

На правах рукописи



Матвеева Ольга Валентиновна

**Магнитоотделяемый катализатор
окисления 2,3,6-триметилфенола на
основе иммобилизованной пероксидазы**

Специальность 02.00.15 – *Кинетика и катализ*

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата химических наук

МОСКВА – 2015

Работа выполнена на кафедре Биотехнологии и химии Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего профессионального образования «Тверской государственной технической университет».

Научный руководитель: доктор химических наук, профессор
Сульман Эсфирь Михайловна
заведующий кафедрой Биотехнологии и химии
ФГБОУ ВПО «Тверской государственной
технической университет».

Официальные оппоненты: доктор химических наук, профессор
Лефёдова Ольга Валентиновна
декан факультета фундаментальной и прикладной
химии ФГБОУ ВПО «Ивановский государственный
химико-технологический университет»

кандидат химических наук, доцент

Симакова Ирина Леонидовна

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

Ведущая организация: Учреждение Российской академии наук ФГБУН
Институт органической химии им. Н.Д. Зелинского
РАН

Защита состоится «24» сентября 2015 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета Д 212.204.02 при Российском химико-технологическом университете имени Д. И. Менделеева (125047 г. Москва, Миусская пл., д. 9) в аудитории 443 (конференц-зал).

С диссертацией можно ознакомиться в Информационно-библиотечном центре РХТУ имени Д. И. Менделеева.

Автореферат разослан «___»_____2015

Ученый секретарь
диссертационного совета
Д 212.204.02



Староверов Д.В.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность исследования. В настоящее время одной из актуальных задач тонкого органического синтеза является разработка эффективных процессов получения биологически активных веществ. Синтезы многих биологически активных соединений являются многостадийными и малоэффективными процессами, в которых большинство стадий достаточно времязатратны, а для получения целевых продуктов требуется дополнительная очистка. Так, например, существующие схемы синтеза 2,3,5-триметилгидрохинона (полупродукта витамина Е) характеризуются применением агрессивных окислителей (перманганата калия, сульфата марганца, двуокиси марганца, азотной кислоты, гипохлорида натрия и др.), что приводит к формированию большого количества побочных веществ и низкому выходу целевого продукта. В последние годы все чаще в процессах окисления фенольных соединений в качестве катализатора применяется пероксидаза, в присутствии которой окисление протекает в мягких условиях с высоким выходом продукта и хорошей селективностью. Имобилизация ферментов позволяет добиться их стабильности, увеличивая тем самым срок службы, и уменьшив затраты на технологическое применение. Перспективным направлением в катализе является имобилизация ферментов на магнитных наночастицах, имеющих такие преимущества, как большая площадь поверхности и простота отделения от реакционной смеси. В связи с вышеизложенным разработка эффективных, селективных магнитоотделяемых биокаталитических систем, применяемых для окисления 2,3,6-триметилфенола является актуальной.

Цель и задачи исследования. Целью работы является разработка магнитоотделяемого катализатора на основе иммобилизованной пероксидазы для селективного окисления 2,3,6-триметилфенола. Для достижения этой цели были решены следующие задачи: теоретическое исследование методов синтеза 2,3,5-триметилгидрохинона; рассмотрение существующих методов имобилизации ферментов; разработка метода синтеза магнитных наночастиц; определение оптимального состава биокаталитической системы на основе пероксидазы для процесса окисления 2,3,6-триметилфенола; определение оптимальных условий проведения этого процесса в присутствии биокатализатора и пероксида водорода в

качестве окислителя; исследование кинетики процесса окисления 2,3,6-триметилфенола; изучение физико-химических свойств биокаталитических систем.

Научная новизна и практическая значимость работы. Разработан магнитоотделяемый катализатор на основе пероксидазы, эффективно работающий в процессе селективного окисления 2,3,6-триметилфенола. Впервые проведено окисление 2,3,6-триметилфенола пероксидом водорода в присутствии фермента. Показана специфичность действия оксидоредуктаз по отношению к пероксиду водорода, что обуславливает его применение как экологически чистого и дешевого окислителя для фенолзамещенных соединений. Проведен ряд кинетических и физико-химических исследований для определения оптимального состава биокатализатора. Подобраны оптимальные условия проведения процесса окисления 2,3,6-триметилфенола.

Личный вклад автора. Автором непосредственно синтезированы катализаторы на основе пероксидазы, иммобилизованной на неорганические носители SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_3O_4 . Получены магнитные наночастицы методом соосаждения и полиольным методом. Проведены эксперименты по определению оптимального состава биокатализаторов и по подбору оптимальных условий процесса селективного окисления 2,3,6-триметилфенола. Кроме того, автор принимал участие в проведении физико-химических исследований каталитических систем: просвечивающая электронная микроскопия, изучение намагниченности магнитных наночастиц, ИК-Фурье спектроскопия, измерение площади поверхности и пористости биокатализаторов, рентгенофотозлектронная спектроскопия, хемосорбция водорода.

