erre történik a polimer leválása. A kristály frekvenciaváltozása és a kristály tömegének megváltozása között Sauerbrey állapított meg összefüggést:⁵²

$$\Delta f = -C \cdot f_0^2 \cdot \Delta m$$

Ahol C konstans, f_0 a kvarckristály saját rezonanciafrekvenciája, míg Δm a tömegváltozás. Amíg a réteg megőrzi merev, nem viszkoelasztikus viselkedését, addig az összefüggés folyadékkal érintkező kristályokra történő szorpció esetén is érvényes, ezáltal lehetőség nyílik az oldatfázisban is működő, kvarckristály tömegváltozásának mérésére. A viszkoelasztikus viselkedés elkerüléséhez a kristállyal együtt mozgó, minél vékonyabb filmet kell leválasztani, ez jellemzően 200 nm alatti rétegvastagságot jelent.⁵³

A tömegváltozás értékéből több információt is nyerhetünk. Mérhetjük a polimerizáció folyamán a polimer képződéséből adódó tömegnövekedést, illetve az ennél sokkal kisebb

tömegváltozást okozó ionszorpció mértékét. Utóbbi igen összetett jelenség, hiszen az ionok szolvátburkukkal együtt mozdulnak el, esetlegesen helyigényük folytán oldószermolekulákat szorítanak ki a filmből.⁵⁴ A polimerizáció során mért tömegnövekedés azonban alkalmas például arra, hogy megmutassuk, hogy a nanokompozit esetén az adott anyag beépült-e a polimer mátrixba, hiszen ha igen, akkor az azonos szintéziskörülmények mellett mért tömegváltozás is nagyobb lesz, mint a polimer esetén.

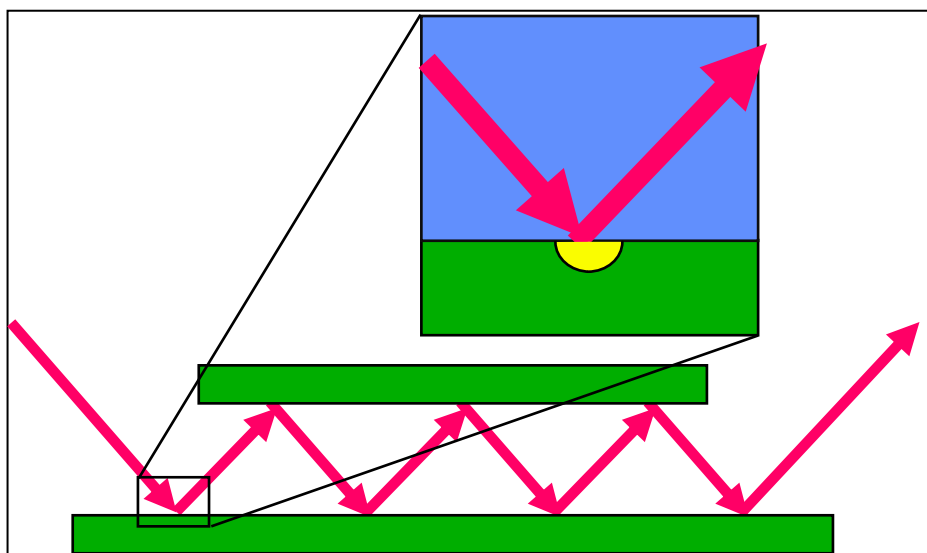
Méréseinket arany filmmel bevont kvarc kristályon végeztük, a műszerhez tartozó, 5 cm³ térfogatú cellában. A geometriai elrendezés, illetve az egyéb paraméterek (felület, frekvencia, stb.) az egyes mérések során azonosak voltak. A polimerizációs körülmények megegyeztek a 3.2.1. fejezetben leírtakkal. Ellenelektrodként egy spirál alakban feltekert platina szálát, míg referencia elektrodként Ag/AgCl/3 M NaCl elektródot alkalmaztunk.

A polimerizációs folyamat előtt a kristályokat monomermentes, egyébként a polimerizációs oldattal megegyező összetételű oldatban addig rezgettük (jellemzően kb. 15 perc), míg a frekvenciaváltozás elhanyagolható lett, azaz megvártuk, hogy lejártsódjanak a különféle fiziszorpciós folyamatok. A kondicionálási fázis után oldatot cseréltünk, majd végrehajtottuk a polimerizációt, közben regisztrálva a kristály rezgési frekvenciájának változását.

Méréseinket egy EQCM 7013 készülékkel végeztük el, mely a potenciosztáthoz volt csatlakoztatva. A rendszert ólom Pb(Ac)₂ oldatból történő leválasztásával kalibráltuk, mely során a kalibrációs állandó (C) értéke -5,04 ng/Hz-nek adódott.

3.2.6. Infravörös spektroszkópia

Ha egy molekula vagy atom elektromágneses sugárzást nyel el, gerjesztett állapotba jut. Ez úgy szűnik meg, hogy a többlet energiát fény formájában kisugározza. A mintát monokromatikus fénnel besugározva a fényintenzitás csökkenéséből többféle következtetést is levonhatunk: egyrészt az intenzitásváltozás függ a minta *anyagi minőségétől*, másrészt pedig az abszorbeáló részecskék *mennyiségétől*. Ezek alapján a színek mind kvantitatív, mind kvalitatív információt szolgáltat, azonban ezek közül mi csak a kvalitatívakat hasznosítjuk. Ezen módszerrel szerves és többatomos szervesetlen molekulákat azonosíthatunk, kimutathatjuk jelenlétüket. Az infravörös spektroszkópiákban a besugárzó fény hullámhossza az infravörös tartományba esik, melynek eredményeképp a különféle molekulák rezgési és forgási energiaszintjei gerjesztődnek.⁵⁵



3.4. ábra: A totálreflexió jelenségének sematikus rajza. (Dr. Berkesi Ottó ábrája)

Esetünkben az infravörös spektrometria egy speciális fajtáját, a *gyengített teljesreflexió*s technikát (Attenuated Total Reflectance) alkalmaztuk.⁵⁶ Ha a fény egy úgynevezett határszög felett érkezik egy nagy törésmutatójú anyag belső felületére, akkor visszaverődik a felületről. A készülékeknél ezt egy nagy törésmutatójú kristállyal érik el. A kristályon áthalad a fény, majd annak alsó „lapján” totálreflexiót szenved, ezek után a jel pedig a detektorra jut (3.4. ábra). A technika különlegessége abban rejlik, hogy a fotonok nem érintkeznek közvetlenül a mintával, azonban az elektromágneses tér átjut a túloldalra, ahol a mintában lévő oszcillátorok képesek energiáját felvenni, így történik meg a gerjesztés, majd a fény gyengítetten verődik vissza.

Ha a minta nem nyel el, akkor teljesen visszaverődik, ha viszont igen, akkor a besugárzó fény egy részét elnyeli, majd a maradék teljesen visszaverődik, innen a technika neve is. A beesési szöget a két közeg törésmutatójából (n_{21}) számíthatjuk:

$$\sin\theta = n_{21}$$

Ez a módszer igen nagy segítséget nyújt, hogy különféle nem átlátszó hordozón rögzített felületi rétegek spektrumát tanulmányozhassuk. Esetünkben a polimer filmek igen vékonyak voltak az elektródok felületén, ezért akár hetekig is eltartott volna a pasztillázáshoz elegendő mennyiségű anyag előállítása. A másik igen nagy előnye, hogy ezáltal közvetlen információkat kapunk a rétegről, míg ha pasztillát készítünk, az már nem ugyanaz a minta, hiszen a polimerben a pasztillázási és előkészítési eljárás során végbemehetnek különféle változások, például szennyeződhet a minta, így esetleg hibás eredményeket kaphatunk, míg ez ennél a módszernél nem áll fenn. Infravörös spektroszkópiás méréseink során egy Harrick

ATR feltétellel és DTGS detektorral ellátott, Bio-Rad Digilab Division FTS-65A/896 FT-IR spektrométerrel dolgoztunk. A bemutatott spektrumokat 128, illetve 256 színek átlagolásával kaptuk.

3.2.7. Transzmissziós elektronmikroszkópia

A *transzmissziós elektronmikroszkópia* (TEM) esetén az elektronsugarat elektromágneses lencsékkel fókuszáljuk, így egy olyan optikai rendszer áll össze, mely messze meghaladja a fénymikroszkóp feloldását. Fényforrásként egy V-alakú izzószál (katód) szolgál, melyet felfűtve abból elektronok lépnek ki. A lencsék szimmetrikus és erős mágneses teret hoznak létre, amelyekben az elektronsugár elhajlik, és így egy pontban gyűjthető össze. Az anód kerek nyílásán átjutó elektronsugár először a kondenzorlencséken fókuszálódik a preparátumra, majd ezen átjutva az objektív és a projektív lencséken halad keresztül, és a képernyőre vetülve alkot erősen nagyított, éles képet. Az alkalmazandó preparátumnak vékonynak kell lenni, mert az elektronok csupán ~100 nm rétegvastagságon képesek áthaladni. A képalkotás során a rugalmasan szóródó elektronokat használjuk fel. Az elektronszóró struktúrák nagyrészt hiányoznak a képalkotásból, és így az elektronmikroszkópban árnyékot adnak. Kis atomszámú elemek az elektronokat kevésbé szórják, ezért a szerves molekulák többsége alig ad árnyékot, míg a magasabb atomszámú elemek erős árnyékot idéznek elő. Ezzel a technikával elsősorban a magnetit jelenlétét kívántuk igazolni az elkészített kompozit esetében. A magnetit nanorészecskék jelenlétét úgy igazolhatjuk, hogy a polimerhez képest igen nagy kontraszttal, éles árnyékot adva látszanak, azaz magától a polimertől jól elkülöníthetők. A technika további előnye, hogy így megmondható, hogy a magnetit/módosított magnetit mekkora mértékben aggregálódott. Méréseinket egy FEI Tecnai G² 20 X-Twin típusú HR-TEM készülékkel végeztük, 200 kV gyorsító feszültség használatával.

