

## ОТЗЫВ

официального оппонента на диссертацию Матвеевой Ольги Валентиновны «Магнитоотделяемый катализатор окисления 2,3,6-триметилфенола на основе иммобилизованной пероксидазы», представленную на соискание ученой степени кандидата химических наук по специальности 02.00.15 – Кинетика и катализ

### ***1. Актуальность темы диссертации***

В настоящее время каталитический органический синтез биологически активных веществ уверенно занимает важное место в фармацевтической промышленности. Во многих ведущих исследовательских центрах проводятся интенсивные работы по созданию эффективных катализаторов для реализации селективных процессов синтеза ценных органических соединений с широким спектром применения. Селективное окисление 2,3,6-триметилфенола (ТМФ) с целью получения 2,3,5-триметилгидрохинона (ТМГХ), являющегося интермедиатом синтеза витамина Е, относится именно к таким промышленно важным процессам. Применение эффективных магнитоотделяемых катализаторов в реакциях тонкого органического синтеза – малоизученная, но интенсивно развивающаяся область катализа. Данная работа посвящена исследованию оптимального состава биокаталитической системы на основе пероксидазы корня хрена, иммобилизованной на магнитные наночастицы и изучению условий селективного синтеза 2,3,5-триметилгидрохинона из 2,3,6-триметилфенола в присутствии этого биокатализатора с участием пероксида водорода в качестве окислителя.

*Цель* диссертационной работы Матвеевой О.В. заключается в разработке магнитоотделяемого катализатора на основе иммобилизованной пероксидазы для селективного окисления 2,3,6-триметилфенола. В этой связи *актуальность* представленной диссертационной работы *не вызывает сомнения*.

### ***2. Новизна и достоверность основных выводов и результатов, полученных и сформулированных в диссертационной работе***

В диссертационной работе впервые разработан эффективный магнитоотделяемый катализатор на основе пероксидазы для селективного окисления фенолзамещенных соединений. Определены условия формирования оптимальной биокаталитической системы для селективного окисления ТМФ в ТМГХ. Впервые осуществлено окисление ТМФ пероксидом водорода в присутствии фермента. Методами ПЭМ, РФЭС, ИКС проведены физико-химические исследования для установления микроструктуры биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на магнитных наночастицах  $Fe_3O_4$ , а также удельная намагниченность синтезированных образцов. Определены

основные кинетические параметры окисления ТМФ в присутствии наиболее активного биокатализатора на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ , а также исследована стабильность биокатализатора в рециклах. Найдены оптимальные условия проведения процесса окисления ТМФ.

Хорошая техника анализа состава продуктов и воспроизводимость экспериментальных данных, применение современных физических методов исследования катализаторов – все это обеспечивает надежность и достоверность полученных в работе результатов.

### ***3. Ценность диссертационной работы для науки и практики.***

Важной фундаментальной научной проблемой, решаемой в рамках диссертации, является изучение образования ковалентной шивки фермента HRP с носителями  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ ,  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Исследование полученных образцов с помощью метода ИК Фурье спектроскопии позволило установить, что фермент HRP образует ковалентные связи с поверхностью носителей  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$ ,  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . При этом с модифицированными поверхностями  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  образуется азометиновая связь  $\text{N}=\text{CH}$  ( $1634 \text{ см}^{-1}$ ); а с модифицированной хитозаном поверхностью  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  образуется пептидная связь  $\text{CO-NH}$  ( $1559 \text{ см}^{-1}$ ), что и объясняет высокую стабильность биокатализаторов. Изучены кинетические закономерности реакции и предложена гипотетическая схема механизма протекания реакции в присутствии иммобилизованной на неорганические носители пероксидазы. Впервые показана высокая специфичность действия оксидоредуктазы по отношению к пероксиду водорода, что обуславливает его применение как экологически безопасного и доступного окислителя для фенолзамещенных соединений. Впервые разработанный эффективный катализатор на основе пероксидазы иммобилизованной на магнитных наночастицах  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  для селективного синтеза ТМГХ из ТМФ может стать основой для разработки метода биокаталитического окисления фенолзамещенных соединений в присутствии магнитоотделяемого катализатора. Результаты данного исследования могут быть использованы *при оптимизации существующих методов синтеза витамина E*. В этой связи *практическое значение работы очевидно*.