Апробация работы. Основные положения диссертации докладывались на следующих конференциях и конгрессах: областная научно-техническая конференция молодых ученых "Физика, химия и новые технологии" (Тверь, 2010); XV Международная молодежная научная конференция «Ломоносов» (Москва, 2010); Российский конгресс по катализу «РОСКАТАЛИЗ» (Москва, 2011); Международная научно-техническая конференция «Научоемкие химические технологии-2012» (Тула-Ясная Поляна-Куликово Поле, 2012); 15-ый Международный конгресс по катализу (Германия, Мюнхен, 2012); Межрегиональная научно-техническая конференция «Интеграция науки и образования – производству, экономике» (Тверь, 2012); 9-ый Европейский конгресс по химической инженерии и 2-й Европейский конгресс по

прикладной биотехнологии (Гаага, Нидерланды, 2013); 9-ая Международная конференция "Биокатализ. Фундаментальные основы и применения" (Москва, 2013); 21-ая Международная конференция по композитам/наноинженерии (Тенерифе, Испания, 2013); 16-й Международный симпозиум по связи между гомогенным и гетерогенным катализом (Саппоро, Япония, 2013); 11-ый Европейский конгресс по катализу (Лион, Франция, 2013); 22-ая Международная конференция по композитам/наноинженерии (Мальта, 2014); 15-ая Международная научно-техническая конференция "Наукоемкие химические технологии - 2014" (Звенигород, 2014); 21-й Международный конгресс по химии и химической технологии и 17-я конференция по процессам интеграции, моделирования и оптимизации энергосбережения и уменьшения загрязнения (Чехия, Прага, 2014); 6-ая Международная конференция Российского химического общества имени Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов» (Москва, 2014).

Работа выполнена в рамках проекта госзадания Тверского государственного технического университета № 129 (базовая часть) «Разработка высокоэффективных многокомпонентных нано- и биокатализаторов на основе иммобилизованных ферментов и наночастиц металлов»; проекта госзадания Тверского государственного технического университета № 1789 «Создание новых микрореакторных каталитических технологий органического синтеза».

Публикации. По результатам исследований опубликовано 24 печатные работы, в том числе 7 статей в изданиях центральной печати, рекомендованных ВАК и международных журналах.

Структура диссертации. Работа состоит из введения, трех глав, выводов и списка использованных источников. Текст изложен на 130 страницах, включает 59 рисунков, 8 таблиц. Список использованных источников содержит 120 наименований.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Во введении обоснованы актуальность исследуемой темы, научная новизна и практическая значимость работы.

Первая глава, «Обзор литературы», посвящена изучению существующих способов получения 2,3,5-триметилгидрохинона (ТМГХ). В ней рассмотрены

основные подходы к окислению 2,3,6-триметилфенола (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 подходам синтеза магнитных наночастиц и 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 SiO_2 и Al_2O_3 . В последующих разделах описана установка, которая применялась для процесса окисления ТМФ и методика проведения анализа полученной реакционной смеси методом высокоэффективной жидкостной хроматографии; представлены методики физико-химических исследований каталитических систем; даны характеристики использованных химических реагентов.

Третья глава, «Результаты экспериментов и их обсуждение», посвящена анализу и трактовке полученных результатов физико-химических исследований и кинетических экспериментов.

Получение ТМГХ методом ферментативного окисления можно рассматривать как экологически чистую альтернативу существующим способам синтеза полупродукта витамина Е с высоким выходом целевого про-

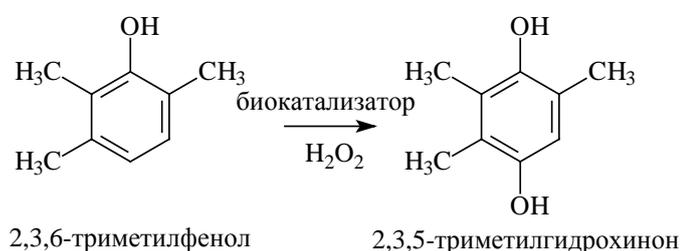


Рис. 1 – Химическая реакция прямого окисления ТМФ до ТМГХ

дукта. На Рис. 1 представлена химическая реакция прямого окисления ТМФ до ТМГХ.

На первом этапе экспериментов был выбран оптимальный способ синтеза магнитных наночастиц. Для определения структуры и морфологии магнитных наночастиц проводилось их ПЭМ исследование. На Рис. 2 представлены микрофотографии образцов магнитных наночастиц Fe_3O_4 , полученных полиольным способом и методом соосаждения. Микрофотография (Рис. 2а) показывает, что наночастицы синтезированные путем метода соосаждения имеют зернистую неоднородность и большое распределение по размерам. Наночастицы, синтезирова-

нные полиольным методом (Рис.2б), образовывали крупные кластеры со средним диаметром 111 нм, состоящие из множества небольших наночастиц. Такие кластеры обладают большей удельной намагниченностью ($92 \text{ Ам}^2/\text{кг}$) по сравнению с наночастицами, синтезированными по методу соосаждения ($58 \text{ Ам}^2/\text{кг}$). Таким образом, в

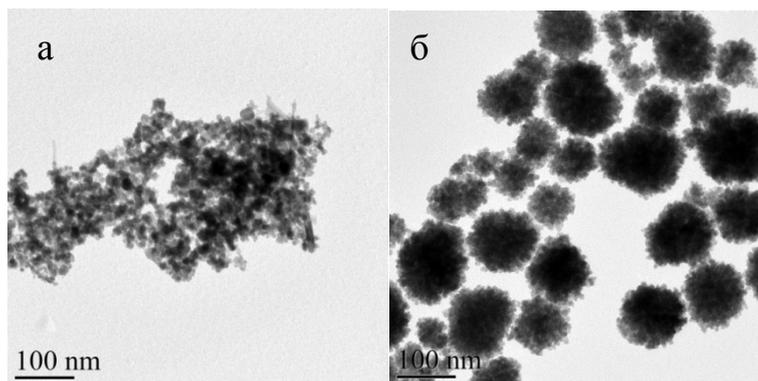


Рис. 2 – Микрофотографии синтезированных наночастиц, полученных а) методом соосаждения, б) полиольным методом

качестве носителя для фермента более предпочтительными оказались наночастицы, синтезированные полиольным методом, т.к. намагниченность таких наночастиц выше и их морфология является более регулярной, представляя собой правильно сформированную сферу.