4. Kísérleti eredmények

4.1. Lakkáz-enzim immobilizációja magnetit nanorészecskék felületén

4.1.1. Szintézismódszer kidolgozása

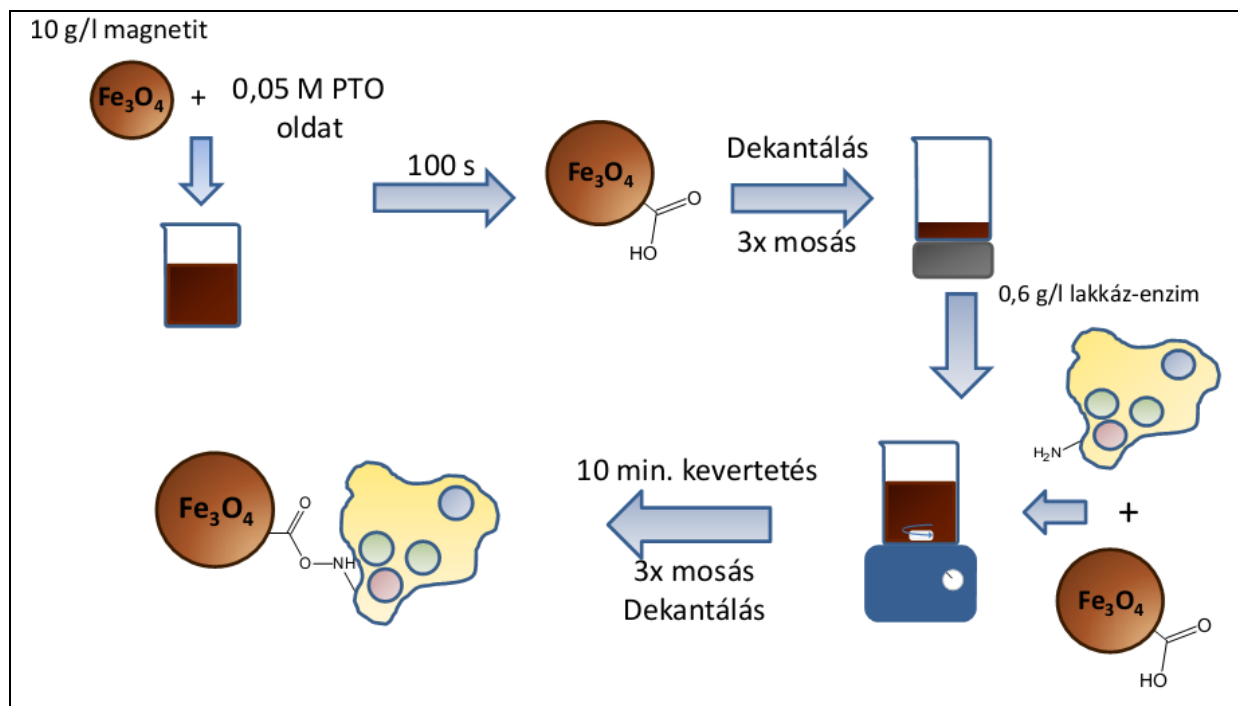
Tudományos Diákköri munkám során, mint azt már a témaválasztás és célkitűzés alfejezetben leírtam, első feladatként a lakkáz-enzimet kívántuk rögzíteni a magnetit nanorészecskék felületén. A 2.6.2. alfejezetben részletesen bemutattam, hogy milyen lehetőségek állnak rendelkezésre az enzim-immobilizáció témakörében. Emlékeztetőül, a célunk az volt, hogy az enzimet valamilyen kemisorpcióos kölcsönhatás révén a nanorészecske felületéhez rögzítsük. További kritériumként kikötöttük, hogy lehetőleg a szintézismódszer vezessen jól definiált kémiai kötések kialakulásához, illetve legyenegyszerűen és gyorsan végrehajtható. A munka kezdetén a szakirodalomban csupán egy olyan módszert³⁶ találtunk, mely révén sikeresen immobilizáltak lakkáz-enzimet a magnetit nanorészecskék felületén, így ezt alapul véve próbáltuk célkitűzéseinket megvalósítani.

A recept szerint a szintetizált magnetit nanorészecskéket 200 ml vízben kell diszpergáltatni. Első lépésben amino-csoporttal funkcionálizáljuk a magnetit nanorészecskéket, ennek eléréséhez 200 µl aminopropil-trietoxi-szilánt (APTES) adunk a szolhoz, majd az elegyet 8 órán keresztül kevertetjük. A reakcióidő letelte után mágnesesen dekantáljuk a nanorészecskéket, 3·70 ml etanollal mossuk, majd levegőn szárítjuk. Az amino-funkcionált nanorészecskékből 10 mg-ot diszpergálunk 2 ml 10%-os glutáraldehid oldatban. Az oldat úgy készül, hogy a glutáraldehidet pH=7,4, c=0,10 M-os foszfát-pufferben hígítjuk a kívánt koncentrációjúra. A szolt 4 órán át ultrahangos kádban rázatjuk, az amino-csoportokkal reagál a kétértékű aldehid, így kialakítva egy formil-funkciót a nanorészecskén. Ezt követően szintén mágnesesen dekantáljuk a nanorészecskéket, melyet egy nagyon alapos desztillált vizes mosás követ. Ezután a funkcionált magnetitet 2 ml pH=6, c=0,10 M-os foszfát-pufferben diszpergáltatjuk, majd a szolhoz 200 µl, 66 U/ml koncentrációjú lakkáz-oldatot adunk, s a rendszert egy éjszakán át kevertetjük. A mágneses dekantálás és a foszfát-pufferrel való többszöri mosás után megkapjuk a módosított nanorészecskéket, melyek felületén rögzítve van a lakkáz-enzim. Már a fenti recept leírásából is látható, hogy ez az eljárás nem teljesítette maradéktalanul az általunk elvárt kritériumokat, ugyanis akár három napon keresztül is eltarthat, továbbá igen bonyolult és vegyszerigényes. Ráadásul kísérleteink során azt tapasztaltuk, hogy a hosszú procedúra alatt előállított magnetit/lakkáz, beépítve a polimer

mátrixba, ugyan kis mértékben megnövekedett katalitikus aktivitást mutatott a polipirrol/magnetit nanokompozithoz képest, azonban a többlet szinte elhanyagolható volt, továbbá a rétegek elektroaktivitása is nagyon gyorsan lecsökkent, nem lehetett jól reprodukálható méréseket végezni. A szintézismódszer sikerességét infravörös spektroszkópiával kívántuk igazolni, azonban a felvett spektrumokon sem sikerült a lakkázhoz köthető sávokat egyértelműen azonosítani.

Beláttuk, hogy a fent vázolt módszer nem alkalmas a kitűzött célok elérésére, így egy új szintézismódszer kidolgozása mellett döntöttünk. Kutatócsoportunkban korábban sikerrel készítettünk nagy magnetit tartalmú vezető polimer alapú nanokompozitokat egy speciális recept alapján.³⁴ E szerint a kálium-tetraoxalát reagálva a nanorészecskék felületével, azon egy vegyes Fe(II)/Fe(III)-oxalátot hoz létre. A folyamat nagyon gyorsan, alig pár másodperc alatt lejátszódik, miközben egy karboxil-csoportokkal teli felületet nyertünk.

Ezáltal egy lépésben, egyszerűen és gyorsan karboxil-funkcionálható a magnetit nanorészecskék felülete, mellyel az enzim amino-csoporttal rendelkező oldalláncai *közvetlenül* reakcióba tudnak majd lépni. A 2.6.2. fejezetben láttuk, hogy az irodalomban ezt számos kerülőút beiktatásával érték el, nincs is nagyon olyan módszer, ami ennyire gyors. Erre az alapra építkezve, a korábbi, sikertelen tapasztalatainkból kiindulva kidolgoztuk a lakkáz-enzim magnetit nanorészecskék felületén való immobilizációját megvalósító szintézismódszert, melyet sematikususan a 4.1. ábrán mutatok be:



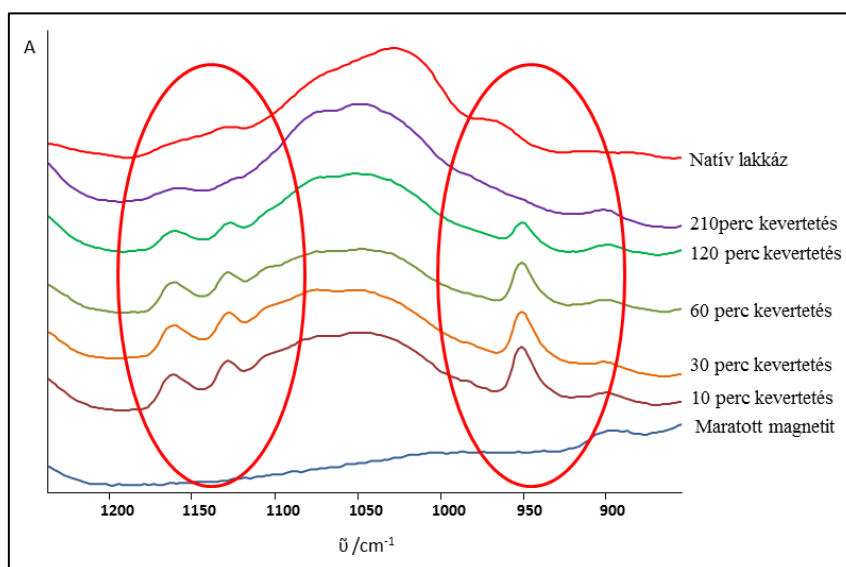
4.1. ábra: A kidolgozott szintézismódszer sematikus rajza (feltüntetve a bemérendő mennyiségeket, koncentrációkat).

A magnetit nanorészecskéket első lépésben 0,05 M-os PTO-oldatban diszpergáltattuk, majd 100 s-nyi időt hagytunk a felületmódosulási reakcióra. Ezt követően a magnetitet mágnesesen dekantáltuk, majd alaposan mostuk, hogy eltüntessük a PTO-nyomokat. Ezt követően bemértünk 3 mg, 210U/mg-os lakkáz-enzimet, illetve 10 ml desztillált vizet. Az elegyet 10 percig kevertettük, ezután dekantáltuk, desztillált vízzel alaposan átmostuk, s így megkaptuk a módosított magnetit nanorészecskéket. Eleinte jóval hosszabb kevertetési idővel dolgoztunk (24 óra), azonban a következő fejezetben részletesen bemutatom, hogy a kemisorpció igazolhatóan rövidebb idő alatt lejátszódik, így a szintézis teljes ideje a mosási ciklusok beiktatásával együtt sem több lényegesen egy óránál.

4.1.2. A szintézis sikerességének igazolása

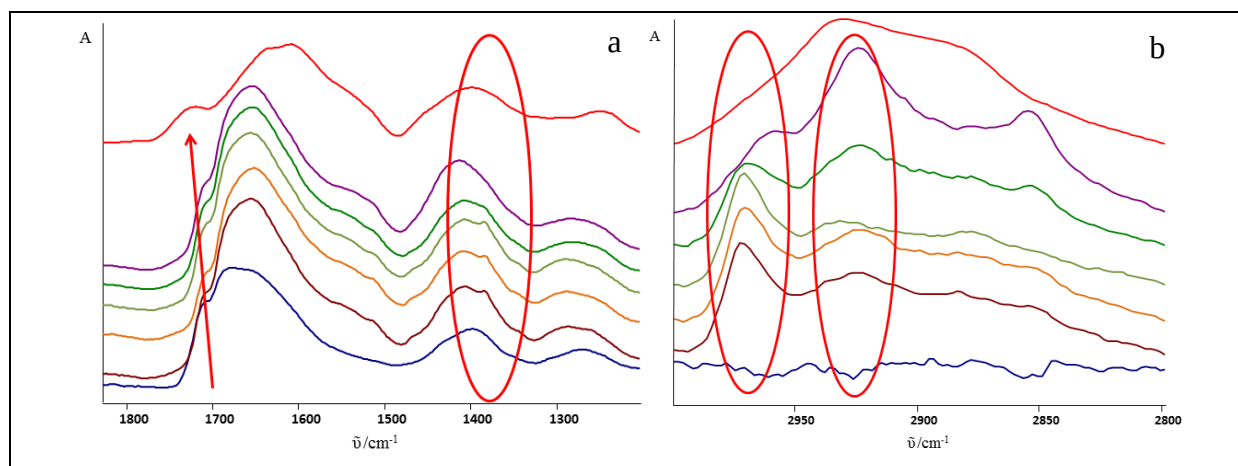
Annak igazolására, hogy valóban megkötődik-e az enzim a nanorészecskék felületén ATR-FT-IR spektroszkópiás vizsgálatokat végeztünk. Azért ezt a technikát választottuk, mert az ATR nagyrészt a felületről szolgáltat közvetlen információkat, így ha a lakkáz kemisorbeálódott a nanorészecskék felületén, akkor azt ezzel a technikával megfigyelhetjük. A szintézismódszer igazolása mellett optimalizálni kívántuk a lakkáz-enzimmel való reakció idejét is. Ezt úgy végeztük, hogy elindítottunk egy szintézist (funkcionalizáltuk a magnetit felületét, majd alapos mosás után lakkáz-enzimet adtunk a szolhoz és ezt kevertettük), majd adott időközönként 1 ml-es mintát vettünk, melyet háromszori desztillált vízzel való mosás után infralámpa alatt szárítottunk.