### ***4. Оценка содержания диссертации в целом, замечания по оформлению диссертации.***

Диссертация изложена на 130 страницах, состоит из введения, трех глав, выводов, списка литературы из 120 наименований. Работа содержит 8 таблиц и 59 рисунков.

Во *введении* автор обосновывает актуальность исследуемой темы, формулирует цель и задачи исследования, описывает научную новизну и практическую значимость работы. Здесь же указывается личный вклад автора, из которого можно заключить, что автор принимал непосредственное участие во всех проведенных экспериментальных исследованиях, в анализе и интерпретации результатов.

В *первой главе* (литературном обзоре) рассматриваются все ключевые вопросы, необходимые для последующего обсуждения полученных результатов. Обобщены данные о существующих способах получения ТМГХ в отечественной промышленности и за рубежом. Рассмотрены основные подходы к окислению ТМФ в присутствии различных катализаторов. Описано строение и механизм действия пероксидазы корня хрена, а также физические и химические способы ее иммобилизации на различные носители. Особое внимание уделено рассмотрению подходов к синтезу и стабилизации магнитных наночастиц, а также иммобилизации на них ферментов.

Во *второй главе* «Методы и методики экспериментов и анализов» приведены методики синтеза магнитных наночастиц и иммобилизации на них пероксидазы, изложены методики иммобилизации пероксидазы на неорганические носители  $\text{SiO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$ . Дано описание установки, которая применялась для процесса окисления ТМФ, приведена методика проведения анализа полученной реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии и хроматомасс-спектрометрии; представлены методики физико-химических исследований каталитических систем методами просвечивающей электронной спектроскопии, измерения намагниченности, инфракрасной спектроскопии, рентгеновской фотоэлектронной спектроскопии, измерения удельной поверхности и пористости; даны характеристики использованных химических реагентов. Этот раздел дает полное представление об экспериментальной стороне диссертационной работы.

В *третьей главе* «Результаты и их обсуждение» представлены и обсуждены результаты физико-химических и кинетических экспериментов, выполнен анализ стабильности каталитической системы, определены кинетические параметры реакции с участием разработанной каталитической системы. Методом ИК спектроскопии исследовано взаимодействие фермента с поверхностью носителя. Установлено, что фермент образует ковалентные связи с поверхностью носителей  $\text{SiO}_2$ ,  $\text{Al}_2\text{O}_3$  и  $\text{Fe}_3\text{O}_4$ . При этом с модифицированными поверхностями  $\text{SiO}_2$  и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  образуется азометиновая связь  $\text{N}=\text{CH}$  ( $1634 \text{ см}^{-1}$ ); а с модифицированной хитозаном поверхностью  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  образуется пептидная связь  $\text{CO}-\text{NH}$  ( $1559 \text{ см}^{-1}$ ), что, как было показано, и обеспечивает высокую стабильность данных биокатализаторов. Исследовано влияние концентрации реагентов в ходе синтеза катализаторов на их каталитическую активность, что позволило выявить оптимальный состав биокаталитических систем на основе  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  (2 мкл/мл АПТС, 0.15 мг/мл пероксидазы),  $\text{SiO}_2$  (0.25 г/л раствора ПСС; 0.15 г/л раствора хитозана; 0.2 г/л раствора глутарового диальдегида, 0.15 мг/мл пероксидазы) и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  (0.5 г/л раствора ПСС;

0.2 г/л раствора хитозана; 0.3 г/л раствора глутарового диальдегида, 0.15 мг/мл пероксидазы). В присутствии оптимального катализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  исследованы кинетические закономерности окисления ТМФ и найдены оптимальные условия селективного синтеза ТМГХ: температура  $40^\circ\text{C}$ , pH 6.5, начальная концентрация ТМФ 1.5 ммоль/л. Определены кажущаяся энергия активации и предэкспоненциальный множитель константы скорости реакции для нативной HRP и для HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы. Определены параметры уравнения Михаэлиса – Ментен: для HRP иммобилизованной на  $\text{Fe}_3\text{O}_4$  ( $K_m = 2.81$  ммоль/л,  $V_{\max} = 0.043$  ммоль/л·мин),  $\text{SiO}_2$  ( $K_m = 5.02$  ммоль/л,  $V_{\max} = 0.009$  ммоль/л·мин) и  $\text{Al}_2\text{O}_3$  ( $K_m = 9.19$  ммоль/л,  $V_{\max} = 0.009$  ммоль/л·мин). Выдвинута гипотеза о механизме окисления ТМФ в ТМГХ в присутствии биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на неорганических носителях.