Далее в ходе экспериментов был оптимизирован состав биокаталитических систем на основе HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 . Для прочного связывания магнитных наночастиц с ферментом, Fe_3O_4 обрабатывался 3-аминопропилтриэтоксисиланом (АПТС) различной концентрации (Рис 3а).

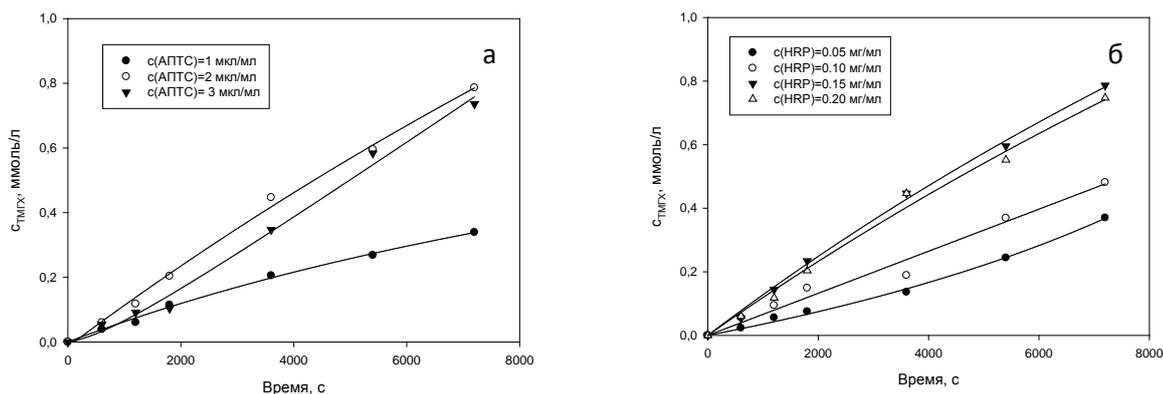


Рис. 3 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМГХ (ммоль/л) а) при модификации магнитных наночастиц различной концентрации АПТС; б) при различной концентрации HRP ($c_0^{\text{ТМФ}} = 1.5 \text{ ммоль/л}$, $c_0(\text{H}_2\text{O}_2) = 1.5 \text{ моль/л}$, $T = 40 \text{ }^\circ\text{C}$)

Эксперименты показали, что концентрация АПТС 2 мкл/мл была оптимальной (Рис. 3а), поскольку при данной концентрации достигается максимальный выход

продукта. Вероятно, происходит максимальное насыщение поверхности магнетита. Увеличение концентрации АПТС практически не влияет на процесс окисления ТМФ, при уменьшении концентрации АПТС, скорее всего не образуется достаточного количества кремнийорганического слоя, соответственно меньшее количество фермента может присоединиться к поверхности наночастицы.

Далее наночастицы покрытые АПТС обрабатывались раствором HRP. На Рис.3б представлены зависимости выхода ТМГХ при различных концентрациях HRP. Оптимальной была определена концентрация HRP 0.15 мг/мл.

Для изучения образования ковалентной сшивки фермента с носителями проводили исследование полученных образцов с помощью метода ИК Фурье спектроскопии. ИК спектры образца биокатализатора на основе HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 представлены на Рис. 4.

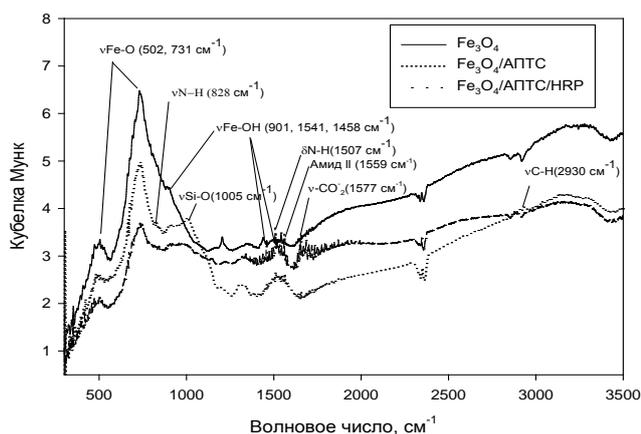


Рис. 4 - Инфракрасные спектры образцов на основе HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4

После иммобилизации HRP на предварительно модифицированную поверхность образуются связи, свидетельствующие о присутствии HRP на поверхности носителя: δ N-H (1507 cm^{-1}), ν $-CO_2^-$ (1577 cm^{-1}) и полоса Амид II, идентифицирующая пептидную связь за счет $\delta_{NH} + \nu_{CN}$ (1559 cm^{-1}).