A por alapú minták infravörös színeképeit FTIR-ATR technikával vettük fel. A bemutatott spektrumokat minden esetben 256 színekép átlagolásával kaptuk meg. A kapott mérési eredményeket 4.2. és 4.3. ábrákon mutatom be:



4.2. ábra: A felvett infravörös színeképek az egyszeres kötések tartományában.

Az egyszeres kötések (C-N, C-O, C-C) tartományán megfigyelhető, hogy több új, karakteres sáv jelent meg a funkcionizált magnetit színeképehez képest 950-, 1125- és 1150 cm^{-1} -nél. Ezen új sávok nem azonosíthatók be minden kétséget kizáróan a natív lakkáz spektrumán, kivéve a kb. 975-1120 cm^{-1} -ig tartó elnyúlt sávot, azonban egyértelműen jelzik, hogy az enzim kölcsönhatásba lépett a nanorészecskével és új *kémiai kötések* alakultak ki. Látható, hogy az egyes spektrumok 10-60 perc kevertetési időig szinte teljesen egyformák, ez után azonban egy jelentős változás következik be: ahogy növeljük a reakció idejét, úgy tűnik el egyre jobban a spektrum finomszerkezete, a spektrum egyre inkább a natív lakkázéhoz lesz hasonló. A jelenség oka valószínűleg abban keresendő, hogy a kemisorpció lejátszódása után az oldat fázisban maradt enzim molekulák fiziszorbeálódnak a módosított nanorészecskék felületén, így elfedve a kemisorpcióból eredő karakteres sávokat.



4.3. ábra: A felvett infravörös színeképek az oxaláthoz rendelhető rezgések (a), illetve a CH-rezgések (b) tartományán.

Az előzőekben levont következtetéseket megerősíti az oxaláthoz rendelhető rezgések tartományának vizsgálata (4.3. ábra; a). Látható, hogy az 1600-1700 cm^{-1} -nél található C=O vegyértékrezgések sávja a kevertetési idővel egyre magasabb hullámszámok felé tolódott, továbbá a kb. 1350-1450 cm^{-1} között lévő C-O vegyértéknyújtási rezgések sávján megjelent egy „váll” ~1380 cm^{-1} -nél. A megjelenő karakteres csúcsok arra utalnak, hogy jól definiált kötések alakulnak ki, mely specifikus megkötődésre, nem pedig fiziszorpciós kölcsönhatásra. A jobb oldalon a C-H rezgések tartományát mutatom be. Látható, hogy a magnetit esetén, (mint azt egyébként is várnánk), nem figyelhetők meg a C-H vegyértékrezgésekhez rendelhető sávok, azonban már az enzimmel való kevertetés 10 perce után megjelennek ezen sávok, a várttól kissé eltolódva a nagyobb hullámszámok felé. A 4.2. ábra alapján levont következtetések itt is igazak, azaz 60 perc után eltűnnek a finom részletek, a spektrum egyre jobban a lakkázéhoz lesz hasonló.

Összefoglalásként elmondható, hogy már mindösszesen 10 perc alatt lejátszódik az enzim immobilizációja a magnetit nanorészecskék felületén, így a további kísérleteink során 10 perc kevertetés után azonnal dekantáltuk a nanorészecskéket, majd alapos mosás után (a nem kemisorbeálódott enzim minél nagyobb mennyiségét eltávolítsuk) megkaptuk a módosított magnetit nanorészecskéket.

4.2. A hibrid rétegek szintézise

Mind a polimert, mint pedig a nanokompozitokat elektrokémiai úton állítottuk elő, galvanosztatikussal alkalmazva. Az áramsűrűséget korábbi tapasztalataink alapján 3 mA/cm^2 -nek állítottuk be. Azért ekkora értéket választottunk, mert az ehhez szükséges potenciálon még nem mennek végbe különféle zavaró folyamatok (pl. a víz bontása), ugyanakkor jó minőségű, elektroaktív polimer válik le.

A polipirrol réteget $0,1 \text{ M}$, frissen desztillált pirrol monomert, továbbá $0,1 \text{ M}$ NaCl-ot és $0,001 \text{ M}$ K-tetraoxalátot tartalmazó vizes oldatból választottuk le. A polymerizáció időtartamát minden egyes esetben 100 s -nak választottuk. A polipirrol/magnetit rétegek leválasztásánál a polymerizációs oldathoz 10 g/l koncentrációban magnetit szolt adagoltunk. A polipirrol/magnetit/lakkáz rétegeknél a módosított felületű magnetit nanorészecskéket szintén 10 g/l koncentrációban adtuk a monomeres oldathoz.

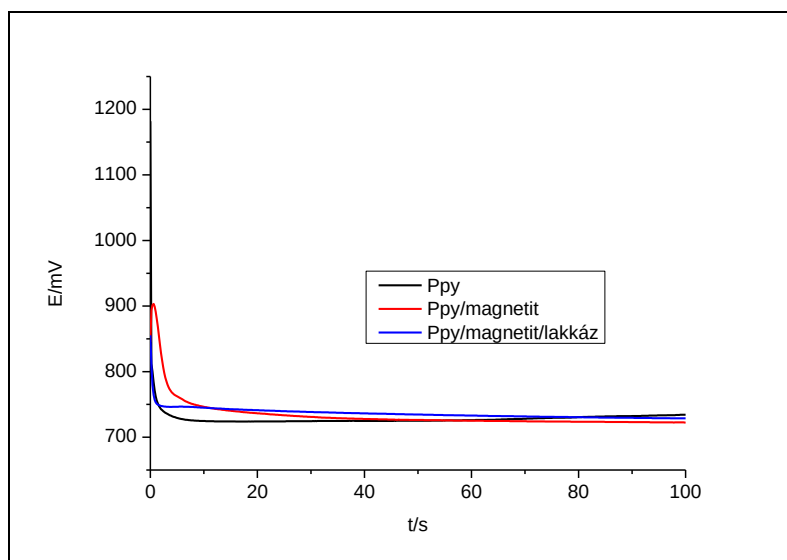
A szintézist eleinte, korábbi tapasztalatainkra alapozva $0,05 \text{ M}$ PTO-t tartalmazó oldatban kívántuk végrehajtani. Ebben az esetben ugyan sikeresen levált a kompozit a munkaelektrodra, azonban az elektrokémiai vizsgálatok során rendkívül rossz stabilitásának bizonyult, valamint nem igazolta egyértelműen a lakkáz beépülését.

Ennek okát kétféleképpen magyarázhatjuk: (i) a $0,05 \text{ M}$ -os PTO oldat pH-ja igen alacsony ($\text{pH}=2$), így a vezetősó ismételt reakcióba léphet a magnetit nanorészecskék felületével, leoldva az immobilizált enzimet is, (ii) ezen a pH-n az enzim elveszíti aktivitását, dezaktiválódik. A fent említett két lehetséges okot kiküszöbölendő a továbbiakban közel semleges/semleges pH-t beállító vezetősóval végeztünk polymerizációs kísérleteket (az enzimaktivitás megőrzése érdekében). Számos vezetősó (Na_2SO_4 , nátrium-dodecil-szulfát, NaCl) kipróbálása során a legjobbnak (a levált rétegek elektroaktivitásának összehasonlításában) a NaCl bizonyult, így a továbbiakban ezt alkalmaztuk.

Ugyanakkor, hogy az eredeti recept szerint a PTO kell a polymerizációnál, mert csak így tud nagy mennyiségű magnetit beépülni a polimer mátrixba (ez biztosítja a felületi töltést a magnetit nanorészecskéknek, és ezáltal a töltéskompenzáció részeként való beépülést). A ciklikus voltammogramokon ez meg is látszott, ugyanis a polipirrol, illetve a

polipirrol/magnetit rétegek voltammogramjai között gyakorlatilag nem volt különbség. Ez azt jelenti, hogy nagyon csekély mennyiségű magnetit épült be a polimerbe. A tapasztaltak alapján egy olyan kompromisszumos megoldást kerestünk, mely esetén a pH nem túl savas, viszont jelentős mennyiségű magnetit tud beépülni a polimer mátrixba, így jutottunk a fentebb már bemutatott polymerizációs oldat-összetételhez.

A következő ábra 1-1 jellemző polymerizációs görbét tartalmaz:



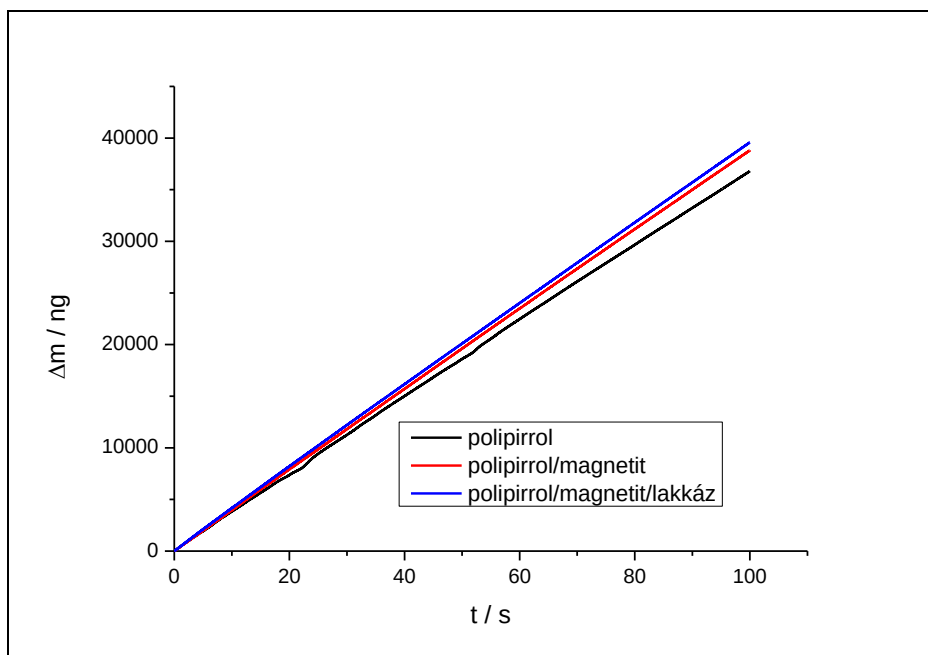
4.4. ábra: Polymerizációs görbék összehasonlítása.