*В заключительной главе* сформулированы основные результаты и выводы, полученные в диссертационной работе. Полученные Матвеевой О.В. *результаты являются новыми*, а выводы – вполне обоснованными.

Результаты диссертационной работы прошли апробацию на международных и всероссийских конференциях и симпозиумах. Автором опубликованы 7 статей в изданиях центральной печати, рекомендованных ВАК, и международных журналах.

Диссертационная работа Матвеевой О.В., несомненно, представляет собой законченную квалификационную работу, актуальность, научная новизна и практическая значимость которой не вызывают сомнений.

Вместе с тем по работе могут быть сделаны *следующие замечания*:

1. Не приведена методика и оценка эффективности отделения разработанного магнитоотделяемого катализатора неодимовым магнитом из реакционной среды.
2. Вывод на стр. 99 об отсутствии внутренней диффузии на основании исследований хемосорбции водорода и порометрического анализа не понятен и требует дополнительного экспериментального или теоретического подтверждения.
3. На стр. 105 автором определены кажущаяся энергия активации  $E_a$  и предэкспоненциальный множитель  $K_0$  для нативной HRP и для HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы. Представляется необходимым привести единицы измерения предэкспоненциального множителя, обсудить физический смысл величин полученных кинетических параметров и сопоставить с имеющимися в литературе данными по изученной автором или похожим реакциям.
4. Использование часто применяемого в литературе классического уравнения

Михаэлиса-Ментен на стр. 110 (раздел 3.2.7) для определения кинетических параметров синтезированных биокатализаторов на самом деле не совсем очевидно и требует более детального обсуждения. Так, на рис. 3.34 наблюдается явное отклонение экспериментальных данных, представленных в координатах Лайнуивера-Берка, от теоретической прямой, что обычно свидетельствует об отклонениях от кинетики Михаэлиса-Ментен и может указывать на более сложный механизм реакции, например, присутствие кооперативной аллостерии.

Приведенные замечания не затрагивают основных положений и выводов диссертации. В целом диссертационная работа является законченным комплексным квалификационным исследованием, развивающим вопросы разработки новых каталитических систем для совершенствования технологий органического синтеза.

Результаты диссертационной работы Матвеевой О.В. могут быть использованы в Институте органической химии РАН, МГУ им. М.В. Ломоносова, РХТУ им. Д.И. Менделеева, Санкт-Петербургском технологическом институте, Институте биохимии им. А.Н. Баха РАН, Институте биохимической физики им. Н.М. Эмануэля РАН, Новосибирском институте органической химии СО РАН, Иркутском институте химии СО РАН для развития теории катализа в процессах органического синтеза.

Опубликованные материалы работы и автореферат в полной мере отражают содержание диссертации. По своей актуальности, научной новизне и практической значимости диссертация полностью соответствует требованиям «Положения о порядке присуждения ученых степеней» (Постановление Правительства Российской Федерации от 24 сентября 2013 года № 842), а ее автор Матвеева Ольга Валентиновна, бесспорно, заслуживает присуждения ученой степени кандидата наук по специальности 02.00.15. – Кинетика и катализ.

Кандидат химических наук,  
старший научный сотрудник, доцент,  
руководитель группы катализаторов  
на углеродных носителях  
ФГБУН Института катализа СО РАН  
им. Г.К. Борескова

Симакова Ирина Леонидовна

Подпись старшего научного сотрудника,  
к.х.н. Симаковой И.Л. заверяю  
Ученый секретарь ФГБУН ИК СО РАН, д.х.н.



Козлов Д.В.

Адрес: пр. Ак. Лаврентьева 5, 630090, г. Новосибирск  
Тел. (383)-326-9531, E-mail: [simakova@catalysis.ru](mailto:simakova@catalysis.ru)

04.09.2015