В случае синтеза катализатора на основе HRP, иммобилизованной на SiO_2 и Al_2O_3 также был оптимизирован состав биокаталитических систем. На поверхность носителей наносился слой полиэлектролитов. Для перезарядки поверхности носители обрабатывались полистиролсульфонатом натрия (ПСС) различной концентрации. Затем добавлялся раствор хитозана, содержащего легкодоступные аминокгруппы,

Сравнивая ИК спектры магнитных наночастиц покрытых и непокрытых АПТС (Рис. 4), можно увидеть, что Fe_3O_4 обработанный модифицирующим реагентом имеет, помимо связей ν Fe-OH ($1541, 1458 \text{ cm}^{-1}$), ν Fe-O ($731, 502 \text{ cm}^{-1}$), связи, указывающие на наличие АПТС, а именно: ν C-H (2930 cm^{-1}), δ N-H (828 cm^{-1}), ν Si-O (1005 cm^{-1}), ν C-N (1055 cm^{-1}).

которые могут использоваться для межмолекулярного поперечного связывания с HRP. Далее полученные образцы для более прочного связывания фермента с носителем обрабатывали раствором глутарового диальдегида, который способен образовывать азометиновую связь в реакции диальдегида с аминогруппами фермента и хитозана. В итоге, были подобраны оптимальные соотношения реагентов: а) для 1 г SiO_2 : 0.25 г/л раствора ПСС; 0.15 г/л раствора хитозана; 0.2 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл HRP; б) для 1 г Al_2O_3 : 0.5 г/л раствора ПСС; 0.2 г/л раствора хитозана; 0.3 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл HRP.

В ходе рентгенофотоэлектронного исследования синтезированных образцов были получены обзорные спектры для Fe_3O_4 , $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}$, $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$ и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$ (после эксперимента). Кислород в составе поверхности образца $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}$ находится в двух состояниях, характерных для Fe_3O_4 и FeOOH : O 1s 530.0 эВ и 531.7 эВ. Последнее состояние объясняется наличием OH-групп на поверхности частиц Fe_3O_4 . После нанесения фермента, компонента O 1s, отвечающая кислородным мостикам структуры Fe_3O_4 530.0 эВ сохраняется, в то время как область 531.7 эВ может быть описана только широким интегральным пиком, отвечающим множеству химических состояний кислорода: -OH, -COOH, $>\text{C}=\text{O}$ и т.д. - в структуре молекулы фермента. При этом после нанесения фермента на поверхность носителя содержание железа уменьшилось в 2 раза, что обусловлено появлением на поверхности Fe_3O_4 белковой молекулы.

Сохранение профилей спектров высокого разрешения, энергий связи подуровней и состава поверхности после одного каталитического цикла, позволяет утверждать, что смывание фермента с поверхности Fe_3O_4 не происходит. Таким образом, с учетом данных ИК-спектроскопии и рентгенофотоэлектронного исследования, можно утверждать, что фермент был ковалентно пришит к поверхности Fe_3O_4 . Соответственно, можно сделать вывод о том, что такой биокатализатор будет стабильным.

Методом низкотемпературной адсорбции азота была исследована поверхностная характеристика образцов на основе магнитных наночастиц. Данный анализ показал, что полученные наночастицы можно отнести к изотермам IV типа, которые ассоциируются с капиллярной конденсацией в мезопорах. На основании полученных данных по низкотемпературной адсорбции азота, можно сделать вывод о

том, что все представленные образцы имеют мезопористую структуру. Диаметр пор составляет в среднем 4-11 нм, которые обеспечивают свободный доступ молекулы HRP, имеющий средний диаметр нативной молекулы 4 нм. Следовательно, белковая молекула может легко закрепиться на носителе, что согласуется с данными рентгенофотозлектронного исследования. Можно также предположить, что область протекания реакции окисления будет кинетической.

Для исключения внешнедиффузионного торможения на границе раздела гетерогенного катализатора и реакционного раствора проводились эксперименты по окислению ТМФ с разной интенсивностью перемешивания. Исследования проводились с гетерогенным биокатализатором – $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$. Исследования показали, что скорость окисления ТМФ увеличивается линейно при увеличении интенсивности перемешивания мешалки до 600 об/мин. При интенсивности перемешивания выше этого значения начальная скорость окисления ТМФ практически не зависит от интенсивности перемешивания, что свидетельствует об исключении влияния внешнедиффузионного торможения. В связи с этим все дальнейшие эксперименты проводились при интенсивности перемешивания 600 об/мин. Таким образом, предположение, выдвинутое на основании метода низкотемпературной адсорбции азота, о том, что реакция протекает в кинетической области является верным.

С целью определения оптимальных условий процесса окисления ТМФ, варьировали начальную концентрацию субстрата, температуру, pH реакционной среды. Также была изучена стабильность полученных биокатализаторов.

Для определения оптимальной концентрации субстрата были проведены кинетические эксперименты по варьированию начальной концентрации ТМФ (0.5; 0.75; 1.0; 1.5; 2.0 и 2.5 ммоль/л) в присутствии нативной HRP (Рис. 5а) и HRP иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 (Рис. 5б).

Оптимальная концентрация ТМФ составляла 1.5 ммоль/л как при использовании нативной HRP, так и HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 .