Látható, hogy a polymerizációs görbék alakja hasonló, továbbá, hogy (a kezdeti szakasztól eltekintve) egy viszonylag szűk potenciáltartományon belül futnak. Ez alapján kijelenthetjük, hogy sem a magnetit, sem pedig a magnetit/lakkáz nem zavarják, befolyásolják jelentős mértékben a polymerizációs folyamatot.

4.3. Az elkészített vékonyrétegek összehasonlító vizsgálata

4.3.1. Elektrokémiai kvarckristály nanomérleggel (EQCN) végzett vizsgálatok

Annak igazolására, hogy a polipirrol/magnetit/lakkáz hibrid esetében a módosított magnetit nanorészecskék (felületükön az enzimmel) beépülnek a polimer mátrixba, első lépésben EQCN vizsgálatokat végeztünk. Az áramsűrűség értékét állandó értéken tartottuk (3 mA/cm^2), ezért Faraday I. törvényének értelmében ($Q=I \cdot t$) a levált tömegnek is lineárisan kell változnia. Mivel az egyes polymerizációs oldatok összetétele a magnetitet kivéve azonos volt így, azt vártuk, hogy a polipirrolhoz képest mindkét nanokompozit esetén nagyobb tömegváltozást detektálunk (feltételezve, hogy az áramkihasználás hatásfoka megegyezik).³⁴



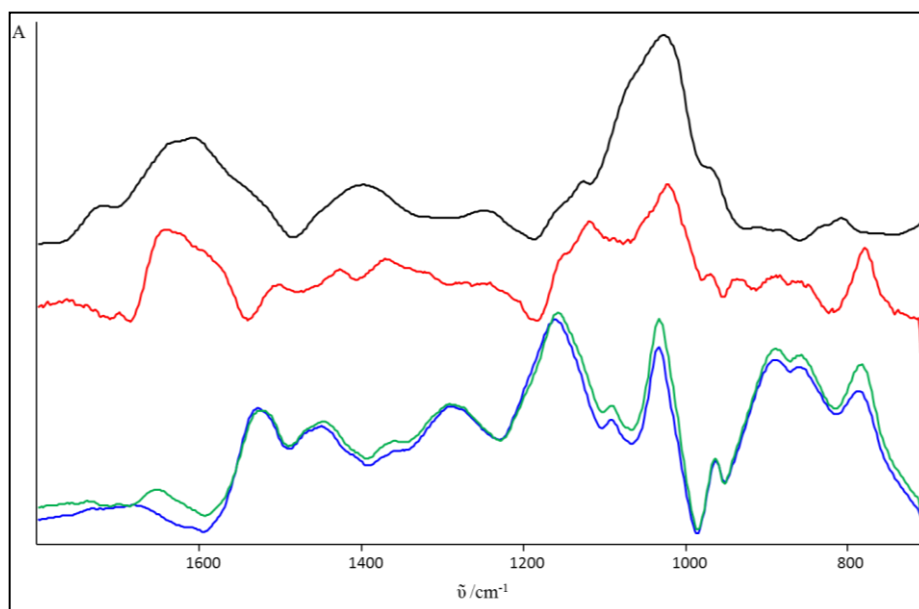
4.5. ábra: Az egyes rétegek polimerizációja során regisztrált tömegváltozások.

A magnetit nanorészecskék felületükön az immobilizált enzimmel nagyobb tömegűek, ezért itt nagyobb tömegváltozásra számítottunk a polipirrol/magnetit hibridhez képest. A 4.5. ábrán megfigyelhető, hogy a tömeg időben lineárisan nő, mely annak a jele, hogy a polimerizáció során a réteg szabályosan, folyamatosan növekedett. Látható továbbá, hogy a polipirrolhoz képest mindkét nanokompozit esetén nagyobb tömeg vált le az elektródfelületre. A polipirrol/magnetit esetén mintegy 5%-kal nagyobb a tömegváltozás, míg a polipirrol/magnetit/lakkázos réteg esetén ez kb. 7%-nak adódott. Ez azt jelenti, hogy a magnetites réteghez képesti kb. 2%-os tömegnövekedés (40%-os relatív növekedés) az enzim beépülését valószínűsíti, így ez a kísérletsorozat további bizonyítékul szolgálhat egyrészt a magnetit felületén történt enzim-immobilizáció sikerességére, illetve a mind a magnetit, mind pedig a lakkázzal módosított nanorészecskék beépülésére.

4.3.2. ATR-FT-IR spektroszkópiás vizsgálatok

Az előző pontban bemutatott rétegeket a továbbiakban ATR-FT-IR spektroszkópiával vizsgáltuk. Ezzel a technikával azt kívántuk igazolni, hogy a lakkáz-enzim jelen van a polimerben. Mind a polimert, mind pedig a nanokompozitokat a polimerizáció után levegőn szárítottuk, a kiértékelést 256 színekép átlagolásával végeztük. A 4.6. ábrán a polipirrolról, illetve a polipirrol/magnetit/lakkázról felvett infravörös színeképeket hasonlítottam össze a natív lakkáz spektrumával. Első ránézésre a polimer és a nanokompozit színeképe szinte teljesen egyforma, alig van különbség a kettő között. Annak érdekében, hogy a legapróbb eltérést is megfigyelhessük, különbségi spektruomot képeztünk, melyet a 4.6. ábrán piros

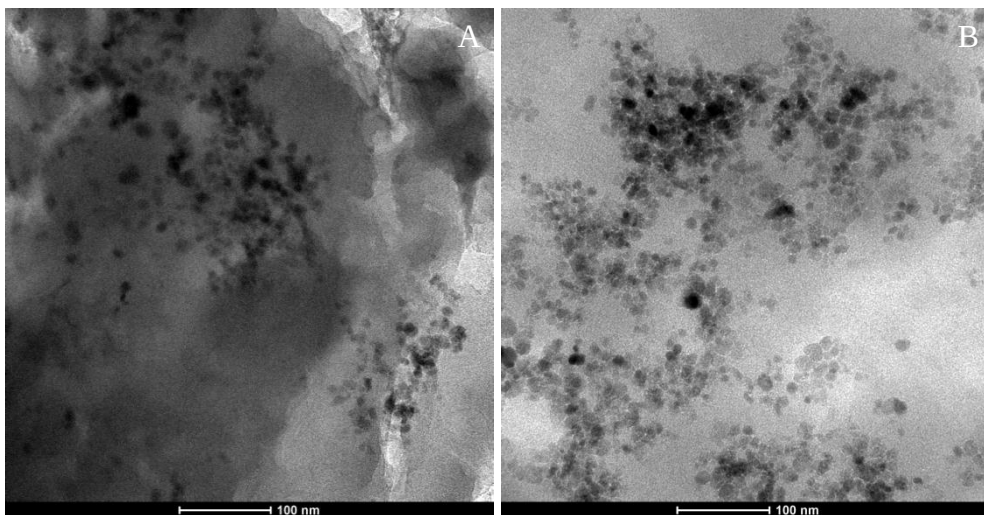
színnel jelöltem. Látható, hogy a különbségi spektrumon megjelent több, az enzimhez rendelhető sáv is: 1030- és 1120 cm^{-1} -nél, illetve 1617- és 1758 cm^{-1} -nél, továbbá az 1250- és 1400 cm^{-1} -nél megjelenő sávok helyzete és karakterisztikája is hasonlít az enzimére. Ezek közül utóbbi kettőt emelném ki. Szakirodalmi adatok alapján ^{42, 57} azonosítottuk az egyes sávokat; az 1758 cm^{-1} -nél található az ún. *amid I* sáv, 1657 cm^{-1} -nél ún. *amid II* sáv, melyek megjelenési helye nagyon érzékeny a másodlagos fehérjeszerkezetre, így tehát abból, hogy a nanokompozit spektrumában is azonos helyen jelenik meg, arra következtethetünk, hogy az enzim másodlagos szerkezete nem változott számottevően az immobilizáció és a polimer mátrixba való beépülés következtében. Összefoglalásul elmondható, hogy a nanokompozitról felvett infravörös spektrumok elemzésével igazoltuk, hogy a polimerizáció során lakkáz épült be a polimerbe.



4.6. ábra: A rétegekről és a natív lakkázzal felvett infravörös spektrumok összehasonlítása. A színek jelentése alulról felfelé: polipirrol, polipirrol/magnetit/lakkáz, különbségi spektrum, natív lakkáz.

4.3.3. Transzmissziós elektronmikroszkópos (TEM) vizsgálatok

Következő lépésként, eltávolítva az egyes rétegeket a felületről, TEM vizsgálatokat végeztünk annak eldöntése érdekében, hogy a magnetit az enzimmel a felületén mennyire van hasonló formában jelen a polimerben, mint a polipirrol/magnetit réteg esetén? A mintaelőkészítés során első lépésként az elektródfelületről eltávolítottuk a kompozitokat, acetonnal rövid ultrahangos kezeléssel diszpergáltuk, ezt követően felcseppentettük egy szénhártyás, négyzethálós réz TEM gridre.



4.7. ábra: Az egyes hibridek TEM képe 88000X-es nagyítás mellett: polipirrol/magnetit/lakkáz (A), polipirrol/magnetit (B).

A 4.7. ábrán látható felvételeken jól elkülöníthető egymástól a világosszürke polimer, illetve a benne található, sötétebb foltokként elkülönült magnetit nanorészecskék. A lakkázos réteg esetén készített felvételeken látszik, hogy túl vastagra sikerült a gridre felvitt réteg, ezért a polimer is sötétebb tónussal jelentkezik, illetve a kisebb életlenségek is annak köszönhetők, hogy az egyes nanorészecskék valószínűleg nem azonos mélységben vannak, így a fókuszt csak pontatlanul lehetett beállítani.

Azonban az egyértelmű, hogy mindkét kompozit esetén hasonló módon épült be a magnetit, azaz néhol megfigyelhetők a primer részecskemérettel rendelkező részecskék (~12 nm), azonban inkább az aggregálódott forma a jellemző. Ez annak köszönhető, hogy a szintézis során semmilyen felületaktív anyagot nem alkalmaztunk, azért, hogy elkerüljük annak kompetitív adszorpcióját. A lakkázos réteg esetén meglepő, hogy az aggregátumok mérete körülbelül akkora, mint a polipirrol/magnetit kompozit esetén, annak ellenére, hogy a lakkázzal borított magnetit részecskék a polimerizáció kezdetéig egy komplex szintézisen estek át. Kiemelendő továbbá, hogy ezzel a technikával jól látszik, hogy a magnetit nem vas-oxalát ionok formájában épült be a polimer mátrixba, hanem nanorészecskeként, hiszen ha előbbi történt volna, a TEM képeken nem láttunk volna semmit a polimer halványszürke színén kívül. További elektronmikroszkópos vizsgálatok folyamatban vannak, amely során célunk nagyobb nagyítású képek felvétele.

