

Diss. ETH NO. 19009

Vesicles as Templates for Enzyme-catalyzed
Polymerizations

A dissertation submitted to

ETH-ZURICH

for the degree of

Doctor of Sciences

presented by

Zengwei Guo

M.Sc., Chalmers University of Technology

born: March 15th, 1981

citizen of P. R. China

accepted on the recommendation of

Prof. Dr. Peter Walde, examiner

Prof. Dr. A. Dieter Schlüter, co-examiner

Dr. Andreas Mühlebach, co-examiner

Zürich 2010

Abstract

The work carried out dealt with enzymatic polymerizations in the presence of vesicles as templates.

In the *first part* of the work, the horseradish peroxidase (HRP) catalyzed polymerization of aniline was used as a model reaction. It was found that sodium dodecylbenzenesulfonate (SDBS)/decanoic acid (1:1) vesicles and sodium bis(2-ethylhexyl) sulfosuccinate (AOT) vesicles are very promising templates for the preparation of the conductive and linear form of polyaniline (PANI) when the reactions are carried out under appropriate optimal conditions. These reaction conditions were first elaborated by following PANI formation with VIS/NIR and electron spin resonance spectroscopy. Only the conductive form of PANI, the emeraldine salt, shows absorption in the NIR region of spectrum. In the HRP/H₂O₂-catalyzed polymerization of aniline in the presence of vesicles, HRP was found to be strongly bound to the vesicle surface, while the anilinium ions showed only weak interactions with the vesicles, as shown by NMR spectroscopy and fluorescence measurements using a fluorescent vesicle membrane probe. Since the enzyme strongly binds to the vesicle surface, it is likely that the reaction is indeed initiated on the template's surface. The polymerization yields the linear emeraldine salt form of PANI which remains bound to the vesicles and results in morphological changes of the vesicles, as shown by cryo-transmission electron microscopy. Due to the relatively large size and the fluidity of the vesicles, these types of novel soft templates can bind long polymer chains. At the end of the reaction, the PANI remains dispersed in the aqueous solution without any precipitation for at least several weeks. This stable PANI/vesicle suspension can be applied as conductive ink for the inkjet printing technology. The PANI obtained was analyzed by various methods, including ¹³C-NMR and FTIR spectroscopy and thermogravimetric analysis (TGA). At the early stage of the polymerization reaction, mixture of oligoaniline that formed could be analyzed by MALDI-TOF mass spectroscopy, which was not possible for the long PANI obtained at the end of the reaction.

Compared with some other soft templates used for HRP/H₂O₂-catalyzed polymerization of aniline, for example SDBS micelles, the vesicle systems are superior since they do not lead to significant enzyme inactivation which is an

advantage and crucial for potential applications. AOT vesicles can even stabilize the HRP at low pH value at room temperature.

In the *second part* of the thesis, laccase/O₂ was applied as catalyst, again for the polymerization of aniline in the presence of SDBS/decanoic acid (1:1) vesicles. Comparing with HRP, laccase showed higher stability at low pH which is of advantage for the polymerization of aniline to yield highly conductive polymer. Analysis of PANI synthesized by laccase/O₂ indicated, however, that short oligoanilines or PANI containing branched units were formed. Furthermore, the presence of phenazine units was indentified by FTIR spectroscopy. The reaction yield in the case of laccase/O₂ in the presence of SDBS/decanoic acid (1:1) vesicles was, however, higher than in the case of HRP/H₂O₂.

In the *last part* of the thesis, the synthesis of polypyrrole (PPy) catalyzed by laccase/O₂ in the presence of SDBS/decanoic acid (1:1) vesicles was studied. PPy obtained in the presence of the vesicles showed a strong absorption in the NIR region, which was comparable with the absorption spectrum of PPy obtained by chemical sythesis. In addition, it seems that the presence of SDBS/decanoic acid (1:1) vesicles as stabilizer to certain extend could eliminate defects with the polymer chain which occurred during the polymerization in water in the absence of the vesicles, as indicated by FTIR measurements.

Overall, the thesis shows the general possibilities and also the limitations of using vesicles as soft templates for enzymatic polymerization reactions.

Zusammenfassung

Bei der durchgeführten Arbeit handelte es sich um Untersuchungen von Enzym-katalysierten Polymerisationsreaktionen in Anwesenheit von Vesikeln als Template.

Im *ersten Teil* der Arbeit wurde die Meerrettich-Peroxidase (HRP)-katalysierte Polymerisation von Anilin als Modellreaktion verwendet. Es konnte dabei gezeigt werden, dass Natriumdodecylbenzensulfonat (SDBS)/Decansäure (1:1) Vesikel und Vesikel aus Natrium Bis(2-ethylhexyl)sulfosuccinat (AOT) sehr vielversprechende Template für die Herstellung von der leitenden und der linearen Form von Polyanilin (PANI) sind. Voraussetzung dafür war, dass die Reaktionen unter entsprechenden optimalen Bedingungen durchgeführt wurden. Diese Reaktionsbedingungen wurden zuerst durch Analyse der PANI-Bildung mittels VIS/NIR-Spektroskopie und Elektronenspinresonanz-Spektroskopie ermittelt. Nur die leitende Form von PANI, das Emeraldinsalz, zeigt Absorption im NIR-Bereich des Spektrums.