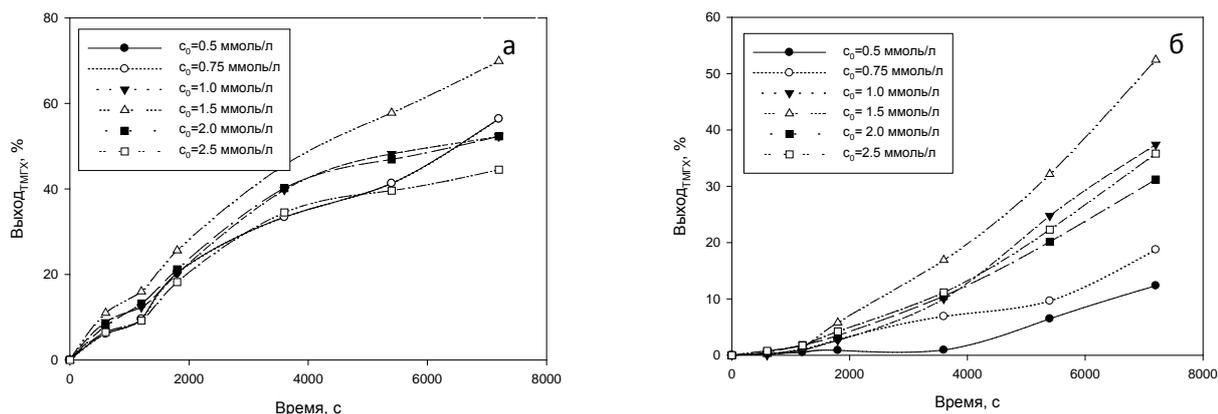


Рис. 5 – Кинетические кривые зависимости выхода ТМГХ от начальной концентрации субстрата а) нативная HRP; б) HRP иммобилизованная на магнитные наночастицы Fe_3O_4 ($c_0^{TMФ} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(H_2O_2) = 1.5$ моль/л, $T = 40$ °С)

Установлено, что на скорость окисления ТМФ помимо биокатализатора влияют также наночастицы Fe_3O_4 , катализируя эту реакцию, т.к. они обладают пероксидазо-подобным действием, за счет атомов железа на их поверхности, которые формируют промежуточный комплекс с субстратом перед катализом. Сродство наночастиц к субстрату может привести к повышению их каталитической активности. В связи с этим были проведены эксперименты по окислению ТМФ в присутствии магнитных наночастиц Fe_3O_4 без иммобилизованной HRP.

Для определения оптимальной температуры проведения процесса окисления ТМФ в присутствии синтезированных биокатализаторов проведено исследование в интервале температур от 30 до 55 °С. На Рис. 6а представлена зависимость начальной скорости реакции окисления ТМФ от температуры.

Полученные данные показывают, что при увеличении температуры активность HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 не снижается, иммобилизованный фермент является термостабильным. Вероятно, это происходит в результате прочного связывания белковой молекулы с носителем, вследствие чего нативная конформация фермента не претерпевает сильных изменений и денатурация белковой молекулы затрудняется. Активность гетерогенного катализатора при повышении температуры продолжает увеличиваться из-за некоторого вклада в процесс окисления Fe_3O_4 . Для остальных образцов катализаторов и для нативной

HRP оптимальная температура процесса окисления ТМФ – 40 °С. Поэтому все дальнейшие эксперименты проводились при данной температуре.

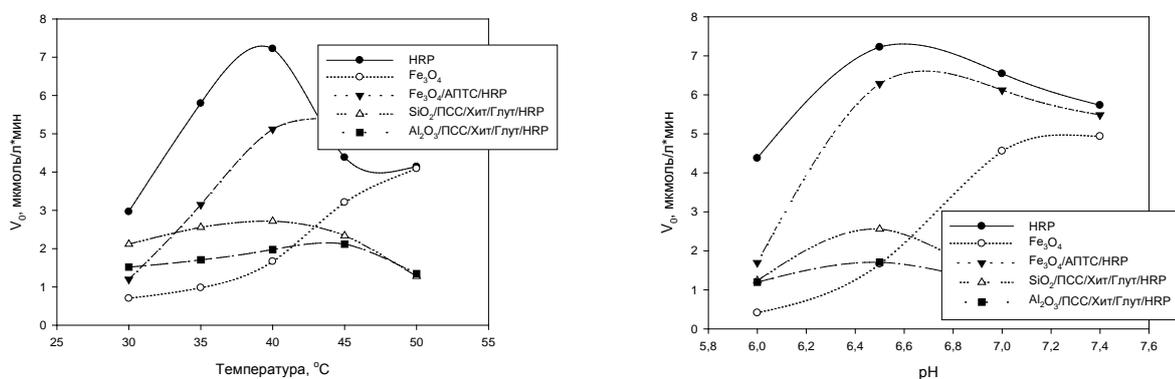


Рис. 6 – Начальная скорость реакции окисления ТМФ при а) при различных температурах; б) при различных значениях рН ($c_0^{ТМФ} = 1.5$ ммоль/л, $c_0(H_2O_2) = 1.5$ моль/л, $c_{кат} = 0.2$ г/л)

Была рассчитана кажущаяся энергия активации E_a и предэкспоненциальный множитель K_0 для нативной HRP, они составляют 61 кДж/моль и $1.4 \cdot 10^7$ соответственно. Для HRP иммобилизованной на магнитные наночастицы E_a составляет 68 кДж/моль, $K_0 - 6.6 \cdot 10^7$. То есть в последнем случае увеличивается число активных центров.