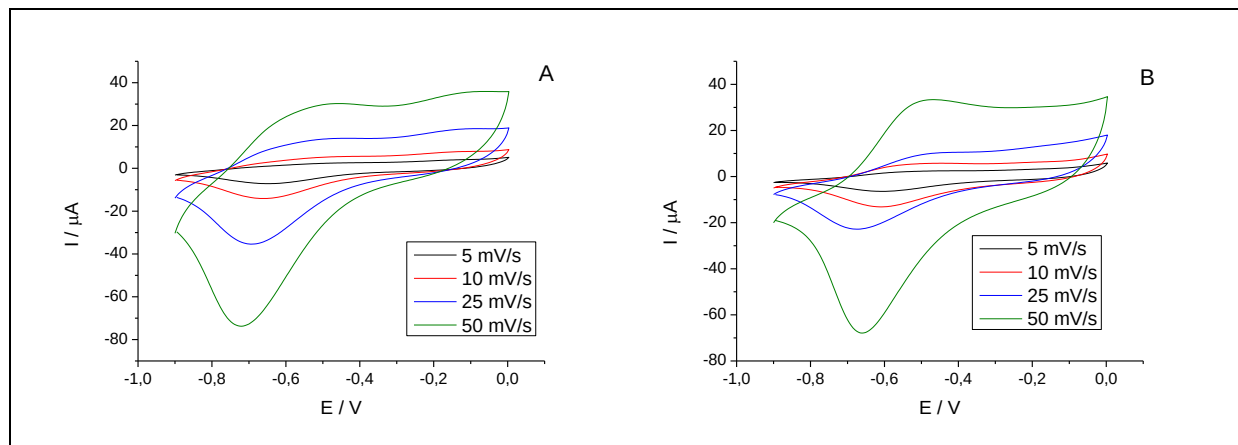
4.4. A hibrid rétegek összehasonlító elektrokémiai vizsgálata

4.4.1. Ciklikus voltammetriás mérések

Az elkészített vékonyrétegek elektrokémiai viselkedését ciklikus voltammetriával vizsgáltuk. Korábbi tapasztalatainkból tudtuk, hogy a polipirrol és a polipirrol/magnetit rétegek elektrokémiai viselkedését *döntően* befolyásolja a megvilágítás és az oxigén jelenléte. Ennek kiküszöbölésére az egyes méréseket sötétben, a forgó korongelektrodos elrendezéshez tartozó zárt cellában végeztük. A cellához egy gázmosót csatlakoztattunk, melyen keresztül a telített oxigén atmoszféra elérése érdekében a mérések előtt körülbelül 30 percig oxigéngázt, míg az inert atmoszféra eléréséhez nitrogéngázt buborékolthattunk át az oldaton.

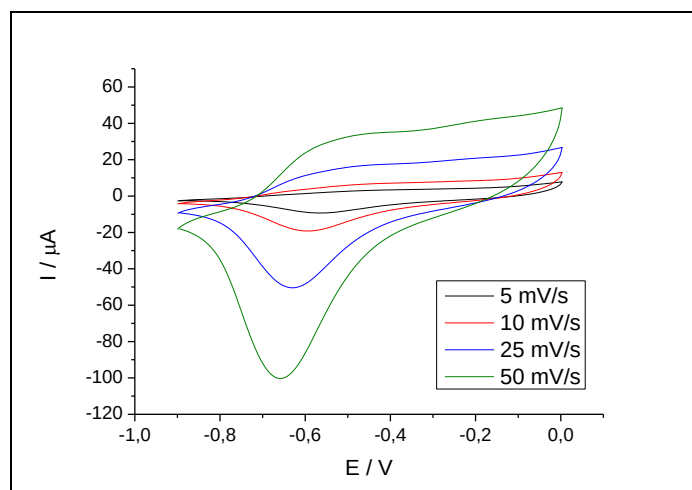
A méréseket 0,5 M-os, pH=7-es foszfát-pufferben végeztük el. Minden esetben egymást követően három ciklust futtattunk le, melyek során a második és harmadik ciklus során felvett voltammogramok jó közelítéssel megegyeztek, azaz a mérés reprodukálható, így következtetéseinket a harmadik cikusból vontuk le, a továbbiakban bemutatott ábrákon is ezek szerepelnek. A potenciáltartományt úgy választottuk meg, hogy az egyes ciklusok reverzibilisek legyenek, azaz ne menjenek végbe nem kívánt mellékfolyamatok, mint például a polimer réteg irreverzibilis oxidációja, mely degradációhoz vezet. Esetünkben ez $E = -0,9$ - 0 V-ig tartott. A voltammogramokat több pásztázási sebesség mellett regisztráltuk, melyek rendre 5-, 10-, 25- és 50 mV/s voltak. Az egyes méréseket minden esetben a potenciáltartomány anódos végpontjából indítottuk.

Munkánk során az oxigén elektrokémiai redukciójának vizsgálatát tűztük ki célul, ezért első lépésben, az oxigénredukció során tapasztalható többletviselkedés elkülönítésére az egyes rétegeket oxigénmentes atmoszférában vizsgáltuk. A mérések megkezdése előtt inert atmoszférát állítottunk be, melyet néhány 50 mV/s-os ciklussorozat lefuttatásával ellenőriztünk.



4.8. ábra: Polipirrol (A) és polipirrol/magnetit (B) ciklikus voltammogramok oxigénmentes környezetben.

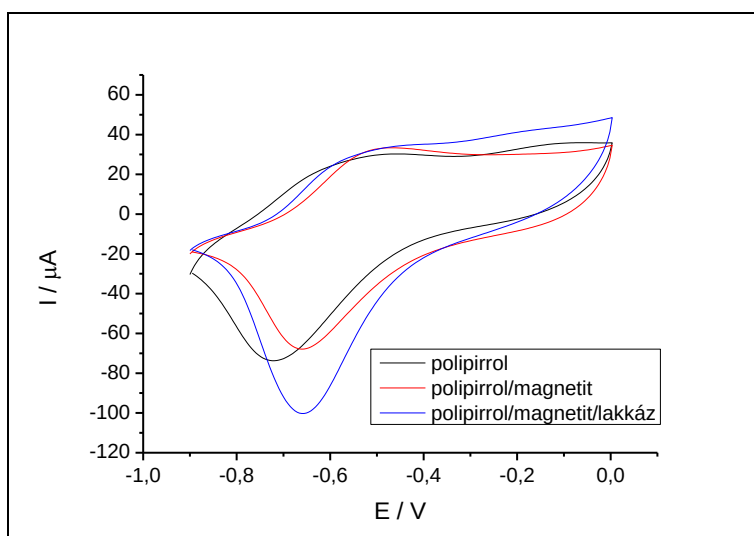
Ha az oxidációs és redukciós töltés közel megegyezett, megkezdhattuk a tényleges méréssorozatot. A 4.8. ábrán a polipirrol, továbbá a polipirrol/magnetit esetén felvett ciklikus voltammogramokat mutatom be. Általánosan elmondható, hogy az egyes voltammogramok alakja, a csúcsok megjelenési helye jól egyezést mutat a korábbi tapasztalatainkkal, illetve az szakirodalmi adatokkal.



4.9. ábra: Polipirrol/magnetit/lakkáz ciklikus voltammogramok oxigénmentes környezetben.

A polipirrol/magnetit/lakkázos réteg esetén regisztrált voltammogramok (4.9. ábra) alakja inkább a polipirrol/magnetit hibridéihez hasonló, a katódos ágon megjelenő intenzív redukciós csúcs közel azonos potenciálnál (0,65 V) található.

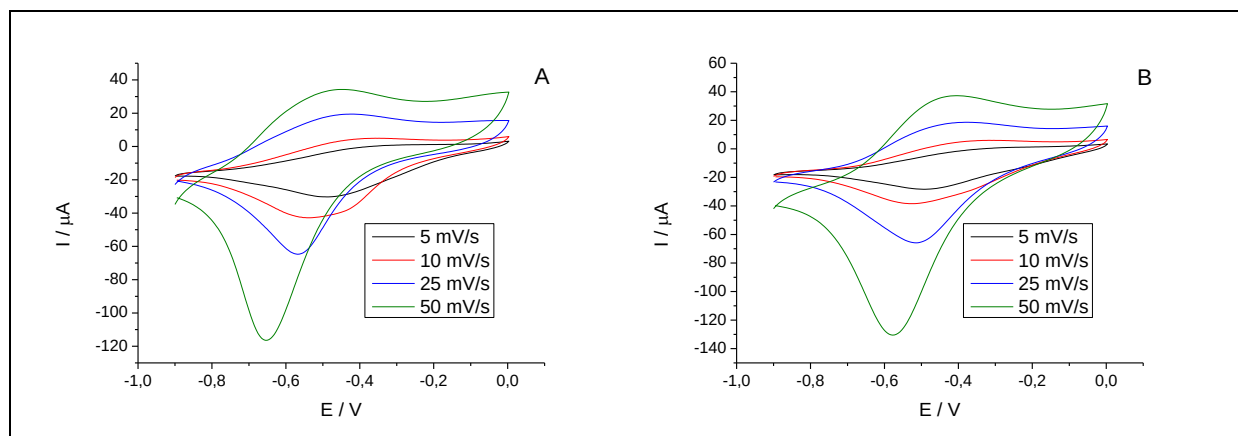
A telített nitrogén atmoszférában felvett ciklikus voltammogramok karakterisztikája mind a három minta esetén hasonló volt, melyet a 4.10. ábra szemléltet.



4.10. ábra: Az egyes rétegek ciklikus voltammogramjainak összehasonlítása oxigénmentes környezetben, 50 mV/s-os pásztázási sebesség esetén.

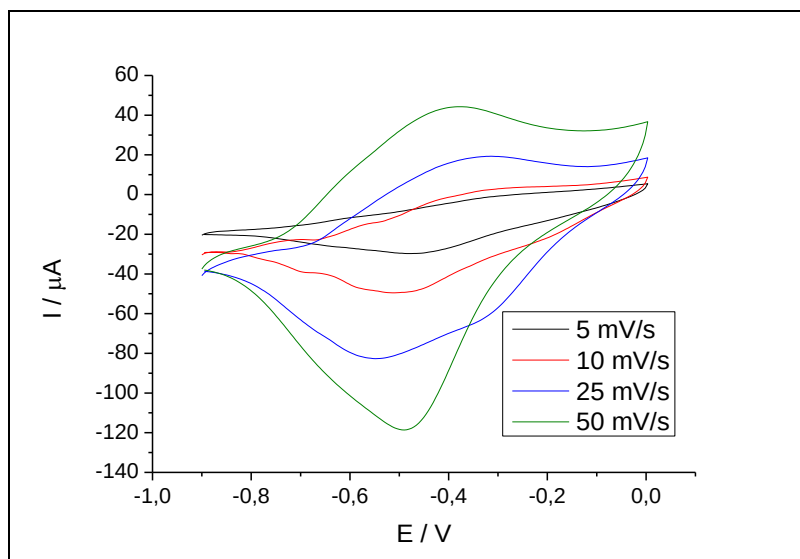
Megfigyelhető, hogy oxigén hiányában a polipirrol/magnetit/lakkáz hibrid réteg nagyobb elektroaktivitást mutat a polipirrol, illetve a polipirrol/magnetithez képest. További érdekesség, hogy a polipirrol/magnetit réteg elektroaktivitása némileg kisebb, mint a polipirrolé, holott korábban ennek a fordítottját tapasztaltuk. Ennek magyarázata az lehet, hogy ilyen kicsi PTO koncentrációnál nem alakul ki számottevően jobb elektroaktivitással rendelkező hibrid.