Bei der HRP/H₂O₂-katalysierten Polymerisation von Anilin in Anwesenheit der Vesikel wurde festgestellt, dass sich HRP stark an die Vesikeloberfläche anlagerte, während die Anilinium-Ionen nur schwache Wechselwirkung mit den Vesikeln zeigten. Dies konnte mit NMR-Spektroskopie und Fluoreszenzmessungen unter Verwendung einer fluoreszierenden Vesikelmembran-Probe nachgewiesen werden. Da das Enzym stark an die Vesikeloberfläche band, ist es wahrscheinlich, dass die Reaktion an der Templateoberfläche initiiert wurde. Die Polymerisation führte zum linearen Emeraldinsalz von PANI, welches an den Vesikeln gebunden blieb. Das hatte zur Folge, dass die Vesikel morphologische Änderungen erfuhren, wie mit der Cryotransmissions-Elektronenmikroskopie gezeigt werden konnte. Wegen des relativ grossen Durchmessers der Vesikel im Vergleich zu den Mizellen und wegen der Fluidität der Vesikelmembran konnten diese neuartigen, weichen Template lange Polymerketten binden. Am Ende der Reaktion blieb PANI während mindestens mehrerer Wochen ohne Niederschlag in der wässrigen Lösung dispergiert. Diese stabile PANI/Vesikel-Suspension konnte als elektrisch leitende Tinte für Anwendungen mit dem Tintenstrahldrucker verwendet werden.

Das erhaltene PANI wurde ausserdem mit verschiedenen Methoden analysiert, u. a. mit ¹³C-NMR- und FTIR-Spektroskopie und thermogravimetrischer Analyse (TGA). Zu Beginn der Polymerisationsreaktion konnten Mischungen der gebildeten

Oligoaniline mittels MALDI-TOF Massenspektrometrie analysiert werden, was für die langen Polymerketten, welche am Ende der Reaktion erhalten wurden, nicht mehr möglich war.

Verglichen mit anderen weichen Templaten, z. B. SDBS-Mizellen, ist das Vesikel-System überlegen, da in letzterem Fall keine signifikante Enzymdesaktivierung beobachtet werden konnte, was für potentielle Anwendungen von Vorteil sein könnte. Die AOT-Vesikel konnten sogar HRP bei tiefem pH-Wert und bei Raumtemperatur stabilisieren.

Im *zweiten Teil* der Dissertation wurde Laccase/O₂ als Katalysator für die Polymerisation von Anilin in Anwesenheit von SDBS/Decansäure (1:1) Vesikeln verwendet. Im Vergleich mit HRP zeigte Laccase eine höhere Stabilität bei tiefem pH-Wert. Dieser ist vorteilhaft für die Polymerisation von Anilin, um ein stark leitendes Polymer zu erhalten. Die Analyse von PANI, welches mit Laccase/O₂ erhalten wurde, zeigte jedoch, dass entweder kurzkettinge Oligoaniline erhalten wurden und/oder PANI mit verzweigten Einheiten. Zudem konnte die Anwesenheit von Phenazin-Einheiten mit FTIR-Spektroskopie nachgewiesen werden, welche Defekte in der Polymerkette darstellen. Die Reaktionsausbeute im Falle von Laccase/O₂ in Anwesenheit von SDBS/Decansäure (1:1)-Vesikeln war jedoch höher als im Falle von HRP/H₂O₂.

Im *letzten Teil* der Dissertation wurde die Synthese von Polypyrrol (PPy), katalysiert mit Laccase/O₂, in Anwesenheit von SDBS/Decansäure (1:1) Vesikeln untersucht. Das erhaltene PPy zeigte starke Absorption im NIR-Bereich des Spektrums, welches vergleichbar war mit dem Absorptionsspektrum von PPy, welches chemisch hergestellt wurde. Zudem scheint es, dass die Anwesenheit von SDBS/Decansäure (1:1)-Vesikeln als Stabilisatoren zu einem gewissen Grad zum Ausbleiben von Defektstellen in der Polymerkette führte. In Abwesenheit von Vesikeln traten diese Defektstellen bei der Polymerisation in wässrigem Medium auf, wie mittels FTIR-Messungen gezeigt werden konnte.

Zusammenfassend zeigt diese Dissertation die allgemeinen Möglichkeiten und auch die Grenzen für die Verwendung von Vesikeln als weiche Template für enzymatische Polymerisationsreaktionen auf.