Для оценки влияния значения рН были проведены эксперименты по окислению ТМФ в интервале рН от 6.0 до 7.4 (Рис. 6б). Кинетические кривые (Рис. 6б) показывают, что оптимальным значением рН для процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии биокатализатора на основе HRP (для всех носителей) и нативной HRP является 6.5. Это свидетельствует о том, что иммобилизация на магнитные наночастицы Fe_3O_4 не вызвала сдвига оптимума рН, по сравнению с нативной HRP. В то время как при использовании магнитных наночастиц Fe_3O_4 без фермента скорость реакции увеличивается с увеличением значения рН.

Для оценки стабильности синтезируемых биокатализаторов были выполнены несколько последовательных экспериментов окисления, используя гетерогенные катализаторы в рецикле (Рис. 7).

Из представленных данных (Рис. 7) видно, что в результате закрепления активных центров фермента иммобилизованная HRP становится стабильной.

Кинетические кривые (Рис. 7б) показывают, что активность биокатализаторов на основе HRP, иммобилизованной на SiO_2 и Al_2O_3 снижается незначительно.

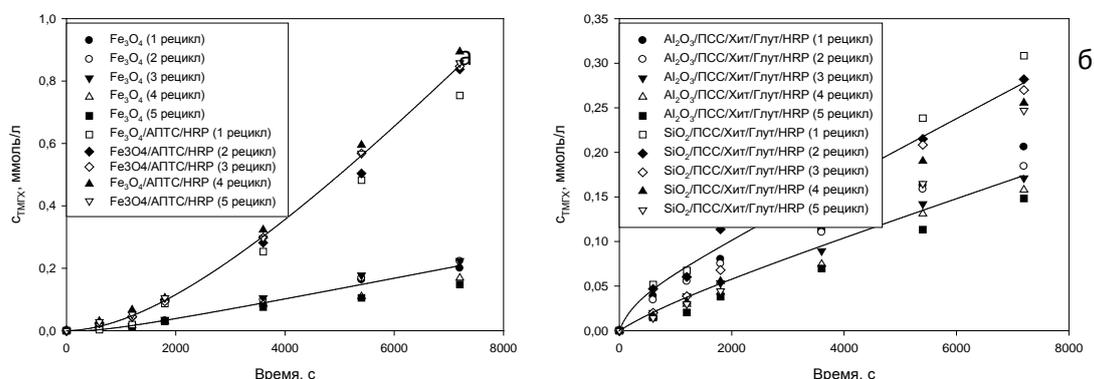


Рис. 7 – Зависимость концентрации ТМГХ от количества рециклов биокаталитической реакции а) Fe_3O_4 и $\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$; б) $\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$ и $\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$ ($c_0^{\text{ТМФ}}=1.5$ ммоль/л, pH 6.5, $T=40^\circ\text{C}$)

Увеличение активности биокатализатора (Рис. 7а) на основе HRP, иммобилизованной на Fe_3O_4 может быть вызвано увеличением количества активных центров фермента. Стабильность биокатализатора на основе HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы подтверждается РФЭС исследованиями, поскольку сохраняются профили спектров высокого разрешения, энергий связи подуровней и состава после каталитического цикла.

После определения оптимальных условий процесса окисления ТМФ, были найдены кинетические параметры: максимальная скорость V_{max} и константа Михаэлиса K_m методом Лайнуивера – Берка. Кинетические параметры реакции окисления ТМФ, определенные по графику в координатах Лайнуивера-Берка приведены в Таблице 1.

Таблица 1 – Кинетические параметры синтезированных биокатализаторов

№	Катализатор	K_m , ммоль/л	V_{max} , ммоль/л·мин	Активность, ед. акт./г(кат)
1	HRP	1.78	0.024	0.346
2	$\text{Fe}_3\text{O}_4/\text{АПТС}/\text{HRP}$	4.15	0.014	0.237
3	$\text{SiO}_2/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$	5.02	0.009	0.218
4	$\text{Al}_2\text{O}_3/\text{ПСС}/\text{Хит}/\text{Глут}/\text{HRP}$	9.19	0.009	0.180

Из Таблицы 1 видно, что нативная HRP имеет наименьшую K_m 1.78 ммоль/л и наибольшие V_{max} 0.024 ммоль/л·мин и активность 0.346 ед.акт./г(кат.). Из гетерогенных катализаторов наиболее эффективным является биокатализатор на основе HRP, иммобилизованная на магнитные наночастицы Fe_3O_4 . Невысокие значения активностей для биокатализаторов на основе SiO_2 и Al_2O_3 по сравнению с биокатализатором на основе Fe_3O_4 могут быть связаны с меньшим количеством пришитого фермента, а также изменением его конформации, вследствие иммобилизации.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ВЫВОДЫ