Annak érdekében, hogy megismerjük az egyes rétegek oxigénredukció során tanúsított többletviselkedését, az előzőekben bemutatott méréseket ugyanazon a minták esetén telített oxigén atmoszférában is elvégeztük. Az oxigén bevezetését a mérések megkezdése előtt szintén 30 percen keresztül végeztük, továbbá az egyes mérések között tovább folytattuk. A 4.11. ábrán a polipirrol, illetve a polipirrol/magnetit rétegek esetén felvett ciklikus voltammogramokat mutatom be.



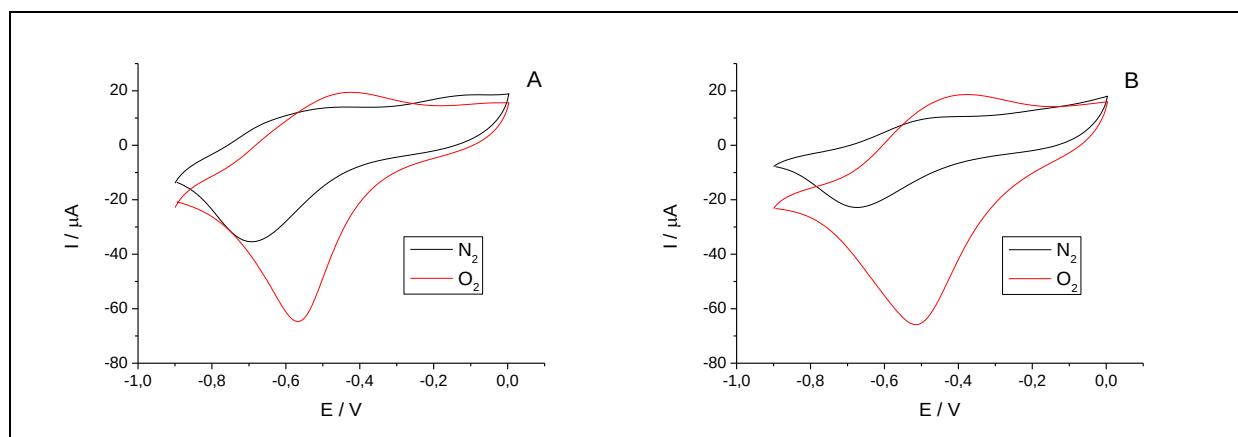
4.11. ábra: Polipirrol (A) és polipirrol/magnetit (B) ciklikus voltammogramok oxigénes környezetben.

Az aszimmetrián kívüli változások is tapasztalhatók: a polipirrol rétegek esetén a katódos ágon tapasztalható intenzív redukciós csúcs a pozitívabb potenciálok felé tolódott el, mely tendencia a polipirrol/magnetit nanohibridre is igaz. Megfigyelhető, hogy a korábbiakban a voltammogramok esetén tapasztalt szimmetrikus alak itt aszimmetriát mutat, az oxigén hatására redukciós töltéstöbblet alakul ki a ciklusok során.



4.12. ábra: Polipirrol/magnetit/lakkáz ciklikus voltammogramok oxigénes környezetben.

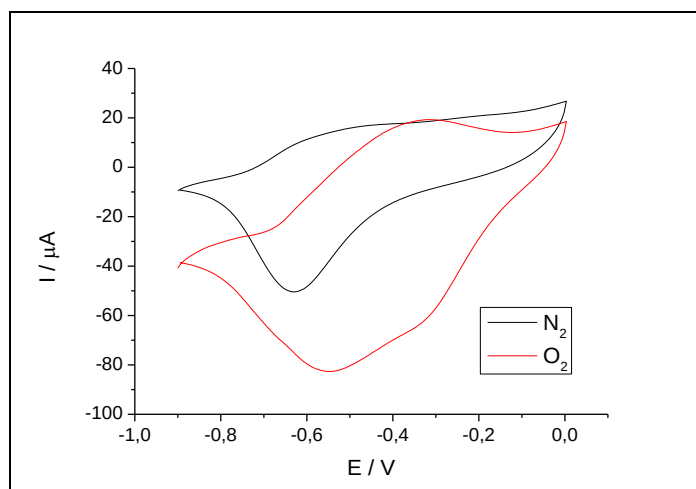
A polipirrol/magnetit/lakkáz kompozit ciklikus voltammogramjai jelentős mértékben megváltoztak a nitrogénben tapasztaltakhoz képest (4.12. ábra). Látható, hogy a voltammogramok kiszélesedtek, illetve a katódos ágon egy új csúcsot is megfigyelhetünk. A 4.12. ábrán továbbá megfigyelhető, hogy az új csúcs csúcspotenciálja a pásztázási sebességtől függően változik, mely valószínűleg a lakkáz oxigénredukciójához köthető.



4.13. ábra: Az oxigénmentes és oxigénes környezetben felvett ciklikus voltammogramok összehasonlítása 25 mV/s pásztázási sebesség esetén: polipirrol (A), polipirrol/magnetit (B).

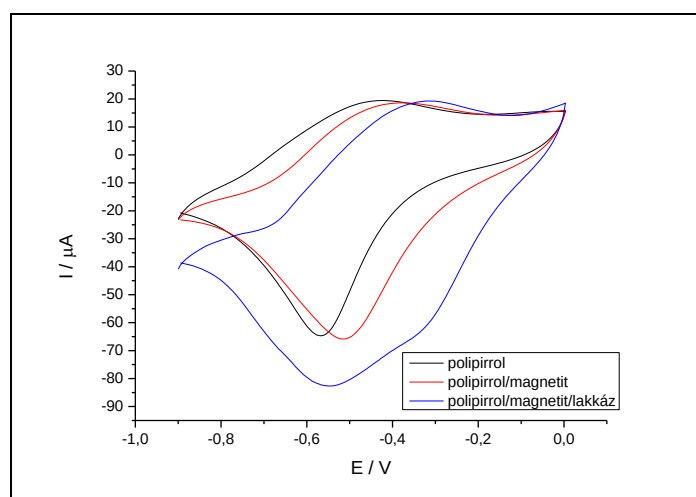
A nitrogén atmoszférában mértékhez képesti eltérések jobb szemléltetése érdekében a 25 mV/s esetén regisztrált ciklikus voltammogramokat a 4.13., illetve a 4.14. ábrán mutatom be mind nitrogén-, mind pedig oxigén atmoszférában. Mind a három esetben szignifikáns különbségek figyelhetők meg a nitrogén atmoszférában mértékhez képest. Látható, hogy már a polipirrol/magnetit esetén is jelentős a redukciós töltéstöbblet alakul ki, azonban az enzimet is tartalmazó réteg esetén jóval nagyobb aszimmetria mutatkozik, mely a magnetit, illetve az

enzim együttes oxigénredukciós aktivitásához, valamint a beépített nanorészecskék hatására megnövekedett elektródfelülethez köthető.



4.14. ábra: Az oxigénmentes és oxigénes környezetben felvett ciklikus voltammogramok összehasonlítása a polipirrol/magnetit/lakkáz hibrid esetén 25 mV/s pásztázási sebesség mellett.

A 4.15. ábrán az egyes minták esetén oxigén atmoszférában felvett ciklikus voltammogramokat ábrázoltam 25 mV/s pásztázási sebesség esetén. Látható, hogy míg a polimer, illetve a magnetitet tartalmazó hibrid esetén a voltammogramok lefutása közti különbséget csupán az oxigén elektrokémiai redukciójának megindulási potenciálja jelenti, addig az enzimet is tartalmazó réteg esetén egy új csúcs megjelenése figyelhető meg, $E = -0.3$ V környékén.



4.15. ábra: Az egyes rétegek ciklikus voltammogramjainak összehasonlítása oxigénes környezetben, 25 mV/s pásztázási sebesség esetén.

A -0,4V–0V-ig tartó oxidációs szakasz mindhárom minta esetén azonosnak mondható., ami ezen a tartományon azonos folyamatokat feltételez. Az anódos végponttól redukciós irányban azonban lényegi eltéréseket tapasztalhatunk. Megfigyelhető, hogy amíg a redukciós

folyamat a polimer esetében -0,4 V körül indul meg, addig ez a magnetit tartalmú réteg esetén körülbelül -0,3 V-ra, az enzim tartalmú kompozit esetében -0,15 V-ra tehető. Ennek oka az eltérő oxigén redukciós mechanizmusokkal magyarázható, amit a későbbiekben lineáris voltammetria segítségével vizsgálunk.

A redukciós ágon tapasztalt különbségek jobb szemléltetése és számszerűsítése érdekében az 1. táblázatban összefoglalom az egyes voltammogramok esetén meghatározott töltés értékeket, majd röviden elemzem azokat:

	Q_+/C	Q_-/C	$\Sigma Q_i /C$	$ Q_-/Q_+ $
Polipirrol	$4,200 \cdot 10^{-4}$	$-9,840 \cdot 10^{-4}$	$1,404 \cdot 10^{-3}$	2,343
Polipirrol/magnetit	$3,689 \cdot 10^{-4}$	$-1,239 \cdot 10^{-3}$	$1,608 \cdot 10^{-3}$	3,359
Polipirrol/magnetit/lakkáz	$3,258 \cdot 10^{-4}$	$-2,154 \cdot 10^{-3}$	$2,480 \cdot 10^{-3}$	6,611

1. táblázat: A ciklikus voltammogramok esetén meghatározott töltés értékek.

A táblázat kvantitatív módon mutatja az előző ábrák alapján levont kvalitatív következtetést, miszerint az enzimet is tartalmazó kompozit töltéskapacitása mintegy 1,5-szerese a polipirrol/magnetit hibridének, ami a redukciós ágon megjelenő töltéstöbblethez kapcsolható. Ami ennél is szembetűnőbb az a redukciós töltéstöbblet nagysága (utolsó oszlop).