1. Синтезирован магниторазделяемый биокатализатор на основе пероксидазы, иммобилизованной на магнитные наночастицы Fe_3O_4 .
2. Осуществлен синтез магнитных наночастиц Fe_3O_4 . Полученные полиольным способом наночастицы обладают достаточно высокой намагниченностью и образуют упорядоченные кластеры.
3. По данным ИК спектроскопии сделан вывод о том, что фермент образует ковалентные связи с поверхностью носителей (SiO_2 , Al_2O_3 , Fe_3O_4): 1) с модифицированными поверхностями SiO_2 , Al_2O_3 образуется азометиновая связь $N=CH$ (1634 см^{-1}); 2) с модифицированной хитозаном поверхностью Fe_3O_4 образуется пептидная связь $CO-NH$ (1559 см^{-1}). Вследствие чего, биокатализаторы приобретают высокую стабильность.
4. Получено оптимальное соотношение состава биокаталитических систем на основе пероксидазы, иммобилизованной на традиционные носители SiO_2 , Al_2O_3 , а также на магнитные наночастицы Fe_3O_4 . Оптимальная концентрация компонентов биокатализатора на основе пероксидазы, иммобилизованной на поверхности SiO_2 : 0.25 г/л раствора ПСС; 0.15 г/л раствора хитозана; 0.2 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл пероксидазы. Оптимальная концентрация компонентов биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на поверхности Al_2O_3 : 0.5 г/л раствора ПСС; 0.2 г/л раствора хитозана; 0.3 г/л раствора глутарового диальдегида и 0.15 мг/мл пероксидазы. Оптимальная концентрация компонентов биокатализатора на основе пероксидазы иммобилизованной на Fe_3O_4 : 2 мкл/мл АПТС, 0.15 мг/мл пероксидазы.

5. Доказано, что биокатализатор имеет мезопористую структуру, что способствует лучшему закреплению фермента на носителе.
6. Впервые проведено биокаталитическое окисление 2,3,6-триметилфенола. Экспериментально подобраны оптимальные условия процесса окисления 2,3,6-триметилфенола в присутствии иммобилизованной пероксидазы: температура 40 °С, рН 6.5, концентрация 2,3,6-триметилфенола 1.5 ммоль/л.
7. Исследована кинетика биокаталитической реакции с участием пероксида водорода при различных концентрациях 2,3,6-триметилфенола. Найдены параметры уравнения Михаэлиса – Ментен. Для HRP, иммобилизованной на магнитные наночастицы: $K_m = 2.81$ ммоль/л, $V_{max} = 0.043$ ммоль/л·мин. Для HRP, иммобилизованной на SiO₂: $K_m = 5.02$ ммоль/л, $V_{max} = 0.009$ ммоль/л·мин. Для HRP, иммобилизованной на Al₂O₃: $K_m = 9.19$ ммоль/л, $V_{max} = 0.009$ ммоль/л·мин.
8. Предложена гипотеза механизма протекания реакции в присутствии иммобилизованной на неорганические носители пероксидазы.

СПИСОК ОСНОВНЫХ ОПУБЛИКОВАННЫХ РАБОТ

1. Matveeva O. Biocatalytic Oxidation of 2,3,6-Trimethylphenol Over Immobilized Horseradish Peroxidase in Nonaqueous Media / O. Matveeva, N. Lakina, V. Matveeva, M. Sulman, E. Sulman, P. Valetsky, V. Doluda // Topics in Catalysis. - 2011. - Vol. 54. - pp. 1309-1317.
2. Биокаталитический способ получения триметилгидрохинона/ Лакина Н.В., Долуда В.Ю., Матвеева О.В., Сульман Э.М., Матвеева В.Г.// Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. –2011. – Т. 54. - № 3. – С. 78-81.
3. Матвеева О.В. Биокаталитическое окисление триметилфенола до полупродукта витамина Е/ О.В. Матвеева, Н.В. Лакина, Э.М. Сульман, В.Г. Матвеева, В.Ю. Долуда // Вестник ТвГУ. Серия «Химия». – 2011. – С. 125-130.
4. Матвеева О.В. Современные тенденции применения оксидоредуктаз в промышленности /О.В. Матвеева, Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, Э.М. Сульман // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология. – 2013. – Т. 56. – № 11. – С. 13-18.

5. Матвеева О.В. Исследование применения ферментмагнитных наночастиц в тонком органическом синтезе / О.В. Матвеева, Н.В. Лакина, Ю.Ю. Косивцов, В.Г. Матвеева, Е.И. Шиманская, Л.М. Бронштейн // Вестник ТвГУ. Серия «Химия». – 2013.– вып. 15. – № 14. – С. 132-139.
6. Матвеева О.В. Преимущества использования магнитных наночастиц для иммобилизации пероксидазы в синтезе полупродукта витамина Е / Матвеева О.В., Лакина Н.В., Долуда В.Ю., Сульман Э.М. // Известия высших учебных заведений. Серия: Химия и химическая технология.– 2014. – Т. 57. - № 6.– С. 15-18.
7. Матвеева О.В. Влияние способа иммобилизации пероксидазы на активность биокатализатора в процессе окисления триметилфенола / О.В. Матвеева, Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, И.П. Шкилева, В.Г. Матвеева, Э.М. Сульман//Катализ в промышленности. 2015. № 1. С. 71 – 79.
8. Матвеева О.В. Изучение иммобилизованной пероксидазы на оксиде алюминия в реакции окисления 2,3,6-триметилфенола/ О.В. Матвеева, С.В. Щенников // XVII Региональные Каргинские чтения. Областная научно-техническая конференция молодых ученых "Физика, химия и новые технологии", Тверь. – 2010. – С. 57.
9. Матвеева О.В. Способы получения триметилгидрохинона/ О.В. Матвеева// Материалы докладов XV Международной молодежной научной конференции «Ломоносов», Москва, 12-15 апреля. – 2010.
10. Матвеева О.В. Применение биокатализаторов для окисления ароматических соединений /Матвеева О.В., Лакина Н.В.// Материалы научно-практической конференции с международным участием «Нанотехнологии: научные изыскания, патентно-лицензионная деятельность, использование в практике и учебном процессе», Тверь: ТГТУ, 18 июня. – 2010. – С. 17-18.
11. Матвеева О.В. Биокаталитическое получение витамина Е / О.В. Матвеева, В.Ю. Долуда, Н.В. Лакина, Э.М. Сульман// Сборник тезисов Российского конгресса по катализу «РОСКАТАЛИЗ», Москва, 3-7 октября. - 2011. – В 2 т. – Т. 2 – С. 264
12. Novel catalyst on a basis of immobilized horseradish peroxidase for biology active substances synthesis/ V. Doluda, N. Lakina, V. Matveeva, O. Matveeva, E. Sulman// Abstracts of 15th International Congress on Catalysis (15th ICC), Munich, Germany, July 1-6. – 2012.

13. Матвеева О.В. Способ окисления триметилфенола и метилнафтола пероксидом водорода с использованием иммобилизованной пероксидазы корня хрена / О.В. Матвеева, В.Ю. Долуда, Н.В. Лакина, Э.М. Сульман// Тезисы докладов XIV Международной научно-технической конференции «Наукоемкие химические технологии-2012», Тула-Ясная Поляна-Куликово Поле, 21-25 мая. – 2012. – С. 221.
14. Матвеева О.В. Актуальность применения биокатализаторов в промышленности/ О.В. Матвеева, Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда //Сборник трудов межрегиональной научно-технической конференции «Интеграция науки и образования – производству, экономике», Тверь: ТвГТУ. – 2012. – С. 38
15. Enzymatic oxidation of phenols by immobilized oxidoreductases /M.G. Sulman, O.V. Matveeva, A.I. Sidorov, B.B. Tikhonov, N.V. Lakina, E.M. Sulman// Abstracts of 9th European Congress of Chemical Engineering (ECCE9) and the 2nd European Conference of Applied Biotechnology (ECAB2), Hague, the Netherlands, April 21-25. – 2013.
16. Biocatalytic oxidation of trimethylphenol as alternative method for vitamin E synthesis/ E.M. Sulman, O.V. Matveeva, N.V. Lakina, V. Yu. Doluda// Abstracts of International Conference Biocatalysis-2013: Fundamentals & application, Moscow, July 2-5. – 2013. - P. 92
17. Biocatalysis on a basis of immobilized oxidoreductases for fine organic synthesis and solution of environmental issues/ E. Sulman, O. Matveeva, B. Tikhonov, N. Lakina, A. Sidorov // Proceedings of 21st Annual International Conference on Composites/Nano Engineering (ICCE-21), Tenerife, Canary Islands, Spain, July 21-27. – 2013.
18. Immobilized oxidoreductases for selective oxidation and hydrogenation of organic compounds/ V.G. Matveeva, A.I. Sidorov, B.B. Tikhonov, N.V. Lakina, O.V. Matveeva, V. Yu. Doluda, E.M. Sulman// Abstracts of 16th International Symposium on Relations between Homogeneous and Heterogeneous Catalysis (ISHHC-16), Hokkaido University, Sapporo, Japan, August 4-9. – 2013 - P. 111
19. Application of immobilized horseradish peroxidase for production of intermediate of vitamin E/ O. Matveeva, V. Doluda, N. Lakina, E. Sulman // Abstracts of Europacat XI, Lyon, France, September 1-6 – 2013.
20. Oxidation of 2,3,6-trimethylphenol and 2-methylnaphthalene to obtain different vitamin precursors/ Sulman E., Shimanskaya E., Matveeva O., Doluda V. // The 25th Conference

of the Organic Reactions Catalysis Society: book of abstracts, Tucson, AZ, USA, March 2-6. – 2014. – P. 90

21. Magnetic-separable oxidoreductases as new concept in enzymatic oxidation/ Matveeva O.V., Lakina N.V., Doluda V.Yu., Sulman E.M.// Proceedings of ICCE-22 – Twenty Second Annual International Conference on Composites/Nano Engineering, Saint Julian's, Malta, July 13-19. – 2014.
22. The study of application of peroxidase immobilized of magnetic nanoparticles / O.V. Matveeva, N.V. Lakina, V.Yu. Doluda, E.M. Sulman // XV International Scientific Conference “High-Tech in Chemical Engineering – 2014”: book of abstracts, Zvenigorod, Russia, September 22-26. - 2014. – P. 158.
23. Biocatalytic oxidation of 2,3,6- trimethylphenol/ O.V. Matveeva, N.V. Lakina, V.Y. Doluda, E.M. Sulman, M.G. Sulman//21st International Congress of Chemical and Process Engineering (CHISA 2014) and 17th Conference on Process Integration, Modelling and Optimisation for Energy Saving and Pollution Reduction (PRES 2014): proceedings, Prague, Czech Republic, August 23-27. – 2014.
24. Матвеева О.В. Перспективное применение биокатализатора на основе магнитных наночастиц в синтезе триметилгидрохинона / О.В. Матвеева, Н.В. Лакина, В.Ю. Долуда, Э.М. Сульман // 6-ая Международная конференция Российского химического общества имени Д.И. Менделеева «Химическая технология и биотехнология новых материалов и продуктов», Москва, 23 октября. – 2014. – С. 51