4.4.2. Mérések forgó korongelektrodon

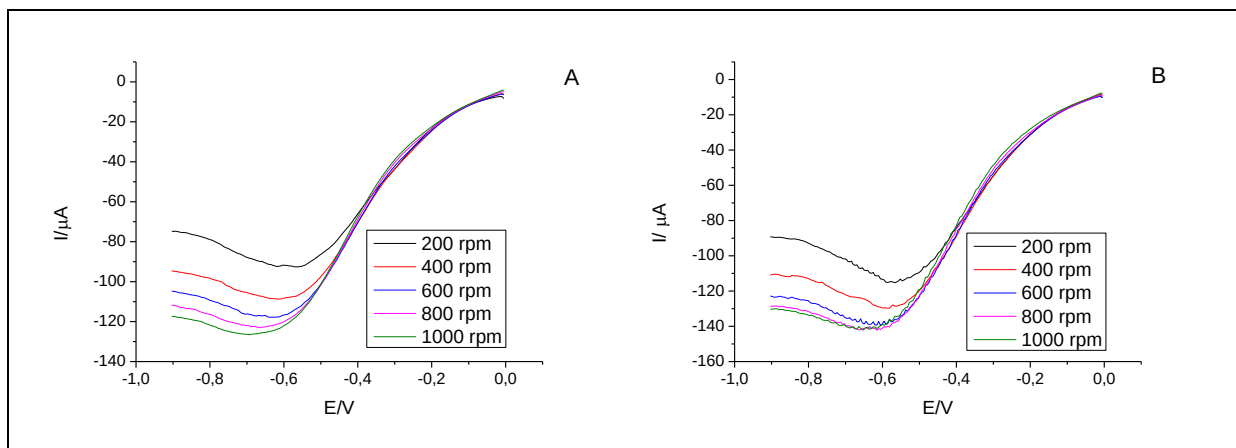
Az oxigénredukció kinetikájának vizsgálatához forgó korongelektrodos méréseket végeztünk. Ennek során adott pásztázási sebesség (10 mV/s) esetén, különböző fordulatszámok mellett (200-1000 rpm) mértük lineáris voltammogramokat a katódos tartományon, majd leolvastuk a határáramok értékeit, s ezeket a Koutecký-Levich-egyenlet alapján értékeltük ki.

A Koutecký-Levich egyenlet: $\frac{1}{j} = \frac{1}{j_k} + \frac{1}{j_d} = \frac{1}{j_k} + \frac{1}{0,62nFD^{2/3}c_0\nu^{1/6}\omega^{1/2}}$, ahol j a mért, j_d a diffúzió-, míg j_k a kinetika által kontrollált áramsűrűség, F a Faraday állandó (96485 C mol^{-1}), D a diffúziós együttható (oxigénre 0,5 M foszfát-pufferben $1,97 \times 10^{-5} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), ν a kinematikai viszkozitás ($9,87 \times 10^{-3} \text{ cm}^2 \text{ s}^{-1}$), c_0 az oldott oxigén koncentrációja ($1,2 \times 10^{-6} \text{ mol/cm}^3$), n pedig az elektrokémiai reakció során átlépő elektronok száma.⁵¹

A 4.16. ábrán látható, hogy diffúziós határáram csak a negatívabb potenciálokon alakul ki, azaz az enzimhez rendelhető csúcs (10 mV/s pásztázási sebesség esetén $\sim -0,2 \text{ V}$ -nál) nem függ a diffúziótól (a görbék ezen a tartományon együtt futnak). Ez egy felületi folyamatot

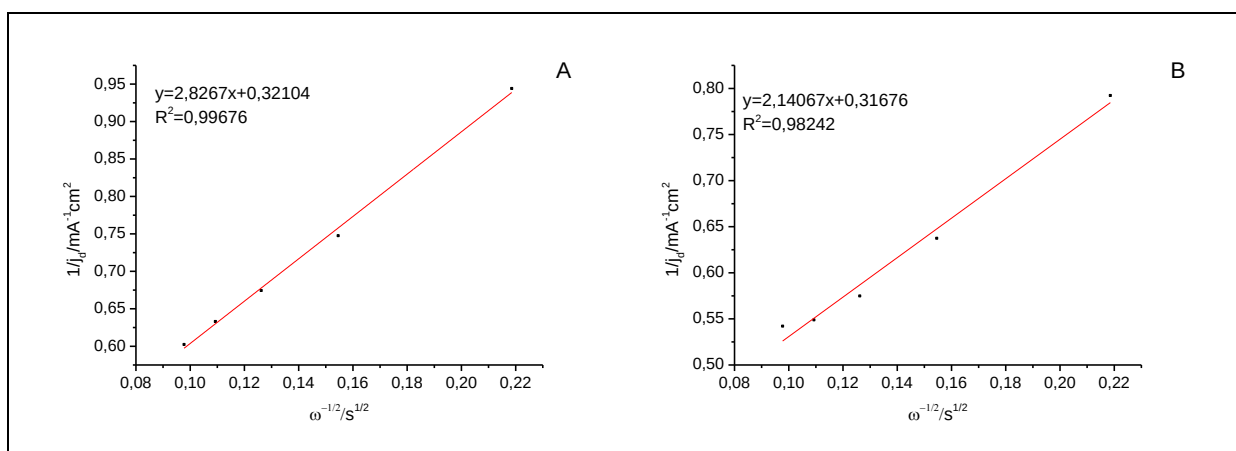
valószínűsít, mely az enzim oxigén általi kémiai oxidációjához rendelhető, mivel csak a lakkáz tartalmú réteg esetén volt megfigyelhető és ott is csak oxigén atmoszférában.

Az áramokat a legjobb linearitást adó -0,9 V-on olvastuk le, majd behelyettesítve a megfelelő értékeket, továbbá és a szükséges átváltást megtéve (a Faraday-állandót mC/molba kell átváltani) a polipirrol esetén $n=3,13$ -at, míg a polipirrol/magnetit/lakkáz hibridnél $n=4,13$ -at kaptunk eredményül.



4.16. ábra: Elterő forgatási sebességeknél regisztrált lineáris voltammogramok 10 mV/s pásztázási sebesség esetén: polipirrol (A), polipirrol/magnetit/lakkáz (B).

A polipirrol/magnetit nanokompozitnál az átlépett elektronok száma kutatócsoportunk korábbi mérései alapján $n=3,75$. Az oxigénredukció pontos mechanizmusának leírásához további vizsgálatok szükségesek, hiszen minden esetben kevert mechanizmusú folyamatok játszódhatnak le, azonban az értékekből világosan kitűnik, hogy a 3 rendszer esetében eltérő a domináns folyamat. Az enzimet tartalmazó vékonyréteg esetén valószínűleg a 4 elektronos redukció lesz az uralkodó, ami jól korrelál a 2.5.1.-es fejezetben az enzim oxigénredukciós mechanizmusánál leírtakkal.



4.17. ábra: Koutecký-Levich illesztés a polipirrol (A), illetve polipirrol/magnetit/lakkáz (B) esetén

5. Összefoglalás

Munkám során sikerrel állítottunk elő polipirrol/magnetit/lakkáz bionanokompozitot elektrokémiai úton. Ennek érdekében első lépésben kidolgoztunk egy olyan szintézismódszert, melynek segítségével specifikusan kemisorbeáltattunk lakkáz-enzimet előzetesen karboxi funkcionizált magnetit nanorészecskék felületén. A szintézis sikerességét ATR-FT-IR technikával igazoltuk, továbbá megmutattuk, hogy az enzim kemisorpciója mindössze tíz perc alatt lejátszódik, így a szorpciós idők szempontjából optimáltuk a szintézismódszert. Ily módon mintegy 30 perc alatt megvalósítható az enzim rögzítése, szemben az irodalomban leírt hosszú és vegyszerigényes módszerekkel. A szintézismódszer további előnye, hogy nem igényli semmilyen környezetszennyező/mérgező anyag használatát (pl. glutáraldehid), így az elkészített nanokompozitok biokompatibilitását is nagyban növeltük.

A polimerizációs körülmények finomhangolásával elértük, hogy a magnetit, illetve az enzimmel borított magnetit nanorészecskék beépüljenek a polimer mátrixba és az enzim aktivitása is megmaradjon. A polipirrol, a polipirrol magnetit nanokompozit, valamint a polipirrol/magnetit/lakkáz kompozit összehasonlítása útján a nanorészecskék és az enzim beépüléséről EQCN-, ATR-FT-IR-, valamint TEM technikákkal győződünk meg.

A polimer és a nanokompozit rétegek elektrokémiai viselkedését ciklikus voltammetriával is vizsgáltuk, mind oxigénnel telített, mind pedig inert közegben. Ez utóbbi alkalmazásával sikerült elkülönítenünk az oxigén redukciójára jellemző redukciós töltéstöbbletet a polimer saját elektrokémiai viselkedésétől. A lakkáz-enzimet tartalmazó vékonyrétegek esetén az enzimhez rendelhető többletviselkedést tapasztaltunk: egy új csúcs megjelenését, a töltésgörbék aszimmetrikussá válását, továbbá a redukciós töltéstöbblet, illetve a réteg töltéskapacitásának szignifikáns megnövekedését.

Az oxigénredukció mechanizmusának vizsgálatára forgó korongelektródos méréseket végeztünk telített oxigén atmoszférában. Megmutattuk, hogy az oxigénredukció (mely egyébként valószínűleg egy kevert mechanizmus szerint játszódik le), a bionanokompozit esetén közel négy elektron átlépésével valósul meg. Ez az eredmény jól korrelál az enzim oxigénredukciós mechanizmusával.

További terveink között szerepel az elkészített bionanokompozit rétegek oxigénredukciós mechanizmusának részletesebb felderítése, illetve ezen tulajdonság szenzorikai vagy tüzelőanyag-cellákban történő hasznosíthatóságának vizsgálata.

6. Irodalomjegyzék

1. György, I., *Kalandozások a kémia múltjában és jelenében*. Vince kiadó: 2003; pp 31-46.
2. Heeger, A. J., Semiconducting and Metallic Polymers: The Fourth Generation of Polymeric Materials (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2591-2611.
3. Shirakawa, H., The Discovery of Polyacetylene Film: The Dawning of an Era of Conducting Polymers (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2574-2580.
4. Macdiarmid, A. G., Synthetic Metals: A Novel Role for Organic Polymers (Nobel Lecture). *Angewandte Chemie International Edition* **2001**, *40*, 2581-2590.
5. Aradilla, D.; Estrany, F.; Alemán, C., Symmetric Supercapacitors Based on Multilayers of Conducting Polymers. *The Journal of Physical Chemistry C* **2011**, *115* (16), 8430-8438.
6. Nada F. Atta, M. F. E.-K., Novel poly(3-methylthiophene)/Pd, Pt nanoparticle sensor: Synthesis, characterization and its application to the simultaneous analysis of dopamine and ascorbic acid in biological fluids. *Sensors and Actuators B* **2010**, (145), 299–310.
7. R. M. Cornell, U. S., *The iron oxides*. Wiley–VCH: 2003.
8. Latonen, R.-M.; Wang, X.; Sjöberg-Eerola, P.; Eriksson, J.-E.; Bergelin, M.; Bobacka, J., Poly(3,4-ethylenedioxythiophene) based enzyme-electrode configuration for enhanced direct electron transfer type biocatalysis of oxygen reduction. *Electrochimica Acta* **2012**, *68* (0), 25-31.
9. György, I., *Conducting polymers*. Springer kiadó.
10. R. McCulloch, P. E., *Handbook of conducting polymers*. 1998.
11. Mazur, M., Preparation of poly(3-methylthiophene) thin films by in situ polymerization. *Thin Solid Films* **2005**, *472* (1–2), 1-4.
12. Okamoto, H.; Kotaka, T., Effect of counter ions in electrochemical polymerization media on the structure and responses of the product polyaniline films III. Structure and properties of polyaniline films prepared via electrochemical polymerization. *Polymer* **1999**, *40* (2), 407-417.
13. Kirk, R. E., *Encyclopedia of Chemical Technology*. Interscience: New York, 1953; Vol. 11, p 340.
14. Emese, P.-K. A polipirrol/dodecil-szulfát rendszer tanulmányozása. Szegedi Tudományegyetem, Szeged, 2002.
15. A.F Diaz, J. B., *Handbook of conducting polymers*. A., T., Ed. Skotheim: New York, 1986; Vol. 1., p 90.

16. Audebert, P.; Hapiot, P., Fast electrochemical studies of the polymerization mechanisms of pyrroles and thiophenes. Identification of the first steps. Existence of π -dimers in solution. *Synthetic Metals* **1995**, 75 (2), 95-102.
17. Wallace, G. G.; Spinks, G. M.; Teasdale, P. R., Conducting Electroactive Polymers. Lancaster, Basel, 1997; p 34.
18. Qiu, Y.-J.; Reynolds, J. R., Electrochemically initiated chain polymerization of pyrrole in aqueous media. *Journal of Polymer Science Part A: Polymer Chemistry* **1992**, 30 (7), 1315-1325.
19. Wallace, G. G.; Spinks, G. M.; Teasdale, P. R., Conductive Electroactive Polymers. Lancaster, Basel, 1997; pp 86-87.
20. Kriván, E.; Visy, C.; Kankare, J., Deprotonation and Dehydration of Pristine PPy/DS Films during Open-Circuit Relaxation: an Ignored Factor in Determining the Properties of Conducting Polymers. *The Journal of Physical Chemistry B* **2003**, 107 (6), 1302-1308.
21. Bragg, W. H., The crystal structure of magnetite and the spinels. *Nature* **1915**, (95), 561-.
22. Blanco-Mantecón, M.; O'Grady, K., Interaction and size effects in magnetic nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2006**, 296 (2), 124-133.
23. Marmier, N.; Delisée, A.; Fromage, F., Surface Complexation Modeling of Yb(III), Ni(II), and Cs(I) Sorption on Magnetite. *Journal of Colloid and Interface Science* **1999**, 211 (1), 54-60.
24. Liu, Z. L.; Liu, Y. J.; Yao, K. L.; Ding, Z. H.; Tao, J.; Wang, X., Synthesis and Magnetic Properties of Fe₃O₄ Nanoparticles. *Journal of Materials Synthesis and Processing* **2002**, 10 (2), 83-87.
25. V. K. Gochev, A. I. K., Fungal Laccases. *Bulgarian Journal of Agricultural Science* **2007**, (13), 75-83.
26. Rodríguez Couto, S.; Toca Herrera, J. L., Industrial and biotechnological applications of laccases: A review. *Biotechnology Advances* **2006**, 24 (5), 500-513.
27. Piontek, K.; Antorini, M.; Choinowski, T., Crystal Structure of a Laccase from the Fungus *Trametes versicolor* at 1.90-Å Resolution Containing a Full Complement of Coppers. *Journal of Biological Chemistry* **2002**, 277 (40), 37663-37669.
28. Kosa, M. In *Laccase BioBleaching Review*, Előadás, Georgia Institute of Technology School of Chemistry and Biochemistry
29. Claus, H., Laccases: structure, reactions, distribution. *Micron* **2004**, 35 (1-2), 93-96.
30. Håkansson, E.; Amiet, A.; Nahavandi, S.; Kaynak, A., Electromagnetic interference shielding and radiation absorption in thin polypyrrole films. *European Polymer Journal* **2007**, 43 (1), 205-213.
31. Apesteguy, J. C.; Jacobo, S. E., Composite of polyaniline containing iron oxides. *Physica B: Condensed Matter* **2004**, 354 (1-4), 224-227.

32. Long, Y.; Chen, Z.; Duvail, J. L.; Zhang, Z.; Wan, M., Electrical and magnetic properties of polyaniline/Fe₃O₄ nanostructures. *Physica B: Condensed Matter* **2005**, 370 (1–4), 121-130.
33. Deng, J.; He, C.; Peng, Y.; Wang, J.; Long, X.; Li, P.; Chan, A. S. C., Magnetic and conductive Fe₃O₄-polyaniline nanoparticles with core-shell structure. *Synthetic Metals* **2003**, 139 (2), 295-301.
34. Janáky, C.; Endrődi, B. z.; Berkesi, O.; Visy, C., Visible-Light-Enhanced Electrocatalytic Activity of a Polypyrrole/Magnetite Hybrid Electrode toward the Reduction of Dissolved Dioxygen. *The Journal of Physical Chemistry C* **2010**, 114 (45), 19338-19344.
35. Yaropolov, A. I.; Shleev, S. V.; Morozova, O. V.; Zaitseva, E. A.; Marko-Varga, G.; Emneus, J.; Gorton, L., An Amperometric Biosensor Based on Laccase Immobilized in Polymer Matrices for Determining Phenolic Compounds. *J Anal Chem* **2005**, 60 (6), 553-557.
36. Lin, Y.; Zhang, Z.; Zhao, L.; Wang, X.; Yu, P.; Su, L.; Mao, L., A non-oxidative electrochemical approach to online measurements of dopamine release through laccase-catalyzed oxidation and intramolecular cyclization of dopamine. *Biosensors and Bioelectronics* **2010**, 25 (6), 1350-1355.
37. Merle, G.; Brunel, L.; Tingry, S.; Cretin, M.; Rolland, M.; Servat, K.; Jolival, C.; Innocent, C.; Seta, P., Electrode biomaterials based on immobilized laccase. Application for enzymatic reduction of dioxygen. *Materials Science and Engineering: C* **2008**, 28 (5–6), 932-938.
38. Freire, R. S.; Durán, N.; Kubota, L. T., Effects of fungal laccase immobilization procedures for the development of a biosensor for phenol compounds. *Talanta* **2001**, 54 (4), 681-686.
39. Corso, C. D.; Dickherber, A.; Hunt, W. D., An investigation of antibody immobilization methods employing organosilanes on planar ZnO surfaces for biosensor applications. *Biosensors and Bioelectronics* **2008**, 24 (4), 805-811.
40. Palmore, G. T. R.; Kim, H.-H., Electro-enzymatic reduction of dioxygen to water in the cathode compartment of a biofuel cell. *Journal of Electroanalytical Chemistry* **1999**, 464 (1), 110-117.
41. Kim, J.; Kim, S. I.; Yoo, K.-H., Polypyrrole nanowire-based enzymatic biofuel cells. *Biosensors and Bioelectronics* **2009**, 25 (2), 350-355.
42. Mazur, M.; Krywko-Cendrowska, A.; Krysiński, P.; Rogalski, J., Encapsulation of laccase in a conducting polymer matrix: A simple route towards polypyrrole microcontainers. *Synthetic Metals* **2009**, 159 (17–18), 1731-1738.
43. Vasil'eva, I. S.; Morozova, O. V.; Shumakovich, G. P.; Shleev, S. V.; Sakharov, I. Y.; Yaropolov, A. I., Laccase-catalyzed synthesis of optically active polyaniline. *Synthetic Metals* **2007**, 157 (18–20), 684-689.
44. V. A. Bogdanovskaya, A. V. K., M. R. Tarasevich, L. N. Kuznetsova, Structure and Properties of Polymer Biocomposite Materials. *Russian Journal of Electrochemistry* **2004**, 40 (3), 311-316.

45. Mahdavian, A. R.; Mirrahimi, M. A.-S., Efficient separation of heavy metal cations by anchoring polyacrylic acid on superparamagnetic magnetite nanoparticles through surface modification. *Chemical Engineering Journal* **2010**, *159* (1–3), 264–271.
46. Yamaura, M.; Camilo, R. L.; Sampaio, L. C.; Macêdo, M. A.; Nakamura, M.; Toma, H. E., Preparation and characterization of (3-aminopropyl)triethoxysilane-coated magnetite nanoparticles. *Journal of Magnetism and Magnetic Materials* **2004**, *279* (2–3), 210–217.
47. Borah, B. M.; Saha, B.; Dey, S. K.; Das, G., Surface-modification-directed controlled adsorption of serum albumin onto magnetite nanocuboids synthesized in a gel-diffusion technique. *Journal of Colloid and Interface Science* **2010**, *349* (1), 114–121.
48. Mohapatra, S.; Pramanik, P., Synthesis and stability of functionalized iron oxide nanoparticles using organophosphorus coupling agents. *Colloids and Surfaces A: Physicochemical and Engineering Aspects* **2009**, *339* (1–3), 35–42.
49. Kuwahara, T.; Homma, T.; Kondo, M.; Shimomura, M., Fabrication of enzyme electrodes with a polythiophene derivative and application of them to a glucose fuel cell. *Synthetic Metals* **2009**, *159* (17–18), 1859–1864.
50. Novák, M.; Szűcs, Á., Elektrokémia. Fizikai kémiai és Anyagtudományi Tanszék: 2009; p 13. fejezet.
51. Bard, A. J.; Faulkner, L. R., *Electrochemical Methods*. 2nd ed. ed.; John Wiley & Sons: New York, 2001.
52. Sauerbrey, G., Verwendung von Schwingquarzen zur Wägung dünner Schichten und zur Mikrowägung. *Zeitschrift für Physik* **1959**, *155* (2), 206–222.
53. Skompska, M.; Jackson, A.; Robert Hillman, A., Evolution from gravimetric to viscoelastic response of poly(3-methylthiophene)-loaded acoustic wave resonators. *Physical Chemistry Chemical Physics* **2000**, *2* (20), 4748–4757.
54. Pruneanu, S.; Csahók, E.; Kertész, V.; Inzelt, G., Electrochemical quartz crystal microbalance study of the influence of the solution composition on the behaviour of poly(aniline) electrodes. *Electrochimica Acta* **1998**, *43* (16–17), 2305–2323.
55. Burger, K., Az analitikai kémia alapjai. Alliter kiadó: 2002; pp 375–381.
56. Theophanides, T., Fourier Transform Infrared Spectroscopy. D. Reidel Pub. Co.: 1984; pp 139–158.
57. Palys, B.; Bokun, A.; Rogalski, J., Poly-o-phenylenediamine as redox mediator for laccase. *Electrochimica Acta* **2007**, *52* (24), 7075–7082.

Köszönetnyilvánítás

Ezúton szeretnék köszönetet mondani Dr. Erdőhelyi András tanszékvezető egyetemi tanárnak, hogy munkám az SZTE TTIK Fizikai Kémiai és Anyagtudományi Tanszékén végezhettem. Témavezetőimnek, Dr. Visy Csaba egyetemi tanárnak, hogy bekapcsolódhattam a kutatásokba, Dr. Janáky Csaba tanársegédnek, illetve Endrődi Balázs PhD hallgatónak, hogy munkám során végig segítettek szakmai tudásukkal, észrevételeikkel.

Továbbá szeretnék köszönetet mondani:

Dr. Berkesi Ottónak az infravörös spektroszkópiás mérések értékelése során nyújtott segítségéért.

Tóth Ildikó PhD hallgatónak a használt magnetit nanorészecskék előállításáért

Dr. Bencsik Gábor- és Dr. Tóth Péter Sándor végzett doktorandusz hallgatónak, hogy kérdéseimmel mindig bizalommal fordulhattam hozzájuk.